

crop is from 30 - 35 plants/m<sup>2</sup> and in the spring crop is 20 - 25 plants/m<sup>2</sup>. The appropriate dose of fertilizer for variety ĐT35 in Winter crop is 30 - 40 kg N + 60 - 80 kg P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> + 60 - 80 kg K<sub>2</sub>O + 800 kg Song Gianh microbial organic fertilizer/ha. The net profit and the ratio of value per capital are significantly high in Winter crop (37.666 - 37.943 million VND; 1.38 - 1.40) and in Spring crop (34.104 - 41.563 million VND; 1.48 - 1.57).

**Keywords:** Soybean variety ĐT35, sowing density, fertilizer dose

Ngày nhận bài: 11/5/2021

Ngày phản biện: 01/6/2021

Người phản biện: PGS.TS. Nguyễn Tấn Hình

Ngày duyệt đăng: 29/6/2021

## NGHIÊN CỨU ỨNG DỤNG VI KHUẨN NỘI SINH *Bacillus velezensis* VY03 TRONG PHÒNG CHỐNG BỆNH BẠC LÁ LÚA

Nguyễn Thị Hiếu Thu<sup>1</sup>, Nguyễn Duy Tới<sup>1</sup>, Lại Tiến Dũng<sup>2</sup>,  
Nguyễn Kim Nữ Thảo<sup>3</sup>, Đinh Thuý Hằng<sup>1</sup>

### TÓM TẮT

Chủng vi khuẩn nội sinh lúa *Bacillus velezensis* VY03 có hoạt tính đối kháng cao với vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) gây bệnh bạc lá lúa. Điều kiện nuôi cấy tối ưu để chủng VY03 sinh trưởng và sinh hoạt chất đối kháng *Xoo* là môi trường có pH 7, NaCl 10 g/L, sucrose là nguồn carbon và năng lượng, cao thịt là nguồn nitơ, nhiệt độ nuôi cấy là 37°C, thời gian nuôi cấy 40 giờ. Thí nghiệm nhà lưới đánh giá hiệu quả phòng chống bệnh bạc lá trên giống lúa Bắc Thơm số 7 cho thấy hiệu quả kiểm soát bệnh cao (71,6%) khi sử dụng dịch nuôi chủng VY03 theo chế độ phòng-chống (phun trước và sau khi nhiễm *Xoo*). Bước đầu đánh giá hiệu quả kiểm soát bệnh bạc lá cũng trên giống lúa Bắc Thơm số 7 trong điều kiện tự nhiên cho thấy, chủng VY03 có hiệu quả kiểm soát bệnh tốt khi được áp dụng kết hợp xử lý đất ươm mạ và phun khi xuất hiện bệnh, hiệu quả đạt 75 - 85%. Bên cạnh đó, sử dụng chủng VY03 còn làm tăng năng suất lúa ~12% so với đối chứng không xử lý. Kết quả thu được mở ra tiềm năng ứng dụng vi khuẩn nội sinh trong kiểm soát sinh học đối với bệnh bạc lá, đồng thời kích thích tăng trưởng của cây, góp phần giảm thiểu sử dụng thuốc hóa học trong canh tác lúa.

**Từ khóa:** Bệnh bạc lá lúa (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*), vi khuẩn nội sinh lúa (*Bacillus velezensis*), kiểm soát sinh học

### I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh bạc lá được phát hiện lần đầu tiên tại vùng Fukuoko, Kyushu ở Nhật Bản năm 1884 (Mizukami and Wakimoto, 1969). Bệnh đã xuất hiện vào những năm 1960 ở Đông Nam Á, hiện nay đây cũng là nơi bệnh diễn ra phổ biến nhất (Goto, 2012). Trên toàn cầu, bệnh bạc lá có thể làm thiệt hại tới 50% năng suất, gây ảnh hưởng lớn đến nền kinh tế của các quốc gia trồng lúa (Mew, 1992).

Vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) là nguyên nhân gây bệnh bạc lá lúa. Vi khuẩn này xâm nhập vào lá thông qua các vết thương hay lỗ khí khổng, thủy khổng, sinh trưởng gây tắc nghẽn các mạch dẫn làm cho lá lúa không nhận được chất

dinh dưỡng và bị héo khô (Huang *et al.*, 1997). *Xoo* có thể lây lan nhanh qua gió, mưa và nước tưới, cũng như qua hạt giống và đất (Murty & Devadath, 1984). Bệnh bạc lá thường phát sinh với các dấu hiệu điển hình là lá héo úa và cháy khô từ ngọn xuống, bắt đầu ở giai đoạn cây đẻ nhánh, đỉnh điểm ở thời kỳ ra hoa, có thể kéo qua thời kỳ trổ hạt và chín (Mew *et al.*, 1993). Khí hậu ẩm và mưa là điều kiện thuận lợi để bệnh bùng phát và lan rộng (Adhikari & Basnyat, 1999). Ở Việt Nam, theo báo cáo của Cục Bảo vệ thực vật, trong những năm gần đây diện tích lúa bị bệnh bạc lá tăng lên mỗi năm, đặc biệt diện tích bệnh nặng dẫn đến mất trắng tăng trên 10 nghìn ha, phản ánh mức độ nghiêm trọng của

<sup>1</sup> Viện Vi sinh vật và Công nghệ sinh học, Đại học Quốc gia Hà Nội

<sup>2</sup> Viện Bảo vệ thực vật, Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam

<sup>3</sup> Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

bệnh. Thông thường bệnh được trị bằng các thuốc hóa học như thuốc diệt vi khuẩn Bismertiazol, thuốc diệt nấm Zineb Bul 80WP (Zhu *et al.*, 2013). Tuy nhiên, việc sử dụng thường xuyên và lâu dài các hóa chất bảo vệ thực vật là nguyên nhân dẫn đến thoái hóa đất và gây ô nhiễm môi trường.

Kiểm soát các bệnh trên cây trồng sử dụng các tác nhân sinh học là hướng đi được quan tâm, nhằm giảm thiểu sử dụng hóa chất trong canh tác nông nghiệp (O'Brien, 2017). Vi khuẩn nội sinh thực vật là nguồn gen có tiềm năng ứng dụng cao trong kiểm soát sinh học, đối kháng với nhiều loài vi sinh vật gây bệnh thực vật trên các loại cây ký chủ khác nhau. Hiện nay, có khoảng hơn 200 chi vi khuẩn nội sinh đã được công bố, chủ yếu thuộc 3 ngành *Actinobacteria*, *Proteobacteria* và *Firmicutes* (Afzal *et al.*, 2019). Vi khuẩn nội sinh ức chế vi sinh vật gây bệnh theo nhiều cơ chế, như (i) sinh các hoạt chất kháng khuẩn, (ii) cạnh tranh về dinh dưỡng và không gian sinh trưởng, (iii) tăng cường sức khỏe và khả năng miễn dịch của cây trồng (Afzal *et al.*, 2019).

Hệ vi khuẩn nội sinh ở cây lúa có mức đa dạng cao và bao gồm nhiều chủng mang đặc tính sinh học có lợi cho cây chủ (Bertani *et al.*, 2016). Nghiên cứu về hệ vi khuẩn nội sinh lúa cũng như một số loài thực vật khác đã chỉ ra rằng các loài *Bacillus* như *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis*, *B. velezensis*, *B. pumilus* có hoạt tính đối kháng nhiều loài vi sinh vật gây bệnh thực vật, do vậy có tiềm năng ứng dụng trong kiểm soát sinh học (Bertani *et al.*, 2016; Chung *et al.*, 2015).

Chủng vi khuẩn nội sinh *Bacillus velezensis* VY03 được phân lập từ rễ cây lúa Bắc Thơm, có hoạt tính đối kháng cao với vi khuẩn *Xoo* gây bệnh bạc lá. Trong nghiên cứu này, ảnh hưởng của các điều kiện sinh trưởng tới hoạt tính kháng *Xoo* của chủng VY03 được đánh giá chi tiết *in vitro* để phục vụ việc ứng dụng trong kiểm soát sinh học. Hiệu quả phòng chống bệnh bạc lá của chủng VY03 cũng được đánh giá trong điều kiện nhà lưới và ngoài đồng ruộng, theo đó hướng ứng dụng chủng vi khuẩn nội sinh này trong phòng trừ bệnh do *Xoo* gây ra được bàn luận.

## II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Vật liệu nghiên cứu

Chủng vi khuẩn nội sinh lúa *Bacillus velezensis* VY03 (trình tự 16S rDNA có mã GenBank là

MT256303) phân lập từ rễ cây lúa Bắc Thơm số 7 vụ Xuân Hè 2018 trồng tại Thái Bình có khả năng đối kháng tốt với vi khuẩn gây bệnh bạc lá *Xoo*. Chủng được lưu tại Trung tâm nguồn gen Vi sinh vật Quốc gia với mã số VTCC60016.

Chủng *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* XR5 được phân lập từ lúa bị bệnh bạc lá ở Việt Nam, được lưu giữ tại phòng Vi sinh Nông nghiệp, Viện Vi sinh vật và Công nghệ Sinh học, Đại học Quốc gia Hà Nội.

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.2.1. Đánh giá ảnh hưởng của các điều kiện nuôi cấy đến hoạt tính kháng *Xoo* của chủng VY03

Chủng VY03 được nuôi cấy trên môi trường Landy dịch thể: glucose 20 g;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1 g;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,5 g;  $\text{FeSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.0012 g;  $\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.0016 g;  $\text{MnSO}_4$  0.0004 g; L-glutamic acid 1 g; cao nấm men 10 g; nước cất 1 L; pH 7,5 (Wu *et al.*, 2015).

Các điều kiện nuôi cấy được đánh giá gồm có: nhiệt độ (25, 30, 37 và 42°C), nồng độ muối (NaCl 0, 5, 10, 15 và 20 g/L), pH (từ 5 đến 9), nguồn carbon (glucose, sucrose, glycerol, methanol, tinh bột, ri đường) và nguồn nitơ (cao nấm men, cao thịt, peptone, triptone, casein). Trong các thí nghiệm, vi khuẩn được nuôi ở điều kiện lắc 160 vòng/phút trong 40 giờ.

Dịch canh trường (1 mL) của vi khuẩn nuôi ở các điều kiện khác nhau được tách chiết bằng dung môi ethyl acetate (tỷ lệ 1 : 1 về thể tích), làm bay hơi trong chân không. Cặn chiết thô sau đó được hòa tan trong 50  $\mu\text{L}$  DMSO và sử dụng để đánh giá hoạt tính kháng *Xoo* bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch (Magaldi *et al.*, 2004), tóm tắt các bước thực hiện như sau: các đĩa petri chứa môi trường PSA (khoai tây 300 g; sucrose 15 g;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  2 g;  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  0,5 g; peptone 5 g) được bổ sung vi khuẩn *Xoo* ở tỷ lệ 1% (v/v). Sử dụng ống hút vô trùng đục các giếng thạch (đường kính 5 mm) trên đĩa, sau đó nhỏ 50  $\mu\text{L}$  hoạt chất thô của chủng VY03 hòa tan trong DMSO vào các giếng và ủ đĩa ở 30°C trong 24 h. Như vậy, lượng mẫu thử trong mỗi giếng tương đương 1 mL dịch nuôi cấy. Hoạt tính đối kháng *Xoo* được đánh giá qua kích thước vòng kháng khuẩn  $\Delta D = D - d$ , trong đó D là đường kính vòng kháng và d là đường kính lỗ thạch.

#### 2.2.2. Nghiên cứu khả năng phòng chống bệnh bạc lá của chủng VY03 trong điều kiện nhà lưới

Thí nghiệm được thực hiện trên giống lúa Bắc Thơm số 7 (BT7), được trồng trong điều kiện nhà lưới tại viện Bảo vệ thực vật và chăm sóc theo quy trình thường quy. Thí nghiệm gồm các bước như sau:

Các ô đất thí nghiệm có kích thước 1 m<sup>2</sup> (1 m × 1 m) được làm sạch cỏ, bừa ái và bón lót theo quy trình thường quy. Hạt giống lúa BT7 được ủ mạ 7 - 10 ngày, cấy vào các ô đất theo tỷ lệ 30 khóm/m<sup>2</sup>, khoảng cách cây cách cây 16 × 16 cm; hàng cách hàng 20 × 20 cm. Duy trì mực nước mặt 5 cm và thực hiện chăm sóc theo quy trình thường quy.

Chủng vi khuẩn *Xoo* XR5 được nuôi trong môi trường TSB 1/2 (tryptone 17 g; soya peptone 3 g; NaCl 5 g; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2,5 g; glucose 2,5 g; pH 7,3; lượng sử dụng các thành phần giảm ½) ở 30°C, lắc 160 v/p trong 24 giờ. Dịch nuôi sau đó được pha loãng bằng môi trường TSB 1/2 vô trùng tới OD<sub>600</sub> = 0,2. Cây lúa 3 tuần tuổi được nhiễm *Xoo* bằng cách dùng kéo vô trùng nhúng vào dịch vi khuẩn *Xoo* chủng XR5 và cắt đầu ngọn lá lúa khoảng 3 - 5 cm.

Chủng VY03 được nuôi trong môi trường Landy ở điều kiện tối ưu. Dịch nuôi được pha loãng với nước theo tỷ lệ 5% và phun. Các công thức thí nghiệm gồm:

Công thức 1: phun dịch nuôi vi khuẩn VY03 trước khi nhiễm *Xoo* 2 ngày và 5 ngày liên tục sau khi nhiễm *Xoo*.

Công thức 2: phun dịch nuôi vi khuẩn VY03 trong 5 ngày liên tục sau khi nhiễm *Xoo*.

Đối chứng A: phun Bismethiazol với liều lượng thường dùng (0,025 g pha trong 50 mL nước phun cho 1 m<sup>2</sup> thí nghiệm) theo chế độ phòng chống bệnh, tức là phun trước khi nhiễm *Xoo* 2 ngày và 5 ngày liên tục sau khi nhiễm *Xoo*.

Đối chứng B: phun Bismethiazol với liều lượng thường dùng theo chế độ chống bệnh, tức là phun 5 ngày liên tục sau khi nhiễm *Xoo*.

Đối chứng C: nhiễm *Xoo*, không xử lý.

Các công thức thí nghiệm được lặp lại 3 lần (3 ô đất cho mỗi công thức).

Tỷ lệ bệnh bạc lá trong các công thức thí nghiệm được đánh giá bằng cách lựa chọn ngẫu nhiên 10 dảnh lúa ở giữa các ô đất thí nghiệm (bỏ qua các dảnh lúa ở bìa ngoài), đo mức độ tổn thương của lá tại các thời điểm trước khi phun 2 ngày và sau khi phun 3, 5, 7, 14, 21 và 28 ngày. Hiệu lực phòng trừ được đánh giá theo công thức Abbott (Abbott, 1987) như sau:

$$H (\%) = \frac{C - T}{T} \times 100$$

Trong đó: C và T lần lượt là chỉ số bệnh trên cây ở công thức đối chứng và công thức thí nghiệm, được tính bằng chiều dài độ tổn thương (mm).

### 2.2.3. Nghiên cứu khả năng phòng chống bệnh bạc lá của chủng VY03 trong thí nghiệm đồng ruộng

Thí nghiệm đồng ruộng được thực hiện trên giống lúa Bắc Thơm số 7, gồm các bước như sau:

Chủng VY03 được nuôi trong môi trường Landy dịch thể ở điều kiện tối ưu. Tế bào vi khuẩn được thu bằng ly tâm và hòa trong dung dịch NaCl 0,9% tới giá trị OD<sub>600</sub> = 0,5. Dịch tế bào chủng VY03 được tưới vào đất ủ mạ 2 ngày trước khi gieo hạt (tỷ lệ 100 mL/m<sup>2</sup>, trộn đều trong 10 cm đất mặt).

Cây mạ sinh trưởng trên đất có bổ sung tế bào của chủng VY03 trong 15 ngày trước khi đưa ra ruộng cấy. Diện tích lúa thí nghiệm là 3 luống lặp lại, mỗi luống 30 m<sup>2</sup> (dài × rộng là 3 m × 10 m). Trong mỗi luống, lúa được cấy từng dảnh với mật độ 42 dảnh/m<sup>2</sup>, khoảng cách cây cách cây là 15 × 15 cm, hàng cách hàng là 16 × 16 cm. Cây lúa được chăm sóc theo quy trình thường quy.

Trong giai đoạn cây lúa làm đòng đến trổ (70 - 75 ngày tuổi), là thời điểm dễ nhiễm bệnh bạc lá, ở công thức thí nghiệm (CTTN) tiến hành phun dịch nuôi chủng VY03 pha loãng (OD<sub>600</sub> = 0,2), tần suất 2 ngày 1 lần (tránh ngày mưa), tổng cộng 5 lần. Đối chứng gồm có (i) ruộng không phun thuốc (ĐC) và (ii) ruộng phun thuốc hóa học Kasumil 2SL với liều lượng thường dùng (40 mL thuốc pha trong bình 16 L phun cho 300 - 400 m<sup>2</sup>) (ĐC<sub>ks</sub>).

Theo dõi tiến triển bệnh ở các ruộng thí nghiệm và đối chứng, đánh giá hiệu lực phòng trừ bệnh bạc lá 7 ngày 1 lần từ khi phun thuốc cho đến khi thu hoạch. Cụ thể, mỗi công thức đánh dấu điều tra 10 điểm, mỗi điểm điều tra 10 dảnh ngẫu nhiên, thực hiện đếm số lá bị bệnh và phân cấp bệnh. Tính toán chỉ số bệnh và tỷ lệ bệnh theo QCVN 01-166:2014/ BNNPTNT (Phương pháp điều tra phát hiện dịch hại lúa) bằng các công thức sau:

Chỉ số bệnh (CSB):

$$CBS (\%) = \frac{(n1+3n3+5n5+7n7+9n9)}{N \times K} \times 100$$

Trong đó: n1, n3, ..., n9 lần lượt là số lá bị bệnh ở các cấp bệnh; N là tổng số lá điều tra; K là cấp bệnh cao nhất quan sát được.

$$\text{Tỷ lệ bệnh (\%)} = \frac{\text{Số lá bị bệnh}}{\text{Số lá điều tra}} \times 100$$

Các yếu tố cấu thành năng suất và năng suất lúa được đánh giá theo QCVN 01-55:2011/BNNPTNT gồm: số bông/m<sup>2</sup>, số hạt chắc, khối lượng 1.000 hạt, năng suất lý thuyết và năng suất thực thu (số liệu được tính toán n = 30 mẫu). Mẫu được thu thập theo TCVN 5451: 2008.

Năng suất lý thuyết (tạ/ha) = (Số bông/m<sup>2</sup> × Số hạt chắc/bông × M 1.000 hạt)/10.000

Năng suất thực tế (tạ/ha) = (năng suất ô/30 m<sup>2</sup>) × 10.000 m<sup>2</sup>

#### 2.2.4. Xử lý số liệu

Số liệu thí nghiệm được xử lý bằng phần mềm Excel và IRRISTAT 5.0.

### 2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

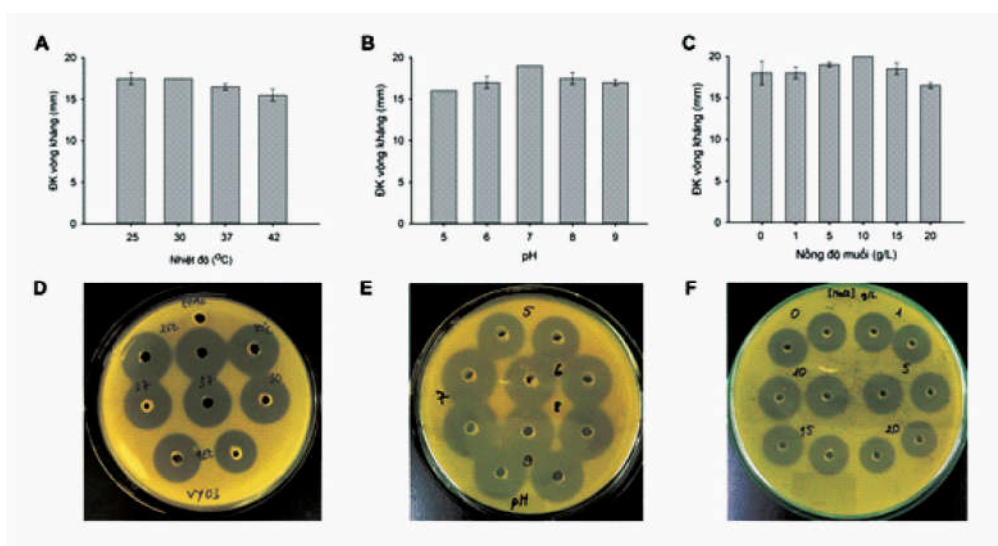
Thí nghiệm nhà lưới được thực hiện tại Viện Bảo vệ thực vật trong vụ Xuân Hè năm 2020. Thí nghiệm đồng ruộng được tiến hành tại xã

Hải Quang, huyện Hải Hậu, tỉnh Nam Định trong vụ Xuân Hè năm 2021.

## III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1. Ảnh hưởng của các điều kiện nuôi cấy đến hoạt tính đối kháng *Xoo* của chủng VY03

Nhiệt độ nuôi cấy đã khảo sát trong khoảng 25 - 42°C không ảnh hưởng đáng kể đến hoạt tính đối kháng *Xoo* của chủng VY03 (Hình 1A, 1D). Mặc dù vậy, có thể nhận thấy hoạt tính đối kháng *Xoo* của chủng đạt mức cao nhất ở nhiệt độ 25°C - 30°C (đường kính vòng kháng khuẩn là 17,5 mm), và giảm nhẹ ở nhiệt độ 37 - 42°C. Độ pH trong khoảng 5 - 9 thích hợp với chủng VY03, trong đó ở pH 7 chủng có hoạt tính đối kháng *Xoo* cao nhất (đường kính vòng kháng khuẩn 19 mm) (Hình 1B, 1E). Hoạt tính đối kháng *Xoo* của chủng VY03 không thay đổi đáng kể trong môi trường có nồng độ muối ở khoảng 0 - 20 g/L (Hình 1C, 1F), mức hoạt tính cao nhất là ở nồng độ muối 10 g/L.



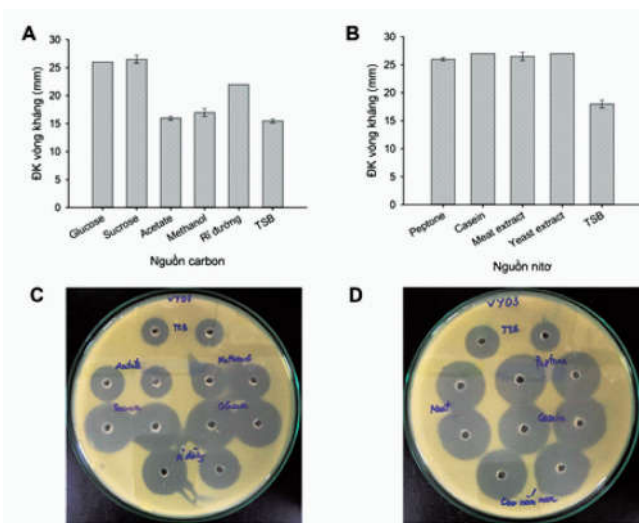
**Hình 1.** Ảnh hưởng của các điều kiện nuôi cấy tới hoạt tính đối kháng *Xoo* của chủng VY03  
Ghi chú: A, D - Ảnh hưởng của nhiệt độ; B, E - Ảnh hưởng của pH; C, F - Ảnh hưởng của nồng độ muối.

Khác với các điều kiện nhiệt độ, pH hay nồng độ muối, nguồn carbon hữu cơ sử dụng trong môi trường nuôi cấy có ảnh hưởng rõ rệt tới hoạt tính đối kháng *Xoo* của chủng VY03 (Hình 2). Chủng VY03 thể hiện hoạt tính đối kháng *Xoo* cao nhất khi được nuôi trong môi trường có glucose hoặc sucrose, đường kính vòng kháng đạt mức 26 và 26,5 mm. Đáng chú ý, rỉ đường có thể được chủng VY03

sử dụng làm cơ chất và cho hoạt tính kháng *Xoo* cao với đường kính vòng kháng đạt 22 mm. Điều này có ý nghĩa thực tiễn quan trọng cho việc giảm giá thành của môi trường nuôi cấy để lên men thu sinh khối chủng VY03. Acetate và methanol là các cơ chất ít phù hợp nhất đối với chủng VY03. Đối chứng trong thí nghiệm này là môi trường TSB 1/2 có hàm lượng glucose thấp (1,25 g/L), dẫn đến chủng VY03

khi nuôi trên môi trường này chỉ đạt hoạt tính đối kháng *Xoo* ở mức 58,49% so với khi nuôi trong môi trường có sucrose (20 g/L) (Hình 2A, 2C). Như vậy,

nguồn carbon hữu cơ có ảnh hưởng lớn đến hoạt tính đối kháng *Xoo* của chủng VY03, cả về bản chất hóa học và liều lượng sử dụng.



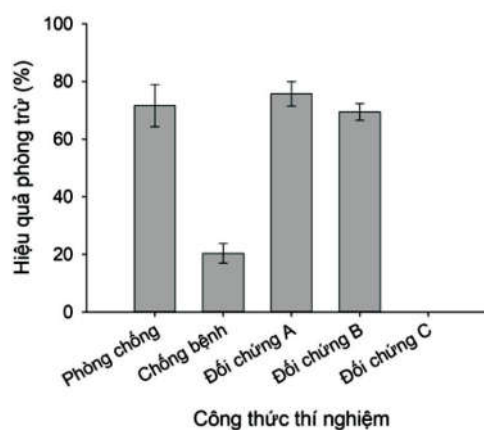
**Hình 2.** Ảnh hưởng của các nguồn carbon và nitơ tới hoạt tính đối kháng *Xoo* của chủng VY03

Khác với nguồn carbon hữu cơ, nguồn nitơ không ảnh hưởng đến hoạt tính đối kháng *Xoo* của chủng VY03. Cụ thể, khi chủng VY03 được nuôi trong môi trường sử dụng các nguồn nitơ khác nhau như peptone, casein, cao thịt hay cao nấm men đều đạt đường kính vòng đối kháng *Xoo* ở mức 26 - 27 mm (Hình 2B, 2D). Đối chứng là môi trường TSB có nguồn nitơ là tryptone ở mức cao tương đương với điều kiện thử nghiệm, tuy nhiên hàm lượng carbon thấp, dẫn đến hoạt tính đối kháng *Xoo* thấp hơn (Hình 2B, D). Kết quả này khẳng định tầm quan trọng của nguồn carbon trong quyết định hoạt tính đối kháng *Xoo* ở chủng VY03. So với môi trường TSB, môi trường Landy có cơ chất là sucrose (20 g/L) và nguồn nitơ là cao nấm men (10 g/L), là môi trường phù hợp cho chủng VY03 để đạt hoạt tính đối kháng *Xoo* cao.

### 3.2. Đánh giá hiệu quả kiểm soát bệnh bạc lá của chủng VY03 trong điều kiện nhà lưới

Thí nghiệm nhà lưới được theo dõi trong 28 ngày và tiến triển của bệnh bạc lá được đánh giá dựa trên các biểu hiện đặc trưng của bệnh như úa vàng, héo khô ở đầu lá (định tính) và đo chiều dài mức độ tổn thương (định lượng). Kết quả cho thấy hiệu quả kiểm soát bệnh cao nhất là ở các công thức xử lý theo chế độ phòng và chống bệnh (phun trước và sau khi nhiễm *Xoo*), gồm công thức 1 phun dịch tế bào chủng VY03 và đối chứng A phun thuốc

Bismethiazol. Hiệu quả kiểm soát bệnh trên cơ sở đo chiều dài mức độ tổn thương và xử lý thống kê (Hình 3) cũng khẳng định xử lý theo chế độ phòng chống có hiệu quả cao hơn. Chủng VY03 có hiệu quả rất đáng chú ý trong kiểm soát bệnh bạc lá khi được áp dụng theo phương thức phòng và chống bệnh, tức là phun liên tục trước và sau khi nhiễm bệnh, hiệu quả đạt 71,6%, gần tương đương với công thức đối chứng A sử dụng thuốc hóa học Bismethiazol cũng theo phương thức phòng và chống bệnh (hiệu quả đạt 75,7%).



**Hình 3.** Hiệu lực kiểm soát bệnh bạc lá trong thí nghiệm ở điều kiện nhà lưới

Tuy nhiên, công thức 2 sử dụng chủng VY03 theo phương thức chống bệnh, tức là chỉ phun sau

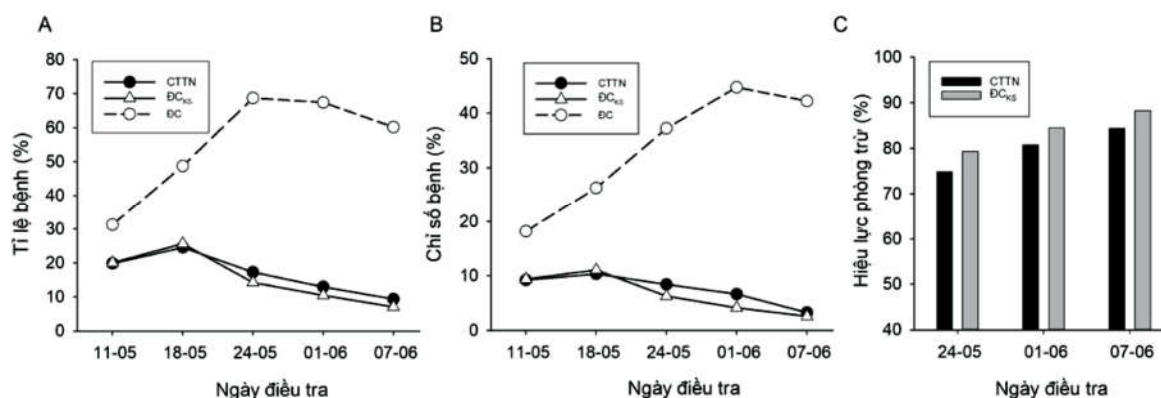
khi nhiễm *Xoo* thì hiệu quả kiểm soát thấp hơn hẳn, chỉ đạt ~20%. Trong khi đó, đối chứng B sử dụng thuốc hóa học Bismethiazol theo cùng điều kiện vẫn đạt hiệu quả cao là 69,4%. Theo nghiên cứu của nhóm tác giả Chung và cộng tác viên (2015), hai chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. YC7007 và YC7010<sup>T</sup> có thể kiểm soát bệnh bạc lá lúa ở mức 61,2 - 70,8%. Rõ ràng, việc sử dụng chủng VY03 theo phương thức phòng và chống đạt hiệu quả kiểm soát bệnh bạc lá cao tương đương với các nghiên cứu đã công bố. Kết quả này gợi mở hướng sử dụng các tác nhân kiểm soát sinh học theo phương thức phòng chống, tức là tạo điều kiện cho cây lúa tiếp xúc sớm với vi sinh vật đối kháng trước khi bị nhiễm bệnh, thậm chí ở giai đoạn hạt nảy mầm hoặc cây mạ và kết hợp phun trị bệnh khi cây có biểu hiện mắc bệnh.

### 3.3. Đánh giá hiệu quả kiểm soát bệnh bạc lá của chủng VY03 trong điều kiện đồng ruộng

Khác với thí nghiệm nhà lưới, trong thí nghiệm đồng ruộng tế bào chủng VY03 được đưa vào đất gieo hạt và ươm mạ để tạo điều kiện cho vi khuẩn

xâm nhập vào cây ngay từ giai đoạn đầu của quá trình sinh trưởng. Kết quả điều tra mức độ nhiễm bệnh bạc lá trong giai đoạn cây lúa làm đồng đến trổ (70 - 75 ngày tuổi) cho thấy bệnh bạc lá xuất hiện ở tất cả các ruộng thí nghiệm với tỷ lệ bệnh tăng dần qua các kỳ điều tra (Hình 4). Tuy nhiên, có thể nhận thấy sự chênh lệch rõ rệt giữa công thức thí nghiệm (lúa được tiếp xúc sớm với chủng VY03) và các ruộng đối chứng. Ở CTTN, tại thời điểm trổ bông tỷ lệ bệnh bạc lá là 19,83 - 20,05% và chỉ số bệnh là 9,21 - 9,38%, sai khác ở mức có ý nghĩa thống kê so với đối chứng là 48,72 % và 26.25% (Hình 4A, B).

Sau khi sự gia tăng của bệnh bạc lá trong các ruộng thí nghiệm được xác định, dịch tế bào của chủng VY03 được phun ở CTNN và so sánh với đối chứng là ruộng không xử lý bệnh (ĐC) và ruộng của các hộ dân xung quanh phun thuốc Kasumin 2SL (ĐC<sub>KS</sub>). Kết quả cho thấy trong CTTN chủng VY03 làm giảm tỷ lệ bệnh và chỉ số bệnh một cách rõ rệt, ở mức tương đương với thuốc hóa học Kasumin 2SL (Hình 4).



Hình 4. Hiệu quả kiểm soát bệnh bạc lá trong điều kiện thực tế ngoài đồng ruộng

Cụ thể, kết quả đánh giá ở thời điểm lúa chín sấp, ruộng được phun dịch tế bào chủng VY03 (CTTN) có tỷ lệ bệnh và chỉ số bệnh tương ứng là 12,96 và 6,63%, tương đương với ruộng phun thuốc Kasumin 2SL (ĐC<sub>KS</sub>) là 10,45 và 4,12%. Ruộng đối chứng không xử lý (ĐC) có tỷ lệ bệnh và chỉ số bệnh tiếp tục tăng nhanh qua các kỳ điều tra và đạt cao nhất ở giai đoạn này là 67,35 và 44,75% (Hình 4A, B). Hiệu quả kiểm soát bệnh bạc lá ở ruộng xử lý bằng chủng vi khuẩn VY03 và ruộng phun thuốc Kasumin 2SL tương đương nhau trong suốt quá trình điều tra, đạt mức 75 - 85%

(Hình 4C). Hiệu quả kiểm soát bệnh cao hơn so với thí nghiệm trong điều kiện nhà lưới, phản ánh tác dụng của việc cho cây tiếp xúc sớm với chủng vi khuẩn nội sinh VY03 bằng xử lý đất ươm mạ với chủng này.

Bên cạnh đó, hiệu quả của chủng VY03 trong ức chế bệnh bạc lá do *Xoo* còn được đánh giá thông qua các yếu tố cấu thành năng suất và năng suất lúa. Quan sát hình thức bông lúa có thể thấy ở CTTN bông lúa có màu sắc hạt vàng sáng, ít hạt lép, trong khi ở đối chứng (ĐC) bông lúa có nhiều hạt lép, màu nâu tối (Hình 5).



**Hình 5.** Bông lúa ở ruộng đối chứng (ĐC) và CTTN

Kết quả đánh giá chi tiết (Bảng 1) cho thấy, số bông/m<sup>2</sup> của CTTN trong khoảng 268,8 - 289,8, số hạt chắc/bông giao động từ 104,22 - 118,12 hạt,

cao hơn ĐC (mức sai khác có ý nghĩa). Khối lượng 1.000 hạt trong CNTN cũng cao hơn ĐC (mức sai khác có ý nghĩa). Năng suất lý thuyết và năng suất thực tế của CTTN dao động từ 64,7 - 70,4 tạ/ha, cao hơn công thức đối chứng ở mức so sánh có ý nghĩa từ 12 - 13%.

Tổng hợp các kết quả phân tích trong thử nghiệm đồng ruộng cho thấy chủng VY03 có ảnh hưởng tích cực tới sự phát triển của cây lúa, gồm (i) kiểm soát tốt bệnh bạc lá và (ii) tăng năng suất lúa. Mặc dù có tính mẫn cảm cao với nhiều bệnh hại, đặc biệt là bệnh bạc lá do *Xoo* gây ra, giống lúa Bắc Thơm số 7 được trồng phổ biến nhất ở các tỉnh đồng bằng sông Hồng trong nhiều năm bởi có chất lượng gạo tốt. Chủng VY03 trong nghiên cứu này thể hiện tác dụng như một probiotic cho cây lúa, có tiềm năng ứng dụng cao trong canh tác lúa hữu cơ, giúp giảm thiểu sử dụng hóa chất trong nông nghiệp.

**Bảng 1.** Yếu tố cấu thành năng suất và năng suất lúa của các công thức thí nghiệm

Công thức	Bông/m <sup>2</sup>	Số hạt chắc/bông	M 1.000 hạt (g)	NSLT (tạ/ha)		NSTT (tạ/ha)
				Năng suất	Tăng (%)	
CTTN	285,6	110,25	20,56	64,7	12	59,2
ĐC	268,8	104,22 <sup>a</sup>	19,25	53,9	-	48,6

Ghi chú: M: Trọng lượng; NSLT: Năng suất lý thuyết; NSTT: Năng suất thực tế.

## IV. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

### 4.1. Kết luận

Chủng vi khuẩn nội sinh lúa *Bacillus velezensis* VY03 có hoạt tính đối kháng vi khuẩn *Xoo* cao thể hiện trong các thí nghiệm *in vitro*. Hoạt tính này ổn định trong các điều kiện nhiệt độ, pH, nồng độ NaCl, và nguồn nitơ, chỉ phụ thuộc vào nguồn carbon sử dụng trong môi trường nuôi cấy, trong đó glucose và sucrose là phù hợp nhất. Thử nghiệm chủng VY03 trong kiểm soát bệnh bạc lá lúa ở điều kiện nhà lưới cho thấy sử dụng theo phương thức phòng và chống bệnh (phun trước và sau khi nhiễm *Xoo*) cho hiệu quả kiểm soát 71.6%, tương đương với thuốc hóa học Bismethiazol áp dụng ở cùng điều kiện. Trong khi đó, nếu sử dụng theo phương thức chống bệnh (phun sau khi nhiễm *Xoo*) thì hiệu quả kiểm soát chỉ đạt mức 20.4%. Thử nghiệm ở điều kiện đồng ruộng theo phương thức phòng và chống, kết hợp xử lý đất ươm mạ bằng chủng VY03 với phun phòng bệnh khi lúa ở giai đoạn làm

đòng và phun trị bệnh khi phát hiện bệnh bạc lá đã cho hiệu quả kiểm soát bệnh tốt (75 - 85%), tương đương thuốc hóa học Kasumin 2SL, trong điều kiện bệnh lây nhiễm tự nhiên. Quá trình xử lý bệnh bằng chủng VY03 cũng làm tăng năng suất lúa ~12% so với đối chứng không xử lý.

### 4.2. Đề nghị

Nghiên cứu phát triển chế phẩm sinh học từ chủng *Bacillus velezensis* VY03 và tiếp tục thử nghiệm ở điều kiện đồng ruộng để đánh giá hiệu quả, làm cơ sở đưa chế phẩm vào phục vụ cho sản xuất lúa hữu cơ.

## LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được tài trợ từ đề tài NĐT.34.ITA/17 do Bộ Khoa học và Công nghệ tài trợ.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

Abbott, W.S., 1987. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 3 (2): 302-303.

- Adhikari, T.B., Basnyat, R.C., & Mew, T.W.,** 1999. Virulence of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* on rice lines containing single resistance genes and gene combinations. *Plant Disease*, 83 (1): 46-50.
- Afzal, I., Shinwari, Z.K., Sikandar, S., & Shahzad, S.,** 2019. Plant beneficial endophytic bacteria: Mechanisms, diversity, host range and genetic determinants. *Microbiological Research*, 221: 36-49.
- Bertani, I., Abbruscato, P., Piffanelli, P., Subramoni, S., & Venturi, V.,** 2016. Rice bacterial endophytes: isolation of a collection, identification of beneficial strains and microbiome analysis. *Environmental Microbiology Reports*, 8 (3): 388-398.
- Chung, E.J., Hossain, M.T., Khan, A., Kim, K.H., Jeon, C.O., & Chung, Y.R.,** 2015. *Bacillus oryzicola* sp. nov., an endophytic bacterium isolated from the roots of rice with antimicrobial, plant growth promoting, and systemic resistance inducing activities in rice. *The Plant Pathology Journal*, 31 (2): 152.
- Goto, M.,** 2012. *Fundamentals of bacterial plant pathology*. Academic Press.
- Huang, N., Angeles, E.R., Domingo, J., Magpantay, G., Singh, S., Zhang, G., ... & Khush, G.S.,** 1997. Pyramiding of bacterial blight resistance genes in rice: marker-assisted selection using RFLP and PCR. *Theoretical and Applied Genetics*, 95 (3): 313-320.
- Magaldi, S., Mata-Essayag, S., De Capriles, C.H., Perez, C., Colella, M.T., Olaizola, C. & Ontiveros, Y.,** 2004. Well diffusion for antifungal susceptibility testing. *International Journal of Infectious Diseases*, 8: 39-45.
- Mew, T.W.,** 1992. Compendium of rice diseases. *American Phytopathological Society. St Paul, MN*: 62.
- Mew, T.W., Alvarez, A.M., Leach, J.E., & Swings, J.,** 1993. Focus on bacterial blight of rice. *Plant Disease*, 77 (1): 5-12.
- Mizukami, T., & Wakimoto, S.,** 1969. Epidemiology and control of bacterial leaf blight of rice. *Annual Review of Phytopathology*, 7 (1): 51-72.
- Murthy Thri, V.S., & Devadath, S.,** 1984. Role of seed in survival and transmission of *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae* causing bacterial blight of rice. *Journal of Phytopathology*, 110 (1): 15-19.
- O'Brien P.A.,** 2017. Biological control of plant diseases. *Australasian Plant Pathology*, 44: 1-12.
- Zhu, X.F., Xu, Y., Peng, D., Zhang, Y., Huang, T.T., Wang, J.X., & Zhou, M.G.,** 2013. Detection and characterization of bismertiazol-resistance of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Crop Protection*, 47: 24-29.
- Wu, L., Wu, H., Chen, L., Yu, X., Borriss, R. and Gao, X.,** 2015. Difficidin and bacilysin from *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 have antibacterial activity against *Xanthomonas oryzae* rice pathogens. *Scientific Reports*, 5: 12975. doi:10.1038/srep12975.

## Study on application of endophytic bacterium *Bacillus velezensis* VY03 in controlling rice bacterial blight disease

Nguyen Thi Hieu Thu, Nguyen Duy Toi, Lai Tien Dung,  
Nguyen Kim Nu Thao, Dinh Thuy Hang

### Abstract

The rice endophytic bacterium strain *Bacillus velezensis* VY03 has high antagonistic activity against the phytopathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) causing rice bacterial blight disease. The optimal culture conditions for the strain to grow and have the highest antagonistic activity against *Xoo* were pH 7, NaCl 10 g/L, sucrose as the carbon and energy sources, meat extract as nitrogen source, temperature 37°C, and culturing time 40 h. The experiment in net house condition using Bacthom N7 cultivar revealed that culture broth of strain VY03 had a high protective effect (71.6%) against the bacterial blight disease when applied at the protective-fighting mode, i.e. before and after the *Xoo* infection. Preliminary results of the field test using the same rice cultivar showed that a protective effect against the bacterial blight disease was obtained as high as 75 - 85% if the strain was used as an additive to soil for the seedlings in combination with spraying when the disease began in the field. In addition, using the strain VY03 also increased the rice yield to ~12% compared to non-treatment control. The study showed significant potential for application of endophytic bacteria in controlling the bacterial blight disease, while stimulating plant growth, thus reducing the use of agrochemical in rice cultivation.

**Keywords:** Bacterial blight disease (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*), rice endophytic bacteria (*Bacillus velezensis*), biocontrol

Ngày nhận bài: 14/5/2021  
Ngày phản biện: 02/6/2021

Người phản biện: PGS.TS. Nguyễn Văn Việt  
Ngày duyệt đăng: 29/6/2021



## KẾT QUẢ ĐÁNH GIÁ MỘT SỐ MÔ HÌNH CÁC GIỐNG CÀ PHÊ CHÈ CHẤT LƯỢNG CAO TN6, TN7, TN9

Nguyễn Thị Thanh Mai<sup>1</sup>, Đinh Thị Tiểu Oanh<sup>1</sup>, Lại Thị Phúc<sup>1</sup>,  
Nguyễn Đình Thoảng<sup>1</sup>, Nông Khánh Nương<sup>1</sup>, Lê Văn Bốn<sup>1</sup>,  
Lê Văn Phi<sup>1</sup>, Vũ Thị Danh<sup>1</sup>, Trần Thị Bích Ngọc<sup>1</sup>,  
Hoàng Quốc Trung<sup>1</sup>, Nguyễn Phương Thu Hương<sup>1</sup>,  
Hà Thục Huyền<sup>1</sup>, Trần Hoàng Ân<sup>1</sup>, Tôn Thất Dạ Vũ<sup>1</sup>

### TÓM TẮT

Các giống cà phê chè lai TN6, TN7, TN9 cho năng suất khá cao và ổn định. Tại các vùng trồng Đắk Lắk, Kon Tum và Lâm Đồng năng suất trung bình 4 vụ của các giống: TN6 đạt từ 3,12 - 3,76 tấn nhân/ha; giống TN7 đạt từ 3,19 - 3,77 tấn nhân/ha; giống TN9 đạt từ 3,22 - 4,05 tấn nhân/ha cao hơn có ý nghĩa so với giống đối chứng Catimor có năng suất trung bình 4 vụ đạt từ 1,89 - 2,56 tấn nhân/ha. Các giống TN6, TN7, TN9 có chất lượng hạt cà phê nhân sống tốt hơn so với giống Catimor và được xếp vào hạng cà phê đặc sản. Chất lượng thử nếm của các giống này đạt lần lượt là TN6: 82,00/100 điểm; TN7: 81,50/100 điểm và TN9: 82,75/100 điểm theo tiêu chuẩn đánh giá của CQI và giống Catimor đạt 75,50/100 điểm. Các giống TN6, TN7, TN9 có khả năng kháng bệnh gỉ sắt rất cao.

**Từ khóa:** Chất lượng cao, giống cà phê chè lai (TN6, TN7, TN9), mô hình

### I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cà phê là một trong những mặt hàng nông sản xuất khẩu chủ lực của Việt Nam. Tuy nhiên, diện tích cà phê Việt Nam hiện nay chủ yếu là cà phê vối, cà phê chè chiếm khoảng 56,3 ngàn ha tương đương 8,2% tổng diện tích (Cục Trồng trọt, 2019). Cây cà phê chè của Việt Nam hiện nay chủ yếu được trồng bằng giống Catimor và chiếm trên 95% diện tích, phần còn lại là một số giống khác. Giống Catimor sinh trưởng khỏe, thích ứng rộng, năng suất cao. Tuy nhiên vẫn có một số hạn chế như hạt nhỏ, ngắn, phẩm vị nước uống còn thiên về cà phê vối. Hơn nữa, giống Catimor đã được trồng rộng rãi trong những năm cuối của thế kỷ 20, do đó vườn cây đã già cỗi, xuống cấp, khả năng cho năng suất thấp không mang lại hiệu quả kinh tế. Vì vậy, cần có những giống cà phê chè mới có năng suất, chất lượng cao, kháng bệnh gỉ sắt, thay thế diện tích cà phê Catimor để mang lại hiệu quả cao hơn. Kế thừa kết quả nghiên cứu của đề tài cấp Bộ “Nghiên cứu chọn tạo giống cà phê chè chất lượng cao cho các vùng trồng chính” giai đoạn 2011 - 2015. Các giống cà phê chè lai TN6, TN7, TN9 đã được trồng khảo nghiệm ở nhiều vùng sinh thái khác nhau và đã cho năng suất cao hơn hoặc bằng giống Catimor, nhưng chất lượng quả, hạt và chất lượng thử nếm vượt trội hơn hẳn so với giống Catimor. Đây là các giống cà phê chất lượng cao, phục vụ cho sản xuất cà phê đặc sản.

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

#### 2.1. Vật liệu nghiên cứu

Các giống cà phê chè lai TN6, TN7, TN9 đã được công nhận sản xuất thử từ năm 2016, theo quyết định số 2812/QĐ-BNN-TT ngày 07/7/2016 của Bộ trưởng Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn và giống đối chứng là giống Catimor.

#### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

Các biện pháp kỹ thuật, công nghệ nhân giống được áp dụng dựa trên cơ sở quy trình kỹ thuật trồng, chăm sóc và thu hoạch cà phê chè (10TCN 527: 2002).

Các chỉ tiêu theo dõi: Năng suất, chất lượng quả hạt, chất lượng thử nếm, khả năng kháng bệnh gỉ sắt.

Các phương pháp phân tích và xử lý số liệu: Số liệu thí nghiệm được tính theo phương pháp thống kê sinh học của Gomez và Gomez (1984), các số liệu được xử lý trên phần mềm Excel 7.0 và Sas 9.1.

Quy mô, địa điểm xây dựng mô hình: Lâm Đồng: 01 ha, Kon Tum: 01 ha, Đắk Lắk: 01 ha; trồng năm 2011.

#### 2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện từ tháng 01 năm 2016 đến tháng 12 năm 2019 tại Đắk Lắk, Kon Tum và Lâm Đồng.

<sup>1</sup> Viện Khoa học Kỹ thuật Nông Lâm nghiệp Tây Nguyên