

Antifungal efficacy of some biological and chemical antagonists to *Alternaria alternata* causing leaf spot disease on aloe vera under *in vitro* and nethouse conditions

Tran Thi Quy, Ho Thi Cam Nguyen, Nguyen Thi Nha

Abstract

Leaf spots caused by *Alternaria alternata* is a common disease on *Aloe vera* in production areas in Ninh Thuan province, seriously affecting quality and yield, leading to reduce economic value of this crop. Biological antagonists (*Trichoderma viride*, *Chaetomium cupreum*, *Bacillus subtilis*) and chemical fungicides (Diniconazole, Metalaxyl M + Mancozeb, Mancozeb + Cymoxanil) were used to test the antifungal efficacy to *Alternaria alternata* under *in vitro* and nethouse conditions. The results showed that, *Trichoderma viride* and *Chaetomium cupreum* completely inhibited the growth of mycelium *Alternaria alternata* after 7 days of culture *in vitro* and in greenhouse conditions, the control efficiency was 60.52% and 42.17%, respectively; *Bacillus subtilis* had poor antifungal activity against *Alternaria alternata* both in *in vitro* and in nethouses. Diniconazole and the mixture of Metalaxyl M + Mancozeb both strongly inhibited mycelial growth on culture medium; similarly, in nethouse conditions, they also gave high inhibition efficacy, reaching 79.51% and 67.05% respectively after 14 days of treatment. In contrast, the mixture of Mancozeb and Cymoxanil showed low antifungal efficacy both under *in vitro* and under nethouse conditions.

Keywords: Aloe vera, leaf spot, *Alternaria alternata*, biological antifungal, chemical fungicides

Ngày nhận bài: 12/02/2022

Ngày phản biện: 07/3/2022

Người phản biện: PGS.TS. Nguyễn Văn Viết

Ngày duyệt đăng: 30/3/2022

KHẢ NĂNG ĐỐI KHÁNG NẤM *Botrytis aclada* HTDL PHÂN LẬP TỪ MẪU BỆNH THỐI XÁM CỦ HÀNH TÂY CỦA VI KHUẨN *Bacillus stercoris* PU10100 VÀ *Bacillus siamensis* PU10103

Võ Hoài Hiếu¹, Nguyễn Thị Tâm², Đinh Thị Ngọc Mai³, Trần Hồng Ba⁴,
Lê Vinh Hoa⁴, Nguyễn Kim Nữ Thảo⁵, Nguyễn Hồng Minh^{3*}

TÓM TẮT

Nghiên cứu nhằm xác định khả năng đối kháng của hai chủng vi khuẩn *Bacillus stercoris* PU10100 và *Bacillus siamensis* PU10103 (đang lưu giữ tại Trung tâm Nghiên cứu nguồn gen, Trường Đại học Phenikaa) đối với chủng nấm *Botrytis aclada* HTDL gây bệnh thối xám củ hành. Kết quả nghiên cứu cho thấy các chủng *Bacillus* nghiên cứu có khả năng tổng hợp enzyme protease, chitinase, cellulase và dịch tiết ngoại bào. Tỷ lệ ức chế sinh trưởng nấm *B. aclada* của chủng PU10100 và PU10103 đạt $71,43 \pm 4,07\%$ và $76,81 \pm 2,71\%$, tương ứng. Nghiên cứu khả năng ức chế sự nảy mầm bào tử và phát triển hệ sợi nấm *B. aclada* HTDL của chủng vi khuẩn xác định, tỷ lệ ức chế sự phát triển hệ sợi và nảy mầm bào tử nấm đạt 100% và $50,17 \pm 1,53\%$ đối với chủng *B. stercoris* PU10100; $47,88 \pm 0,88\%$ và $51,33 \pm 2,08\%$ đối với chủng *B. siamensis* PU10103.

Từ khóa: Bệnh thối xám hành tây, *Botrytis aclada*, *Bacillus siamensis*, *Bacillus stercoris*, khả năng đối kháng

¹ Trung tâm Thí Nghiệm-Thực hành, Trường Đại học Yersin Đà Lạt

² Khoa Sinh học-Môi trường, Trường Đại học Yersin Đà Lạt

³ Trung tâm Nghiên cứu Nguồn gen, Trường Đại học Phenikaa

⁴ Khoa Vi sinh và Biến đổi gen, Viện Kiểm nghiệm An toàn vệ sinh thực phẩm Quốc gia

⁵ Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

* Tác giả liên hệ: E-mail: minh.nguyenhong@phenikaa-uni.edu.vn

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Hành tây (*Allium cepa* L.) là một trong những loại nông sản được trồng tại Lâm Đồng với diện tích lên đến 102 hecta trong năm 2021 thuộc loại thực vật một lá mầm sống lâu năm hoặc hai năm thuộc họ *Liliaceae* với khoảng 3.700 loài (Stajner and Varga, 2003), được sử dụng trực tiếp hay thông qua các phương pháp chế biến hàng ngày để làm giá tăng hương vị món ăn. Điều kiện khí hậu ẩm ướt tạo điều kiện cho nhiều loại nấm bệnh sinh trưởng, phát triển và gây ra thiệt hại lớn trong sản xuất củ hành tây (Körner and Holst, 2005). Trong đó, một số loài nấm thuộc họ *Sclerotiniaceae* là các tác nhân gây bệnh phổ biến trên hành. *Botrytis squamosa* gây hiện tượng cháy lá hành; *Botrytis aclada*, *Botrytis byssoidea* và *Botrytis allii* gây thối xám; *Sclerotium cepivorum* gây thối trắng củ hành (Steentjes *et al.*, 2021).

Trong nhiều năm, việc sử dụng các loại hóa chất bảo vệ thực vật để phòng trừ bệnh hại cây trồng đóng vai trò quan trọng trong hoạt động sản xuất nông nghiệp. Tuy nhiên, việc lạm dụng chúng đã làm tăng khả năng kháng thuốc của mầm bệnh, đe dọa đến các vi sinh vật có lợi, phá hủy hệ sinh thái nông nghiệp và ảnh hưởng đến sức khỏe con người (Zhou *et al.*, 2020). Để đảm bảo các hoạt động sản xuất nông nghiệp diễn ra một cách bền vững và duy trì cân bằng hệ sinh thái, các biện pháp kiểm soát sinh học sử dụng các chủng vi khuẩn có lợi được xem là một phần không thể thiếu trong nông nghiệp hiện đại (Ku *et al.*, 2021). Thông qua các cơ chế kiểm soát nấm bệnh như tổng hợp chất kháng sinh, enzyme, các hợp chất hữu cơ dễ bay hơi, cạnh tranh dinh dưỡng và không gian sống cũng như khả năng hình thành nha bào, có thể chống chọi với điều kiện khắc nghiệt của thời tiết mà các loài vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* đang rất được quan tâm nghiên cứu (Roca-Couso *et al.*, 2021). Trong bài báo này, khả năng kiểm soát nấm *Botrytis aclada* phân lập từ mẫu bệnh thối xám củ hành của hai chủng vi khuẩn *Bacillus stercoris* PU10100 và *Bacillus siamensis* PU10103 trong bộ sưu tập giống của Trung tâm Nghiên cứu nguồn gen, Trường Đại học Phenikaa được nghiên cứu.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Vật liệu sử dụng trong nghiên cứu gồm mẫu bệnh thối xám củ hành tây trồng tại các ruộng trên địa bàn

thành phố Đà Lạt và 2 chủng vi khuẩn *B. stercoris* PU10100, *B. siamensis* PU10103 do Trung tâm Nghiên cứu nguồn gen, trường Đại học Phenikaa cung cấp, trong đó 2 chủng *Bacillus* được nuôi cấy trên thạch nghiêng chứa môi trường LB (g/L: cao nấm men - 5, pepton - 10, NaCl - 10, agar - 15) ở 37°C trong thời gian 24 giờ và lưu giữ ở -80°C.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phân lập và định danh nấm gây bệnh thối xám củ hành

Củ hành tây xuất hiện vết bệnh được xử lý bằng dung dịch NaClO 1% để loại bỏ các tế bào vi khuẩn sinh dưỡng bám trên bề mặt. Một phần củ hành chứa vết bệnh được chuyển vào môi trường thạch PDA (Himedia) có bổ sung kháng sinh chloramphenicol 100 mg/L và ủ ở 25°C trong 3 - 5 ngày cho đến khi xuất hiện hệ sợi nấm. Mẫu nấm HTDL tiếp tục được cấy chuyển nhiều lần trên môi trường thạch PDA cho đến khi thu được chủng nấm thuần khiết. Tiến hành quan sát bằng mắt thường và kính hiển vi quang học để đánh giá độ đồng nhất về màu sắc, hình thái khuẩn lạc, hình thái sợi nấm và bào tử nấm.

Sau khi làm thuần và xác định hình thái, DNA của chủng nấm được tách chiết và đoạn gen ITS được khuếch đại bằng cặp mồi ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') và ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC3'). Sản phẩm PCR sau khi được kiểm tra trên gel 1% agarose được tinh sạch bằng PCR Purification Kit (Bioneer, Hàn Quốc) và đọc trình tự. Trình tự của đoạn gen ITS được sử dụng để tìm loài gần gũi nhất bằng công cụ blast lên hệ thống NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Chủng nấm sau đó được đánh giá khả năng gây bệnh trên củ hành dựa theo phương pháp được mô tả bởi Presly (1985). Thỏi thạch nấm (Φ 6 mm) được đặt vào phần mô cổ của hành bằng cách cắt bỏ phần ngọn của củ hành không bị tổn thương. Các củ hành tây được lưu giữ ở 25°C trong 3 tuần để quan sát biểu hiện bệnh. Những củ hành xuất hiện biểu hiện bệnh giống với mẫu ban đầu được mang đi phân lập, định danh bằng hình thái và sinh học phân tử.

2.2.2. Xác định hoạt tính enzyme của chủng vi khuẩn *Bacillus stercoris* PU10100 và *Bacillus siamensis* PU10103

Hoạt tính cellulase, protease của hai chủng vi khuẩn *Bacillus stercoris* PU10100 và *Bacillus siamensis* PU10103 được xác định bằng cách nuôi cấy chủng trên môi trường thạch nước bổ sung 1% CMC và sữa gầy. Sau 24 giờ ủ ở 37°C, đĩa nuôi cấy được nhuộm với congo đỏ để xác định hoạt tính cellulase và đo vòng phân giải đối với hoạt tính protease (Chen *et al.*, 2019). Hoạt tính chitinase được xác định theo mô tả của Saima và cộng tác viên (2013) đã được cải tiến bằng cách cấy ria hai chủng vi khuẩn lên môi trường chitin agar (g/L: MgSO₄·7H₂O - 0,3; (NH₄)₂SO₄ - 3; KH₂PO₄ - 1; Citric acid - 1; Tween 80 - 200 µL; Colloidal chitin - 4,5; Bromocresol purple - 0,15; Agar - 15; pH 4,7). Sau 3 ngày nuôi cấy ở 37°C, chủng vi khuẩn có khả năng sinh enzyme chitinase khi làm đổi màu môi trường nuôi cấy sang tím.

2.2.3. Xác định khả năng đối kháng nấm *Botrytis aclada* HTDL của dịch tiết ngoại bào của chủng vi khuẩn PU10100 và PU10103

Hoạt tính ức chế sinh trưởng và phát triển nấm *Botrytis aclada* HTDL của hai chủng vi khuẩn *Bacillus stercoris* PU10100 và *Bacillus siamensis* PU10103 được xác định bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch theo mô tả của Pretorius và cộng tác viên (2015) đã được cải tiến. Thỏi thạch nấm *Botrytis aclada* HTDL (Φ 6 mm) được đặt ở tâm đĩa petri chứa môi trường PDA. 50 µL dịch nuôi cấy đã loại bỏ tế bào của hai chủng vi khuẩn được nhỏ vào các giếng cách khoanh nấm 2,5 cm và ủ đĩa ở 25 ± 2°C trong 5 ngày. Tỷ lệ kháng của các chủng vi khuẩn đối với nấm được tính theo công thức: $S = (R - r)/R \times 100\%$. Trong đó, S: Phần trăm ức chế, R: bán kính khuẩn lạc nấm ở phía đối diện với giếng nhỏ dịch nuôi cấy, r: bán kính khuẩn lạc nấm ở phía giếng nhỏ dịch vi khuẩn.

2.2.4. Xác định khả năng ức chế nảy mầm bào tử nấm *Botrytis aclada* HTDL của hai chủng PU10100 và PU10103

Chuẩn bị dịch bào tử nấm: Bào tử nấm *B. aclada* HTDL được thu nhận bằng cách bổ sung 5 mL nước cất vô trùng chứa 0,05% Tween 80 vào đĩa PDA chứa nấm *B. aclada* HTDL đã được nuôi cấy 7 ngày ở 25°C. Hỗn hợp dịch bào tử sau đó được lọc qua lớp bông thấm nước vô trùng để loại bỏ sợi nấm và điều chỉnh về mật độ 10⁴ bào tử/mL.

Chuẩn bị dịch vi khuẩn: Hai chủng vi khuẩn *B. stercoris* PU10100 và *B. siamensis* PU10103 được

nuôi cấy trên môi trường LB, lắc 160 rpm, 24 giờ ở 37°C. Dịch vi khuẩn được điều chỉnh về mật độ 10⁶ tế bào/mL.

Hai mươi µL dịch vi khuẩn được trải đều trên môi trường LB thạch và 20 µL dịch bào tử nấm được trải đều trên đĩa môi trường PDA. Đáy của đĩa petri chứa vi khuẩn được đặt phía dưới và đáy của đĩa petri chứa bào tử nấm được úp lên trên. Đáy của hai đĩa petri được dán kín bằng parafilm và ủ ở 25°C. Mẫu đối chứng dùng 20 µL nước cất vô trùng thay cho 20 µL dịch vi khuẩn. Ảnh hưởng của hợp chất bay hơi được sản xuất bởi hai chủng *Bacillus stercoris* PU10100 và *Bacillus siamensis* PU10103 lên tỷ lệ nảy mầm của bào tử nấm được xác định sau 8 giờ bằng cách quan sát dưới kính hiển vi quang học. Chiều dài của ống mầm vượt quá một nửa đường kính tối đa của bào tử được coi là tiêu chuẩn nảy mầm của bào tử. Tỷ lệ nảy mầm được tính theo công thức $R(\%) = n/t \times 100\%$, trong đó R là tỷ lệ nảy mầm của bào tử nấm, n là số lượng bào tử đã nảy mầm, t là tổng số bào tử (Zhao *et al.*, 2019).

2.2.5. Xác định khả năng ức chế phát triển sợi nấm *Botrytis aclada* HTDL của hai chủng PU10100 và PU10103

Trong thí nghiệm xác định ảnh hưởng của hợp chất bay hơi được sản xuất bởi hai chủng PU10100 và PU10103 lên sự phát triển của hệ sợi nấm *Botrytis aclada* HTDL, đáy đĩa petri chứa bào tử nấm được thay thế bằng đáy đĩa petri chứa một khoanh nấm đường kính 6 mm. Sau 5 ngày ủ đĩa ở 25°C, đường kính của hệ sợi nấm được đo ở đĩa thí nghiệm và đĩa đối chứng. Phần trăm ức chế sự phát triển của hệ sợi nấm được tính theo công thức:

$$R(\%) = \frac{D_1 - D_2}{D_1 - D_0} \times 100$$

Trong đó: D₁ là đường kính hệ sợi nấm (mm) mẫu đối chứng; D₂ là đường kính hệ sợi nấm của mẫu thí nghiệm bao gồm cả kích thước của khoanh nấm (mm); và D₀ là đường kính khoanh nấm ban đầu (6 mm) (Gao *et al.*, 2018).

2.2.6. Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu được xử lý bằng phần mềm Excel. Các nghiệm thức được lặp lại ba lần để tính giá trị trung bình, độ lệch chuẩn. Sự khác biệt có ý nghĩa giữa các mẫu thí nghiệm được xác định bằng phương pháp thống kê ANOVA. Giá trị p < 0,05 được xem là sai khác có ý nghĩa.

2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

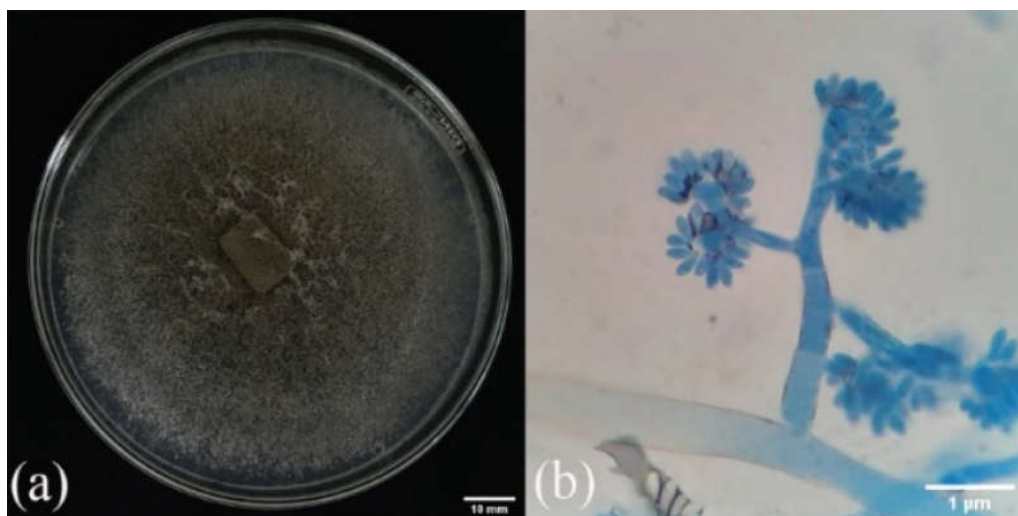
Nghiên cứu được thực hiện từ tháng 02/2021 đến tháng 01/2022 tại Trung tâm Nghiên cứu nguồn gen, trường Đại học Phenikaa.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân lập, định danh nấm gây bệnh thối xám củ hành

Sau 7 ngày nuôi cấy trên môi trường thạch PDA, hệ sợi nấm *Botrytis* sp. HTDL mọc lan ra hết toàn

bộ đĩa. Khuẩn lạc nấm có màu xám và các khuẩn ty khí sinh phát triển tập trung ở khu vực gần tâm (Hình 1a). Khi quan sát dưới kính hiển vi quang học ở độ phóng đại 1.000 lần, hệ sợi nấm có vách ngăn, cuống bào tử rời phân nhánh ở đỉnh được phát sinh từ sợi nấm hoặc hạch nấm, bào tử nấm hình bầu dục đến hơi dài được đính thành từng chùm (Hình 1b). Hình thái chủng nấm *Botrytis* sp. HTDL phù hợp với hình thái của nấm thuộc chi *Botrytis* theo khóa phân loại được mô tả bởi (Chilvers and du Toit, 2006).



Hình 1. Hình thái khuẩn lạc (a) và hình thái tế bào (b) của nấm *Botrytis* sp. HTDL

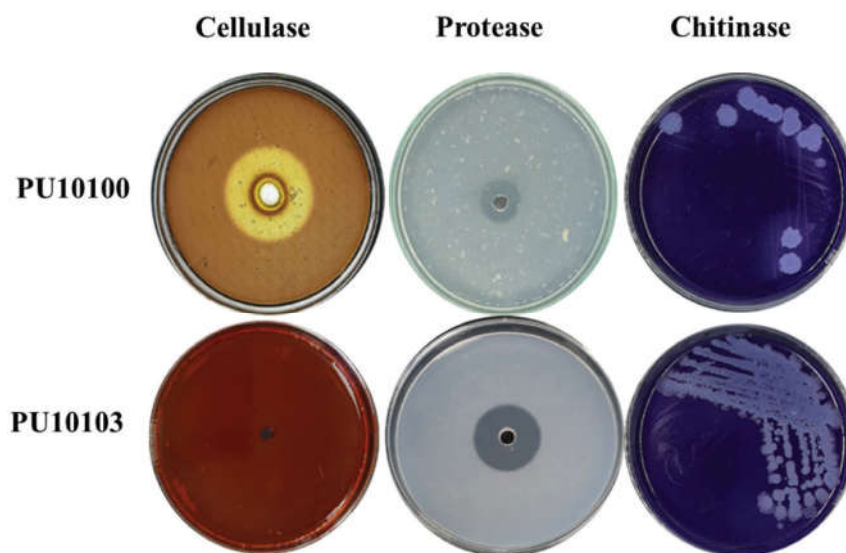
Kết hợp với kết quả giải trình tự vùng ITS sau khi so sánh với trình tự của các dòng nấm trong cơ sở dữ liệu Genbank của NCBI bằng công cụ Blast cho thấy, chủng nấm HTDL có độ tương đồng lên đến 99,61% so với chủng *B. aclada* D_D29 (KC311471.1) và *B. aclada* OnionBC-18 (FJ169669.1). Chủng nấm *Botrytis* sp. HTDL được định danh là *Botrytis aclada* HTDL.

Khả năng gây bệnh trên củ hành của chủng *B. aclada* HTDL được thể hiện sau 3 tuần theo dõi. Hiện tượng thối nâu xuất hiện từ khu vực cổ củ hành xuống phía dưới. Các sợi nấm màu xám xuất hiện rải rác xung quanh củ hành. Kết quả phân lập, định danh hình thái và phân tử của chủng nấm tái phân lập có sự tương đồng với chủng *Botrytis aclada* HTDL ban đầu.

3.2. Hoạt tính enzyme của vi khuẩn *Bacillus stercoris* PU10100 và *Bacillus siamensis* PU10103

Một số loại enzyme thủy phân được tổng hợp trong quá trình sinh trưởng và phát triển của một số loài vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* được xem như một trong những cơ chế kiểm soát nấm gây bệnh thực vật (Khan *et al.*, 2018). Các enzyme này có thể phân cắt các hợp chất cao phân tử như chitin, cellulose, hemicellulose, protein hoặc thậm chí cả DNA; can thiệp vào khả năng trao đổi chất của vi nấm gây bệnh, làm ức chế sự nảy mầm của bào tử nấm và ngăn cản sự phát triển của sợi nấm (Roca-Couso *et al.*, 2021).

Kết quả khảo sát khả năng tổng hợp các enzyme cellulase, protease, chitinase của hai chủng vi khuẩn PU10100 và PU10103 thể hiện trong hình 2 xác định chủng PU10103 có khả năng tổng hợp enzyme protease, chitinase và chủng PU10100 có khả năng tổng hợp enzyme cellulase, protease và chitinase.



Hình 2. Hoạt tính enzyme cellulase, protease và chitinase của hai chủng vi khuẩn PU10100 và PU10103

3.3. Khả năng đối kháng nấm *Botrytis aclada* HTDL của hai chủng vi khuẩn PU10100 và PU10103

Kết quả nghiên cứu khả năng ức chế nấm *B. aclada* HTDL của 2 chủng vi khuẩn nghiên cứu thể hiện trong hình 3 xác định dịch nuôi cấy của hai chủng vi khuẩn PU10100 và PU10103 có khả năng đối kháng nấm *B. aclada* HTDL, trong đó tỷ lệ ức chế nấm của chủng PU10100 là $71,43 \pm 4,07\%$ và của chủng PU10103 là $76,81 \pm 2,71\%$. Một số chủng *Bacillus* đã được chứng minh là có khả năng đối kháng với nấm gây bệnh thực vật. Nghiên cứu của Hang và cộng tác viên (2005) cho biết, vi khuẩn *B. subtilis* S1-0210 có khả năng đối kháng nấm *B. cinerea* gây thối quả kiwi và *Botrytis cinerea* gây thối quả dâu tây với tỷ lệ ức chế lần lượt là 66% và 80%. Chen và cộng tác viên (2019) thông báo, các chủng *B. amyloliquefaciens* RS-25, *B. licheniformis* MG-4, *B. subtilis* Z-14 và *B. subtilis* Pnf-4 đều có khả năng ức chế *Botrytis cinerea* gây mốc xám trên quả cà chua, bưởi, dâu tây sau thu hoạch. Chủng *B. amyloliquefaciens* NCPSJ7 cũng được nhóm tác giả Zhou và cộng tác viên (2020) chứng minh là có khả năng giảm tỷ lệ bệnh, đường kính vết bệnh và chỉ số thối rửa của nho bị nhiễm *Botrytis cinerea*.

Bảng 1. Tỷ lệ (%) đối kháng nấm *Botrytis aclada* HTDL của vi khuẩn PU10100 và PU10103

Chủng vi khuẩn đối kháng	PU10100	PU10103
<i>Botrytis aclada</i> HTDL	$71,43 \pm 4,07$	$76,81 \pm 2,71$

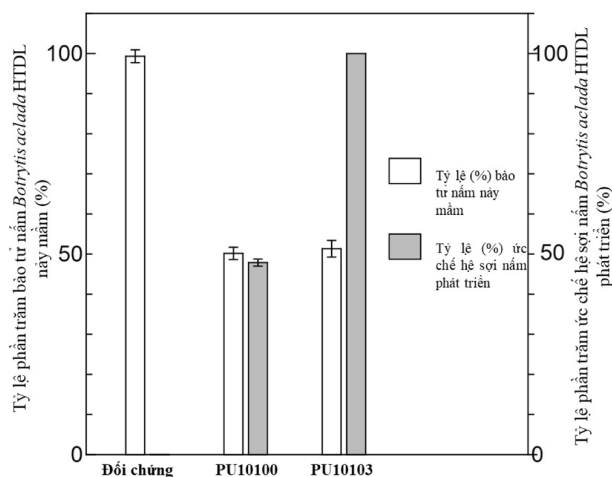
3.4. Khả năng ức chế nảy mầm bào tử và phát triển sợi nấm *Botrytis aclada* HTDL của hai chủng vi khuẩn PU10100 và PU10103

Kết quả khảo sát ảnh hưởng của các hợp chất hữu cơ dễ bay hơi được sản xuất bởi hai chủng vi khuẩn PU10100 và PU10103 đến khả năng nảy mầm bào tử và phát triển hệ sợi của nấm *Botrytis aclada* HTDL được thể hiện qua hình 3. Sau 8 giờ theo dõi trên 200 bào tử, tỷ lệ nảy mầm bào tử nấm ở nghiệm thức đối chứng đạt $99,33 \pm 1,61\%$. Trong khi đó, ở hai nghiệm thức còn lại sử dụng vi khuẩn PU10100 và PU10103, tỷ lệ nảy mầm chỉ đạt lần lượt $50,17 \pm 1,53\%$ và $51,33 \pm 2,08\%$. Ngoài ra, các hợp chất hữu cơ dễ bay hơi được tổng hợp từ hai chủng vi khuẩn này còn có khả năng ức chế sự sinh trưởng hệ sợi nấm với hiệu quả ức chế đạt $47,88 \pm 0,88\%$ đối với chủng PU10100 và lên đến 100% đối với chủng PU10103.

Bacillus sp. được biết đến với khả năng tổng hợp các hợp chất thứ cấp, trong đó có các hợp chất hữu cơ dễ bay hơi ức chế nấm *Botrytis cinerea* (Carmona-

Hernandez *et al.*, 2019; Roca-Couso *et al.*, 2021). Theo nghiên cứu của Gao và *et al.*, (2017), vi khuẩn *Bacillus velezensis* ZSY-1 có khả năng tổng hợp 2,5-dimethyl, benzothiazole, 4-chloro-3-methyl, 1,1-dimethylethyl có hiệu quả ức chế nấm *Botrytis cinerea* đạt trên 90%. Tuy nhiên, sự đa dạng và hàm lượng của các hợp chất hữu cơ dễ bay hơi được tạo

ra bởi một vi sinh vật cụ thể phụ thuộc vào nhiều yếu tố khác nhau như điều kiện dinh dưỡng và hàm lượng oxy (Insam and Seewald, 2010). Điều đó cho thấy cần có nhiều nghiên cứu hơn cho việc ứng dụng thực tế các hợp chất hữu cơ dễ bay hơi được sản xuất từ vi sinh vật vào kiểm soát nấm bệnh trong điều kiện thực nghiệm.



Hình 3. Ảnh hưởng của hợp chất hữu cơ dễ bay hơi được sản xuất bởi hai chủng vi khuẩn PU10100 và PU10103 đến khả năng nảy mầm bào tử và phát triển hệ sợi của nấm *Botrytis aclada* HTDL

IV. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

4.1. Kết luận

Hai chủng vi khuẩn *Bacillus stercoris* PU10100 và *Bacillus siamensis* PU10103 có khả năng tổng hợp enzyme protease, chitinase, cellulase và đối kháng nấm *Botrytis aclada* HTDL phân lập từ mẫu bệnh thối xám củ hành với hiệu lực ức chế nấm đạt $71,43 \pm 4,07\%$ đối chủng PU10100 và $76,81 \pm 2,71\%$ đối với chủng PU10103. Các hợp chất dễ bay hơi do hai chủng vi khuẩn *Bacillus stercoris* PU10100 và *Bacillus siamensis* PU10103 tổng hợp có khả năng ức chế sinh trưởng, phát triển của nấm *Botrytis aclada* HTDL, trong đó tỷ lệ ức chế sự phát triển hệ sợi và nảy mầm bào tử nấm bệnh đạt 100% và $50,17 \pm 1,53\%$ đối với chủng *Bacillus stercoris* PU10100 và $47,88 \pm 0,88\%$ và $51,33 \pm 2,08\%$ đối với chủng *Bacillus siamensis* PU10103. Chủng *Bacillus stercoris* PU10100 có tiềm năng sử dụng cho nghiên cứu phát triển chế phẩm sinh học kiểm soát nấm *Botrytis aclada* gây bệnh thối xám trên hành tây.

4.2. Đề nghị

Tiếp tục nghiên cứu các hợp chất có khả năng ức chế nấm *Botrytis aclada* HTDL được sản xuất

bởi hai chủng vi khuẩn đối kháng *Bacillus stercoris* PU10100 và *Bacillus siamensis* PU10103 cũng như khả năng kiểm soát nấm bệnh trên điều kiện *in vivo*.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ phát triển khoa học và công nghệ Quốc gia (NAFOSTED) trong đề tài mã số 106-NN.04-2016.44.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Carmona-Hernandez S., Reyes-Pérez J.J., Chiquito-Contreras R.G., Rincon-Enriquez G., Cerdan-Cabrera C.R. & Hernandez-Montiel L.G., 2019. Biocontrol of Postharvest Fruit Fungal Diseases by Bacterial Antagonists: A Review. *Agronomy*, 9(3): 121.
- Chen, X., Wang, Y., Gao, Y., Gao, T. & Zhang, D., 2019. Inhibitory Abilities of Bacillus Isolates and Their Culture Filtrates against the Gray Mold Caused by *Botrytis cinerea* on Postharvest Fruit. *The Plant Pathology Journal*, 35(5): 425-436.
- Chilvers M.I. & du Toit L.J., 2006. Detection and Identification of *Botrytis* Species Associated with Neck Rot, Scape Blight, and Umbel Blight of Onion. *Plant Health Progress*, 7(1): 38.
- Gao Z., Zhang B., Liu H., Han J. & Zhang Y., 2017. Identification of endophytic *Bacillus velezensis*

- ZSY-1 strain and antifungal activity of its volatile compounds against *Alternaria solani* and *Botrytis cinerea*. *Biological Control*, 105: 27-39.
- Gao H., Li P., Xu X., Zeng Q. & Guan, W., 2018. Research on Volatile Organic Compounds From *Bacillus subtilis* CF-3: Biocontrol Effects on Fruit Fungal Pathogens and Dynamic Changes During Fermentation. *Frontiers in Microbiology*, (9): 456.
- Hang N.T.T., Oh S.O., Kim G.H., Hur J.S. & Koh Y.J., 2005. *Bacillus subtilis* S1-0210 as a biocontrol agent against *Botrytis cinerea* in strawberries. *Plant Pathology Journal*, 21: 59-63.
- Insam H. & Seewald M.S.A., 2010. Volatile organic compounds (VOCs) in soils. *Biology and Fertility of Soils*, 46(3): 199-213.
- Khan N., Martínez-Hidalgo P., Ice T.A., Maymon M., Humm E.A., Nejat N., Sanders E.R., Kaplan D. & Hirsch A.M., 2018. Antifungal activity of *Bacillus* species against *Fusarium* and analysis of the potential mechanisms used in biocontrol. *Frontiers in Microbiology*, 9: 2363.
- Ku Y., Yang N., Pu P., Mei X., Cao L., Yang X. & Cao C., 2021. Biocontrol mechanism of *Bacillus subtilis* C3 against bulb rot disease in *Fritillaria taipaiensis* P.Y.Li. *Frontiers in Microbiology*, 12: 756329.
- Körner O. & Holst N., 2005. Model Based Humidity Control of Botrytis in Greenhouse Cultivation. *Acta Horticulturae*, 691(2): 141-148.
- Pretorius D., van Rooyen J., & Clarke K.G., 2015. Enhanced production of antifungal lipopeptides by *Bacillus amyloliquefaciens* for biocontrol of postharvest disease. *New Biotechnology*, 32(2): 243-252.
- Presly A.H.M., 1985. Studies on *Botrytis* spp. occurring on onions (*Allium cepa*) and leeks (*Allium porrum*). *Plant Pathology*, 34: 422-427
- Roca-Couso R., Flores-Félix J.D. & Rivas R., 2021. Mechanisms of action of microbial biocontrol agents against *Botrytis cinerea*. *Journal of Fungi (Basel, Switzerland)*, 7(12): 1045.
- Saima, Kuddus M., Roohi & Ahmad I.Z., 2015. Isolation of novel chitinolytic bacteria and production optimization of extracellular chitinase. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 11(1): 39-46.
- Stajner D. & Varga I.S.I., 2003. An evaluation of the antioxidant abilities of *Allium* species. *Acta Biologica Szegediensis*, 47(1-4): 103-106.
- Steentjes M.B.F., Tonn S., Coolman H., Langebeeke S., Scholten O.E. & van Kan J.A.L., 2021. Visualization of three sclerotiniaceae species pathogenic on onion reveals distinct biology and infection strategies. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(4): 1865.
- Zhao P., Li P., Wu S., Zhou M., Zhi R. & Gao H., 2019. Volatile organic compounds (VOCs) from *Bacillus subtilis* CF-3 reduce anthracnose and elicit active defense responses in harvested litchi fruits. *AMB Expr*, 9(1): 119.
- Zhou Q., Fu M., Xu M., Chen X., Qiu J., Wang F., Yan R., Wang J., Zhao S., Xin X. & Chen L., 2020. Application of antagonist *Bacillus amyloliquefaciens* NCPSJ7 against *Botrytis cinerea* in postharvest Red Globe grapes. *Food Science & Nutrition*, 8(3): 1499-1508.

Antagonistic ability of *bacillus stercoris* PU10100 and *bacillus siamensis* PU10103 against *botrytis aclada* isolated from onion bulbs with symptoms of gray-mold neck rot

Vo Hoai Hieu, Nguyen Thi Tam, Dinh Thi Ngoc Mai, Tran Hong Ba, Le Vinh Hoa, Nguyen Kim Nu Thao, Nguyen Hong Minh

Abstract

The study aimed to determine the antagonistic ability of two bacterial strains *Bacillus stercoris* PU10100 and *Bacillus siamensis* PU10103 (preserved at Bioresource Research Center, Phenikaa University) against *Botrytis aclada* HTDL isolated from onion bulbs with symptoms of gray-mold neck rot. The result showed that two *Bacillus* strains were capable to synthesize protease, chitinase, cellulase and extracellular secretion. Inhibition rate of PU10100 and PU10103 strains reached $71.43 \pm 4.07\%$ and $76.81 \pm 2.71\%$, respectively. Studying on the sporulation and growth inhibition of *Botrytis aclada* showed that, the inhibition rates of mycelium growth and fungal spore germination reached 100% and $50.17 \pm 1.53\%$ for *Bacillus stercoris* PU10100; $47.88 \pm 0.88\%$ and $51.33 \pm 2.08\%$ for *Bacillus siamensis* PU10103.

Keywords: Onion Grey mold (onion neck rot), *Botrytis aclada*, *Bacillus siamensis*, *Bacillus stercoris*, antifungal ability

Ngày nhận bài: 03/3/2022
Ngày phản biện: 05/3/2022

Người phản biện: GS.TS. Phạm Văn Toàn
Ngày duyệt đăng: 30/3/2022

XÁC ĐỊNH KHẢ NĂNG TRUYỀN NHIỄM BỆNH HOẠI HUYẾT QUA MÔI TRƯỜNG PHÒNG NUÔI VÀ DA TẮM

Nguyễn Thuý Hạnh¹, Hoàng Minh Tuấn¹, Phạm Minh Ngọc¹

TÓM TẮT

Bệnh hoại huyết trên tầm dâu do vi khuẩn *Bacillus* sp. và vi khuẩn *Serratia marcescens* gây hại là bệnh có mức độ truyền nhiễm mạnh. Ngoài việc nghiên cứu xác định các đặc điểm sinh học, sinh thái của tác nhân gây bệnh, thì việc nghiên cứu các con đường lây nhiễm của nó là rất quan trọng. Bởi vì, chỉ có xác định được chính xác các con đường lây nhiễm thì mới có thể xây dựng được những biện pháp phòng trừ phù hợp, có hiệu quả. Nghiên cứu này được thực hiện trong 2 năm (2020 - 2021), thông qua việc lây nhiễm nhân tạo bệnh hoại huyết trên tầm dâu. Kết quả đã xác định được 2 con đường lây nhiễm chính của bệnh này, đó là lây nhiễm qua da tằm và lây nhiễm qua môi trường phòng nuôi tằm. Mức độ lây nhiễm qua da lớn hơn qua môi trường phòng nuôi tằm. Cụ thể, lây nhiễm qua da có tỷ lệ bệnh hoại huyết là 53,23%, lây nhiễm qua môi trường phòng nuôi tằm có tỷ lệ bệnh hoại huyết là 43,24%.

Từ khoá: Tằm dâu, bệnh hoại huyết, lây nhiễm qua da, lây nhiễm qua môi trường

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh hoại huyết trên tầm dâu do vi khuẩn xâm nhập vào cơ thể tằm, nhộng và ngài. Trong cơ thể tằm, khi bị bệnh nặng đã có một số lượng lớn vi khuẩn được nhân lên nhanh chóng rồi theo máu tằm lây nhiễm toàn thân đã làm cho tằm chết vì toàn bộ hệ máu tằm bị nhiễm trùng, bị huỷ hoại (Nguyễn Huy Trí, 1998). Dựa vào thể trạng tằm bệnh mà người ta đã phân chia bệnh thành hai cấp bệnh đó là nguyên phát và thứ phát (Mei Yajun *et al.*, 2004).

Bệnh hoại huyết xảy ra thường xuyên trong sản xuất dâu tằm, đặc biệt là vào mùa Hè và mùa Thu nóng ẩm, gây thiệt hại rất lớn về kinh tế cho người trồng dâu nuôi tằm (Nguyễn Thị Đằm, 2005). Hai loại vi khuẩn chính gây bệnh hoại huyết trên tầm dâu đã được xác định *Bacillus* sp. (gây bệnh hoại huyết đen ngực) và *Serratia marcescens* Bizio (gây bệnh hoại huyết linh khuẩn) (Nguyễn Huy Trí, 1998). Kết quả “Nghiên cứu bệnh tằm và phòng dịch” thường xuyên theo chức năng của Bộ môn Kỹ thuật nuôi và nhân giống tằm năm 2020 - 2021 cho thấy, mức độ gây hại của bệnh hoại huyết là 37,07% (chỉ đứng sau bệnh virus) ở một số vùng trồng dâu nuôi tằm thuộc miền Bắc nước ta.

Các tác giả (Yu Hua Wang *et al.*, 2008; Mei Yajun *et al.*, 2004) và Nguyễn Huy Trí (1998) đều cho rằng, muốn phòng trừ tốt bệnh hoại huyết cần phải nghiên cứu kỹ các con đường truyền nhiễm của bệnh này. Để từ đó có phương pháp phòng trừ

hiệu quả, kết hợp với việc sẽ chọn lựa được chính xác thuốc kháng khuẩn thích hợp để có thể nuôi tằm đạt năng suất ổn định, cao và nâng cao lợi ích kinh tế. Có như vậy mới có thể duy trì, nâng cao và ổn định việc phát triển nghề trồng dâu nuôi tằm lâu dài, bền vững.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

- Giống tằm thí nghiệm: Là giống tứ nguyên lưỡng hệ kén trắng mới lai tạo.

- Phòng nuôi tằm: Phòng được phun mầm bệnh và phòng không phun mầm bệnh.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Bố trí thí nghiệm

- Xác định khả năng truyền nhiễm bệnh hoại huyết qua da tằm: Lấy 10 mL hỗn hợp vi khuẩn (*Bacillus* sp. + *Serratia marcescens* Bizzio) đã được phân lập (nồng độ 10^6 tế bào/1 mL) từ các mẫu tằm bệnh (viết tắt là HHB). Tiến hành phun lên mình tằm tuổi 3 (lúc tằm mới ngủ dậy). Hàng ngày theo dõi tình hình phát sinh bệnh đến khi tằm chín, lên né, kết kén. Tính tỷ lệ tằm bị các loại bệnh vi khuẩn ở các công thức. Thí nghiệm được nuôi 2 lứa, gồm 3 công thức: CT1: Phun 10 mL HHB lên da tằm; CT2: Phun 10 mL nước lên da tằm (đối chứng); CT3: Nuôi tằm ở điều kiện tự nhiên bình thường.

¹ Trung tâm Nghiên cứu Dâu tằm tơ Trung ương

* Tác giả liên hệ: E-mail: hanhncdt@gmail.com