

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
ĐẠI HỌC ĐÀ NẴNG**

BÁO CÁO TỔNG KẾT

**ĐỀ TÀI KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ
CẤP ĐẠI HỌC ĐÀ NẴNG**

**NGHIÊN CỨU THỬ NGHIỆM CHẾ PHẨM SINH HỌC
TỪ XẠ KHUẨN *Streptomyces*, ĐỂ PHÒNG CHỐNG BỆNH
THÁN THƯ TRÊN CÂY ỚT (*Capsicum frutescens*)
TẠI THÀNH PHỐ ĐÀ NẴNG**

Mã số: Đ 2013-03-39

Chủ nhiệm đề tài: ThS. Lê Thị Mai

Đà Nẵng, Tháng 12/ 2013

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
ĐẠI HỌC ĐÀ NẴNG**

**BÁO CÁO TỔNG KẾT
ĐỀ TÀI KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ
CẤP ĐẠI HỌC ĐÀ NẴNG**

**NGHIÊN CỨU THỬ NGHIỆM CHẾ PHẨM SINH HỌC
TỪ XẠ KHUẨN *Streptomyces*, ĐỂ PHÒNG CHỐNG BỆNH
THÁN THU TRÊN CÂY ỚT (*Capsicum frutescens*)
TẠI THÀNH PHỐ ĐÀ NẴNG**

Mã số: Đ 2013-03-39

Xác nhận của cơ quan chủ trì đề tài
(*ký, họ và tên, đóng dấu*)

Chủ nhiệm đề tài
(*ký, họ và tên*)

Lê Thị Mai

Đà Nẵng, Tháng 12/2013

MỤC LỤC

DANH MỤC CÁC BẢNG	6
DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT	7
THÔNG TIN KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU	8
INFORMATION ON RESEARCH RESULTS	1
MỞ ĐẦU	3
CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN TÀI LIỆU	5
1.1. KHÁI QUÁT VỀ CÂY ỚT VÀ TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU <i>Colletotrichum sp</i> GÂY BỆNH THÁN THƯ TRÊN ỚT.....	5
1.1.1. Khái quát về cây ớt.....	5
1.1.1.1. Đặc điểm sinh học của cây ớt.....	5
1.1.1.2. Giá trị dinh dưỡng, y học của cây ớt.....	5
1.1.2. Nghiên cứu về các loài nấm <i>Colletotrichum</i> gây bệnh thán thư ớt.....	5
1.2. SƠ LƯỢC VỀ XẠ KHUẨN.....	5
1.2.1. Cấu tạo của xạ khuẩn.....	5
1.2.2. Ứng dụng của xạ khuẩn sinh chất kháng sinh trong bảo vệ thực vật trên thế giới và Việt Nam.....	6
1.2.2.1. Ứng dụng của xạ khuẩn sinh chất kháng sinh trong bảo vệ thực vật trên thế giới.....	6
1.2.2.2. Ứng dụng xạ khuẩn sinh chất kháng sinh trong bảo vệ thực vật ở Việt Nam.....	6
CHƯƠNG 2: ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	6
2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU.....	6
2.2. ĐỊA ĐIỂM, PHẠM VI VÀ THỜI GIAN NGHIÊN CỨU.....	6
2.2.1. Địa điểm và phạm vi nghiên cứu thí nghiệm.....	6
2.2.1.1. Địa điểm thu mẫu ngoài thực địa.....	6
2.2.2.2. Địa điểm nghiên cứu thí nghiệm.....	6

2.2.2. Thời gian nghiên cứu.....	7
2.3. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	7
2.3.1 Phương pháp thu mẫu ngoài thực địa.....	7
2.3.1.1. Thu mẫu bệnh cây	7
2.3.1.2. Phương pháp thu thập mẫu đất.....	7
2.3.1.3. Phương pháp thu mẫu theo giai đoạn sinh trưởng, phát triển của cây ớt.....	7
2.3.2 Phương pháp nghiên cứu trong phòng thí nghiệm	7
2.3.2.1. Phương pháp phân lập mẫu bệnh cây	7
2.3.2.2. Sơ bộ phân loại các chủng nấm mốc gây bệnh trên ớt	7
2.3.2.3. Nghiên cứu một số đặc điểm sinh học.....	7
2.3.2.4. Các phương pháp xác định hoạt tính kháng sinh.....	7
2.3.2.5. Lựa chọn môi trường lên men sinh tổng hợp chất kháng sinh.....	7
2.3.2.6. Phương pháp tìm hiểu khả năng ứng dụng dịch kháng sinh thô của các chủng xạ khuẩn chống nấm gây bệnh thán thur trên cây ớt.....	7
2.3.3. Phương pháp xử lý số liệu.....	7
CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ VÀ BIỆN LUẬN	8
3.1. THÀNH PHẦN CÁC CHỦNG VI NẤM GÂY TRÊN CÂY ỚT	8
3.2. NGHIÊN CỨU TRIỆU CHỨNG BỆNH VÀ LÂY BỆNH NHÂN TẠO CỦA CÁC CHỦNG NẤM MỐC GÂY BỆNH THÁN THUR (<i>Colletotrichum</i>) TRÊN CÂY ỚT.....	9
3.2.1 Nghiên cứu các chủng nấm mốc gây bệnh thán thư (<i>Colletotrichum</i>) trên cây ớt	9
3.2.2. Kết quả lây bệnh nhân tạo xác định tác nhân nấm gây bệnh thán thư trên cây ớt.....	9

3.3. PHÂN LẬP, TUYỂN CHỌN CÁC CHỦNG XẠ KHUẨN CÓ HOẠT TÍNH KHÁNG SINH MẠNH VỚI VI NẤM GÂY BỆNH TRÊN CÂY ỚT	10
3.4. NGHIÊN CỨU CÁC ĐẶC ĐIỂM SINH HỌC CỦA CHỦNG XẠ KHUẨN XK5	12
3.4.1. Đặc điểm nuôi cấy và đặc điểm hình thái.....	12
3.4.2. Đặc điểm sinh lý, sinh hóa	12
3.4.2.1. Xác định nhiệt độ và pH tối ưu.....	12
3.4.2.2. Sự hình thành sắc tố mêtanin	13
3.4.2.3 Khả năng đồng hóa các nguồn cacbon	13
3.4.2.4. Khả năng sinh amilaza, xenlulaza ngoại bào của chủng xạ khuẩn XK5.....	14
3.5. KHẢ NĂNG SINH TỔNG HỢP CHẤT KHÁNG SINH CỦA CHỦNG XẠ KHUẨN XK5	14
3.5.1. Hoạt tính kháng nấm <i>Colletrichum</i> của chủng xạ khuẩn XK5	14
3.5.2. Lựa chọn môi trường lên men	15
3.5.3. Ảnh hưởng của nhiệt độ và pH đến khả năng sinh tổng hợp CKS	15
3.5.4. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến khả năng sinh tổng hợp CKS	15
3.6. THỬ NGHIỆM KHẢ NĂNG ỨNG DỤNG CỦA DỊCH KHÁNG SINH THÔ CỦA CHỦNG XẠ KHUẨN XK5.....	16
3.6.1. Xử lý hạt bằng dung dịch kháng sinh thô của chủng XK5..	16
3.6.2. Phương pháp tạo chế phẩm	17
3.6.3. Xử lý đất trồng ớt đã nhiễm <i>Colletotrichum</i>	17
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....	19

DANH MỤC CÁC BẢNG

Số hiệu bảng	Tên bảng	Trang
3.1	Thành phần và tỷ lệ % các chi nấm mốc gây bệnh trên cây ớt	8
3.3	Tỷ lệ mẫu có nấm mốc gây bệnh thán thư trên tổng số mẫu phân lập ở các giai đoạn sinh trưởng, phát triển trên cây ớt	9
3.4	Kết quả lây bệnh nhân tạo chủng nấm NB11 lên quả ớt	10
3.5	Hoạt tính kháng VSVKD của 20 chủng XK chi <i>Streptomyces</i>	11
3.7	Khả năng đồng hóa các nguồn cacbon của chủng XK5	13
3.8	Khả năng sinh amilaza, xenlulaza ngoại bào của chủng xạ khuẩn XK5	14
3.9	Hoạt tính kháng nấm <i>colletotrichum</i> của chủng XK 5	14
3.14	Kết quả ảnh hưởng của dịch kháng sinh thô của chủng XK5	16
3.15	Khả năng chống bệnh thán thư của chế phẩm kháng sinh của chủng XK5	17

DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT

CFU	: Colony Foming Unit (Đơn vị khuẩn lạc)
CKS	: Chất kháng sinh
CT	: Công thức
MT	: Môi trường
NB	: Nấm bệnh
STT	: Số thứ tự
TP	: Thành phố
VSV	: Vi sinh vật
XK	: Xạ khuẩn

THÔNG TIN KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

1. Thông tin chung

Tên đề tài: Nghiên cứu thử nghiệm chế phẩm sinh học từ xạ khuẩn *Streptomyces*, để phòng chống bệnh thán thư trên cây ớt (*Capsium frutescens*) tại Thành phố Đà Nẵng

Mã số: Đ2013-39

Chủ nhiệm đề tài : ThS. Lê Thị Mai

Cơ quan chủ trì: Trường Đại học Sư phạm- Đại học Đà Nẵng

Thời gian thực hiện: Từ tháng 01 năm 2013 đến 31 tháng 12 năm 2013

2. Mục tiêu

Nghiên cứu thử nghiệm chế phẩm sinh học từ các chủng xạ khuẩn *Streptomyces* để phòng chống nấm gây bệnh trên cây ớt (*Capsium frutescens*) tại một số vùng của Tp. Đà Nẵng

3. Tính mới và sáng tạo

Đề tài đã cung cấp những số liệu ban đầu về các chủng nấm mốc gây bệnh thán thư trên cây ớt (*Capsicum frutescent* L.) tại một số vùng trồng ớt của TP. Đà Nẵng. Thông tin kết quả ứng dụng dịch kháng sinh thô của các chủng xạ khuẩn chống nấm gây bệnh thán thư trên cây ớt cho hiệu quả tốt, là cơ sở khoa học cho việc ứng dụng các chất kháng sinh trong lĩnh vực bảo vệ cây trồng tại điều kiện địa phương nhằm góp phần nâng cao năng suất cây trồng và xây dựng nền một nông nghiệp sạch dựa trên quan điểm sinh thái bền vững.

4. Kết quả nghiên cứu

- Thành phần của các chủng nấm mốc gây bệnh chính trên cây ớt.

- Phân lập, nghiên cứu được 04 chủng nấm mốc gây bệnh thán thư trên cây ớt.
- Tuyển chọn được 05 chủng xạ khuẩn (XK1, XK5, XK8, XK14, XK20) có hoạt tính mạnh, kháng với 4 chủng nấm bệnh gây thán thư trên ớt.
- Đã nghiên cứu động thái sinh trưởng phát triển và sinh tổng hợp chất kháng sinh của chủng XK5.
- Nghiên cứu ứng dụng chế phẩm kháng sinh thô của các chủng xạ khuẩn XK5 chống nấm gây bệnh thán thư trên cây ớt cho kết quả tốt, có tác dụng kích thích nhẹ sự sinh trưởng, phát triển của cây, có thể ứng dụng vào thực tiễn địa phương

5. Tên sản phẩm

- Bài báo khoa học: “Nghiên cứu đặc điểm sinh học của chủng xạ khuẩn XK5 sinh kháng sinh chống nấm gây bệnh thán thư trên cây ớt (*Capsicum frutescens* L.)”

6. Hiệu quả, phương thức chuyển giao kết quả nghiên cứu và khả năng áp dụng

Các kết quả nghiên cứu của đề tài được ứng dụng tại các vùng trồng ớt của TP. Đà Nẵng.

Ngày 22 tháng 12 năm 2013

Cơ quan Chủ trì

(ký, họ và tên, đóng dấu)

Chủ nhiệm đề tài

(ký, họ và tên)

INFORMATION ON RESEARCH RESULTS

1. General information:

Project title:

Research tested probiotics from *Streptomyces*, to prevent anthracnose on chilli (*Capsium frutescens*) in Da Nang City

Code number: D2013-03-39

Coordinator: MSc. Le Thi Mai

Implementing institution: Danang University of Education

Duration: from 01/01/ 2013 to 31/12/ 2013

2. Objective(s):

Research testing biological products from actinomycetes *Streptomyces* strains to prevent fungus on chilli (*Capsium frutescens*) at some region of Da Nang city

3. Creativeness and innovativeness:

Supplement new data on the species of mold cause anthracnose on chilli (*Capsicum frutescens* L.) in some areas of Da Nang city. Information results antibiotic crude application of antifungal actinomycetes strains causing anthracnose on chilli has effected good. This results is the scientific basis for the use of antibiotics in plant protection in local conditions in order to contribute to improving crop yields and the building of a clean agriculture based on sustainable ecological perspective.

4. Research results:

The composition of the major pathogenic strains of mold on chilli.

- Isolation, study 04 strains of fungi causing anthracnose on chilli
- Selection of the 05 strains of actinomycetes (XK1, XK5, XK8, XK14, XK20) has strong activity, 4 strains resistant to anthracnose diseases on chili.

- Studying the growth dynamics and the development of antibiotic biosynthesis of XK5 strain.
- Research crude preparations antibiotic of XK5 actinomycetes strains causing anthracnose on chilli has effected good and has effected stimulating on the growth and development of plants. This Result can be applied to local practices

5. Products:

- Once article

6. Effects, transfer alternatives of reserach results and applicability:

- Research results are applied chilli growing areas of Da Nang city

MỞ ĐẦU

1. LÝ DO CHỌN ĐỀ TÀI

Hàng năm các bệnh nấm thực vật như thán thư, đạo ôn, khô vằn, thối cổ rễ... đã gây nhưng tổn thất nặng nề cho cây trồng. Để khắc phục tình hình dịch bệnh các biện pháp phòng trừ bằng hóa học đã được áp dụng tuy hiệu suất nhanh chóng, song sẽ ảnh hưởng tới chất lượng nông sản, đặc biệt là gây ra hàng loạt vấn đề môi trường như ô nhiễm nguồn nước, đất, dư lượng thuốc bảo vệ thực vật vượt quá ngưỡng cho phép, mất cân bằng hệ sinh thái vi sinh. Vì vậy, tìm kiếm biện pháp phòng trừ bệnh hại tối ưu là một trong những hướng đi đúng đắn và cần thiết cho một nền nông nghiệp sạch và bền vững.

Một trong những hướng nghiên cứu đã được đẩy mạnh là phòng trừ dịch hại cây trồng bằng biện pháp sinh học, theo xu hướng này là sử dụng các tác nhân sinh học để hạn chế các quần thể VSV gây bệnh. Trong số các tác nhân sinh học được chú ý sử dụng để ức chế VSV gây bệnh thì xạ khuẩn *Streptomyces* là nhóm có nhiều tiềm năng nhất vì tỷ lệ loài có khả năng chống nấm mạnh nhiều, nấm gây bệnh không kháng thuốc, không gây ô nhiễm môi trường, không ảnh hưởng đến các loài thiên địch có lợi trên đồng ruộng, giúp cải tạo đất.

Cây ớt (*Capsium frutescens*) là cây trồng quan trọng, có giá trị kinh tế cao. Cây ớt vừa là loại rau vừa là gia vị. Ớt không chỉ được dùng làm gia vị trong chế biến thực phẩm mà còn là dược liệu. Chính nhờ những lợi ích trên, diện tích trồng cây ớt không ngừng được mở rộng ở nhiều nơi trong cả nước.

Nhưng do sự biến đổi khí hậu và các biện pháp chăm sóc của nông dân chưa hợp lý là điều kiện thuận lợi để bệnh thán thư bùng phát làm ảnh hưởng lớn tới năng suất và phẩm chất ớt. Trước diễn biến phức tạp của bệnh thán thư thì nhưng kết quả nghiên cứu về chế

phẩm sinh học từ xạ khuẩn *Streptomyces*, để phòng chống bệnh thán thư sẽ góp phần giảm thiểu thiệt hại cho người dân trồng ớt ở địa phương. Do vậy, đề tài mang tính cấp thiết và có ý nghĩa khoa học thực tiễn cao. Xuất phát từ những lý do trên chúng tôi chọn đề tài: “**Nghiên cứu thử nghiệm chế phẩm sinh học từ xạ khuẩn *Streptomyces*, để phòng chống bệnh thán thư trên cây ớt (*Capsium frutescens*) tại Thành phố Đà Nẵng**”.

2. MỤC TIÊU NGHIÊN CỨU

Nghiên cứu thử nghiệm chế phẩm sinh học từ các chủng xạ khuẩn *Streptomyces* để phòng chống nấm gây bệnh trên cây ớt (*Capsium frutescens*) tại một số vùng của Tp. Đà Nẵng

3. NỘI DUNG NGHIÊN CỨU

- Phân lập và nghiên cứu các chủng vi nấm gây bệnh thán thư trên cây ớt (*Capsium frutescens*).
- Phân lập, tuyển chọn các chủng xạ khuẩn *Streptomyces* trong đất sinh kháng sinh kháng mạnh với nấm gây bệnh thán thư trên cây ớt.
- Nghiên cứu đặc điểm sinh học của một số chủng xạ khuẩn *Streptomyces* trong đất, sinh kháng sinh kháng mạnh với nấm gây bệnh thán thư trên cây ớt (*Capsium frutescens*)
- Nghiên cứu thử nghiệm chế phẩm sinh học thô phòng trừ nấm gây bệnh thán thư trên cây ớt (*Capsium frutescens*).

4. Ý NGHĨA KHOA HỌC VÀ THỰC TIỄN CỦA ĐỀ TÀI

- Đã cung cấp những số liệu ban đầu về các chủng nấm mốc gây bệnh thán thư trên cây ớt (*Capsicum frutescens* L.) tại một số vùng trồng ớt của TP. Đà Nẵng. Thông tin của các chủng nấm mốc gây bệnh trên cây ớt là cơ sở khoa học cho việc nghiên cứu các biện pháp phòng trừ nấm bệnh trên cây ớt phù hợp với điều kiện sinh thái tại địa phương.

- Kết quả ứng dụng dịch kháng sinh thô của các chủng xạ khuẩn chống nấm gây bệnh thán thư và héo vàng trên cây ớt cho hiệu quả tốt, là cơ sở khoa học cho việc ứng dụng các chất kháng sinh trong lĩnh vực bảo vệ cây trồng tại điều kiện địa phương nhằm góp phần nâng cao năng suất cây trồng và xây dựng nên một nông nghiệp sạch dựa trên quan điểm sinh thái bền vững.

5. CẤU TRÚC CỦA ĐỀ TÀI

Đề tài gồm 54 trang, với bố cục:

Phần mở đầu 3 trang

Chương 1: Tổng quan tài liệu 12 trang

Chương 2: Đối tượng và phương pháp nghiên cứu 8 trang

Chương 3: Kết quả và biện luận 25 trang

Kết luận và kiến nghị 1 trang, tài liệu tham khảo 5 trang, phần phụ lục gồm các bảng số liệu, các hình ảnh về kết quả nghiên cứu, các địa điểm lấy mẫu nghiên cứu.

CHƯƠNG 1

TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. KHÁI QUÁT VỀ CÂY ỚT VÀ TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU

***Colletotrichum sp* GÂY BỆNH THÁN THƯ TRÊN ỚT**

1.1.1. Khái quát về cây ớt

1.1.1.1. Đặc điểm sinh học của cây ớt

1.1.1.2. Giá trị dinh dưỡng, y học của cây ớt

1.1.2. Nghiên cứu về các loài nấm *Colletotrichum* gây bệnh thán thư ớt

1.2. SƠ LƯỢC VỀ XẠ KHUẨN

1.2.1. Cấu tạo của xạ khuẩn

1.2.2. Ứng dụng của xạ khuẩn sinh chất kháng sinh trong bảo vệ thực vật trên thế giới và Việt Nam

1.2.2.1. Ứng dụng của xạ khuẩn sinh chất kháng sinh trong bảo vệ thực vật trên thế giới

1.2.2.2. Ứng dụng xạ khuẩn sinh chất kháng sinh trong bảo vệ thực vật ở Việt Nam

CHƯƠNG 2

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

- Các chủng nấm mốc gây bệnh được phân lập từ các mẫu bệnh của cây ớt và mẫu đất trồng ớt tại hợp tác xã La Hường (phường Hòa Thọ Đông, quận Cẩm Lệ), thôn Túy Loan (xã Hòa Phong, huyện Hòa Vang), thôn Lộc Mỹ (xã Hòa Bắc, huyện Hòa Vang) - TP. Đà Nẵng.

- Chủng xạ khuẩn *Streptomyces* được phân lập các mẫu đất tại Tp. Đà Nẵng

- Cây ớt (*Capsium frutescens*)

2.2. ĐỊA ĐIỂM, PHẠM VI VÀ THỜI GIAN NGHIÊN CỨU

2.2.1. Địa điểm và phạm vi nghiên cứu thí nghiệm

2.2.1.1. Địa điểm thu mẫu ngoài thực địa

Mẫu bệnh của cây ớt và mẫu đất trồng ớt được lấy tại một số vùng trồng ớt ở TP. Đà Nẵng như: tại hợp tác xã La Hường (phường Hòa Thọ Đông, quận Cẩm Lệ), thôn Túy Loan (xã Hòa Phong, huyện Hòa Vang), thôn Lộc Mỹ (xã Hòa Bắc, huyện Hòa Vang).

2.2.2.2. Địa điểm nghiên cứu thí nghiệm

- Phòng thí nghiệm hóa sinh - vi sinh, khoa Sinh – Môi trường, Trường Đại học Sư phạm, Đại học Đà Nẵng.

- Phòng thí nghiệm vi sinh, Trường Cao đẳng Lương thực thực phẩm, TP. Đà Nẵng.

- Phòng Hóa- Vi sinh, Trung tâm Kỹ thuật TC ĐLCL2, TP.Đà Nẵng.

- Phòng Vi sinh- Hóa sinh, Trung tâm Môi trường, TP.Đà Nẵng.

2.2.2. Thời gian nghiên cứu

Thời gian thực hiện: từ tháng 1/2013 đến 31/12/2013

2.3. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.3.1 Phương pháp thu mẫu ngoài thực địa [1],[2],[6],[8]

2.3.1.1. Thu mẫu bệnh cây [1], [2], [8]

2.3.1.2. Phương pháp thu thập mẫu đất [3], [6], [7]

2.3.1.3. Phương pháp thu mẫu theo giai đoạn sinh trưởng, phát triển của cây ớt [6], [16], [20]

2.3.2 Phương pháp nghiên cứu trong phòng thí nghiệm

2.3.2.1. Phương pháp phân lập mẫu bệnh cây [2], [6], [19]

2.3.2.2. Sơ bộ phân loại các chủng nấm mốc gây bệnh trên ớt [2], [25], [37]

2.3.2.3. Nghiên cứu một số đặc điểm sinh học [6],[12]

2.3.2.4. Các phương pháp xác định hoạt tính kháng sinh

2.3.2.5. Lựa chọn môi trường lên men sinh tổng hợp chất kháng sinh

2.3.2.6. Phương pháp tìm hiểu khả năng ứng dụng dịch kháng sinh thô của các chủng xạ khuẩn chống nấm gây bệnh thán thư trên cây ớt

2.3.3. Phương pháp xử lý số liệu

CHƯƠNG 3

KẾT QUẢ VÀ BIỆN LUẬN

3.1. THÀNH PHẦN CÁC CHỦNG VI NẤM GÂY BỆNH TRÊN CÂY ỚT

Từ 63 mẫu bệnh của cây ớt và mẫu đất lấy tại một số vùng trồng ớt của thành phố Đà Nẵng: La Hường, Túy Loan và Lộc Mỹ, bằng phương pháp phân lập trên môi trường WA (môi trường đặc trưng để phân lập nấm mốc gây bệnh) chúng tôi đã phân lập được 16 chủng nấm kí hiệu NB1- NB16.

Sử dụng khóa phân loại của Oh.I.S. (1995) [37], Brian C. Sutton (1998) [29], S. B. Marthu Olga Kongsdal (2000) [43], J. Taylor (2007) [33], Antonio N. Moretti(2009) [28], Cẩm nang chẩn đoán bệnh cây ở Việt Nam [2] và trên cơ sở các đặc điểm hình thái của 16 chủng nấm mốc. Đặc biệt là đặc điểm quan sát dưới kính hiển vi về hình dạng cuống sinh bào tử, bào tử, sợi nấm chúng tôi sơ bộ phân loại được 6 chi nấm mốc. Kết quả được trình bày ở bảng 3.1

Bảng 3.1. Thành phần và tỷ lệ % các chi nấm mốc gây bệnh trên cây ớt

STT	Chi nấm	Số chủng	Tỷ lệ %
1	<i>Alternaria</i>	2	12,5
2	<i>Colletotrichum</i>	4	25
3	<i>Curvularia sp.</i>	1	6,25
4	<i>Fusarium</i>	4	25
5	<i>Phytophthora</i>	3	18,75
6	<i>Choanephora</i>	2	12,5

Qua bảng 3.1 cho thấy nấm mốc gây bệnh trên ớt thường gặp 6 chi: *Alternaria*, *Colletotrichum*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Phytophthora*, *Chrophyran*. Trong đó *Alternaria* chiếm 12,5%, *Colletotrichum* chiếm 25%, *Curvularia* chiếm 6,25%, *Fusarium* chiếm 25%, *Phytophthora* chiếm 18.75%, *Choanephora* chiếm 12,5%. Như vậy, chi *Colletotrichum* và chi *Fusarium* có số lượng nhiều nhất, chi

Curvularia có số lượng ít nhất. Chi *Colletotrichum* là nguyên nhân gây bệnh thán thư trên cây ớt, là bệnh chính làm giảm sản lượng, chất lượng ớt trên thế giới và ở Việt Nam

3.2. NGHIÊN CỨU TRIỆU CHỨNG BỆNH VÀ LÂY BỆNH NHÂN TẠO CỦA CÁC CHỦNG NẤM MỐC GÂY BỆNH THÁN THƯ (*Colletotrichum*) TRÊN CÂY ỚT

3.2.1 Nghiên cứu các chủng nấm mốc gây bệnh thán thư (*Colletotrichum*) trên cây ớt

Bảng 3.3. Tỷ lệ mẫu có nấm mốc gây bệnh thán thư trên tổng số mẫu phân lập ở các giai đoạn sinh trưởng, phát triển trên cây ớt

Các chủng nấm gây bệnh thán thư	Mẫu có nấm bệnh/ Tổng số mẫu phân lập ở các giai đoạn sinh trưởng, phát triển của cây ớt					
	Giai đoạn cây con		Giai đoạn trưởng thành		Giai đoạn đậu quả	
	Số lượng (mẫu bệnh)	TLB (%)	Số lượng (mẫu bệnh)	TLB (%)	Số lượng (mẫu bệnh)	TLB (%)
NB1	1/18	5,56	2/18	11,11	3/27	11,11
NB4					2/27	7,407
NB6			2/18	11,11	2/27	7,407
NB11	2/18	11,11	3/18	16,67	7/27	25,93
Tỷ lệ bệnh trên tổng số mẫu của giai đoạn	3/18	16,67	8/18	38,89	14/27	51,86

Ghi chú: TLB: Tỷ lệ bệnh

3.2.2. Kết quả lây bệnh nhân tạo xác định tác nhân nấm gây bệnh thán thư trên cây ớt

Bảng 3.4. Kết quả lây bệnh nhân tạo chủng nấm NB11 lên quả ớt

Chỉ tiêu	Đặc điểm quả ớt			
	<i>Lây bệnh không sát thương</i>		<i>Lây bệnh có sát thương</i>	
	Đối chứng	Ớt lây nhiễm chủng nấm NB11	Đối chứng	Ớt lây nhiễm chủng nấm NB11
Ngày phát bệnh	0	Sau 4 ngày	0	Sau 3 ngày
TLB (%)	0	20	0	60
ĐKVB sau 7 ngày (mm)	0	5	0	8
Triệu chứng	Bình thường	Hình thành vết loét, hơi lõm, màu nâu, có sợi nấm phát triển trên vết bệnh	Bình thường	Hình thành vết loét, hơi lõm, màu nâu, có sợi nấm phát triển trên vết bệnh

Ghi chú:

TLB: Tỷ lệ bệnh

ĐKVB: đường kính vết bệnh

Qua bảng 3.4 và hình 3.3 cho thấy các triệu chứng biểu hiện bệnh được mô tả trong bảng phù hợp với kết quả điều tra ngoài đồng ruộng.

3.3. PHÂN LẬP, TUYỂN CHỌN CÁC CHỦNG XẠ KHUẨN CÓ HOẠT TÍNH KHÁNG SINH MẠNH VỚI VI NẤM GÂY BỆNH TRÊN CÂY ỚT

Sau khi tiến hành phân lập 30 mẫu đất lấy từ nhiều vùng đất khác nhau của Tp. Đà Nẵng, trên môi trường Gauze I, đã thu được 45 chủng xạ khuẩn. Dựa vào đặc điểm hình thái khi quan sát khuẩn lạc, hệ sợi khí sinh, cuống sinh bào tử, bào tử dưới kính hiển vi và theo khóa phân loại của Gauze [7] và Bergey [24]. Chúng tôi đã xác định 45 chủng xạ khuẩn đều thuộc chi *Streptomyces* và tạm kí hiệu từ XK1- XK 45. Để nghiên cứu và sơ tuyển các chủng xạ khuẩn chi *Streptomyces* có hoạt tính kháng sinh, chúng tôi tiến hành nuôi cấy

45 chủng xạ khuẩn trên môi trường Gauze II, ở nhiệt độ 28 - 30°C, thời gian 5 - 7 ngày cho hệ sợi phát triển mạnh, CKS hình thành. Kết quả được thể hiện ở bảng 3.5.

Bảng 3.5. Hoạt tính kháng VSVKD của 20 chủng XK chi *Streptomyces*

STT	Các chủng xạ khuẩn	Hoạt tính kháng <i>Collestotrichum</i> (Kích thước vòng vô khuẩn (D-d,mm))			
		NB1	NB4	NB6	NB11
1	XK1	16	18	20	23
2	XK2	7	10	13	19
3	XK3	10	17	9	12
4	XK4	11	19	13	8
5	XK5	21	20	19	25
6	XK6	12	11	15	9
7	XK7	8	16	19	20
8	XK8	18	15	13	21
9	XK9	10	14	9	18
10	XK10	12	9	8	17
11	XK11	14	11	10	13
12	XK12	16	19	12	15
13	XK13	11	10	13	16
14	XK14	17	18	22	17
15	XK15	7	10	13	12
16	XK16	10	17	9	16
17	XK17	12	19	13	15
18	XK18	8	10	11	13
19	XK19	11	9	15	17
20	XK20	14	16	19	22

Trong đó: $D - d \leq 10$: hoạt tính yếu;
 $D - d = 10 - 15$: hoạt tính trung bình;
 $D - d > 15$: hoạt tính mạnh

Kết quả ở bảng 3.5 cho thấy có 20/45 chủng có hoạt tính kháng sinh với nấm kiểm định, chiếm tỷ lệ 44,4%. Nếu so sánh với số liệu của Lê Gia Hy trong cả nước (48,13%) [15] là thấp hơn và Bùi Thị Hà (37,5%) [10] là cao hơn. Trong 20 chủng có hoạt tính kháng sinh chống nấm có 5 chủng xạ khuẩn XK1, XK5, XK8, XK14, XK20 có hoạt tính mạnh. Trong đó, chủng XK5 có khả năng kháng mạnh nhất ở cả 4 nấm bệnh gây hại. Từ đó, chúng tôi tiến hành nghiên cứu đặc điểm sinh học của chủng xạ khuẩn XK5 để có cơ sở khoa học cho việc tạo chế phẩm kháng vi nấm trên cây ớt.

3.4. NGHIÊN CỨU CÁC ĐẶC ĐIỂM SINH HỌC CỦA CHỦNG XẠ KHUẨN XK5

3.4.1. Đặc điểm nuôi cấy và đặc điểm hình thái

Qua bảng 3.6 và hình 3.4 cho thấy chủng xạ khuẩn XK5 sinh trưởng mạnh nhất trên môi trường A4-H và Gauze II là những môi trường giàu đạm hữu cơ, sinh trưởng khá trên môi trường GauzeI, ISP-4 và mọc yếu nhất trên môi trường Czapek tinh bột.

Chủng XK5 có sự biến đổi màu sắc của HSKS và HSCC qua 5 môi trường mô tả như sau:

HSKS có màu trắng đến trắng xám

HSCC có màu nâu đến nâu đậm

Chủng XK5 có khả năng sinh sắc tố tan từ màu vàng nhạt, vàng đậm. Hình dạng cuống sinh bào tử của chủng XK5 là dạng RF, thẳng ngắn đến lượn sóng.

3.4.2. Đặc điểm sinh lý, sinh hóa

3.4.2.1. Xác định nhiệt độ và pH tối ưu

Chủng xạ khuẩn XK5 được nuôi cấy trên môi trường pepton-cao nấm men- thạch, ở các nhiệt độ khác nhau: 21, 24, 28, 30, 35⁰C.

Kết quả cho thấy chủng XK5 sinh trưởng phát triển tốt ở nhiệt độ 28- 30⁰C, sinh trưởng yếu ở nhiệt độ 35⁰C.

pH: Chúng XK 5 được nuôi cấy trên môi trường pepton- cao nấm men- thạch đã chỉnh pH= 5-8, ở nhiệt độ 28-30⁰C, thời gian 5-7 ngày. Sau đó lấy ra quan sát khả năng sinh trưởng của chủng XK5.

Kết quả cho thấy chủng XK 5 sinh trưởng được ở pH= 6,5- 8 nhưng pH tối ưu là pH = 7,0.

3.4.2.2. Sự hình thành sắc tố melanin

Chủng xạ khuẩn tuyển chọn được nuôi cấy trên môi trường ISP-4, pH= 7,0, ở nhiệt độ 28- 30⁰C, trong thời gian 15 ngày. Bắt đầu quan sát màu của môi trường sau một ngày đến 15 ngày. Nếu kết quả dương tính (+), màu của môi trường sẽ chuyển từ màu vàng nhạt sang vàng nâu tối đến màu đen. Kết quả cho thấy chủng xạ khuẩn XK5 sau 24 giờ không có khả năng tiết sắc tố melanin ra môi trường làm cho môi trường chuyển từ màu vàng nhạt sang vàng nâu tối đến màu đen. Khi nuôi chủng XK5 trên các môi trường khác như Gauze I, Gauze II, A4-H cũng cho thấy không có sự hình thành sắc tố.

3.4.2.3 Khả năng đồng hóa các nguồn cacbon

Khả năng đồng hóa các nguồn cacbon của chủng xạ khuẩn XK5 được trình bày ở bảng 3.7.

Bảng 3.7. Khả năng đồng hóa các nguồn cacbon của chủng XK5

Nguồn cacbon	Chủng xạ khuẩn XK5
D- glucoza	+
D- Frucroza	+
Dextrin	+
saccaroza	+
D- Manitol	+
L- Rhamnoza	-
Lactoza	+

Chú thích: Có khả năng : +

Không có khả năng –

Qua kết quả bảng 3.7 cho thấy:

Chủng XK5 có khả năng sử dụng được các nguồn cacbon là D- glucoza, D- Fructroza, Dextrin, saccaroza, D- Manitol. Không sử dụng được nguồn cacbon là L- Rhamnoza.

3.4.2.4. Khả năng sinh amilaza, xenlulaza ngoại bào của chủng xạ khuẩn XK5

Sau khi sử dụng phương pháp khuếch tán trên thạch bằng cách đục lỗ, nhỏ dịch lên men rồi đo vòng phân giải (D-d,mm). Kết quả thu được trong bảng 3.8.

Bảng 3.8. Khả năng sinh amilaza, xenlulaza ngoại bào của chủng xạ khuẩn XK5

Chủng xạ khuẩn	Hoạt tính enzym (D-d,mm)	
	<i>Xenlulaza</i>	<i>Amylaza</i>
XK5	21±1,4	26±1,25

3.5. KHẢ NĂNG SINH TỔNG HỢP CHẤT KHÁNG SINH CỦA CHỦNG XẠ KHUẨN XK5

3.5.1. Hoạt tính kháng nấm *Colletotrichum* của chủng xạ khuẩn XK5

Bằng phương pháp khối thạch đã xác định được khả năng ức chế nấm *Collectotrichum* của chủng xạ khuẩn XK5. Kết quả được trình bày ở bảng 3.9 như sau:

Bảng 3.9. Hoạt tính kháng nấm *Colletotrichum* của chủng XK 5

Chủng xạ khuẩn	Hoạt tính kháng <i>Colletotrichum</i> (Kích thước vòng vô khuẩn, D-d,mm)			
	NB1	NB4	NB6	NB11
XK5	21±1,1	20±1,7	19±1,53	25±0,82

Qua kết quả bảng 3.9 cho thấy chủng xạ khuẩn XK5 có khả năng kháng nấm mạnh và rộng với nhiều chủng nấm *Colletotrichum* gây bệnh thán thư trên cây ớt.

3.5.2. Lựa chọn môi trường lên men

Chủng xạ khuẩn XK5 có hoạt tính kháng sinh kháng nấm mạnh nhất trên môi trường A-4H. Đây là môi trường giàu đạm hữu cơ thích hợp cho xạ khuẩn sinh trưởng và phát triển. Ngoài ra, thành phần của môi trường A4-H khá đơn giản, sẽ thuận lợi cho việc tách chiết chất kháng sinh. Do vậy, môi trường này được chọn làm môi trường lên men thích hợp cho quá trình sinh tổng hợp chất kháng sinh

3.5.3. Ảnh hưởng của nhiệt độ và pH đến khả năng sinh tổng hợp CKS

** Ảnh hưởng của nhiệt độ*

Nhiệt độ tối ưu thích hợp cho khả năng hình thành CKS là 28⁰C. Nhận xét này phù hợp với nhiều tác giả đã nghiên cứu

** Ảnh hưởng của pH ban đầu*

Qua kết quả bảng 3.12 cho thấy pH thích hợp cho sự sinh tổng hợp CKS của chủng XK5 là pH=7-8. Nhưng pH tối ưu cho khả năng hình thành CKS của chủng xạ khuẩn XK5 là pH=7. Khi pH < 6 ức chế sự hình thành CKS của chủng XK5.

3.5.4. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến khả năng sinh tổng hợp CKS

Chủng xạ khuẩn XK5, CKS được hình thành sau 1 ngày nuôi cấy, lượng kháng sinh đạt cực đại vào ngày thứ 5. Do CKS là sản phẩm trao đổi thứ cấp được hình thành bắt đầu từ pha log (sau 24-48 giờ nuôi cấy) và đạt cực đại sau 120 giờ nuôi cấy.

3.6. THỬ NGHIỆM KHẢ NĂNG ỨNG DỤNG CỦA DỊCH KHÁNG SINH THÔ CỦA CHỦNG XẠ KHUẨN XK5

3.6.1. Xử lý hạt bằng dung dịch kháng sinh thô của chủng XK5

Ớt là giống ớt F1 TN155 có phẩm chất tốt, rửa sạch, ngâm vào nước ấm, sau đó được xử lý theo các công thức khác nhau (*mục a, thuộc 2.3.2.10*). Kết quả được thể hiện ở bảng 3.14

Bảng 3.14. Kết quả ảnh hưởng của dịch kháng sinh thô của chủng XK5 đối với hạt ớt đã nhiễm chủng nấm NB11 (*Colletotrichum*)

Công thức	Thí nghiệm	Tổng số hạt	Số hạt bị bệnh	TLB (%)
CT1	Hạt ớt + <i>Colletotrichum</i> + dịch nuôi cấy MT A-4H không có chủng XK5	30	15	50
CT2	Hạt ớt + <i>Colletotrichum</i> + dịch nuôi cấy MT A-4H có chủng XK5	30	9	30
CT3	Hạt ớt + dịch dịch nuôi cấy MT A-4H có chủng XK5	30	0	0
CT4	Hạt ớt + dịch dịch nuôi cấy MT A-4H không có chủng XK5	30	0	0

Qua kết quả bảng 3.14 và hình 3.7 cho thấy tỷ lệ mắc bệnh thán thư ở các công thức là khác nhau. Ở CT1 tỷ lệ mắc bệnh là 50%, CT2 là 30% (giảm tỷ lệ tới 20%) như vậy việc xử lý hạt ớt bị nhiễm nấm *Colletotrichum* bằng dịch nuôi cấy chủng XK5 có hiệu quả rõ rệt.

3.6.2. Phương pháp tạo chế phẩm

Các chủng xạ khuẩn được nuôi cấy được nuôi cấy lắc 220 vòng/ phút ở nhiệt độ 28°C trong môi trường A4-H, sau 4 ngày được giống cấp 1, nhân tiếp trên môi trường A4-H trên với 1 % giống cấp 1, sau 4 ngày được giống cấp 2. Tiếp tục lên men rắn trên môi trường cám : trấu : nước với tỷ lệ 1 : 1 : 2 với 10% giống cấp 2, sau 3 - 4 ngày thu được chế phẩm rắn, tiến hành sấy khô ở nhiệt độ 35°C ta thu được chế phẩm khô, nghiền bột và đóng gói để bảo quản.

3.6.3. Xử lý đất trồng ớt đã nhiễm *Colletotrichum*

Việc thử nghiệm được tiến hành theo các công thức ở mục. Kết quả được trình bày ở bảng 3.15

Bảng 3.15. Khả năng chống bệnh thán thư của chế phẩm kháng sinh của chủng XK5

Công thức	Thí nghiệm	Tổng số cây	Số cây bị bệnh	TLB (%)	Chiều cao cây trung bình ($\bar{X} \pm m$)
CT1	Đất nhiễm nấm <i>Colletotrichum</i> + không có chế phẩm CKS thô dạng rắn	10	6	60	26,3 ± 0,5
CT2	Đất nhiễm nấm <i>Colletotrichum</i> + chế phẩm CKS thô dạng rắn	10	4	40	28,4 ± 0,3
CT3	Đất không nấm <i>Colletotrichum</i> + không có chế phẩm CKS thô dạng rắn	10	0	0	27,8 ± 0,25

Kết quả thực nghiệm ở bảng 3.15 và hình 3.9. cho thấy có sự khác nhau về tỷ lệ nhiễm nấm *Colletotrichum* và sự sinh trưởng chiều cao cây ớt ở các công thức là khác nhau. Đối với tỷ lệ nhiễm

nấm ở các công thức thì ở CT1 có tỷ lệ mắc bệnh là cao nhất lên tới 60%, CT2 tỷ lệ là 40% (giảm 20%). Như vậy, chế phẩm kháng sinh thô của chủng XK5 đã ức chế nấm *Colletotrichum* do đó giảm tỷ lệ mắc bệnh ở cây ớt.

Chiều cao cây là một chỉ tiêu quan trọng phản ánh tình trạng sinh trưởng của cây với điều kiện ngoại cảnh. Chiều cao trung bình của cây ở CT2 là 28,4cm cao hơn so với CT1 là 2,1cm, CT3 là 0,6cm.

Các kết quả trên đã chứng tỏ vai trò và hiệu quả tích cực của chế phẩm kháng sinh thô của chủng XK5 trong việc ngăn ngừa sự xâm nhiễm nấm *colletotrichum* vào cây ớt đạt hiệu quả. Đây là cơ sở khoa học cho việc ứng dụng các chất kháng sinh trong lĩnh vực bảo vệ cây trồng tại điều kiện địa phương một cách hợp lý và hiệu quả, nhằm giảm thiểu sự tồn dư của các chất sát trùng, thuốc trừ sâu tích lũy trong rau quả, hạt và tiến tới xây dựng nền nông nghiệp sạch và bền vững.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

1. KẾT LUẬN

Qua các nghiên cứu trên chúng tôi rút ra một số kết luận sau:

1.1. Đã xác định được 16 chủng nấm mốc gây bệnh trên cây ớt thuộc 6 chi, trong đó : *Alternaria* chiếm 12,5%, *Colletotrichum* chiếm 25%, *Curvularia* chiếm 6,25%, *Fusarium* chiếm 25%, *Phytophthora* chiếm 18.75%, *Choanephora* chiếm 12,5%. Trong đó có 4 chủng nấm mốc gây bệnh thán thư (NB1, NB4, NB6, NB11) và chủng NB11 ảnh hưởng suốt quá trình sinh trưởng phát triển của cây ớt.

1.2. Phân lập, tuyển chọn được 20 chủng xạ khuẩn có hoạt tính kháng nấm thán thư. Trong đó 05 chủng xạ khuẩn (XK1, XK5, XK8, XK14, XK20) có hoạt tính mạnh. chủng XK5 có khả năng kháng mạnh nhất ở cả 4 nấm bệnh gây thán thư trên ớt.

1.3. Đã nghiên cứu ảnh hưởng của môi trường, nhiệt độ, pH, thời gian nuôi cấy tới khả năng sinh kháng sinh của chủng XK5. Kết quả chủng XK5 trên môi trường A4-H, lượng kháng sinh đạt được cao nhất sau 5 ngày lên men ở nhiệt độ 280C, pH= 7,0

1.4. Nghiên cứu ứng dụng chế phẩm kháng sinh thô của các chủng xạ khuẩn XK5 chống nấm gây bệnh thán thư trên cây ớt cho kết quả tốt, có tác dụng kích thích nhẹ sự sinh trưởng, phát triển của cây, có thể ứng dụng vào thực tiễn địa phương.

2. KIẾN NGHỊ

1.1. Tiếp tục nghiên cứu các điều kiện giữ giống xạ khuẩn để giữ nguyên hoạt tính trong thời gian dài.

1.2. Nghiên cứu các chất mang tối ưu để tạo chế phẩm có hoạt tính mạnh nhất, bảo quản được lâu dài và mang hiệu quả kinh tế cao.

1.3. Nghiên cứu hoàn thiện quy trình sản xuất chế phẩm, ứng dụng đối kháng với nấm bệnh trên nhiều cây trồng khác nhau.