

TÁC DỤNG ỨC CHẾ VI KHUẨN *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* GÂY BỆNH BẠC LÁ LÚA CỦA DỊCH CHIẾT CÂY MÒ HOA TRẮNG (*Clerodendron fragrans* Vent.) VÀ ĐƠN ĐỎ (*Excoecaria cochinchinensis* Lour.)

Đặng Hoàng Trang, Đoàn Thị Nhung, Nguyễn Thanh Hải*

Khoa Công nghệ Sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

Email*: danghoangtrang27@gmail.com; nthaicnsh@vnua.edu.vn

Ngày gửi bài: 17.10.2017

Ngày chấp nhận: 17.11.2017

TÓM TẮT

Bạc lá lúa do vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) gây ảnh hưởng lớn đến năng suất lúa gạo. Một trong những hướng tiếp cận hiệu quả kiểm soát bệnh là sử dụng chế phẩm chiết xuất từ thực vật. Do đó, nghiên cứu này tiến hành với hai loài thực vật mô hoa trắng (*Clerodendron fragrans* Vent.) và đơn đỏ (*Excoecaria cochinchinensis* Lour.) nhằm kiểm tra hiệu suất chiết thu cao khô toàn phần của chúng trong sáu loại dung môi có độ phân cực khác nhau (nước cất, ethanol 70%, chloroform, n - hexane, acetone 100%, acetonitrile 100%), đồng thời đánh giá khả năng ức chế Xoo của các cao khô dịch chiết thu được trong cả điều kiện *in vitro* và *in vivo*. Kết quả cho thấy hiệu suất chiết thân - rễ mô hoa trắng dao động từ 8,3% (dung môi n-hexane) đến 29,1% (dung môi ethanol 70%); hiệu suất chiết lá đơn đỏ là từ 7,2% (dung môi chloroform) đến 20,3% (dung môi ethanol 70%). Dung môi ethanol cho cao khô dịch chiết có hoạt tính ức chế vi khuẩn tốt nhất với đường kính vòng vô khuẩn $28,50 \pm 0,41$ cm ở mô hoa trắng và $21,00 \pm 0,41$ cm ở đơn đỏ. Nồng độ ức chế vi khuẩn tối thiểu của cao khô dịch chiết mô hoa trắng sử dụng dung môi ethanol 70% là 1,56 mg/ml và của đơn đỏ là 3,13 mg/ml; nồng độ này còn giảm xuống tương ứng là 0,39 mg/ml và 0,78 mg/ml khi được phối trộn với nano bạc. Cao khô dịch chiết mô hoa trắng nồng độ 3,13 mg/ml, hỗn hợp cao khô dịch chiết mô hoa trắng hoặc đơn đỏ nồng độ 3,13 mg/ml với nano bạc 3,13 ppm đều có khả năng làm giảm mức độ gây bệnh bạc lá của chủng vi khuẩn Xoo 07 từ mức nhiễm xuống mức kháng khi thử nghiệm trên giống lúa IR24.

Từ khóa: Bạc lá lúa, cao khô dịch chiết mô hoa trắng (*Clerodendron fragrans*), cao khô dịch chiết đơn đỏ (*Excoecaria cochinchinensis*), nano bạc, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*.

Bacterial Inhibitory Effect of *Clerodendron fragrans* Vent. and *Excoecaria cochinchinensis* Lour. Extracts on *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* Causing Rice Leaf Blight

ABSTRACT

Bacterial rice leaf blight (BLB) caused by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) is the most devastating in terms of annual yield losses to rice. This research aimed to examine the extraction efficiency for *Clerodendron fragrans* Vent. (*C. fragrans*) and *Excoecaria cochinchinensis* Lour. (*E. cochinchinensis*) by six solvents with different polarities (distilled water, ethanol, chloroform, n-hexane, acetone and acetonitrile) and to evaluate antibacterial effect of the extracts on Xoo under both *in vitro* and *in vivo* conditions. In comparison to the dry input materials, the extraction efficiency for *C. fragrans* Vent stem and root varied from 8.3% to 29.1%, while the figure for *E. cochinchinensis* leaf varied from 7.2% to 20.3%, depending on solvents. *C. fragrans* extracted by ethanol at 100 mg/ml showed the best anti-bacterial effect in terms of inhibition zone. The minimum inhibiting concentration (MIC) of *C. fragrans* extract was 1.56 mg/ml and of *E. cochinchinensis* extract was 3.13 mg/ml. These MICs reduced to 0.39 mg/ml and 0.78 mg/ml, respectively, when the extracts were mixed with nanosilver solution at 3.13 ppm. The *in vivo* test demonstrated that *C. fragrans* extract 3.13 mg/ml, and the mixture of nanosilver solution 3.13 ppm with *C. fragrans* or *E. cochinchinensis* extract at 3.13 mg/ml could intrigue resistance of IR24 rice to BLB.

Keywords: Bacterial leaf blight *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae*, *Clerodendron fragrans*, *Excoecaria cochinchinensis*, herbal extract, anti-bacterial activity.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bạc lá (bacterial leaf blight) là một trong những bệnh gây ảnh hưởng lớn nhất đến sản xuất lúa gạo. Hiện nay, bệnh đã xảy ra trên rất nhiều quốc gia, đặc biệt, ở nhiều nước châu Á trong đó có Việt Nam, căn bệnh này đã trở thành đại dịch trên lúa (Đỗ Tấn Dũng & Nguyễn Văn Viên, 2005). Tác nhân gây bệnh bạc lá lúa là vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo). Đây là loại vi khuẩn Gram âm và không sinh bào tử, khuẩn lạc hình tròn, lồi, bề mặt nhẵn, màu vàng (Niño-Liu *et al.*, 2006). Vi khuẩn xâm nhập qua thủy khổng, lỗ khí ở trên mút lá, mép lá và đặc biệt qua vết thương sây sát trên lá (Nguyễn Thị Liên & cs., 2012).

Một trong những giải pháp quan trọng nhất phòng trừ bệnh bạc lá lúa hiện nay là sử dụng các dòng lúa mang gen kháng bệnh. Tuy nhiên, các dòng lúa chỉ mang một vài gen kháng đơn lẻ, được nuôi trồng liên tục trên diện rộng dẫn đến tình trạng các chủng Xoo có khả năng gây bệnh ngay cả khi có các gen kháng đó (Vasudevan *et al.*, 2002). Chính vì vậy, việc kiểm soát bệnh bạc lá lúa bằng các hướng tiếp cận khác đang thu hút được sự chú ý của nhiều nhà nghiên cứu, trong đó có hướng sử dụng các hợp chất từ thực vật để sản xuất thuốc bảo vệ thực vật an toàn và hiệu quả (Jabeen, 2011; Nascimento *et al.*, 2000). Một số loài thực vật như *Poncirus trifoliata* Rafin (Rahman *et al.*, 2014) hay *Adathoda vasica* (Govindappa *et al.*, 2011) đã cho thấy khả năng ức chế vi khuẩn Xoo hiệu quả trong điều kiện thí nghiệm và còn kích thích tính kháng tập nhiễm hệ thống trên cây lúa. Những chế phẩm có nguồn gốc thực vật có ưu thế rõ rệt so với thuốc trừ sâu hóa học trong việc giảm tác động của tồn dư lên môi trường cũng như sức khỏe con người, qua đó góp phần thúc đẩy mục tiêu phát triển nông nghiệp bền vững.

Việt Nam là một nước nhiệt đới ẩm rất thích hợp cho sự phát triển của nhiều loài thảo mộc, do đó việc nghiên cứu và sử dụng chiết xuất từ thực vật trong kháng và ức chế vi khuẩn đã được tiến hành từ lâu đời và đạt được những thành tựu nhất định (Đỗ Tấn Lợi, 2003). Cây mò hoa trắng (*Clerodendron fragrans* Vent.) trong

dân gian được sử dụng để trị vết thương ngoài da bị nhiễm trùng. Nhiều nghiên cứu ngoài nước đã khẳng định, cây mò hoa trắng và các cây trong chi *Clerodendrum* có tính kháng sinh, có khả năng chống lại nhiều loại vi khuẩn gây bệnh (Shrivastava & Patel, 2007; Nguyễn Văn Thanh & Nguyễn Thanh Hải, 2014). Bên cạnh đó, cây đơn đỏ (*Excoecaria cochinchinensis* Lour.) được dùng khá thông dụng tại các nước Đông Nam Á và Trung Quốc như một loại thảo dược để chữa mẩn ngứa, mụn nhọt, viêm vú, tiêu chảy. Các nghiên cứu trên thế giới và Việt Nam đều cho thấy các hoạt chất tách chiết từ cây đơn đỏ có tính kháng khuẩn, chống viêm (Nguyễn Thanh Hải & Nguyễn Văn Thanh, 2016; Wang *et al.*, 2014; Xie *et al.*, 1989).

Vì vậy, mục đích của nghiên cứu này là xác định khả năng ức chế vi khuẩn Xoo của cao chiết xuất từ cây mò hoa trắng và cây đơn đỏ bằng các dung môi khác nhau, qua đó tìm ra dung môi phù hợp nhất cho việc chiết xuất các hợp chất phòng trừ bệnh bạc lá lúa từ hai loại thực vật trên, đồng thời xác định hiệu quả ức chế vi khuẩn khi phối trộn nano bạc với dịch chiết thực vật thu được.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Thân và rễ cây mò hoa trắng được thu hái tại xã Khánh Lợi, Yên Khánh, Ninh Bình vào tháng 8/2016 tại thời điểm cây sắp ra hoa (chọn những phần lành lặn, không bị sâu bệnh hoặc thối). Mẫu tươi thu hái về được rửa nước sạch 3 lần, rồi rửa với nước cất, được sấy khô ở 40°C. Mẫu khô được nghiền thành bột mịn (< 0,05 mm). Bột được liệu đựng trong túi nilon bảo quản trong bình hút ẩm.

Lá cây đơn đỏ được thu hái tại bộ môn Cây Công nghiệp và Cây thuốc, Khoa Nông học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam vào tháng 1/2016 (lá lành lặn, bánh tẻ, không bị sâu). Mẫu tươi thu hái về được rửa dưới vòi nước sạch 3 lần, sau đó được sấy ở 40°C. Mẫu khô được nghiền thành bột mịn (< 0,05 mm). Bột lá đơn đỏ được đựng trong túi nilon bảo quản trong bình hút ẩm.

Tác dụng ức chế vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* gây bệnh bạc lá lúa của dịch chiết cây mả hoa trắng (*Clerodendron fragrans* Vent.) và đơn đỏ (*Excoecaria cochinchinensis* Lour.)

Hóa chất: Các dung môi thu cao khô bao gồm nước cất, ethanol 70%, chloroform, n-hexane, acetone 100%, acetonitrile 100%. Dimethyl sulfoxide (DMSO) dùng để pha loãng cao khô. Nano bạc được điều chế bằng phương pháp hóa học có nồng độ 500 ppm, 90% các hạt nano bạc có kích thước 20 - 25 nm do bộ môn Sinh học, Khoa Công nghệ Sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam cung cấp. Thuốc bảo vệ thực vật Ankamycin 30SL (Kasugamycin 19 g/l + Tricyclazole 11 g/l) của Công ty CP XNK Nông được Hoàng Ân

Chủng vi khuẩn *Xoo* 07 là một trong 12 chủng vi khuẩn có độc tính mạnh gây bệnh bạc lá lúa đang hiện hữu tại các tỉnh phía Bắc Việt Nam (Phan Hữu Tôn, 2016) do Trung tâm Bảo tồn và Phát triển Nguồn gen cây trồng, Học viện Nông nghiệp Việt Nam cung cấp. Chủng vi khuẩn được nuôi cấy trong môi trường Wakimoto lỏng và rắn. Môi trường Wakimoto đặc được đổ vào đĩa petri có đường kính 10 cm, với độ dày là $4 \pm 0,2$ mm.

Giống lúa IR24 là giống chuẩn nhiễm (giống không mang gen kháng) được sử dụng trong thí nghiệm chậu vại *in vivo*.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Thu dịch chiết và tạo cao khô dịch chiết

Bột lá được liệu được chiết với 6 dung môi có độ phân cực khác nhau bằng phương pháp ngâm kiệt chiết lạnh ở nhiệt độ phòng với cùng một tỷ lệ (20 g bột lá khô/200 ml dung môi), mỗi ngày được lắc đảo 2 lần. Sau 72 giờ, thu dịch chiết, lọc qua vải màn và giấy lọc Whatman No.1. Dịch chiết được li tâm với tốc độ 1.096 g trong 20 phút. Phần dịch trong được hút lấy, mang đi cô quay chân không để loại bỏ hoàn toàn dung môi. Tới khi khối lượng của bình cô quay không đổi đem cân để tính hiệu suất tách chiết của các dung môi. Cao cô toàn phần đã loại bỏ hết dung môi bảo quản trong tủ mát 4°C để tiến hành nghiên cứu.

+ Pha cao khô dịch chiết nồng độ 100 mg/ml

Lấy 1 g cao cô toàn phần pha với 10 ml DMSO, dùng thìa thủy tinh khuấy tan hoàn toàn ta được dung dịch gốc có nồng độ 100 mg/ml.

Pha loãng dung dịch gốc theo hệ số pha loãng 2^n .

2.2.3. Nuôi cấy vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*

Chủng vi khuẩn *Xoo* được hoạt hóa và cấy trang trên đĩa thạch môi trường Wakimoto ở 28 - 30°C. Sau 24 giờ, các khuẩn lạc đơn điển hình (có hình dạng tròn, nhẵn bóng, lồi lên, kích thước khoảng 1 - 2 mm, màu vàng chanh) xuất hiện. Khuẩn lạc đơn được nuôi cấy tăng sinh trong môi trường lỏng Wakimoto, lắc với tốc độ 200 vòng/phút trong khoảng 16 giờ. Mật độ vi khuẩn sau khi nuôi cấy trong môi trường lỏng được xác định theo phương pháp đo mật độ quang. Khi mật độ quang đạt giá trị 2 ở bước sóng $\lambda = 600$ nm thì mật độ tế bào tương ứng là 10^8 tế bào/ml.

2.2.4. Đánh giá khả năng ức chế vi khuẩn *Xoo* bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch

Dùng pipet hút 100 μ l dịch khuẩn (10^8 tế bào/ml) nhỏ vào giữa đĩa môi trường Wakimoto. Dùng que thủy tinh vô trùng trang đều cho đến khi mặt thạch khô. Mặt thạch được đục 5 lỗ tròn đường kính 5 mm. Một trong số đó chứa 60 μ l DMSO làm đối chứng, còn lại chứa 60 μ l dịch chiết thực vật khác nhau. Đĩa thạch được đặt vào tủ ấm ở 28 - 30°C trong 24 h. Đọc kết quả bằng cách đo đường kính vòng vô khuẩn, rồi tính giá trị trung bình. Các thao tác được thực hiện trong tủ cấy vô trùng (Bauer *et al.*, 1966).

2.2.5. Đánh giá khả năng ức chế vi khuẩn *Xoo in vitro* của dịch chiết và nano bạc

Phối trộn dịch chiết với nano bạc: Hút 5 ml dịch chiết được liệu được tách chiết, ở các nồng độ pha loãng khác nhau cho vào các ống nghiệm. Tiếp tục hút 5 ml nano bạc ở nồng độ kháng khuẩn *Xoo* 3,13 ppm (Đồng Huy Giới & Nguyễn Thanh Hải, 2017) cho lần lượt vào các ống nghiệm này, lắc đều. Thử hoạt tính ức chế vi khuẩn của hỗn hợp dịch chiết - nano bạc bằng phương pháp kháng sinh đồ khuếch tán trên đĩa thạch (Bauer *et al.*, 1966).

2.2.6. Đánh giá khả năng kháng bệnh bạc lá gây ra bởi chủng vi khuẩn Xoo 07 của các công thức trong thí nghiệm chậu vại

Giống lúa IR24 được trồng trong chậu vại ở điều kiện thí nghiệm. Lây nhiễm nhân tạo được tiến hành vào thời điểm lúa làm đồng bằng phương pháp cắt 3 - 5 cm đầu lá (Kauffman *et al.*, 1973). Vi khuẩn được nuôi cấy trên môi trường Wakimoto lỏng, rồi chuẩn độ 10^8 - 10^9 tế bào/ml. Nhúng lưỡi kéo vào dung dịch khuẩn, cắt đầu lá (khoảng 3 - 5 cm từ đỉnh lá). Sau 48 giờ lây nhiễm (Đồng Huy Giới và Nguyễn Thanh Hải, 2017), phun các công thức thí nghiệm lên lúa (CT1 - dùng nước cất làm đối chứng, CT2 - dịch chiết mô hoa trắng nồng độ 3,13 mg/ml, CT3 - dịch chiết đơn đỏ nồng độ 3,13 mg/ml, CT4 - hỗn hợp dịch chiết mô hoa trắng nồng độ 3,13 mg/ml và nano bạc nồng độ 3,13 ppm, CT5 - hỗn hợp dịch chiết đơn đỏ nồng độ 3,13 mg/ml và nano bạc nồng độ 3,13 ppm, CT6 - thuốc bảo vệ thực vật Ankamycin 30SL). Các công thức này rút ra từ kết quả của các thí nghiệm đã thực hiện ở trên và kế thừa kết quả thí nghiệm với nano bạc của Đồng Huy Giới và Nguyễn Thanh Hải (2017). Đánh giá khả năng kháng bệnh của từng giống bằng cách đo chiều dài vết bệnh sau 20 ngày lây nhiễm theo tiêu chuẩn SES (2002) như sau: Chiều dài vết bệnh < 8cm: kháng bệnh (R); từ 8 - 12 cm: nhiễm vừa (M); > 12 cm: nhiễm (S).

2.3. Xử lý số liệu

Các thí nghiệm được bố trí ngẫu nhiên và được lặp lại 3 lần. Số liệu thu được xử lý thống kê sinh học bằng phần mềm Excel 2013.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Hiệu suất chiết xuất cao khô thực vật với 6 loại dung môi

Kế thừa các kết quả nghiên cứu đã được công bố trước đây, các bộ phận cho kết quả ức chế vi khuẩn tối ưu của 2 loại thực vật mục tiêu, cụ thể là lá cây đơn đỏ (Nguyễn Thanh Hải & Nguyễn Văn Thanh, 2016) và thân - rễ cây mô hoa trắng (Nguyễn Văn Thanh & Nguyễn Thanh Hải,

2014), được nghiền thành dạng bột với kích thước hạt < 0,05 mm, ngâm trong 6 loại dung môi. Sau 72 giờ, dịch chiết thu được từ mỗi loại dung môi có màu sắc khác nhau rõ rệt dù cùng một đối tượng thực vật (Hình 1 và 2). Dung môi ethanol 70%, nước cất và chloroform cho kết quả dịch chiết ở mô hoa trắng có màu sắc hoàn toàn giống ở đơn đỏ, lần lượt là nâu nhạt, nâu đậm và xanh đen. Dung môi acetone 100% và acetonitrile 100% đều cho dịch chiết đơn đỏ đậm màu hơn dịch chiết mô hoa trắng, trong khi dung môi n-hexane cho dịch chiết mô hoa trắng màu đậm hơn. Bước đầu có thể nhận định rằng chất lượng cao khô dịch chiết (thành phần hóa học và hoạt tính) của mỗi loại thực vật khi được chiết tách bởi các dung môi khác nhau sẽ khác nhau.

Dịch chiết được đem cô quay hút chân không để loại bỏ hoàn toàn dung môi tới khi khối lượng không đổi. Kết quả thu được ở bảng 1 và hình 3 cho thấy, cùng một phương pháp chiết xuất nhưng hiệu quả chiết xuất khi sử dụng các loại dung môi là khác nhau. Khối lượng cao khô thu được từ 20 g bột mô hoa trắng dao động từ 1,66 g (dung môi n-hexane) đến 5,81 g (dung môi ethanol 70%) tương đương với hiệu suất tách chiết là 8,3 - 29,1%. Cả mô hoa trắng và đơn đỏ đều cho hiệu chiết cao tốt nhất khi dùng dung môi ethanol 70%, loại dung môi thông dụng cho chiết xuất và phân tích thành phần hóa học của thảo mộc (Wang *et al.*, 2014). Đặc biệt, mô hoa trắng cho thấy tiềm năng tạo ra cao khô dịch chiết lớn hơn đơn đỏ.

Trong các loại dung môi sử dụng, n-hexane (hằng số điện môi 1,88) và chloroform (hằng số điện môi 4,88) là hai dung môi không phân cực, đã cho hiệu suất chiết nhỏ nhất so với các dung môi khác ở cả mô hoa trắng và đơn đỏ, do đó có thể sơ bộ kết luận rằng các hoạt chất trong mô hoa trắng và đơn đỏ tan chủ yếu trong dung môi phân cực.

Đối với mô hoa trắng, dung môi ethanol 70% (phân cực protic với hằng số điện môi 24,55) và dung môi acetone 100% (phân cực aprotic với hằng số điện môi 20,7) cho hiệu suất tách chiết tương đương (không có sự sai khác về mặt thống kê). Mặt khác, dung môi acetonitrile

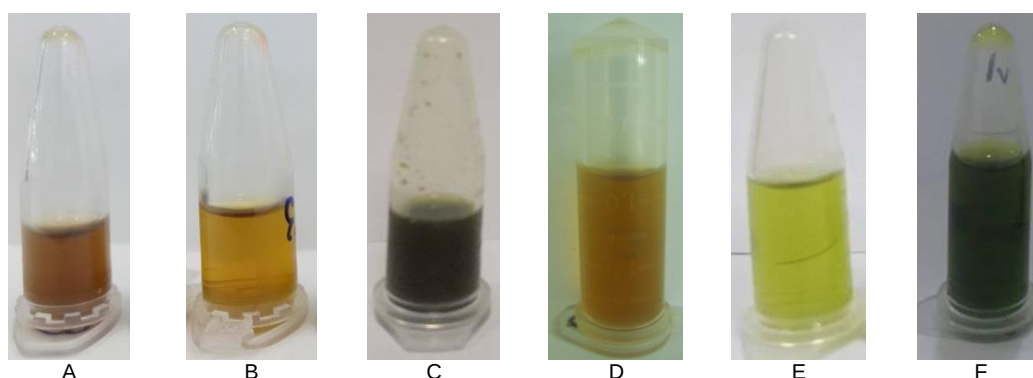
Tác dụng ức chế vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* gây bệnh bạc lá lúa của dịch chiết cây mủ hoa trắng (*Clerodendron fragrans* Vent.) và đơn đỏ (*Excoecaria cochinchinensis* Lour.)

tuy cùng thuộc nhóm phân cực aprotic nhưng cho hiệu suất thấp hơn đáng kể so với dung môi acetone.

Đối với đơn đỏ, ethanol 70% (dung môi phân cực protic với hằng số điện môi 24,55) và acetonitrile 100% (dung môi phân cực aprotic với hằng số điện môi 37,5) cho hiệu suất chiết cao nhất, lần lượt là 20,3% và 18,8%. Có thể thấy rằng, tuy trong cùng nhóm phân cực protic,

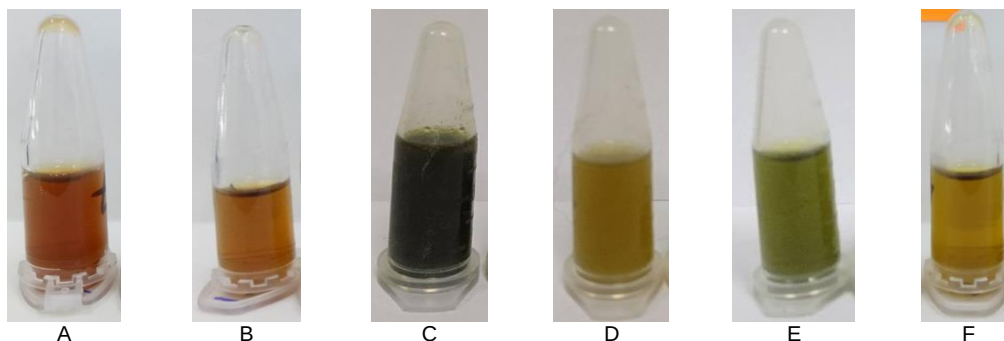
nước cất không có khả năng hòa tan nhiều hợp chất trong đơn đỏ bằng ethanol 70%.

Như vậy, có thể kết luận rằng dung môi phân cực cho khả năng hòa tan các hoạt chất có trong mủ hoa trắng và đơn đỏ cao hơn dung môi không phân cực, tuy nhiên, hiệu suất chiết cao không phụ thuộc vào mức độ phân cực của dung môi mà phụ thuộc vào các bản chất khác của dung môi.



Hình 1. Dịch chiết cây mủ hoa trắng thu được từ các loại dung môi khác nhau

Ghi chú: A. Nước cất; B. Ethanol 70%; C. Chloroform; D. n-Hexane; E. Acetone 100%; F. Acetonitrile 100%



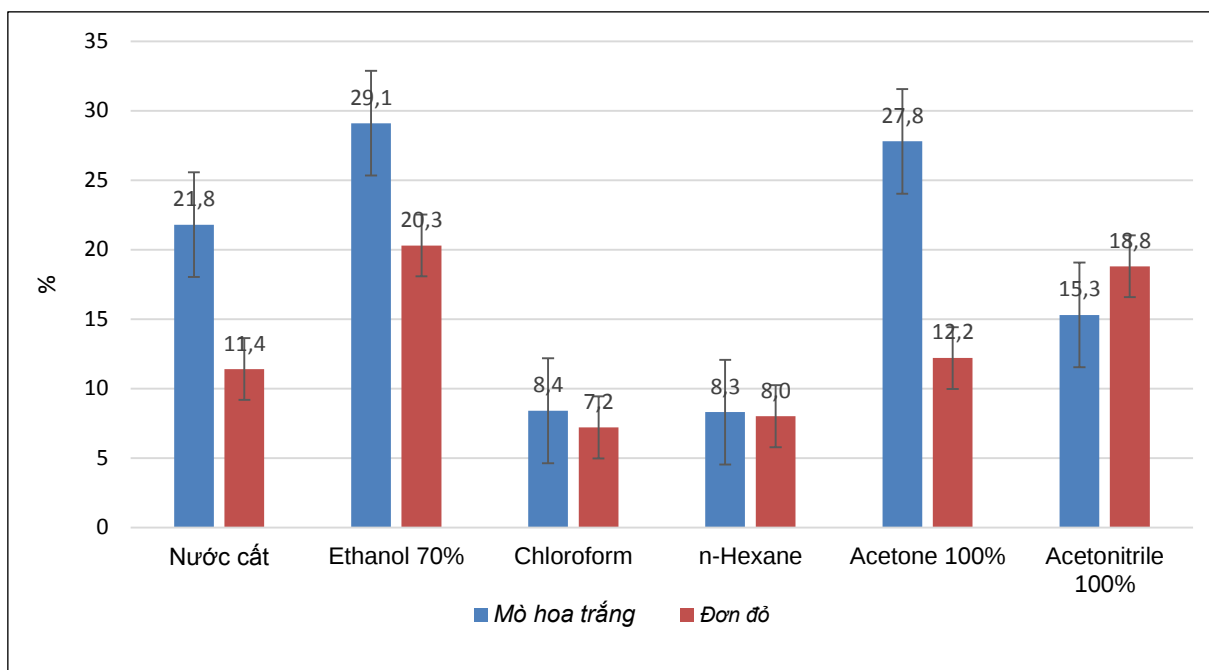
Hình 2. Dịch chiết lá cây đơn đỏ thu được từ các loại dung môi khác nhau

Ghi chú: A. Nước cất; B. Ethanol 70%; C. Chloroform; D. n-Hexane; E. Acetone 100%; F. Acetonitrile 100%

Bảng 1. Khối lượng cao khô thu được từ bột khô mủ hoa trắng và đơn đỏ khi sử dụng các loại dung môi khác nhau (g)

Khối lượng cao khô	Loại dung môi					
	Nước cất	Ethanol 70%	Chloroform	n-hexane	Acetone 100%	Acetonitrile 100%
Mủ hoa trắng	4,37 ^a	5,81 ^b	1,68 ^d	1,66 ^d	5,55 ^b	3,05 ^c
Đơn đỏ	2,28 ^c	4,07 ^a	1,44 ^b	1,60 ^b	2,44 ^c	3,76 ^d

Ghi chú: a, b, c, d trên cùng một hàng chỉ ra sự sai khác có ý nghĩa về mặt thống kê $P < 0,05$; Khối lượng bột khô ban đầu là 20 g



Hình 3. Hiệu suất chiết mô hoa trắng và đơn đỏ bằng 6 loại dung môi

3.2. Khả năng ức chế *in vitro* vi khuẩn *Xoo* của cao dịch chiết

Để có thể kết luận chính xác hơn về khả năng của từng loại dung môi trong việc hòa tan các hợp chất trong mô hoa trắng và đơn đỏ có tác dụng ức chế vi khuẩn *Xoo*, chúng tôi tiến hành pha loãng cao khô bằng DMSO ở nồng độ 100 mg/ml và tiến hành thử hoạt tính bằng phương pháp khuếch tán trên thạch (Bảng 2 và Hình 4). Kết quả vòng vô khuẩn đo được cho thấy cao khô dịch chiết mô hoa trắng ức chế vi khuẩn *Xoo* tốt hơn đơn đỏ ở tất cả các dung môi. Trong đó, cao khô dịch chiết mô

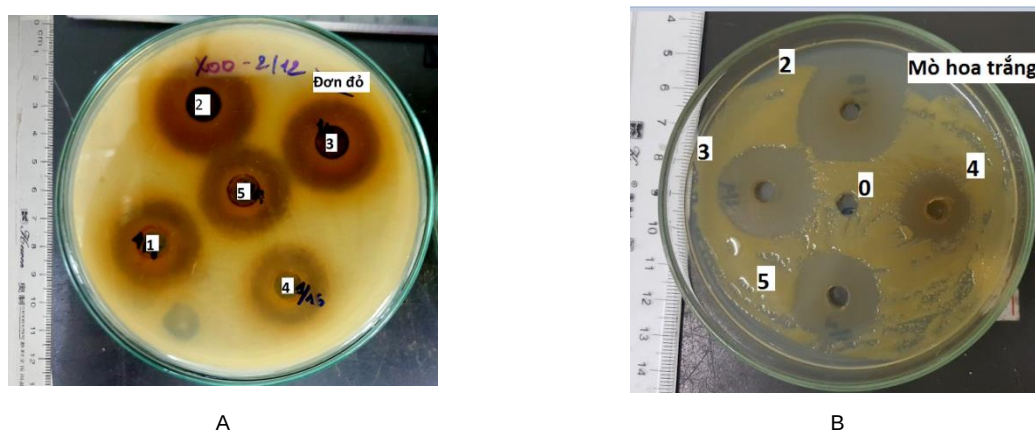
hoa trắng sử dụng dung môi ethanol 70% cho vòng vô khuẩn vượt trội (28,50 mm). Ethanol 70% cũng là dung môi tốt nhất cho cao khô dịch chiết đơn đỏ với đường kính vòng vô khuẩn là 21,00 mm.

Sử dụng dung môi chloroform tuy cho hiệu suất chiết cao không lớn, nhưng cao khô thu được có hoạt tính khá tốt (vòng vô khuẩn 27,00 mm với cao mô hoa trắng và 18,33 mm với cao đơn đỏ). Cao khô dịch chiết sử dụng dung môi acetone 100% có khả năng ức chế vi khuẩn *Xoo* yếu nhất ở cả mô hoa trắng và đơn đỏ, với vòng vô khuẩn lần lượt là 17,33 mm và 11,83 mm.

Bảng 2. Khả năng ức chế vi khuẩn *Xoo* của cao khô dịch chiết mô hoa trắng và đơn đỏ thu được từ các loại dung môi khác nhau

Cao khô dịch chiết sử dụng dung môi	Nồng độ (mg/ml)	Đường kính vòng vô khuẩn (cm)	
		Mô hoa trắng	Đơn đỏ
Đ/c DMSO	N/c	0	0
Nước cất	100	17,67 ± 0,47	14,33 ± 0,62
Ethanol 70%	100	28,50 ± 0,41	21,00 ± 0,41
Chloroform	100	27,00 ± 0,41	18,33 ± 0,47
n-Hexane	100	19,83 ± 0,62	14,83 ± 0,24
Acetone 100%	100	17,33 ± 0,24	11,83 ± 0,24
Acetonitrile 100%	100	21,33 ± 0,47	18,00 ± 0,82

Tác dụng ức chế vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* gây bệnh bạc lá lúa của dịch chiết cây mủ hoa trắng (*Clerodendron fragrans* Vent.) và đơn đỏ (*Excoecaria cochinchinensis* Lour.)



Hình 4. Khả năng ức chế vi khuẩn Xoo của cao khô dịch chiết mủ hoa trắng và đơn đỏ (100 mg/ml) thu được từ các dung môi khác nhau

Chú thích: A - Đĩa thử hoạt tính ức chế Xoo của cao khô dịch chiết đơn đỏ; B - Đĩa thử hoạt tính ức chế Xoo của cao khô dịch chiết mủ hoa trắng; 0 - DMSO (đối chứng); 1 - cao chiết bằng nước cất; 2 - cao chiết bằng ethanol 70%; 3 - cao chiết bằng chloroform; 4 - cao chiết bằng acetone 100%; 5 - cao chiết bằng acetonitrile 100%

Kết quả này của chúng tôi tương đồng với nghiên cứu của Nguyễn Thanh Hải và Nguyễn Văn Thanh (2014 và 2016). Các tác giả khẳng định cao khô dịch chiết thân - rễ mủ hoa trắng và lá đơn đỏ từ dung môi ethanol 70% có tác dụng ức chế *in vitro* tốt nhất đối với các vi khuẩn *E. coli*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus* spp. và *Streptococcus* spp. Dung môi acetone cho cao khô dịch chiết mủ hoa trắng có khả năng ức chế vi khuẩn yếu. Dung môi chloroform cho cao khô dịch chiết đơn đỏ ức chế vi khuẩn khá tốt trong điều kiện thí nghiệm. Nước cất cũng có thể làm dung môi thu cao ở cả hai loài thực vật, tuy nhiên hoạt tính của cao khô dịch chiết thu được không bằng các dung môi hữu cơ khác.

Bên cạnh đó, kết quả nghiên cứu của Rahman *et al.* (2014) đối với chi *Xanthomonas* spp. cho thấy, cao khô dịch chiết cây *Poncirus trifoliata* Rafin cho đường kính vòng vô khuẩn biến đổi từ 13,00 - 22,10 mm tùy từng loài vi khuẩn và nồng độ nghiên cứu. Với vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* thì đường kính vòng vô khuẩn dao động từ 16,02 - 21,05 mm. Tác giả Đồng Huy Giới và Nguyễn Thanh Hải (2017) tiến hành thử hoạt tính của cao khô dịch chiết lá trâu không với hai chủng vi khuẩn Xoo, kết

quả, cao khô dịch chiết dùng dung môi ethanol 70% cho đường kính vòng vô khuẩn từ 21,33 - 23,33 mm, lớn hơn vòng vô khuẩn của cao khô dịch chiết dùng dung môi acetone 100% và n-hexane. Từ kết quả trên, chúng tôi quyết định sử dụng cao khô dịch chiết từ dung môi ethanol 70% đối với mủ hoa trắng và đơn đỏ cho các thí nghiệm tiếp theo.

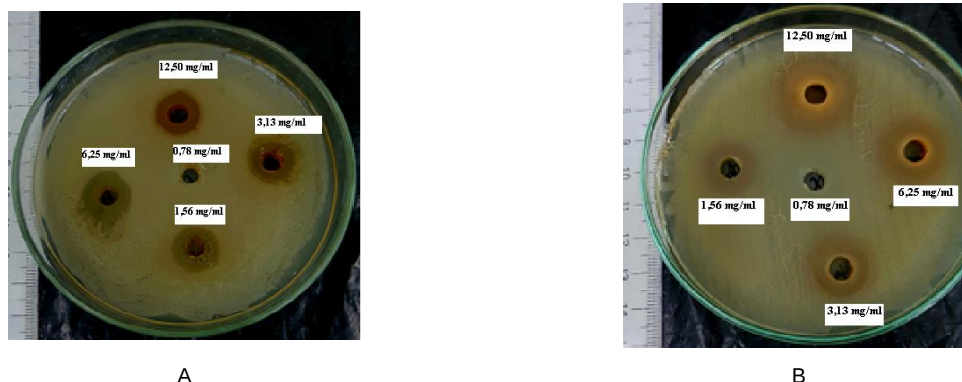
3.3. Khả năng ức chế vi khuẩn Xoo *in vitro* của cao mủ hoa trắng và đơn đỏ chiết xuất bằng ethanol 70% khi pha loãng và khi phối trộn với dung dịch nano bạc

Trong thí nghiệm này, chúng tôi tiến hành pha loãng cao khô dịch chiết sử dụng dung môi ethanol 70% để xác định nồng độ cao khô dịch chiết nhỏ nhất vẫn còn khả năng ức chế vi khuẩn. Mặt khác, nồng độ nano bạc nhỏ nhất được chứng minh từ kết quả nghiên cứu của Đồng Huy Giới và Nguyễn Thanh Hải (2017) có khả năng ức chế hoàn toàn 2 chủng vi khuẩn Xoo là 6,25 ppm, do đó chúng tôi tiến hành đánh giá khả năng ức chế vi khuẩn của hỗn hợp cao khô dịch chiết có bổ sung nano bạc với nồng độ là 3,13 ppm (bằng nồng độ ức chế tối thiểu).

Bảng 3. Khả năng ức chế vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in vitro của cao mò hoa trắng và đơn đỏ chiết xuất bằng ethanol 70% khi pha loãng và khi phối trộn với dung dịch nano bạc

	Nồng độ dịch chiết (mg/ml)									
	50,00	25,00	12,50	6,25	3,13	1,56	0,78	0,39	0,195	0,10
<i>Mò hoa trắng</i>										
Cao khô dịch chiết	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Cao khô dịch chiết + nano bạc	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>Đơn đỏ</i>										
Cao khô dịch chiết	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Cao khô dịch chiết + nano bạc	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-

Ghi chú: (+): Quan sát thấy vòng vô khuẩn; (-): Không quan sát thấy vòng vô khuẩn



Hình 5. Đĩa thử khả năng ức chế vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in vitro của cao mò hoa trắng và đơn đỏ chiết xuất bằng ethanol 70% khi pha loãng

Chú thích: A - Đĩa thử hoạt tính ức chế Xoo của cao khô dịch chiết mò hoa trắng, B - Đĩa thử hoạt tính ức chế Xoo của cao khô dịch chiết đơn đỏ.

Kết quả cho thấy, nồng độ cao khô dịch chiết mò hoa trắng thấp nhất vẫn có khả năng ức chế chủng vi khuẩn thí nghiệm là 1,56 mg/ml, với đơn đỏ nồng độ ức chế tối thiểu phải tăng lên đến 3,13 mg/ml (Bảng 3, Hình 5). Kết quả có sự khác biệt so với kết quả nghiên cứu của Nguyễn Văn Thanh & cs. (2016) khi sử dụng cao khô dịch chiết đơn đỏ để ức chế một số vi khuẩn *Staphylococcus* spp. và *Streptococcus* spp., trong đó, nồng độ ức chế tối thiểu của dịch chiết đơn đỏ từ dung môi chloroform được kết luận là 0,195 mg/ml. Điều này có thể giải thích là do khả năng chống chịu khác nhau của mỗi loại vi khuẩn.

Kết quả thí nghiệm cũng cho thấy cao khô dịch chiết thực vật khi phối trộn với nano bạc cho

hiệu quả ức chế Xoo tốt hơn. Cụ thể, cao khô dịch chiết mò hoa trắng ở nồng độ 0,39 mg/ml và cao khô dịch chiết đơn đỏ ở nồng độ 0,79 mg/ml bổ sung nano bạc 3,13 ppm đã có thể ức chế vi khuẩn. Kết quả này tương đồng với nghiên cứu của Đồng Huy Giới và Nguyễn Thanh Hải (2017) về việc phối trộn nano bạc với cao khô dịch chiết lá trà không để ức chế vi khuẩn Xoo in vitro.

3.4. Khả năng ức chế vi khuẩn Xoo của các chế phẩm trong điều kiện in vivo

Kết quả của các thí nghiệm trên cho thấy, cao khô dịch chiết mò hoa trắng và đơn đỏ có khả năng ức chế vi khuẩn Xoo trong điều kiện in vitro và phát huy hiệu quả tốt hơn khi phối trộn

Tác dụng ức chế vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* gây bệnh bạc lá lúa của dịch chiết cây mả hoa trắng (*Clerodendron fragrans* Vent.) và đơn đỏ (*Excoecaria cochinchinensis* Lour.)

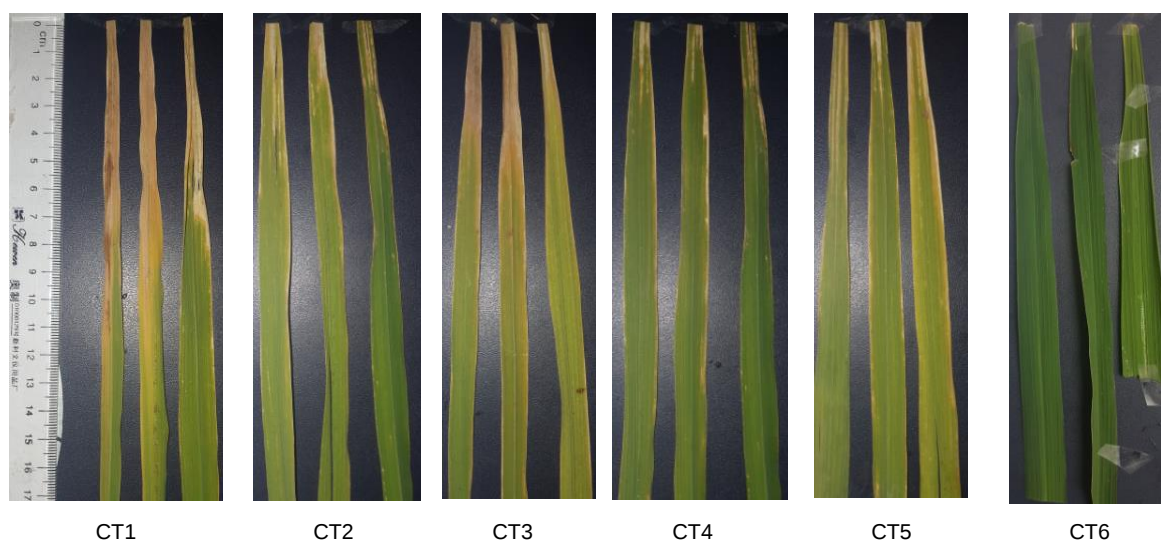
cùng nano bạc. Mục đích của thí nghiệm này là khảo sát và kiểm chứng khả năng ức chế của các chế phẩm nói trên với vi khuẩn *Xoo* trong điều kiện *in vivo*. Từ các kết quả thu được ở các thí nghiệm 3.2 và 3.3, 6 công thức thí nghiệm được lựa chọn và trình bày trong bảng 4 và hình 6.

Kết quả thu được cho thấy, chủng vi khuẩn *Xoo* 07 trong thí nghiệm có khả năng gây bệnh cao đối với giống lúa IR24. Ở công thức đối chứng khi chỉ phun nước cất sau 20 ngày lây nhiễm, chiều dài vết bệnh đạt 15 cm, lá lúa không còn màu xanh và mất khả năng quang hợp (Hình 6). Theo tiêu chuẩn đánh giá thì giống IR24 đã nhiễm nặng với bệnh bạc lá lúa chủng 07.

Kasugamycin - hoạt chất chính của thuốc bảo vệ thực vật Ankamycin - là kháng sinh chiết xuất từ sự lên men của nấm *Streptomyces kusaensis*, chuyên trị đạo ôn và bạc lá lúa, hiện nay vẫn đang được coi là một trong những thuốc kháng sinh có hiệu quả với *Xoo*, do đó được dùng trong thí nghiệm làm đối chứng âm. Có thể thấy chiều dài vết bệnh trong CT6 giảm đi nhiều so với đối chứng là nước (từ 15,00 cm xuống còn 1,50 cm). Bốn công thức (CT2-5) sử dụng chế phẩm đều làm giảm khả năng gây

bệnh bạc lá của chủng vi khuẩn 07. Khi sử dụng dịch chiết mả hoa trắng 3,13 mg/ml để phun, chiều dài vết bệnh đã giảm xuống 7,17 cm, còn dịch chiết đơn đỏ ở cùng nồng độ giúp bệnh chỉ nhiễm ở mức trung bình (vết bệnh dài 9,10 cm). Công thức sử dụng cao khô dịch chiết mả hoa trắng phối trộn nano bạc cho kết quả ức chế vi khuẩn rất khả quan, chiều dài vết bệnh giảm đi rõ rệt so với đối chứng (từ 15,00 cm xuống còn 4,40 cm). Nano bạc cũng giúp dịch chiết đơn đỏ tăng hiệu quả ức chế bệnh.

Theo nghiên cứu của Jabeen (2011), dịch chiết 3 loại cây *Terminalia chebula*, *Amomum subulatum*, *Thuja orientalis* đều cho khả năng ức chế vi khuẩn bạc lá trong điều kiện *in vivo*, chiều dài vết bệnh đều nhỏ hơn so với đối chứng. Dịch chiết lá cây *Terminalia chebula* cho kết quả tốt nhất, với khả năng kiểm soát bệnh bạc lá tăng 83,25% so với đối chứng. Cũng theo nghiên cứu này khi ứng dụng diện rộng trên cánh đồng thì dịch chiết cây *Terminalia chebula* cho kết quả rất khả quan. Dịch chiết là trầu không (*Piper beetle*) theo nghiên cứu của Đồng Huy Giới và Nguyễn Thanh Hải (2017) cũng được chứng minh khả năng kiểm soát bệnh tốt trong thí nghiệm chậu vại.



Hình 6. Kích thước vết bệnh bạc lá trên giống lúa IR24 sau 20 ngày lây nhiễm

Chú thích: CT1 - nước cất (đối chứng); CT2 - dịch chiết mả hoa trắng nồng độ 3,13 mg/ml; CT3 - dịch chiết đơn đỏ nồng độ 3,13 mg/ml; CT4 - hỗn hợp dịch chiết mả hoa trắng nồng độ 3,13 mg/ml và nano bạc nồng độ 3,13 ppm; CT5 - hỗn hợp dịch chiết đơn đỏ nồng độ 3,13 mg/ml và nano bạc nồng độ 3,13 ppm; CT6 - thuốc bảo vệ thực vật Ankamycin 30SL

Bảng 4. Kích thước vết bệnh bạc lá trên giống lúa IR24 sau 20 ngày lây nhiễm

	CT1	CT2	CT3	CT4	CT5	CT6
Chiều dài vết bệnh (cm)	15,00 ± 0,82	7,17 ± 1,03	9,10 ± 0,85	4,40 ± 0,43	7,03 ± 0,21	1,50 ± 0,41
Tỉ lệ cây nhiễm bệnh (%)	100	41,33	66,12	31,25	40,66	29,75
Đánh giá khả năng kháng bệnh	S	R	M	R	R	R

Chú thích: S-nhiễm, M-nhiễm vừa, R-kháng

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi và một số tác giả nói trên đã khẳng định khả năng ức chế vi khuẩn *Xoo in vitro* và kiểm soát bệnh bạc lá trong điều kiện thí nghiệm *in vivo* của dịch chiết thân - rễ mô hoa trắng và lá đơn đỏ. Những điều này một lần nữa chứng minh tính khả thi cho việc có thể sử dụng các hợp chất thiên nhiên, không độc hại thay thế thuốc bảo vệ thực vật hóa học nhằm giảm thiểu ô nhiễm môi trường, đảm bảo an toàn thực phẩm vì sức khỏe cộng đồng, qua đó phát triển một nền nông nghiệp sạch và bền vững.

4. KẾT LUẬN

Cao khô dịch chiết lá cây đơn đỏ (*Excoecaria cochinchinensis* Lour.) và thân rễ cây mô hoa trắng (*Clerodendron fragrans* Vent.) sử dụng 6 loại dung môi khác nhau đều có khả năng ức chế *in vitro* chủng vi khuẩn *Xoo* 07 gây bệnh bạc lá lúa. Cao khô dịch chiết ở nồng độ 100 mg/ml sử dụng dung môi ethanol 70% có hoạt tính ức chế vi khuẩn *Xoo* tốt nhất, đường kính vòng vô khuẩn lần lượt là 28,50 ± 0,41 cm (mô hoa trắng) và 21,00 ± 0,41 cm (đơn đỏ). Khi pha loãng, các dịch chiết này vẫn có tác dụng ức chế *in vitro* đối với chủng vi khuẩn *Xoo* 07. Nồng độ ức chế vi khuẩn tối thiểu (MIC_{DC}) của cao khô dịch chiết mô hoa trắng sử dụng dung môi ethanol 70% là 1,56 mg/ml và của đơn đỏ là 3,13 mg/ml; nồng độ này còn giảm xuống tương ứng là 0,39 mg/ml và 0,78 mg/ml khi được phối trộn với nano bạc 3,13 ppm. Cao khô dịch chiết mô hoa trắng nồng độ 3,13 mg/ml, hỗn hợp cao khô dịch chiết mô hoa trắng hoặc đơn đỏ nồng độ 3,13 mg/ml với nano bạc 3,13 ppm đều có khả năng làm giảm mức độ gây bệnh bạc lá của chủng vi khuẩn *Xoo* 07 từ mức nhiễm xuống mức kháng khi thử nghiệm trên giống lúa IR24.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được thực hiện với sự hỗ trợ một phần kinh phí từ quỹ học bổng VNUA-Monsanto.

Chúng tôi xin gửi lời cảm ơn đến Trung tâm Bảo tồn nguồn gen, Học viện Nông nghiệp Việt Nam đã cung cấp vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* và Bộ môn Sinh học, Khoa Công nghệ Sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam đã cung cấp nano bạc cho nghiên cứu. Chúng tôi cũng gửi lời cảm ơn tới các sinh viên Vũ Thị Quỳnh Nga, Nguyễn Thị Thương và Nguyễn Văn Tính của Khoa đã giúp đỡ trong quá trình thực hiện một số thí nghiệm để hoàn thành nghiên cứu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Đỗ Tấn Dũng & Nguyễn Văn Viên (2005). Bệnh bạc lá, một số bệnh chính hại lúa và biện pháp phòng trừ. Hà Nội. Nhà xuất bản Nông nghiệp.
- Đỗ Tấn Lợi (2003). Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam. Hà Nội.
- Đồng Huy Giới & Nguyễn Thanh Hải (2017). Đánh giá khả năng ức chế vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* gây bệnh bạc lá lúa của nano bạc và dịch chiết lá trà không. Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn, 3+4: 49-57.
- Govindappa, M., Umesha, S., & Lokesh, S. (2011). Adathoda 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.
- Jabeen, R. (2011). Medicinal plants-a potent antibacterial source against bacterial leaf blight (BLB) of rice. Pakistan Journal Botany, 43(1): 1-118.
- Kauffman HE., Reddy APK., Hsich SPY., Merca SD (1973). An improved technique for evaluating

Tác dụng ức chế vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* gây bệnh bạc lá lúa của dịch chiết cây mả hoa trắng (*Clerodendron fragrans* Vent.) và đơn đỏ (*Excoecaria cochinchinensis* Lour.)

- resistance of rice to *Xanthomonas oryzae*. The Plant Disease Reporter, 57, 537-541.
- Nascimento, G. G., Locatelli, J., Freitas, P. C., & Silva, G. L. (2000). Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. Brazilian journal of microbiology, 31(4): 247-256.
- Nguyễn Thanh Hải và Nguyễn Văn Thanh (2016). Nghiên cứu ảnh hưởng của dung môi đến hiệu suất chiết và tác dụng diệt khuẩn *in vitro* của cao khô dịch chiết lá cây đơn đỏ (*Excoecaria cochinchinensis* Lour.) với vi khuẩn *Staphylococcus* spp. và *Streptococcus* spp. phân lập từ dịch viêm từ cung bò. Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn, 6: 90-96.
- Nguyễn Thị Liên, Trần Thị Xuân Mai và Nguyễn Thị Pha (2012). Phân lập và nhận diện vi khuẩn gây bệnh bạc lá lúa (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) bằng kỹ thuật PCR đa thành phần. Tạp chí Khoa học, Trường đại học Cần Thơ, 23(a): 155-164.
- Nguyễn Văn Thanh & Nguyễn Thanh Hải (2014). Nghiên cứu tác dụng diệt khuẩn *in vitro* của dịch chiết cây mả hoa trắng (*Clerodendron fragrans* Vent.) trên vi khuẩn *E. coli*, *Salmonella* spp. phân lập từ phân lợn con theo mẹ mắc bệnh viêm ruột tiêu chảy và thử nghiệm điều trị. Tạp chí Khoa học và Phát triển, 12(5): 683-689.
- 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.
- Phan Hữu Tôn (2016). Lưu giữ và đánh giá tập đoàn nguồn gen lúa đã thu thập được đến năm 2012. Báo cáo tổng hợp nhiệm vụ quỹ gen cấp bộ. Mã số: B2014-11-02 GEN.
- Rahman, A., Islam, R., Al-Reza, S. M., & Kang, S. C. (2014). *In vitro* control of plant pathogenic *Xanthomonas* spp. using *Poncirus trifoliata* Rafin. EXCLI journal, 13: 1104.
- SES, IRRI (2002). Standard Evaluation System. International Rice Research Institute, Manila, Philippines, 11-30.
- Shrivastava, N., & Patel, T. (2007). Clerodendrum and healthcare: an overview. Medicinal and aromatic plant science and biotechnology, 1(1): 142-150.
- Tagami, Y., & Mizukami, T. (1962). Historical review of the researches on bacterial blight of rice caused by *Xanthomonas oryzae* (Uyede and Ishiyama) Dowson. Spec. Rep. Plant Dis. Ins. Pests Forecasting Serv, 10: 112.
- Vasudevan, P., Kavitha, S., Priyadarisini, V. B., Babujee, L., & Gnanamanickam, S. S. (2002). Biological control of rice diseases. Biological control of crop diseases. Gnanamanickam ed. Marcel Dekker Inc, New York, pp. 11-32.
- Wang, Ye-ling, Ping Li, Kai-jing Guo, Li-yu Chen, & Qing Tong (2014). Isolation and Identification of Chemical Constituents of *Excoecaria cochinchinensis* Lour. Natural Product Research and Development, 1: 013.
- Xie, J. M., Chen, Y. S., Zhao, S. N., & Zhou, X. D. (1989). Studies on the chemical constituents of *Excoecaria cochinchinensis* Lour. var. *viridis* Merr. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi, 14(5): 292-294, 319.