

**BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO**

**VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM**

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Nguyễn Thị Thủy

**TUYỂN CHỌN VÀ PHÂN TÍCH ĐẶC ĐIỂM SINH HỌC
CỦA CÁC CHỦNG VI SINH VẬT CÓ HOẠT TÍNH
KHÁNG BỆNH THÁN THƯ TRÊN CÂY ĐIỀU**

LUẬN VĂN THẠC SĨ NGÀNH SINH HỌC THỰC NGHIỆM

Hà Nội - 2023

**BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO**

**VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM**

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Nguyễn Thị Thủy

**TUYỂN CHỌN VÀ PHÂN TÍCH ĐẶC ĐIỂM SINH HỌC
CỦA CÁC CHỦNG VI SINH VẬT CÓ HOẠT TÍNH
KHÁNG BỆNH THÁN THƯ' TRÊN CÂY ĐIỀU**

LUẬN VĂN THẠC SĨ NGÀNH SINH HỌC THỰC NGHIỆM

Mã số: 8420114

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:

1. PGS.TS. NGUYỄN VIỆT LONG

2. TS. PHAN THỊ THANH HƯƠNG

Two handwritten signatures in blue ink are present. The first signature is above the name 'NGUYỄN VIỆT LONG' and the second is above the name 'PHAN THỊ THANH HƯƠNG'.

Hà Nội – 2023

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đề tài nghiên cứu *“Tuyển chọn và phân tích đặc điểm sinh học của các chủng vi sinh vật có hoạt tính kháng bệnh thán thư trên cây điều”* là công trình nghiên cứu của tôi dựa trên những tài liệu, số liệu do chính tôi tự tìm hiểu và nghiên cứu. Chính vì vậy, các kết quả nghiên cứu đảm bảo trung thực, khách quan nhất và chưa xuất hiện trong bất kì công bố nào khác. Các thông tin, nội dung tham khảo trong luận văn đều được trích dẫn nguồn gốc rõ ràng. Các số liệu, kết quả nêu trong luận văn là trung thực nếu sai tôi hoàn chịu trách nhiệm trước pháp luật.

Tác giả luận văn



Nguyễn Thị Thủy

LỜI CẢM ƠN

Lời đầu tiên, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc và gửi lời chân thành cảm ơn tới hai thầy, cô hướng dẫn là PGS.TS. Nguyễn Việt Long (Học viện Nông nghiệp Việt Nam) và TS. Phan Thị Thanh Hương (Viện Hoá Sinh biển, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam) đã tận tình hướng dẫn, chỉ bảo và luôn có sự phản hồi tỉ mỉ trong suốt thời gian thực hiện luận văn.

Tôi xin cảm ơn Ban lãnh đạo, các cán bộ, chuyên viên tại Khoa Tài nguyên và Môi trường, Học viện Nông nghiệp Việt Nam đã tạo điều kiện thuận lợi, giúp đỡ tôi để tôi hoàn thành nghiên cứu này.

Tôi cũng xin được cảm ơn Trung tâm Đổi mới sáng tạo nông nghiệp, Học viện Nông nghiệp Việt Nam và các thành viên trong đề tài “Nghiên cứu sản xuất điều hữu cơ theo hướng nông nghiệp tuần hoàn”, Mã số: ĐTĐL.CN – 57/22 đã giúp đỡ tôi đạt được những kết quả trong luận văn này.

Bên cạnh đó, tôi xin gửi lời cảm ơn đến ban Lãnh đạo, phòng Đào tạo, các phòng chức năng của Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, đặc biệt là các thầy, cô giảng viên tại Khoa Công nghệ sinh học đã truyền đạt kiến thức trong suốt quá trình tôi học tập bậc cao học này.

Cuối cùng, tôi muốn gửi lời cảm ơn sâu sắc tới gia đình và bạn bè - những người đã luôn khích lệ và ủng hộ tôi hết mình, là chỗ dựa tinh thần vững chắc cho tôi trong suốt quá trình học tập đã qua.

Hà Nội, ngày 28 tháng 11 năm 2023

Học viên



Nguyễn Thị Thủy

MỤC LỤC

MỞ ĐẦU	1
Chương 1. TỔNG QUAN TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU	3
1.1. TÌNH HÌNH SẢN XUẤT VÀ TIÊU THỤ NGÀNH HÀNG ĐIỀU	4
1.1.1. Tình hình sản xuất và tiêu thụ ngành hàng điều trên thế giới.....	4
1.1.2. Tình hình sản xuất và tiêu thụ hạt điều tại Việt Nam	6
1.2. TÌNH HÌNH PHÁT SINH SÂU BỆNH HẠI TRÊN CÂY ĐIỀU.....	9
1.3. TỔNG QUAN BỆNH THÁN THƯ TRÊN CÂY ĐIỀU	10
1.3.1. Giới thiệu bệnh thán thư.....	10
1.3.2. Các biện pháp phòng trị bệnh thán thư	12
1.3.3. Cơ sở khoa học sử dụng biện pháp sinh học trong phòng trị bệnh cho cây trồng	14
1.3.4. Tình hình nghiên cứu về phòng trị bệnh thán thư cho cây điều trên thế giới.....	17
1.4. SỰ CẦN THIẾT CỦA TIẾN HÀNH NGHIÊN CỨU	19
Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	21
2.1. ĐỐI TƯỢNG.....	21
2.1.1. Chủng giống	21
2.1.2. Thời gian và địa điểm nghiên cứu.....	21
2.1.3. Vật liệu, hóa chất và thiết bị	21
2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	22
2.2.1. Phương pháp lấy mẫu để phân lập vi sinh vật	22
2.2.2. Phương pháp phân lập vi sinh vật	22
2.2.3. Phương pháp tuyển chọn VSV	22
2.2.4. Phương pháp phân loại sơ bộ chủng vi sinh vật tuyển chọn.....	24
2.2.5. Phương pháp kiểm tra tính an toàn của chủng VSV trên thực vật.....	24
2.2.6. Phương pháp sản xuất chế phẩm dạng dịch từ VSV tuyển chọn	25
2.2.7. Phương pháp xác định chất lượng chế phẩm	25
2.2.8. Phương pháp đánh giá tiềm năng phòng trị bệnh thán thư trên cây điều.....	25
Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	27
3.1. PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN VI SINH VẬT CÓ KHẢ NĂNG ĐỐI KHÁNG VỚI NẤM GÂY BỆNH THÁN THƯ TRÊN CÂY ĐIỀU	27

3.1.1. Phân lập các chủng VSV từ các mẫu nghiên cứu	27
3.1.2. Khả năng đối kháng nấm gây bệnh thán thư.....	31
3.1.3. Hoạt tính enzyme protease, cellulase, amylase và chitinase của các chủng VSV	34
3.1.4. Khả năng thích ứng nhiệt độ	38
3.1.5. Khả năng thích ứng pH của các chủng vi sinh vật.....	39
3.2. PHÂN LOẠI SƠ BỘ CHŨNG VI SINH VẬT TUYỂN CHỌN	43
3.3. XÂY DỰNG VÀ THỬ NGHIỆM BỘ CHŨNG VI SINH VẬT CÓ KHẢ NĂNG PHÒNG TRỊ BỆNH THÁN THƯ TRÊN CÂY ĐIỀU	45
3.3.1. Kết quả đánh giá chất lượng chế phẩm dạng dịch sau sản xuất	45
3.3.2. Hiệu quả phòng trị bệnh thán thư trên cây điều của VSV tuyển chọn trong điều kiện nhà lưới	46
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....	52
KẾT LUẬN	52
KIẾN NGHỊ	52
DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO	53
PHỤ LỤC	57
Phụ lục 1: Quy trình sản xuất chế phẩm dạng dịch từ VSV tuyển chọn	57
Phụ lục 2: Các loại môi trường sử dụng trong nghiên cứu của Luận văn	57

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ CÁI VIẾT TẮT

Tên viết tắt	Tên đầy đủ
ANOVA	Analysis of Variance
<i>Bt</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>
BVTV	Bảo vệ thực vật
CFU	Colony Forming Units
CPSH	Chế phẩm sinh học
DN	Doanh nghiệp
DNA	Deoxyribonucleic acid
EPA	Cục Bảo vệ môi trường Mỹ (United States Environmental Protection Agency)
EU	Liên minh châu Âu (European Union)
EVFTA	Hiệp định thương mại tự do Liên minh châu Âu-Việt Nam (European-Vietnam Free Trade Agreement)
FAO	Tổ chức Nông Lương Liên Hợp Quốc (Food and Agriculture Organization of the United Nations)
HQGB	Hiệu quả giảm bệnh
IAA	Indole-3-acetic acid
ISO	International Organization for Standardization
LBNT	Lây bệnh nhân tạo
NA	Nutrient Agar
NNHC	Nông nghiệp hữu cơ
NNTH	Nông nghiệp tuần hoàn
PCA	Plate Count Agar
PDA	Potato Dextrose Agar
TCVN	Tiêu chuẩn Việt Nam
TGA	Trypton – Glucose - Agar
VINACAS	Hiệp hội Điều Việt Nam
VKK	Vòng kháng khuẩn
VSV	Vi sinh vật

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 1.1. Diện tích, năng suất, sản lượng điều của một số châu lục trên thế giới	4
Bảng 1.2. Diện tích, năng suất và sản lượng điều của một số quốc gia trên thế giới	5
Bảng 1.3. Diện tích thu hoạch và sản lượng điều tại một số tỉnh thành năm 2017.....	7
Bảng 2.1. Môi trường đánh giá hoạt tính 4 loại enzyme <i>amylase</i> , <i>protease</i> , <i>cellulase</i> , <i>chitinase</i> của vi sinh vật.....	23
Bảng 3.1. Kết quả phân lập một số chủng vi sinh vật	27
Bảng 3.2. Khả năng kháng nấm <i>Colletotrichum</i> spp. của các chủng VSV phân lập.....	32
Bảng 3.3. Hoạt tính enzyme protease, cellulase, amylase và chitinase của các chủng vi sinh vật	34
Bảng 3.4. Khả năng thích ứng nhiệt độ của vi sinh vật.....	38
Bảng 3.5. Khả năng thích ứng pH của các chủng VSV.....	40
Bảng 3.6. Mức độ kháng kháng sinh của các chủng VSV	40
Bảng 3.7. Bảng tổng hợp đặc điểm của 3 chủng VSV tuyển chọn	41
Bảng 3.8. Chất lượng sản xuất chế phẩm	46
Bảng 3.9. Đường kính (mm) vết bệnh trên lá cây điều qua các thời điểm.....	46
Bảng 3.10. Hiệu quả giảm bệnh (%) trên lá điều qua các thời điểm	48

DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ, ĐỒ THỊ

Hình 1.1. Cây điều – Cây đào lộn hột (<i>Anacardium occidentale</i> L.)	3
Đồ thị 1. Diện tích, năng suất và sản lượng điều Việt Nam	7
giai đoạn 1961-2019	7
Hình 1.2. Triệu chứng vết bệnh thán thư trên chồi non (A), chồi hoa (B), quả non (C), lá (D) và quả già (E)	11
Hình 1.3. Phân loại và một số ví dụ của thuốc BVTV sinh học	15
Hình 3.1. Hình thái khuẩn lạc của một số chủng VSV phân lập được	31
Hình 3.2. Khả năng đối kháng nấm <i>Colletotrichum</i> của các chủng Aa1, Bp3, Tc2 phân lập	33
Hình 3.3. Vòng phân giải xenlulose của các chủng vi sinh vật	36
Hình 3.4. Vòng phân giải protein của một số chủng vi sinh vật	36
Hình 3.5. Vòng phân giải chitin của một số chủng vi sinh vật	37
Hình 3.6. Vòng phân giải tinh bột của một số chủng vi sinh vật	37
Hình 3.7. Vi khuẩn phát triển ở các nhiệt độ khác nhau	39
Hình 3.8. Khả năng kháng kháng sinh của các chủng vi sinh vật	41
Hình 3.9. Tính an toàn của chủng vi sinh vật trên lá cây điều	42
Hình 3.10. Hình thái khuẩn lạc và tế bào của chủng Aa1	43
Hình 3.11. Hình thái khuẩn lạc và tế bào của chủng Bp3	44
Hình 3.12. Hình thái khuẩn lạc và tế bào của chủng Tc2	45

MỞ ĐẦU

Cây điều (cây đào lộn hột) có tên khoa học là *Anacardium occidentale* L., thuộc họ thực vật *Anacardiaceae*, bộ *Rutales*, tên thương mại là *Cashew nut tree*, được trồng ở Việt Nam từ những năm đầu thế kỷ XVI [1]. Trên thực tế, hạt điều Việt Nam mới chỉ thực sự phát triển ở những năm cuối thế kỷ XX. Chỉ trong vòng 40 năm (1980 – 2020), ngành điều Việt Nam đã đạt được những thành tựu vô cùng to lớn và trở thành nước xuất khẩu hạt điều thô tốp đầu thế giới. Tuy nhiên, nền kinh tế xoay quanh giá trị ngành điều của Việt Nam mới chỉ dừng lại ở mức độ canh tác và chế biến nhân điều mà chưa đi sâu vào các ngành có giá trị tăng cao như áp dụng sản xuất điều theo hướng hữu cơ hay hữu cơ tuần hoàn.

Ở khâu sản xuất, vướng mắc lớn nhất ảnh hưởng tới năng suất cần được khắc phục là hiện tượng cháy đọt non, khô bông rụng trái do sâu bệnh hại (thán thư, bọ xít muỗi) và thiếu nước tưới gây ra. Trong đó, thán thư là bệnh hại phổ biến và gây ảnh hưởng trực tiếp tới quá trình sinh trưởng, phát triển cũng như năng suất và chất lượng hạt điều. Bệnh thán thư do nấm *Colletotrichum gloeosporioides* gây ra [2]. Loại nấm này có thể gây bệnh cho trên 1000 loài thực vật [3] như cam, quýt, đu đủ, điều, bơ, ca cao, v.v., làm giảm giá trị kinh tế cây trồng và gây thiệt hại nặng nề cho người nông dân. Bệnh phát sinh và phát triển trong điều kiện độ ẩm cao, sương mù nhiều. Đặc biệt, bệnh thường phát triển mạnh trong giai đoạn cây điều đâm lộc, ra nụ hoa quả non, lại gặp điều kiện thời tiết phù hợp. Để phòng trừ bệnh thán thư, sử dụng các chế phẩm sinh học hay chế phẩm chứa vi sinh vật đối kháng được nhiều nhà khoa học trên thế giới quan tâm nghiên cứu bởi hiệu quả phòng trừ cao và thân thiện với môi trường. Tuy nhiên, ở Việt Nam còn ít chế phẩm vi sinh chuyên dùng và sử dụng, đặc biệt là chế phẩm để phòng chống bệnh thán thư trên cây điều.

Hiện nay, để hạn chế bệnh hại thán thư trên cây điều, người dân thường dùng các loại thuốc BVTV và điều này gây ô nhiễm môi trường, ảnh hưởng đến sức khỏe con người. Bên cạnh đó, việc sử dụng không đúng cách và không đúng chủng loại các loại thuốc bảo vệ thực vật gây tồn dư vượt ngưỡng cho phép các hợp chất hoá học, ảnh hưởng trực tiếp tới hình thức, chất lượng, và khả năng xuất khẩu mặt hàng này tới các thị trường lớn như EU, Mỹ, hay Nhật Bản.

Đề tăng giá trị của ngành hàng điều, đồng thời đảm bảo sản xuất bền vững, tăng tính cạnh tranh trên thị trường quốc tế, xu hướng tất yếu là sản xuất hữu cơ. Vì vậy, các biện pháp kiểm soát sinh học đang được sử dụng rộng rãi tại Việt Nam và trên thế giới để hướng tới nền nông nghiệp sạch và an toàn.

Dựa trên xu hướng phát triển nông nghiệp và thực trạng sản xuất ngành hàng điều của Việt Nam, có thể nhận thấy rằng việc tìm ra giải pháp kỹ thuật giúp phòng trị bệnh thán thư trên cây điều, góp phần nâng cao năng suất và chất lượng hạt điều là hết sức cần thiết. Để tạo tiền đề cho giải pháp kỹ thuật nêu trên, đề tài hướng tới mục tiêu sàng lọc được các chủng vi sinh vật có hoạt tính kháng bệnh thán thư trên cây điều, phục vụ sản xuất chế phẩm sinh học để phòng trị bệnh thán thư ứng dụng trong sản xuất điều hữu cơ tại Việt Nam. Xuất phát từ tình hình thực tiễn và sự cần thiết của nghiên cứu, chúng tôi tiến hành đề tài: ***“Tuyển chọn và phân tích đặc điểm sinh học của các chủng vi sinh vật có hoạt tính kháng bệnh thán thư trên cây điều”***.

Mục tiêu của Luận văn:

Tuyển chọn được các chủng vi sinh vật có hoạt tính kháng bệnh thán thư trên cây điều phục vụ sản xuất chế phẩm sinh học có tác dụng phòng trị bệnh thán thư trên cây điều.

Nội dung nghiên cứu:

- 1) Phân lập và tuyển chọn vi sinh vật có khả năng đối kháng với nấm gây bệnh thán thư trên cây điều.
- 2) Phân loại sơ bộ chủng vi sinh vật tuyển chọn.
- 3) Xây dựng bộ chủng vi sinh vật có khả năng phòng trừ bệnh thán thư trên cây điều.

Chương 1. TỔNG QUAN TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU

Nông nghiệp hữu cơ (NNHC) là hướng sản xuất nông nghiệp nhằm duy trì sức khỏe của đất, hệ sinh thái và con người theo một hệ thống. Cụ thể, NNTH dựa vào chủ yếu các tiến trình sinh thái, sự đa dạng sinh học và các chu trình thích nghi với điều kiện địa phương hơn là sử dụng các yếu tố đầu vào mang theo những ảnh hưởng bất lợi. Việc kết hợp các tiến bộ khoa học kỹ thuật với các phương pháp canh tác truyền thống trong sản xuất nông nghiệp hữu cơ giúp mang lại lợi ích cho môi trường nói chung, đồng thời thúc đẩy mối quan hệ bình đẳng và nâng cao chất lượng cuộc sống cho các thành phần tham gia vào nông nghiệp hữu cơ [4].

Hiện nay, trên thế giới có rất nhiều nước đã và đang thực hiện phương thức canh tác hữu cơ. Do đó, định hướng phát triển nông nghiệp theo hướng nông nghiệp hữu cơ là cần thiết và tất yếu đối với nước thuần nông như Việt Nam.

Cây điều tại Việt Nam chủ yếu được phân bố tại các khu vực Đông Nam Bộ, Tây Nguyên, Duyên hải Nam Trung Bộ và một số vùng khu vực đồng bằng Sông Cửu Long [5].



Hình 1.1. Cây điều – Cây đào lộn hột (*Anacardium occidentale* L.)

Chụp bởi: Nguyễn Thị Thủy tại vườn điều tỉnh Bình Phước, ngày 28/04/2023

Ở nước ta, cây điều có khả năng sinh trưởng từ vĩ độ 25° Bắc - 25° Nam. Tuy nhiên, vùng trồng điều lại tập trung chủ yếu từ vĩ độ 15° Bắc - 15° Nam. Độ cao thích hợp nhất cho cây điều sinh trưởng và phát triển là dưới 600m so với mặt nước biển. Ngưỡng nhiệt độ thích hợp nhất để cây điều sinh sống

trung bình khoảng 27°C, lượng mưa dao động hàng năm từ 400-5000 mm, thích hợp nhất là khoảng 1000-2000 mm. Ở Việt Nam, điều được trồng khắp nơi trên cả nước nhưng cho sản lượng tốt nhất là các vùng Đông Nam Bộ và Tây Nguyên với điều kiện tự nhiên, đặc điểm khí hậu và thổ nhưỡng rất phù hợp cho sự sinh trưởng và phát triển của cây điều.

Cây điều là cây trồng lâu năm và sản xuất gắn với tự nhiên, hiện nay Việt Nam chưa có quy trình sản xuất điều hữu cơ được công bố. Tuy nhiên do nhu cầu lớn của thị trường cũng như hiệu quả kinh tế và tính bền vững của sản xuất hữu cơ mang lại, các doanh nghiệp sản xuất chế biến điều đã chủ động chuyển đổi và mời các tổ chức đánh giá để được công nhận vùng sản xuất hữu cơ. Đối với các doanh nghiệp chủ động chuyển đổi sang sản xuất điều hữu cơ, một trong những khó khăn của việc chuyển đổi từ sản xuất thâm canh (sử dụng phân bón và thuốc phòng trừ sâu bệnh hoá học) sang hệ phương thức sản xuất hữu cơ, thay thế phân bón và thuốc trừ sâu hoá học bằng phân bón hữu cơ và các biện pháp kiểm soát sinh học.

1.1. TÌNH HÌNH SẢN XUẤT VÀ TIÊU THỤ NGÀNH HÀNG ĐIỀU

1.1.1. Tình hình sản xuất và tiêu thụ ngành hàng điều trên thế giới

Theo thống kê của Tổ chức Nông lương Liên hợp quốc (FAO), năm 2019 toàn thế giới có 7.091.275 ha điều tập trung tại Châu Phi (66,3%) và Châu Á (27,4%). Tây Phi là khu vực trồng điều lớn nhất thế giới (46,2%), tiếp đến là Đông Phi (20,1%), Nam Á (15,8%), Đông Nam Á (11,6%), Nam Mỹ (6,2%), các khu vực còn lại không trồng hoặc diện tích trồng không đáng kể. Sản lượng hạt điều đạt 3.960.680 tấn, trong đó Châu Phi chiếm 58,9% và Châu Á chiếm 37,2%.

Bảng 1.1. Diện tích, năng suất, sản lượng điều của một số châu lục trên thế giới

Quốc gia	Diện tích (ha)	Sản lượng (tấn)	Năng suất (tấn/ha)
Châu Phi	4.704.272	2.334.405	0,50
Đông Phi	1.424.867	635.805	0,45
Trung Phi	2.646	2.183	0,83
Tây Phi	3.276.759	1.696.417	0,52

Châu Mỹ	441.831	151.413	0,34
Trung Mỹ	3.542	6.185	1,75
Caribbe	9.607	663	0,07
Nam Mỹ	428.682	144.565	0,34
Châu Á	1.945.172	1.474.862	0,76
Đông Á	111	149	1,34
Nam Á	1.121.758	778.051	0,69
Đông Nam Á	823.303	696.662	0,85
Thế giới	7.091.275	3.960.680	0,56

Nguồn: FAO (2019)

Trên thế giới có khoảng 35 nước trồng điều, trong đó Bờ Biển Ngà (27,0%), Ấn Độ (15,6%) và Cộng hòa Tanzania (13,8%) có diện tích trồng lớn nhất. Năng suất điều trung bình thế giới khá thấp, trung bình 0,56 tấn/ha. Do nhiều nguyên nhân (đất nghèo dinh dưỡng, không có điều kiện đầu tư thâm canh, trình độ canh tác lạc hậu...) năng suất điều của các quốc gia như Tanzania, Indonesia, Cộng hòa Bénanh (Benin), Bờ Biển Ngà năng suất điều đạt dưới trung bình của thế giới. Ngược lại, tại các quốc gia có điều kiện thuận lợi và đầu tư thâm canh, năng suất điều có thể đạt rất cao như Philipin (8,45 tấn/ha), Mali (4,19 tấn/ha), Peru (3,33 tấn/ha), Mexico (2,66 tấn/ha)...

Bảng 1.2. Diện tích, năng suất và sản lượng điều của một số quốc gia trên thế giới

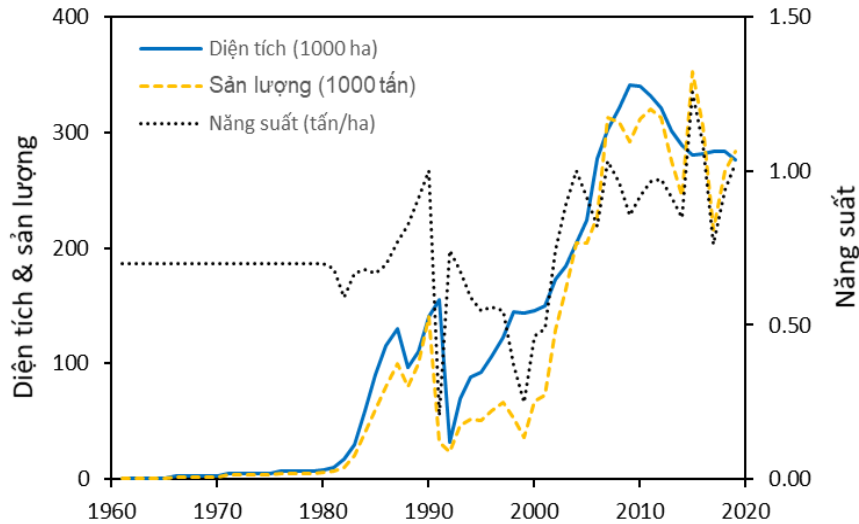
Quốc gia	Diện tích (ha)	Sản lượng (tấn)	Năng suất (tấn/ha)
Bờ Biển Ngà	1.913.073	792.678	0,41
Ấn Độ	1.105.000	743.000	0,67
Tanzania	980.363	225.106	0,23
Benin	573.204	204.302	0,36
Indonesia	496.331	134.183	0,27
Brazil	426.417	138.754	0,33
Guinea-Bissau	279.610	166.190	0,59
Việt Nam	276.365	283.328	1,02
Ghana	161.400	85.962	0,53
Nigeria	140.000	100.000	0,71
Mozambique	130.053	107.147	0,82
Burkina Faso	130.011	136.558	1,05
Philippin	28.686	242.329	8,45

Nguồn: FAO (2019)

Theo Nguyễn Công Thành (2015), thị trường điều hữu cơ toàn cầu đạt trên 5.000 tấn, trong đó khoảng 2.000 - 2.500 tấn tại thị trường Châu Âu, còn lại là thị trường Mỹ. Sản xuất điều tại Châu Á và Châu Phi được coi là “mặc định hữu cơ” do canh tác chủ yếu tự nhiên hoặc không có khả năng đầu tư hóa chất nông nghiệp. Tuy nhiên, gần đây do nguồn cung hạt điều không đủ, nhiều quốc gia khuyến cáo nông dân gia tăng sử dụng hóa chất và phân bón. Điều đó đi ngược với nhu cầu của thị trường đòi hỏi chất lượng hạt điều và điều hữu cơ ngày càng cao. Việc nghiên cứu sản xuất các sản phẩm sinh học như chế phẩm sinh học hay phân hữu cơ và áp dụng các quy trình công nghệ vào canh tác sản xuất điều đang là xu hướng và phát triển mạnh mẽ tại các nước Hà Lan, Pháp, Nhật Bản, Australia...

1.1.2. Tình hình sản xuất và tiêu thụ hạt điều tại Việt Nam

Tại Việt Nam, trước những năm 1980, cây điều chưa được chú trọng phát triển, diện tích trồng điều cả nước ước đạt 7000 ha, năng suất 0,70 tấn/ha và sản lượng 7000 tấn. Những năm 1980, cây điều được trú trọng phát triển, diện tích không ngừng tăng đạt 155 nghìn ha vào năm 1991, sau đó sụt giảm nghiêm trọng trước khi tăng trở lại vào năm 1984. Từ đó, diện tích trồng điều tiếp tục tăng mạnh đạt cao nhất vào năm 2012 (>320 nghìn ha), nhưng sau đó giảm mạnh và ổn định vào những năm gần đây (xung quanh 280 nghìn ha). Năng suất điều cũng có nhiều biến động từ 0,70 tấn/ha cuối những năm 1970, tăng lên >1,0 tấn/ha vào năm 1991, rồi đột ngột giảm vào năm 1992. Giai đoạn 1993-1999 chứng kiến diễn biến ngược chiều giữa năng suất và diện tích trồng điều. Năm 1993 năng suất điều tăng trở lại đạt 0,74 tấn/ha, nhưng giảm mạnh cho tới những năm cuối thập niên 90 (chỉ còn 0,2 tấn/ha). Giai đoạn những năm 2000-2012 đánh dấu thời kỳ tăng trưởng nhanh cả về diện tích, năng suất và sản lượng điều. Tuy nhiên, sau đó diện tích trồng điều giảm, năng suất điều cũng có những biến động tăng giảm không đều, dẫn đến sản lượng cũng không ổn định. Từ năm 2017 đến nay, năng suất điều có xu hướng tăng, góp phần tăng sản lượng điều lên >280 nghìn tấn (năm 2019).



Đồ thị 1. Diện tích, năng suất và sản lượng điều Việt Nam giai đoạn 1961-2019

Nguồn: FAO, 2019

Cây điều được trồng tại nhiều tỉnh thành tại năm vùng sinh thái chính: Bắc Trung Bộ (Quảng Trị), Duyên hải Nam Trung Bộ, Tây Nguyên, Đông Nam Bộ và Đồng bằng Sông Cửu Long. Trong đó, tập trung chủ yếu tại các tỉnh khu vực Đông Nam Bộ và Tây Nguyên. Bình Phước, Đồng Nai, Lâm Đồng... (Bảng 1.3) là các tỉnh có diện tích trồng và sản lượng điều lớn nhất cả nước [5]. Bình Phước được coi là thủ phủ của cây điều, được đánh giá là nơi có điều ngon nhất thế giới kim ngạch xuất khẩu hạt điều của tỉnh phân đầu đạt 800 triệu USD vào năm 2020, dự kiến đến năm 2025 là 900 triệu USD, đến năm 2030 sẽ đạt 1 tỷ USD (UBND tỉnh Bình Phước, 2020).

Bảng 1.3. Diện tích thu hoạch và sản lượng điều tại một số tỉnh thành năm 2017

Tỉnh thành	Diện tích (ha)	Sản lượng (tấn)
Cả nước	283.800	215.800
Gia Lai	16.480	13.562
Đắk Lắk	18.525	20.394
Đắk Nông	13.728	15.242
Lâm Đồng	23.884	4.436
Bình Định	3.995	2.447
Bình Dương	942	613
Đồng Nai	37.181	31.171
Bình Phước	134.302	132.550

Nguồn: Thống kê các tỉnh, 2018

Theo thống kê của Hiệp hội Điều Việt Nam (VINACAS), Việt Nam bắt đầu xuất khẩu nhân điều vào năm 1990 với khối lượng 286 tấn, đạt giá trị 1,4 triệu USD. Năm 1995, lượng nhân điều xuất khẩu đã tăng lên rất nhanh chóng đạt 15.000 tấn, trị giá 90 triệu USD. Đến năm 2006, Việt Nam vượt qua Ấn Độ vươn lên đứng vị trí số 1 thế giới về xuất khẩu nhân điều, đạt gần 127 nghìn tấn, trị giá 504 triệu USD. Trong 15 năm liền, từ 2006-2020, kể cả trong những thời điểm nhiều khó khăn, ngành điều Việt Nam vẫn luôn giữ vững vị trí số 1 thế giới về xuất khẩu nhân điều.

Năm 2020, theo số liệu thống kê từ Tổng cục Hải quan, mặc dù bị ảnh hưởng nặng nề từ dịch COVID-19 nhưng xuất khẩu hạt điều vẫn đạt gần 515 nghìn tấn, trị giá 3,21 tỷ USD, tăng 13% về lượng, nhưng giảm 2,3% về trị giá so với năm 2019. Theo VINACAS, trong 30 năm từ năm 1990 đến hết năm 2020, ngành điều đã xuất khẩu trên 4,6 triệu tấn nhân điều, với tổng giá trị đạt hơn 31 tỷ USD. Theo Bộ Công Thương (2021), điều nhân là một trong những mặt hàng nông sản xuất khẩu chủ lực của Việt Nam với sản lượng xuất khẩu đạt 515 nghìn tấn và kim ngạch xuất khẩu đạt 3,21 tỷ USD vào các thị trường như Trung Quốc, Mỹ, Hà Lan, vượt qua gạo, hồ tiêu, cà phê, cao su... Tuy nhiên, nguyên liệu cho ngành chế biến điều của nước ta vẫn dựa nhiều vào nhập khẩu từ Bờ Biển Ngà, Nigeria, Nam Phi, v.v. với kim ngạch trong năm 2020 là 1,81 tỷ USD. Với sự thiếu chủ động về mặt nguyên liệu, những sản phẩm điều xuất khẩu rất khó để đảm bảo được về mặt chất lượng (Ngân hàng Thế giới, 2016), nhất là với thị trường phương Tây. Cũng theo Bộ Công thương (2021), giá điều nhân xuất khẩu của Việt Nam giảm mạnh từ 7.200 USD/tấn xuống còn 6.200 USD/tấn.

Để tận dụng được cơ hội khi tham gia vào Hiệp định EVFTA, yêu cầu trong việc tăng sản lượng điều nhân nói chung và điều hữu cơ nói riêng của Việt Nam ngày càng cấp bách nhưng tương đối thách thức khi diện tích trồng điều trong nước ngày càng giảm do lợi nhuận thấp. Do đó, theo Quyết định 579/QĐ-BNN-TT 2015 của Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn năm 2015 phê duyệt quy hoạch phát triển ngành điều, định hướng đến năm 2020, tầm nhìn năm 2030, ngành điều của Việt Nam cần phải tập trung vào chế biến sâu, sản xuất thêm các sản phẩm khác từ cây điều như dầu điều, nước ép quả,

ván ép, v.v. Chính vì vậy, việc nghiên cứu xây dựng quy trình sản xuất các sản phẩm hữu cơ như chế phẩm sinh học, phân hữu cơ phục vụ canh tác và phòng trừ sâu bệnh hại là hướng đi đáp ứng nhu cầu của Việt nam và theo xu hướng của thế giới.

1.2. TÌNH HÌNH PHÁT SINH SÂU BỆNH HẠI TRÊN CÂY ĐIỀU

Trên toàn thế giới, có 10 loại bệnh hại chính được báo cáo gây ảnh hưởng đến khả năng sinh trưởng, phát triển và năng suất của cây điều, trong đó bệnh thán thư (*Colletotrichum gloeosporioides*), bệnh phấn trắng (*Oidium anacardii*), bệnh thối quả (*C. gloeosporioides*), bệnh xỉ mù quả và thân (*Lasiodiplodia theobromae*) là những bệnh phổ biến nhất gây thiệt hại đáng kể cho cây điều [6]. Ngoài ra, một số quốc gia ở Châu Phi đã báo cáo các bệnh khác gây hại trên cây điều như bệnh phấn trắng, bệnh gỉ sắt, bệnh đốm lá do vi khuẩn, v.v. [7].

Một số tác giả trên thế giới như Kristain Davis [8], Azam-Ali & Jugde [9] Surendra [10], Magboo [11], v.v. đều cho rằng bọ xít muỗi là sâu bệnh chính hại điều, là tác nhân để cho bệnh thán thư xâm nhập gây bệnh hại cho điều; ngoài ra còn một số loại sâu bệnh khác như sâu phồng lá, bọ phấn đầu dài, sâu đục thân, bệnh tàn lụi hoa... và nêu ra một số biện pháp phòng trừ. Ngoài ra, một số tác giả còn nghiên cứu một số loại côn trùng có ích là thiên địch của bọ xít muỗi; loại kiến xanh, ong tấn công rệp sáp và còn thụ phấn cho hoa điều.

Song song với các công trình nghiên cứu tuyển chọn giống điều, nghiên cứu điều tra phát hiện, quản lý và phòng trừ sâu bệnh hại điều cũng được tiến hành tại Việt Nam. Một số tác giả như Phạm Văn Biên & Nguyễn Thanh Bình [12], Lê Xuân Phương [13], Lương Anh Tuấn [14], Nguyễn Xuân Thành [15], Nguyễn Thị Sương [16], Nguyễn Văn Ngân [17], Nguyễn Thanh Phương [18] đã tiến hành điều tra xác định thành phần sâu, bệnh hại trên cây điều tại các tỉnh phía nam như Tây Nguyên, Đông Nam Bộ, Duyên hải Nam Trung Bộ,... xác định > 40 loài sâu hại và > 15 bệnh hại cây điều. Các kết quả nghiên cứu cũng xác định các loại thuốc hóa học hiệu quả trong phòng trừ các nhóm sâu, bệnh phổ biến trên cây điều [15, 16, 18, 19], nghiên cứu sử dụng kết hợp các loại thuốc phòng trừ sâu bệnh kết luận sử dụng kết hợp Sherpa với Ridomil hoặc Bavistin cho hiệu quả phòng trừ sâu bệnh tốt nhất. Ngoài ra, đã xác định

được thành phần sâu bệnh hại trên điều tại vùng Duyên hải Nam Trung Bộ, Tây Nguyên, tỉnh Quảng Nam, Quảng Ngãi, Bình Định và đã đề ra một số biện pháp phòng trừ. Sâu bệnh hại chính là bọ xít muỗi, sâu đục nõn, sâu phồng lá, thán thư, khô hoa, khô đọt... [17, 19, 20, 21].

Trong số các sâu bệnh hại kể trên, thán thư là bệnh hại được các nhà nghiên cứu đặc biệt quan tâm bởi đây là loại bệnh thường gặp trên cây điều, có thể gây hại trên các bộ phận từ lá, cành, chồi non, quả non,... gây ảnh hưởng nặng tới năng suất và chất lượng điều. Bọ xít muỗi được coi là một trong những véc tơ truyền bệnh bởi khi chúng chích hút thường gây ra các vết thương hở, mầm bệnh thán thư từ những cây bị bệnh sẽ được bọ xít muỗi truyền đi khiến bệnh nhanh chóng lây lan. Chính vì vậy mà khi vườn điều xuất hiện bọ xít muỗi thì thường đi kèm với bệnh thán thư [22]. Hiện nay, cách phòng và trị bệnh thán thư mới chỉ dừng lại ở việc sử dụng các loại thuốc tác dụng tiếp xúc, chủ yếu phòng bệnh và hạn chế nguồn lây lan như thuốc gốc Đồng, Mancozeb, Propineb... hay các thuốc có khả năng hội hấp, hạn chế sự phát triển của nấm bệnh trong cây như các chất Difenocanazole, Tebuconazole, Azoxystrobin... cho một số cây trồng nói chung [22], mà chưa có loại chế phẩm sinh học nào có tác dụng phòng trị bệnh thán thư hiệu quả trên cây điều, góp phần đảm bảo năng suất và chất lượng thu hoạch cho canh tác điều, đặc biệt là trong phát triển cây điều hữu cơ.

1.3. TỔNG QUAN BỆNH THÁN THƯ TRÊN CÂY ĐIỀU

1.3.1. Giới thiệu bệnh thán thư

Thán thư là một loại bệnh hại phổ biến và thường gặp trên cây điều và là một trong những nguyên nhân dẫn đến giảm năng suất và chất lượng điều. Bệnh thán thư do nấm *Colletotrichum gloeosporioides* gây ra [2]. Nấm gây hại chủ yếu trên chồi, lá, cành non (giai đoạn ra lá), trên hoa và quả (giai đoạn ra hoa, tạo quả). Nấm phát triển nhanh trong điều kiện môi trường ẩm ướt, đặc biệt là điều kiện nóng ẩm (sau mưa hoặc trời lạnh, nhiều sương). Khi các bộ phận của cây (thân lá, quả già, chồi non, v.v.) rơi xuống đất và gặp điều kiện thích hợp thì đây được coi là nguồn lây nhiễm.

Tại các vườn điều không được chăm sóc hoặc chăm sóc không đúng cách như sử dụng lượng phân bón không cân đối, dư thừa đạm, không tỉa

cảnh tạo tán khiến tán lá rậm rạp, làm tăng độ ẩm của vườn và làm thiếu không gian đón nắng cho cây cũng là một trong những điều kiện phát sinh phát triển bệnh thán thư trên cây điều. Ngoài ra, tại các vườn điều có mật độ bọ xít muỗi cao cũng cho thấy tỉ lệ bị bệnh thán thư cao hơn [22], hoặc vườn không phun thuốc phòng trừ bệnh kịp thời vào những thời điểm quan trọng của cây thì bệnh cũng phát triển, gây hại nặng hơn.



Hình 1.2. Triệu chứng vết bệnh thán thư trên chồi non (A), chồi hoa (B), quả non (C), lá (D) và quả già (E)

Nguồn: <https://www.hoptri.com>

Triệu chứng vết bệnh thán thư biểu hiện rõ trên lá, đặc biệt là các lá non, ban đầu xuất hiện các đốm nhỏ li ti màu nâu, sau lớn dần thành các đốm tròn hoặc góc cạnh có tâm xám nâu, viền vàng nhạt. Trên lá già, vết bệnh cháy khô và rách giữa. Trường hợp bệnh nặng hơn thì sau khoảng 3 - 5 ngày, các đốm bệnh xuất hiện thành từng mảng lớn dẫn đến các lá nhăn nheo, vắn xoắn, khô, rách dần và rụng xuống. Trên các cành non nhiễm bệnh, xuất hiện các đốm bệnh không đều. Trường hợp nhiễm nặng hơn sẽ gây chết đọt non do các đốm bệnh liên kết lại bao quanh chúng. Trên hoa: mầm, cuống và cả chùm hoa là nơi nấm có thể gây bệnh (biểu hiện là hoa khô đen và rụng). Quả điều có thể bị nhiễm bệnh từ thời điểm bắt đầu ra quả cho đến khi chín. Nếu bệnh xảy ra ngay giai đoạn tạo quả có thể khiến quả rụng. Biểu hiện bệnh điển hình là trên bề mặt quả bắt đầu xuất hiện các đốm tròn, đen, lõm rồi lớn dần gây hư hỏng. Lưu ý rằng hình dạng và kích thước đốm bệnh không cố định.

1.3.2. Các biện pháp phòng trị bệnh thán thư

Tại các vùng trồng điều, bệnh hại thán thư có khả năng bùng phát thành dịch rất cao nếu không có các biện pháp can thiệp và phòng trị kịp thời. Các biện pháp phổ biến được địa phương khuyến cáo người nông dân áp dụng có thể kể đến như biện pháp canh tác, biện pháp sinh học và biện pháp hóa học. Các biện pháp này được coi là khá phổ biến đối với các loại cây trồng nói chung và mỗi biện pháp đều có những ưu, nhược điểm riêng biệt.

Biện pháp canh tác

Mật độ trồng hợp lý: Mật độ trồng vừa phải, đảm bảo vườn thông thoáng (đón nắng tốt, độ ẩm đủ) để cho cây phát triển.

Tỉa cành, tạo tán: Tiến hành định kì 1 lần/năm để cây có không gian đón nắng tốt, giảm thiểu sâu bệnh hại (bọ xít muỗi, sâu phồng lá, thán thư, khô hoa, khô đọt...), sinh trưởng và phát triển tốt hơn.

Vệ sinh vườn cây: Cần vệ sinh định kỳ (1-2 lần/năm) cỏ vườn, lá rụng. Tiêu hủy tập trung cành lá, chùm bông, quả giả bị bệnh để hạn chế nguồn bệnh lan rộng. Trường hợp bệnh nặng cần vệ sinh vườn trước khi phun thuốc để đảm bảo hiệu quả phun tối ưu.

Chăm bón vườn cây: Đảm bảo vườn cây không quá khô hạn vào mùa nắng và ẩm thấp vào mùa mưa, đồng thời cần đảm bảo thời điểm bón phân phù hợp, bón đủ liều lượng các loại phân và cân đối NPK, bổ sung các vi khoáng, vi lượng thích hợp cho từng thời điểm, giai đoạn phát triển của cây. Việc sử dụng loại phân hữu cơ vi sinh có chứa nấm Trichoderma giúp cải thiện các tính chất lý hóa của đất, tăng sức đề kháng cho cây, hạn chế được sâu bệnh hại và giúp cây phát triển tốt hơn.

Ngoài ra, biện pháp sử dụng giống kháng bệnh cũng đang được nghiên cứu, ứng dụng. Tuy nhiên, biện pháp này đem lại hiệu quả trên rau màu rõ hơn là trên cây ăn quả [23].

Ưu điểm của biện pháp canh tác là dễ áp dụng, hiệu quả lâu dài, không gây ô nhiễm môi trường, an toàn cho sức khỏe của người sản xuất và tiêu dùng. Xong, nhược điểm của biện pháp này là hiệu quả thấp khi bệnh hại đã phát triển mạnh hoặc bùng phát thành dịch.

Biện pháp sinh học

Biện pháp sinh học được coi như một chiến lược áp dụng nhiều giải pháp khác nhau, chẳng hạn như sử dụng thiên địch bắt mồi, thiên địch ký sinh, sử dụng chế phẩm sinh học hay sử dụng thuốc thảo mộc trong quản lý dịch hại [24]. Nhìn chung, biện pháp sinh học hướng đến việc không sử dụng thuốc BVTV, cân bằng với thiên nhiên và hướng đến nền nông nghiệp bền vững.

Trong tự nhiên, loài vật này sẽ là loài thức ăn của loài vật khác. Chính vì vậy, việc nghiên cứu thiên địch của các loài sâu bệnh gây hại cho cây điều rất quan trọng. Các loại sâu hại cây điều như sâu róm, bọ đục cành, xén tóc là thức ăn cho côn trùng thiên địch. Mật độ thiên địch càng lớn thì sâu hại càng nhỏ và ngược lại. Với những vườn điều ít sử dụng thuốc bảo vệ thực vật thì lượng côn trùng có ích sẽ tăng cao. Côn trùng có ích bao gồm: bọ ngựa, bọ rùa, ruồi, bọ mắt vàng, v.v. Thiên địch của bọ xít muỗi như kiến vàng, bọ ngựa, nhện. Thiên địch của bọ cánh cứng đục ngọn là kiến vàng, ong ký sinh. Thiên địch của rầy mềm là bọ rùa, ruồi, bọ mắt vàng. Kiến vàng giúp ngăn sự phát triển của sâu bệnh hại nghiêm trọng như bọ xít muỗi, bọ cánh cứng đục ngọn, v.v. Bệnh thán thư có liên hệ chặt chẽ với bọ xít muỗi. Kiến vàng ăn bọ xít muỗi từ đó giảm thiệt hại của bệnh thán thư [25].

Ngoài ra, một số nghiên cứu đã chỉ ra rằng việc sử dụng chế phẩm sinh học trong việc quản lý dịch hại trên cây điều đạt được những hiệu quả nhất định, chẳng hạn: Chế phẩm *Bt* giúp tiêu diệt bọ cánh phấn, chế phẩm vi sinh *Bacillus penetrans* dùng để trừ tuyến trùng; Chế phẩm *Tricoderma* giúp ngăn chặn tác nhân gây bệnh trong đất như tuyến trùng, nấm. Chính vì vậy mà chúng được đóng gói và lưu hành như những loại thuốc trừ sâu khác [25]. Tuy nhiên, hiện nay chưa có loại CPSH nào có tác dụng phòng trị bệnh thán thư hiệu quả trên cây điều, góp phần đảm bảo năng suất và chất lượng thu hoạch cho canh tác điều, đặc biệt là trong sản xuất, phát triển cây điều hữu cơ theo hướng NNTH.

Áp dụng biện pháp sinh học trong phòng trừ sâu bệnh không chỉ đảm bảo cân bằng sinh thái mà còn thân thiện môi trường, an toàn cho sức khỏe của người sản xuất và tiêu dùng. Tuy nhiên, hiệu quả của việc sử dụng biện

pháp sinh học khá chậm và không có tác dụng dập dịch khi dịch bệnh bùng phát diện rộng.

Biện pháp hóa học

Biện pháp hóa học được sử dụng khi sâu bệnh hại xuất hiện, gây hại trên diện rộng và mất kiểm soát. Trong điều kiện ngoại cảnh thuận lợi, sâu bệnh hại sẽ phát sinh nhanh chóng và khi đó cần dùng thuốc BVTV để trừ bệnh. Hiện nay, trên thị trường có khá nhiều loại thuốc BVTV có khả năng và có hiệu quả với nấm gây bệnh thán thư cho các dòng cây ăn quả. Tuy nhiên, cách phòng và trị bệnh thán thư mới chỉ dừng lại ở việc sử dụng các loại thuốc tác dụng tiếp xúc, chủ yếu phòng bệnh và hạn chế nguồn bệnh lây lan như thuốc gốc đồng, Mancozeb, Propineb, v.v. hay những loại thuốc có khả năng hấp hội, ngăn ngừa sự phát triển của các loại nấm bệnh trong cây như những chất Difenocanazole, Tebuconazole, Azoxystrobin, v.v. cho một số cây trồng nói chung [26].

Để tối ưu khả năng trừ bệnh của thuốc, cần phun thuốc đúng thuốc, đúng thời điểm, đúng liều lượng, nồng độ và đúng cách, đồng thời có thể áp dụng kết hợp các biện pháp khác để hiệu quả cao hơn [25].

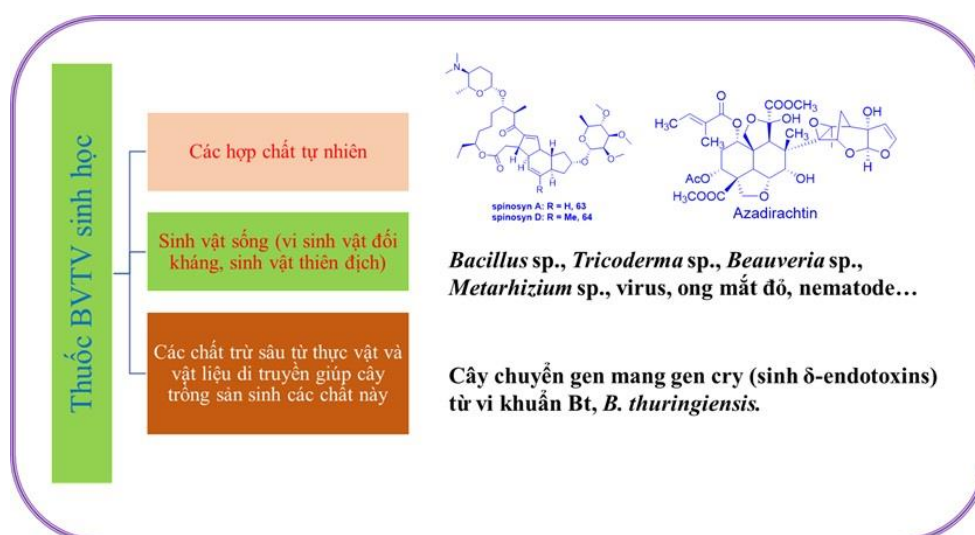
Sử dụng biện pháp hóa học trong quá trình canh tác để phòng trị bệnh thán thư trên cây điều giúp mang lại hiệu quả cao, diệt sâu bệnh nhanh, đồng thời giúp người nông dân tiết kiệm thời gian và công sức. Tuy nhiên, nhược điểm của biện pháp hóa học là gây ô nhiễm môi trường, gây độc cho cây trồng, con người, vật nuôi và làm tiêu diệt các sinh vật có lợi khác. Do vậy, cần hạn chế tối đa việc sử dụng biện pháp hóa học trong canh tác và sản xuất cho cây điều nói riêng và các loại cây trồng nói chung.

1.3.3. Cơ sở khoa học sử dụng biện pháp sinh học trong phòng trị bệnh cho cây trồng

Theo định nghĩa của Cục Bảo vệ môi trường Mỹ (EPA), thuốc BVTV sinh học bao gồm: các hợp chất nguồn gốc tự nhiên; các vi sinh vật và sinh vật sử dụng kiểm soát dịch hại; các chất trừ sâu từ thực vật và vật liệu di truyền giúp cây trồng sản sinh ra các chất này (Hình 1.3). Các hợp chất tự

nhiên sử dụng làm hoạt chất trong BVTV có thể được sinh tổng hợp từ vi sinh vật và thực vật.

Theo EPA, một số các hoạt chất tự nhiên sử dụng trong BVTV truyền thống như abamectin có tác dụng gây độc lên thần kinh côn trùng đã được biết và sử dụng từ lâu, nhưng không được đăng ký vào chủng loại thuốc BVTV sinh học. Một số hoạt chất nguồn gốc tự nhiên như nicotin, pyrethrum, milbemectin có tác dụng độc thần kinh được đăng ký vào chủng loại thuốc BVTV hóa học (chemical pesticides) [27, 28]. Sở dĩ như vậy vì thuốc BVTV sinh học ưu tiên các hoạt chất không độc thần kinh hoặc độc tính thấp hơn.



Hình 1.3. Phân loại và một số ví dụ của thuốc BVTV sinh học

Nguồn: <https://vjst.vn>

Các thuốc BVTV sinh học chủ yếu gồm các hoạt chất nguồn gốc tự nhiên, cao chiết thực vật và sinh khối của vi sinh vật, vi sinh vật và sinh vật đối kháng. Ngoài ra còn có những cây đã được biến đổi gen khiến cây sản xuất thuốc trừ sâu bên trong mô của chính nó (ví dụ, giống ngô biến đổi gen tạo ra protein độc tố của *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) để tự vệ trước sự tấn công của côn trùng). Bên cạnh việc gia tăng sử dụng thuốc BVTV sinh học, nông dân cũng đang sử dụng nhiều công cụ quản lý dịch hại tổng hợp như xen canh, cây che phủ, kiểm soát sinh học và luân canh cây trồng, cùng với các thuốc trừ sâu ít nguy hại [29].

Hiệu quả của các thuốc BVTV sinh học phụ thuộc rất nhiều vào đối tượng dịch hại, cây trồng, điều kiện thời tiết và kỹ thuật sử dụng. Bên cạnh đó, dù ở mức độ nào các thuốc BVTV sinh học đều có tác động đối với môi trường, đặc điểm các thuốc thế hệ mới có phổ tác động rộng có thể gây ảnh hưởng tới nhiều loại thiên địch trên vườn cây [29].

Sử dụng thuốc BVTV sinh học trong việc canh tác cây trồng vừa đem lại hiệu quả trong việc phòng trừ cũng như trị bệnh mà còn thân thiện với môi trường, an toàn với cây trồng, vật nuôi và con người. Các thuốc BVTV sinh học được nghiên cứu dựa trên: khả năng đối kháng giữa các chủng VSV, khả năng sinh ra các bào tử tinh thể độc, khả năng cạnh tranh dinh dưỡng, bên cạnh đó các CPSH sinh ra chất kích thích sinh trưởng cây IAA, khả năng phân hủy chuyển hóa chất hữu cơ, v.v.

Khả năng đối kháng giữa các chủng VSV giúp tìm ra các chủng VSV có hoạt tính sinh học cao, khả năng cạnh tranh dinh dưỡng tốt, có khả năng sinh trưởng và phát triển trong các điều kiện môi trường khác nhau về điều kiện nhiệt độ, pH, mức độ kháng sinh, v.v.

Các thuốc BVTV có nguồn gốc sinh học không chỉ có tác dụng phòng và điều trị bệnh, mà còn có khả năng sinh chất kích thích sinh trưởng IAA. IAA thường được dung như chất điều hòa quá trình sinh học, giúp kích thích kéo dài tế bào bằng cách thay đổi các điều kiện nhất định như tính thấm lọc, tăng tính thấm nước, áp lực thành tế bào và tăng tổng hợp thành tế bào.

Ngoài ra, khả năng sinh tinh thể độc của các chủng VSV là một trong các đặc tính sinh học được quan tâm khi sản xuất thuốc BVTV có nguồn gốc sinh học để tiêu diệt các côn trùng gây hại cho các loại cây trồng. Trong vô vàn chủng VSV có khả năng tiêu diệt sâu hại, *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) là tác nhân sinh học đầu tiên được nghiên cứu và sản xuất thành thuốc trừ sâu vi sinh trên thế giới, đồng thời là sản phẩm nổi tiếng nhất hiện nay. Các chế phẩm sinh học từ *Bt* đã được sử dụng nhiều trong nông nghiệp, mang lại hiệu quả cao [30].

Thuốc BVTV sinh học nguồn gốc vi sinh vật được sử dụng nhiều tại Việt Nam được thấy chủ yếu là các chủng vi khuẩn và vi nấm như: vi khuẩn

trừ sâu *Bt* (*Bacillus thuringiensis*); vi khuẩn trừ bệnh (*Bacillus subtilis*); vi nấm trừ bệnh như *Trichoderma* sp. và *Chetomium* sp. [29]. Tại Việt Nam từ năm 2009-2019 số lượng nghiên cứu ứng dụng các thuốc BVTV sinh học đã tăng đáng kể. Trong đó có khoảng 58% là các nghiên cứu về vi sinh vật đối kháng (*Bacillus substilis*, *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), *Trichoderma* sp.), 18% là các nghiên cứu thuốc BVTV nguồn gốc thảo mộc và chitosan, 15% ứng dụng công nghệ mới để tạo dạng nano cho các thuốc BVTV [31].

1.3.4. Tình hình nghiên cứu về phòng trị bệnh thán thư cho cây điều trên thế giới

Một số tác giả đã nghiên cứu sử dụng thuốc hoá học tổng hợp để phòng trừ nấm gây bệnh thán thư như nhóm thuốc Azoxystrobin, Carbendazim, Prochloraz, Propiconazole Mancozeb, Thirame, Cymoxanil + Mancozeb và Metalaxyl-M +. Trong số các loại thuốc diệt nấm được thử nghiệm, Carbendazim và Prochloraz có hiệu quả hơn đối với sự phát triển của nấm, hạn chế sự nảy mầm của bào tử nấm giúp bảo vệ cây điều [2].

Ramaiana Soares Melo và cs. (2019) đã sử dụng tinh dầu cây hương nhu (*Ocimum gratissimum*) và các chất diệt nấm tổng hợp Azoxystrobin và Carbendazim + Chlorothalonil để phòng bệnh thán thư trên cây điều. Kết quả: Sau 16 ngày ủ ở $30 \pm 2^\circ\text{C}$, sự phát triển xuyên tâm của sợi nấm của *C. gloeosporioides* hoàn toàn bị ức chế từ 1 $\mu\text{L/L}$ bởi Carbendazim, 5 $\mu\text{L/L}$ Carbendazim + Chlorothalonil, và 1500 $\mu\text{L/L}$ bởi tinh dầu của *O. gratissimum*. Nồng độ diệt nấm tối thiểu thu được là 25 $\mu\text{L/L}$ đối với Carbendazim, 100 $\mu\text{L/L}$ đối với Carbendazim + Chlorothalonil và 2000 $\mu\text{L/L}$ đối với *O. gratissimum*. Nghiên cứu cho thấy tinh dầu của *O. gratissimum* đã giảm đáng kể tỷ lệ mắc bệnh thán thư trên lá và mức độ nghiêm trọng của bệnh thán thư, có thể được sử dụng để kiểm soát sinh học đối với mầm bệnh *Colletotrichum gloeosporioides* trên cây điều [32].

Hiện nay, trên thế giới chưa có nhiều nghiên cứu liên quan đến chế phẩm sinh học có nguồn gốc vi sinh vật chuyên dùng trong việc phòng trị bệnh thán thư trên cây điều.

1.3.5. Tình hình nghiên cứu về phòng trị bệnh thán thư cho cây điều tại Việt Nam

Hoàng Vinh và cs. (2017) đã nghiên cứu sử dụng một số loại thuốc dòng sinh học để phòng trừ bệnh hại cây điều. Trong đó, thuốc trừ sâu sinh học Vimatox 1.9EC có khả năng phòng trừ bọ xít muỗi, Thuốc trừ bệnh Lợi Nông 50FL có thể phòng trừ bệnh thán thư thay thế được cho các loại thuốc bảo vệ thực vật hoá học cho vườn điều trong thời kỳ kinh doanh [33].

Phạm Đình Dũng và cs. (2017) đã sử dụng Chế phẩm oligochitosan – nano silica có khối lượng phân tử (Mw) từ 4-6 kDa, hạt nano silica có kích thước từ 20-30 nm được sử dụng để nghiên cứu khả năng kháng nấm *Colletotrichum gloeosporioides* gây bệnh thán thư trên cây ớt (*Capsicum frutescens* L.). Kết quả khảo sát hiệu lực kháng nấm *C. gloeosporioides* trong điều kiện in vitro cho thấy trong khoảng nồng độ bổ sung chế phẩm từ 20 đến 80 ppm đều có tác dụng ức chế sự phát triển của tản nấm tương ứng 15,6 đến 67,2% [34].

Trần Ngọc Hùng và Nguyễn Thị Liên Thương (2016) nghiên cứu kiểm soát bệnh thán thư trên cây ớt bằng *Trichoderma*. Chế phẩm bào tử từ các chủng *Trichoderma* chọn lọc có khả năng hạn chế bệnh thán thư trên trái ớt cao hơn 58,4 % so với việc sử dụng các chế phẩm phòng trừ nấm khác. Kết quả nghiên cứu này cho thấy tính khả thi của việc ứng dụng chế phẩm từ bào tử nấm *Trichoderma* trong việc phòng trừ bệnh thán thư trên cây ớt [35].

Phùng Thị Kim Huệ và cs. (2021) nghiên cứu chế tạo thành công phân bón hữu cơ và chế phẩm trừ sâu sinh học từ vỏ hạt điều và lá cây dã quỳ, bước đầu cho thấy hiệu quả phòng trừ bọ xít muỗi xanh và hiệu quả trong việc cung cấp dinh dưỡng cho cây điều và một số loại cây trồng nông nghiệp khác tại Gia Lai [36].

Tuy nhiên, hiện Việt Nam vẫn chưa có chế phẩm sinh học nào được thương mại hoá có tác khả năng phòng trừ hiệu quả bệnh thán thư chuyên dùng trên cây điều. Hầu hết các nghiên cứu tập trung trên một số loại cây trồng khác và mới chỉ dừng lại ở thử nghiệm in vitro nên rất cần quan tâm nghiên cứu sản xuất thuốc BVTV sinh học để phòng trừ bệnh thán thư cho

cây điều, giúp đảm bảo năng suất và chất lượng thu hoạch cho canh tác điều và đặc biệt có ý nghĩa trong việc phát triển cây điều hữu cơ theo hướng nông nghiệp tuần hoàn.

1.4. SỰ CẦN THIẾT CỦA TIẾN HÀNH NGHIÊN CỨU

Trong quá trình canh tác sản xuất, khâu phòng trừ sâu bệnh hại trên điều hết sức được quan tâm bởi đây là một trong những yếu tố chính ảnh hưởng trực tiếp đến năng suất và chất lượng hạt điều. Do khí hậu nóng ẩm, lượng mưa lớn nên tại các vùng trồng điều của Việt Nam đã xuất hiện dịch bệnh thán thư gây hại khoảng 40% năng suất hạt. Cây điều đang thời kỳ ra đọt non, bông và trái bị bệnh thán thư nặng có thể giảm năng suất từ 30-60%. Trên cây điều có nhiều loại sâu, bệnh hại như sâu đục thân, cành, bọ xít muỗi... Trong đó, thán thư là bệnh hại đặc biệt được quan tâm bởi đây là loại bệnh có thể gây hại trên các bộ phận từ lá, cành, chồi non, quả non... gây ảnh hưởng nặng tới sinh trưởng, phát triển cũng như năng suất và chất lượng hạt điều.

Trong khi đó, Việt Nam vẫn chưa có chế phẩm sinh học nào được thương mại hóa có tác dụng phòng trừ hiệu quả bệnh thán thư trên cây điều. Việc sản xuất được loại chế phẩm sinh học có khả năng phòng trừ bệnh thán thư trên cây điều (tạo ra từ phụ phẩm trong sản xuất điều và nông nghiệp tại vùng) không chỉ giúp tối ưu hoá nguồn phụ phẩm điều mà còn góp phần đảm bảo năng suất và chất lượng cho canh tác điều, có thể áp dụng chúng vào quy trình sản xuất hữu cơ, hướng tới sản xuất điều hữu cơ theo hướng nông nghiệp tuần hoàn.

Để có thể tạo ra được loại chế phẩm sinh học kể trên thì việc chọn lọc và tìm ra được các chủng vi sinh vật có hoạt tính kháng bệnh thán thư trên cây điều là hết sức cần thiết. Từ thực tế đó, đề tài thực hiện một số phương pháp sinh học thực nghiệm để phân lập, tuyển chọn các chủng vi sinh vật có hoạt tính sinh học cao, theo các tiêu chí về tính kháng bệnh thán thư, khả năng kích thích sinh trưởng thực vật, độ an toàn sinh học đối với con người và môi trường... kết hợp với các hợp chất có tính kháng khuẩn từ phụ phẩm cây điều để phục vụ sản xuất chế phẩm sinh học có khả năng phòng trừ bệnh thán thư ứng dụng trong sản xuất điều hữu cơ.

Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. ĐỐI TƯỢNG

2.1.1. Chủng giống

- Các chủng vi sinh vật được phân lập từ lá điều, quả giả điều, đất trồng điều và một số mẫu lá, đất trồng loại cây khác (cây vú sữa, cây roi) được thu thập trong cùng một vườn điều tại tỉnh Bình Phước có khả năng đối kháng với nấm gây bệnh thán thư trên cây điều.

- Chủng nấm kiểm định *Colletotrichum gloeosporioides* gây bệnh thán thư trên cây trồng do Viện Bảo vệ thực vật – phường Đức Thắng, quận Bắc Từ Liêm, thành phố Hà Nội cung cấp.

2.1.2. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

- Thời gian nghiên cứu: từ tháng 10 năm 2022 đến tháng 9 năm 2023.

- Địa điểm nghiên cứu: Khoa Tài nguyên và Môi trường, Học Viện nông nghiệp Việt Nam.

2.1.3. Vật liệu, hóa chất và thiết bị

- Vật liệu: Các cây điều AB29 giống ghép, 30 ngày tuổi có độ cao đồng đều khoảng 60 cm, khỏe mạnh do Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển cây điều, Viện Khoa học kỹ thuật Nông nghiệp miền Nam cung cấp và 03 bao đất trồng cây do Cửa hàng vật tư nông nghiệp tại Học viện Nông nghiệp Việt Nam cung cấp.

- Một số hóa chất chính được sử dụng trong đề tài: cao nấm men, peptone (Himedia, Ấn Độ), NaCl, KH_2PO_4 , MgSO_4 , KNO_3 , NaCl, FeSO_4 (Trung Quốc), glucose (Trung Quốc), dung dịch Lugol (Việt Nam) và một số hóa chất thí nghiệm khác.

- Các thiết bị, dụng cụ được sử dụng trong nghiên cứu này: Đĩa petri, micropipettes, đầu tip (Isolab, Đức); máy ly tâm lạnh (Biofuge fresco, Kendro, Đức); kính hiển vi quang học (Nikon, Nhật Bản), máy ổn nhiệt (Labnet, Mỹ); máy vortex (vision scientific, Hàn Quốc); máy khuấy từ (vision scientific, Hàn Quốc); tủ cấy an toàn sinh học Class II (Esco, Anh); tủ nuôi (Sanyo, Nhật Bản); cân kỹ thuật (Precisa XT2200A, Thụy Điển); pH kế Melter Toledo (Đức); tủ sấy Cornthem (New Zealand) và một số thiết bị, dụng cụ nghiên cứu khác.

2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.2.1. Phương pháp lấy mẫu để phân lập vi sinh vật

Mẫu phân lập vi sinh vật bao gồm: mẫu lá điều, quả giả điều, đất trồng điều hay một số mẫu lá cây vú sữa, lá cây roi (cây mận) được thu thập trong cùng một khuôn viên tại vườn điều tỉnh Bình Phước. Mẫu được thu và đựng trong các bình (túi) đựng riêng biệt đã được khử trùng. Mẫu thu về sẽ được tiến hành làm thí nghiệm ngay hoặc bảo quản trong điều kiện nhiệt độ thấp ở 4°C trong thời gian 5 ngày.

Mẫu đất xung quanh phần rễ được thu thập ở độ sâu tối đa 20cm (Lamsan et al., 2012) tại vườn trồng điều tỉnh Bình Phước. Lấy 5 điểm/vườn, trộn lại thành 1 mẫu và đựng trong túi nilong vô trùng, bảo quản ở thùng mát (4°C) và chuyển về phòng thí nghiệm (Sun et al., 2017).

Tương tự như lấy mẫu đất, các mẫu lá (lá điều, lá vú sữa, lá roi khỏe mạnh, lá điều bị bệnh) và mẫu quả giả điều chín còn trên cây sẽ được thu thập, đựng trong túi nilong vô trùng, bảo quản ở thùng mát (4°C) và chuyển về phòng thí nghiệm để chuẩn bị cho các thí nghiệm tiếp theo.

2.2.2. Phương pháp phân lập vi sinh vật

Sử dụng môi trường đặc hiệu (PCA, NA với vi khuẩn, Gauze với xạ khuẩn, Soubourou với nấm mốc, Hansen với nấm men, v.v.) để phân lập vi sinh vật theo phương pháp pha loãng Koch. Dùng 5g mẫu từ mẫu phân lập vi sinh vật (lá điều/quả giả điều/...) pha loãng với 45ml nước vô trùng, lắc đều trong vòng 30 phút. Dịch pha loãng được cấy ria lên bề mặt đĩa thạch chứa môi trường đặc hiệu cho từng chủng VSV. Làm thuần các chủng phân lập trên môi trường đặc hiệu tương ứng bằng phương pháp cấy ria 3 pha trên môi trường bán rắn, giữ giống trong môi trường thạch nghiêng ở 4°C.

Để xác định các chủng VSV, tiến hành sàng lọc ban đầu thông qua việc nhuộm tế bào bằng phương pháp nhuộm gram và quan sát hình thái VSV qua kính hiển vi.

2.2.3. Phương pháp tuyển chọn VSV: Thông qua đánh giá đặc tính sinh học bằng cách nuôi cấy trực tiếp trên môi trường đặc hiệu ở các điều kiện khác nhau

Đánh giá khả năng kháng bệnh của các chủng VSV tuyển chọn được:

Khả năng kháng bệnh của các chủng VSV tuyển chọn được xác định bằng phương pháp đục lỗ thạch có hiệu chỉnh theo phương pháp của Saadoun và Muhana [37]. Các chủng VSV phân lập được nuôi cấy trên môi trường đặc hiệu trên máy lắc với tốc độ 200 vòng/phút ở nhiệt độ 30°C trong vòng từ 3-5 ngày. Sau đó, thu hồi và ly tâm dịch nuôi cấy các chủng VSV với tốc độ 6000 – 8000 vòng/phút ở 4°C. Trên môi trường PDA thạch, cấy trang chủng nấm kiểm định *Colletotrichum gloeosporioides* có mật độ tế bào đạt 5.10^8 CFU/ml, sau đó đục lỗ thạch bằng dụng cụ đục lỗ thạch. Nhổ 100 ml dung dịch nuôi cấy vào mỗi lỗ và để đĩa ở 4-5°C trong 4-6 giờ, sau đó đem nuôi ủ ấm ở 36°C trong 18 – 24 giờ. Hoạt tính kháng VSV kiểm định được xác định theo kích thước vòng kháng khuẩn (VKK, mm) xuất hiện xung quanh đĩa thạch đã nhỏ dịch, vòng càng lớn thì hoạt tính càng mạnh theo công thức:

$VKK = D - d$ (mm). Trong đó: D: Đường kính vòng vô khuẩn (mm); d: đường kính lỗ thạch (mm).

Xác định hoạt tính enzyme của các chủng VSV tuyển chọn được theo phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch (William, 1983):

Nuôi cấy VSV bằng dịch chiết: Sử dụng 9ml dung dịch môi trường đặc hiệu với 1 vòng que cấy chứa VSV, lắc ở 150 vòng/phút. Sau 72 giờ đối với vi khuẩn, dịch nuôi cấy được đánh giá khả năng phân giải enzyme.

Môi trường sử dụng để đánh giá hoạt tính 4 loại enzyme *amylase*, *protease*, *cellulase*, *chitinase* của vi sinh vật được trình bày tại Bảng 2.1.

Bảng 2.1. Môi trường đánh giá hoạt tính 4 loại enzyme *amylase*, *protease*, *cellulase*, *chitinase* của vi sinh vật

Enzyme	<i>Amylase</i>		<i>Protease</i>		<i>Cellulase</i>		<i>Chitinase</i>	
	Tinh bột	Thạch	Casein	Thạch	CMC	Thạch	Chitin	Thạch
Định lượng	0,2%	1,5%	0,3%	1,5%	0,2%	1,5%	0,2%	1,5%

Hấp khử trùng môi trường ở 121°C trong vòng 20 phút. Sau khi môi trường nguội bớt, đổ môi trường lên các đĩa petri với độ dày 2mm rồi để nguội. Lưu ý đảm bảo rằng các đĩa petri đã được khử trùng trong nồi hấp áp

suất ở 150°C trong 2 giờ. Sử dụng ống khoan đã khử trùng để đục lỗ trên các đĩa thạch. Sau đó tiến hành nhỏ 2ml dịch chiết ở trên vào các lỗ thạch, bảo quản 6h trong tủ lạnh để chờ enzyme khuếch tán vào trong thạch, rồi đem nuôi ở 30°C trong vòng 48h. Sau đó, nhuộm màu bằng thuốc thử lugol và đo vòng phân giải.

Đường kính vòng phân giải enzym của VSV được xác định bằng công thức: $D = d_2 - d_1$; Trong đó: D là đường kính vòng phân giải enzym của VSV; d_2 là đường kính vòng phân giải; d_1 là đường kính của lỗ đục.

Đánh giá khả năng chống chịu của các chủng VSV:

Nuôi cấy VSV trên môi trường đặc hiệu trong những điều kiện thử nghiệm khác nhau về pH, nhiệt độ, nồng độ kháng sinh, nồng độ muối.

Khả năng chịu pH: Cấy các chủng VSV phân lập được trên môi trường đặc hiệu có bổ sung dung dịch đệm, được điều chỉnh pH bằng HCl và NaOH theo các giá trị pH: 4, 5, 6, 7, 8. Sau đó xác định mật độ vi khuẩn sau khoảng 48-72 giờ nuôi cấy

Khả năng chịu nhiệt: Cấy các chủng VSV phân lập được trên môi trường đặc hiệu và nuôi ở các mức nhiệt độ khác nhau: 20, 30, 40, 50°C. Sau đó, xác định mật độ vi khuẩn sau khoảng 48-72 giờ nuôi cấy.

Khả năng kháng kháng sinh: Pha kháng sinh streptomycin theo các mức nồng độ khác nhau: 300mg/l, 500mg/l, 800mg/l và 1000mg/l môi trường, sau đó bổ sung vào môi trường đặc hiệu của từng chủng vi sinh vật (môi trường đã được khử trùng ở 1atm, 30 phút). Sau đó chia ra các đĩa petri để nguội. Cấy 0,1 ml dịch khuẩn của từng chủng vi sinh vật trên đĩa petri, đem nuôi trong tủ nuôi ổn nhiệt (nhiệt độ 28-30°C). Sau 3 ngày nuôi cấy đem ra đếm và quan sát số lượng khuẩn lạc hình thành ở từng nồng độ kháng sinh khác nhau.

2.2.4. Phương pháp phân loại sơ bộ chủng vi sinh vật tuyển chọn

Phân loại sơ bộ các chủng VSV được tuyển chọn: Các chủng VSV tuyển chọn được phân loại sơ bộ bằng phương pháp so sánh đặc điểm hình thái và các phản ứng sinh hoá đặc trưng theo khóa phân loại Campbell (1971), Petter (1991) và Bergey (1989).

2.2.5. Phương pháp kiểm tra tính an toàn của chủng VSV trên thực vật

Mẫu lá điều làm thí nghiệm được rửa sạch dưới vòi nước máy, cắt bỏ cuống và cắt thành từng miếng. Sau đó rửa với nước xà phòng loãng trong

khoảng thời gian 20 – 30 phút, tiếp tục rửa dưới vòi nước máy cho đến khi hết xà phòng. Mẫu lá được rửa lại với nước cất vô trùng 2 lần và khử trùng bằng cồn 70° trong 1 phút. Sau đó, mẫu được khử trùng bằng dung dịch Javen 60%, HgCl₂ 0,1% và H₂O₂ 15% trong vòng 20 phút, sau đó rửa bằng nước cất khử trùng nhiều lần (5 lần). Thâm khô mẫu lá bằng giấy lọc vô trùng. Đặt miếng lá lên đĩa peptri có chứa giấy thấm nước vô trùng với độ ẩm khoảng 40%. Sau đó tiến hành cấy vi sinh vật vào các miếng lá đã cắt. Mẫu lá không cấy vi sinh vật là mẫu đối chứng. Sau 2 ngày, đem quan sát nếu thấy lá không bị các vết tổn thương xung quanh khu vực cấy thì chứng tỏ vi sinh vật an toàn đối với thực vật (các thao tác thực hiện trong điều kiện vô trùng) [38].

2.2.6. Phương pháp sản xuất chế phẩm dạng dịch từ VSV tuyển chọn

Áp dụng sản xuất theo quy trình của Khoa Tài Nguyên và Môi trường, Học viện Nông nghiệp Việt Nam (Phụ lục 1).

2.2.7. Phương pháp xác định chất lượng chế phẩm

Phương pháp xác định mật độ VSV: Theo phương pháp pha loãng Koch và nuôi cấy trên đĩa thạch

Sử dụng phương pháp pha loãng mẫu đến nồng độ 10⁻⁷. Chọn 3 nồng độ pha loãng liên tiếp, tại mỗi nồng độ cấy lặp lại 3 lần trên môi trường đặc hiệu, mỗi lần cấy 0,025ml dịch. Nuôi cấy ở 28°C từ 2-3 ngày. Đếm số lượng khuẩn lạc tạo thành trên các đĩa hộp lồng. Từ đó xác định số lượng VSV theo công thức: $N = \Sigma C / [d(n_1 + 0,1.n_2).V]$ (CFU/ml); trong đó: N là số VSV trong một đơn vị kiểm tra (CFU/ml); ΣC là tổng số khuẩn lạc đếm được trên tất cả các đĩa Petri; n₁ là số đĩa Petri được giữ lại ở độ pha loãng thứ nhất; n₂ là số đĩa Petri được giữ lại ở độ pha loãng thứ hai; d là hệ số pha loãng tương ứng với độ pha loãng thứ nhất; V là thể tích cấy VSV (ml).

Kiểm tra VSV tạp: Cấy trên môi trường VSV tổng hợp TGA, xác định và đếm số lượng VSV tạp.

2.2.8. Phương pháp đánh giá tiềm năng phòng trị bệnh thán thư trên cây điều

Cây thí nghiệm được lựa chọn là cây điều AB29 giống ghép, 30 ngày tuổi cao khoảng 60cm, không bị bệnh và côn trùng gây hại, không phun thuốc hóa học trước ngày lây bệnh nhân tạo khoảng 10 ngày. Trồng 1 cây/chậu với

đường kính chậu 25 cm và sử dụng 3kg đất/chậu để trồng cây. Các chậu cây thí nghiệm được đặt trong nhà lưới và không để ánh nắng chiếu trực tiếp. Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 1 nhân tố, 3 lần lặp lại, gồm 14 công thức:

- CT1T: Phun huyền phù chủng Aa1 2 ngày trước LBNT
- CT1S: Phun huyền phù chủng Aa1 2 ngày sau LBNT
- CT1TS: Phun huyền phù chủng Aa1 kết hợp 2 ngày trước + sau LBNT
- CT2T: Phun huyền phù chủng Bp3 2 ngày trước LBNT
- CT2S: Phun huyền phù chủng Bp3 2 ngày sau LBNT
- CT2TS: Phun huyền phù chủng Bp3 kết hợp 2 ngày trước + sau LBNT
- CT3T: Phun huyền phù chủng Tc2 2 ngày trước LBNT
- CT3S: Phun huyền phù chủng Tc2 2 ngày sau LBNT
- CT3TS: Phun huyền phù chủng Tc2 kết hợp 2 ngày trước + sau LBNT
- CT4T: Phun huyền phù hỗn hợp chủng tuyển chọn 2 ngày trước LBNT
- CT4S: Phun huyền phù hỗn hợp chủng tuyển chọn 2 ngày sau LBNT
- CT4TS: Phun huyền phù hỗn hợp chủng tuyển chọn kết hợp 2 ngày trước + sau LBNT
- CT13: Đối chứng (+): Xử lý bằng thuốc Carmanthai 800WP (hoạt chất Carbendazim) và phun theo lượng khuyến cáo trên bao bì
- CT14: Đối chứng (-): Xử lý với nước cất thanh trùng.

Lưu ý rằng: Huyền phù chủng/hỗn hợp chủng VSV tuyển chọn (Aa1, Bp3 và Tc2) có mật độ 10^8 CFU/ml.

Cách thực hiện: Tạo vết thương trên lá cây điều (2 vết/lá) bằng bó kim sạch (5 kim/bó). Tiến hành nhiễm bệnh nhân tạo bằng cách phun huyền phù nấm *Colletotrichum* sp. với mật số 10^5 bào tử/ml (phun 10 ml/chậu). Sau đó, đo đường kính phát triển của vết bệnh qua các thời điểm 5, 7, 9 và 11 ngày sau khi nhiễm bệnh nhân tạo [39].

Hiệu quả giảm bệnh (HQGB) trên cây được tính theo công thức của Prasad và Kumar (2011): $HQGB (\%) = [(C-T)/C] * 100$. Trong đó: HQGB là hiệu quả giảm bệnh (%); C là đường kính vết bệnh (mm) ở công thức đối chứng; T là đường kính vết bệnh ở (mm) ở công thức có xử lý.

2.2.9. Phương pháp phân tích và xử lý số liệu

Sử dụng phần mềm Microsoft Office Excel và phần mềm MSTATC qua phép thử Duncan để xử lý và phân tích các số liệu.

Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN VI SINH VẬT CÓ KHẢ NĂNG ĐỐI KHÁNG VỚI NẤM GÂY BỆNH THÁN THƯ TRÊN CÂY ĐIỀU

3.1.1. Phân lập các chủng VSV từ các mẫu nghiên cứu

Các chủng VSV phân lập từ các mẫu nghiên cứu gồm: lá điều, quả già điều, đất trồng điều hay một số mẫu lá cây vú sữa, lá cây roi được thu thập trong cùng một khuôn viên tại vườn điều tỉnh Bình Phước.

Kết quả đã phân lập được 28 chủng vi sinh vật dựa vào sự khác nhau về màu sắc, hình dạng, đường kính của khuẩn lạc. Các chủng này được ký hiệu theo nhóm phân loại và được đánh số thứ tự. Dựa vào việc làm tiêu bản và soi dưới kính hiển vi quang học, xác định được trong 28 chủng VSV phân lập có 4 chủng là nấm mốc và nấm men, 20 chủng là vi khuẩn và 4 chủng là xạ khuẩn. Đường kính khuẩn lạc sau 5 ngày dao động từ 0,5 - 9 (mm). Kết quả được trình bày tại Bảng 3.1.

Bảng 3.1. Kết quả phân lập một số chủng vi sinh vật

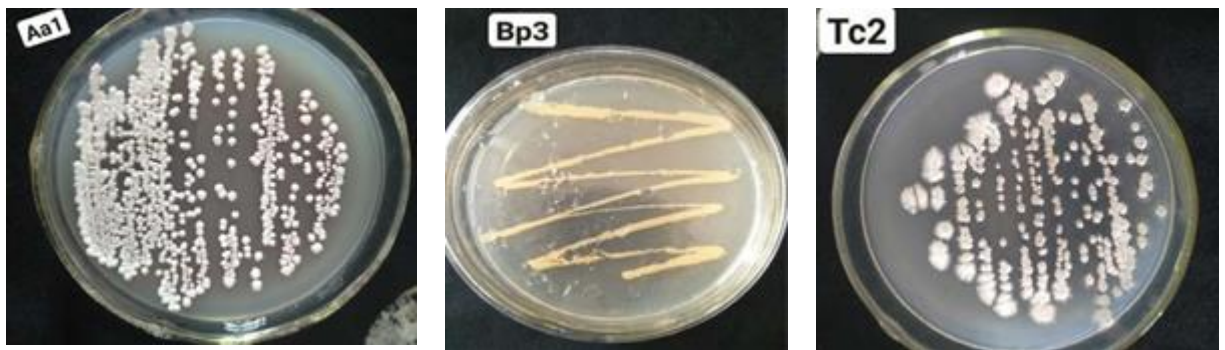
TT	Ký hiệu	Nguồn mẫu	Môi trường	Thời gian hình thành khuẩn lạc (giờ)	Kích thước khuẩn lạc sau 5 ngày (mm)	Hình thái khuẩn lạc	Nhóm phân loại
1	Aa1	Lá mận roi	Sabouraud	48	7-8	Trắng, nhẵn, hình tròn	Vi khuẩn
2	Aa2	Quả điều già	Hansen	48	1-2	Màu trắng, lồi, khô tròn đều	Nấm men
3	Aa3	Lá điều bệnh rỉ sắt	Sabouraud	72	8	Xanh, sợi ngắn trắng	Nấm mốc
4	Aa4	Lá vú	Sabouraud	72	7	Xanh, sợi ngắn	Nấm

TT	Ký hiệu	Nguồn mẫu	Môi trường	Thời gian hình thành khuẩn lạc (giờ)	Kích thước khuẩn lạc sau 5 ngày (mm)	Hình thái khuẩn lạc	Nhóm phân loại
		sữa					mốc
5	Aa5	Lá điều bệnh thán thư	Sabouraud	48	7,5-9	Trắng, sợi ngắn	Nấm mốc
6	Bp1	Quả điều giả	Hansen	36	2	Trắng ngà, dẹt, bên mặt nhẵn, hình tròn biên không đều	Vi khuẩn
7	Bp2	Mẫu điều	PCA	24	2	Trắng trong, lồi nhậy, hình tròn	Vi khuẩn
8	Bp3	Lá mận roi	PCA	24	2-3	Trắng, nhẵn, tròn, trơn bóng	Vi khuẩn
9	Bp4	Lá điều thường	PCA	36	1-2	Màu trắng ngà, hình tròn biên không đều	Vi khuẩn
10	Bp5	Đất trồng điều	PCA	24	1-2	Màu trắng ngà, bề mặt nhám, hình tròn biên không đều	Vi khuẩn
11	Bp6	Lá vú sữa	PCA	24	1-2	Trắng ngà, lồi, trơn bóng, hình tròn biên đều	Vi khuẩn
12	Bp7	Lá vú sữa	NA	24	2,5	Vàng nhạt, lồi, trơn bóng, hình	Vi khuẩn

TT	Ký hiệu	Nguồn mẫu	Môi trường	Thời gian hình thành khuẩn lạc (giờ)	Kích thước khuẩn lạc sau 5 ngày (mm)	Hình thái khuẩn lạc	Nhóm phân loại
						tròn biên đều	
13	Bp8	Lá điều bệnh rỉ sắt	NA	36	1-2	Trắng ngà, đục, khô bóng	Vi khuẩn
14	Bp9	Lá điều bệnh	NA	24	2	Tròn, trắng đục, lồi, thô	Vi khuẩn
15	Bp10	Lá mạn roi	NA	48	2,1	Nâu sữa, lồi, trơn bóng, hình tròn biên đều	Vi khuẩn
16	Bp11	Lá điều thường	PCA	24	2,5	Trắng sữa, lồi, trơn bóng, hình tròn biên đều	Vi khuẩn
17	Bp12	Lá điều bệnh	PCA	24	5,5	Trắng, đục, khô nhẵn nhám, hình tròn biên không đều	Vi khuẩn
18	Bp13	Mẫu điều	Sabouraud	24	2-3	Trắng trong, lồi nhày, hình tròn	Vi khuẩn
19	Bp14	Lá điều thường	Sabouraud	24	0,5	Đục, khô, hình tròn biên đều	Vi khuẩn
20	Bp15	Lá điều thường	PCA	24	1,5-2	Trắng, tròn, có vành	Vi khuẩn
21	Bp16	Lá điều bệnh thán	Sabouraud	24	2	Trắng ngà, bề mặt nhẵn	Vi khuẩn

TT	Ký hiệu	Nguồn mẫu	Môi trường	Thời gian hình thành khuẩn lạc (giờ)	Kích thước khuẩn lạc sau 5 ngày (mm)	Hình thái khuẩn lạc	Nhóm phân loại
		thư					
22	Bp17	Mẫu điều	Sabouraud	24	2,5	Trắng trong, lồi nhậy, hình tròn	Vi khuẩn
23	Bp18	Lá điều thường	Sabouraud	24	0,5-1	Trắng trong, dẹt, ướt	Vi khuẩn
24	Bp19	Lá điều bệnh thán thư	Hansen	24	1,5	Tròn, trắng trong, lồi	Vi khuẩn
25	Tc1	Lá mận roi	Gause	72	2,5	Nâu nhạt, bề mặt nhung, hình tròn	Xạ khuẩn
26	Tc2	Lá điều bệnh	PCA	36	4-5	Trắng, dẹt, khô xù xì, hình tròn biên không đều	Xạ khuẩn
27	Tc3	Đất trồng điều	PCA	48	2-3	Màu trắng, bề mặt nhung, màu sắc môi trường ngả dần sang nâu	Xạ khuẩn
28	Tc4	Lá vú sữa	Gause	72	2	Nâu đen, khô, bề mặt dạng nhung	Xạ khuẩn

Các chủng VSV thuộc nhóm sinh trưởng phát triển nhanh chủ yếu là các chủng vi khuẩn, được nuôi cấy trên môi trường PCA, có thời gian hình thành khuẩn lạc từ 24 – 48h. Trong đó, thời gian hình thành khuẩn lạc nhanh nhất (chưa đến 24h) có thể kể đến các chủng vi khuẩn như chủng Bp2, Bp3, Bp5, Bp6, Bp7, Bp9, Bp11- Bp19. Các chủng nấm men và nấm mốc như Aa2, Aa3, Aa4, Aa5 được nuôi cấy trong môi trường Hansen và Sabrouraud thuộc nhóm sinh trưởng và phát triển chậm, thời gian hình thành khuẩn lạc từ 48 - 72h. Các chủng xạ khuẩn như Tc1, Tc2, Tc3, Tc4 được nuôi cấy trong môi trường Gause và PCA đều có thời gian hình thành khuẩn lạc dao động từ 36 – 72h. Như vậy, 20/28 chủng VSV phân lập được là vi khuẩn (*bacterium*; chiếm 72%), có hình thái khuẩn lạc hầu hết đều là hình tròn, màu trắng, trắng đục hoặc vàng nhạt, bề mặt trơn nhày, v.v. và có thời gian hình thành khuẩn lạc nhanh hơn so với các chủng nấm (nấm men, nấm mốc) và xạ khuẩn. 4/28 chủng VSV phân lập được là nấm men và nấm mốc (chiếm 14%) có hình thái khuẩn lạc chủ yếu là màu trắng hoặc màu xanh, sợi ngắn. Chiếm 14% còn lại là các chủng xạ khuẩn (*Actinomycetes*) với hình thái khuẩn lạc chủ yếu có màu nâu, nâu đen, trắng ngả dần sang nâu, hình tròn, bề mặt nhung.



Hình 3.1. Hình thái khuẩn lạc của một số chủng VSV phân lập được

3.1.2. Khả năng đối kháng nấm gây bệnh thán thư

Mỗi loài VSV khác nhau sẽ thích nghi với điều kiện môi trường khác nhau. Điều kiện môi trường gây ảnh hưởng trực tiếp tới quá trình trao đổi chất và sinh trưởng của mỗi loài. Trong khoảng thời gian nuôi cấy, một số hoạt

chất sinh học sẽ được VSV tiết ra môi trường và một trong số hoạt chất đó có thể gây ức chế khả năng sinh trưởng và phát triển của sinh vật khác. Bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch, hoạt tính đối kháng của những chủng vi khuẩn phân lập được với nấm gây bệnh thán thư sẽ được đánh giá. Đây cũng chính là mục đích của đề tài nhằm tìm ra các chủng VSV có khả năng đối kháng nấm *Colletotrichum*. Do đó, chúng tôi nghiên cứu hoạt tính đối kháng nấm *Colletotrichum* trên 28 chủng VSV phân lập được.

Kết quả được trình bày tại Bảng 3.2.

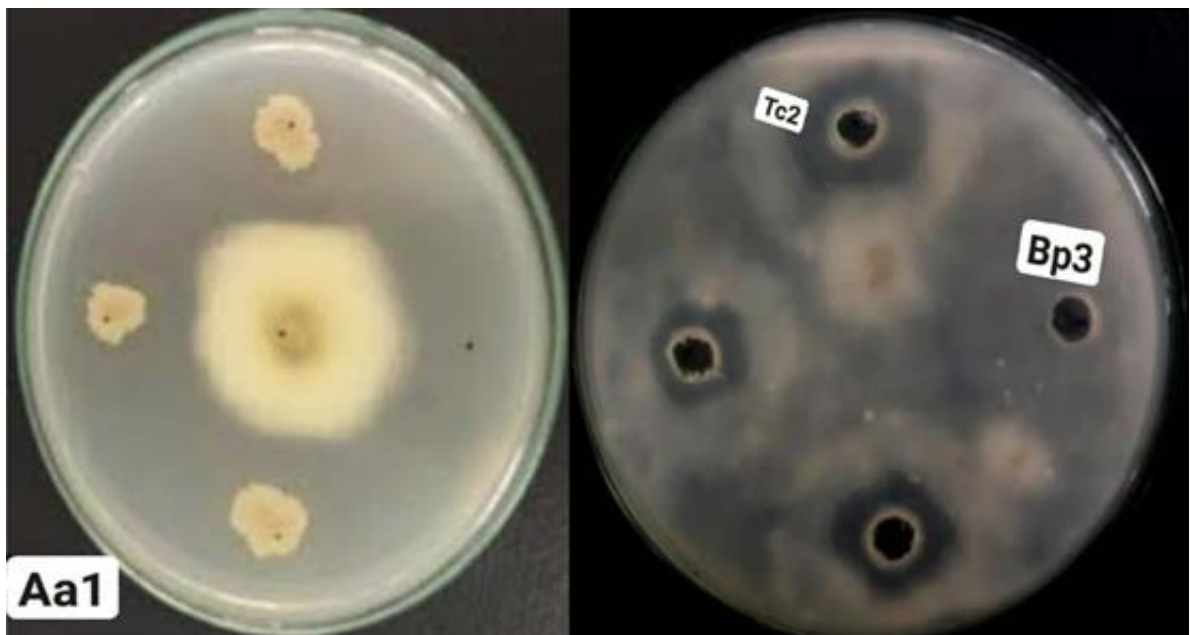
**Bảng 3.2. Khả năng kháng nấm *Colletotrichum* spp.
của các chủng VSV phân lập**

STT	Ký hiệu	Khả năng kháng nấm <i>Colletotrichum</i> spp.	Kích thước vòng đối kháng (mm)
1	Aa1	+	7
2	Aa2	-	-
3	Aa3	-	-
4	Aa4	-	-
5	Aa5	-	-
6	Bp1	-	-
7	Bp2	-	-
8	Bp3	+	6
9	Bp4	-	-
10	Bp5	-	-
11	Bp6	-	-
12	Bp7	-	-
13	Bp8	-	-
14	Bp9	-	-
15	Bp10	-	-
16	Bp11	-	-
17	Bp12	-	-
18	Bp13	-	-
19	Bp14	-	-

STT	Ký hiệu	Khả năng kháng nấm <i>Colletotrichum</i> spp.	Kích thước vòng đối kháng (mm)
20	Bp15	-	-
21	Bp16	-	-
22	Bp17	-	-
23	Bp18	-	-
24	Bp19	-	-
25	Tc1	-	-
26	Tc2	+	2
27	Tc3	-	-
28	Tc4	-	-

Ghi chú: (-) không có khả năng đối kháng; (+) có khả năng đối kháng

Trong 28 chủng vi sinh vật phân lập, chỉ có 3 chủng có khả năng đối kháng với nấm *Colletotrichum* spp. là Aa1, Bp3, Tc2 với kích thước vòng đối kháng từ 2-7 (mm).



Hình 3.2. Khả năng đối kháng nấm *Colletotrichum* của các chủng Aa1, Bp3, Tc2 phân lập

So sánh với kết quả nghiên cứu của tác giả Đỗ Văn Sử và Lê Minh Tường (2016) [39], tác giả đã tuyển chọn ra 3/100 chủng xạ khuẩn có khả năng đối kháng với *Colletotrichum* sp. gây bệnh thán thư trên cây ớt được

phân lập từ đất trồng ớt ở một số tỉnh khu vực đồng bằng sông Cửu Long, qua các thời điểm khảo sát với bán kính vòng vô khuẩn lần lượt là 13,7 mm; 12,3 mm, 13,5 mm. Từ đây nhận thấy, kích thước vòng đối kháng với nấm *Colletotrichum* spp. của 3 chủng Aa1, Bp3 và Tc2 ở mức không quá cao.

3.1.3. Hoạt tính enzyme protease, cellulase, amylase và chitinase của các chủng VSV

Để tuyển chọn được các chủng VSV có khả năng phân giải, chuyển hóa chất hữu cơ tốt thì việc đánh giá hoạt tính enzyme của các chủng VSV này là yếu tố vô cùng quan trọng. Hoạt tính enzyme của các chủng VSV phân lập tuyển chọn được thể hiện bằng đường kính vòng phân giải enzyme của chúng. Hướng tới mục tiêu tuyển chọn được các chủng VSV có hoạt tính sinh học cao, chuyển hóa tốt, nghiên cứu đã tiến hành đánh giá khả năng phân giải 4 loại enzyme *protease*, *cellulase*, *amylase* và *chitinase* của các chủng VSV phân lập và tuyển chọn dựa trên đường kính vòng phân giải của chúng. Kết quả được trình bày tại Bảng 3.3.

Bảng 3.3. Hoạt tính enzyme protease, cellulase, amylase và chitinase của các chủng vi sinh vật

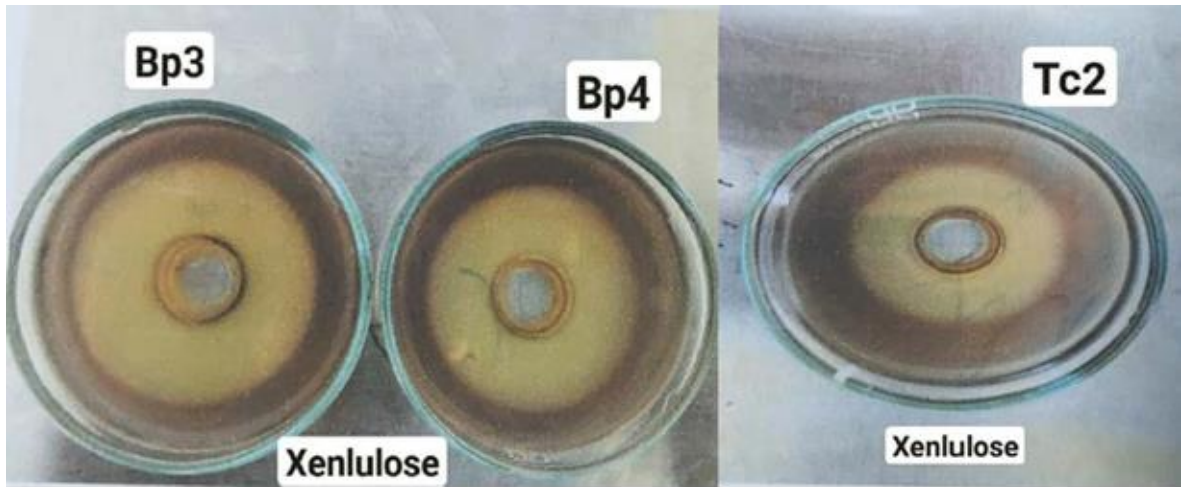
STT	Ký hiệu	Vòng phân giải cơ chất, D - d (cm)			
		Protease	Cellulase	Amylase	Chitinase
1	Aa1	2,5	2,5	1,9	2,15
2	Aa2	1,3	-	-	-
3	Aa3	-	-	-	-
4	Aa4	-	-	-	-
5	Aa5	-	-	-	-
6	Bp1	-	-	-	-
7	Bp2	-	-	-	-
8	Bp3	1,5	2,3	1,1	1,4
9	Bp4	-	2,1	-	-
10	Bp5	-	-	-	-

STT	Ký hiệu	Vòng phân giải cơ chất, D - d (cm)			
		Protease	Cellulase	Amylase	Chitinase
11	Bp6	-	-	-	-
12	Bp7	-	-	-	-
13	Bp8	-	-	-	-
14	Bp9	-	-	-	-
15	Bp10	-	-	-	-
16	Bp11	-	-	-	-
17	Bp12	-	-	-	-
18	Bp13	-	-	-	-
19	Bp14	-	-	-	-
20	Bp15	-	-	-	-
21	Bp16	-	-	-	-
22	Bp17	-	-	-	-
23	Bp18	-	-	-	-
24	Bp19	-	-	-	-
25	Tc1	-	-	-	-
26	Tc2	1,7	1,4	1,3	1,6
27	Tc3	-	-	-	-
28	Tc4	-	-	-	-

Kết quả từ Bảng 3.3 cho thấy: Chủng vi sinh vật nào có đường kính vòng phân giải cơ chất càng lớn thì chủng vi sinh vật đó có hoạt tính enzyme càng cao. Các chủng vi sinh vật có khả năng phân giải cellulose (xenlulose) là tốt nhất, sau đó đến protease (protein), chitinase (chitin) và cuối cùng đến amylase (tinh bột).

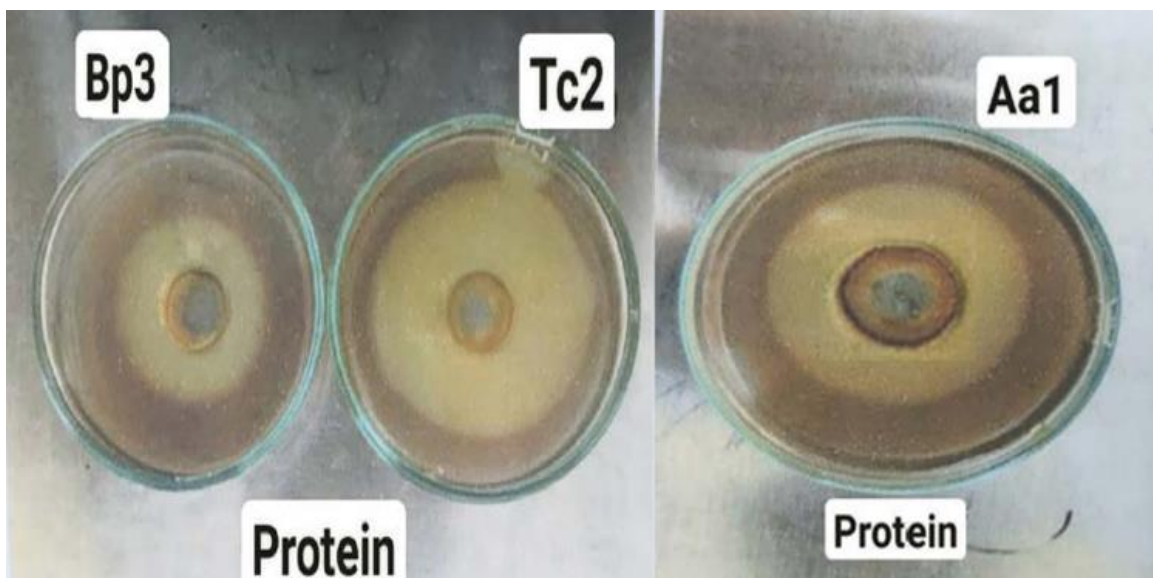
Trong số các chủng vi sinh vật phân lập được, đa số các chủng không có khả năng phân giải xenlulose. Chỉ có 4 chủng vi sinh vật gồm Aa1, Bp3, Bp4 và Tc2 có khả năng phân giải xenlulose khá tốt, đường kính vòng phân giải đạt từ 1,4 - 2,5cm. Trong đó, chủng Aa1 có hoạt lực phân giải xenlulose tốt

nhất với hiệu số vòng phân giải đạt 2,5cm và chủng Tc2 có khả năng phân giải xenlulose thấp nhất đạt 1,4cm.



Hình 3.3. Vòng phân giải xenlulose của các chủng vi sinh vật

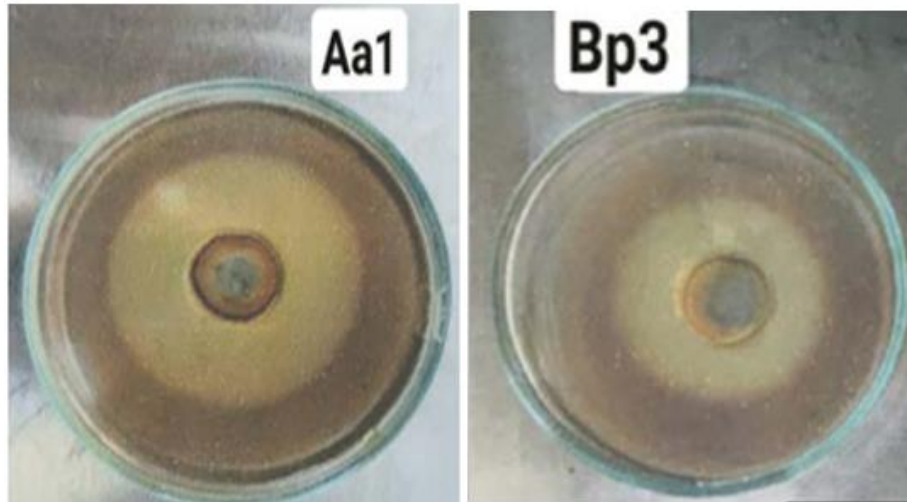
Tương tự như khả năng phân giải xenlulose, đa số các chủng vi sinh vật trong 28 chủng phân lập không có khả năng phân giải protein. Chỉ có 4/28 chủng vi sinh vật gồm Aa1, Aa2, Bp3 và Tc2 có khả năng phân giải protein khá tốt, đường kính vòng phân giải từ 1,3 – 2,5cm. Trong đó, chủng Aa1 có khả năng phân giải protein tốt nhất với đường kính đạt 2,5cm.



Hình 3.4. Vòng phân giải protein của một số chủng vi sinh vật

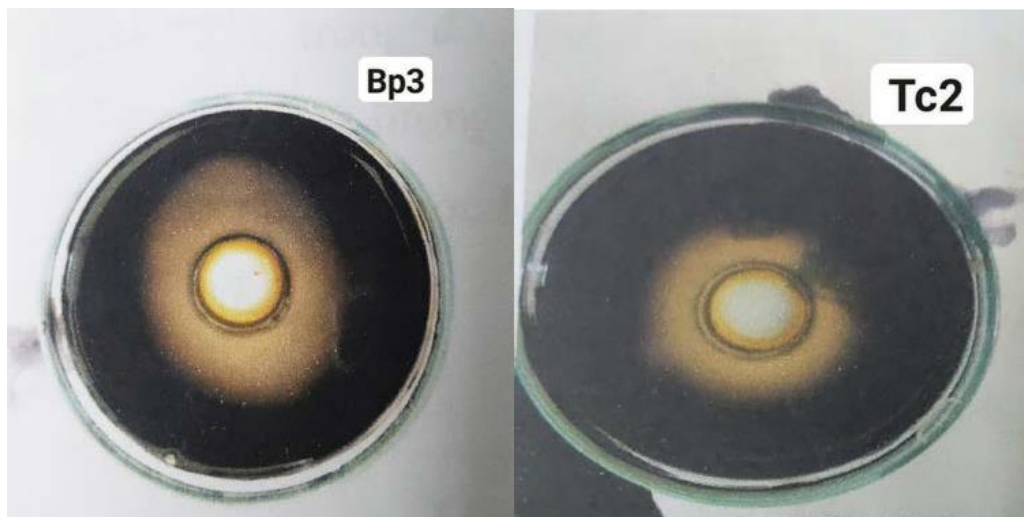
Kết quả đánh giá khả năng phân giải chitin của 28 chủng VSV phân lập cho thấy rằng: Chỉ có 3/28 chủng VSV gồm Aa1, Bp3 và Tc2 có khả năng phân giải chitin, đường kính vòng phân giải đạt từ 1,4 – 2,15 cm. Chủng Aa1

có khả năng phân giải chitin tốt nhất với đường kính đạt 2,15cm. Hai chủng Bp3 và Tc2 có hiệu số vòng phân giải chitin lần lượt là 1,4 cm và 1,6cm. Nhìn chung trong 28 chủng VSV phân lập, cũng giống như khả năng phân giải xenlulose/protein, đa số các chủng không có khả năng phân giải chitin.



Hình 3.5. Vòng phân giải chitin của một số chủng vi sinh vật

Trong 28 chủng VSV đã xác định hoạt tính enzyme, chỉ có 3/28 chủng gồm Aa1, Bp3 và Tc2 có vòng phân giải amylase. 3 chủng này có khả năng phân giải tinh bột khá cao, đường kính vòng phân giải đạt từ 1,1 – 1,9cm. Tuy nhiên, nhìn chung khả năng phân giải của các chủng vi sinh đối với tinh bột kém hơn khả năng phân giải xenlulose, protein và kitin. Chủng Aa1 có khả năng phân giải tinh bột tốt nhất, đường kính vòng phân giải đạt 1,9 cm. 2 chủng Bp3 và Tc2 có hiệu số vòng phân giải tinh bột lần lượt là 1,1 cm và 1,3 cm.



Hình 3.6. Vòng phân giải tinh bột của một số chủng vi sinh vật

Dựa trên kết quả đánh giá hoạt lực phân giải xenlulose, protein, kitin và tinh bột của 28 chủng VSV phân lập, chúng tôi đã tuyển chọn được 3 chủng có hoạt tính enzyme cao để phục vụ nghiên cứu tiếp theo, gồm: Aa1, Bp3, Tc2.

3.1.4. Khả năng thích ứng nhiệt độ

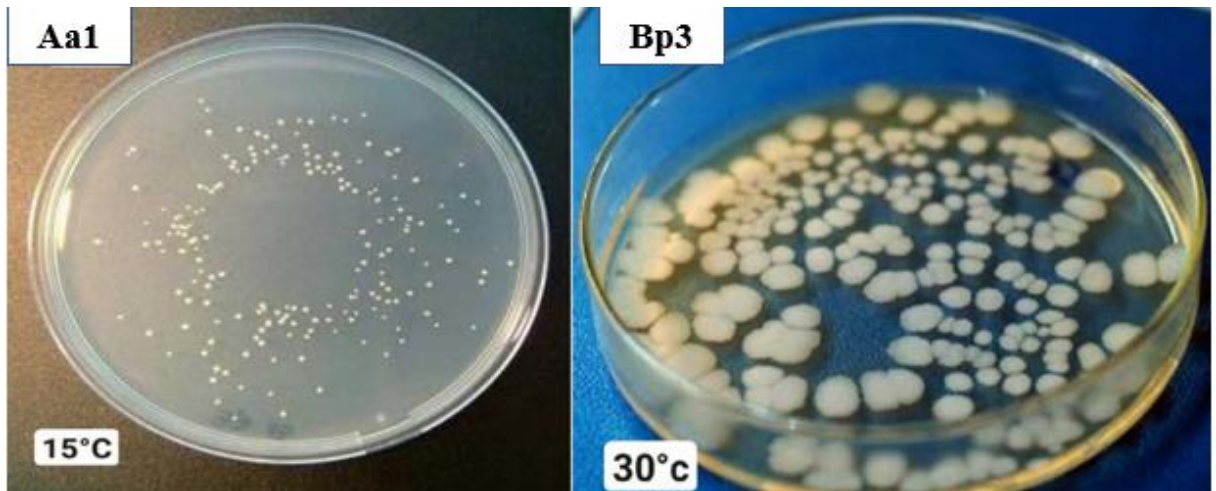
Nhiệt độ môi trường được coi là một trong những yếu tố tác động và gây ảnh hưởng lớn đối với vi sinh vật. Thực tế cho thấy rằng, nhiệt độ tăng làm tăng khả năng sinh trưởng và khả năng tiết enzyme ngoại bào của VSV. Tuy nhiên, khi nhiệt độ tăng đến mức giới hạn sẽ làm giảm khả năng hoạt động, sinh trưởng và phát triển của chúng. Các nhân tố lý – hóa – sinh gây ảnh hưởng lớn đến quá trình sinh trưởng và phát triển của VSV, đặc biệt là nhiệt độ. Chủng vi sinh vật chịu được ngưỡng nhiệt càng cao thì chủng đó sẽ có khả năng chống chịu tốt với sự thay đổi nhiệt độ của môi trường. Khả năng chịu nhiệt của các chủng VSV tuyển chọn được đánh giá ở các ngưỡng nhiệt độ 20°C, 30°C, 40°C và 50°C.

Bảng 3.4. Khả năng thích ứng nhiệt độ của vi sinh vật

TT	Chủng VSV	Số lượng khuẩn lạc ($\times 10^8$ CFU/ml)			
		20°C	30°C	40°C	50°C
1	Aa1	2,00	4,62	2,55	1,10
2	Bp3	1,20	3,05	1,34	1,98
3	Tc2	0,88	2,13	1,45	-

Kết quả bảng 3.4 cho thấy rằng 3 chủng Aa1, Bp3 và Tc2 có khoảng nhiệt độ khá rộng. Tuy nhiên, chúng sinh trưởng và phát triển tốt nhất trong điều kiện 30 - 40°C. Ở nhiệt độ 20°C, 2 chủng Bp3 và Tc2 phát triển ít, chúng tỏ đây là những chủng ưa ấm. Còn ở nhiệt độ 50°C, chủng Tc2 không thể phát triển được. Với khoảng nhiệt độ như vậy rất phù hợp với thời tiết nóng ẩm của Việt Nam, thuận lợi cho VSV sinh trưởng và phát triển. Theo kết quả nghiên cứu Nguyễn Văn Giang và cộng sự (2016) [40], chỉ có 2/14 chủng vi khuẩn phân lập được thích nghi nhiệt độ 35°C. So với nghiên cứu trên thì các

chủng vi khuẩn phân lập được (Aa1, Bp3) thích nghi với điều kiện nhiệt độ lên đến 50°C.



Hình 3.7. Vi khuẩn phát triển ở các nhiệt độ khác nhau

Kết quả này cho thấy tiềm năng ứng dụng chế phẩm ở những vùng núi khô hạn, đặc biệt là khu vực Tây Nguyên – nơi thường xuyên chịu ảnh hưởng của thời tiết với nền nhiệt cao và các đợt nắng nóng kéo dài liên tục. Như vậy, 3 chủng vi sinh vật được dùng để đánh giá khả năng thích ứng nhiệt độ nêu trên đều có khoảng chịu nhiệt khá rộng.

3.1.5. Khả năng thích ứng pH của các chủng vi sinh vật

Mỗi loại vi sinh vật thường có khả năng và giới hạn thích ứng pH khác nhau. Một số loại có khả năng phát triển trong các môi trường axit, số khác có thể tồn tại và phát triển trong môi trường trung tính hoặc môi trường kiềm. Đối với các chủng VSV này, chủng nào có khả năng thích ứng với khoảng pH rộng hơn thì chủng đó sẽ có khả năng thích nghi, sinh trưởng và phát triển trong các điều kiện sinh thái/môi trường sống khác nhau, đồng thời có thể phát huy hết các tiềm năng ứng dụng của chúng. Do vậy, việc đánh giá được khả năng thích ứng pH của các chủng VSV trong nghiên cứu này là vô cùng quan trọng và hết sức cần thiết.

Kết quả khả năng thích ứng pH của các chủng vi sinh vật phân lập được, được thể hiện tại Bảng 3.5.

Bảng 3.5. Khả năng thích ứng pH của các chủng VSV

TT	Chủng VSV	Số lượng khuẩn lạc ($\times 10^8$ CFU/ml)				
		pH4	pH5	pH6	pH7	pH8
1	Aa1	0,76	2,34	3,16	3,45	2,68
2	Bp3	2,13	2,60	3,24	3,56	2,29
3	Tc2	1,20	1,54	1,67	1,95	1,31

Từ bảng 3.5 nhận thấy đa số các chủng VSV phân lập được có khả năng thích ứng pH rộng từ pH4 – pH8. Với nồng độ pH=7, các chủng vi sinh phát triển mạnh nhất. Đây là nồng độ thích hợp cho cây điều đánh giá khả năng sinh trưởng và phát triển trong các mức pH của vi sinh vật, thuận lợi nhất trong môi trường trung tính hoặc kiềm yếu [19]. Ngoài ra kết quả này cho biết vi sinh vật có khoảng pH sống phù hợp là khoảng pH mà cây điều phát triển được (pH=5,5-7).

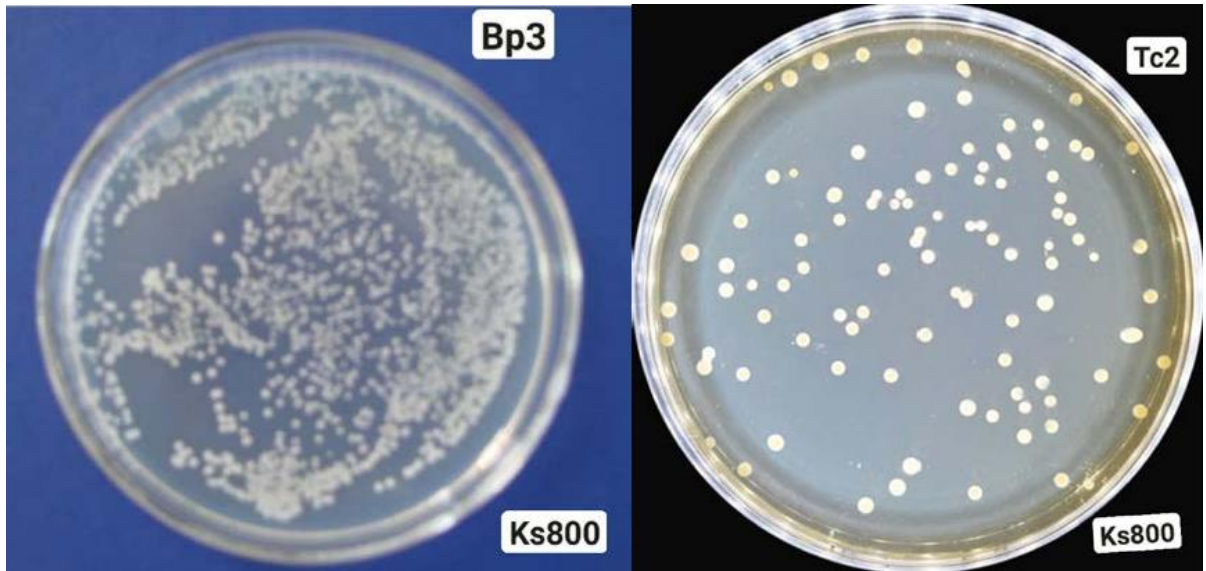
3.1.6. Khả năng kháng kháng sinh của các chủng vi sinh vật

Trong môi trường tự nhiên, các sinh vật tồn tại dưới nhiều hình thức khác nhau, từ cộng sinh đến ký sinh, v.v. Trong điều kiện thích hợp, vi sinh vật có thể phát triển tốt với các vi sinh vật khác nhưng khi môi trường không thuận lợi, vi sinh vật bị ức chế và có thể bị tiêu diệt. Chúng có khả năng tạo hàng rào bảo vệ riêng để sinh trưởng và phát triển trong điều kiện môi trường khắc nghiệt. Theo Nguyễn Xuân Thành (2013), chủng nào có khả năng sinh trưởng và phát triển trong điều kiện nồng độ kháng sinh cao thì chủng đó có khả năng chống chịu với điều kiện môi trường sống tốt hơn, có sức sống cao, sức cạnh tranh lớn hơn dẫn đến phát huy hết các đặc tính tốt nhất.

Bảng 3.6. Mức độ kháng kháng sinh của các chủng VSV

STT	Mức độ KS (mg/l) Chủng VSV	Số lượng khuẩn lạc ($\times 10^8$ CFU/ml)			
		300	500	800	1000
1	Aa1	2,65	2,12	1,06	0,37
2	Bp3	3,05	3,10	2,34	0,47
3	Tc2	2,35	1,32	0,55	0,33

Từ bảng 3.6 nhận thấy 3 chủng Aa1, Bp3 và Tc2 đều có khả năng kháng kháng sinh. Trong đó, chủng Bp3 là chủng có khả năng kháng kháng sinh tốt nhất, sau mới đến 2 chủng Aa1 và Tc2. Các chủng Aa1, Bp3 và Tc2 có khả năng kháng đến 1000 mg/l. Đây được coi là yếu tố quan trọng để lựa chọn chủng để làm chế phẩm sinh học.



Hình 3.8. Khả năng kháng kháng sinh của các chủng vi sinh vật

3.1.7. Kiểm tra tính an toàn của chủng vi sinh vật thực trên thực vật

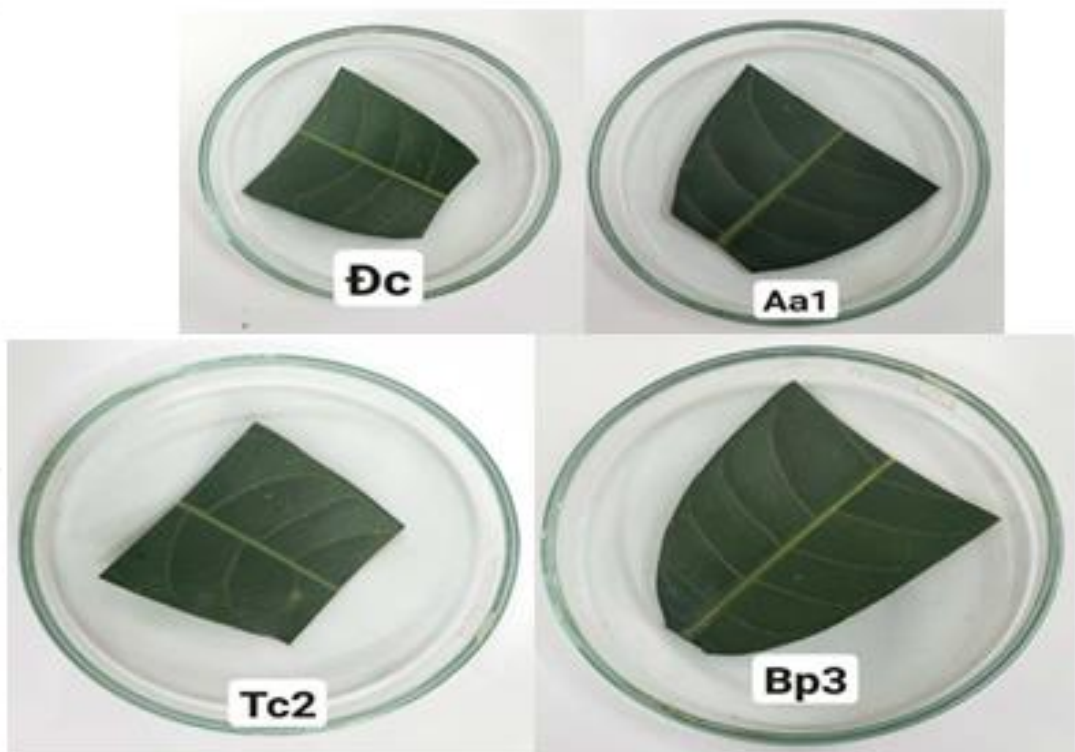
Từ các kết quả phân lập và tuyển chọn, đánh giá khả năng đối kháng với nấm gây bệnh thán thư, đánh giá hoạt tính enzyme, khả năng thích ứng nhiệt độ, thích ứng pH, khả năng kháng kháng sinh của các chủng VSV phân lập, chúng tôi đã chọn ra được 3 chủng vi sinh vật gồm Aa1, Bp3 và Tc2 để kiểm tra tính an toàn của chủng vi sinh vật trên thực vật.

Bảng 3.7. Bảng tổng hợp đặc điểm của 3 chủng VSV tuyển chọn

Các đặc điểm	Chủng		
	Aa1	Bp3	Tc2
Thời gian hình thành khuẩn lạc (giờ)	48	24	36
Hình thái khuẩn lạc	Trắng, nhẵn, hình tròn	Trắng, nhẵn, tròn, trơn, bóng	Trắng, dẹt, khô xù xì, hình tròn biên không đều

Các đặc điểm		Chủng		
		Aa1	Bp3	Tc2
Vòng phân giải cơ chất (<i>D-d; cm</i>)	Protein	2,5	1,5	1,7
	Xenlulose	2,5	2,3	1,4
	Tinh bột	1,9	1,1	1,3
	Chitin	2,15	1,4	1,6
Khả năng thích ứng pH		4-8	4-8	4-8
Khả năng thích ứng nhiệt độ		20° - 50°C	20° - 50°C	20° - 50°C
Số lượng khuẩn lạc tại kháng sinh 1000 mg/l ($\times 10^8$ CFU/ml)		0,37	0,47	0,33

Sau 2 ngày kiểm tra tính an toàn của chủng VSV trên thực vật (lá cây điều) nhận thấy các mẫu lá điều không bị các vết thương tổn xung quanh khu vực cấy VSV. Điều đó chứng tỏ 3 chủng vi sinh vật Aa1, Bp3 và Tc2 an toàn đối với thực vật. Từ đây, chúng tôi tiến hành quan sát đặc điểm hình thái, kích thước, điều kiện sinh trưởng của 3 chủng được chọn.



Hình 3.9. Tính an toàn của chủng vi sinh vật trên lá cây điều

3.2. PHÂN LOẠI SƠ BỘ CHỦNG VI SINH VẬT TUYỂN CHỌN

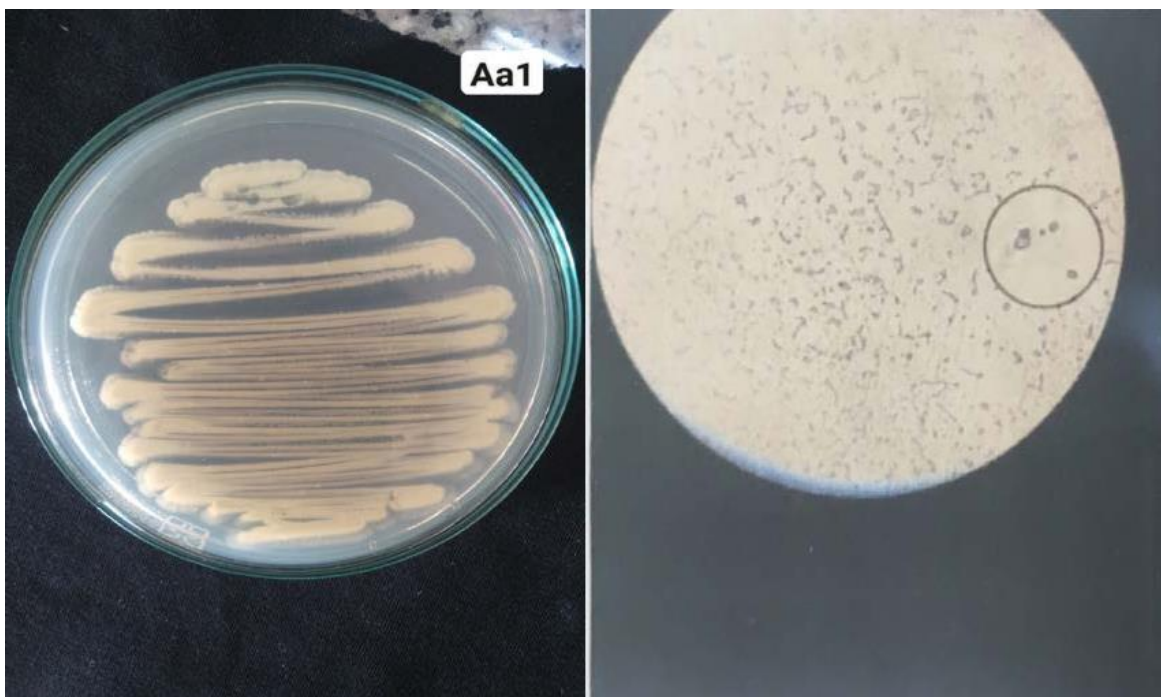
Đặc điểm sinh học của các chủng vi sinh vật tuyển chọn

➤ **Chủng Aa1**

Chủng Aa1 được phân lập từ lá cây mận (cây roi - cây trồng ngay cạnh cây điều tại vườn điều Bình Phước). Khuẩn lạc của chúng có màu trắng ngà, hình tròn nhỏ li ti như đầu tăm, lồi, nhày, trơn, không nhăn, kích thước khuẩn lạc giao động từ 0,5 - 0,8mm. Nhuộm bất màu hồng, Gram âm, tế bào dạng hình cầu có xu hướng sắp xếp kiểu liên cầu khuẩn.

Chủng Aa1 sống được ở các nồng độ pH khác nhau như pH4, pH5, pH6, pH7, pH8 nhưng phát triển tốt nhất ở pH7 với $3,45.10^8$ CFU/ml. Xét về nhiệt độ, chủng Aa1 sinh trưởng và phát triển được từ 20-50°C, phát triển mạnh nhất ở 30°C với mật độ $4,62.10^8$ CFU/ml. Khả năng kháng kháng sinh của chủng cũng rất tốt khi chủng kháng kháng sinh tới 1000 mg/l với mật độ là $0,37.10^8$ CFU/ml.

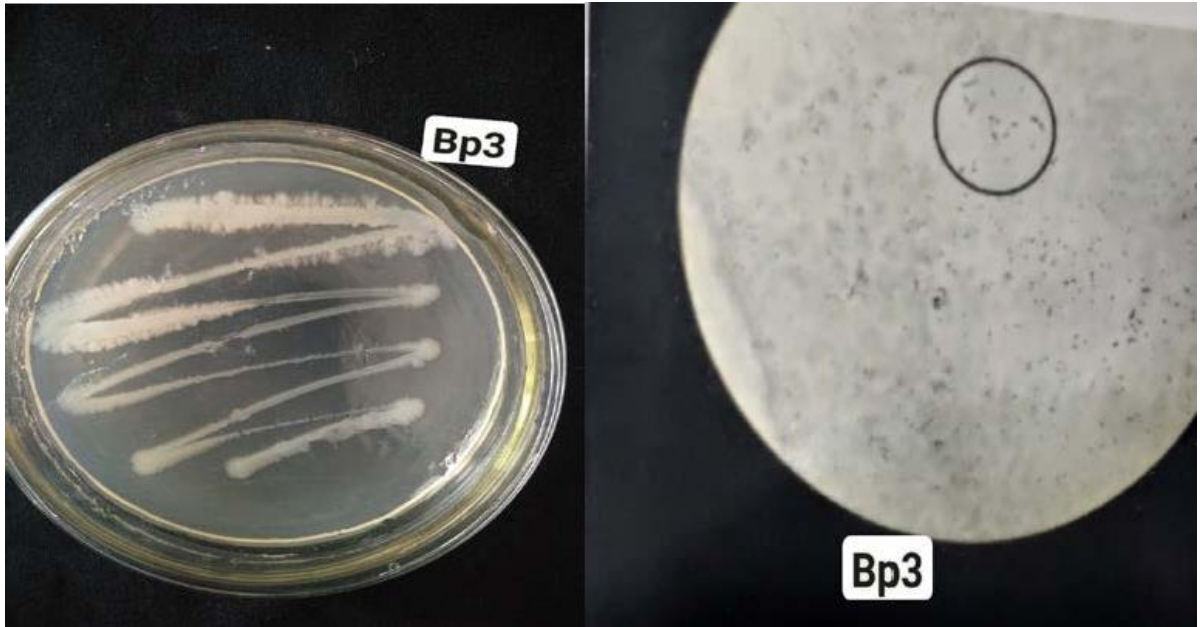
So sánh với với khóa phân loại của Campbell (1971) có thể phân loại sơ bộ chủng Aa1 thuộc nhóm *coccus*.



Hình 3.10. Hình thái khuẩn lạc và tế bào của chủng Aa1

➤ **Chủng Bp3:**

Chủng Bp3 được phân lập từ lá cây mận (cây roi - cây trồng ngay cạnh cây điều tại vườn điều Bình Phước). Khuẩn lạc của chúng có màu trắng, hình tròn, rìa răng cưa nhỏ, khô, nhăn, dẹt, kích thước khuẩn lạc giao động từ 1,1 - 1,8 mm, nhuộm bắt màu tím, Gram dương, tế bào dạng hình que.



Hình 3.11. Hình thái khuẩn lạc và tế bào của chủng Bp3

Chủng Bp3 sinh trưởng và phát triển được ở các nồng độ pH khác nhau (pH4 – pH8). Tại pH7, chủng Bp3 được đánh giá là sinh trưởng và phát triển mạnh nhất với $3,56.10^8$ CFU/ml. Ngoài ra, chủng Bp3 sinh trưởng được trong ngưỡng nhiệt độ từ 20 - 50°C và phát triển mạnh nhất ở 30°C với mật độ $3,05.10^8$ CFU/ml. Khả năng kháng kháng sinh của chủng cũng rất tốt khi chủng kháng kháng sinh tới 1000mg/l với mật độ là $0,47.10^8$ CFU/ml.

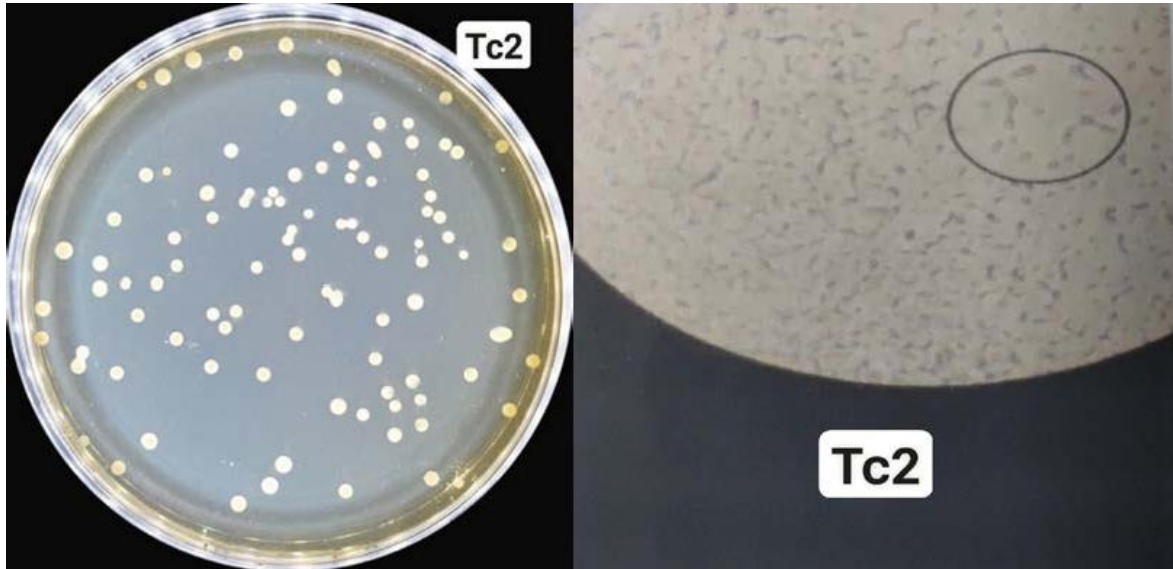
So sánh với với khóa phân loại của Bergey (1989) có thể phân loại sơ bộ chủng Bp3 thuộc chi *Bacillus*.

➤ **Chủng Tc2**

Chủng Tc2 được phân lập từ lá cây điều bị bệnh, khuẩn lạc của chúng có màu trắng ngà, hình tròn, trơn, lồi, bóng kích thước khuẩn lạc dao động từ 1,1 - 2,8 mm, nhuộm bắt màu tím, Gram dương, tế bào dạng hình sợi.

Tương tự như các chủng vi sinh vật Aa1 và Bp3, chủng Tc2 sinh trưởng và phát triển được ở tất cả các nồng độ pH khác nhau: pH4, pH5, pH6, pH7,

pH8, nhưng phát triển tốt nhất ở pH7 với $1,95.10^8$ CFU/ml. Ngoài ra, chủng Tc2 sinh trưởng và phát triển được trong khoảng nhiệt độ từ 20 – 40°C; ở 50°C chủng không mọc và ở 30°C thì chủng Tc2 phát triển mạnh nhất với mật độ là $2,13.10^8$ CFU/ml. Khả năng kháng kháng sinh của chủng được đánh giá là rất tốt khi chúng kháng kháng sinh tới 1000 mg/l với mật độ là $0,33.10^8$ CFU/ml.



Hình 3.12. Hình thái khuẩn lạc và tế bào của chủng Tc2

So sánh với với khóa phân loại của Petter (1991) có thể phân loại sơ bộ chủng Tc2 thuộc nhóm *Actinomycetes*.

3.3. XÂY DỰNG VÀ THỬ NGHIỆM BỘ CHỦNG VI SINH VẬT CÓ KHẢ NĂNG PHÒNG TRỊ BỆNH THÁN THƯ TRÊN CÂY ĐIỀU

Dựa trên kết quả đánh giá hoạt tính sinh học các chủng VSV được tuyển chọn, chúng tôi chọn ra được bộ chủng vi sinh vật có khả năng phòng trị bệnh thán thư trên cây điều, gồm 3 chủng: Aa1, Bp3 và Tc2. Để đảm bảo rằng 03 chủng vi sinh vật này có khả năng phòng trừ bệnh thán thư trên cây điều, chúng tôi tiếp tục tiến hành sản xuất thử nghiệm chế phẩm dạng dịch từ các chủng trên theo nguyên tắc nhân sinh khối riêng rẽ từng chủng, tạo hỗn hợp sinh khối của các chủng theo tỉ lệ 1:1:1.

3.3.1. Kết quả đánh giá chất lượng chế phẩm dạng dịch sau sản xuất

Kết quả đánh giá chất lượng chế phẩm dạng dịch sau sản xuất được trình bày tại Bảng 3.8.

Bảng 3.8. Chất lượng sản xuất chế phẩm

Nhóm VSV	Aa1	Bp3	Tc2	TCVN
VSV hữu ích	1,24 x 10 ⁸	1,35 x 10 ⁸	1,28 x 10 ⁸	> 1x10 ⁸
VSV tạp	0,15 x 10 ⁵	0,19 x 10 ⁵	0,9 x 10 ⁴	< 1x10 ⁵

Quan sát bảng 3.8, nhận thấy chất lượng chế phẩm sau sản xuất đạt tiêu chuẩn chất lượng Việt Nam (TCVN). Ngoài ra, mật độ VSV tạp cũng nằm trong giới hạn cho phép. Do đó, chế phẩm đạt TCVN về chế phẩm vi sinh. Vì vậy có thể sử dụng để thử nghiệm hiệu quả đối kháng với nấm gây bệnh thán thư trên cây điều.

3.3.2. Hiệu quả phòng trị bệnh thán thư trên cây điều của VSV tuyển chọn trong điều kiện nhà lưới

Đường kính vết bệnh thán thư nhân tạo trên lá điều được trình bày tại Bảng 3.9. Phần lớn các công thức xử lý bằng chủng/hỗn hợp chủng VSV có chiều dài vết bệnh thấp hơn công thức đối chứng âm (sử dụng nước cất thanh trùng) và cao hơn công thức đối chứng dương (xử lý bằng thuốc hóa học Carmanthai 800WP) ở mức khác biệt 5%.

Bảng 3.9. Đường kính (mm) vết bệnh trên lá cây điều qua các thời điểm

T T	Công thức	Hiệu quả giảm bệnh (%) trên lá điều qua các thời điểm				
		5NSLB	7NSLB	9NSLB	11NSLB	Trung bình
1	CT1T	12,34 bcd	16,82 bcd	21,12 bc	26,80 bc	19,27 bc
2	CT1TS	11,20 bcd	15,84 cd	20,44 bc	26,76 bc	18,45 bc
3	CT1S	13,92 bc	19,18 abc	23,54 ab	28,08 b	21,18 b
4	CT2T	10,74 cd	14,02 d	17,44 c	23,10 c	16,35 c
5	CT2TS	9,50 d	14,12 d	17,56 c	23,44 bc	16,16 c
6	CT2S	14,14 b	20,08 ab	23,32 ab	27,22 bc	21,19 b
7	CT3T	11,32 bcd	15,80 bcd	20,06 bc	25,74 bc	18,23 bc
8	CT3TS	10,18 bcd	14,68 cd	19,28 bc	25,50 bc	17,41 bc

T T	Công thức	Hiệu quả giảm bệnh (%) trên lá điều qua các thời điểm				
		5NSLB	7NSLB	9NSLB	11NSLB	Trung bình
9	CT3S	12,86 bc	18,16 abc	22,52 ab	27,02 b	20,14 b
10	CT4T	9,72 d	15,66 cd	20,92 bc	23,58 bc	17,49 bc
11	CT4TS	5,74 e	7,46 e	10,04 d	13,24 d	9,12 d
12	CT3S	13,36 bc	19,42 abc	22,16 b	27,20 bc	20,54 b
13	Carbendazim	3,38 e	4,76 e	7,24 d	10,36 d	6,44 d
14	Đối chứng	17,38 a	22,29 a	26,94 a	32,44 a	24,76 a
Mức ý nghĩa		*	*	*	*	*
CV (%)		21,66	18,31	15,04	13,60	15,26

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

NSLB: ngày sau khi lây bệnh nhân tạo

T: phun 2 ngày trước khi lây bệnh nhân tạo

S: phun 2 ngày sau khi lây bệnh nhân tạo

TS: phun kết hợp 2 ngày trước và 2 ngày sau khi lây bệnh nhân tạo

Thời điểm 5 ngày sau lây bệnh, các chủng VSV thí nghiệm ở các thời điểm xử lý đều có chiều dài vết bệnh thấp hơn so với công thức đối chứng âm. Trong đó, CT4TS (*hỗn hợp chủng tuyển chọn Aa1, Bp3 và Tc2*) ở thời điểm phun kết hợp 2 ngày trước và 2 ngày sau LBNT có đường kính vết bệnh là 5,74 mm, thấp tương đương với công thức đối chứng dương (3,38 mm) và thấp hơn (có ý nghĩa thống kê) so với các công thức khác.

Thời điểm 7 ngày sau lây bệnh, công thức CT4TS ở thời điểm phun kết hợp trước và sau 2 ngày LBNT có chiều dài vết bệnh là 7,46 mm và thấp gần bằng đối chứng dương (4,76 mm). Thời điểm 9 ngày sau lây bệnh, chiều dài vết bệnh trên lá điều ở các công thức đều tăng so với thời điểm 7 ngày sau lây bệnh. Trong đó, công thức CT4TS ở thời điểm phun kết hợp trước - sau có

chiều dài vết bệnh thấp là 10,04 mm, thấp gần tương đương với công thức đối chứng dương (7,24 mm) và thấp hơn có ý nghĩa thống kê so với các công thức còn lại. Tại thời điểm 11 ngày sau lây bệnh, chiều dài các vết bệnh trên lá điều đã rất lớn. Tuy nhiên, công thức CT4TS vẫn có đường kính vết bệnh thấp là 13,24 mm, thấp gần tương đương với công thức đối chứng dương (10,36 mm) và thấp hơn có ý nghĩa thống kê so với các công thức còn lại.

Nhìn chung, qua các thời điểm khảo sát nhận thấy các công thức thí nghiệm sử dụng các chủng VSV tuyển chọn đều có khả năng phòng trị bệnh thán thư trên cây điều và thể hiện với nhiều mức độ khác nhau. Trong đó, hỗn hợp chủng Aa1, Bp3 và Tc2 ở công thức CT4TS xử lý ở thời điểm phun kết hợp trước 2 ngày và sau 2 ngày LBNT có đường kính vết bệnh thấp ở thời điểm 11 ngày sau khi LBNT gần tương đương với công thức đối chứng dương sử dụng thuốc hóa học Carmanthai 800WP.

Hiệu quả giảm bệnh (HQGB) của các chủng VSV tuyển chọn thí nghiệm được trình bày tại Bảng 3.10. Thời điểm 5 ngày sau lây bệnh, các chủng VSV thí nghiệm đều thể hiện được hiệu quả giảm bệnh với nhiều mức độ khác nhau. Trong đó, công thức sử dụng hỗn hợp chủng tuyển chọn Aa1, Bp3 và Tc2 ở thời điểm phun kết hợp trước 2 ngày và sau 2 ngày LBNT cho hiệu quả giảm bệnh là 66,97%, cao gần bằng công thức đối chứng dương sử dụng thuốc hóa học Carbendazim (80,55%), cao hơn và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các công thức còn lại.

Bảng 3.10. Hiệu quả giảm bệnh (%) trên lá điều qua các thời điểm

T T	Công thức	Hiệu quả giảm bệnh (%) trên lá điều qua các thời điểm				
		5NSLB	7NSLB	9NSLB	11NSLB	Trung bình
1	CT1T	29,00 bcd	24,54 bcd	21,60 bc	17,39 bcd	22,17 bcd
2	CT1TS	35,56 bcd	28,94 bc	24,13 bc	17,51 bcd	25,48 bcd
3	CT1S	19,91 cd	13,95 cde	12,62 cd	13,44 d	14,46 d
4	CT2T	38,20 bc	37,10 b	35,26 b	28,79 b	33,97 b
5	CT2TS	45,34 b	36,65 b	34,82 b	27,74 bc	34,73 b

T T	Công thức	Hiệu quả giảm bệnh (%) trên lá điều qua các thời điểm				
		5NSLB	7NSLB	9NSLB	11NSLB	Trung bình
6	CT2S	18,64 d	9,91 de	13,44 cd	16,09 cd	14,42 d
7	CT3T	34,87 bcd	29,12 bcd	25,54 bc	20,65 bcd	26,37 bcd
8	CT3TS	41,43 bcd	34,14 bc	28,43 bc	21,39 bcd	29,68 bcd
9	CT3S	26,01 cd	18,53 cde	16,41 cd	16,71 d	18,66 d
10	CT4T	44,07 b	29,74 bc	22,35 bc	27,31 bc	29,36 bc
11	CT4TS	66,97 a	66,53 a	62,73 a	59,19 a	63,17 a
12	CT3S	23,13 cd	12,88 cde	17,74 c	16,15 cd	17,04 cd
13	Carbendazim	80,55 a	78,65 a	73,13 a	68,06 a	74,01 a
Mức ý nghĩa		*	*	*	*	*
CV (%)		36,05	38,63	36,36	32,61	33,63

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

NSLB: ngày sau khi lây bệnh nhân tạo

T: phun 2 ngày trước khi lây bệnh nhân tạo

S: phun 2 ngày sau khi lây bệnh nhân tạo

TS: phun kết hợp 2 ngày trước và 2 ngày sau khi lây bệnh nhân tạo

Thời điểm 7 ngày sau LBNT, hiệu quả giảm bệnh ở các công thức đều giảm so với 5 ngày LBNT. Tuy nhiên, công thức CT4TS ở thời điểm phun kết hợp trước và sau cho HQGB là 66,53%, cao gần tương đương với công thức đối chứng dương sử dụng thuốc hóa học Carbendazim 800 WP (78,65%), cao hơn và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các công thức còn lại.

Ở thời điểm 9 ngày sau LBNT, công thức CT4TS sử dụng hỗn hợp chủng VSV tuyển chọn thí nghiệm cho HQGB là 62,73% khi phun kết hợp trước 2 ngày và sau 2 ngày LBNT. HQGB này cao gần tương đương với công thức đối chứng dương sử dụng thuốc hóa học Carbendazim 800 WP (73,13%). Tương tự, ở thời điểm 11 ngày sau LBNT và phun kết hợp trước + sau, công thức CT4TS tiếp tục cho HQGB tương đương với công thức đối

chúng dương, khi mà công thức CT4TS cho HQGB đạt 59,19%, còn công thức đối chứng dương sử dụng thuốc hóa học Carbendazim 800 WP đạt 68,06%, cao hơn và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các công thức còn lại.

Tóm lại, kết quả thí nghiệm thu được cho thấy 3 chủng VSV tuyển chọn Aa1, Bp3 và Tc2 cho hiệu quả phòng trừ nấm *C. gloeosporioides* gây bệnh thán thư trên cây điều trong điều kiện nhà lưới với các mức độ khác nhau. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Hồ Như Thiện (2012) khi đánh giá hiệu quả phòng trị thán thư trên ớt bằng biện pháp sinh học và hóa học trong điều kiện nhà lưới, kết quả ghi nhận 6 công thức Benomyl, VK159, VK80, 159 + 80, HHVK + 1/4 Benomyl, 1/4 Be đều có khả năng ức chế sự phát triển của bệnh thán thư trên ớt, trong đó nghiệm thức hỗn hợp vi khuẩn + 1/4 Benomyl có hiệu quả cao nhất, các nghiệm thức khác có hiệu quả tương đương nhau [41].

Tuy nhiên, hiệu quả giảm bệnh thán thư trên cây điều được đánh giá tốt nhất khi sử dụng hỗn hợp chủng Aa1, Bp3 và Tc2 (hay nói cách khác là sử dụng chế phẩm dạng dịch của 3 chủng VSV tuyển chọn Aa1, Bp3 và Tc2) phun kết hợp trước và sau 2 ngày khi chủng bệnh có chiều dài vết bệnh thấp và hiệu quả giảm bệnh tương đương công thức đối chứng dương (xử lý thuốc hóa học Carmanthai 800WP) đến thời điểm 11 ngày sau lây bệnh nhân tạo. Kết quả này tương tự như kết quả nghiên cứu của Lê Minh Tường (2014), cho rằng biện pháp xử lý kết hợp phun trước - sau cho thấy hiệu quả quản lý tốt bệnh thán thư trên gấc do nấm *Colletotrichum* spp. gây ra [42]. Ngoài ra, kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu của Đặng Xuân Ánh (2011) khi khảo sát khả năng phòng trị bệnh thán thư trên dưa hấu bằng tác nhân vi khuẩn vùng rễ đã ghi nhận biện pháp có hiệu quả phòng trị cao nhất là biện pháp phun trước và biện pháp phun kết hợp trước + sau 2 ngày chủng bệnh [43]. Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu của Đinh Hồng Thái (2014) khi dùng tác nhân xạ khuẩn để phòng trị bệnh đốm vằn do nấm *R. solani* Kuhn gây ra đã ghi nhận biện pháp phun kết hợp trước - sau cho hiệu quả cao hơn

và khác biệt so với các biện pháp xử lý khác [44]. Sigeo (1993) cho rằng, khi tác nhân đối kháng và mầm bệnh cùng định vị tại một vị trí sẽ dẫn đến sự cạnh tranh trực tiếp với nhau [45]. Khi xử lý chủng vi sinh vật lên lá điều 2 ngày trước khi LBNT thì các chủng VSV này đã định vị trên bề mặt lá và có thể chúng sẽ tiết ra một số chất như chất kháng sinh, enzyme phân giải vách tế bào nấm bệnh (phân giải chitin, β -glucan, v.v.) hay sinh ra siderophore cạnh tranh nguồn vi lượng sắt... Khi nấm bệnh xuất hiện lúc này sẽ gặp điều kiện bất lợi cho sự phát triển của bào tử nấm và khi xử lý VSV thêm một lần nữa ở thời điểm 2 ngày sau khi lây bệnh thì điều đó đồng nghĩa với việc đã bổ sung thêm nguồn VSV, sẽ càng làm ức chế và có thể gây chết nấm bệnh.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

KẾT LUẬN

Trong khuôn khổ nội dung nghiên cứu, Luận văn thu được các kết quả như sau:

Từ các mẫu nghiên cứu gồm: lá điều, quả giả điều, đất trồng điều hay một số mẫu lá cây vú sữa, lá cây roi được thu thập trong cùng một khuôn viên tại vườn điều tỉnh Bình Phước đã phân lập được 28 chủng vi sinh vật gồm: 20 chủng là vi khuẩn (chiếm 72%), 4 chủng là nấm men và nấm mốc (chiếm 14%) và 4 chủng là xạ khuẩn (chiếm 14%).

Đã tuyển chọn được 3 chủng vi sinh vật có khả năng đối kháng với nấm *Colletotrichum gloeosporioides* bao gồm chủng Aa1, Bp3 và Tc2, trong đó: Chủng Aa1 là vi khuẩn thuộc nhóm *Coccus*, chủng Bp3 là vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* và chủng Tc2 là xạ khuẩn thuộc nhóm *Actinomycetes*. Chủng Aa1 có vòng đối kháng với nấm *C. gloeosporioides* cao nhất đạt 7 mm. 3 chủng này đều có hoạt tính enzyme khá tốt với hiệu số vòng phân giải đạt từ 0,6-2,5 cm; khả năng thích ứng pH được đánh giá tốt nhất ở pH=7; khoảng nhiệt độ thích ứng khá rộng và phát triển tốt nhất ở khoảng 30-40°C; có khả năng kháng kháng sinh đến 1000 mg/l.

Bộ chủng giống vi sinh vật được tuyển chọn có hoạt tính kháng bệnh thán thư trên cây điều gồm Aa1, Bp3 và Tc2. Sử dụng chế phẩm sinh học sản xuất từ các vi sinh vật tuyển chọn phun kết hợp trước và sau 2 ngày khi chủng bệnh có chiều dài vết bệnh thấp, cho hiệu quả phòng trừ bệnh cao gần tương đương công thức xử lý bằng thuốc hóa học Carmanthai 800WP.

KIẾN NGHỊ

Tiếp tục nghiên cứu đánh giá chế phẩm VSV trên ở quy mô ngoài đồng để đánh giá chính xác khả năng phòng trị bệnh thán thư trên cây điều phục vụ sản xuất điều hữu cơ.

DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. <https://hatdieu.info/hat-dieu-binh-phuoc-va-cay-dieu-viet-nam/>
2. Silue Nakpalo, Soro Sibirina, Kone Tchoa, Abo Kouabenan, Kone Mongomake and Kone Daouda., 2017, Parasitical Fungi in Cashew (*Anacardium occidentale* L.) Orchard of Cote d'Ivoire, *Plant Pathology Journal*, 16, pp. 82-88.
3. Sittisack Phoulivong, Lei Cai, Hang Chen, Eric H. C. McKenzie, Kamel Abdelsalam, Ekachai Chukeatirote, Kevin D. Hyde, 2010, *Colletotrichum gloeosporioides* is not a common pathogen on tropical fruits, *Fungal Diversity*, 44, pp. 33–43, DOI: 10.1007/s13225-010-0046-0
4. <https://www.ifoam.bio/why-organic/organic-landmarks/definition-organic>
5. <https://binhphuoc.gov.vn/vi/news/hoat-dong-huyen-thi-xa-thanh-pho/nguon-goc-dien-tich-san-luong-va-nang-suat-dieu-binh-phuoc-24130.html>
6. A. V. Meera Manjusha, P. K. Laya, Amal Premachandran & M. Veena, 2023, First report of wilt disease in cashew (*Anacardium occidentale* L.) caused by *Fusarium decemcellulare* in Kerala, India, *CABI Agriculture and Bioscience*, 4, pp. 7.
7. Majune DJ, Masawe PA, Mbega ER, 2018, Status and management of cashew disease in Tanzania. *International Journal Environment, Agriculture Biotechnology*, 3(5), pp. 264441.
8. Davis K., 1999, Cashew, *Echo Technical Note*, June 14, 2006.
9. Azam-Ali S.H., Judge E.C., 2001, Small – scale cashew nut processing. Coventry (UK): ITDG Schumacher Centre of Technology and Development Bourton on Dunsmore.
10. Surendra G.B.B., 1998, "Integrated production practices of cashew in Sri Lanka" Online, Available at <http://www.fao.org/docrep/005/ac451e/ac451e08.htm> [Retrieved March 2006].
11. Magboo, 1998, Technology transfer, promotion and commercialization: the case of cashew-IRDP, *Philippine Journal of Crop Science*, 23(1), pp. 58-60.
12. Phạm Văn Biên, Nguyễn Thanh Bình, 1999, Hiện trạng nghiên cứu và sản xuất điều và định hướng phát triển điều trong giai đoạn 1999-2010, *Kỷ yếu hội thảo phát triển điều đến năm 2010*, tr. 64-67.
13. Lê Xuân Phương, 2016, *Giáo trình vi sinh vật học môi trường*, NXB Nông nghiệp, Hà Nội.
14. Lương Anh Tuấn, 2005, *Nghiên cứu một số sâu bệnh chính trên cây điều tại Quảng Ngãi*, Luận văn thạc sĩ nông nghiệp, Huế.
15. Nguyễn Xuân Thành, 2006, *Thành phần sâu hại điều và thiên địch của chúng tại Quảng Ngãi và Bình Định*, Báo cáo khoa học hội nghị khoa học kỹ thuật bảo vệ thực vật toàn quốc lần thứ II, Nhà xuất bản nông nghiệp, Hà

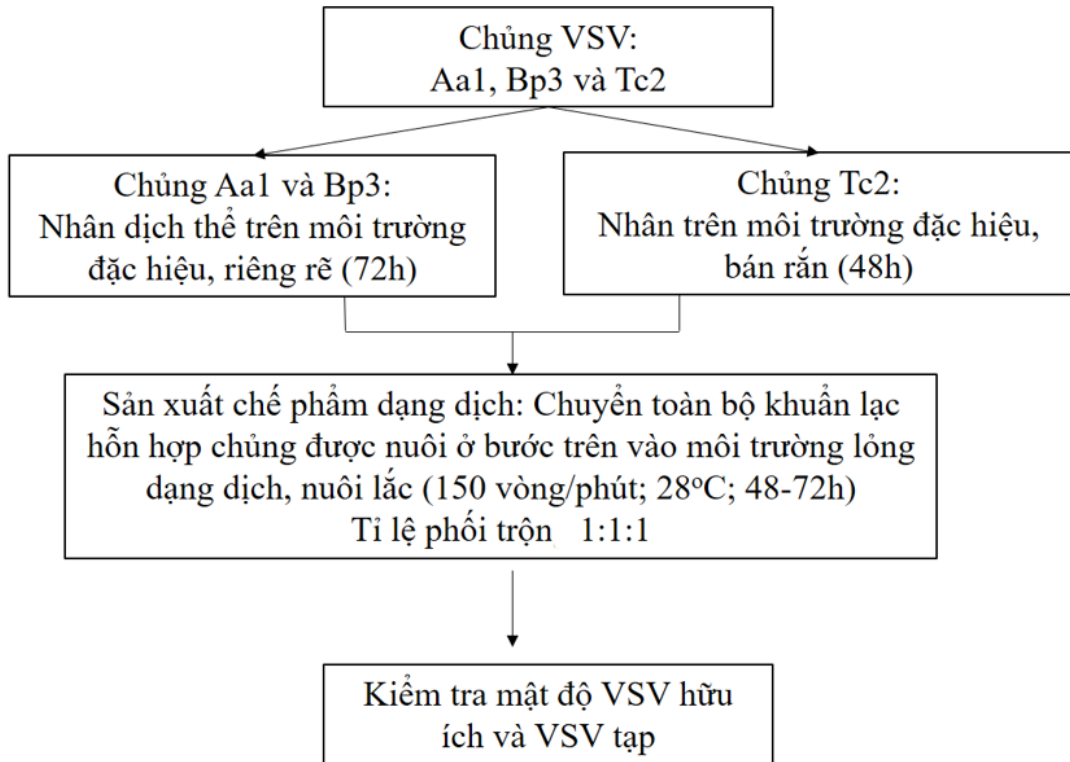
- Nội, tr. 100-106.
16. Nguyễn Thị Suong, 2005, *Điều tra thành phần sâu, bệnh hại điều và sử dụng biện pháp hóa học phòng trừ đối tượng gây hại chủ yếu tại tỉnh Quảng Nam*, Luận văn thạc sĩ nông nghiệp, Huế.
 17. Nguyễn Văn Ngân, 2006, *Kết quả nghiên cứu bước đầu về sâu bệnh chính hại điều và thử nghiệm các biện pháp phòng trừ tại vùng Duyên hải Nam Trung Bộ từ 2000-2003*, Tuyển tập kết quả nghiên cứu khoa học kỹ thuật nông nghiệp 2001-2005, Quy Nhơn, tr. 173-184.
 18. Nguyễn Thanh Phương, 2007, *Nghiên cứu một số biện pháp kỹ thuật chính nhằm phát triển cây điều (*Anacardium occidentale* L.) ở tỉnh Bình Định*, Luận án tiến sĩ nông nghiệp, Viện Khoa học nông nghiệp Việt Nam.
 19. Phạm Văn Biên, 2005, *Nghiên cứu mối quan hệ giữa sản xuất, chế biến và thị trường tiêu thụ các sản phẩm điều (*Anacardium occidentale* L.)*, Viện Khoa học kỹ thuật nông nghiệp miền Nam, Thành phố Hồ Chí Minh.
 20. Đường Hồng Dật, 1999, *Kỹ thuật trồng và triển vọng phát triển cây điều*, Nhà xuất bản nông nghiệp, Hà Nội.
 21. Tạ Minh Sơn, 2006, *Kết quả nghiên cứu quy trình nhân giống vô tính cây điều bằng phương pháp ghép vô tính ở vùng Duyên hải Nam Trung Bộ*, Tuyển tập kết quả nghiên cứu khoa học kỹ thuật nông nghiệp 2001-2005, tr. 136-137.
 22. Silue Nakpalo, Soro Sibirina, Kone Tchoa, Abo Kouabenan, Kone Mongomake and Kone Daouda., 2017, Parasitical Fungi in Cashew (*Anacardium occidentale* L.) Orchard of Cote d'Ivoire, *Plant Pathology Journal*, 16, pp. 82-88.
 23. Phoulivong S., 2011, Colletotrichum, naming, control, resistance, biocontrol of weeds and current challenges, *Current Research in Environmental & Applied Mycology*, 1(1), pp. 53–73.
 24. <https://www.zun.vn/tai-lieu/giao-trinh-su-dung-bien-phap-sinh-hoc-nghe-quan-ly-dich-hai-tong-hop-54627/>
 25. <https://hatdieu.info/phuong-phap-quan-ly-dich-hai-tong-hop-tren-cay-dieu/>
 26. <https://www.fao.org.vn/sau-benh/benh-than-thu/>
 27. Marrone P.G., 2019, Pesticidal natural products-status and future potential. *Pest. Manag. Sci.*, pp. 5433, DOI: 10.1002/ps.5433.
 28. Seiber J.N., Duke J., Gross A.D., 2018, Pest management with biopesticides, *Front. Agr. Sci. Eng.*, 5, pp. 295-300.
 29. <https://vjst.vn/vn/Pages/chitiettin.aspx?IDNews=8118&tieude=thuoc-bao-ve-thuc-vat-sinh-hoc--lua-chon-tat-yeu-cua-nong-nghiep-ben-vung.aspx>
 30. Võ Minh Phát, 2010, Sản xuất thuốc trừ sâu *B. thuringiensis* bằng bùn thải, Luận văn Thạc sĩ Công nghệ Sinh học, Đại học Bách Khoa Tp. HCM.

31. Lê Đăng Quang, Vũ Đình Hoàng, Phạm Quang Dương, Nguyễn Trung Huy, Trần Đại Lâm, 2020, Thuốc BVTV sinh học tại Việt Nam giai đoạn 2009-2019: Hiện trạng nghiên cứu và triển vọng phát triển Biopesticides tại Việt Nam, *Tạp chí Bảo vệ Thực vật*, 5, tr. 50-56.
32. Ramaiana Soares Melo, Águida Maria Albuquerque Azevedo, Antônio Mateus Gomes Pereira, Renan Rhonalty Rocha, Rafaela Mesquita Bastos Cavalcante, Maria Nágila Carneiro Matos, Pedro Henrique Ribeiro Lopes, Geovany Amorim Gomes, Tigressa Helena Soares Rodrigues, Hécio Silva Dos Santos, Izabelly Linhares Ponte, Renata Albuquerque Costa, Gabriel Sousa Brito, Francisco Eduardo Aragão Catunda Júnior, Victor Alves Carneiro., 2019, Chemical Composition and Antimicrobial Effectiveness of *Ocimum gratissimum* L. Essential Oil Against Multidrug-Resistant Isolates of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, *Molecules*, 24(21), pp. 3864.
33. Vinh H., Nam T.Đ., Nghị N.P., Cường H.H., 2017, Nghiên cứu ảnh hưởng của các biện pháp phòng trừ sâu bệnh chính gây hại trên vườn điều kinh doanh tại vùng Duyên Hải Nam Trung Bộ, *Tạp chí Khoa học Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam*, 8(105).
34. Dũng P.Đ., Nghĩa Đ.H., Hiệt H.Đ., Thắng N.T., Lê B.V., Hưng L.T., 2017, Nghiên cứu khả năng kháng nấm *Colletotrichum gloeosporioides* gây bệnh thán thư trên cây ớt (*Capsicum frutescens* L.) của chế phẩm oligochitosan - nano silica (SiO₂), *Tạp chí Khoa học Đại học Cần Thơ*, 48, tr. 66-70. <https://doi.org/10.22144/ctu.jvn.2017.618>.
35. Trần Ngọc Hùng, Nguyễn Thị Liên Thương, 2016, Nghiên cứu tạo chế phẩm từ *Trichoderma* sp. kiểm soát bệnh thán thư do *Colletotrichum* spp. gây ra trên cây ớt (*Capsicum frutescens*), *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 45b, tr. 86-92.
36. <https://nangluongsachvietnam.vn/d6/vi-VN/news/Tao-che-pham-sinh-hoc-tu-vo-hat-dieu-va-la-cay-da-quy-6-1956-9124>.
37. Saadoun, I., and Muhana, A., 2008, Optimal production conditions, extraction, partial purification and characterization of inhibitory compound(s) produced by *Streptomyces* Ds-104 isolate against multi-drug resistant *Candida albicans*, *Curr. Trends Biotechnol. Pharm.*, 2(2), pp. 402–432.
38. Q.B. Dang, T.P.T. Nguyen, V.P. Nguyen, T.S. Dinh, T. T. Ninh, V. H. Nguyen, V.L. Tran, T.T.L. Nguyen, 2017, Establishment of In vitro Propagation Protocol for Golden *Camellia* (*Camellia* sp.), *Vietnam J.Agric. Sci.*, vol. 15, no. 12, pp. 1664-1678.
39. Sử Đ.V., Tường L.M., 2016, Hiệu quả phòng trị của xạ khuẩn đối với bệnh thán thư trên cây ớt do nấm *Colletotrichum* sp., *Tạp chí Khoa học Đại học Cần Thơ*, CĐ Nông nghiệp 2016, tr. 28-35. <https://doi.org/10.22144/ctu.jsi.2016.067>.

40. Nguyễn Văn Giang, Trần Thị Đào, Trịnh Thúy An, 2016, Phân lập và đánh giá đặc điểm sinh học của một số chủng vi khuẩn nội sinh từ rễ cây nha đam, *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*, 14(5), tr. 772-778.
41. Hồ Như Thiện, 2012, *Hiệu quả phòng trị bệnh thán thư trên ớt (Colletotrichum sp.) bằng biện pháp sinh học và hóa học trong điều kiện phòng thí nghiệm và nhà lưới*, Luận văn tốt nghiệp ngành Bảo vệ thực vật, Khoa Nông nghiệp và Sinh học Ứng dụng, Đại học Cần Thơ.
42. Lê Minh Tường và Ngô Thị Kim Ngân, 2014, Phân lập và đánh giá khả năng đối kháng của các chủng xạ khuẩn đối với nấm *Rhizoctonia solani* Kuhn gây bệnh đốm vằn trên lúa. *Tạp chí khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, Chuyên đề Nông nghiệp, tr. 113-119.
43. Đặng Xuân Ánh, 2011, *Nghiên cứu biện pháp phòng trị bệnh thán thư trên dưa hấu (Colletotrichum lagenarium) bằng vi khuẩn vùng rễ trong điều kiện nhà lưới*, Luận văn tốt nghiệp ngành Bảo vệ thực vật, Khoa Nông nghiệp và Sinh học Ứng dụng, Đại học Cần Thơ.
44. Đinh Hồng Thái, 2014, *Đánh giá khả năng phòng trị của các chủng xạ khuẩn đối với nấm gây bệnh đốm vằn Rhizotonia solani Kuhn trong điều kiện nhà lưới và khảo sát một số cơ chế đối kháng của chúng*, Luận văn tốt nghiệp cao học ngành Bảo vệ thực vật, Khoa Nông nghiệp và Sinh học Ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ.
45. Sigeo D. C., 1993, Bacterial plant pathology: cell and molecular aspects, *Published by the press syndicate of the University of Cambridge, United Kingdom*, 325p.

PHỤ LỤC

Phụ lục 1: Quy trình sản xuất chế phẩm dạng dịch từ VSV tuyển chọn



Phụ lục 2: Các loại môi trường sử dụng trong nghiên cứu của Luận văn

- Môi trường Gause (g/l): Tinh bột 1000; KH₂PO₄ 25,0; MgSO₄ 25,0; KNO₃ 50,0; NaCl 25,0; FeSO₄ 0,5; nước cất 1000 ml; pH 6,5-7,0.
- Môi trường Hansen (g/l): Glucose 50,0; Peptone 10,0; KH₂PO₄ 3,0; thạch 20,0; nước cất 1000 ml; pH 6,5.
- Môi trường Nutrient Agar (NA) (g/l): Nutrient Agar 23,0; nước cất 1000 ml; pH 7,0.
- Môi trường Sabouraud (g/l): Dextrose 40,0; Peptone 10,0; thạch 15,0; nước cất 1000 ml; pH 7,0.
- Môi trường Plate Count Agar (PCA) (g/l): Plate Count Agar 23,5; nước cất 1000 ml; pH 6,5 – 7,0.
- Môi trường VSV tổng hợp Tripton – Glucose – Agar (TGA) (g/l): Peptone 5,0; Glucose 4,0; Cao nấm men 2,5; thạch 15,0; nước cất 1000 ml; pH 6,5 – 7.