

DOI:10.22144/ctu.jvn.2017.159

NGHIÊN CỨU ĐIỀU KIỆN TỒN TRỮ VÀ HIỆU QUẢ CỦA CHẤT BẢO VỆ SỰ TỒN TẠI THỰC KHUẨN THỂ TRONG QUẢN LÝ BỆNH CHÁY BÌA LÁ LÚA DO VI KHUẨN *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* TRONG ĐIỀU KIỆN NHÀ LƯỚI

Huỳnh Thanh Suôi, Ngô Bá Tước và Nguyễn Thị Thu Nga

Khoa Nông nghiệp và Sinh học Ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ

ABSTRACT

Study on additives to help recovery of phages after lyophilization, Glucose 10% showed the best effectiveness, following Mannitol 5% and 10%. Study on storage durations of three formulations, lyophilized formulation at room temperature showed maintaining phage density stable up to 5 months storage, while liquid formulation in 4°C and in room temperature showed significant reduction phage density after 3 months and 1 month storage, respectively. Study on additives to help phage surviving on foliar of rice under sunlight conditions, phage density maintained equally among treatments after 24 hours spraying phage on foliar rice. Treatment phage + skimmilk showed better effect in maintaining phage density up to 5 days after spraying, while other treatments showed critical declined of phage density. However, the disease suppression efficacy did not correlate with phage density on rice foliar. Disease reduction was determined by phage density contact with bacterial pathogens in first several hours, therefore the reduction of phage density after 24 hours had no effect on disease reduction. Specially, treatments phage + mungbean or soybean powder expressed better in reduction of percentage of leaf infection than other treatments, there results could be involved with the effect of these additives in enhancing rice resistance beside phage effects.

TÓM TẮT

Nghiên cứu chất phụ gia phục hồi thực khuẩn thể (TKT) sau đông khô ghi nhận Glucose 10% cho hiệu quả tốt nhất, sau đó là Mannitol (5% và 10%). Khảo sát thời gian tồn trữ ở 3 điều kiện tồn trữ cho thấy dạng bột đông khô trữ nhiệt độ phòng duy trì mật số TKT ổn định đến 5 tháng, trong khi dạng lỏng trữ ở 4°C và nhiệt độ phòng mật số TKT giảm mạnh sau 3 và 1 tháng tồn trữ, tuần tự. Nghiên cứu chất bảo vệ giúp TKT tồn tại dưới ánh nắng mặt trời, mật số TKT duy trì tương đương nhau ở các nghiệm thức trong 24 giờ sau khi phun trên bề mặt tán lá lúa. Nghiệm thức TKT + sữa tách béo giúp duy trì mật số TKT tốt lên đến 5 ngày, ở các nghiệm thức còn lại thì mật số giảm mạnh. Tuy nhiên, hiệu quả giảm bệnh không tương quan với mật số TKT trên lá lúa. Kết quả này là do hiệu quả giảm bệnh được quyết định dựa vào số lượng TKT tiếp xúc với vi khuẩn gây bệnh trong vài giờ đầu nên việc suy giảm mật số TKT sau 24 giờ không ảnh hưởng đến hiệu quả giảm bệnh. Riêng nghiệm thức TKT + bột đậu xanh hoặc đậu nành thể hiện giảm phần trăm diện tích lá bệnh tốt hơn, hiệu quả của hai nghiệm thức này có thể do sự tác động của chất bảo vệ lên tính kháng bệnh của cây bên cạnh tác động của TKT.

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 12/05/2017

Ngày nhận bài sửa: 28/06/2017

Ngày duyệt đăng: 30/11/2017

Title:

*Study on storage conditions and effect of protecting additives on bacteriophage survival in controlling bacterial leaf blight disease of rice caused by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* under nethouse conditions*

Từ khóa:

*Chất phụ gia bảo vệ, chất phụ gia phục hồi, chế phẩm đông khô, thời gian tồn trữ, TKT, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae**

Keywords:

*Bacteriophage, lyophilized formulation, protecting additives, recovering additives, storage duration, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae**

Trích dẫn: Huỳnh Thanh Suôi, Ngô Bá Tước và Nguyễn Thị Thu Nga, 2017. Nghiên cứu điều kiện tồn trữ và hiệu quả của chất bảo vệ sự tồn tại thực khuẩn thể trong quản lý bệnh cháy bìa lá lúa do vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* trong điều kiện nhà lưới. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 53b: 71-78.

1 ĐẶT VẤN ĐỀ

Cháy bìa lá lúa do vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) là mầm bệnh quan trọng ở các khu vực trồng lúa trên thế giới bao gồm châu Á, Bắc Australia, châu Phi, châu Mỹ Latinh (Gnanamanickam, 2009). Ở Việt Nam ghi nhận gây hại nặng trên các giống Jasmine 85, OMCS 2000, OM2490, OM2492, OM2517, OM4498 và OM4656 trên diện rộng (Loan *et al.*, 2006).

Với ưu thế thân thiện với môi trường, sản phẩm an toàn cho người sử dụng, biện pháp sinh học sử dụng các vi sinh vật đối kháng với mầm bệnh đang được các nhà khoa học quan tâm, trong đó có liệu pháp sử dụng thực khuẩn thể (TKT). Hướng nghiên cứu về TKT để quản lý vi khuẩn gây bệnh cháy bìa lá lúa do *X. oryzae* pv. *oryzae* cũng được bắt đầu sớm nhất vào năm 1953 bởi Yoshii *et al.*, (Wakimoto, 1960). Theo Lương Hữu Tâm (2013) và Nguyễn Thị Trúc Giang *et al.* (2014), nghiên cứu và phân lập TKT ký sinh và tiêu diệt vi khuẩn Xoo gây bệnh cháy bìa lá, có hiệu quả ngăn chặn bệnh trong điều kiện nhà lưới với mật số 10^8 pfu/ml. Theo Chae *et al.* (2014), TKT có khả năng quản lý bệnh cháy bìa lá trong điều kiện ngoài đồng đến 51%, có thể là biện pháp thay thế biện pháp hóa học trong quản lý bệnh.

Tiềm năng của TKT trong quản lý bệnh cháy bìa lá lúa là rất lớn. Nghiên cứu này nhằm tìm ra điều kiện tồn trữ TKT để dễ sử dụng và bảo quản lâu dài hơn, cũng như ứng dụng TKT này kết hợp với các chất bảo vệ giúp duy trì sự tồn tại của TKT trên bề mặt tán lá lúa dưới điều kiện ánh nắng mặt trời, góp phần tăng hiệu lực quản lý mầm bệnh của TKT.

2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Nghiên cứu chất phụ gia giúp thể thực khuẩn hồi phục từ dạng bột đông khô

Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên, 7 nghiệm thức bao gồm nghiệm thức đối chứng (bổ sung nước) và các nghiệm thức có bổ sung chất phụ gia Mannitol (5% và 10%), Glucose (5% và 10%) và sữa tách béo (10% và 20%) với 3 lần lặp lại.

Nhân nuôi TKT và vi khuẩn: Sử dụng dòng thực khuẩn *XaDT60b* (Φ60) nhân nuôi trên môi trường King'B 0,8% và vi khuẩn *Xoo* (dòng *XaAG73*) được nuôi trên môi trường Wakimoto cải tiến 4 ngày (nguồn vi khuẩn và TKT được nhận từ bộ môn Bảo vệ Thực vật - Trường Đại học Cần Thơ), sau đó mật số ban đầu của TKT trước khi đông khô được xác định bằng phương pháp pha loãng và trải đĩa (Nguyễn Thị Trúc Giang *et al.*, 2014).

Tiến hành thí nghiệm: Sử dụng Sucrose 10% làm chất bảo vệ thể thực khuẩn trong đông khô (Lương Hữu Tâm, 2013). Rút 2 ml huyền phù TKT đã xác định mật số + 2 ml dung dịch đường sucrose 20% (đã lọc qua màng lọc vi khuẩn (0,45 μm)) để được một hỗn hợp TKT trong nồng độ Sucrose 10% vào ống falcon 50 ml, sau đó đặt trong điều kiện -20°C trong 24 giờ cho mẫu đã đông đá hoàn toàn, tiến hành đông khô bằng máy đông khô lạnh (Labconco FreeZone 6) ở nhiệt độ -51°C và áp suất 0,040 mbar trong 3 ngày. Bột TKT sau đông khô được hòa tan trong dung dịch chứa chất phụ gia hồi phục (gồm dung dịch Mannitol (5% và 10%), Glucose (5% và 10%) và sữa tách béo (skim milk) (10% và 20%) được lọc qua màng lọc vi khuẩn đường kính 0,45 μm) đến đúng thể tích ban đầu là 4 ml, lắc đều, để trong 10 phút (Valdez *et al.*, 1985) và xác định mật số bằng phương pháp pha loãng và trải đĩa.

Số liệu xử lý thống kê qua phép thử Duncan bằng phần mềm SPSS 20.0. Số liệu mật số được chuyển sang log(x) trước khi phân tích.

2.2 Khảo sát khả năng tồn trữ của các dạng chế phẩm TKT

Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên, 3 nghiệm thức với 4 lần lặp lại bao gồm: Đông khô - Trữ NĐP (TKT dạng bột đông khô, trữ điều kiện nhiệt độ phòng), dạng lỏng - trữ 4°C (huyền phù TKT, trữ ngăn mát tủ lạnh), Dạng lỏng - Trữ NĐP (huyền phù TKT trữ điều kiện nhiệt độ phòng).

Tiến hành thí nghiệm: Nghiệm thức bột đông khô trữ nhiệt độ phòng được chuẩn bị như ở mục 2.1 và khi đếm mật số có bổ sung chất phụ gia hồi phục tìm được ở mục 2.1. Nghiệm thức dạng lỏng - trữ 4°C và trữ NĐP được chuẩn bị bằng cách rút 1 ml TKT có cùng mật số ban đầu cho vào ống eppendorf (mỗi ống là một thời điểm khảo sát và một lần lặp lại) và các ống được trữ tương ứng hai điều kiện.

Xác định mật số TKT ở các thời điểm tồn trữ 1 ngày, 1, 2, 3, 4, 5, 6 tháng sau khi tồn trữ của các dạng tồn trữ khác nhau. Số liệu mật số được chuyển sang log(x) trước khi xử lý thống kê bằng phần mềm SPSS 20.0 qua phép thử Duncan.

2.3 Nghiên cứu các chất phụ gia giúp duy trì khả năng tồn tại và hiệu quả phòng, trị của TKT trong điều kiện nhà lưới

Nguồn TKT Φ60 và bệnh *Xoo* dòng *XaAG73*. Sử dụng TKT dạng bột đông khô, hòa tan bằng chất phụ gia phục hồi tìm ở mục 2.1, sau đó TKT được kết hợp với các dung môi chất phụ gia bảo vệ bột đậu xanh, bột đậu nành, bột bắp, sữa tách béo và bột cà rốt (được mua dạng đóng gói sẵn, trong

cửa hàng thực phẩm) ở nồng độ 0,5% và mật số TKT trong huyền phù là 10^8 pfu/ml.

Bố trí thí nghiệm: Hoàn toàn ngẫu nhiên, 7 nghiệm thức và 4 lần lặp lại gồm: 1. TKT + Bột đậu xanh (0,5%), 2. TKT + Bột đậu nành (0,5%), 3. TKT + Bột bắp (0,5%), 4. TKT + Sữa tách béo (0,5%), 5. TKT + Bột cà rốt (0,5%), 6. TKT + nước cất thanh trùng, 7. Đối chứng (nước cất thanh trùng).

Chuẩn bị lúa: Hạt giống Jasmine 85 được xử lý nước ấm (54°C) trong 30 phút, sau đó ủ đến khi hạt này mềm, gieo hạt sau đó tuyển lại còn 10 cây/chậu. Chậu có đường kính 10 cm, cao 6,5 cm chứa 0,75 kg đất/ chậu. Chăm sóc, quản lý sâu, bệnh, bón phân theo công thức phân bón của Nguyễn Ngọc Đệ (1998) với 120 N - 40 P₂O₅-30 K₂O. Gieo tổng cộng 42 chậu gồm 28 chậu khảo sát khả năng phòng trị của 7 nghiệm thức trên và 24 chậu để khảo sát khả năng tồn tại của TKT trên tán lá lúa khi kết hợp với chất bảo vệ ở 6 nghiệm thức có xử lý TKT.

Sau khi gieo 25 ngày, lúa được phun huyền phù TKT có chất phụ gia với 25 ml/chậu trên lá lúa. Sau 2 giờ phun huyền phù, vi khuẩn OD_{600 nm} = 0,3 (tương đương mật số 10⁹ cfu/ml) với 25 ml/chậu; phun vào chiều mát và chậu đặt trong nhà lưới, che mưa, phun sương 2 giờ/lần.

Chỉ tiêu ghi nhận: Ước lượng phần trăm diện tích lá bị bệnh khi bệnh xuất hiện và mỗi lần cách nhau 5 ngày. Mật số TKT tồn tại trên tán lá lúa (pfu/g lá) được xác định bằng cách cắt hết lá của 1 cây/chậu/thời điểm cân trọng lượng, cho vào bình tam giác chứa 100 ml nước cất thanh trùng, lắc 20 phút (105 vòng/phút), sau đó xác định mật số TKT trong 1 gram lá, ở các thời điểm 0 giờ, 12 giờ, 24 giờ, 3 ngày và 5 ngày sau khi chúng bệnh bằng phương pháp pha loãng và trải đĩa.

Số liệu mật số được chuyển sang log(x) trước khi xử lý thống kê bằng phần mềm SPSS 20.0 qua phép thử Duncan.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Nghiên cứu chất phụ gia giúp TKT phục hồi từ tình trạng đông khô về tình trạng tăng trưởng

Qua kết quả Bảng 1, chất phụ gia Glucose 10% cho thấy hiệu quả phục hồi tốt nhất với log mật số TKT (pfu/ml) đạt 9,96 khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức còn lại, sau đó là Mannitol 5% và 10% tốt hơn có ý nghĩa thống kê so với đối chứng. Glucose cũng cho kết quả hồi phục tốt trên vi khuẩn *Serratia marcescens* đông khô với nồng độ 0,05 M (Wasserman và Hopkins,

1957), có thể nồng độ Glucose 10% liên quan đến sự thẩm thấu, cũng như các quá trình trao đổi chất của TKT một cách tốt nhất giữa bên trong và bên ngoài môi trường, cho phép sự ra vào của các chất, trong khi glucose với nồng độ 5% là chưa đủ.

Bảng 1: Hiệu quả các chất phụ gia trong sự hồi phục TKT sau đông khô

Nghiệm thức	Log mật số TKT (pfu/ml)
Đối chứng	9,58 b
Sữa tách béo 10%	9,38 a
Sữa tách béo 20%	9,50 ab
Glucose 5%	9,39 a
Glucose 10%	9,96 d
Mannitol 5%	9,81 c
Mannitol 10%	9,74 c
CV (%)	0,73
Mức ý nghĩa	*

Ghi chú: Trong cùng một cột các số trung bình có cùng chữ theo sau giống nhau thì không khác biệt qua phép thử Duncan. () khác biệt ở mức ý nghĩa 5%. Log mật số (pfu/ml) TKT ở các nghiệm thức trước đông khô là 10,08*

Ngoài ra, TKT ở điều kiện như đông khô khi hồi phục về trạng thái tăng trưởng có thể dẫn đến tổn thương trong cấu trúc, thay đổi tính thẩm thấu hoặc tích lũy chất ức chế làm cho virion bị phá hủy, tổn thương... Đối với các tổn thương không gây chết, glucose 10% có thể đóng vai trò là chất sửa chữa, vai trò này được chứng minh trên một số sinh vật khác mà các chất phụ gia như K₂HPO₄ 0,5%, sodium pyruvate (Ray và Speck, 1972), malate 0,05 M (Wasserman và Hopkins, 1957). Chất phụ gia có hiệu quả phục hồi thấp nhất là sữa tách béo 10% với log pfu/ml là 9,38 không khác biệt thống kê với Glucose 5%.

Như vậy, Glucose 10% được chọn làm chất phụ gia hồi phục chế phẩm TKT đông khô.

3.2 Kết quả thời gian tồn trữ của các dạng chế phẩm TKT

Kết quả Bảng 2 cho thấy TKT duy trì mật số tốt nhất trong nghiệm thức đông khô - trữ NDP qua các thời điểm khảo sát, nghiệm thức dạng lỏng - trữ 4°C và dạng lỏng - trữ NDP TKT giảm nhanh mật số sau 3 và 1 tháng tồn trữ, tuần tự.

Thời điểm 1 ngày sau khi khảo sát, dạng lỏng - trữ NDP đã cho thấy giảm mật số với log mật số (pfu/ml) là 9,47 thấp hơn và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với 2 nghiệm thức còn lại với log mật số (pfu/ml) là 10,0. Trong các thời điểm 1 tháng, 2 tháng sau tồn trữ, đông khô - ĐKP và dạng lỏng - trữ 4°C vẫn duy trì mật số tốt tương đương nhau và cao hơn khác biệt ý nghĩa so với dạng lỏng - trữ NDP.

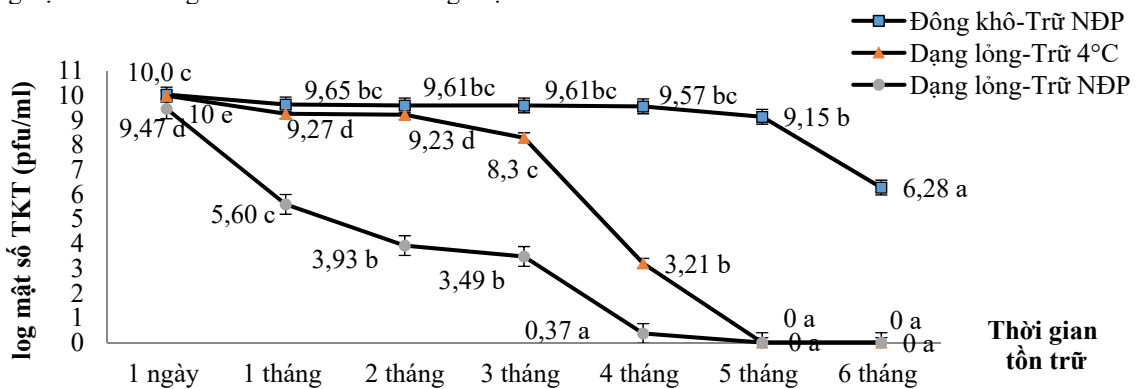
Bảng 2: Thời gian tồn trữ TKT trong 3 điều kiện dạng chế phẩm bột đông khô trữ nhiệt độ phòng (NDP), dạng lỏng - trữ 4⁰C và trữ NDP

Nghiem thức	Log mật số TKT(pfu/ml) sau thời gian tồn trữ						
	1 ngày	1 tháng	2 tháng	3 tháng	4 tháng	5 tháng	6 tháng
Đông khô - trữ NDP	10,0 b	9,65 b	9,61 b	9,61 c	9,57 c	9,15 b	6,28 b
Dạng lỏng - trữ 4 ⁰ C	10,0 b	9,27 b	9,23 b	8,30 b	3,21 b	0,00 a	0,00 a
Dạng lỏng - trữ NDP	9,47 a	5,60 a	3,93 a	3,49 a	0,37 a	0,00 a	0,00 a
CV %	1,47	4,61	5,91	6,58	10,6	9,22	12,6
Mức ý nghĩa	*	*	*	*	*	*	*

Ghi chú: Trong cùng một cột các số trung bình có cùng chữ theo sau giống nhau thì không khác biệt qua phép thử Duncan. (*) khác biệt ở mức ý nghĩa 5%. NDP: nhiệt độ phòng.

Ở thời điểm 3 đến 4 tháng tồn trữ, nghiệm thức dạng lỏng- trữ NDP bắt đầu có sự giảm mật số với log mật số pfu /ml là 8,3 (sau 3 tháng) và 3,21 (sau 4 tháng), thấp hơn và khác biệt ý nghĩa so với nghiệm thức đông khô- trữ NDP với log mật số

pfu/ml là 9,61 và 9,57, tuần tự. Nghiệm thức dạng lỏng - trữ NDP tiếp tục giảm mạnh nhất với log mật số (pfu/ml) chỉ còn 3,49 (3 tháng) và 0,37 (4 tháng) (Bảng 2, Hình 1).



Hình 1: Mật số TKT ở 3 điều kiện tồn trữ qua 7 thời điểm

Ghi chú: Trong một đường các số trung bình có cùng chữ theo sau giống nhau thì không khác biệt qua phép thử Duncan. (*) khác biệt ở mức ý nghĩa 5%. ĐKP: điều kiện phòng

Thời điểm 5 tháng sau khi tồn trữ, nghiệm thức đông khô - trữ NDP vẫn còn duy trì mật số TKT tốt với log mật số (pfu/ml) là 9,15, trong khi hai nghiệm thức còn lại không còn ghi nhận TKT tồn tại. Vào 6 tháng sau tồn trữ, nghiệm thức đông khô - trữ NDP bắt đầu giảm mật số với log mật số (pfu/ml) là 6,28. Sự giảm mật số TKT trong nghiệm thức đông khô có thể liên quan đến ẩm độ trong sản phẩm đông khô gia tăng so với yêu cầu ẩm độ tối hảo cho tồn trữ sản phẩm đông khô là 4 - 6% (Puapermpoonsiri *et al.*, 2010).

Theo Ratti (2016) đông khô là phương pháp tối ưu giúp bảo quản sinh vật và TKT cũng có thể tồn trữ bằng biện pháp đông khô (Iijima và Sakane, 1973). Hơn nữa, hiệu quả duy trì mật số TKT tối ưu ở điều kiện đông khô trong nghiên cứu là do kết hợp các chất phụ gia bảo vệ sucrose 10% cộng trong huyền phù trước đông khô và phụ gia hồi phục glucose 10% bổ sung sau khi đông khô. Biện pháp trữ ở 4⁰C cũng được ghi nhận có thể tồn trữ TKT trong thời gian ngắn không quá 2 tháng

(Jończyk *et al.*, 2011). Bên cạnh đó, TKT giảm mật số nhiều nhất trong điều kiện trữ dạng lỏng ở nhiệt độ phòng có thể vì sự nhiễm vi sinh vật khác.

Như vậy, biện pháp đông khô có thể áp dụng để tồn trữ TKT trong ít nhất 5 tháng không suy giảm mật số.

3.3 Kết quả chất phụ gia giúp gia tăng khả năng tồn tại và hiệu quả phòng trị của TKT trên bề mặt tán lá lúa

3.3.1 Kết quả khả năng bảo vệ của chất phụ gia đến sự tồn tại của TKT trên bề mặt tán lá lúa

Khi bổ sung các chất phụ gia kết hợp TKT nhằm bảo vệ TKT trên tán lá cho thấy hiệu quả tốt trong khoảng 24 giờ sau khi xử lý. Nghiệm thức TKT + Sữa tách béo duy trì mật số vượt trội qua các thời điểm.

Từ thời điểm bắt đầu phun cho đến 12 giờ sau đó ghi nhận sự gia tăng mật số TKT ở nghiệm thức TKT + Sữa tách béo.

Bảng 3: Hiệu quả của các chất bảo vệ sự tồn tại TKT trên tán lá lúa qua các thời điểm

Nghiệm thức	Log mật số TKT (pfu/gram lá) ở các thời điểm sau khi xử lý				
	0 giờ	12 giờ	24 giờ	3 ngày	5 ngày
TKT + Bột đậu xanh	7,59	7,35 ab	5,87	0,00 a	0,00 a
TKT + Bột đậu nành	7,58	7,41 ab	5,50	2,96 b	0,00 a
TKT + Bột bắp	7,78	7,50 ab	5,70	0,00 a	0,00 a
TKT + Sữa tách béo	7,56	7,89 c	6,88	6,27 c	4,32 b
TKT + Bột cà rốt	7,65	7,55 bc	5,88	0,00 a	0,00 a
TKT + Nước cất	7,38	7,14 a	6,37	3,50 b	0,00 a
CV %	2,80	3,08	10,7	40,0	52,6
Mức ý nghĩa	ns	*	ns	*	*

Ghi chú: Trong cùng 1 cột các trung bình có cùng một chữ theo sau thì không khác biệt ý nghĩa thống kê qua kiểm định Duncan. (*) khác biệt ở mức ý nghĩa 5%, (ns) không khác biệt ý nghĩa

Thời điểm 24 giờ sau khi xử lý, sự giảm mật số ở hầu hết các nghiệm thức. Trên bề mặt tán lá cây, TKT bị ảnh hưởng bởi sự khô hạn, nhiệt độ, pH trên tán lá (Ly-Chatain, 2014)... Ánh sáng mặt trời có các tia UV gây bất hoạt đối với TKT (Neves-Petersen *et al.*, 2012). Theo Iriarte *et al.* (2007) xử lý TKT vào lúc 6 giờ sáng thì mật số TKT sau 6 giờ giảm 6 log và giảm hoàn toàn sau 4 giờ tiếp theo, khi sử dụng chất bảo vệ thì con số này chỉ là 1 - 2,7 log. Kết quả tương tự cũng được ghi nhận trên TKT của vi khuẩn *Xoo* trong nghiên cứu của (Nguyễn Thị Trúc Giang, 2016).

Thời điểm 3 ngày, hiệu quả duy trì mật số tốt nhất của sữa tách béo đối với TKT, với log mật số còn lại là 6,27 trong khi các nghiệm thức còn lại thì log mật số TKT giảm mạnh. Nghiên cứu của Balogh (2002) và Balogh (2006) đã cho thấy hiệu quả này của sữa tách béo, có thể vì các chất dinh dưỡng trong nó như amino acid có vòng thơm (phenylalanine và tryptophan), vitamin,... (USDEC, 2005) chống lại tác động của tia UV

trong ánh sáng mặt trời. Các nghiệm thức TKT + Bột cà rốt, TKT + Bột bắp và TKT + Bột đậu xanh ghi nhận không còn sự hiện diện TKT trên lá.

Thời điểm 5 ngày sau xử lý, sữa tách béo vẫn cho thấy tiềm năng nhất trong các chất phụ gia sử dụng với khả năng giúp TKT tồn tại cho 1 khoảng thời gian dài với log MS ghi nhận 4,32, các nghiệm thức còn lại TKT không còn tồn tại. Như vậy, sữa tách béo nồng độ 0,5% giúp bảo vệ TKT duy trì mật số trong điều kiện tán lá lúa, kết quả ghi nhận tương tự Balogh *et al.* (2003). Bên cạnh đó, sữa tách béo chứa khoảng 0,60-1,25% chất béo, có thể tham gia bảo vệ TKT.

Kết quả Bảng 4 cho thấy các nghiệm thức đều có mật số TKT ổn định trong thời gian 12 giờ đầu sau xử lý (từ 6 giờ chiều đến 6 giờ sáng). Thời điểm 24 giờ sau khi xử lý ghi nhận sự giảm mật số một cách đáng kể ở nghiệm thức đối chứng và chỉ có TKT + sữa tách béo cho thấy mật số TKT vẫn duy trì tương đương và không khác biệt ý nghĩa thống kê so với thời điểm 0 giờ.

Bảng 4: Mật số TKT theo thời gian ở các nghiệm thức kết hợp với chất bảo vệ

Nghiệm thức	Log mật số TKT (pfu/gr lá) theo thời gian					
	TKT + Nước cất	TKT + Bột đậu xanh	TKT +Bột đậu nành	TKT + Sữa tách béo	TKT + Bột bắp	TKT + Bột cà rốt
0 giờ	7,38 d	7,59 c	7,58 d	7,56 cd	7,78 c	7,65 c
12 giờ	7,14 d	7,35 c	7,41 d	7,89 d	7,50 c	7,55 c
24 giờ	6,37 c	5,87 b	5,50 c	6,88 bc	5,70 b	5,88 b
3 ngày	3,50 b	0,00 a	2,96 b	6,27 b	0,00 a	0,00 a
5 ngày	0,00 a	0,00 a	0,00 a	4,32 a	0,00 a	0,00 a
CV %	6,88	21,7	10,1	7,61	4,37	5,72
Mức ý nghĩa	*	*	*	*	*	*

Ghi chú: Trong cùng 1 cột các trung bình có cùng một chữ theo sau thì không khác biệt ý nghĩa thống kê qua kiểm định Duncan. (*) khác biệt ở mức ý nghĩa 5%

Bên cạnh đó, nghiệm thức đối chứng TKT + nước cất vẫn duy trì khả năng hoạt động của TKT đến 24 giờ. Điều này có thể do bột đồng khô có chứa (sucrose và glucose) góp phần làm nên hiệu

quả bảo vệ. Theo Ting *et al.* (2009), sucrose trong công thức bảo vệ tế bào, giảm sự bất hoạt của sinh vật dưới điều kiện ánh sáng UV. Kết quả cũng phù hợp với nghiên cứu của Iriarte *et al.* (2007) khi sử

dụng sữa tách béo + sucrose cho hiệu quả bảo vệ tốt dưới tác động của ánh sáng UV.

Như vậy, thí nghiệm này cho thấy rằng sữa tách béo là chất phụ gia triển vọng trong duy trì khả năng hoạt động của TKT dưới tác động của các yếu tố môi trường, nhất là tia UV trong ánh sáng mặt trời.

3.3.2 Kết quả quản lý bệnh cháy bìa lá lúa của TKT dạng đông khô có bổ sung chất bảo vệ

Nhìn chung các nghiệm thức xử lý TKT đều cho thấy hiệu quả giảm bệnh tốt hơn so với đối chứng không xử lý cho đến thời điểm 15 ngày sau khi chủng bệnh (NSKCB) (Bảng 5). Trong đó, nghiệm thức TKT + sữa tách béo và TKT + bột đậu xanh cho thấy hiệu quả giảm phần trăm diện tích

vết bệnh vượt trội hơn so với đối chứng lên đến 20 NSKCB.

Thời điểm 10 NSKCB, các nghiệm thức có TKT đều cho hiệu quả giảm phần trăm diện tích vết bệnh tốt hơn, khác biệt ý nghĩa thống kê so với đối chứng không xử lý (ngoại trừ nghiệm thức xử lý với bột cà rốt).

Thời điểm 15 NSKCB, tất cả các nghiệm thức xử lý TKT đều thể hiện hiệu quả phòng trị, trong đó nghiệm thức TKT+ bột đậu xanh và bột đậu nành thể hiện hiệu quả cao hơn với phần trăm diện tích lá bị bệnh là 31,4% và 38,6 % thấp hơn và khác biệt ý nghĩa so với các nghiệm thức còn lại và đối chứng không xử lý TKT với diện tích lá bị bệnh là 69,7%.

Bảng 5: Phần trăm diện tích lá bệnh qua các thời điểm 10, 15, 20 ngày sau khi chủng bệnh

Nghiệm thức	Trung bình % diện tích lá bệnh qua các thời điểm sau khi chủng bệnh			AUDPC
	10 NSKCB *	15 NSKCB **	20 NSKCB **	
Đối chứng	10,4 c	69,7 c	88,9 c	649 c
TKT+ đậu xanh	1,64 a	31,4 a	68,6 a	341 a
TKT+ đậu nành	1,32 a	38,6 a	80,7 abc	405 a
TKT+ sữa tách béo	1,26 a	56,8 b	73,7 ab	478 b
TKT+ bột bắp	0,92 a	55,3 b	83,3 abc	492 b
TKT+ cà rốt	8,64 c	55,7 b	78,3 abc	539 b
TKT + nước cất	5,28 b	59,2 b	86,8 bc	553 b
CV %	11,9	8,82	9,71	9,85
Mức ý nghĩa	*	*	*	*

Ghi chú: (*) số liệu được chuyển sang \sqrt{x} , (**) số liệu được chuyển sang $\arcsin\sqrt{x}$. Trong cùng 1 cột các trung bình có cùng một chữ theo sau thì không khác biệt ý nghĩa thống kê qua kiểm định Duncan. (*) khác biệt ở mức ý nghĩa 5%.NSCK: ngày sau khi chủng

Thời điểm 20 NSKCB, nghiệm thức TKT + bột đậu xanh vẫn cho thấy phần trăm diện tích vết bệnh thấp nhất, tuy nhiên không khác biệt ý nghĩa thống kê với nghiệm thức TKT + sữa tách béo và cho hiệu quả giảm vết bệnh có ý nghĩa hơn đối chứng, các nghiệm thức còn lại không còn thể hiện hiệu quả giảm bệnh khác biệt so với đối chứng.

Về diện tích bên dưới đường cong tiến triển bệnh (AUDPC), tất cả các nghiệm thức xử lý TKT đều giảm sự phát triển của bệnh, nghiệm thức xử lý phụ gia bột đậu xanh và đậu nành là tốt nhất.

Kết quả Bảng 4 và 5 cho thấy chưa có sự tương quan giữa mật số TKT được duy trì và hiệu quả giảm bệnh. Hầu hết các nghiệm thức có xử lý TKT đều thể hiện hiệu quả giảm bệnh, riêng nghiệm thức bột đậu xanh và nghiệm thức bột đậu nành thể hiện hiệu quả cao hơn mặc dù mật số TKT không còn duy trì sau 5 ngày xử lý. Kết quả này là do hiệu quả giảm bệnh được quyết định dựa vào số lượng TKT tiếp xúc với vi khuẩn gây bệnh trong vài giờ đầu nên việc suy giảm mật số TKT sau 24

giờ không ảnh hưởng đến hiệu quả giảm bệnh. Riêng nghiệm thức TKT + bột đậu xanh hoặc đậu nành thể hiện giảm phần trăm diện tích lá bệnh tốt hơn, hiệu quả của hai nghiệm thức này có thể do sự tác động của chất bảo vệ lên tính kháng bệnh của cây bên cạnh tác động của TKT. Thực vậy, trong đậu xanh tìm thấy protein, vitamin (thiamine, vitamin A, vitamin C, vitamin K,...), kháng chất (canxi, magie, carotene),... (Rudrappa, 2009; USDA, 2017), vitamin B1 (thiamine) chứa từ <1 - 7%. Theo Ahn *et al.* (2005) xử lý thiamine 50 nM kích hoạt sự kháng bệnh cháy bìa lá lúa, ngoài ra còn riboflavin, vitamin K ở một số loại cây nhất định (Walters *et al.*, 2007).

Như vậy, sữa tách béo giúp duy trì mật số TKT trên bề mặt lá lúa. Nghiên cứu đã ghi nhận sự tồn tại của TKT lên đến 5 ngày sau khi phun lên bề mặt lá khi kết hợp sữa tách béo 0,5%, điều này mở một hướng khai thác vai trò của sữa tách béo cần được nghiên cứu đó là kết hợp TKT với sữa tách béo cho phun ngừa trước 1 ngày, 3 ngày và thậm

chỉ lên đến 5 ngày, sau đó xử lý vi khuẩn gây bệnh để đánh giá tính khả thi của sự kết hợp này.

4 KẾT LUẬN VÀ ĐỀ XUẤT

4.1 Kết luận

Glucose 10% cho hiệu quả hồi phục mật số TKT tốt nhất đối với bột TKT sau đông khô.

Phương pháp tồn trữ dạng đông khô có thể duy trì mật số TKT ổn định ít nhất 5 tháng tồn trữ ở nhiệt độ phòng, trong khi dạng lỏng trữ 4°C và nhiệt độ phòng có mật số TKT giảm mạnh sau 3 và 1 tháng sau khi tồn trữ.

Chất phụ gia sữa tách béo (0,5%) cho hiệu quả duy trì mật số TKT tốt trên bề mặt lá lúa ít nhất 5 ngày trong điều kiện nhà lưới.

Các chất phụ gia bổ sung vào chế phẩm TKT đông khô đều giúp tăng hiệu quả giảm bệnh (ngoại trừ bột cà rốt). Trong đó, đậu xanh, đậu nành và sữa tách béo cho hiệu quả giảm bệnh tốt.

4.2 Đề xuất

Kiểm tra hiệu quả giảm bệnh của TKT kết hợp với sữa tách béo bằng biện pháp phun ngừa 1, 3 và 5 ngày trước khi lây bệnh so với đối chứng phun TKT không có kết hợp sữa tách béo.

Nghiên cứu cơ chế giảm bệnh của bột đậu xanh hoặc bột đậu nành trong hiệu giảm bệnh, khi không có TKT.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Ahn, I.P., Kim, S. & Lee, Y.H., 2005. Vitamin B1 functions as an activator of plant disease resistance. *Plant physiology* 138(3): 1505-1515.

Balogh, B., 2002. Strategies for improving the efficacy of bacteriophages for controlling bacterial spot of tomato. Master thesis. University of Florida, Florida.

Balogh, B., 2006. Characterization and use of bacteriophages associated with citrus bacterial pathogens for disease control. Ph. D thesis. University of Florida.

Balogh, B., J. Jones, Momol, M., Olson, S., Obradovic, A., King, P. & Jackson, L., 2003. Improved efficacy of newly formulated bacteriophages for management of bacterial spot on tomato. *Plant disease* 87(8): 949-954.

Chae, J. C., Hung, N. B., Yu, S. M., Lee, H. K. & Lee, Y. H., 2014. Diversity of Bacteriophages Infecting *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in Paddy Fields and Its Potential to Control Bacterial Leaf Blight of Rice. *Journal of microbiology and biotechnology* 24(6): 740-747.

Gnanamanickam, S.S., 2009. *Biological Control of Rice Diseases*. Springer. 97p

Iijima, T. & Sakane, T., 1973. A method for preservation of bacteria and bacteriophages by drying in vacuo. *Cryobiology* 10(5): 379-385.

Iriarte, F., B. Balogh, Momol, M., Smith, L., Wilson, M. & Jones, J., 2007. Factors affecting survival of bacteriophage on tomato leaf surfaces. *Applied and environmental microbiology* 73(6): 1704-1711.

Jończyk, E., M. Klak, R. Międzybrodzki & A. Górski, 2011. The influence of external factors on bacteriophages—review. *Folia microbiologica* 56(3): 191-200.

Loan, L.C., Ngan, V.T.T. & Du, P.V., 2006. Preliminary evaluation on resistance genes against rice bacterial leaf blight in Can Tho province - Vietnam. *Omonrice* 14: 44-47.

Lương Hữu Tâm, 2013. Phân lập và bước đầu đánh giá khả năng hạn chế bệnh cháy bìa lá lúa do vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* của một số chủng thực khuẩn thể ở Đồng bằng sông Cửu Long. Luận văn Thạc sĩ. Trường Đại học Cần Thơ. Cần Thơ.

Ly-Chatain, M.H., 2014. The factors affecting effectiveness of treatment in phages therapy. *Frontiers in Microbiology* 5(51).

Neves-Petersen, M.T., Gajula, G.P. & Petersen, S., 2012. *UV light effects on proteins: from photochemistry to nanomedicine*. INTECH Open Access Publisher

Nguyễn Thị Trúc Giang, 2016. Nghiên cứu thực khuẩn thể trong phòng trị bệnh cháy bìa lá do *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* trên lúa và yếu tố môi trường tác động lên thực khuẩn thể. Luận văn tốt nghiệp Thạc sĩ. Trường đại học Cần Thơ. 72 trang.

Nguyễn Thị Trúc Giang, Đoàn Thị Kiều Tiên & Nguyễn Thị Thu Nga, 2014. Phân lập thực khuẩn thể và đánh giá hiệu quả phòng trị bệnh cháy bìa lá lúa do vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ (4): 194-203.

Puapermpoonsiri, U., Ford, S. & Van der Walle, C., 2010. Stabilization of bacteriophage during freeze drying. *International journal of pharmaceuticals* 389(1): 168-175.

Ratti, C., 2016. Freeze - drying Process Design In *Handbook of Food Process Desig*, 622-642 (Ed J. A. a. M. S. u. Rahman.). ResearchGate: Blackwell Publishing Ltd.

Ray, B. & Speck, M., 1972. Repair of injury induced by freezing *Escherichia coli* as influenced by recovery medium. *Applied microbiology* 24(2): 258-263.

Rudrappa, U., 2009. Green beans nutrition facts. http://www.nutrition-and-you.com/green_beans.html. 09/03/2017.

Ting, A.S.Y., Fang, M.T. & Tee, C.S., 2009. Assessment on the Effect of Formulative Materials on the Viability and Efficacy of *Serratia marcescens* - a Biocontrol Agent

- Against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4 *American Journal of Agricultural and Biological Sciences* 4(4): 283-288.
- USDA, 2017. Basic Report 16080, Mung beans, mature seeds, raw. accessed 10/03/2017.
- USDEC, 2005. Reference Manual For U.S. Milk Powders. *U.S. Dairy Export Council* 1(2).
- Valdez, G.F.D., Giorl, G.S.D., Holgad, A.P.D.R. & Oliver, G., 1985. Rehydration Conditions and Viability of Freeze-Dried Lactic Acid Bacteria. *Cryobiology* 22(1985): 574-517.
- Wakimoto, S., 1960. Classification of strains of *Xanthomonas oryzae* on the basis of their susceptibility against bacteriophages. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 25(4): 193-198.
- Walters, D., Newton, A. & Lyon, G., 2007. *Induced Resistance for Plant Defence*. Australia: Blackwell Publishing. 251p.
- Wasserman, A.E. & Hopkins, W.J., 1957. Studies in the recovery of viable cells of freeze-dried *Serratia marcescens*. *Applied microbiology* 5(5): 295.