NGUYỄN ĐĂNG MINH CHÁNH (Chủ biên)
LƯƠNG THỊ HOAN, NGUYỄN THÀNH TUẤN,
LÊ BẢO THANH, HOÀNG THỊ HẰNG

CÔNG NGHỆ TÁCH CHIẾT CINNAMYL ACETATE TỪ VỎ CÂY QUẾ VÀ SẢN XUẤT CHẾ PHẨM SINH HỌC LÀM THUỐC BẢO VỆ THỰC VẬT

(Sách chuyên khảo)

NHÀ XUẤT BẢN NÔNG NGHIỆP
HÀ NỘI - 2020

MỤC LỤC

LỜI GIỚI THIỆU 7

KÝ HIỆU VIẾT TẮT 11

Chương I. ĐẠI CƯƠNG VỀ TUYẾN TRÙNG VÀ NẤM BỆNH GÂY HẠI RỄ CÀ PHÊ VÀ HỒ TIÊU 12

1.1. Thực trạng phát triển cà phê và hồ tiêu 12

1.2. Tuyến trùng, nấm bệnh gây hại rễ cây cà phê và hồ tiêu 14

1.3. Nghiên cứu phòng trừ tuyến trùng và nấm bệnh 21

1.4. Đặc điểm, hình thái của tuyến trùng *Meloidogyne incognita* và *Pratylenchus coffeae* 28

1.4.1. Tuyến trùng *Meloidogyne incognita* 28

1.4.2. Tuyến trùng *Pratylenchus coffeae* 31

Chương II. ĐẠI CƯƠNG VỀ CINNAMYL ACETATE 33

2.1. Đặc điểm và tác dụng của cinnamyl aCetatE 33

2.2. Cây quế, công nghệ, quy trình tách chiết và hiệu quả phòng trừ 34

Chương III. QUY TRÌNH CÔNG NGHỆ TÁCH CHIẾT VÀ HOẠT TÍNH CỦA CINNAMYL ACETATE 41

3.1. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU 41

3.1.1. Vật liệu nghiên cứu 41

3.1.1.1. Vỏ quế và chitosan 41

3.1.1.2. Tuyến trùng và nấm bệnh 41

3.1.1.3. Hóa chất 42

3.1.1.4. Thiết bị 42

3.1.2. Phương pháp phân lập CA 42

3.1.2.1. Phương pháp sắc ký bản mỏng (Thin layer chromatography-TLC) 44
3.1.2.2. Phương pháp sắc ký cột (Column chromatography-CC) 45
3.1.2.3. Phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (High performance liquid chromatography-HPLC) 45
3.1.2.4. Phương pháp phân tích phổ (Nuclear magnetic resonance: ^{1}H-NMR và ^{13}C-NMR) 46
3.1.2.5. Phương pháp sắc ký khí khối phổ (GC-MS) 46
3.1.3. Phương pháp phân lập, nhân nuôi tuyến trùng và nấm 47
3.1.3.1. Phương pháp tách lọc tuyến trùng từ đất 47
3.1.3.2. Phương pháp tách lọc tuyến trùng từ rễ 48
3.1.3.3. Nhân nuôi tuyến trùng sần rễ Meloidogyne incognita 49
3.1.3.4. Nhân nuôi tuyến trùng gây vết thương rễ Pratylenchus coffeae 50
3.1.3.5. Phương pháp nhân nuôi nấm 50
3.1.3.6. Xác định tính kháng nấm điều kiện phòng 50
3.1.3.7. Xác định tính kháng tuyến trùng điều kiện phòng 51
3.1.4. Phương pháp xử lý số liệu, thống kê 51
3.2. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN 52
3.2.1. Tách chiết Cinnamyl acetate (CA) trong phòng thí nghiệm 52
3.2.1.1. Chiết vỏ quế bằng các dung môi 53
3.1.1.2. Sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) 56
3.1.1.3. Cộng hưởng từ hạt nhân ^{1}H-NMR và ^{13}C-NMR 56
3.2.1.4. Sắc ký khí khối phổ (GC-MS) 57
3.2.2. Xác định nồng độ của CA sử dụng hiệu quả phòng trừ tuyến trùng gây hại rễ cây cà phê và hồ tiêu 58
3.2.3. Xác định nồng độ của CA sử dụng hiệu quả phòng trừ nấm bệnh gây hại rễ cây cà phê và hồ tiêu 61
3.2.4. Xác định hiệu quả phòng trừ của cao chiết từ vỏ quế phối trộn với chitosan 63

3.2.5. Hoàn thiện quy trình kỹ thuật tách chiết CA từ vỏ quế 65
2.2.5.1. Sơ đồ thực hiện quy trình tách chiết cinnamyl acetate từ vỏ cây quế 65
3.2.5.2. Thuyết minh quy trình công nghệ 66

Chương IV. ỨNG DỤNG CHẾ PHẨM SINH HỌC BaC PHÒNG TRỪ TUYẾN TRÙNG VÀ NẤM BỆNH CHÍNH HẠI RỄ ĐIỀU KIỆN NHÀ LƯỚI 68

4.1. vật liệu và phương pháp nghiên cứu 68
4.1.1. Vật liệu nghiên cứu 68
4.1.2. Phương pháp nghiên cứu 68
4.1.2.1. Đánh giá hiệu quả phòng trừ tuyến trùng và nấm bệnh gây hại rễ cây cà phê của Bacte Cinsan 68
4.1.2.2. Đánh giá hiệu quả phòng trừ tuyến trùng và nấm bệnh gây hại rễ cây hồ tiêu của BaC 69
4.1.2.3. Phương pháp theo dõi đánh giá 70
4.1.3. Phương pháp xử lý số liệu, thống kê 71

4.2. Kết quả nghiên cứu và thảo luận 72
4.2.1. Hiệu quả phòng trừ tuyến trùng và nấm bệnh chính gây hại rễ cà phê của BaC 72
4.2.2. Ảnh hưởng của BaC đến khả năng sinh trưởng và phát triển của cây cà phê 80
4.2.3. Hiệu quả phòng trừ tuyến trùng và nấm bệnh chính gây hại hồ tiêu của BaC 84
4.2.4. Ảnh hưởng của BaC đến khả năng sinh trưởng và phát triển của cây hồ tiêu 88

Chương V. ỨNG DỤNG CHẾ PHẨM SINH HỌC BaC PHÒNG TRỪ TUYẾN TRÙNG VÀ NẤM BỆNH CHÍNH HẠI RỄ ĐIỀU KIỆN ĐỒNG RUỘNG 91

5.1. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU 91
5.1.1. Vật liệu nghiên cứu 91

5.1.2. Phương pháp nghiên cứu 91
5.1.2.1. Đánh giá hiệu quả phòng trừ tuyến trùng và nấm bệnh gây hại rễ cây cà phê của BaC ở tỉnh Đắk Lắk 91
5.1.2.2. Đánh giá hiệu quả phòng trừ tuyến trùng và nấm bệnh gây hại rễ cây cà phê của BaC ở tỉnh Gia Lai 93
5.1.2.3. Phương pháp theo dõi đánh giá 94
5.1.3. Phương pháp xử lý số liệu, thống kê 95
5.2. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN 96
5.2.1. Đánh giá hiệu quả phòng trừ tuyến trùng và nấm bệnh chính gây hại rễ trên cây cà phê và hồ tiêu của BaC tại Đắk Lắk 96
5.2.1.1. Đánh giá hiệu lực phòng trừ tuyến trùng cà phê của BaC tại Đắk Lắk 96
5.2.1.2. Đánh giá hiệu lực phòng trừ nấm bệnh cà phê của BaC tại Đắk Lắk 101
5.2.1.3. Đánh giá hiệu lực phòng trừ tuyến trùng hồ tiêu của BaC tại Đắk Lắk 104
5.2.1.4. Đánh giá hiệu lực phòng trừ nấm bệnh gây hại hồ tiêu của BaC tại Đắk Lắk 106
5.2.2. Đánh giá hiệu quả phòng trừ tuyến trùng và nấm bệnh chính gây hại rễ trên cây cà phê và hồ tiêu của BaC tại Gia Lai 108
5.2.2.1. Đánh giá hiệu lực phòng trừ tuyến trùng cà phê của BaC tại Gia Lai 108
5.2.2.2. Đánh giá hiệu lực phòng trừ nấm bệnh cà phê của BaC tại Gia Lai. 114
5.2.2.3. Đánh giá hiệu lực phòng trừ tuyến trùng hồ tiêu của BaC tại Gia Lai 117
5.2.2.4. Đánh giá hiệu lực phòng trừ nấm bệnh gây hại hồ tiêu của BaC tại Gia Lai 119
5.2.3. Tổng hợp hiệu quả kinh tế việc sử dụng BaC trên cây cà phê và hồ tiêu tại Đắk Lắk và Gia Lai 123
TÀI LIỆU THAM KHẢO 127
PHỤ LỤC HÌNH ẢNH 134

LỜI GIỚI THIỆU

Chế phẩm sinh học (CPSH) có nguồn gốc từ thiên nhiên là vô cùng cần thiết để sử dụng trong phòng trừ sâu bệnh hại cây trồng. Thảo mộc là nguồn tự nhiên làm vật liệu chế tạo chế phẩm sinh học tiềm năng để phòng trừ sâu bệnh hại cây trồng, đặc biệt là đối với tuyến trùng gây sưng rễ (Root-knot Nematode), tuyến trùng gây vết thương (Root-lesion Nematode) và các loài nấm gây hại rễ (*Fusarium* spp., *Phytophthora* spp., *Rhizoctonia* spp.). Sử dụng chế phẩm sinh học có nhiều ưu điểm như: không gây ảnh hưởng đến sức khỏe con người, vật nuôi, cây trồng, không gây ảnh hưởng môi trường sinh thái; có tác dụng cân bằng hệ sinh thái trong môi trường đất nói riêng và môi trường nói chung; có tác dụng đồng hóa các chất dinh dưỡng, góp phần tăng năng suất và chất lượng nông sản phẩm; các CPSH không làm hại kết cấu đất, không làm chai đất, thoái hóa đất mà còn góp phần tăng độ phì nhiêu đất; có tác dụng tiêu diệt côn trùng gây hại, giảm thiểu bệnh hại, tăng khả năng đề kháng bệnh của cây trồng mà không làm ảnh hưởng đến môi trường như các loại thuốc bảo vệ thực vật có nguồn gốc hóa học khác; có khả năng phân hủy, chuyển hóa các chất hữu cơ bền vững, các phế thải sinh học, góp phần làm sạch môi trường.

Trong những năm gần đây, các nhà khoa học trên thế giới đã phát hiện ra hợp chất sinh học mới được tách chiết từ vỏ cây quế làm chế phẩm sinh học có tiềm năng ứng dụng làm thuốc bảo vệ thực vật. Đó là cinnamyl acetate, một hợp chất có trong vỏ cây quế, là một hợp chất hóa học thuộc họ este cinnamyl, trong đó nhóm R biến đổi được thay thế bằng nhóm methyl. Kết quả của liên kết đôi carbon-carbon không thơm, cinnamyl acetate có thể tồn tại trong cấu hình Z và E: cinnamyl acetate tự nhiên xuất hiện trong vỏ quế. Nhiều nghiên cứu đã chứng minh cinnamyl acetate là một hợp chất an toàn, có khả năng ức chế nấm bệnh, diệt tuyến trùng và ức chế trứng tuyến trùng nở.

Tùy theo đặc tính sinh học của từng loài tuyến trùng mà chúng có thể chui sâu vào mô rễ, chui một phần hay nằm ngoài để gây hại, chích hút dịch từ tế bào mô rễ của ký chủ, có một số loài tuyến trùng chủ yếu sau: Tuyến trùng nội ký sinh khi chui vào bộ phận của rễ để gây hại chúng tạo thành các nốt u sưng bướu như nốt sần họ Đậu, điển hình là giống *Meloydogyne* spp. Giống này thường gây hại chính trên rễ cây hồ tiêu. Tuyến trùng nội ngoại ký sinh chích vào rễ gây sát thương bộ rễ làm cho các loại nấm xâm nhập và gây hại điển hình là giống *Pratylenchus* spp. Giống này thường gây hại chính trên rễ cây cà phê. Sau khi xâm nhập vào rễ, ấu trùng tuổi 2 giống *Meloidogyne* sẽ di chuyển và cư trú tại mô phân sinh, tấn công vào đỉnh sinh trưởng của chóp rễ, làm phân hóa tế bào đỉnh sinh trưởng, đồng thời tiết ra enzyme làm thay đổi mô rễ và hình thành các điểm dinh dưỡng cho tuyến trùng. Rễ cây bị nhiễm tuyến trùng sần rễ sẽ bị tổn thương, gây ra trên bề mặt có dạng sần sùi hoặc tạo thành các u cục, cây bị còi cọc, vàng lá và gây chết. Các loài tuyến trùng sần

rễ *Meloidogyne* có khả năng ký sinh trên nhiều loại cây chủ khác nhau và phân bố rộng trên toàn cầu, làm suy giảm năng suất và sản lượng của các loại cây trồng. Vì vậy, tuyến trùng sần rễ *Meloidogyne* trở thành mối quan tâm trong sản xuất nông nghiệp.

Trước nguy cơ lan nhanh của tuyến trùng, nấm bệnh gây tác hại và phát triển rộng trên cây trồng, việc ngăn chặn và phòng trừ nhóm tuyến trùng và nấm bệnh này luôn được quan tâm và định hướng tới nền nông nghiệp an toàn. Biện pháp phòng trừ sâu bệnh hiện nay chủ yếu sử dụng thuốc hóa học với hàm lượng cao đã gây nên hiện tượng kháng thuốc cũng như ảnh hưởng đến môi trường đất, làm suy giảm sự đa dạng của các sinh vật có ích, suy thoái đất, ảnh hưởng trực tiếp đến sức khỏe của con người và vật nuôi. Do đó, các biện pháp phòng trừ sinh học hiện được chú trọng hơn khi sử dụng các vi sinh vật để chống lại các loài tuyến trùng ký sinh thực vật, được xem là một trong những biện pháp rất tiềm năng. Một trong số đó nghiên cứu cao chiết xuất từ vỏ cây quế làm giảm mật độ tuyến trùng trong rễ, ức chế trứng nở và ức chế sự sinh trưởng của nấm bệnh.

Vì những lý do nêu trên, với cuốn sách "***Công nghệ tách chiết cinnamyl acetate từ vỏ cây quế và sản xuất chế phẩm sinh học làm thuốc bảo vệ thực vật***", các tác giả mong muốn được giới thiệu những khái niệm và kiến thức cơ bản, cùng với những kết quả nghiên cứu công nghệ tách chiết và sản xuất chế phẩm sinh học trong phòng trừ sâu bệnh hại cây trồng. Hy vọng rằng, đây là cuốn sách được các đồng nghiệp, doanh nghiệp, các nghiên cứu sinh, học viên cao học và sinh viên đón nhận để tham khảo phục vụ cho sản xuất, nghiên cứu và học tập.

Hầu hết số liệu thí nghiệm nêu trong cuốn sách này là kết quả thực hiện Đề tài cấp Nhà nước "Nghiên cứu cải tiến công nghệ tách chiết một số chất có hoạt tính từ vỏ cây quế (*Cinnamomum cassia*), xác định chất mang và tạo chế phẩm sinh học phòng trừ hiệu quả tuyến trùng và nấm bệnh chính gây hại rễ cây cà phê và hồ tiêu tại Tây Nguyên" thuộc Chương trình Đổi mới Công nghệ Quốc gia đến năm 2020 của Bộ Khoa học và Công nghệ do chính tác giả thực hiện. Vì vậy các tác giả chân thành cảm ơn sự đóng góp của một số đồng nghiệp tại Viện Cây lương thực và Cây thực phẩm, Viện Khoa học Kỹ thuật Nông Lâm nghiệp Tây Nguyên, Công ty TNHH Thương mại và Dịch vụ Quốc tế TipTo Mã Lai đã cùng thực hiện các thí nghiệm.

Các tác giả
Nguyễn Đăng Minh Chánh (Chủ biên)
Lương Thị Hoan, Nguyễn Thành Tuấn,
Lê Bảo Thanh, Lương Thị Hằng

KÝ HIỆU VIẾT TẮT

BaC	Bacte Cinsan
CCQ	Cao chiết từ vỏ quế
CPSH	Chế phẩm sinh học
CSB	Chỉ số bệnh
CCC	Chiều cao cây
CA	Cinnamyl acetate
NMR	Cộng hưởng từ hạt nhân
F. oxysporum	*Fusarium oxysporum*
F. solani	*Fusarium solani*
CV	Hệ số biến động
NS	Khác biệt không có ý nghĩa
M. incognita	*Meloidogyne incognita*
P. capsici	*Phytophthora capsici*
P. coffeae	*Pratylenchus coffeae*
R. solani	*Rhizoctonia solani*
GC-MS	Sắc ký khí khối phổ
HPLC	Sắc ký lỏng hiệu năng cao
TLC	Sắc ký lớp mỏng
SXL	Sau xử lý
LSD	Sự sai khác có ý nghĩa nhỏ nhất
TSĐ	Tần suất xuất hiện nấm trong đất
TSR	Tần suất xuất hiện nấm trong rễ
TXL	Trước xử lý
TLB	Tỷ lệ bệnh

Chương I

ĐẠI CƯƠNG VỀ TUYẾN TRÙNG VÀ NẤM BỆNH GÂY HẠI RỄ CÀ PHÊ VÀ HỒ TIÊU

1.1. THỰC TRẠNG PHÁT TRIỂN CÀ PHÊ VÀ HỒ TIÊU

Trong những năm gần đây, Việt Nam được xem là một trong số các quốc gia đứng đầu về xuất khẩu cà phê và hồ tiêu cho thị trường thế giới. Tây Nguyên là vùng có diện tích và sản lượng lớn nhất cả nước về cà phê (*Coffea canephora*) và hồ tiêu (*Piper nigrum*). Những năm gần đây người dân vùng Tây Nguyên mở rộng diện tích trồng hồ tiêu một cách ồ ạt, vượt xa quy hoạch cơ cấu hồ tiêu của từng địa phương. Diện tích cà phê chiếm 89,4% so với tổng diện tích của cả nước và diện tích hồ tiêu chiếm 51,3% diện tích cả nước. Hầu hết người nông dân ở vùng này sống dựa vào nguồn thu nhập từ 2 cây trồng này. Vùng cà phê Tây Nguyên đang đứng trước nguy cơ già cỗi, hiện tại có khoảng 100.000 ha năng suất dưới 1,5 tấn/ha, cần trồng tái canh. Thực tế hiện có nhiều diện tích tái canh không thành công. Diện tích trồng hồ tiêu tại một số địa phương ở các tỉnh Tây Nguyên đã vượt diện tích trồng so với quy hoạch, nhiều diện tích trồng không theo quy hoạch.

Tuy nhiên người dân đang gặp khó khăn trong sản xuất 2 loại cây trồng chủ lực này, do vấn đề sâu bệnh hại, đặc biệt là tuyến trùng. Tuyến trùng gây hại rễ là tác nhân chính để cho một số loại nấm bệnh tấn công, dẫn đến rễ cây bị u sưng, thối, cây phát triển còi cọc và nếu nhiễm nặng cây sẽ chết. Người dân vẫn có xu hướng sử dụng thuốc hóa học để phòng trừ tuyến trùng gây hại cây cà phê và hồ tiêu, tuy nhiên sử dụng thuốc hóa học gây ảnh hưởng nghiêm trọng cho người sử dụng, chất lượng sản phẩm giảm và ô nhiễm môi trường do dư lượng của thuốc hóa học để lại.

Tùy theo đặc tính sinh học của từng loài tuyến trùng mà chúng có thể chui sâu vào mô rễ, chui một phần hay nằm ngoài để gây hại, chích hút dịch từ tế bào mô rễ của ký chủ, có một số loài tuyến trùng chủ yếu sau: Tuyến trùng nội ký sinh khi chui vào bộ phận của rễ để gây hại chúng tạo thành các nốt u sưng bướu như nốt sần họ Đậu, điển hình là giống *Meloidogyne* spp. Giống này thường gây hại chính trên rễ cây hồ tiêu. Tuyến trùng ngoại ký sinh chích vào rễ gây sát thương bộ rễ làm cho các loại nấm xâm nhập và gây hại điển hình là giống *Pratylenchus* spp. Giống này thường gây hại chính trên rễ cây cà phê.

Hiện nay phần lớn diện tích cà phê khi thực hiện tái canh thường rất khó thành công. Thông thường 2 năm đầu cây phát triển rất tốt, nhưng khi bước sang năm thứ 3 thì cây cà phê thường có dấu hiệu chuyển sang vàng lá, rụng lá, thậm chí còn dẫn đến chết cây. Nguyên nhân chủ yếu là dịch bệnh hại rễ cây cà phê, bà con nông dân lo lắng nhất là tuyến trùng hại rễ. Mặc dù người nông dân đã áp dụng rất nhiều biện pháp về giống, kỹ thuật canh tác và thuốc hóa học bảo vệ cây trồng. Tuy nhiên, dù đã dùng

thuốc này để xử lý nhưng người nông dân cũng chưa kiểm soát được tuyến trùng hoàn toàn. Do vậy dù chỉ còn sống sót một số ít thì tuyến trùng sinh sản rất nhanh với vòng đời từ 25 - 30 ngày sẽ tạo ra mật độ dày đặc trong đất và tiếp tục gây hại cho cây cà phê.

1.2. TUYẾN TRÙNG, NẤM BỆNH GÂY HẠI RỄ CÂY CÀ PHÊ VÀ HỒ TIÊU

Một trong những vi sinh vật quan trọng sống trong đất gây hại cho cây hồ tiêu đó là nấm *Phytophthora* spp. Nấm gây hiện tượng chết nhanh và phân bố rộng rãi trên thế giới, đặc biệt là vùng Đông Nam Á, châu Á, Úc. Ngoài ra còn có các loài nấm khác gây chết cây như *Fusarium* spp., *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia solani* [16]. Bệnh thối rễ chết nhanh do *P. capsici* gây thất thoát sản lượng từ 5 - 10% hàng năm ở Malaysia. Hiện tượng vàng lá của cây có thể do sự cộng hợp của các tác nhân *Fusarium* sp., *Rhizoctonia* sp., và tuyến trùng *Meloidogyne* sp., rệp sáp hại rễ, và do cây thiếu dinh dưỡng. Hiện chưa có biện pháp phòng trị hữu hiệu cho cây bị nhiễm *Fusarium* [59].

Trên hồ tiêu có 3 nhóm dịch hại có ý nghĩa kinh tế và cần được quan tâm nghiên cứu giải quyết đó là: bệnh chết nhanh, bệnh chết chậm, bệnh virus. Nguyên nhân gây bệnh chết nhanh do hai nhóm nấm *P. capsici* và *Pythium* gây ra bao gồm *P. capsici*, *P. nicotianae*, *P. cinnamon* và *Pythium* sp. Bệnh chết chậm do các tác động cộng hưởng của nhiều tác nhân như: tuyến trùng, nấm *F. solani*, *R. solani*, rệp sáp và mối [5].

Ở Việt Nam, nói đến cây hồ tiêu, trước hết là nói đến bệnh hại, đó là vấn đề lớn nhất với người trồng tiêu. Trong những năm

gần đây, thiệt hại do dịch bệnh trên cây tiêu có xu hướng tăng cả về diện tích lẫn mức độ thiệt hại. Dịch hại phân bố rộng khắp trên các vùng trồng tiêu trong cả nước và là nguyên nhân chính làm giảm năng suất cây tiêu, giảm tuổi thọ vườn tiêu và thu nhập của nông dân trồng tiêu. Tổng hợp tình hình thiệt hại do dịch bệnh ở 16 tỉnh trồng hồ tiêu, Cục Bảo vệ Thực vật cho biết bệnh chết nhanh, tuyến trùng và rệp sáp là ba loại dịch hại phát sinh từ đất hiện diện phổ biến và gây hại nặng cho cây tiêu ở tất cả các tỉnh, trong đó bệnh gây hại nặng nhất là bệnh chết nhanh, kế đến là tuyến trùng và rệp sáp.

Bệnh chết nhanh (Quick wilt, *Phytophthora* foot rot) hay còn gọi là thối gốc, rễ, chết dây trên cây tiêu. Có tên gọi như vậy là vì từ khi thấy cây tiêu "ủ rũ", dây héo, xuống lá bắt đầu chuyển vàng, rụng nhiều lá chỉ để lại dây, sau đó cây tiêu chết rất nhanh trong vòng vài tuần lễ. Quan sát dấu hiệu cây hồ tiêu bị bệnh khi được nhổ lên thì thấy toàn bộ rễ bị thối đen nhất là phần cổ rễ, phần thân sát mặt đất bị thối rã, vỏ cây bong ra, mùi hôi nhẹ. Một khi đã xuất hiện bệnh sẽ làm cây chết hàng loạt nọc tiêu, dẫn đến việc phòng và trị bệnh rất khó khăn, tốn kém và thường không mang lại hiệu quả vì khi triệu chứng đã biểu hiện ra bên ngoài thì bộ rễ tiêu đã bị nấm tấn công trước đó 1 đến 2 tháng. Bệnh thối gốc, chết dây có nguyên nhân do một loại nấm sống dưới đất, ưa ẩm là *Phytophthora* (*Phytophthora palmivora, Phytophthora capsici,...*). Các nấm gây bệnh này thường phát sinh và phát triển lây lan trong thời gian mùa mưa, cao điểm là giai đoạn giữa và cuối mùa mưa. Nấm *Phytophthora* thường kết hợp với các loại nấm ở trong đất khác như *Pythium, Fusarium, Rhizoctonia...* cùng tấn công cây hồ tiêu làm cây chết rất nhanh. Nấm bệnh có

thể xâm nhập được hầu hết tất cả các bộ phận của cây như lá, rễ, thân, nhánh... đặc biệt là phần nằm trong đất và sát mặt đất. Nếu có thêm những tác nhân từ bên ngoài tác động vào, bệnh sẽ dễ dàng phát triển thành dịch. Khi dịch đã phát sinh, sự lây lan nhanh chóng của bệnh theo kiểu vết dầu loang do nước mưa chảy tràn. Bước vào mùa mưa, mầm bệnh có trong đất được nước lây nhiễm lên phần trên của cây.

Bệnh chết chậm (hay còn gọi bệnh tiêu vàng lá, bệnh tuyến trùng...) vì bệnh làm cho cây tiêu sinh trưởng chậm, lá bị vàng héo trên toàn trụ tiêu và rụng dần, ban đầu là các lá già, sau đó đến rụng đốt. Quan sát trong vườn tiêu thì bệnh xuất hiện thành từng vùng, lúc đầu là một vài cây sau đó lan sang các cây bên cạnh và tạo thành vùng bệnh. Tiêu bị bệnh chết chậm có thể vẫn cho quả nhưng năng suất cực kỳ kém, phần mạch dẫn nhựa của thân dây có màu nâu đen, và quá trình này kéo dài vài ba tháng đến cả năm. Một số cây có điều kiện dinh dưỡng tốt và tiêu tơ bộ rễ đang phát triển mạnh, thì có thể chống chọi với bệnh lên đến 2 - 3 năm nhưng cuối cùng vẫn chết. Bệnh chết chậm cùng với bệnh tiêu chết nhanh tạo thành cặp "song sát" gây ra nỗi ám ảnh cho người trồng tiêu, một khi tiêu đã mắc bệnh, rất dễ lây lan ra cả vườn tiêu, gây nên dịch và làm tiêu chết hàng loạt. Bộ rễ tiêu bị bệnh chết chậm phát triển kém, khi đào lên quan sát thì thấy các nốt sần nằm rải rác hoặc nằm thành từng chuỗi. Ở tiêu con (tiêu tơ mới trồng được 1 - 2 năm) các triệu chứng vàng lá do tuyến trùng thường dễ bị nhầm với thiếu dinh dưỡng. Để nhận biết nên quan sát nếu thấy lá non teo nhỏ, bạc màu, vàng đồng loạt trên toàn trụ, bứt lá thấy khá dai thì nên kiểm tra ngay phần rễ, nếu xuất hiện nốt sần thì khả năng cao là tuyến trùng

Meloidogyne đã vào làm tổ, cây có thể sinh trưởng chậm nhưng chưa chết ngay, vào giai đoạn kinh doanh sẽ phát bệnh do bắt đầu nhiễm nấm. Theo đánh giá tại Tây Nguyên, nguyên nhân gây ra bệnh tiêu chết chậm là tuyến trùng *Meloidogyne incognita* và một số loại nấm (*Fusarium* sp., *Fusarium solani*, *Phytophthora* sp., *Pythium* sp.) gây ra. Ban đầu tuyến trùng tấn công vào bộ rễ gây ra những vết thương tổn, tạo điều kiện cho nấm tấn công. Rễ tiêu bị nhiễm nấm yếu dần dẫn tới việc cung cấp nước và dinh dưỡng cho phần cành lá bên trên không hiệu quả. Theo thời gian sợi nấm và bào tử sẽ lan dần lên phần thân và cành, rễ bắt đầu thối và cây sẽ chết.

Tuyến trùng xâm nhập vào rễ được chia ra làm 3 giai đoạn: (1) Khi tuyến trùng xâm nhập vào rễ và nốt sần, rễ hồ tiêu vẫn còn màu sáng, chức năng của rễ chưa bị ảnh hưởng nhiều; (2) Rễ chuyển sang màu nâu, chức năng dinh dưỡng và vận chuyển nước bị ảnh hưởng; (3) Rễ chuyển màu đen, chức năng của rễ bị phá hủy hoàn toàn. Từ giai đoạn 2 do rễ bị tổn thương tạo cơ hội cho các loại nấm *Phytopthora* sp., *Fusarium* sp., *Rhizoctonia* sp..., gây bệnh trên cây hồ tiêu. Tuyến trùng xâm nhập không chỉ ở những cây bị vàng, mà ngay cả những cây nhìn xanh tốt, nhưng đang trong giai đoạn đầu, chức năng của rễ chưa bị ảnh hưởng nhiều. Còn những cây bị vàng lá, rụng lá từ gốc lên là do bệnh phát triển ở giai đoạn cuối.

Tuyến trùng gây hại chính trên cây hồ tiêu là *Meloidogyne,* là loại tuyến trùng nội ký sinh cố định. Vòng đời của tuyến trùng *Meloidogyne* spp. được chia làm 5 giai đoạn. Trứng tuyến trùng tuổi 1, tuổi 2, tuổi 3, tuổi 4 và tuyến trùng trưởng thành. Tùy vào cây ký chủ và nhiệt độ mà vòng đời của tuyến trùng kéo dài từ 40

- 60 ngày. Hoạt động chủ yếu ở độ sâu từ 5 - 30 cm. Con cái đẻ hàng loạt trứng trong túi gelatin do chúng tự tiết ra trong trong quá trình sinh sản, để bảo vệ trứng khỏi yếu tố bất lợi bên ngoài, túi trứng nằm ngoài nốt sần, đôi khi nằm trong nốt sần (bướu rễ, túi trứng tồn tại 1 năm nếu gặp điều kiện thuận lợi), bên trong chứa từ 1 đến 2 ngàn trứng, khi tiếp xúc với axit yếu của rễ tiêu chúng nở ra 200 - 600 tuyến trùng tuổi 1 và chui ra thành tuyến trùng tuổi 2, từ tuổi 2 chúng bắt đầu hình thành kim chích và xâm nhập vào nốt sần hay rễ mới. Khi dinh dưỡng chúng tiết ra men tiêu hóa làm cho quá trình sinh lý, sinh hóa của mô rễ thay đổi, hình thành tế bào khổng lồ, vùng dinh dưỡng của tuyến trùng gồm 5 - 6 tế bào khổng lồ. Từ tuổi 2 đến tuổi 3 cũng là giai đoạn biến đổi quan trọng phân giới tính của tuyến trùng, con cái phát triển chiều ngang và thành hình như quả lê hay giọt nước, con đực phát triển chiều dài sau đó đi ra ngoài chứ không nằm trong mô rễ.

Trên cà phê, bệnh do sự phối hợp tấn công của tuyến trùng *P. coffeae* và các nấm *F. oxysporum, R. solani, P. capsici*... tuy nhiên tuyến trùng *P. coffeae* là loài gây hại nghiêm trọng nhất cho cây trồng này [56]. Chúng phá hoại làm bộ rễ không phát triển, cây không hút được dinh dưỡng, bộ rễ bị tổn thương và điều kiện để các loài nấm trên tấn công gây hại. Đây là loài có phạm vi phân bố rộng khắp thế giới và ký sinh trên nhiều loài cây trồng ở các vùng khí hậu khác nhau gây thiệt hại năng nề về năng suất và phẩm chất của cây trồng.

Trong ngành nông nghiệp, bệnh cây là nguyên nhân chính làm suy giảm năng suất, từ đó gây thiệt hại cho nền kinh tế quốc gia. Các tác nhân gây bệnh có thể tác động trực tiếp hoặc gián tiếp đến cây trồng, làm thiệt hại kinh tế ước tính khoảng 40 tỷ

USD trên toàn thế giới [55]. Bệnh gây hại nghiêm trọng ở vùng rễ cây cam do tuyến trùng ký sinh thực vật được biết đến là một trong những nguyên nhân gây bệnh chết chậm trên các loại cây ăn quả, cây công nghiệp lâu năm [53].

Tác nhân liên quan chính đến bệnh vàng lá thối rễ cây cà phê từ trước đến nay được các nhà khoa học và người dân trồng cà phê cho là bởi tuyến trùng. Có hai loài tuyến trùng *Pratylenchus coffeae* và *Meloidogyne incognita* gây hại trên cà phê [9], [11]. Sauza và cộng sự [51] đã tổng kết có 5 loài tuyến trùng gây hại trên cà phê vùng Tây Nguyên, nhưng hai loài phổ biến nhất vẫn là *P. coffeae* và *M. incognita*. Mật độ cá thể của *P. coffeae* trên 5 g rễ tại tỉnh Đắk Lắk lên đến 500 cá thể. Một kết quả khảo sát khác [6] trên cà phê chè tại 4 tỉnh trồng cà phê ở Việt Nam thì tại tỉnh Lâm Đồng có 3 loài *P. coffeae, M. incognita* và *Helicotylenchus coffeae* được phát hiện với mật độ cao nhất trong đất trồng cà phê.

Bên cạnh đó nghiên cứu gần đây đã phát hiện thấy ngoài hai loài quan trọng nhất là *Pratylenchus coffea, Meloidogyne incognita*, còn có thêm nhiều loài tuyến trùng khác tại vùng cà phê Tây Nguyên nhưng phổ biến nhất là *Radopholus arabocoffeae* [56]. Nghiên cứu này cũng cho biết mật độ cá thể trung bình trên 5 g rễ cà phê của ba loài tuyến trùng *P. coffeae, Meloidogyne incognita* và *R. arabocoffeae* là 248, 88 và 162, tương ứng. Cả ba loài này đều phát hiện có mặt trên cà phê *Coffee arabica* và *C. robusta*. Trong nghiên cứu chi tiết về độc tính của hai loài *P. coffeae* và *R. arabocoffeae* trên cây cà phê con *C. arabica* cv. Catimor. *P. coffeae* gây hại mạnh hơn *R.*

arabocoffeae. *P. coffeae* chủ yếu phá hủy rễ tơ hơn rễ cọc, trong khi *R. arabocoffeae* làm giảm chiều dài rễ cọc [4].

Ngoài tuyến trùng, bệnh nấm rễ cũng được quan tâm do những nguy hại của nó gây ra cho cây trồng. Cho đến nay một số loài nấm hại rễ cà phê được giới khoa học phát hiện là *F. oxysporum*, *Rhizoctonia bataticola*. Nấm *F. oxysporum* gây hại nặng nhất trên cả rễ cọc và rễ tơ, trong khi đó *R. bataticola* chỉ gây hại trên rễ tơ [11]. Những nghiên cứu chuyên sâu về nấm gây bệnh còn rất ít có thể do tác hại đơn lẻ của chúng gây ra cho cây cà phê không đáng kể. Các nhà khoa học đang hướng nghiên cứu tập trung vào mối liên kết giữa tuyến trùng với nấm gây bệnh. Điều tra khảo sát cho thấy tuyến trùng thường đi kèm với một số loài nấm để gây hại rễ, phổ biến nhất là *P. coffeae* với nấm *F. solani* và *Rosellina* làm thối rễ cọc cà phê, *P. coffeae* với *R. bataticola* và *F. oxysporum* làm rễ tơ bị bệnh [11].

Như vậy, ngoài khả năng gây hại trực tiếp đối với cây cà phê của tuyến trùng trong đó đại diện các loài thuộc nhóm tuyến trùng nội ký sinh di chuyển (*P. coffeae* và *Radopholus* spp.), nhóm tuyến trùng gây sần rễ (*M. incognita*), nhóm tuyến trùng bán nội ký sinh (*Rotylenchulus eniformis*) và nhóm số loài ngoại ký sinh. Tuyến trùng là tác nhân đầu tiên gây hại đến vùng rễ gây ra những vết thương tạo điều kiện thuận lợi cho nấm gây bệnh xâm nhập và gây thối rễ cà phê làm cho bệnh trên cà phê trầm trọng hơn. Điều này lý giải tại sao tổ hợp gây bệnh vùng rễ cà phê làm cho chương trình tái canh cà phê không thành công trong những năm gần đây.

Theo Lê Đức Khánh và cộng sự [3], thành phần loài tuyến trùng ký sinh trên cây cà phê tại 4 tỉnh Tây Nguyên gồm 27 loài,

loài gây hại quan trọng và có độ bắt gặp nhiều nhất trong rễ và trong đất trồng là *P. coffeae,* loài *M. incognita* đang có chiều hướng gia tăng. Mật độ tuyến trùng diễn biến khá phức tạp trong mùa mưa tại Cư Kuin, Đắk Lắk; Chư Sê, Gia Lai. Trong rễ mật độ tuyến trùng thường cao vào mùa khô.

Sở dĩ gọi tuyến trùng là sát thủ giấu mặt vì chúng có kích thước hiển vi nên mắt thường không nhìn thấy được, chỉ có loại tuyến trùng nội ký sinh (*Meloidogyne*) làm cho rễ bị u bướu thì các nhà khoa học mới biết tác động gây bệnh của tuyến trùng. Thường khi cây bị vàng lá bất thường chúng ta hay nghĩ là do nấm *Phytophthora* sp. *Fusarium* sp. *Pythium* sp... Nhưng một trong những nguyên nhân sâu xa là do tuyến trùng tấn công rễ, làm rễ bị tổn thương, tạo cơ hội cho các loại nấm trên tấn công hại rễ tiêu. Ngoài tuyến trùng *Meloidogyne* (còn gọi tuyến trùng nốt sần) gây hại hồ tiêu, trên tiêu có nhiều loại tuyến trùng gây hại phổ biến khác như *Pratylenchus, Radopholus, Xiphinema, Circonemoides, Tylenchus* sp, *Rotylenchulus, Paratrichodorus,....*

1.3. NGHIÊN CỨU PHÒNG TRỪ TUYẾN TRÙNG VÀ NẤM BỆNH

Bệnh chết nhanh gây thối rễ do *Phytophthora capsici*, điều trị bằng metalaxyl, hoặc acid phosphoric, fosetyl-Al rất có hiệu quả [28], [59]. Đối với bệnh chết nhanh gây thối rễ, cần áp dụng đồng bộ các biện pháp: thoát thủy tốt, tạo sự thông thoáng cho vườn trong mùa mưa, loại bỏ chôn vùi các tàn dư thực vật quanh gốc tiêu trong mùa mưa, vệ sinh vườn làm sạch cỏ dại, đốt bỏ cành nhánh bị bệnh, tưới đẫm gốc tiêu với dung dịch bordeaux 1% [26], [28].

Khi nghiên cứu về biện pháp phòng trừ, tác giả cho rằng thuốc Agrifos-400 có tác động tốt đối với bệnh chết nhanh, hạn chế sự lây lan của bệnh, và phân hữu cơ đa chức năng MT1 có hiệu quả hạn chế tác hại của bệnh chết chậm, tăng năng suất hồ tiêu tại Đắc Nông và Quảng Trị [5].

Biện pháp phòng trừ tuyến trùng hiện nay chủ yếu sử dụng thuốc hóa học với hàm lượng cao đã gây nên hiện tượng kháng thuốc cũng như ảnh hưởng đến môi trường đất, làm suy giảm sự đa dạng của các sinh vật có ích, suy thoái đất, ảnh hưởng trực tiếp đến sức khỏe của con người và vật nuôi.

Nhiều nghiên cứu cho thấy sử dụng chất chiết xuất từ cây dược liệu và CPSH có các ưu điểm là: i) Không gây ảnh hưởng đến sức khỏe con người, vật nuôi, cây trồng, không gây ảnh hưởng môi trường sinh thái; ii) Có tác dụng cân bằng hệ sinh thái trong môi trường đất nói riêng và môi trường nói chung; iii) Có tác dụng đồng hóa các chất dinh dưỡng, góp phần tăng năng suất và chất lượng nông sản phẩm; iv) Các CPSH không làm hại kết cấu đất, không làm chai đất, thoái hóa đất mà còn góp phần tăng độ phì nhiêu đất; v) Có tác dụng tiêu diệt côn trùng gây hại, giảm thiểu bệnh hại, tăng khả năng đề kháng bệnh của cây trồng mà không làm ảnh hưởng đến môi trường như các loại thuốc bảo vệ thực vật có nguồn gốc hóa học khác; vi) Có khả năng phân hủy, chuyển hóa các chất hữu cơ bền vững, các phế thải sinh học, góp phần làm sạch môi trường.

Nghiên cứu của Lê Văn Trịnh và cộng sự [4] về tuyến trùng hại hồ tiêu, cà phê và các giải pháp khoa học công nghệ phòng

trừ hiệu quả ở các vùng sản xuất trọng điểm kết luận: Biện pháp phòng trừ tuyến trùng trong sản xuất cà phê, hồ tiêu gồm sử dụng giống chống chịu, cắt nguồn thức ăn tuyến trùng. Các sản phẩm SH-BV1, AH N^{o}2, Sông Lam 333 50ND và Tervigo 020SC có hiệu lực phòng trừ tuyến trùng. Nghiên cứu đã xây dựng được 2 ha mô hình phòng trừ tổng hợp tuyến trùng hại cà phê và 2 ha mô hình phòng trừ tuyến trùng hại hồ tiêu. Đồng thời xây dựng được "quy trình quản lý tổng hợp tuyến trùng hại cà phê" và "quy trình quản lý tổng hợp tuyến trùng hại hồ tiêu". Chế phẩm SH-BV1 có hiệu lực phòng trừ tuyến trùng cao trong phòng thí nghiệm (100% sau 1 - 7 ngày xử lý). Ngoài đồng ruộng, sau 1 tháng xử lý sản phẩm, tỷ lệ phòng trừ đạt 47,9% và sau 3 tháng vẫn duy trì hiệu quả phòng trừ đạt 61,3%. Trong khi đó các sản phẩm khác lưu hành trên thị trường cho hiệu quả phòng trừ thấp hơn sau 3 tháng xử lý như sản phẩm ANISAF SH-01 (*Gleditschia australis*, *Siegesbeckia orientalis*, *Bidens pilosa*, *Parthenium hystherophorus*); chế phẩm AT: Nts 2,8%, P_2O_5 1,5%, K_2O 2,0%, humic 2,5%, hữu cơ 23%, axit amin, *Veticilium*, *Paceliomyces*, *Dactyrella*; Sông Lam 333 50ND; AH No2; Tervigo 020SC; chitosan super + Indosol 0,1%.

Kết quả từ dự án hoàn thiện công nghệ sản xuất, ứng dụng CPSH (SH-BV1) phòng trừ tuyến trùng và nấm bệnh hại rễ hồ tiêu, cà phê. Kết quả cho thấy: (i) Đã hoàn thiện, nắm vững và làm chủ công nghệ sản xuất VSV: Công nghệ sản xuất VSV chức năng (*Bacillus subtilis*, *Bacillus ginsengihumi*, *Azotobacter beijerinckii* và *Streptomyces owasiensis*), sản phẩm trước phối trộn có mật độ tế bào vi sinh vật là 10^8 CFU/g. Công nghệ sản xuất nấm *Trichoderma hazianum* và *Metarhizium anisopliae*, mật

độ bào tử đạt 10^9 CFU/g; (ii) Hoàn thiện kỹ thuật chế biến thảo dược, phối trộn thành phần thảo dược. Thảo dược khô, hạt mịn đều, dễ phối trộn với các thành phần khác; (iii) Hoàn thiện quy trình sản xuất chế phẩm SH-BV1 quy mô 1 tấn/mẻ. Chế phẩm xuất ra đạt chất lượng tốt, có mật độ mỗi loài VSV>10^6 CFU/g. Thành phần thảo dược trong chế phẩm là trên 70%. Thời gian bảo quản của chế phẩm là 6 tháng. CPSH SH-BV1 hoàn toàn an toàn, không gây độc cấp tính đối với chuột bạch. Quy trình sản xuất chế phẩm SH-BV1 đã được nghiệm thu cấp cơ sở; (iv) Đã đào tạo 10 lượt cán bộ và công nhận vận hành về kỹ thuật công nghệ sản xuất chế phẩm SH-BV1; (v) Đã sản xuất được tổng số 9.077 kg chế phẩm vi sinh (*Bacillus subtilis, Bacillus ginsengihumi, Azotobacter beijerinckii, Streptomyces owasiensis, Trichoderma hazianum, Metarhizium anisopliae*), đạt chất lượng tốt về mật độ tế bào VSV đạt từ $3,9\times10^8$ CFU/g đến $2,1\times10^9$ CFU/g (giữ được chất lượng tốt sau bảo quản 6 tháng - mật độ tế bào VSV đạt từ $1,6\times10^8$ CFU/g đến 1×10^9 CFU/g, phục vụ sản xuất 150,08 tấn chế phẩm SH-BV1 (mật độ VSV các loài > 10^6 CFU/g chế phẩm) để chuyển đi xây dựng mô hình và phát triển sản phẩm tại Hà Nội, Hải Dương, Hòa Bình,... (vi) Đã xây dựng được mô hình ứng dụng chế phẩm SH-BV1 trên cà phê tại Nâm N'Jang - Đắk Song - Đắk Nông và mô hình trên hồ tiêu tại Chư Sê - Gia Lai; (vii) Hiệu lực phòng trừ tuyến trùng hại đất trồng hồ tiêu đạt 57,4 - 77,2%, trừ nấm *Phytophthora* spp. trong đất hồ tiêu đạt 53,9 - 68,3%, trừ nấm *Fusarium* spp. trong đất hồ tiêu đạt 70,0 - 78,2%. Mật độ nấm đối kháng *Trichoderma* và nấm có ích *Metarhizium anisopliae* của mô hình cao hơn đối

chứng từ 3 đến 6,33 lần. Hiệu quả kinh tế mô hình hồ tiêu ứng dụng chế phẩm SH-BV1 cao hơn đối chứng là 98,4 triệu đồng/ha/năm 2013 và 155,98 triệu đồng/ha và 181,3 triệu đồng/ ha năm 2015; (viii) Hiệu lực phòng trừ tuyến trùng hại rễ cà phê đạt 61,8 - 79,3%, trừ tuyến trùng trong đất trồng cà phê đạt 63,2 - 69,1%, trừ nấm *Fusarium* spp. trong đất cà phê đạt 69,8 - 82,8%. Mật độ nấm đối kháng *Trichoderma* và nấm có ích *Metarhizium anisopliae* của mô hình cao hơn đối chứng từ 3 đến 5 lần. Hiệu quả kinh tế mô hình cà phê ứng dụng chế phẩm SH-BV1 cao hơn đối chứng là 1,5 triệu đồng/ha/năm 2013 và 2,1 triệu đồng/ha và 181,3 triệu đồng/ha năm 2014. Dự án cũng đã sử dụng ba loại thảo dược là bã trẩu (khô trẩu), bã thanh hao và bã neem đã ép khô lấy dầu như khuyến cáo trong nghiên cứu của Nguyễn Thị Chúc Quỳnh và cộng sự [8].

Nhiều nghiên cứu cho thấy rằng sản phẩm chiết từ cây dược liệu có tiềm năng phòng trừ tuyến trùng hại rễ cụ thể như: Bánh neem nồng độ 3% kết hợp với aza (azadirachtin, sản phẩm thương mại) nồng độ 0,1% cho thấy hiệu quả phòng trừ tuyến trùng *M. incognita*, giảm số bọc trứng có ý nghĩa so với đối chứng. Tuy nhiên nếu sử dụng bánh neem nồng độ 3% kết hợp với aza nồng độ 0,05% hiệu quả phòng trừ sẽ giảm đáng kể. Một số nghiên cứu sử dụng MeOH để chiết xuất cây neem (*Melia azedarach)* tạo được dịch có hoạt tính phòng trừ tuyến trùng *M. incognita* trong điều kiện phòng thí nghiệm sau khi xử lý 1 giờ với nồng độ 0,08%, ở nồng độ xử lý 2,5% dịch chiết cho kết quả tuyến trùng giai đoạn 2 (J2) chết 100%. Bằng công nghệ tách chiết, sử dụng các phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao

(HPLC), phân tích khối lượng phân tử (Mass spectrometry) đã xác định được 2 chất hoạt tính đó là axit p-coumaric và axit p-hydroxybenzoic, phòng trừ tốt lần lượt ở nồng độ 840 and 871 µg/ml [41], [42], [43]. Dịch chiết của một số loài cây thuộc họ Xoan (Meliaceae) như *Azadirachta indica* (neem), *Azadirachta excelsa* (sentang), *Melia volkensii*, *Azadirachta azedarach* (Chinaberry) và *Trichilia americana* kết hợp với một số thuốc sâu nguồn gốc tự nhiên như ryania, pyrethrum, rotenone và tinh dầu hương thảo và lá của cây Cỏ ba lá cho thấy có khả năng ức chế nấm và một số loài côn trùng [12]. Tác giả Zasada và cộng sự [62] đã sử dụng vật liệu cây Đậu mèo rừng (*Mucuna pruriens*) để chiết xuất bằng cách sử dụng nước với tỷ lệ cây đậu mèo/dung môi là 1/15. Kết quả thử nghiệm cho thấy nồng độ gây chết (LC) tuyến trùng *M. incognita* giai đoạn 2 là trên 1,1% cao chiết từ vỏ cây bàng (*Terminalia arjuna*) [15]. Meyer và cộng sự [29] kết luận rằng dịch chiết từ cây Mã đề (*Plantago lanceolata* và *Plantago rugelii*) gây độc cho trứng tuyến trùng *M. incognita* và tuyến trùng giai đoạn 2, trong đó dịch chiết *Plantago lanceolata* có hoạt tính tốt hơn *Plantago rugelii* trong phòng trừ tuyến trùng *M. incognita*. Theo Hong và cộng sự [23], 2 chất ethyl cinnamate và ethyl p-methoxycinnamate được tách chiết từ rễ *Kaempferia galanga* (cây Địa liền) có hoạt tính kháng tuyến trùng *M. incognita* cao hơn carbofuran, ethyl cinnamate, ethyl p-methoxycinnamate và carbofuran cho thấy nồng độ gây chết tuyến trùng theo thứ tự là 37, 41 và 92 µg/ml. Nghiên cứu về hoạt chất của *Greek Lamiaceae* [41] cho thấy hầu hết các dịch chiết này đều cho thấy có hoạt tính kháng tuyến trùng hiệu quả nhưng chỉ mới dừng lại ở mức độ phòng và nhà lưới. Đối với

dịch chiết từ vỏ cây Chiêu liêu (*Ternminalia nigrovenulosa)*, mọc chủ yếu ở rừng khộp Tây Nguyên, là cây gỗ có thể cao tới gần 30m, đường kính thân cây có thể tới 1m. Vỏ thân cây màu xám tro, có nứt dạng vảy hình chữ nhật không đều. Lớp vỏ thân cây dày tới 2 cm có nhiều tầng màu đỏ và nâu nhạt xen kẽ nhau. Lá đơn mọc cách. Phiến lá nguyên có hình trứng hoặc trứng ngược, đầu lá có mũi nhọn (nhọn gấp), đuôi lá hình nêm rộng, phiến dài trung bình 7 - 10 cm và rộng 4,5 - 8 cm. Cuống lá dài 1 - 3 cm, đỉnh cuống lá có 2 - 4 tuyến nhỏ. Hệ gân lông chim có 6 - 10 cặp gân thứ cấp) và các chất được tách chiết từ Chiêu liêu (axit gallic và axit 3,4 - Dihydroxybenzoic) cho thấy hoạt tính phòng trừ hiệu quả nấm bệnh (*F. solani*) và tuyến trùng hại rễ *M. incognita* [34], [35], [36], [37], [39] và tuyến trùng *P. coffeae* gây hại rễ cà phê [31]. Dịch chiết bánh dầu neem ở nồng độ 5% đã làm chết 100% cá thể tuyến trùng *M. incognita* giai đoạn 2 sau 24 giờ phơi nhiễm. Dịch nguyên chất bánh dầu neem ức chế một số loài nấm bệnh như *R. solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Collectotrichum* spp. và *P. capsici*. Giá trị EC50 của bánh dầu neem lên ấu trùng tuổi 2 của *M. incognita* và các loài nấm bệnh chính hại rễ hồ tiêu *R. solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Collectotrichum* spp. và *P. capsici* tương ứng là 0,51, 0,74, 0,30, 0,51 và 4,33% [2]. Hạt cây củ đậu, rễ cây ruốc cá, hạt và lá cây sầu đâu rừng, cây bông cúc vạn thọ, hạt cây thầu dầu, khô trẩu, sở, bã thanh hao, bã neem... là một số cây dược liệu được khuyến cáo có tác dụng gây ngộ độc diệt và xua đuổi tuyến trùng. Tuy nhiên đến nay trên thị trường vẫn chưa có sản phẩm đặc trị nào hiệu quả và thương mại từ các loại cây dược liệu nêu trên. Đánh giá hiệu lực phòng trừ của các chế phẩm thảo dược (TD1, TD2, TD3 và TD4), nhóm nghiên cứu đã kết luận: sử

dụng 4 loại thảo dược có chứa hoạt chất saponin và alkaloid có thể sử dụng để phòng trừ nhiều đối tượng dịch hại cây trồng như: các loại nhuyễn thể, tuyến trùng, sùng, rệp sáp... Bốn loại thảo dược có hàm lượng saponin từ 1,617 - 3,732% chất khô và hàm lượng alkaloid chiếm từ 0,024 - 2,130%. Các thảo dược chứa saponin có hiệu quả hạn chế tuyến trùng từ 60,6 - 88,9% sau 18 ngày thí nghiệm. Tuy nhiên, để sử dụng TD3 và TD4 cần phải xử lý giảm hàm lượng dầu béo để hiệu quả hạn chế tuyến trùng nhanh và mạnh hơn, vì dầu béo trong TD3 chiếm trên 15,7% và TD4 chiếm trên 18,6%. Ngoài ra, xử lý với các công thức hỗn hợp như: 2% vi sinh vật chức năng + 30 - 70% thảo dược TD1 + 28 - 68% nước, cho kết quả phòng trừ tuyến trùng sau 7 ngày là 75,9 - 76,9% và sau 18 ngày là 80,9 - 88,9%. Đánh giá khả năng tồn tại của các chủng vi sinh vật trong dịch chiết thảo mộc, đó là các chủng: xạ khuẩn phân giải cellulose *Streptomyces owasiensis* Act26, chủng vi khuẩn phân giải lân khó tiêu *Bacillus gisengihumi* QT1, vi khuẩn đối kháng bệnh *Bacillus subtilis* M2.4 và chủng vi khuẩn cố định đạm *Azotobacter beijerinckii* AT65. Tuy nhiên, khi trộn hỗn hợp cả 4 chủng thì sự phát triển của từng chủng có khác nhau và ở mức thấp hơn so với đơn chủng [2].

1.4. ĐẶC ĐIỂM, HÌNH THÁI CỦA TUYẾN TRÙNG *Meloidogyne incognita* VÀ *Pratylenchus coffeae*

1.4.1. Tuyến trùng *Meloidogyne incognita*

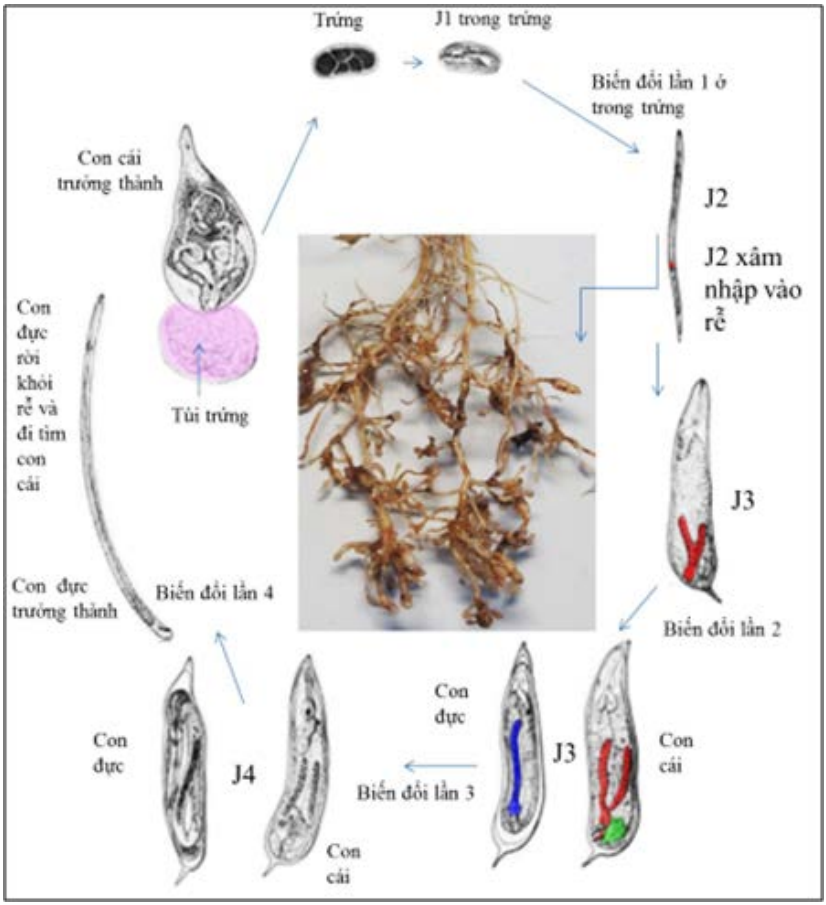
Con cái: Cơ thể có dạng hình quả lê đến hình cầu, thân tròn, kích thước cơ thể từ 488 - 1.151µm, cổ ngắn đến hơi dài, tỷ lệ chiều dài cơ thể/chiều dài cổ từ 1,9 - 6,9. Phần đầu có vùng môi bằng, hơi tách rời với đường viền cơ thể, kitin hóa rõ ràng, kim

hút to khỏe với chiều dài trung bình 10,6 - 16,4µm và có dạng thẳng hoặc hơi cong về phía lưng, gốc kim hút tròn hoặc hơi vát về phía sau, lỗ bài tiết nằm ở vị trí ngang với gốc kim hút, chiều dài DGO khoảng 2,9 - 5,9µm. Diều giữa có dạng oval, van được kitin hóa mạnh. Phần cutin vùng chậu với vòm lưng nhô cao, hơi vuông và bóp hẹp lại từ hai phía bên, vân bụng tròn mịn, đứt đoạn không đều, cấu trúc vulva, anus và mút đuôi rõ ràng, chiều dài vulva khoảng từ 15 - 23,5µm, khoảng cách vulva-anus từ 11 - 26µm, khoảng cách phasmid từ 12 - 24,2µm. Vùng bên đặc trưng dạng đứt nối có dạng fork giữa các vân vùng bụng và vùng lưng.

Con đực: Cơ thể hình giun, thuôn nhỏ ở hai đầu, chiều dài từ 894 - 1.872µm. Đầu dạng bằng, vùng môi hơi nhô lên, tách biệt với cơ thể. Môi giữa và đĩa môi tạo thành dạng tròn, hơi nhô cao so với môi giữa. Kim hút to khỏe, chiều dài từ 15 - 21µm, núm gốc lớn, dạng tròn, tách rời nhau. Khoảng cách DGO từ 2,4 - 7,4µm. Diều trước có thành kitin hóa yếu, diều giữa dạng ô van với lumen mở rộng, eo thắt thực quản không rõ ràng. Testis chiếm 1/2 chiều dài cơ thể, từ 368 - 986µm. Gai giao cấu cong về phía bụng, gai đệm nhỏ, sát vào gai giao cấu.

Ấu trùng: Cơ thể dạng giun, thon nhỏ ở phần đầu và đuôi, chiều dài từ 313 - 424µm. Vùng môi kitin hóa yếu, hơi tách biệt với đường viền cơ thể. Kim hút mảnh, chiều dài từ 7,5 - 12,6µm, gốc kim hút tròn nhỏ. Diều giữa lớn, dạng oval, van diều giữa kitin hóa mạnh. Van nối ruột - thực quản rõ ràng. Lỗ bài tiết ngang với vị trí vòng thần kinh, mở ngay sau vị trí hemizonid.

Phasmid nhỏ nằm giữa đường bên khoảng một phần hai chiều dài đuôi. Đuôi thuôn nhọn với phần hyaline dài từ 9,2 - 17,8µm chiếm khoảng 33% chiều dài đuôi.

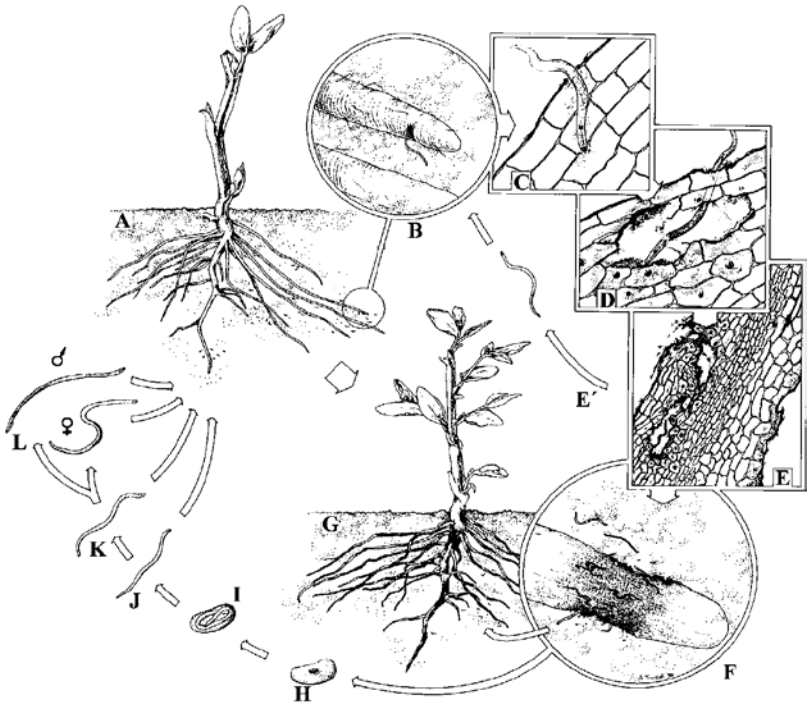


***Hình 1.1. Chu kỳ vòng đời của tuyến trùng sần rễ Meloidogyne* spp.**

1.4.2. Tuyến trùng *Pratylenchus coffeae*

Con cái: Cơ thể hầu như thẳng và hơi cong về phía bụng sau khi được cố định nhiệt. Đốt cơ thể rộng từ 1 - 1,5 µm. Vùng môi thấp, bằng cao từ (1,9 - 2,9 µm) và rộng (6,6 - 8,8 µm), có hai đến ba vòng đầu, thường có một đến 2 vòng là không hoàn thiện. Vòng môi thứ hai thường cao hơn và rộng hơn vòng thứ nhất. Gốc kim hút tròn hoặc phẳng về phía trước cao 1,4 - 4,7 µm và rộng (2,2 - 4,8 µm). Lỗ bài tiết có vị trí ngay van thực quản và ruột. Hemizonid ngay phía trên lỗ bài tiết với hai đốt cutin. Thực quản tuyến phủ về phía bụng với độ dài 35,3 - 76 µm từ van thực quản và ruột. Vùng bên với 4 đường bên, hiếm khi sáu, bao gồm 3 dải tương đương nhau hoặc dải giữa rộng hơn hai dải bên, đôi khi dải giữa có những khứa chéo. Nhánh sinh dục phía trên kéo dài về phía trước, túi chứa tinh hình ô van luôn chứa tinh. Túi sinh dục dài khoảng đường kính cơ thể tại lỗ sinh dục. Hình dạng đuôi thường dạng cắt cụt, đôi khi vát, bán cầu hay cầu, mút đuôi nhẵn, đôi khi có khía. Phasmid hình kim, thường nằm ở 1/3 đuôi từ phía lỗ hậu môn.

Con đực: Cơ thể thường mảnh hơn con cái, đuôi hình chóp, gai sinh dục cong về phía bụng, cánh đuôi kéo dài tận cùng mút đuôi.



Ghi chú: A, B, C theo A: Bộ rễ của cây khỏe; B-D: Sự xâm nhập của tuyến trùng trên rễ; E, F: Tổn thương vỏ não; G: Tổn thương hoại tử bộ rễ bị nhiễm trùng; H, I: Trứng; J, K: Mẫu vật vị thành niên; L: Mẫu vật trưởng thành.

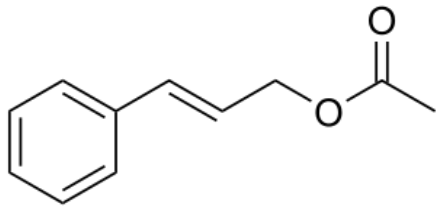
***Hình 1.2. Chu kỳ vòng đời của tuyến trùng gây vết thương rễ Pratylenchus* spp.**

Chương II

ĐẠI CƯƠNG VỀ CINNAMYL ACETATE

2.1. ĐẶC ĐIỂM VÀ TÁC DỤNG CỦA CINNAMYL ACETATE

Cinnamyl acetate (CA) là một hợp chất hóa học thuộc họ este cinnamyl, có công thức phân tử là $C_{11}H_{12}O_2$, trong phân tử có chứa một vòng thơm (hình 2.1). CA có khả năng hòa tan trong nước tạo thành dung dịch, khối lượng phân tử 176,2. CA được sử dụng như một ester hương vị, như bánh mì và thức ăn động vật, có mùi thơm trái cây ngọt ngào.



Hình 2.1. Cấu trúc phân tử của cinnamyl acetate

CA tách chiết từ vỏ quế đã được chứng minh có khả năng diệt tuyến trùng gây u sưng rễ, tuyến trùng gây vết thương rễ và ức chế sinh trưởng và phát triển của một số loài nấm gây hại rễ [33], [38].

2.2. CÂY QUẾ, CÔNG NGHỆ, QUY TRÌNH TÁCH CHIẾT VÀ HIỆU QUẢ PHÒNG TRỪ

Cây quế (tên khoa học: *Cinnamomum cassia*) là cây mọc hoang trong rừng hoặc trồng bằng hạt, có chiều cao từ 10 - 20m. Trong các bộ phận của cây quế như: vỏ, lá, rễ, gỗ đều có chứa tinh dầu tuy nhiên trong vỏ quế có hàm lượng tinh dầu cao nhất. Tinh dầu quế có vị thơm, cay, ngọt rất ưa chuộng và được sử dụng nhiều trong ngành công nghệ thực phẩm.

Giống quế Quảng Nam được sử dụng trong nghiên cứu này, cây chủ yếu tập trung ở Trà My, Trà Bồng tỉnh Quảng Nam. Vỏ Quế chứa 0,5 đến 2,5% tinh dầu gồm các loại: cinnamaldehyd (65 - 80%), eugenol, và trans-cinnamic acid (5 - 10%). Ngoài ra còn có các phenylpropanes như cinnamyl acetate, linalool, β-caryoP. capsicillen, (E)-cinnamic aldehyd, benzyl benzoat, hydroxycinnamaldehyd, cinnamyl alcohol và các chất terpenes gồm limonene, alpha-terpineol... cùng các tanin, chất nhày, các procyanidin và một ít counarin.

Bảng 2.1. Hằng số vật lý của vỏ cây quế

Hằng số vật lý	Vỏ quế
Tỷ trọng d_{15}	1,020 - 1,040
Chiết suất $n^{20}D$	1,581 - 1,591
Độ quay cực	$1 - 0^0$

Bảng 2.2. Thành phần các hoạt chất trong vỏ quế

Thành phần	Vỏ quế
Cinnamandehit	65 - 80%
Axit Cinnamic	5 - 10%
Phenylpropanoid như: cinnamyl acetate, linalool, β-caryophyllen, (E)-cinnamic andehit, benzyl benzoat, hidroxycinnamandehit, cinnamyl ancol và các chất terpen gồm limonen, alpha-terpineol... cùng các tani, chất nhày, các procyanidin và một ít counarin.	10 - 30%

Nhiều nghiên cứu cho thấy tinh dầu quế được sử dụng trong công nghệ dược, thực phẩm và mỹ phẩm do có các hoạt tính đặc trưng như kháng nấm [22], [45] và kháng khuẩn [19]. Kết quả nghiên cứu sơ bộ của Chang và cộng sự cho kết quả 4 chất trong tinh dầu quế (cinnamaldehyde, CA, eugenol và anethole) có hoạt tính kháng ấu trùng muỗi *Aedes aegypti* trong 24 giờ xử lý [18]. Nghiên cứu của Sung và cộng sự [54] cũng đưa ra rằng CCQ ức chế khả năng bong da trên chuột làm giảm khả năng dị ứng gây hại vết thương da của chuột. Bên cạnh đó tác giả Kim và cộng sự [25] kết luận rằng dịch chiết từ vỏ quế cũng cho hoạt tính kháng khuẩn *Escherichia coli*.

Nghiên cứu của Nguyen và cộng sự [32] sàng lọc 26 mẫu cây dược liệu có nguồn gốc từ Việt Nam, được thử nghiệm tại Hàn Quốc cho thấy chỉ có Cao chiết từ vỏ quế (CCQ) là cho hoạt tính kháng tuyến trùng *Bursaphelenchus xylophilus* gây hại cây thông. CA và một hợp chất chưa xác định được tách chiết từ vỏ quế xử lý với nồng độ 3 mg/ml trong vòng 50 phút, tuyến trùng *Bursaphelenchus xylophilus* đã bị chết trên 95%. Bên cạnh đó CCQ và hợp chất được tinh chế từ vỏ quế cho thấy hoạt

tính kháng nấm hiệu quả trên nấm bệnh *R. solani* gây hại cây trồng [40]. Trên cơ sở đó tiếp tục thử nghiệm bằng cách xử lý chất CCQ vào trong đất đối với cây dưa chuột đã được lây nhiễm tuyến trùng *M. incognita*, kết quả cho thấy số lượng tuyến trùng trong đất và rễ giảm có ý nghĩa so với đối chứng không xử lý [38]. Phân tích mẫu lá cây dưa chuột cho thấy các enzyme (hoạt tính chống ôxy hóa như: superoxide dismutase SOD, catalase CAT và ascorbate peroxidase APX) có hoạt tính kháng sâu bệnh trong lá của công thức có xử lý cao hơn có ý nghĩa so với công thức không xử lý (đối chứng). Điều này cho thấy xử lý CCQ đã làm giảm mật độ tuyến trùng trong đất và không làm ảnh hưởng đến sinh trưởng phát triển của cây trồng. Kết quả thử nghiệm CA phòng trừ tuyến trùng và nấm bệnh gây hại rễ cho kết quả như sau: Khi xử lý CA với tuyến trùng *M. incognita* trong điều kiện phòng thí nghiệm, hiệu quả phòng trừ tuyến trùng ấu trùng tuổi 2 của *M. incognita* lên đến 100% chỉ sau 50 phút xử lý ở nồng độ 100 µg/ml, đồng thời ức chế trứng nở 88,7% sau 6 ngày xử lý ở nồng độ 200 µg/ml [33]. Đặc biệt, công trình nghiên cứu của Seo và Nguyen [47] kết hợp CCQ với chitosan tạo thành hỗn hợp (cinnamon-chitosan) có khả năng phòng trừ hiệu quả nấm *R. solani* và tuyến trùng *M. incognita* trong điều kiện phòng thí nghiệm. Cụ thể nghiên cứu của Seo và Nguyen [47] thử nghiệm phối kết hợp hỗn hợp 1: kết hợp giữa CCQ với các nồng độ 0,1; 0,3 và 0,5% + chitosan 7% và tạo hạt trong môi trường H_2O-MeOH-NaOH = 4:5:1, w/w/w) và hỗn hợp 2: kết hợp giữa bột nghiền trực tiếp từ vỏ quế với các nồng độ 1; 3 và 5% + chitosan 7% và tạo hạt trong môi trường H_2O-MeOH-NaOH = 4:5:1, w/w/w), công thức đối chứng chỉ sử dụng chitosan 7% không kết hợp với vỏ quế. Kết

quả cho thấy công thức phòng trừ tuyến trùng *M. incognita* và nấm *R. solani* hiệu quả nhất ở công thức phối trộn cao chiết 0,5% + chitosan 7% hoặc công thức phối trộn bột nghiền từ vỏ quế 5% + chitosan 7% cho kết quả phòng trừ cao có ý nghĩa so với các công thức khác và công thức đối chứng chỉ sử dụng chitosan 7%. Kết quả này phù hợp với nhận định của một số nghiên cứu khác trên thế giới. Một trong những chất mang có thể kết hợp với sản phẩm chiết xuất thảo dược đó là chitin và chitosan, hợp chất có hoạt tính kháng nấm và kháng khuẩn. Chitosan là một polyme động vật được tách chiết từ vỏ tôm, cua, ghẹ, với đặc tính là hòa tan tốt trong môi trường axit, do đó mà chitosan được sử dụng trong nhiều lĩnh vực của đời sống. Nghiên cứu của Singh và Chhatpar [49] đã cho thấy chitinase kháng nấm được sinh tổng hợp bởi chủng *Paenibacillus* sp. D1, sử dụng phế thải chitin làm nguồn cacbon. Chitosan và oligochitosan được xem như thuốc kháng nấm, có hiệu quả ức chế sự nảy mầm của bào tử, sự sinh trưởng của sợi nấm như *P. capsici* và *Alternaria solani, F. solani* [60], *Sclerotium rolfsii* [21], *Botrytis cinerea* [20]. Theo kết quả nghiên cứu của Sid Ahmed và cộng sự [48] cho thấy kiểm soát các bệnh cây do nấm *P. capsici, R. solani* gây bệnh cho hồ tiêu khi dùng chế phẩm vi khuẩn *Bacillus* và nấm *Trichoderma* đối kháng kết hợp với chitin 5%. Khi bổ sung chitin vào làm tăng hiệu quả kiểm soát bệnh từ 41 và 43% lên 61% và 68% lần lượt đối với nấm *P. capsici, R. solani*. Mặc dù có nhiều kết quả chứng minh được bằng chứng về vai trò của chitin và chitosan ức chế nấm bệnh nhưng cho đến nay cơ chế và các sản phẩm sử dụng trong bảo vệ thực vật vẫn chưa đáp ứng được trong thực tiễn.

Trên cơ sở các nghiên cứu về hoạt tính của CCQ phòng trừ tuyến trùng và nấm bệnh chính gây hại rễ bước đầu đã cho kết quả rất khả quan, cụ thể: CCQ cho thấy hiệu quả cao trong phòng trừ tuyến trùng *M. incognita* [38], [33], *P. coffeae* [31], *Bursaphelenchus xylophilus* [32] và nấm bệnh *R. solani* [40]. Nghiên cứu thử nghiệm hoạt tính CCQ phòng trừ tuyến trùng và nấm gây hại cà phê và hồ tiêu ở Viện KHNLN Tây Nguyên cho kết quả phù hợp với các nghiên cứu trước đây, hiệu quả phòng trừ của CCQ đối với tuyến trùng và nấm bệnh chính gây hại rễ cây cà phê và hồ tiêu, cụ thể: Điều kiện phòng, nồng độ CCQ 0,02 - 0,04% phòng trừ hiệu quả 100% *M. incognita* và 93 - 96% *P. coffeae* sau 40 phút xử lý; Dịch chiết quế ở nồng độ cao nhất 1,0% có khả năng ức chế tốt sinh trưởng của nấm bệnh *R. solani* với tỷ lệ ức chế đạt 92,6% sau 3 ngày cấy nấm so sánh với đối chứng. Điều kiện nhà lưới: sau 4 tuần xử lý với nồng độ CCQ 0,04%, tuyến trùng *M. incognita* trong rễ giảm 76% và trong đất giảm trên 95%; tuyến trùng *P. coffeae* trong rễ giảm 60% và trong đất giảm 55%; Sinh trưởng của cây trong điều kiện thí nghiệm không có sự sai khác [1], điều này cho thấy sử dụng CCQ không làm ảnh hưởng đến sinh trưởng của cây trồng. Chất CA trong CCQ cho thấy hiệu quả phòng trừ rất cao với tuyến trùng *M. incognita*.

Theo nghiên cứu của Nguyen và cộng sự [33], xử lý CCQ vào cây dưa chuột đã được lây nhiễm tuyến trùng *M. incognita* cho thấy sự khác biệt giữa các công thức. Số tuyến trùng trong rễ ở công thức xử lý 0,05% CCQ giảm đáng kể so với công thức đối chứng không xử lý. Thành phần các protein trong lá ở các công thức xử lý cũng có sự khác biệt đáng kể. Thành phần các hoạt chất kháng oxy hóa (superoxide dismutase, ccatalase và ascorbate

peroxidase) trong lá dưa chuột khác nhau, các hoạt chất này trong lá ở công thức xử lý 0,05% CCQ cao hơn so với lá trong các công thức đối chứng sau 28 ngày xử lý. Bên cạnh đó sinh trưởng của cây dưa chuột giữa các công thức xử lý không có sự khác biệt. Điều này cho thấy rằng xử lý CCQ không gây ảnh hưởng đến sinh trưởng phát triển của cây trồng.

Theo một phương pháp chiết xuất tinh dầu quế, sáng chế số US20170158985 [58], đề cập đến phương pháp chiết xuất dịch từ vỏ cây quế sử dụng dung dịch nước muối Natri bao gồm: dung dịch muối Natri Clorua và/hoặc muối Natri Bicarbonat có nồng độ khối lượng 1 - 12% và tỷ lệ khối lượng của dung dịch muối Natri với bột quế là 5 - 15%. Đầu tiên, bột quế được trộn và điều hòa với dung dịch muối natri, thu được bột quế điều hòa, ngay sau đó, bột quế điều hòa thu được đã được đông lạnh và sau đó tan nhanh, thu được bột quế được làm tan. Cuối cùng, bột quế tan được trộn với dung môi khí, thực hiện chiết xuất chất lỏng có áp suất, sau khi tách, thu được dầu quế. Phương pháp chiết xuất dầu quế từ quế ở nhiệt độ thấp bổ sung dung dịch muối natri để điều hòa bột quế, sử dụng quy trình đông lạnh chậm và quá trình rã đông nhanh chóng, và cuối cùng sử dụng dung môi khí, có thể khí hóa mà không cần đun nóng để tách ra khỏi dịch chiết; quá trình chiết xuất được tránh xa không khí và các thành phần nhạy cảm với nhiệt không bị hư hại.

Phương pháp "lôi cuốn hơi nước" cũng thường xuyên được sử dụng để chiết tinh dầu. Phương pháp này có thể lấy triệt để tinh dầu trong nguyên liệu, tuy nhiên lại có hạn chế là khó áp dụng đối với những cây có tinh dầu thuộc thành phần khó bay hơi như nhựa hay sáp, hoặc tinh dầu có thành phần hóa học không bền ở nhiệt độ cao.

Dựa vào bằng độc quyền sáng chế số AU2007227386 [14] và US20070292540 [57], cả hai sáng chế đều đề cập đến phương pháp chiết xuất dịch vỏ cây quế bằng phương pháp trích ly CO_2 siêu tới hạn nhằm tăng hiệu suất trích ly, tuy nhiên, chi phí đầu tư lớn. Bên cạnh đó một số nghiên cứu khác đã sử dụng công nghệ chiết xuất dung môi môi CO_2 siêu tới hạn để chiết xuất ra hoạt chất như γ-tocopherol trong dầu mè [61] và một số tinh dầu được được chiết ra với ứng dụng trong dược phẩm, mỹ phẩm, thực phẩm như: tinh dầu gừng, tinh dầu quế, vani, tinh dầu hương thảo, tinh dầu xô thơm, tinh dầu xạ hương, cafein, chất mầu oleoresin [30].

Các sáng chế nêu trên đều đáp ứng được các mục đích và yêu cầu cụ thể của một giải pháp kỹ thuật. Tuy nhiên, đây là phương pháp chiết xuất ra tinh dầu quế, các sáng chế này không đề cập đến sử dụng loại dung môi nào với nồng độ bao nhiêu nhằm chiết xuất được hàm lượng hoạt chất cinnamyl axetat chiếm tỷ lệ bao nhiêu phần trăm (%) cao nhất tính theo trọng lượng trong dịch được trích ly từ vỏ quế.

Nghiên cứu về quy trình tách chiết hoạt chất từ vỏ cây quế đã được thực hiện, tuy nhiên quy trình mới dừng lại ở bước sử dụng sắc ký lớp mỏng TLC và tách được hoạt chất có hoạt tính diệt tuyến trùng tuổi *Bursaphelenchus xylophilus* và nấm bệnh *Rhizoctonia solani*, chưa xác định được tên hoạt chất có hoạt tính [32], [40]. Sau đó hợp chất có hoạt tính từ cao chiết vỏ quế đã được xác định là cinnamyl acetate [33], tuy nhiên chưa xác định được tỷ lệ phần trăm của CA trong vỏ quế và trong CCQ, bên cạnh đó chưa xác định được điều kiện tối ưu trong quá trình tách chiết.

Chương III

QUY TRÌNH CÔNG NGHỆ TÁCH CHIẾT VÀ HOẠT TÍNH CỦA CINNAMYL ACETATE

3.1. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

3.1.1. Vật liệu nghiên cứu

3.1.1.1. Vỏ quế và chitosan

Vỏ quế có nguồn gốc từ huyện Trà My, tỉnh Quảng Nam; Chitosan có nguồn gốc từ Công ty Sokcho Mulsan, 76 Nonggongdanji-gil, Sokcho-si, Gangwon-do 24899, Hàn Quốc. Thông số kỹ thuật bao gồm: Độ deaxetyl hóa 96,75%, độ ẩm 7,4%, tro 0,56% (600^0C, 4 giờ), hàm lượng kim loại nặng Asen và chì nhỏ hơn 2 ppm, không nhiễm khuẩn và độ an toàn chung.

3.1.1.2. Tuyến trùng và nấm bệnh

Tuyến trùng *Meloidogyne incognita* và *Pratylenchus coffeae* được phân lập từ vườn cà phê và hồ tiêu bị bệnh. Nấm bệnh *Rhizoctonia solani, Fusarium solani, Fusarium oxysporum, Phytophthora capsici* được phân lập từ vườn cà phê và hồ tiêu bị bệnh. Thí nghiệm trên cà phê sẽ được sử dụng mẫu phân lập từ vườn cà phê; Thí nghiệm trên hồ tiêu sẽ được sử dụng mẫu phân

lập từ vườn hồ tiêu. Tuyến trùng và nấm do bộ môn Bảo vệ thực vật, Viện Khoa học Kỹ thuật Nông Lâm nghiệp Tây Nguyên phân lập.

3.1.1.3. Hóa chất

Dung môi methanol, *n*-hexane, ethyl acetate, chloroform, *n*-butanol từ công ty hóa chất. Tấm sắc ký Silica gel 60 F_{254}, silica gel, Sephadex LH-20 từ hãng Merck (Darmstadt, Đức). Hóa chất phục vụ cho nghiên cứu được mua có nguồn gốc rõ ràng, chất lượng đảm bảo theo tiêu chuẩn.

3.1.1.4. Thiết bị

Hệ thống máy cất quay chân không (1 lít) sử dụng để nghiên cứu tách chiết (Heidolph-Đức); hệ thống máy cất quay chân không công nghiệp (20 lít), các thiết bị máy móc để vận hành, đóng chai CPSH; máy quang phổ UV-VIS (CECIL-Anh). Hệ thống sắc ký khí ghép khối phổ GC-MS (Agilent-Mỹ), các thiết bị phân tích sắc ký lớp mỏng (TLC), sắc ký cột... đủ điều kiện để thực hiện các nội dung quy trình công nghệ tách chiết. Hệ thống phòng thí nghiệm với đầy đủ trang thiết bị máy móc để phân lập tuyến trùng, nấm bệnh, theo dõi đánh giá các chỉ tiêu nghiên cứu; hệ thống nhà lưới khép kín, đảm bảo cho bố trí thí nghiệm. Phân tích phổ ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR (BRUCKER AV ở tần số 500 MHz cho ^{1}H-NMR và 125 MHz cho ^{13}C-NMR)...

3.1.2. Phương pháp phân lập CA

10 kg vỏ quế khô được cắt nhỏ 5 - 10 cm, cho vào thùng (thể tích phụ thuộc vào số lượng mẫu), sử dụng dung môi MeOH

(80%) với tỷ lệ vỏ quế/MeOH là 1/5 theo khối lượng/thể tích. Sau 3 - 5 ngày thu được dịch chiết đợt 1, tiếp tục bổ sung MeOH 80% vào và tiến hành tương tự để thu được dịch chiết đợt 2. Thu được dịch chiết MeOH 80% có màu nâu đậm. Cô dung môi MeOH bằng máy cất quay chân không (Eyela N-1000) ở nhiệt độ 40 - 45^{o}C, 150 vòng/phút để loại bỏ hoàn toàn lượng MeOH, tiếp tục chuyển đến máy thăng hoa (Freeze Dryer) để đông khô mẫu (loại bỏ nước) thu được cao chiết từ vỏ quế (CCQ) có màu nâu đậm, mùi thơm của quế. Tiếp tục phân tán CCQ trong nước và chiết tách lớp bằng dung môi *n*-hexane với thể tích theo tỷ lệ nước : *n*-hexane là 1 : 1 theo thể tích. Lắc đều trong vòng 3 - 5 phút, để lắng đọng tạo phân lớp thành 2 màu, trong đó lớp của dung môi *n*-hexane nổi lên phía trên có màu xanh nhạt hơi vàng và phần phía dưới là hệ dung môi nước có màu nâu. Phần dịch từ dung môi *n*-hexane sẽ được cô bằng máy cất quay chân không thu được cao phân đoạn *n*-hexane.

Cao phân đoạn *n*-hexane được sử dụng để tách chiết CA bằng cách sử dụng sắc ký cột với chất hấp phụ là silica gel với hệ dung môi là *n*-hexane : ethyl acetate, thu được dịch từ hệ dung môi *n*-hexane : ethyl acetate ở tỷ lệ 80:20 (v:v). Phần dịch này sẽ được cô bằng máy cất quay chân không thu được chất rắn phân đoạn *n*-hexane : ethyl acetate ở tỷ lệ 80:20 (v/v). Chất rắn này sẽ được sử dụng để chạy sắc ký cột với hệ dung môi môi là *n*-hexane : ethyl acetate, thu được chất rắn từ hệ dung môi *n*-hexane : ethyl acetate ở tỷ lệ 15:1 (v:v). Phần dịch này sẽ được cô bằng máy cất quay chân không thu được chất rắn phân đoạn hệ dung môi *n*-hexane : ethyl acetate ở tỷ lệ 15:1 (v:v). Phần chất rắn này tiếp tục được chạy sắc ký cột với chất hấp phụ là

sephadex LH-20, thu được dịch từ sephadex LH-20. Phần dịch này sẽ được cô bằng máy cất quay chân không thu được chất rắn từ sephadex LH-20. Chất rắn thu được có màu trắng đục được kiểm tra sơ bộ qua sắc ký lớp mỏng trước khi đo phổ để xác định cấu trúc.

Sử dụng phương pháp khảo sát bằng sắc ký bản mỏng TLC và sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC để xác định mức độ chất tinh khiết. Cấu trúc của chất tinh khiết được xác định bằng các phương pháp phổ: sắc ký khí ghép khối phổ GC-MS tại Phòng phân tích kiểm định chất lượng nông sản, Viện Cây lương thực và Cây thực phẩm; ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR (Brucker AV ở tần số 500 MHz cho ^{1}H-NMR và 125 MHz cho ^{13}C-NMR) tại Viện Hóa học, Viện hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

3.1.2.1. Phương pháp sắc ký bản mỏng (Thin layer chromatography-TLC)

Phát hiện vệt chất bằng đèn tử ngoại ở bước sóng $\lambda = 254$ nm và các thuốc thử $Ce(SO_4)_2/H_2SO_4$ đặc và vanilin/H_2SO_4 đặc. Là kỹ thuật sắc ký được sử dụng khá phổ biến trong công nghệ tách chiết, xác định chất. Trong phương pháp sắc ký lớp mỏng, thành phần trong hỗn hợp được xác định nhờ so sách hệ số lưu của hỗn hợp Rf và hệ số lưu Rf của một số chất đã biết. Nhỏ một lượng mẫu thử (~20 µl) lên tấm sắc ký đã được đánh dấu khoảng 1 cm từ dưới lên. Bản sắc ký sau đó được nhúng vào một dung môi thích hợp, như ethanol hoặc nước, và được đặt vào trong một vật chứa có nắp. Dung môi di chuyển lên bản sắc ký bởi mao dẫn, gặp phải mẫu thử và dịch chuyển mẫu thử lên bản sắc kí. Các hợp chất khác nhau trong hỗn hợp mẫu thử dịch chuyển với tốc

độ khác nhau do chúng có sức hút khác nhau đối với pha tĩnh, và độ tan khác nhau trong dung môi. Sau khi mẫu chuyển động lên hết tấm sắc ký, mẫu TLC F_{254} (20 × 20 cm) sẽ được xem dưới đèn tia cực tím tại bước sóng 254 nm (Vilber Lourmat) để phát hiện số lượng thành phần có trong hỗn hợp đem sắc ký.

3.1.2.2. Phương pháp sắc ký cột (Column chromatography-CC)

Sử dụng sắc ký cột Silica gel với các dung môi có tỷ lệ khác nhau của hexane và ethyl aceta để tách bằng cách tăng dần mức độ phân cực của dung môi. Sau đó các chất này sẽ tiếp tục tách bằng phương pháp sắc ký cột sử dụng Sephadex LH-20 để tách chiết theo trọng lượng phân tử.

3.1.2.3. Phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (High performance liquid chromatography-HPLC)

Là phương pháp sắc ký phân tách và định lượng sinh chất dưới áp suất cao, giúp giảm đáng kể thời gian và hiệu quả, chất lượng phân tích. Ưu điểm là giảm thời gian tách và thu mẫu nhờ quá trình sắc ký được thực hiện dưới áp suất nén cao, chất mang thường là polymer hữu cơ như polystyren hoặc hạt silicagel. Chất tinh chế từ dịch chiết xuất vỏ quế sẽ được kiểm tra bằng cách sử dụng hệ thống HPLC với cột C18 (7,8 mm i.d. × 300 mm, 10 µm Thermo Hypersil) và dung môi acetonitrile : nước (30 : 70, v/v) với dòng chảy là 1 ml/phút. Ở các hệ thống liên tục như HPLC, các hợp chất được chiết xuất bởi chất chiết xuất, mức lưu giữ được đo bằng thời gian lưu (Retention time) Rt hay tR, khoảng thời gian giữa tiêm (injection time) và phát hiện (detection time).

3.1.2.4. Phương pháp phân tích phổ (Nuclear magnetic resonance: ^{1}H-NMR và ^{13}C-NMR)

Là hiện tượng một hạt nhân nguyên tử nằm trong từ trường hấp thu hoặc phát xạ một bức xạ điện từ. Cộng hưởng từ hạt nhân cũng được xem là một nhóm các phương pháp khoa học áp dụng cộng hưởng từ hạt nhân vào việc nghiên cứu các phân tử. Sau các bước tách chiết và kiểm tra lại độ tinh khiết của chất được tách chiết bằng phương pháp sắc ký lỏng áp suất cao (HPLC), chuẩn bị khoảng 10 mg của chất đã tinh chế bằng cách hòa tan trong dung môi metanol-d (CD_3OD) và cho vào ống chuyên dụng để phân tích NMR. Mẫu sẽ được phân tích NMR để xác định số lượng H và gốc C. Cộng hưởng từ hạt nhân sẽ được ghi nhận trên thiết bị Bruker DRX 500 NMR, hoạt động tại 500 MHz để đo ^{1}H-NMR và 125 MHz để đo ^{13}C-NMR. Các bước được tiến hành ở điều kiện nhiệt độ phòng. Sử dụng CD_3OD như một dung môi và trimethylsilane như một chất nền bên trong. Đây là công nghệ hiện đại và rất mới ở Việt Nam, cần phải có các chuyên gia hỗ trợ giúp đỡ để hoàn thiện tốt.

3.1.2.5. Phương pháp sắc ký khí khối phổ (GC-MS)

Là phương pháp nghiên cứu các chất bằng cách đo, phân tích chính xác khối lượng phân tử của chất đó dựa trên sự chuyển động của các ion nguyên tử hay ion phân tử trong một điện trường hoặc từ trường nhất định. Tỷ số giữa khối lượng và điện tích (m/z) có ảnh hưởng rất lớn đối với chuyển động này của ion. Nếu biết được điện tích của ion thì ta dễ dàng xác định được khối lượng của ion đó. Trong nghiên cứu khối phổ của bất kỳ chất nào, trước tiên nó phải được chuyển sang trạng thái bay

hơi, sau đó được ion hoá bằng các phương pháp thích hợp. Các ion tạo thành được đưa vào nghiên cứu trong bộ phân tích khối của máy khối phổ. Tùy theo loại điện tích của ion nghiên cứu mà người ta chọn kiểu quét ion dương (+) hoặc âm (-). Kiểu quét ion dương thường cho nhiều thông tin hơn về ion nghiên cứu nên được dùng phổ biến hơn. Tách sắc ký được thực hiện trên một khối phổ kế Agilent 1100 được trang bị bộ phun điện tử (ESI) can thiệp, một máy bơm nhị phân, lò cột, và một mảng đầu dò diode (Agilent Technology, Santa Clara, CA, USA). Tách sắc ký của các chất phân tích đã thu được trên cột C18 (kích thước hạt 5 mm, 250 × 4,6 mm, Agilent Technology). Pha động là 5,0% axetonitril/nước với tốc độ dòng chảy 1,0 ml/phút. Tỷ lệ phân chia sau cột được thiết lập tỷ lệ 3: 1 trước khi rửa giải được chuyển đến ESI. Khối lượng đưa vào là 20 µl cho tất cả các phân tích. TOF-MS đã được thực hiện trong chế độ cực âm sử dụng nhiều phản ứng giám sát (MRM). Các điều kiện tối ưu của giao diện như sau: ion phun điện 24.500 V, áp lực khí Heli (He) là 1,3 m Torr và 40 psi, và tốc độ dòng chảy của khí máy phun sương (N2) và khí khô (N2) tương ứng là 40 psi và 8,0 l/phút. Nhiệt độ khô đã được cài đặt đến 350ºC. Phân tích được phát hiện bằng cách khối phổ bẫy MS sử dụng MRM với thời gian dừng tại 100 ms.

3.1.3. Phương pháp phân lập, nhân nuôi tuyến trùng và nấm

3.1.3.1. Phương pháp tách lọc tuyến trùng từ đất

Mẫu được lấy theo phương pháp 5 điểm chéo góc: Gạt bỏ lớp đất bề mặt quanh vùng rễ (khoảng 5 cm) dưới mép tán cây, đào sâu xuống khoảng 15 - 20 cm từ mặt đất và thu khoảng 1 kg đất,

10 g rễ [6]. Mẫu đất và rễ được đựng trong túi nilon, một đầu được buộc bằng dây chun và được ghi đầy đủ các thông tin như: số thứ tự, ngày thu, cây chủ, địa điểm. Mẫu thu được bảo quản trong thùng ổn nhiệt và vận chuyển về phòng thí nghiệm tách lọc tuyến trùng. Tuyến trùng được tách lọc từ đất theo phương pháp được mô tả của Nguyễn Ngọc Châu (2003) [6]: Mẫu đất trộn đều và định lượng 250 g, cho vào 2 lít nước, bóp vụn và khuấy đều, gạn cặn thô từ 5 - 7 lần. Sau đó, dịch huyền phù thô được chuyển qua các rây lọc đường kính 250, 63, 40 µm và giữ lại phần cặn ở rây 40 µm chuyển qua lọc tĩnh với rây lọc đường kính 85 × 25 mm và kích thước lỗ rây 63 µm trên đĩa petri đường kính 90 × 30 mm. Sau 48 giờ, thu dung dịch tuyến trùng chui qua rây lọc dưới đáy đĩa petri.

3.1.3.2. Phương pháp tách lọc tuyến trùng từ rễ

Phương pháp tách lọc tuyến trùng từ rễ thực hiện theo mô tả của Nguyễn Ngọc Châu, (2003) [6]: Rễ rửa sạch, trộn đều và định lượng 5g. Cắt nhỏ 0,5 - 1,0 cm thêm vào 250 ml nước, cho vào máy xay với tốc độ 12.600 vòng trong 30 giây. Dịch rễ xay cho qua rây lọc thô có kích thước lỗ rây 100µm để loại bỏ các phần rễ to. Phần dịch còn lại được lọc qua rây lọc có đường kính 85 × 25 mm và kích thước lỗ rây 63 µm trên đĩa petri đường kính 90 × 30 mm để thu tuyến trùng. Mẫu rễ sau khi tách lọc sẽ được đưa lên đĩa đếm, đặt lên kính hiển vi soi nổi để đếm số lượng tuyến trùng bắt gặp. Đối với các mẫu rễ có nốt sần sẽ được soi trực tiếp dưới kính hiển vi soi nổi, các nốt sần sẽ được cắt riêng thành từng đoạn 0,5 - 1 cm, dùng kẹp và kim nhọn tách con cái và túi trứng từ những nốt sần. Phương pháp tách trứng, ấu trùng

từ rễ phục vụ cho nhân nuôi: Mẫu nốt sần rễ được đặt lên kính hiển vi soi nổi, sử dụng kim nhọn và panh kẹp để tách từng con cái và túi trứng chứa trong các nốt sần. Mỗi mẫu được tách từ 10 - 20 cá thể cái có kèm túi trứng của từng con cái, trứng sẽ được để riêng ra đĩa petri và ủ ở nhiệt độ 25ºC từ 5 - 7 ngày sẽ nở để thu ấu trùng phục vụ cho nhân nuôi thuần.

3.1.3.3. Nhân nuôi tuyến trùng sần rễ Meloidogyne incognita

Tuyến trùng *Meloidogyne incognita* được nhân nuôi trên cây cà chua theo phương pháp được mô tả của López-Pérez và cộng sự (2011) [63], có hiệu chỉnh. Hạt cà chua được khử trùng bề mặt bằng ethanol 70% trong thời gian 5 phút, vớt ra rửa sạch rồi cho vào dung dịch natri hypochlorite (NaOCl) 1% trong vòng 15 phút để loại trừ các vi sinh vật gây bệnh bên ngoài vỏ hạt và gieo trong các cốc chứa 250g đất đã khử trùng (ở 121ºC, áp suất 1atm trong 60 phút) (số lượng 1 cây/1 chậu), cho đến khi cây 2 được hai lá thật thì tiến hành thả tuyến trùng với lượng 200 ấu trùng/cốc hoặc số trứng đã nở ra từ 1 túi trứng riêng biệt. Sau 50 - 60 ngày thì thu hoạch tuyến trùng.

Thu trứng và ấu trùng phục vụ thử nghiệm: Rễ cây cà chua được rửa sạch cho hết đất, cân 10 - 20 g rễ cắt nhỏ 2 - 5 mm và cho vào lọ thủy tinh dung tích 1 lít có nắp đậy kín, thêm 100 ml dung dịch NaOCl 0,5% và lắc mạnh trong 10 phút để phá vỡ lớp vỏ bên ngoài của rễ làm cho con cái, ấu trùng và trứng bong ra, ấu trùng được thu qua rây lọc (đường kính lỗ rây 40 µm), trứng được thu ở rây lọc (đường kính lỗ rây 25 µm) và được rửa nhiều lần bằng nước sạch để loại bỏ NaOCl [64].

3.1.3.4. Nhân nuôi tuyến trùng gây vết thương rễ Pratylenchus coffeae

Tuyến trùng *P. coffeae* được nhân nuôi trên cà rốt theo mô tả của O'Bannon và Taylor (1968) [44]: Miếng cà rốt dày 2 - 4 mm từ củ cà rốt cắt trước đó, rửa sạch, nhúng trong ethanol 95% sau đó được hơ qua lửa, được đặt trong đĩa petri nhỏ. *Pratylenchus* được đặt rìa bên cạnh của miếng cà rốt.

3.1.3.5. Phương pháp nhân nuôi nấm

Nấm *Rhizoctonia solani*, *Fusarium solani* và *Fusarium oxysporum* được phân lập trên vườn cà phê, hồ tiêu bị bệnh và được nuôi cấy trên môi trường Potato Dextrose Agar (PDA) theo mô tả của Burgess và cộng sự (2008) [17],.

Nấm *Phytotpthora capsici* được bẫy nấm từ dung dịch đất bằng cánh hoa hồng theo mô tả của Burgess và cộng sự (2008) [17], nấm được nhân nuôi trên môi trường Potato Carrot Agar (PCA).

3.1.3.6. Xác định tính kháng nấm điều kiện phòng

Phương pháp xác định hoạt tính kháng nấm được mô tả theo phương pháp của Soylu và cộng sự [52] có điều chỉnh:

Chuẩn bị môi trường PDA: Cân 39 g PDA hòa tan 1 lít nước, cho vào các bình tam giác có chứa 100 ml môi trường PDA, khử trùng 121^{o}C trong 30 phút. Sau khi PDA giảm nhiệt độ sẽ được đổ vào đĩa petri (10 ml/đĩa).

Cấy nấm: Một mảnh nấm khoảng 6 mm cắt từ đĩa nấm được nuôi từ trước, đặt vào ngay trung tâm của đĩa môi trường PDA, ủ nhiệt độ 25^{o}C sau 24 giờ.

Đánh giá hoạt tính: Đặt 4 đĩa giấy (đã được khử trùng) đường kính 3 mm, dày 0,5 mm vào 4 hướng của đĩa PDA (lúc này sợi

nấm đã bắt đầu phát triển). Nhỏ khoảng 30 µl chất cần thử lên đĩa giấy sao cho không bị tràn ra ngoài. 4 đĩa giấy tương ứng với 4 công thức trong đó đối chứng là nhỏ nước cất hoặc MeOH, 3 đĩa còn lại là 3 công thức với nồng độ thử khác nhau. Ủ đĩa nấm ở nhiệt độ 25^{o}C, sau 3 ngày đưa ra đánh giá hoạt tính. Tỷ lệ ức chế được tính theo công thức:

$$\text{Tỷ lệ ức chế (\%)} = \frac{(\text{Chiều dài khuẩn lạc CT ĐC} - \text{Chiều dài KL CT xử lý})}{\text{Chiều dài khuẩn lạc ở CT ĐC}} \times 100$$

3.1.3.7. Xác định tính kháng tuyến trùng điều kiện phòng

Tỷ lệ trứng nở (%) và tỷ lệ chết của ấu trùng (%) được chuyển sang hàm Asin ((x/100)^1/2) và phân tích so sánh ANOVA trong chương trình thống kê SAS 9.1. Các giá trị trung bình được gắn các ký tự giống nhau trên cùng một cột là không sai khác có ý nghĩa thống kê. Theo dõi tỷ lệ trứng nở và ấu trùng tuyến trùng chết trên kính hiển vi soi nổi Olympus SZX12.

$$\text{Tỷ lệ (\%)trứng nở} = \frac{\text{số trứng ấu trùng nở ra}}{\text{số lượng trứng ban đầu}} \times 100$$

$$\text{Tỷ lệ (\%) chết} = \frac{(\text{số lượng ấu trùng đầu} - \text{số lượng ấu trùng còn sống})}{\text{số lượng ấu trùng đầu}} \times 100$$

3.1.4. Phương pháp xử lý số liệu, thống kê

Tỷ lệ trứng nở (%) và tỷ lệ chết của ấu trùng (%) được chuyển sang hàm Asin ((x/100)^1/2) và phân tích so sánh ANOVA trong chương trình thống kê SAS 9.1. Những số liệu % được quy đổi sang arcsin hay căn bậc hai. Những số liệu mật độ tuyến trùng được chuyển sang log(x + 1) trước khi đưa vào xử lý

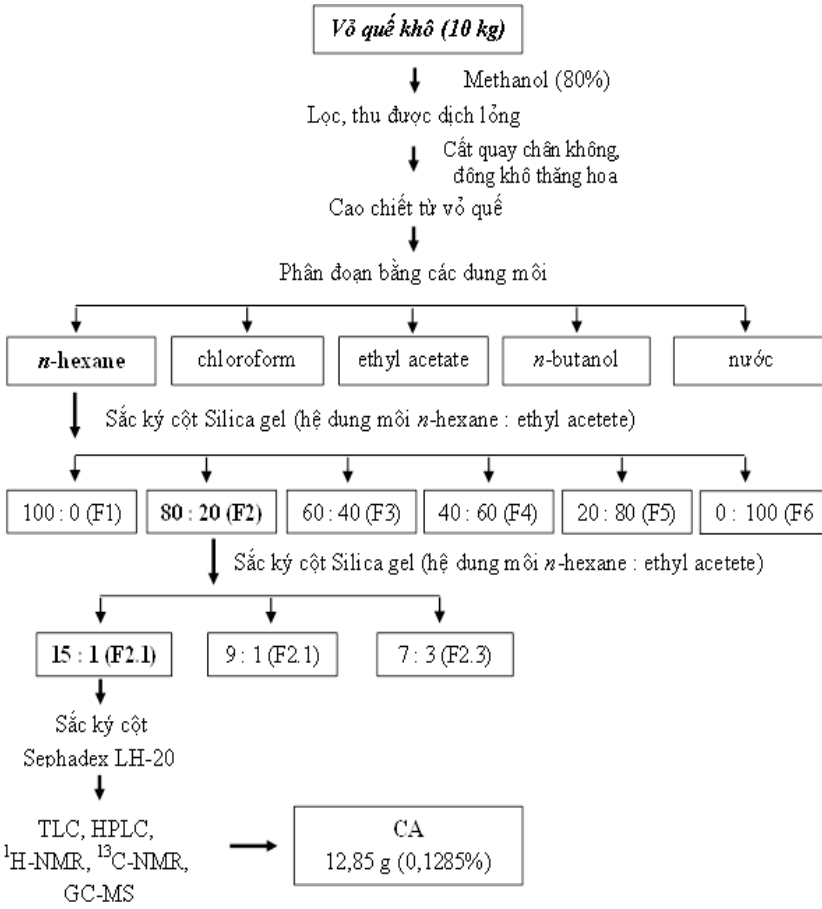
thống kê. Các giá trị trung bình được gắn các ký tự giống nhau trên cùng một cột là không sai khác có ý nghĩa thống kê.

3.2. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.2.1. Tách chiết Cinnamyl acetate (CA) trong phòng thí nghiệm

Bảng 3.1. Quy trình công nghệ tách chiết CA cũ và mới

TT	Nội dung	Công nghệ và quy trình cũ	Công nghệ và quy trình mới
1	Chiết vỏ quế bằng các dung môi	-Dung môi MeOH 99% - Cao chiết vỏ quế (CCQ) đạt 4,0% [32], [33]. - Phân đoạn dung môi *n*-hexane, cao thu hồi đạt 7,95% [33].	-Dung môi MeOH 80% - Cao chiết vỏ quế (CCQ) đạt 5,08%. - Phân đoạn dung môi *n*-hexane, cao thu hồi đạt 26,55%.
2	Tách chiết hoạt chất	- Sử dụng sắc ký cột với chất hấp phụ là silica gel với 1 lần tách ở hệ dung môi *n*-hexane:chloroform [33]. - Không sử dụng chất hấp phụ Sephadex LH-20.	- Sử dụng sắc ký cột với chất hấp phụ là silica gel với 2 lần tách ở hệ dung môi là *n*-hexane : ethyl acetate. - Sử dụng sắc ký cột với chất hấp phụ là Sephadex LH-20
3	Xác định độ tinh chất	-TLC - Không sử dụng HPLC	-TLC - HPLC
4	Xác định cấu trúc hoạt chất	-^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR - MS - Chưa xác định được tỷ lệ hoạt chất	-^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR - GC/MS - Đã xác định được tỷ lệ CA chiếm 0,1285%.



Hình 3.1. Quy trình công nghệ tách chiết cinnamyl acetate

3.2.1.1. Chiết vỏ quế bằng các dung môi

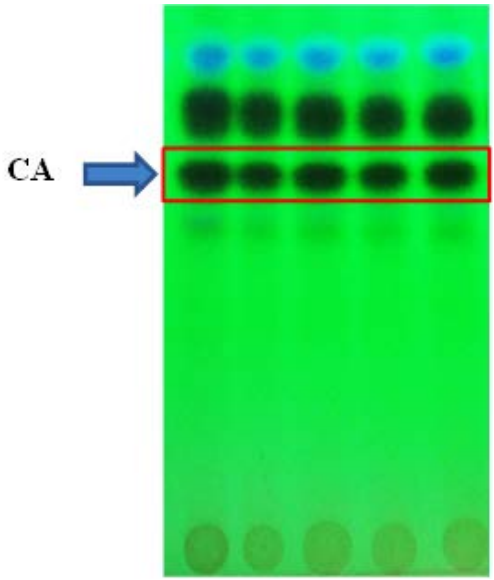
Vỏ quế 10 kg đã được tách chiết bằng 50 lít MeOH 80%. Sau chi tách chiết thu hồi được dịch và dịch được làm khô dung môi MeOH bằng máy cất quay chân không, thu được cao chiết từ vỏ

quế (CCQ) với khối lượng 0,508 kg (tương đương 5,08% vỏ quế). Để loại dần các chất không có hoạt tính trong CCQ, tiến hành tách phân đoạn bằng các dung môi khác nhau, kết quả thu được ở bảng sau.

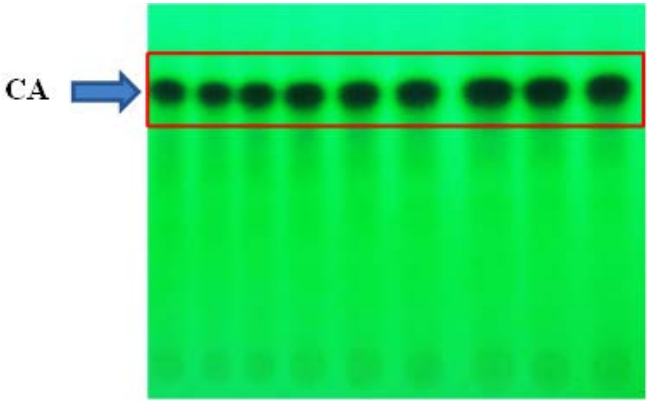
Bảng 3.2. Khối lượng cao thu được từ vỏ quế ở phân đoạn dung môi

Dung môi chiết xuất	Khối lượng cao (kg)	Tỷ lệ (%)
n-hexane	0,135	26,55
Chloroform	0,098	19,24
Ethyl acetate	0,110	21,70
n-butanol	0,146	28,83
Nước	0,019	3,68
Tổng	0,508	100

Sau khi thử hoạt tính kháng tuyến trùng và kháng nấm của chất chiết xuất từ phân đoạn các dung môi, kết quả cho thấy phân đoạn từ dung môi *n*-hexane cho hoạt tính kháng cao trong điều kiện phòng thí nghiệm. Sử dụng cao thu được từ phân đoạn *n*-hexane để làm sạch bằng cách chạy sắc ký cột với hệ dung môi *n*-hexane : ethyl acetate theo các tỷ lệ khác nhau. Thu được chất có hoạt tính ở hệ dung môi *n*-hexane : ethyl acetate với tỷ lệ thu hồi là 22,16%. Cao thu được từ hệ dung môi này tiếp tục được làm sạch sắc ký cột và thu được chất có hoạt tính ở hệ dung môi *n*-hexane : ethyl acetate = 15 : 1 với tỷ lệ thu hồi 69,65%.

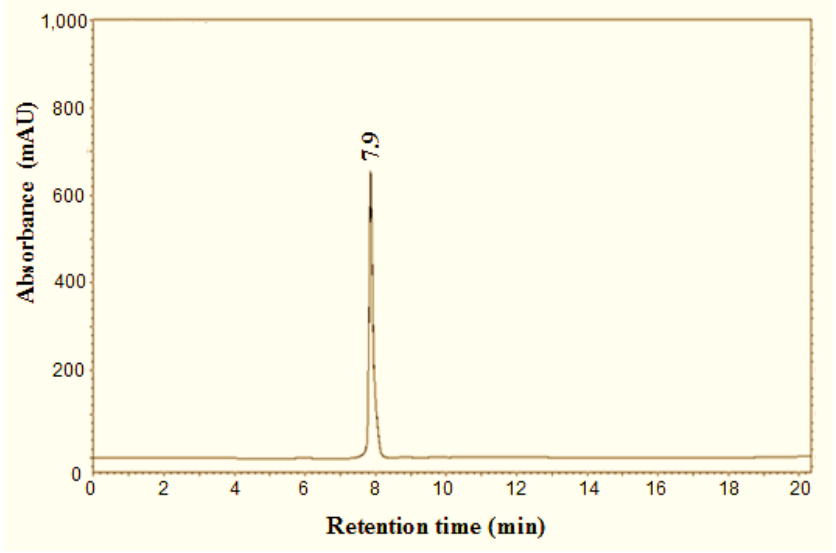


Hình 3.2. Sắc ký đồ của các phân đoạn trong quá trình chiết tách CA từ cao MeOH vỏ quế



Hình 3.3. Sắc ký đồ kiểm tra độ tinh sạch trong quá trình chiết tách từ cao MeOH vỏ quế sau khi tách bằng Sephadex LH-20.

3.1.1.2. Sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC)



Hình 3.4. Sắc ký đồ xác định độ tinh của CA bằng phương pháp HPLC

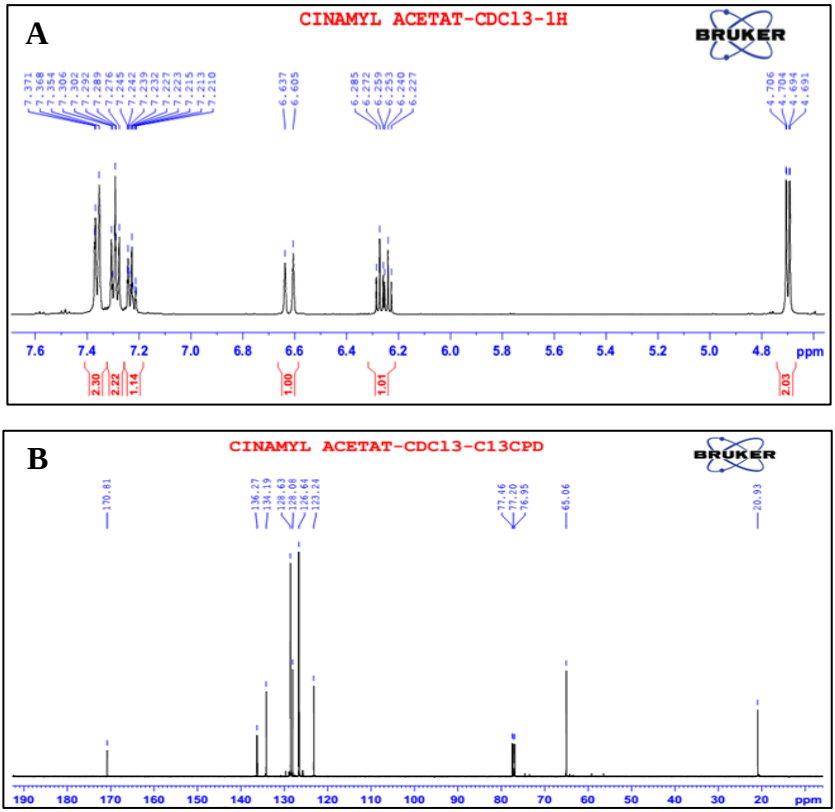
Hợp chất thu được có dạng rắn, màu trắng đục, được sử dụng để phân tích khối phổ ^{1}H-NMR và ^{13}C-NMR.

3.1.1.3. Cộng hưởng từ hạt nhân ^{1}H-NMR và ^{13}C-NMR

Kết quả phân tích cộng hưởng từ hạt nhân của CA từ CCQ thu được kết quả như sau:

Phổ ^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ = 4.69 - 4.70, 6.22 - 6.28, 6.60, 6.63, 7.21 - 7.37 (hình 3.5A)

Phổ ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$): δ = 20.93, 65.06, 76.95, 77.20, 77.46, 123.24, 126.64, 128.08, 128.63, 134.19, 136.27, 170.81 (hình 3.5B).



Hình 3.5. Phổ 1H-NMR (A) và 13C-NMR (B) của CA tinh chế từ vỏ quế: Phổ 1H-được xác định trong dung môi Chloroform-d (CDCl3) tại bước sóng 500 MHz; Phổ 13C-được xác định trong dung môi Chloroform-d (CDCl3) tại bước sóng 125 MHz.

3.2.1.4. Sắc ký khí khối phổ (GC-MS)

Kết quả phổ GC-MS (hình 3.6) cho thấy: cụm pic ion phân tử dạng $[M]^+$, rất phù hợp với khối lượng phân tử và sự phân mảnh

công thức cấu tạo của cinnamyl acetate dạng [$C_{11}H_{12}O_2$], với khối lượng phân tử là 176.

Hình 3.6. Sắc ký khí khối phổ (GC-MS) của CA

3.2.2. Xác định nồng độ của CA sử dụng hiệu quả phòng trừ tuyến trùng gây hại rễ cây cà phê và hồ tiêu

Bảng 3.3. Tỷ lệ chết của *M. incognita* và *P. coffeae* sau khi xử lý CA

Công thức	*M. incognita* (%)			*P. coffeae* (%)		
	30 phút	60 phút	90 phút	30 phút	60 phút	90 phút
CT1	8,3^{d}	15,0^{d}	26,7^{c}	5,0^{d}	8,3^{d}	23,3^{d}
CT2	30,0^{c}	46,7^{c}	63,3^{b}	26,7^{c}	36,7^{c}	58,3^{c}
CT3	66,7^{b}	80,0^{b}	85,0^{ab}	55,0^{b}	56,7^{b}	81,7^{b}
CT4	81,7^{a}	86,7^{a}	98,3^{a}	65,0^{ab}	70,0^{a}	93,3^{a}
CT5	83,3^{a}	96,7^{a}	100,0^{a}	73,3^{a}	78,3^{a}	95,0^{a}
CT6	1,7^{d}	6,7^{d}	6,7^{d}	1,7^{d}	5,0^{d}	5,0^{e}
CT7	3,3^{d}	8,3^{d}	10,0^{d}	0,0^{d}	6,7^{d}	6,6^{e}

Ghi chú: Công thức 1 (CT1): 10 ppm; CT2: 50 ppm; CT3: 100 ppm; CT4: 200 ppm; CT5: 500 ppm; CT6: MeOH (ĐC1), CT7: nước (ĐC2).

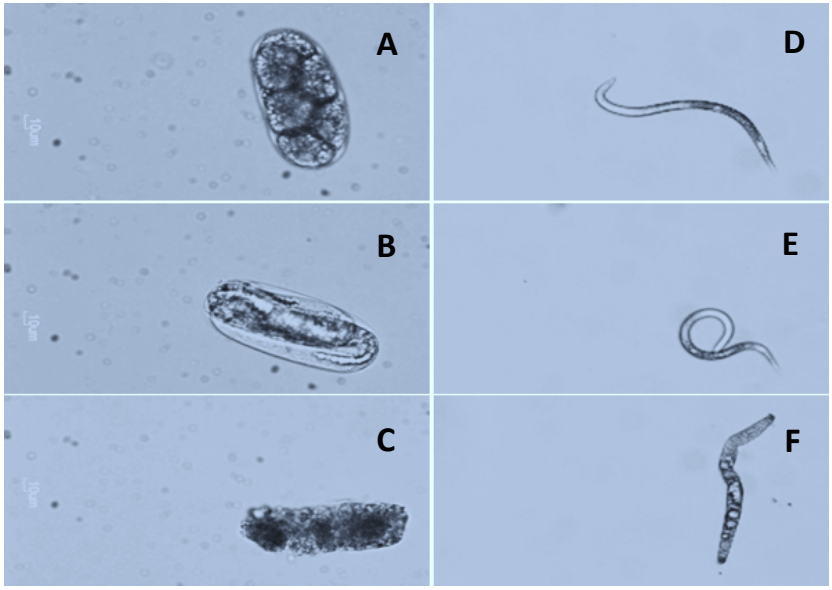
Kết quả bảng 3.3 cho thấy tỷ lệ chết của tuyến trùng khác nhau ở các nồng độ xử lý CA khác nhau. Tuy nhiên, khi tăng nồng độ xử lý CA lên 500 ppm, cho kết quả không khác biệt về thống kê so với ở nồng độ 200 ppm. Điều này có thể kết luận, chỉ cần xử lý CA ở nồng độ 200 ppm sau 90 phút sẽ cho hiệu quả cao nhất. CA nồng độ 200 ppm có hiệu quả phòng trừ *M. incognita* là > 98% sau 90 phút xử lý và *P. coffeae* là > 93% sau 90 phút xử lý. Hai công thức đối chứng xử lý MeOH (CT6) và nước (CT7) cho thấy tỷ lệ chết của tuyến trùng ở mức thấp chiếm 0 - 7%. Điều này có thể kết luận rằng sự gây chết tuyến trùng *M. incognita* và *P. coffeae* là do hoạt chất của CA.

Bảng 3.4. Tỷ lệ ức chế trứng M. incognita và P. coffeae nở của CA

Công thức	*M. incognita* (%)		*P. coffeae* (%)	
	3 ngày	6 ngày	3 ngày	6 ngày
CT1	13,3^{d}	13,3^{c}	11,6^{c}	16,6^{d}
CT2	20,0^{c}	20,0^{c}	16,7^{c}	23,3^{c}
CT3	51,7^{b}	53,3^{b}	46,6^{b}	53,3^{b}
CT4	78,3^{a}	80,0^{a}	75,0^{a}	83,0^{a}
CT5	83,3^{a}	81,6^{a}	76,7^{a}	83,3^{a}
CT6	1,7^{e}	1,7^{d}	1,6^{d}	1,7^{e}
CT7	3,3^{e}	3,3^{d}	3,3^{d}	3,3^{e}

Ghi chú: Công thức 1 (CT1): 10 ppm; CT2: 50 ppm; CT3: 100 ppm; CT4: 200 ppm; CT5: 500 ppm; CT6: MeOH (ĐC1), CT7: nước (ĐC2).

Giữa các công thức xử lý khác nhau cho kết quả ức chế khác nhau. Công thức 4 và công thức 5 cho khả năng ức chế trứng nở cao, tuy nhiên không có sự khác biệt thống kê giữa 2 công thức này. Sau 6 ngày xử lý CA nồng độ 200 ppm cho khả năng ức chế trứng nở là 80% đối với *M. incognita* và 83% đối với *P. coffeae.* Các công thức đối chứng xử lý MeOH (CT6) và nước (CT7) cho thấy tỷ lệ trứng nở cao trên 97%. Điều này có thể kết luận rằng sự ức chế trứng nở là do hoạt chất của CA.



Hình 3.7. (A) Trứng tuyến trùng trước xử lý; (B) Trứng tuyến trùng sau 3 ngày (ĐC); (C) Trứng tuyến trùng sau 3 ngày xử lý CA nồng độ 200 ppm; (D) Tuyến trùng J2 trước xử lý; (E) Tuyến trùng J2 sau 1 giờ (ĐC); (F) Tuyến trùng J2 sau 12 giờ xử lý CA nồng độ 200 ppm.

3.2.3. Xác định nồng độ của CA sử dụng hiệu quả phòng trừ nấm bệnh gây hại rễ cây cà phê và hồ tiêu

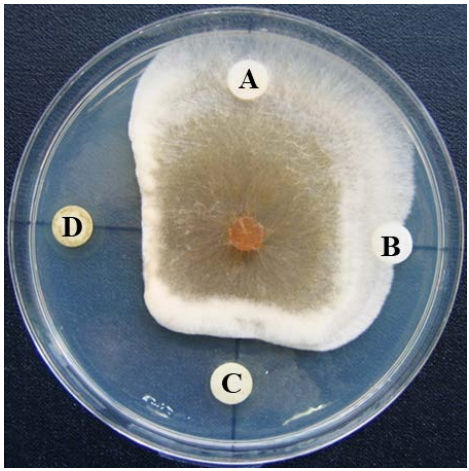
Bảng 3.5. Hiệu quả ức chế (%) của CA đến sinh trưởng phát triển của nấm bệnh

Công thức	Chủng nấm			
	R. solani	*F. solani*	*F. oxysporum*	*P. capsici*
CT1	7,0	8,3	5,2	5,8
CT2	21,4	15,7	16,4	9,4
CT3	50,6	28,8	28,8	22,6
CT4	81,5	45,6	44,3	47,9
CT5	83,8	49,5	54,2	51,5
CT6	0	0	0	0
CT7	0	0	0	0
LSD $_{(0,05)}$	*8,49*	*11,50*	*11,33*	*13,51*

Ghi chú: Công thức 1 (CT1): 10 ppm; CT2: 50 ppm; CT3: 100 ppm; CT4: 200 ppm; CT5: 500 ppm; CT6: MeOH (ĐC1), CT7: nước (ĐC2).

Ở các nồng độ khác nhau của CA cho tỷ lệ ức chế sinh trưởng của sợi nấm khác nhau. Trong 4 chủng nấm được thử nghiệm, chủng *R. solani* cho thấy bị chất CA ức chế sinh trưởng mạnh nhất lên đến trên 83% ở nồng độ xử lý 500 ppm, tuy nhiên ở nồng độ 200 ppm cũng đã ức chế được 81,5%. Giữa 2 nồng độ xử lý 200 và 500 ppm không có sự khác nhau có ý nghĩa về thống kê. Điều này kết luận rằng xử lý nồng độ 200 ppm CA cho hiệu quả cao nhất trong điều kiện thí nghiệm. Khi xử lý với nồng độ 500 ppm CA đối với 3 chủng nấm còn lại *F. solani*,

F. oxysporum, *P. capsici*, hiệu quả ức chế chỉ đạt khoảng 50%. Kết quả này cho thấy để xử lý ức chế sinh trưởng của các chủng nấm này cần có các chất phối trộn phù hợp.



Hình 3.8. R. solani trên PDA sau khi xử lý CA với nồng độ (A) 0 ppm, (B) 100 ppm, (C) 200 ppm và (D) 500 ppm.

Bảng 3.6. Tỷ lệ tuyến trùng chết (%) sau khi xử lý CA

Tuyến trùng	Thời gian CA được bảo quản			
	3 tháng	6 tháng	9 tháng	12 tháng
P. coffeae	73,3	74,3	72,5	71,6
M. incognita	82,8	86,4	84,3	83,6

Để đánh giá thời gian bảo quản của CA, tiến hành đánh giá hiệu quả phòng trừ tuyến trùng của CA chứa trong CCQ qua các thời điểm lưu mẫu. Mẫu CA được thử hoạt tính vào thời điểm mẫu được bảo quản 3, 6, 9 và 12 tháng ở điều kiện nhiệt độ phòng. Kết

quả cho thấy tỷ lệ tuyến trùng chết ở các thời điểm mẫu lưu giữ khác nhau không có sự khác biệt trên cả 2 đối tượng tuyến trùng *M. incognita* và *P. coffeae*, điều này cho thấy CA có khả năng giữ hiệu lực ít nhất 12 tháng ở điều kiện nhiệt độ phòng.

3.2.4. Xác định hiệu quả phòng trừ của cao chiết từ vỏ quế phối trộn với chitosan

Bảng 3.7. Tỷ lệ chết (%) của *M. incognita* và *P. coffeae*

Công thức	*M. incognita*			*P. coffeae*		
	30 phút	60 phút	90 phút	30 phút	60 phút	90 phút
CT1	4,9^{c}	3,5^{c}	6,9^{b}	4,8^{c}	3,4^{b}	6,7^{b}
CT2	74,3^{b}	77,5^{b}	92,0^{a}	71,5^{b}	73,0^{a}	92,1^{a}
CT3	77,7^{b}	80,9^{b}	95,0^{a}	74,4^{b}	76,2^{a}	96,7^{a}
CT4	80,2^{a}	85,6^{a}	95,3^{a}	78,0^{ab}	77,4^{a}	96,8^{a}
CT5	80,7^{a}	93,6^{a}	96,6^{a}	82,8^{a}	81,3^{a}	96,9^{a}

Ghi chú: Công thức 1 (CT1): ĐC (nước); CT2: 200 ppm CCQ; CT3: 200 ppm CCQ + chitosan 1%; CT4: 200 ppm CCQ + chitosan 3%; CT5: 200 ppm CCQ + chitosan 5%.

Công thức xử lý khác nhau cho thấy có có sự khác nhau về tỷ lệ tuyến trùng chết, tuy nhiên không thấy sự khác biệt về thống kê. Sau 90 phút xử lý, tuyến trùng chết ở các công thức xử lý dao động từ 92,0 - 96,6% đối với tuyến trùng *M. incognita* và 92,13 - 96,9% đối với tuyến trùng *P. coffeae*. Điều này cho thấy chất CCQ và hợp chất chất CCQ kết hợp với chitosan oligomer cho hiệu quả cao trên cả 2 loài tuyến trùng gây hại *M. incognita* và *P. coffeae*.

Bảng 3.8. Tỷ lệ ức chế (%) trứng *M. incognita và P. coffeae* nở

Công thức	*M. incognita*		*P. coffeae*	
	3 ngày	6 ngày	3 ngày	6 ngày
CT1	13,3^{c}	13,0^{b}	10,2^{b}	15,1^{b}
CT2	75,9^{b}	80,6^{a}	79,9^{a}	86,7^{a}
CT3	78,9^{ab}	85,8^{a}	81,7^{a}	88,3^{a}
CT4	80,9^{a}	87,9^{a}	81,9^{a}	89,1^{a}
CT5	84,5^{a}	88,0^{a}	82,7^{a}	90,0^{a}

Ghi chú: Công thức 1 (CT1): ĐC (nước); CT2: 200 ppm CCQ; CT3: 200 ppm CCQ + chitosan 1%; CT4: 200 ppm CCQ + chitosan 3%; CT5: 200 ppm CCQ + chitosan 5%.

Sau 3 và 6 ngày xử lý chất CCQ và hỗn hợp CCQ kết hợp với chitosan tỷ lệ ức chế trứng nở khá cao. Cụ thể đối với tuyến trùng *M. incognita* sau 3 ngày xử lý tỷ lệ ức chế trứng nở là 75,9 - 84,5% và sau 6 ngày xử lý tỷ lệ ức chế trứng nở dao động từ 80,6 - 88,0%. Đối với *P. coffeae* dao động từ 79,9 - 82,7% sau 3 ngày xử lý và 86,7 - 90,0% sau 6 ngày xử lý.

Bảng 3.9. Hiệu quả ức chế (%) nấm bệnh sinh trưởng phát triển của các công thức

Công thức	Chủng nấm			
	R. solani	*F. solani*	*F. oxysporum*	*P. capsici*
CT1	0	0	0	0
CT2	78,7	48,0	55,5	46,7
CT3	80,2	51,5	56,2	55,8
CT4	85,2	75,3	75,2	72,1
CT5	87,4	79,2	81,7	80,5
$LSD_{(0,05)}$	*5,0701*	*7,1591*	*4,5238*	*9,7316*

Ghi chú: Công thức 1 (CT1): ĐC (nước); CT2: 200 ppm CCQ; CT3: 200 ppm CCQ + chitosan 1%; CT4: 200 ppm CCQ + chitosan 3%; CT5: 200 ppm CCQ + chitosan 5%.

Kết quả cho thấy hỗn hợp phối trộn giữa chất CCQ và chitosan với các nồng độ khác nhau có sự khác biệt về mặt thống kê. Công thức chất CCQ kết hợp với chitosan 3 - 5% cho hiệu quả ức chế nấm sinh trưởng tốt nhất.

Qua đánh giá hiệu quả phòng trừ tuyến trùng và nấm bệnh chính gây hại rễ cây cà phê và hồ tiêu bước đầu kết luận công thức chất CCQ kết hợp với chitosan 3% cho hiệu quả phòng trừ tốt nhất. Đặc biệt ở công thức có phối trộn chitosan, hiệu quả ức chế sinh trưởng của nấm cao hơn hẳn so với công thức chỉ có CCQ.

3.2.5. Hoàn thiện quy trình kỹ thuật tách chiết CA từ vỏ quế

2.2.5.1. Sơ đồ thực hiện quy trình tách chiết cinnamyl acetate từ vỏ cây quế

Bước 1: Vỏ quế khô, cắt 5 - 10 cm

↓

Bước 2: Ngâm vỏ quế trong methanol 80%

↓

Bước 3: Dịch sau khi chiết được lọc sạch, cô dung môi bằng máy cất quay chân không để làm sạch dung môi methanol, thu được cao chiết từ vỏ quế methanol 80%.

↓

Bước 4: Hòa tan cao chiết từ vỏ quế trong nước, bổ sung dung môi *n*-hexane với thể tích tương ứng để chiết phân lớp, lắc đều trong vòng 3 - 5 phút sau đó để lắng và phân lớp. Thu phần dung dịch với dung môi là *n*-hexane. Cô cạn dung môi *n*-hexane để thu được cao chiết vỏ quế từ *n*-hexane

↓

Bước 5: Sắc ký cột với chất hấp phụ là silica gel, Sephadex LH-20
Kiểm tra độ tinh sạch bằng TLC, HPLC

↓

Bước 6: Xác định cấu trúc bằng phổ: ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR, GC-MS

↓

Bước 7: Cinnamyl acetate ($C_{11}H_{12}O_2$)
(có hoạt tính phòng trừ tuyến trùng và nấm bệnh hại rễ cà phê và hồ tiêu)

Hình 3.9. Sơ đồ tách chiết cinnamyl acetate từ vỏ cây quế

3.2.5.2. Thuyết minh quy trình công nghệ

i) Bước 1: Sơ chế vỏ quế: 10 kg vỏ quế khô được loại bỏ tạp chất, cắt nhỏ từ 5 - 10 cm cho vào thùng chứa; kết quả thu được vỏ quế sơ chế;

ii) Bước 2: Ngâm vỏ quế sơ chế được chuẩn bị ở bước i) bằng dung môi vào thùng chứa với dung môi methanol (50 lít) theo tỷ lệ vỏ quế/dung môi methanol là 1/5 theo khối lượng/thể tích ở nhiệt độ phòng, có kết hợp máy khuấy đảo có tần số là 150 vòng/phút trong khoảng thời gian 3 - 5 ngày; trong đó, dung môi được dùng là methanol có nồng độ phần trăm tính theo trọng lượng khoảng từ 70 - 85% trọng lượng, tốt nhất tỷ lệ dung môi methanol là 80% trọng lượng; trong đó, tổng % tính theo trọng lượng của nước và methanol.

(iii) Bước 3: Tách methanol ra khỏi dung dịch vỏ quế bằng cách đưa dung dịch vỏ quế thu được ở bước 2 vào máy chưng cất chân không ở nhiệt độ 40 - 45^{o}C, 150 vòng/phút để tách hoàn toàn lượng methanol chứa trong dung dịch vỏ quế, đồng thời thu được cao chiết từ vỏ quế.

(iv) Bước 4: Phân tán cao chiết từ vỏ quế trong nước và chiết tách lớp bằng dung môi *n*-hexane với thể tích theo tỷ lệ 1:1. Lắc đều trong vòng 3 - 5 phút và để lắng đọng để phân lớp, thu được dung dịch theo phân lớp dung môi *n*-hexane. Cô cạn dung môi *n*-hexane để thu được cao phân đoạn *n*-hexane.

(v) Bước 5: Cao chiết thu được ở bước 4 được sử dụng tiếp tục các bước sắc ký cột với chất hấp phụ là silica gel trong đó thành phần dung môi là *n*-hexane : ethyl acetate theo các tỷ lệ khác nhau, thu được sản phẩm từ dung môi *n*-hexane : ethyl acetate với tỷ lệ thể tích 80:20 (v:v). Tiếp tục tách phân đoạn hoạt chất với thành phần dung môi là *n*-hexane : ethyl acetate theo các tỷ lệ khác nhau, thu được dịch từ dung môi *n*-hexane : ethyl acetate với tỷ lệ thể tích 15:1 (v:v). Dịch này được sử dụng để chạy sắc ký cột với chất hấp phụ là sephadex LH-20. Hoạt chất trong dịch này được xác định bằng sắc ký TLC, HPLC.

(vi) Bước 6: Hoạt chất thu được ở bước 5 được xác định cấu trúc bằng phương pháp phổ ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR và GC-MS.

(vii) Hoạt chất được xác định là cinnamyl acetate (CA: $C_{11}H_{12}O_2$), khối lượng phân tử 176, chiếm tỷ lệ 0,12855% trong vỏ quế.

Chương IV

ỨNG DỤNG CHẾ PHẨM SINH HỌC BaC PHÒNG TRỪ TUYẾN TRÙNG VÀ NẤM BỆNH CHÍNH HẠI RỄ ĐIỀU KIỆN NHÀ LƯỚI

4.1. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

4.1.1. Vật liệu nghiên cứu

Vật liệu nghiên cứu là chế phẩm sinh học mới Bacte Cinsan (BaC), thành phần chính gồm 16% cao chiết từ vỏ quế (CCQ); 3% bột chitosan với hàm lượng CA chiếm 0,0205% (tương ứng với 205 mg/lít CPSH BaC). CPSH BaC được xếp loại "không gây kích ứng" trên da thỏ theo Hệ thống hài hòa toàn cầu (GHS 2019) về phân loại hóa chất theo kết quả phân tích của Viện Kiểm nghiệm An toàn Vệ sinh thực phẩm Quốc gia.

4.1.2. Phương pháp nghiên cứu

4.1.2.1. Đánh giá hiệu quả phòng trừ tuyến trùng và nấm bệnh gây hại rễ cây cà phê của Bacte Cinsan

Thí nghiệm 4.1: Được bố trí theo khối ngẫu nhiên đầy đủ, gồm 4 công thức, mỗi ô cơ sở 12 cây, 3 lần nhắc lại. Thí nghiệm được bố trí trên cây cà phê thực sinh, lây khi cây cà phê được 2

cặp lá, lấy từ hạt lai đa dòng TRS1. Kích thước bầu 13 × 23 cm. Lây nhiễm tuyến trùng với mật độ 1.000 tuyến trùng/1 kg đất (nhiễm hỗn hợp 60% *P. coffeae* và 40% *M. incognita*). Công thức 1 (CT1): Đối chứng (nước); CT2: CCQ 0,2%; CT3: BaC 0,1%; CT4: BaC 0,2%. Sau 1 tháng lây nhiễm tuyến trùng, tiến hành xử lý với lượng 50 ml/bầu.

Thí nghiệm 4.2: Được bố trí theo khối ngẫu nhiên đầy đủ, gồm 4 công thức, mỗi ô cơ sở 12 cây, 3 lần nhắc lại, vườn cây cà phê thực sinh, lây nhiễm khi cây cà phê được 2 cặp lá, lấy từ hạt lai đa dòng TRS1. Kích thước bầu 13 × 23 cm. Lây nhiễm nấm *F. oxysporum* với mật độ 10^4 CFU/g đất. Công thức 1 (CT1): Đối chứng (nước); CT2: CCQ 0,2%; CT3: BaC 0,1%; CT4: BaC 0,2%.

4.1.2.2. Đánh giá hiệu quả phòng trừ tuyến trùng và nấm bệnh gây hại rễ cây hồ tiêu của BaC

Thí nghiệm 4.3: Được bố trí theo khối ngẫu nhiên đầy đủ, gồm 4 công thức, mỗi ô cơ sở 12 cây, 3 lần nhắc lại. Thí nghiệm được bố trí trên cây hồ tiêu giống Vĩnh Linh ươm từ dây lươn. Kích thước bầu 13 × 23 cm. Lây nhiễm tuyến trùng với mật độ 1.000 tuyến trùng/1 kg đất (*M. incognita*). Công thức 1 (CT1): Đối chứng (nước); CT2: CCQ 0,2%; CT3: BaC 0,1%; CT4: BaC 0,2%. Sau 1 tháng lây nhiễm tuyến trùng, tiến hành xử lý với lượng 50 ml/bầu.

Thí nghiệm 4.4: Được bố trí theo khối ngẫu nhiên đầy đủ, gồm 4 công thức, mỗi ô cơ sở 12 cây, 3 lần nhắc lại, vườn cây hồ tiêu giống Vĩnh Linh ươm từ dây lươn. Kích thước bầu 13 × 23

cm. Lây nhiễm nấm *P. capsici* với mật độ 10^3 CFU/g đất. Công thức 1 (CT1): Đối chứng (nước); CT2: CCQ 0,2%; CT3: BaC 0,1%; CT4: BaC 0,2%.

4.1.2.3. Phương pháp theo dõi đánh giá

Sau khi lây nhiễm tuyến trùng, sau thời gian 1, 2 và 3 tháng theo dõi các chỉ tiêu về sinh trưởng phát triển của cây cà phê ở các công thức. Trước và sau khi xử lý chế phẩm 1, 2 và 3 tháng, mỗi ô thí nghiệm chọn 3 cây/đợt theo dõi. Như vậy tổng số cây cho 1 lần theo dõi sẽ là: 4 công thức × 3 lần nhắc lại × 3 cây/ô = 36 cây. Các chỉ tiêu theo dõi cụ thể là: sinh trưởng chiều cao cây: Đo từ mặt đất đến đỉnh sinh trưởng; số cặp lá: tính từ khi cây ra 2 lá; sinh khối tươi và khô của thân lá: cắt cây từ mặt đất và thu toàn bộ thân lá, tiến hành cân thu được khối lượng thân lá tươi. Sấy khô mẫu ở nhiệt độ 65^{o}C, đến khi khô kiệt, tiến hành cân thu được khối lượng thân lá khô; sinh khối tươi và khô của rễ: nhổ cây để thu toàn bộ rễ, sau đó rửa sạch bằng nước vòi, để ráo nước, tiến hành cân thu được khối lượng rễ tươi. Sấy khô mẫu ở nhiệt độ 105^{o}C, đến khi khô kiệt, tiến hành cân thu được khối lượng rễ khô.

Xác định hiệu quả phòng trừ của CPSH: Được tính theo công thức Henderson-Tilton:

$$\mathrm{H}(\%) = 1 - \frac{\text{số tuyến trùng ở CT CPSH sau xử lý} \times \text{số TT ở CT ĐC trước xử lý}}{\text{Số ở CT ĐC sau xử lý} \times \text{số TT ở CT CPSH trước xử lý}} \times 100$$

Tỷ lệ vàng lá được tính theo công thức:

$$\text{TLVL } (\%) = \frac{\text{Số cây bị bệnh}}{\text{Tổng số cây điều tra}} \times 100$$

Chỉ số bệnh vàng lá tính theo công thức của Townsend-Heuberger

$$\text{CSBB (\%)} = \frac{1n1 + 2n2 + 3n3 + 4n4}{4N} \times 100$$

Trong đó: N là tổng số cây điều tra; n_0: Số cây không bị nhiễm bệnh; n_1: Số cây bị nhiễm bệnh cấp 1: < 25% số lá trên cây bị vàng, rụng; n_2: Số cây bị nhiễm bệnh cấp 2: 25 - 50% số lá trên cây bị vàng, rụng; n_3: Số cây bị nhiễm bệnh cấp 3: 50 - 75% số lá trên cây bị vàng, rụng; n_4: Số cây bị nhiễm bệnh cấp 4: > 75% số lá trên cây bị vàng, rụng tới chết cây.

Tỷ lệ rễ bị u sưng/thối: nhổ toàn bộ cây, rửa sạch để ráo nước, sau đó tách rễ bị u sưng/thối. Tỷ lệ rễ bị u sưng, thối được tính theo công thức:

$$\text{TLUS (\%)} = \frac{\text{trọng lượng rễ bị u sưng}}{\text{tổng trọng lượng theo dõi}} \times 100$$

Tỷ lệ cây chết (%) được tính theo công thức:

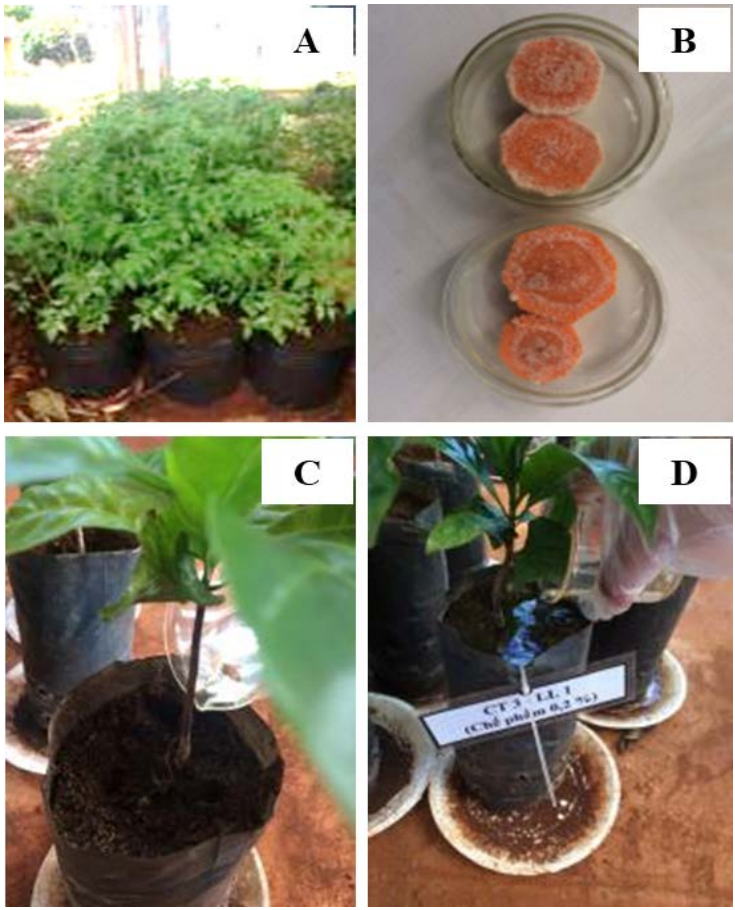
$$\text{Tỷ lệ cây chết (\%)} = \frac{\text{Tổng số cây chết}}{\text{Tổng số cây điều tra}} \times 100$$

4.1.3. Phương pháp xử lý số liệu, thống kê

Tỷ lệ trứng nở (%) và tỷ lệ chết của ấu trùng (%) được chuyển sang hàm Asin ((x/100)^1/2) và phân tích so sánh ANOVA trong chương trình thống kê SAS 9.1. Những số liệu % được quy đổi sang arcsin hay căn bậc hai. Những số liệu mật độ tuyến trùng được chuyển sang log(x + 1) trước khi đưa vào xử lý thống kê. Các giá trị trung bình được gắn các ký tự giống nhau trên cùng một cột là không sai khác có ý nghĩa thống kê.

4.2. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

4.2.1. Hiệu quả phòng trừ tuyến trùng và nấm bệnh chính gây hại rễ cà phê của BaC

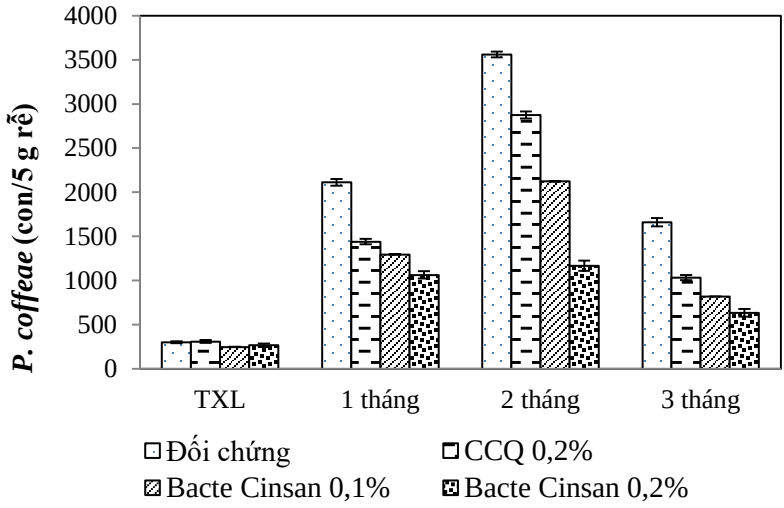


Hình 4.1. (A) Chậu cà chua trồng nhân nuôi M. incognita, (B) Đĩa cà rốt nhân nuôi tuyến trùng P. coffeae, (C) Chủng tuyến trùng vào cây cà phê, (D) Xử lý BaC.

Bảng 4.1. Mật độ *P. coffeae* trong đất và rễ cà phê

Công thức	*P. coffeae* (con/100 g đất)				*P. coffeae* (con/5 g rễ)			
	TXL	SXL 1 tháng	SXL 2 tháng	SXL 3 tháng	TXL	SXL 1 tháng	SXL 2 tháng	SXL 3 tháng
CT1	3	24	35	16	301	2.112	3.560	1.661
CT2	3	21	29	0	309	1.441	2.875	1.035
CT3	5	19	24	5	248	1.296	2.123	820
CT4	3	11	0	0	267	1.064	1.169	635
CV (%)	*9,7*	*4,7*	*5,1*	*10,7*	*14,8*	*33,9*	*34,9*	*7,01*

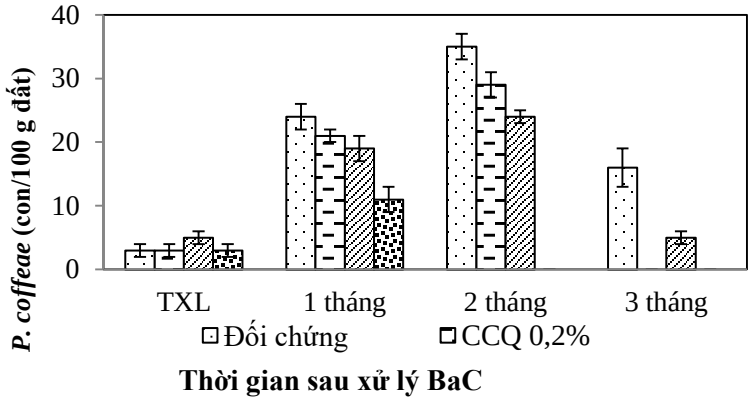
Ghi chú: Công thức 1 (CT1): Đối chứng (nước); CT2: CCQ 0,2%; CT3: BaC 0,1%; CT4: BaC 0,2%.



Hình 4.2. Mật độ P. coffeae trong rễ cà phê sau xử lý BaC

Bảng số liệu mật độ tuyến trùng *P. coffeae* trong rễ sau 1 tháng lây nhiễm cho thấy tuyến trùng đã xâm nhiễm vào trong rễ, lây nhiễm tuyến trùng đã thành công. Mật độ tuyến trùng *P. coffeae* trong rễ của công thức trước xử lý khá đồng đều nhau nằm trong khoảng 248 - 309 con/5 g rễ. Sau khi xử lý, mật độ tuyến trùng *P. coffeae* trong rễ của công thức 4 thấp nhất. Mật độ tuyến trùng *P. coffeae* của công thức này ở các đợt theo dõi sau khi xử lý lần lượt là 1.064, 1.169, 635 con/5g rễ.

Tuyến trùng thường nằm trong rễ gây hại cho cây. Do đó mật độ tuyến trùng trong đất của các công thức ở các thời điểm theo dõi khá thấp trong khoảng 0 - 35 con/100 g đất. Sau xử lý 1 tháng, mật độ tuyến trùng trong đất của các công thức đều có xu hướng tăng, trong đó công thức 4 có mật độ tuyến trùng tăng thấp nhất tăng 8 con. Đến sau xử lý 2, 3 tháng không ghi nhận sự có mặt của tuyến trùng trong mẫu đất của công thức 4. Hiệu lực phòng trừ tuyến trùng trong đất của công thức 4 sau 1 tháng xử lý chỉ đạt 54,2%, tuy nhiên đến sau xử lý 2, 3 tháng hiệu lực đạt 100%.



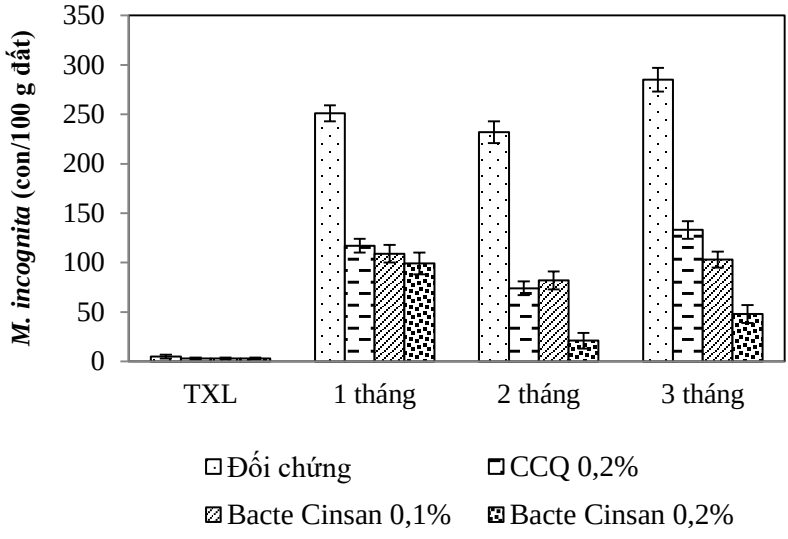
Hình 4.3. Mật độ P. coffeae trong đất cà phê sau xử lý BaC

Bảng 4.2. Mật độ *M. incognita* trong đất và rễ cà phê

Công thức	*M. incognita* (con/100 g đất)				*M. incognita* (con/5 g rễ)			
	TXL	SXL 1 tháng	SXL 2 tháng	SXL 3 tháng	TXL	SXL 1 tháng	SXL 2 tháng	SXL 3 tháng
CT1	5	251	232	285	5	320	1.936	1.267
CT2	3	117	74	133	19	997	491	633
CT3	3	109	82	103	32	793	1.920	432
CT4	3	99	21	48	13	181	517	184
CV (%)	*14,8*	*23,8*	*21,6*	*12,1*	*18,0*	*20,7*	*20,3*	*25,4*

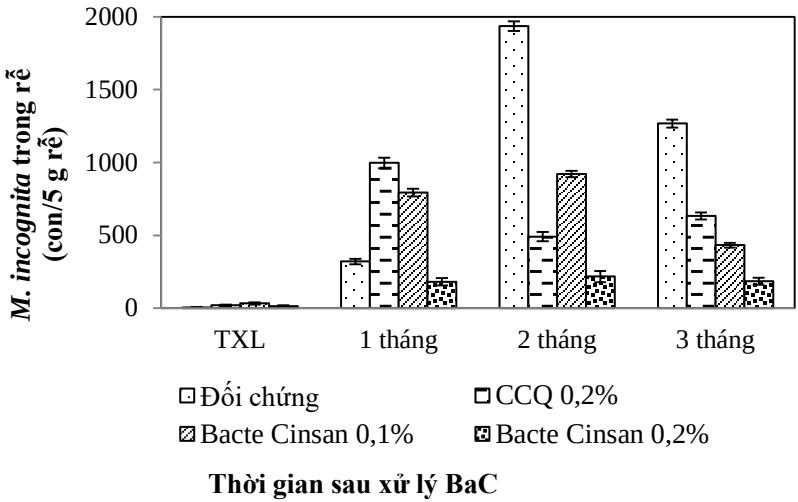
Ghi chú: Công thức 1 (CT1): Đối chứng (nước); CT2: CCQ 0,2%; CT3: BaC 0,1%; CT4: BaC 0,2%.

Mật độ tuyến trùng *M. incognita* trong đất trước xử lý của các công thức đều rất thấp dưới 5 con/100g đất. Đến các thời điểm theo dõi tiếp theo mật độ tuyến trùng *M. incognita* đều tăng ở các công thức. Công thức 4 có mật độ tuyến trùng *Meloidogyne incognita* trong đất thấp nhất (99, 21, 48 con/100 g đất thời điểm 1, 2, 3 tháng sau xử lý). Hiệu lực phòng trừ tuyến trùng *M. incognita* trong đất của công thức 4 tại 3 thời điểm theo dõi đều đạt hiệu lực cao nhất, sau 2 và 3 tháng xử lý hiệu lực đạt trên 84%.



Hình 4.4. Mật độ M. incognita trong đất cà phê sau xử lý BaC

Mật độ tuyến trùng *M. incognita* trong rễ trước xử lý khá thấp nằm trong khoảng 5 - 32 con trong 5 g rễ. Tại 2 thời điểm sau xử lý 1 và 3 tháng mật độ tuyến trùng trong rễ của công thức 4 là thấp nhất 181 và 184 con/5g rễ. Hiệu lực phòng trừ tuyến trùng trong rễ của các công thức khá cao trong khoảng 50,0 - 89,7%. Công thức 4 có hiệu lực cao nhất tại các thời điểm sau xử lý, tuy nhiên tại thời điểm sau và 3 tháng xử lý, công thức 3 và công thức 4 có hiệu lực phòng trừ không khác nhau, đạt hiệu lực trên 87%. Tại thời điểm sau 2 tháng xử lý, hầu hết ở các công thức có xử lý, mật độ tuyến trùng giảm thấp hơn hẳn so với công thức đối chứng do đó hiệu lực phòng trừ vào thời điểm này là rất cao.



Hình 4.5. Mật độ M. incognita trong rễ cà phê sau xử lý BaC

Hình 4.6. Cà phê sau xử lý BaC 3 tháng

Bảng 4.3. Hiệu lực phòng trừ tuyến trùng trong đất và rễ cà phê

Công thức	Tổng mật độ tuyến trùng trong đất và rễ (con)				Hiệu lực (%)		
	TXL	SXL 1 tháng	SXL 2 tháng	SXL 3 tháng	SXL 1 tháng	SXL 2 tháng	SXL 3 tháng
CT1	314	2.707	5.763	3.229	-	-	-
CT2	334	2.176	3.469	1.801	24,4	43,6	66,7
CT3	288	2.119	4.067	1.257	14,7	23,1	65,0
CT4	286	1.453	1.789	9.70	41,1	65,9	73,1
CV (%)	*10,53*	*14,25*	*16,19*	*19,17*			

Ghi chú: Công thức 1 (CT1): Đối chứng (nước); CT2: CCQ 0,2%; CT3: BaC 0,1%; CT4: BaC 0,2%.

Các công thức xử lý đều có tổng mật độ tuyến trùng trong đất và rễ thấp hơn công thức đối chứng. Trong đó công thức có tổng mật độ tuyến trùng trong đất và rễ thấp nhất là công thức 4 với tổng mật độ tuyến trùng trong đất và rễ ở các thời điểm sau xử lý lần lượt là 1.453, 1.789, 970 con, giảm đáng kể so với công thức đối chứng so sánh vào từng thời điểm. Hiệu lực phòng trừ tuyến trùng trong đất và rễ của công thức 4 đạt 73,1% sau 3 tháng xử lý.

Trước xử lý, mật độ nấm *F. oxysporum* gây hại trong đất dao động từ 0,90 - 0,93 × 10^4 CFU/g đất. Theo dõi tại các thời điểm sau xử lý 1 và 2 tháng, tất cả các công thức thí nghiệm kể cả công thức đối chứng có xu hướng giảm về mật độ nấm *F. oxysporum* trong đất so với thời điểm trước xử lý. Tuy nhiên, công thức đối chứng luôn là công thức có mật độ nấm *F. oxysporum* trong đất cao nhất. Theo dõi đến thời điểm sau xử lý 3 tháng, mật độ nấm

F. oxysporum trong đất ở phần lớn các công thức xử lý và đối chứng đều tăng nhưng mức tăng không đáng kể, tuy nhiên, mức tăng này ở công thức có xử lý khác biệt ý nghĩa về mặt thống kê so với công thức đối chứng. Tại thời điểm sau xử lý 3 tháng công thức 4 là công thức có mật độ nấm thấp nhất đạt 0,43 × 10^4 (CFU/g đất), kế đến lần lượt là công thức 2, đạt 0,52 × 10^4 (CFU/g đất), công thức 3, đạt 0,55 × 10^4 (CFU/g đất) và cao nhất là công thức đối chứng 0,98 × 10^4 (CFU/g đất).

Bảng 4.4. Mật độ nấm *F. oxysporum* trong đất × 10^4 (CFU/g đất) và tần suất xuất hiện nấm trong rễ (%)

Công thức	TXL		SXL 1 tháng		SXL 2 tháng		SXL 3 tháng	
	MĐN	TSN	MĐN	TSN	MĐN	TSN	MĐN	TSN
CT1	0,93	38,1	0,75	57,1	0,83	61,9	0,98	69,1
CT2	0,90	35,7	0,63	42,9	0,53	52,4	0,55	40,5
CT3	0,93	33,3	0,52	35,7	0,47	38,1	0,43	28,6
CT4	0,92	35,7	0,57	40,5	0,48	45,2	0,52	26,2
CV (%)	*6,54*	*9,27*	*2,11*	*23,1*	*3,32*	*20,4*	*3,52*	*15,2*
LSD $_{(0,05)}$	*NS*	*NS*	*0,16*	*NS*	*NS*	*NS*	*0,26*	*12,0*

Ghi chú: TXL: Trước xử lý; SXL: Sau xử lý; MĐN: Mật độ nấm trong đất (CFU/g đất) × 10^4; TSN: Tần suất xuất hiện nấm trong rễ (%); NS: không có sai khác về thống kê.

Trong khi mật độ nấm *F. oxysporum* trong đất liên tục giảm tại thời điểm sau xử lý 1 và 2 tháng, tần suất xuất hiện nấm trong rễ lại liên tục tăng. Điều này cho thấy nguồn nấm trong đất đã xâm nhiễm vào bộ phận rễ của cây làm cho tần suất xuất hiện

nấm trong rễ tăng lên nhanh chóng. Theo dõi đến thời điểm sau xử lý 3 tháng tần suất xuất hiện nấm trong rễ lại có khuynh hướng giảm ở tất cả các công thức có xử lý thuốc. Trong khi đó, tần suất xuất hiện của nấm trong rễ của công thức đối chứng luôn tăng tại mỗi đợt theo dõi. Theo đó, công thức có tần suất xuất hiện nấm trong rễ tại thời điểm sau xử lý 3 tháng thấp nhất là công thức 4 đạt 26,2%, kế đến lần lượt là công thức 3, đạt 28,6%, công thức 2, đạt 40,5% và cao nhất là công thức đối chứng (69,1%).

Như vậy, qua phân tích số liệu các công thức có xử lý BaC có ảnh hưởng nhất định đến mật độ và tần suất xuất hiện nấm trong đất và rễ cây cà phê trong điều kiện nhà lưới.

4.2.2. Ảnh hưởng của BaC đến khả năng sinh trưởng và phát triển của cây cà phê

Bảng 4.5. Sinh trưởng của cây cà phê nhiễm tuyến trùng

Công thức	Chiều cao (cm)				Số cặp lá (cặp)			
	TXL	SXL 1 tháng	SXL 2 tháng	SXL 3 tháng	TXL	SXL 1 tháng	SXL 2 tháng	SXL 3 tháng
CT1	18,8	20,3	22,3	23,3	5,5	6,0	6,7	6,8
CT2	17,7	20,8	23,4	25,1	5,7	6,2	7,0	7,3
CT3	17,2	21,1	23,8	24,9	6,0	6,5	7,3	7,7
CT4	18,2	21,5	24,3	26,0	5,7	6,7	7,5	8,0
CV (%)	*18,5*	*10,7*	*14,5*	*16,3*	*8,1*	*6,6*	*7,8*	*5,4*
$LSD_{(0,05)}$	*NS*	*NS*	*NS*	*NS*	*NS*	*NS*	*NS*	*0,8*

Ghi chú: Công thức 1 (CT1): Đối chứng (nước); CT2: CCQ 0,2%; CT3: BaC 0,1%; CT4: BaC 0,2%.

Sự sinh trưởng của cây cà phê con ở các công thức không có sự khác biệt nhiều ở các công thức. Cây giống ở các công thức trước khi tiến hành thí nghiệm khá đồng đều, chiều cao trong khoảng 17,2 - 18,8 cm và có khoảng 5 - 6 cặp lá. Đến các thời điểm sau khi xử lý, công thức 4, cây cà phê có chiều cao cây và số cặp lá tốt nhất (chiều cao là 26 cm và 8 cặp lá sau 3 tháng xử lý).

Bảng 4.6. Sinh trưởng của cây cà phê nhiễm nấm bệnh

Công thức	TXL		SXL 1 tháng		SXL 2 tháng		SXL 3 tháng	
	CCC	SCL	CCC	SCL	CCC	SCL	CCC	SCL
CT1	19,1	5,3	25,2	7,0	29,0	7,3	29,1	8,0
CT2	18,7	5,3	26,3	7,3	28,2	7,6	29,1	8,3
CT3	19,9	5,0	27,0	7,3	29,2	8,0	29,3	8,3
CT4	19,5	5,3	27,6	7,6	30,0	8,3	30,4	9,0
CV (%)	*1,78*	*2,48*	*3,37*	*2,34*	*3,76*	*1,72*	*3,71*	*5,28*
$LSD_{(0,05)}$	*NS*	*NS*	*NS*	*NS*	*NS*	*0,03*	*NS*	*NS*

CCC: Chiều cao cây (cm); SCL: Số cặp lá.

Theo dõi tình hình sinh trưởng của cây cà phê con thông qua chỉ tiêu tăng trưởng chiều cao cây và số cặp lá. Kết quả cho thấy: Trước xử lý, chiều cao cây dao động từ 18,7 - 19,9 cm, số cặp lá trung bình là 5 cặp. Số liệu quan trắc cho thấy chiều cao cây và số cặp lá tăng dần theo thứ tự thời gian. Tuy nhiên, mức chênh lệch về chiều cao cây và số cặp lá giữa các công thức thí nghiệm là không đáng kể và khá tương đồng tại các thời điểm theo dõi. Tại thời điểm sau xử lý 3 tháng công thức 4 là công thức có chiều

cao cây và số cặp lá cao nhất đạt 30,4 cm và 9 cặp lá. Nhìn chung, không có sự khác biệt đáng kể ở những công thức 2, 3 so với công thức đối chứng.

Bảng 4.7. Ảnh hưởng của BaC đến sinh khối rễ cây cà phê

Công thức	Sinh khối rễ tươi (g)	Sinh khối rễ khô (g)	Tỷ lệ khô/tươi (%)
CT1	12,57^{c}	3,33^{c}	26,57^{b}
CT2	21,7^{b}	6,92^{b}	31,93^{a}
CT3	23,00^{b}	7,63^{b}	33,27^{a}
CT4	27,03^{a}	9,40^{a}	34,83^{a}
CV (%)	*5,92*	*7,25*	*5,17*
$LSD_{(0,05)}$	*3,25*	*1,31*	*4,28*

Ghi chú: Công thức 1 (CT1): Đối chứng (nước); CT2: CCQ 0,2%; CT3: BaC 0,1%; CT4: BaC 0,2%.

Rễ cây cà phê là bộ phận quan trọng để hút nước và dinh dưỡng giúp cây sinh trưởng phát triển tốt. Giai đoạn cây con, hệ thống rễ phát triển tốt giúp cây phòng chống sâu bệnh, đặc biệt là tuyến trùng hại rễ tấn công. Kết quả cho ta thấy được trọng lượng rễ tươi ở công thức có xử lý chế phẩm cao hơn hẳn so với công thức đối chứng. Trọng lượng rễ khô cũng khác biệt có ý nghĩa giữa các công thức, trong đó công thức xử lý BaC 0,2% có trọng lượng rễ khô cao nhất là 9,4 g so với công thức đối chứng trọng lượng rễ tươi chỉ đạt 3,3 g. Qua đó tỷ lệ tươi/khô cũng có sự sai khác có ý nghĩa giữa các công thức, công thức có xử lý BaC cao hơn hẳn so với công thức đối chứng.

Bảng 4.8. Ảnh hưởng của BaC đến sinh khối thân cây cà phê

Công thức	Sinh khối thân tươi (g)	Sinh khối thân khô (g)	Tỷ lệ khô/tươi (%)
CT1	178,8^{c}	51,7^{c}	28,8^{b}
CT2	261,4^{b}	93,0^{b}	36,0^{a}
CT3	270,1^{b}	95,9^{b}	36,1^{a}
CT4	307,4^{a}	123,7^{a}	40,2^{a}
CV (%)	*3,59*	*5,98*	*5,68*
$LSD_{(0,05)}$	*23,91*	*14,28*	*5,22*

Ghi chú: Công thức 1 (CT1): Đối chứng (nước); CT2: CCQ 0,2%; CT3: BaC 0,1%; CT4: BaC 0,2%.

Thân cây khỏe sẽ giúp cây chống chịu với điều kiện bất thuận tốt, góp phần giúp cây đẻ nhánh tốt và tạo điều kiện cho cây ra hoa đậu quả tốt. Từ bảng 4.8 có thể thấy sinh khối thân tươi và và sinh khối thân khô cà phê ở các công thức khác nhau có sự khác biệt có ý nghĩa về thống kê. Sinh khối thân tươi ở công thức BaC 0,2% đạt 307,4 g cao gần gấp 2 lần công thức đối chứng là 178,8 g. Sinh khối thân khô thì ở công thức BaC 0,2% là 123,7 g cao hơn gấp 2 lần công thức đối chứng. Tỷ lệ khô/tươi ở công thức xử lý BaC 0,2% cao hơn có ý nghĩa so với công thức đối chứng không xử lý. Điều này cho thấy trong công thức xử lý chế phẩm, hệ thống rễ tốt hơn, bộ lá nhiều hơn giúp cây trồng tích lũy được nhiều dinh dưỡng hơn công thức đối chứng.

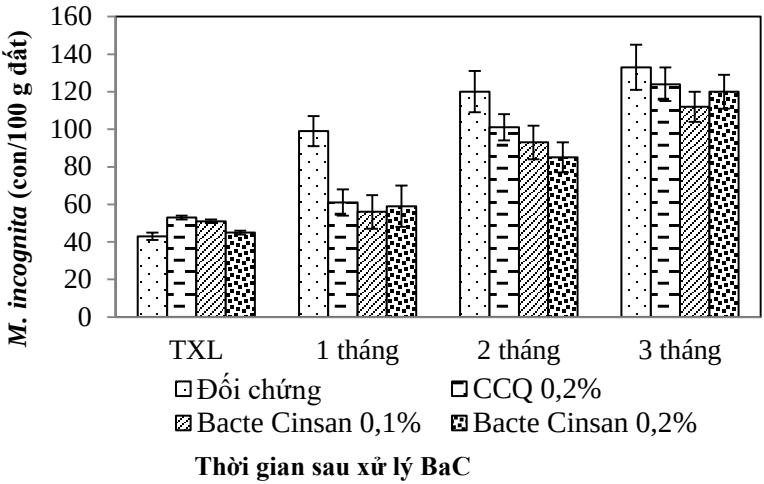
4.2.3. Hiệu quả phòng trừ tuyến trùng và nấm bệnh chính gây hại hồ tiêu của BaC

Bảng 4.9. Mật độ *M. incognita* trong đất và rễ hồ tiêu

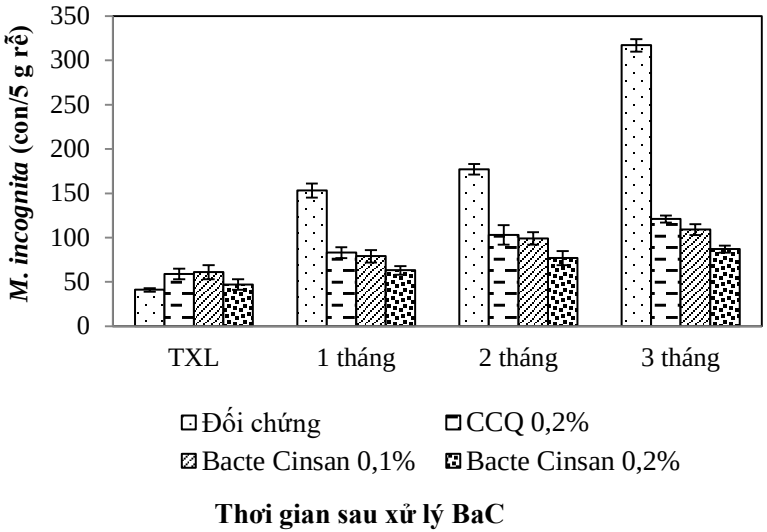
Công thức	*M. incognita* (con/100 g đất)				*M. incognita* (con/5 g rễ)			
	TXL	SXL 1 tháng	SXL 2 tháng	SXL 3 tháng	TXL	SXL 1 tháng	SXL 2 tháng	SXL 3 tháng
CT1	43	99	120	133	41	153	177	317
CT2	53	61	101	124	59	83	103	121
CT3	51	56	93	112	61	79	99	109
CT4	45	59	85	120	47	63	77	87
CV (%)	*14,7*	*15,6*	*12,4*	*11,7*	*18,4*	*11,5*	*15,3*	*12,6*

Ghi chú: Công thức 1 (CT1): Đối chứng (nước); CT2: CCQ 0,2%; CT3: BaC 0,1%; CT4: BaC 0,2%.

Trước xử lý mật độ tuyến trùng trong đất khá thấp, mật độ tuyến trùng dao động trong khoảng 43 - 53 con/100g đất. Đến 1 tháng sau xử lý, các công thức có xử lý mật độ tuyến trùng trong đất tăng thấp hơn (tăng 5 - 14 con) so với mật độ tuyến trùng trong đất ở công thức đối chứng (tăng lên 56 con) so với trước xử lý. Ở cả 3 thời điểm theo dõi sau xử lý chế phẩm, mật độ tuyến trùng ở các công thức có xử lý đều có sự sai khác có ý nghĩa với công thức đối chứng.



Hình 4.7. Mật độ M. incognita trong đất hồ tiêu sau xử lý BaC



Hình 4.8. Mật độ M. incognita trong rễ hồ tiêu sau xử lý BaC

Mật độ tuyến trùng trong rễ ở các công thức khác nhau rõ qua các thời điểm theo dõi khác nhau. Công thức 4 luôn là công thức có mật độ tuyến trùng trong rễ thấp nhất ở các đợt theo dõi. Sau khi lây nhiễm nhân tạo nấm *P. capsici* vào các ô thí nghiệm với mật độ 10^3 CFU/g đất, tiến hành lấy mẫu đất và rễ trước và sau thí nghiệm để xác định tần suất xuất hiện nấm *P. capsici* trong đất và rễ.

Bảng 4.10. Tần suất (%) xuất hiện nấm *P. capsici* trong đất và rễ hồ tiêu

Công thức	TXL		SXL 1 tháng		SXL 2 tháng		SXL 3 tháng	
	TSĐ	TSR	TSĐ	TSR	TSĐ	TSR	TSĐ	TSR
CT1	50,0	38,9	66,7	44,4	38,9	50,0	27,8	55,6
CT2	44,4	44,4	55,6	38,9	27,8	27,8	16,7	22,2
CT3	50,0	44,4	55,6	33,3	22,2	22,2	11,1	16,7
CT4	44,4	44,4	50,0	33,3	167	16,7	5,6	11,1
CV (%)	*28,6*	*11,9*	*16,9*	*27,1*	*68,3*	*48,7*	*78,4*	*34,2*

Ghi chú: TXL: Trước xử lý; SXL: Sau xử lý; TSĐ: Tần suất xuất hiện nấm P. capsici trong đất; TSR: Tần suất xuất hiện nấm P. capsici trong rễ.

Kết quả được thể hiện trong bảng 4.10 cho thấy: Trước xử lý tần suất xuất hiện của nấm *P. capsi* trong đất khá tương đồng dao động từ 44,4 - 50,0%. Sau xử lý 1 tháng tần suất xuất hiện của nấm *P. capsici* trong đất đều tăng ở tất cả các công thức thí nghiệm, tăng mạnh nhất so với thời điểm trước xử lý là công thức đối chứng (tăng 16,7%), tăng thấp nhất là công thức 4. Tại các đợt theo dõi tiếp theo các công thức thí nghiệm đều có xu hướng

giảm dần. Tuy nhiên, công thức đối chứng luôn là công thức có tần suất xuất hiện nấm *P. capsici* trong đất cao nhất tại mỗi thời điểm theo dõi. Kết quả theo dõi tại thời điểm sau xử lý 3 tháng, công thức có tần suất xuất hiện nấm *P. capsici* trong đất cao nhất là công thức đối chứng (27,8%) và thấp nhất là công thức 4, đạt 5,6%. Đây cũng là công thức luôn có tần suất xuất hiện nấm *P. capsici* trong đất thấp nhất tại các thời điểm theo dõi.

Diễn biến về nấm *P. capsici* trong rễ ghi nhận: Trước xử lý tần suất xuất hiện nấm *P. capsici* trong rễ dao động từ 38,9 - 44,4%. Tại các thời điểm quan trắc tiếp theo, tất cả các công thức có xử lý có khuynh hướng giảm về tần suất xuất hiện của nấm *P. capsici* trong rễ. Trong khi đó, trái ngược với tần suất xuất hiện nấm *P. capsici* trong đất ở công thức công thức đối chứng có chiều hướng giảm dần thì tần suất xuất hiện của nấm *P. capsici* trong rễ liên tục tăng và đạt tỷ lệ cao nhất tại mỗi thời điểm theo dõi. Cụ thể: Tại thời điểm sau xử lý 3 tháng, công thức có tần suất xuất hiện nấm *P. capsici* trong rễ thấp nhất là công thức 4, đạt 11,1%, kế đến lần lượt là công thức 3, đạt 16,7%, công thức 2, đạt 22,2% và cao nhất là công thức đối chứng (55,6%).

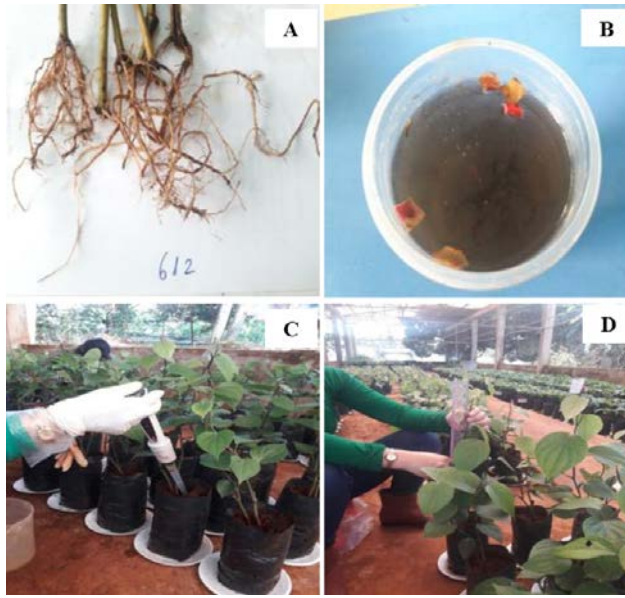
Hiệu quả phòng trừ nấm *P. capsici* trong đất và rễ của các công thức xử lý thuốc tăng dần theo thứ tự thời gian và cho hiệu quả cao nhất tại thời điểm sau xử lý 3 tháng. Cũng tại thời điểm này công thức 4 là công thức đạt hiệu lực phòng trừ nấm *P. capsici* trong đất và rễ cao nhất tương ứng 77,5% và 78,1% và cũng là công thức đạt hiệu quả cao nhất tại hầu hết các thời điểm theo dõi.

Bảng 4.11. Hiệu quả phòng trừ *P. capsici* trong đất và rễ hồ tiêu (%)

Công thức	*P. capsici* trong đất			*P. capsici* trong rễ		
	SXL 1 tháng	SXL 2 tháng	SXL 3 tháng	SXL 1 tháng	SXL 2 tháng	SXL 3 tháng
CT1	-	-	-	-	-	-
CT2	6,3	19,6	32,5	23,4	51,4	56,3
CT3	16,7	42,9	60,0	34,4	61,1	67,2
CT4	15,6	51,8	77,5	34,4	70,8	78,1

Ghi chú: Công thức 1 (CT1): Đối chứng (nước); CT2: CCQ 0,2%; CT3: BaC 0,1%; CT4: BaC 0,2%.

4.2.4. Ảnh hưởng của BaC đến khả năng sinh trưởng và phát triển của cây hồ tiêu



Hình 4.9. (A) Rễ hồ tiêu bị thối sau 1 tháng lây nhiễm nấm P. capsici; (B) Bẫy nấm P. capsici từ rễ sau 1 tháng lây nhiễm; (C) Lây nhiễm nấm; (D) Theo dõi sinh trưởng

Bảng 4.12. Sinh trưởng của cây hồ tiêu nhiễm tuyến trùng

Công thức	Số lá trên chồi (lá)			
	TXL	SXL 1 tháng	SXL 2 tháng	SXL 3 tháng
CT1	8,5	8,9	10,4	10,9
CT2	8,2	10,4	12,6	13,9
CT3	9,5	10,8	12,1	12,6
CT4	10,0	10,8	12,8	13,5
CV (%)	*15,00*	*7,16*	*12,28*	*8,44*
$LSD_{(0,05)}$	*NS*	*1,46*	*NS*	*2,15*

Ghi chú: Công thức 1 (CT1): Đối chứng (nước); CT2: CCQ 0,2%; CT3: BaC 0,1%; CT4: BaC 0,2%.

Qua bảng số liệu cho thấy: số lá trên chồi của các công thức trước xử lý trong khoảng 8 - 10 lá. Đến 1 tháng sau xử lý, số lá trên chồi của công thức đối chứng tăng lên không nhiều như ở các công thức có xử lý và có sự sai khác thông kê về số lá trên chồi của các công thức. Sau 2 tháng xử lý, công thức 4 và công thức xử lý 2 có số lá trên chồi tốt nhất gần 13 lá. Đến sau xử lý 3 tháng, công thức 4 và công thức 2 vẫn là 2 công thức có số lá trên chồi tốt nhất khoảng gần 14 lá.

Bảng 4.13. Sinh trưởng của cây hồ tiêu nhiễm nấm bệnh

Công thức	TXL		SXL 1 tháng		SXL 2 tháng		SXL 3 tháng	
	CCC	SCL	CCC	SCL	CCC	SCL	CCC	SCL
CT1	18,9	6	33,4	9	44,5	11	52,4	12
CT2	20,6	7	35,1	10	51,4	12	58,3	13
CT3	20,3	6	37,7	10	54,2	12	60,0	12
CT4	18,6	6	34,3	9	57,9	13	67,4	14
CV (%)	*4,73*	*4,33*	*4,23*	*4,26*	*3,44*	*3,70*	*5,13*	*7,33*
$LSD_{(0,05)}$	*NS*	*NS*	*NS*	*NS*	*NS*	*0,08*	*NS*	*NS*

Ghi chú: Công thức 1 (CT1): Đối chứng (nước); CT2: CCQ 0,2%; CT3: BaC 0,1%; CT4: BaC 0,2%; CDC: chiều dài chồi; SLC: số lá trên chồi.

Chiều dài chồi và số cặp lá là một trong những chỉ tiêu để đánh giá khả năng sinh trưởng của bầu tiêu. Trước xử lý, chiều dài chồi dao động từ 18,6 - 20,6 cm, số lá trên chồi dao động từ 6 - 7 lá. Kết quả quan trắc cho thấy, chiều dài chồi và số lá trên chồi tăng dần theo thứ tự thời gian. Các công thức có xử lý thuốc có chiều dài chồi và số lá trên chồi đa số cao hơn công thức đối chứng, tuy nhiên mức chênh lệch này là không đáng kể. Tại thời điểm sau xử lý 3 tháng công thức 4 có chiều dài chồi và số lá trên chồi cao nhất tương ứng là 57,9 cm và 14 lá và thấp nhất là công thức đối chứng tương ứng 52,4 cm và 12 lá.

Bảng 4.14. Ảnh hưởng của BaC đến sinh khối thân cây hồ tiêu

Công thức	Sinh khối thân lá rễ tươi (g)	Sinh khối thân lá rễ khô (g)	Tỷ lệ khô/tươi (%)
CT1	$39,1^{b}$	$9,2^{c}$	$23,5^{b}$
CT2	$57,4^{a}$	$15,2^{b}$	$26,1^{ab}$
CT3	$60,2^{a}$	$16,4^{ab}$	$27,2^{ab}$
CT4	$63,7^{a}$	$17,8^{a}$	$27,9^{a}$
CV (%)	*5,35*	*6,72*	*5,89*
$LSD_{(0,05)}$	*7,67*	*2,56*	*4,06*

Ghi chú: Công thức 1 (CT1): Đối chứng (nước); CT2: CCQ 0,2%; CT3: BaC 0,1%; CT4: BaC 0,2%.

Qua bảng số liệu nhận thấy giữa các công thức có sự sai khác có ý nghĩa về thống kê. Sinh khối cây hồ tiêu tươi ở các công thức có xử lý cao hơn có ý nghĩa so với công thức đối chứng không xử lý, công thức CPSH BaC 0,2% có sinh khối tươi cao nhất 63,7g và sinh khối khô cao nhất là 17,8g. Tỷ lệ khô/tươi ở công thức xử lý BaC 0,2% cao hơn có ý nghĩa so với công thức đối chứng không xử lý.

Chương V

ỨNG DỤNG CHẾ PHẨM SINH HỌC BaC PHÒNG TRỪ TUYẾN TRÙNG VÀ NẤM BỆNH CHÍNH HẠI RỄ ĐIỀU KIỆN ĐỒNG RUỘNG

5.1. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

5.1.1. Vật liệu nghiên cứu

Vật liệu nghiên cứu là chế phẩm sinh học mới Bacte Cinsan (BaC), thành phần chính gồm 16% cao chiết từ vỏ quế (CCQ); 3% bột chitosan với hàm lượng CA chiếm 0,0205% (tương ứng với 205 mg/lít CPSH BaC). BaC được xếp loại "không gây kích ứng" trên da thỏ theo Hệ thống hài hòa toàn cầu (GHS 2019) về phân loại hóa chất theo kết quả phân tích của Viện Kiểm nghiệm an toàn vệ sinh thực phẩm quốc gia.

5.1.2. Phương pháp nghiên cứu

5.1.2.1. Đánh giá hiệu quả phòng trừ tuyến trùng và nấm bệnh gây hại rễ cây cà phê của BaC ở tỉnh Đắk Lắk

Thí nghiệm 5.1: Xác định hiệu quả của BaC đến khả năng phòng trừ tuyến trùng (*M. incognita* và *P. coffeae*) gây hại rễ cây cà phê trong điều kiện đồng ruộng tại Đắk Lắk: vườn thí nghiệm

là vườn cà phê kinh doanh, khoảng cách trồng 3 × 3 m (1.110 cây/ha), được chăm sóc bón phân và tưới nước đầy đủ, vườn có hiện tượng nhiễm tuyến trùng. Thiết kế gồm 4 công thức, 3 lần lặp, mỗi ô cơ sở 15 cây cà phê. Bố trí theo ô vuông, giữa các ô cơ sở có dải phân cách là 1 hàng cà phê. Công thức 1 (CT1): Không xử lý (đối chứng); CT2: BaC 0,2% (3 lít/cây); CT3: BaC 0,2% (5 lít/cây); CT4: BaC 0,2% (7 lít/cây).

Thí nghiệm 5.2: Xác định hiệu quả của Bacte Cinsan đến khả năng phòng trừ nấm bệnh chính (*F. oxysporum*) gây hại rễ cây cà phê trong điều kiện đồng ruộng tại Đắk Lắk: vườn thí nghiệm là cà phê kinh doanh, khoảng cách trồng 3 × 3 m (1.110 cây/ha), được chăm sóc bón phân và tưới nước đầy đủ, vườn có hiện tượng nhiễm tuyến trùng. Thiết kế gồm 4 công thức, 3 lần lặp, mỗi ô cơ sở 15 cây cà phê. Bố trí theo ô vuông, giữa các ô cơ sở có dải phân cách là 1 hàng cà phê. Công thức 1 (CT1): Không xử lý (đối chứng); CT2: BaC 0,2% (3 lít/cây); CT3: BaC 0,2% (5 lít/cây); CT4: BaC 0,2% (7 lít/cây).

Thí nghiệm 5.3: Xác định hiệu quả của Bacte Cinsan đến khả năng phòng trừ tuyến trùng (*M. incognita*) gây hại rễ cây hồ tiêu trong điều kiện đồng ruộng tại Đắk Lắk: vườn được trồng với khoảng cách 2,5 × 2,5 m tương tương với mật độ 1.600 cây/ha. Thiết kế gồm 4 công thức, 3 lần lặp, mỗi ô cơ sở 15 cây hồ tiêu. Công thức 1 (CT1): Không xử lý (đối chứng); CT2: BaC 0,2% (2 lít/cây); CT3: BaC 0,2% (4 lít/cây); CT4: BaC 0,2% (6 lít/cây).

Thí nghiệm 5.4: Xác định hiệu quả của Bactete Cinsan đến khả năng phòng trừ nấm bệnh chính (*P. capsici*) gây hại rễ cây

hồ tiêu trong điều kiện đồng ruộng tại Đắk Lắk: vườn được trồng với khoảng cách 2,5 × 2,5 m tương tương với mật độ 1.600 cây/ha. Thiết kế gồm 4 công thức, 3 lần lặp, mỗi ô cơ sở 15 cây hồ tiêu. Công thức 1 (CT1): Không xử lý (đối chứng); CT2: BaC 0,2% (2 lít/cây); CT3: BaC 0,2% (4 lít/cây); CT4: BaC 0,2% (6 lít/cây).

5.1.2.2. Đánh giá hiệu quả phòng trừ tuyến trùng và nấm bệnh gây hại rễ cây cà phê của BaC ở tỉnh Gia Lai

Thí nghiệm 5.5: xác định hiệu quả của BaC đến khả năng phòng trừ tuyến trùng (*M. incognita* và *P. coffeae*) gây hại rễ cây cà phê trong điều kiện đồng ruộng tại Gia Lai: vườn thí nghiệm là vườn cà phê kinh doanh, khoảng cách trồng 3 × 3 m (1110 cây/ha), được chăm sóc bón phân và tưới nước đầy đủ, vườn có hiện tượng nhiễm tuyến trùng. Thí nghiệm gồm 4 công thức, 3 lần lặp, mỗi ô cơ sở 15 cây cà phê. Các công thức được bố trí theo ô vuông, giữa các ô cơ sở có dải phân cách là 1 hàng cà phê. Công thức 1 (CT1): Không xử lý (đối chứng); CT2: BaC 0,2% (3 lít/cây); CT3: BaC 0,2% (5 lít/cây); CT4: BaC 0,2% (7 lít/cây).

Thí nghiệm 5.6: xác định hiệu quả của BaC đến khả năng phòng trừ nấm bệnh chính (*F. oxysporum*) gây hại rễ cây cà phê trong điều kiện đồng ruộng tại Gia Lai: Vườn thí nghiệm là vườn cà phê kinh doanh, khoảng cách trồng 3 × 3 m (1.110 cây/ha), được chăm sóc bón phân và tưới nước đầy đủ, vườn có hiện tượng nhiễm tuyến trùng. Thí nghiệm gồm 4 công thức, 3 lần lặp, mỗi ô cơ sở 15 cây cà phê. Các công thức được bố trí theo ô vuông, giữa các ô cơ sở có dải phân cách là 1 hàng cà phê. Công

thức 1 (CT1): Không xử lý (đối chứng); CT2: BaC 0,2% (3 lít/cây); CT3: BaC 0,2% (5 lít/cây); CT4: BaC 0,2% (7 lít/cây).

Thí nghiệm 5.7: Xác định hiệu lực của BaC đến khả năng phòng trừ tuyến trùng (*M. incognita*) gây hại rễ cây hồ tiêu trong điều kiện đồng ruộng tại Gia Lai: Vườn được trồng với khoảng cách 2,5 × 2,0 m tương tương với mật độ 2.000 cây/ha. Thiết kế gồm 4 công thức, 3 lần lặp, mỗi ô cơ sở 15 cây hồ tiêu. Công thức 1 (CT1): Không xử lý (đối chứng); CT2: BaC 0,2% (2 lít/cây); CT3: BaC 0,2% (4 lít/cây); CT4: BaC 0,2% (6 lít/cây).

Thí nghiệm 5.8: Xác định hiệu quả của BaC đến khả năng phòng trừ nấm bệnh chính (*P. capsici*) gây hại rễ cây hồ tiêu trong điều kiện đồng ruộng ở Gia Lai: vườn được trồng với khoảng cách 2,5 × 2,0 m tương tương với mật độ 2.000 cây/ha. Thiết kế gồm 4 công thức, 3 lần lặp, mỗi ô cơ sở 15 cây hồ tiêu. Công thức 1 (CT1): Không xử lý (đối chứng); CT2: BaC 0,2% (2 lít/cây); CT3: CPSH 0,2% (4 lít/cây); CT4: BaC 0,2% (6 lít/cây).

5.1.2.3. Phương pháp theo dõi đánh giá

Xác định hiệu quả phòng trừ của BaC: Được tính theo công thức Henderson-Tilton:

$$\mathrm{H}(\%) = 1 - \frac{\text{Số tuyến trùng ở CT CPSH sau xử lý} \times \text{số TT ở CT ĐC trước xử lý}}{\text{Số ở CT ĐC sau xử lý} \times \text{số TT ở CT CPSH trước xử lý}} \times 100$$

Tỷ lệ vàng lá được tính theo công thức:

$$\mathrm{TLVL}\ (\%) = \frac{\text{Số cây bị bệnh}}{\text{Tổng số cây điều tra}} \times 100$$

Chỉ số bệnh vàng lá tính theo công thức của Townsend-Heuberger

$$\text{CSBB (\%)} = \frac{1n1 + 2n2 + 3n3 + 4n4}{4N} \times 100$$

Trong đó: N là tổng số cây điều tra; n_0: Số cây không bị nhiễm bệnh; n_1: Số cây bị nhiễm bệnh cấp 1: < 25% số lá trên cây bị vàng, rụng; n_2: Số cây bị nhiễm bệnh cấp 2: 25 - 50% số lá trên cây bị vàng, rụng; n_3: Số cây bị nhiễm bệnh cấp 3: 50 - 75% số lá trên cây bị vàng, rụng; n_4: Số cây bị nhiễm bệnh cấp 4: > 75% số lá trên cây bị vàng, rụng tới chết cây.

Tỷ lệ rễ bị u sưng/thối: Nhổ toàn bộ cây, rửa sạch để ráo nước, sau đó tách rễ bị u sưng/thối. Tỷ lệ rễ bị u sưng, thối được tính theo công thức:

$$\text{TLUS (\%)} = \frac{\text{Trọng lượng rễ bị u sưng}}{\text{Tổng trọng lượng theo dõi}} \times 100$$

Tỷ lệ cây chết (%) được tính theo công thức:

$$\text{Tỷ lệ cây chết (\%)} = \frac{\text{Tổng số cây chết}}{\text{Tổng số cây điều tra}} \times 100$$

5.1.3. Phương pháp xử lý số liệu, thống kê

Số liệu được phân tích so sánh ANOVA trong chương trình thống kê SAS 9.1. Những số liệu % được quy đổi sang arcsin hay căn bậc hai. Những số liệu mật độ tuyến trùng được chuyển sang log(x + 1) trước khi đưa vào xử lý thống kê. Các giá trị trung bình được gắn các ký tự giống nhau trên cùng một cột là không sai khác có ý nghĩa thống kê.

5.2. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

5.2.1. Đánh giá hiệu quả phòng trừ tuyến trùng và nấm bệnh chính gây hại rễ trên cây cà phê và hồ tiêu của BaC tại Đắk Lắk

5.2.1.1. Đánh giá hiệu lực phòng trừ tuyến trùng cà phê của BaC tại Đắk Lắk

Hiện tượng vàng lá, thối rễ trên cây cà phê phổ biến là do tuyến trùng kết hợp với nấm bệnh. Tuyến trùng gây hại xuất hiện chủ yếu trên vườn cà phê là tuyến trùng *P. coffeae* và tuyến trùng *M. incognita*. Ban đầu tuyến trùng xâm nhiễm gây vết thương trên bề mặt rễ tạo điều kiện cho nấm theo sau xâm nhiễm làm thối rễ cà phê khiến cho cây không hấp thu được dinh dưỡng và nước, cây bị suy yếu, vàng lá, cây bị nặng có thể bị chết.

Bảng 5.1. Mật độ *P. coffeae* trong rễ cà phê và hiệu lực phòng trừ

Công thức	*P. coffeae* trong rễ (con/5 g rễ)				Hiệu lực (%)		
	TXL	SXL 1 tháng	SXL 2 tháng	SXL 3 tháng	SXL 1 tháng	SXL 2 tháng	SXL 3 tháng
CT1	301	656	484	480	-	-	-
CT2	327	362	279	265	49,2	46,9	49,2
CT3	340	332	218	173	55,2	60,1	67,5
CT4	312	304	186	133	55,9	62,9	72,3
CV (%)	*20,6*	*19,0*	*12,9*	*14,7*			

Ghi chú: Công thức 1 (CT1): Không xử lý (đối chứng); CT2: BaC 0,2% (3 lít/cây); CT3: BaC 0,2% (5 lít/cây); CT4: BaC 0,2% (7 lít/cây).

Mật độ tuyến trùng *P. coffeae* trong rễ ở các công thức thí nghiệm trước xử lý nằm trong khoảng 301 - 340 con/5 g rễ. Sau 1 tháng xử lý, mật độ tuyến trùng *P. coffeae* trong rễ của công thức có xử lý chế phẩm có xu hướng giảm xuống trong khi mật độ tuyến trùng *P. coffeae* trong rễ của công thức đối chứng tăng cao. Công thức 4 có mật độ tuyến trùng giảm nhiều nhất (giảm 28 con), tiếp theo là công thức 3. Hiệu lực phòng trừ tuyến trùng *P. coffeae* trong rễ của các công thức xử lý đạt trên 50%, lần lượt là 55,2 và 55,9% tương ứng với công thức 3 và công thức 4. Đến thời điểm sau xử lý 2 tháng, mật độ tuyến trùng *P. coffeae* ở các công thức tiếp tục giảm. Hiệu lực của các công thức xử lý lần lượt là 46,9, 60,1 và 62,9% tương ứng với ở các công thức 2, 3 và 4. Tại thời điểm 3 tháng sau xử lý, hiệu lực của các công thức xử lý lần lượt là 49,2, 67,5 và 75,3% tương ứng với ở các công thức 2, 3 và 4.

Bảng 5.1. Mật độ *M. incognita* trong rễ cà phê và hiệu lực phòng trừ

Công thức	*M. incognita* trong rễ (con/5 g rễ)				Hiệu lực (%)		
	TXL	SXL 1 tháng	SXL 2 tháng	SXL 3 tháng	SXL 1 tháng	SXL 2 tháng	SXL 3 tháng
CT1	19	128	173[a]	64[a]	-	-	-
CT2	21	108	145[b]	43[b]	23,7	24,2	39,2
CT3	20	96	124[c]	19[c]	28,8	31,9	71,8
CT4	21	99	113[c]	15[c]	30,0	40,9	74,8
CV (%)	*32,4*	*20,1*	*23,2*	*29,5*			
$LSD_{(0,05)}$	*NS*	*NS*	*11,2*	*4,0*			

Ghi chú: Công thức 1 (CT1): Không xử lý (đối chứng); CT2: BaC 0,2% (3 lít/cây); CT3: BaC 0,2% (5 lít/cây); CT4: BaC 0,2% (7 lít/cây).

Mật độ tuyến trùng *M. incognita* trong rễ ở các công thức tại các thời điểm theo dõi khá thấp (dưới 200 con/5 g rễ). Hiệu lực đối với tuyến trùng *Meloidogyne* spp. của các công thức có xử lý khá cao.

Trước xử lý, mật độ *Meloidogyne* spp. trong rễ của các công thức khoảng 20 con/5 g rễ. Sau 1 tháng xử lý, mật độ *M. incognita* có xu hướng tăng ở các công thức. Công thức 3 tuy có mật độ tuyến trùng *M. incognita* trong rễ thấp nhất (96 con/5 g rễ) nhưng công thức 4 lại hiệu lực đối với *M. incognita* trong rễ cao nhất (đạt 30,0%), tiếp theo là công thức 3 có hiệu lực đạt 28,8%. Sau 2 tháng xử lý, công thức 4 có mật độ *M. incognita* trong rễ thấp nhất (113 con/5 g rễ) và hiệu lực đối với *M. incognita* trong rễ cao nhất (31,90%), tiếp theo là công thức 3 với mật độ *M. incognita* trong rễ là 124 con/5 g rễ và hiệu lực đạt 31,9%. Tại thời điểm 3 tháng sau xử lý, mật độ *M. incognita* trong rễ ở các công thức có xu hướng giảm, công thức 4 có số lượng tuyến trùng giảm cao nhất, mật độ *M. incognita* trong rễ thấp nhất (15 con/5 g rễ) và hiệu lực đối với *M. incognita* trong rễ cao nhất (78,8%). Tiếp theo là công thức 3 có hiệu lực là 71,8%.

Bảng 5.3. Mật độ *P. coffeae* trong đất cà phê và hiệu lực phòng trừ

Công thức	*P. coffeae* trong đất (con/100 g đất)				Hiệu lực (%)		
	TXL	SXL 1 tháng	SXL 2 tháng	SXL 3 tháng	SXL 1 tháng	SXL 2 tháng	SXL 3 tháng
CT1	21	89	84	60			
CT2	13	31	33	23	43,7	36,5	38,1
CT3	17	35	21	16	51,4	69,1	67,1
CT4	23	37	25	17	62,0	72,8	73,2
CV (%)	*10,13*	*7,13*	*10,36*	*20,23*			
$LSD_{(0,05)}$	*NS*	*10,23*	*12,35*	*16,72*			

Ghi chú: Công thức 1 (CT1): Không xử lý (đối chứng); CT2: BaC 0,2% (3 lít/cây); CT3: BaC 0,2% (5 lít/cây); CT4: BaC 0,2% (7 lít/cây).

Mật độ tuyến trùng *P. coffeae* trong đất của các công thức ở các thời điểm theo dõi khá thấp trong khoảng 13 - 89 con/100g đất. Sau xử lý 1 tháng, mật độ *P. coffeae* trong đất của các công thức đều có xu hướng tăng, trong đó công thức 4 có mật độ tuyến trùng tăng thấp nhất tăng 14 con. Mật độ *P. coffeae* trong đất của công thức này có sự sai khác so với công thức đối chứng. Đến sau xử lý 2, 3 tháng công thức 4 có mật độ *P. coffeae* trong mẫu đất thấp nhất. Hiệu lực phòng trừ *P. coffeae* trong đất của công thức 4 đều đạt cao nhất tại các đợt theo dõi, sau 1 tháng xử lý đạt 62,0%; đến sau xử lý 2 và 3 tháng hiệu lực đạt theo thứ tự là 72,8% và 74,2%. Tương ứng với 1, 2 và 3 tháng sau xử lý hiệu lực ở công thức 3 đạt giá trị 51,4, 69,1 và 67,1%.

Bảng 5.4. Mật độ *M. incognita* trong đất cà phê và hiệu lực phòng trừ

Công thức	*M. incognita* trong đất (con/100 g đất)				Hiệu lực (%)		
	TXL	SXL 1 tháng	SXL 2 tháng	SXL 3 tháng	SXL 1 tháng	SXL 2 tháng	SXL 3 tháng
CT1	32	67	93	62			
CT2	21	35	47	27	20,4	23,0	33,6
CT3	25	35	33	15	33,1	54,5	69,0
CT4	23	27	21	11	43,9	68,6	74,3
CV (%)	*10,79*	*5,08*	*17,28*	*14,29*			
$LSD_{(0,05)}$	*NS*	*0,16*	*0,54*	*0,37*			

Ghi chú: Công thức 1 (CT1): Không xử lý (đối chứng); CT2: BaC 0,2% (3 lít/cây); CT3: BaC 0,2% (5 lít/cây); CT4: BaC 0,2% (7 lít/cây).

Mật độ tuyến trùng *M. incognita* trong đất trước xử lý của các công thức đều rất thấp dưới 32 con/100 g đất. Đến thời điểm theo dõi tiếp theo (sau xử lý 1 tháng) mật độ *M. incognita* đều tăng ở các công thức. Công thức 4 có mật độ *M. incognita* trong đất tăng thấp nhất tăng 4 con còn công thức đối chứng tăng 25 con. Đến 2 và 3 tháng sau xử lý, mật độ *M. incognita* trong đất ở công thức 4 có xu hướng giảm và cũng có mật độ thấp nhất (giảm còn 21, 11 con/100g đất tại 2, 3 tháng sau xử lý). Hiệu lực phòng trừ *M. incognita* trong đất của công thức 4 tại 3 thời điểm theo dõi đều đạt hiệu lực cao nhất. Đến sau 3 tháng xử lý hiệu lực phòng trừ *M. incognita* trong đất của công thức 4 đạt 75,3%, công thức 2 đạt 69,0% và công thức 2 đạt 33,6%.

Bảng 5.5. Hiệu lực phòng trừ bệnh vàng lá cà phê của BaC

Công thức	Tỷ lệ vàng lá (%)				Chỉ số bệnh (%)			
	TXL	SXL 1 tháng	SXL 2 tháng	SXL 3 tháng	TXL	SXL 1 tháng	SXL 2 tháng	SXL 3 tháng
CT1	33,3	51,9	59,3	66,7	9,3	17,6	24,1	27,8
CT2	33,3	48,2	45,6	49,3	9,5	15,7	21,3	21,2
CT3	37,0	34,4	25,9	26,5	9,3	10,7	11,5	13,3
CT4	37,0	24,6	21,9	20,3	10,2	8,9	8,6	9,1
CV (%)	*12,4*	*14,1*	*7,5*	*9,9*	*15,3*	*12,7*	*8,5*	*7,3*
$LSD_{(0,05)}$	*NS*	*7,3*	*6,2*	*8,2*	*NS*	*5,1*	*4,4*	*4,2*

Ghi chú: Công thức 1 (CT1): Không xử lý (đối chứng); CT2: BaC 0,2% (3 lít/cây); CT3: BaC 0,2% (5 lít/cây); CT4: BaC 0,2% (7 lít/cây).

Tỷ lệ cây bị vàng lá ở các công thức ở mức độ trung bình <37%, chỉ số vàng lá của các công thức trong khoảng 10% tại thời điểm trước thí nghiệm. Sau xử lý, các công thức có xử lý chế phẩm đều có tỷ lệ cây bị vàng lá và chỉ số vàng lá thấp hơn so với đối chứng. Sau xử lý 1 tháng, tỷ lệ cây vàng lá và chỉ số vàng lá của công thức đối chứng là 51,9% và 17,6% còn các công thức có xử lý tỷ lệ cây bị vàng lá nằm trong khoảng 24,6 - 48,2% và chỉ số vàng lá nằm trong khoảng 8,9 - 15,7%. Sau 2 và 3 tháng xử lý, tỷ lệ cây bị vàng lá và chỉ số vàng lá của các công thức xử lý đều thấp hơn công thức đối chứng. Trong đó công thức 4 có tỷ lệ cây vàng lá và chỉ số vàng lá thấp nhất, tiếp đến là công thức 3. So sánh giữa công thức 4 và 3 không khác biệt về thống kê. Hiệu lực của các công thức xử lý đối với tỷ lệ vàng lá khá cao. Công thức xử lý 4 có hiệu lực đối với bệnh vàng lá do tuyến trùng tốt nhất so với hai công thức còn lại. Hiệu lực đối với tỷ lệ cây bị vàng lá đạt tốt nhất 72,6% tại thời điểm sau xử lý 3 tháng.

5.2.1.2. Đánh giá hiệu lực phòng trừ nấm bệnh cà phê của BaC tại Đắk Lắk

Bảng 5.6. Mật độ và tần suất xuất hiện *Fusarium* sp. trong đất cà phê

Công thức	Mật độ nấm (CFU/g đất)				Tần suất xuất hiện (%)			
	TXL	SXL 1 tháng	SXL 2 tháng	SXL 3 tháng	TXL	SXL 1 tháng	SXL 2 tháng	SXL 3 tháng
CT1	$0,23x10^4$	$0,31x10^4$	$0,24x10^4$	$1,28x10^4$	54,8	50,0	50,0	38,1
CT2	$0,24x10^4$	$0,30x10^4$	$0,21x10^4$	$0,72x10^4$	50,0	40,9	32,9	23,3
CT3	$0,24x10^4$	$0,27x10^4$	$0,18x10^4$	$0,65x10^4$	50,0	27,5	23,8	15,1
CT4	$0,27x10^4$	$0,24x10^4$	$0,14x10^4$	$0,63x10^4$	52,4	25,6	21,8	11,7
Cv (%)	*2,1*	*7,1*	*5,9*	*3,6*	*12,7*	*23,8*	*20,9*	*25,7*

Ghi chú: Công thức 1 (CT1): Không xử lý (đối chứng); CT2: BaC 0,2% (3 lít/cây); CT3: BaC 0,2% (5 lít/cây); CT4: BaC 0,2% (7 lít/cây).

Trước xử lý, mức chênh lệch về mật độ nấm *Fusarium* sp. trong đất giữa các công thức là không đáng kể, dao động từ (0,23 - 0,27) × 10^4 (CFU/g đất). Tất cả các công thức thí nghiệm đều có sự tăng giảm về mật độ nấm *Fusarium* sp. trong đất không tuân theo quy luật thời gian. Quan trắc đến thời điểm 3 tháng sau xử lý tất cả các công thức đều gia tăng về mật độ nấm *Fusarium* sp. trong đất so với thời điểm trước xử lý. Trong đó, công thức có mức tăng cao nhất là công thức đối chứng (1,28 × 10^4 CFU/g đất), kế đến lần lượt là công thức 3, đạt 0,65 × 10^4 CFU/g đất và công thức 4, đạt 0,63 × 10^4 CFU/g đất. Xét về ý nghĩa thống kê cả 2 công thức 3 và 4 đều có ý nghĩa thống kê so với đối chứng. Đây cũng là 2 công thức cho hiệu lực phòng trừ tốt nhất trong việc kiểm soát mật độ nấm *Fusarium* sp. trong đất tại thời điểm 3 tháng sau xử lý (>50%). Tần suất xuất hiện nấm *Fusarium* sp.trong rễ khá cao trước khi xử lý, dao động từ 50,0 - 54,8%. Trong khi mật độ nấm *Fusarium* trong đất có chiều hướng tăng tại các thời điểm sau xử lý thì ngược lại tần suất xuất hiện nấm *Fusarium* sp. trong rễ lại liên tục giảm ở tất cả các công thức thí nghiệm kể cả công thức đối chứng. Tuy nhiên, công thức đối chứng luôn là công thức có mật độ nấm *Fusarium* sp. trong rễ là cao nhất. Điều này cho thấy các công thức có xử lý thuốc có ảnh hưởng nhất định đến tần suất xuất hiện nấm *Fusarium* sp. trong rễ. Đặc biệt công thức có hàm lượng CPSH trên gốc càng cao thì tần suất xuất hiện của nấm *Fusarium* sp. trong rễ càng thấp. Tại thời điểm 3 tháng sau xử lý công thức đối chứng là công thức có tần suất xuất hiện nấm cao nhất (38,1%) và thấp nhất là công thức 4, đạt 11,7%.

Hiệu lực của BaC trong việc làm giảm tần suất xuất hiện nấm *Fusarium* sp. trong rễ của các công thức xử lý tại các đợt theo dõi đều không cao. Tại thời điểm sau xử lý 3 tháng công thức 4 là công thức duy nhất cho hiệu lực tốt nhất trong việc làm giảm tần suất xuất hiện nấm *Fusarium* sp. trong rễ, đạt 72,4%.

Bảng 5.7. Hiệu lực phòng trừ bệnh u sưng, thối rễ cà phê của BaC

Công thức	Tỷ lệ u sưng và thối rễ (%)				Hiệu lực (%)		
	TXL	SXL 1 tháng	SXL 2 tháng	SXL 3 tháng	SXL 1 tháng	SXL 2 tháng	SXL 3 tháng
CT1	49,0	48,3	44,0	43,3	-	-	-
CT2	42,7	37,2	31,2	35,6	10,3	27,9	38,8
CT3	40,0	25,7	21,6	26,4	39,7	47,8	64,3
CT4	46,7	22,4	19,8	22,1	46,5	54,4	72,4
CV (%)	*10,7*	*29,8*	*13,6*	*9,5*			
LSD $_{(0,05)}$	*NS*	*NS*	*11,11*	*7,72*			

Ghi chú: Công thức 1 (CT1): Không xử lý (đối chứng); CT2: BaC 0,2% (3 lít/cây); CT3: BaC 0,2% (5 lít/cây); CT4: BaC 0,2% (7 lít/cây).

Trước xử lý BaC, tỷ lệ u sưng và thối rễ khá cao dao động từ 40,0 - 49,0%. Qua các đợt theo dõi sau xử lý, tỷ lệ u sưng và thối rễ ở tất cả các công thức có xử lý thuốc đều có khuynh hướng giảm dần theo thứ tự thời gian. Mức giảm này có sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ở hầu hết các công thức xử lý so với công thức đối chứng tại thời điểm 2 và 3 tháng sau xử lý. Trong đó công thức có tỷ lệ u sưng thấp nhất là công thức 4 đạt 22,1% và cao nhất là công thức đối chứng đạt 43,3% tại thời điểm 3 tháng sau xử lý.

Kết quả bảng số liệu ghi nhận hiệu lực của BaC ở các công thức xử lý trong việc làm giảm tỷ lệ u sưng và thối rễ tăng dần theo thời gian và cho hiệu lực tốt nhất tại thời điểm 3 tháng sau xử lý. Trong đó công thức cho hiệu lực cao nhất là công thức 4 với mức 54,1%.

5.2.1.3. Đánh giá hiệu lực phòng trừ tuyến trùng hồ tiêu của BaC tại Đắk Lắk

Bảng 5.8. Hiệu lực phòng trừ bệnh u sưng, thối rễ hồ tiêu của BaC

Công thức	Tỷ lệ u sưng và thối rễ (%)				Hiệu lực (%)		
	TXL	SXL 1 tháng	SXL 2 tháng	SXL 3 tháng	SXL 1 tháng	SXL 2 tháng	SXL 3 tháng
CT1	38,3	57,2	59,4	49,8	-	-	-
CT2	46,7	53,9	54,3	35,2	22,7	25,0	29,3
CT3	50,0	46,6	43,9	20,2	37,6	43,3	63,5
CT4	46,7	41,4	34,2	16,5	40,6	52,8	70,2
CV (%)	*19,20*	*17,18*	*21,75*	*13,39*			

Ghi chú: Công thức 1 (CT1): Không xử lý (đối chứng); CT2: BaC 0,2% (2 lít/cây); CT3: BaC 0,2% (4 lít/cây); CT4: BaC 0,2% (6 lít/cây).

Tỷ lệ rễ hồ tiêu bị u sưng của các công thức xử lý và công thức đối chứng không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê. Công thức 4 có tỷ lệ rễ bị u sưng thấp nhất và hiệu lực đối với tỷ lệ rễ bị u sưng cao nhất tại các thời điểm theo dõi sau xử lý, hiệu lực tại các thời điểm lần lượt là 40,6%, 52,8% và 70,2%. Tiếp theo là công thức xử lý 3 có hiệu lực đối với tỷ lệ rễ bị u sưng đứng thứ hai, hiệu lực tại các thời điểm theo dõi lần lượt là 37,6%, 43,3%,

63,5%. Mật độ tuyến trùng *M. incognita* trong rễ của các công thức trước xử lý khá đồng đều, không có sự sai khác khi xử lý thông kê. Mật độ tuyến trùng trong rễ dao động trong khoảng 41 - 61 con/5 g rễ. Sau xử lý 1 tháng, mật độ tuyến trùng trong rễ ở các công thức có xu hướng tăng, công thức 3 có mật độ tuyến trùng tăng thấp nhất. Hiệu lực công thức 4 đạt 65,3, 72,7 và 74,2% tương ứng thời điểm sau xử lý 1, 2 và 3 tháng. Sau 3 tháng xử lý công thức chế phẩm 3 có hiệu lực đạt 71,3% và giữa 2 công thức 3 và 4 không có sự khác biệt về thống kê trong thời điểm này.

Bảng 5.9. Hiệu lực phòng trừ *M. incognita* trong đất và rễ hồ tiêu của BaC

Công thức	Mật độ *M. incognita* (con)				Hiệu lực (%)		
	TXL	SXL 1 tháng	SXL 2 tháng	SXL 3 tháng	SXL 1 tháng	SXL 2 tháng	SXL 3 tháng
CT1	65	217	276	350	-	-	-
CT2	75	161	161	165	37,0	51,0	53,6
CT3	60	84	88	111	51,8	64,6	72,0
CT4	78	103	96	99	56,2	69,3	76,2
CV (%)	*11,31*	*19,43*	*10,18*	*14,83*			

Ghi chú: Công thức 1 (CT1): Không xử lý (đối chứng); CT2: BaC 0,2% (2 lít/cây); CT3: BaC 0,2% (4 lít/cây); CT4: BaC 0,2% (6 lít/cây).

Trước xử lý, mật độ tuyến trùng *M. incognita* ở các công thức khá thấp dưới 100 con/100 g đất + 5 g rễ. Đến thời điểm 1 tháng sau xử lý, mật độ tuyến trùng ở các công thức có xu hướng tăng, trong đó, công thức 3, 4 có mật độ tuyến trùng tăng thấp nhất tiếp theo là công thức 2. Đồng thời, hiệu lực đối với tuyến

trùng của công thức 4 cũng đạt cao nhất (56,2%) tiếp theo là công thức 3. Sau xử lý 2 tháng, mật độ tuyến trùng trong đất của công thức đối chứng tăng cao, mật độ tuyến trùng trong đất của 3 công thức xử lý chỉ giảm nhẹ. Mật độ tuyến trùng của các công thức có xử lý chế phẩm có sự khác biệt về mặt thống kê đối với công thức đối chứng. Đến thời điểm này, công thức 4 vẫn có hiệu lực tốt nhất (69,3%) tiếp theo là công thức 3 đạt 64,6%. Tại thời điểm theo dõi sau xử lý 3 tháng, mật độ tuyến trùng có xu hướng giảm mạnh. Mật độ tuyến trùng ở công thức 4 là thấp nhất, tiếp theo là công thức 3. Hiệu lực đối với tuyến trùng của công thức 4 là tốt nhất (đạt 76,2%) tiếp theo là công thức 3 đạt 72,0%.

5.2.1.4. Đánh giá hiệu lực phòng trừ nấm bệnh gây hại hồ tiêu của BaC tại Đắk Lắk

Bảng 5.10. Tần suất xuất hiện nấm *P. capsici* trong đất và rễ hồ tiêu

Công thức	TSXH nấm trong đất (%)				TSXH nấm trong rễ (%)			
	TXL	SXL 1 tháng	SXL 2 tháng	SXL 3 tháng	TXL	SXL 1 tháng	SXL 2 tháng	SXL 3 tháng
CT1	61,1	66,7	72,2	61,1	27,8	38,9	61,1	44,4
CT2	66,7	55,6	50,0	33,3	27,5	33,3	47,8	32,2
CT3	62,3	44,4	38,9	22,2	32,3	33,3	27,8	16,7
CT4	62,7	38,9	27,8	16,7	33,7	27,8	21,2	11,1
CV (%)	*16,8*	*25,4*	*23,7*	*16,8*	*19,4*	*16,7*	*15,7*	*16,6*
$LSD_{(0,05)}$	*NS*	*NS*	*20,5*	*11,6*	*NS*	*NS*	*18,2*	*5,6*

Ghi chú: Công thức 1 (CT1): Không xử lý (đối chứng); CT2: CPSH 0,2% (2 lít/cây); CT3: CPSH 0,2% (4 lít/cây); CT4: CPSH 0,2% (6 lít/cây).

Trước xử lý, tần suất xuất hiện nấm *P. capsici* trong đất khá tương đồng ở các công thức thí nghiệm dao động từ 61,1 - 66,7%. Qua các đợt theo dõi, các công thức xử lý thuốc đều có chiều hướng giảm dần theo thời gian về tần suất xuất hiện nấm *P. capsici* trong đất. Trong khi đó, công thức đối chứng có tần suất xuất hiện nấm *P. capsici* lại tăng giảm không theo quy luật. Tuy nhiên, công thức đối chứng luôn là công thức có tần suất xuất hiện nấm cao nhất tại các thời điểm theo dõi. Tại thời điểm sau xử lý 3 tháng, công thức có tần suất xuất hiện nấm *P. capsici* thấp nhất là công thức 4, đạt 16,7%, kế đến lần lượt là công thức 3, đạt 22,2%, công thức 2, đạt 33,3% và cao nhất là công thức đối chứng (61,1%).

Kết quả về tần suất xuất hiện nấm *P. capsici* trong rễ qua các đợt theo dõi được thể hiện trong bảng 5.10: Trước xử lý tần suất xuất hiện nấm ở mức trung bình dao động từ 27,8 - 33,7%. Sự tăng giảm về tần suất xuất hiện nấm *P. capsici* trong rễ qua các đợt theo dõi sau xử lý ở hầu hết các công thức thí nghiệm là không tuân theo quy luật về thời gian. Theo dõi đến thời điểm sau xử lý 3 tháng, công thức có tần suất xuất hiện của nấm *P. capsici* trong rễ cao nhất là công thức đối chứng (44,4%) và thấp nhất là công thức 4, đạt 11,1%. Sự khác biệt này có nghĩa thống kê rõ tại thời điểm sau xử lý 2 và 3 tháng ở các công thức xử lý so với công thức đối chứng.

Bảng 5.11. Tỷ lệ cây hồ tiêu bị chết ở các công thức xử lý BaC

Công thức	Tỷ lệ cây hồ tiêu chết (%)			
	TXL	SXL 1 tháng	SXL 2 tháng	SXL 3 tháng
CT1	3,7	13,1	22,3	22,4
CT2	3,2	10,4	15,8	13,3
CT3	3,5	8,5	13,4	8,5
CT4	3,5	7,70	11,6	7,1
CV (%)	*33,85*	*25,38*	*22,44*	*36,48*
$LSD_{(0,05)}$	*NS*	*1,88*	*4,52*	*3,94*

Ghi chú: Công thức 1 (CT1): Không xử lý (đối chứng); CT2: BaC 0,2% (2 lít/cây); CT3: BaC 0,2% (4 lít/cây); CT4: BaC 0,2% (6 lít/cây).

Trước xử lý, tỷ lệ cây chết ở các công thức ngang bằng nhau với tỷ lệ 3,5%. Các đợt theo dõi tiếp theo, tỷ lệ cây chết có xu hướng tăng dần qua thời gian ở hầu hết các công thức thí nghiệm. Tuy nhiên tăng cao nhất luôn là công thức đối chứng. Tại thời điểm sau xử lý 3 tháng, công thức có tỷ lệ cây chết cao nhất là công thức đối chứng (22,4%) và thấp nhất là 2 công thức 3 và 4, đạt lần lượt là 8,5 và 7,1%.

5.2.2. Đánh giá hiệu quả phòng trừ tuyến trùng và nấm bệnh chính gây hại rễ trên cây cà phê và hồ tiêu của BaC tại Gia Lai

5.2.2.1. Đánh giá hiệu lực phòng trừ tuyến trùng cà phê của BaC tại Gia Lai

Mật độ tuyến trùng *P. coffeae* trong rễ ở các công thức thí nghiệm trước xử lý nằm trong khoảng 212 - 221 con/5 g rễ. Mật độ tuyến trùng *P. coffeae* trong rễ có sự sai khác giữa các công

thức sau các thời gian theo dõi. Sau 1 tháng xử lý, mật độ tuyến trùng *P. coffeae* trong rễ của công thức có xử lý chế phẩm có xu hướng giảm xuống trong khi mật độ tuyến trùng *P. coffeae* trong rễ của công thức đối chứng tăng cao. Công thức 4 có mật độ tuyến trùng giảm nhiều nhất, tiếp theo là công thức 3. Hiệu lực phòng trừ tuyến trùng *P. coffeae* trong rễ của các công thức xử lý đạt 54,2% ở công thức 4.

Bảng 5.12. Mật độ *P. coffeae* trong rễ cà phê ở các công thức

Công thức	*P. coffeae* trong rễ (con/5 g rễ)				Hiệu lực (%)		
	TXL	SXL 1 tháng	SXL 2 tháng	SXL 3 tháng	SXL 1 tháng	SXL 2 tháng	SXL 3 tháng
CT1	212	507	660	710			
CT2	221	376	455	441	28,9	33,9	37,9
CT3	215	270	327	340	47,5	51,1	56,9
CT4	219	240	269	242	54,2	60,5	69,1
CV (%)	*14,4*	*16,3*	*15,2*	*13,9*			
$LSD_{(0,05)}$	*4,3*	*32,4*	*121,2*	*101,6*			

Ghi chú: Công thức 1 (CT1): Không xử lý (đối chứng); CT2: BaC 0,2% (3 lít/cây); CT3: BaC 0,2% (5 lít/cây); CT4: BaC 0,2% (7 lít/cây).

Hiệu lực của các công thức xử lý lần lượt là 28,9, 47,5 và 54,2% ở các công thức xử lý 2, 3 và 4. Đến thời điểm sau xử lý 2 tháng, mật độ tuyến trùng *P. coffeae* ở các công thức tiếp tục giảm. Mật độ tuyến trùng *P. coffeae* ở các công thức xử lý chế phẩm đều có sự sai khác có ý nghĩa đối với công thức đối chứng. Hiệu lực của các công thức xử lý lần lượt là 33,9, 51,1 và 60,6% ở các công thức 2, 3 và 4 theo thứ tự. Tại thời điểm 3 tháng sau xử lý, hiệu lực

của các công thức lần lượt là 37,9, 56,9 và 69,1% tương ứng các công thức 2, 3 và 4.

Mật độ tuyến trùng *M. incognita* trong rễ ở các công thức tại các thời điểm theo dõi khá thấp (dưới 200 con/5 g rễ). Hiệu lực đối với tuyến trùng *M. incognita* của các công thức có xử lý khá cao. Trước xử lý, mật độ tuyến trùng *M. incognita* trong rễ của các công thức ở khoảng 41 - 50 con/5 g rễ và không có sự sai khác có ý nghĩa thống kê.

Bảng 5.13. Mật độ *M. incognita* trong rễ cà phê ở các công thức

Công thức	*M. incognita* trong rễ (con/5 g rễ)				Hiệu lực (%)		
	TXL	SXL 1 tháng	SXL 2 tháng	SXL 3 tháng	SXL 1 tháng	SXL 2 tháng	SXL 3 tháng
CT1	42	143	182	291			
CT2	50	128	148	183	24,8	31,7	37,1
CT3	41	81	92	116	42,0	48,2	64,1
CT4	48	80	87	90	51,0	58,2	72,2
CV (%)	*13,7*	*20,1*	*15,4*	*19,6*			
$LSD_{(0,05)}$	*NS*	*28,6*	*7,3*	*22,5*			

Ghi chú: Công thức 1 (CT1): Không xử lý (đối chứng); CT2: BaC 0,2% (3 lít/cây); CT3: BaC 0,2% (5 lít/cây); CT4: BaC 0,2% (7 lít/cây).

Tại thời điểm 3 tháng sau xử lý, mật độ tuyến trùng *M. incognita* trong rễ ở các công thức thể hiện rất khác nhau trong đó công thức 4 có mật độ tuyến trùng thấp hơn hẳn so với công thức đối chứng và công thức 2. Qua bảng cho thấy hiệu lực ở

công thức 2, 3 và 4 lần lượt là 37,1, 64,1 và 72,2% theo thứ tự. Điều này có thể cho thấy rằng công thức 4 cho hiệu lực thuốc tốt nhất sau 3 tháng xử lý, tiếp đến là công thức 3. Công thức 2, mặc dù số tuyến trùng giảm nhiều so với đối chứng, tuy nhiên hiệu lực vẫn khá thấp so với đối chứng.

Bảng 5.14. Mật độ *P. coffeae* trong đất cà phê ở các công thức

Công thức	*P. coffeae* trong đất (con/100 g đất)				Hiệu lực (%)		
	TXL	SXL 1 tháng	SXL 2 tháng	SXL 3 tháng	SXL 1 tháng	SXL 2 tháng	SXL 3 tháng
CT1	18	70	73	75			
CT2	21	51	49	37	37,6	42,5	50,7
CT3	19	42	33	29	43,2	57,2	65,2
CT4	25	41	35	23	57,8	65,5	72,4
CV (%)	*6,22*	*15,7*	*14,8*	*17,3*			
$LSD_{(0,05)}$	*NS*	*1,36*	*3,8*	*5,8*			

Ghi chú: Công thức 1 (CT1): Không xử lý (đối chứng); CT2: BaC 0,2% (3 lít/cây); CT3: BaC 0,2% (5 lít/cây); CT4: BaC 0,2% (7 lít/cây).

Mật độ tuyến trùng *P. coffeae* trong đất của các công thức ở các thời điểm theo dõi khá thấp trong khoảng 18 - 75 con/100g đất. Sau xử lý 1 tháng, mật độ tuyến trùng *P. coffeae* trong đất của các công thức đều có xu hướng tăng, trong đó công thức 4 có mật độ tuyến trùng tăng thấp nhất tăng 16 con. Mật độ tuyến trùng *P. coffeae* trong đất của công thức 4 và 3 có sự sai khác rõ so với công thức đối chứng. Đến sau xử lý 2, 3 tháng, công thức

4 có mật độ tuyến trùng *P. coffeae* trong mẫu đất thấp nhất, chỉ 23 con so với đối chứng là 75 con. Hiệu lực phòng trừ tuyến trùng *P. coffeae* trong đất của công thức 4 đều đạt cao nhất tại các đợt theo dõi, sau 1 tháng xử lý đạt 50,7%; đến sau xử lý 2 và 3 tháng hiệu lực đạt tương ứng 65,2% và 72,4%.

Bảng 5.15. Mật độ *M. incognita* trong đất cà phê ở các công thức

Công thức	*M. incognita* trong đất (con/100 g đất)				Hiệu lực (%)		
	TXL	SXL 1 tháng	SXL 2 tháng	SXL 3 tháng	SXL 1 tháng	SXL 2 tháng	SXL 3 tháng
CT1	26	73	107	99	-	-	-
CT2	28	57	72	55	27,5	37,5	44,4
CT3	24	43	45	33	36,2	54,4	70,0
CT4	27	36	37	29	52,5	66,7	73,6
CV (%)	*8,9*	*15,28*	*16,4*	*13,9*			
$LSD_{(0,05)}$	*NS*	*6,6*	*7,3*	*4,6*			

Ghi chú: Công thức 1 (CT1): Không xử lý (đối chứng); CT2: BaC 0,2% (3 lít/cây); CT3: BaC 0,2% (5 lít/cây); CT4: BaC 0,2% (7 lít/cây).

Mật độ tuyến trùng trong đất trước xử lý của các công thức đều rất thấp dưới 32 con/100g đất. Đến thời điểm theo dõi tiếp theo (sau xử lý 1 tháng) mật độ tuyến trùng đều tăng ở các công thức. Công thức 4 có mật độ tuyến trùng *M. incognita* trong đất tăng thấp nhất tăng 9 con còn công thức đối chứng tăng 47 con. Đến 2 và 3 tháng sau xử lý, mật độ tuyến trùng trong đất ở công thức 4 có xu hướng giảm và cũng có mật độ thấp nhất. Hiệu lực phòng trừ tuyến trùng trong đất của công thức 4 tại 3 thời điểm

theo dõi đều đạt hiệu lực cao nhất. Đến sau 3 tháng xử lý, hiệu lực phòng trừ tuyến trùng trong đất của công thức 4 đạt 73,6%.

Trước xử lý, tổng mật độ tuyến trùng trong đất ở các công thức là tương đương nhau, không có sự sai khác có ý nghĩa thống kê. Qua bảng số liệu tổng mật độ tuyến trùng trong đất nhận thấy, các công thức có xử lý chế phẩm đều có tổng mật độ tuyến trùng trong đất thấp hơn công thức đối chứng, có sự sai khác có ý nghĩa thống kê so với đối chứng. Trong đó công thức có tổng mật độ tuyến trùng trong đất thấp nhất là công thức 4, với tổng mật độ tuyến trùng trong đất ở các thời điểm sau xử lý 1, 2 và 3 tháng lần lượt là 77, 72, 52 con/100 g đất. Hiệu lực phòng trừ của công thức 4 đạt cao nhất ở các đợt theo dõi. Hiệu lực tại các đợt theo dõi lần lượt là 54,4%; 66,2% và 73,1%.

Bảng 5.16. Tỷ lệ bệnh vàng lá và chỉ số bệnh cà phê ở các công thức

Công thức	Tỷ lệ vàng lá (%)				Chỉ số vàng lá (%)			
	TXL	SXL 1 tháng	SXL 2 tháng	SXL 3 tháng	TXL	SXL 1 tháng	SXL 2 tháng	SXL 3 tháng
CT1	35,5	57,2	62,5	69,5	11,5	18,5	22,5	29,5
CT2	33,5	46,5	43,5	48,3	11,0	15,5	16,5	21,5
CT3	36,5	42,5	29,5	25,0	9,5	10,5	8,5	12,5
CT4	34,0	26,9	20,5	22,5	10,5	8,5	7,0	9,0
CV (%)	*8,5*	*15,4*	*17,5*	*15,9*	*17,3*	*13,5*	*10,5*	*17,4*
$LSD_{(0,05)}$	*NS*	*8,8*	*9,2*	*2,6*	*NS*	*5,1*	*4,4*	*4,2*

Ghi chú: Công thức 1 (CT1): Không xử lý (đối chứng); CT2: BaC 0,2% (3 lít/cây); CT3: BaC 0,2% (5 lít/cây); CT4: BaC 0,2% (7 lít/cây).

Tỷ lệ cây bị vàng lá ở các công thức ở mức độ nhẹ < 40%, và chỉ số vàng lá của các công thức trong khoảng 10% tại thời điểm trước thí nghiệm. Sau xử lý, các công thức có xử lý chế phẩm đều có tỷ lệ cây bị vàng lá và chỉ số vàng lá thấp hơn so với đối chứng. Sau xử lý 1 tháng, tỷ lệ cây vàng lá và chỉ số vàng lá của công thức đối chứng là 57,2% và 11,5% còn các công thức có xử lý, tỷ lệ cây bị vàng lá nằm trong khoảng 26,9 - 46,5% và chỉ số vàng lá nằm trong khoảng 8,5 - 15,5%. Sau 2 và 3 tháng xử lý, tỷ lệ cây bị vàng lá và chỉ số vàng lá của các công thức xử lý đều thấp hơn công thức đối chứng. Trong đó công thức 4 có tỷ lệ cây vàng lá và chỉ số vàng lá thấp nhất. Đồng thời chỉ số vàng lá của công thức này có sự sai khác có ý nghĩa thống kê so với công thức đối chứng ở cả 2 thời điểm theo dõi.

5.2.2.2. Đánh giá hiệu lực phòng trừ nấm bệnh cà phê của BaC tại Gia Lai.

Bảng 5.17. Hiệu lực phòng trừ bệnh vàng lá cà phê của CPSH

Công thức	Tỷ lệ vàng lá (%)				Hiệu lực (%)		
	TXL	SXL 1 tháng	SXL 2 tháng	SXL 3 tháng	SXL 1 tháng	SXL 2 tháng	SXL 3 tháng
CT1	25,5	54,5	61,6	60,5	-	-	-
CT2	27,5	45,5	46,0	37,5	22,6	30,8	38,0
CT3	25,5	35,5	33,5	23,8	34,9	45,6	64,6
CT4	26,0	29,5	22,0	17,5	46,9	65,0	74,0
CV (%)	*7,38*	*12,45*	*10,15*	*13,27*			

Ghi chú: Công thức 1 (CT1): Không xử lý (đối chứng); CT2: BaC 0,2% (3 lít/cây); CT3: BaC 0,2% (5 lít/cây); CT4: BaC 0,2% (7 lít/cây).

Trước xử lý, tỷ lệ vàng lá dao động ở mức trung bình và ở các công thức khác nhau có tỷ lệ vàng lá tương đương nhau. Tại tất cả các thời điểm theo dõi sau xử lý, công thức đối chứng là công thức duy nhất có xu hướng tăng dần theo thứ tự thời gian và là công thức có tỷ lệ bệnh cao nhất tại mỗi thời điểm theo dõi. Ngược lại, công thức 3 và công thức 4 có tỷ lệ bệnh vàng lá giảm dần theo thứ tự thời gian. Trong đó, công thức 4 là công thức có tỷ lệ bệnh thấp nhất (17,5%), kế đến là công 3, đạt 23,8%. Đây cũng là 2 công thức có tỷ lệ bệnh khác biệt rõ so với đối chứng và cho hiệu lực thuốc tốt nhất, trong đó công thức 4 có hiệu lực sau 3 tháng xử lý lên đến 74,0%.

Trước xử lý, mức chênh lệch về mật độ nấm *F. oxysporum* trong đất giữa các công thức là không đáng kể, dao động từ (0,15 - 0,17) $\times 10^4$ (CFU/g đất). Tất cả các công thức thí nghiệm đều có sự tăng giảm về mật độ nấm *F. oxysporum* trong đất không tuân theo quy luật thời gian. Quan trắc đến thời điểm 3 tháng sau xử lý tất cả các công thức đều gia tăng về mật độ nấm *F. oxysporum* trong đất so với thời điểm trước xử lý. Trong đó, công thức có mức tăng cao nhất là công thức đối chứng (0,75 $\times 10^4$ CFU/g đất), kế đến lần lượt là công thức 2, đạt 0,66 $\times 10^4$ CFU/g đất, công thức 3, đạt 0,45 $\times 10^4$ CFU/g đất và công thức 4, đạt 0,33 $\times 10^4$ CFU/g đất.

Bảng 5.18. Mật độ nấm và tần suất xuất hiện *F. oxysporum* trong đất cà phê

Công thức	Mật độ nấm trong đất (%)				TSXH nấm trong rễ (%)			
	TXL	SXL 1 tháng	SXL 2 tháng	SXL 3 tháng	TXL	SXL 1 tháng	SXL 2 tháng	SXL 3 tháng
CT1	$0,15x10^4$	$0,21x10^4$	$0,22x10^4$	$0,75x10^4$	45,4	49,0	53,5	50,5
CT2	$0,16x10^4$	$0,20x10^4$	$0,21x10^4$	$0,66x10^4$	46,5	43,5	39,5	32,0
CT3	$0,15x10^4$	$0,22x10^4$	$0,17x10^4$	$0,45x10^4$	47,0	30,0	25,0	15,4
CT4	$0,17x10^4$	$0,21x10^4$	$0,14x10^4$	$0,33x10^4$	45,5	26,5	18,5	12,5
CV (%)	*6,7*	*10,5*	*8,5*	*11,4*	*6,72*	*13,51*	*8,76*	*11,34*

Ghi chú: Công thức 1 (CT1): Không xử lý (đối chứng); CT2: BaC 0,2% (3 lít/cây); CT3: BaC 0,2% (5 lít/cây); CT4: BaC 0,2% (7 lít/cây).

Trước xử lý, tần suất xuất hiện nấm *F. oxysporum* trong rễ khá cao, dao động từ 45,4 - 47,0%. Công thức đối chứng luôn là công thức có mật độ nấm *F. oxysporum* trong rễ cao nhất. Điều này cho thấy các công thức có xử lý thuốc có ảnh hưởng nhất định đến tần suất xuất hiện nấm *F. oxysporum* trong rễ. Đặc biệt công thức có lượng dung dịch thuốc/gốc càng cao thì tần suất xuất hiện của nấm *F. oxysporum* trong rễ càng thấp. Tại thời điểm 3 tháng sau xử lý, công thức đối chứng là công thức có tần suất xuất hiện nấm cao nhất (50,5%) và thấp nhất là công thức 4 đạt 12,5%, tiếp đến là công thức 3 đạt 15,4% và công thức 2 đạt 32,0%. Nhìn chung, hiệu lực thuốc trong việc làm giảm tần suất xuất hiện nấm *F. oxysporum* trong rễ ở công thức 4 cho hiệu lực tốt nhất trong việc làm giảm tần suất xuất hiện nấm *F. oxysporum* trong rễ, đạt 77,7% và công thức 3 đạt 72,6%.

5.2.2.3. Đánh giá hiệu lực phòng trừ tuyến trùng hồ tiêu của BaC tại Gia Lai

Bảng 5.19. Mật độ *M. incognita* trong rễ hồ tiêu ở các công thức

Công thức	*M. incognita* trong rễ (con/5 g rễ)				Hiệu lực (%)		
	TXL	SXL 1 tháng	SXL 2 tháng	SXL 3 tháng	SXL 1 tháng	SXL 2 tháng	SXL 3 tháng
CT1	46,3	200,7	226,4	272,5	-	-	-
CT2	42,4	155,2	159,3	182,2	15,1	22,9	33,1
CT3	55,6	168,5	182,7	168,1	29,7	32,6	44,4
CT4	48,4	115,8	118,6	81,4	44,9	50,0	73,2
CV (%)	*16,5*	*18,7*	*21,2*	*18,9*			

Ghi chú: Công thức 1 (CT1): Không xử lý (đối chứng); CT2: BaC 0,2% (2 lít/cây); CT3: BaC 0,2% (4 lít/cây); CT4: BaC 0,2% (6 lít/cây).

Mật độ tuyến trùng *M. incognita* trong rễ của các công thức trước xử lý có sự biến động nhỏ, không có sự sai khác khi xử lý thông kê. Mật độ tuyến trùng trong rễ dao động trong khoảng 42,4 - 55,6 con/ 5 g rễ.

Qua các thời gian theo dõi, mật độ tuyến trùng đều tăng ở các công thức, Cụ thể, sau xử lý 1 tháng, mật độ tuyến trùng trong rễ ở các công thức có xu hướng tăng, công thức 4 có mật độ tuyến trùng tăng thấp nhất. Hiệu lực công thức 4 đạt 44,9, 50,0 và 73,2% sau 1, 2 và 3 tháng xử lý. Sau 3 tháng xử lý, công thức 3 hiệu lực chỉ đạt 44,4%.

Bảng 5.20. Mật độ *M. incognita* trong đất hồ tiêu ở các công thức

Công thức	*M. incognita* trong đất (con/100 g đất)				Hiệu lực (%)		
	TXL	SXL 1 tháng	SXL 2 tháng	SXL 3 tháng	SXL 1 tháng	SXL 2 tháng	SXL 3 tháng
CT1	32,5	62,7	86,4	90,5	-	-	-
CT2	26,6	43,5	52,7	59,8	15,2	25,5	33,9
CT3	33,1	35,8	45,3	32,4	43,9	48,5	67,8
CT4	27,9	28,9	26,5	26,1	46,3	64,3	74,0
CV (%)	*11,5*	*16,4*	*15.3*	*17,2*			
$LSD_{(0,05)}$	*NS*	*8,2*	*7,9*	*6,8*			

Ghi chú: Công thức 1 (CT1): Không xử lý (đối chứng); CT2: BaC 0,2% (2 lít/cây); CT3: BaC 0,2% (4 lít/cây); CT4: BaC 0,2% (6 lít/cây).

Sau thời điểm 1 tháng xử lý, mật độ tuyến trùng trong đất ở các công thức có xu hướng tăng, trong đó, công thức 4 có mật độ tuyến trùng tăng thấp nhất tiếp theo là công thức 3. Đồng thời, hiệu lực đối với tuyến trùng trong đất của công thức 4 cũng đạt cao nhất (46,3%) tiếp theo là công thức 3 đạt 43,9%. Sau xử lý 2 tháng, mật độ tuyến trùng trong đất của công thức đối chứng tăng cao, mật độ tuyến trùng trong đất của 3 công thức xử lý chỉ giảm nhẹ. Mật độ tuyến trùng trong đất của các công thức có xử lý chế phẩm có sự khác biệt về mặt thống kê đối với công thức đối chứng. Đến thời điểm này, công thức 4 vẫn có hiệu lực tốt nhất (64,3%) tiếp theo là công thức 3 đạt 48,5%. Tại thời điểm theo dõi sau xử lý 3 tháng, mật độ tuyến trùng trong đất có xu hướng giảm mạnh. Mật độ tuyến trùng trong đất ở công thức xử lý 4 là thấp nhất (26 con/100 g đất), tiếp theo là công thức 3 (32 con/100

g đất). Hiệu lực đối với tuyến trùng trong đất của công thức 4 là tốt nhất (đạt 74,0%) tiếp theo là công thức 3 đạt 67,8%.

5.2.2.4. Đánh giá hiệu lực phòng trừ nấm bệnh gây hại hồ tiêu của BaC tại Gia Lai

Bảng 5.21. Tần suất xuất hiện nấm *P. capsici* và tỷ lệ cây hồ tiêu chết

Công thức	Tần suất xuất hiện nấm (%)				Tỷ lệ cây hồ tiêu chết (%)			
	TXL	SXL 1 tháng	SXL 2 tháng	SXL 3 tháng	SXL 1 tháng	SXL 2 tháng	SXL 3 tháng	TXL
CT1	32,6	41,5	63,2	58,9	6,7	15,3	25,5	31,7
CT2	34,2	36,7	50,5	39,3	7,0	12,7	19,7	21,5
CT3	33,7	35,6	36,2	24,8	6,4	9,6	12,1	13,7
CT4	35,5	31,5	29,6	17,9	7,9	8,5	10,5	9,6
CV (%)	*12,9*	*21,2*	*13,7*	*14,3*	*15,8*	*17,2*	*21,5*	*16,4*
$LSD_{(0,05)}$	*NS*	*2,55*	*4,68*	*5,32*				

Ghi chú: Công thức 1 (CT1): Không xử lý (đối chứng); CT2: BaC 0,2% (2 lít/cây); CT3: BaC 0,2% (4 lít/cây); CT4: BaC 0,2% (6 lít/cây).

Kết quả về tần suất xuất hiện nấm *P. capsici* trong rễ qua các đợt theo dõi được thể hiện trong bảng 5.21: Trước xử lý, tần suất xuất hiện nấm ở mức trung bình dao động từ 32,6 - 35,5%. Sự tăng giảm về tần suất xuất hiện nấm *P. capsici* trong rễ qua các đợt theo dõi sau xử lý ở hầu hết các công thức thử nghiệm là không tuân theo quy luật về thời gian. Theo dõi đến thời điểm sau xử lý 3 tháng, công thức có tần suất xuất hiện của nấm *P. capsici* trong rễ cao nhất là công thức đối chứng (58,9%) và thấp nhất là công thức 4, đạt 17,9%. Sự khác biệt này có nghĩa thống kê rõ tại thời điểm sau xử lý 2 và 3 tháng ở các công thức xử lý so với công thức đối chứng. Hiệu lực thuốc của các công

thức có xu hướng tăng dần theo thứ tự thời gian. Các công thức có lượng dung dịch thuốc/gốc càng cao thì cho hiệu lực phòng trừ càng cao. Tại thời điểm sau xử lý 3 tháng, công thức 4 cho hiệu lực cao nhất (72,6%), tiếp đến lần lượt là công thức 3, đạt 62,1% và công thức 2, đạt 33,3%.

Trước xử lý, tỷ lệ cây chết ở các công thức từ 6,4 - 7,9%. Các đợt theo dõi tiếp theo, tỷ lệ cây chết có xu hướng tăng dần qua thời gian ở hầu hết các công thức thí nghiệm, tuy nhiên tăng cao nhất luôn là công thức đối chứng. Tại thời điểm sau xử lý 3 tháng, công thức có tỷ lệ cây chết cao nhất là công thức đối chứng (31,7%) và thấp nhất là công thức 4 (9,6%), tiếp đến là công thức 3 (13,7%) và công thức 2 (21,5%). Qua đó, công thức 4 cho hiệu lực cao nhất đạt 72,7%, kế đến lần lượt là công thức 3 đạt 61,1% và công thức 2 đạt 32,2%.

Bảng 5.22. Hiệu quả sử dụng BaC đến năng suất cà phê

Công thức	Thí nghiệm tuyến trùng cà phê ở ĐL		Thí nghiệm tuyến trùng cà phê ở GL		Thí nghiệm nấm bệnh cà phê ở ĐL		Thí nghiệm nấm bệnh cà phê ở GL	
	Năng suất (tấn nhân/ha)	Tăng so với ĐC (%)	Năng suất (tấn nhân/ha)	Tăng so với ĐC (%)	Năng suất (tấn nhân/ha)	Tăng so với ĐC (%)	Năng suất (tấn nhân/ha)	Tăng so với ĐC (%)
CT1	2,25	-	2,03	-	2,11	-	1,86	-
CT2	2,54	11,4	2,23	9,0	2,44	13,5	2,00	7,0
CT3	2,92	22,9	2,61	22,2	3,01	29,9	2,23	16,6
CT4	3,28	31,4	2,72	25,4	3,18	33,6	2,36	21,2
CV(%)	*5,49*		*6,02*		*5,93*		*4,52*	-

Ghi chú: ĐL: Đắk Lắk; GL: Gia Lai; Công thức 1 (CT1): Không xử lý (đối chứng); CT2: BaC 0,2% (3 lít/cây); CT3: BaC 0,2% (5 lít/cây); CT4: BaC 0,2% (7 lít/cây).

Sử dụng BaC phòng trừ tuyến trùng gây hại cà phê cho thấy: Ở Đắk Lắk, năng suất của vườn thực hiện thí nghiệm ở mức khá, năng suất dao động trong khoảng 2,25 - 3,28 tấn nhân/ha. Mức tăng so với đối chứng trong khoảng 11,4 - 31,4%. Công thức 4 có năng suất cao nhất (3,28 tấn nhân/ha) và mức tăng so với đối chứng cao nhất (31,4%). Công thức 3 có mức tăng năng suất so với đối chứng là 22,9%. Công thức 2 tăng năng suất so với đối chứng là 11,4%. Ở Gia Lai, năng suất của vườn thực hiện thí nghiệm ở mức trung bình, năng suất trên 1 ha là 2,03 - 2,72 tấn/ha. Mức tăng so với đối chứng trong khoảng 9,0 - 25,4%. Công thức 4 có năng suất cao nhất đạt 2,72 tấn/ha và mức tăng so với đối chứng cao nhất 25,4%. So sánh hai công thức 3 và 4, nhận thấy sự khác biệt không có ý nghĩa về thống kê, chỉ dao động ở mức 0,11 tấn/ha.

Sử dụng BaC phòng trừ nấm bệnh gây hại cà phê cho thấy: Ở Đắk Lắk, năng suất dao động từ 2,11 - 3,18 tấn nhân/ha. Trong đó, công thức đối chứng có năng suất trung bình thấp nhất đạt 2,11 tấn/ha và cao nhất là công thức 4 đạt 3,18 tấn/ha. Như vậy ở công thức 3 và công thức 4 cho năng suất cà phê tăng lần lượt lên 29,9 và 33,6% theo thứ tự so với đối chứng. Ở Gia Lai, năng suất trung bình của các công thức xử lý BaC dao động từ 1,86 - 2,36 tấn nhân/ha. Trong đó, công thức đối chứng có năng suất trung bình thấp nhất đạt 1,76 tấn/ha và cao nhất là công thức 4 đạt 2,36 tấn/ha. Như vậy công thức 3 (BaC 0,2% với 5 lít/gốc) và công thức 4 (BaC 0,2% với 7 lít/gốc) có hiệu quả tăng năng suất vườn cà phê lần lượt lên 16,6 và 21,2% so với đối chứng.

Bảng 5.23. Hiệu quả sử dụng BaC đến năng suất hồ tiêu

Công thức	Thí nghiệm tuyến trùng cà phê ở ĐL		Thí nghiệm tuyến trùng cà phê ở GL		Thí nghiệm nấm bệnh cà phê ở ĐL		Thí nghiệm nấm bệnh cà phê ở GL	
	Năng suất (tấn khô/ha)	Tăng so với ĐC (%)	Năng suất (tấn khô/ha)	Tăng so với ĐC (%)	Năng suất (tấn khô/ha)	Tăng so với ĐC (%)	Năng suất (tấn khô/ha)	Tăng so với ĐC (%)
CT1	1,64	-	1,76	-	1,47	-	1,68	-
CT2	1,77	7,4	1,93	8,8	1,57	6,4	1,85	9,2
CT3	2,05	20,0	2,09	15,8	1,84	20,1	1,98	15,2
CT4	2,11	22,3	2,27	22,5	1,95	24,6	2,14	21,5
CV(%)	*6,48*		*7,76*		*3,82*	-	*4,32*	-

Ghi chú: ĐL: Đắk Lắk; GL: Gia Lai; Công thức 1 (CT1): Không xử lý (đối chứng); CT2: BaC 0,2% (2 lít/cây); CT3: BaC 0,2% (4 lít/cây); CT4: BaC 0,2% (6 lít/cây).

Sử dụng BaC phòng trừ tuyến trùng gây hại hồ tiêu cho thấy: Ở Đắk Lắk, năng suất của hồ tiêu trên vườn đạt mức khá trong khoảng 1,64 - 2,11 tấn khô/ha. Công thức 4 có năng suất tốt nhất trong các công thức xử lý BaC và mức tăng so với đối chứng cao nhất (22,3%). Tiếp theo là công thức 3 có mức tăng so với đối chứng là 20,0%. Ở Gia Lai, năng suất của hồ tiêu trên vườn đạt mức trung bình khá dao động trong khoảng 1,76 - 2,27 tấn khô/ha. Công thức 4 có năng suất tốt nhất trong các công thức xử lý chế phẩm và mức tăng so với đối chứng cao nhất (22,5%), tiếp theo là công thức 3 có mức tăng so với đối chứng là 15,8%.

Sử dụng BaC phòng trừ nấm bệnh gây hại hồ tiêu cho thấy: Ở Đắk Lắk, năng suất trung bình của các công thức thí nghiệm dao động từ 1,47 - 1,95 tấn khô/ha. Trong đó, công thức đối chứng có năng suất trung bình thấp nhất đạt 1,47 tấn/ha và cao nhất là công thức 4, đạt 1,95 tấn/ha. Đồng thời công thức 4 cũng

là công thức có mức tăng năng suất cao nhất (24,6%), tiếp theo là công thức 3 đạt mức tăng năng suất là 20,1% so với đối chứng. Công thức có mức tăng năng suất thấp nhất là công thức 2, chỉ đạt 6,4%. Ở Gia Lai, năng suất trung bình của các công thức thử nghiệm dao động từ 1,68 - 2,14 tấn khô/ha. Trong đó, công thức đối chứng có năng suất trung bình thấp nhất đạt 1,68 tấn/ha và cao nhất là công thức 4 đạt 2,14 tấn/ha. Đồng thời công thức 4 cũng là công thức có mức tăng năng suất cao nhất (21,5%), tiếp theo là công thức 3 đạt mức tăng năng suất là 15,2% so với đối chứng. Công thức có mức tăng năng suất thấp nhất là công thức 2, chỉ đạt 9,2%.

5.2.3. Tổng hợp hiệu quả kinh tế việc sử dụng BaC trên cây cà phê và hồ tiêu tại Đắk Lắk và Gia Lai

Bảng 5.24. Hiệu quả sản xuất đối với 01 ha cà phê sử dụng BaC

Thí nghiệm	Công thức	Năng suất (tấn/ha)	Tổng chi phí (1.000đ)	Tổng doanh thu (1.000đ)	Lợi nhuận (1.000đ)
Tuyến trùng cà phê ở ĐL	BaC	3,28	54.800	137.760	82.960
	Đối chứng	2,25	45.000	94.500	49.500
Tuyến trùng cà phê ở GL	BaC	2,72	54.800	114.240	59.440
	Đối chứng	2,03	45.000	85.260	40.260
Nầm bệnh cà phê ở ĐL	BaC	3,18	54.800	133.560	78.760
	Đối chứng	2,11	45.000	88.620	43.620
Nầm bệnh cà phê ở GL	BaC	2,36	54.800	99.120	44.320
	Đối chứng	1,86	45.000	78.120	33.120

Ghi chú: ĐL: Đắk Lắk; GL: Gia Lai; Cà phê phun BaC 0,2% 7 lít/gốc tương ứng 16 lít BaC/ha; hồ tiêu phun BaC 0,2% 6 lít/gốc tương ứng 20 lít BaC/ha; Giá cà phê 42.000.000 đồng/tấn nhân; Giá hồ tiêu 51.000.000 đồng/tấn khô.

Chi phí tăng thêm cho 01 ha cà phê sử dụng BaC ở Đắk Lắk:

+ 16 lít BaC × 300.000 đ = 4.800.000 đ

+ Công + khác: 20 công × 250.000 đ = 5.000.000 đ

Chi phí tăng thêm cho 01 ha hồ tiêu sử dụng BaC ở Đắk Lắk:

+ 20 lít BaC × 300.000 đ = 6.000.000 đ

+ Công + khác: 20 công × 250.000 đ = 5.000.000 đ

Kết quả đánh giá thử nghiệm BaC trên cà phê và hồ tiêu tại Đắk Lắk cho kết quả cụ thể như sau:

- *Xác định hiệu quả của BaC phòng trừ tuyến trùng gây hại cà phê tại Đắk Lắk:* Chi phí đầu tư cho 01 ha cà phê có sử dụng BaC là 54.800.000 đồng/ha/năm, tăng 21,8%, tuy nhiên doanh thu tăng 45,8% do tăng năng suất, lợi nhuận 82.960.000 đồng/ha/năm tăng trội so với đối chứng là 33.460.000 đồng (tăng 67,6%).

- *Xác định hiệu quả của BaC phòng trừ tuyến trùng gây hại cà phê tại Gia Lai:* Chi phí đầu tư cho 01 ha cà phê có sử dụng BaC là 54.800.000 đồng/ha/năm, tăng 21,8%, tuy nhiên doanh thu tăng 28.900.000 (tăng 34,0%) do tăng năng suất, lợi nhuận 59.440.000 đồng/ha/năm tăng trội so với đối chứng là 19.180.000 đồng (47,6%).

- *Xác định hiệu quả của BaC phòng trừ nấm bệnh gây hại cà phê tại Đắk Lắk:* Lợi nhuận 78.760.000 đồng/ha/năm tăng 35.140.000 đồng (tăng 70,9%) so với đối chứng.

- *Xác định hiệu quả của BaC phòng trừ nấm bệnh gây hại cà phê tại Gia Lai:* Lợi nhuận 44.320.000 đồng/ha/năm tăng 11.200.000 đồng (tăng 33,8%) so với đối chứng.

Bảng 5.25. Hiệu quả sản xuất đối với 01 ha hồ tiêu sử dụng BaC

Thí nghiệm	Công thức	Năng suất (tấn/ha)	Tổng chi phí (1.000đ)	Tổng doanh thu (1.000đ)	Lợi nhuận (1.000đ)
Tuyến trùng hồ tiêu ở ĐL	BaC	2,11	61.000	107.610	46.610
	Đối chứng	1,64	50.000	83.640	33.640
Tuyến trùng hồ tiêu ở GL	BaC	2,27	62.200	115.770	53.570
	Đối chứng	1,76	50.000	89.760	39.760
Nấm bệnh hồ tiêu ở ĐL	BaC	1,95	61.000	99.450	38.450
	Đối chứng	1,47	50.000	74.970	24.970
Nấm bệnh hồ tiêu ở GL	BaC	2,14	62.200	109.140	46.940
	Đối chứng	1,68	50.000	85.680	35.680

Ghi chú: ĐL: Đắk Lắ k; GL: Gia Lai; Cà phê phun BaC 0,2% 7 lít/gốc tương ứng 16 lít BaC/ha; hồ tiêu phun BaC 0,2% 6 lít/gốc tương ứng 20 lít BaC/ha; Giá cà phê 42.000.000 đồng/tấn nhân; Giá hồ tiêu 51.000.000 đồng/tấn khô.

Chi phí tăng thêm cho 01 ha cà phê sử dụng BaC ở Gia Lai:

+ 16 lít BaC × 300.000 đ = 4.800.000 đ

+ Công + khác: 20 công × 250.000 đ = 5.000.000 đ

Chi phí tăng thêm cho 01 ha hồ tiêu sử dụng BaC ở Gia Lai:

+ 24 lít BaC × 300.000 đ = 7.200.000 đ

+ Công + khác: 20 công × 250.000 đ = 5.000.000 đ

- *Xác định hiệu quả của BaC phòng trừ tuyến trùng gây hại hồ tiêu tại Đắk Lắk*: Chi phí đầu tư cho 01 ha hồ tiêu có sử dụng BaC là 61.000.000 đồng/ha, tăng 22,0%, tuy nhiên doanh thu tăng 28,7% do tăng năng suất. Lợi nhuận 46.610.000 đồng/ha/năm tăng 12.970.000 đồng (tăng 38,6%) so với đối chứng.

- *Xác định hiệu quả của BaC phòng trừ tuyến trùng gây hại hồ tiêu tại Gia Lai*: Chi phí đầu tư cho 01 ha hồ tiêu có sử dụng BaC là 62.200.000 đồng/ha, tăng 24,4%, tuy nhiên doanh thu tăng 28,7% do tăng năng suất. Lợi nhuận 53.570.000 đồng/ha/năm tăng 13.810.000 đồng (tăng 34,7%) so với đối chứng.

- *Xác định hiệu quả của BaC phòng trừ nấm bệnh gây hại hồ tiêu tại Đắk Lắk:* Lợi nhuận 38.450.000 đồng/ha/năm tăng 13.480.000 đồng (tăng 54,0%) so với đối chứng.

- *Xác định hiệu quả của BaC phòng trừ nấm bệnh gây hại hồ tiêu tại Gia Lai:* Lợi nhuận 46.940.000 đồng/ha/năm tăng 11.260.000 đồng (tăng 31,6%) so với đối chứng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tài liệu tiếng Việt

[1] Cù Thị Dần, Trần Ngô Tuyết Vân, Nguyễn Hồng Phong, Lê Đăng Khoa (2015). Nghiên cứu thử nghiệm hoạt tính chiết xuất vỏ quế phòng trừ tuyến trùng và nấm gây hại cà phê và hồ tiêu. Báo cáo nhiệm vụ cấp cơ sở tại Viện KHKT NLN Tây Nguyên.

[2] Dương Đức Hiếu, Ngo XQ, Do DG, Le TAH, Nguyen VT, Nic S. (2014). Tác động của bánh dầu neem (*Azadirachta indica* A. Juss) lên tuyến trùng và nấm bệnh ký sinh cây hồ tiêu ở điều kiện *in vitro*. Tạp chí Môi trường Việt Nam 6 (3): 233 - 238.

[3] Lê Đức Khánh, Lê Quang Khải, Đào Thị Hằng, Nguyễn Ngọc Châu, Trịnh Quang Pháp và cs. (2013). Thành phần tuyến trùng ký sinh thực vật trên cây cà phê, hồ tiêu ở một số vùng trồng tập trung tại Tây Nguyên. Tạp chí Bảo vệ thực vật 6, 24 - 30.

[4] Lê Văn Trịnh và cs. (2010). Nghiên cứu phát triển CPSH phòng trừ tuyến trùng và nấm bệnh vùng rễ cà phê và hồ tiêu. Đề tài cấp Bộ, Bộ Nông nghiệp và PTNT (2007 - 2009).

[5] Ngô Vĩnh Viễn (2007). Báo cáo dịch hại trên hồ tiêu và biện pháp phòng trừ. Hội thảo sâu bệnh hại tiêu và biện pháp phòng trừ. ĐắK Nông, tháng 7 năm 2007, tr. 1 - 8.

[6] Nguyễn Ngọc Châu (2003). Tuyến trùng thực vật và cơ sở phòng trừ. NXB Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội, 302 trang.

[7] Nguyễn Ngọc Châu, Nguyễn Vũ Thanh (2000). Tuyến trùng ký sinh thực vật ở Việt Nam. Động vật chí Việt Nam 4. NXB Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội: 400 trang.

[8] Nguyễn Thị Chúc Quỳnh và cs. (2014). Hoàn thiện công nghệ sản xuất, ứng dụng CPSH phòng trừ tuyến trùng và nấm bệnh hại rễ hồ tiêu, cà phê. Dự án cấp Bộ, Bộ Nông nghiệp và PTNT (2012 - 2014).

[9] Phan Quốc Sủng, Hà Minh Trung, Hoàng Thanh Tiệm, Trần Kim Loang, Trịnh Đức Minh, và cộng sự (2001). Điều tra nghiên cứu hội chứng vàng lá cà phê và biện pháp phòng trừ. Báo cáo tổng kết - Đề tài độc lập cấp Nhà nước (1997 - 2001). Bộ Khoa học Công nghệ và Môi trường.

[10] Tổng cục Thống kê (2018).

[11] Trần Kim Loang (2002). Nghiên cứu một số nguyên nhân gây hiện tượng vàng lá, thối rễ trên cà phê vối tại Đắk Lắk và khả năng phòng trừ. Luận án tiến sỹ, Trường Đại học Nông nghiệp I, Hà Nội.

Tài liệu tiếng Anh

[12] Akhtar Y, Yeoung R, Isman MB. (2008). Comparative bioactivity of selected extracts from *Meliaceae* and some commercial botanical insecticides against two noctuid caterpillars, *Trichoplusia ni* and *Pseudaletia unipuncta.* Phytochem. Rev. 7: 77 - 88.

[13] Aoudia H, Ntalli N, Aissani N, Yahiaoui-Zaidi R, Caboni P. (2012). Nematotoxic phenolic compounds from *Melia azedarach* against *Meloidogyne incognita*. J. Agric. Food Chem. 60: 11675 - 11680.

[14]AU2007227386.https://patents.google.com/patent/AU2007227386A1/en?oq=AU2007227386

[15] Bachaya HA, Iqbal Z, Khan MN, Jabbar A, Gilani AH, Din IU. (2009). In vitro and in vivo anthelmintic activity of *Terminalia arjuna* bark. Int. Agric. Biol. 11: 273 - 278.

[16] Barbara S, Andre D. (2001). Practical guide to detection and identification of *Phytophthora* spp., version 1.0. CRC for Tropical Plant Protection, Brisbane, Australia.

[17] Burgess LW, Knight TE, Tesoriero L, Phan HT. (2008). Diagnostic manual for plant diseases in Vietnam, pp. 126 - 133, ACIAR, Canberra.

[18] Chang KS, Tak JH, Kim SI, Lee WJ, Ahn YJ. (2006). Repellency of *Cinnamomum cassia* bark compounds and cream containing cassia oil to *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) under laboratory and indoor conditions. Pest Manag. Sci. 62: 1032 - 1038.

[19] Chang ST, Chen PF, Chang SC. (2001). Antibacterial activity of leaf essential oils and their constituents from *Cinnamomum osmophloeum*. J. Ethnopharmacol. 77: 123 - 127.

[20] Chien P, Chou C. (2006). Antifungal activity of chitosan and its application to control postharvest quality and fungal rotting of Tankan citrus fruit (*Citrus tankan hayata*). J. Sci. Food Agr. 86, 1964 - 1969. [16]

[21] Eweis M, Elkholy SS, Elsabee MZ. (2006). Antifungal efficacy of chitosan and its thiourea derivatives upon the growth of some sugar-beet pathogens. Int. J. Biol. Macromol. 38: 1 - 8.

[22] Giordani R, Regli P, Kaloustian J, Portugal H. (2006). Potentiation of antifungal activity of amphotericin B by essential oil from *Cinnamomum cassia*. Phytother. Res. 20: 58 - 61.

[23] Hong TK, Kim SI, Heo JW, Lee JK, Choi DR, Ahn YJ. (2011). Toxicity of *Kaempferia galanga* rhizome constituents to *Meloidogyne incognita* juveniles and eggs. Nematology 13: 235 - 244.

[24] Hooper DJ. (1990). Extraction and processing of plant and soil nematodes. In: Luc M, Sikora RA, Bridge J. (Eds). Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture. Wallingford, UK, CAB International, U.K.: 45 - 68.

[25] Kim HO, Park SW, Park HD. (2004). Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 by cinnamic aldehyde purified from *Cinnamomum cassia* shoot. Food Microbiology 21: 105 - 110.

[26] Kularatne, R.S. 2002. Pests and diseases of black pepper (*Piper nigrum* L.) in Sri Lanka. Paper presented at the Symposium on Pests and Diseases on Pepper. Sarawak, Malaysia, 24 Sep. 2002.

[27] Mai WF, Mullin PG. (1996). Plant-parasitic nematodes: A pictorial key to genera. Ithaca: Comstock Pub. Associates, Cornell University Press.

[28] Manohara, D., Mulya, A., Purwantara, A., and Wahyuno, D. 2002. *Phytophthora capsici* on black pepper in Indonesia. Paper presented at the Workshop on *Phytophthora* in South Asia, Chiang Mai, Thailand, 8 - 12 November 2002. pp 9 - 11.

[29] Meyer SLF, Zasada, IA, Roberts, DP, Vinyard BT, Lakshman DK, Lee JK, Chitwood DJ, Carta L. (2006). *Plantago lanceolata* and *Plantago rugelii* extracts are toxic to *Meloidogyne incognita* but not to certain microbes. Journal of Nematology 38:333 - 338.

[30] Moyler DA. (1994). Oleoresins tincture and extracts, in Food Flavourings, Ashrurst, P.R., De., Blackie Academic and Professional, an imprint of Chapman & Hall. Glasgow.

[31] Nguyen DMC, Jung WJ. (2014). Đặc tính kháng tuyến trùng của các hợp chất chiết xuất từ cây thuốc phòng trừ *Pratylenchus coffeae* gây hại rễ cà phê. Tạp chí Môi trường Việt Nam 6(3): 264 - 269.

[32] Nguyen DMC, Nguyen VN, Seo DJ, Park RD, Jung WJ. (2009a). Nematicidal activity of compounds extracted from medicinal plants against the pine wood nematode *Bursaphelenchus xylophilus*. Nematology 11(6): 835 - 845.

[33] Nguyen DMC, Seo DJ, Kim KY, Kim TH, Jung WJ. (2012). Nematode-antagonistic effects of *Cinnamomum aromaticum* extracts and a purified compound against *Meloidogyne incognita*. Nematology 14(8): 913 - 924.

[34] Nguyen DMC, Seo DJ, Kim KY, Park RD, Kim DH, Han YS, Kim TH, Jung WJ. (2013a). Nematicidal activity of 3,4 - Dihydroxybenzoic acid purified from *Terminalia nigrovenulosa* bark against *Meloidogyne incognita*. Microb. Pathogenesis 59: 52 - 59.

[35] Nguyen DMC, Seo DJ, Lee HB, Kim IS, Kim KY, Park RD, Jung WJ. (2013b). Antifungal activity of gallic acid purified from *Terminalia nigrovenulosa* bark against *Fusarium solani*. Microb. Pathogenesis 56: 8 - 15.

[36] Nguyen DMC, Seo DJ, Nguyen VN, Kim KY, Park RD, Jung WJ. (2013c). Nematicidal activity of gallic acid purified from *Terminalia nigrovenulosa* bark against the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. Nematology 15(5): 507 - 518.

[37] Nguyen DMC, Seo DJ, Park RD, Lee BJ, Jung WJ. (2013d). Chitosan beads combined with *Terminalia nigrovenulosa* bark enhance suppressive activity to *Fusarium solani*. Industrial Crops and Products 50: 462 - 467.

[38] Nguyen DMC, Seo DJ, Park RD, Lee BR, Jung WJ. (2011). Changes in antioxidative enzyme activities in cucumber plants with regard to biological control of root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* with *Cinnamomum cassia* crude extracts. Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry 54(4): 507 - 514.

[39] Nguyen DMC. (2014). Control of Phytopathogens (*Meloidogyne incognita* and *Fusarium solani*) by 3,4 - Dihydroxybenzoic Acid and Gallic Acid Purified from *Terminalia nigrovenulosa*. Doctoral dissertation, Chonnam National University, Korea, pp.114.

[40] Nguyen VN, Nguyen DMC, Seo DJ, Park RD, Jung WJ. (2009b). Antimycotic activities of Cinnamon-derived compounds against *Rhizoctonia solani* in vitro. BioControl 54: 697 - 707.

[41] Ntalli NG, Caboni P. (2012). Botanical nematicides: A review. J. Agric. Food Chem. 60: 9929 - 9940.

[42] Ntalli NG, Menkissoglu-Spiroudi U, Giannakou I. (2010a). Nematicidal activity of powder and extracts of *Melia azedarach* fruits against *Meloidogyne incognita*. Ann. Appl. Biol. 156: 309−317.

[43] Ntalli NG, Vargiu S, Menkissoglu-Spiroudi U, Caboni P. (2010b). Nematicidal carboxylic acids and aldehydes from *Melia azedarach* fruits. J. Agric. Food Chem. 58: 11390 - 11394. [31]

[44] O'Bannon IH, Taylor AL. (1968). Migratory endoparsitic nematodes reared on carrot discs. Phytopathology 58: 385.

[45] Ooi LSM, Li YL, Kam SL, Wang H, Wong EYL, Ooi VEC. (2006). Antimicrobial activities of cinnamon oil and cinnamaldehyde from the chinese medicinal herb *Cinnamomum cassia* Blume. Am. J. Chin. Med. 34 (3): 511 - 522.

[46] SAS (2004). SAS/STAT User's Guide, version 9.1. Cary, NC, USA, SAS Institute.

[47] Seo DJ, Nguyen DMC, Park RD, Jung WJ. (2014). Chitosane cinnamon beads enhance suppressive activity against *Rhizoctonia solani* and *Meloidogyne incognita* in vitro. Microbial Pathogenesis 66: 44 - 47. [12]

[48] Sid AA, Ezziyyani M, Pérez Sánchez C, Candela ME. (2003). Effect of chitin on biological control activity of *Bacillus* spp. and *Trichoderma harzianum* against root rot disease in pepper (*Capsicum annuum*) plants. European Journal of Plant Pathology 6: 633 - 637.

[49] Singh AK1, Chhatpar HS. (2011). Purification and characterization of chitinase from *Paenibacillus* sp. D1. Appl Biochem Biotechnol. 164(1): 77 - 88.

[50] Southey JF. (1986). In laboratory methods for work with plant and soil nematodes. (6th ed.). Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, London, UK. Reference Book 402, pp: 202.

[51] Souza RM. (2008). Plant-parasitic nematodes of Coffee, Netherlands, 340pp.

[52] Soylu EM, Soylu S, Kurt S. (2006). Antimicrobial activities of the essential oils of various plants against tomato late blight disease agent *Phytophthora infestans*. Mycopathologia 161: 119 - 128.

[53] Spaull VJ, Jones R, De Waele D, Foure D, Daneel M. (2017). Nematode pests of citrus. In Nematology in South Africa: A view from the 21st century, 311 - 324.

[54] Sung YY, Yoon TS, Jang JY, Park SJ, Jeong GH, Kim HK. (2011). Inhibitory effects of *Cinnamomum cassia* extract on atopic dermatitis-like skin lesions induced by mite antigen in NC/Nga mice. Journal of Ethnopharmacology 133: 621 - 628.

[55] Syed AR, Singh SF, Pieterse CMJ, Schenk PM (2018). Emerging microbial biocontrol strategies for plant pathogens. Plant Science 267: 102 - 111.

[56] Trinh PQ. (2010). Identity and diversity of migratory plant-parasitic nematodes on coffee and their sustainable management via crop resistance in Vietnam. PhD thesis, Ghent University, Gent, Belgium.

[57] US20070292540.https://patents.google.com/patent/US20070292540A1/en?oq=US20070292540

[58] US20170158985.https://patents.google.com/patent/US20170158985A1/en?oq=US+20170158985

[59] Wong MH. (2002). Fungal diseases of black pepper and their management in Sarawak, Malaysia. Paper presented at the Symposium on Pests and Diseases on Pepper. Sarawak, Malaysia, 24 Sep. 2002.

[60] Xu JG, Zhao XM, Han XW, Du TG. (2007). Antifungal activity of oligochitosan against *Phytophthora capsici* and other plant pathogenic fungi in vitro. Pestic. Biochem. P. capsicis. 87: 220 - 228.

[61] Young WJ, Sang YB. (2005). Supercritical CO_2 extraction of sesame oil with high content of tocopherol. K.J Biotechnol. Bioeng., 20 (3), pp.210 - 214.

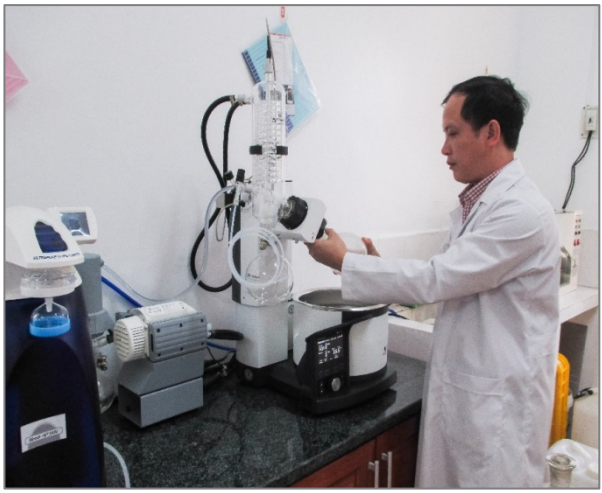
[62] Zasada IA, Klassen W, Meyer SLF, Codallo M, Abdul Baki AA. (2006). Velvetbean (*Mucuna pruriens*) extracts: impact on *Meloidogyne incognita* survival and on *Lycopersicon esculentum* and *Lactuca sativa* germination and growth. Pest Manag. Sci. 62: 1122 - 1127.

[63] López Pérez JA, Escuer M, Díez Rojo MA, Robertson L, Piedra-Buena A, López Cepero J, and Bello Pérez A. (2011). Host range of Meloidogyne arenaria (Neal, 1889) Chitwood, 1949 (Nematoda: Meloidogynidae) in Spain, Nematropica 41, 2011,130 - 140. 153.

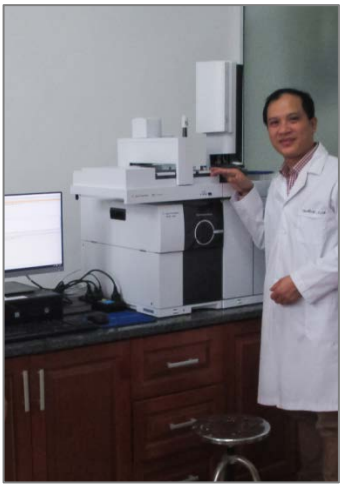
[64] Hussey RS, Barker KR. (1973). Comparison of methods for collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique, Plant Disease Reporter, 1973, 57, 1025 - 1028.

PHỤ LỤC HÌNH ẢNH

Hình ảnh sử dụng Máy cô quay chân không tách MeOH ra khỏi dung dịch CCQ (bình cô quay thể tích 20 lít)

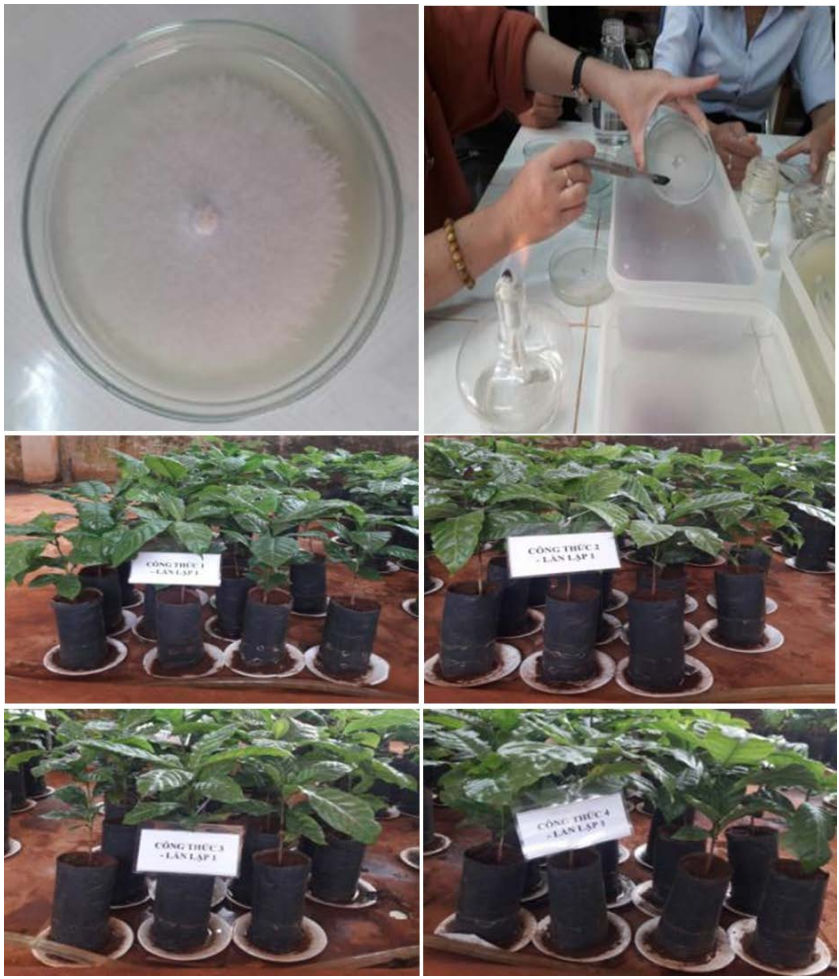


Hệ thống cô quay chân không



Tách chiết hoạt chất Cinnamyl acetate từ CCQ bằng sắc ký cột silica gel và Sephadex và sắc ký khí khối phổ GC-MS.

Tạo Chế phẩm sinh học BaC và đóng chai
(16% cao CCQ và 3% bột chitosan)



Nấm F. solaniarium* spp. *cấy sau 7 ngày trên môi trường PDA và chuẩn bị bào tử để lây nhiễm vào cà phê

Lấy mẫu đất và rễ trên cây cà phê

Nấm P. capsici. trên tiêu phân lập
trên môi trường PDA và lây nhiễm vào bầu tiêu

Xử lý chế phẩm sinh học

Thử nghiệm chế phẩm sinh học
trên cây cà phê ở Đắk Lắk và Gia Lai

QUỸ ĐỔI MỚI CÔNG NGHỆ QUỐC GIA (NATIF)
CÔNG TY TNHH THƯƠNG MẠI VÀ DỊCH VỤ QUỐC TẾ TIPTO MÃ LAI
ĐỀ TÀI
NGHIÊN CỨU CẢI TIẾN CÔNG NGHỆ TÁCH CHIẾT MỘT SỐ CHẤT CÓ HOẠT TÍNH TỪ VỎ CÂY QUẾ (CINNAMOMUM CASSIA), XÁC ĐỊNH CHẤT MANG VÀ TẠO CHẾ PHẨM SINH HỌC PHÒNG TRỪ HIỆU QUẢ TUYẾN TRÙNG VÀ NẤM BỆNH CHÍNH GÂY HẠI RỄ CÂY CÀ PHÊ VÀ HỒ TIÊU TẠI TÂY NGUYÊN
NỘI DUNG: SỬ DỤNG CPSH BACTE CINSAN NHẰM PHÒNG TRỪ TUYẾN TRÙNG VÀ NẤM BỆNH CHÍNH GÂY HẠI RỄ CÂY HỒ TIÊU
Thời gian thực hiện: 2019
Địa điểm: Chư Sê, Gia Lai
Diện tích: 01 ha

VIỆN KHOA HỌC KỸ THUẬT NÔNG LÂM NGHIỆP TÂY NGUYÊN
CÔNG TY TNHH THƯƠNG MẠI VÀ DỊCH VỤ QUỐC TẾ TIPTO MÃ LAI
TIPTO
VIỆN CÂY LƯƠNG THỰC VÀ CÂY THỰC PHẨM
ĐỀ TÀI
NGHIÊN CỨU CẢI TIẾN CÔNG NGHỆ TÁCH CHIẾT MỘT SỐ CHẤT CÓ HOẠT TÍNH TỪ VỎ CÂY QUẾ (Cinnamomum cassia), XÁC ĐỊNH CHẤT MANG VÀ TẠO CHẾ PHẨM SINH HỌC PHÒNG TRỪ HIỆU QUẢ TUYẾN TRÙNG VÀ NẤM BỆNH CHÍNH GÂY HẠI RỄ CÂY CÀ PHÊ VÀ HỒ TIÊU TẠI TÂY NGUYÊN
THÍ NGHIỆM 10: XÁC ĐỊNH HIỆU QUẢ CHẾ PHẨM BEN KHẢ NĂNG PHÒNG TRỪ TUYẾN TRÙNG GÂY HẠI RỄ CÂY HỒ TIÊU TRONG ĐIỀU KIỆN ĐỒNG RUỘNG
CHỦ TRÌ: LÊ TỰ LỰ
ĐỊA ĐIỂM: HUYỆN CƯ KUIN, ĐẮK LẮK
THỜI GIAN: 2019

Thử nghiệm chế phẩm sinh học
trên cây hồ tiêu ở Đắk Lắk và Gia Lai

Hình hội thảo

CÔNG NGHỆ TÁCH CHIẾT CINNAMYL ACETATE TỪ VỎ CÂY QUẾ VÀ SẢN XUẤT CHẾ PHẨM SINH HỌC LÀM THUỐC BẢO VỆ THỰC VẬT

Chịu trách nhiệm xuất bản
Giám đốc - Tổng biên tập
TS. LÊ LÂN

Biên tập và sửa bản in
ĐINH VĂN THÀNH

Trình bày, bìa
VŨ HẢI YẾN

NHÀ XUẤT BẢN NÔNG NGHIỆP
167/6 Phương Ma i- Đống Đa - Hà Nội
ĐT: (024) 38523887, (024) 38521940-Fax: 024.35760748
Website: http://www.nxbnongnghiep.com.vn
E-mail: nxbnn1@gmail.com

CHI NHÁNH NHÀ XUẤT BẢN NÔNG NGHIỆP
58 Nguyễn Bỉnh Khiêm - Q.I - Tp. Hồ Chí Minh
ĐT: (028) 38299521, 38297157-Fax: (028) 39101036

In 115 bản khổ 14,5×20,5 cm tại Xưởng in Nhà xuất bản Nông nghiệp.
Địa chỉ: Số 6 ngõ 167 Phương Mai, Đống Đa, Hà Nội.
Đăng ký KHXB số 2589-2020/CXBIPH/1-85NN ngày 07/07/2020.
Quyết định XB số: 12/QĐ-NXBNN ngày 08/07/2020.
ISBN: 978-604-60-3187-1
In xong và nộp lưu chiểu quý IV/2020.