

ĐẠI HỌC ĐÀ NẴNG
PHÂN HIỆU ĐẠI HỌC ĐÀ NẴNG TẠI KON TUM

BÁO CÁO TỔNG KẾT
ĐỀ TÀI NGHIÊN CỨU KHOA HỌC CỦA SINH VIÊN
NĂM HỌC 2020 - 2021

**Nghiên cứu sử dụng chế phẩm sinh học sản xuất từ vi khuẩn
Pseudomonas sp. phòng trị bệnh thối nhũn do nấm *Phytophthora sp.* gây hại
trên cây Lan kim tuyến (*Anoectochilus setaceus*).**

Thuộc nhóm ngành khoa học:
Khoa học kỹ thuật

Họ và tên sinh viên chịu trách nhiệm chính thực hiện đề tài
Đoàn Thị Hòa
Lớp K11LK2

Kon Tum, tháng 05 năm 2021

ĐẠI HỌC ĐÀ NẴNG
PHÂN HIỆU ĐẠI HỌC ĐÀ NẴNG TẠI KON TUM

BÁO CÁO TỔNG KẾT
ĐỀ TÀI NGHIÊN CỨU KHOA HỌC CỦA SINH VIÊN
NĂM HỌC 2020 - 2021

**Nghiên cứu sử dụng chế phẩm sinh học sản xuất từ vi khuẩn
Pseudomonas sp. phòng trị bệnh thối nhũn do nấm *Phytophthora sp.* gây ra
trên cây Lan kim tuyến (*Anoectochilus setaceus*).**

Thuộc nhóm ngành khoa học: Khoa học kỹ thuật

1. Sinh viên thực hiện: Đoàn Thị Hòa Nam, Nữ: Nữ

Lớp, khoa: K11LK2 – Khoa SP&DBĐH

Ngành học: Luật kinh tế

2. Sinh viên thực hiện: Sinsavath Bousisouk Nam, Nữ: Nam

Lớp, khoa: K11KN – Khoa kinh tế

Ngành học: Kinh doanh nông nghiệp

3. Sinh viên thực hiện: Sayhosonglevang Theun Nam, Nữ: Nam

Lớp, khoa: K11KN – Khoa kinh tế

Ngành học: Kinh doanh nông nghiệp

3. Sinh viên thực hiện: A Thuyên Nam, Nữ: Nam

Lớp, khoa: K12KN – Khoa kinh tế

Ngành học: Kinh doanh nông nghiệp

3. Sinh viên thực hiện: Thao Sử Nam, Nữ: Nam

Lớp, khoa: K12KN – Khoa kinh tế

Ngành học: Kinh doanh nông nghiệp

Người hướng dẫn: **Th.S Trần Quốc Hùng**

Kon Tum, tháng 05 năm 2021

MỤC LỤC

MỤC LỤC	3
DANH MỤC CÁC TỪ VIẾT TẮT	5
DANH MỤC CÁC BẢNG VÀ HÌNH.....	6
MỞ ĐẦU	7
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN CÁC VẤN ĐỀ NGHIÊN CỨU	10
1.1. Cơ sở lý luận của các vấn đề nghiên cứu.....	10
1.1.1. Giới thiệu về Lan kim tuyến - <i>Anoectochilus sp.</i>	10
1.1.2. Vi khuẩn <i>Pseudomonas</i>	11
1.1.2.1. Đặc điểm của vi khuẩn <i>Pseudomonas</i>	11
1.1.2.2. Vai trò của vi khuẩn <i>Pseudomonas</i>	11
1.1.2.3. Cơ chế tác động của vi khuẩn <i>Pseudomonas</i>	12
1.1.3. Nấm <i>Phytophthora sp.</i>	13
1.1.3.1. Đặc tính.....	13
1.1.3.2. Điều kiện phát sinh, phát triển.....	13
1.2. Cơ sở thực tiễn của đề tài.....	14
1.3. Các nghiên cứu liên quan đến đề tài.....	15
1.3.1. Nghiên cứu ngoài nước	15
1.3.2. Nghiên cứu trong nước.....	16
CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG, NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	18
2.1. Đối tượng nghiên cứu	18
2.2. Nội dung nghiên cứu	18
2.3. Phương pháp nghiên cứu.....	18
2.3.1. Cách tiếp cận.....	18
2.3.2. Phương pháp nghiên cứu.....	18
2.3.2.1 Công thức thí nghiệm	18
2.3.2.2 Phương pháp bố trí thí nghiệm.	19
2.3.2.3 Cách lấy mẫu, theo dõi	19
2.3.2.4 Địa điểm nghiên cứu.....	20
2.3.2.5 Thời gian nghiên cứu.....	20
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN.....	21
3.1. Khả năng sinh trưởng, phát triển của cây Lan kim tuyến.	21
3.1.1. Chiều cao cây.....	21
3.1.2. Số lá trên cây.....	22
3.1.3. Chiều dài và chiều rộng lá.....	22

3.1.4. Đánh giá sự sinh trưởng ở các công thức nghiên cứu	23
3.2. Khả năng phòng trị bệnh của chế phẩm sinh học sản xuất từ chủng vi khuẩn <i>Pseudomonas putida</i>	24
3.3. Quy trình kỹ thuật phòng trừ bệnh thối nhũn do nấm <i>Phytophthora sp.</i> gây hại trên cây Lan kim tuyến bằng chế phẩm sinh học sản xuất từ vi khuẩn <i>Pseudomonas putida</i>	25
3.3.1. Quy trình kỹ thuật trồng và chăm sóc Lan kim tuyến bằng chế phẩm sinh học sản xuất từ vi khuẩn đối kháng <i>Pseudomonas putida</i> . Phòng trị bệnh thối nhũn do nấm <i>Phytophthora sp.</i> gây hại.	25
3.3.1.1. Chuẩn bị nhà trồng.....	25
3.3.1.2. Chuẩn bị giá thể.....	25
3.3.1.3. Sử dụng chế phẩm <i>Pseudomonas putida</i>	26
3.3.1.4. Tiêu chuẩn cây giống trồng.....	26
3.3.1.5. Thời vụ trồng.....	26
3.3.1.6. Kỹ thuật trồng và chăm sóc	26
3.3.1.7. Phòng trừ bệnh thối nhũn (thối thân) do nấm <i>Phytophthora sp.</i>	27
3.3.1.8. Thu hoạch và bảo quản.....	28
3.3.2. Sơ đồ quy trình kỹ thuật.....	29
CHƯƠNG IV. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....	31
4.1. Kết luận	31
4.2. Kiến nghị.....	31
TÀI LIỆU THAM KHẢO	32

DANH MỤC CÁC TỪ VIẾT TẮT

Chữ viết tắt/ký hiệu	Cụm từ đầy đủ
VSV	Vi sinh vật
PGPR	Plant Growth Promoting Rhizobacteria Kích thích sinh trưởng thực vật
ISR	Induction of Systemic Resistance Tính kích kháng hệ thống
SAR	Systemic Acquired Resistance Tính kích kháng hệ thống có điều kiện
FAO	Tổ chức lương thực thế giới
CT	Công thức
QCVN	Quy chuẩn Việt Nam
BNNPTNT	Bộ nông nghiệp phát triển nông thôn
ĐVT	Đơn vị tính
LSD	Least Significant Difference Sai số nhỏ nhất có ý nghĩa
CCC	Chiều cao cây
SL	Số lá
CDL	Chiều dài lá
CRL	Chiều rộng lá
TTCCC	Tăng trưởng chiều cao cây
TTSL	Tăng trưởng số lá
TTCDL	Tăng trưởng chiều dài lá
TTCRL	Tăng trưởng chiều rộng lá

DANH MỤC CÁC BẢNG VÀ HÌNH

Bảng 3.1. Chiều cao cây ở các công thức nghiên cứu	21
Bảng 3.2. Số lá trên cây ở các công thức nghiên cứu	22
Bảng 3.3. Chiều dài và chiều rộng lá ở các công thức nghiên cứu	23
Bảng 3.4. Tỷ lệ, phân cấp và chỉ số bệnh ở các công thức nghiên cứu	24
Hình 1.1. Các cơ chế kích thích sự sinh trưởng thực vật bởi PGPR	12
Hình 3.1. Các chỉ tiêu sinh trưởng ở các công thức	23
Hình 3.2. Sơ đồ quy trình kỹ thuật	30

MỞ ĐẦU

1. Tính cấp thiết

Anoectochilus là một chi thuộc Họ Phong lan. Có khoảng 50 loài được mô tả trong chi *Anoectochilus*. Những loài này được biết đến như là thực vật trên cạn, sống lâu năm, thảo mộc rụng lá, cộng sinh có dây leo thân rễ, có hoa thẳng đứng từ thân và các lá có màu sẫm với các gân đối xứng. Hoa mọc thành từng cụm, với cụm hoa dài 10–15 cm, mang 5-10 hoa màu hồng phủ lông đỏ, dài 2,5 cm với cánh môi dài 1,5 cm mang 6-8 ria mỗi bên, đầu môi chẻ thành 2 thùy thuôn đầu tròn. Trong khi trái cây là một quả nang có lông chứa hạt có cánh. Các chi Lan thuộc *Anoectochilus* có phân bố tự nhiên từ Himalaya đến Nam Trung Quốc, Đông Nam Châu Á, Úc, New Guinea, Melanesia và Hawaii. Nó được tìm thấy trong các khu rừng thường xanh nơi có độ ẩm cao và bóng râm dày [1]. Ví dụ, *Anoectochilus roxburghii* được tìm thấy ở Ấn Độ, Thái Lan, Trung Quốc, Lào và Việt Nam. Hiện tại loài này được sử dụng làm thuốc đã được nghiên cứu trong Darjeeling Himalaya ở Tây Bengal, Ấn Độ có hiệu quả tốt trong kiểm soát sốt, bệnh phổi và tăng huyết áp. Tuy nhiên, việc khai thác bừa bãi không có tính bảo vệ, phá rừng và mở rộng đất nông nghiệp là những mối đe dọa lớn làm nguy cơ mất loài này tại Tây Bengal, Ấn Độ [2].

Các loài thuộc chi *Anoectochilus* được biết đến như là loại lan dược liệu quý hiếm và có nhiều chức năng khác nhau trong bào chế thuốc cổ truyền như chống khối u, giảm lipase, chống tiểu đường và chống viêm gan [3]. Các thành phần hóa học và sinh học của một số loài thuộc chi *Anoectochilus* đã được mô tả chẳng hạn như axit helvolic từ *A. setaceus* cho hoạt động kháng khuẩn. Các thành phần hóa học trong *A. setaceus* bao gồm α -cadinol, (E, E) - farnesol, và terpinen-4-ol. Trong khi *A. formosanus* chứa β -sitosterol, 4 - axit hydroxycinnamic, β -D-glucopyranosyloxy, và axit butanoidglucosides [4]. Loài *A. formosanus* có tác dụng chữa nhiều bệnh như đau tức ngực, đau bụng, tiểu đường, viêm thận, sốt cao, cao huyết áp, rối loạn chức năng gan, rối loạn chức năng lá lách và ngực đau nhói [4]. Loài *A. setaceus* được sử dụng cho dầu thuốc trị rắn độc cắn, và *A. roxburghii* được sử dụng để điều trị bệnh lao. Ngoài ra, một số loài thuộc *Anoectochilus* được người dân bản địa sử dụng làm rau ăn và trang trí do có hoa đẹp [1].

Loài lan kim tuyến *Anoectochilus setaceus* còn gọi là lan gấm, nam trùng thảo, cỏ nhung, cây kim cương, giải thủy tơ. Đây là một loài dược liệu đặc biệt quý hiếm, có giá trị kinh tế cao của Việt Nam. Nhưng do hiện nay nhu cầu sử dụng quá cao của người tiêu dùng cùng với sản lượng trong tự nhiên rất ít nên cây lan kim tuyến đang đứng trước nguy cơ tuyệt chủng. Cây lan kim tuyến đã được đưa vào sách đỏ Việt Nam, loài lan cần được bảo vệ trong tự nhiên. *Anoectochilus setaceus* thường mọc ở

ven suối (nơi có độ ẩm cao) chúng ưa bóng mát nên chỉ mọc dưới các tán cây rừng. Cây thường mọc ở vùng núi cao của các tỉnh phía Tây Bắc như: Yên Bái, Lào Cai, Lai Châu, Cao Bằng, Tuyên Quang, Hòa Bình và một số nơi khu vực cao nguyên các tỉnh Tây Nguyên. Tại Kon Tum, đã triển khai thành công đề tài cấp tỉnh nghiên cứu nhân giống và trồng thử nghiệm loài *Anoectochilus setaceus* của Trung tâm Ứng dụng tiến bộ khoa học và công nghệ (nay là Trung tâm nghiên cứu, ứng dụng và dịch vụ khoa học công nghệ) thuộc Sở Khoa học và Công nghệ tỉnh mở ra cơ hội phát triển loại cây dược liệu có giá trị kinh tế này thành cây hàng hóa; góp phần tăng thu nhập, giảm nghèo cho đồng bào dân tộc thiểu số vùng sâu vùng xa. Đề tài nghiên cứu nhân giống và trồng thử nghiệm cây Kim Tuyến được tiến hành trong giai đoạn (2014-2017) với tổng kinh phí gần 600 triệu đồng từ nguồn vốn sự nghiệp khoa học công nghệ. Đề tài tập trung triển khai các nội dung chính: Nghiên cứu, đánh giá đặc tính sinh thái và tính thích nghi, khả năng phân bố của cây kim tuyến tại địa bàn tỉnh Kon Tum; nghiên cứu nhân giống cây Kim Tuyến bằng 2 phương pháp (nuôi cấy mô tế bào thực vật và giâm hom); nghiên cứu các điều kiện trồng, chăm sóc, thu hoạch cây Kim tuyến tại huyện Kon Plông; điều tra, đánh giá và cách phòng trừ sâu bệnh cây Kim tuyến trồng ngoài thực địa; phân tích, so sánh thành phần hoạt chất hóa học có trong cây kim tuyến trong tự nhiên và cây trồng thực địa; xây dựng tài liệu hướng dẫn kỹ thuật nhân giống, tài liệu hướng dẫn kỹ thuật trồng và chăm sóc cây kim tuyến.

Tuy nhiên, thực tế trong trồng và chăm sóc trong điều kiện nhân tạo, đặc điểm khí hậu không tương thích như bản địa của loài này đã phát sinh một số loại bệnh hại ảnh hưởng rất lớn đến năng suất thu hoạch loại dược liệu này, đặc biệt là bệnh thối nhũn do các loài nấm *Phytophthora sp.* gây ra. Để trị bệnh này người sản xuất ưu tiên sử dụng các loại thuốc hóa học có chứa hoạt chất mancozeb và metalaxyl như Ridomil gold 68 WG, Vimonyl 72 WP, Mexyl MZ 72 WP... để phun phòng trị bệnh với mật độ phun dày từ 3-5 ngày/1 lần, trong khi loài lan kim tuyến *Anoectochilus setaceus* là loài dược liệu được sử dụng toàn bộ thân, lá, rễ để bào chế thuốc chữa bệnh và các mục đích hữu dụng khác. Việc sử dụng các loại thuốc hóa học trên làm tăng nguy cơ tồn dư các hoạt chất hóa học độc hại cho người sử dụng, giảm giá trị của loại lan kim tuyến này trên thị trường khi phát triển thành hàng hóa.

Xuất phát từ thực tiễn đó, nhóm chúng tôi thực hiện đề tài “Nghiên cứu sử dụng chế phẩm sinh học sản xuất từ vi khuẩn *Pseudomonas sp.* phòng trị bệnh thối nhũn do nấm *Phytophthora sp.* gây ra trên cây Lan kim tuyến (*Anoectochilus setaceus*)” nhằm mục đích ứng dụng các biện pháp sinh học thay thế các biện pháp hóa học trong phòng trừ bệnh trên cây lan kim tuyến.

2. Mục đích nghiên cứu

Đánh giá được khả năng và xây dựng quy trình phòng trị bệnh thối nhũn do nấm *Phytophthora sp.* bằng chế phẩm sinh học sản xuất từ vi khuẩn *Pseudomonas sp* (chủng *Pseudomonas putida*) trên cây Lan kim tuyến.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN CÁC VẤN ĐỀ NGHIÊN CỨU

1.1. Cơ sở lý luận của các vấn đề nghiên cứu

1.1.1. Giới thiệu về *Lan kim tuyến - Anoectochilus sp.*

- Giới: *Plantae*
- Bộ: *Asparagales*
- Họ: *Orchidaceae*
- Phân họ: *Orchidaceae*
- Tông: *Cranichideae*
- Phân tông: *Goodyerinea*
- Chi: *Anoectochillus*

Lan kim tuyến còn có nhiều tên gọi khác như: Kim tuyến, Kim tuyến tơ, Giải thủy tơ, Lan gấm, Cỏ nhung, Kim cương. Chi Lan Kim tuyến (*Anoectochilus*) thuộc phân họ *Orchidaceae*, trên thế giới đã thống kê được 51 loài. Tại khu vực châu Á và châu Úc đã phát hiện được 25 loài. Lan Kim tuyến được biết đến nhiều không chỉ vì giá trị làm cảnh, mà còn bởi giá trị làm thuốc của nó.

Lan kim tuyến là cây thảo, có thân rễ mọc dài; thân trên đất mọc nước mang 2-6 lá mọc xòe sát đất, với các đặc điểm cụ thể như sau: Thân rễ nằm ngang sát mặt đất, đôi khi hơi nghiêng, bò dài. Chiều dài thân rễ từ 5-12cm, trung bình là 8,5cm. Đường kính thân rễ từ 2,5 - 3,5mm, trung bình là 3,28mm. Số lông trên thân rễ từ 3-7 lông, trung bình là 4,03 lông. Chiều dài của lông từ 1-5cm, trung bình là 2,14 cm. Thân rễ thường có màu xanh trắng, đôi khi có màu nâu đỏ, thường nhẵn, không phủ lông.

Thân khí sinh thường mọc thẳng đứng trên mặt đất, ít khi mọc nghiêng. Chiều dài thân khí sinh từ 3-7cm, trung bình 5,63cm. Đường kính thân khí sinh từ 2,5-3,5mm, trung bình là 3,09 mm. Thân khí sinh mang nhiều lông, các lông có chiều dài khác nhau. Số lông trên thân khí sinh thay đổi từ 2-5 lông, trung bình là 3,07 lông. Chiều dài mỗi lông từ 1,5-4cm, trung bình 1,87cm. Thân khí sinh thường mọc nước, nhẵn, không phủ lông; có màu xanh trắng, đôi khi có màu hồng nhạt.

Rễ được mọc ra từ các mấu trên thân rễ. Đôi khi rễ cũng được hình thành từ thân khí sinh. Rễ thường đâm thẳng xuống đất. Thông thường mỗi mấu chỉ có một rễ, đôi khi có vài rễ cùng được hình thành từ một mấu trên thân rễ. Số lượng và kích thước rễ cũng rất thay đổi tùy theo cá thể. Số rễ trên một cây thường từ 2 - 9 rễ, trung bình là 5,2 rễ. Chiều dài của rễ thay đổi từ 1 - 9cm, rễ dài nhất trung bình là 6,37cm và ngắn nhất trung bình là 1,04cm, chiều dài trung bình của các rễ trên một cây là 4,07cm.

Lá hình trứng, gần tròn ở gốc, chóp hơi nhọn và có mũi ngắn, cỡ 3,5 - 4,5cm x 2,5 - 3,5cm. Lá có màu nâu đỏ ở mặt trên. Hệ gân lá mạng lưới lông chim, thường có 5 gân gốc. Các gân này thường có màu hồng ở mặt trên và nổi rất rõ. Đôi khi gân ở giữa có màu vàng nhạt. Mặt dưới lá có màu nâu đỏ nhạt, nhẵn với 5 gân gốc nổi rõ. Các gân bên ở phía rìa lá nổi rõ, gân ở giữa lá ở mặt dưới không rõ. Số lượng lá trên một cây thay đổi từ 2 - 6 chiếc, thông thường có 4 lá. Lá mọc cách xoắn quanh thân, xòe trên mặt đất. Kích thước của lá cũng thay đổi, thường dài từ 3 - 5cm, trung bình là 3,87cm và rộng của lá từ 2 - 4cm, trung bình là 2,93cm. Các lá trên một cây thường có kích thước khác nhau rõ rệt. Chiều rộng trung bình của các lá trên một cây là 2,5cm. Cuống lá dài 0,6 - 1,2cm, thường nhẵn và có màu trắng xanh, đôi khi hơi đỏ tía ở bẹ lá. Bẹ lá nổi rõ và nhẵn.

Hoa tự chùm mọc ở đầu ngọn thân, trục hoa dài từ 5 - 20cm, thường phủ lông màu nâu đỏ, mang từ 4 - 10 hoa. Mùa hoa nở tháng 9 - 12. Mùa quả chín tháng 12 - 3 năm sau. Hoa có cánh môi màu trắng. Hai bên rìa mang từ 6 - 8 râu mỗi bên.

1.1.2. Vi khuẩn *Pseudomonas*

1.1.2.1. Đặc điểm của vi khuẩn *Pseudomonas*

Vi khuẩn *Pseudomonas* thường là vi khuẩn Gram âm, hình que. Có tiên mao ở cực nên có khả năng lặn tốt trong nước, không có khả năng tạo bào tử. *Pseudomonas* là vi khuẩn sống tự do, chúng hiện diện khắp nơi như trong đất, trong nước, thực vật, động vật, một số tàn dư thực phẩm. Chúng có khả năng hô hấp hiếu khí hay kỵ khí. Nhiệt độ thuận lợi để chúng phát triển là 30-37⁰C. Tuy nhiên một số chủng *Pseudomonas* lại có thể sống tốt ở 40⁰C. *Pseudomonas* có thể được nuôi trong môi trường đơn giản và ở pH trung tính. Một vài chủng có thể tạo huỳnh quang dưới ánh sáng tia cực tím ở bước sóng 254 nm.

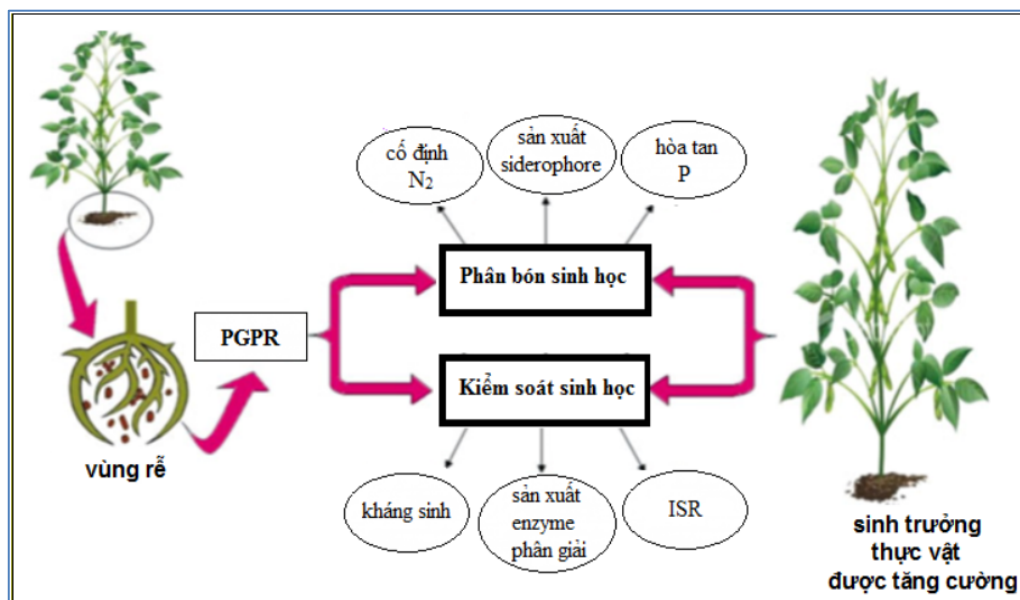
1.1.2.2. Vai trò của vi khuẩn *Pseudomonas*

Vi khuẩn *Pseudomonas spp.* phân bố rộng rãi và có nhiều chủng loài, là vi khuẩn sống tự do, chúng có thể được tìm thấy trong đất, nước, trong thực vật, động vật. Giống *Pseudomonas spp.* có nhiều loài, có khả năng cố định đạm như *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas diminuta*, *Pseudomonas paucimobilis*, *Pseudomonas pseudoflava*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas saccharophila* và *Pseudomonas vesicularis*. Một số loài *Pseudomonas* có khả năng hòa tan lân như *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas chlororaphis* [5], một số có khả năng tổng hợp kích thích tố tăng trưởng như *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas syringae* [6] .

Một số chủng *Pseudomonas* có ảnh hưởng quan trọng trong sự sinh trưởng và phát triển thực vật, tổng hợp kích tố tăng trưởng thực vật như: auxin, cytokinin, kích thích sự phát triển của bộ rễ cây làm gia tăng khả năng hấp thu chất dinh dưỡng trong đất ở một số loài như: *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas syringae* [6].

1.1.2.3. Cơ chế tác động của vi khuẩn *Pseudomonas*

Pseudomonas kích thích sinh trưởng của cây trồng bởi vì chúng xúc tiến cây trồng sinh ra các chất kích thích sinh trưởng như auxin, xitokinyl, gibberellin và tính kháng tập thể của cây, giúp cây kháng lại tốt hơn sự tấn công của mầm bệnh. Cơ chế tác động của vi khuẩn đối kháng *Pseudomonas* như sau: Có khả năng sản sinh ra cyanide, tăng tính chống chịu của cây, sản sinh ra chất kích thích sinh trưởng và có khả năng phân giải độc tố do vi sinh vật gây bệnh tiết ra. Có khả năng hấp thụ các ion Fe^{3+} trong môi trường với ái lực cao nhằm phục vụ trực tiếp cho sự sinh trưởng và hô hấp của VSV, làm cho môi trường xung quanh nghèo sắt, dẫn đến các loại vi sinh vật khác không có đủ ion Fe^{3+} cho quá trình sinh trưởng của mình, do đó chúng sẽ không sinh trưởng được. Cạnh tranh dinh dưỡng với các vi sinh vật gây bệnh, ví dụ như tiết ra các hợp chất siderophore tạo điều kiện thuận lợi cho việc cạnh tranh Fe. Có khả năng phòng chống lại nhiều loại vi sinh vật gây bệnh hại cây - những vi sinh vật đó thường làm giảm sự sinh trưởng và phát triển của cây trồng.



Hình 1.1. Các cơ chế kích thích sự sinh trưởng thực vật bởi PGPR

PGPR: *Plant Growth Promoting Rhizobacteria*

ISR: *Induction of Systemic Resistance of host plant by PGPR*

(Nguồn: Kumar & cộng sự, 2011)

Kích thích sinh trưởng thực vật (Plant Growth Promoting Rhizobacteria - PGPR) do vi khuẩn vùng rễ khi tương tác với rễ cây có thể tạo ra tính kháng của cây chống lại vi khuẩn, nấm và virus gây bệnh. Hiện tượng này được gọi là tính kích kháng hệ thống - ISR (Induction of Systemic Resistance), cũng giống như tính kích kháng hệ thống có điều kiện - SAR (Systemic Acquired Resistance).

1.1.3. Nấm *Phytophthora sp.*

1.1.3.1. Đặc tính

Các loài *Phytophthora sp.* tấn công một phạm vi thực vật rộng lớn và là tác nhân gây một số dịch bệnh nghiêm trọng trên thế giới – điển hình như bệnh mốc sương mai (hay tàn lụi muện) trên khoai tây đã gây ra nạn đói ở Châu Âu những năm 1840, nguyên nhân do nấm *P. Infestans* [7]. Bệnh gây ra do nấm *Phytophthora* đã được nghiên cứu sâu tại Châu Âu. Tuy nhiên, bệnh khá phổ biến ở vùng nhiệt đới ẩm và gây nhiều nguy hiểm làm mất mùa ở nhiều loại cây ăn quả quan trọng ở những vùng này; như bệnh thối rễ, thối cổ rễ, loét thân, tàn lụi lá và thối trái. Nấm *P. palmivora* đã gây rất nhiều bệnh trên nhiều loại cây trồng khác nhau: đen vỏ ca cao; thân và trái đu đủ; thối rễ và tàn lụi trên cam quýt; thối chồi trên cọ; sọc đen trên cao su; thối rễ loét thân sầu riêng; chết nhanh trên tiêu. Trên cây tiêu dòng nấm *Phytophthora* gây hại được xác định là nấm *Phytophthora capsici* gây hại chủ yếu trong mùa mưa, nhất là vào cuối mùa mưa khi có khí hậu ẩm và ấm. Nấm *Phytophthora sp.* có thể tấn công riêng lẻ nhưng đa số có sự kết hợp với các nấm khác như *Fusarium*, *Pythium* và *Rhizoctonia*.

Có thể nói *Phytophthora* là một nhóm lớn có mặt khắp mọi nơi trên thế giới và có hơn 1.000 cây ký chủ, một vài loài của *Phytophthora* đã trở thành dịch hại. Trong khi *P. cinnamomi* được tìm thấy ở vùng nhiệt đới thì *P. palmivora*, *P. paracitica* (*P. nicotianae*) và *P. citrophthora* là đặc trưng ở vùng nhiệt đới và cận nhiệt đới; *P. infestans*, *P. syringae* và *P. fragariae* xuất hiện phổ biến ở vùng ôn đới.

1.1.3.2. Điều kiện phát sinh, phát triển.

Bệnh do nấm *Phytophthora sp.* tấn công trên các đối tượng cây trồng thường xảy ra trong mùa mưa, khi có khí hậu nóng và ẩm. Bệnh xảy ra trên những vườn thoát nước kém, đất bị úng nước hoàn toàn là điều kiện cho nấm phát triển. Nấm *Phytophthora* sống trong đất dưới hình thức các sợi nấm (mycelium) hoặc các bào tử có vách dày gọi là noãn bào tử (oospores), các noãn bào tử tồn tại hàng năm trong đất. Khi đất ẩm, các noãn bào tử nảy mầm cho ra các sợi nấm (mycelia), các sợi nấm sinh ra các bào tử nang (sporangia), các bào tử nang chứa các cá thể gây bệnh gọi là động bào tử (zoospores). Các động bào tử chỉ phóng thích ra ngoài bào tử nang để đi gây

bệnh khi đất bị úng nước hoàn toàn. Khi ra ngoài các động bào tử dùng roi (flagella) bơi tới các rễ cây để gây bệnh hay bơi theo dòng nước mưa để tới các nơi khác trong vườn, làm bệnh lây lan rất nhanh. Vườn bị ngập úng nước càng lâu thì áp lực bệnh càng lớn. Ngoài ra tuyến trùng cũng tạo điều kiện thuận lợi cho nấm phát triển, tuyến trùng xâm nhập vào rễ tạo vết thương hở cho nấm xâm nhập vào gây bệnh [8].

1.2. Cơ sở thực tiễn của đề tài

Theo thống kê của Tổ chức Lương thực thế giới (FAO): Các loại cây trồng trên đồng ruộng hiện nay phải chống đỡ với khoản 100.000 loại sâu hại, 10.000 loài nấm, 200 loài vi khuẩn, 600 loài tuyến trùng và 600 loài virus gây bệnh. Chính vì vậy, hàng năm khoảng 20% sản lượng lương thực, thực phẩm trên thế giới bị mất trắng. Trên thế giới bệnh cây đã gây ra những thiệt hại to lớn cho sản xuất nông nghiệp, chúng phá hủy đến 537,3 triệu tấn các loại nông sản chủ yếu, chiếm 11,6% tổng sản lượng nông nghiệp thế giới. Riêng lúa chiếm khoảng 9%, ngô 10%, cây rau 12% và cây ăn quả 16,5%. Trong các loại bệnh cây, bệnh do nấm gây ra chiếm khoảng 83%. Theo kết quả nghiên cứu khoa học bảo vệ thực vật giai đoạn 1971-1976 của Viện Bảo vệ thực vật, trong số 24 bệnh hại lúa ở Việt Nam có tới 13 bệnh do nấm gây ra, 34 bệnh ngô có 26 bệnh do nấm gây ra và 21 bệnh khoai tây có 8 bệnh do nấm. Những bệnh nấm chủ yếu và có tầm quan trọng nhất, là các bệnh: đạo ôn, khô vằn, tiêm hạch, đốm nâu, thối rễ, mốc sương... Một số bệnh nấm tiêu biểu gây hại cho cây trồng được quan tâm nhiều nhất là bệnh thối thân, rễ ở thực vật do nhiều loài nấm ký sinh gây ra như *Phytophthora sp.*, *Pythium sp.*, *Botrytis cinerospers*, *Diplodia sp.*, *Fusarium sp.*, *Rhizoctonia solani* Kuhn, *Sclerotium bataticola* Faud. Chỉ riêng tính ở khoai tây thiệt hại do *Fusarium sp.* gây bệnh thối củ trên đồng ruộng và trong bảo quản lên tới 20% số củ thu hoạch được. Ngoài ra, chúng còn gây một số bệnh khác như bệnh mốc hồng và thối thân ở ngô. Nấm *Fusarium oxysorum* còn gây ra bệnh héo mạch dẫn và nhiều bệnh thối thân thối rễ ở nhiều loại cây rau quả và cây lương thực như lạc, cà chua...

Thực tế trong trồng và chăm sóc Lan kim tuyến trong điều kiện nhân tạo, đặc điểm khí hậu không tương thích như bản địa của loài này đã phát sinh một số loại bệnh hại ảnh hưởng rất lớn đến năng suất thu hoạch loại dược liệu này, đặc biệt là bệnh thối nhũn do nấm *Phytophthora sp.* gây ra. Để trị bệnh này người sản xuất ưu tiên sử dụng các loại thuốc hóa học có chứa hoạt chất mancozeb và metalaxyl như Ridomil gold 68 WG, Vimonyl 72 WP, Mexyl MZ 72 WP... để phun phòng trị bệnh với mật độ phun dày từ 3-5 ngày/1 lần, trong khi loài lan kim tuyến *Anoectochilus setaceus* là loài dược liệu được sử dụng toàn bộ thân, lá, rễ để bào chế thuốc chữa bệnh và các mục đích hữu dụng khác. Việc sử dụng các loại thuốc hóa học trên làm tăng nguy cơ tồn dư các hoạt

chất hóa học độc hại cho người sử dụng, giảm giá trị của loại lan kim tuyến này trên thị trường khi phát triển thành hàng hóa.

Để phòng chống các loại bệnh hại này người sản xuất thường phải sử dụng nhiều loại thuốc bảo vệ thực vật có nguồn gốc hóa học để giảm thiệt hại về kinh tế, hậu quả là chi phí đầu tư cho sản xuất nhiều mà hiệu quả phòng trừ thấp lại gây ô nhiễm môi trường và ảnh hưởng xấu đến sức khỏe con người. Trước thực trạng đó, kiểm soát sinh học đang được xem như một chiến lược có tiềm năng để quản lý *Phytophthora sp.* trên cây Lan kim tuyến. Kiểm soát sinh học thực chất là nghiên cứu sử dụng các vi sinh vật đối kháng (nấm, vi khuẩn) để sản xuất ra chế phẩm sinh học nhằm phòng chống bệnh và góp phần giảm thiểu sử dụng thuốc hóa học, tạo ra các sản phẩm nông nghiệp an toàn cho sức khỏe cộng đồng và không gây ô nhiễm môi trường. *Pseudomonas sp.* là một loài vi khuẩn đối kháng với tác nhân gây bệnh do nấm *Phytophthora sp.* Đây là loài vi khuẩn có ích, có khả năng cạnh tranh, kìm hãm sự phát triển của nấm *Phytophthora sp.* Và biện pháp phòng trừ sinh học bằng vi khuẩn đối kháng *Pseudomonas* không những có khả năng làm giảm tỷ lệ bệnh mà còn có khả năng kích thích sinh trưởng, phát triển của cây trồng.

1.3. Các nghiên cứu liên quan đến đề tài

1.3.1. Nghiên cứu ngoài nước

Ganesan & Gnanamanickam (1987) đã chỉ ra rằng: biện pháp phòng trừ sinh học sử dụng vi khuẩn đối kháng *Pseudomonas* được xem là biện pháp phòng trừ có nhiều tiềm năng trong phòng trừ bệnh thối trắng hại lạc do nấm *Sclerotium rolfsii*. Sử dụng các chủng vi khuẩn bản địa *Pseudomonas fluorescens* đánh giá khả năng của chúng trong hạn chế bệnh héo rũ gốc mốc trắng lạc do *Sclerotium rolfsii* cho thấy vi khuẩn *Pseudomonas fluorescens* có khả năng ức chế sinh trưởng của sợi nấm *Sclerotium rolfsii* ở điều kiện invitro, giảm khả năng nảy mầm của hạch nấm và giảm tỷ lệ bệnh ở trong điều kiện nhà kính [9].

Kishore & cộng sự (1995), 393 chủng vi khuẩn nội sinh (endophyte) *Pseudomonas* được sử dụng xử lý hạt giống lạc và tưới vào đất để đánh giá khả năng phòng trừ bệnh thối trắng hại lạc *Sclerotium rolfsii*. Trong đó, 12 chủng có khả năng giảm tỉ lệ bệnh cây chết. Và sử dụng 12 chủng này nghiên cứu ở điều kiện invitro cho thấy chúng có khả năng làm giảm sự sinh trưởng của sợi nấm *Sclerotium rolfsii* và hoạt chất của chúng tiết ra có khả năng ức chế enzyme phân hủy vách tế bào của nấm *Sclerotium rolfsii* [10].

Vidhyasekaran (1998) cho biết: *Pseudomonas putida* và vi khuẩn *Pseudomonas fluorescens* là nhóm tác nhân phòng trừ sinh học quan trọng đã phát triển như những

thương phẩm. *Pseudomonas fluorescens* là nhóm vi khuẩn có khả năng phát quang tạo thành nhóm vi khuẩn chủ yếu sống lâu dài trong rễ và thân ngầm của cây trồng. Chúng được ghi nhận là có khả năng kiểm soát các bệnh do nấm, vi khuẩn, vi rút có nguồn gốc từ đất, hạt giống và không khí. Chúng còn được biết đến như những vi khuẩn kích thích sinh trưởng của cây trồng bởi vì chúng xúc tiến cây trồng sinh ra các chất kích thích sinh trưởng như auxin, xytokinyl, gibberellin [11].

Thrane & cộng sự (2000), cho thấy chủng vi khuẩn *Pseudomonas fluorescens* DR54 có khả năng ức chế sinh trưởng và phát triển của sợi nấm *Rhizoctonia solani* gây bệnh chết rạp trên cây củ cải đường. Hạt giống được xử lý với chủng vi khuẩn *Pseudomonas fluorescens* DR54 thì số lượng cây có triệu chứng bệnh chết rạp giảm đáng kể so với đối chứng. Bên cạnh đó bằng phương pháp pha loãng, sử dụng kỹ thuật kháng thể ELISA và kính hiển vi nhóm tác giả phát hiện quần thể chủng vi khuẩn *Pseudomonas fluorescens* DR54 khá cao ở rễ cây củ cải đường có hạt được xử lý vi khuẩn và sự có mặt của chủng vi khuẩn DR45 có ảnh hưởng ức chế sự phát triển sinh khối và hình thành hạch nấm của nấm *Rhizoctonia solani* [12].

Anand & Kulothungan (2010), cho thấy các chủng vi khuẩn *Pseudomonas fluorescens* được phân lập từ rễ cây lạc khỏe và đánh giá khả năng đối kháng của chúng với nấm gây bệnh héo rũ gốc mốc đen *Aspergillus niger*. Kết quả ở điều kiện in vitro cho thấy 5 trong số 60 chủng *Pseudomonas fluorescens* có khả năng đối kháng và có khả năng tạo ra các enzyme phân hủy như protease, lipase và các hợp chất thứ cấp như HCN, salicylic acid. Bên cạnh đó các chủng vi khuẩn *Pseudomonas fluorescens* có khả năng làm giảm tỷ lệ bệnh còn 8,27% trong khi đó đối chứng là 18,77% và năng suất quả khô đạt 1.800,48kg/ha và đối chứng đạt 1.557,14 kg/ha [13].

Ở lĩnh vực phòng trừ sinh học bệnh cây trồng, một số chủng vi khuẩn *Pseudomonas* tạo chất hoạt hóa bề mặt có khả năng phòng trừ hiệu quả nhiều loại bệnh cây trồng như *Pythium aphanidermatum*, *Plasmopara lactucae-radices*, *Phytophthora capsici* và *Collectotrichum orbiculare* [14].

Nghiên cứu của Rini & Sulochana (2006), cũng cho thấy khi kết hợp nấm đối kháng *Trichoderma spp.* và *Pseudomonas fluorescens* cho hiệu quả phòng trừ nấm *Rhizoctonia solani* cao nhất và năng suất/cây cũng cao nhất so với sự kết hợp riêng lẻ trên cây cà chua [15].

1.3.2. Nghiên cứu trong nước

Các chủng vi khuẩn *Pseudomonas putida* được phân lập ở rễ tiêu ở Việt Nam có khả năng hạn chế bệnh chết nhanh do nấm *Phytophthora capsici* ở giai đoạn tiêu vườn ươm và kích thích khả năng sinh trưởng, phát triển và ra rễ của tiêu [14].

Trong số 5 chủng tạo ra chất hoạt dịch *Pseudomonas putida* phân lập được ở Việt Nam có khả năng làm giảm đáng kể tỉ lệ bệnh héo rũ của cây tiêu dâm cảnh ở vườn ươm trồng trong đất nhiễm nấm *Phytophthora capsici*. Và một thí nghiệm khác trồng trong đất không nhiễm nấm *Phytophthora capsici* nhưng cảnh tiêu được xử lý bằng các chủng vi khuẩn *Pseudomonas putida* này thì có khả năng kích thích sinh trưởng phát triển của cây tiêu dâm. Số lượng rễ/cảnh tiêu dâm tăng và chiều dài cảnh tăng so với đối chứng. Kiểm tra trong điều kiện in vitro cho thấy cả 5 chủng vi khuẩn *Pseudomonas putida* có khả năng tạo ra indole acetic axit (IAA) là một chất kích thích sinh trưởng cho cây trồng. Các thí nghiệm tiếp theo với cây dưa chuột và nấm *Phytophthora capsici* cho thấy chủng vi khuẩn *Pseudomonas putida* và chủng *Pseudomonas fluorescens* SS101 có hiệu quả giống nhau trong phòng trừ sinh học bệnh chết rạp do nấm *Phytophthora* gây ra. Tổng hợp những nghiên cứu trên cho thấy tiềm năng *Pseudomonas fluorescens* chứa chất hoạt dịch và các vi khuẩn *Pseudomonas putida* có khả năng tạo ra chất hoạt dịch trong phòng trừ bệnh hại cây. Hai trong số 5 chủng *Pseudomonas* có khả năng phòng trừ bệnh thối đen cổ rễ *Aspergillus niger* trong điều kiện lây bệnh nhân tạo và ngoài đồng ruộng được thực hiện tại Hà Tĩnh tỷ lệ bệnh giảm đáng kể [16].

Cao Ngọc Diệp (2005), nghiên cứu của chủng vi khuẩn nốt rễ và vi khuẩn *Pseudomonas spp.* trên lúa cao sản trồng trên đất phù sa Cần Thơ với kết quả các dòng vi khuẩn hữu hiệu có thể kích thích sự phát triển và gia tăng năng suất lúa cao sản [17].

Trần Thị Thu Hà và cộng sự (2010), nghiên cứu ảnh hưởng của vi khuẩn đối kháng *Pseudomonas* đến bệnh héo rũ gốc mốc đen (*Aspergillus niger*) trên cây lạc và khả năng tồn tại của chúng. Kết quả chủng vi khuẩn *Pseudomonas putida* và chủng tham khảo *Pseudomonas fluorescens* SS101 có khả năng phòng trừ bệnh héo rũ gốc mốc đen *Aspergillus niger* hại lạc và khả năng tồn tại của các chủng vi khuẩn *Pseudomonas* ở rong và ngoài lá, thân và rễ lạc sau gieo 30 ngày là khá cao, đến ngày thứ 45 sau gieo thì có giảm, đặc biệt ở phía trong hầu như không còn tồn tại [18].

Ngô Thanh Phong và cộng sự (2011), đã nghiên cứu hiệu quả cố định đạm sinh học của vi khuẩn *Pseudomonas stutzeri* với cây lúa cao sản trồng trên đất phù sa nông trường sông Hậu, Cần Thơ. Kết quả cho thấy cây lúa có chủng vi khuẩn *Pseudomonas stutzeri* PS4, bổ sung 50%N và 75%N cho các yếu tố cấu thành năng suất và năng suất tương đương với lúa được bón 100%N, không chủng vi khuẩn; lúa chủng vi khuẩn *Pseudomonas stutzeri* PS1 bổ sung 75%N cũng có kết quả tương tự như trên. Như vậy, cả hai dòng vi khuẩn đều có khả năng cố định đạm và thay thế từ 25 -50% nhu cầu đạm cho sự phát triển cây lúa [19].

CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG, NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

- Lan kim tuyến: Loài *Anoectochilus setaceus* Blumn. Giống nuôi cấy mô.
- Chế phẩm *Pseudomonas putida*.
- Nấm *Phytophthora sp.*

2.2. Nội dung nghiên cứu

- Nội dung 1: Đánh giá khả năng sinh trưởng, phát triển của cây Lan kim tuyến ở các công thức thí nghiệm so với đối chứng.
- Nội dung 2: Đánh giá khả năng phòng trị bệnh của chế phẩm sinh học sản xuất từ vi khuẩn *Pseudomonas putida* thông qua các chỉ tiêu đánh giá.
- Nội dung 3: Đề xuất quy trình kỹ thuật phòng trừ bệnh thối nhũn do nấm *Phytophthora sp.* gây hại trên cây Lan kim tuyến bằng chế phẩm sinh học sản xuất từ vi khuẩn *Pseudomonas putida*.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Cách tiếp cận

Để đạt được mục tiêu và nhiệm vụ đặt ra, đề tài sẽ áp dụng các cách tiếp cận sau:

- Tiếp cận khu vực học với yêu cầu liên ngành giữa khoa học nông nghiệp, công nghệ sinh học, vi sinh vật học.... Để từ đó tìm ra những mối liên hệ đối kháng trong phòng trừ bệnh sinh học.
- Tiếp cận lý thuyết về các chủng loại thuộc vi khuẩn *Pseudomonas sp.* Và cơ chế tác động đối kháng đến nấm gây bệnh *Phytophthora sp.*
- Tiếp cận phân tích định tính và xử lý thống kê để xác định hiệu quả nghiên cứu so với đối chứng.
- Tiếp cận theo hướng thực nghiệm, bố trí thí nghiệm theo dõi hiệu quả nghiên cứu so với đối chứng.

2.3.2. Phương pháp nghiên cứu

2.3.2.1 Công thức thí nghiệm

- CT1: Không sử dụng (Đối chứng). Số lượng cây 50 cây.
- CT2: Sử dụng chế phẩm *Pseudomonas sp.* xử lý cây lúc cấy. Sử dụng 1 kg chế phẩm trên diện tích 2,5 m². Số lượng cây 150 cây.

- Nền: Phân chuồng + trấu hun + xơ dừa và đất theo tỷ lệ 2 : 1 : 1 : 3. Vôi (CaCO_3) 2 kg trên $2,5\text{m}^2$.

2.3.2.2 Phương pháp bố trí thí nghiệm.

Thí nghiệm được bố trí theo kiểu ngẫu nhiên (RCD – Randomized Completed Design) với 2 công thức và 1 lần nhắc lại trên nền giá thể chung.

2.3.2.3 Cách lấy mẫu, theo dõi

a. Lấy mẫu đại diện.

- Công thức 1 (Đ/C): chọn 10/50 cây để theo dõi các chỉ tiêu về sinh trưởng, phát triển và bệnh cây. Tỷ lệ mẫu đạt 20%.

- Công thức 2: Chọn 30/150 cây để theo dõi các chỉ tiêu về sinh trưởng, phát triển và bệnh cây. Tỷ lệ mẫu đạt 20%.

Mẫu cây đại diện được lấy ở 5 điểm trên 2 đường chéo. Công thức 1 mỗi điểm 2 cây, công thức 2 mỗi điểm 6 cây. Khi cây đại diện theo dõi bị chết có thể chọn cây khác để theo dõi.

b. Theo dõi các chỉ tiêu

- Chỉ tiêu về sinh trưởng, phát triển: Tiến hành 3 lần đo ở các công thức nghiên cứu, mỗi lần đo cách nhau 30 ngày.

+ Chiều cao cây: sử dụng thước có đơn vị đến mm, đo từ gốc tính từ mặt đất đến đỉnh sinh trưởng của cây. Đơn vị tính là cm.

+ Số lá/cây: đếm số lá trên cây. Đơn vị tính số lá/cây.

+ Chiều dài lá: sử dụng thước có đơn vị đến mm, đo từ gốc lá (điểm tiếp giáp giữa cuống lá và thân chính) đến đỉnh lá. Đơn vị tính là cm.

+ Chiều rộng lá: sử dụng thước có đơn vị đến mm, đo chiều ngang lớn nhất của lá. Đơn vị tính là cm.

- Các chỉ tiêu về bệnh: Tiến hành 3 lần kiểm tra ở các công thức nghiên cứu, mỗi lần đo cách nhau 30 ngày.

+ Tỷ lệ bệnh: Đơn vị tính là %. Đếm số cây đại diện bị bệnh và tính tỷ lệ trung bình mẫu theo công thức:

$$\text{Tỷ lệ bệnh (\%)} = \frac{\text{Số cây bị bệnh}}{\text{Tổng số cây mẫu}} \times 100$$

+ Cấp bệnh: Đơn vị tính là cấp bệnh theo các căn cứ QCVN 01-166:2014/BNNPTNN. Chia làm 5 cấp như sau:

Cấp 1: nhiễm nhẹ, % cây bị bệnh < 5%

Cấp 2: nhiễm vừa, % cây bị bệnh từ 5% - 10%

Cấp 3: nhiễm trung bình, % cây bị bệnh từ 10% - 20%

Cấp 4: nhiễm nặng, % cây bị bệnh từ 20% - 50%

Cấp 5: nhiễm nhẹ, % cây bị bệnh > 50%

+ Chỉ số bệnh: Đơn vị tính là %. Được tính theo công thức sau:

$$\text{Chỉ số bệnh (\%)} = \frac{[(N_1 \times 1) + \dots + (N_n \times n)]}{N \times 9} \times 100$$

Trong đó: N_1 : Số cây bị bệnh ở cấp 1

N_n : Số cây bị bệnh ở cấp n

N: Tổng số cây điều tra

9: Số cấp bệnh cao nhất của thang quy cấp theo QCVN

2.3.2.4 Địa điểm nghiên cứu

Vườn thực nghiệm – cơ sở II Phân hiệu Đại học Đà Nẵng tại Kon Tum, 306 Duy Tân, phường Quang Trung, thành phố Kon Tum, tỉnh Kon Tum.

2.3.2.5 Thời gian nghiên cứu

Từ tháng 12/2020 – 05/2021 (05 tháng)

2.3.2.7. Phương pháp xử lý số liệu

- Số liệu sơ cấp và số liệu thứ cấp được thu thập và xử lý bằng phần mềm Excel.
- Xử lý thống kê bằng phần mềm Excel, SAS.

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Khả năng sinh trưởng, phát triển của cây Lan kim tuyến.

3.1.1. Chiều cao cây

Chiều cao thân chính là một trong những chỉ tiêu quan trọng phản ánh khả năng sinh trưởng phát triển của cây lan kim tuyến. Cây sinh trưởng khỏe mạnh, cân đối là cơ sở cho các bộ phận khác phát triển một cách hợp lý và cũng là tiền đề để nâng cao năng suất cây trồng nói chung và cây lan kim tuyến nói riêng. Chiều cao cây bên cạnh chịu sự chi phối đặc tính di truyền của giống quy định, song nó cũng chịu sự tác động tổng hợp của các yếu tố khác như: điều kiện ngoại cảnh, đất đai, phân bón... Trong đó, phân bón là yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến chiều cao cây. Khi cung cấp đầy đủ, cân đối và hợp lý chất dinh dưỡng cho cây sẽ tạo điều kiện cho cây sinh trưởng và phát triển tốt, đạt được chiều cao tiềm năng của giống. Chiều cao cây được thể hiện qua bảng 3.1:

Bảng 3.1. Chiều cao cây ở các công thức nghiên cứu

ĐVT: cm

Công thức	Lần đo 1	Lần đo 2	Lần đo 3	Tăng trưởng
CT1	5,41 ^b	6,02 ^a	6,59 ^b	1,18 ^a
CT2	5,64 ^a	6,09 ^a	6,70 ^a	1,06 ^a
Trung bình	5,53	6,05	6,65	1,12
LSD_{0,05}	0,16	0,11	0,10	0,14
F_{test}	**	ns	*	ns

Trong cùng một cột, các kí tự giống nhau không có sự khác biệt ý nghĩa thống kê. *: khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức ý nghĩa 0,05; **: khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức ý nghĩa 0,01; ns: khác biệt không có ý nghĩa thống kê (non-significance); LSD (Least Significant Difference): sai số nhỏ nhất có ý nghĩa.

Kết quả bảng 3.1 cho thấy: chiều cao thân chính ở CT2 cao hơn CT1 khác biệt có nghĩa thống kê ở lần đo 1 và 3 với mức ý nghĩa lần lượt là 0,01 và 0,05. Lần đo 2 chiều cao thân chính ở các công thức không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (ns). Tuy nhiên, xét về mức độ tăng trưởng chiều cao thân chính chung qua các lần đo cho thấy, ở CT1 (không sử dụng chế phẩm) cao hơn CT2 (có sử dụng chế phẩm) là 0,12 cm, nhưng khác biệt không có ý nghĩa thống kê với $LSD_{0,05} = 0,14$. Như vậy, việc sử dụng chế phẩm *Pseudomonas putida* đã không ảnh hưởng đến chiều cao cây so với đối chứng, điều này cho thấy chiều cao thân chính của cây Lan kim tuyến phụ thuộc rất lớn vào giống và điều kiện chăm sóc (phân bón, nước tưới...), trong khi đó hai yếu tố này là hai yếu tố nền ở các công thức và không có sự khác biệt.

3.1.2. Số lá trên cây

Số lượng lá nhiều hay ít, diện tích lá lớn hay nhỏ đều chi phối và ảnh hưởng rất lớn đến năng suất cây trồng. Số lá trên cây phụ thuộc vào đặc điểm di truyền của giống, điều kiện ngoại cảnh. Tuy nhiên, bên cạnh đó số lá cũng chịu sự chi phối bởi nguồn dinh dưỡng cung cấp cho cây trồng. Lá là cơ quan quang hợp tổng hợp chất hữu cơ, giúp cây trồng sinh trưởng phát triển. Do đó, số lá trên cây là một chỉ tiêu quan trọng giúp ta có thể đánh giá được khả năng tích lũy chất khô của cây, dựa vào chỉ tiêu này có thể đánh giá được tiềm năng của cây trồng. Vì vậy, việc đáp ứng đầy đủ các điều kiện cần thiết thông qua các biện pháp kỹ thuật như: tưới nước, bón phân, phòng trừ sâu bệnh... để tạo điều kiện thuận lợi nhất cho cây trồng phát triển là điều hết sức cần thiết.

Bảng 3.2. Số lá trên cây ở các công thức nghiên cứu

ĐVT: lá

Công thức	Lần đo 1	Lần đo 2	Lần đo 3	Tăng trưởng
CT1	5,00 ^b	5,60 ^b	5,90 ^a	0,90 ^a
CT2	5,50 ^a	5,83 ^a	6,07 ^a	0,57 ^a
Trung bình	5,25	5,72	5,99	0,74
LSD_{0,05}	0,43	0,21	0,28	0,36
F_{test}	*	*	ns	ns

Trong cùng một cột, các kí tự giống nhau không có sự khác biệt ý nghĩa thống kê. *: khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức ý nghĩa 0.05; **: khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức ý nghĩa 0.01; ns: khác biệt không có ý nghĩa thống kê (non-significance); LSD (Least Significant Difference): sai số nhỏ nhất có ý nghĩa.

Kết quả bảng 3.2 cho thấy: số lá trên thân chính ở CT2 qua các lần đo đều cao hơn so với CT1. Ở lần đo 1 và 2, số lá trên thân chính ở CT2 đều cao hơn CT1 và khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức ý nghĩa 0,05. Tuy nhiên, ở lần đo 3 số lá trên thân chính ở CT2 cao hơn CT1 là 0,17 lá nhưng khác biệt không có ý nghĩa thống kê, với LSD. Mức tăng trưởng bình quân chung qua các lần đo ở các công thức không có sự khác biệt, nhưng ở CT1 mức tăng trưởng số lá cao hơn so với CT2 là 0,33 lá nhưng khác biệt không có ý nghĩa thống kê, với $LSD_{0,05} = 0,36$. Như vậy, số lá trên thân chính cũng như chiều cao cây chủ yếu phụ thuộc chính vào giống và các yếu tố khác.

3.1.3. Chiều dài và chiều rộng lá

Chiều dài và chiều rộng lá là hai chỉ tiêu phản ánh diện tích lá, chiều dài và chiều rộng lá càng cao thì diện tích lá càng lớn, có ý nghĩa trong quá trình quang hợp. Hai chỉ tiêu này phụ thuộc lớn vào đặc tính của giống, bên cạnh đó cũng thay đổi lớn trong điều kiện chăm sóc nhất định. Cây sinh trưởng tốt sẽ là điều kiện để lá phát triển, tăng quá trình quang hợp và sinh khối cây.

Kết quả bảng 3.3 cho thấy: Chiều dài lá ở các công thức qua các lần đo và mức tăng trưởng bình quân chung không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê. Nhưng ở chiều rộng lá có sự khác biệt ở 2 công thức nghiên cứu, cụ thể: ở lần đo 1 và 2 chiều rộng lá ở CT2 cao hơn CT1 lần lượt là 0,22 cm và 0,16 cm khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức ý nghĩa 0,05. Tuy nhiên, tăng trưởng chiều rộng lá bình quân chung qua các lần đo ở CT1 cao hơn CT2 là 0,17 cm và khác biệt có ý nghĩa ở mức ý nghĩa 0,05, với $LSD_{0,05} = 0,15$.

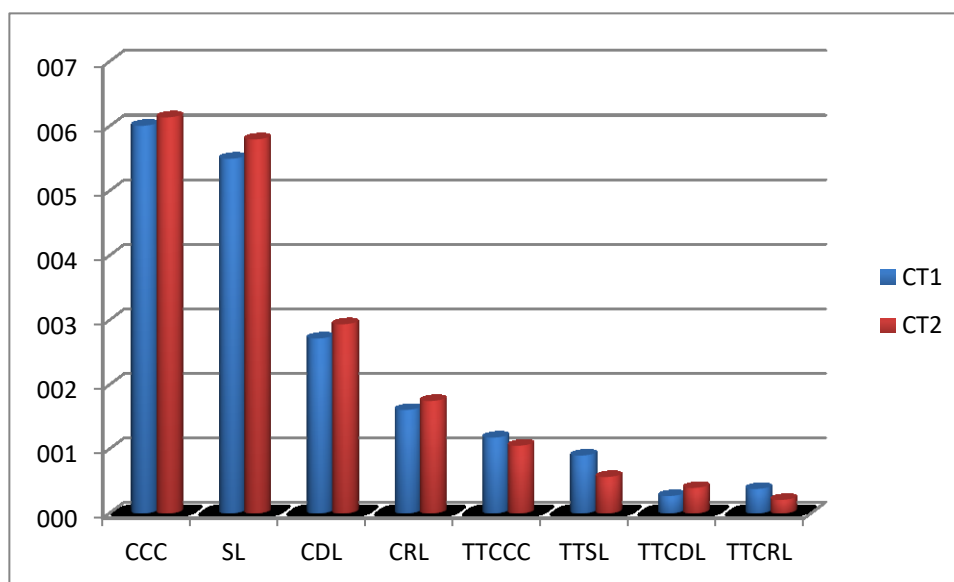
Bảng 3.3. Chiều dài và chiều rộng lá ở các công thức nghiên cứu

ĐVT: cm

Công thức	Chiều dài lá				Chiều rộng lá			
	Lần đo 1	Lần đo 2	Lần đo 3	Tăng trưởng	Lần đo 1	Lần đo 2	Lần đo 3	Tăng trưởng
CT1	2,58 ^a	2,72 ^a	2,85 ^a	0,27 ^a	1,42 ^b	1,61 ^b	1,80 ^a	0,38 ^a
CT2	2,64 ^a	2,77 ^a	2,90 ^a	0,26 ^a	1,64 ^a	1,77 ^a	1,85 ^a	0,21 ^b
Trung bình	2,61	2,75	2,88	0,27	1,53	1,69	1,83	0,30
LSD_{0,05}	0,18	0,21	0,16	0,10	0,21	0,14	0,17	0,15
F_{test}	ns	ns	ns	ns	*	*	ns	*

Trong cùng một cột, các kí tự giống nhau không có sự khác biệt ý nghĩa thống kê. *: khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức ý nghĩa 0.05; **: khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức ý nghĩa 0.01; ns: khác biệt không có ý nghĩa thống kê (non-significance); LSD (Least Significant Difference): sai số nhỏ nhất có ý nghĩa.

3.1.4. Đánh giá sự sinh trưởng ở các công thức nghiên cứu



Hình 3.1. Các chỉ tiêu sinh trưởng ở các công thức

Ghi chú: CCC: Chiều cao cây; SL: Số lá; CDL: Chiều dài lá; CRL: Chiều rộng lá; TTCCC: Tăng trưởng chiều cao cây; TTSL: Tăng trưởng số lá; TTCDL: Tăng trưởng chiều dài lá; TTCRL: Tăng trưởng chiều rộng lá.

Qua hình 3.1 cho thấy: các chỉ tiêu sinh trưởng như chiều cao thân chính, số lá, chiều dài lá và chiều rộng lá trung bình qua các lần đo ở CT2 đều cao hơn so với CT1

(đối chứng), nhưng khác biệt không có ý nghĩa thống kê. Tuy nhiên, về mức độ tăng trưởng về các chỉ tiêu sinh trưởng như tăng trưởng chiều cao cây, số lá và chiều dài lá ở CT2 đều thấp hơn so với CT1 ngoại trừ tăng trưởng về chiều dài lá, tuy nhiên sự khác biệt về mức độ tăng trưởng của các chỉ tiêu sinh trưởng không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các công thức nghiên cứu. Có thể thấy, sử dụng chế phẩm *Pseudomonas putida* đã không có ảnh hưởng đến khả năng sinh trưởng của cây Lan kim tuyến, kết quả cho thấy sự sinh trưởng chủ yếu phụ thuộc vào giống và các điều kiện chăm sóc khác như phân bón, nước tưới...

3.2. Khả năng phòng trị bệnh của chế phẩm sinh học sản xuất từ chủng vi khuẩn *Pseudomonas putida*.

Kon Tum là một tỉnh nằm trong khu vực có điều kiện khí hậu phân chia hai mùa rõ rệt, nên không tránh khỏi đối tượng sâu bệnh phát sinh và gây hại trên các loại cây trồng. Sâu bệnh không những làm tăng chi phí trong quá trình sản xuất, mà còn là nguyên nhân làm giảm khả năng sinh trưởng, phát triển của cây trồng, từ đó ảnh hưởng rất lớn đến năng suất, chất lượng nông sản và giảm hiệu quả kinh tế. Lan kim tuyến là đối tượng ưa ẩm, ưa bóng đây cũng là nguyên nhân phát sinh một số loại nấm bệnh gây hại, trong đó chủ yếu là *Phytophthora sp.* gây bệnh thối thân (thối nhũn).

Sự phát sinh gây hại của từng đối tượng sâu bệnh hại rất phức tạp, liên quan chặt chẽ và chịu ảnh hưởng của điều kiện khí hậu, thời tiết, phương thức canh tác và mỗi giai đoạn sinh trưởng phát triển của cây trồng. Khả năng chống chịu sâu bệnh chủ yếu là do đặc tính di truyền của giống quyết định, tuy nhiên để đảm bảo năng suất thì việc phòng trừ sâu bệnh là chính. Đối với Lan kim tuyến là một loại dược liệu, phương pháp phòng trừ bệnh sinh học được ưu tiên lựa chọn hàng đầu, đảm bảo chất lượng cho sản phẩm.

Bảng 3.4. Tỷ lệ, phân cấp và chỉ số bệnh ở các công thức nghiên cứu

Chỉ tiêu	Đơn vị tính	Lần đo	Công thức 1	Công thức 2
1. Tỷ lệ bệnh	%	1	30,0	33,3
		2	40,0	36,7
		3	50,0	40,0
Trung bình			40,0	36,7
2. Cấp bệnh	Thang phân cấp bệnh	1	0,6	0,6
		2	1,1	1,0
		3	1,6	1,2
Trung bình			1,1	0,9
3. Chỉ số bệnh	%	1	22,2	7,0
		2	30,6	11,1
		3	35,6	13,0
Trung bình			29,9	10,4

Kết quả bảng 3.4 cho thấy: Tỷ lệ bệnh, cấp bệnh và chỉ số bệnh qua các lần đo ở CT2 luôn thấp hơn CT1, cụ thể về tỷ lệ bệnh trung bình là 36,7% thấp hơn CT1 3,3%; cấp bệnh trung bình là 0,9/5 thấp hơn CT1 (1,1/5) là 0,2; chỉ số bệnh trung bình là 10,4% thấp hơn CT1 (29,9%) là 19,5%.

Như vậy, sử dụng chế phẩm *Pseudomonas putida* đã góp phần giảm khả năng gây hại của nấm *Phytophthora sp.* gây bệnh thối nhũn (thối thân) trên cây Lan kim tuyến.

3.3. Quy trình kỹ thuật phòng trừ bệnh thối nhũn do nấm *Phytophthora sp.* gây hại trên cây Lan kim tuyến bằng chế phẩm sinh học sản xuất từ vi khuẩn *Pseudomonas putida*.

Dựa vào kết quả nghiên cứu, nhóm tác giả đề xuất xây dựng quy trình kỹ thuật phòng trị bệnh thối nhũn (thối thân) do nấm *Phytophthora sp.* gây hại trên cây Lan kim tuyến bằng chế phẩm sinh học sản xuất từ vi khuẩn *Pseudomonas putida*.

3.3.1. Quy trình kỹ thuật trồng và chăm sóc Lan kim tuyến bằng chế phẩm sinh học sản xuất từ vi khuẩn đối kháng *Pseudomonas putida*. Phòng trị bệnh thối nhũn do nấm *Phytophthora sp.* gây hại.

3.3.1.1. Chuẩn bị nhà trồng

Cây Lan Kim tuyến là cây chịu bóng, cần ẩm độ cao vì vậy để nâng cao chất lượng và hiệu quả kinh tế chúng ta nên trồng cây Lan Kim tuyến trong nhà có mái che để giảm ánh sáng: Có thể dùng nhà lưới hiện đại, nhà lưới đơn giản hoặc nhà lưới che tạm tùy theo điều kiện canh tác. Vì trồng trong nhà kính hoặc nhà lưới sẽ ngăn cản sự xâm nhập của các loại côn trùng gây hại và giảm thiểu tối đa các yếu tố gây bệnh cho cây. Tuy nhiên việc lựa chọn nhà kính là lựa chọn tối ưu nhất với đối tượng cây này.

Đối với nhà trồng cây Kim tuyến cần chú ý một số điểm sau:

+ Dùng lưới cản quang có độ cản từ 50-70% ánh sáng tán xạ để che phần trên mái và phần xung quanh nhà trồng.

+ Cần lắp đặt hệ thống phun sương trong nhà trồng.

3.3.1.2. Chuẩn bị giá thể

Yêu cầu đối với giá thể trồng cây Lan Kim tuyến: Tơi xốp, thoát nước tốt, giàu dinh dưỡng và không chứa mầm bệnh hại. Vì vậy giá thể dùng để trồng cây Lan Kim tuyến được chúng tôi lựa chọn là lại giá thể gồm: 2/5 xơ dừa + 1/5 đất mặt + 1/5 phân bò + 1/5 trấu hun được ủ với chế phẩm, phụ gia (vôi tôi 1% + tricolor 1% + phân NPK 1% + phân lân 5% + phân vi sinh 1%), sau đó tiến hành phối trộn và ủ 2,5-3 tháng trước khi trồng.

3.3.1.3. Sử dụng chế phẩm *Pseudomonas putida*

Sau khi giá thể được xử lý đảm bảo theo mục 3.3.1.2. Tiến hành trộn giá thể với chế phẩm *Pseudomonas sp.* với tỷ lệ 150 : 1 (150 kg giá thể : 1 kg chế phẩm *Pseudomonas sp.* dạng bột).

3.3.1.4. Tiêu chuẩn cây giống trồng

- Đối với cây ươm bầu: Cây giống khi đưa ra trồng cần đảm bảo tiêu chuẩn sau: Cây đồng đều, to khỏe, chiều cao từ 3,5 - 5cm, số lá thật từ 2 - 4 lá, không bị sâu bệnh.

- Đối với cây giống là cây in vitro cần được huấn luyện ra cây 35 ngày trước khi trồng để đảm bảo tỷ lệ sống cao nhất. Trong đó, huấn luyện cây ngoài vườn ươm 30 ngày.

3.3.1.5. Thời vụ trồng

Thời vụ trồng cây kim tuyến tốt nhất là vào đầu mùa mưa vào khoảng tháng 4-5 hàng năm. Tuy nhiên đối với cây Kim tuyến khi trồng trong nhà màng, chủ động điều khiển được ánh sáng, độ ẩm và nhiệt độ thì việc trồng cây lan kim tuyến có thể trồng quanh năm.

3.3.1.6. Kỹ thuật trồng và chăm sóc

a. Cách vào giá thể

* Đối với trồng trên luống

Chiều rộng luống nên thiết kế khoảng 1-1,2m, chiều dài tùy thuộc vào chiều dài nhà kính để thuận tiện trồng và chăm sóc, sau đó cho giá thể đã được chuẩn bị vào luống với độ dày của giá thể từ 20-25cm.

* Đối với trồng trên khay hoặc chậu

Cần vệ sinh khay, chậu, vỉ xốp bằng xà phòng và khử trùng bằng dung dịch nước vôi pha loãng, sau đó đem phơi nắng để ráo nước mới đưa vào sử dụng.

Cho giá thể đã chuẩn bị sẵn vào khay xốp với độ dày từ 15-20cm.

b. Cách trồng

- Đối với việc trồng cây Kim tuyến trên luống hay trong khay xốp thì mật độ trồng là 5x5cm/cây. Khi trồng dùng tay nén chặt đất vừa phải sao cho thân cây thẳng đứng vuông góc với bề mặt luống trồng.

- Sau khi trồng pha chế phẩm *Pseudomonas putida* với lượng 1 kg/200 lít nước để tưới lại toàn bộ diện tích trồng.

c. Tưới nước

* Tưới nước cho cây không trồng trong nhà kính

- Vào hai tuần đầu mới trồng mỗi ngày cần định kỳ tưới nước 2-3 lần đối với những ngày trời nắng, còn đối với những ngày mưa tưới 1 lần bằng hệ thống phun sương cho ẩm bề mặt luống.

- Vào những ngày tiếp theo cho tới giai đoạn cây trưởng thành ta định kỳ ngày tưới 1-2 lần đối với ngày nắng, ngày mưa tưới 1 lần hoặc không tưới tùy thuộc vào ẩm độ của vườn.

* Tưới nước cho cây trồng trong nhà kính.

- Đối với cây trồng trong nhà kính việc tưới nước cho cây trong hai tuần đầu lúc mới trồng mỗi ngày cần định tưới nước 3-4 lần đối với những ngày trời nắng bằng hệ thống phun sương cho ẩm bề mặt luống, vào những ngày mưa ta không cần tưới vì nhà kính khi mưa nước mưa đã đi qua lưới cản còn trùng bổ sung lượng nước cho vườn.

- Vào những ngày tiếp theo cho tới giai đoạn cây trưởng thành ta định kỳ ngày tưới 1-2 lần đối với ngày nắng, ngày mưa tưới không tưới nước.

d. Bón phân

* Giai đoạn 2 tháng đầu mới trồng

- Giai đoạn trong 32 tháng đầu: Đối với cây Kim tuyến trong 2 tháng đầu mới trồng khả năng cây hấp thụ dinh dưỡng từ giá thể chưa cao vì bộ rễ cây còn yếu, cho nên định kỳ mỗi tuần 1 lần ta sử dụng phân bón lá phun bổ sung qua lá cho cây dễ hấp thụ. Phân bón lá dùng cho giai đoạn này là Atonik hoặc gibber TB nhằm bổ sung dinh dưỡng qua lá và kích thích sự sinh trưởng của rễ, thân, lá với liều dùng (1g Atonik hoặc gibber TB / 1 lít H₂O) phun ướt đẫm toàn thân và lá.

* Giai đoạn sau 2 tháng trồng: Từ tháng thứ 2 trở đi bón phân theo công thức 80N : 40P₂O₅ : 90K₂O định kỳ 1,5 tháng/lần, mỗi lần bón 1/3 lượng phân theo tỷ lệ trên bón bổ sung cho cây.

3.3.1.7. Phòng trừ bệnh thối nhũn (thối thân) do nấm *Phytophthora sp.*

Đối với bệnh thối nhũn (thối thân) thường gây hại trong điều kiện ẩm độ không khí cao, nhiệt độ thấp. Để sử dụng chế phẩm *Pseudomonas putida* phòng trừ có hiệu quả cần phải thực hiện một số biện pháp sau:

- Tưới nước với lượng phù hợp.

- Định kì 01 tháng tưới chế phẩm với lượng 01 kg/ 200 lít nước.

- Nhỏ bỏ hoàn toàn những cây bị bệnh ra khỏi vườn khi phát hiện, ví lan kim tuyến trồng với mật độ dày, khả năng lây lan của bệnh rất nhanh.

* Bên cạnh đó cần những chú ý đến các đối tượng động vật, sâu bệnh gây hại khác trên cây Lan kim tuyến như chuột, sâu khoang, ốc sên, rầy nâu, nhện đỏ, bệnh vàng lá....

3.3.1.8. Thu hoạch và bảo quản

Cây Kim tuyến sau khi trồng từ 1 năm đến 16 tháng có thể thu hoạch tất cả các bộ phận cây. Đối với cây Kim tuyến khi thu hái nên thu hái vào buổi sáng sớm là tốt nhất, khi bề mặt lá và thân đều khô ráo. Tuy nhiên để thu hoạch lan Kim tuyến được hiệu quả cao nhất ta nên thu hoạch khi cây đang có hoa, vào thời này trọng lượng cây đạt là cao nhất.







Cây kim tuyến có thân và lá chứa nhiều nước nên thu hoạch xong cần vận chuyển trong thời gian nhanh nhất (muộn nhất 24 giờ) tránh hao hụt chất lượng cây, mất nước.

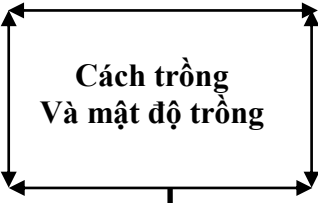
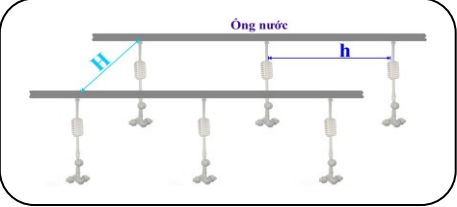

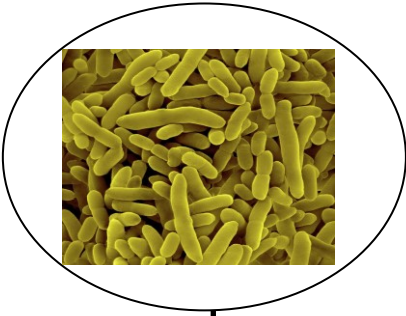

Đối với cây Kim tuyến khi sử dụng có thể dùng dạng tươi hoặc khô, tuy nhiên hiện nay trên thị trường thường dùng sản phẩm tươi là chủ yếu vì vậy đối với mỗi cách ta cần chú ý một số điểm sau.

+ Đối với trường hợp dùng tươi: Sau khi thu hái ta chỉ rửa nhẹ thân cây để làm sạch một phần đất bám trên rễ, không nên rửa vì khi vận chuyển xa có thể làm cho cây bị thối. Còn sử dụng ngay tại chỗ ta tiến hành rửa sạch đất cát bám trên thân lá, hong cây nơi thoáng mát cho ráo nước rồi đưa vào sử dụng như (ngâm rượu, nấu nước uống, dùng rau...)

+ Đối với trường hợp dùng khô: Sau khi thu hái ta tiến hành rửa sạch đất cát bám trên thân lá, hong cây nơi thoáng mát cho khô. Nếu ngày nắng ta có thể phơi khô còn ngày mưa ta có thể sấy khô. Có 2 cách sấy khô (Sấy khô bằng máy sấy thông thường ở 50⁰C hoặc sấy lạnh) tuy nhiên cách sấy lạnh là tốt nhất vì cách sấy này ít làm mất giá trị dinh dưỡng của cây. Sau khi sấy khô ta cho vào bao Nilon và dùng máy hút chân không để hút hết không khí ra khỏi bì đựng Kim tuyến sau đó dập miệng. đối với phương pháp sấy khô ta bảo quản được sản phẩm đi xa và thời gian sử dụng lâu hơn.

3.3.2. Sơ đồ quy trình kỹ thuật

Các bước quy trình	Sơ đồ quy trình	Yêu cầu
1. Chuẩn bị nhà trồng		<ol style="list-style-type: none"> 1. Ánh sáng tán xạ 50-70%. 2. Cần lắp đặt hệ thống tưới phun sương
2. Chuẩn bị giá thể		<ol style="list-style-type: none"> 1. Tơi xốp, thoát nước tốt, giàu dinh dưỡng và không có mầm bệnh. 2. Xơ dừa – đất mặt – phân bò – trấu hun với tỷ lệ 2-1-1-1. Phụ gia vôi (1%), Trichoderma (1%), NPK (1%), lân (1%) và phân hữu cơ vi sinh (1%). 3. Được ủ 2,5 – 3 tháng trước khi trồng.
3. Sử dụng chế phẩm <i>Pseudomonas putida</i>		<p>Tỷ lệ 150 : 1 (150 kg giá thể : 1 kg chế phẩm <i>Pseudomonas putida</i>) dạng bột.</p>
4. Tiêu chuẩn giống cây trồng		<ol style="list-style-type: none"> 1. Cây ươm bầu: Cây đồng đều, to khỏe, chiều cao từ 3,5 – 5 cm, số lá thật từ 2 - 4 lá, không bị sâu bệnh. 2. Cây invitro: Chiều cao 2,5-3,0 cm, số lá thật 2-4 lá, cây không bị sâu bệnh.
5. Thời vụ trồng		<ol style="list-style-type: none"> 1. Đầu mùa mưa (tháng 4-5 hàng năm) 2. Trong điều kiện nhà màng chủ động được các điều kiện có thể trồng quanh năm.
6. Cách vào giá thể		<ol style="list-style-type: none"> 1. Trên luống: Luống rộng 1-1,2 m; độ dày giá thể từ 20-25 cm. 2. Trên khay: khử khuẩn vì bằng vôi loãng, độ dày từ 15-20 cm.

7. Cách trồng và mật độ trồng		<ol style="list-style-type: none"> 1. nén chặt đất vừa phải sao cho thân cây thẳng đứng vuông góc với bề mặt luống trồng. 2. Mật độ trồng 5x5 cm.
8. Tưới nước		<p>Tùy điều kiện thời tiết mà số lần tưới thích hợp, duy trì ẩm độ đất từ 80-85%</p>
9. Bón phân		<ol style="list-style-type: none"> 1. Giai đoạn 2 tháng đầu mới trồng, sử dụng phân bón lá Atonik hoặc Gibber TB với lượng 1g/1 lít H₂O. 2. Từ tháng thứ 2 trở đi: Bón theo công thức 80N + 40P₂O₅ + 90K₂O, bón 1,5 tháng 1 lần, bón 1/3 lượng bón trên/1 lần bón.
9. Phòng trừ bệnh thối nhũn (Thối thân) bằng chế phẩm <i>Pseudomonas putida</i> .		<ol style="list-style-type: none"> 1. Tưới nước với lượng phù hợp. 2. Định kì 01 tháng tưới chế phẩm với lượng 01 kg/ 200 lít nước. 3. Nhổ bỏ hoàn toàn những cây bị bệnh ra khỏi vườn khi phát hiện, ví lan kim tuyến trồng với mật độ dày, khả năng lây lan của bệnh rất nhanh. <p>* Bên cạnh đó cần những chú ý đến các đối tượng động vật, sâu bệnh gây hại khác trên cây Lan kim tuyến như chuột, sâu khoang, ốc sên, rầy nâu, nhện đỏ, bệnh vàng lá....</p>
10. Thu hoạch và bảo quản		<ol style="list-style-type: none"> 1. Sau khi trồng từ 14-18 tháng có thể thu hoạch (tùy điều kiện chăm sóc) 2. Thu hoạch lúc cây có hoa để đạt khối lượng cao nhất. 3. Tùy vào cách dùng có thể bảo quản khác nhau.

Hình 3.2. Sơ đồ quy trình kỹ thuật

CHƯƠNG IV. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

Qua kết quả nghiên cứu, nhóm nghiên cứu rút ra một số kết luận và kiến nghị như sau:

4.1. Kết luận

- 1) Sử dụng chế phẩm *Pseudomonas putida* không có ảnh hưởng đến khả năng sinh trưởng của cây Lan kim tuyến trong điều kiện nghiên cứu. Khả năng sinh trưởng của cây Lan kim tuyến chủ yếu phụ thuộc vào giống và các điều kiện chăm sóc khác như bón phân, tưới nước...
- 2) Khả năng gây hại của nấm *Phytophthora sp.* giảm đáng kể so với đối chứng (không sử dụng) với tỷ lệ bệnh và chỉ số bệnh thấp hơn đối chứng lần lượt là 3,3% và 19,5%.
- 3) Điều kiện thí nghiệm ở quy mô nhỏ (2,5 m²), công thức nghiên cứu ít, chưa thể hiện các lần lặp lại nên mức độ chính xác của nghiên cứu chưa được cao, cần có những nghiên cứu ở quy mô lớn để kết quả nghiên cứu phản ánh chính xác hơn.

4.2. Kiến nghị

- 1) Do điều kiện về kinh phí không đủ lớn nên nghiên cứu chỉ tiến hành ở quy mô nhỏ, kết quả nghiên cứu chưa đạt độ chính xác cao. Cần có những nghiên cứu tiếp theo ở quy mô lớn hơn (tối thiểu 50 m²), công thức nghiên cứu nhiều hơn và số lần lặp lại ít nhất 3 lần. Thí nghiệm nên bố trí theo khối hoàn toàn ngẫu nhiên (RCBD – Randomized Complete Block Design) thay vì bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên (RCD - Randomized Complete Design) để kết quả nghiên cứu chính xác hơn.
- 2) Thực hiện thí nghiệm đối với hai loại giống trồng là giống ươm bầu và giống invitro, so sánh và đánh giá khả năng gây hại của nấm *Phytophthora spp.* trên hai loại đối tượng giống trên để có cơ sở khoa học khuyến cáo sử dụng giống trồng cho các hộ sản xuất.
- 3) Cần có nghiên cứu xác định chủng nấm thuộc *Phytophthora sp.* gây bệnh thối nhũn (thối thân) trên cây Lan kim tuyến để sử dụng chủng vi khuẩn đối kháng thuộc *Pseudomonas sp.* đạt hiệu quả cao nhất.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Bon Trinh Ngoc, "Medicinal Plant, Anoectochilus: Distribution, Ecology, Commercial Value and Use in North Vietnam", *Journal of Pharmaceutical Research International*, 32, 2020, 84-92.
- [2]. Yonzone R., "Current availability status and medicinal uses of Anoectochilus roxburghii (Wall.) Lindl. (Orchidaceae) in Darjeeling Himalaya of West Bengal, India", *Trends in Biosciences*, 10, 2017, 6565-6568.
- [3]. Thuy T.T.H., et al., "In vitro micropropagation of an endangered medicinal orchid (Anoectochilus setaceus Blume) through protocorm-like bodies", *Vietnam Ecology Journal*, 37, 2015, 76-83.
- [4]. Le T.H., et al., "Chemical constituents of essential oils from some Vietnamese plants", *Physics, Chemistry and Technology*, 2015, 16-79.
- [5]. Cattenlla A.J., P.G. Hartel and J.J. Fuhrmann, "Screening for plant growthpromoting rhizobacteria to promote early soybean growth", *Soil. Sci. Soc. Am.*, 63, 1999, 1670-1680.
- [6]. Tý Trần Văn, "NGHIÊN CỨU HIỆU QUẢ SỬ DỤNG PHÂN HỮU CƠ VỚI CHẾ PHẨM TRICHODERMA VÀ PSEUDOMONAS CHO CÂY LẠC TẠI THỪA THIÊN HUẾ", *Luận ôn Tiến sĩ Nụng Nghiệp. Đại Học Huế*, 2018, 133.
- [7]. Austin Bourke P. M., "Emergence of Potato Blight, 1843– 46", *Nature*, 203, 1964, 805-808.
- [8]. Hũa Trần Văn, "101 câu hỏi thường gặp trong sản xuất nụng nghiệp", *Nhà xuất bản Trẻ*, 9, 2001,
- [9]. Ganesan P. and Gnanamanickam S.S., "Biological control of Sclerotium rolfsii sacc. in peanut by inoculation with Pseudomonas fluorescens", *Soil Biology and Biochemistry*, 9, 1987, 35-38.
- [10]. Kishore G.K. and Greeher W.J., "Managemet of stem rot of stem rot of peanuts (Arachis hypogaea) caused by Sclerotium rolfsii with fungicides", *Crop Protection*, 14, 1995, 135-141.
- [11]. P. Vidhyasekaran, "Physiology of disease resistance in plants", *CRC Press, Boca Raton, FL.*, 2, 1998, 127.
- [12]. Thrane C., et al., "Pseudomonas fluorescens DR54 reduces sclerotium formation, biomass development and disease incidence of Rhizoctonia solani causing damping-off in sugar beet", *Microbial ecology*, 42, 2000, 438-445.
- [13]. Anand R. and Kulothungan S., "Antifungal metabolite Pseudomonas fluorescens against crown rot pathogen of Arachis hypogaea", *Annals of Biological Research*, 1, 2010, 199-207.
- [14]. Ha T.T.T, M. Kruijt and J.M. Raaijmakers, "Diversity and activity of biosurfactant-producing Pseudomonas in the rhizosphere of black pepper in Vietnam", *Journal of Applied Microbiology*, 104, 2008, 839-851s.
- [15]. Rini C.R. and K.K. Sulochana, "Usefulness of Trichoderma and Pseudomonas against Rhizoctonia solani and Fusarium oxysporum infecting tomato", *Journal of Tropical Agriculture*, 45, 2007, 21-28.
- [16]. Hà Trần Thị Thu and Phạm Thanh Hòa, "Khả năng đối kháng của nấm Trichoderma với nấm bệnh hại cõy trồng Sclerotium rolfsii Sacc trong điều kiện in vitro", *Tạp chí khoa học, Đại học Huế*, 75, 2012, 49-55.
- [17]. Đìệp Cao Ngọc, "Nghiên cứu của chủng vi khuẩn nốt rỗ và vi khuẩn Pseudomonas spp. trên lỵa cao sản trồng trên đất phự sa Cần Thơ", *Tạp chí nghiên cứu khoa học*, 3, 2005, 1-7.
- [18]. Hà Trần Thị Thu, et al., "Ảnh hưởng của vi khuẩn đối kháng Pseudomonas đến bệnh hợ rữ gốc mốc đen (Aspergillus niger Van Tiegh) trên cõy lạc và khả năng tồn tại của chỳng", *Tạp chí cụng nghờ sinh học*, 8, 2010, 1299-1304.

- [19]. Phong Ngụ Thanh and Cao Ngọc Điệp, "Hiệu quả cố định đạm sinh học của vi khuẩn *Pseudomonas stutzeri* với cây lỵa cao sản trồng trên đất phự sa nụng trườg sụng Hợu, Cần Thợ", *Tạp chớ Nụng nghiờp và Phỏt triẻn nụng thụn*, 2011, 40-44.