

1. Tên nhiệm vụ: Thu thập, đánh giá, bảo tồn và định hướng ứng dụng nguồn gen vi sinh vật bảo vệ thực vật (vi sinh vật gây hại và vi sinh vật có ích) trên cây ăn quả tại tỉnh Đắk Lắk.

2. Tổ chức chủ trì nhiệm vụ: Viện Bảo vệ thực vật (Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam).

Địa chỉ: phường Đức Thắng, quận Bắc Từ Liêm, thành phố Hà Nội.

Điện thoại: 043 7521380; Fax: 043 8389724

3. Chủ nhiệm nhiệm vụ: Thạc sĩ LÊ ĐÌNH THAO

4. Mục tiêu nghiên cứu:

* **Mục tiêu tổng quát:** Bảo tồn, đánh giá và định hướng ứng dụng được nguồn gen vi sinh vật bảo vệ thực vật từ cây bơ, mít và cam tại tỉnh Đắk Lắk.

* **Mục tiêu cụ thể:**

- Thu thập và phân lập được nguồn gen vi sinh vật gây bệnh và vi sinh vật đối kháng trên bơ, mít và cam tại tỉnh Đắk Lắk.

- Đánh giá được nguồn gen vi sinh vật và định hướng ứng dụng của vi sinh vật đối kháng.

- Bảo tồn và đánh giá sức sống của vi sinh vật hàng năm.

- Tư liệu hóa nguồn gen (Cập nhật, tư liệu hóa) và trao đổi thông tin dữ liệu nguồn gen (Cung cấp nguồn gen vi sinh vật phục vụ công tác nghiên cứu, các đơn vị có nhu cầu).

5. Nội dung nghiên cứu chính:

Nội dung 1: Thu thập nguồn gen vi sinh vật bảo vệ thực vật trên cây mít, bơ và cam.

Hoạt động 1: Thu thập và phân lập nguồn gen vi sinh vật gây bệnh trên cây mít, bơ và cam.

Hoạt động 2: Thu thập và phân lập nguồn gen vi sinh vật đối kháng tại các vùng trồng mít, bơ và cam.

Hoạt động 3: Định danh các nguồn gen vi sinh vật.

Nội dung 2: Đánh giá và định hướng ứng dụng nguồn gen vi sinh vật bảo vệ thực vật.

Hoạt động 1: Đánh giá độc tính, xác định tính gây bệnh của các chủng vi sinh vật phân lập từ mẫu bệnh và định hướng ứng dụng của vi sinh vật gây bệnh.

Hoạt động 2: Đánh giá khả năng ức chế của vi sinh vật đối kháng đối với vi sinh vật gây bệnh có nguồn gốc từ đất trong điều kiện phòng thí nghiệm và định hướng ứng dụng nguồn gen vi sinh vật đối kháng.

Hoạt động 3: Đánh giá khả năng ức chế của vi sinh vật đối kháng đối với vi sinh vật gây bệnh trên mặt đất trong điều kiện phòng thí nghiệm và định hướng ứng dụng nguồn gen vi sinh vật đối kháng.

Nội dung 3: Bảo tồn nguồn gen vi sinh vật bảo vệ thực vật.

Hoạt động 1: Bảo quản nguồn gen vi sinh vật bảo vệ thực vật.

Hoạt động 2: Hoạt hóa, kiểm tra nguồn gen vi sinh vật sau thời gian bảo quản.

Nội dung 4: Tư liệu hóa và trao đổi thông tin.

Hoạt động 1: Tư liệu hóa nguồn gen vi sinh vật bảo vệ thực vật trên cây ăn quả.

Hoạt động 2: Cung cấp, trao đổi thông tin về các nguồn gen trên.

6. Lĩnh vực nghiên cứu:

Mã cấp 1: 4 – Khoa học nông nghiệp

Mã cấp 2:

7. Phương pháp nghiên cứu:

Nội dung 1: Thu thập nguồn gen vi sinh vật bảo vệ thực vật trên cây mít, bơ và cam

*** Điều tra, thu mẫu vi sinh vật**

Thu thập tất cả các mẫu bộ phận của cây (lá, thân, rễ, hoa, quả, đất vùng rễ) có triệu chứng bệnh hại.

Đối với mẫu phân lập vi sinh vật đối kháng, thu thập mẫu đất vùng rễ, rễ cây và các bộ phận của cây mít, bơ và cam phát triển khỏe mạnh. Tại vùng rễ cây, gạt nhẹ lớp đất mặt, thu 200g đất ở độ sâu 15 – 20cm tại mỗi điểm.

Thời gian điều tra, thu mẫu: Vào các thời điểm xung yếu của cây và theo mùa vụ trong năm. Đặc biệt là thời gian cây ra hoa, phát triển quả. Đối với cây mít, thời gian thu mẫu tập trung vào tháng 2 đến tháng 12 năm trước cho đến tháng 6 - 7 năm sau; đối với cây bơ khoảng tháng 2 đến tháng 7 - 8; đối với cây cam vào khoảng tháng 2 đến tháng 11 hàng năm.

- Số mẫu bệnh thu thập và phân lập (gồm mẫu các bộ phận trên mặt đất (thân, lá, hoa, quả) và bộ phận dưới mặt đất (rễ, đất): 5 mẫu/cây/điểm x 2 cây/điểm x 5 điểm/vườn (theo đường chéo) x 5 vườn/huyện x 3 huyện x 3 loại cây = 2.250 mẫu.

- Số mẫu thu thập và phân lập vi sinh vật đối kháng (mẫu đất + mẫu cây): 2 mẫu/cây/điểm x 2 cây/điểm x 5 điểm/vườn (theo đường chéo) x 5 vườn/huyện x 3 huyện x 3 loại cây = 900 mẫu.

*** Phân lập và định danh vi sinh vật gây bệnh và vi sinh vật đối kháng**

Số mẫu phân lập vi sinh vật gây bệnh: 2.250 mẫu.

Số mẫu phân lập vi sinh vật đối kháng: 900 mẫu.

- *Phân lập vi khuẩn gây bệnh:*

+ Khử trùng bề mặt mẫu bệnh bằng cồn 70%, rửa qua nước vô trùng và để khô trong bốc cây.

+ Cắt thành các mẫu nhỏ kích thước 5x5mm, nghiền trong cối sứ cùng với 2ml nước vô trùng. + Hút 1ml dịch nghiền hòa trong 9ml nước vô trùng và pha loãng đến 10^{-2} , 10^{-3} ... 10^{-6} lần.

+ Từ mỗi nồng độ pha loãng nhỏ 0,1ml sang đĩa Petri chứa môi trường phân lập thích hợp (King'B, PSA). Dùng que gạt vô trùng chằng đều, sau đó nuôi ở nhiệt độ 20°C trong 2 - 3 ngày.

+ Khuẩn lạc được cấy truyền sang đĩa Petri chứa môi trường nhân nuôi để làm thuần (phương pháp cấy 3 pha). Sau khi làm thuần xạ khuẩn được bảo quản trên môi trường thạch nghiêng, bảo quản trong glycerol ở -20°C hoặc bảo quản đông khô.

- *Phân lập vi khuẩn, xạ khuẩn và nấm đối kháng từ đất*

Đất thu thập được làm tươi và mịn. Cân 10g mẫu đất vào bình tam giác có chứa 100ml nước cất đã khử trùng tạo dung dịch A có nồng độ 10^{-1} . Lắc dung dịch đất trên máy lắc trong 30 phút. Chuyển 10ml dung dịch A sang bình tam giác có chứa 90ml nước cất đã khử trùng có dung dịch B nồng độ 10^{-2} . Cứ tiếp tục làm các bước như trên để có dung dịch có nồng độ 10^{-3} hay 10^{-4} . Dùng pipet hút 0,5ml dung dịch đất tráng đều trên bề mặt đĩa Petri có môi trường phân lập đặc hiệu đối với nấm Trichoderma, vi khuẩn và xạ khuẩn. Đặt các đĩa phân lập này trong tủ định ôn 28°C trong 3 - 7 ngày. Cấy truyền các tản nấm và khuẩn lạc vi khuẩn sang đĩa môi trường mới và làm thuần bằng phương pháp tách đơn bào tử.

- *Đối với nấm gây bệnh:*

+ Phương pháp phân lập nấm gây bệnh từ mô cây bệnh

Rửa mẫu bệnh dưới vòi nước. Cắt mô bệnh thành những miếng có kích thước 5 x 5mm ở phần ranh giới giữa mô bệnh và mô khỏe.

Loại bỏ tạp bẩn bề mặt bằng cách nhúng vào dung dịch natri hypochlorite trong 45 giây sau đó khử trùng bề mặt bằng cồn 70°C trong 15 - 20 giây. Rửa sạch bằng nước cất vô trùng và làm khô mẫu bằng giấy thấm vô trùng.

Sau 2 - 3 ngày, tách đầu sợi nấm từ các khuẩn lạc mọc ra từ mô cây trên môi trường phân lập và chuyển sang môi trường nuôi cấy mới.

+ Phương pháp phân lập *Phytophthora* từ đất sử dụng môi bẫy: Môi bẫy là cánh hoa và vỏ quả (Một số loại quả như đu đủ, ca cao, táo, lê... thường ở giai đoạn quả xanh), (Phạm Ngọc Dung và cộng sự, 2008).

Lấy mẫu đất ở xung quanh gốc của cây bị bệnh.

Cho đất, rễ vào cốc, thêm nước cất vô trùng vào tới khi đạt $\frac{3}{4}$ cốc. Khuấy nhẹ đất trong cốc bằng đũa thủy tinh, để đất lắng xuống trong 2 giờ (tốt nhất để qua đêm).

Cắt cánh hoa có màu sắc thành miếng nhỏ (5 x 5mm) hoặc lá cà chua/ớt thả vào cốc nước trên.

Đề cốc bẫy bào tử qua đêm ở nhiệt độ 25 - 28°C.

Quan sát cánh hoa sau 1 ngày, 2 ngày, 3 ngày. Khi thấy cánh hoa bị mất màu đem lên kính hiển vi soi, quan sát thấy bào tử nấm *Phytophthora* sp.

Khử trùng bề mặt cánh hoa, lá bẫy và cấy lên môi trường đặc hiệu.

Đặt hộp Petri đã cấy ở nhiệt độ 25 - 28°C ở tủ ẩm.

Kiểm tra đĩa cấy hàng ngày, khi các tản nấm phát triển từ các miếng cấy, cấy truyền chủng sang môi trường PCA.

Các bước cấy đỉnh sinh trưởng là quá trình cấy truyền đỉnh sinh trưởng của một sợi nấm để tạo một mẫu nấm thuần của nấm *Phytophthora*.

Giám định lần cuối dùng mẫu cấy đã được làm thuần từ đỉnh sinh trưởng.

***Định danh VSV gây bệnh và VSV có ích bằng sinh học phân tử**

Số loài cần định danh thành công là 5 loài VSV gây bệnh và 3 loài VSV đối kháng

Định danh vi khuẩn

Định danh loài vi khuẩn bằng kỹ thuật PCR với hai mồi 27F và 1492R được sử dụng để nhân toàn bộ vùng 16S RNA ribosome (Liu và cộng sự, 2007), sản phẩm PCR được giải trình tự trực tiếp bằng mồi PCR. Trình tự nucleotide được biên tập, lắp ráp bằng phần mềm Seqman và tìm kiếm cơ sở dữ liệu trên ngân hàng Genbank bằng phần mềm trực tuyến BLAST tại NCBI. Xây dựng cây phả hệ bằng phần mềm MEGA 7.0, RAxML, Mrbayes.

Thành phần phản ứng PCR: PCR buffer 10X(có chứa Mg^{2+}) 2,5 μ l, dNTPs (10mM) 2,5 μ l, Mồi xuôi 27F 1 μ l, Mồi ngược 1492R 1 μ l, Taq polymeraza 0,2 μ l, DNA 1 μ l, DH_2O 15,8 μ l, Tổng thể tích 25 μ l

Trình tự cặp mồi:

Mồi xuôi 27F: 5' AGA GTT TGA TTC MTG GCT CAG 3'

Mồi ngược 1492R: 5' GGY TAC CTT GTT ACG ACTT 3'

Chu trình nhiệt độ: Biến tính ban đầu ở 94°C trong 5 phút; 35 chu kỳ gồm: biến tính ở 94°C trong 30 giây, gắn mồi ở 55°C trong 30 giây, kéo dài sợi ở 72°C trong 2 phút; và giai đoạn kết thúc ở 72°C trong 15 phút.

Định danh nấm (Phương pháp xác định và đánh giá mối quan hệ của nấm gây bệnh dựa vào các vùng liên gen ITS của cụm gen rDNA của Blair và cộng sự, 2008)

Hiện nay, sự kết hợp giữa đặc điểm hình thái nấm và phân tích phân tử đóng vai trò quan trọng trong việc xác định chính xác tên loài. Trong các phương pháp nghiên cứu ở cấp độ phân tử áp dụng trong việc xác định tác nhân gây bệnh hại cây trồng thì việc phân tích trình tự vùng rDNA ITS (nuclear ribosomal internal transcribed spacers) được sử dụng phổ biến và có hiệu quả đối với tác nhân gây bệnh do nấm. Ngoài ra, việc phân tích bổ sung các vùng gene khác như translation elongation factor 1-alpha (TEF1-alpha), beta-tubulin (TUB)... là cần thiết trong trường hợp không thể xác định tên loài dựa trên vùng ITS.

Phương pháp gồm các bước cơ bản sau :

1. Chiết tách ADN của mẫu nấm
2. Thực hiện phản ứng PCR nhân vùng ITS mục tiêu
3. Kiểm tra và tinh sạch sản phẩm PCR sử dụng Kit chuyên dụng
4. Giải trình tự sản phẩm PCR bằng máy giải trình tự gene
5. Biên tập và phân tích trình tự bằng phần mềm như Mega, Mrbayes, RAxML

Các bước tiến hành cụ thể :

- Nuôi cấy nấm trên môi trường nhân tạo

- Chiết DNA từ nấm

ADN từ mẫu nấm nuôi cấy được chiết dùng kit Dneasy Plant Mini Kit của hãng Qiagen.

- Phản ứng PCR

Phản ứng PCR được thực hiện để khuếch đại vùng ITS với nấm bằng các cặp mồi ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGC-3') và ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'; Gene TEF1 alpha với cặp mồi EF1-728F (5' - CATCGAGAAGTTCGAGAAGG - 3') và EF1-986R (5'-TACTTGAAGGAACCCTTACC - 3'); gene TUB với cặp mồi Bt-2a (5'-GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC - 3') và Bt-2b (5'-ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC - 3') (White và cộng sự, 1990). Vùng 16S RNA ribosome đối với vi khuẩn được khuếch đại bằng cặp mồi 27F (5'-AGA GTT TGA TTC MTG GCT CAG -3') và 1492R (5'-GGY TAC CTT GTT ACG ACTT -3') (Liu và cộng sự, 2007). Chu trình nhiệt PCR với mỗi mồi và mỗi nhóm loài là khác nhau. Phản ứng PCR được thực hiện trên máy PCR với điều kiện sau : Khởi đầu biến tính ở 94⁰C trong 5 phút ; tiếp theo là 25 chu trình PCR với nhiệt độ gắn mồi được tham khảo theo nhiệt độ biến tính trình bày ở bảng 1. Phản ứng được kết thúc với 5 phút ở 72⁰C

Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1% được chuẩn bị bằng đệm TAE và chứa 0,5mg/ml ethidium bromide. Gel được chạy trên thiết bị điện di là Mini-Sub Cell (Biorad) với đệm TAE ở điện thế 100 V trong 30 phút. Bản gen được kiểm tra bằng hệ thống phân tích ảnh điện di.

- Giải trình tự chuỗi ITS

Sản phẩm PCR được tinh sạch trực tiếp hoặc từ gel agarose dùng kit tinh chiết Pure Link™ Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Hàm lượng DNA được ước lượng bằng điện di agarose với lượng DNA tham khảo là 2 µl, 1 µl, 0,5 µl tương ứng với 0,5 µg ; 0,25µg DNA (Marker Generuler, Fermentas). Sản phẩm PCR sau khi tinh sạch được giải trình tự trực tiếp cả 2 chiều bằng mồi PCR. Các chuỗi trình tự được biên tập bằng phần mềm Mega 7.0 và được so sánh với các chuỗi đã công bố từ trước bằng công cụ tìm kiếm BLAST tại NCBI (The National Center for Biotechnology Information

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) hoặc tại cơ sở dữ liệu nấm *Phytophthora* <http://www.phytophthoradb.org/>.

Phân tích chuỗi và xây dựng cây phả hệ được thực hiện bởi các phần mềm BioEdit 7.0 ; ClustalX1.83 ; Mega 7.0, RAxML, Mrbayes, PAUP...

Nội dung 2: Đánh giá và định hướng ứng dụng nguồn gen vi sinh vật bảo vệ thực vật

*** Đánh giá độc tính, xác định tính gây bệnh của các chủng vi sinh vật phân lập từ mẫu bệnh và định hướng ứng dụng của vi sinh vật gây bệnh**

** Phương pháp lây bệnh nhân tạo*

5 loài x 2 công thức x 3 cây/lần nhắc x 3 lần nhắc x 3 loại cây

- Lây bệnh bằng thạch sợi nấm:

Công thức 1: Áp thạch sợi nấm

Công thức 2: Áp thạch vô trùng

+ Nguồn nấm bệnh được nuôi cấy trên môi trường thạch thích hợp.

+ Tạo vết thương trên cành, thân hoặc lá

+ Áp thạch và bọc bằng bông ẩm và parafilm, giữ trong điều kiện nhiệt độ 25° -28° C

- Lây bệnh bằng dịch bào tử:

Công thức 1: Phun hoặc tưới dịch bào tử

Công thức 2: Phun hoặc tưới nước vô trùng

+ Dịch huyền phù của bào tử nấm, vi khuẩn được chuẩn bị với nồng độ 10⁵cfu/ml

+ Gây sát thương bằng kim hoặc một số dụng cụ chuyên biệt

+ Phun dịch bào tử hoặc bổ sung dịch bào tử vào đất và tạo độ ẩm khoảng 90% trong điều kiện nhiệt độ 25° -28° C

- Đánh giá độc tính thông qua vết bệnh được hình thành sau lây nhiễm

- Định hướng ứng dụng của các chủng vi sinh vật dựa trên kết quả nghiên cứu cụ thể và thành phần chủng nòi và độc tính của chúng.

*** Phương pháp đánh giá khả năng đối kháng của VSV đối kháng với VSV gây bệnh**

Thí nghiệm được tiến hành với 2 công thức x 3 đĩa Petri/lần nhắc x 3 lần nhắc x 3 chủng VSV x 5 chủng VSV gây bệnh

** Đánh giá khả năng đối kháng của nấm *Trichoderma* sp. với nấm gây bệnh*

Công thức 1: Nấm gây bệnh và nấm *Trichoderma* sp cùng nuôi cấy trên 1 đĩa môi trường

Công thức 2: Nấm gây bệnh

Phương pháp: Nấm đối kháng và nấm gây bệnh được nuôi cấy trên môi trường PDA. Đặt thỏi thạch (đường kính 0,5cm) chứa sợi nấm *Trichoderma* sp. và thỏi thạch chứa sợi nấm gây bệnh tại 2 điểm đối xứng nhau trên đĩa Petri. Đối chứng là đĩa môi trường có đặt 2 thỏi thạch sợi nấm gây bệnh đối xứng nhau. Các đĩa được đặt trong tủ định ôn, nhiệt độ 28⁰C (Seiketov, 1982). Đánh giá khả năng đối kháng dựa vào đường kính phát triển của nấm bệnh sau 7-10 ngày nuôi cấy.

- Đánh giá hiệu lực của nấm đối kháng *Trichoderma* sp. với nấm bệnh theo công thức:

(Dc – Dt)

Hiệu lực ức chế (%) = ----- x 100

Dc

Trong đó: - Dt : đường kính tán nấm bệnh trong đĩa có nấm *Trichoderma* sp.

- Dc: đường kính tán nấm bệnh trong đĩa đối chứng.

* *Đánh giá khả năng đối kháng của vi khuẩn, xạ khuẩn đối với nấm gây bệnh*

Phương pháp cấy vạch đối kháng

Công thức 1: VSV gây bệnh và VSV đối kháng cùng nuôi cấy trên 1 đĩa môi trường

Công thức 2 (Đối chứng): Chỉ cấy vi sinh vật gây bệnh

Phương pháp thực hiện: Nấm kiểm định được cấy ở giữa mặt thạch trên đĩa petri (môi trường PDA ưu tiên đối với nấm kiểm định). Cấy vạch vi sinh vật (vsv) đối kháng đối xứng hai bên với các khoảng cách như nhau. Công thức đối chứng chỉ có nấm kiểm định không có vi sinh vật đối kháng. Đĩa Petri được đặt trong tủ định ôn nhiệt độ 28°C. Theo dõi và đo đường kính khuẩn lạc nấm sau các ngày nuôi cấy.

CT

$$\text{Hiệu lực ức chế (\%)} = (1 - \frac{\text{Dt}}{\text{Dc}}) \times 100$$

Trong đó: CT: Công thức thí nghiệm

ĐC: đối chứng

* *Đánh giá khả năng đối kháng của vi khuẩn, xạ khuẩn đối với vi khuẩn gây bệnh*

Công thức 1: VSV gây bệnh và VSV đối kháng cùng nuôi cấy trên 1 đĩa môi trường

Công thức 2 (Đối chứng): Chỉ cấy vi sinh vật gây bệnh

Vi khuẩn gây bệnh được trộn với môi trường nuôi cấy sau khi môi trường được hấp khử trùng và để nguội khoảng 40°C (nồng độ vi khuẩn 10⁶ CFU/ml). Cấy vạch vi sinh vật (vsv) đối kháng ở giữa đĩa, Đĩa Petri được đặt trong tủ định ôn nhiệt độ 28°C. Theo dõi và đo khoảng vô khuẩn được hình thành sau các ngày nuôi cấy. Thí nghiệm được tiến hành với 3 lần nhắc lại

Nội dung 3: Bảo quản nguồn gen vi sinh vật bảo vệ thực vật

* *Phương pháp bảo quản ở nhiệt độ phòng hoặc trong điều kiện lạnh 4°C*

Tổng số lượng bảo quản = (200 chủng vi sinh vật gây bệnh + 100 chủng vi sinh vật đối kháng) x 2 mẫu/chủng = 600 mẫu

* *Bảo quản nấm trên giá thể mẫu giấy*

- Nuôi cấy nấm thuần trong ống nghiệm, để ống nghiệm trong điều kiện phát triển tốt nhất của VSV

- Sau 2-3 ngày nấm phát triển tốt trên môi trường, thả các mẫu giấy vô trùng vào ống nghiệm để sợi nấm phát triển trên giấy.

- Sau khi nấm đã phát triển tốt trên mẫu giấy, lấy các mẫu giấy cho vào phong bì vô trùng, ghi mã hiệu cho từng nguồn VSV.

- Đặt phong bì vào bình hút chân không (Khoảng 10-15 ngày), khi phong bì khô, cho vào túi nilon vô trùng và lưu giữ ở nhiệt độ phòng hoặc 4°C

- Hoạt hoá và kiểm tra sức sống của VSV sau 3 tháng bảo quản

* *Phương pháp bảo quản thạch nghiêng (áp dụng cho nấm và vi khuẩn, xạ khuẩn)*

- Cấy nguồn vi sinh vật trong ống thạch nghiêng

- Để trong tủ định ôn 28°C trong 3-5 ngày

- Bảo quản trong điều kiện nhiệt độ 4°C

- Hoạt hoá và kiểm tra sức sống của VSV sau từ 1- 3 tháng bảo quản

* *Phương pháp bảo quản nấm Phytophthora, Pythium trong nước cất*

- Cấy nguồn nấm *Phytophthora, Pythium* trên môi trường thạch agar trong 3-5 ngày

- Dùng dao cấy vô trùng tách các mẫu thạch agar (0,5 x 0,5 x 0,5 cm) có sợi nấm

- Mẫu sợi nấm thạch agar được bảo quản trong ống thuỷ tinh chứa 10 ml nước cất vô trùng, bảo quản ở nhiệt độ phòng 28°C

- Hoạt hoá và kiểm tra sức sống của VSV sau 3 tháng bảo quản

* **Bảo quản lạnh đông**

Tổng số lượng bảo quản = (50 chủng vi sinh vật gây bệnh + 50 chủng vi sinh vật đối kháng) x 2 mẫu/chủng = 200 mẫu

- Vi sinh vật được tạo sinh khối và chuyển vào dung môi bảo quản như glycerol 10%

- Để ở điều kiện lạnh 4°C trong vòng 24h, sau đó chuyển sang điều kiện 0°C trong 24h tiếp theo và cuối cùng mẫu được bảo quản ở -40°C

- Hoạt hoá và kiểm tra sức sống của VSV sau 12 tháng

* **Bảo quản đông khô**

Tổng số lượng bảo quản = (20 chủng vi sinh vật gây bệnh + 20 chủng vi sinh vật đối kháng) x 2 mẫu/chủng = 80 mẫu

- Môi trường bảo quản cho nấm sợi (%): Skim milk -10%; Inositol -5%

- Môi trường bảo quản cho nấm men, xạ khuẩn và vi khuẩn: 0,1 M photphat buffer (pH=7.0) - 100ml; Monosodium glutamate -3.0g; Adonitol -1.5g; Khử trùng 121°C trong 15 phút.

- Chuẩn bị ampoul: Ngâm ampoul trong dịch rửa, rửa sạch, sấy khô, khử trùng 170°C trong 90 phút.

- Chuẩn bị dịch bào tử hoặc sợi nấm.

+ Nuôi cấy trong môi trường nhân tạo thích hợp trong 2-5 ngày

+ Bổ sung môi trường bảo quản đã khử trùng vào ống.

+ Làm huyền phù tế bào bằng vortex trong 5 phút.

+ Dùng pipet Pasteus phân 100µl dịch huyền phù tế bào vào đáy ống ampoul

+ Đẩy nhẹ nút bông xuống gần phần thắt của ống ampoul.

+ Nối ngay ampoul với manifold. Đông khô trong 9 giờ.

+ Khi mẫu đã khô, tiến hành hàn đầu ống ampoul bằng lửa gas

+ Bảo quản giống ở 4°C.

- Hoạt hoá và kiểm tra sức sống của VSV sau 12 tháng

Nội dung 4: Tư liệu hóa và trao đổi thông tin

Tư liệu hoá thông tin về nguồn gen vi sinh vật BVTV trên cây ăn quả bao gồm ký hiệu nguồn gen, tên khoa học nguồn gen, lịch sử nguồn gen, điều kiện bảo quản.

Tính mới, tính sáng tạo:

Kết quả của nhiệm vụ sẽ cung cấp thêm nguồn gen vi sinh vật BVTV, tăng khả năng khai thác và sử dụng nguồn gen của các đơn vị có nhu cầu, các nguồn gen là sản phẩm của nhiệm vụ sẽ được ứng dụng trong nghiên cứu cơ bản và nghiên cứu ứng dụng.

Các nguồn gen VSV gây bệnh sẽ được ứng dụng trong phòng thí nghiệm công tác đánh giá giống, khảo nghiệm thuốc, những nghiên cứu đặc điểm sinh học, sinh thái, phổ ký chủ của nấm, vi khuẩn trong nhiều đề tài, rút ngắn được thời gian và tiết kiệm kinh phí.

Nguồn gen vi sinh vật có ích sẽ được hướng tới tiếp tục nghiên cứu chế phẩm sinh học phòng trừ nấm, vi khuẩn, vi rút và các loại chế phẩm tổng hợp khác, phục vụ phòng trừ sâu bệnh hại theo hướng an toàn, bền vững.

8. Sản phẩm khoa học và công nghệ dự kiến:

Sản phẩm dạng I:

- Nguồn gen VSV gây bệnh được bảo quản

+ 200 chủng VSV được bảo quản ở điều kiện nhiệt độ phòng hoặc 4° C: Thời gian bảo quản 1-3 tháng

+ 50 chủng VSV được bảo quản lạnh đông: Thời gian bảo quản 1 năm

+ 20 chủng VSV được bảo quản ở điều kiện đông khô: Thời gian bảo quản 1 năm

- Nguồn gen VSV có ích được bảo quản

+ 200 chủng VSV được bảo quản ở điều kiện nhiệt độ phòng hoặc 4° C: Thời gian bảo quản 1-3 tháng

+ 50 chủng VSV được bảo quản lạnh đông: Thời gian bảo quản 1 năm

+ 20 chủng VSV được bảo quản ở điều kiện đông khô: Thời gian bảo quản 1 năm

Sản phẩm dạng II:

Tư liệu hóa nguồn gen VSV bảo vệ thực vật trên cây bơ, mít và cam: 200 chủng VSV gây bệnh, 100 chủng VSV đối kháng

Danh mục nguồn gen đã được định danh: 8 loài (5 loài VSV gây bệnh và 3 loài VSV đối kháng)

Báo cáo hiệu lực đối kháng của nguồn gen vi sinh vật có ích: 1 báo cáo

Báo cáo tổng kết nhiệm vụ: 1 báo cáo

Sản phẩm dạng III:

Bài báo khoa học: 02 bài báo Tạp chí Bảo vệ thực vật hoặc tạp chí chuyên ngành tương đương.

9. Thời gian thực hiện: 21 tháng (từ tháng 4/2022 đến 12/2023).