

**NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM CỦA
Bacillus amyloliquefaciens VL4.6
TÁC NHÂN KIỂM SOÁT SINH HỌC ĐỐI KHÁNG VỚI
Colletotrichum lagenarium
GÂY BỆNH THÁN THƯ TRÊN DƯA LEO**

Nguyễn Thị Liên^{1,*}, Nguyễn Thị Phi Oanh², Nguyễn Đắc Khoa^{1,3}

TÓM TẮT

Bacillus amyloliquefaciens được xác định là tác nhân kiểm soát sinh học (BCA) hiệu quả và thân thiện với môi trường trong canh tác nhiều loại cây trồng khác nhau. Nghiên cứu này nhằm mục đích xác định các đặc tính của chủng vi khuẩn *Bacillus amyloliquefaciens* VL4.6 trong điều kiện *in vitro* và đánh giá hiệu quả giảm bệnh thán thư trên dưa leo do *Colletotrichum lagenarium* gây ra của chủng *B. amyloliquefaciens* VL4.6 (VL4.6) được phân lập từ đất vùng rễ cây dưa leo. Chủng VL4.6 thể hiện hoạt tính đối kháng với nhiều mầm bệnh gây hại trên cây dưa leo. Chủng VL4.6 cho thấy, khả năng sản sinh nhiều enzyme ngoại bào (β -1,3-glucanase, cellulase, chitinase, và protease), siderophore, các hợp chất hữu cơ không bay hơi và các hợp chất hữu cơ dễ bay hơi kháng nấm. Kết quả khảo sát ghi nhận, khi xử lý chủng VL4.6 cho thấy, hiệu quả phòng trừ bệnh thán thư trên dưa leo ở điều kiện nhà lưới. Các biện pháp xử lý huyền phù VL4.6 vào đất (ngâm hạt, tưới đất) và phun lên lá đều làm giảm diện tích vết bệnh trên lá. Mật số vi khuẩn 10^8 tế bào/mL cho hiệu quả giảm bệnh cao nhất. Nhìn chung, *B. amyloliquefaciens* VL4.6 có thể sử dụng như BCA trong canh tác dưa leo, đặc biệt trong phòng trừ bệnh thán thư do *C. lagenarium*.

Từ khóa: *Bacillus amyloliquefaciens*, *Colletotrichum lagenarium*, dưa leo, kiểm soát sinh học, thán thư.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Dưa leo (*Cucumis sativus* L.) là một trong những loại cây rau được trồng nhiều và lâu đời nhất tại nhiều quốc gia thuộc vùng nhiệt đới [1]. Chúng được tiêu thụ với nhiều hình thức như quả tươi, lên men, hoặc thực phẩm chế biến sẵn. Bên cạnh đó, dưa leo là nguồn cung cấp nhiều loại dinh dưỡng khác nhau như chất xơ, axit béo, axit amin và các phytochemical (alkaloids, flavonoids, tanins, phlobatannins, steroids và saponins) [2]. Tuy nhiên, dưa leo thường bị tấn công bởi *Colletotrichum lagenarium* gây bệnh thán thư, ngay cả trong điều kiện nhà kính và đồng ruộng [3].

Trong công cuộc phát triển nông nghiệp bền vững, việc sử dụng vi khuẩn vùng rễ kích thích sinh trưởng (plant growth-promoting rhizobacteria - PGPR) được xem là một phương pháp hiệu quả nhằm giảm sử dụng thuốc hoá học trong kiểm soát mầm bệnh [4]. Vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* được ghi nhận có khả năng sản sinh các hợp chất chuyển hoá như các peptide, cyclic lipopeptide, polyketide, bacteriocin và siderophore. Các hợp chất chuyển hoá có phổ hoạt động rộng với nhiều mầm bệnh nấm, vi khuẩn và virus [5]. *Bacillus* spp. được báo cáo có thể sử dụng như các tác nhân kiểm soát sinh học kiểm soát nhiều mầm bệnh trên dưa leo như các loài nấm sợi *Colletotrichum* [6], [7], *Fusarium* [8], *Alternaria cucumerina* [9], *Rhizoctonia solani* [10], *Pseudoperonospora cubensis* [11], *Pythium mamillatum* [12] và vi khuẩn *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* [7].

¹ Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm,
Trường Đại học Cần Thơ

² Khoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Cần Thơ

³ Ban Quản lý dự án ODA, Trường Đại học Cần Thơ

*Email: ntlien@ctu.edu.vn

Bên cạnh *Bacillus subtilis*, vi khuẩn *Bacillus amyloliquefaciens* được công nhận là an toàn và được ứng dụng nhiều trong công nghiệp và nông nghiệp [13]. *B. amyloliquefaciens* được báo cáo có khả năng liên kết mạnh với hệ rễ của cây trồng, từ đó phát triển các kiểu tương tác cạnh tranh và ức chế chống lại các mầm bệnh gây hại cây trồng. Các sản phẩm chuyển hoá thứ cấp từ *B. amyloliquefaciens* có phổ hoạt động rộng, mục tiêu chủ yếu là mầm bệnh nấm [14].

Nghiên cứu này được thực hiện nhằm đánh giá tiềm năng ứng dụng của chủng PGPR *B. amyloliquefaciens* VL4.6 trong phòng trừ bệnh thán thư trên dưa leo. Nhằm đánh giá sâu hơn về hiệu quả phòng trừ bệnh của chủng VL4.6, nghiên cứu thực hiện với hai mục tiêu chính: (i) khảo sát được một số đặc tính của chủng VL4.6, (ii) đánh giá được hiệu quả giảm bệnh thán thư trên dưa leo của chủng VL4.6 trong điều kiện nhà lưới.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vi khuẩn đối kháng và mầm bệnh

Chủng VL4.6 được phân lập từ đất trồng dưa leo thu thập tại tỉnh Vĩnh Long. Trong nghiên cứu trước đó, phần trăm ức chế sự phát triển xuyên tâm của khuẩn ty *Colletotrichum lagenarium* bởi VL4.6 được ghi nhận là 52,3%. Chủng VL4.6 được xác định là *B. amyloliquefaciens* dựa trên trình tự gen vùng 16S rRNA và một số thử nghiệm sinh hoá.

Mầm bệnh *Colletotrichum 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

2.2.1. Khảo sát khả năng sinh enzyme thủy phân và siderophore

- β -1,3-glucanase: Huyền phù chủng VL4.6 (100 μ L) được chuyển vào 10 mL canh thang Luria (LB), ủ ở 30°C trong 48 giờ trên máy lắc ngang với tốc độ 100 vòng/phút. Dịch nổi vô bào (CFS) được thu nhận bằng cách ly tâm dịch nuôi vi khuẩn ở 20.000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C.

- CFS (100 μ L) được thêm vào 900 μ L laminarin (0,05% trong dung dịch đệm natri

acetate, pH 5,2) và trộn đều. Sau 30 phút ủ ở 37°C, nồng độ đường khử trong hỗn hợp được ước lượng bằng phương pháp 3,5-dinitrosalicylic acid. Hoạt tính của enzyme được biểu thị bằng μ mol glucose $\text{min}^{-1} \text{mL}^{-1}$.

Khả năng sản sinh cellulase, chitinase, protease và siderophore được thực hiện bằng phương pháp cấy nhỏ giọt. Huyền phù VL4.6 (3 μ L) được cấy vào các đĩa chứa môi trường thử nghiệm. Các đĩa được ủ ở 30°C. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần, đồng nghĩa với 3 điểm cấy huyền phù vi khuẩn.

- Hoạt tính cellulase: Môi trường carboxymethyl cellulose (CMC) [15] được sử dụng cho hoạt động của cellulase. Sau 72 giờ ủ, các đĩa được ngâm với dung dịch Congo Red 0,1% trong 15 phút rồi rửa bằng NaCl 1 M. Vùng không màu xung quanh các khuẩn lạc cho thấy, chủng vi khuẩn dương tính với việc sản sinh cellulase.

- Hoạt tính chitinase: Yeast extract glucose agar bổ sung 1% chitin được sử dụng cho thử nghiệm. Sau 72 giờ ủ, các đĩa được ngâm với dung dịch Lugol trong 5 phút. Một vùng màu vàng xung quanh các khuẩn lạc cho thấy chủng vi khuẩn có khả năng sản xuất chitinase.

- Hoạt tính protease: Skim milk agar [16] đã được sử dụng trong thí nghiệm này. Sau 48 giờ ủ, vùng xung quanh khuẩn lạc trong suốt chứng tỏ hoạt tính của enzyme protease.

- Siderophore: Thí nghiệm đã được thực hiện với phương pháp đĩa thạch hai lớp. Đĩa thạch CAS [17] được phủ một lớp mỏng yeast extract glucose agar. Sau 72 giờ ủ, vùng màu vàng xung quanh các khuẩn lạc cho thấy sự sản xuất siderophore.

2.2.2. Khảo sát ảnh hưởng của các hợp chất hữu cơ dễ bay hơi và các hợp chất hữu cơ không bay hơi từ chủng VL4.6 đến sự phát triển của *Colletotrichum lagenarium*

Các hợp chất hữu cơ dễ bay hơi (volatile organic compounds): Huyền phù *B. amyloliquefaciens* (100 μ L) được trải lên các đĩa thạch LB bằng tăm bông vô trùng. Các đĩa PDA được cấy với một khối thạch *C. lagenarium* (đường kính 6 mm) ở trung tâm. Đối với thử nghiệm ức chế sự nảy mầm của bào tử, 100 μ L huyền phù bào

từ *C. lagenarium* (10^5 bào tử/mL) được trải đều trên các đĩa PDA. Các đĩa petri phía trên được cấy nấm bệnh được đặt úp lên trên các đĩa petri đã được chủng với *B. amyloliquefaciens* VL4.6. Các đĩa petri trên và dưới được quấn kín bằng parafilm và ủ ở 28°C trong 5 ngày. Các đĩa thạch LB không chủng với *B. amyloliquefaciens* VL4.6 được sử dụng làm đối chứng. Tốc độ ức chế sự phát triển của sợi nấm và sự nảy mầm của bào tử được tính theo công thức sau:

Tỷ lệ ức chế sự phát triển của khuẩn ty (%) = [(đường kính khuẩn lạc ở nghiệm thức đối chứng - đường kính của khuẩn lạc ở nhóm ủ với chủng VL4.6)/đường kính khuẩn lạc ở nghiệm thức đối chứng] $\times 100\%$.

Tỷ lệ ức chế sự phát triển của bào tử (%) = [(số đơn vị khuẩn lạc ở nghiệm thức đối chứng - số đơn vị khuẩn lạc ở nghiệm thức ủ với chủng VL4.6)/số đơn vị khuẩn lạc ở nghiệm thức đối chứng] $\times 100\%$.

Các hợp chất hữu cơ không bay hơi: Huyền phù VL4.6 (100 μL) được chuyển vào 10 mL canh trường LB [18] và ủ ở 30°C trong 48 giờ trên máy lắc ngang ở tốc độ 100 vòng/phút. Dịch nuôi cấy vi khuẩn được ly tâm ở 20.000 vòng/phút, 10 phút, 4°C . Dịch nổi phía trên được thu thập và lọc qua màng lọc vô trùng (kích thước lỗ lọc 0,22 μm). Dịch nổi vô bào (CFS) được trộn với PDA nóng chảy (50°C) để đạt nồng độ 20% (vol/vol) và đổ vào đĩa petri. PDA được bổ sung với LB được sử dụng làm đối chứng. Các khối thạch nấm *C. lagenarium* (đường kính 6 mm) được cấy vào giữa các đĩa đã chuẩn bị. Sau 5 ngày ủ ở 28°C , đo đường kính của sự phát triển của nấm trên môi trường thử nghiệm. Huyền phù bào tử *C. lagenarium* (100 μL) được trải lên các đĩa đã chuẩn bị. Sau 5 ngày ủ, ghi nhận sự nảy mầm của các bào tử ở các nghiệm thức. Sự ức chế tăng trưởng xuyên tâm của sợi nấm và sự ức chế nảy mầm của bào tử được tính bằng công thức như mô tả ở trên.

2.2.3. Khảo sát hiệu quả giảm bệnh thán thư trên cây dưa leo trong điều kiện nhà lưới

- Chuẩn bị cây dưa leo: Chậu nhựa có đường kính 30 cm được làm đầy với 5 kg đất vô trùng mỗi chậu. Hạt dưa leo được ngâm trong nước ấm ($45\text{--}50^\circ\text{C}$) khoảng 6 tiếng. Sau đó, ủ hạt qua đêm bằng

khăn bông ẩm để hạt nảy mầm. Hạt nảy mầm được xử lý vi khuẩn hoặc đem trồng trong chậu theo các nghiệm thức đã bố trí. Cây được tưới nước mỗi ngày một lần. Mỗi cây được bón 1 g phân bón tan chậm hoàn chỉnh (16: 16: 8) [19].

Xử lý huyền phù vi khuẩn và hóa chất: Huyền phù VL4.6 được chuẩn bị như mô tả ở trên. Mật số vi khuẩn tương đương 10^8 tế bào/mL, sau đó được pha loãng đến mật độ 10^4 và 10^6 tế bào/mL.

Biện pháp ngâm hạt với huyền phù vi khuẩn: Hạt nảy mầm được chuyển vào bình nón chứa dịch huyền phù vi khuẩn với mật độ 10^4 , 10^6 và 10^8 tế bào/mL. Các bình được đặt trên máy lắc với tốc độ 120 vòng/phút trong 6 giờ. Sau khi ủ, hạt được để ráo nước và đem gieo vào các chậu đất đã chuẩn bị sẵn. Dung dịch NaCl 0,85% vô trùng được sử dụng làm đối chứng âm.

Tưới huyền phù vi khuẩn: Mỗi cây được tưới 5 mL huyền phù vi khuẩn ở 3 mật độ 10^4 , 10^6 , 10^8 tế bào/mL vào 1 ngày sau khi gieo. Dung dịch NaCl 0,85% vô trùng được sử dụng làm đối chứng âm.

Phun huyền phù vi khuẩn lên lá: Mỗi lá thật phát triển hoàn chỉnh được phun với huyền phù VL4.6 đến khi chảy thành giọt khỏi lá tại thời điểm 1 ngày trước khi chủng bệnh. Dung dịch NaCl 0,85% vô trùng được sử dụng làm đối chứng âm.

Đối chứng dương: Phun hóa chất (Antracol WP70) lên lá 1 ngày sau khi chủng bệnh (DAI).

- Chủng bệnh: Bào tử của nấm bệnh thán thư 7 ngày tuổi được thu bằng cách huyền phù khuẩn lạc nấm với nước cất vô trùng. Hỗn hợp được lọc qua hai lớp vải thưa. Mật độ bào tử được xác định bằng cách đếm trên buồng Neubauer cải tiến và điều chỉnh về nồng độ 10^5 bào tử/mL bằng nước cất vô trùng. Các lá phát triển hoàn chỉnh được phun với huyền phù bào tử ở cả mặt trên và mặt dưới của mỗi lá vào thời điểm cây vừa ra hoa. Sau khi chủng bệnh, cây được bao bằng túi nylon để giữ ẩm trong 24 giờ. Sau đó, túi nylon được mở ra một phần để cây thích nghi dần với điều kiện độ ẩm thấp của môi trường bên ngoài.

- Đánh giá mức độ nặng của bệnh: Vào các ngày thứ 4, 5 và 6 sau khi chủng bệnh, ghi nhận các lá bệnh. Mỗi đơn vị thí nghiệm ghi nhận kết quả trên 3 lá thật. Trung bình 3 lá thật là 1 lần lặp

lại của 1 nghiệm thức. Mỗi nghiệm thức lặp lại 3 lần. Tỷ lệ % tổng diện tích vết bệnh thán thư được xác định bằng phần mềm ImageJ.

2.3. Phân tích thống kê

Dữ liệu được phân tích phương sai (ANOVA một chiều) bằng phần mềm thống kê MINITAB 16 (Minitab, Inc.). Sự khác biệt thống kê được phân tích bằng phép thử Tukey với $p \leq 0,05$.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Các đặc tính *in vitro* của chủng VL4.6

Chủng VL4.6 cho thấy khả năng sản sinh các enzyme thủy phân β -1,3-glucanase, cellulase, chitinase và protease để thủy phân các cơ chất khảo sát (Bảng 1). Khả năng sản sinh β -1,3-glucanase và chitinase cao, có thể thấy tác động ức chế nấm bệnh chịu ảnh hưởng mạnh bởi hai enzyme này. Bên cạnh đó, chủng VL4.6 cũng thể hiện khả năng

sản sinh siderophore, một cơ chế hỗ trợ vi khuẩn cạnh tranh sắt với mầm bệnh. Khả năng sản sinh cellulase của chủng VL4.6 là một cơ chế quan trọng góp phần tăng khả năng ức chế sự phát triển của nấm bệnh. Kết quả được thể hiện ở bảng 1.

Các hợp chất dễ bay hơi và các hợp chất không bay hơi trong dịch nổi vô bào thu nhận từ chủng VL4.6 cho thấy hiệu quả ức chế đối với cả khuẩn ty và bào tử của *C. lagenarium*. Phần trăm ức chế sự phát triển khuẩn ty của VOCs và CFS từ chủng VL4.6 được ghi nhận lần lượt là 46,9% và 38,5%. Phần trăm ức chế sự nảy mầm của bào tử của VOCs và CFS từ chủng VL4.6 được ghi nhận lần lượt là 69,2% và 64,1%. So sánh với đối chứng, VOCs và CFS từ chủng VL4.6 có tác dụng ức chế sự lan rộng của khuẩn lạc nấm, khuẩn ty khí sinh kém phát triển, khả năng sản sinh sắc tố bị hạn chế.

Bảng 1. Kết quả khảo sát các đặc tính của chủng *B. amyloliquefaciens* VL4.6

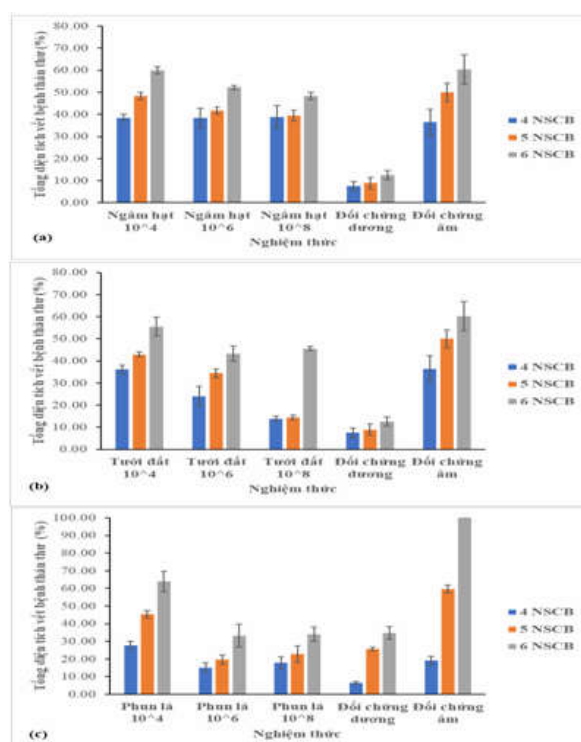
	Đặc điểm	Phần trăm ức chế/đường kính vòng phân giải
Sản sinh enzyme thủy phân	β -1,3-glucanase	0,312 $\mu\text{mol glucose phút}^{-1} \text{ mL}^{-1}$
	Khả năng phân giải cellulose	9,70 mm
	Khả năng phân giải chitin	19,2 mm
	Khả năng phân giải protein	11,7 mm
Sản sinh siderophore	Siderophore	5,70 mm
Các hợp chất dễ bay hơi	Ức chế sự phát triển của khuẩn ty	46,9%
	Ức chế sự nảy mầm của bào tử	69,2%
Các hợp chất không bay hơi	Ức chế sự phát triển của khuẩn ty	30,5%
	Ức chế sự nảy mầm của bào tử	64,1%

3.2. Hiệu quả phòng trừ bệnh thán thư trên dưa leo của chủng *B. amyloliquefaciens* VL4.6 trong điều kiện nhà lưới

Nhìn chung, cả 3 biện pháp xử lý huyền phù chủng VL4.6 (ngâm hạt, tưới đất và phun lên lá) đều cho thấy hiệu quả kiểm soát bệnh thán thư trên dưa leo so với nghiệm thức không xử lý vi khuẩn đối kháng. Hiệu quả kiểm soát bệnh kéo dài theo các thời điểm khảo sát. Các nghiệm thức xử lý với huyền phù chủng VL4.6 ở mật số cao hơn, cho hiệu quả giảm bệnh tốt hơn.

Biện pháp ngâm hạt và tưới đất với huyền phù vi khuẩn thể hiện hiệu quả kiểm soát bệnh thấp

hơn so với thuốc hoá học. Tuy nhiên, sự phát triển của vết bệnh khi xử lý với chủng VL4.6 được khống chế, có thể giảm nhẹ việc thất thoát năng suất do mất diện tích quang hợp ở lá. Mặt khác, biện pháp phun huyền phù vi khuẩn lên lá ở thời điểm một ngày trước khi chủng bệnh cho thấy hiệu quả giảm bệnh cao. Nghiệm thức phun lá với huyền phù vi khuẩn ở mật số 10^6 và 10^8 tế bào/mL có hiệu quả kiểm soát bệnh tương đương thuốc hoá học ($p < 0,05$). Kết quả cho thấy, biện pháp xử lý, thời điểm xử lý có thể ảnh hưởng đến hiệu quả phòng trừ bệnh hại trên cây trồng của các tác nhân kiểm soát sinh học. Kết quả được thể hiện ở hình 1.



Hình 1. Kết quả khảo sát hiệu quả giảm bệnh thán thư trên dưa leo của *B. amyloliquefaciens* VL4.6
(a) Biện pháp xử lý ngâm hạt, (b) Biện pháp xử lý tưới đất, (c) Biện pháp phun lên lá

3.3. Thảo luận

Vi khuẩn *Bacillus amyloliquefaciens* được báo cáo có khả năng đối kháng với *Colletotrichum* spp. gây bệnh thán thư trên nhiều loại cây trồng như củ hành tây [20], dưa leo [21], dưa hấu [22], dưa tây [23]. Trong nghiên cứu này, chủng *B. amyloliquefaciens* VL4.6 được phân lập từ đất vùng rễ cây dưa leo đã có kết quả khảo sát trước đó là có khả năng đối kháng cao với nấm *C. lagenarium* trong điều kiện *in vitro*. Khả năng phòng trừ tác nhân gây bệnh cho thấy tiềm năng ứng dụng cao của chủng VL4.6 trong canh tác dưa leo.

Nhằm xác định được các đặc tính đối kháng của chủng VL4.6, khả năng sản sinh các enzyme thủy phân và các sản phẩm trao đổi chất thứ cấp của chủng vi khuẩn này đã được đánh giá. Khả năng sản sinh các enzyme thủy phân β -1,3-glucanase, chitinase, cellulase, protease và sản sinh các siderophore có thể hỗ trợ chủng VL4.6 trực tiếp ức chế *C. lagenarium*, thông qua tác động

đến vách tế bào nấm bệnh và sự cạnh tranh về chất dinh dưỡng, không gian sống.

Enzyme β -1,3-glucanase và chitinase tác động phân giải β -glucan và chitin tham gia trong cấu trúc của thành tế bào nấm. Sự phân giải này dẫn đến sự lỏng lẻo hoặc phá hủy toàn bộ cấu trúc sợi nấm, do đó ngăn cản sự kéo dài của sợi nấm [24]. Khả năng sản sinh cellulase có thể giúp vi khuẩn cạnh tranh về không gian sống thông qua phân hủy xác bã thực vật, hoặc tạo liên kết với thực vật để tồn tại và phát triển trong hệ sinh thái của chúng. Protein là một phân tử sinh học quan trọng tham gia trong các hoạt động sống và gây bệnh của các mầm bệnh [25]. Khả năng sản sinh protease là một cơ chế quan trọng giúp vi khuẩn cạnh tranh với nấm bệnh để chiếm ưu thế trong tồn tại và cạnh tranh [26].

Siderophore được vi khuẩn sản sinh nhằm hấp thu sắt từ môi trường, việc cạn kiệt sắt trong môi trường có thể làm giảm sự phát triển của nấm bệnh. Trong mối liên hệ giữa PGPR và cây trồng, siderophore góp phần cung cấp dinh dưỡng cho cây trồng thông qua đó tăng cường sự phát triển và khả năng chống lại mầm bệnh của cây trồng [27].

Khả năng sản sinh các sản phẩm trao đổi chất thứ cấp là một cơ chế quan trọng giúp cho các BCA có thể cạnh tranh với các mầm bệnh [28]. Các sản phẩm trao đổi chất có thể trực tiếp tác động đến mầm bệnh hoặc gián tiếp thông qua hoạt động kích thích tính kháng hệ thống ở cây trồng, điển hình là lipopeptide [5], [20], [23].

B. amyloliquefaciens là vi khuẩn Gram dương, có khả năng sản sinh nội bào tử, đây cũng là yếu tố nổi bật giúp chúng có thể tồn tại trong điều kiện tự nhiên dưới áp lực của các yếu tố phi sinh học. Việc sử dụng *B. amyloliquefaciens* như tác nhân kiểm soát sinh học được báo cáo tác động tăng hoặc giảm tính đa dạng của hệ vi sinh vật vùng rễ. Khác biệt trong sự thay đổi tính đa dạng phụ thuộc vào từng chủng BCA, hệ vi sinh vật sẵn có, đặc điểm đất và loại cây trồng [29]. Nghiên cứu của Wang và cs (2021) [29] cho thấy, chủng *B. amyloliquefaciens* FH1 tác động tăng các loài thuộc Nannocystaceae và ức chế sự phát triển của Acidobacteria, Actinobacteria, Chloroflexi,

Plantctomycetes và Verrucomicrobia, thông qua đó kích thích sự phát triển của cây dưa leo. Trong mối tương tác với cây trồng, *B. amyloliquefaciens* tăng cường tín hiệu của các con đường chuyển hoá liên quan đến salicylic axit và jasmonic axit; gia tăng hoạt động của các enzyme tham gia trong cơ chế phòng vệ của cây trồng như superoxide dimutase, peroxidase, polyphenol oxidase, phenylalanine amonia lyase và các enzyme ức chế sự xâm nhiễm của nấm bệnh như chitinase, β -1,3-glucanase. Các sự thay đổi trên giúp cây trồng chống lại sự xâm nhiễm của nhiều mầm bệnh nấm [11], [21], [23] và virus [30].

4. KẾT LUẬN

Chủng VL4.6 có khả năng sản sinh nhiều loại hợp chất có vai trò quan trọng trong việc ức chế nấm bệnh như β -1,3-glucanase, cellulase, chitinase, protase và siderophore. Ngoài ra, các hợp chất dễ bay hơi và không bay hơi trong dịch nổi vô bào được thu nhận từ chủng VL4.6 cũng cho thấy hiệu quả ức chế đối với cả khuẩn ty và bào tử của *C. lagenarium*. Phần trăm ức chế sự phát triển khuẩn ty của VOCs và CFS từ chủng VL4.6 được ghi nhận lần lượt là 46,9% và 38,5%. Phần trăm ức chế sự nảy mầm của bào tử của VOCs và CFS từ chủng VL4.6 được ghi nhận lần lượt là 69,2% và 64,1%.

Cả 3 biện pháp xử lý huyền phù chủng VL4.6 (ngâm hạt, tưới đất và phun lên lá) đều cho thấy hiệu quả kiểm soát bệnh thán thư so với nghiệm thức không xử lý vi khuẩn đối kháng trong điều kiện nhà lưới. Qua các thời điểm khảo sát, hiệu quả kiểm soát bệnh của các biện pháp đều được duy trì. Mật số vi khuẩn 10^8 tế bào/mL cho hiệu quả giảm bệnh cao nhất ở cả ba biện pháp xử lý.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Tatlioglu, T. (1993). 13 - Cucumber: *Cucumis sativus* L. In: Kalloo, G., & Bergh, B. O. (Eds), Genetic improvement of vegetable crops (pp. 197-234). Pergamon.
2. Alnadif, A. M., Mirghani, M. E. S., & Hussein, I. (2017). Unconventional oilseeds and oil sources. Academic Press.
3. Eskandari, S., Höfte, H., & Zhang, T. (2020). Foliar manganese spray induces the resistance of cucumber to *Colletotrichum lagenarium*. *Journal*

of plant physiology, 246-247, 153129. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2020.153129>

4. Chung, S. H., & Kim, S. D. (2005). Biological control of phytopathogenic fungi by *Bacillus amyloliquefaciens* 7079; Suppression rates are better than popular chemical fungicides. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 15(5), 1011-1021.
5. Fira, D., Dimkić, I., Berić, T., Lozo, J., & Stanković, S. (2018). Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species. *Journal of Biotechnology*, 285, 44-55. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.07.044>
6. Nguyễn Thị Liên, Nguyễn Thị Phi Oanh và Nguyễn Đắc Khoa (2021). Khảo sát khả năng cố định đạm, hòa tan lân và tổng hợp IAA của các chủng vi khuẩn vùng rễ và ảnh hưởng lên sự sinh trưởng và phát triển của cây dưa chuột trong điều kiện phòng thí nghiệm. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*, số 6/2021, 3-11.
7. Raupach, G. S., & Kloepper, J. W. (2000). Biocontrol of cucumber diseases in the field by plant growth-promoting rhizobacteria with and without methyl bromide fumigation. *Plant disease*, 84, 1073-1075. DOI: 10.1094/PDIS.2000.84.10.1073.
8. Cao, Y., Zhang, Z., Ling, N., Yuan, Y., Zheng, X., Shen, B., & Shen, Q. (2011). *Bacillus subtilis* SQR 9 can control *Fusarium* wilt in cucumber by colonizing plant roots. *Biology and Fertility of Soils*, 47, 495-506. <https://doi.org/10.1007/s00374-011-0556-2>
9. Alkooranee, J. T., & Kadhum, N. N. (2019). Induce systemic resistance in cucumber by some bioelicitors against *Alternaria* leaf blight disease caused by *Alternaria cucumerina* fungus. *Plant Archives*, 19(1), 747-755.
10. Huang, X., Zhang, N., Yong, X., Yang, X., & Shen, Q. (2012). Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off disease in cucumber with *Bacillus pumilus* SQR-N43. *Microbiological research*, 167(3), 135-143. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2011.06.002>
11. Li, Y., Gu, Y., Li, J., Xu, M., Wei, Q., & Wang, Y. (2015). Biocontrol agent *Bacillus amyloliquefaciens* LJ02 induces systemic

resistance against cucurbits powdery mildew. *Frontiers in Microbiology*, 6, 883. doi: 10.3389/fmicb.2015.00883

12. Paul, B., Charles, R., & Bhatnagar, T. (1995). Biological control of *Pythium mamillatum* causing damping-off of cucumber seedlings by a soil bacterium, *Bacillus mycoides*. *Microbiological Research*, 150(1), 71-75. [https://doi.org/10.1016/S0944-5013\(11\)80036-4](https://doi.org/10.1016/S0944-5013(11)80036-4)

13. de Boer Sietske, A., & Diderichsen, B. (1991). On the safety of *Bacillus subtilis* and *B. amyloliquefaciens*: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology* 36, 1-4. <https://doi.org/10.1007/BF00164689>

14. Dimopoulou, A., Theologidis, I., Benaki, D., Koukounia, M., Zervakou, A., Tzima, A., Diallinas, G., Hatzinikolaou, D. G., & Skandalis, N. (2021). Direct antibiotic activity of bacillibactin broadens the biocontrol range of *Bacillus amyloliquefaciens* MBI600. *mSphere*, 6(4), e0037621. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00376-21>

15. Eggins, H. O. W., & Pugh, G. J. F. (1962). Isolation of cellulose decomposing fungi from the soil. *Nature*, 193, 94-95.

16. Geok, L. P., Razak, C. N. A., Rahman, R. N. Z. A., Basri, M., Salleh, A. B. (2003). Isolation and screening of an extracellular organic solvent-tolerant protease producer. *Biochemical Engineering Journal*, 13(1), 73-77. [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(02\)00137-7](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(02)00137-7)

17. Schwyn, B., & Neilands, J. B. (1987). Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical biochemistry*, 160(1), 47-56. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90612-9](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90612-9)

18. Miller, J. H. (1972). Experiments in molecular genetics. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor.

19. Descalzo, R. C., Rahe, J. E., & Mauza, B. (1990) Comparative efficacy of induced resistance for selected diseases of greenhouse cucumber. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 12(1), 16-24. DOI: 10.1080/07060669009501037

20. Hu, J., Zheng, M., Dang, S., Shi, M., Zhang, J., & Li, Y. (2021). Biocontrol potential of *Bacillus amyloliquefaciens* LYZ69 against anthracnose of alfalfa (*Medicago sativa*). *Phytopathology*, 111(8), 1338-1348. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-09-20-0385-R>

21. Wang, X., Yuan, Z., Shi, Y., Cai, F., Zhao, J., Wang, J., & Wang, Y. (2020). *Bacillus amyloliquefaciens* HG01 induces resistance in loquats against anthracnose rot caused by *Colletotrichum acutatum*. *Postharvest Biology and Technology*, 160, 111034. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2019.111034>

22. Kim, P. I., & Chung, K. C. (2004). Production of an antifungal protein for control of *Colletotrichum lagenarium* by *Bacillus amyloliquefaciens* MET0908. *FEMS microbiology letters*, 234(1), 177-183. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.03.032>

23. Yamamoto, S., Shiraishi, S., & Suzuki, S. (2015). Are cyclic lipopeptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* S13-3 responsible for the plant defence response in strawberry against *Colletotrichum gloeosporioides*? *Letters in applied microbiology*, 60(4), 379-386. <https://doi.org/10.1111/lam.12382>

24. Latgé, J. P. (2007). The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell. *Molecular microbiology*, 66(2), 279-290. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05872.x>

25. Yamagishi, D., Otani, H., & Kodama, M. (2006). G protein signaling mediates developmental processes and pathogenesis of *Alternaria alternata*. *Molecular plant-microbe interactions: MPMI*, 19(11), 1280-1288. <https://doi.org/10.1094/MPMI-19-1280>

26. Hammers, D., Carothers, K. & Lee, S. (2022). The role of bacterial proteases in microbe and host-microbe interactions. *Current drug targets*, 23(3), 222-239. <https://doi.org/10.2174/1389450122666210809094100>

27. Scavino, A. F., & Pedraza, R. O. (2013). The role of siderophores in plant growth-promoting bacteria. In: Maheshwari, D., Saraf, M.,

Aeron, A. (eds) *Bacteria in Agrobiolology: Crop Productivity*. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-37241-4_11

28. Yuan, J., Raza, W., Shen, Q., & Huang, Q. (2012). Antifungal activity of *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6 volatile compounds against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *Applied and environmental microbiology*, 78(16), 5942-5944. <https://doi.org/10.1128/AEM.01357-12>

29. Wang, J., Xu, S., Yang, R., Zhao, W., Zhu, D., Zhang, X., & Huang, Z. (2021). *Bacillus amyloliquefaciens* FH-1 significantly affects cucumber seedlings and the rhizosphere bacterial community but not soil. *Scientific reports*, 11(1), 12055. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-91399-6>

30. Lee, G. H., & Ryu, C. M. (2016). Spraying of leaf-colonizing *Bacillus amyloliquefaciens* protects pepper from cucumber mosaic virus. *Plant Disease*, 100(10), 2099-2105. doi:10.1094/pdis-03-16-0314-re

STUDY ON CHARACTERIZATION OF *Bacillus amyloliquefaciens* VL4.6 AS A BIOCONTROL AGENT AGAINST *Colletotrichum lagenarium* CAUSING ANTHRANOSE ON CUCUMBER

Nguyen Thi Lien, Nguyen Thi Phi Oanh, Nguyen Dac Khoa

¹ Institute of Food and Biotechnology, Can Tho University

² College of Natural Sciences, Can Tho University

³ ODA Project Management Unit, Can Tho University

Summary

Bacillus amyloliquefaciens has been identified as an effective and environmentally friendly biocontrol agent (BCA) in the cultivation of a wide variety of crop. This study aims to determine the properties of *Bacillus amyloliquefaciens* VL4.6 under *in vitro* condition, and to evaluate the effectiveness in reducing anthracnose disease on cucumber caused by *Colletotrichum lagenarium* of *B. amyloliquefaciens* strain VL4.6 (VL4.6) isolated from the soil of cucumber root zone. Bacterial strain VL4.6 exhibited the ability to produce many extracellular enzymes (β -1,3-glucanase, cellulase, chitinase, and protease), siderophore, antifungal nonvolatile and volatile organic compounds. The results indicated that the treatment of strain VL4.6 showed effective control of anthracnose on cucumber under greenhouse condition. Soil treatments (seed soaking, soil drenching) and foliar spray both reduce diseased leaf areas. Bacterial density of 10^8 cells/ml gave the highest disease efficiency. Overall, *B. amyloliquefaciens* VL4.6 can be used as a BCA in cucumber cultivation, especially in the control of anthracnose caused by *C. lagenarium*.

Keywords: Anthracnose, *Bacillus amyloliquefaciens*, biocontrol, *Colletotrichum lagenarium*, cucumber.

Người phản biện: TS. Hà Minh Thanh

Ngày nhận bài: 30/3/2023

Ngày thông qua phản biện: 20/4/2023

Ngày duyệt đăng: 27/4/2023