



KHẢ NĂNG KÍCH KHÁNG LƯU DẪN CỦA VI KHUẨN *Bacillus* SPP. ĐỐI VỚI BỆNH CHÁY LÁ LÚA DO NẤM *Pyricularia oryzae* TRONG ĐIỀU KIỆN NHÀ LƯỚI

Trần Vũ Phấn, Trần Ánh Lụa và Đinh Ngọc Trúc

Khoa Nông nghiệp và Sinh học Ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ

Thông tin chung:

Ngày nhận: 05/08/2016

Ngày chấp nhận: 26/10/2016

Title:

Induction of systemic resistance by some bacterial *Bacillus* isolates against rice blast disease caused by *Pyricularia oryzae* in net house conditions

Từ khóa:

Bacillus, bệnh cháy lá, cây lúa, kích kháng lưu dẫn

Keywords:

Bacillus, blast disease, induced systemic resistance, rice

ABSTRACT

The study was conducted at the Plant Protection Department, College of Agriculture and Applied Biology, Can Tho University to assess the ability to elicit induced systemic resistance against blast disease of some strains of *Bacillus* spp. isolated from rice fields. In the experiment, inducing bacteria and challenging pathogen remained temporally separated, more specifically, *Bacillus* spp. were applied by seed soaking and foliar spray on rice at 16 days after sowing (DAS) and disease infection was on 20 DAS. Results showed that *Bacillus* isolates-P78, -P81, -P84 and *B. amyloliquefaciens* are potential systemic resistance elicitors against rice leaf blast disease. Their all blast disease suppression levels were about 90% as compared to the control treatment. In the rice plants treated with the *Bacillus*-P84, P81 and *B. amyloliquefaciens*, there was an increase in the activity of β -1,3- glucanase and chitinase, which may be related to the ability of systemic resistance induced by *Bacillus* against rice blast disease.

TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện tại nhà lưới Bộ môn Bảo vệ thực vật, Khoa Nông nghiệp và Sinh học Ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ nhằm đánh giá khả năng kích kháng đối với bệnh cháy lá lúa của một số chủng vi khuẩn *Bacillus* spp. phân lập từ ruộng lúa. Thí nghiệm được thực hiện theo phương pháp lây nhiễm tác nhân gây bệnh cách biệt về mặt thời gian với tác nhân phòng trị, cụ thể là vi khuẩn *Bacillus* được xử lý bằng cách ngâm và áo hạt và phun trên tán lá lúa vào 16 ngày sau khi gieo (NSKG) và lây bệnh nhân tạo được thực hiện vào 20 NSKG. Kết quả đã ghi nhận các chủng *Bacillus*-P78, -P81, -P84 và *B. amyloliquefaciens* là tác nhân kích kháng lưu dẫn triển vọng đối với bệnh cháy lá lúa, giúp cây lúa có mức độ nhiễm bệnh thấp hơn so với đối chứng không xử lý, với hiệu quả giảm bệnh khoảng 90%. Trong cây lúa được kích kháng, các chủng *Bacillus*-P84, -P81 và *B. amyloliquefaciens* có sự gia tăng hoạt tính β -1,3-glucanase và chitinase, tương ứng theo thứ tự về hiệu quả giảm bệnh. Sự gia tăng hoạt tính của các enzyme này có thể liên quan tới khả năng kích kháng lưu dẫn của vi khuẩn *Bacillus* đối với bệnh cháy lá lúa.

Trích dẫn: Trần Vũ Phấn, Trần Ánh Lụa và Đinh Ngọc Trúc, 2016. Khả năng kích kháng lưu dẫn của vi khuẩn *Bacillus* spp. đối với bệnh cháy lá lúa do nấm *Pyricularia oryzae* trong điều kiện nhà lưới. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. Số chuyên đề: Nông nghiệp (Tập 3): 249-257.

1 GIỚI THIỆU

Tính kích kháng lưu dẫn (Induced Systemic Resistance, ISR) là một dạng kháng chủ động, toàn cây, phổ rộng hình thành sau khi cơ chế tự phòng vệ của cây được hoạt hóa bởi một tác nhân có khả năng kích kháng, giúp cây bị nhiễm bệnh nhẹ hơn so với cây không được kích kháng (Alabouvette and Steinberg, 2006; Roberts and Taylor, 2016). ISR ngày càng thể hiện rõ vai trò là một cơ chế quan trọng có ở các vi khuẩn vùng rễ kích thích tăng trưởng thực vật (plant growth-promoting bacteria - PGPR), bao gồm nhiều chủng thuộc chi *Pseudomonas*, *Bacillus*, ... (Kloepper *et al.*, 2004; Pieterse *et al.*, 2014), trong đó *Bacillus* là triển vọng cao nhất cho ứng dụng trong sản xuất do chúng có khả năng hình thành nội bào tử, có thể sống sót lâu dài trong môi trường (Kloepper *et al.*, 2004). Đây là một giải pháp bảo vệ cây trồng cho hiệu quả bền vững, thân thiện với con người và môi trường (Roberts and Taylor, 2016).

Trường Đại học Cần Thơ đã công bố nhiều kết quả nghiên cứu về kích kháng bệnh cháy lá lúa bằng nhiều tác nhân có nguồn gốc hóa chất hoặc vi sinh vật (Phạm Văn Kim *và ctv.*, 2004; Trần Thị Thu Thủy *và ctv.*, 2004; Trần Vũ Phấn, 2010; Trần Thị Thu Thủy *và ctv.*, 2015), tuy nhiên khả năng kích kháng của PGPR thuộc chi *Bacillus* chưa có nhiều công bố. Bên cạnh đó, một số kết quả nghiên cứu trên thế giới đã chứng minh vi khuẩn *Bacillus* có tiềm năng kiểm soát bệnh cháy lá lúa (Kloepper *et al.*, 2004; Cawoy *et al.*, 2011; Suryadi *et al.*, 2013; Chung *et al.*, 2015).

Nghiên cứu này được thực hiện nhằm tuyển chọn các chủng vi khuẩn *Bacillus* spp. có khả năng kích kháng tốt trên lúa đối với bệnh cháy lá và khảo sát cơ chế có liên quan.

2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Nghiên cứu được thực hiện từ tháng 12/2014 đến 12/2015, tại phòng thí nghiệm và nhà lưới, Bộ môn Bảo vệ Thực vật, khoa Nông nghiệp và Sinh học Ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ.

Thí nghiệm được thực hiện trong chậu, trên giống lúa OM1490, giống nhiễm bệnh cháy lá. Thí nghiệm được bố trí theo thể thức hoàn toàn ngẫu nhiên, 6 lần lặp lại, gồm 13 nghiệm thức (1 chủng vi khuẩn *Bacillus* spp., đối chứng dương BIOSAR-3 ĐHCT (hoạt chất chính là $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, xử lý ở nồng độ 0,05mM) (Phạm Văn Kim *và ctv.*, 2004) và đối chứng âm (chủng bệnh và không chủng bệnh, để so sánh hoạt tính enzyme).

Hạt lúa giống OM1490 sau khi được xử lý với nước muối 15%, nước ấm 54°C trong 15 phút, sau đó được ủ nảy mầm. Gieo 6 hạt đã nảy mầm/ chậu (0,6 kg đất mặt của ruộng lúa đã khử trùng). Bón phân cho lúa theo công thức phân: 90N - 40P₂O₅ - 30K₂O (kg/ha) (Nguyễn Ngọc Đệ, 2008).

Vi khuẩn *Bacillus* được nuôi 48 giờ trên môi trường King'B agar (Atlas, 2010). Xử lý kích kháng bằng cách ngâm hạt trong 24 giờ với huyền phù (mật số 10⁸ cfu/ml) của từng chủng vi khuẩn, sau đó ủ tiếp 36 giờ, xử lý lần hai bằng cách phun lá vào 16 NSKG (có lá 4) (Kloepper *et al.*, 2004, De Vleeschauwer *et al.*, 2008). Hạt của nghiệm thức đối chứng được ngâm, ủ với nước cất.

Xử lý lây nhiễm bệnh bằng cách phun huyền phù bào tử nấm *P. oryzae* (được nuôi trên môi trường oatmeal agar), ở mật số 5 × 10⁴ bào tử/ml, 5ml/ chậu trên tán lá, vào 20 NSKG (lá 5 phát triển đầy đủ) vào lúc chiều mát. Sau khi lây nhiễm, cây lúa được chuyển vào phòng tối ủ bệnh (nhiệt độ 26°C, ẩm độ 98 - 100%), trong 24 giờ, rồi được chuyển ra nhà lưới che mát, để bệnh phát triển (Trần Vũ Phấn, 2010).

Ghi nhận mức độ nhiễm bệnh theo Pinnschmidt *et al.* (1993) vào 3, 5, 7 ngày sau khi chủng nhiễm và phân tích hiệu quả kích kháng dựa trên so sánh mức độ nhiễm bệnh giữa các nghiệm thức.

Thu thập mẫu lá lúa cho phân tích hoạt tính các enzyme vào các thời điểm 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ngày sau khi lây nhiễm bệnh. Ngay sau khi thu, mẫu được xử lý với nito lỏng, bảo quản ở -20°C. Mẫu sau nghiền thô với nito lỏng, được nghiền đến đồng nhất với cối sứ được giữ lạnh ở 4°C (0,25 g mẫu + 1 ml dung dịch đệm 50 mM sodium acetate buffer pH=5,2), thu dịch trích trong ống eppendorf (1,5 ml), ly tâm với tốc độ 10.000 vòng/phút, trong 30 phút, ở 4°C, thu phần dịch trích phía trên ống và trữ ở 4°C, trong suốt quá trình phân tích. Hàm lượng trong dịch trích thô được ước lượng theo Bradford (1976), với protein chuẩn là Bovine Serum Album (Sigma), chất nhuộm màu protein là Comassie Brilliant Blue G250.

Hoạt tính của β-1,3- glucanase được xác định dựa theo Isaac and Gokhale (1982), thời gian phản ứng giữa 0,05 ml dịch trích enzyme (khoảng 25 μg protein) với chất nền (0,05% laminarin trong dung dịch 0,05M Na-acetate, pH 5,2) là 15 phút, ở 37°C. Độ quang truyền OD_{abs 540nm} của hỗn hợp phản ứng được xác định bằng Shimadzu UV-1800 Spectrophotometer. Dựa vào đường chuẩn glucose tiến hành xác định lượng glucose được phóng thích, hoạt tính β-1,3- glucanase được thể hiện bằng số đơn vị μM glucose min⁻¹mg⁻¹protein (1 đơn vị = μM glucose min⁻¹mg⁻¹protein).

Hoạt tính của chitinase được xác định dựa theo Kobayashi *et al.* (2000) thành phần tham gia phản ứng gồm 1 ml chất nền 0,05% glycol chitosan (Sigma) trong dung dịch 0,05M Na-acetate (pH 5,0), 0,5 ml dịch trích enzyme (khoảng 50 µg protein) và 2 ml chất phản ứng màu (0,05 g/l K₃Fe(CN)₆ trong 0,5M Na₂CO₃), ngưng phản ứng bằng cách đun cách thủy trong 15 phút, để nguội. Đo OD_{abs 420nm} và dựa trên đường chuẩn N-acetylglucosamine để xác định lượng sản phẩm tạo ra. Hoạt tính chitinase được thể hiện bằng số đơn vị µM N-acetylglucosamine giờ⁻¹mg⁻¹protein (1 đơn vị = µM N-acetyl glucosamine giờ⁻¹mg⁻¹protein).

Số liệu được tính toán và vẽ biểu đồ trên MS. Excel; phân tích ANOVA và so sánh sự khác biệt giữa các nghiệm thức nhờ chương trình MSTAT-C.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Đánh giá khả năng kích kháng thông qua biểu hiện của bệnh cháy lá lúa

Từ kết quả đánh giá sơ khởi theo phương pháp được mô tả bởi De Vleeschauwer *et al.*, (2008), xử lý áo hạt và lây bệnh nhân tạo một lần vào 12 NSKG, với 49 chủng vi khuẩn *Bacillus spp.*, cho thấy các chủng *Bacillus*-P4, -P7, -P29, -P35, -P42,

-P47, -P77, -P78, -P81, -P84 có khả năng kích kháng tốt được khảo sát lần hai.

3.1.1 Tỷ lệ diện tích lá nhiễm bệnh

Kết quả ở Bảng 1 cho thấy, tỷ lệ diện tích lá nhiễm bệnh (TLDTLNB) ở các nghiệm thức có xử lý vi khuẩn *Bacillus* và đối chứng dương CuCl₂ đều thấp hơn có ý nghĩa thống kê so với đối chứng âm (nước cất).

– Ở 3 NSKC, các nghiệm thức có xử lý đều có TLDTLNB thấp hơn và khác biệt có ý nghĩa so với đối chứng âm (0,79%). Trong đó, các nghiệm thức được xử lý với các vi khuẩn *Bacillus*-P77, -P78, -P81, -P84 và *B. amyloliquefaciens* có TLDTLNB thấp hơn các chủng vi khuẩn khác và tương đương với đối chứng dương CuCl₂ (0,06%).

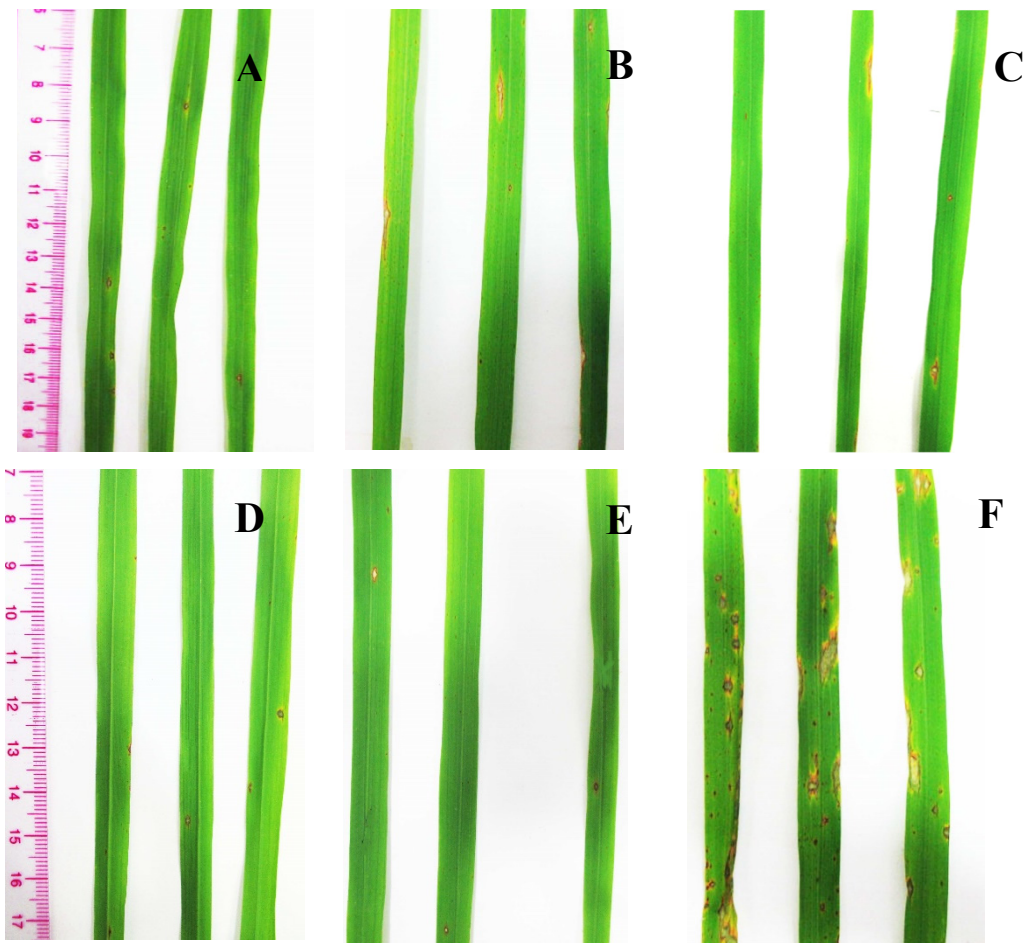
– Ở các thời điểm 5 và 7 NSKC, hầu hết các nghiệm thức đều có TLDTLNB tăng lên nhưng các nghiệm thức được xử lý với vi khuẩn *Bacillus* vẫn có TLDTLNB thấp hơn so với đối chứng âm (1,39%). Trong đó, các chủng *Bacillus*-P78, -P81, -P84 và *Bacillus amyloliquefaciens* tiếp tục có TLDTLNB thấp và tương đương với đối chứng dương CuCl₂ (0,11 - 0,17%).

Bảng 1: Tỷ lệ diện tích lá nhiễm bệnh (%) của các nghiệm thức qua các thời điểm

Nghiệm thức	Tỷ lệ diện tích lá nhiễm bệnh (%)			
	3NSKC	5NSKC	7NSKC	10NSKC
<i>Bacillus</i> -P4	0,19 ^{cd}	0,31 ^{bc}	0,93 ^b	1,32 ^c
<i>Bacillus</i> -P7	0,25 ^{bc}	0,35 ^{bc}	0,96 ^b	1,36 ^c
<i>Bacillus</i> -P29	0,11 ^e	0,18 ^{def}	0,35 ^{ef}	0,65 ^{de}
<i>Bacillus</i> -P35	0,17 ^d	0,23 ^{cde}	0,57 ^{cd}	1,40 ^c
<i>Bacillus</i> -P42	0,28 ^b	0,38 ^b	0,73 ^{bc}	2,86 ^b
<i>Bacillus</i> -P47	0,23 ^{bcd}	0,27 ^{bcd}	0,50 ^{de}	0,91 ^{cd}
<i>Bacillus</i> -P77	0,09 ^{ef}	0,13 ^f	0,30 ^{ef}	0,57 ^{de}
<i>Bacillus</i> -P78	0,09 ^{ef}	0,11 ^f	0,14 ^g	0,42 ^e
<i>Bacillus</i> -P81	0,09 ^{ef}	0,17 ^{ef}	0,27 ^{fg}	0,41 ^e
<i>Bacillus</i> -P84	0,09 ^{ef}	0,13 ^f	0,18 ^{fg}	0,38 ^e
<i>B. amyloliquefaciens</i>	0,09 ^{ef}	0,13 ^f	0,33 ^{ef}	0,57 ^{de}
CuCl ₂ (0,05mM)	0,06 ^f	0,11 ^f	0,17 ^{fg}	0,42 ^e
Đối chứng (-)	0,79 ^a	1,39 ^a	3,09 ^a	6,08 ^a
Mức ý nghĩa	**	**	**	**
CV (%)	16,37	16,51	17,90	19,95

Ghi chú: Các trung bình nghiệm thức trong bảng theo sau bởi một hay những chữ cái giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê trong phép thử Duncan với mức ý nghĩa 5%. Số liệu chuyển đổi sang \sqrt{x} khi phân tích thống kê. **: khác biệt 1%.

– NSKC: ngày sau khi chủng bệnh



Hình 1: Vết bệnh ở 10 NSKC ở các nghiệm thức có biểu hiện kích kháng so với đối chứng âm

Ghi chú: các nghiệm thức có xử lý kích kháng: A. $CuCl_2$, B. *Bacillus amyloliquesciens*, C. *Bacillus*-P78, D. *Bacillus*-P81, E. *Bacillus*-P84, và F. Đối Chứng âm

– Đến thời điểm 10 NSKC, các nghiệm thức vẫn duy trì được hiệu quả kích kháng, với TLDTLNB thấp hơn và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với đối chứng âm (6,08%). Trong đó, ba nghiệm thức xử lý với chủng *Bacillus*-P78, -P81 hoặc -P84 có TLDTLNB thấp (0,42%; 0,41%; 0,38%, theo thứ tự), tương đương nhau và không khác biệt ý nghĩa với đối chứng dương $CuCl_2$ (0,42%) (Hình 1).

Nhìn chung, qua các thời điểm khảo sát (Bảng 1), ba chủng vi khuẩn *Bacillus*-P78, -P81 và -P84 cho hiệu quả kích kháng tương đối ổn định hơn so với các chủng vi khuẩn còn lại. TLDTLNB tuy có

tăng theo thời gian nhưng luôn thấp hơn đối chứng âm và tương đương với đối chứng dương là $CuCl_2$.

3.1.2 Hiệu quả giảm bệnh so với đối chứng

Kết quả Bảng 2 cho thấy, các nghiệm thức được xử lý đều thể hiện tính kích kháng, với hiệu quả giảm bệnh (HQGB) cao hơn so với đối chứng âm (nước cất).

– Ở 3 NSKC, các nghiệm thức đều cho HQGB so với đối chứng >60%. Trong đó, nghiệm thức được xử lý với chủng *Bacillus*-P29, -P77, -P78, -P81, -P84 và *B. amyloliquesciens* có HQGB > 80% không khác biệt với đối chứng dương $CuCl_2$ (92,20%).

Bảng 2: Hiệu quả giảm bệnh so với đối chứng (%) của các nghiệm thức qua các thời điểm

Nghiệm thức	Hiệu quả giảm bệnh so với đối chứng (%)			
	3NSKC	5NSKC	7NSKC	10NSKC
<i>Bacillus</i> -P4	75,43 ^c	76,86 ^{cd}	67,75 ^c	77,36 ^c
<i>Bacillus</i> -P7	68,11 ^{cd}	74,56 ^{cd}	66,62 ^c	77,43 ^c
<i>Bacillus</i> -P29	85,09 ^{ab}	86,67 ^{ab}	87,62 ^{abc}	88,10 ^{ab}
<i>Bacillus</i> -P35	77,88 ^{bc}	82,63 ^{bc}	81,49 ^{cd}	75,95 ^c
<i>Bacillus</i> -P42	63,85 ^d	71,23 ^d	75,06 ^{de}	51,61 ^d
<i>Bacillus</i> -P47	70,54 ^{cd}	80,04 ^{bcd}	82,55 ^{bcd}	84,18 ^{bc}
<i>Bacillus</i> -P77	88,82 ^a	89,86 ^a	89,36 ^{abc}	90,14 ^{ab}
<i>Bacillus</i> -P78	87,19 ^a	91,79 ^a	94,97 ^a	92,86 ^{ab}
<i>Bacillus</i> -P81	89,36 ^a	87,83 ^{ab}	90,87 ^{ab}	92,82 ^{ab}
<i>Bacillus</i> -P84	87,51 ^a	91,16 ^a	93,67 ^a	93,74 ^a
<i>B. amyloliqueciens</i>	87,87 ^a	90,00 ^a	88,52 ^{abc}	90,24 ^{ab}
CuCl ₂ (0,05mM)	92,20 ^a	91,58 ^a	94,26 ^a	92,65 ^{ab}
Mức ý nghĩa	**	**	**	**
CV (%)	8,60	7,38	8,23	8,68

Ghi chú: Các trung bình nghiệm thức trong bảng theo sau bởi một hay những chữ cái giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê trong phép thử Duncan với mức ý nghĩa 5%. Số liệu chuyển đổi sang arsin \sqrt{x} khi phân tích thống kê.

** : khác biệt 1%

– Ở thời điểm 5 và 7 NSKC, hiệu quả giảm bệnh vẫn được duy trì ở hầu hết các nghiệm thức có xử lý kích kháng. Trong đó, các chủng *Bacillus*-P29, -P77, -P78, -P81, -P84 và *B. amyloliqueciens* cho HQGB cao trong khoảng 86,09 - 94,97%, tương đương đối chứng dương CuCl₂ (91,58 - 94,26%). HQGB đạt được trong nghiên cứu này tương tự như kết quả được báo cáo bởi Shan *et al.* (2013) khi xử lý vi khuẩn *Bacillus methylophilicus* BC79 với HQGB đạt được là 89,87%.

– Đến thời điểm 10 NSKC, các nghiệm thức được kích kháng có hiệu quả giảm bệnh so với đối chứng giảm nhưng vẫn cao hơn có ý nghĩa thống kê so với đối chứng. Trong đó, một số nghiệm thức xử lý với chủng *Bacillus*-P29, -P77, -P78, -P81, -P84 và *B. amyloliqueciens* được duy trì cao, với

hiệu quả giảm bệnh 88,10 - 93,74%, tương đương với đối chứng dương CuCl₂ (92,65%).

Nhìn chung, từ kết quả trình bày ở Bảng 2 có thể thấy cây lúa được xử lý bởi các chủng vi khuẩn *Bacillus* đều có hiệu quả giảm bệnh cao so với đối chứng ở các thời điểm khảo sát. Từ kết quả trên, bốn chủng *Bacillus*-P78, *Bacillus*-P81, *Bacillus*-P84, và *B. amyloliqueciens* được chọn cho khảo sát cơ chế sinh hóa có liên quan đến tính kích kháng.

3.2 Đánh giá khả năng kích kháng thông qua sự tăng hoạt tính của enzyme liên quan

3.2.1 Hoạt tính của enzyme β -1,3- glucanase

Kết quả được trình bày ở Bảng 3 cho thấy hoạt tính của β -1,3- glucanase biến động qua các thời điểm khảo sát, cao điểm được ghi nhận vào thời điểm 2 và 5 NSKC (Hình 2).

Bảng 3: Diễn biến hoạt tính β -1,3- glucanase trong cây lúa ở các nghiệm thức theo thời gian

Nghiệm thức	Hoạt tính β -1,3- glucanase (μ M glucose min ⁻¹ mg ⁻¹ protein) qua các thời điểm khảo sát (ngày sau khi chủng bệnh)							
	0	1	2	3	4	5	6	7
<i>Bacillus</i> -P78	1,01	1,04	2,39 ^a	1,29	1,03 ^b	1,94 ^{ab}	1,06	1,10
<i>Bacillus</i> -P81	1,18	1,49	2,33 ^a	1,24	1,77 ^{ab}	2,30 ^a	1,25	1,34
<i>Bacillus</i> -P84	1,28	1,27	2,49 ^a	1,14	1,85 ^{ab}	2,14 ^a	1,48	1,32
<i>B. amyloliqueciens</i> (+)	1,18	1,65	2,91 ^a	1,12	2,27 ^a	2,21 ^a	1,11	1,04
CuCl ₂ (+)	1,27	1,26	2,08 ^{ab}	1,08	1,96 ^a	1,78 ^{ab}	1,05	1,24
ĐC ⁰ không chủng	1,01	1,10	1,31 ^c	0,76	1,01 ^b	1,15 ^c	1,07	1,28
ĐC(-) chủng bệnh	1,06	1,25	1,53 ^{bc}	1,02	1,09 ^b	1,24 ^{bc}	1,26	1,10
Mức ý nghĩa	ns	ns	**	ns	*	*	ns	ns
CV (%)	8,28	12,99	10,52	10,22	13,89	11,91	13,00	10,76

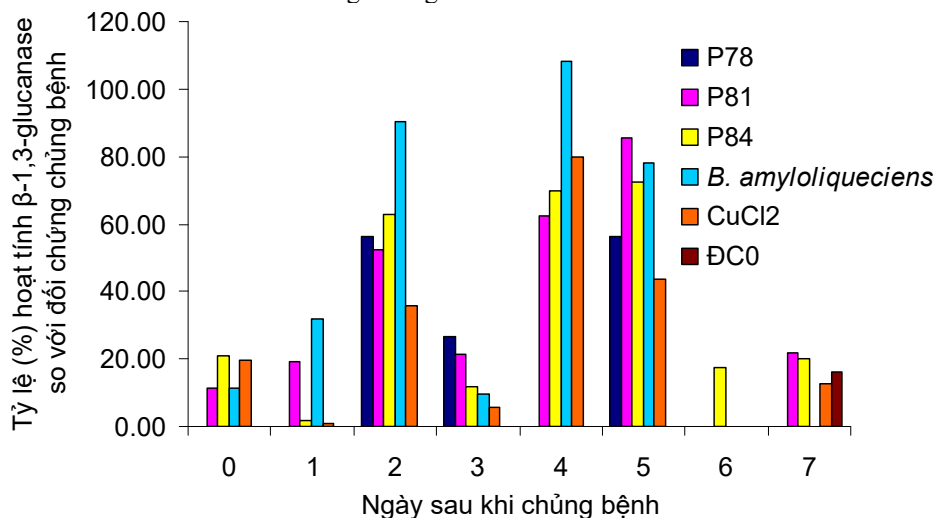
Ghi chú: Các trung bình nghiệm thức trong bảng theo sau bởi một hay những chữ cái giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê trong phép thử Duncan với mức ý nghĩa 5%, số liệu chuyển đổi sang \sqrt{x} khi phân tích thống kê. ** : khác biệt 1%, * : khác biệt 5%, ns: không khác biệt

Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các nghiệm thức được ghi nhận vào 3 thời điểm 2, 4 và 5 NSKC, trong đó ở thời điểm 2 NSKC cây lúa được xử lý với chủng vi khuẩn *Bacillus*-P78, -P81, -P84 và *B. amyloliqueiens* hoặc CuCl_2 đều có hoạt tính enzyme β -1,3- glucanase, cao hơn có ý nghĩa so với đối chứng không chủng bệnh và với đối chứng chủng bệnh, riêng nghiệm thức xử lý với CuCl_2 (+) có hoạt tính tương đương đối chứng không chủng bệnh.

Cây lúa được xử lý với chủng vi khuẩn *B. amyloliqueiens* có sự gia tăng hoạt tính của enzyme β -1,3- glucanase ở cả 3 thời điểm 2, 4 và 5 NSKC và đều cao hơn so với đối chứng chủng

bệnh hoặc đối chứng không chủng bệnh. Hoạt tính enzyme β -1,3- glucanase trong cây cao hơn đối chứng chủng bệnh gấp 1,9 lần (thời điểm 2 NSKC), gấp 2,08 lần (thời điểm 4 NSKC), gấp 1,78 lần (thời điểm 5 NSKC) và đều không khác biệt có ý nghĩa thống kê so với hoạt tính enzyme β -1,3- glucanase trong cây lúa được xử lý với CuCl_2 .

Cây lúa được xử lý với hai chủng vi khuẩn *Bacillus*-P81 hoặc *Bacillus*-P84 có sự gia tăng hoạt tính enzyme β -1,3- glucanase không khác biệt thống kê so với nghiệm thức đối chứng dương ở cả 3 thời điểm 2, 4 và 5 NSKC, nhưng cao hơn đối chứng không chủng bệnh và đối chứng chủng bệnh ở 2 thời điểm 2 và 5 NSKC.



Hình 2: Tỷ lệ gia tăng β -1,3- glucanase trong cây lúa của các nghiệm thức xử lý kích kháng so với đối chứng có chủng bệnh

Từ các kết quả trên có thể thấy, hoạt tính enzyme β -1,3- glucanase trong mô cây lúa khỏe (đối chứng không chủng bệnh) và cây lúa không được xử lý kích kháng có chủng bệnh thấp hơn so với trong mô của cây lúa có xử lý kích kháng ở một số thời điểm. Điều này chứng tỏ tác nhân xử lý có khả năng kích thích cây lúa tạo ra cơ chế bảo vệ của cây lúa để chống lại sự tấn công của nấm gây bệnh cháy lá.

3.2.2 Hoạt tính của enzyme chitinase

Kết quả trình bày ở Bảng 4 cho thấy, hoạt tính của enzyme chitinase trong cây lúa ở các nghiệm thức biến động qua các thời điểm 0 -7 NSKC, trong đó khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các nghiệm thức được ghi nhận vào 1, 2, 5, 7 NSKC.

Ở nghiệm thức đối chứng dương (cây lúa được xử lý với CuCl_2), sự gia tăng hoạt tính chitinase biểu hiện sớm từ thời điểm 1 NSKC (7,84 đơn vị hoạt tính), cao hơn 147,32% so với đối chứng chủng bệnh (3,17 đơn vị). Sau đó, hoạt tính

chitinase giảm dần nhưng vẫn duy trì ở mức cao và khác biệt so với đối chứng chủng bệnh ở các thời điểm 2 NSKC, 5 NSKC, 7 NSKC.

Ở cây lúa được xử lý với chủng vi khuẩn *B. amyloliqueiens* hoạt tính của chitinase gia tăng ở 3 thời điểm: 1 NSKC, 2 NSKC, 5 NSKC lần lượt là 6,38; 7,62 và 5,44 đơn vị hoạt tính, với tỷ lệ gia tăng hoạt tính với đối chứng lần lượt là 101,26%; 138,13%; 106,06%, và khác biệt có ý nghĩa so với đối chứng chủng bệnh. Trong đó, thời điểm 2 NSKC cho hoạt tính enzyme chitinase cao nhất, đạt 2,38 lần hơn so với đối chứng chủng bệnh.

Cây lúa được xử lý với chủng vi khuẩn *Bacillus*-P84 có hoạt tính enzyme chitinase ở thời điểm 2 NSKC cao hơn so với đối chứng chủng bệnh 109,06%, đạt 6,69 đơn vị hoạt tính so với đối chứng chủng bệnh là 3,20 đơn vị hoạt tính và đối chứng không chủng bệnh là 2,98 đơn vị hoạt tính. Đến thời điểm 5 NSKC, hoạt tính enzyme đạt 6,20 đơn vị, với tỷ lệ gia tăng hoạt tính so với đối chứng là 134,85%, và khác biệt có ý nghĩa ở mức 5% so

với đối chứng chung bệnh (2,64 đơn vị) và đối chứng không chung bệnh (2,59 đơn vị).

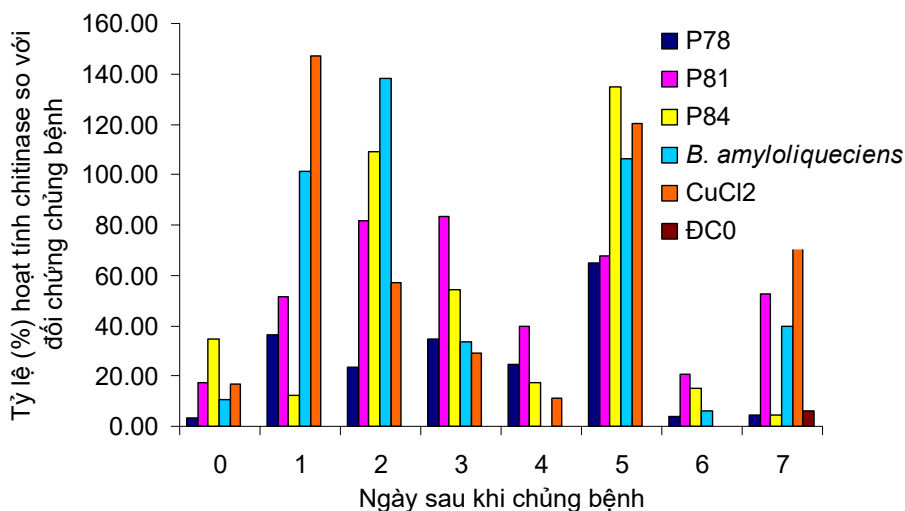
– Cây lúa được xử lý với chủng vi khuẩn *Bacillus*-P81 có hoạt tính enzyme chitinase ở thời điểm 2 NSKC cao hơn đối chứng chung bệnh

81,56%, đạt 5,81 μM N-acetylglucosamine $\text{giờ}^{-1} \text{mg}^{-1}$ protein so với đối chứng chung bệnh là 3,20 μM N-acetylglucosamine $\text{giờ}^{-1} \text{mg}^{-1}$ protein.

Bảng 4: Diễn biến hoạt tính chitinase trong cây lúa ở các nghiệm thức theo thời gian

Nghiệm thức	Hoạt tính chitinase (μM N-acetyl glucosamine $\text{giờ}^{-1} \text{mg}^{-1}$ protein) trong cây lúa qua các thời điểm (ngày sau khi chung bệnh)							
	0	1	2	3	4	5	6	7
<i>Bacillus</i> -P78	2,72	4,33 ^{cd}	3,95 ^{cd}	5,36	4,04	4,36 ^{ab}	3,25	2,46 ^b
<i>Bacillus</i> -P81	3,09	4,80 ^{bc}	5,81 ^{ab}	7,29	4,53	4,42 ^{ab}	3,76	3,58 ^{ab}
<i>Bacillus</i> -P84	3,54	3,56 ^{cd}	6,69 ^{ab}	6,13	3,81	6,20 ^a	3,59	2,46 ^b
<i>B. amyloliqueciens</i> (+)	2,91	6,38 ^{ab}	7,62 ^a	5,32	3,09	5,44 ^a	3,31	3,28 ^{ab}
CuCl_2 (+)	3,07	7,84 ^a	5,03 ^{bc}	5,13	3,61	5,81 ^a	2,79	4,11 ^a
ĐC ⁰ không chung	2,49	2,88 ^d	2,98 ^d	3,12	3,07	2,59 ^b	2,72	2,50 ^b
ĐC(-) chung bệnh	2,63	3,17 ^{cd}	3,20 ^d	3,98	3,24	2,64 ^b	3,12	2,35 ^b
Mức ý nghĩa	ns	**	**	ns	ns	*	ns	*
CV (%)	14,63	10,63	9,13	17,91	16,50	17,32	16,61	10,69

Ghi chú: Các trung bình nghiệm thức trong bảng theo sau bởi một hay những chữ cái giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê trong phép thử Duncan với mức ý nghĩa 5%, số liệu chuyển đổi sang \sqrt{x} khi phân tích thống kê. **: khác biệt 1%, *: khác biệt 5%, ns: không khác biệt.



Hình 3: Tỷ lệ gia tăng hoạt tính chitinase trong cây lúa của các nghiệm thức xử lý kích kháng so với đối chứng có chung bệnh

Như vậy, khi được xử lý với các chủng vi khuẩn *Bacillus*-P81, -P84, *B. amyloliqueciens* hoặc CuCl_2 trong cây lúa có sự gia tăng hoạt tính của enzyme chitinase, cao hơn so với ở đối chứng âm chung bệnh và với đối chứng không chung bệnh ở 1 số thời điểm. Các kết quả trên cũng cho thấy hoạt tính của enzyme chitinase biểu hiện sớm hơn và kéo dài hơn so với của enzyme β -1,3- glucanase. Chitin và β -glucan là thành phần cấu tạo chủ yếu của vách tế bào nấm như *P. oryzae*, sự gia tăng hoạt tính của các enzyme chitinases và β -1,3- glucanase trong cây ngoài tác động trực tiếp là làm ngăn cản sự phát triển của nấm bệnh, thì còn có thể

tạo các phân mảnh glucan và chitin, qua đó kích thích tính kháng lưu dẫn và cây có biểu hiện kích kháng (Fesel and Zuccaro, 2016).

Trong nghiên cứu này, vi khuẩn xử lý và nấm gây bệnh được giữ không cho tiếp xúc nhau để tránh tác động đối kháng trực tiếp, vì vậy hiệu quả giảm bệnh so với đối chứng không xử lý của các nghiệm thức xử lý với *Bacillus*-P81, -P84, *B. amyloliqueciens* và CuCl_2 (Bảng 1 và Bảng 2), có thể do các tác nhân xử lý này đã kích thích được cơ chế kháng của cây lúa, biểu hiện qua sự gia tăng hoạt tính của các enzyme β -1,3- glucanase và

chitinase, nhờ đó chống lại được sự tấn công của nấm bệnh.

Khả năng kích thích tính kháng ISR của nhiều chủng vi khuẩn *Bacillus* (*B. amyloliquifaciens*, *B. subtilis*, *B. pasteurii*, *B. cereus*, *B. pumilus*, *B. mycooides*, *B. sphaericus*) đã được chứng minh qua các kết quả nghiên cứu, trên nhiều loại cây trồng (cà chua, ớt, dưa hấu,...) đối với các bệnh trên lá do nấm, vi khuẩn (Choudhary and Johri, 2009). ISR thường được điều hòa theo cơ chế độc lập với salicylic acid (SA), tuy nhiên nhiều PGPR như *Paenibacillus alvei* K165, *P. fluorescens* SS101 cũng được báo cáo là có khả năng kích kháng ISR phụ thuộc SA, tương tự như dạng kích kháng lưu dẫn SAR với sự hoạt hóa các PR-gene (Pieterse *et al.*, 2014), tuy nhiên chưa có nhiều nghiên cứu về các cơ chế có liên quan, nhất là trên cây lúa. Sự gia tăng hoạt tính của β -1,3- glucanase và chitinase ở cây có kích kháng đã được ghi nhận trên các loại cây trồng khác nhau. Trên cây củ cải đường, ISR do *B. mycooides* Bac J, và *B. pumilus* 203-6 và 203-7 được chứng minh có liên quan đến sự gia tăng hoạt tính của enzyme peroxidase, chitinase và β -1,3-glucanase, tương ứng (Choudhary and Johri, 2009). ISR do xử lý với chủng vi khuẩn *Pseudomonas azotoformans* GC-B19 hoặc *Paenibacillus elgii* MM-B22, đi cùng với sự tích tụ enzyme β -1,3-glucanase, chitinase, peroxidase (Sang *et al.*, 2014).

Tùy theo tác nhân kích kháng mà biểu hiện hoạt tính của β -1,3- glucanase và chitinase trong cây kích kháng khác nhau về thời điểm biểu hiện và mức độ gia tăng. Trên lúa, Wang *et al.* (2007) ghi nhận 24 giờ là thời gian cần thiết để *P. oryzae* cảm ứng tính kháng và 48 giờ cần cho hoạt hóa phản ứng phòng vệ của cây chủ. Hoạt tính chitinase và β -1,3- glucanase biểu hiện vào 5 NSKC khi được kích thích bởi vi sinh vật (Dann *et al.*, 1996). Trong nghiên cứu này, sự gia tăng của các enzyme β -1,3- glucanase và chitinase trong cây lúa có biểu hiện kích kháng có liên quan đến hiệu quả của các chủng *Bacillus* hoặc CuCl_2 , qua đó giúp giảm sự lây lan diện tích vết bệnh, TLDTLNB thấp hơn và hiệu quả giảm bệnh cao so với đối chứng chủng bệnh. Kích thích tính kháng lưu dẫn đạt được trong thí nghiệm này có liên quan đến kết quả của tác động riêng lẻ hoặc phối hợp của enzyme β -1,3- glucanase và chitinase.

4 KẾT LUẬN

Các chủng vi khuẩn *Bacillus*-P78, -P81, -P84, *B. amyloliquifaciens* có khả năng kích kháng cây lúa ở giai đoạn sinh trưởng sinh dưỡng chống lại bệnh cháy lá do nấm *P.oryzae* gây ra.

Có sự gia tăng hoạt tính các enzyme β -1,3- glucanase và chitinase trong cây lúa được kích kháng, và sự gia tăng hoạt tính các enzyme này trong cây lúa có liên quan đến khả năng kích kháng chống lại bệnh cháy lá của các chủng *Bacillus* này

LỜI CẢM ƠN

Các tác giả chân thành cảm ơn Sở Khoa học và Công nghệ tỉnh Hậu Giang đã hỗ trợ kinh phí cho thực hiện công trình nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Alabouvette C. and C. Steinberg, 2006. The soil as a reservoir for antagonists to plant diseases. In: Eilenberg J. and H.M.T. Hokkanen (eds.) An ecological and societal approach to biological control, Springer, the Netherlands, pp: 123-144.
- Atlas, R.M., 2010. Handbook of microbiological media, Fourth Edition. CRC Press. 2040 pp.
- Borriss R., 2015. *Bacillus*, A plant-beneficial bacterium. In: Lugtenberg B. (Ed.), Principles of plant-microbe interactions, Springer International Publishing Switzerland, pp: 379- 391.
- Braford, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for quantiation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein- dye binding. Analytical Biochemistry 72: 248-254.
- Cawoy, H., W. Bettli, P. Fickers and M. Ongena, 2011. *Bacillus*-Based biological control of plant disease. In: Stoytch M. (Ed), Pesticides in the modern world – pesticides use and management. Intech, Rijeka, 273-302.
- Choudhary D.K. and B.N. Johri, 2009. Interactions of *Bacillus* spp. and plants – With special reference to induced systemic resistance (ISR). Microbiological Research 164 (5): 493-513
- Chung E. J., M.T. Hossain, A. Khan, K.H. Kim, C.O. Jeon, Y.R. Chung, 2015. *Bacillus oryzicola* sp. nov., an endophytic bacterium isolated from the roots of rice with antimicrobial, plant growth promoting, and systemic resistance inducing activities in rice. The Plant Pathology Journal 31(2): 152-164.
- Dann E.K., P. Meuwly, J.P. Métraux and B.J. Deverall, 1996. The effect of pathogen inoculation or chemical treatment on activities of chitinase and β -1,3- glucanase and accumulation of salicylic acid in leaves of green bean, *Phaseolus vulgaris* L.. Physiol. Mol. Plant Pathology 49: 307-319.
- De Vleeschauwer D., M. Djavaheeri, P.A. Bakker, M. Höfte, 2008. *Pseudomonas fluorescens* WCS374r-induced systemic resistance in rice against *Magnaporthe oryzae* is based on pseudobactin-mediated priming for a salicylic acid-repressible multifaceted defense response. Plant Physiol. 148 (4): 1996-2012.

- Fesel P.H. and A. Zuccaro, 2016. β -glucan: crucial component of the fungal cell wall and elusive MAMP in plants. *Fungal Genetics and Biology* 90: 53–60.
- Isaac S. and A.V. Gokhale, 1982. Autolysis: a tool for protoplast production from *Aspergillus nidulans*. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 78: 389-394.
- Kloepper JW, Ryu C-M, Zhang SA. 2004. Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology* 94 (11):1259–66
- Kobayshi, K., M. Fukuda, D. Igarashi, M. Sunaoshi, 2000. Cytokinin-binding proteins from tobacco callus share homology with osmotin-like protein and an endochitinase. *Plant Cell Physiol* 41(2): 148-157.
- Nguyễn Ngọc Đệ, 2008. Giáo trình cây lúa. Nhà xuất bản Đại học Quốc gia TP. Hồ Chí Minh. 338 trang.
- Phạm Văn Kim, E. de Neergaard, H.J.L. Joergensen, H.S. Shetty và V. Smedegaard-Peterson, 2004. Ứng dụng nguyên lý kích thích tính kháng bệnh lưu dẫn như biện pháp sinh học đối với bệnh cháy lá lúa *Pyricularia grisea* tại Đồng bằng sông Cửu Long. Trong: Hội nghị kích thích tính kháng bệnh lưu dẫn trên lúa, ngày 30/6/2004, trường đại học Cần thơ. Nhà xuất bản Nông nghiệp, trang 3-7.
- Pieterse C.M., C. Zamioudis, R.L. Berendsen, D.M. Weller, S.C. Van Wees, P.A. Bakker, 2014. Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annu Rev Phytopathol.* 52: 347-75. doi: 10.1146/annurev-phyto-082712-102340.
- Pinnschmidt H., P.S. Teng, J.M. Bonman and J. Kranz, 1993. A new assessment key for leaf blast. *I.R.R.N.* 18 (1): 45-46.
- Ramamoorthy V., R. Viswanthan, T. Raguchander, V. Prakasam, R. Samiyappan, 2001. Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pest and diseases. *Crop Protection* 20: 1–11.
- Roberts M.R. and J.E. Taylor, 2016. Exploiting plant induced resistance as a route_ to sustainable crop protection. In: Collinge D.B. (Ed.) *Plant pathogen resistance biotechnology*, 1st Edition. John Wiley & Sons, Inc., pp: 319-339.
- Sang M.K., E.N. Kim, G.D. Han, M.S. Kwack, Y.C. Jeun and K.D. Kim, 2014. Priming mediated systemic resistance in cucumber induced by *Pseudomonas azotoformans* GC-B19 and *Paenibacillus elgii* MM-B22 against *Colletotrichum orbiculare*. *Phytopathology* 104:834–842
- Suryadi Y, D.N. Susilowati, E. Riana and N.R. Mubarik, 2013. Management of rice blast disease (*Pyricularia oryzae*) using formulated bacterial consortium. *Emirates Journal of Food and Agriculture* 25 (5): 349-357. doi: 10.9755/ejfa.v25i5.12564.
- Trần Thị Thu Thủy, Nguyễn Thị Lùng và H.J.L. Joergensen, 2015. Khảo sát khả năng kích kháng bệnh cháy lá lúa do nấm *Pyricularia grisea* (Cooke) Sacc. của dịch trích thực vật trên khía cạnh sinh học và mô học. *Tạp chí khoa học Trường Đại học Cần Thơ* 36: 57-62.
- Trần Thị Thu Thủy, Phạm Văn Kim, H.J.L. Joergensen và E. de. Neergaard, 2004. Nghiên cứu khả năng kích kháng lưu dẫn của một số hóa chất đối với bệnh cháy lá lúa *Pyricularia grisea* (Cooke) Sacc. trên khía cạnh mô học. Trong: Hội nghị kích thích tính kháng bệnh lưu dẫn trên lúa, ngày 30/6/2004, trường đại học Cần Thơ. Nhà xuất bản Nông nghiệp, trang 41-50.
- Trần Vũ Phấn, 2010. Hiệu quả và cơ chế sinh hóa học của tính kháng lưu dẫn do tác nhân sinh học chống lại bệnh đạo ôn trên lúa (*Pyricularia oryzae* Cavara). Luận án tiến sĩ. Trường đại học Cần Thơ. 149 trang.
- Van Loon, L.C., P.A.H.M. Bakker and C.M.J. Pieterse, 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review of Phytopathology* 36: 453-483.
- Wang, Z., Y. Jia, H. Lin, A. Iintern, N. Valent and J.N. Rutger, 2007. Host active defense responses occur within 24 hours after pathogen inoculation in the rice blast system. *Rice Science* 14 (4): 302-310.