

ẢNH HƯỞNG CỦA VI SINH VẬT NỘI SINH CÂY THÔNG NHỰA (*Pinus merkusii*) ĐẾN MỘT SỐ TẬP TÍNH CỦA SÂU RÓM THÔNG (*Dendrolimus punctatus*)

Đào Ngọc Quang, Đặng Như Quỳnh

Trung tâm Nghiên cứu Bảo vệ rừng, Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam

TÓM TẮT

Từ khóa: Cây kháng, cây mẫn cảm, sâu róm thông (SRT), Thông nhựa, vi sinh vật nội sinh (VSVNS)

Kết quả phân lập vi sinh vật nội sinh của 45 mẫu lá Thông nhựa cho thấy phân lập được 15 chủng nấm và 19 chủng vi khuẩn. Có sự khác biệt rõ ràng về thành phần và mật độ vi sinh vật giữa cây kháng và cây mẫn cảm: Ở cây kháng thành phần, chủng loại vi sinh vật nội sinh đa dạng hơn, có 8 chủng nấm và 13 chủng khuẩn chỉ xuất hiện ở các cây kháng, ở cây mẫn cảm chỉ có 3 chủng nấm và 3 chủng khuẩn, còn lại có 4 chủng nấm và 3 chủng khuẩn xuất hiện ở cả hai loại cây. Không những vậy, mật độ vi khuẩn ở cây kháng cũng cao hơn hẳn so với cây mẫn cảm (ở cây kháng mật độ vi khuẩn cao nhất là $8,6 \times 10^8$ CFU/gam, thấp nhất là $3,7 \times 10^5$ CFU/gam, trong khi đó ở cây mẫn cảm mật độ cao nhất là $1,3 \times 10^5$ CFU/gam và thấp nhất là $4,3 \times 10^4$ CFU/gam). Kết quả nuôi sâu róm thông bằng lá được phun dung dịch chứa các chủng VSVNS (NT1, NT7, KT1, KT8, KT10, KT12) phân lập được ở lá những cây kháng cho thấy VSVNS có thể làm tăng, kích thích khả năng kháng sâu róm thông của Thông nhựa thông qua hoạt động sản sinh các thành phần hóa học độc đối với sâu hại hoặc ngăn cản sự tấn công của sâu hại, hoặc xua đuổi sâu hại.

Effects of microorganisms in *Pinus merkusii* on the behaviour of *Dendrolimus punctatus*

Key words: *Dendrolimus punctatus*, endophytic microorganisms, *Pinus merkusii*, resistant plant, susceptible plant

From 45 samples of *Pinus merkusii* needle (30 plants resistant and 15 plants susceptible to *Dendrolimus punctatus*), isolated 15 endophytic fungi strains and 19 endophytic bacteria strains. There are clear differences in the composition and density of endophytic microorganisms between resistant and susceptible host plants. In resistant plants, more diverse endophytic microorganisms composition, with 8 endophytic fungi and 13 endophytic bacteria strains appear only in the resistant plants, only 3 endophytic fungi and 3 endophytic bacteria strains appear only in the susceptible plants, the remaining 4 endophytic fungi and 3 endophytic bacteria strains appear in both host plants. Moreover, the density of endophytic bacteria in resistant plants is much higher than in susceptible plants (highest and lowest density of endophytic bacteria in resistant plants is 8.6×10^8 CFU/g and 3.7×10^5 CFU/g, respectively; whereas in susceptible plants the highest density is only 1.3×10^5 CFU/g). Results about rearing the *D. punctatus* by *P. merkusii* needle were sprayed with a solution containing endophytic microorganism strains (NT1, NT7, KT1, KT8, KT10, KT12) isolated from the resistant plants showed that these strains may increase resistance in *P. merkusii* to *D. punctatus* through activity produces toxic chemical ingredients for or repel or prevent the attack of *D. punctatus*.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Xu hướng chọn giống kháng sâu bệnh đang là biện pháp được quan tâm nghiên cứu phát triển ở nhiều nước trên thế giới. Trong lĩnh vực lâm nghiệp việc tuyển chọn và nhân giống Thông nhựa (*Pinus merkussi*) kháng sâu róm thông (*Dendrolimus punctatus*) là một nghiên cứu tiên phong trong ngành nhằm tìm ra giải pháp hữu hiệu góp phần tăng năng suất sản lượng của Thông nhựa và hạn chế dịch sâu róm thông diễn biến phức tạp hàng năm. Trong cùng một khu vực bị dịch hại có những cây không bị sâu ăn (cây kháng) và những cây bị sâu phá hại nghiêm trọng (cây mẫn cảm). Qua điều tra, khảo sát, đánh giá tình hình dịch hại của sâu róm thông, kết hợp với kết quả nuôi sâu trong phòng thí nghiệm, nghiên cứu phân tích sinh hóa thành phần các hợp chất có trong lá của các cây Thông nhựa kháng và mẫn cảm với sâu róm thông, nghiên cứu đã tuyển chọn được 30 cá thể Thông nhựa tại 3 địa điểm nghiên cứu (Thanh Hóa, Nghệ An và Hà Tĩnh) kháng sâu róm thông và sản lượng nhựa vượt trội so với lâm phần (gấp 200 - 300% lần so với những cây mẫn cảm). Bước đầu đã xác định được tính kháng sâu róm thông của các cá thể Thông nhựa kháng: Tính không ưa thích và Tính kháng kháng sinh. Nói một cách cụ thể với sâu róm thông cây kháng như là một loại thức ăn không ngon, không hấp dẫn thậm chí có mùi vị làm sâu khó chịu. Ngược lại cây mẫn cảm lại có khả năng thu hút và hấp dẫn côn trùng hơn. Lý do tại sao?

Ngoài ra còn một lý do cũng rất quan trọng đó là trong cây kháng và cây mẫn cảm chứa các loại vi sinh vật nội sinh có khả năng sản sinh ra một số hợp chất có thể xua đuổi hay hấp dẫn sâu róm thông. Vì vi khuẩn nội sinh có thể xâm nhập vào các mô xuyên qua khí khổng hay các vị trí bị tổn thương của lá (Roos và Hattingh, 1983), vi khuẩn nội sinh

trải qua phần lớn vòng đời trong cây trồng (Quispel, 1992). Sau khi xâm nhập vào cây chủ, các vi khuẩn nội sinh có thể tập trung tại vị trí xâm nhập hay phát tán khắp nơi trong cây đến các tế bào bên trong, đi vào các khoảng trống gian bào hay vào trong hệ mạch (Zinniel *et al.*, 2002). Mật độ của quần thể vi khuẩn nội sinh rất biến thiên, phụ thuộc chủ yếu vào loài vi khuẩn và kiểu di truyền của cây chủ; nhưng cũng phụ thuộc vào giai đoạn phát triển của cây chủ và các điều kiện môi trường (Pillay và Nowak, 1997; Tan *et al.*, 2003). Một số nhóm vi khuẩn nội sinh không gây hại hay gây bệnh cho cây chủ, mà trái lại chúng có thể thúc đẩy sự phát triển của cây trồng bằng cách sản xuất các chất kích thích sự sinh trưởng thực vật và sự cố định đạm từ không khí (Sturz *et al.*, 2000). Hơn nữa, một số dòng vi khuẩn nội sinh có thể cải thiện sự phát triển bệnh (Benhamou *et al.*, 1996) và kích thích sự chống chịu của cây trồng đối với sự tác động của các nhân tố vô sinh và hữu sinh (Hallmann *et al.*, 1997).

Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng vi khuẩn nội sinh có khả năng kiểm soát được mầm bệnh trên thực vật (Sturz và Matheson, 1996; Duijff *et al.*, 1997; Krishnamurthy và Gnanamanickam, 1997), ở côn trùng (Azevedo *et al.*, 2000.) và cả ở tuyến trùng (Hallmann *et al.*, 1997, 1998). Trong một số trường hợp chúng có thể đẩy mạnh tốc độ nảy mầm của hạt, thúc đẩy sự hình thành cây con trong điều kiện bất lợi (Chanway, 1997) và nâng cao khả năng tăng trưởng của thực vật (Bent và Chanway, 1998).

Để làm rõ hơn tính kháng sâu róm thông của những cá thể Thông nhựa được tuyển chọn, chúng tôi tiến hành phân lập 45 mẫu lá Thông nhựa (30 cá thể kháng sâu róm thông và 15 cá thể mẫn cảm với sâu róm thông) để phân tích thành phần vi sinh vật nội sinh trong các mẫu lá Thông nhựa.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Phân lập nấm nội sinh

Các mẫu phân lập được đánh dấu kí hiệu mẫu, mỗi mẫu chọn ra những nhánh, bẹ lá khỏe, tươi không bị bệnh tiến hành khử trùng bề mặt với hypochlorite natri (Miche và Balandreau, 2001), sau đó ngâm mẫu qua cồn 70° trong vòng 1 phút sau đó rửa lại 3 lần bằng nước cất vô trùng, dùng giấy thấm tệt trùng thấm khô và kéo vô trùng cắt thành từng đoạn nhỏ 1cm rồi đặt vào các hộp lồng chứa môi trường PDA. Đặt các hộp lồng đã cấy mẫu này trong tủ định ôn ở nhiệt độ 28°C trong khoảng 2 - 3 ngày để cho sợi nấm phát triển mọc trên môi trường. Khi nấm đã mọc tiến hành tách nấm và cấy sang các hộp lồng khác có chứa PDA, lặp lại cho tới khi được sợi nấm nội sinh thuần khiết.

2.2. Phân lập khuẩn nội sinh

Mỗi mẫu lấy 1 gam lá thông tươi khử trùng bằng cồn 75° trong 1 phút. Lấy ra hơ nhanh qua đèn cồn, sau đó cắt thành các đoạn ngắn 1cm cho vào ống nghiệm có chứa 9ml môi trường PBS nút bông và cuốn miệng ống nghiệm bằng giấy, lắc trong vòng 24 giờ ở nhiệt độ 28°C.

Phân lập vi khuẩn theo phương pháp pha loãng tới hạn (Onkar và James, 1995). Dùng pipet hút 1ml dịch PBS ngâm mẫu lá như trên (10⁻¹) cho vào ống nghiệm chứa 9ml nước cất (10⁻²), tiếp tục pha loãng đến nồng độ 10⁻⁴, 10⁻⁵. Hút 0,1ml cho vào hộp lồng chứa môi trường

King's B, dùng trang thủy tinh trang đều bề mặt thạch đến khô, băng kín và ghi rõ ký hiệu mẫu bệnh. Để các hộp lồng trong tủ định ôn với nhiệt độ 28°C, theo dõi sự xuất hiện của các khuẩn lạc đếm số lượng vi khuẩn có trong hộp lồng theo phương pháp của Talaro (2005). Dùng que cấy tách từng chủng vi khuẩn khác nhau ra các hộp lồng có chứa môi trường PDA (dùng phương pháp cấy ria, mỗi hộp một loại vi khuẩn), mỗi chủng cấy 2 hộp lồng, ghi rõ ký hiệu. Bước đầu nhận dạng các loại vi khuẩn khác nhau dựa vào đặc điểm hình thái, màu sắc, kích thước của khuẩn lạc.

Quan sát mô tả đặc điểm của hệ sợi, đặc điểm hình thái vi sinh vật nội sinh trên kính hiển vi quang học BX50 Olympus, có độ phóng đại từ 200 đến 2.000 lần.

2.3. Phương pháp đánh giá ảnh hưởng của VSVNS đến tập tính của sâu trưởng thành và sâu non mới nở

Lựa chọn một số chủng nấm và khuẩn chỉ xuất hiện ở cây kháng và cây mẫn cảm với tần suất xuất hiện nhiều. Các mẫu này được cấy trong môi trường PD lỏng trong 7 ngày ở 28°C, sau đó lọc lấy dịch trong của các mẫu nấm còn các mẫu khuẩn tiến hành li tâm tách lấy dịch. Các cành Thông nhựa mẫn cảm tươi được lấy trên 1 cây mẫn cảm cắm vào trong dung dịch trong 7 ngày, sau 7 ngày tiến hành phun ướt toàn bộ lá Thông nhựa bằng các dung dịch trong của nấm và khuẩn. Mẫu đối chứng là nước lã. Cụ thể các công thức thí nghiệm được thể hiện ở bảng 1.

Bảng 1. Ký hiệu các công thức thí nghiệm

STT	Ký hiệu công thức	Ký hiệu chủng
1	CT1	Dịch nuôi cấy chủng NT1
2	CT2	Dịch nuôi cấy chủng NT6
3	CT3	Dịch nuôi cấy chủng NT7
4	CT4	Dịch nuôi cấy chủng NT15
5	CT5	Dịch nuôi cấy chủng KT2
6	CT6	Dịch nuôi cấy chủng KT8
7	CT7	Dịch nuôi cấy chủng KT10
8	CT8	Dịch nuôi cấy chủng KT12
9	CT9	Dịch nuôi cấy chủng KT19
10	CT10	ĐC (nước)

Một ngày sau khi những bình chứa các lá cây đã được phun các dung dịch, các bình này được đặt trong cùng 1 lồng lưới, đặt ở mỗi lồng 10 cặp nhộng SRT. Theo dõi quá trình đẻ trứng của sâu trưởng thành sau 5 ngày vũ hóa. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

Tương tự, các bình này được đặt trong cùng 1 lồng lưới, thả mỗi cây 50 trứng, theo dõi tỷ lệ trứng nở và tập tính của sâu non mới nở trong thời gian 24 giờ. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Thành phần nấm nội sinh

Dựa vào đặc điểm của hệ sợi, tốc độ mọc hệ sợi, màu sắc hệ sợi khi được nuôi cấy trên môi trường PDA, từ 45 mẫu lá Thông nhựa thu tại 3 địa điểm nghiên cứu (Thanh Hóa, Nghệ An và Hà Tĩnh), trong đó 30 mẫu Thông nhựa kháng và 15 mẫu mẫn cảm với SRT, phân lập được 15 chủng nấm ký hiệu từ NT1 đến NT15. Kết quả phân lập, thành phần và tần suất xuất hiện các chủng nấm nội sinh được thể hiện ở bảng 2.

Bảng 2. Kết quả phân lập các chủng nấm trong các mẫu lá Thông nhựa

Địa điểm	Chủng Ký hiệu cây	NT1	NT2	NT3	NT4	NT5	NT6	NT7	NT8	NT9	NT10	NT11	NT12	NT13	NT14	NT15
		Thanh Hóa	TH001													
	TH002															
	TH003	√		√	√											
	TH004		√	√		√										
	TH005															
	THĐC1						√									
	THĐC2					√										
	THĐC3			√		√										√
	THĐC4															
	THĐC5						√									
Nghệ An	NA001															
	NA002									√						
	NA003									√						
	NA004				√				√							
	NA005							√								
	NA006		√					√								
	NA007															
	NA008			√												
	NA009			√				√	√							
	NA010			√				√	√							
	NAĐC1															
	NAĐC2								√							
	NAĐC3										√					
	NAĐC4									√						
	NAĐC5			√		√			√	√						√
Hà	HT001															

Địa điểm	Chủng Ký hiệu cây	NT1	NT2	NT3	NT4	NT5	NT6	NT7	NT8	NT9	NT10	NT11	NT12	NT13	NT14	NT15
		Tỉnh	HT002			√	√			√						
	HT003	√		√												
	HT004	√														
	HT005															
	HT006															
	HT007			√												
	HT008													√		
	HT009	√										√				
	HT010							√								
	HT011			√				√								
	HT012							√					√		√	
	HT013												√			
	HT014												√			
	HT015															
	HTĐC1															√
	HTĐC2						√									√
	HTĐC3															
	HTĐC4															
	HTĐC5					√										
Tổng		4	2	11	3	5	3	8	5	4	1	1	3	1	1	4
Tần suất xuất hiện ở cây kháng		4/30	2/30	9/30	3/30	1/30		8/30	3/30	2/30		1/30	3/30	1/30	1/30	
Tần suất xuất hiện ở cây miễn cảm				2/15		4/15	3/15		2/15	2/15	1/15					4/15

Tổng hợp các chủng nấm phân lập được ở lá các cây Thông nhựa kháng và miễn cảm với SRT ở bảng 2 cho thấy phân lập được 15 chủng nấm nội sinh, có những chủng chỉ xuất hiện ở lá cây kháng (NT1, NT2, NT4, NT7, NT11, NT12, NT14) hoặc cây miễn cảm (NT6, NT10, NT15) nhưng cũng có một số chủng có mặt ở cả 2 loại cây (NT3, NT5, NT8, NT9). Đồng thời tần suất xuất hiện của các chủng

nấm cũng khác nhau rõ rệt, như chủng NT1, NT7 chỉ xuất hiện ở 4 và 8 mẫu lá cây kháng, chủng NT15 chỉ xuất hiện ở 4 mẫu lá cây miễn cảm; có những chủng chỉ thấy xuất hiện 1 lần ở lá cây kháng (NT11, NT13, NT14) hoặc ở lá cây miễn cảm (NT10).

Đặc điểm hệ sợi của các chủng nấm nội sinh Thông nhựa kháng và miễn cảm với SRT được mô tả chi tiết ở bảng 3.

Bảng 3. Đặc điểm hệ sợi nấm của các chủng nấm nội sinh Thông nhựa

STT	Ký hiệu chủng	Đặc điểm
1	NT1	Hệ sợi nấm màu trắng, mọc bông xốp trên môi trường, sợi nấm dài mọc phân tầng.
2	NT2	Hệ sợi nấm màu trắng ngà, sợi mọc đều, bông trên môi trường.
3	NT3	Sợi nấm màu nâu đen, mọc bông mịn đều trên môi trường.
4	NT4	Sợi nấm ban đầu màu trắng sau chuyển sang màu nâu sáng, mọc bông xốp đồng tâm trên môi trường, hệ sợi dày.
5	NT5	Sợi nấm màu trắng mọc đồng tâm, sợi ngắn mọc mịn, phía rìa sợi mỏng trong.
6	NT6	Sợi nấm màu trắng đục, ngắn, mọc trên và trong môi trường, sợi mọc rất chậm.
7	NT7	Sợi nấm màu trắng hơi hồng, mọc bông trên môi trường.
8	NT8	Sợi nấm màu trắng mịn, bông, mọc dày trên môi trường.
9	NT9	Sợi nấm màu nâu đỏ, sợi mọc bông mịn và mọc khá nhanh trên môi trường dinh dưỡng.
10	NT10	Sợi nấm màu cam nhạt, mỏng, rìa sợi nấm thường trong suốt sau đó chuyển sang màu cam nhạt, hệ sợi mọc chậm trên môi trường.
11	NT11	Màu trắng, mọc dày, bông và rất mịn.
12	NT12	Sợi nấm ban đầu màu trắng sau chuyển sang màu vàng cam, mọc bông xốp và đồng tâm trên môi trường.
13	NT13	Sợi nấm màu vàng cam, viền trắng, sợi ngắn mọc chậm trên môi trường.
14	NT14	Sợi nấm màu trắng ngà, sợi ngắn, mọc sát môi trường, sợi không bông.
15	NT15	Hệ sợi màu trắng, mọc nhanh, bông xốp trên môi trường.

3.2. Thành phần khuẩn nội sinh

Dựa vào đặc điểm khuẩn lạc trên môi trường nuôi cấy như màu sắc, mép khuẩn lạc, cách mọc... và hình thái bào tử trên kính hiển vi, với tổng số 45 mẫu lá Thông nhựa thu tại 3

địa điểm nghiên cứu, phân lập được 19 chủng khuẩn nội sinh ký hiệu từ KT1 đến KT19. Kết quả phân lập, thành phần và tần suất xuất hiện các chủng vi khuẩn nội sinh được thể hiện ở bảng 4.

Bảng 4. Kết quả phân lập các chủng khuẩn trong các mẫu lá Thông nhựa

Địa điểm	Chủng Ký hiệu cây	KT	KT	KT	KT	KT	KT	KT	KT	KT	KT	KT	KT	KT	KT	KT	KT	KT	KT	KT
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Thanh Hóa	TH001				√															
	TH002		√	√	√	√	√	√	√											
	TH003	√	√								√									
	TH004									√							√			
	TH005	√	√		√	√														
	THĐC1											√								
	THĐC2																			
	THĐC3	√																		
	THĐC4										√									
	THĐC5																			

Địa điểm	Chủng Ký hiệu cây	KT	KT	KT	KT	KT	KT	KT	KT	KT	KT	KT	KT	KT	KT	KT	KT	KT	KT	KT
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Nghệ An	NA001			√					√				√							
	NA002																			
	NA003			√					√					√	√					
	NA004														√					
	NA005			√													√			
	NA006								√	√										
	NA007			√										√						
	NA008																			
	NA009			√										√	√					
	NA010													√						
	NAĐC1																			√
	NAĐC2																√			
	NAĐC3			√																
	NAĐC4																			
	NAĐC5																			
Hà Tĩnh	HT001	√					√						√							
	HT002	√																		
	HT003																			
	HT004	√	√																√	
	HT005													√						
	HT006											√								
	HT007																			
	HT008																			
	HT009																			
	HT010		√																	√
	HT011																			
	HT012												√							
	HT013																			
	HT014																			
	HT015	√						√				√								
	HTĐC1																			
	HTĐC2																			
	HTĐC3	√																		
	HTĐC4																			√
HTĐC5																			√	
Tổng		8	5	7	3	2	3	1	4	3	4	1	5	3	2	1	2	1	1	3
Tần suất xuất hiện ở cây kháng		6/30	5/30	6/30	3/30	2/30	3/30	1/30	4/30	2/30	4/30		5/30	3/30	2/30		2/30	1/30	1/30	
Tần suất xuất hiện ở cây mẫn cảm		2/15		1/15						1/15		1/15				1/15				3/15
Bào tử tổng số (CFU/gam)		2,3 x10 ⁸	3,9 x10 ⁸	8,7 x10 ⁶	2,6 x10 ⁷	2,6 x10 ⁷	1,5 x10 ⁸	2,6 x10 ⁷	2,1 x10 ⁸	3,2 x10 ⁷	1,8 x10 ⁸	1,3 x10 ⁵	4,8 x10 ⁷	1,0 x10 ⁶	3,7 x10 ⁵	8,5 x10 ⁴	8,5 x10 ⁷	8,6 x10 ⁸	2,8 x10 ⁸	4,3 x10 ⁴

Tổng hợp các chủng khuẩn phân lập được ở lá các cây Thông nhựa kháng và mẫn cảm với SRT ở bảng 4 cho thấy phân lập được 19 chủng nấm nội sinh, có 13 chủng chỉ xuất hiện ở lá cây kháng (KT2, KT4, KT5, KT6, KT7, KT8, KT10, KT12, KT13, KT14, KT16, KT17, KT18); 3 chủng chỉ xuất hiện ở lá cây mẫn cảm (KT11, KT15, KT19); và 3 chủng xuất hiện ở cả 2 loại cây (KT1, KT3, KT9). Đồng thời tần suất xuất hiện của các chủng nấm cũng khác nhau rõ rệt, như chủng KT2, KT8, KT10 và KT12 chỉ xuất hiện ở 5, 4, 4 và 5 mẫu lá cây kháng, chủng KT19 chỉ xuất

hiện ở 3 mẫu lá cây mẫn cảm. Mật độ vi khuẩn giữa các mẫu lá cây kháng và mẫn cảm cũng rất khác nhau. Ở cây kháng mật độ cao hơn rất nhiều, cao nhất là chủng KT17 ($8,6 \times 10^8$ CFU/gam), thấp nhất là chủng KT14 ($3,7 \times 10^5$ CFU/gam), trong khi đó ở cây mẫn cảm mật độ cao nhất cũng chỉ là $1,3 \times 10^5$ CFU/gam (KT11) và thấp nhất là $4,3 \times 10^4$ CFU/gam (KT19).

Đặc điểm của các chủng vi khuẩn trên môi trường dinh dưỡng được mô tả chi tiết ở bảng 5.

Bảng 5. Đặc điểm các chủng vi khuẩn nội sinh

STT	Ký hiệu chủng	Đặc điểm
1	KT1	Màu nâu, bề mặt nổi, mép khuẩn lạc phân thùy.
2	KT2	Màu hồng nhạt, bề mặt phẳng, mép khuẩn lạc gợn sóng.
3	KT3	Màu vàng nhạt, bề mặt nổi, mép khuẩn lạc hơi gợn sóng.
4	KT4	Màu trắng đục, bề mặt nổi nhẵn, mép khuẩn lạc trơn láng.
5	KT5	Màu vàng nhạt, bề mặt nhô cao, bóng, mép khuẩn lạc trơn láng.
6	KT6	Màu trắng đục, bề mặt nhẵn, mép khuẩn lạc phân thùy có nhiều sợi nhỏ.
7	KT7	Màu xanh ánh kim, bề mặt nhô cao, mép trơn láng.
8	KT8	Màu vàng mờ gà, bề mặt phẳng nhẵn, mép trơn láng.
9	KT9	Màu trắng, bề mặt phẳng, mép nhiều sợi nhỏ.
10	KT10	Màu vàng nhạt, bề mặt lồi, mép khuẩn lạc trơn láng.
11	KT11	Khuẩn lạc màu trắng đục bề mặt nhẵn, mỏng.
12	KT12	Màu vàng đậm, bề mặt nhô cao, khuẩn lạc mọc chậm.
13	KT13	Màu nâu đỏ bề mặt lõm giữa, khuẩn lạc mọc rất chậm, mép khuẩn lạc trơn láng.
14	KT14	Màu nâu, bề mặt lõm giữa, mép răng cưa.
15	KT15	Khuẩn lạc màu trắng đục, bề mặt mỏng, nhẵn, mép khuẩn lạc gợn sóng.
16	KT16	Màu vàng, bề mặt nhô cao, mép phân thùy.
17	KT17	Màu nâu đỏ nhạt, bề mặt phẳng, mép khuẩn lạc gợn sóng.
18	KT18	Màu trắng đục, bề mặt nhẵn, lõm giữa, mép phân thùy có nhiều sợi nhỏ.
19	KT19	Màu trắng hơi vàng, bề mặt nhẵn, khuẩn lạc đặc, mép trơn láng.

Trong 45 mẫu lá Thông nhựa (30 mẫu Thông nhựa kháng và 15 mẫu mẫn cảm với SRT) ở 3 khu vực nghiên cứu phân lập được 15 chủng nấm nội sinh và 19 chủng khuẩn nội sinh. Số lượng chủng nấm và khuẩn phân lập được ở lá

các cây Thông nhựa kháng với SRT lớn hơn rất nhiều so với lá các cây Thông nhựa mẫn cảm (8 chủng nấm và 13 chủng khuẩn so với 3 chủng nấm và 3 chủng khuẩn): 8 chủng nấm và 13 chủng khuẩn chỉ xuất hiện ở cây kháng là

NT1 (4/30), NT2 (2/30), NT4 (3/30), NT7 (8/30), NT11 (1/30), NT12 (2/30), NT13 (1/30), NT14 (1/30) và KT2 (5/30), KT4 (3/30), KT5 (2/30), KT6 (3/30), KT7 (1/30), KT8 (4/30), KT10 (4/30), KT12 (5/30), KT13 (3/30), KT14 (2/30), KT16 (2/30), KT17 (1/30), KT18 (1/30); 3 chủng nấm và 3 chủng khuẩn xuất hiện ở cây mẫn cảm là NT6 (3/15), NT10 (1/15), NT15 (4/15), KT11 (1/15), KT15 (1/15), KT19 (3/15); Ở mẫu lá cây kháng mật độ bào tử của các chủng khuẩn cao hơn rất nhiều so với lá cây mẫn cảm, cao nhất là chủng KT17 ($8,6 \times 10^8$ CFU/gam), thấp nhất là chủng KT14 ($3,7 \times 10^5$ CFU/gam), trong khi đó ở lá cây mẫn cảm mật độ bào tử cao nhất là chủng KT11 ($1,3 \times 10^5$ CFU/gam) và thấp nhất là chủng KT19 ($4,3 \times 10^4$ CFU/gam).

3.3. Ảnh hưởng của VSVNS đến tập tính của sâu trưởng thành và sâu non mới nở

3.3.1. Đánh giá ảnh hưởng của VSVNS đến tập tính của sâu trưởng thành

Theo dõi quá trình đẻ trứng của sâu trưởng thành sau 5 ngày vũ hóa thấy rằng có một số sâu trưởng thành đã đậu trên lá cây có phun dung dịch chứa bào tử nấm và khuẩn phân lập được từ những cây kháng (NT1, NT7, KT1, KT8, KT10, KT12) nhưng lại không đẻ trứng, sau đó chúng bay sang lá cây có phun dung

dịch chứa bào tử nấm và khuẩn phân lập được từ những cây mẫn cảm (NT6, NT15, KT19) hoặc lá cây là đối chứng hoặc lưới của lồng nuôi để đẻ trứng. Như vậy, khi phun dung dịch chứa bào tử nấm và khuẩn đã ảnh hưởng đến sự đẻ trứng của sâu trưởng thành. Sâu trưởng thành đã đến đậu trên lá những cây có phun dung dịch chứa bào tử nấm và khuẩn phân lập được từ những cây kháng (NT1, NT7, KT1, KT8, KT10, KT12) nhưng sâu trưởng thành cảm thấy sẽ không đảm bảo nguồn thức ăn hoặc nguồn thức ăn không thích hợp cho thế hệ sau nên không đẻ trứng trên đó.

3.3.2. Đánh giá ảnh hưởng của VSVNS đến tập tính của sâu non mới nở

Quá trình theo dõi cho thấy tỷ lệ trứng nở khá cao, trung bình đạt 86%. Sau khi trứng nở sâu non chỉ ở lá cây có phun dung dịch chứa bào tử nấm và khuẩn phân lập được từ những cây kháng (NT1, NT7, KT1, KT8, KT10, KT12) một thời gian rất ngắn, sau đó sâu non tự tìm nguồn thức ăn thích hợp bằng cách di chuyển đến lá cây có phun dung dịch chứa bào tử nấm và khuẩn phân lập được từ những cây mẫn cảm (NT6, NT15, KT19) và đối chứng còn những con sâu non không có khả năng di chuyển để tìm nguồn thức ăn sẽ không tồn tại được (bảng 6).

Bảng 6. Ảnh hưởng của VSVNS đến tập tính của sâu non mới nở

STT	Công thức	Số trứng thả (quả)	Số trứng nở (con)	Số sâu sống sau 4 giờ (con)	Số sâu sống sau 8 giờ (con)	Số sâu sống sau 24 giờ (con)
1	CT1 (Dịch nuôi cấy chủng NT1)	50	45,00	23,33	11,67	6,00
2	CT2 (Dịch nuôi cấy chủng NT6)	50	40,00	65,00	74,67	78,00
3	CT3 (Dịch nuôi cấy chủng NT7)	50	43,33	21,00	7,00	3,67
4	CT4 (Dịch nuôi cấy chủng NT15)	50	35,67	49,33	65,00	67,33
5	CT5 (Dịch nuôi cấy chủng KT2)	50	37,00	17,33	14,67	5,67
6	CT6 (Dịch nuôi cấy chủng KT8)	50	48,33	25,00	7,67	3,67
7	CT7 (Dịch nuôi cấy chủng KT10)	50	45,00	20,00	12,33	7,33
8	CT8 (Dịch nuôi cấy chủng KT12)	50	44,67	20,67	15,33	7,33
9	CT9 (Dịch nuôi cấy chủng KT19)	50	47,33	67,33	72,00	80,33
10	CT10 (Đối chứng - nước)	50	45,33	55,33	64,00	74,33

Như vậy khi phun dung dịch chứa bào tử nấm và khuẩn lên lá Thông nhựa đã có ảnh hưởng đến sự ăn, tập tính của sâu non mới nở. Thành phần VSVNS đã có ảnh hưởng rất lớn đến tập tính của sâu trưởng thành và sâu non mới nở, những chủng VSVNS (NT1, NT7, KT1, KT8, KT10, KT12) phân lập được ở những lá cây kháng có thể làm tăng khả năng kháng đối với sâu hại.

IV. KẾT LUẬN

Với tổng số 45 mẫu lá Thông nhựa, phân lập được 15 chủng nấm và 19 chủng vi khuẩn nội sinh. Có sự khác biệt rõ ràng về thành phần và mật độ vi sinh vật nội sinh giữa cây kháng và cây mẫn cảm: Ở cây kháng thành phần, chủng loại VSVNS đa dạng hơn: có 8 chủng nấm và 13 chủng khuẩn chỉ xuất hiện ở các cây kháng (NT1, NT2, NT4, NT7, NT11, NT12, NT13, NT14 và KT2, KT4, KT5, KT6, KT7, KT8, KT10, KT12, KT13, KT14, KT16, KT17, KT18). Trong khi đó ở cây mẫn cảm chỉ có 3

chủng nấm và 3 chủng khuẩn (NT6, NT10, NT15 và KT11, KT15, KT19) còn lại có 4 chủng nấm và 3 chủng khuẩn xuất hiện ở cả hai loại cây. Hơn nữa, mật độ bào tử các chủng vi khuẩn ở cây kháng cũng cao hơn hẳn so với cây mẫn cảm (ở cây kháng mật độ bào tử cao nhất là $8,6 \times 10^8$ CFU/gam, thấp nhất là $3,7 \times 10^5$ CFU/gam, trong khi đó ở cây mẫn cảm mật độ cao nhất là $1,3 \times 10^5$ CFU/gam và thấp nhất là $4,3 \times 10^4$ CFU/gam).

Thành phần VSVNS đã có ảnh hưởng rất lớn đến tập tính của sâu trưởng thành và sâu non mới nở, những chủng VSVNS (NT1, NT7, KT1, KT8, KT10, KT12) phân lập được ở những lá cây kháng có thể làm tăng, kích thích khả năng kháng sâu róm thông của Thông nhựa thông qua hoạt động sản sinh các thành phần hóa học độc đối với sâu hại hoặc ngăn cản sự tấn công của sâu hại, hoặc xua đuổi sâu hại.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Azevedo, J. L., W. Maccheroni, J., Pereira J. O., and Araújo. W.L., 2000. "Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants", *Elect. J. Biotech.*
2. Benhamou, N., Kloepper, J. W., Quadt - Hallman, A., Tuzon, S., 1996. "Induction of defense - related ltrastructural modification in pea root tissues inoculated with endophytic bacteria", *Plant Physiol.*, 112: 919 - 929.
3. Bent, E. and Chanway, C. P., 1998. "The growth - promoting effects of a bacterial endophyte on lodgepole pine are partially inhibited by the presence of other rhizobacteria", *Can. J. Microbiol.*, 44: 980 - 988.
4. Duijff, B. J., Gianinazzi, P. V. and Lemanceau, P., 1997. "Involvement of the outer membrane lipopolysaccharides in the endophytic colonization of tomato roots by biocontrol *Pseudomonas fluorescens* strain WCS417r", *New Phytol.*, 135: 325 - 334.
5. Hallmann, J., Quadt, H. A., Mahaffee, W. and Kloepper, J., 1997. "Bacterial endophytes in agricultural crops", *Can. J. Microbiol.*, 43: 895 - 914.
6. Hallmann, J., Quadt, H. A., Rodríguez K. R. and Kloepper, J. W., 1998. "Interactions between *Meloidogyne incognita* and endophytic bacteria in cotton and cucumber", *Soil Biol. Biochem.*, 30: 925 - 937.
7. Miche, L. and Balandreau, J., 2001. "Effects of rice seed surface sterilization with hypochlorite on inoculated *Burkholderia Vietnamiensis*", *Appl Environ Microbiol.*, 67: 3046 - 3052.
8. Onkar, D. D. and James, S. B., 1995. "Basic Plant Pathology Methods", 2nd edition. *Boca Raton, Florida: CRC Press, Inc.*, 1995.
9. Pillay, V. J. and Nowak, J., 1997. "Inoculum density, temperature and genotype effects on in vitro growth promotion and epiphytic and endophytic colonization of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) seedlings inoculated with a pseudomonad bacterium", *Can. J. Microbiol.*, 43: 354 - 361.

10. Quispel, A., 1992. "A search of signal in endophytic microorganisms. In: Verma, D.P.S. (Ed.). *Molecular Signals in Plant - Microbe Communications*", *CRS Press, Boca Raton, FL*: 475 - 491.
11. Roos, I. M. M. and Hattingh, M. J., 1983. "Scanning electron microscopy of *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* on sweet cherry leaves", *Phytopathologische Zeitschrift*, 108: 18 - 25.
12. Sturz, A. V. and Matheson. B. G., 1996. "Populations of endophytic bacteria which influence host - resistance to *Erwinia* - induced bacterial soft rot in potato tubers", *Plant Soil*, 184: 265 - 271.
13. Sturz, A. V., Christie, B. R. and Nowak, J., 2000. "Bacterial endophytes: potential role in developing sustainable systems of crop production", *Crit. Rev. Plant Sci.*, 19: 1 - 30.
14. Talaro K. P. (2005), *Foundations in Microbiology*, 5th Ed., McGraw - Hill.
15. Tan, M., Liu, T., Hou, J., Qin, X., Zhang, H., and Li, T., 2003. "Cyclic rapid warming on centennial - scale revealed by a 2650 - year stalagmite record of warm season temperature", *Geophys. Res. Lett.*, 30, 1617, doi: 1610.1029/2003GL017352, 2003.
16. Zinniel, D. K, Lambrecht, P., Harris, N. B. and Feng, Z., 2002. "Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants", *Appl. Environ. Microbiol.*, 68: 2198 - 2208.

Người thẩm định: PGS.TS. Phạm Quang Thu