

# ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG PHÒNG TRỪ SINH HỌC BỆNH THÁN THƯ (*COLLETOTRICHUM OBICULARE* 104T) TRÊN CÂY DƯA LEO (*CUCUMIS SATIVUS* CV. TSUYATARO) CỦA MỘT SỐ DÒNG ACTINOMYCETES NỘI SINH

Trần Sỹ Hiếu<sup>1</sup>, Tomonori Shiraishi<sup>2</sup> và Kazuhiro Toyoda<sup>2</sup>

## ABSTRACT

*This study was carried out in order to evaluate tolerant characteristics to some stress conditions; protection capacity (Yoshida, 2009) against anthracnose (Colletotrichum orbiculare); and to examine Pathogenesis-related genes expression in cucumber plants. The three strains was evaluated tolerance capacity at different temperature regimes (23, 30, 35 and 40°C); in media supplemented with 0.5 and 1 M NaCl; and at different pH conditions (pH 4, 7 and 8). Bio-control activities was evaluated by spot challenge of C. orbiculare on true leaf surface of seedlings pretreated with Actinomyces strains. Results showed that A12 and A19 strain could adapt well to high temperature condition (35-40°C). A12 and A16 strain can adapt well to supplementation of NaCl 1M. All three strains can response well to both pH levels (4 and 8). Among the three candidates, A12 strain exerted the greatest protection effect which was reflected by significant declining ( $p < 0.01$ ) of both lesion area and lesion number. A12 strain at  $OD_{660}=2$  was determined to be the best concentration to be applied. Result of PR gene expression reflected that, PAL gene was expressed clearer in true leaves pretreated with A12 strain in comparison to that expressed in the other strains and control.*

**Keywords:** Actinomycetes, Streptomyces, Colletotrichum orbiculare 104T

**Title:** Evaluation of some endophytic Actinomycetes strains as biological control agents against anthracnose (Colletotrichum orbiculare strain 104T) on cucumber (Cucumis sativus cv. Tsuyataro)

## TÓM TẮT

*Đề tài được thực hiện nhằm đánh giá khả năng chống chịu với một số điều kiện stress, khả năng phòng trừ bệnh thán thư (Colletotrichum orbiculare) trên cây dưa leo và khảo sát sự biểu hiện của các gene liên quan đến sự hình thành bệnh (Yoshida, 2009). Ba dòng nấm được đánh giá ở các chế độ nhiệt độ (23, 30, 35 và 40°C), trong môi trường bổ sung NaCl (0,5 và 1M) và pH (4 và 8). Khả năng kiểm soát sinh học của ba dòng Actinomyces được đánh giá bằng cách nhỏ giọt dịch chứa C. orbiculare lên bề mặt của lá thật của cây con xử lý trước với Actinomycetes. Kết quả cho thấy hai dòng A12 và A19 có thể đáp ứng tốt với nhiệt độ 35 và 40°C. Dòng A12 và A16 đáp ứng tốt với nghiệm thức bổ sung 1M NaCl. Cả ba dòng có thể sinh trưởng tốt ở mức pH 4 và 8. Trong số ba dòng được đánh giá, A12 cho thấy khả năng phòng trị hiệu quả, làm giảm rõ rệt ( $p < 0.01$ ) số lượng và diện tích vết bệnh so với đối chứng. Dòng A12 ở mức  $OD_{660}=2$  cho kết quả phòng trị tốt nhất. Kết quả biểu hiện gene liên quan đến sự gây bệnh cho thấy lá thật xử lý với dòng A12 có mức biểu hiện gen PAL cao hơn so với đối chứng và các dòng khác.*

**Từ khóa:** Actinomycetes, Streptomyces pactum, Colletotrichum orbiculare dòng 104T

<sup>1</sup> Bộ môn Khoa Học Cây Trồng, Khoa Nông Nghiệp & Sinh Học Ứng Dụng, Trường Đại học Cần Thơ

<sup>2</sup> Graduate School of Natural Science and Technology, Okayama University, Japan

## 1 ĐẶT VẤN ĐỀ

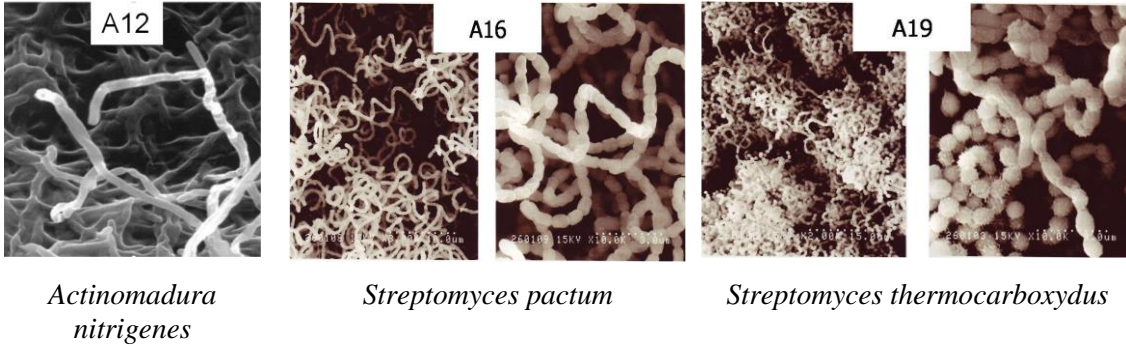
Nhiều nghiên cứu cho thấy các loài sinh vật nội sinh (endophytic microorganism) đem lại nhiều lợi ích cho cây trồng (Downing and Thomson, 2000; Strobel, 2003). Một số loài nấm và vi khuẩn nội sinh đã được phân lập và đánh giá tiềm năng phòng trừ sinh học, trong đó có nhiều loài đã và đang được thương mại hóa và sử dụng rộng rãi như *Trichoderma*, *Bacillus*. Benhamou *et al.* (1996) cho biết *Bacillus pumilus* dòng SE34 có thể phòng trừ bệnh thối rễ trên cây đậu do nấm *Fusarium oxysporum* f. sp. Pisi. Ngoài ra, Varma *et al.* (1999) đã xác định được hiệu quả thúc đẩy sinh trưởng trên nhiều loài cây trồng bởi loài nấm nội sinh *Piriformospora indica*. Các loài vi sinh vật nội sinh vừa có thể giúp phòng trừ bệnh vừa thúc đẩy sự sinh trưởng của cây ký chủ, do đó chúng hoàn toàn có thể được xem xét để phát triển thành các tác nhân phòng trừ sinh học và/hoặc thúc đẩy sinh trưởng. Một số tác giả đã nghiên cứu trên nhiều chủng Actinomycetes nội sinh bên trong nhiều loại cây trồng (Coombs and Franco, 2003; Shimizu *et al.*, 2000) có thể được phát triển thành các tác nhân phòng trừ sinh học. Trong số các loài Actinomycetes nội sinh, Streptomyces đã được áp dụng rộng rãi trên toàn thế giới trong phòng trừ nhiều loại bệnh phát sinh từ đất. Một điểm rất đáng chú ý ở Streptomyces nói riêng và Actinomyces nói chung là chúng có khả năng đối kháng mạnh (intense antagonist) thông qua việc sản xuất ra nhiều hoạt chất kháng nấm (El-Tarabilya and Sivasithamparam, 2006). Trong số các loài gây bệnh trên họ bầu bí, *Colletotrichum orbiculare* (*C. lagenarium*), gây bệnh thán thư, được xem là loài gây bệnh đáng ngại nhất (Kim and Chung, 2004; Meera *et al.*, 1995). Để kiểm soát bệnh này, biện pháp phổ biến nhất là dùng các loại thuốc trừ nấm như Azoxystrobin, Benomyl, Captan, TPN và Mancozeb (Shimizu *et al.*, 2000). Tuy nhiên, các loại thuốc đó hiện nay lại đang gây ra quan ngại về một số vấn đề như ô nhiễm môi trường, ảnh hưởng đến sức khỏe và nguy cơ bùng nổ kháng thuốc. Do đó, để giải quyết các vấn đề trên, nhu cầu phát triển và ứng dụng các tác nhân phòng trừ sinh học đang trở nên cấp thiết. Trong đề tài này, khả năng phòng trừ bệnh thán thư (*Colletotrichum orbiculare*) trên cây dưa leo của ba dòng Actinomyces đã được đánh giá. Ngoài ra, một số đặc tính chống chịu của các dòng đó cũng được khảo sát. Mục đích của thí nghiệm cuối của đề tài là nhằm xác định sự biểu hiện của một số gene liên quan đến sự hình thành bệnh (pathogenesis related –PR gene) trong cây dưa leo được xử lý với Actinomycetes.

## 2 PHƯƠNG TIỆN VÀ PHƯƠNG PHÁP

### 2.1 Phương tiện

- Giống dưa leo: Tsuyataro (*Cucumis sativus* cv. Tsuyataro).
- Loài gây bệnh: *Colletotrichum orbiculare* 104T.

Các dòng Actinomyces được sử dụng trong nghiên cứu là A12 (*Actinomadura nitrigenes*), A16 (*Streptomyces pactum*) và A19 (*Streptomyces thermocarboxydus*) được thu thập bởi Yoshida (2009) (Hình 1).



**Hình 1:** Các dòng nấm Actinomyces A12, A16 và A19 sử dụng trong nghiên cứu

## 2.2 Phương pháp

Đề tài được thực hiện tại phòng thí nghiệm Sinh Học Phân Tử Bệnh Học Thực Vật (Laboratory of Molecular Biology Plant Pathology), Khoa Nông Nghiệp, trường đại học Okayama, Nhật Bản, trong đó bao gồm ba thí nghiệm được thực hiện theo trình tự.

### 2.2.1 Đánh giá khả năng chống chịu của ba dòng Actinomyces đối với một số điều kiện môi trường bất lợi

Có ba yếu tố môi trường được đánh giá: ảnh hưởng của nhiệt độ, hàm lượng muối (NaCl) và pH. Trong thí nghiệm về nhiệt độ, ba dòng Actinomyces được nuôi cấy trong môi trường IMA-2 dạng lỏng, sau đó được ủ ở các điều kiện nhiệt độ khác nhau: 23; 30; 35 và 40°C. Tương tự như yếu tố nhiệt độ, thí nghiệm về ảnh hưởng của muối có 2 nghiệm thức bổ sung 0,5 và 1M NaCl. Đối với yếu tố pH, tác động của môi trường acid (pH=4) và base (pH=8) đã được khảo sát. Thử nuôi cấy lỏng trong hai thí nghiệm pH và muối được ủ ở nhiệt độ 30°C trong 4 ngày. Các thí nghiệm đều được lập lại ba lần, mỗi lần lập lại tương ứng với hai bình tam giác chứa 50 ml môi trường nuôi cấy IMA-2.

### 2.2.2 Đánh giá hiệu quả kiểm soát sinh học của ba dòng Actinomyces trên lá thật của cây dưa leo

Ba dòng Actinomyces được nuôi trong môi trường IMA-2 ở điều kiện nhiệt độ 30°C, 120 rpm (round per minute) trong 5 ngày. Sau đó, dịch treo Actinomycetes được dùng để lây nhiễm với hạt dưa leo nảy mầm trong 15 phút. Nồng độ dịch treo được điều chỉnh về mức OD<sub>660</sub>=1 trước khi lây nhiễm. Hạt giống dưa leo được khử trùng bằng ethanol 70% (1 phút) và NaClO 5% (5 phút) trước khi ủ nảy mầm ở nhiệt độ 26°C. Hạt sau khi lây nhiễm được gieo vào chậu có chứa hỗn hợp than bùn-vermiculite (1:1). Sau 3 tuần lưu trong phòng tăng trưởng (26°C), lá thật của cây con được cắt ra và lây nhiễm với dịch treo *C. lagenarium* (10<sup>6</sup> cfu), mỗi lá thật được lây nhiễm với 11 giọt (mỗi giọt 10 µl). Lá sau khi lây nhiễm được đặt trong môi trường ẩm độ cao trong 1 tuần. Diện tích và số lượng vết bệnh xuất hiện trên bề mặt lá được xác định bằng phần mềm Assess 2.0 (APS – American Plant Pathology Society) và đếm. Thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên, với 5 lần lập lại, mỗi lần lập lại có 4 cây con cho mỗi nghiệm thức lây nhiễm với Actinomycetes. Một thí nghiệm khác tương tự đã được thực hiện để xác định nồng độ lây nhiễm tốt nhất đối với dòng A12.

2.2.3 *Biểu hiện (gene expression) của một số gene liên quan đến sự gây bệnh (Pathogenesis relate-PR gene) bên trong cây dưa leo khi được lây nhiễm với 3 dòng Actinomyces*

Hạt nảy mầm được lây nhiễm tương tự như thí nghiệm trên (nồng độ các dịch treo Actinomycetes được chỉnh về OD<sub>660</sub>=1). Sau 3 tuần lưu trong phòng thí nghiệm, RNA tổng trong lá mầm và lá thật được ly trích theo quy trình được mô tả bởi công ty Invitrogen. Mẫu được nghiền trong nitor lỏng trước khi phá vách tế bào bằng dung dịch Trizol (Invitrogen Inc.). RNA tổng được trích trong hỗn hợp Iso-propanol và High Salt Precipitation Solution (Wako Chem.) với tỷ lệ 1:1 sau khi ly tâm ở 12.000 vòng. cDNA (complimentary DNA) được phiên mã ngược (reverse transcript) từ RNA tổng thu được với enzyme AMV Rnase (Takara Inc., Japan). Sau đó, một số gene thường trú (housekeeping gene) và PR được khuếch đại bằng phản ứng PCR với các đoạn mồi được mô tả bởi Shoresh *et al.* (2004). Các gene được khuếch đại bao gồm: EF1 $\alpha$  (housekeeping); Glu (1,3- glucanase); Chit (Chitinase); PAL (Phenyl alanine ammonia-lyase); POX (peroxidase); và LOX (lipoxygenase). Sau khi khuếch đại, sản phẩm PCR được tiến hành điện di (electrophoresis) với gel agarose 1.5% và nhuộm với Ethidium bromide. Mức độ biểu hiện của các gene khảo sát được đánh giá thông qua độ sáng của các vạch thể hiện trong hình điện di.

Tất cả các thí nghiệm (ngoại trừ thí nghiệm khảo sát sự chống chịu thuốc trừ nấm) được đề cập ở trên được phân tích biến lượng (ANOVA) để phát hiện sự khác biệt giữa các nghiệm thức bằng phần mềm SPSS version 16. Các giá trị trung bình được so sánh bằng phép thử Duncan ở mức ý nghĩa 5% và 1%.

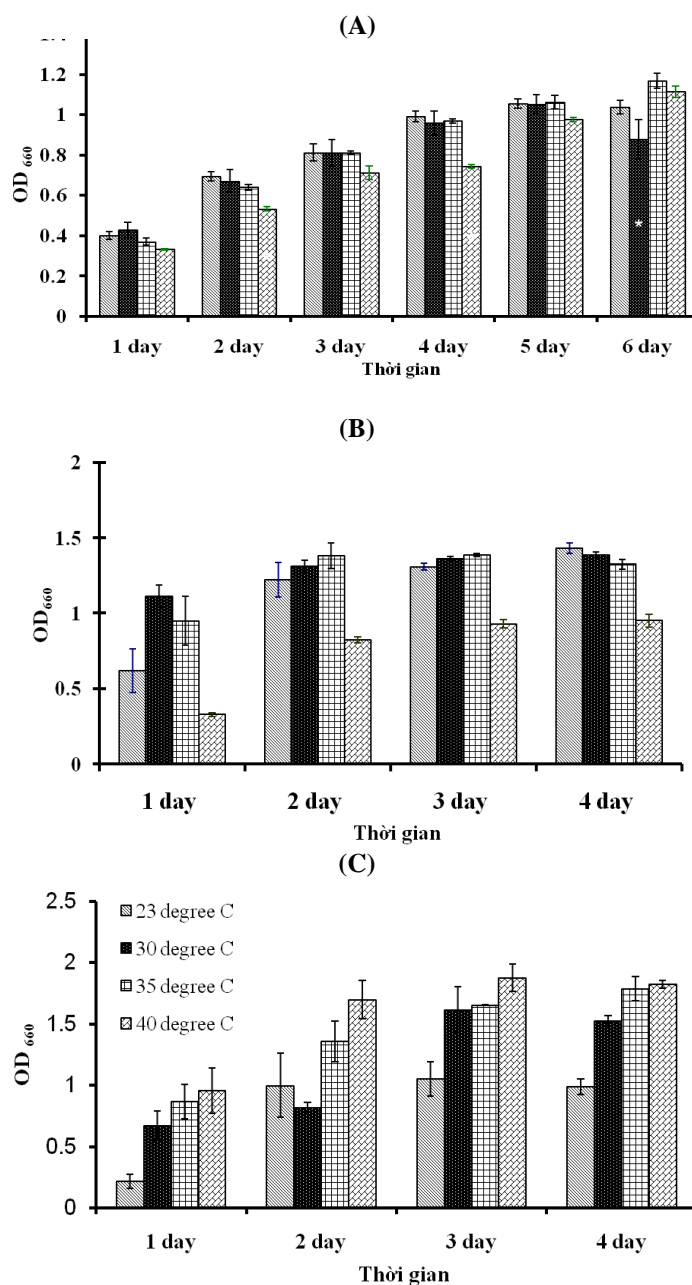
**3 KẾT QUẢ**

**3.1 Đánh giá khả năng chống chịu của ba dòng Actinomycetes đối với một số điều kiện môi trường bất lợi**

*3.1.1 Sự chống chịu các điều kiện môi trường bất lợi*

**Sự chống chịu nhiệt độ**

Đối với dòng A12, sự sinh trưởng ở nghiệm thức 40°C trong 4 ngày đầu tiên thấp hơn so với ở các nghiệm thức nhiệt độ khác (23, 30, 35°C), đặc biệt là ở ngày thứ 3 và thứ 4, khác biệt có ý nghĩa ở mức 5% (Hình 2). Tuy nhiên, ở ngày thứ 5 và thứ 6, tốc độ sinh trưởng ở các nghiệm thức khác giảm đi (giảm xuống ở nghiệm thức 30°C) dẫn đến sự khác biệt không có ý nghĩa giữa nghiệm thức 40°C và các nghiệm thức khác. Có thể thấy rằng, dòng A12 có thể chống chịu tốt ở dãy nhiệt độ từ 23-40°C, mặc dù ở những ngày đầu nuôi cấy sự sinh trưởng ở nhiệt độ 40°C thấp hơn so với ở các điều kiện nhiệt độ còn lại. Sự sinh trưởng của dòng A16 trong 4 ngày cho thấy, ở nhiệt độ 40°C, chỉ số OD<sub>660</sub> thấp hơn đáng kể so với các nghiệm thức nhiệt độ còn lại. Qua đó có thể kết luận rằng dòng A16 không thể chống chịu được nhiệt độ cao (40°C), và nhiệt độ thích hợp cho sự sinh trưởng của dòng A16 ở khoảng từ 23 đến 35°C. Ngược lại, kết quả cho thấy dòng A19 chỉ có thể phát triển tốt ở nhiệt độ tương đối cao, 35-40°C. Điều đó có thể thấy rõ nhất ở ngày nuôi cấy thứ 3 và 4, có sự khác biệt có ý nghĩa về mật thống kê giữa các nghiệm thức nhiệt độ.



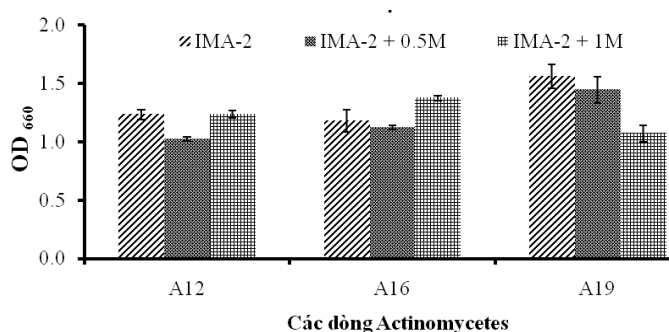
**Hình 2: Tác động của nhiệt độ lên sự sinh trưởng của ba dòng Actinomycetes, A12 (A); A16 (B); A19 (C)**

Chú thích: Các giá trị được biểu diễn trong đồ thị là giá trị trung bình của ba lần lặp lại. Các đường dọc trong mỗi cột biểu thị cho sai số chuẩn (SE).

**Sự chống chịu muối**

Vì thí nghiệm này được thực hiện chỉ nhằm xác định xem ba dòng Actinomycetes có đáp ứng được với tác động của môi trường có nồng độ muối cao hay không, do đó khả năng chống chịu muối của từng dòng đã không được so sánh với nhau trong kết quả thống kê. Hình 3 cho thấy, khi so sánh với sự sinh trưởng trên môi trường IMA-2 không bổ sung muối (đối chứng), dòng A12 có thể đáp ứng tốt với nghiệm thức bổ sung 1M NaCl. Tương tự, dòng A16 cũng cho thấy khả năng sinh trưởng tốt trong điều kiện có hàm lượng muối cao ở cả hai nghiệm thức bổ sung

0,5 và 1 M NaCl. Trái lại, dòng A19 chỉ có thể đáp ứng được với mức bổ sung 0,5 M NaCl.

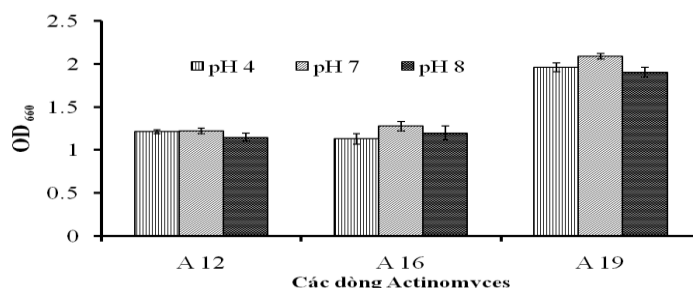


**Hình 3: Tác động của muối (NaCl) đến sự sinh trưởng của ba dòng Actinomycetes**

Chú thích: Các giá trị được biểu diễn trong đồ thị là giá trị trung bình của ba lần lặp lại. Các đường dọc trong mỗi cột biểu thị cho sai số chuẩn (SE).

### Sự chống chịu với điều kiện acid và base

Tương tự thí nghiệm về sự chống chịu muối, sự đáp ứng của ba dòng Actinomycetes đối với các điều kiện pH khác nhau không được so sánh trong quá trình thống kê số liệu, thay vào đó là so sánh tác động của các mức pH môi trường khác nhau trong cùng một dòng Actinomycetes. Kết quả thí nghiệm cho thấy không có sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê về chỉ số OD<sub>660</sub> giữa các mức độ pH môi trường ở cả 3 dòng (Hình 4). Nói cách khác, cả ba dòng Actinomycetes được khảo sát đều có khả năng đáp ứng tốt với cả hai điều kiện môi trường acid (pH=4) và base (pH=8).



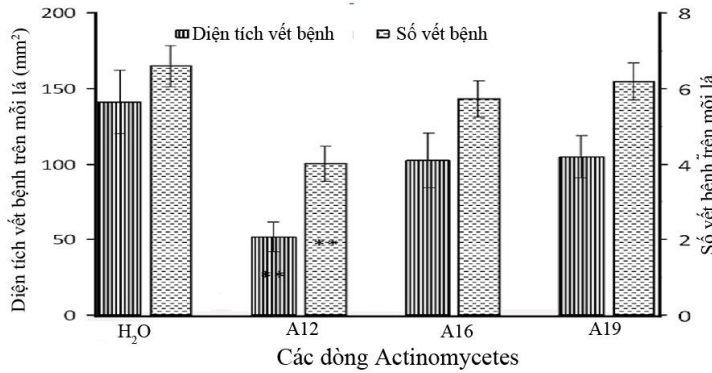
**Hình 4: Tác động của pH đến sự sinh trưởng của ba dòng Actinomycetes**

Chú thích: Các giá trị được biểu diễn trong đồ thị là giá trị trung bình của ba lần lặp lại. Các đường dọc trong mỗi cột biểu thị cho sai số chuẩn (SE).

### 3.2 Đánh giá hiệu quả kiểm soát sinh học của ba dòng Actinomycetes trên lá thật của cây dưa leo

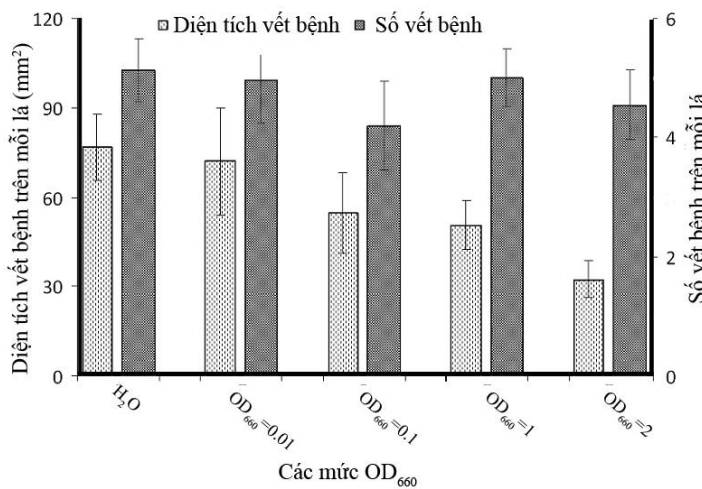
Bảy ngày sau khi lây nhiễm với *C. Obicularre*, có thể quan sát thấy trung bình có 6 vết bệnh hiện diện trên lá thật của cây con không được xử lý, trung bình của tổng diện tích vết bệnh là 140 mm<sup>2</sup> trên lá. Trái lại, đối với các cây con đã được xử lý trước với các dòng Actinomycetes, sự mở rộng của vết bệnh đã bị chặn lại (Hình 5) ở các mức độ khác nhau ở các dòng khác nhau. Việc xử lý hạt nảy mầm với dòng A16 và A19 làm giảm cả diện tích và số vết bệnh. Tuy nhiên, hiệu quả đạt được

thấp hơn so với xử lý với dòng A12 và khác biệt không có ý nghĩa thống kê so với đối chứng không xử lý. Kết quả cho thấy, hiệu quả đạt được cao nhất với dòng A12, cả diện tích và số vết bệnh giảm rõ rệt ( $p < 0.01$ ) khi so sánh với đối chứng. Bên cạnh đó, trong một thí nghiệm tương tự, trong số 5 nồng độ được đánh giá, dòng A12 được áp dụng ở mức  $OD_{660} = 2$  cho hiệu quả làm giảm diện tích và số bệnh tốt nhất (Hình 6). Có thể nhận thấy xu thế tăng dần hiệu quả cùng với sự tăng của nồng độ từ mức  $OD_{660} = 1$  cho đến 2, trong đó hiệu quả giảm diện tích và số bệnh ở mức  $OD_{660} = 0.01$  và 0.1 không khác biệt có ý nghĩa so với đối chứng.



**Hình 5: Diện tích và số vết bệnh gây ra bởi *C. obiculare* trên lá thật của cây dưa leo đã được lây nhiễm trước với các dòng Actinomyces**

Chú thích: Các giá trị được biểu diễn trong đồ thị là giá trị trung bình của năm lần lặp lại. Các đường dọc trong mỗi cột biểu thị cho sai số chuẩn (SE). (\*\*): khác biệt có ý nghĩa ở mức  $p < 0.01$



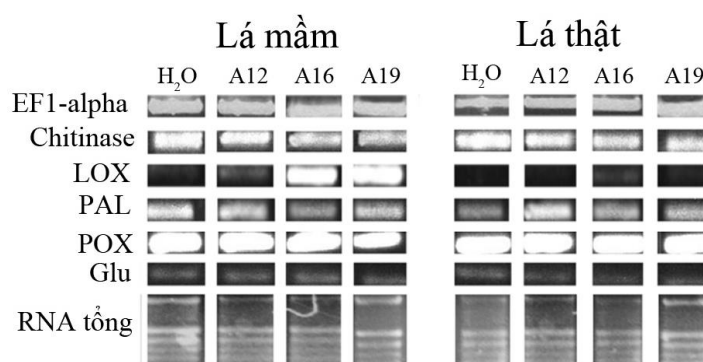
**Hình 6: Diện tích và số vết bệnh gây ra bởi *C. obiculare* trên lá thật của cây dưa leo đã được lây nhiễm trước với dòng A12 ở các mức OD<sub>660</sub> khác nhau**

Chú thích: Các giá trị được biểu diễn trong đồ thị là giá trị trung bình của năm lần lặp lại. Các đường dọc trong mỗi cột biểu thị cho sai số chuẩn (SE).

### 3.3 Biểu hiện (gene expression) của một số gene liên quan đến sự gây bệnh (Pahtogenesis relate-PR gene) bên trong cây dưa leo khi được lây nhiễm với 3 dòng Actinomyces

Trong số năm gene có liên quan đến hiện tượng Tính Kháng Hệ Thống Do Kích Ứng (Induced Systemic Resistance - ISR) (Shoresh *et al.*, 2004) được biểu hiện trong thí nghiệm này, ba gene POX (peroxidase), Glu ( $\beta$  1,3-glucanase) và

Chitinase được biểu hiện đồng đều nhau ở các nghiệm thức xử lý (Hình 7). Nói cách khác, gene POX, Glu ( $\beta$  1,3-glucanase) và Chitinase được biểu hiện trong cây dưa leo mà không cần đến sự tác động của các dòng Actinomyces lây nhiễm trước. Mặt khác, có thể thấy rõ ràng, ở lá thật của cây con được xử lý trước với A12 cho thấy sự biểu hiện của gene PAL (phenyl alanine amonia-lyase) rõ hơn so với các cây con lây nhiễm với các dòng Actinomyces khác (A16 và A19) và nghiệm thức đối chứng (xử lý với nước). Như đã đề cập ở thí nghiệm trên, dòng A12 cho hiệu quả tốt nhất trong việc làm giảm số lượng và diện tích vết bệnh. Do đó, biểu hiện rõ rệt của gene PAL dưới tác động của dòng A12 có thể liên quan đến kết quả đó. Ngoài ra, sự biểu hiện của gene LOX (lipoxygenase) cũng cho thấy sự khác biệt rõ rệt ở các nghiệm thức xử lý. Sự biểu hiện của gene này chỉ xảy ra ở lá mầm của cây dưa leo được xử lý trước với các dòng Actinmycetes, đặc biệt là hai dòng A16 và A19.



**Hình 7: Biểu hiện (gene expression) của một số gene liên quan đến sự hình thành bệnh (Pathogenesis Gene - PR) trong lá thật và lá mầm của cây dưa leo được xử lý trước với các dòng Actinomyces.**

Chú thích: các đoạn gene được khuếch đại có kích thước 200 bp (base pair), số chu kỳ khuếch đại, n=40

#### 4 THẢO LUẬN

Trong đề tài này, một số đặc tính chống chịu với các điều kiện bất lợi của ba dòng Actinomyces đã được xác định. Các đặc tính đó đóng vai trò quan trọng trong việc đánh giá các đối tượng tiềm năng có thể được sử dụng như trong phòng trừ sinh học. Khi được áp dụng ở vùng rễ hay vùng tán lá, các vi sinh vật được cho là chịu tác động bởi một số yếu tố như nhiệt độ, pH, lượng muối. Do đó, việc lựa chọn các tác nhân theo hướng chống chịu tốt với các điều kiện bất lợi và sự biến thiên của các điều kiện đó sẽ giúp làm tăng sự hiện diện của các tác nhân phòng trừ trên đồng ruộng, cũng như kéo dài hiệu quả phòng trừ đối với các mầm bệnh. Các kết quả cho thấy mức độ chống chịu có sự khác biệt giữa các dòng. A19 và A16 có thể phát triển tốt ở nhiệt độ cao (30-35°C) (40°C đối với A19), trong khi lại tăng sinh chậm ở nhiệt độ 23°C. Trái lại, A12 tăng sinh chậm ở nhiệt độ 40°C trong 3-4 ngày đầu. Ở ngày thứ năm và sáu, sự sinh trưởng của A12 ở 40°C lại trở nên tương đồng với hai nghiệm thức 23 và 35°C.

Sousa *et al.* (2008) cho biết phần lớn các chủng Actinomyces, phân lập từ vùng rễ và đất không thuộc vùng rễ, phát triển tốt ở môi trường pH trong khoảng 6,5 - 8,0. Khoảng pH đó cũng được cho là tối ưu đối với các giống Streptomyces (Lodders và Kämpfer, 2008). Theo đó, cả ba dòng Actinomyces trong đề tài này có khả



năng sống tốt ở môi trường pH 4.0-8.0. Điều đó phản ánh khả năng chống chịu tốt đối với điều kiện acid của ba dòng được khảo sát. Khoảng pH chống chịu được trong thí nghiệm này tương đồng với khoảng của dòng phân lập *Streptomyces* R-5 (pH từ 4,0 – 8,0, tối ưu ở pH 5 - 6) (Shimizu *et al.*, 2000).

Trong thí nghiệm của Sousa *et al.* (2008), sáu chủng phân lập được nuôi trên môi trường có bổ sung NaCl ở năm nồng độ khác nhau thay đổi từ 1-3%. Chỉ một dòng (AC92) phát triển mạnh ở mức bổ sung 3%. So với kết quả của thí nghiệm đó, cả ba dòng trong nghiên cứu này có khả năng sống tốt trong môi trường có lượng muối bổ sung tương đương 5,8%. Thêm vào đó, theo Killham và Firestone (1984), NaCl có khả năng ức chế sinh trưởng và giảm năng suất sinh trưởng của *Streptomyces griseus* và *Streptomyces californicus* mạnh hơn so với KCl ở hàm lượng bổ sung tương đương. Sự so sánh đó cho thấy khả năng chống chịu tốt của ba dòng Actinomycetes đối với muối.

Các cơ chế giúp các tác nhân kiểm soát sinh học làm tổn hại đến các sinh vật gây bệnh bao gồm kháng sinh (antibiosis), ký sinh (parasitism), cạnh tranh dinh dưỡng, không gian và kích ứng tính kháng (induction of disease resistance) trong cây ký chủ (Driesche and Bellows, 1996). Như đã được làm rõ trong các thí nghiệm trên, trong số ba dòng Actinomycetes được khảo sát, A12 được xác định là dòng có khả năng hạn chế sự phát triển của bệnh thán thư. Kết luận đó được rút ra sự khác biệt có ý nghĩa trong việc làm giảm số lượng và diện tích vết bệnh trên lá thật của cây dưa leo khi so sánh hiệu quả đạt được của A12 các dòng khác, và nghiệm thức đối chứng. Các kết quả của Yoshida (2009) cho thấy không thể phân lập lại (re-isolate) các dòng Actinomycetes kể trên từ lá thật thứ nhất và thứ hai của cây dưa leo được lây nhiễm trước với cùng các tác nhân đó. Hơn nữa, không có hoạt động đối kháng diễn ra trong các thí nghiệm quan sát đặc tính đối kháng và kháng sinh (Yoshida, 2009). Sự suy giảm tỷ lệ bệnh gây ra bởi ba dòng Actinomycetes, do đó được dự đoán có liên quan đến tính kháng hệ thống đạt được do kích ứng (Induced Systemic Resistance - ISR). Sự kích hoạt các gene liên quan sự hình thành bệnh (Pathogenesis Related – PR gene), cần thiết cho việc gia tăng lượng phân tử acid salicylic (SA) trong cả mô bị xâm nhiễm và không bị xâm nhiễm, được cho là có liên quan đến sự đáp ứng của tính kháng hệ thống đạt được (Systemic Acquired Resistance – SAR) (Sticher *et al.*, 1997). Bên cạnh đó, sự xâm nhập của các vi khuẩn sống trong rễ có khả năng gây ra ISR. Một số tác giả cho biết ISR không phụ thuộc vào con đường tín hiệu SA (SA signaling pathway), nhưng lại yêu cầu sự tham gia của một số thành phần thuộc con đường truyền tín hiệu JA (Jasmonic acid – JA signaling pathway) và được nối tiếp bởi con đường truyền tín hiệu ethylene (ethylene signaling pathway) (Loon *et al.*, 1998; Pieterse *et al.*, 1996; Pieterse và *et al.*, 2000). Theo đó, gene mã hóa cho phenylalanine ammoni lyase (PAL) được cho là được kích hoạt bởi con đường tín hiệu JA trong tình huống cây bị kích ứng các phản ứng phòng vệ. PAL, enzyme đầu tiên trong con đường sinh tổng hợp phenyl propanoid (có sự tham gia của peroxidase), cũng được kích ứng trong các phản ứng kháng. Như đã đề cập trong phần kết quả liên quan đến hoạt động kiểm soát sinh học, A12 làm giảm số lượng và diện tích vết bệnh hiệu quả nhất. Do đó, biểu hiện rõ rệt của PAL trong lá thật được xử lý với A12 có thể liên quan đến kết quả đó. Tuy nhiên, cần tiến hành nhiều thí nghiệm hơn nữa để rút ra

kết luận về sự tham gia của con đường tín hiệu JA/ethylene hoặc SA trong tính kháng đạt được dưới sự tác động của A12.

## 5 KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

### 5.1 Kết luận

- Hai dòng A12 và A19 có thể đáp ứng tốt với điều kiện nhiệt độ cao (35-40°C). Dòng A12 và A16 có thể đáp ứng tốt với nghiệm thức bổ sung NaCl (1M) ở mức cao nhất. Cả ba dòng có thể sinh trưởng tốt trong cả hai điều kiện acid và base.
- Trong số ba dòng được đánh giá, A12 cho thấy khả năng phòng trị hiệu quả nhất thể hiện qua sự giảm rõ rệt ( $P < 0.01$ ) số lượng và diện tích vết bệnh khi so với đối chứng. Dòng A12 ở nồng độ tương ứng với  $OD_{660}=2$  cho kết quả phòng trị tốt nhất.
- Kết quả liên quan đến sự biểu hiện gene liên quan đến sự gây bệnh cho thấy lá thật xử lý với dòng A12 có mức biểu hiện gen PAL cao hơn so với đối chứng và các dòng khác.

### 5.2 Đề nghị

- Có thể thực hiện thêm một số thí nghiệm để tối ưu hóa quá trình nuôi cấy dòng A12 phù hợp cho việc sản xuất chế phẩm ứng dụng.
- Cần tiến hành thêm một số thí nghiệm sinh học phân tử để làm rõ thêm cơ chế truyền tín hiệu trong quá trình hình thành tính kháng dưới tác động của ba dòng Actinomyces.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Benhamou N., J.W. Kloepper, A. Quadt-Hallman, and S.Tuzun 1996. Induction of defense-related ultrastructural modifications in pea root tissues inoculated with endophytic bacteria. *Plant Physiol* 112:919–929.
- Coombs J.T., and C.M.M. Franco 2003. Isolation and identification of actinobacteria from surface-sterilized wheat roots. *Appl Environ. Microbiol* 69:5603-5608.
- Downing K.J., and J.A. Thomson 2000. Introduction of the *Serratia marcescens* chiA gene into an endophytic *Pseudomonas fluorescens* for the biocontrol of phytopathogenic fungi. *Can J. Microbiol* 46:363-369.
- Driesche R.G.v., and T.S.J. Bellows 1996. *Biological control*. Chapman & Hall, New York.
- El-Tarabilya K.A., and K. Sivasithamparam 2006. Non-streptomycete actinomycetes as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. *Soil Biology & Biochemistry* 38 15.
- Killham K., and M.K. Firestone 1984. Salt Stress Control of Intracellular Solutes in Streptomycetes Indigenous to Saline Soils. *Applied And Environmental Microbiology* 47: 301-306.
- Kim P.I., and K.-C. Chung 2004. Production of an antifungal protein for control of *Colletotrichum lagenarium* by *Bacillus amyloliquefaciens* MET0908. *FEMS Microbiol Lett* 234:177-183.
- Lodders N., and P. Kämpfer 2008. Streptomycetaceae: Phylogeny, Ecology and Pathogenicity, *Encyclopedia of Life Science*, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester.
- Loon L.C.v., P.A.H.M. Bakker, and C.M.J. Pieterse 1998. Systemic Resistance induced by Rhizobacteria *Annu. Rev. Phytopathol.* : 36:453-483.

- Meera M.S., M.B. Shivanna, K. Kageyama, and M. Hyakumachi 1995. Responses of cucumber cultivars to induction of systemic resistance against anthracnose by plant growth promoting fungi. *Eur J Plant Pathol* 101:421-430.
- Shimizu M., Y. Nakagawa, Y. Sato, T. Furumai, Y. Igarashi, H. Onaka, R. Yoshida, and H. Kunoh 2000. Studies on Endophytic Actinomycetes (I) *Streptomyces* sp. Isolated from *Rhododendron* and Its Antifungal Activity. *J.Gen.Plant Pathol.* 66:360-366.
- Pieterse C.M.J., S.C.M.v. Wees, E. Hoffland, J.A.v. Pelt, and L.C.v. Loon 1996. Systemic Resistance in *Arabidopsis* Induced by Biocontrol Bacteria is Independent of Salicylic Acid Accumulation and Pathogenesis-Related Gene Expression. *The Plant Cell* 8:1225-1237.
- Pieterse C.M.J., J.A.V. Pelt, J. Ton, S. Parchmann, M.J. Mueller, A.J. Buchala, J.-P. Meatraux, and L.C.V. Loon 2000. Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance (ISR) in *Arabidopsis* requires sensitivity to jasmonate and ethylene but is not accompanied by an increase in their production. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 57:123±134.
- Shoresh M., I. Yedida, and I. Chet. 2004. Involvement of Jasmonic Acid/ Ethylene Signaling Pathway in the Systemic Resistance Induced in Cucumber by *Trichoderma asperellum* T203. *Phytopathology* Vol. 95, No. 1
- Sousa C.d.S., A.C.F. Soares, and M.d.S. Garrido 2008. Characterization of *Streptomyces* with potential to promote plant growth and biocontrol. *Sci. Agric. (Piracicaba, Braz.)* 65:50-55.
- Sticher L., B. Mauch-Mani, and J.P. Mestrauch 1997. Systemic acquired resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 35:235-270.
- Strobel G.A. 2003. Endophytes as sources of bioactive products. *Microbes Infect* 5:535-544.
- Varma A., S. Verma, Sudha, N. Sahay, and B. Butehorn, 1999. *Piriformospora indica*, a cultivable plant-growth-promoting root endophyte. *Appl Environ Microbiol* 65:2741-2744.
- Yoshida M. 2009. Isolation and Characterization of Endophytic *Streptomyces* as Biocontrol Agent. Master Thesis. Okayama University.