

NGHIÊN CỨU ẢNH HƯỞNG CỦA MÔI TRƯỜNG NUÔI CẤY, ẨM ĐỘ ĐẾN SINH TRƯỞNG, PHÁT TRIỂN CỦA NẤM *Pyricularia oryzae*

Effective of Culture Media and Relative Humidity on Infection, Conidiation and Growth of *Pyricularia oryzae*

Phạm Thị Lương^{1*}, Lê Thị Thanh Tâm¹, Lê Thị Phương Thảo¹, Hoàng Thị Nguyệt¹, Nguyễn Văn Chung¹, Nguyễn Doãn Phương¹, Lê Mai Nhất¹, Đặng Cao Cường²

Ngày nhận bài: 09.7.2021

Ngày chấp nhận: 09.8.2021

Abstract

Blast disease caused by *Pyricularia oryzae*. In *in vitro* conditions, *P. oryzae* grow much better on Agar - oat - tomato in comparison with other media. Relative humidity (RH, 85 to 100% at 26°C) has a clear effect on the growth, development, and sporulation of *P. oryzae* on rice leaf tissue. Our results showed that at the relative humidity 85% mycelia did not grow. Mycelia grows fast at RH 97% and 100%. Five days post-inoculation, the appearance of conidiation on rice leaves tissue was observed when RH was $\geq 94\%$, and no conidiation occurred at RH $\leq 91\%$. After 7 days of infection, the density of spores reached $16.8 \times 10^4/\text{ml}$ at RH = 100%.

Keywords: Isolate, blast disease, spore size, *Pyricularia oryzae*, *in vitro*

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Lúa (*Oryza sativa* L.) là cây lương thực lâu đời nhất, phổ biến nhất trên thế giới cũng như ở Việt Nam. Ở Việt Nam, năm 2018 diện tích trồng lúa cả nước 7.570,9 nghìn ha, chiếm > 50% tổng diện tích các loại cây trồng trong cả nước (Tổng cục thống kê, 2019). Trong những năm gần đây Việt Nam đã có nhiều thành tựu trong sản xuất nông nghiệp, nhiều tiến bộ khoa học về giống, cơ cấu sản xuất, biện pháp canh tác... được áp dụng vào sản xuất góp phần quan trọng nâng cao năng suất lúa gạo. Tuy nhiên, do tác động của biến đổi khí hậu cùng với cơ cấu giống giống lúa hiện nay nên tình hình sinh vật gây hại diễn biến phức tạp đe dọa đến năng suất và sản lượng lúa gạo. Trong đó bệnh đạo ôn (*Pyricularia oryzae/Magnaporthe oryzae*) là một trong những bệnh hại có ý nghĩa kinh tế lớn nhất ở các vùng trồng lúa ở Việt Nam. Theo ước tính của FAO, thiệt hại do bệnh đạo ôn gây ra làm giảm năng suất lúa trung bình từ 0,7 – 17,5%, những nơi

thiệt hại nặng có thể làm giảm đến 80% (Nguyễn Thị Phong Lan và ctv., 2012). Nguồn nấm bệnh đạo ôn rất phong phú, trong điều kiện tự nhiên quần thể nấm này luôn thay đổi do quá trình đột biến, lai tạo và sự di chuyển của nấm từ vùng này sang vùng khác. Kết quả ghi nhận được trên đồng ruộng gieo trồng một loại giống lúa chủ lực nhiều năm liền sẽ là nguyên nhân dẫn đến sự sụp đổ nhanh chóng tính kháng của giống (Hà Minh Trung và ctv, 2000). Trong điều kiện *in vitro* môi trường nuôi cấy cũng ảnh hưởng đến sự phát triển của nấm, khả năng sử dụng carbon trong các hợp chất thay đổi tùy theo chủng nấm, một số báo cáo về sự hình thành bào tử của nấm đạo ôn cho thấy số lượng bào tử được hình thành bởi mỗi dòng phân lập của nấm đạo ôn là kết quả của số lượng conidiophore được hình thành trên thảm sợi nấm (Kalpana *et al.*, 2019). Số lượng bào tử được tạo ra trên sợi nấm khác nhau với vùng sợi có tuổi khác nhau. Sự hình thành bào tử của nấm *Magnaporthe oryzae* phát triển thuận lợi trên môi trường tự nhiên hơn là trên môi trường tổng hợp tuy nhiên sự sinh sản của nấm phụ thuộc dựa trên số lượng phát triển sinh dưỡng của sợi nấm (Gad M *et al.*, 2011).

1. Viện Bảo vệ thực vật;

2. Tập đoàn Thai Binh Seed

* Corresponding author: luong3tb@gmail.com

Diễn biến của bệnh đạo ôn thay đổi ở các vị trí và thời điểm khác nhau, phụ thuộc chủ yếu vào điều kiện thời tiết, trong đó độ ẩm có ảnh hưởng mật thiết đến sự phát sinh phát triển của nấm và số lượng bào tử được hình thành. Để kiểm chứng rõ hơn chúng tôi tiến hành thí nghiệm: Nghiên cứu ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy, ẩm độ đến sinh trưởng, phát triển của nấm *Pyricularia oryzae*.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Vật liệu nghiên cứu

Các mẫu nấm bệnh đạo ôn cổ bông được thu thập tại một số tỉnh đại diện cho 5/7 vùng sinh thái ở Việt Nam: Đồng bằng sông Hồng (Thái Bình, isolate TB 1.3), Bắc Trung Bộ (Thừa Thiên Huế, isolate H 1.2), Duyên Hải Nam Trung Bộ (Bình Thuận, isolate BT 2.1), Tây Nguyên (Gia Lai, isolate GL 2.1), Đông Nam Bộ (Vũng Tàu, isolate VT1.1). Các mẫu bệnh được phân lập, làm thuần, lưu giữ theo phương pháp của Hà Minh Trung và ctv (2000).

Giống lúa thí nghiệm: BT7

Môi trường dùng để phân lập và nuôi cấy nấm *P. oryzae*: thạch - yến mạch, thạch - yến mạch - cà chua, thạch - cám gạo, thạch - cám gạo - cà chua, thạch - cám gạo bổ sung cao nấm men 2,5g và 5g.

Các hóa chất, dụng cụ dùng để khử trùng, quan sát nấm, gieo hạt...

Thời gian thực hiện thí nghiệm: 8/2020 – 5/2021.

Địa điểm thực hiện: Bộ môn Bệnh cây & Miễn dịch thực vật – Viện Bảo vệ thực vật.

2.2 Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy

Lấy 5mm tản nấm *P. oryzae* sau khi đã được phân lập, làm thuần bằng phương pháp cấy đơn bào tử cấy lên các môi trường thử nghiệm. Quan sát đặc điểm hình thái của các 5 isolates *P. oryzae* trên các môi trường đã nuôi cấy sau 12 ngày.

2.2.2. Nghiên cứu ảnh hưởng của độ ẩm đến sự phát sinh phát triển của *P. oryzae*

Chuẩn bị buồng độ ẩm: Sự ảnh hưởng của độ ẩm đối với sự phát triển của bệnh đạo ôn lúa được nghiên cứu bằng cách sử dụng buồng kiểm soát độ ẩm mini theo phương pháp của Dufault *et al.* (2006). Đĩa thủy tinh được sấy khử trùng 2 lần ở 181° trong 3h. Giá đỡ bằng nhựa được khử trùng trong dung dịch NaOCl 0,5% trong 10 phút sau đó rửa sạch lại bằng nước cất vô trùng và để khô trong không khí. Giấy lọc được cắt theo hình dấu cộng và hấp khử trùng ở 121°C, 1.5atm trong 25 phút, dung dịch glycerol được bổ sung vào nước cất vô trùng với tỷ lệ khác nhau để tạo ra độ ẩm từ 85%, 88%, 91%, 94%, 97% và 100% (Dhingra & Sinclair, 1985). Bổ sung 150ml dung dịch glycerol – nước trên vào các buồng độ ẩm mini. Các phiến lá lúa được đặt trên các giấy thấm, 4 đầu của giấy thấm được nhúng vào trong dung dịch.

Nghiên cứu ảnh hưởng của độ ẩm đến sự phát triển của bệnh được thực hiện theo phương pháp của (Li, 2014). Lấy dung dịch bào tử (1×10^6 /ml) nhỏ giọt trên một đoạn 6cm của lá lúa ở giai đoạn làm đòng. Các lá lúa được khử trùng bằng dung dịch NaOCl 0,5% trong 2 phút và rửa sạch lại 03 lần bằng nước cất vô trùng. Mỗi buồng độ ẩm được nhắc lại 3 lần, đặt 6 đoạn lá lúa/1lần nhắc. Buồng độ ẩm được bao bằng parafilm và đặt ở nhiệt độ phòng 26°C, 12h sáng, 12h tối xen kẽ. Quan sát quá trình phát triển của nấm *P. oryzae*, triệu chứng bệnh trên lá sau 7 ngày lây nhiễm. Tính mật độ bào tử nấm *P. oryzae* trên các đoạn lá ở các độ ẩm thử nghiệm bằng cách mỗi độ ẩm lấy ngẫu nhiên 3 đoạn lá lúa cho vào tube chứa 1ml dung dịch nước cất vô trùng vortex trong khoảng 2 phút, đếm số lượng bào tử thu được.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1 Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến phát triển của nấm *P. oryzae*

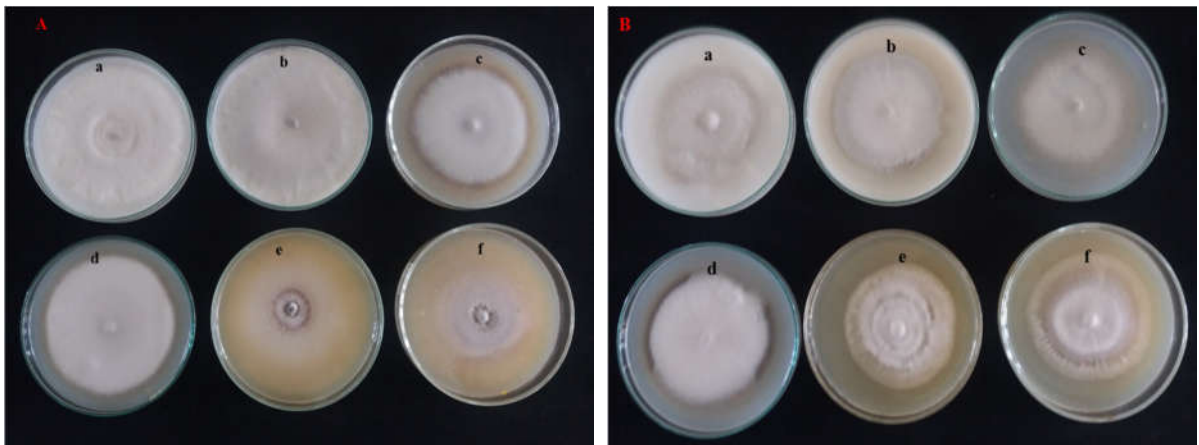
Môi trường nuôi cấy khác nhau có ảnh hưởng đến sự phát triển của nấm *P. oryzae* là khác nhau, đã có nhiều kết quả nghiên cứu trong và ngoài nước về môi trường nuôi cấy nấm

P. oryzae. Từ những năm 1991-1995 Bộ môn Bệnh cây – Viện Bảo vệ thực vật đã tìm ra được môi trường thạch - cám gạo là loại môi trường rẻ tiền nhưng lại rất thích hợp cho việc nhân nuôi bào tử nấm *P.oryzae*. Cho đến nay môi trường cám gạo – thạch cũng đang được sử dụng rộng rãi trong việc nhân nuôi nguồn nấm *P.oryzae*. Tuy nhiên sự hình thành, phát triển bào tử nấm *P.oryzae* phụ thuộc vào chất lượng của cám gạo được sử dụng. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi trên 6 môi trường được thử nghiệm (Bảng 1) cho thấy các chủng nấm khác nhau thì tốc độ phát triển sợi nấm khác nhau, hình thái tản nấm trên các môi là trường khác nhau (Hình 1&2). Môi trường thạch - yến mạch - cà chua cả năm chủng nấm *P. oryzae* đều phát triển tốt nhất. Kích thước tản nấm dao động từ 7,13 - 8,63cm ở môi trường thạch - yến mạch - cà chua, môi trường thạch - yến mạch 6,57-8,5 cm và môi trường thạch - cám gạo - cà chua là 6,83-8,17 cm. Trên môi trường tự nhiên thạch - cám gạo sợi nấm phát triển tốt hơn trên môi trường thạch - cám gạo có bổ sung cao nấm men, đặc biệt trên môi trường cám gạo bổ sung cao nấm men lớp sợi nấm khí sinh hầu

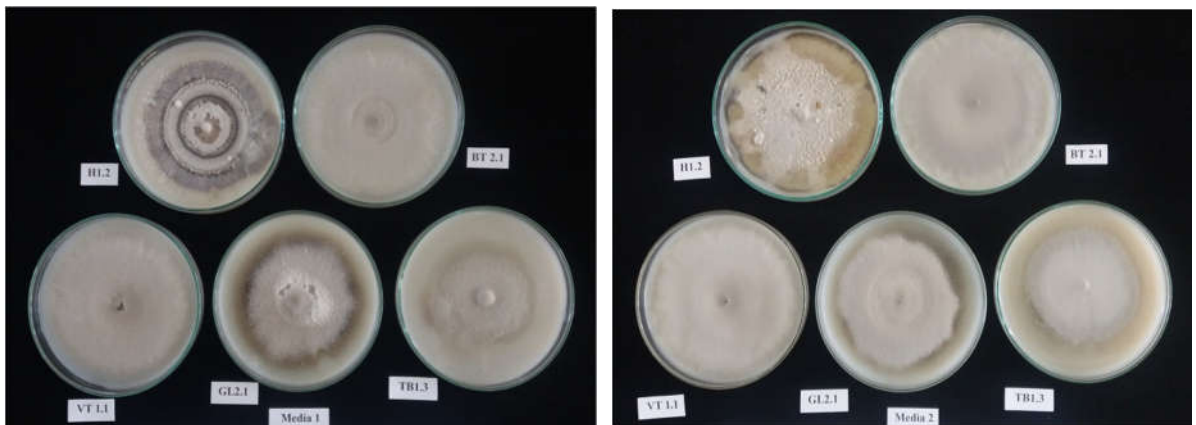
như không có hoặc có ít, không có sự xuất hiện của bào tử nấm. Kết quả này phù hợp với kết quả nghiên cứu của Gad M. *et al.*, (2011), sự hình thành bào tử của nấm *Magnaporthe oryzae* phát triển thuận lợi trên môi trường tự nhiên hơn là trên môi trường tổng hợp. Kết quả nghiên cứu trình bày trong bài báo này chúng tôi chỉ xét đến khía cạnh ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến sự phát triển của sợi nấm, trong một thử nghiệm khác (không trích dẫn số liệu trong bài báo này) về khả năng hình thành bào tử nấm *P. Oryzae* cho thấy sự hình thành bào tử nấm trên môi trường thạch - cám gạo tương đương với môi trường thạch - yến mạch - cà chua khi chúng tôi tác động vào bề mặt sợi nấm và để dưới ánh sáng từ 3 -5 ngày. Như vậy bệnh cạnh môi trường quen thuộc thạch - cám gạo đã sử dụng có thể lựa chọn môi trường thạch - yến mạch - cà chua để nhân nuôi nguồn nấm *P. Oryzae*. Chủng H1.2 phát triển mạnh nhất trong năm chủng nấm *P. Oryzae* thử nghiệm nên được chọn sử dụng cho thí nghiệm ảnh hưởng của độ ẩm đến sự phát triển, hình thành bào tử. Hình dạng bào tử nấm được minh họa ở hình 3.

Bảng 1. Đường kính tản nấm (cm) sau 12 ngày nuôi cấy của một số chủng *P. oryzae* trên các môi trường nuôi cấy khác nhau

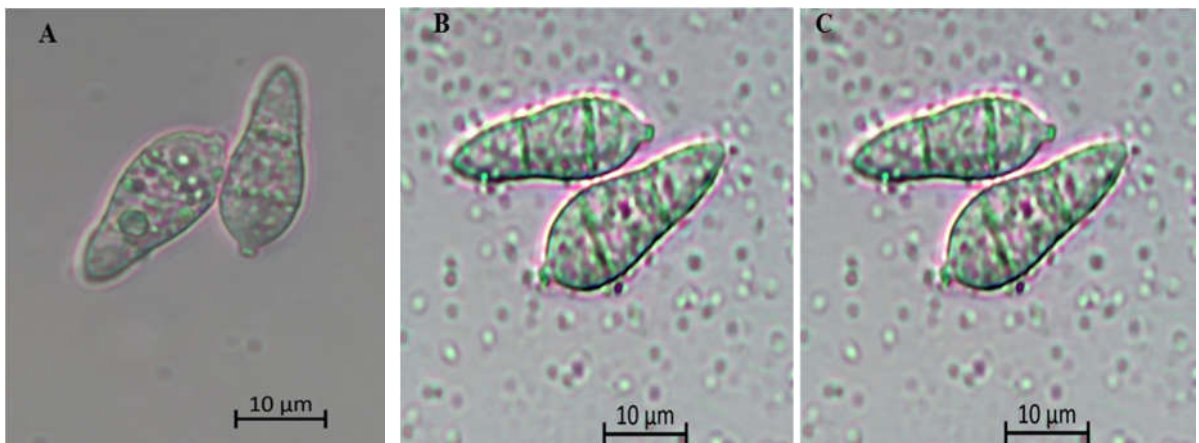
STT	Chủng nấm					
	Môi trường	TB1.3	H1.2	BT 2.1	GL2.1	VT1.1
1	Thạch - Yến mạch	6,57 ^b	8,43 ^b	8,50 ^a	8,2 ^{ab}	7,53 ^b
2	Thạch - Yến mạch - cà chua	7,13 ^a	8,63 ^a	8,57 ^a	8,5 ^a	8,0 ^a
3	Thạch - Cám gạo	6,53 ^b	7,90 ^c	7,50 ^b	7,9 ^b	7,4 ^b
4	Thạch - Cám gạo - cà chua	6, 83 ^b	8,17 ^{ab}	7,97 ^b	8,1 ^b	7,83 ^a
5	Thạch - Cám gạo - 2,5g cao nấm men	5,27 ^c	6,80 ^d	6,30 ^c	6,03 ^c	6,43 ^c
6	Thạch - Cám gạo - 5g cao nấm men	5,27 ^c	6,90 ^d	6,40 ^c	6,23 ^c	6,60 ^c
	LSD _{5%}	0,40	0,30	0,29	0,31	0,26
	CV (%)	3,6	2,2	2,1	2,4	2,0



Hình 1. Đặc điểm hình thái của nấm *Pyricularia oryzae* trên các môi trường nuôi cấy (A) isolate BT2.1, (B) isolate TB1.3; a thạch - yến mạch, b thạch - yến mạch - cà chua, c thạch - cám gạo, d thạch - cám gạo - cà chua, e-f thạch - cám gạo bổ sung cao nấm men 2,5g và 5g



Hình 2. Đặc điểm hình thái tản nấm của các chủng *Pyricularia oryzae* khác nhau trên môi trường thạch - yến mạch và thạch - yến mạch - cà chua





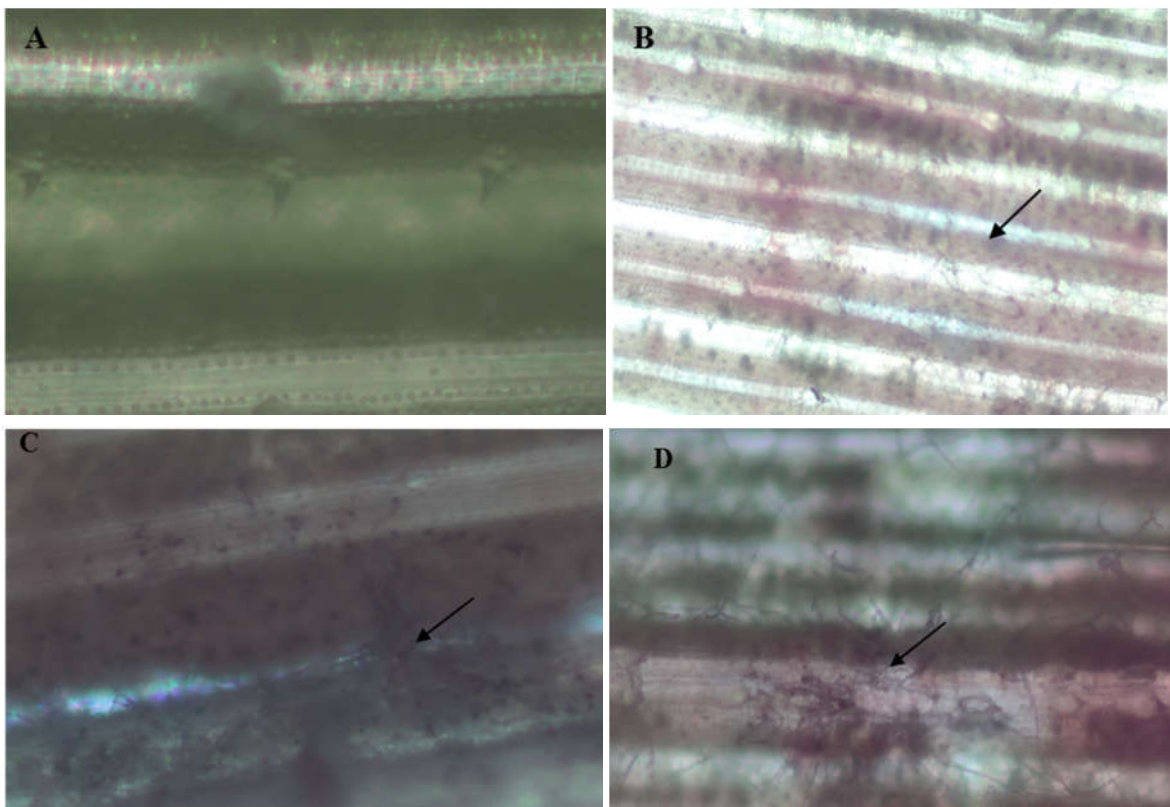
Hình 3. Hình thái bào tử của một số chủng nấm *Pyricularia oryzae*.
(A) isolate BT 2.1, **(B)** isolate GL2.1, **(C)** isolate VT 1.1, **(D)** isolate TB1.3, **(E)** isolate H1.2

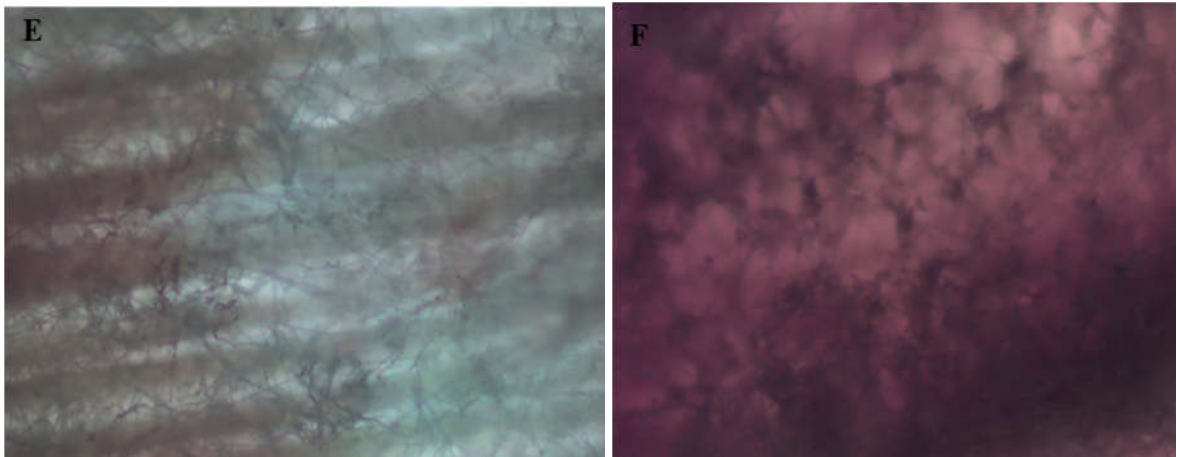
3.2 Ảnh hưởng của độ ẩm đến sự phát triển của nấm *Pyricularia oryzae*

3.2.1. Ảnh hưởng của độ ẩm đến sự phát triển của sợi nấm trên mô lá lúa

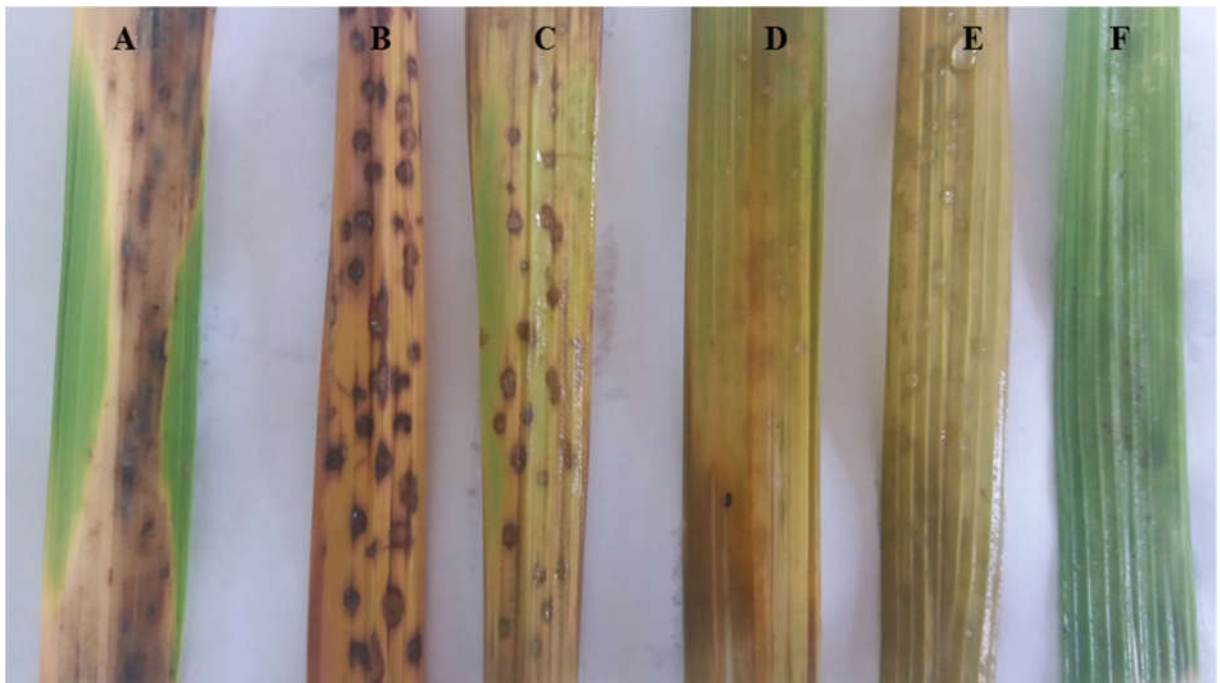
Quan sát dưới kính hiển vi các mô lá lúa cho thấy có sự phát triển khác nhau của sợi nấm *P. oryzae* ở độ ẩm 85% đến 100% (khoảng cách độ ẩm thử nghiệm 3%) sau 7

ngày lây nhiễm. Đánh giá trực quan mô lá quan sát được cho thấy sự phát triển, xâm nhiễm của sợi nấm có liên quan mật thiết đến độ ẩm, ở độ ẩm 85% không có sự phát triển của sợi nấm vào mô lá, độ ẩm 88% chỉ có một vài sợi nấm được hình thành, đến độ ẩm 97% và 100% sợi nấm phát triển dày đặc trên các mô lá (Hình 4).





Hình 4. Ảnh hưởng của độ ẩm đến sự xâm nhiễm, phát triển của nấm *P. oryzae* trên mô lá lúa sau 7 ngày lây nhiễm. (A) độ ẩm 85%, (B) độ ẩm 88%, (C) độ ẩm 91%, (D) độ ẩm 94%, (E) độ ẩm 97% và (F) độ ẩm 100%.



Hình 5. Triệu chứng vết bệnh trên lá lúa sau 7 ngày lây nhiễm.

A độ ẩm 100%, B độ ẩm 97%, C độ ẩm 94%, D độ ẩm 91%, E độ ẩm 88% và F độ ẩm 85%.

3.2.2. Ảnh hưởng của độ ẩm đến sự hình thành bào tử nấm *Pyricularia oryzae*

Không nghi nhận thấy sự xuất hiện của bào tử nấm *P. Oryzae* ở độ ẩm 85%, 88%,

91% trong suốt quá trình theo dõi thí nghiệm. Sau 5 ngày bắt đầu nghi nhận thấy sự xuất hiện bào tử trên các mô lá ở độ ẩm 94%, 97% và 100%, đến 7 ngày số lượng bào tử tăng

dần ở mỗi độ ẩm. Ngày thứ 7 sau lây nhiễm mật độ bào tử ở độ ẩm 94% là $1,2 \times 10^3$ /ml, 97% là $4,5 \times 10^4$ /ml và ở độ ẩm 100% là $16,8 \times 10^4$ /ml. Kết quả này phù hợp với kết quả nghiên cứu của C.M.Leach (1979), trong điều kiện có kiểm soát sự giải phóng bào tử nấm *P.oryzae* lớn nhất khi độ ẩm gần đạt đến độ bão hòa. Kết quả nghiên cứu của M.Castejón-Muñoz (2008) cũng chỉ ra rằng nhiệt độ, độ ẩm tương đối ảnh hưởng đến nồng độ bào tử nấm *P.oryzae* trong không khí và sự phát triển của bệnh đạo ôn. Độ ẩm tương đối 95% và nhiệt độ trung bình $26^\circ - 27^\circ\text{C}$ là điều kiện tối ưu cho sự lây nhiễm và giải phóng bào tử nấm ở ngoài đồng ruộng.

4. KẾT LUẬN

Môi trường thạch - yến mạch - cà chua là một trong những trường nuôi cấy phù hợp đối với nấm *P. oryzae*

Độ ẩm có sự ảnh hưởng mật thiết đến sự phát triển của sợi nấm trên mô lá lúa. Ở độ ẩm 85% sợi nấm không phát triển, sợi nấm phát triển mạnh mẽ ở độ ẩm 97% và 100%. Sau 5 ngày lây nhiễm bắt đầu nhận sự xuất hiện của các bào tử nấm trên mô lá lúa ở độ ẩm $\geq 94\%$, ở độ ẩm $\leq 91\%$ không ghi nhận sự xuất hiện của bào tử nấm *P. oryzae*. Mật độ bào tử ở độ ẩm 100% sau 7 ngày lây nhiễm là $16,8 \times 10^4$ /ml.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Viện Bảo vệ thực vật 50 năm xây dựng và phát triển 1968-2018. Nhà xuất bản Lao Động - 2018.

2. Hà Minh Trung, Ngô Vĩnh Viễn và ctv., 2000. *Kết quả nghiên cứu bệnh đạo ôn hại lúa ở các tỉnh ven biển Miền trung và Đồng bằng bắc*

bộ 1996-1997. Tuyển tập công trình nghiên cứu bảo vệ thực vật 1996-2000. Nhà xuất bản Nông Nghiệp -2000.

3. Nguyễn Thị Phong Lan và CTV, 2012. *Nghiên cứu các giải pháp quản lý bền vững bệnh đạo ôn hại lúa vùng Đồng bằng sông Cửu Long*. Hội thảo Quốc gia về Khoa học cây trồng lần thứ hai.

4. Castejón-Muñoz M., 2008. The effect of temperature and relative humidity on the airborne concentration of *Pyricularia oryzae* spores and the development of rice blast in southern Spain. *Spanish Journal of Agricultural Research* 6(1), 61-69. ISS: 1695-971-X

5. Dufault, N. S., et al., 2006. Role of temperature and moisture in the production and maturation of *Gibberella zeae* perithecia. *Plant Disease*, 90(5), 637-644.

6. Gad Mohamed, D. K., 2011. Studies on growth and sporulation of blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *JASS*, Vol 52, No. 2.

7. Kalpana K.R., & Peshwe, D. S., 2019. Comparative study of growth and sporulation of *Magnaporthe oryzae* using different media formulations. *International Journal of scientific & Technology research* volume 8, 2277-8616.

8. Leach.C.M, 1980. Influence of humidity, red-infrared radiation, and vibration on spore discharge by *Pyricularia oryzae*. *Phytopathology* 70:201-205.

9. Li, Y. Uddin, W., & Kaminski, J., 2014. Effects of relative humidity on infection, colonization and conidiation of *Magnaporthe oryzae* on perennial ryegrass. *Plant Pathology*, 63, 590-597.

10. Dhingra OD & Sinclair J.B, 1985. Basic plant pathology methods. *CRC press*.

Phản biện: TS. Ngô Vĩnh Viễn