

NGHIÊN CỨU KHẢ NĂNG KÍCH KHÁNG BỆNH THÁN THƯ CỦA CHỦNG NẤM *Penicillium citrinum* CTND-2405 TRÊN CÂY HÚNG QUẾ

Huỳnh Hữu Trí¹, Nguyễn Thị Thùy Dung¹,
Trần Nghĩa Trình Du¹, Nguyễn Phúc Hậu¹, Trần Thị Bích Quyên², Lê Thanh Toàn^{1*}

¹Trường Nông nghiệp, Trường Đại học Cần Thơ

²Trường Bách khoa, Trường Đại học Cần Thơ

*Tác giả liên hệ: ltoan@ctu.edu.vn

Ngày nhận bài: 31.10.2024

Ngày chấp nhận đăng: 21.01.2025

TÓM TẮT

Những chủng nấm vùng rễ được biết đến với khả năng đối kháng với các tác nhân gây bệnh thực vật, thúc đẩy tăng trưởng và kích thích cây trồng kháng bệnh. Nghiên cứu này nhằm đánh giá tiềm năng ứng dụng của *Penicillium citrinum* CTND-2405 làm tác nhân kích kháng giúp cây húng quế (*Ocimum basilicum* L.) chống lại bệnh thán thư do *Colletotrichum* sp. gây ra. Hạt húng quế được ngâm 4 giờ trong huyền phù bào tử *P. citrinum* (10^6 cfu/ml) hoặc nước cất thanh trùng, có hoặc không có lây bệnh nhân tạo với nấm *Colletotrichum* sp. được ghi nhận sự tích tụ polyphenol và phản ứng huỳnh quang trong mô lá. Trong thí nghiệm nhà lưới, năm phương pháp xử lý đã được thử nghiệm: ngâm hạt bằng bào tử *P. citrinum*, ngâm trong nước cất thanh trùng, tưới bổ sung 10ml bào tử sau 3, 6 và 9 ngày sau khi trồng và nghiệm thức thuốc trừ bệnh hóa học. Kết quả ghi nhận, ngâm hạt húng quế bằng bào tử nấm *P. citrinum* sau đó lây bệnh nhân tạo đã ghi nhận sự tích lũy polyphenol và phát huỳnh quang vạch tế bào sớm và nhiều hơn so với các nghiệm thức còn lại. Kết hợp ngâm hạt húng quế và tưới bổ sung bào tử nấm đã làm giảm tỷ lệ bệnh và chỉ số bệnh thán thư, hiệu quả giảm bệnh lên đến 59,92% so với nghiệm thức đối chứng.

Từ khóa: *Colletotrichum* sp., húng quế, kích kháng, *Penicillium citrinum*, phòng trừ sinh học.

Induced Resistance Potential of *Penicillium citrinum* CTND-2405 against anthracnose disease on basil (*Ocimum basilicum* L.)

ABSTRACT

Rhizosphere fungi are known for their ability to antagonize plant pathogens, promote growth, and induce disease resistance in plants. This study aimed to evaluate the potential of *Penicillium citrinum* CTND-2405, isolated from rhizospheric soil, in inducing resistance on basil (*Ocimum basilicum* L.) against anthracnose caused by *Colletotrichum* sp. Basil seeds were soaked for 4 hours in either a spore suspension of *P. citrinum* (10^6 cfu/ml) or sterile water, with or without artificial inoculation of *Colletotrichum* sp. Polyphenolic accumulation and fluorescence responses in leaf tissues were observed under a fluorescence microscope. In greenhouse experiments, five treatments were tested: seed soaking with *P. citrinum* spores, soaking in sterile water, additional spore applications at 3, 6, 9 days post-planting, and chemical fungicide applications. Results showed that seed soaking with *P. citrinum* followed by pathogen inoculation triggered earlier and stronger polyphenolic accumulation and fluorescence responses. Combining seed soaking with spore applications further reduced anthracnose incidence and severity, and disease control efficiency up to 59.92% compared with the control treatment.

Keywords: Biological control, *Colletotrichum* sp., induced resistance, basil, *Penicillium citrinum*.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây húng quế (*Ocimum basilicum* L.) thuộc họ Lamiaceae, có nguồn gốc từ châu Á và được

trồng phổ biến trên thế giới. Ở Việt Nam, húng quế được dùng như loại rau gia vị phổ trong cuộc sống hằng ngày (Phạm Thị Minh Tâm & Nguyễn Thị Huệ, 2018). Bên cạnh đó, húng quế

còn được dùng trong y học và chiết xuất tinh dầu (Nguyễn Thị Thanh & cs., 2023). Trong quá trình canh tác, sự tấn công của bệnh thán thư hay còn gọi là bệnh đốm đen do nấm *Colletotrichum* spp. đã ảnh hưởng đến năng suất, chất lượng của cây húng quế và được ghi nhận là mầm bệnh quan trọng trên cây húng quế trong những năm gần đây (Cacciola & cs., 2020; Ismail & cs., 2021; Martino & cs., 2022).

Hiện nay, việc phòng trị bệnh thán thư trên cây húng quế chủ yếu bằng biện pháp hóa học, biện pháp này mang lại hiệu quả nhanh chóng nhưng cũng tiềm ẩn nhiều nguy cơ. Sử dụng biện pháp hóa học trong thời gian dài và lạm dụng thuốc hóa học làm ảnh hưởng đến sự an toàn của nông sản, nguy cơ dẫn đến mầm bệnh kháng thuốc hóa học (Cortaga & cs., 2023), các vấn đề về môi trường như ô nhiễm nguồn nước, đất, làm mất cân bằng hệ sinh thái cũng như ảnh hưởng đến sức khỏe con người (Tsalidis, 2022).

Nghiên cứu các biện pháp phòng trừ sinh học được xem là hướng đi đầy tiềm năng, đặc biệt là sử dụng các vi sinh vật có lợi đối kháng với các tác nhân gây bệnh trên cây trồng, kích thích cây trồng tăng trưởng và kháng lại mầm bệnh (Jaiswal & cs., 2022). Một số nghiên cứu chỉ ra rằng, nấm *Penicillium* spp. có khả năng ức chế và làm giảm sự nghiêm trọng của mầm bệnh trên cây trồng (Alam & cs., 2011; Elsharkawy & cs., 2012). Điều này liên quan đến phản ứng phòng vệ của cây khi được xử lý tác nhân kích kháng, thông qua sự tích tụ polyphenol có thể quan sát thấy trong mô thực vật khi được nhuộm với Toluidine Blue O (TBO) và hình thành callose tạo phản ứng phát huỳnh quang khi nhuộm với Aniline Blue, đóng vai trò quan trọng trong việc hạn chế sự xâm nhập và lan rộng của nấm bệnh (Daayf & cs., 2012; Ge & cs., 2013; Ellinger & Voigt, 2014; Wang & cs., 2021). Trong nghiên cứu này, chủng nấm *Penicillium citrinum* CTND-2405 được phân lập từ đất vùng rễ cây trồng đã được đánh giá khả năng kích kháng trên cây húng quế chống lại bệnh thán thư qua khảo sát cấu trúc mô lá và hiệu lực phòng trừ trong điều kiện nhà lưới.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Nguồn nấm: Chủng nấm vùng rễ *Penicillium citrinum* CTND-2405 mã số truy cập MH665234.1. (Lê Thanh Toàn & Phạm Văn Hướng, 2021) và nấm *Colletotrichum* sp. gây bệnh thán thư đã phân lập từ lá húng quế được cung cấp từ Phòng Thí nghiệm Phòng trừ Sinh học, Khoa Bảo vệ Thực vật, Trường Nông nghiệp, Trường Đại học Cần Thơ.

Hạt giống: Hạt giống cây húng quế (*Ocimum basilicum* L.) (Công ty TNHH giống cây trồng Phú Nông)

Hóa chất: Thuốc trừ bệnh gốc Hexaconazole, sản phẩm thương mại có tên Anvil 5SC (Công ty TNHH Syngenta Việt Nam).

2.2. Khảo sát sự tích tụ polyphenol sau khi xử lý nấm có lợi *Penicillium citrinum* CTND-2405 giúp cây húng quế chống chịu bệnh thán thư

Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên (HTNN) 1 nhân tố gồm 4 nghiệm thức với 5 lần lặp lại, mỗi lần lặp lại là 2 cây húng quế trồng trong 1 chậu.

Nghiệm thức 1: Peni-CLB (Xử lý *P. citrinum* CTND-2405 + Lây bệnh nhân tạo);

Nghiệm thức 2: Peni-KLB (Xử lý *P. citrinum* CTND-2405 + Không lây bệnh nhân tạo);

Nghiệm thức 3: K-Peni-CLB (Không xử lý *P. citrinum* CTND-2405 + Lây bệnh nhân tạo);

Nghiệm thức 4: K-Peni-KLB (Không xử lý *P. citrinum* CTND-2405 + Không lây bệnh nhân tạo);

Các bước chuẩn bị: nấm *Colletotrichum* sp. nuôi cấy 7 ngày trên môi trường PDA và nấm *P. citrinum* CTND-2405 nuôi cấy 10 ngày trên môi trường PDA. Huyền phù bào tử nấm được xác định mật số đưa về mật số 10^6 cfu/ml khi bố trí thí nghiệm.

Hạt húng quế được khử trùng bề mặt bằng cách ngâm hạt trong NaOCl 2% trong 5 phút, rửa sạch 2 lần với nước cất thanh trùng và

ngâm trong huyền phù bào tử *P. citrinum* CTND-2405 ở mật số 10^6 cfu/ml hoặc nước cất 4 giờ, sau đó đặt trong hộp nhựa có lớp giấy ẩm 2-3 ngày để hạt nảy mầm. Sau đó, hạt được gieo vào khay ươm chứa hỗn hợp đất: mùn tỷ lệ (1:1). Mười ngày sau khi gieo (NSKG): 2 cây con được trồng vào chậu nhựa chứa 0,5kg hỗn hợp đất: mùn tỷ lệ (1:1) và được đặt trong nhà lưới để theo dõi sự sinh trưởng và phát triển. Tiến hành lây bệnh nhân tạo ở giai đoạn 10 ngày sau khi trồng (NSKT). Các chậu cây được chuyển vào phòng ủ bệnh được che tối hoàn toàn bằng tấm nilon đen, lây bệnh nhân tạo bằng cách phun 10ml huyền phù bào tử nấm *Colletotrichum* sp. cho mỗi chậu ở mật số 10^6 cfu/ml. Cây húng quế sau khi được đặt trong phòng ủ bệnh 24 giờ, nhiệt độ 25°C, ẩm độ khoảng 95% thì được chuyển ra nhà lưới có che mát.

Phương pháp thu mẫu lá: mẫu lá húng quế được thu ở thời điểm 24, 48 và 72 giờ sau lây bệnh (GSLB) để khảo sát sự tích tụ polyphenol. Lá được tẩy diệt lục tố bằng ethanol-acetic acid (3:1). Thay giấy thấm và dung dịch ethanol-acetic acid mỗi ngày cho đến khi mẫu lá không còn màu xanh của diệt lục tố. Sau đó, chuyển mẫu vào nước cất 1 giờ và giữ trong lactoglycerol (lactic acid + glycerol + nước cất theo tỷ lệ 1:1:1) đến khi quan sát. Mẫu được quan sát với Toluidine Blue O (0,05%; pH 6,8) ở nhiệt độ 60°C trong 1 giờ và quan sát bằng kính hiển vi quang học. Mỗi lặp lại quan sát 2 lá, mỗi lá quan sát ngẫu nhiên 20 vị trí có bào tử nấm.

Chỉ tiêu ghi nhận: số lượng tế bào phản ứng tích tụ polyphenol (tế bào có màu xanh lá cây) theo 3 mức độ (+) tế bào màu xanh lá cây nhạt, (++) tế bào màu xanh lá cây trung bình, (+++) tế bào màu xanh lá cây đậm (De Neergaard, 1997).

2.3. Khảo sát phản ứng phát huỳnh quang của tế bào sau khi xử lý nấm có lợi *Penicillium citrinum* CTND-2405 kích thích cây húng quế chống chịu bệnh thán thư

Thí nghiệm được bố trí HTNN, 1 nhân tố gồm 4 nghiệm thức (tương tự như thí nghiệm

2.2) với 5 lần lặp lại, mỗi lần lặp lại là 1 cây húng quế trồng trong 1 chậu.

Các chủng vi sinh vật dùng trong thí nghiệm và cây húng quế được gieo trồng, chăm sóc và lây bệnh nhân tạo như được mô tả ở thí nghiệm 2.2.

Phương pháp thu mẫu lá: mẫu lá húng quế được thu vào thời điểm 24 và 48 GSLB và tiến hành tẩy diệt lục tố tương tự như thí nghiệm 2.2.

Chỉ tiêu ghi nhận: lá được quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang (bước sóng 400-440nm) bằng cách nhuộm trong dung dịch Aniline Blue 0,5%. Sau khi làm trong mô lá thì mẫu lá được quan sát ngay ở kính hiển vi huỳnh quang. Ghi nhận chỉ tiêu với 4 lần lặp lại, mỗi lặp lại quan sát ngẫu nhiên 100 đĩa áp (quan sát 4 lá, mỗi lá quan sát ngẫu nhiên 25 đĩa áp và 25 khí khổng). Ghi nhận phần trăm đĩa áp và khí khổng phát sáng tế bào, số lượng tế bào phát sáng và đánh giá mức độ phát sáng của tế bào theo 3 mức độ: “+” (tế bào phát sáng màu vàng nhạt): “++” (tế bào phát sáng ở mức trung bình) và “+++” (tế bào phát sáng có màu vàng đậm).

Từ đó, lá được xác định phần trăm đĩa áp và khí khổng tạo sự phát sáng tế bào. Phần trăm đĩa áp, khí khổng tạo sự phát sáng tế bào ở mức độ “+”, “++” và “+++” và số lượng tế bào phát sáng trên mỗi đĩa áp theo các công thức (1): (2) và (3).

$$\text{Tỷ lệ đĩa áp tạo phản ứng phát sáng (\%)} = \frac{\text{Số đĩa áp tạo phản ứng phát sáng}}{\text{Số đĩa áp quan sát}} \times 100 \quad (1)$$

$$\text{Số lượng vách tế bào phát sáng/ đĩa áp} = \frac{\text{Tổng số tế bào phát sáng}}{\text{Số đĩa áp tạo phản ứng phát sáng}} \times 100 \quad (2)$$

$$\text{Phần trăm đĩa áp tạo phát sáng ở mức +} = \frac{\text{Số đĩa áp tạo phát sáng ở mức “+”}}{\text{Số đĩa áp tạo phản ứng phát sáng}} \times 100 \quad (3)$$

Tính tương tự đối với mức “++”, “+++” và với chỉ tiêu khí khổng.

2.4. Khảo sát khả năng nấm *Penicillium citrinum* CTND-2405 giúp cây húng quế chống chịu bệnh thán thư trong điều kiện nhà lưới

Thí nghiệm được bố trí HTNN, một nhân tố, 5 nghiệm thức (Bảng 1): 4 lặp lại và mỗi lần lặp lại 2 cây húng quế.

Lá húng quế sau khi lây bệnh được quan sát và ghi nhận vết bệnh thán thư vào các thời điểm 5, 7 và 9 ngày sau lây bệnh (NSLB). Bệnh trên lá được đánh giá cấp bệnh theo Thang đánh giá của Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia về khảo nghiệm trên đồng ruộng hiệu lực phòng trừ bệnh thán thư của các thuốc trừ bệnh:

$$\text{Tỷ lệ bệnh (\%)} = \frac{\text{Số lá bị bệnh}}{\text{Tổng số lá điều tra}} \times 100$$

$$\text{Chỉ số bệnh (\%)} = \frac{9n_9 + 7n_7 + 5n_5 + 3n_3 + n_1}{9N} \times 100$$

Trong đó: n1 (số lá ở cấp 1 với $\leq 5\%$ diện tích lá bị bệnh, vết bệnh tròn nhỏ); n3 (số lá ở cấp 3 với $> 5-15\%$ diện tích lá bị bệnh, vết bệnh lõm xuống); n5 (số lá ở cấp 5 với $> 15-25\%$ diện tích lá bị bệnh, vết bệnh có màu đen); n7 (số lá ở cấp 7 với $> 25-50\%$ diện tích lá bị bệnh, vết bệnh biến màu thối đen); n9 (số lá ở cấp 9 với $> 50\%$ diện tích lá bị bệnh, xuất hiện nhiều vết bệnh trên lá, các vết bệnh có liên kết lại với nhau) và N (tổng số lá khảo sát).

Hiệu quả giảm bệnh (HQGB) được tính theo công thức:

$$\text{HQGB (\%)} = \frac{\text{CSB đối chứng} - \text{CSB xử lý}}{\text{CSB đối chứng}} \times 100 \%$$

Trong đó: HQGB (hiệu quả giảm bệnh); CSB đối chứng (chỉ số bệnh nghiệm thức đối chứng) và CSB xử lý (chỉ số bệnh nghiệm thức xử lý).

2.5. Phân tích số liệu

Số liệu được tổng hợp, xử lý bằng phần mềm

Microsoft Excel 2019. Phân tích ANOVA thí nghiệm một nhân tố và so sánh sự khác biệt giữa các nghiệm thức được thực hiện bằng phần mềm SPSS 26 với phép thử Duncan ở mức ý nghĩa 5%.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Sự tích tụ polyphenol sau khi xử lý nấm có lợi *Penicillium citrinum* CTND-2405 giúp cây húng quế chống chịu bệnh thán thư

Kết quả khảo sát sự tích tụ polyphenol trong mô lá tại thời điểm 24 GSLB (Bảng 2) đã ghi nhận sự xuất hiện tế bào có màu xanh lá cây khi nhuộm với Toluidine Blue O ở vùng tế bào có bào tử nấm bệnh ở tất cả các nghiệm thức ngoại trừ nghiệm thức K-Peni-KLB. Trung bình, số tế bào tích tụ hợp chất polyphenol ở mức “+” ghi nhận nghiệm thức Peni-CLB (47,6) cao hơn và khác biệt có nghĩa thống kê so với các nghiệm thức còn lại, kể đến là nghiệm thức K-Peni-CLB (32,9) và Peni-KLB (27,2). Ở thời điểm 24 GSLB, chỉ ghi nhận nghiệm thức Peni-CLB có mức độ tích tụ polyphenol “++” với số lượng tế bào trung bình là 12,0.

Ở thời điểm 48 GSLB, mức độ tích tụ polyphenol “+”, “++” và “+++” ở nghiệm thức xử lý Peni-CLB lần lượt là 43,0; 29,5 và 12,4 tế bào và tại 72 GSLB (29,4; 37,0 và 32,5 tế bào) đều cao hơn và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức K-Peni-CLB cũng như Peni-KLB. Điều này cho thấy khi xử lý ngâm hạt húng quế với nấm *Penicillium citrinum* CTND-2405 và có lây bệnh nhân tạo đã giúp tế bào húng quế tích tụ polyphenol sớm và nhiều hơn so với các nghiệm thức còn lại, điều này liên quan đến sự thay đổi vách tế bào làm cho các tế bào kháng lại các enzyme do nấm tiết ra (Hình 1). Khi mầm bệnh tấn công, cây trồng sẽ phản ứng và tổng hợp nhanh tại vị trí xâm nhiễm để hạn chế sự tấn công và phát triển của mầm bệnh bằng phản ứng siêu nhạy cảm HR (Hypersensitive response) giúp cây trồng chống lại sự tấn công của mầm bệnh (Trần Thị Thu Thủy & cs., 2015).

Bảng 1. Các nghiệm thức sử dụng trong thí nghiệm 2.4

Nghiệm thức	Biện pháp xử lý
NHP + T-Peni	Ngâm hạt húng quế 4 giờ trong huyền phù nấm <i>P. citrinum</i> CTND-2405 + tưới 10ml huyền phù nấm <i>P. citrinum</i> CTND-2405 vào thời điểm 3, 6, 9 NSKT; lây bệnh nhân tạo 13 NSKT.
NNC + T-Peni	Ngâm hạt húng quế 4 giờ trong nước cất + tưới 10ml huyền phù nấm <i>P. citrinum</i> CTND-2405 vào thời điểm 3, 6, 9 NSKT; lây bệnh nhân tạo 13 NSKT.
NHP + T-NC	Ngâm hạt húng quế 4 giờ trong huyền phù nấm <i>P. citrinum</i> CTND-2405 + tưới nước; lây bệnh nhân tạo 13 NSKT.
Anvil 5SC	Xử lý thuốc hóa học Anvil 5SC (liều lượng 0,3%, theo khuyến cáo); lây bệnh nhân tạo 13 NSKT.
Đối chứng	Xử lý nước cất thanh trùng; lây bệnh nhân tạo 13 NSKT.

Bảng 2. Số lượng tế bào lá tích tụ hợp chất polyphenol ở thời điểm 24, 48 và 72 giờ sau lây bệnh theo các mức độ “+”, “++” và “+++”

Nghiệm thức	24 GSLB		48 GSLB			72 GSLB		
	+	++	+	++	+++	+	++	+++
Peni-CLB	47,6 ^a	12,0 ^a	43,0 ^a	29,5 ^a	12,4 ^a	29,4 ^a	37,0 ^a	32,5 ^a
Peni-KLB	27,2 ^c	0,00 ^b	27,4 ^b	22,0 ^b	0,00 ^b	21,0 ^b	23,0 ^b	11,0 ^b
K-Peni-CLB	32,9 ^b	0,00 ^b	25,0 ^b	0,00 ^c	0,00 ^b	22,2 ^b	12,0 ^c	0,00 ^c
K-Peni-KLB	0,00 ^d	0,00 ^b	0,00 ^c	0,00 ^c	0,00 ^b	0,00 ^c	0,00 ^d	0,00 ^c
Mức ý nghĩa	**	**	**	**	**	**	**	**
CV (%)	13,7	14,4	10,5	11,8	23,2	10,8	7,76	8,15

Ghi chú: Các số trung bình trong cùng một cột theo sau bởi một hoặc nhiều chữ cái giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê qua phép thử Duncan ở mức ý nghĩa 5%. GSLB: Giờ sau lây bệnh.



Ghi chú: Mức độ “+” tế bào màu xanh lá nhạt (A); Mức độ “++” tế bào màu xanh lá trung bình (B); Mức độ “0” tế bào không màu và “+++” tế bào màu xanh đậm (C).

Hình 1. Các mức tích tụ polyphenol dưới kính hiển vi quang học

3.2. Kết quả phát huỳnh quang của tế bào sau khi xử lý nấm có lợi *Penicillium citrinum* CTND-2405 kích thích cây húng quế chống chịu bệnh thán thư

Phản ứng phát huỳnh quang của tế bào lá húng quế được quan sát ở thời điểm 24 và 48 GSLB bằng kính hiển vi huỳnh quang ở bước

sóng 400–440nm, các tế bào có phản ứng phát huỳnh quang sẽ có màu vàng sáng. Các chỉ tiêu ghi nhận gồm phần trăm đĩa áp và khí khổng tạo sự phát sáng vách tế bào, số tế bào phát sáng và mức độ phát sáng.

Ở thời điểm 24 GSLB (Bảng 3) đã ghi nhận sự phát sáng tế bào thể hiện ở 3 nghiệm thức Peni-CLB, Peni-KLB và K-Peni-CLB, ngoại trừ

nghiệm thức K-Peni-KLB không ghi nhận hiện tượng phát sáng của tế bào. Kết quả khảo sát cho thấy nghiệm thức Peni-CLB là nghiệm thức có tỷ lệ đĩa áp tạo sự phát sáng tế bào (37,8%) và số tế bào phát sáng/đĩa áp (1,87) cao nhất và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức K-Peni-CLB (23,2% và 1,43) và Peni-KLB (12,0% và 1,42). Mức độ phát sáng của vách tế bào chủ yếu ở mức “+” và chỉ ghi nhận ở nghiệm thức Peni-CLB có hiện tượng phát sáng vách tế bào ở mức “++” với tỷ lệ 35,4%.

Kết quả ghi nhận tại thời điểm 48 GSLB (Bảng 4): nghiệm thức không xử lý ngâm hạt với huyền phù nấm *Penicillium citrinum* CTND-2405 (K-Peni-KLB) vẫn không xảy ra hiện tượng phát sáng vách tế bào. Điều này có thể giải thích rằng khi cây trồng phát triển bình

thường không có tác nhân kích kháng hay mầm bệnh tấn công thì không có phản ứng thay đổi về mặt sinh hóa dẫn đến sự phát sáng vách tế bào (Lyngs & cs., 1998). Tỷ lệ đĩa áp tạo phản ứng phát sáng tế bào ghi nhận sự khác biệt giữa các nghiệm thức, nghiệm thức Peni-CLB (55,6%) cao nhất, kế đến là K-Peni-CLB và Peni-KLB. Mặt khác, tỷ lệ này ở thời điểm 48 GSLB đã tăng lên so với 24 GSLB, trong đó nghiệm thức Peni-CLB tăng nhiều hơn (17,8%) so với nghiệm thức K-Peni-CLB (3,8%).

Về mức độ phát sáng vách tế bào ở thời điểm 48 GSLB (Bảng 4): nghiệm thức K-Peni-CLB chỉ ghi nhận mức độ phát sáng tế bào “+” trong khi nghiệm thức Peni-CLB đã ghi nhận mức độ phát sáng tế bào “++” và “+++” với lần lượt là 24,11% và 8,29%.

Bảng 3. Kết quả phản ứng phát sáng của tế bào lá húng quế ở đĩa áp sau khi chủng nấm *Colletotrichum* sp. tại thời điểm 24 giờ sau lây bệnh

Nghiệm thức	Tỷ lệ đĩa áp tạo phản ứng phát sáng tế bào (%)	Số tế bào phát sáng/đĩa áp	Tỷ lệ đĩa áp tạo mức độ phát sáng (%)	
			+	++
Peni-CLB	37,8 ^a	1,87 ^a	64,6 ^b	35,4 ^a
Peni-KLB	12,0 ^c	1,42 ^b	100 ^a	0,00 ^b
K-Peni-CLB	23,2 ^b	1,43 ^b	100 ^a	0,00 ^b
K-Peni-KLB	0,00 ^d	0,00 ^c	0,00 ^c	0,00 ^b
Mức ý nghĩa	**	**	**	**
CV (%)	6,37	13,8	1,17	7,67

Ghi chú: Các số trung bình trong cùng một cột theo sau bởi một hoặc nhiều chữ cái giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê qua phép thử Duncan ở mức ý nghĩa 5%; GSLB: Giờ sau lây bệnh.

Bảng 4. Kết quả phản ứng phát sáng của tế bào lá húng quế ở đĩa áp sau khi chủng nấm *Colletotrichum* sp. tại thời điểm 48 giờ sau lây bệnh

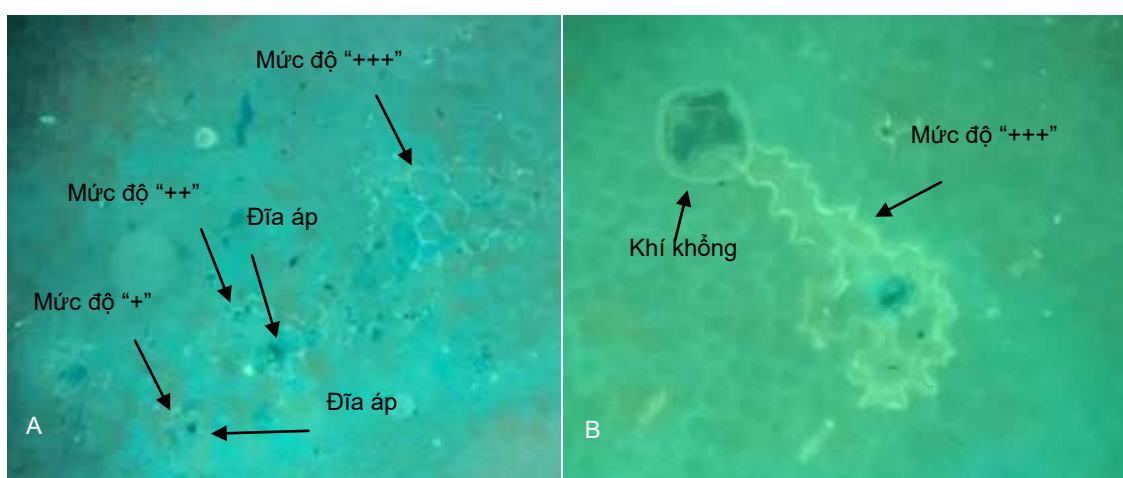
Nghiệm thức	Tỷ lệ đĩa áp tạo phản ứng phát sáng tế bào (%)	Số tế bào phát sáng/đĩa áp	Tỷ lệ đĩa áp tạo mức độ phát sáng (%)		
			+	++	+++
Peni-CLB	55,6 ^a	2,19 ^a	67,6 ^c	24,11 ^b	8,29 ^a
Peni-KLB	21,2 ^c	1,47 ^c	70,77 ^b	29,23 ^a	0,00 ^b
K-Peni-CLB	27,0 ^b	1,56 ^b	100 ^a	0,00 ^c	0,00 ^b
K-Peni-KLB	0,00 ^d	0,00 ^d	0,00 ^d	0,00 ^c	0,00 ^b
Mức ý nghĩa	**	**	**	**	**
CV (%)	4,31	4,31	3,36	10,1	26,0

Ghi chú: Các số trung bình trong cùng một cột theo sau bởi một hoặc nhiều chữ cái giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê qua phép thử Duncan ở mức ý nghĩa 5%; GSLB: Giờ sau lây bệnh.

Bảng 5. Kết quả phản ứng phát sáng của tế bào lá húng quế ở khí khổng sau khi chủng nấm *Colletotrichum* sp. tại thời điểm 48 giờ sau lây bệnh

Nghiệm thức	Tỷ lệ khí khổng tạo phản ứng phát sáng tế bào (%)	Số tế bào phát sáng/khí khổng	Tỷ lệ khí khổng tạo mức độ phát sáng (%)		
			+	++	+++
Peni-CLB	12,8 ^a	1,62 ^a	59,7 ^b	28,0 ^a	12,3 ^a
Peni-KLB	1,60 ^c	1,40 ^{ab}	100 ^a	0,00 ^b	0,00 ^b
K-Peni-CLB	3,20 ^b	1,10 ^b	100 ^a	0,00 ^b	0,00 ^b
K-Peni-KLB	0,00 ^d	0,00 ^c	0,00 ^c	0,00 ^b	0,00 ^b
Mức ý nghĩa	**	**	**	**	**
CV (%)	25,9	27,6	1,82	29,0	48,6

Ghi chú: Các số trung bình trong cùng một cột theo sau bởi một hoặc nhiều chữ cái giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê qua phép thử Duncan ở mức ý nghĩa 5%; GSLB: Giờ sau lây bệnh.



Ghi chú: Vách tế bào phát sáng quanh đĩa áp ở mức "+" tế bào phát sáng màu vàng nhạt, mức "++" tế bào phát sáng trung bình, mức "+++ tế bào phát sáng màu vàng đậm (A); Vách tế bào phát sáng quanh khí khổng (B).

Hình 2. Các mức độ phát sáng vách tế bào dưới kính hiển vi huỳnh quang ở bước sóng 400-440nm

Bảng 6. Tỷ lệ bệnh, chỉ số bệnh và hiệu quả giảm bệnh thân thư trên húng quế do nấm *Colletotrichum* sp. qua các thời điểm

Nghiệm thức	Tỷ lệ bệnh (%)			Chỉ số bệnh (%)			HQGB (%)		
	5 NSLB	7 NSLB	9 NSLB	5 NSLB	7 NSLB	9 NSLB	5 NSLB	7 NSLB	9 NSLB
NHP + T-Peni	50,00 ^b	50,00 ^b	50,00 ^b	19,72 ^b	24,72 ^c	30,00 ^c	60,68 ^a	59,03 ^a	59,92 ^a
NNC + T-Peni	62,50 ^{ab}	62,50 ^{ab}	62,50 ^{ab}	33,61 ^b	41,11 ^b	52,22 ^b	28,93 ^b	27,54 ^b	27,00 ^b
NHP + T-NC	62,50 ^{ab}	62,50 ^{ab}	87,50 ^{ab}	30,28 ^b	40,00 ^b	49,29 ^b	35,99 ^b	28,79 ^b	30,81 ^b
Anvil 5SC	25,00 ^b	37,50 ^b	50,00 ^b	28,33 ^b	34,44 ^{bc}	47,22 ^b	41,23 ^{ab}	39,68 ^{ab}	34,04 ^b
Đối chứng	100,00 ^a	100,00 ^a	100,00 ^a	47,77 ^a	56,89 ^a	71,66 ^a	-	-	-
Mức ý nghĩa	*	*	*	**	**	**	**	**	**
CV (%)	45,64	33,67	34,50	26,84	23,05	20,95	44,98	45,36	43,41

Ghi chú: Các số trung bình trong cùng một cột theo sau bởi một hoặc nhiều chữ cái giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê qua phép thử Duncan ở mức ý nghĩa 5%; **: Khác biệt ở mức ý nghĩa 1%; *: Khác biệt ở mức ý nghĩa 5%; NSLB: Ngày sau lây bệnh.

Hiện tượng phát sáng tế bào không chỉ xuất hiện ở vị trí đĩa áp mà còn có tại khí khổng (Bảng 5): tỷ lệ khí khổng tạo phản ứng phát sáng ở thời điểm 48 GSLB, các nghiệm thức đều có sự khác biệt có ý nghĩa với tỷ lệ cao nhất là nghiệm thức Peni-CLB (12,8%) kể đến K-Peni-CLB (3,20%) và thấp hơn là Peni-KLB (1,60%). Tỷ lệ vách tế bào phát sáng/khí khổng ghi nhận nghiệm thức Peni-CLB (1,62) có sự khác biệt về mặt thống kê so với nghiệm thức Peni-KLB (1,40) và nghiệm thức K-Peni-CLB (1,10).

Qua các kết quả trên chúng ta có thể thấy rằng các nghiệm thức được xử lý với chủng *Penicillium citrinum* CTND-2405 cho tỷ lệ tạo đĩa áp và khí khổng phản ứng phát sáng vách tế bào và mức độ phát sáng cao hơn so với nghiệm không xử lý. Đồng thời, thể hiện sớm và gia tăng qua thời các điểm khảo sát. Sự phát sáng của vách tế bào là phản ứng tự vệ của cây đối với sự xâm nhiễm của mầm bệnh, phản ứng này có liên quan đến sự tích lũy các hợp chất polyphenol, lignin, callose và sự tích lũy này có tác dụng ngăn cản mầm bệnh xâm nhiễm vào trong mô và hiện tượng này liên quan đến phản ứng siêu nhạy cảm (HR) để tự vệ có hiệu quả của cây trồng đối với các mầm bệnh ký sinh (biotroph) hoặc bán ký sinh (hemibiotroph) (Balint-Kurti, 2019). Nghiên cứu của Zhao & cs. (2021) cũng đã ghi nhận ở nghiệm thức đồng xử lý tác nhân phòng trừ sinh học *Penicillium bilaiiae* 47M-1 và nấm *Fusarium oxysporum* (T1) gây bệnh héo rũ trên cây vừng, các gen liên quan đến khả năng kháng bệnh NPR1, Coi1, PR1, PR2 và PR3 bắt đầu tăng lên sau 8 giờ lây nhiễm *F. oxysporum* (T1). Do đó, sự xuất hiện mầm bệnh ở cây được xử lý kích kháng trước đó sẽ làm tăng cường các gen liên quan đến khả năng kháng bệnh của cây trồng.

3.3. Khả năng nấm *Penicillium citrinum* CTND-2405 giúp cây húng quế chống chịu bệnh thân thư trong điều kiện nhà lưới

* Tỷ lệ bệnh

Tại thời điểm 5 NSLB, nghiệm thức thuốc hóa học Anvil 5SC có tỷ lệ bệnh thấp nhất (25%): kể đến là NHP + T-Peni ghi nhận tỷ lệ bệnh (50%): NNC + T-Peni (62,5%): NHP + T-

NC (62,5%) thấp hơn và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với đối chứng (100%). Ở thời điểm 7 NSLB, nghiệm thức xử lý thuốc hóa học Anvil 5SC có tỷ lệ bệnh tăng từ 25% lên 37,5%, các nghiệm thức còn lại có tỷ lệ bệnh trung bình dao động từ 50-62,5%. Trong đó, nghiệm thức NHP-T-Peni có tỷ lệ bệnh là 50% khác biệt ý nghĩa so với đối chứng ở mức ý nghĩa 5% nhưng không khác biệt so với các nghiệm thức còn lại.

Tại thời điểm 9 NSKLB, nghiệm thức NHP + T-NC có tỷ lệ bệnh là 87,5% tăng so với thời điểm quan sát trước đó, hai nghiệm thức NHP + T-Peni và thuốc hóa học có tỷ lệ bệnh là 50% khác biệt có ý nghĩa so với đối chứng nhưng không khác biệt so với hai nghiệm thức còn lại.

Nhìn chung qua kết quả khảo sát tỷ lệ bệnh ở các thời điểm cho thấy các nghiệm thức có xử lý *Penicillium citrinum* CTND-2405 và thuốc hóa học đều cho hiệu quả phòng trị cao thông qua tỷ lệ bệnh thấp hơn đối chứng phun nước cất (Bảng 6).

* Chỉ số bệnh

Ở thời điểm 5 NSLB, chỉ số bệnh ở nghiệm thức đối chứng 47,77% cao hơn và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức còn lại. Trong đó, nghiệm thức NHP + T-Peni có chỉ số bệnh thấp nhất là 19,72% nhưng không khác biệt ý nghĩa so với các nghiệm thức xử lý khác. Tại thời điểm 7 NSLB, chỉ số bệnh tiếp tục tăng đều ở các nghiệm thức, chỉ số bệnh ở nghiệm thức đối chứng đạt 56,89% khác biệt có ý nghĩa ở mức 5% so với các nghiệm thức còn lại. Hai nghiệm thức NNC-T-Peni, NHP-T-NC có chỉ số bệnh lần lượt là 41,11% và 40% khác biệt ý nghĩa ở mức 5% so với nghiệm thức NHP + T-Peni (24,72%).

Ở thời điểm 9 NSLB, chỉ số bệnh ở các nghiệm thức dao động từ 30-71,66%. Cao nhất là nghiệm thức đối chứng (71,66%) và khác biệt có ý nghĩa ở mức 5% so với các nghiệm thức còn lại. Ở nghiệm thức NHP + T-Peni ghi nhận chỉ số bệnh là 30% khác biệt có ý nghĩa so với các nghiệm thức xử lý còn lại. Kết quả này cũng tương đồng với nghiên cứu của De Cal & cs. (1997) khi xử lý *Penicillium oxalicum* đã kích hoạt cơ chế phòng vệ giúp cây cà chua kháng

bệnh héo rũ thông qua giảm chỉ số bệnh và mức độ tích lũy bệnh theo thời gian trên cả giống cà chua nhạy cảm và kháng bệnh.

* Hiệu quả giảm bệnh

Ở thời điểm 5 NSLB (Bảng 6), nghiệm thức NHP + T-Peni cho hiệu quả giảm bệnh lên đến 60,68%, kể đến là nghiệm thức xử lý thuốc Anvil 5SC, NNC-T-Peni, NHP + T-NC cho hiệu quả giảm bệnh lần lượt là 41,23%; 28,93% và 35,99%. Hiệu quả giảm bệnh có xu hướng giảm tại thời điểm 7 NSLB, nghiệm thức NHP + T-Peni cho hiệu quả giảm bệnh 59,03% khác biệt ý nghĩa so các nghiệm thức xử lý còn lại.

Ở thời điểm 9 NSKLB, nghiệm thức NHP + T-Peni ghi nhận hiệu quả giảm bệnh 59,92% cao hơn và khác biệt ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức còn lại ở mức ý nghĩa 1%. Trong đó, hiệu quả giảm bệnh ở nghiệm thức NNC + T-Peni là 27%, NHP + T-NC là 30,81% và thuốc Anvil 5SC là 34,04%.

Kết quả thí nghiệm này cho thấy nấm *Penicillium citrinum* CTND-2405 khi xử lý ngâm hạt và tưới gốc mang lại hiệu quả giảm bệnh lên đến 59,92% tại thời điểm 9 NSLB, điều này chứng minh chủng nấm *P. citrinum* CTND-2405 có khả năng tương tác với cây trồng và kích thích cây húng quế kháng lại bệnh thán thư. Hiệu quả giảm bệnh của nấm vùng rễ *Penicillium* spp. cũng được ghi nhận làm giảm đáng kể mức độ nghiêm trọng của bệnh thối rễ ở đậu bắp do *Fusarium solani* 22,17% (Zia & cs., 2015): kích thích cây chuối kháng bệnh héo rũ *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (FocR4) qua sự gia tăng nồng độ các enzyme peroxidase, polypolyphenoloxidase, phenylalanine ammonia lyase (Ting & cs., 2012): kích kháng lưu dẫn giúp cây dưa leo kháng lại bệnh thán thư do *Colletotrichum orbiculare* và chết cây con do *Rhizoctonia solani* (Hossain & cs., 2024).

4. KẾT LUẬN

Khảo sát sự tích tụ polyphenol và phản ứng phát huỳnh quang của tế bào lá sau khi xử lý nấm có lợi *Penicillium citrinum* CTND-2405 đã cho thấy ở nghiệm thức ngâm hạt húng quế trong huyền phù bào tử nấm *P. citrinum*

CTND-2405 và có lây bệnh nhân tạo với *Colletotrichum* sp. sự tích tụ polyphenol và phản ứng phát huỳnh quang xảy ra sớm và nhiều hơn so với nghiệm thức không xử lý. Ở thí nghiệm khảo sát khả năng nấm *P. citrinum* CTND-2405 giúp cây húng quế chống chịu bệnh thán thư trong điều kiện nhà lưới, nghiệm thức ngâm hạt kết hợp tưới huyền phù bào tử nấm *P. citrinum* CTND-2405 mật số 10^6 cfu/ml ở thời điểm 3, 6 và 9 ngày sau khi trồng cho hiệu quả giảm bệnh tốt nhất qua các thời điểm khảo sát.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Alam S.S., Sakamoto K. & Inubushi K. (2011). Biocontrol efficiency of Fusarium wilt diseases by a root-colonizing fungus *Penicillium* sp. Soil Science and Plant Nutrition. 57(2): 204-212.
- Balint-Kurti P. (2019). The plant hypersensitive response: concepts, control and consequences. Molecular Plant Pathology. 8: 1163-1178.
- Cacciola S.O., Gilardi G., Faedda R., Schena L., Pane A., Garibaldi A. & Gullino M.L. (2020). Characterization of *Colletotrichum ocimi* population associated with black spot of sweet basil (*Ocimum basilicum*) in Northern Italy. Plants. 9(5): 654.
- Cortaga C.Q., Cordez B.W.P., Dacones L.S., Balendres M.A.O. & Dela Cueva F.M. (2023). Mutations associated with fungicide resistance in *Colletotrichum* species: A review. Phytoparasitica. 51(3): 569-592.
- Daayf F., El Hadrami A., El-Bebany A.F., Henriquez M.A., Yao Z., Derksen H., El Hadrami & Adam L.R. (2012). Phenolic compounds in plant defense and pathogen counter-defense mechanisms. Recent advances in polyphenol research. 3: 191-208.
- De Cal A., Pascual S. & Melgarejo P. (1997). Involvement of resistance induction by *Penicillium oxalicum* in the biocontrol of tomato wilt. Plant Pathology. 46(1): 72-79.
- De Neergaard E. (1997). Methods in botanical histopathology. Danish Government Institute of Seed Pathology for Developing Countries, Copenhagen, Denmark. P. 191.
- Ellinger D. & Voigt C.A. (2014). Callose biosynthesis in Arabidopsis with a focus on pathogen response: what we have learned within the last decade. Annals of botany. 114(6): 1349-1358.
- Elsharkawy M.M., Shimizu M., Takahashi H. & Hyakumachi M. (2012). Induction of systemic resistance against Cucumber mosaic virus by *Penicillium simplicissimum* GP17-2 in *Arabidopsis* and tobacco. Plant Pathology. 61(5): 964-976.

- Ge Y., Bi Y. & Guest D.I. (2013). Defence responses in leaves of resistant and susceptible melon (*Cucumis melo* L.) cultivars infected with *Colletotrichum lagenarium*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 81: 13-21.
- Hossain M.M., Sultana F., Miyazawa M. & Hyakumachi M. (2014). The plant growth-promoting fungus *Penicillium* spp. GP15-1 enhances growth and confers protection against damping-off and anthracnose in the cucumber. *Journal of Oleo Science*. 63(4): 391-400.
- Ismail S.I., Rahim N.A. & Zulperi D. (2021). First report of *Colletotrichum siamense* causing blossom blight on Thai Basil (*Ocimum basilicum*) in Malaysia. *Plant Disease*. 105(4): 1209-1209.
- Jaiswal D.K., Gawande S.J., Soumia P., Krishna R., Vaishnav A. & Ade A.B. (2022). Biocontrol strategies: an eco-smart tool for integrated pest and diseases management. *BMC Microbiology*. 22(1): 324.
- Lê Thanh Toàn & Phạm văn Hường (2021). Phân lập và đánh giá khả năng đối kháng của các chủng nấm từ đất nông nghiệp. *Tạp chí Khoa học Đại học Huế, Khoa học tự nhiên*. 130(1A): 87-96.
- Lyngs Jørgensen H.J., Lübeck P.S., Thordal-Christensen H., de Neergaard E. & Smedegaard-Petersen V. (1998). Mechanisms of induced resistance in barley against *Drechslera teres*. *Phytopathology*. 88(7): 698-707.
- Martino I., Crous P.W., Garibaldi A., Gullino M.L. & Guarnac-cia V. (2022). A SYBR Green qPCR assay for specific detection of *Colletotrichum ocimi*, which causes black spot of basil. *Phytopathologia mediterranea*. 61(2): 405-413.
- Nguyễn Thị Thanh, Trần Thị Kim Thi, Đoàn Mạnh Dũng & Nguyễn Hữu Kiên (2023). Thành phần hoá học, khả năng kháng oxy hoá, kháng viêm, ức chế α -amylase và α -glucosidase của tinh dầu húng quế (*Ocimum basilicum* L.): được trồng tại Đắk Lắk. *Tạp chí Khoa học Tây Nguyên*. 17(59).
- Phạm Thị Minh Tâm & Nguyễn Thị Huệ (2018). Ảnh hưởng của thời điểm bấm ngọn đến sinh trưởng, năng suất của ba giống rau húng quế (*Ocimum basilicum* L.) trồng trong nhà màng. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển*, 17(4): 19-27.
- Ting A.S.Y., Mah S.W. & Tee C.S. (2012). Evaluating the feasibility of induced host resistance by endophytic isolate *Penicillium citrinum* BTF08 as a control mechanism for Fusarium wilt in banana plantlets. *Biological Control*. 61(2): 155-159.
- Trần Thị Thu Thủy, Nguyễn Thị Lùng & Hans Jorgen Lyngs Jorgensen (2015). Khảo sát khả năng kích kháng bệnh cháy lá lúa do nấm *Pyricularia grisea* (Cooke) Sacc. của dịch trích thực vật trên khía cạnh sinh học và mô học. *Tạp chí Khoa học Đại học Cần Thơ*. (36): 57-62.
- Tsalidis G.A. (2022). Human health and ecosystem quality benefits with life cycle assessment due to fungicides elimination in agriculture. *Sustainability*. 14(2): 846.
- Wang Y., Li X., Fan B., Zhu C. & Chen Z. (2021). Regulation and function of defense-related callose deposition in plants. *International Journal of Molecular Sciences*. 22(5): 2393.
- Zia Ullah Z.U., Syed S.A., Aqleem Abbas A.A., Muhammad Amir M.A. & Sufiyan Qureshi S.Q. (2015). Evaluation of *Penicillium* sp. Eu0013 for management of root rot disease of okra. *International Journal of Biosciences*. 7(3): 11-15.
- Zhao X., Liu X., Zhao H., Ni Y., Lian Q., Qian H., He B., Liu H. & Ma Q. (2021). Biological control of Fusarium wilt of sesame by *Penicillium bilaiae* 47M-1. *Biological Control*. 158: 104601.