

KHẢO SÁT CƠ CHẾ KÍCH KHÁNG BỆNH BẠC LÁ KHI PHUN LÊN LÁ LÚA CAO CHIẾT LÁ SỐNG ĐỜI LY TRÍCH BẰNG DUNG MÔI METHANOL

Nguyễn Trần Bảo Duy¹, Trương Văn Xạ², Nguyễn Đắc Khoa^{1,*}

¹Trường Đại học Cần Thơ

²Trường Đại học Sư phạm Kỹ Thuật Vĩnh Long

*Email: ndkhoa@ctu.edu.vn

TÓM TẮT

Bạc lá (cháy bìa lá) do vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* là một trong những bệnh gây hại trên ruộng lúa. Nghiên cứu này khảo sát cơ chế kích thích tính kháng bệnh lưu dẫn (kích kháng) trong cây lúa liên quan đến khả năng giúp giảm bệnh khi phun lên lá lúa cao chiết lá sống đời (*Kalanchoe pinnata*) ly trích bằng phương pháp tách chiết lỏng - lỏng với dung môi methanol. Ba nồng độ cao chiết (1; 1,5; 2%) và ba biện pháp phun gồm: (1) phun ở thời điểm 14 ngày trước chủng bệnh (NTCB), (2) phun ở thời điểm 7 NTCB và (3) phun kết hợp cả hai thời điểm này được sử dụng để khảo sát khả năng giúp giảm bệnh trong điều kiện nhà lưới. Phun cao chiết 1% lên lá lúa ở thời điểm 14 NTCB giúp giảm chiều dài vết bệnh, tương đương với đối chứng dương sử dụng thuốc hóa học Starner 20WP ở tất cả các thời điểm khảo sát. Kết quả khảo sát hoạt tính của bốn enzyme liên quan đến cơ chế kháng bệnh gồm: Peroxidase, catalase, polyphenol oxidase và phenylalanine ammonia lyase cho thấy, khả năng giúp giảm bệnh cháy bìa lá của cao chiết lá sống đời có liên quan đến cơ chế kích kháng. Hoạt tính của cả bốn enzyme tăng sớm khi cây lúa được xử lý với cao chiết và tăng cao hơn khi có sự hiện diện của cả mầm bệnh và cao chiết.

Từ khóa: Bạc lá, sống đời, *Kalanchoe pinnata*, kích kháng, lúa, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) là tác nhân gây bệnh bạc lá (cháy bìa lá) lúa, là mối đe dọa nghiêm trọng đối với sản xuất lúa gạo trên toàn cầu [1]. Ở Việt Nam, bệnh có sức tàn phá đặc biệt, gây thiệt hại năng suất lên tới 65% [2], làm ảnh hưởng đến chất lượng gạo và tiềm năng xuất khẩu gạo chất lượng cao của Việt Nam [2, 3].

Các phương pháp kiểm soát bệnh hiện nay bao gồm: Sử dụng hóa chất [4], vi khuẩn đối kháng [5] và sử dụng gen kháng [6]. Tuy nhiên, những phương pháp này hiệu quả không cao và có những hạn chế về tính bền vững. Phương pháp kích kháng hứa hẹn là một chiến lược để kiểm soát bệnh thay thế cho các phương pháp truyền thống [7, 8]. Phương pháp này tập trung vào cơ chế bảo vệ vốn có của cây lúa, kích thích phản ứng tự bảo vệ khi tiếp xúc với các tác nhân gây bệnh.

Khoa và cs (2017) [8] đã chứng minh, dịch trích lá sống đời (*Kalanchoe pinnata*) có khả năng kích thích tính kháng bệnh bạc lá, bằng cách ngâm hạt với dịch trích lá sống đời tươi đã làm giảm vết bệnh, tương đương sử dụng thuốc hóa học. Hiệu quả giảm bệnh này tương quan với việc kích hoạt sớm hơn và mạnh hơn các enzyme có liên quan đến cơ chế tự vệ là enzyme peroxidase (POX) và enzyme catalase (CAT) sau khi chủng bệnh [8]. Nguyễn Thị Thu Hương và cs (2018) [9] đã quan sát thấy, hoạt động của enzyme polyphenol oxidase (PPO) và enzyme phenylalanine ammonia-lyase (PAL) được tăng cường sau khi phun dịch trích lá sống đời lên lá lúa ở các nồng độ khác nhau [9]. Nghiên cứu của Xạ và cs (2023) [10, 11] đã chứng minh hiệu quả giảm bệnh của dịch chiết lá sống đời ly trích bằng dung môi methanol trong việc ngâm hạt, kết quả cho thấy, hiệu quả giảm bệnh được duy trì đến 21 ngày sau chủng bệnh (NSCB).

Nghiên cứu này đánh giá khả năng giảm bệnh của bệnh bạc lá lúa của dịch trích lá sống đời ly trích bằng dung môi methanol thông qua phương pháp phun qua lá. Đồng thời, cơ chế kích kháng trên lúa thông qua hoạt tính của các enzyme POX, CAT, PPO và PAL cũng được khảo sát. Với mục tiêu bảo vệ môi trường, bảo vệ sức khỏe người dân và hướng đến nền nông nghiệp bền vững, kết quả nghiên cứu này có tiềm năng cung cấp một giải pháp hữu ích cho việc quản lý bệnh bạc lá ở Việt Nam.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguồn cao chiết và mầm bệnh

Cao chiết lá sống đời bằng phương pháp tách chiết lỏng - lỏng được thực hiện theo phương pháp của Hanson (2013) [12] và tham khảo của Kagale và cs (2004) [13] lần lượt gồm: Sử dụng 300 g lá sống đời cắt nhỏ (2 - 3 cm) và cho vào 1.500 mL methanol (1/5, w/v), xay nhuyễn bằng máy xay (BL-T60, Toshiba) trong 5 phút. Hỗn hợp được xử lý sóng siêu âm bằng bể siêu âm (S300, Elmasonic) ở công suất 120 W trong 60 phút. Sau đó, hỗn hợp được lọc bằng Na_2SO_4 khan và giấy lọc (Whatman Ø 110 mm) để thu được dịch chiết. Dịch chiết được cô quay chân không bằng máy cô quay (RV, IKA) ở tốc độ 5.000 vòng/phút và nhiệt độ bể chứa bình cô quay ở $50 \pm 2^\circ\text{C}$. Dịch chiết sau khi cô cạn (còn khoảng 100 mL) được sấy ở nhiệt độ $50 \pm 2^\circ\text{C}$ cho đến khi thu được cao tổng đạt ẩm độ từ 10% thì dừng quá trình sấy để thu được cao chiết.

Giống lúa Jasmine 85 và chủng *Xoo* CT-13 có độc lực cao được cung cấp bởi nhóm nghiên cứu Bệnh học thực vật, Phòng Thí nghiệm Sinh học phân tử, Viện Công nghệ Sinh Học và Thực Phẩm, Trường Đại học Cần Thơ.

2.2. Khảo sát khả năng giảm bệnh bạc lá khi phun lên lá lúa cao chiết

Thí nghiệm được bố trí theo thể thức hoàn toàn ngẫu nhiên với ba lần lặp lại gồm hai yếu tố được nghiên cứu: (1) 3 nồng độ cao chiết (1; 1,5; 2%) và (2) biện pháp phun 7, 14 NTCB, kết hợp hai thời điểm là 14 và 7 NTCB. Thuốc hóa học Starner 20WP được sử dụng làm nghiệm thức đối chứng dương, được phun ở ba thời điểm: 5, 10 và 15 NSCB [14, 8]. Đối chứng âm phun nước cất.

Chủng bệnh nhân tạo: Lúa được loại hết hạt lép và được xử lý ngâm trong nước 3 sôi 2 lạnh ($50 - 55^\circ\text{C}$) để hạn chế mầm bệnh tiềm ẩn trên hạt. Hạt được ủ từ 24 - 48 giờ đến khi nảy mầm và được gieo vào chậu. Cây lúa được chủng bệnh vào giai đoạn 45 ngày sau khi gieo, thực hiện theo phương pháp của Kauffman và cs (1973) [15] và điều chỉnh của Khoa và cs (2017) [8] gồm: Dùng kéo đã thanh trùng nhúng vào huyền phù vi khuẩn *Xoo* 10^9 CFU/mL. Cắt 3 chóp lá/cây (khoảng 2 - 3 cm từ chóp lá). Mỗi bụi cắt ngẫu nhiên 5 cây.

Ghi nhận chỉ tiêu: Chiều dài vết bệnh được đo ở thời điểm 7, 14 và 21 NSCB [16, 8]. Chiều dài vết bệnh trên lá lúa được tính từ đầu lá lúa đến hết vị trí vết bệnh lan trên lá.

2.3. Khảo sát hoạt tính enzyme

Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với ba lần lặp lại gồm bốn nghiệm thức, bao gồm: (1) cây lúa được phun lên lá bằng nước, không chủng bệnh; (2) cây lúa được phun lên lá cao chiết và không chủng bệnh; (3) cây lúa được phun lên lá cao chiết, có chủng bệnh; (4) cây lúa được phun lên lá bằng nước và có chủng bệnh.

2.3.1. Thu mẫu lá lúa và ly trích enzyme

Lá lúa được thu ngay sau khi chủng bệnh (0 NSCB) và cách nhau 24 giờ trong 7 ngày. Tất cả các lá thu được ngay lập tức được trữ trong nito lỏng để duy trì hoạt động của enzyme. Sau đó, mẫu được trữ ở -20°C [8, 10].

Sử dụng 0,1 g mẫu lá lúa được cắt nhỏ và cho vào ống eppendorf 2 ml có chứa bi sắt đã được thanh trùng, tiếp theo ngâm trong nito lỏng 20 phút và nghiền thành bột mịn bằng máy nghiền mẫu. Sau đó mẫu được đồng nhất trong 1,5 ml dung dịch đệm, hỗn hợp được ly tâm 10.000 vòng/phút trong 30 phút ở 4°C . Sau khi ly tâm, chuyển phần dung dịch nổi trên mặt sang tuýp mới và sử dụng như nguồn dịch chiết enzyme thô. Tất cả các mẫu được bảo quản trên đá trong suốt quá trình chiết để giảm thiểu sự biến tính enzyme [8, 10].

2.3.2. Khảo sát hoạt tính enzyme POX

Hoạt tính enzyme POX được thể hiện thông qua sự thay đổi giá trị hấp thụ quang phổ ở bước

sóng 470 nm của nồng độ sản phẩm tetraguaiacol sinh ra từ phản ứng chuyển hóa H_2O_2 và guaiacol dưới sự xúc tác của enzyme POX theo phương pháp của Hammerschmidt và cs (1982) [17] và điều chỉnh theo Khoa và cs (2017) [8]. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Mẫu đối chứng gồm: 1,6 mL H_2O_2 0,05 M; 0,15 mL guaiacol 0,15 M và 0,15 mL dung dịch đệm sodium phosphate 0,1 M, pH 6,5. Mẫu khảo sát gồm: Hỗn hợp 1,6 mL H_2O_2 0,05 M; 0,15 mL guaiacol 0,15 M và 0,15 mL dung dịch enzyme được pha loãng 2 lần trong dung dịch đệm sodium phosphate 0,1 M, pH 6,5. Giá trị $\Delta\text{OD}_{470\text{ nm}}$ được ghi nhận từ lúc bắt đầu phản ứng đến 2 phút và mỗi 30 giây ghi nhận một lần. Hoạt tính POX được thể hiện qua sự thay đổi giá trị hấp thụ quang phổ ở bước sóng 470 nm ($\Delta\text{OD}_{470\text{ nm}} \times \text{phút}^{-1} \times \text{g}^{-1}$ mô lá lúa) và được lấy trung bình của ba lần lặp lại [17, 18].

2.3.3. Khảo sát hoạt tính enzyme CAT

Hoạt tính enzyme CAT được thể hiện thông qua sự thay đổi giá trị hấp thụ quang phổ ở bước sóng 240 nm của nồng độ cơ chất H_2O_2 dưới sự xúc tác của enzyme CAT theo phương pháp của Beers và Sizer (1952) [19] và điều chỉnh theo Khoa và cs (2017) [8]. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Mẫu đối chứng gồm: 1,75 mL H_2O_2 0,1 M và 0,15 mL dung dịch đệm potassium phosphate 0,1 M, pH 7,0. Mẫu khảo sát gồm: Hỗn hợp 1,75 mL H_2O_2 0,1 M và 0,15 mL dung dịch enzyme được pha loãng 5 lần trong dung dịch đệm potassium phosphate 0,1 M, pH 7,0. Giá trị $\Delta\text{OD}_{240\text{ nm}}$ được ghi nhận từ lúc bắt đầu phản ứng đến 2 phút và mỗi 30 giây ghi nhận một lần. Hoạt tính CAT được thể hiện qua khả năng phân hủy cơ chất H_2O_2 thông qua sự thay giảm giá trị hấp thụ quang phổ ở bước sóng 240 nm ($\Delta\text{OD}_{240\text{ nm}} \times \text{phút}^{-1} \times \text{g}^{-1}$ mô lá lúa) và được lấy trung bình của ba lần lặp lại [19].

2.3.4. Khảo sát hoạt tính enzyme PPO

Hoạt tính của enzyme PPO được thể hiện thông qua sự thay đổi giá trị hấp thụ quang phổ ở bước sóng 490 nm của nồng độ sản phẩm benzoquinone do phản ứng chuyển hóa catechol dưới sự xúc tác của enzyme PPO theo phương pháp của Mayer và cs (1966) [20], Nisha và cs (2012) [18]. Mẫu đối chứng gồm: 1,75 mL catechol 0,1 M và 0,15 mL đệm potassium phosphate 0,1 M

(pH 6,5). Mẫu khảo sát gồm: Hỗn hợp 1,75 mL catechol 0,1 M và 0,15 mL dịch trích enzyme. Các mẫu được đo hấp thụ quang phổ ở bước sóng 490 nm được ghi nhận từ lúc bắt đầu phản ứng đến 2 phút và mỗi 30 giây ghi nhận một lần. Hoạt tính enzyme polyphenol oxidase được thể hiện qua sự thay đổi giá trị hấp thụ quang phổ ($\Delta\text{OD}_{490\text{ nm}} \times \text{phút}^{-1} \times \text{g}^{-1}$ mô lá lúa) và được lấy trung bình của ba lần lặp lại [18, 20].

2.3.5. Khảo sát hoạt tính enzyme PAL

Hoạt tính của enzyme PAL được thể hiện thông qua sự thay đổi giá trị hấp thụ quang phổ ở bước sóng 290 nm của nồng độ sản phẩm trans-cinnamate do phản ứng chuyển hóa L-phenylalanine dưới sự xúc tác của enzyme PAL [21]. Mẫu đối chứng gồm: 0,7 mL đệm sodium borate 0,1 M (pH 8,7); 1 mL L-phenylalanine 1 M và 0,15 mL nước cất thanh trùng. Mẫu khảo sát gồm: Hỗn hợp 0,5 mL đệm sodium borate 0,1 M (pH 8,7), 1 mL L-phenylalanine 1 M, 0,15 mL nước cất thanh trùng và 0,2 mL dịch trích enzyme. Phản ứng được thực hiện trong 40 phút ở nhiệt độ 35°C. Sau đó, phản ứng được dừng lại bằng 0,2 mL HCl 5 N. Hoạt tính enzyme được thể hiện qua sự thay đổi giá trị hấp thụ quang phổ ($\Delta\text{OD}_{290\text{ nm}} \times \text{phút}^{-1} \times \text{g}^{-1}$ mô lá lúa), được lấy trung bình của 3 lần lặp lại [21].

2.4. Phân tích số liệu

Số liệu về chiều dài vết bệnh được phân tích phương sai ANOVA từ phần mềm IBM SPSS Statistics 20 để kiểm tra sự khác biệt đáng kể giữa các nghiệm thức thông qua phép thử Duncan với mức ý nghĩa 5%.

Đối với số liệu khảo sát hoạt tính enzyme, giá trị hấp thụ OD của mỗi enzyme sẽ được tính toán và biểu diễn trên biểu đồ để minh họa hoạt động của enzyme của bốn nghiệm thức trong 7 NSCB bằng phần mềm Microsoft Excel 2013.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

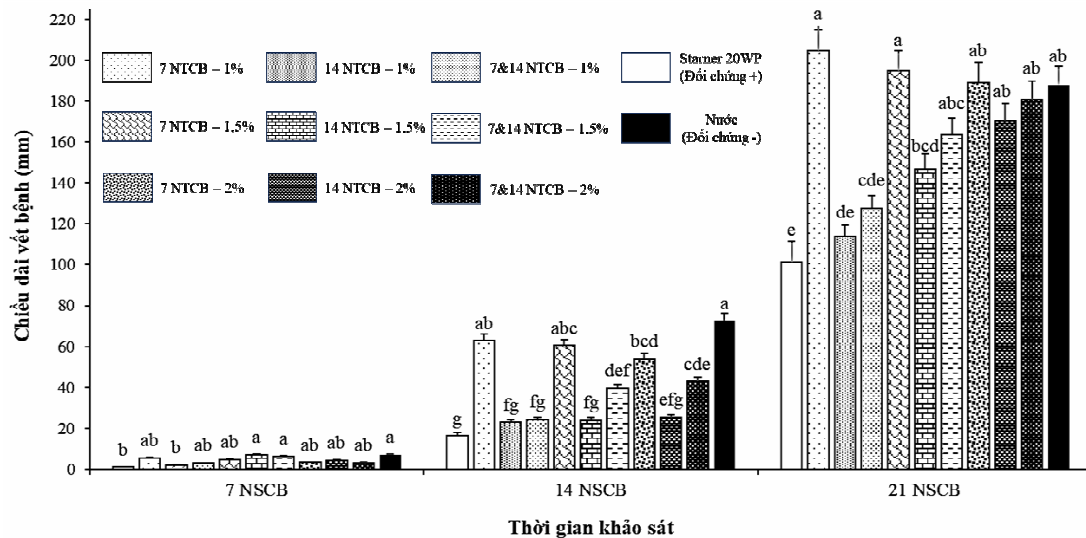
3.1. Khả năng giảm bệnh bạc lá của cao chiết lá sống đời trong điều kiện nhà lưới

Để đánh giá hiệu quả của cao chiết lá sống đời trong việc giảm bệnh, ba nồng độ của cao chiết (1; 1,5; 2% w/v) đã được phun lên lá lúa. Hiệu quả giảm bệnh được đánh giá bằng cách so sánh chiều

dài vết bệnh ở tất cả các nghiệm thức tại ba thời điểm: 7, 14 và 21 NSCB.

Ở thời điểm 7 NSCB, nghiệm thức phun 1% tại 14 NTCB có chiều dài tổn thương trung bình ngắn hơn so với đối chứng âm. Nghiệm thức phun 1,5%

tại 7 NTCB và 1,5% kết hợp tại 7 và 14 NTCB cho thấy, không có sự khác biệt đáng kể so với đối chứng âm. Hầu hết các nghiệm thức khác không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức ý nghĩa 95% so với đối chứng dương và đối chứng âm.



Hình 1. Chiều dài vết bệnh trung bình (mm) của bệnh bạc lá khi phun lên lá cao chiết methanol lá sống đời với 3 nồng độ khác nhau (1; 1,5; 2%) ở 3 thời điểm 14 NTCB, 7 NTCB, kết hợp 14 và 7 NTCB.

Ghi chú: Starter 20 WP (axit oxolinic 20%, 1 mg/mL) được sử dụng (đối chứng dương). Các thanh có cùng chữ cái ở cùng thời điểm thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức $P \leq 0,05$ theo phép thử Duncan.

Ở thời điểm 14 NSCB, nghiệm thức phun 1% tại 7 NTCB và 1,5% tại 7 NTCB cho thấy, khác biệt không có ý nghĩa thống kê so với đối chứng âm. Nghiệm thức phun 2% tại 7 NTCB và 2% kết hợp 7 và 14 NTCB đều có sự khác biệt đáng kể so với cả hai nghiệm thức đối chứng. Tất cả các nghiệm thức còn lại khác biệt không có ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức đối chứng dương nhưng khác biệt đáng kể so với nghiệm thức đối chứng âm. So sánh hiệu quả giảm bệnh ở hai thời điểm 14 NSCB với 7 NSCB có thể thấy, ngoại trừ nghiệm thức phun 1% tại 7 NTCB, 1,5% tại 7 NSCB không hiệu quả thì các nghiệm thức còn lại vẫn có hiệu quả giảm bệnh. Trong đó, nghiệm thức phun 1% tại 14 NTCB cho hiệu quả giảm bệnh tốt nhất.

Ở thời điểm 21 NSCB, chỉ còn hai nghiệm thức, phun 1% tại 14 NTCB và phun 1% kết hợp 7 và 14 NTCB có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với đối chứng âm và khác biệt không có ý nghĩa thống kê so với đối chứng dương.

Tóm lại, nghiệm thức phun 1% tại 14 NTCB và 1% kết hợp tại 7 và 14 NTCB có tác dụng giảm bệnh cao nhất và duy trì hiệu quả đến 21 ngày. Sau khi xử lý thống kê thì nghiệm thức phun 1% tại 14 NTCB được chọn cho thí nghiệm tiếp theo, vì hiệu quả giảm bệnh cao hơn và tiện lợi hơn so với nghiệm thức phun 1% kết hợp 7 và 14 NTCB. Kết quả nghiên cứu này phù hợp với kết quả nghiên cứu của Nguyễn Thị Thu Hương và cs (2018) [9] chứng minh rằng, phun dịch trích lá sống đời tại thời điểm 14 NTCB có hiệu quả giảm bệnh nhiều hơn so với phun ở thời điểm 7 NTCB.

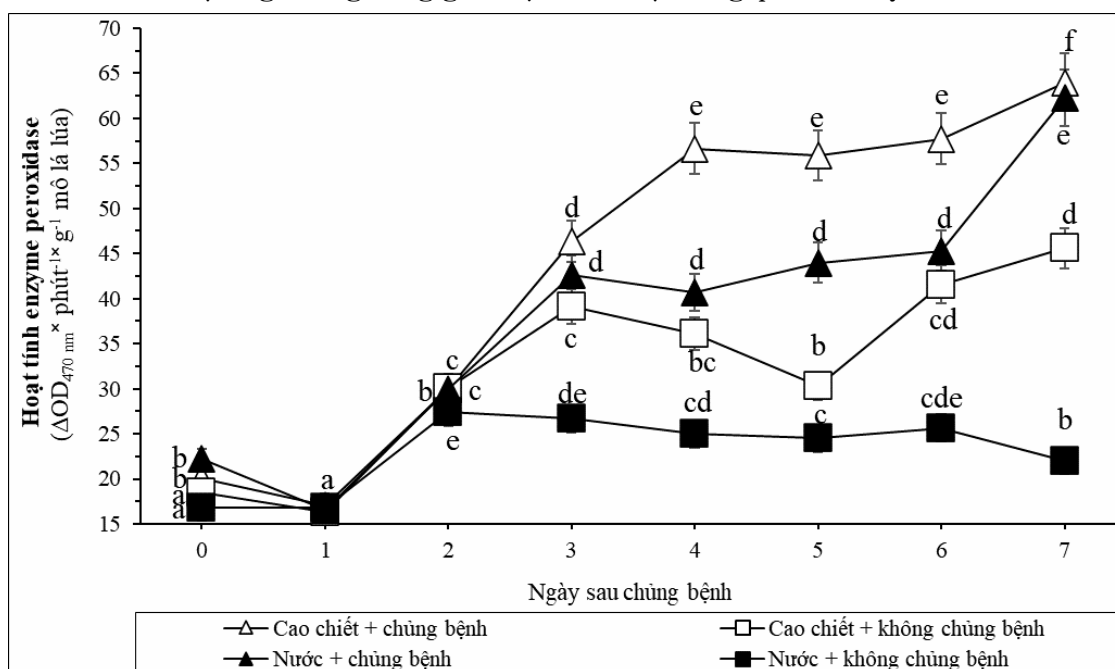
3.2. Cơ chế kích kháng của cao chiết lá sống đời đối với bệnh bạc lá

3.2.1. Hoạt tính enzyme POX

Đối với nghiệm thức phun nước + không chủng bệnh, giá trị hấp thụ quang phổ tăng từ 0 - 2 NSCB và ổn định từ 3 - 7 NSCB, điều này cho thấy hoạt tính của POX tăng dần. Sự gia tăng hoạt động

của enzyme này có thể là do sự tổng hợp các hợp chất cần thiết cho sự tăng trưởng trong giai đoạn

phát triển của cây lúa, trong đó POX đóng vai trò tích cực trong quá trình này.



Hình 2. Giá trị hấp thụ quang phổ ($\Delta OD_{470\text{ nm}}/\text{phút}/\text{g}$ mô lá) của sản phẩm tetraguaiacol trong phản ứng phân hủy H_2O_2 xúc tác bởi enzyme peroxidase

Đối với nghiệm thức phun nước + chủng bệnh, giá trị hấp thụ quang phổ có xu hướng tăng lên từ 1 - 7 NSCB, nhưng tăng mạnh nhất từ 1 - 3 NSCB. Từ 3 - 6 NSCB, giá trị hấp thụ quang phổ tăng nhẹ, nhưng vẫn cao hơn so với nghiệm thức phun nước + không chủng bệnh. Cuối cùng, hoạt tính của POX tăng vọt từ 6 - 7 NSCB. Những kết quả này cho thấy, hoạt động của POX tăng lên theo thời gian ở cả hai nghiệm thức phun nước. Sự hiện diện của vi khuẩn *Xoo* đã làm cho hoạt tính của POX tăng lên mạnh mẽ và rõ rệt hơn. Nguyên nhân có thể do phản ứng tự vệ của cây lúa trước sự xâm nhiễm của vi khuẩn *Xoo* bằng quá trình tổng hợp các hợp chất biến dưỡng, trong đó có sự gia tăng hoạt tính của POX để ngăn cản quá trình xâm nhiễm của vi khuẩn *Xoo*. Tuy nhiên, ở giai đoạn đầu khi chủng bệnh thì quá trình tự vệ tự nhiên của cây lúa là không đủ để ngăn cản sự xâm nhiễm của *Xoo* do trong giai đoạn này hoạt tính của POX chưa kịp tổng hợp. Nhưng sau khi có sự xâm nhiễm của mầm bệnh vào trong cây thì quá trình sinh trưởng và phát triển của mầm bệnh có thể kích thích tính kháng bệnh của cây lúa, từ đó khả

năng tự vệ của cây lúa được tăng cao hơn. Do vậy, hoạt tính của POX có sự tăng vọt ở thời điểm 6 và 7 NSCB.

Đối với nghiệm thức phun cao chiết + không chủng bệnh, giá trị hấp thụ quang phổ tương tự như nghiệm thức phun nước ở thời điểm 1 NSCB, nhưng tăng mạnh ở thời điểm 3 NSCB. Đến ngày 4 sau chủng bệnh, giá trị hấp thụ quang phổ có giảm nhẹ đến ngày 5, nhưng tăng ở trở lại vào 6 và 7 NSCB.

Đối với nghiệm thức phun cao chiết + chủng bệnh, giá trị hấp thụ quang phổ tăng mạnh từ ngày 1 - 4 NSCB và duy trì ổn định ở mức cao hơn so với các nghiệm thức còn lại cho đến 7 NSCB. Nhìn chung, hoạt tính POX của nghiệm thức này luôn tăng lên từ 1 - 7 NSCB. Nguyên nhân hoạt tính enzyme tăng mạnh hơn so với các nghiệm thức khác có thể do phun cao chiết và chủng bệnh là hai điều kiện cần và đủ để kích thích cây lúa sản sinh hoạt tính POX, giúp cây lúa ngăn chặn sự xâm nhiễm và phát triển của vi khuẩn *Xoo*.

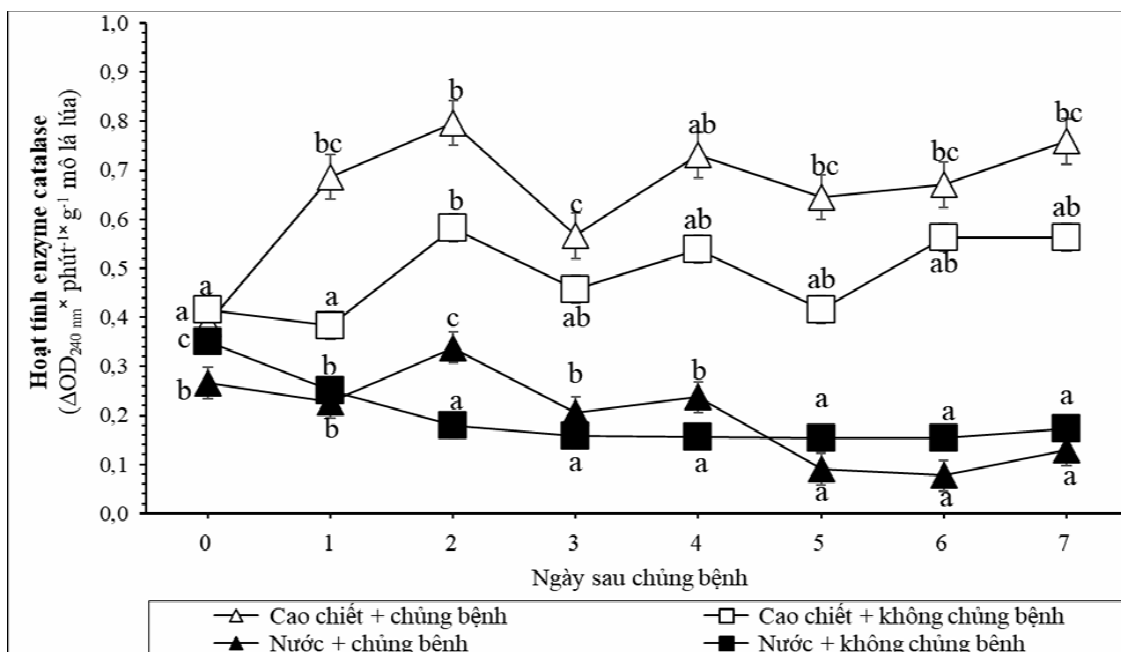
Kết quả nghiên cứu này tương đồng với kết quả nghiên cứu của Kagale và cs (2004) [13], khi

phun lên lá chiết xuất cây cà độc dược (*Datura stramonium*). Govindappa và cs (2011) [22], khi ngâm lúa với chiết xuất lá cây dừa cạn (*Catharanthus roseus*) đã làm tăng hoạt tính của POX, hoạt tính của enzym này tăng liên tục từ 0 - 96 giờ sau chủng bệnh (GSCB) [22]. Theo Nisha và cs (2012) [18], việc ngâm lúa với chiết xuất nước và metanol của lá cây bạch tật lê (*Tribulus terrestris*) cũng gia tăng hoạt tính của POX, tăng liên tục từ 0 - 100 GSCB (chiết xuất metanol) và từ 0 - 120 GSCB (chiết xuất nước) [18]. Khoa và cs (2017) [8] cũng ghi nhận hoạt tính POX tăng

từ 0 - 6 NSCB khi ngâm lúa với dịch chiết lá sống đời.

3.2.2. Hoạt tính enzyme CAT

Sau khi chủng bệnh, vi khuẩn *Xoo* xâm nhập vào hệ thống mạch của lá, sử dụng chất dinh dưỡng để tồn tại và phát triển nhanh chóng. Từ 2 - 3 NSCB, *Xoo* lây lan dọc theo hệ thống mạch và gây bệnh trên lá lúa [23, 24]. Sự gia tăng sớm hoạt động của hai enzyme POX và CAT trong quá trình nhiễm *Xoo* là rất quan trọng đối với cơ chế bảo vệ của cây lúa, giúp cây lúa tự bảo vệ kịp thời và tốt hơn trước sự tấn công của mầm bệnh [25, 26].



Hình 3. Giá trị hấp thụ quang phổ ($\Delta OD_{240nm} / \text{phút} / g \text{ mô lá}$) của sản phẩm hóa nâu trong phản ứng oxy hóa catechol xúc tác bởi enzyme catalase

Đối với nghiệm thức phun nước + không chủng bệnh, giá trị hấp thụ quang phổ giảm từ 0 - 2 NSCB và duy trì ổn định cho đến 7 NSCB. Đối với nghiệm thức phun nước + chủng bệnh, giá trị hấp thụ quang phổ có xu hướng tăng từ 1 - 2 NSCB. Sau đó giảm từ 4 - 5 NSCB và giữ ổn định cho đến 7 NSCB. Đối với nghiệm thức phun cao chiết + không chủng bệnh, giá trị hấp thụ quang phổ luôn cao hơn hai nghiệm thức phun nước ở hầu hết các thời điểm khảo sát. Giá trị độ hấp thụ quang phổ vẫn tăng từ 1 - 2 NSCB và duy trì ở mức cân bằng cho đến 7 NSCB. Đối với nghiệm thức phun cao chiết + chủng bệnh, giá trị hấp thụ

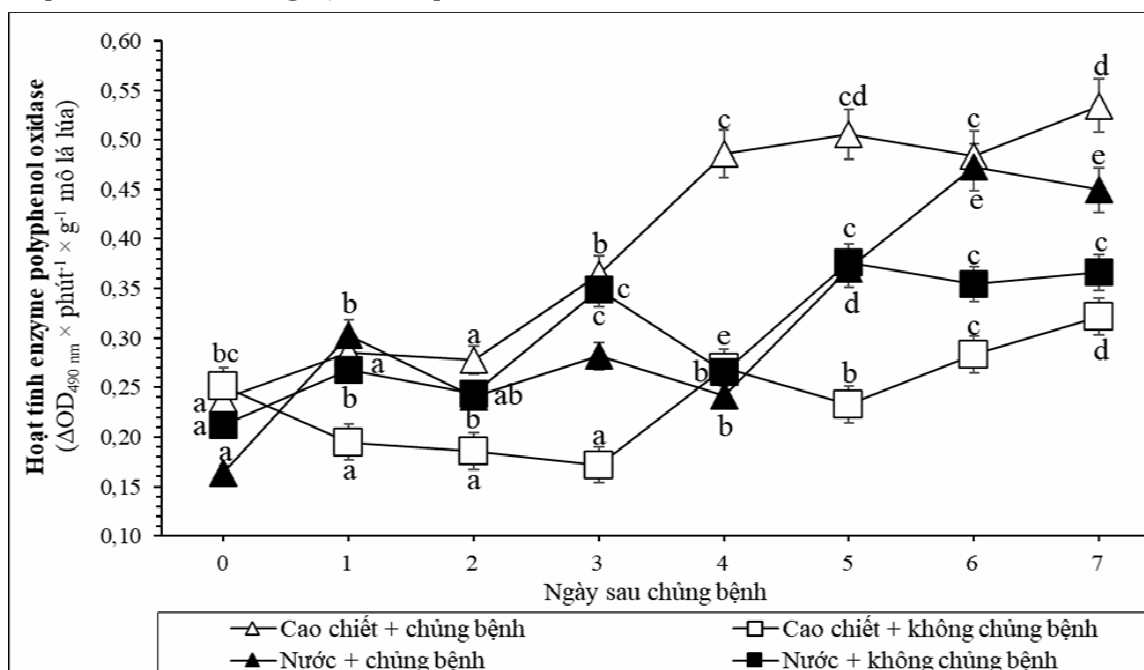
quang phổ được duy trì tăng liên tục từ 0 - 2 NSCB. Sau đó, ở 3 NSCB vẫn cao hơn các nghiệm thức khác cùng thời điểm khảo sát. Tại thời điểm 4 NSCB, giá trị hấp thụ quang phổ tăng trở lại và duy trì ổn định đến 7 NSCB. Một trong những cơ chế bảo vệ cây lúa chống lại mầm bệnh là quá trình sinh tổng hợp H_2O_2 liên tục để chống lại sự phát triển của vi khuẩn. H_2O_2 còn góp phần hình thành các rào cản cấu trúc như lignin và suberin trong thành tế bào, kích hoạt các gen liên quan đến phòng vệ và kích thích tổng hợp phytoalexin, là những hợp chất độc hại ức chế sự phát triển của mầm bệnh [25, 27]. Tuy nhiên, H_2O_2 được tổng

hợp quá mức có thể gây độc cho cây. Do đó, để duy trì cân bằng nội môi tế bào, hai enzyme CAT và POX tăng lên nhằm phân hủy H_2O_2 trong tế bào [13, 22].

Tóm lại, hoạt tính CAT luôn cao hơn ở nghiệm thức phun cao chiết và nghiệm thức phun nước.

Nguyên nhân có thể là do kết hợp việc phun qua lá bằng cao chiết và có sự xâm nhiễm của vi khuẩn *Xoo* là hai điều kiện đủ để cây lúa sản sinh CAT nhằm bảo vệ cây lúa khỏi mầm bệnh.

3.2.3. Hoạt tính enzyme PPO



Hình 4. Giá trị hấp thụ quang phổ ($\Delta OD_{490 \text{ nm}} / \text{phút} / \text{g}$ mô lá) của sản phẩm hóa nâu trong phản ứng oxy hóa catechol xúc tác bởi enzyme polyphenol oxidase

Đối với nghiệm thức phun nước + không chủng bệnh, từ 0 - 7 ngày giá trị quang phổ được giữ ở mức cân bằng, có sự dao động nhỏ nhưng không có sự tăng lên hay giảm xuống ý nghĩa. Đối với nghiệm thức phun nước + chủng bệnh, giá trị quang phổ có xu hướng tăng lên, nhưng tăng mạnh nhất từ 4 - 6 NSCB. Sau đó được giữ ổn định và luôn cao hơn so với nghiệm thức phun nước + không chủng bệnh đến thời điểm 7 NSCB. Kết quả này tương đồng với kết quả nghiên cứu của Trương Văn Xạ (2015) [28] chứng minh hiệu quả giảm bệnh qua cơ chế kích kháng đối với bệnh bạc lá lúa của các loại dịch trích. Nguyên nhân hoạt tính enzyme PPO tăng 1 NSCB có thể do vi khuẩn *Xoo* vừa là tác nhân gây bệnh cho cây lúa, đồng thời cũng là tác nhân kích thích tính kháng bệnh trong cây lúa, do vậy khi mầm bệnh tấn công thì các tính kháng bệnh của cây lúa được kích hoạt, trong đó có sự gia tăng hoạt tính PPO.

Đối với hai nghiệm thức phun cao chiết, nghiệm thức được chủng bệnh có hoạt động PPO tăng mạnh và sớm hơn so với nghiệm thức không chủng bệnh. Giá trị hấp thụ phổ ổn định từ 0 - 2 NSCB và sau đó tăng đáng kể từ 3 - 7 NSCB. Sự tăng chậm này của hoạt động PPO có thể là do cây lúa ưu tiên tổng hợp các enzyme phòng thủ khác như POX và CAT trong giai đoạn đầu của nhiễm bệnh.

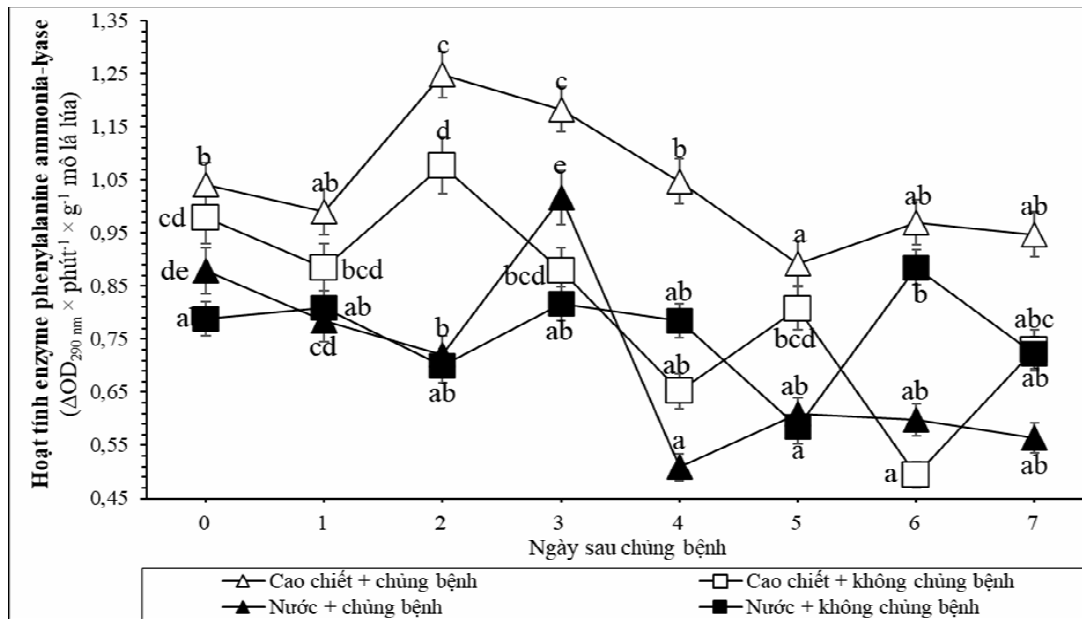
Tóm lại, khi phun qua lá cao chiết lá sống đòi ly trích bằng dung môi methanol thì hoạt tính của enzyme polyphenol oxidase sẽ thấp hơn khi phun bằng nước. Nhưng khi có sự xuất hiện của mầm bệnh thì hoạt tính của enzyme polyphenol oxidase sẽ tăng lên, trong đó nghiệm thức phun cao chiết có chủng bệnh sẽ tăng mạnh hơn nghiệm thức phun nước có chủng bệnh. Những phát hiện này cho thấy, sự xâm nhập của mầm bệnh kết hợp với phun cao chiết đã làm tăng đáng kể hoạt động của

PPO, đặc biệt là trong khoảng thời gian từ 0 - 5 NSCB.

3.2.4. Hoạt tính enzyme PAL

Enzyme PAL đóng vai trò then chốt trong chu trình phenylpropanoid để sinh tổng hợp các hợp chất phenolic như: Flavonoid, isoflavonoid, phytoalexin và tiền chất lignin [29]. Các hợp chất

này thường được phân loại là chất chuyển hóa thứ cấp ở thực vật, thể hiện các cấu trúc hóa học và chức năng đa dạng [30]. Chúng phục vụ nhiều mục đích ở thực vật, hoạt động như chất chống oxy hóa và bảo vệ chống lại mầm bệnh thông qua các cơ chế như kích hoạt phản ứng siêu nhạy cảm hoặc ức chế các mầm bệnh [17, 27].



Hình 5. Giá trị hấp thụ quang phổ ($\Delta OD_{290\text{nm}}/\text{phút}/\text{g}$ mô lá) của sản phẩm trans-cinnamate trong phản ứng phân hủy L-phenylalanine xúc tác bởi enzyme phenylalanine ammonia lyase

Đối với hai nghiệm thức không có sự xuất hiện của mầm bệnh là nghiệm thức phun bằng nước và phun bằng cao chiết không chủng bệnh đều ghi nhận hoạt tính của enzyme PAL giảm từ 1 - 7 NSCB. Tuy có sự dao động nhưng không có sự tăng lên hay giảm xuống ý nghĩa. Nhìn chung, đối với nghiệm thức phun qua lá bằng cao chiết không chủng bệnh, giá trị hấp thụ quang phổ có sự giảm nhẹ từ ngày 1 đến ngày 2. Tuy nhiên, có sự tăng trở lại đạt đỉnh cao nhất tại ngày 3 sau chủng bệnh. Từ ngày 4, giá trị hấp thụ quang phổ giảm và có xu hướng tăng trở lại vào ngày 7 sau chủng bệnh. Nhìn chung, giá trị quang phổ vẫn cao hơn nghiệm thức phun qua lá bằng nước không chủng bệnh. Kết quả nghiên cứu này tương đồng với thí nghiệm khảo sát hoạt tính enzyme PAL trong nghiên cứu sử dụng dịch trích cà độc dược (*Datura metel*) để kích kháng bệnh đốm vằn (*Rhizoctonia solani*) trên lúa ở Ấn Độ [13].

Đối với hai nghiệm thức có sự xuất hiện của mầm bệnh là nghiệm thức phun nước có chủng bệnh và phun cao chiết có chủng bệnh, giá trị hấp thụ quang phổ tăng ở thời điểm từ 1 - 2 NSCB, đó là giai đoạn khi mầm bệnh bắt đầu tấn công. Sau đó, ghi nhận giá trị hấp thụ quang phổ bắt đầu giảm tương tự như ở hai nghiệm thức không có sự xuất hiện của mầm bệnh. Tuy nhiên, đối với nghiệm thức phun cao chiết có chủng bệnh thì giá trị hấp thụ quang phổ luôn cao hơn so với các nghiệm thức còn lại.

Tóm lại, khi phun qua lá cao chiết dịch trích lá sống đời ly trích bằng dung môi methanol giúp cây được kích thích tính kháng bệnh bạc lá. Khả năng kích thích được thể hiện qua sự gia tăng hoạt tính enzyme PAL ngay từ khi có sự xâm nhiễm của vi khuẩn *Xoo*. Tuy nhiên, hoạt tính của enzyme PAL không được thể hiện sự tăng rõ ràng ở các thời điểm sau khi có sự tấn công của vi khuẩn.

4. KẾT LUẬN

Kết quả khảo sát hiệu quả giảm bệnh trong điều kiện nhà lưới cho thấy, khi phun lên lá cao chiết lá sống đời ly trích bằng dung môi methanol giúp cây lúa tăng khả năng kháng bệnh. Phun ở nồng độ 1% vào thời điểm 14 NTCB có hiệu quả giảm bệnh tương đương với sự dụng thuốc hóa học Starner 20WP và duy trì được đến 21 NSCB. Hơn nữa, các thí nghiệm cho thấy, cơ chế kích kháng có liên quan đến khả năng của cao chiết lá sống đời trong việc tăng cường hoạt động của các enzyme tự vệ. Enzyme POX và CAT đều tăng đáng kể khi mầm bệnh xuất hiện. Đặc biệt, khi phun cao chiết methanol lá sống đời dẫn đến sự gia tăng sớm hơn và mạnh hơn các hoạt động của enzyme này. Cụ thể, hoạt tính enzyme POX tăng đáng kể từ 1 - 6 NSCB và hoạt tính enzyme CAT tăng đáng kể từ 0 - 2 NSCB.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Swings J., Van Den Mooter M., Vauterin L., Hoste B., Gillis M., Mew T. W. *et al.* (1990). Reclassification of the causal agents of bacterial blight (*Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*) and bacterial leaf streak (*Xanthomonas campestris* pv. *oryzicola*) of rice as pathovars of *Xanthomonas oryzae* (ex Ishiyama 1922) sp. nov., nom. rev. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 40(3): 309 - 311
- Dinh H. D., Oanh N. K., Toan N. D., Du P. V., Loan L. C. (2008). Pathotype profile of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* isolates from the rice ecosystem in Cuu Long river Delta. *Omonrice*, 16: 34 - 40.
- Vũ Triệu Mân, Nguyễn Văn Tuất, Bùi Cách Tuyến, Phạm Văn Kim (2018). *Bệnh hại cây trồng Việt Nam*. Nxb Học viện Nông nghiệp Việt Nam, trang 107 - 113.
- Khan J. A., Siddiq R., Arshad H. M. I., Anwar H. S., Saleem K., Jamil F. F. (2012). Chemical control of bacterial leaf blight of rice caused by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Pak J Phytopathol*, 24(2), 97 - 100.
- Khoa N. D., Giau N. D. N., Tuan T. Q. (2016). Effects of *Serratia nematodiphila* CT-78 on rice bacterial leaf blight caused by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Biological Control*, 103, 1 - 10.
- Kumar A., Kumar R., Sengupta D., Das S. N., Pandey M. K., Bohra A. *et al.* (2020). Deployment of genetic and genomic tools toward gaining a better understanding of rice *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* interactions for development of durable bacterial blight resistant rice. *Frontiers in Plant Science*, 11: 1 - 23.
- Kloepper J. W., Tuzun S., Kuc J. A. (1992). Proposed definitions related to induced disease resistance. *Biocontrol Science and Technology*, 2(4): 349 - 351
- Khoa N. D., Xa T. V., Hao L. T. (2017). Disease-reducing effects of aqueous leaf extract of *Kalanchoe pinnata* on rice bacterial leaf blight caused by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* involve induced resistance. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 100: 57 - 66.
- Nguyễn Thị Thu Hương, Lâm Tấn Hào, Nguyễn Đắc Khoa (2018). Hiệu quả giảm bệnh và cơ chế kích kháng liên quan đến enzyme phenylalanine ammonia-lyase và polyphenol oxidase. *Tạp chí Khoa học, Trường Đại học Cần Thơ*, 54(7): 13.
- Xa T. V., Thoa T. K., Do N. D., Khoa N. D. (2023). Seed soaking using methanol *Kalanchoe pinnata* leaf extracts induces rice resistance against bacterial leaf blight. *International Journal of Plant Biology*, 14(4), 1155 - 1166.
- Xa T. V., Thoa T. K., Thu T. T. A., Khoa N. D. (2023). Effects of seed soaking and foliar spraying of *Kalanchoe pinnata* aqueous leaf extracts against rice bacterial leaf blight. *CTU Journal of Innovation and Sustainable Development*, 15(3), 12 - 22.
- Hanson C. (2013). Recent Advances in Liquid-Liquid Extraction. Pergamon press, pp. 429 - 465.
- Kagale S., Marimuthu T., Thayumanavan B., Nandakumar R., Samiyappan R. (2004). Antimicrobial activity and induction of systemic resistance in rice by leaf extract of *Datura metel* against *Rhizoctonia solani* and *Xanthomonas*

oryzae pv. *oryzae*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 65(2), 91 - 100.

14. Kleitman F., Shtienberg D., Blachinsky D., Oppenheim D., Zilberstaine M., Dror O., Manulis S. (2005). *Erwinia amylovora* populations resistant to oxolinic acid in Israel: prevalence, persistence and fitness. *Plant pathology*, 54(2), 108 - 115.

15. Kauffman, H. E., Reddy, A. P. K., Hsieh, S. P. Y., Merca, S. D. (1973). An Improved Technique for Evaluating Resistance of Rice Varieties to *Xanthomonas oryzae*. *Plant Disease Report*, 57, 737 - 741.

16. Mew T. W. (1993). Focus on Bacterial Blight of Rice. *Plant Disease*, 77(1): 5.

17. Hammerschmidt R., Nuckles E.M., Kuć J. (1982). Association of enhanced peroxidase activity with induced systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum lagenarium*. *Physiological Plant Pathology*, 20(1): 73 - 82.

18. Nisha S., Revathi K., Chandrasekaran R., Kirubakaran S. A., Sathish-Narayanan S., Stout M.J *et al.* (2012). Effect of plant compounds on induced activities of defense-related enzymes and pathogenesis related protein in bacterial blight disease susceptible rice plant. *Physiological and molecular plant pathology*, 80: 1 - 9.

19. Beers R., Sizer I. W. (1952). A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *Journal of Biological Chemistry*, 195(1): 133 - 140

20. Mayer A. M., Harel E., Ben-Shaul R. (1966). Assay of catechol oxidase-a critical comparison of methods. *Phytochemistry*, 5(4): 783 - 789

21. Dickerson D. P., Pascholati S. F., Hagerman A. E., Butler L. G., Nicholson R. L. (1984). Phenylalanine ammonia-lyase and hydroxycinnamate: CoA ligase in maize mesocotyls inoculated with *Helminthosporium maydis* or *Helminthosporium carbonum*. *Physiological Plant Pathology*, 25(2): 111 - 123

22. Govindappa M., Umesha S., Lokesh S. (2011). *Adhatoda vasica* leaf extract induces

resistance in rice against bacterial leaf blight disease (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*). *International Journal of Plant Physiology and Biochemistry*, 3(1): 6 - 14.

23. Leach J. E., Roberts P. D., Guo A., Barton-Willis P. (1989). Multiplication of *Xanthomonas capestri* pv. *oryzae* in rice leaves. *Bacterial blight of rice*, 1989: 43 - 53.

24. Niño-Liu D. O., Ronald P. C., Bogdanove A. J. (2006). *Xanthomonas oryzae* pathovars: Model pathogens of a model crop. *Molecular Plant Pathology*, 7(5): 303 - 324.

25. Shetty N. P., Mehrabi R., Lütken H., Haldrup A., Kema G. H. J., Collinge D. B. (2007). Role of hydrogen peroxide during the interaction between the hemibiotrophic fungal pathogen *Septoria tritici* and wheat. *New Phytologist*, 174(3): 637 - 647.

26. Sohag A. A. M., Tahjib-Ul-Arif M., Brestic M., Afrin S., Sakil M. A., Hossain M. T. (2020). Exogenous salicylic acid and hydrogen peroxide attenuate drought stress in rice. *Plant, Soil and Environment*, 66(1): 7 - 13.

27. Van Loon L. C., Rep M., Pieterse C. M. J. (2006). Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual Review of Phytopathology*, 44: 135 - 162

28. Trương Văn Xạ (2015). Khảo sát khả năng và cơ chế kích thích tính kháng bệnh cháy bìa lá lúa của dịch trích thực vật. Luận văn thạc sĩ Công nghệ sinh học, Trường Đại học Cần Thơ. 110 trang.

29. Garcion C., Lamotte O., Cacas J. L., Métraux J. P. (2014). Mechanisms of defence to pathogens: biochemistry and physiology. *Induced Resistance for Plant Defense*, 106 - 136.

30. Potato S., Tanaka Y., Matsuoka M., Yamamoto N., Ohashi Y., Kano-murakami Y. (1989). Structure and characterization of a cDNA clone for phenylalanine ammonia-lyase from cut-injured roots of sweet potato. *Plant Physiology*, 90(4), 1403 - 1407.

INVESTIGATION OF INDUCED RESISTANCE AGAINST RICE BACTERIAL LEAF BLIGHT OF
METHANOL *Kalanchoe pinnata* LEAF EXTRACTS USING FOLIAR SPRAYING

Nguyen Tran Bao Duy¹, Truong Van Xa², Nguyen Dac Khoa¹

¹Can Tho University

²Vinh Long University of Technology Education

Summary

Bacterial leaf blight caused by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* is one of the important diseases in rice fields. This study aims at testing for disease-reducing effects of methanol *Kalanchoe pinnata* leaf extracts using foliar spraying and investigating the mechanism involved in the observed disease reduction, focusing on induced resistance. The extracts were prepared by the liquid-liquid extraction method. Three spraying methods, i.e., (1) spraying at 14 days before inoculation (DBI), (2) at 7 DBI and (3) at both 14 and 7 DBI, using three extract concentrations (1, 1.5, 2%) were tested under greenhouse conditions. Spraying 14 DBI using 1% extract showed significant disease reduction similar to that of the chemical control (Starnar 20WP) at all disease assessment timepoints. Induced resistance involved in the observed disease reduction through activities of the four defense-related and/or antioxidant enzymes, i.e., peroxidase, catalase, polyphenol oxidase and phenylalanine ammonia lyase. Indeed, the activities of all enzymes increased in early stage with extract application and reached higher levels with both extract application and pathogen inoculation.

Keywords: Bacterial leaf blight, induced resistance, *Kalanchoe pinnata*, rice, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*.

Ngày nhận bài: 02/4/2024

Ngày gửi phản biện: 03/6/2024

Ngày thông qua phản biện: 16/6/2024

Ngày duyệt đăng: 23/7/2024