

DISEASE REDUCING EFFECTS AND ENZYME ACTIVITIES RELATED TO ANTHRACNOSE RESISTANCE MECHANISM OF CUCUMBER CAUSED BY *Colletotrichum lagenarium* OF *Bacillus* sp. MIXTURE UNDER NET HOUSE CONDITIONS

Le Hieu Huy, Nguyen Thi Lien*, Nguyen Dac Khoa

Institute of Food and Biotechnology, Can Tho University

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Received: 08/9/2023	Anthracnose cucumber caused by the fungus <i>Colletotrichum lagenarium</i> seriously affected the yield and quality of cucumber. This study aims at testing for the disease-reducing effects, catalase (CAT), and phenylalanine ammonia-lyase (PAL) enzyme activities related to the mechanism of disease resistance stimulation by seed treatment with two strains of bacteria <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> VL4.6 and <i>Bacillus siamensis</i> CL8. The bacterial mixing ratio was investigated in five ratios: 1:0, 1:1, 1:2, 2:1, and 0:1, with a microbial density of 10^8 cells/mL. The percentage of infected leaf area was recorded every 24 hours for seven days after inoculation. The ratio of bacteria 1:1 was the most effective in disease reduction with the ratio of diseased leaf area of 7.5% (bacteria – with inoculation) equivalent to that of the positive control 6.8% (CaCl ₂ – with inoculation), and lower than that of negative control 30.7% (water – with inoculation) at seven days after inoculation. CAT and PAL activities in leaf tissue were increased when treated with <i>Bacillus</i> mixture, especially in the case of pathogens attacking the plant. CAT and PAL activities peaked in leaf tissue four days after inoculation. The results showed that mixing <i>B. amyloliquefaciens</i> VL4.6 and <i>B. siamensis</i> CL8 at a ratio of 1:1 (density 10^8 cells/mL) was the best treatment for disease reduction.
Revised: 14/11/2023	
Published: 15/11/2023	
KEYWORDS	
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	
<i>Bacillus siamensis</i>	
Anthracnose	
<i>Colletotrichum lagenarium</i>	
Resistance	

HIỆU QUẢ GIẢM BỆNH VÀ HOẠT TÍNH ENZYME LIÊN QUAN ĐẾN CƠ CHẾ KÍCH KHÁNG BỆNH THÁN THƯ TRÊN DƯA LEO DO *Colletotrichum lagenarium* CỦA HỖN HỢP VI KHUẨN *Bacillus* sp. TRONG ĐIỀU KIỆN NHÀ LƯỚI

Lê Hiếu Huy, Nguyễn Thị Liên*, Nguyễn Đắc Khoa

Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm - Trường Đại học Cần Thơ

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
Ngày nhận bài: 08/9/2023	Bệnh thán thư dưa leo do nấm <i>Colletotrichum lagenarium</i> gây ảnh hưởng nghiêm trọng đến năng suất và chất lượng dưa leo. Nghiên cứu này nhằm mục đích khảo sát hiệu quả giảm bệnh và hoạt tính enzyme catalase (CAT), phenylalanine ammonia-lyase (PAL) liên quan đến cơ chế kích thích kháng bệnh bằng biện pháp xử lý hạt với hai chủng vi khuẩn <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> VL4.6 và <i>Bacillus siamensis</i> CL8. Tỷ lệ phối trộn vi khuẩn được khảo sát ở năm tỷ lệ: 1:0, 1:1, 1:2, 2:1 và 0:1 với mật số 10^8 tế bào/mL. Tỷ lệ diện tích lá bệnh ghi nhận mỗi 24 giờ trong 7 ngày sau chủng bệnh. Tỷ lệ phối trộn 1:1 cho hiệu quả giảm bệnh cao nhất với tỷ lệ diện tích lá bệnh là 7,5% (vi khuẩn – chủng bệnh) tương đương với đối chứng dương 6,8% (CaCl ₂ – có chủng bệnh) và thấp hơn so với đối chứng âm 30,7% (nước – chủng bệnh) tại 7 ngày sau chủng bệnh. Hoạt tính CAT và PAL trong mô lá được tăng lên khi xử lý với hỗn hợp vi khuẩn, đặc biệt trong trường hợp mầm bệnh tấn công cây. Hoạt tính CAT và PAL đạt cực đại trong mô lá sau 4 ngày chủng bệnh. Kết quả cho thấy, phối trộn <i>B. amyloliquefaciens</i> VL4.6 và <i>B. siamensis</i> CL8 với tỷ lệ 1:1 (mật số 10^8 tế bào/mL) là nghiệm thức cho hiệu quả giảm bệnh tốt nhất.
Ngày hoàn thiện: 14/11/2023	
Ngày đăng: 15/11/2023	
TỪ KHÓA	
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	
<i>Bacillus siamensis</i>	
Bệnh thán thư	
<i>Colletotrichum lagenarium</i>	
Kích kháng	

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.8709>

* Corresponding author. Email: ntlien@ctu.edu.vn

1. Đặt vấn đề

Bệnh thán thư dưa leo do *Colletotrichum lagenarium* gây ra thiệt hại nghiêm trọng về năng suất dưa leo trong cả điều kiện nhà kính và ngoài đồng [1], [2]. Kiểm soát bệnh hại bằng biện pháp hoá học được sử dụng phổ biến, tuy nhiên tính nguy hiểm của việc sử dụng không kiểm soát thuốc hoá học đẩy lên nhiều mối lo ngại [2], [3]. Việc áp dụng các biện pháp canh tác phù hợp được báo cáo giúp giảm sâu bệnh hại tấn công và tăng sự khoẻ mạnh cây trồng [4], [5]. Bên cạnh đó, việc sử dụng vi sinh vật trong kiểm soát bệnh hại cây trồng nhận được sự chú ý lớn trong vài thập kỷ qua [3].

Vi khuẩn vùng rễ được báo cáo là có thể phòng trừ nhiều nấm bệnh hại trên dưa leo như *Colletotrichum orbiculare* [6], [7], *Fusarium oxysporum* [8], [9], *Rhizoctonia solani* [8]. Sự xâm chiếm vùng rễ của cây trồng là một bước thiết yếu đối với hoạt động bảo vệ cây trồng của các tác nhân kiểm soát sinh học [10]. Hoạt động ức chế mầm bệnh là kết quả của sự cạnh tranh về chất dinh dưỡng, sự cạnh tranh qua trung gian siderophore, sự kháng sinh hoặc sự tiết ra các enzyme ly giải [11]. Bên cạnh đó, hoạt động kích kháng lưu dẫn (ISR) được chứng minh đóng góp lớn về hiệu quả giảm bệnh trên cây trồng khi xử lý các tác nhân kiểm soát sinh học [11]. Hoạt động ISR bao gồm sự thay đổi về cấu trúc tế bào, tích lũy protein liên quan đến bệnh học và tăng cường hoạt động của các enzyme liên quan đến phòng vệ [12].

Một số yếu tố về canh tác như mật độ trồng cây, giá thể trồng sử dụng phụ phẩm nông nghiệp đã được báo cáo giúp cây dưa leo phát triển khoẻ mạnh, đạt năng suất cao. Các loài *Bacillus* đã được nghiên cứu rộng rãi như tác nhân kiểm soát sinh học do khả năng ức chế mầm bệnh, kích hoạt tính kháng hệ thống ở thực vật và tăng cường sự phát triển của thực vật [13]. Việc kích thích ISR bởi *Bacillus* sp. đã được chứng minh trên nhiều loại cây trồng khác nhau chống lại các mầm bệnh do nấm, vi khuẩn và virus [11]. Trong các nghiên cứu trước của chúng tôi [14], [15], các chủng vi khuẩn *Bacillus siamensis* CL8 và *B. amyloliquefaciens* VL4.6 cho thấy hiệu quả đối kháng với *C. lagenarium* và hiệu quả giảm bệnh thán thư trên cây dưa leo trong điều kiện nhà lưới. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm: (i) khảo sát hiệu quả giảm bệnh và (ii) xác định hoạt tính enzyme catalase và phenylalanine ammonia-lyase của hỗn hợp hai chủng vi khuẩn CL8 và VL4.6.

2. Vật liệu và phương pháp

2.1. Vật liệu

Giống dưa leo TN456 được sản xuất bởi Công ty TNHH TM Trang Nông.

Vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* VL4.6, *B. siamensis* CL8 và nấm *C. lagenarium* được cung cấp bởi phòng thí nghiệm Vi sinh, Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm, trường Đại học Cần Thơ.

2.2. Phương pháp

Thí nghiệm được bố trí theo thể thức hoàn toàn ngẫu nhiên với ba lần lặp lại, mỗi lần lặp lại tương ứng với một cây. Năm tỷ lệ phối trộn hai vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* VL4.6 và *B. siamensis* CL8: 1:0, 1:1, 1:2, 2:1, 0:1 với mật số 10^8 tế bào/mL, đối chứng dương CaCl_2 (100 mM) và đối chứng âm sử dụng nước cất.

Mỗi nghiệm thức xử lý hạt với vi khuẩn trong 1 giờ trước khi gieo. Chủng bệnh với huyền phù bào tử nấm *C. lagenarium* mật số 10^6 bào tử/mL với thể tích 1 mL huyền phù bào tử/lá vào thời điểm cây dưa leo được 30 ngày tuổi; đặt cây trong điều kiện che tối trong 1 ngày sau khi chủng bệnh.

Tương tự, có thêm nghiệm thức ngâm hạt với các tỷ lệ phối trộn vi khuẩn trong 1 giờ trước khi gieo nhưng không sử dụng nấm *C. lagenarium* mà thay bằng xử lý với nước cất.

2.2.1. Chuẩn bị vi khuẩn và nấm bệnh

Hai chủng vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* VL4.6 và *B. siamensis* CL8 được nuôi cấy trên môi trường Nutrient Agar (NA) trong 24 giờ. Dịch huyền phù vi khuẩn được chuẩn bị bằng cách dùng que

cấy lấy sinh khối vi khuẩn hòa tan trong 10 mL nước cất vô trùng. Điều chỉnh huyền phù vi khuẩn về giá trị độ hấp thụ quang ở bước sóng 600 nm bằng 0,1 (tương ứng với mật số 10^8 tế bào/mL).

Nấm *C. lagenarium* được nuôi cấy trên môi trường Potato Dextrose Agar (PDA) 14 ngày để tạo bào tử. Dịch huyền phù bào tử nấm được chuẩn bị bằng cách cạo khuẩn lạc nấm với nước cất vô trùng. Hỗn hợp thu được được lọc qua giấy lọc định tính (Φ 110 mm) để loại bỏ khuẩn ty (chỉ sử dụng bào tử). Mật độ bào tử được xác định bằng cách đếm trực tiếp trên buồng đếm Newbauer cải tiến và điều chỉnh về mật số 10^6 bào tử/mL [16].

2.2.2. Ly trích enzyme từ mô lá

Lá được thu tại vị trí lá thật thứ 6 (đếm từ dưới gốc lên), gói bằng giấy bạc và ngâm trong nitor lỏng; sau đó mang về phòng thí nghiệm để tiến hành ly trích enzyme. Cân 1 g mẫu lá, nghiền trong nitor lỏng, đồng nhất bằng 10 mL dung dịch đệm Na-acetate 0,1 M (pH 5,2). Ly tâm lạnh hỗn hợp ở 4°C với tốc độ 10.000 vòng/phút trong 30 phút. Thu phần dịch lỏng bên trên sau ly tâm để khảo sát hoạt tính enzyme. Tiếp tục thu lá và ly trích enzyme tại các thời điểm cách nhau 24 giờ trong 7 ngày sau chủng bệnh (NSCB).

2.2.3. Các chỉ tiêu theo dõi

Hoạt tính enzyme catalase (CAT): Hỗn hợp phản ứng chứa 3 mL đệm phosphate (50 mM, pH 7,0) cùng với 40 μ L enzyme thô. Phản ứng được bắt đầu bằng cách thêm 40 μ L H_2O_2 10 mM và được đo quang phổ ở bước sóng 240 nm. Hoạt tính catalase được biểu thị bằng $\Delta OD/\text{phút}/\text{mg}$ protein [17].

Hoạt tính enzyme phenylalanine ammonia-lyase (PAL): Thể tích của hỗn hợp phản ứng là 3 mL bao gồm 0,5 mL enzyme thô, 2,5 mL L-Phenylalanin 0,01 M trong dung dịch đệm sodium borate (0,025 M, pH 8,8). Ủ hỗn hợp trong 2 giờ ở 40°C, sau đó thêm 100 μ L HCL 5 N để ngừng phản ứng. Đo độ hấp thụ của hỗn hợp enzyme ở bước sóng 290 nm, mẫu blank được sử dụng là hỗn hợp không chứa dịch enzyme. Hoạt tính enzyme được biểu thị bằng $\Delta OD/\text{phút}/\text{mg}$ protein [18].

Hàm lượng protein: Được xác định bằng cách cho 100 μ L enzyme vào 1 mL thuốc thử Bradford, ủ trong 2 phút và xác định độ hấp thụ quang của hỗn hợp ở bước sóng 595 nm [19].

Đường chuẩn $y = 0,0022x + 0,071$ ($R^2 = 0,991$) (1)

Tỷ lệ diện tích lá bệnh (TLDTLB): Lá dưa leo bị nhiễm bệnh được chụp ảnh và tính toán tỷ lệ diện tích lá bệnh bằng phần mềm ImageJ được mô tả bởi T. Ferreira và cộng sự [20].

Tỷ lệ diện tích lá bệnh (%) = (diện tích vết bệnh/tổng diện tích lá) $\times$ 100% (2)

2.3. Xử lý số liệu

Các số liệu TLDTLB và hoạt tính các enzyme được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel 2019. Phần mềm Minitab 16.0 được sử dụng để phân tích phương sai (ANOVA) và kiểm định Tukey ở mức ý nghĩa 5% để so sánh các giá trị trung bình của các chỉ tiêu.

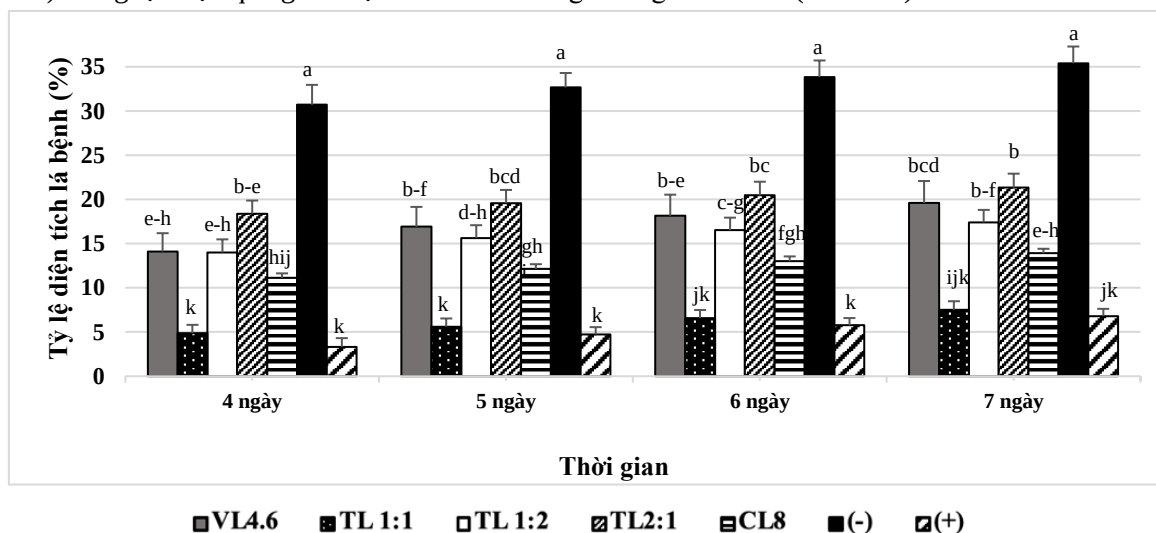
3. Kết quả và thảo luận

3.1. Hiệu quả giảm bệnh thán thư trong điều kiện nhà lưới của hỗn hợp vi khuẩn *Bacillus* sp.

Thí nghiệm được thực hiện nhằm khảo sát hiệu quả giảm bệnh thán thư dưa leo của huyền phù hai chủng vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* VL 4.6 và *B. siamensis* CL8 với năm tỷ lệ (1:0, 1:1, 1:2, 2:1 và 0:1). Kết quả tỷ lệ diện tích lá bệnh tại thời điểm 4, 5, 6 và 7 ngày sau chủng bệnh ở các nghiệm thức phối trộn được ghi nhận ở Hình 1.

Tại thời điểm 0 đến 3 NSCB: Đây là giai đoạn xâm nhiễm của nấm *C. lagenarium*, trong thời gian này độ ẩm có vai trò quan trọng đến việc nảy mầm và phát triển của nấm bệnh trong những thời điểm kế tiếp. Ở mốc 4 NSCB, vết bệnh đã bắt đầu hình thành trên lá, ở tất cả các nghiệm thức phối trộn có TLDTLB dao động từ 4,86 - 18,38%, thấp hơn và khác biệt có ý nghĩa so với đối chứng nước cất 30,7%. Có thể thấy, TLDTLB càng thấp cho thấy khả năng kiểm soát nấm bệnh của vi khuẩn càng cao và ngược lại. Tại thời điểm 5, 6 và 7 NSCB vết bệnh phát triển nhiều

hơn so với thời điểm 4 NSCB, TLDTLB bắt đầu tăng đặc biệt ở nghiệm thức phối trộn vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* VL 4.6, *B. siamensis* CL8 và đối chứng CaCl_2 (100 mM) đều có biên độ thay đổi thấp hơn so với nghiệm thức đối chứng âm. Ở mốc 7 NSCB, ở nghiệm thức phối trộn tỷ lệ 1:1, tỷ lệ diện tích lá bệnh ở mức 7,5%, khác biệt có ý nghĩa với các nghiệm thức phối trộn 1:0, 1:2, 2:1 và 0:1; đồng thời TLDTLB tương đương và không khác biệt có ý nghĩa thống kê với đối chứng dương CaCl_2 (100 mM) (6,8%). *B. amyloliquefaciens* VL 4.6 và *B. siamensis* CL8 (tỷ lệ 1:1) mang lại hiệu quả giảm bệnh thán thư tương đương với CaCl_2 (100 mM).



Hình 1. Tỷ lệ diện tích lá bệnh (%) trên giống TN456 tại thời điểm 4, 5, 6 và 7 NSCB

Việc xử lý tác nhân là vi khuẩn hoặc hoá chất có thể ức chế sự phát triển của nấm *C. lagenarium* nên vết bệnh sẽ phát triển chậm. Đối với vi khuẩn, do cơ chế tạo ra các lipopeptide kháng nấm, hợp chất hữu cơ dễ bay hơi, cạnh tranh dinh dưỡng và kích kháng lưu dẫn [21]. Đối với đối chứng CaCl_2 (100 mM), hiệu quả giảm bệnh do cơ chế kích thích cây tạo ra các hợp chất phenol, flavonoid và sự gia tăng các enzyme bảo vệ như polyphenol oxidase (PPO), phenylalanine ammonia-lyase (PAL), β -1,3-glucanase, chitinase và enzyme chống oxy hóa catalase (CAT) hiện diện trong cây thông qua việc tăng biểu hiện của các gen có chức năng bảo vệ khác nhau như PR1, PR2a, PR2b,... [22]. Việc vi khuẩn tác động vào rễ nhưng lại tạo hiệu quả giảm bệnh trên lá có thể hiểu theo một giả thuyết: sau khi vi khuẩn tập trung ở vùng rễ, chúng di chuyển đến bề mặt rễ và xâm nhập vào rễ, thậm chí là vào các bộ phận khác của cây [23]. Tại đây chúng thể hiện đầy đủ tính chất và chức năng của vi khuẩn đối kháng khi tiết kháng sinh, enzyme và cạnh tranh dinh dưỡng với nấm bệnh. Biện pháp xử lý áo hạt, vi khuẩn sẽ phát triển theo bộ rễ và đóng vai trò là một nhân tố dẫn truyền tín hiệu trong hệ thống miễn dịch giúp cây tạo ra hệ thống phòng vệ theo hai con đường đối kháng và kích kháng lưu dẫn (ISR). Con đường kích kháng giúp cây tăng cường hoạt động của các enzyme [24].

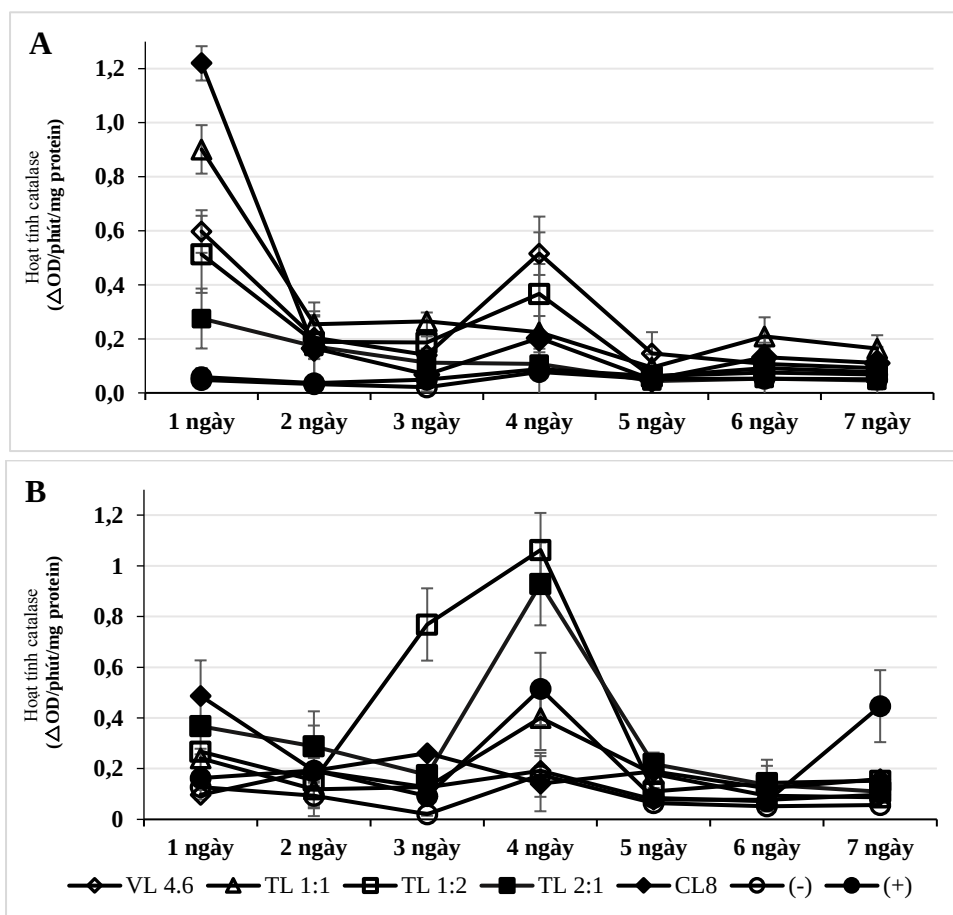
Mỗi nhân tố kích kháng đóng vai trò quan trọng giúp cây nhận diện được tín hiệu phòng bệnh. Việc kích thích ở rễ với tỷ lệ phối trộn *B. amyloliquefaciens* VL 4.6 và *B. siamensis* CL8 (tỷ lệ 1:2 hoặc 2:1) có thể sẽ tạo nhiều tín hiệu dẫn truyền nên cây xem đây là một nhân tố gây stress, sau đó phản ứng lại với các nhân tố kích kháng này theo cách tiết kiệm năng lượng. Ngoài ra, dịch tiết rễ và sự tích tụ chất hữu cơ ở vùng rễ là nguồn carbon và năng lượng thu hút nhiều vi sinh vật như vi khuẩn, nấm, nguyên sinh động vật và tảo [25]. Kích kháng là quá trình làm tăng khả năng phòng vệ của thực vật khi được kích thích bởi nhân tố kích kháng, phản ứng thay đổi cấu trúc, tổng hợp nhiều loại enzyme và các hợp chất thứ cấp [26]. Xác định rõ sự thay đổi hoạt tính của từng loại enzyme trong mô lá được xem là một cách để chứng minh được mối liên hệ chặt chẽ giữa kích kháng lưu dẫn và hiệu quả giảm bệnh (cụ thể là TLDTLB).

3.2. Hoạt tính enzyme catalase và phenylalanine ammonia-lyase

3.2.1. Catalase

Về hoạt tính enzyme CAT, ở điều kiện sinh lý bình thường của cây (nước – không chủng bệnh), hoạt tính enzyme CAT luôn ở mức thấp nhất và dao động quanh 0,05 – 0,1 $\Delta OD/\text{phút}/\text{mg}$ protein. Ở các nghiệm thức phối trộn vi khuẩn (vi khuẩn – không chủng bệnh) và đối chứng hoá chất CaCl_2 (100 mM), hoạt tính enzyme cao tại thời điểm ngày 1 và khi không có sự xuất hiện của mầm bệnh (nấm bệnh) thì hoạt tính enzyme sẽ có xu hướng giảm cho đến ngày 7 (Hình 2a).

Với sự có mặt của mầm bệnh (có khuẩn – có chủng bệnh), giá trị hấp thụ quang phổ tăng đều từ 0,1 – 1,2 $\Delta OD/\text{phút}/\text{mg}$ protein nhất tại 4 NSCB và giảm từ 5 NSCB (Hình 2b). Hoạt tính enzyme CAT tăng liên quan đến cơ chế xâm nhiễm của nấm *C. lagenarium*, chúng bắt đầu nhân mật số và di chuyển đến các mô lân cận sau khoảng 2 - 4 ngày nhiễm bệnh. Ngoài CAT, các enzyme từ thực vật trực tiếp tham gia vào việc ngăn chặn vi sinh vật gây hại cho cây cũng được kích thích như peroxidase, phenylalanine ammonia-lyase, polyphenol oxidase, vì vậy hoạt tính giữa chúng không thể duy trì trong thời gian dài vì các gen chức năng đều được hoạt hóa cùng lúc [24].



Hình 2. Sự thay đổi hoạt tính của enzyme CAT trong mô lá của giống dưa leo TN456 ở những thời điểm cách nhau 24 giờ trong 7 NSCB ở bước sóng 240 nm; (A) Không chủng bệnh (B) Có chủng bệnh

Ở nghiệm thức vi khuẩn – có chủng bệnh (Hình 2b), hoạt tính enzyme CAT tại thời điểm 4 NSCB đạt cao nhất và giảm dần tại 7 NSCB tương đương với đối chứng âm (nước – có chủng bệnh). Điều này, có thể hiểu tác nhân vi khuẩn là nguyên nhân làm thay đổi hoạt tính enzyme CAT khi so với nghiệm thức đối chứng. Nhân tố kích kháng (elicitor) là một chất cơ bản mà đưa

một lượng nhỏ vào hệ thống tế bào sống thì có thể khởi động hoặc cải thiện sự sinh tổng hợp các hợp chất thứ cấp, giúp cây chống lại các yếu tố bất lợi của nấm bệnh. Ở nghiên cứu này, các tỷ lệ phối trộn vi khuẩn được xem là elicitor sinh học, chúng được giải phóng trực tiếp từ vi sinh vật (các enzyme, các mảnh vỡ của thành tế bào); và đối chứng dương CaCl_2 (100 mM) được xem là elicitor phi sinh học có ái lực cao với DNA thực vật.

Ở giai đoạn tiếp xúc, bào tử nấm *C. lagenarium* sẽ nảy mầm tạo đĩa bám, xâm nhập vào lá và thiết lập mối quan hệ ký sinh với cây ký chủ, chúng xâm nhập qua các lỗ hở tự nhiên (khí khổng hoặc vết thương cơ học). Ngoài ra, *C. lagenarium* còn có thể chủ động xâm nhập trực tiếp qua lớp cutin và biểu bì của lá nhờ hệ enzyme thủy phân vách tế bào [27]. Chức năng chính của CAT là phân hủy hydrogen peroxide thành nước, khí oxy và góp phần ngăn ngừa tổn thương oxy hoá gây ra bởi yếu tố sinh học và phi sinh học. CAT thuộc nhóm enzyme phòng vệ thực vật, hoạt tính của CAT tỷ lệ thuận với nồng độ hydrogen peroxide khi có mầm bệnh tấn công, CAT cũng có khả năng liên kết với salicylic acid trong kích kháng lưu dẫn [28].

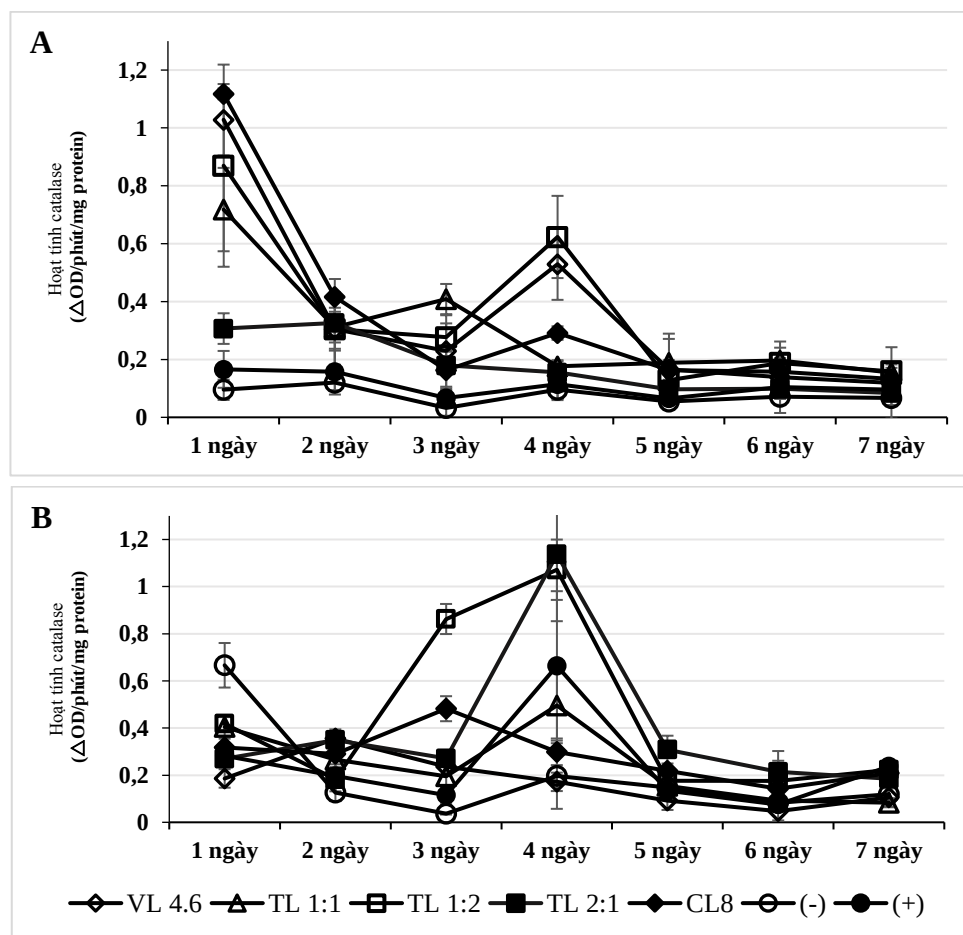
3.2.2. Phenylalanine ammonia-lyase

Về hoạt tính enzyme PAL, ở điều kiện không chủng bệnh, nghiệm thức xử lý vi khuẩn – không chủng bệnh mức độ hấp phụ quang phổ dao động từ 0,1 – 1,1 $\Delta\text{OD}/\text{phút}/\text{mg}$ protein đạt cao nhất tại ngày 1, sau đó tiếp tục tăng vào ngày 4 và xuống ở mức thấp vào ngày 7 tương đương với đối chứng (nước – không chủng bệnh) (Hình 3a). Điều này cho thấy, vi khuẩn đã kích thích hệ thống miễn dịch của cây trong thời gian đầu và enzyme PAL tăng nhanh trong ngày đầu để tổng hợp những chất biến dưỡng thứ cấp ở thực vật như flavonoid, isoflavonoid cùng các hợp chất phenol khác. Mặt khác, khi không có mầm bệnh, hoạt tính enzyme không tồn tại lâu trong mô lá của cây, vì hoạt động tiết kiệm năng lượng của cây.

Khi có mặt mầm bệnh, giá trị hấp phụ quang phổ tăng cao vào thời điểm 4 NSCB và xuống thấp vào thời điểm 7 NSCB tương đương với đối chứng (nước – có chủng bệnh) (Hình 3b). Hoạt tính enzyme PAL tăng phần lớn do sự có mặt của mầm bệnh như một cách nhân hoạt hoá bộ gen của thực vật để ngăn chặn sự phát triển của mầm bệnh. Enzyme PAL tham gia vào con đường sinh tổng hợp các hợp chất hoạt hóa các gen kháng trong thực vật trong cơ chế tự vệ của cây [29].

Trong số các enzyme và PR-protein có liên quan đến phản ứng phòng vệ của cây, PAL xúc tác phản ứng khử amine chuyển L-phenylalanine thành trans-cinnamic acid, khởi đầu cho con đường phenylpropanoid, dẫn đến tổng hợp các hợp chất liên quan đến sự phòng vệ (lignin, phytoalexins), PAL cũng tham gia vào con đường sinh tổng hợp salicylic acid [30]. PAL được cảm ứng gia tăng hoạt tính trong nhiều phản ứng kháng bệnh và sau khi xử lý với các chất kích kháng khác nhau. Nghiên cứu sử dụng tác nhân kích kháng (elicitor sinh học) điển hình là vi khuẩn. Chúng là những phân tử màng tế bào, vật chất di truyền DNA và protein tự do trong quá trình sinh trưởng và phát triển của vi khuẩn.

Nhìn chung, cây luôn có những cơ chế tự vệ làm giảm sự tấn công của các tác nhân bên ngoài và giảm biểu hiện bệnh đến mức thấp nhất [31]. Sự thay đổi hoạt tính của enzyme là một trong những dấu hiệu rõ nhất chứng tỏ tính kháng bệnh trên cây trồng đã được kích hoạt [32]. Cơ chế này có thể hoạt động hiệu quả hơn nếu cây được kích thích bằng các tác nhân phù hợp [33]. Kích kháng là quá trình sử dụng nhiều năng lượng và nguyên liệu do phải khuếch đại các tín hiệu và kích hoạt các gen kháng bệnh sẵn có trong cây, nhưng ở trạng thái bất hoạt hoặc chưa được biểu hiện nhiều [34]. Sau khi các cơ chế kích kháng được kích hoạt, cây được bảo vệ trước mầm bệnh, ở các thời điểm 4 NSCB trở đi, CAT và PAL có xu hướng giảm hoạt tính để cân bằng năng lượng và đảm bảo cho các chu trình chuyển hoá khép kín khác của cây.



Hình 3. Sự thay đổi hoạt tính của enzyme PAL trong mô lá của giống dưa leo TN456 ở những thời điểm cách nhau 24 giờ trong 7 NSCB ở bước sóng 290 nm (A) Không chủng bệnh (B) Có chủng bệnh

4. Kết luận

Nghiệm thức xử lý hạt với hỗn hợp vi khuẩn *Bacillus* ở tỷ lệ 1:1 thể hiện hiệu quả giảm bệnh cao nhất, với tỷ lệ diện tích lá bệnh đạt thấp nhất. Biện pháp xử lý hạt với hỗn hợp vi khuẩn cho thấy sự gia tăng hoạt tính CAT và PAL. Sự gia tăng hoạt tính của CAT và PAL thể hiện rõ nhất trong điều kiện cây chịu sự tấn công của mầm bệnh. Kết quả nghiên cứu chỉ ra tiềm năng ứng dụng của hỗn hợp vi khuẩn *Bacillus* trong phòng trừ bệnh thán thư trên dưa leo.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] Y. Chen and G. Dai, "Antifungal activity of plant extracts against *Colletotrichum lagenarium*, the causal agent of anthracnose in cucumber," *Journal of the science of food and agriculture*, vol. 92, no. 9, pp. 1937-1943, 2012.
- [2] M. J. Falade, "Efficacy of plant extracts in the management of cucumber anthracnose caused by *Colletotrichum lagenarium*," *International Journal of Soil and Crop Sciences*, vol. 5, no. 7, pp. 10-23, 2021.
- [3] M. Hyakumachi, H. Takahashi, Y. Matsubara, N. Someya, M. Shimizu, K. Kobayashi, and M. Nishiguchi, "Recent studies on biological control of plant diseases in Japan," *Journal of General Plant Pathology*, vol. 80, pp. 287-302, 2014.
- [4] B. V. Quang, H. D. Truong, and N. Q. Anh, "Study on the effects of plant density on growth and yield of japanese cucumber variety F1 (VA.66) in Cho Moi district, Bac Kan province," *TNU Journal of Science and Technology*, vol. 228, no. 1, pp. 68-72, 2022.

- [5] H. D. Truong, "Effect of agricultural by-products as substrates for H'mong cucumber seedlings under greenhouse conditions," *TNU Journal of Science and Technology*, vol. 228, no. 9, pp. 424-429, 2023.
- [6] M. S. Kwack, S. G. Park, Y. C. Jeun, and K. D. Kim, "Selection and efficacy of soil bacteria inducing systemic resistance against *Colletotrichum orbiculare* on cucumber," *Mycobiology*, vol. 30, no. 1, pp. 31-36, 2002.
- [7] K. S. Park, J. W. Park, S. W. Lee, and K. Balaraju, "Disease suppression and growth promotion in cucumbers induced by integrating PGPR agent *Bacillus subtilis* strain B4 and chemical elicitor ASM," *Crop protection*, vol. 54, pp. 199-205, 2013.
- [8] S. Singh and R. Balodi, "Bio-management of soil borne pathogens infesting cucumber (*Cucumis sativus* L.) under protected cultivation system," *Biological control*, vol. 157, 2021, Art. no. 104569.
- [9] Y. Zhai, J. X. Zhu, T. M. Tan, J. P. Xu, A. R. Shen, X. B. Yang, J. L. Li, L. B. Zeng, and L. Wei, "Isolation and characterization of antagonistic *Paenibacillus polymyxa* HX-140 and its biocontrol potential against *Fusarium* wilt of cucumber seedlings," *BMC microbiology*, vol. 21, no. 1, p. 75, 2021.
- [10] D. R. Walters, "Induced resistance: destined to remain on the sidelines of crop protection?" *Phytoparasitica*, vol. 38, pp. 1-4, 2010.
- [11] D. K. Choudhary and B. N. Johri, "Interactions of *Bacillus* spp. and plants--with special reference to induced systemic resistance (ISR)," *Microbiological research*, vol. 164, no. 5, pp. 493-513, 2009.
- [12] N. Jayapala, N. H. Mallikarjunaiah, H. Puttaswamy, H. Gavirangappa, and N. S. Ramachandrappa, "Rhizobacteria *Bacillus* spp. induce resistance against anthracnose disease in chili (*Capsicum annuum* L.) through activating host defense response," *Egyptian Journal of biological pest control*, vol. 29, p. 45, 2019.
- [13] E. G. Poulaki and S. E. Tjamos, "*Bacillus* species: factories of plant protective volatile organic compounds," *Journal of applied microbiology*, vol. 134, no. 3, 2023, Art. no. lxad037.
- [14] N. T. Lien, N. T. P. Oanh, and N. D. Khoa, "Isolation and selection antagonistic bacteria against *Colletotrichum lagenarium* causing anthracnose on cucumber," *Agriculture and rural development*, vol. 10, pp. 15-20, 2019.
- [15] N. T. Lien, N. T. P. Oanh, and N. D. Khoa, "Study on characterization of *Bacillus amyloliquefaciens* VL4.6 as a biocontrol agent against *Colletotrichum lagenarium* causing anthracnose on cucumber," *Agriculture and rural development*, vol. 10, pp. 34-41, 2023.
- [16] R. C. Descalzo, J. E. Rahe, and B. Mauza, "Comparative efficacy of induced resistance for selected diseases of greenhouse cucumber," *Canadian Journal of Plant Pathology*, vol. 12, no. 1, pp. 16-24, 1990.
- [17] P. Nandeeshkumar, K. Ramachandrakini, H. S. Prakas, S. R. Niranjana, and H. S. Shetty, "Induction of resistance against downy mildew on sunflower by rhizobacteria," *Journal of Plant Interactions*, vol. 3, no. 4, pp. 255-262, 2008.
- [18] K. C. Nagarathna, A. Sudheer, H. Shetty, and S. Shetty, "Phenylalanine Ammonia Lyase Activity in Pearl Millet Seedlings and its Relation to Downy Mildew Disease Resistance," *Journal of Experimental Botany*, vol. 44, no. 8, pp. 1291-1296, 1993.
- [19] M. M. Bradford, "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding," *Analytical Biochemistry*, vol. 72, no. 1-2, pp. 248-254, 1976.
- [20] T. Ferreira and W. Rasband, "ImageJ user guide," *ImageJ/Fiji*, vol. 1, pp. 155-161, 2012.
- [21] S. Y. Wang, D. D. Herrera-Balandrano, Y. X. Wang, X. C. Shi, X. Chen, Y. Jin, F. Q. Liu, and P. Laborda, "Biocontrol Ability of the *Bacillus amyloliquefaciens* Group, *B. amyloliquefaciens*, *B. velezensis*, *B. nakamurai*, and *B. siamensis*, for the Management of Fungal Postharvest Diseases: A Review," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 70, no. 22, pp. 6591-6616, 2022.
- [22] N. Chakraborty, S. Chandra, and K. Acharya, "Biochemical basis of improvement of defense in tomato plant against *Fusarium* wilt by CaCl_2 ," *Physiology and Molecular Biology of Plants*, vol. 23, no. 3, pp. 581-596, 2017.
- [23] S. Compant, C. Clément, and A. Sessitsch, "Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization," *Soil Biology & Biochemistry*, vol. 42, no. 5, pp. 669-678, 2010.
- [24] Z. A. Siddiqui, "PGPR: Prospective Biocontrol Agents of Plant Pathogens," in *PGPR: Biocontrol and Biofertilization*, Z. A. Siddiqui, Ed. Dordrecht: Springer, 2006, pp. 111-142.
- [25] B. S. Saharan and V. Nehra, "Plant growth promoting rhizobacteria: a critical review," *Life Sciences and Medicine Research*, vol. 21, no. 1, p. 30, 2011.
- [26] J. W. Kloepper, S. Tuzun, and T. A. Kue, "Propose definition related to induced disease resistance," *Biocontrol science and technology*, vol. 2, no. 4, pp. 349-351, 1992.
- [27] R. R. Frost, "Seta formation in *Colletotrichum* spp.," *Nature*, vol. 201, no. 4920, pp. 730-731, 1964.

-
- [28] J. N. Lin and C. H. Lin, "Effect of oxidative stress caused by hydrogen peroxide on senescence of rice leaves," *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, vol. 39, pp. 161-165, 1998.
- [29] H. Xiangyang, L. Wansha, Q. Chen, and Y. Yongping, "Early signal transduction linking the synthesis of jasmonic acid in plant," *Plant Signaling & Behavior*, vol. 4, no. 8, pp. 696-697, 2009.
- [30] M. C. Wildermuth, J. Dewdney, G. Wu, and F. M. Ausubel, "Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence," *Nature*, vol. 414, pp. 562-565, 2001.
- [31] C. Garcion, O. Lamotte, J. L. Cacas, and J. P. Metraux, "Mechanism of defense to pathogens: biochemistry and physiology," in *Induced resistance for plant defense: A Sustainable Approach to Crop Protection*, 2nd Edition, D. R. Walters, A. C. Newton, and G. D. Lyon, Eds. Chichester: John Wiley & Sons, 2014, pp. 106-136.
- [32] K. E. Hammond-Kosack and J. D. G. Jones, "Resistance gene-dependent plant defense responses," *The Plant Cell*, vol. 8, no. 10, pp. 1773-1791, 1996.
- [33] N. D. Khoa, "Control of Sheath Blight and Other Rice Diseases by Induced Resistance Using an Extract of the Plant *Chromolaena odorata*," PhD. Thesis, University of Copenhagen, Denmark, 2010.
- [34] M. Heil, "Damaged-self recognition in plant herbivore defence," *Trends in Plant Science*, vol. 14, no. 7, pp. 356-363, 2009.