

XÁC ĐỊNH MẦM BỆNH TRÊN HẠT LÚA GIỐNG JASMINE 85 TẠI AN GIANG

Nguyễn Thị Kiều My, Hồ Quang Triệu và Nguyễn Đắc Khoa

Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 08/03/2017

Ngày nhận bài sửa: 17/05/2017

Ngày duyệt đăng: 31/10/2017

Title:

Identification of seed-borne pathogens on rice cv. Jasmine 85 in An Giang

Từ khóa:

Hạt giống, Jasmine 85, lúa, phương pháp giấy thấm, xác định mầm bệnh

Keywords:

Blotter method, Jasmine 85, pathogen identification, rice, seed-borne pathogens

ABSTRACT

This study aims at identifying pathogens contaminating seeds of rice cultivar Jasmine 85 in An Giang to study disease control methods. A total of 36 seed samples was collected from nine main rice cultivation areas of An Giang, i.e., Châu Đốc, Thoại Sơn, Tịnh Biên, Tri Tôn, An Phú, Châu Thành, Châu Phú, Long Xuyên and Chợ Mới. Seven fungal pathogens were identified based on their morphological characterization using blotter method. They include *Alternaria padwickii*, *Bipolaris oryzae*, *Sarocladium oryzae*, *Aspergillus* sp., *Fusarium moniliforme*, *Mucor* sp. and *Penicillium* sp. Two bacterial pathogens *Pseudomonas glumae* and *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* were furthermore identified from the samples. The bacterium *Pseudomonas glumae* was detected based on its colony morphology on selective media whereas Koch's postulates combined with PCR technique using specific primers were used to identify *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. These results serve as a basis for effective control of seed transmitted diseases in rice fields.

TÓM TẮT

Nghiên cứu này xác định mầm bệnh nhiễm trên hạt lúa giống Jasmine 85 tại An Giang nhằm tạo tiền đề cho các nghiên cứu phòng trị bệnh trên hạt. Tổng số 36 mẫu hạt được thu thập từ 9 địa điểm trồng lúa trọng điểm của tỉnh An Giang gồm: Châu Đốc, Thoại Sơn, Tịnh Biên, Tri Tôn, An Phú, Châu Thành, Châu Phú, Long Xuyên và Chợ Mới. Có 7 loài nấm bệnh được xác định là *Alternaria padwickii*, *Bipolaris oryzae*, *Sarocladium oryzae*, *Aspergillus* sp., *Fusarium moniliforme*, *Mucor* sp. và *Penicillium* sp. dựa trên đặc điểm hình thái bằng phương pháp giấy thấm. Ngoài ra, hai loài vi khuẩn cũng được nhận diện từ những mẫu hạt này. Vi khuẩn *Pseudomonas glumae* được xác định dựa vào đặc điểm hình thái khuẩn lạc trên các môi trường chọn lọc chuyên biệt. Vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* được xác định dựa vào quy trình Koch kết hợp với kỹ thuật sinh học phân tử PCR với cặp mồi đặc hiệu.

Trích dẫn: Nguyễn Thị Kiều My, Hồ Quang Triệu và Nguyễn Đắc Khoa, 2017. Xác định mầm bệnh trên hạt lúa giống Jasmine 85 tại An Giang. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 52b: 41-48.

1 GIỚI THIỆU

Lúa được xem là cây trồng chính của thế giới đặc biệt là ở các nước châu Á như Pakistan, Ấn Độ và Việt Nam (Khush, 2005; Zahid *et al.*, 2005). Tại Đồng bằng sông Cửu Long (ĐBSCL), vựa lúa của nước ta, An Giang là tỉnh có diện tích canh tác lúa

lớn nhất vùng (238.951,9 ha) chiếm 13,46% diện tích trồng lúa của cả nước. Một trong ba giống lúa chủ lực được trồng ở tỉnh là Jasmine 85 (Sở Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn An Giang, 2016).

Quá trình canh tác và năng suất lúa gạo luôn chịu ảnh hưởng của rất nhiều yếu tố như sức khỏe hạt giống, điều kiện thời tiết và dịch bệnh. Trong

đó, sức khỏe hạt giống là yếu tố quan trọng khởi đầu cho việc đạt được năng suất cao. Sử dụng hạt giống có chất lượng tốt góp phần tăng năng suất 7-20% (Diaz *et al.*, 1998). Tuy nhiên, nhiều nghiên cứu cho thấy hạt lúa còn là nơi lưu tồn của nhiều mầm bệnh nấm và vi khuẩn gây hại trong quá trình sản xuất lúa. Hạt giống bị nhiễm bệnh không chỉ làm giảm năng suất và phẩm chất của hạt lúa mà còn liên quan mật thiết với tình hình bệnh hại sau khi gieo trồng (Fakir, 1983; Ora *et al.*, 2011). Hạt giống nhiễm nấm có tỷ lệ nảy mầm thấp (chỉ khoảng 20-70%), khả năng trao đổi chất kém và năng suất thất thoát có thể lên đến 30% (Imolehin, 1983). Mầm bệnh ký sinh trên hạt giống gây hại từ giai đoạn nảy mầm đến các giai đoạn tiếp theo trên lúa, trở thành nguồn bệnh lây lan trong quần thể lúa trồng. Theo các nghiên cứu, có nhiều bệnh trên lúa có nguồn gốc phát sinh từ hạt giống như bệnh cháy bìa lá lúa gây ra bởi vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, vi khuẩn *Pseudomonas glumae* gây thối hạt (Mew and Misra, 1994; Javaid and Anjum, 2006). Bệnh do nấm *Bipolaris oryzae* làm thất thoát năng suất 20-40%. Nấm *Fusarium moniliforme* gây ảnh hưởng nghiêm trọng đến sản xuất lúa gạo ở các tỉnh ĐBSCL giai đoạn 2002-2008 (Phạm Văn Kim, 2015).

Xuất phát từ tình hình thực tế trên, đề tài được thực hiện nhằm xác định mầm bệnh nhiễm trên hạt lúa giống Jasmine 85 để làm tiền đề cho các nghiên cứu phòng trị bệnh trên hạt trước khi gieo trồng.

2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1 Thu mẫu hạt

Mẫu hạt được thu thập và phân tích dựa theo TCVN 8548:2011 (Tiêu chuẩn Việt Nam, 2011). Cụ thể, hạt lúa giống Jasmine 85 được thu thập tại các cơ sở sản xuất lúa giống của An Giang. Mẫu được lấy là lúa trồng trong vụ Đông Xuân 2016 và trữ trong kho tại các huyện, thành phố gồm: Châu Đốc, Thoại Sơn, Tịnh Biên, Tri Tôn, An Phú, Châu Thành, Châu Phú, Long Xuyên, Chợ Mới. Tại mỗi điểm, mẫu lúa được lấy ngẫu nhiên, xác suất có mặt của các thành phần trong mẫu là đại diện cho lô hạt giống. Mẫu được phân loại theo từng địa điểm, chia đôi liên tiếp để lấy ra các phần nhỏ ngẫu nhiên, gộp các phần này lại để được khối lượng mẫu theo quy định (tối thiểu là 100 g). Khối lượng mẫu được điều chỉnh chính xác bằng cách thêm hay bớt một lượng rất nhỏ hạt giống bằng thìa đến khi đủ số lượng hạt phân tích.

2.2 Xác định mầm bệnh nấm nhiễm trên hạt lúa giống

Thí nghiệm kiểm tra sự hiện diện của nấm bệnh lưu tồn trên hạt được thực hiện theo phương pháp giấy thấm (blotter method) của ISTA (International

Seed Testing Association, 1993). Thấm ướt hoàn toàn 2-3 tờ giấy thấm với nước cất và đặt vào đĩa petri đã tiệt trùng. Đặt 25 hạt cách đều nhau lên bề mặt giấy thấm, lặp lại 3 lần trên 3 đĩa khác nhau. Ủ ở nhiệt độ 22°C với chu kỳ 12 giờ sáng xen kẽ 12 giờ tối dưới ánh sáng đèn cận cực tím bước sóng 320- 400 nm (Near Ultra Violet, NUV). Sau 6-8 ngày, quan sát hạt dưới kính hiển vi soi nổi để xác định những hạt bị nhiễm nấm. Sau đó, nấm bệnh được phân lập và tách ròng trên môi trường PDA (1 lít môi trường gồm 250g khoai tây, 20 g dextrose, 20 g agar và nước cất thanh trùng) bằng phương pháp cấy đơn bào tử hoặc đỉnh sinh trưởng (Burgess và *ctv.*, 2009). Quan sát hình thái tản nấm phát triển trên môi trường PDA kết hợp với quan sát hình thái sợi nấm và bào tử dưới kính hiển vi quang học để xác định nấm bệnh dựa theo mô tả của Mew and Misra (1994); Mew and Gozales (2000).

2.3 Xác định mầm bệnh vi khuẩn nhiễm trên hạt lúa giống

Vi khuẩn nhiễm trên hạt được phân lập và xác định theo phương pháp được mô tả bởi Cottyn *et al.* (1994). Sau khi được rửa dưới vòi nước chảy khoảng 30 phút để loại bỏ hạt lép và các mảnh vụn bám trên bề mặt hạt, 100 hạt sẽ được nghiền mịn và cho vào ống Falcon có chứa 50 ml dung dịch phosphate-buffered saline (PBS) (1,15 g Na₂HPO₄, 0,2 g KCl, 0,2 g K₂HPO₄ và 8 g NaCl) (Mew and Misra, 1994), lắc đều trong 5 phút và để yên trong 2 giờ ở nhiệt độ 25-28°C. Sau đó, rút phần dung dịch trong phía trên và pha loãng với nước cất 1000 lần. Dung dịch sau khi pha loãng sẽ được trải lên nhiều loại môi trường chuyên biệt để xác định sự hiện diện của mầm bệnh.

Vi khuẩn *P. glumae* và *P. avenae*: Trải 40 µL dung dịch trên môi trường trường chuyên biệt S-PG (1,3 g KH₂PO₄, 1,2 g Na₂HPO₄, 5 g (NH₄)₂SO₄, 0,25 g MgSO₄.7H₂O, 24 mg Na₂MoO₄.2H₂O, 10 mg EDTA-Fe, 10 µg L-cystine, 10 g D-sorbitol, 50 mg pheneticillin potassium, 10 mg ampicillin sodium, 10 mg cetrinide, 1 mg methyl violet, 20 mg phenol red, 15 g agar và thêm nước cất đến 1000 mL) (Tsushima *et al.*, 1986) và ủ ở nhiệt độ 28°C. Sau 3-5 ngày nuôi cấy, nếu trên môi trường xuất hiện khuẩn lạc có màu nâu đỏ, tròn, trơn và bề mặt cong lồi (khuẩn lạc dạng A) thì mẫu được xác định đã nhiễm vi khuẩn *P. glumae*. Nếu môi trường xuất hiện khuẩn lạc nào có màu tím, tròn, trơn và bề mặt cong lồi (khuẩn lạc dạng B) thì mẫu hạt có thể bị nhiễm vi khuẩn *P. glumae* hoặc vi khuẩn *P. avenae*. Để phân biệt hai loài vi khuẩn này, khuẩn lạc dạng B tiếp tục được nuôi trên môi trường muối khoáng Ayers (1 lít môi trường chứa 0,2 g KCl; 0,2 g MgSO₄.7H₂O; NH₄H₂PO₄; 12 g agar và 5 g

inositol) có bổ sung đường inositol và ủ ở nhiệt độ 28°C. Sau 3 ngày nuôi cấy, nếu vi khuẩn phát triển được trên môi trường chứng tỏ mẫu hạt bị nhiễm vi khuẩn *P. glumae* và ngược lại là vi khuẩn *P. avenae*. (Cottyn *et al.*, 1994).

Vi khuẩn *P. syringae* pv. *syringae*: Hút 40 µL dung dịch pha loãng và trải đều trên đĩa môi trường dinh dưỡng nutrient agar (1 lít môi trường chứa 5 g peptone, 3 g beef extract, 5 g NaCl, 15 g agar và nước cất thanh trùng, pH 6.8) (Shivaji *et al.*, 2006) và ủ ở nhiệt độ 28°C. Sau 3-5 ngày, chọn các khuẩn lạc có đặc điểm tròn, nhỏ, trơn, lồi có màu trắng mờ và cấy lên môi trường King's B (20 g peptone, 1,5 g K₂HPO₄, 1,5 g MgSO₄ 20 g agar, 15 mL glycerol, 1000 mL nước cất) (King *et al.*, 1954). Sau 3- 5 ngày, đặt đĩa vi khuẩn dưới ánh sáng tia UV, nếu khuẩn lạc có khả năng phát quang chứng tỏ mẫu hạt bị nhiễm vi khuẩn *P. syringae* pv. *syringae*. Các chủng vi khuẩn sau đó được xác định bằng phương pháp chủng bệnh, hạt được gieo vào hộp nhựa có đường kính 30 cm trong 3 tuần, sau đó huyền phù các chủng vi khuẩn được pha loãng ở mật số 10⁹ CFU/ml và chủng bệnh bằng phương pháp cắt lá. Trước khi chủng bệnh khử trùng kéo bằng ethanol 70% sau đó nhúng vào huyền phù vi khuẩn. Quan sát lá ở thời điểm 14 ngày sau khi chủng bệnh. Các chủng vi khuẩn là *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* sẽ gây ra triệu chứng chết chồi (bud rot) và thối bẹ (leaf sheath rots) (Backer, 2002).

Vi khuẩn *P. fuscovaginae*: Trải 40 µL dung dịch trên môi trường Miyajima's (1 lít môi trường chứa 50 mg penicillin G, 45 mg novobiocin, 75 mg cycloheximide, 3 mL ethanol 75%, 940 mL môi trường King's B và thêm nước cất) (Miyajima's, 1983) và ủ ở nhiệt độ 28°C trong 5 ngày. Nếu trên môi trường xuất hiện các khuẩn lạc có đặc điểm tròn, trơn, lồi, trong suốt, màu kem và tạo sắc tố xanh lá cây ở giữa khuẩn lạc thì mẫu hạt được xác định đã nhiễm vi khuẩn *P. fuscovaginae*.

Xác định vi khuẩn chi *Xanthomonas*: Trải 40 µL dung dịch trên môi trường Wakimoto cải tiến (0,5 g Ca(NO₃)₂.4H₂O, 0,82 g Na₂HPO₄, 5 g pepton, 20 g sucrose, 0,05 g FeSO₄.7H₂O, 15 g agar, nước cất 1000 mL, pH 7.0) (Karganilla *et al.*, 1973). Sau 3-5 ngày nuôi cấy, dựa vào đặc điểm hình thái khuẩn lạc của vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) và *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* (*Xcola*) trên môi trường Wakimoto cải tiến như tròn, trơn, viền rõ và có màu vàng chanh, chọn các khuẩn lạc có các đặc điểm trên để phân lập và tách ròng. Sau đó, các chủng vi khuẩn này được chủng lên cây lúa tại thời điểm 45 ngày sau khi gieo bằng phương pháp cắt chóp lá để xác định vi khuẩn *Xoo* và phun lên lá để xác định vi

khẩn *Xcola* với mật số 10⁹ CFU/mL (Khoa, 2005). Sau 14 ngày chủng bệnh, quan sát triệu chứng với triệu chứng điển hình của bệnh cháy bìa lá và bệnh sọc trong để từ đó xác định vi khuẩn *Xoo* và *Xcola*. Kết quả này được tái khẳng định bằng kỹ thuật sinh học phân tử PCR với cặp mồi chuyên biệt XOO290F/R theo mô tả của Cho *et al.* (2011).

Thành phần phản ứng PCR: Hỗn hợp cho một phản ứng PCR có thể tích 25 µl với thành phần hóa chất gồm có 11 µl nước; 2,5 µl buffer 10X; 4 µl dNTPs; 2 µl MgCl₂; 0,25 µl BSA; 0,25 µl Taq polymerase; 1 µl mồi XOO290F (5'-GCGCACCGAGTATTCCTA-3'); 1 µl XOO290R (5'-CTTCGCCGGTCCAGATGA-3') và 3 µl DNA (Cho *et al.*, 2011). Phản ứng PCR: giai đoạn biến tính DNA ở 94°C trong 5 phút. Tiếp theo là 30 chu kỳ của giai đoạn biến tính ở 94°C trong 1 phút, giai đoạn bắt cặp ở 56°C trong 30 giây và giai đoạn kéo dài ở 72°C trong 1 phút. Cuối cùng là giai đoạn kéo dài khoảng 7 phút ở nhiệt độ 72°C để các sợi DNA đã được bổ sung hoàn toàn bởi các dNTPs. Sau đó sản phẩm PCR sẽ được ổn định và bảo quản tại 4°C (Cho *et al.*, 2011). Chuẩn bị gel, pha 0,3 g agarose với 20 ml TBE 1X, đun nóng dung dịch trong lò vi sóng cho agarose tan hoàn toàn trong TBE. Dung dịch được đổ vào khuôn có gắn một thanh nhựa có răng lược để tạo các giếng nhỏ trên bề mặt gel, sản phẩm PCR sẽ được cho vào những giếng nhỏ này để điện di. Điện di: sản phẩm PCR của mỗi chủng vi khuẩn được nhuộm với 5 µl thuốc nhuộm Runsafe được cho vào giếng, sau khi điện di ảnh của các băng được chụp bằng tia UV. Phân tích kết quả, sản phẩm PCR của vi khuẩn có một đoạn băng có kích thước khoảng 290 bp trên gel agarose là vi khuẩn *Xoo*.

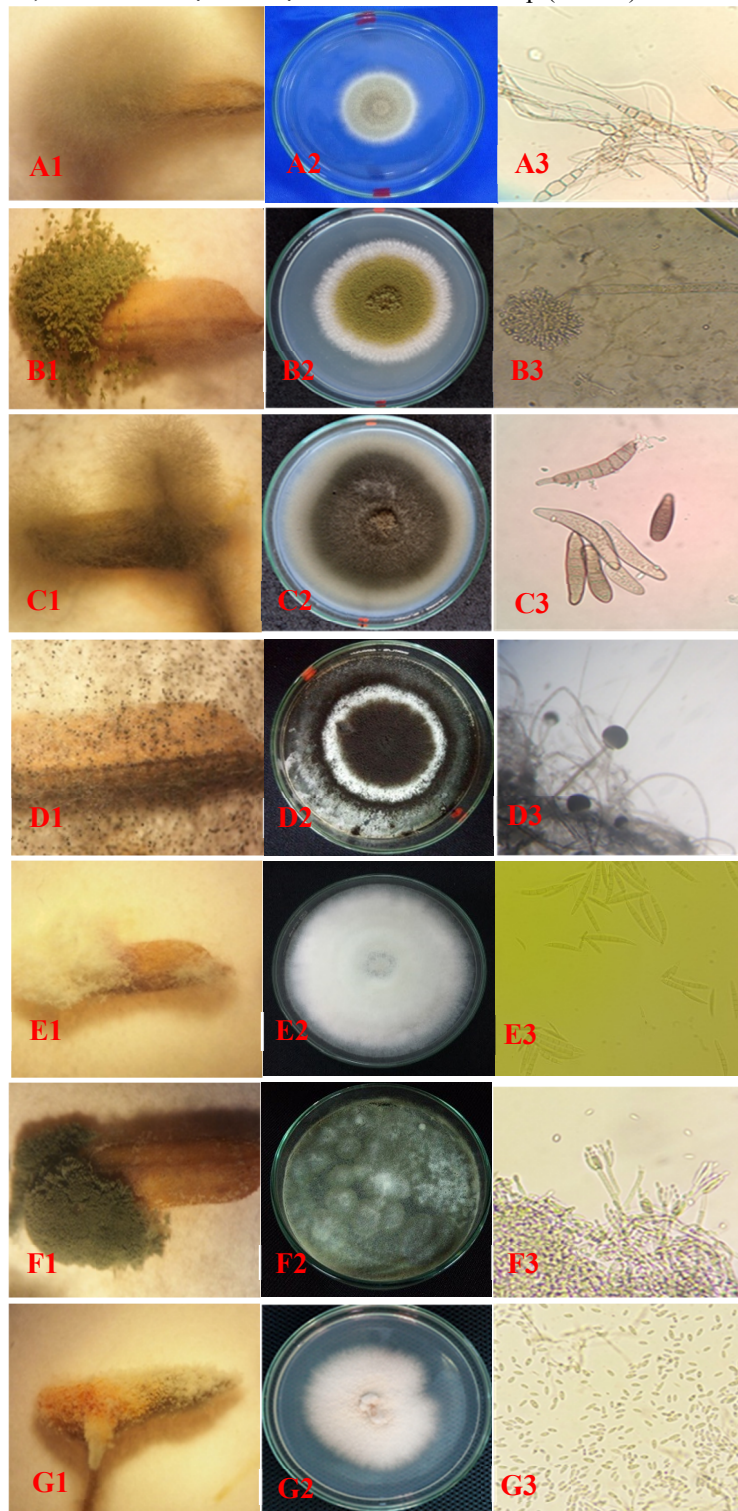
3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Thành phần mầm bệnh nhiễm trên hạt giống

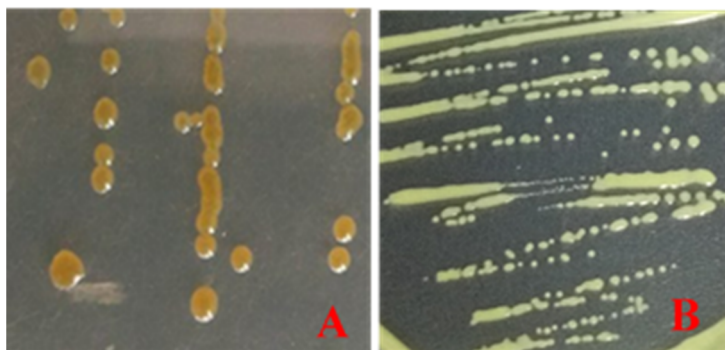
Sau 10 ngày ủ hạt và quan sát dưới kính hiển vi soi nổi trên tổng số 36 mẫu hạt thu thập đã xác định được 7 loài nấm trên hạt và 2 loài vi khuẩn (Hình 1). Các loài nấm được xác định là *Alternaria padwickii*, *Bipolaris oryzae*, *Sarocladium oryzae*, *Aspergillus* sp., *Fusarium moniliforme*, *Mucor* sp. và *Penicillium* sp. Hai loài vi khuẩn được xác định là *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* và *Pseudomonas glumae* (Hình 2). Không ghi nhận được sự có mặt của các loài *P. avenae*, *P. fuscovaginae*, *P. syringae* pv. *syringae*, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* trên hạt lúa giống. Kết quả chủng bệnh theo quy trình Koch, vi khuẩn cho vết bệnh điển hình (Hình 3) và được kiểm chứng với kỹ thuật PCR bằng cặp mồi chuyên biệt XOO290F/R, mẫu vi khuẩn trên hạt

lúa giống tại 5 địa điểm gồm An Phú, Châu Thành, Tỉnh Biên, Thoại Sơn, Châu Phú được xác định là

vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* do có band 290 bp (Hình 4).



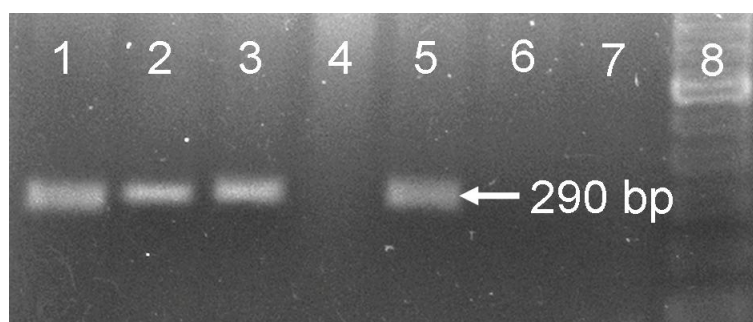
Hình 1: Sự phát triển của sợi nấm trên hạt, hình thái tản nấm trên môi trường PDA và hình thái bào tử của 7 loài nấm nhiễm trên hạt giống Jasmine 85 tại An Giang. Nấm *Alternaria padwickii* (A1, A2, A3); *Aspergillus* sp. (B1, B2, B3); *Bipolaris oryzae* (C1, C2, C3); *Mucor* sp. (D1, D2, D3); *Fusarium moniliforme* (E1, E2, E3); *Penicillium* sp. (F1, F2, F3); *Sarocladium oryzae* (G1, G2, G3)



Hình 2: Hình thái khuẩn lạc vi khuẩn *Pseudomonas glumae* trên môi trường S-PG sau 4 ngày nuôi cấy (A) và vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* trên môi trường Wakimoto cải tiến sau 3 ngày nuôi cấy (B)



Hình 3: Kết quả xác định vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) bằng quy trình Koch. Vết bệnh cháy bìa lá tại thời điểm 5 ngày sau khi chủng (A) và giọt dịch vi khuẩn Xoo (B)



Hình 4: Sản phẩm PCR 290 bp trên gel agarose được khuếch đại bằng cặp mồi chuyên biệt XOO290R/F (giếng 1, 2, 3 và 5: DNA của vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*; giếng 4 và 6: DNA của vi khuẩn khác; giếng 7: nước cất; giếng 8: thang chuẩn)

3.2 Sự phân bố của các mầm bệnh ở các huyện và thành phố của An Giang

Các loại nấm bệnh hiện diện ở hầu hết ở các địa điểm bao gồm nấm *Alternaria padwickii*, *Aspergillus* sp., *Bipolaris oryzae*, *Fusarium moniliforme*, *Sarocladium oryzae*. Châu Đốc là địa điểm ghi nhận được thành phần mầm bệnh nhiều nhất với 7 loài nấm và 1 loài vi khuẩn. Long Xuyên và Chợ Mới là hai địa điểm có thành phần mầm bệnh ít nhất chỉ có nấm bệnh và không ghi nhận được vi khuẩn tại 2 địa điểm này. Kết quả xác

định mầm bệnh cho thấy vi khuẩn lưu tồn trên hạt ở các địa điểm ít hơn so với nấm bệnh (Bảng 1). Vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, *Pseudomonas glumae* là vi khuẩn gram âm và không có khả năng sinh bào tử nếu ở điều kiện tồn trữ ở 25-35°C vi khuẩn có thể sống 2 tháng (Bradbury, 1984; Phạm Văn Kim, 2015). Vi khuẩn tồn tại trong phôi nhũ và vỏ hạt giống đến 6 tháng (Vũ Triệu Mân và ctv., 2007). Tuy nhiên, đối với một số loài nấm như nấm *Bipolaris oryzae* trong cùng điều kiện nhiệt độ thì bào tử có thể lưu tồn

đến 2 năm trên hạt. Trong điều kiện khô ráo, bào tử nấm bệnh trên hạt lúa tồn trữ có thể sống sót đến 4 năm. Bào tử nấm ở dạng tiềm sinh không hoạt

động cho đến khi gặp điều kiện thuận lợi sinh bào tử ảnh hưởng đến sự nảy mầm của hạt (Nghiep and Ashor, 2004).

Bảng 1: Sự hiện diện của mầm bệnh trên hạt giống Jasmine 85 thu thập tại An Giang

Địa điểm	Nấm							Vi khuẩn		Tổng
	<i>Alte</i>	<i>Aspe</i>	<i>Saro</i>	<i>Bipo</i>	<i>Fusa</i>	<i>Muco</i>	<i>Peni</i>	<i>Xoo</i>	<i>Pseu</i>	
Châu Đốc	+	+	+	+	+	+	+	-	+	8
Thoại Sơn	+	+	+	+	-	-	+	+	+	7
Tịnh Biên	+	-	+	+	+	+	-	+	+	7
An Phú	+	+	+	+	-	+	-	+	+	7
Châu Thành	+	+	+	+	+	-	-	+	-	6
Tri Tôn	+	+	-	-	+	+	+	-	-	5
Châu Phú	+	-	-	+	+	+	-	+	-	5
Long Xuyên	+	+	+	+	-	-	-	-	-	4
Chợ Mới	+	+	+	-	-	-	+	-	-	4
Tổng	9	7	7	7	5	5	4	5	4	

(+): có hiện diện (-): không hiện diện

Alte: *Alternaria padwickii* *Aspe*: *Aspergillus sp.* *Xoo*: *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*

Bipo: *Bipolaris oryzae* *Peni*: *Penicilium sp.* *Fusa*: *Fusarium moniliforme*

Saro: *Sarocladium oryzae* *Muco*: *Mucor sp.* *Pseu*: *Pseudomonas glumae*

Kết quả nghiên cứu tương đồng với kết quả của Mew và Gonzales (2002) khi phân lập mẫu lúa thu được từ nhiều vùng khác nhau trên thế giới. Trong đó, tần số xuất hiện của nấm *A. padwickii*, *B. oryzae*, *F. moniliforme*, *S. oryzae* được ghi nhận tại Nam Á và Đông Nam Á là rất cao; đặc biệt nấm *A. padwickii* là cao nhất với tần số luôn dao động từ 40-100% trong giai đoạn 1989-1997 nấm *A. padwickii* xuất hiện ở tất cả các địa điểm thu mẫu, là tác nhân gây bệnh đốm vòng trên lúa. Nấm hiện diện ở hầu hết các bộ phận của hạt lúa, trên bề mặt của hạt và tấn công vào nội nhũ, phôi mầm, lớp cám và mảy của hạt lúa và hạch nấm được tìm thấy trong nội nhũ (Ou, 1983). Đối với nấm *Bipolaris oryzae*, bệnh do nấm *Bipolaris oryzae* gây ra ảnh hưởng trên hạt phụ vào sinh lý của cây lúa (Mew and Gozales, 2002). Nấm dễ hình thành và phát triển ở những vùng đất thiếu chất dinh dưỡng, bệnh thay đổi tùy theo các hệ sinh thái lúa (ở vùng cao, đất thấp, nước mưa, nước tưới, nhiệt đới, cận nhiệt đới) (Mew and Gozales, 2002; Zadoks, 2002). Một con đường nấm lây nhiễm khác là mầm bệnh dính vào hạt giống khi thu hoạch nắm tồn tại trên tàn dư cây bệnh, rơm rạ, hạt giống hoặc đất mang mầm bệnh sẽ làm cho hạt giống bị nhiễm bệnh thứ cấp thông qua sự cọ xát trong quá trình thu hoạch, vận chuyển trao đổi hạt giống (Nghiep and Ashok, 2014). Đối với nấm *Fusarium moniliforme* chủ yếu lây lan bằng hạt và thời gian thích hợp để cho bệnh phát triển lây vào hạt là lúc lúa phơi màu. Theo thống kê, bệnh lúa von do nấm *F. moniliforme* làm thất thoát 0,01% cho nền sản xuất lúa gạo châu Á (Mew and Gonzales, 2002). Kết quả nghiên cứu tương đồng với các nghiên cứu của Islam *et al.* (2012) phân lập các mẫu hạt ở Bangladesh; Trần

Thị Thu Thủy và Nguyễn Văn Lực (2014) phân lập mầm bệnh trên hạt ở Sóc Trăng đều ghi nhận được sự hiện diện của nấm *Fusarium moniliforme*. Trên thực tế, bệnh lúa von do nấm *F. moniliforme* đã từng bùng phát thành dịch tại địa bàn tỉnh An Giang giai đoạn 2002 và lan rộng sang các tỉnh ĐBSCL đến năm 2008 (Phạm Văn Kim, 2015). Do đó, dù tần suất xuất hiện của *F. moniliforme* ít hơn các loài nấm bệnh khác, nhưng đây là đối tượng nên được ưu tiên nghiên cứu và phòng trị tại tỉnh An Giang. Nấm *S. oryzae* có ảnh hưởng nghiêm trọng đến sự sinh trưởng và phát triển của cây lúa và giá trị dinh dưỡng của hạt (Sakthivel, 2001; Gopalakrishnan *et al.*, 2010). Nấm *S. oryzae* chủ yếu hiện diện trong môi trường đất thấp (Pearce *et al.*, 2001) thời tiết nóng và ẩm thuận lợi cho nấm bệnh. Nhiệt độ từ 20-30°C và độ ẩm tương đối trong khoảng 65-85% có lợi cho nấm phát triển (Sakthivel, 2001). Đối với nhóm nấm mốc như *Aspergillus sp.*, *Penicilium sp.*, *Mucor sp.* gây bệnh trong quá trình tồn trữ, kết quả phân lập tương đồng với nghiên cứu của các tác giả khi phân lập nấm trên hạt ở nhiều quốc gia trong đó có Việt Nam và kết quả cho thấy phần lớn các mẫu hạt đều có sự hiện diện của nấm *Aspergillus sp.* và *Penicilium sp.* (Wu and Dow, 1993; Lương Minh Châu và *ctv.*, 1998; Zafar *et al.*, 2014). Nguyên nhân có thể do nấm mốc phân bố rộng rãi trong tự nhiên (trong đất, nước, không khí), dưới điều kiện tồn trữ không tốt, độ ẩm cao, tạo điều kiện thuận lợi cho nấm phát triển. Mặt khác, nấm mốc không có diệt lục, không có khả năng tự tổng hợp chất dinh dưỡng, nhưng lại có khả năng phân giải cellulose, protein, lipid. Hạt lúa lại chứa nhiều protein và các chất dinh dưỡng cần thiết cho quá trình sinh trưởng và phát triển của nấm (McCance

and Widdowson, 1960). Do đó, khả năng lúa bị xâm nhiễm bởi nấm mốc là rất cao.

Đối với vi khuẩn, kết quả phân lập có sự lưu tồn của vi khuẩn *P. glumae* tương đồng với kết quả phân lập của Cottyn *et al.* (2001) khi phân lập các mẫu hạt ở Philippines. Ngoài ra, một số kết quả nghiên cứu phân lập được vi khuẩn *P. glumae* trên hạt lúa của cây bị bệnh (Song *et al.*, 2004; Nadarkumar *et al.*, 2009; Razak *et al.*, 2009). Điều này chứng tỏ hạt giống có khả năng mang mầm bệnh khi cây bị nhiễm bệnh ngoài đồng. Vi khuẩn lưu tồn trên hạt có cả dạng biểu hiện và dạng không biểu hiện (Tsushima *et al.*, 1996), do đó hạt lúa có vẻ ngoài chắc khỏe cũng có thể là nguồn lây truyền bệnh cho vụ sau. Đối với vi khuẩn *Xoo*, nghiên cứu của Sakthivel *et al.* (2001) chỉ ra rằng, lúa giống được thu từ cây lúa mang mầm bệnh cháy bìa lá, sau quá trình gieo sạ và chăm sóc, cây lúa trưởng thành vẫn mang mầm bệnh *Xoo* trong lá và hạt chứng tỏ hạt giống lúa là một nguồn lây truyền nguồn bệnh cháy bìa lá từ mùa vụ này sang mùa vụ tiếp theo. Từ kết quả nghiên cứu cho thấy việc xác định mầm bệnh trên hạt giống là cần thiết để ứng dụng các biện pháp xử lý hạt giống trước khi gieo trồng. Xử lý hạt giống bằng các biện pháp sinh học như sử dụng dịch trích thực vật và vi khuẩn đối kháng là một hướng phát triển an toàn để phòng trị mầm bệnh trên hạt.

4 KẾT LUẬN

Đề tài đã xác định được 7 loài nấm và 2 loài vi khuẩn nhiễm trên hạt giống Jasmine 85 gồm *Bipolaris oryzae*, *Sarocladium oryzae*, *Aspergillus* sp., *Fusarium moniliforme*, *Mucor* sp., *Penicilium* sp., *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* và *Pseudomonas glumae*. Trong đó, nấm *Alternaria padwickii* hiện diện ở tất cả các địa điểm thu mẫu. Vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* hiện diện ở nhiều địa điểm thu mẫu hơn so với vi khuẩn *Pseudomonas glumae*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Backer, D., 2002. Method for inoculating rice with *Xanthomonas*. Plant Pathology Laboratory, Iowa State University Dr. Adam Bogdanove.
- Bradbury, J. F., 1984. Genus II. *Xanthomonas* Dowson 1939. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 1: 199-210.
- Burgess, L.W., Knight, T.E., Tesoriero, L. and P. T. Hiên, 2009. Cẩm nang chẩn đoán bệnh cây ở Việt Nam. Xuất bản bởi Trung tâm Nghiên cứu Nông nghiệp Quốc tế Australia (ACIAR), 210 trang.
- Cho, M.S., Kang, M.J., Kim, C.K., Seo, Y.J., Hahn, J.H., Park, S.C., Hwang, D.J., Ahn, T.Y., Park, D.H., Lim, C.K. and Park, D.S., 2011. Sensitive

and specific detection of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* by real-time bio-PCR using pathovar-specific primers based on an *rhs* family gene. Plant disease. 95(5): 589-594.

- Cottyn, B. and Mew, T.W., 1994. Chapter 7 Bacteria. In Mew T.W, Misra J.K, (eds). A manual of rice seed health testing. IRRI, Philippines, 113 pages.
- Diaz, C., Hossain, M., Merca S. and Mew, T.W., 1998. Seed quality and effect on rice yield. Findings from Farmer Participatory experiments in Central Luzon, Philippines. Philippine Journal of Crop Science. 23(2): 111-119.
- Fakir, G.A., 1983. Teaching, Research and Training Activities on Seed Pathology in Bangladesh. Seed Sciences and Technology. 11: 1345-1352.
- Gopalakrishnan, C., Kamalakannan, A. and Valluvaridasanb, V., 2010. Effect of seed-borne *Sarocladium oryzae*, the incitant of rice sheath rot on rice seed quality. Journal Plant Protection Research. 50(1): 98-102.
- Imolehin, E.D., 1983. Rice seedborne fungi and their effect on seed germination. Plant Disease. 12:1334-1336.
- Islam, M.S., Rahman, H., Pervez, Z., Mahmud, M.R. and Alam, A., 2012. Studies on seed-borne fungi in rice cultivars grown in non saline tidal zones of patuakhali their effect on seed germination. Bangladesh Research Publications Journal. 6(3): 286-290.
- ISTA- International Seed Testing Association, 1993. International rules for seed testing. Seed Science and Technology 21 (Suppl.), 288 pages.
- Javaid, M.S., Wahid, A., Idrees, M., Gill, M.A. and Saleem, A., 2006. Seed mycoflora studies in rice. Pakistan Journal Phytopathol. 14: 132-134.
- Karganilla, A., Paris-Natural, M. and Ou, S.H., 1973. A comparative study of culture media for *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. Philippine Agriculture. 57: 141-152.
- Khoa, N.D., 2005. Effect of single resistance genes and their pyramid on the diversity of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* population under field conditions as revealed by insertion sequence-polymerase chain reaction (IS - PCR). MSc Thesis. University of the Philippines Los Baños.
- Lương Minh Châu, Ngô Lực Cường, Trần Thị Kiều Trang, Phan Thị Bê và Hoàng Đức Cát, 1998. Hiệu quả của các biện pháp xử lý hạt giống đối với sâu bệnh hại lúa. Báo cáo chương trình cải tiến giống lúa tỉnh Cần Thơ 1996-1998. Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn.
- McCance, R.A. and Widdowson, E.M., 1960. The composition of foods. MRC Special Report Series No. 297. London: HM Stationery Office.
- Mew, T. W. and P., Gonzales, 2002. A handbook of rice seedborne fungi. IRRI, 90 pages.
- Mew, T.W. and J.K., Misra, 1994. A manual of rice seed health testing. IRRI Philippines, 113 page.

- Miyajima, K., Tanii, A. and Akita, T., 1983. *Pseudomonas fuscovaginae* sp. nov., nom. rev. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 33 (3): 656-657.
- Nghiep, V.H. and Ashok, G., 2004. Role of *Bipolaris oryzae* in producing abnormal seedling of rice (*Oryza sativa*). Omonrice 12: 102-108.
- Ora, N., Faruq, A.N., Islam, M.T., Akhtar, N. and Rahman, M.M., 2011. Detection and Identification of Seed Borne Pathogens from Some Cultivated Hybrid Rice Varieties in Bangladesh. Middle-East Journal of Scientific Research. 10(4): 482-488.
- Ou, S.H., 1985. Rice diseases. Common-wealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England, 380 pages.
- Pearce, D.A., Bridge, P.D. and Hawksworth, D. L., 2001. Species concept in *Sarocladium*, the causal agent in sheath rot in rice and bamboo blight. In: Sreenivasaprasad, S., Johnson, R. (Eds.) Major Fungal Diseases of Rice. Springer, Dordrecht, pp.285-292.
- Phạm Văn Kim, 2015. Các bệnh hại lúa quan trọng ở Đồng bằng sông Cửu Long. Nhà xuất bản Nông nghiệp, 132 trang.
- Razak, A.A., Zainudin, N.A.I.M., Sidiq, S.N.M., Ismail, N.A., Mohamad, N.M.I.N., Salleh Nandakumar, B., Rush, M.C., 2009. *Burkholderia glumae* and *Burkholderia gladioli* Cause Bacterial Panicle Blight in Rice in the Southern United States. Plant Diseases. 93: 896-905.
- Sakthivel, N., 2001. Sheath rot disease of rice: current status and control strategies, in Major Fungal Diseases of Rice: Recent Advances eds Sreenivasaprasad S., Johnson R., editors. (Dordrecht: Springer), pp. 271-283.
- Sakthivel, N., Mortensen, C.N. and Mathur, S.B., 2001. Detection of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in artificially inoculated and naturally infected rice seeds and plants by molecular techniques. Applied microbiology and biotechnology. 56(3): 435-441.
- Shivaji, S., Chaturvedi, P., Suresh, K., Reddy, G. S. N., Dutt, C. B. S., Wainwright, M. and Bhargava, P. M., 2006. *Bacillus aerius* sp. nov., *Bacillus aerophilus* sp. nov., *Bacillus stratosphericus* sp. nov. and *Bacillus altitudinis* sp. nov., isolated from cryogenic tubes used for collecting air samples from high altitudes. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 56(7): 1465-1473.
- Sở Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn An Giang, 2016. Cơ Cấu giống lúa An Giang.
- Song, W.Y., Kim, H.M., Hwang, C.Y. and Schaad, N.W., 2004. Detection of *Acidovorax avenae* ssp. *avenae* in Rice Seeds Using BIO-PCR. Journal of Phytopathology. 152(11-12): 667-676.
- Trần Thị Thu Thủy và Nguyễn Văn Lực, 2014. Xác định nấm gây bệnh trên hạt lúa tại Tỉnh Sóc Trăng. Hội thảo quốc gia bệnh hại thực vật Việt Nam. 134-140.
- Tsushima, S., Wakimoto, S. and Shizuo, M.O.G. I., 1986. Selective medium for detecting *Pseudomonas glumae* Kurita et Tabei, the causal bacterium of grain rot of rice. Japanese Journal of Phytopathology. 52(2): 253-259.
- Vũ Triệu Mân, Ngô Bích Thảo, Lê Lương Tề, Nguyễn Kim Vân, Đỗ Tấn Dũng, Ngô Thị Xuyên, Nguyễn Ngọc Châu, 2007. Giáo trình bệnh cây chuyên khoa. Trường Đại học Nông nghiệp I - Hà Nội, 233 trang.
- Wu, W.S. and Dow, S.K., 1993. A survey of Rice Seed-borne Fungi in Taiwan Plant Pathology Bulletin. 2(1): 52-55.
- Zafar, M., Jamal, A., Tahira, R., Zakria, M. and Naeemullah, M., 2014. Incidence of Seed-Borne Mycoflora in Wheat and Rice Germplasm. International Journal of Agriculture Innovations and Research. 2(5): 720-722.