

DOI:10.22144/ctu.jvn.2019.044

PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN NHỮNG CHỦNG XẠ KHUẨN TRIỂN VỌNG ĐỐI KHÁNG VỚI TUYẾN TRÙNG *Pratylenchus* SP. TRONG ĐIỀU KIỆN PHÒNG THÍ NGHIỆM

Trương Thanh Thảo*, Võ Quốc Cảnh và Nguyễn Thị Thu Nga

Khoa Nông nghiệp, Trường Đại học Cần Thơ

*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Trương Thanh Thảo (email: ttthao22@gmail.com)

ABSTRACT

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 04/09/2018

Ngày nhận bài sửa: 26/10/2018

Ngày duyệt đăng: 26/04/2019

Title:

Isolation and selection of promising antagonistic *Actinomyces* against nematode *Pratylenchus* sp. in laboratory condition

Từ khóa:

Chitinase, *Pratylenchus* sp., protease, xạ khuẩn đối kháng

Keywords:

Antagonistic *Actinomyces*, chitinase, *Pratylenchus* sp., protease

The study on isolation and selection of antagonistic *Actinomyces* against nematode *Pratylenchus* sp. was conducted in laboratory condition. Sixty-four strains of *Actinomyces* were isolated from vegetable farm soil collected from Tra Vinh and Can Tho. All *Actinomyces* strains were screened on hydrolytic ability of chitin and protein which are components of nematode cell wall, results showed that six strains i.e. 4A1, BM15, 8.11.1, 9.3.1, 5A6 and SM8 exhibited high chitinase and protease enzymes. Especially, three strains i.e 4A1, BM15, 8.11.1 expressed hydrolytic ability of chitin and protein higher than other strains. Investigation the effect of culture extract of strains 4A1, BM15, 8.11.1 and mix 4A1+BM15+8.11.1 in liquid medium ISP2 contained colloidal chitin on the survival of nematode in soil pot, results found that all treatments expressed effect in killing nematode *Pratylenchus* sp. with number of alive nematodes were significant lower than control, especially the treatment mixture of 3 strains (4A1+BM15+8.11.1) showed highest efficacy in killing nematode at 48 and 72 hours of testing.

TÓM TẮT

Nghiên cứu phân lập và tuyển chọn các chủng xạ khuẩn triển vọng có khả năng đối kháng với tuyến trùng *Pratylenchus* sp. được thực hiện trong điều kiện phòng thí nghiệm. Sáu mươi bốn chủng xạ khuẩn đã được phân lập từ đất trồng rau ở Trà Vinh và Cần Thơ. Tuyển chọn các chủng xạ khuẩn thể hiện khả năng phân giải chitin và protein cao nhằm mục đích phòng trừ bằng cách phá vỡ vách tế bào của tuyến trùng. Kết quả cho thấy, sáu chủng xạ khuẩn: 4A1, BM15, 8.11.1, 9.3.1, 5A6 và SM8 đều thể hiện hoạt tính tiết enzyme chitinase và protease cao. Trong đó, ba chủng 4A1, BM15, 8.11.1 thể hiện khả năng phân giải chitin và protein cao hơn các chủng còn lại. Kết quả khi khảo sát ảnh hưởng của dịch trích các chủng 4A1, BM15, 8.11.1 và hỗn hợp 4A1+BM15+8.11.1 trong môi trường ISP2 lỏng chứa chitin lên sự tồn tại của tuyến trùng trong chậu đất cho thấy tất cả các nghiệm thức đều thể hiện hiệu quả trong việc giết chết tuyến trùng *Pratylenchus* sp. với số lượng tuyến trùng sống thấp hơn khác biệt ý nghĩa so với đối chứng, trong đó nghiệm thức hỗn hợp 3 chủng xạ khuẩn (4A1+BM15+8.11.1) cho hiệu quả cao nhất trong việc giết tuyến trùng ở 48 và 72 giờ thử nghiệm.

Trích dẫn: Trương Thanh Thảo, Võ Quốc Cảnh và Nguyễn Thị Thu Nga, 2019. Phân lập và tuyển chọn những chủng xạ khuẩn triển vọng đối kháng với tuyến trùng *Pratylenchus* sp. trong điều kiện phòng thí nghiệm. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 55(2B): 19-27.

1 ĐẶT VẤN ĐỀ

Pratylenchus spp. là loài tuyến trùng thuộc nhóm nội ký sinh di chuyển, bao gồm khoảng 68 loài. Đây là loài tuyến trùng có phổ kí chủ khá rộng, gây hại trên rễ, củ hay bộ phận thực vật nằm trong đất ở nhiều loại cây trồng như: mía, lạc, khoai tây, cà phê, chuối, cây thuốc lá, cây ăn trái, củ cải đường... (Ferraz and Brow, 2000; Nguyễn Ngọc Châu, 2003). Trên khoai mỡ, tuyến trùng *Pratylenchus* gây bệnh thối khô đầu củ (Muniz *et al.*, 2012; Từ Ngọc Hiếu, 2013). Theo Muniz *et al.* (2012), bệnh này có thể làm giảm năng suất từ 10-85%, nếu bệnh gây hại nặng có thể làm củ thối hoàn toàn. Bên cạnh đó, tuyến trùng *Pratylenchus* cũng là tác nhân gây bệnh đốm đen trên trái đậu phộng gây thiệt hại về năng suất và giá trị thương phẩm đậu phộng rất cao cho các vùng trồng đậu phộng trên thế giới và Việt Nam (Nguyễn Ngọc Châu, 2003). Chính vì vậy, việc phòng trừ tuyến trùng *Pratylenchus* sp. là rất cần thiết, tuy nhiên hiện nay việc phòng trừ tuyến trùng chủ yếu sử dụng biện pháp hóa học, nhưng biện pháp này chỉ mang lại hiệu quả nhất thời và tác động tiêu cực đến môi trường (Bell, 2000). Gần đây, có nhiều nghiên cứu đã sử dụng các vi sinh vật có lợi trong đất để quản lý tuyến trùng, ví dụ như: sử dụng nấm *Trichoderma* spp. để quản lý tuyến trùng *Meloidogyne incognita* (Phan Thị Mỹ Phúc, 2014). Jonathan *et al.* (2000) sử dụng vi khuẩn vùng rễ, xạ khuẩn và vi khuẩn *Pasteuria penetrans* trong phòng trừ tuyến trùng buri rễ *M. incognita* trên cây cà chua. Điều này cho thấy việc sử dụng các vi sinh vật đối kháng để tiêu diệt tuyến trùng là hướng mang lại hiệu quả khả quan và lâu dài. Do đó, phòng trừ tuyến trùng hiện nay theo hướng thân thiện với môi trường là rất cần thiết với thực trạng hiện nay. Trên cơ sở đó, đề tài **“Phân lập và tuyển chọn những dòng xạ khuẩn triển vọng đối kháng với tuyến trùng *Pratylenchus* sp. trong điều kiện *in vitro*.”** được thực hiện nhằm tìm ra các chủng xạ khuẩn triển vọng có khả năng đối kháng với tuyến trùng *Pratylenchus* sp.

2 PHƯƠNG TIỆN VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Phương tiện

Nghiên cứu này được thực hiện trong điều kiện phòng thí nghiệm của Bộ môn Bảo vệ Thực vật, Khoa Nông nghiệp, Trường Đại học Cần Thơ.

2.2 Phương pháp nghiên cứu

2.2.1 Phân lập xạ khuẩn tại các tỉnh Đồng bằng sông Cửu Long

Mẫu đất được thu thập trên các ruộng đất trồng rau của một số tỉnh thuộc vùng Đồng bằng sông Cửu

Long như Cần Thơ và Trà Vinh. Các mẫu đất sau khi thu thập được cho vào trong túi nylon riêng lẻ và mang về phòng thí nghiệm để tiến hành phân lập xạ khuẩn. Quy trình phân lập xạ khuẩn được thực hiện theo phương pháp của Hsu và Lockwood (1975). Cân 2 g đất cho vào ống Falcon chứa 20 ml nước cất thanh trùng, lắc đều bằng máy lắc cho đến khi đất tan hết, sau đó thực hiện pha loãng với 3 nồng độ 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , tiếp tục rút 20 μ l huyền phù ở nồng độ cho vào đĩa petri chứa môi trường chitin agar (chitin thô 10 g, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 0,917 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,5 g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,018 g, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,0018 g, agar 20 g, nước cất 1000 ml, pH = 7, trong đó Chitin thô được xử lý bằng HCl đậm đặc và được nghiền mịn, sau đó ngâm trong HCl đậm đặc qua đêm, cho nước cất vào và lọc qua vải lọc, thực hiện ly tâm để rửa HCl, phần lắng dưới ống Falcon là colloidal chitin được dùng để hòa vào môi trường (Shurtleff and Averre, 1997)). Sau đó, dùng que chà hình tam giác phân tán giọt huyền phù vi sinh vật trên bề mặt đĩa thạch. Sau 4 -5 ngày, xạ khuẩn sẽ phát triển trong đĩa, chọn những xạ khuẩn phân giải chitin để thực hiện tách rỗng trên môi trường Mannitol Soya flour (MS) (Mannitol 20 g, bột đậu nành 20 g, agar 20 g, nước cất 1000 ml, pH 7,0) (Hobbs *et al.*, 1989) bằng phương pháp vạch và chọn khuẩn lạc riêng lẻ để cấy trữ trong ống nghiệm chứa môi trường MS trong điều kiện 4^oC.

2.2.2 Đánh giá khả năng phân giải Chitin của xạ khuẩn được phân lập trong điều kiện *in vitro*

Mục đích: Tuyển chọn các chủng xạ khuẩn có khả năng tiết chitinase cao để phục vụ cho thí nghiệm khảo sát khả năng tiêu diệt tuyến trùng.

Thí nghiệm A: Thực hiện đánh giá nhanh khả năng tiết chitinase của 64 chủng xạ khuẩn được phân lập với 2 lần lặp lại nhằm tuyển chọn các chủng xạ khuẩn tiết chitinase.

Thí nghiệm B: So sánh khả năng tiết chitinase của các chủng xạ khuẩn được chọn từ thí nghiệm A. Thí nghiệm được bố trí theo thể thức hoàn toàn ngẫu nhiên một nhân tố với 19 nghiệm thức (gồm 14 chủng xạ khuẩn được chọn ra từ thí nghiệm A và 5 chủng xạ khuẩn tiết enzyme chitinase cao từ bộ môn Bảo vệ Thực vật cung cấp) và 4 lần lặp lại.

Thí nghiệm được tiến hành trên đĩa petri chứa 10ml môi trường chitin agar. Những khoanh giấy thấm (đường kính 5 mm) đã được vô trùng vào huyền phù xạ khuẩn mật số 10^8 cfu/ml. Sau đó, đặt vào trong đĩa petri 3 khoanh giấy cách đều nhau. Đặt đĩa petri ở điều kiện nhiệt độ phòng. Đối với thí nghiệm B, sử dụng 14 chủng xạ khuẩn được chọn ra từ thí nghiệm A và 5 chủng xạ khuẩn tiết enzyme chitinase cao từ Bộ môn Bảo vệ Thực vật để tiến hành thí nghiệm.

Ghi nhận khả năng tiết enzyme chitinase của xạ khuẩn thông qua đo bán kính vùng phân giải chitin ở thời điểm 5, 7 và 9 ngày sau khi cấy (NSKC).

2.2.3 Đánh giá khả năng tiết enzyme protease của xạ khuẩn trong điều kiện *in vitro*

Mục đích: Nhằm tìm ra các chủng xạ khuẩn có khả năng tiết ra enzyme protease cao.

Thí nghiệm được bố trí theo thể thức hoàn toàn ngẫu nhiên một nhân tố với 6 nghiệm thức (gồm 6 chủng có khả năng tiết chitinase cao nhất từ thí nghiệm 2.2.2) và 8 lần lặp lại.

Chuẩn bị nguồn xạ khuẩn và cách tiến hành thí nghiệm tương tự như thí nghiệm B (phần 2.2.2) và môi trường chitin agar được thay bằng môi trường Skimmilk Agar (sữa tách béo 35g, agar 18g, nước cất 1000ml) (Wei *et al.*, 2010).

Ghi nhận khả năng tiết protease của xạ khuẩn thông qua việc đo bán kính vùng phân giải protein ở thời điểm 3, 4 và 5 NSKC.

2.2.4 Đánh giá khả năng gây chết tuyến trùng *Pratylenchus sp.* của dịch trích nuôi cấy từ các xạ khuẩn triển vọng trong điều kiện phòng thí nghiệm

Mục đích: Chọn những chủng xạ khuẩn có khả năng tiêu diệt tuyến trùng *Pratylenchus sp.* trong điều kiện phòng thí nghiệm.

Thí nghiệm được bố trí theo thể thức hoàn toàn ngẫu nhiên với 6 nghiệm thức gồm: ĐC (đối chứng, sử dụng ISP2 lỏng), thuốc Abamectin (đối chứng dương, nồng độ 20 µl/20 ml), xạ khuẩn 4A1, xạ khuẩn 8.11.1, xạ khuẩn BM15 và hỗn hợp 3 chủng xạ khuẩn (4A1+BM15+8.11.1) với 4 lần lặp lại.

Chuẩn bị dịch trích của xạ khuẩn: Các dòng xạ khuẩn được nuôi cấy trên môi trường MS trong 7 ngày. Sau đó, thu hoạch huyền phù xạ khuẩn, thực hiện đếm mật số và đưa về cùng mật số 10⁸cfu/ml. Tiếp theo, rút 1ml huyền phù xạ khuẩn cho vào mỗi bình có chứa 100 ml môi trường ISP2 lỏng (Yeast extract 4g, Glucose 4g, Malt extract 10g, agar 20 g, nước cất 1000 ml) (Holt *et al.*, 1994), có bổ sung thêm 10g chitin thô đã nghiền thành colloidal chitin trong 1000ml môi trường ISP2 lỏng và được lắc ở 100 vòng/phút trong 7 ngày. Sau đó, thu dịch trích xạ khuẩn bằng cách: ly tâm huyền phù xạ khuẩn ở 6000 vòng/phút (trong 10 phút), lấy phần dịch bên trên lọc qua dụng cụ lọc vi khuẩn có đường kính lỗ lọc 0,45 µm, dung dịch qua lọc thu được là dịch trích xạ khuẩn.

Nguồn tuyến trùng được ly trích từ những củ khoai mỡ bị thối khô đầu củ và được ly trích theo phương pháp được miêu tả như sau: sau khi rửa sạch củ bằng nước sạch, mỗi củ sẽ được cắt nhỏ khoảng 3 mm (chỉ lấy những phần thối đen và phần tiếp giáp

với chỗ thịt trắng của củ), tiếp theo đặt chúng vào rây lọc tinh và đặt trên đĩa petri thông qua lớp giấy lọc. Thêm một lượng nước xấp xỉ mẫu, rồi đặt đĩa petri ở nhiệt độ phòng, tuyến trùng sẽ từ mô bệnh chui ra qua rây xuống đĩa petri. Sau 24 giờ, ta thu phần dịch chứa tuyến trùng trong đĩa petri (Nguyễn Ngọc Châu, 2003).

Thí nghiệm được thực hiện trong chậu nhựa chứa đất thanh trùng (100 g/chậu), không trồng cây. Tuyến trùng được ly trích từ củ khoai mỡ và đưa về mật số 1000 con/1ml, hút 1 ml dịch chứa tuyến trùng cho vào chậu nhựa. Sau đó, hút 10ml dịch trích xạ khuẩn phun thấm đều xuống đất. Tiếp theo, thu mẫu đất vào thời điểm 24, 48 và 72 giờ sau khi xử lý bằng cách ly trích tuyến trùng trong đất được áp dụng theo phương pháp của Nguyễn Ngọc Châu (2003) có cải tiến. Quy trình được tiến hành như sau:

Cho mẫu đất vào xô A có dung tích 5 lít, đổ 1 lít nước vào ngâm, sau đó bóp vụn đất, tiếp tục khuấy đều và cho thêm 2 lít nước vào xô A.

Nước từ xô A được đổ vào xô B qua rây có kích thước lỗ rây 1 mm để loại bỏ cặn đất và rác bẩn.

Nước trong xô B để lắng 20 phút sau đó đổ qua rây có kích thước lỗ rây 20 µm, giữ lấy phần cặn trong xô B, phần trên rây sẽ được cho vào cốc.

Xô B tiếp tục cho nước vào và để lắng 15 phút, sau đó lọc qua rây 20 µm như ở bước trên. Các lần tiếp theo làm tương tự chỉ thay vào thời gian lắng là 10 phút và 5 phút. Cuối cùng, cho cốc nước được giữ lại sau 4 lần lọc cho vào đĩa petri đặt ở nhiệt độ phòng sau 24 giờ nhắc rây ra khỏi đĩa petri, thu dịch chứa tuyến trùng trong đĩa petri.

Thu dung dịch chứa tuyến trùng qua rây lọc tinh (tuyến trùng sống) được cho vào ống Falcon, đưa về thể tích như nhau giữa các nghiệm thức, lắc đều và dùng pipet hút 1 ml cho vào lam đếm tuyến trùng được quan sát dưới kính hiển vi vật kính 4X và 10X, thực hiện đếm mật số tuyến trùng lặp lại 2-3 lần, lấy trung bình và nhân lên với lượng nước có trong ống Falcon.

Ghi nhận chỉ tiêu: Thực hiện đếm mật số tuyến trùng từ các mẫu đất ở 3 thời điểm 24, 48 và 72 giờ sau khi xử lý để xác định số lượng tuyến trùng còn sống ở các nghiệm thức.

Độ hữu hiệu (%) của thuốc được tính bằng công thức Abbott (1925).

$$\text{Độ hữu hiệu (\%)} = [(C-T)/C]*100$$

Trong đó:

C: Số lượng cá thể tuyến trùng sống ở nghiệm thức đối chứng

T: Số lượng cá thể tuyến trùng sống ở nghiệm thức có xử lý dịch trích

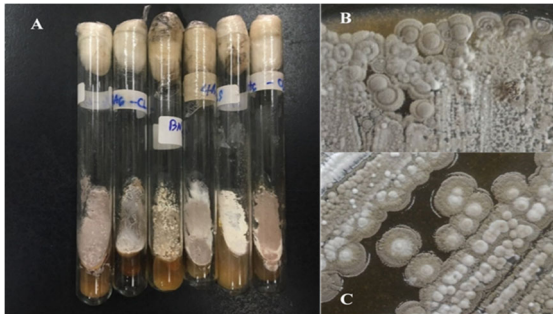
2.2.5 Xử lý số liệu

Xử lý số liệu bằng chương trình Excel và trung bình của các nghiệm thức được phân tích bằng phép kiểm định Duncan qua phần mềm Mstatc.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Phân lập xạ khuẩn và tuyển chọn xạ khuẩn có khả năng phân giải chitin

Phân lập xạ khuẩn



Hình 1: Đặc điểm khuẩn lạc của một số chủng xạ khuẩn được phân lập. Ghi chú: A. Màu sắc khuẩn lạc, B. Chủng 4A1, C. Chủng BM15

(Nguồn: Trương Thanh Thảo, 2018)

Kết quả phân lập được 64 chủng xạ khuẩn được trình bày ở Bảng 1. Khi quan sát các chủng xạ khuẩn được phân lập trên môi trường MS cho thấy xạ khuẩn rất đa dạng về hình thái, kích thước và màu sắc khuẩn lạc. Màu sắc các chủng xạ khuẩn được

phân lập có các màu như xám, trắng, đen (Hình 1). Bề mặt khuẩn lạc khô ráo, không bóng như vi khuẩn, hình dạng chủ yếu hình tròn, một số chủng tạo thành vòng tròn đồng tâm, hệ sợi cơ chất phát triển cắm sâu vào môi trường và đây cũng là đặc điểm giúp phân biệt giữa xạ khuẩn với vi khuẩn và nấm (Nguyễn Lâm Dũng và ctv., 2002). Ngoài ra, khả năng phát triển của các chủng xạ khuẩn trên môi trường MS tương đối chậm từ 3-5 ngày tùy theo các chủng xạ khuẩn khác nhau. Kết quả này phù hợp với miêu tả của Dương Văn Anh (2017) đã khảo sát về hình thái của các chủng xạ khuẩn trên môi trường MS và ISP2 cũng cho thấy khuẩn lạc xạ khuẩn có nhiều màu sắc như xám, nâu, dạng khô ráp. Tương tự kết quả nghiên cứu của Bùi Thị Hà (2008), khi phân lập xạ khuẩn từ các mẫu đất trồng chè ở Thái Nguyên cho thấy các chủng xạ khuẩn có màu sắc khuẩn lạc rất đa dạng như nâu, trắng, xanh trên môi trường ISP2.

Qua đánh giá sơ tuyển khả năng phân giải chitin được thực hiện trên 64 chủng xạ khuẩn trên môi trường chitin agar cho thấy có 32 chủng xạ khuẩn phân giải chitin chiếm tỷ lệ 50%. Trong đó, các chủng xạ khuẩn có bán kính phân giải chitin (BKPGC) trung bình của 2 lần lặp lại ở thời điểm 9 ngày sau khi cấy (NSKC) từ 1 mm đến 4 mm chiếm khoảng 42,20%; BKPGC < 1 mm chiếm khoảng 7,8% và có khoảng 50% chủng xạ khuẩn không phân giải chitin. Dựa trên cơ sở đó, tuyển chọn được 19 chủng xạ khuẩn có bán kính phân giải cao nhất để thực hiện thí nghiệm so sánh khả năng phân giải chitin.

Bảng 1: Các chủng xạ khuẩn được phân lập trên các ruộng rau tại Trà Vinh và Cần Thơ

STT	Mã số	Địa điểm phân lập
1 – 22	BM1 – BM22	Áp Bào Môt - Xã Long Sơn - Huyện Cầu Ngang - Trà Vinh
23 – 38	SM1 – SM16	Áp Sóc Mới - Xã Long Sơn - Huyện Cầu Ngang - Trà Vinh
39 – 47	5A2 – 5A9I	Áp 5A - Xã Nhị Trường - Huyện Càng Long - Trà Vinh
48 – 56	4A1 – 4A9	Áp 4A - Xã Nhị Trường - Huyện Càng Long - Trà Vinh
57 – 59	NT1 – NT3	DH18- Xã Nhị Trường – Huyện Cầu Ngang - Trà Vinh
60 – 62	TL1 – TL3	Thị Trấn Thới Lai - huyện Thới Lai - Thành phố Cần Thơ
63– 64	BT1 – BT2	Đường Võ Văn Kiệt - Quận Bình Thủy - Cần Thơ

So sánh khả năng phân giải chitin của xạ khuẩn được phân lập trong điều kiện in vitro

Qua kết quả Bảng 2, khi so sánh 19 chủng được chọn với 4 lần lặp lại cho thấy rằng hầu hết các chủng xạ khuẩn có khả năng phân giải chitin bắt đầu từ thời điểm 5 NSKC.

Ở thời điểm 5 NSKC, có 12/19 chủng xạ khuẩn phân giải chitin với bán kính vòng phân giải chitin dao động từ 0,2 – 2,5 mm. Chủng 4A1 có bán kính phân giải cao nhất là 2,5 mm khác biệt có ý nghĩa với các chủng xạ khuẩn còn lại. Ngoài ra, các chủng BM15, 8.11.1, 9.3.1 tuy không khác biệt với BM3,

BM20, 5.1.1, SM8, 12.4.1 nhưng lại khác biệt có ý nghĩa đối với các chủng còn lại.

Thời điểm 7 NSKC, số chủng xạ khuẩn có khả năng phân giải chitin tăng lên được 13/19 chủng. Chủng xạ khuẩn 4A1 vẫn ở vị trí cao nhất với bán kính vòng phân giải là 3,1 mm cao hơn và khác biệt ý nghĩa hoàn toàn so với các chủng còn lại. Kế tiếp là 2 chủng xạ khuẩn BM15, 8.11.1 với bán kính phân giải lần lượt là 2,2 và 2,0 mm khác biệt ý nghĩa với các chủng khác. Mặc dù, chủng xạ khuẩn 8.11.1 không khác biệt ý nghĩa đối với chủng 5A6, nhưng lại khác biệt ý nghĩa với các chủng xạ khuẩn còn lại (Hình 2).

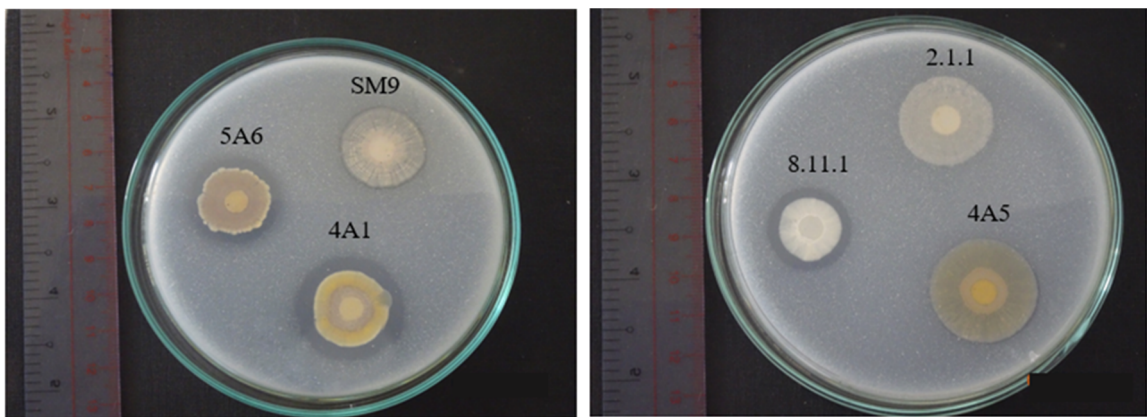
Bảng 2: Khả năng phân giải chitin (mm) của 19 chủng xạ khuẩn qua các thời điểm

STT	Chủng xạ khuẩn	Bán kính phân giải chitin (mm)		
		5 NSKC	7 NSKC	9 NSKC
1	BM3	0,6 efg	0,8 fg	0,7 fg
2	5A9	0,0 i	0,0 i	0,2 i
3	5A2	0,0 i	0,0 i	0,1 i
4	BM20	0,5 fg	0,6 g	0,8 ef
5	4A2	0,0 i	0,0 i	0,2 hi
6	TL1	0,0 i	0,0 i	0,2 hi
7	4A1	2,5 a	3,1 a	3,8 a
8	5A6	0,3 gh	1,6 cd	2,3 bc
9	SM9	0,0 i	0,1 hi	0,1 hi
10	8.11.1	1,2 bc	2,0 bc	2,6 abc
11	4A5	0,0 i	0,0 i	0,2 hi
12	2.1.1	0,2 h	0,2 h	0,2 hi
13	9.3.1	1,1 bcd	1,3 de	1,5 de
14	5.1.1	0,7 ef	1,2 def	1,2 def
15	BM6	0,0 i	0,0 i	0,3 ghi
16	BM15	1,3 b	2,2 b	3,0 ab
17	SM8	0,8 def	1,0 efg	1,9 cd
18	12.4.1	0,7 def	0,9 fg	1,0 ef
19	NT2	0,5 fg	0,6 g	0,6 fgh
Mức ý nghĩa		*	*	*
CV (%)		32,62	25,37	31,99

Ghi chú: Trong cùng một cột, các giá trị trung bình theo sau bởi một hay nhiều chữ giống nhau thì không khác biệt thống kê ở mức ý nghĩa 5% qua phép kiểm định Duncan; *: khác biệt ở mức ý nghĩa 5%; Số liệu đã được chuyển sang log(X+1) khi phân tích thống kê. NSKC: ngày sau khi cấy

Đến thời điểm 9 NSKC, toàn bộ 19 chủng xạ khuẩn đều thể hiện khả năng phân giải chitin, trong đó 3 chủng xạ khuẩn 4A1, BM15, 8.11.1 vẫn là những chủng xạ khuẩn chiếm vị trí phân giải chitin cao với bán kính phân giải lần lượt là 3,8 mm; 3,0 mm; 2,6 mm và chủng xạ khuẩn 4A1 vẫn là chủng luôn khác biệt ý nghĩa với các chủng còn lại, kế tiếp là 3 chủng 5A6, SM8 và 9.3.1 với bán kính phân giải lần lượt là 2,3 mm, 1,9 mm và 1,5 mm cao hơn và khác biệt ý nghĩa với các chủng xạ khuẩn BM3, 5A9, 5A2, 4A2, TL1, SM9, 4A5, 2.1.1, BM6 và NT2.

Tóm lại, qua 3 thời điểm khảo sát 5 NSKC, 7 NSKC và 9 NSK, nhìn chung các chủng xạ khuẩn đều thể hiện khả năng phân giải chitin. Trong đó, có 6 chủng xạ khuẩn thể hiện khả năng phân giải tốt nhất là 4A1, BM15, 8.11.1, 5A6, SM8 và 9.3.1. Kết quả khảo sát khả năng phân hủy chitin phù hợp với nghiên cứu của Đinh Ngọc Trúc và Trần Vũ Phên (2014) xạ khuẩn có khả năng tiết enzyme chitinase và phân giải chitin cũng bắt đầu thể hiện vào thời điểm 5 NCKC.



Hình 2: Bán kính phân giải chitin của một số chủng xạ khuẩn ở thời điểm 7 NSKC

3.2 Khả năng phân giải protein của xạ khuẩn trong điều kiện *in vitro*

Kết quả khảo sát khả năng phân giải protein thông qua việc tiết enzyme protease của 6 chủng xạ

khuẩn được chọn ở thí nghiệm trên môi trường skim milk (Bảng 3) cho thấy rằng tất 6 chủng đều có khả năng tiết enzyme protease được thể hiện qua bán kính phân giải protein (BKPGP).

Bảng 3: Khả năng phân giải protein của 6 chủng xạ khuẩn qua các thời điểm

STT	Chủng xạ khuẩn	Bán kính phân giải protein (mm)		
		3 NSKC	4 NSKC	5 NSKC
1	4A1	3,0 a	6,1 a	6,8 a
2	BM15	1,0 c	2,6 bc	4,1 bc
3	8.11.1	1,0 c	3,1 b	4,3 b
4	SM8	0,0 d	1,5 d	3,3 d
5	9.3.1	2,0 b	3,5 b	5,3 b
6	5A6	0,0 d	1,9 cd	4,1 bc
Mức ý nghĩa		*	*	*
CV (%)		15,2	24,7	24,1

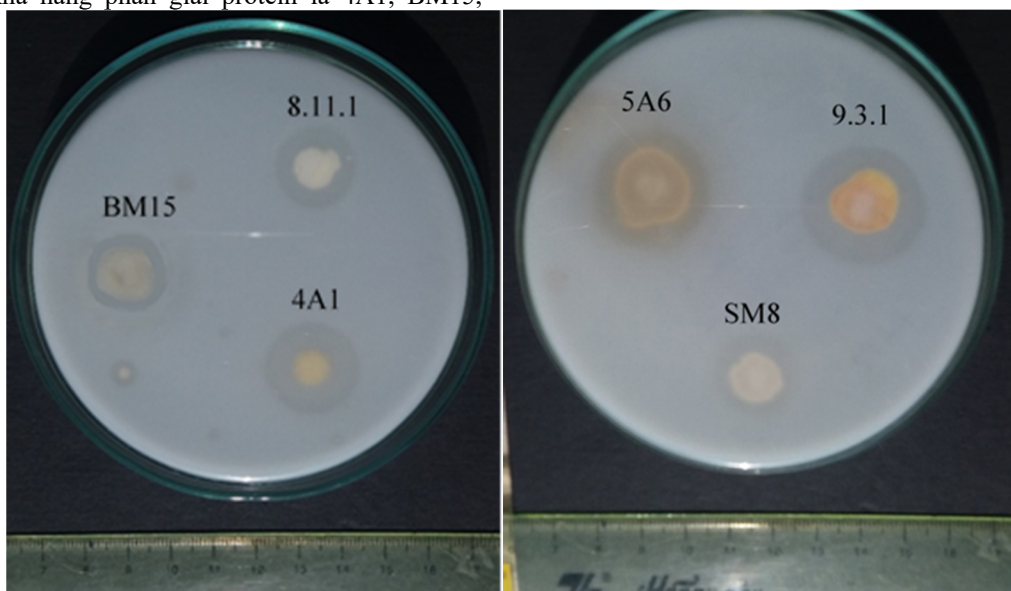
Ghi chú: Trong cùng một cột, các giá trị trung bình theo sau bởi một hay nhiều chữ giống nhau thì không khác biệt thống kê ở mức ý nghĩa 5% qua phép kiểm định Duncan; *: khác biệt ở mức ý nghĩa 5%; Số liệu đã được chuyển sang log(X+1) khi phân tích thống kê

Ở thời điểm 3NSKC, các chủng xạ khuẩn thể hiện khả năng phân giải protein ngoại trừ 2 chủng SM8 và 5A6, nhưng đến thời điểm 4NSKC toàn bộ các chủng đều phân giải protein. Điều này cho thấy khả năng phân giải protein của xạ khuẩn có khuynh hướng nhanh hơn phân giải chitin, kết quả được ghi nhận tương tự với nghiên cứu của Huỳnh Trường Giang và Lê Minh Tường (2017). Nhìn chung, qua 3 thời điểm khảo sát cho thấy chỉ có chủng xạ khuẩn 4A1 có khả năng phân giải cao nhất, kể đến là các chủng BM15, 8.11.1, 9.3.1, 5A6.

Vào thời điểm 3NSKC, có 4 chủng xạ khuẩn thể hiện khả năng phân giải protein là 4A1, BM15,

8.11.1 và 9.3.1, trong đó 4A1 vẫn là chủng xạ khuẩn thể hiện khả năng phân giải protein cao nhất với BKPGP là 3 mm, cao hơn và khác biệt ý nghĩa hoàn toàn so với các chủng còn lại. Kể đến là chủng 9.3.1 với BKPGP là 2 mm.

Vào thời điểm 4 NSKC, cả 6 chủng đều phân giải protein, trong đó chủng 4A1 có BKPGP là 6 mm đạt cao nhất và cao gấp đôi so với các chủng khác. Kể đến là các chủng xạ khuẩn gồm 9.3.1, 8.11.1, BM15 với BKPGP lần lượt là 3,5 mm, 3,1 mm, 2,6 mm, cao hơn và khác biệt ý nghĩa với 2 chủng còn lại (Hình 3).



Hình 3: Bán kính phân giải protein của 6 chủng xạ khuẩn ở thời điểm 4 NSKC

Tại thời điểm 5 NSKC, chủng 4A1 với BKPGP tăng lên 6, 8 mm vẫn khác biệt ý nghĩa với các chủng xạ khuẩn khác. 4 chủng BM15, 8.11.1, 9.3.1 và 5A6 không có khác biệt về mặt ý nghĩa nhưng lại khác biệt so với chủng SM8.

Như vậy, qua 2 thí nghiệm khảo sát khả năng phân giải chitin và protein cho thấy rằng 3 chủng xạ khuẩn là chủng 4A1, 8.11.1, BM15, có khả năng phân giải chitin và protein cao nên được chọn để đánh giá hiệu quả phòng tuyến trùng *Pratylenchus* sp. trong thí nghiệm tiếp theo. Kết quả trong thí nghiệm trên cho thấy 3 chủng xạ khuẩn này có liên đến khả năng phân giải vách tế bào tuyến trùng, bởi vì theo Nguyễn Ngọc Châu và Nguyễn Vũ Thanh (2000) vách tế bào của cơ thể tuyến trùng được bao bọc bằng lớp vỏ chitin là nơi gắn các bắp thịt đảm bảo cho tuyến trùng có độ căng cần thiết và nhiệm vụ quan trọng hơn là giúp bảo vệ cơ thể, tránh tác động bên ngoài và giúp tuyến trùng chuyển động. Hơn nữa, chitin cũng là một trong những thành phần quan trọng trên vỏ trứng tuyến trùng giúp chống lại những điều kiện khắc nghiệt (Endo *et al.*, 1999 trích dẫn bởi Castillo and Vovlas, 2007). Ngoài ra,

protein là một trong những thành phần hóa học để tạo thành lớp vỏ bên ngoài của tuyến trùng. Lớp vỏ rất quan trọng với ấu trùng cũng như tuyến trùng trưởng thành, giúp bảo vệ chúng khỏi tác động của môi trường (Ferraz and Brow, 2002). Vì vậy, khả năng phân giải chitin và protein thông qua việc tiết enzyme chitinase và enzyme protease của xạ khuẩn có thể làm phân hủy lớp vỏ trứng tuyến trùng làm chúng không thể nở thành ấu trùng tuổi 2, cũng như hạn chế khả năng lưu tồn của trứng. Song song đó, cũng làm phân hủy vách tế bào bên ngoài của con tuyến trùng làm chúng chết. Do đó, có thể xem đây là một trong những cơ chế quan trọng trong phòng trừ tuyến trùng.

3.3 Ảnh hưởng của dịch trích xạ khuẩn lên tuyến trùng *Pratylenchus* sp. trong điều kiện phòng thí nghiệm

Qua xác định số lượng tuyến trùng *Pratylenchus* sp. còn sống từ các mẫu đất vào 3 thời điểm 24, 48 và 72 giờ ở các nghiệm thức cho thấy các chủng xạ khuẩn đều có khả năng gây chết tuyến trùng (Bảng 4 và 5).

Bảng 4: Số tuyến trùng *Pratylenchus* sp. còn sống qua các thời điểm sau khi xử lý dịch trích xạ khuẩn trong điều kiện phòng thí nghiệm

STT	Nghiệm thức	Số tuyến trùng còn sống sau thời điểm xử lý		
		24 GSKXL	48 GSKXL	72 GSKXL
1	XK 4A1	153,3 b	145,8 b	106,8 bc
2	XK BM15	147,3 b	162,5 b	115,8 bc
3	XK 8.11.1	166,0 b	166,5 b	144,0 b
4	HHXK (4A1+BM15+8.11.1)	119,3 b	81,3 c	65,8 c
5	Abamectin	12,8 c	0,0 d	0,0 d
6	Đối chứng	356,5a	354,3 a	256,5 a
Mức ý nghĩa		*	*	*
CV (%)		22,1	27,7	28,8

Ghi chú: Trong cùng một cột, các giá trị trung bình theo sau bởi một hay nhiều chữ giống nhau thì không khác biệt thống kê ở mức ý nghĩa 5% qua phép kiểm định Duncan; *: khác biệt ở mức ý nghĩa 5%; GSKXL: giờ sau khi xử lý. Số liệu đã được chuyển sang arcsin khi phân tích thống kê.

Bảng 5: Hiệu lực của dịch trích xạ khuẩn đối với tuyến trùng *Pratylenchus* sp. trong thí nghiệm ở các thời điểm sau khi xử lý trong điều kiện phòng thí nghiệm

STT	Nghiệm thức	Độ hữu hiệu (%)		
		24 GSKXL	48 GSKXL	72 GSKXL
1	XK 4A1	56,72 b	57,41 c	64,83 bc
2	XK BM15	58,88 b	52,02 c	55,67 cd
3	XK 8.11.1	53,60 b	50,04 c	44,82 d
4	HHXK (4A1+BM15+8.11.1)	66,34 b	76,35 b	74,58 b
5	Abamectin	96,50a	100,0a	100,0a
Mức ý nghĩa		*	*	*
CV (%)		11,88	9,42	11,62

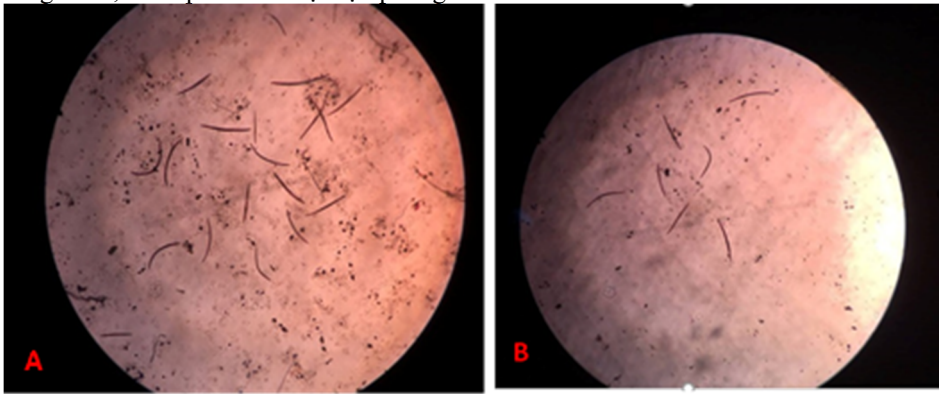
Ghi chú: Trong cùng một cột, các giá trị trung bình theo sau bởi một hay nhiều chữ giống nhau thì không khác biệt thống kê ở mức ý nghĩa 5% qua phép kiểm định Duncan; *: khác biệt ở mức ý nghĩa 5%; GSKXL: giờ sau khi xử lý. Số liệu đã được chuyển sang arcsin√x khi phân tích thống kê

Ở thời điểm 24 GSKXL, số tuyến trùng sống ở các nghiệm thức xử lý dịch trích của các chủng xạ khuẩn 4A1, BM15, 8.11.1, hỗn hợp 3 chủng xạ khuẩn 4A1+BM15+8.11.1 và hoạt chất abamectin đều thấp hơn và khác biệt ý nghĩa so với đối chứng, trong đó nghiệm thức abamectin thể hiện hiệu quả cao hơn các nghiệm thức xử lý xạ khuẩn (Bảng 4 và 5).

Đến thời điểm 48 GSKXL, thời điểm này bắt đầu có sự khác biệt giữa các nghiệm thức xử lý xạ khuẩn. Trong đó, nghiệm thức hỗn hợp 3 chủng xạ khuẩn 4A1+BM15+8.11.1 thể hiện khả năng giết chết tuyến trùng mạnh hơn với số trung bình con tuyến trùng còn sống là 81,25 thấp hơn và hiệu lực phòng

trị đạt 76,35% khác biệt so với ba nghiệm thức xử lý xạ khuẩn đơn còn lại. Chủng 4A1, BM15, 8.11.1 mặc dù không khác biệt nhau, nhưng vẫn có sự khác biệt so với đối chứng. Hoạt chất abamectin thể hiện hiệu quả nhất với độ hữu hiệu đạt 100%.

Tương tự, tại thời điểm 72 giờ, tất cả các nghiệm thức xử lý dịch trích xạ khuẩn đều thể hiện hiệu lực giết chết tuyến trùng, trong đó hỗn hợp dịch trích của 3 chủng xạ khuẩn 4A1+BM15+8.11.1 thể hiện hiệu quả cao hơn với số tuyến trùng còn sống là 65,75 và hiệu lực phòng trị đạt 74,58% khác biệt ý nghĩa so với dịch trích chủng 8.11.1. Riêng về hiệu lực phòng trị, dịch trích chủng 4A1 đạt cao hơn và khác biệt so với dịch trích chủng 8.11.1.



Hình 4: Số con tuyến trùng còn sống ở thời điểm 72 giờ sau khi xử lý. Ghi chú: A. Nghiệm thức đối chứng; B. Nghiệm thức hỗn hợp 3 chủng xạ khuẩn 4A1+BM15+8.11.1. (Hình chụp ở vật kính 4X)

Nhìn chung, cả 3 thời điểm xử lý, dịch trích các chủng xạ khuẩn đều thể hiện khả năng gây chết tuyến trùng. Trong đó, hỗn hợp dịch trích xạ khuẩn 4A1+BM15+8.11.1 cho hiệu quả gây chết tuyến trùng cao nhất, dịch trích chủng xạ khuẩn 8.11.1 có hiệu quả diệt tuyến trùng thấp hơn so với chủng 4A1, BM15. Sự khác biệt về hiệu lực gây chết giữa nghiệm thức xử lý dịch trích từ các chủng xạ khuẩn khác nhau thể hiện rõ ở giai đoạn sau có thể liên quan đến tính ổn định trong tiêu diệt tuyến trùng của từng loại trích từ xạ khuẩn là khác nhau. Tóm lại, tuy xạ khuẩn tác dụng chậm nhưng cho hiệu quả gây chết kéo dài. Ba chủng xạ khuẩn 4A1, BM15, 8.11.1 đều có khả năng tiết enzyme chitinase cao, khi được nuôi cấy xạ khuẩn trong môi trường ISP2 có bổ sung thêm colloidal chitin sẽ tạo điều kiện xạ khuẩn tiết ra nhiều enzyme chitinase trong dịch trích nuôi cấy, từ đó phá hủy lớp chitin của tuyến trùng *Pratylenchus sp.*. Tương tự như kết quả nghiên cứu của Phan Thị Mỹ Phúc (2014) cũng đã sử dụng những chủng nấm *Trichoderma spp.* có khả năng tiết enzyme chitinase cao để phá hủy vỏ trứng tuyến trùng *Meloidogyne incognita*. Ngoài ra, theo kết quả nghiên cứu của Zhang (2016), khi sử dụng dịch trích của chủng xạ khuẩn S07 để tiêu diệt tuyến trùng

Heterodera filipjevi cho thấy 24 giờ sau khi xử lý ấu trùng tuổi 2, tỷ lệ sống giảm còn 35% so với đối chứng 97%, đến 48 giờ thì tỷ lệ này chỉ còn 3,9% và được chọn là tác nhân có tiềm năng dùng trong phòng trừ sinh học.

4 KẾT LUẬN VÀ ĐỀ XUẤT

4.1 Kết luận

Kết quả phân lập được 64 chủng xạ khuẩn, trong đó có 6 chủng xạ khuẩn 4A1, BM15, 8.11.1, 9.3.1, 5A6, SM8 có khả năng phân giải chitin và protein cao. Trong đó, 3 chủng xạ khuẩn 4A1, BM15, 8.11.1 thể hiện khả năng phân giải chitin và protein cao nhất vượt trội hơn các chủng còn lại.

Dịch trích 3 chủng xạ khuẩn đơn 4A1, BM15, 8.11.1 và hỗn hợp 3 chủng xạ khuẩn 4A1+BM15+8.11.1 đều thể hiện khả năng giết chết tuyến trùng. Trong đó, dịch trích của hỗn hợp 3 chủng xạ khuẩn 4A1+BM15+8.11.1 thể hiện hiệu quả cao hơn so với các chủng xạ khuẩn đơn, đạt hiệu lực phòng trị tới 74,58% vào 72 giờ sau khi xử lý.

4.2 Đề xuất

Tiếp tục thực hiện định danh các chủng xạ khuẩn triển vọng và đánh giá hiệu quả của các xạ khuẩn

triển vọng trong phòng trừ tuyến trùng *Pratylenchus* sp. ở điều kiện ngoài đồng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Abbott, W. S., 1925. A method for computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomol*, 18(2): 265-267.
- Adesiyun, S.O., Odihirin, R.A., 1977. Plant-parasitic nematodes associated with tubers in Midwest states, Nigeria. *Nigerian Journal of plant protection*, 3: 178-179.
- Bell, C.A., 2000. Fumigation in the 21 century. *Crop protection*, 19:563-569.
- Bùi Thị Hà, 2008. Nghiên cứu xạ khuẩn thuộc chi *Streptomyces* sinh chất kháng sinh chống nấm gây bệnh trên cây chè ở Thái Nguyên. Luận văn thạc sĩ Sinh học. Trường Đại học Thái Nguyên, 77tr.
- Castillo, P., and Vovlas, N., 2007. *Pratylenchus* (Nematoda: Pratylenchidae): diagnosis, biology, pathogenicity and management. *Brill*, 6: 529.
- Dương Văn Anh, 2017. Đánh giá hiệu quả phòng trị của xạ khuẩn và thuốc hóa học đối với bệnh thán thư do nấm *Colletotrichum* sp. trên đậu nành rau (*Glycine max.*(L) Merr.) trong điều kiện nhà lưới. Luận văn thạc sĩ, chuyên ngành Bảo vệ thực vật. Khoa Nông nghiệp và Sinh học Ứng dụng. Trường Đại học Cần Thơ, 94 trang.
- Đinh Ngọc Trúc và Trần Vũ Phấn, 2014. Khả năng đối kháng của chủng xạ khuẩn đối với nấm *Pyricularia oryzae* Cavara và cơ chế có liên quan trong điều kiện in vitro. *Tạp chí hội thảo quốc gia bệnh hại thực vật VN lần 13*, 13: 208-217.
- Ferraz, L. C., and Brown, D. J., 2002. *An Introduction to Nematodes: A Student's Textbook*. Plant nematology, Pensoft Pub., 3: 221.
- Hobbs, G., Frazer, C., Gardner, D. J., Cullum, J. and Oliver, S., 1989. Dispersed growth of *Streptomyces* in liquid culture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 31(3): 272 - 277.
- Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J. T., Williams, S. T., 1994. *Bergey's manual of determinative bacteriology*, Ninth Edition. Lippincott Williams and Wilkins. USA.
- Hsu, S. C. and Lockwood, J. L., 1975. Powdered chitin agar as a selective medium for enumeration of actinomycetes in water and soil. *Applied microbiology*, 422-426.
- Huỳnh Trường Giang và Lê Minh Tường, 2017. Khảo sát khả năng đối kháng của xạ khuẩn đối với vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* gây bệnh héo xanh hại khoai lang. *Tạp chí bảo vệ thực vật*, 3: 34-39.
- Jonathan, E. I., Barker, K. R., Abdel, A., Vrain, T. C. and Dickson, D. W., 2000. Biological control of *Meloidogyne incognita* on tomato and banana with rhizobacteria, actinomycetes, and *Pasteuria penetrans*. *Nematropica*, 30(2):231-240.
- Michel, K.A., Brice, D. K. E., Boni, N.Z.U.E., Sidoine, E.B., Pierre, Z.G., 2015. Dichotomous key determining varietal groups of yam species *Dioscorea alata* L. *Greener Journal of Agricultural sciences*, 5(5): 190-203.
- Muniz, M.F.S., Silva, E.J., Castro, J.M.C., Rocha, F.S., Alencar, L.M.C. and Gonzaga, V., 2012. Intensity of dry rot disease of yam in the state of Alagoas, Brazil. *Nematropica*, 49:198-200.
- Nguyễn Ngọc Châu và Nguyễn Vũ Thanh, 2000. *Động vật chí Việt Nam tập 4*. Nhà xuất bản khoa học và kỹ thuật. 401 trang.
- Nguyễn Ngọc Châu, 2003. *Tuyến trùng thực vật và cơ sở phòng trừ*. Nhà xuất bản khoa học kỹ thuật. 302 trang.
- Nguyễn Lâm Dũng, Nguyễn Đình Quyến, Phạm Văn Ty, 2002. *Vi sinh vật học*. Nhà xuất bản Giáo Dục, Hà Nội. 559 trang.
- Perry, N. R. and Moens, M., 2006. *Plant nematology*, Biddles Ltd, King's Lynn, 440 pages.
- Phan Thị Mỹ Phúc, 2014. Đánh giá khả năng tiết chitinase và phòng trị của các chủng nấm *Trichoderma* spp. đối với trứng tuyến trùng (*Meloidogyne incognita*, Chitwood) gây bệnh bướu rễ trên cây cà chua (*Lycopersicon esculentum*, Miller). Luận văn thạc sĩ, chuyên ngành Bảo vệ thực vật. Khoa Nông nghiệp và Sinh học Ứng dụng. Trường Đại học Cần Thơ, 57 trang.
- Shurtleff, M. C., Averre, C. V., 1997. *The plant disease clinic and field, society*. St. Paul, Minnesata, 245 pages.
- Từ Ngọc Hiếu, 2013. Khảo sát bệnh tuyến trùng trên cây khoai mỡ và cây lúa ở vùng canh tác trồng điem của Đồng Bằng Sông Cửu Long. Luận văn thạc sĩ, chuyên ngành Bảo vệ thực vật. Khoa Nông nghiệp và Sinh học ứng dụng. Trường Đại học Cần Thơ, 84 trang.
- Wei, G., Kloepper, J. W., Sadik, T., 1991. Induction of Systemic Resistance of Cucumber to *Colletotrichum orbicular* by Selected Strains of Plant Growth Promoting Rhizobacteria. *Phytopathol.*, 81:1508-1512.
- Zhang, J., Wang, L.M., Li, Y. H., Ding, S. L., Yuan, H. X., Rily, I. T. and Li, H. L., 2016. Biocontrol of Cereal cyst nematode by *Streptomyces anulatus* isolate S07. *Australian Plant Pathol.*, 45(1): 57-64.