

Hiệu quả của chế phẩm vi khuẩn và dịch chiết từ củ gừng trong ức chế nấm *Alternaria solani* gây bệnh bạc lá sớm ở cà chua

Đỗ Quang Trung^{1*}, Nguyễn Trọng Trí²

¹Khoa Dược, Trường Đại học Đại Nam, phường Phú Lương, Hà Nội, Việt Nam

²Trường Đại học Lâm nghiệp, xã Xuân Mai, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 24/7/2024; ngày chuyển phản biện 27/7/2024; ngày nhận phản biện 11/8/2024; ngày chấp nhận đăng 15/8/2024

Tóm tắt:

Bệnh bạc lá sớm (EB), do *Alternaria solani* gây ra, là một vấn đề nghiêm trọng trong sản xuất cà chua. Nghiên cứu nhằm đánh giá hiệu quả sinh học của tác dụng hiệp đồng giữa chủng vi khuẩn phân giải lân PSB31 và dịch chiết từ củ gừng (GPE) kháng lại bệnh EB cà chua. Kết quả cho thấy, vi khuẩn PSB31 (được định danh là *Bacillus* sp. IMAU61039) ức chế tối đa (46,9%) sự phát triển sợi nấm *A. solani*. Trong số các tổ hợp, PSB31 + GPE có tác dụng ức chế tăng trưởng sợi nấm cao nhất (65,4%) so với nhóm đối chứng. Hơn nữa, trong điều kiện vườn ươm, hạt giống được xử lý bằng tổ hợp vi khuẩn PSB31 + GPE có tỷ lệ ức chế bệnh cao nhất (77,81%) so với nhóm đối chứng không được xử lý (72,71%) và nhóm được kiểm soát bệnh bằng hóa chất (90,23%). Đặc biệt, xử lý hạt cà chua với tổ hợp vi khuẩn PSB31 và GPE giúp thúc đẩy sự nảy mầm của hạt và sự tăng trưởng của cây con trong quá trình lây nhiễm nấm *A. solani*. Các kết quả này cho thấy tiềm năng trong việc ứng dụng chủng PSB31 và GPE trong kháng lại bệnh do nấm *A. solani* trên cây cà chua.

Từ khóa: *Alternaria solani*, bệnh bạc lá sớm, cao chiết gừng, cây cà chua, chế phẩm vi khuẩn.

Chỉ số phân loại: 1.6, 4.6

Effectiveness of bacterial inoculant and ginger extract in suppressing *Alternaria solani* causing early blight in tomato

Quang Trung Do^{1*}, Trọng Trí Nguyễn²

¹Faculty of Pharmacy, Dai Nam University, Phu Luong Ward, Hanoi, Vietnam

²Vietnam National University of Forestry, Xuan Mai Commune, Hanoi, Vietnam

Received 24 July 2024; revised 11 August 2024; accepted 15 August 2024

Abstract:

Early blight (EB), caused by the fungus *Alternaria solani*, represents a serious problem in tomato production. This study aimed to evaluate the effectiveness of a synergistic strategy, combining phosphorus-solubilising bacteria PSB31 with ginger extract (GPE) in inhibiting early blight. The findings showed that strain PSB31 (identified as *Bacillus* sp. IMAU61039) presented the highest level of inhibition (46.9%) against the mycelial growth of *A. solani*, the causal agent of early blight in tomato plants. Among the treatments, the combination of PSB31 and GPE exhibited the most significant inhibitory effect on the mycelial growth (65.4%) of *A. solani* compared to the control. Moreover, under greenhouse conditions, tomato seeds treated with this combination showed the highest rate of early-blight inhibition (77.81%) compared to the untreated control (72.71%) and chemical disease control (90.23%). Notably, treatment of tomato seeds with the combination of PSB31 and GPE promoted seed germination (93.54%) and seedling development under *A. solani* infection. These results indicate the potential application of strain PSB31 in combination with GPE for controlling diseases caused by *A. solani* in tomato plants.

Keywords: *Alternaria solani*, bacterial inoculants, early blight, ginger extract, tomato plant.

Classification numbers: 1.6, 4.6

*Tác giả liên hệ: Email: trungdq@dainam.edu.vn

1. Đặt vấn đề

Cà chua (*Lycopersicon esculentum* Mill.) có giá trị kinh tế cao và được trồng ở Việt Nam. Tuy nhiên, cây cà chua đang bị đe dọa bởi nhiều loại bệnh do virus, tuyến trùng, vi khuẩn và nấm [1]. Đáng lưu ý là EB ở cây cà chua do nấm *A. solani* làm giảm đáng kể năng suất cây cà chua trên toàn thế giới, khoảng 80% [2]. Để khắc phục vấn đề này, người dân đã áp dụng các phương pháp hóa học, chủ yếu là sử dụng các loại thuốc diệt nấm đất tiền [2, 3]. Giải pháp này có những nhược điểm chính là không phù hợp với môi trường và ảnh hưởng đến sức khỏe cộng đồng, cũng như là nguyên nhân gây ra sự phát triển tính kháng thuốc diệt nấm ở nấm *A. solani* [2, 3]. Phương pháp kiểm soát sinh học các mầm bệnh thực vật đang được các nhà khoa học quan tâm để thay thế cho phương pháp hóa học, do phương pháp này không chỉ thân thiện với môi trường, hữu ích lâu dài, kháng lại bệnh tật và không ảnh hưởng cho sức khỏe mà còn cải thiện đáng kể chất lượng và sản lượng cây cà chua [3].

Các hợp chất từ thực vật và các tác nhân kiểm soát sinh học thân thiện với môi trường, có khả năng kháng lại nhiều loại bệnh trên thực vật. Một số loài thực vật có khả năng tạo ra các hợp chất tự nhiên kháng lại hiệu quả nấm gây bệnh thực vật [2]. Gần đây, nhiều nghiên cứu đã cho thấy chiết xuất thực vật cùng với vi khuẩn vùng rễ kích thích tăng trưởng thực vật (PGPR) là chiến lược tối ưu để quản lý và kiểm soát bệnh ở thực vật [4]. Cây Gừng (*Zingiber officinale*) là một lựa chọn thay thế phù hợp cho thuốc kháng vi khuẩn tổng hợp, do sự hiện diện của các chất hóa học như monoterpenoids, sesquiterpenoids, hợp chất phenol và các dẫn xuất của nó, aldehyde, xeton, rượu, este [5]. Các nghiên cứu gần đây cho thấy hoạt động kháng nấm của chiết xuất gừng và tinh dầu gừng tương ứng kháng lại *Fusarium oxysporum* và *Colletotrichum falcatum* [6].

Tương tự, việc điều tra và đánh giá các chủng PGPR có lợi cùng với một số chiết xuất thực vật, phân compost và than sinh học (biochar) cải tiến được sử dụng để nâng cao độ phì nhiêu của đất, ngăn chặn tác nhân gây bệnh ở thực vật [2], mặc dù tất cả PGPR đều hữu ích cho việc nâng cao năng suất cây trồng và cải thiện cả về chất lượng và số lượng [7]. Hơn nữa, nấm rễ cộng sinh cũng được sử dụng rộng rãi để ngăn chặn bệnh do *A. solani* và bảo vệ cây cà chua khỏi bị thiệt hại do loài nấm này gây ra [8]. Việc sử dụng chế phẩm vi khuẩn là một công cụ hữu ích để quản lý bệnh gây chết cây [9]. PGPR có mặt trong đất nông nghiệp nhưng tiềm năng đối kháng của chúng đối với EB của cà chua vẫn chưa được nghiên cứu rộng rãi. Nghiên cứu này được thiết kế để đánh giá hoạt tính kháng nấm của riêng PGPR và kết hợp với GPE kháng lại nấm *A. solani* trong điều kiện *in vitro* và thử nghiệm trong chậu vại.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Chuẩn bị dịch chiết từ củ gừng

Củ gừng khoảng 11-12 tháng tuổi được thu mua trực tiếp tại vườn ở thôn Hoàng Trung, xã Hồng Dương, huyện Thanh Oai, Hà Nội (trước sập nhập).

Những củ gừng tươi, vỏ mịn và ít nếp nhăn được rửa sạch,

xay nhuyễn rồi sấy khô (độ ẩm 10%-15%) trong máy sấy ở 60°C trong 72h. Máy xay hạt khô (Logkent, Nhật Bản) được sử dụng để nghiền gừng khô và bột được lọc qua rây lưới 100 Mesh (tương ứng 0,149 mm). Bột sau đó được giữ lạnh (4°C) trong bóng tối. Chiết xuất được thực hiện bằng cách trộn 100 g bột gừng với 1000 ml nước cất vô trùng và ủ trong 3 ngày ở nhiệt độ phòng. Hỗn hợp dịch được lọc và ly tâm để loại bỏ kết tủa thu dịch nổi. Dịch nổi này được sử dụng làm dung dịch gốc cho các thí nghiệm tiếp theo.

2.2. Khả năng tương thích của GPE với chủng vi khuẩn PSB31

Chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. IMAU61039 (ký hiệu là PSB31), phân lập từ đất vùng rễ cây cà chua vụ xuân hè 2022 trồng tại Thái Bình (trước sập nhập) có khả năng hòa tan tốt các hợp chất lân khó tan [10]. Chủng vi khuẩn được lưu giữ tại Khoa Công nghệ sinh học, Trường Đại học Đại Nam.

Khả năng tương thích của GPE với chủng vi khuẩn PSB31 đã được thử nghiệm trên môi trường LB (Luria - Bertani; tryptone: 10 g, cao nấm men: 5 g, NaCl: 5 g, nước cất vừa đủ: 1l, môi trường thạch bổ sung agar: 15 g/l) trong một thí nghiệm lặp lại. Trong thí nghiệm này, GPE được chuẩn bị với các nồng độ khác nhau (10, 15 và 20%) bằng cách pha loãng lần lượt 10, 15 và 20 ml GPE trong 100 ml nước cất vô trùng.

Chủng vi khuẩn được nuôi trong 48 giờ, cấy trải trên các đĩa có chứa môi trường LB. Ba đĩa giấy nhỏ (5 mm) được đặt cách đều nhau trên mỗi đĩa petri. Sau đó, 10 µl của 10, 15 và 20% GPE được nhỏ vào đĩa giấy lọc vô trùng bằng pipet. Tương tự, các đĩa đối chứng dương và âm được xử lý lần lượt với 10 µl streptomycin sulfate 100 ppm và dH_2O . Tất cả các đĩa được ủ ở $26 \pm 2^\circ\text{C}$ trong 48 giờ và quan sát sự phát triển của các vùng ức chế xung quanh các đĩa giấy. Sự hình thành vùng ức chế cho thấy, sự không tương thích giữa GPE và chủng vi khuẩn, trong khi việc không có vùng ức chế xác nhận tính tương thích [11].

2.3 Hiệu quả kháng nấm *Alternaria solani* Tr1 trong điều kiện phòng thí nghiệm của việc sử dụng riêng lẻ và kết hợp vi khuẩn PSB31 và GPE

Nấm *A. solani* Tr1 được phân lập từ cà chua mắc bệnh bạc lá sớm ở Việt Nam, lưu giữ tại Khoa Công nghệ sinh học, Trường Đại học Đại Nam.

Phương pháp đồng nuôi cấy được thực hiện để kiểm tra hiệu quả của việc áp dụng riêng lẻ và kết hợp của chủng vi khuẩn PSB31 và GPE đối với sự phát triển sợi nấm của *A. solani* trong ống nghiệm. Các đĩa giấy lọc đã khử trùng (5 mm) được đặt lên đĩa Petri có chứa môi trường PDA (Potato Glucose Agar: potato 200 g/l, D - glucose 20 g/l, agar: 20 g/l, nước cất vừa đủ 1l). Các đĩa này được thêm 6 µl canh trường chủng vi khuẩn PSB31 ($\text{OD}_{600\text{nm}}=1$) hoặc GPE. Đối với các ứng dụng kết hợp, 3 µl dịch nuôi cấy chủng vi khuẩn PSB31 và 3 µl GPE được đặt trên các đĩa giấy lọc đã khử trùng. Các đĩa sợi nấm đang phát triển tốt (5 mm) lấy từ đĩa giống nấm *A. solani* 7 ngày tuổi được đặt ở phía bên kia của đĩa giấy lọc. Các đĩa Petri đối chứng chỉ chứa các đĩa giấy lọc được nhúng bằng nước cất. Các đĩa thí nghiệm được giữ ở $26 \pm 2^\circ\text{C}$

trong 7 ngày. Mỗi thí nghiệm được thực hiện với ba lần lặp lại. Số liệu về % ức chế phát triển của sợi nấm từ mỗi thí nghiệm được tính theo công thức sau:

$$\text{Sự ức chế phát triển của sợi nấm (\%)} = [(C-T)/C] \times 100$$

trong đó: C: tăng trưởng sợi nấm ở mẫu đối chứng (cm); T: tăng trưởng sợi nấm trong điều trị (cm).

2.4. Nghiên cứu khả năng kích thích nảy mầm hạt cà chua của chủng vi khuẩn PSB31

Ảnh hưởng của chủng vi khuẩn PSB31 đối với sự nảy mầm của hạt cà chua đã được nghiên cứu bằng phương pháp khăn giấy của J. Sudisha và cs (2012) [12]. Hạt cà chua giống (*Lycopersicon esculentum* F1 TN747) do Công ty TNHH thương mại Trang Nông phát triển được lưu hành trên thị trường.

Trong thí nghiệm này, năm hạt cà chua được làm sạch bề mặt bằng dung dịch NaOCl 1% trong 2 phút, sau đó rửa 3 lần trong nước cất vô trùng và để khô trên giấy lọc vô trùng. Hạt cà chua đã khử trùng bề mặt được xử lý tiếp bằng dung dịch CMC (0,1%) khử trùng làm vật liệu kết dính, sau đó ngâm trong 30 ml canh trường vi khuẩn (1×10^7 cfu/ml) trong 2 giờ. Trong thí nghiệm đối chứng, hạt giống được xử lý bằng nước cất vô trùng. Hạt giống đã phủ vi khuẩn (25 hạt) được đặt trên 2 lớp giấy lọc ẩm trong khay nhựa. Mỗi thí nghiệm có 3 khay. Tất cả các khay được đặt ở $28 \pm 2^\circ\text{C}$ trong 15 ngày. Sau 07 ngày, tỷ lệ nảy mầm của hạt (SGP) được ghi nhận theo công thức:

$$\text{Tỷ lệ nảy mầm của hạt (\%)} = (\text{Số hạt nảy mầm} / \text{Tổng số hạt giống}) \times 100$$

Số liệu về số mầm và chiều dài rễ, chồi (cm) được ghi nhận 15 ngày sau khi xử lý. Chỉ số sức sống của cây con (SVI) được tính theo công thức:

$$\text{SVI} = (\text{chiều dài rễ trung bình} + \text{chiều dài chồi trung bình}) \times \% \text{ độ nảy mầm}$$

2.5. Ảnh hưởng của vi khuẩn PSB31 và GPE lên bệnh EB và thúc đẩy tăng trưởng cây cà chua

Thí nghiệm trong chậu được thiết kế theo phương pháp của M. Rasool và cs (2021) [13] để nghiên cứu tác động của việc áp dụng riêng lẻ và kết hợp chủng vi khuẩn PSB31 và GPE trong việc ngăn chặn tỷ lệ mắc bệnh EB và thúc đẩy tăng trưởng cây cà chua. Hạt cà chua được làm sạch bề mặt bằng NaOCl 1%, rửa 3 lần trong dH_2O và sấy khô bằng giấy thấm trước khi cho vi khuẩn. Hạt giống được xử lý bằng 0,1% CMC làm vật liệu kết dính, sau đó ngâm trong 30 ml huyền phù vi khuẩn PSB31 (1×10^7 cfu/ml) trong 2 giờ. Sau đó, 5 hạt cà chua đã phủ vi khuẩn được gieo vào chậu nhựa (10 l) chứa 8 kg hỗn hợp đất (cát: đất sét: phân chuồng với tỷ lệ 1:1:1) đã khử trùng [14]. Khi cây con được bốn tuần tuổi, đất vùng rễ được tưới bổ sung 15 ml huyền phù vi khuẩn (1×10^7 cfu/ml). Huyền phù bảo tử nấm được chuẩn bị bằng cách cho 3 ml nước cất vô trùng vào đĩa nuôi cấy nấm *A. solani* một tuần tuổi. Lắc đều để giải phóng bào tử khỏi các sợi nấm. Huyền phù có nồng độ bào tử 1×10^6 bào tử ml^{-1} được sử dụng cho thí nghiệm [15]. Sau 1 ngày bổ sung chủng vi

khẩn PSB31 vào đất, cây giống cà chua được phun sương huyền phù bào tử nấm *A. solani* lên lá bằng máy phun cầm tay [14]. Độ ẩm tương đối (~70%) cần thiết cho sự phát triển của bệnh EB được duy trì bằng cách phun nước cất cho cây.

Chiết xuất bột gừng (25 g/l) được chuẩn bị trong nước cất và được sử dụng dưới dạng phun qua lá trong các thí nghiệm. Những cây được phun thuốc trừ nấm Antracol 70 WP ở nồng độ 0,2% đóng vai trò là đối chứng dương, trong khi những cây được phun huyền phù bào tử nấm *A. solani* là đối chứng âm. Các chậu được đặt trong vườn ươm, với điều kiện được kiểm soát và các hoạt động nông học khác được giữ nguyên cho tất cả các thí nghiệm. Các thí nghiệm được thiết kế hoàn toàn ngẫu nhiên với 3 lần lặp lại. Các thí nghiệm bao gồm: T1=Vi khuẩn PSB31+*A. solani*; T2=GPE+*A. solani*; T3=Vi khuẩn PSB31+GPE+*A. solani*; T4=Antracol (đối chứng dương); T5=chỉ lây nhiễm nấm *A. solani* (đối chứng âm).

Số liệu về khả năng kiểm soát bệnh được ghi lại sau khi áp dụng biện pháp xử lý được ba tuần. Hiệu quả giảm bệnh được tính toán theo công thức của W.S. Abbott (1987) [16] dựa trên tỷ lệ nhiễm bệnh của hai nhóm đối tượng: nhóm đối chứng và nhóm thí nghiệm. Công thức cụ thể như sau:

$$\text{Tỷ lệ kiểm soát bệnh (\%)} = [(C-T)/C] \times 100$$

trong đó: C: tỷ lệ nhiễm bệnh trên tổng số cây trong nhóm đối chứng; T: tỷ lệ nhiễm bệnh trên tổng số cây trong nhóm thí nghiệm.

Số liệu về các đặc điểm sinh trưởng của cây (sự nảy mầm của hạt, chiều dài mầm, chiều dài rễ mầm, chỉ số sức sống, chiều dài chồi, chiều dài rễ, trọng lượng chồi tươi, trọng lượng chồi khô, trọng lượng rễ tươi và trọng lượng rễ khô) được ghi nhận 45 ngày sau khi cấy. Mức độ gây hại của bệnh và chỉ số phần trăm bệnh (PDI) được tính theo QCVN 01-38:2010/BNNTPTNT như dưới đây:

$$\text{PDI} = [(n_1 + 3n_2 + 5n_3 + 7n_4 + 9n_5) / (N \times K)] \times 100$$

trong đó: $n_1, n_2, \dots, n_5$ lần lượt là số lá bị bệnh ở các cấp bệnh; N là tổng số lá điều tra; K là cấp bệnh cao nhất quan sát được.

2.6. Xác định hàm lượng chất diệp lục

Hàm lượng chất diệp lục (chlorophyll) và carotenoid được xác định theo phương pháp của J. Hiscox và cs (1979) [17]. Trong phương pháp này, 1 g mẫu lá cà chua tươi được cắt thành từng đoạn nhỏ, nghiền bằng chày và cối sứ trong 100 ml dung dịch axeton 80% (v/v) và sau đó lọc qua giấy lọc Whatman No. 1. Mật độ quang của dịch lọc được đo bằng máy đo quang phổ ở bước sóng 470, 649 và 665 nm. Nồng độ chlorophyll và Carotenoid trong các mẫu lá được tính toán bằng công thức của O.H. Hansen và cs (1978) [18] dưới đây:

$$\text{Chlorophyll (a)/g mẫu} = 11,63 \times \text{OD}_{665 \text{ nm}} - 2,39 \times \text{OD}_{649 \text{ nm}}$$

$$\text{Chlorophyll (b)/g mẫu} = 20,11 \times \text{OD}_{649 \text{ nm}} + 5,18 \times \text{OD}_{665 \text{ nm}}$$

$$\text{Chlorophyll (a+b)/g mẫu} = 6,45 \times \text{OD}_{665 \text{ nm}} + 17,72 \times \text{OD}_{649 \text{ nm}}$$

$$\text{Carotenoid (mg/g mẫu tươi)} = 1000 \times \text{OD}_{470 \text{ nm}} - 1,82 \times \text{Ca} - 85,02 \times \text{Cb} / 198$$

trong đó: Ca: nồng độ chlorophyll (a); Cb: nồng độ chlorophyll (b).

2.7. Phương pháp xử lý số liệu

Các số liệu thí nghiệm được phân tích trong Statistix 8.1 và MS Excel 365. Các thí nghiệm được tiến hành hoàn toàn ngẫu nhiên với ba lần lặp lại. Các giá trị trung bình được tính toán bằng phần mềm ANOVA và kiểm tra sự khác biệt bằng cách sử dụng LSD ($p < 0,05$). Phân tích tương quan được thực hiện trong MS Excel 365. Kết quả được biểu thị bằng trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Ảnh hưởng của việc sử dụng riêng lẻ và kết hợp vi khuẩn PSB31 và dịch chiết từ củ gừng lên sự phát triển sợi nấm *A. solani* trong điều kiện phòng thí nghiệm

Các kết quả thu thập được từ nghiên cứu về khả năng tương thích giữa chủng vi khuẩn PSB31 với GPE cho thấy, GPE ở các nồng độ khác nhau (10%, 15% và 20%) không ảnh hưởng đến sự sinh trưởng và phát triển của chủng vi khuẩn PSB31.

Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của việc sử dụng riêng lẻ và kết hợp vi khuẩn PSB31 và GPE lên sự phát triển sợi nấm *A. solani* trong điều kiện phòng thí nghiệm được minh họa trong ảnh 1 và bảng 1. Số liệu cho thấy khả năng đối kháng cao của chủng vi khuẩn PSB31 đối với nấm *A. solani* trong điều kiện *in vitro* (tỷ lệ ức chế sự phát triển sợi nấm là 46,9%). Đặc biệt là việc áp dụng kết hợp chủng vi khuẩn PSB31 và GPE cho kết quả tốt hơn trong việc ức chế sự phát triển của sợi nấm *A. solani*, tỷ lệ ức chế tăng trưởng sợi nấm cao nhất (65,4%) so với đối chứng không được xử lý bằng vi khuẩn và GPE. Việc áp dụng GPE riêng lẻ cũng cho thấy sự ức chế tăng trưởng sợi nấm của *A. solani* là 44,4% (bảng 1).

Chủng vi khuẩn PSB31 (định danh là chủng *Bacillus* sp. IMAU61039) được phân lập từ đất vùng rễ cây cà chua có khả năng hòa tan lân đã được thử nghiệm kháng lại nấm *A. solani*, để xác định và mô tả các chủng phân lập đối chứng sinh học có triển vọng. Kết quả nghiên cứu cho thấy, chủng vi khuẩn PSB31 với các hoạt động phân giải lân có hoạt tính đối kháng kháng lại nấm *A. solani*. Sự

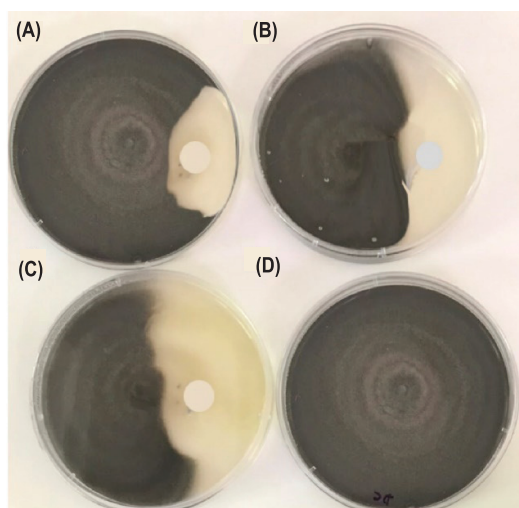
Bảng 1. Ảnh hưởng của vi khuẩn PSB31 và dịch chiết từ củ gừng đến khả năng ức chế sự phát triển của sợi nấm *A. solani*.

Thí nghiệm	Đường kính hệ sợi nấm gây bệnh (cm)	Tỷ lệ ức chế sự phát triển của sợi nấm so với đối chứng (%)
Vi khuẩn PSB31	4,3 $\pm$ 0,12 ^{bc}	46,9
Vi khuẩn PSB31 + Dịch chiết từ củ gừng	2,8 $\pm$ 0,22 ^{cd}	65,4
Dịch chiết từ củ gừng	4,5 $\pm$ 0,21 ^b	44,4
Đối chứng	8,1 $\pm$ 0,31 ^a	0,0

^aCác giá trị trong cùng một cột có cùng (các) chữ cái không khác biệt đáng kể như đã xác định bằng thử nghiệm LSD ($p = 0,01$).

ức chế tăng trưởng sợi nấm trong ống nghiệm là 46,9% so với đối chứng. Hiệu quả ức chế của loài *Pseudomonas* và *Bacillus* kháng lại nấm *A. solani* có thể là do sự tồn tại của các chất kháng sinh như surfactin, bacilloycin, zwittermycin A, pyoluteorin, pyrrolnitrin, pyocyanin, iturin và 2,4-diacetylphloroglucinol [19]. Những chất kháng sinh này có thể ức chế sự phát triển của nấm bằng cách nhắm vào các quá trình tế bào của chúng [20]. Các chất kháng sinh có nguồn gốc từ vi khuẩn vùng rễ cung cấp sự thay thế bền vững và thân thiện với môi trường cho thuốc diệt nấm tổng hợp. Các hợp chất này có khả năng được tạo ra thông qua sự sinh trưởng và phát triển của vi khuẩn trong vùng rễ, và gây kích thích sinh học đến sự phát triển của thực vật, mang lại khả năng phòng vệ, kháng lại các mầm bệnh thực vật.

Kết quả của nghiên cứu này cho thấy xử lý bằng GPE đạt được sự ức chế sợi nấm 44,4%, chứng tỏ đây là hợp chất hiệu quả để kiểm soát nấm *A. solani*. Các chiết xuất từ các loài thực vật khác như *A. indica*, *A. sativum*, *P. lysterophorus* và *D. stramonium* cũng được báo cáo có khả năng ức chế nấm *A. solani* [21]. Ngoài ra, một số nghiên cứu khác phát hiện GPE có đặc tính kháng khuẩn phổ rộng và hoạt động như thuốc diệt nấm, bằng cách ngăn chặn sự hình thành và nảy mầm bào tử, cũng như làm biến dạng sợi nấm của các loại vi khuẩn gây bệnh thực vật khác nhau [21], chẳng hạn như *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* [22], *Alternaria alternata* [23], *Fusarium solani* [24]. Ngoài ra, kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy sự kết hợp của GPE và vi khuẩn PSB31, thể hiện hiệu quả ức chế nấm *A. solani* cao hơn so với việc chỉ sử dụng vi khuẩn PSB31 hoặc GPE. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của S. Hyder và cs [25], cho thấy sự kết hợp của chiết xuất bột gừng với vi khuẩn *Bacillus cereus* Gb-T23 và *Pseudomonas fluorescens* Ft-G43 duy trì sự ức chế nấm so với chỉ sử dụng chiết xuất bột gừng, trong khi sự kết hợp của hợp chất này với *Bacillus subtilis* Hyd-01F, Hyd-13Z và *Pseudomonas putida* St-149D, đã chứng tỏ khả năng kháng nấm tăng lên. Đặc tính kháng khuẩn và ức chế của các chất chiết xuất từ thực vật, chẳng hạn như chiết xuất bột gừng, là chủ đề của nhiều nghiên cứu chứng minh tiềm năng của chúng trong việc quản lý sâu bệnh và mầm bệnh. Một số báo cáo đã chứng minh việc sử dụng đồng thời hai tác nhân này có khả năng khai thác các tương tác hiệp đồng, hoặc bổ sung của chúng để quản lý hiệu quả các bệnh nấm trên cây trồng [26].



Hình 1. Ức chế sự phát triển của sợi nấm *A. solani* trong điều kiện phòng thí nghiệm của dịch chiết từ củ gừng. (A) vi khuẩn PSB31 (B) và kết hợp của vi khuẩn PSB31 với dịch chiết từ củ gừng (C) so với đối chứng (D).

3.2. Đánh giá ảnh hưởng của chủng vi khuẩn PSB31 đến khả năng nảy mầm và sức sống của hạt cà chua trong điều kiện phòng thí nghiệm

Kết quả cho thấy tác nhân vi khuẩn PSB31 đã cải thiện khả năng nảy mầm của hạt cà chua ($86,23 \pm 2,15\%$) so với đối chứng ($77,12 \pm 1,27\%$). Hơn nữa, chủng vi khuẩn PSB31 cũng cải thiện đáng kể chiều dài mầm ($9,31 \pm 0,76$ cm) và chiều dài rễ mầm ($3,12 \pm 0,32$ cm) ở cây giống cà chua so với đối chứng (chiều dài mầm và rễ mầm được ghi nhận lần lượt là $7,68 \pm 0,27$ và $2,13 \pm 0,21$ cm). Sự gia tăng đáng kể về chỉ số sức sống của cây con cũng được ghi nhận cho cây được xử lý với vi khuẩn PSB31 so với cây trong thí nghiệm đối chứng (bảng 2).

Bảng 2. Ảnh hưởng của vi khuẩn PSB31 đến các tính trạng chất lượng hạt giống cà chua trong điều kiện phòng thí nghiệm.

Thí nghiệm	Tỷ lệ hạt nảy mầm (%)	Chiều dài mầm (cm)	Chiều dài rễ mầm (cm)	Chỉ số sức sống của cây con
Xử lý với vi khuẩn PSB31	$86,23 \pm 2,15^b$	$9,31 \pm 0,76^b$	$3,12 \pm 0,32^b$	1071,8
Đối chứng	$77,12 \pm 1,27^a$	$7,68 \pm 0,27^a$	$2,13 \pm 0,21^a$	756,5

^aCác giá trị trong cùng một cột có cùng (các) chữ cái không khác biệt đáng kể như đã xác định bằng thử nghiệm LSD ($p=0,01$).

Trong điều kiện *in vitro*, kết quả nghiên cứu này cho thấy hạt giống được phủ bằng vi khuẩn PSB31 tăng cường khả năng nảy mầm của hạt và các chỉ số tăng trưởng khác. Các kết quả tương tự được công bố ở cây cà chua [27] và các cây rau khác [28]. Hạt nảy mầm phụ thuộc vào điều kiện môi trường và sự cân bằng giữa tỷ lệ axit abscisic/gibberellin để thúc đẩy quá trình phá vỡ trạng thái ngủ. Theo nhiều nghiên cứu, việc sử dụng PGPR tạo điều kiện thuận lợi cho sự nảy mầm của hạt và sự phát triển của cây con, có thể là do sự tổng hợp axit gibberellic [28]. Tuy nhiên, hạt nảy mầm rất dễ bị tổn thương trước các yếu tố sống và không sống, bao gồm cả nhiễm mầm bệnh [29]. Hơn nữa, nghiên cứu này cho thấy, việc áp dụng PGPR kết hợp với GPE làm tăng khả năng nảy mầm của hạt cà chua khi có mầm bệnh thực vật, và quản lý hiệu quả bệnh EB của cà chua trong thử nghiệm trong chậu.

3.3. Thử nghiệm chủng vi khuẩn PSB31 và chiết xuất từ củ gừng (GPE) trong việc kiểm soát bệnh bạc lá sớm (EB) và kích thích tăng trưởng thực vật

Tác dụng riêng lẻ và tổ hợp giữa chủng vi khuẩn PSB31 và GPE đối với sự nảy mầm của hạt, ức chế bệnh EB và thúc đẩy tăng trưởng ở cây cà chua được kiểm tra với sự tương tác với nấm *A. solani* Tr1 trong chậu ở điều kiện vườn ươm. Kết quả cho thấy, hạt cà chua được xử lý bằng vi khuẩn PSB31 riêng lẻ và kết hợp với GPE cho thấy các hiệu quả khác nhau trong ức chế bệnh EB và sự nảy mầm của hạt như được trình bày trong bảng 3.

Số liệu trong bảng 3 cho thấy, hạt được xử lý bằng tổ hợp vi khuẩn PSB31+GPE cho tỷ lệ ức chế bệnh cao nhất là 77,81%, trong khi phản ứng riêng lẻ của vi khuẩn PSB31 và GPE cho thấy tỷ lệ ức chế bệnh lần lượt là 56,71% và 50,52% và kém hiệu quả hơn đối chứng dương sử dụng thuốc Antracol (68,21%). Trong trường hợp hạt cà chua nảy mầm, chủng vi khuẩn PSB31 được thử nghiệm

riêng lẻ và kết hợp với GPE đã cải thiện đáng kể khả năng nảy mầm của hạt. Tỷ lệ nảy mầm của hạt tối đa được ghi nhận trong tổ hợp vi khuẩn PSB31+GPE ($93,54 \pm 2,25\%$) so với đối chứng âm ($72,71 \pm 2,23\%$) và đối chứng dương ($90,23 \pm 2,14\%$). Việc xử lý hạt giống riêng lẻ bằng GPE hoặc vi khuẩn PSB31 cho tỷ lệ nảy mầm của hạt lần lượt là $78,15 \pm 3,11\%$ và $88,23 \pm 1,31\%$ khi có sự hiện diện của nấm *A. solani*. Đáng lưu ý là tỷ lệ phần trăm bệnh là tối thiểu cũng được quan sát thấy trong thí nghiệm sử dụng vi khuẩn PSB31+GPE ($13,51 \pm 1,23\%$), cao hơn trong đối chứng sử dụng thuốc diệt nấm Antracol ($18,27 \pm 1,14\%$).

Bảng 3. Ảnh hưởng của vi khuẩn PSB31 và dịch chiết từ củ gừng đến khả năng ức chế bệnh bạc lá sớm và cải thiện sự phát triển của cây cà chua.

Thí nghiệm	Tỷ lệ nảy mầm (%)	Tỷ lệ mắc bệnh EB (%)	Tỷ lệ kiểm soát bệnh EB (%)
Vi khuẩn PSB31 + <i>A. solani</i>	$88,23 \pm 1,31^{bc}$	$24,7 \pm 1,25^{bc}$	56,71
Dịch chiết từ củ gừng + <i>A. solani</i>	$78,15 \pm 3,11^c$	$30,31 \pm 1,25^b$	50,52
Vi khuẩn PSB31+GPE + <i>A. solani</i>	$93,54 \pm 2,25^a$	$13,51 \pm 1,23^d$	77,81
Đối chứng dương (Antracol)	$90,23 \pm 2,14^b$	$18,27 \pm 1,14^c$	68,21
Đối chứng âm (Nước)	$72,71 \pm 2,23^d$	$61,72 \pm 1,34^a$	0,0

^aCác giá trị trong cùng một cột có cùng (các) chữ cái không khác biệt đáng kể như đã xác định bằng thử nghiệm LSD ($p=0,01$).

Thêm vào đó, kết quả nghiên cứu cũng cho thấy chủng vi khuẩn PSB31 riêng lẻ và kết hợp với GPE đều ảnh hưởng đáng kể đến các thông số tăng trưởng của cây khi có mặt của nấm gây bệnh *A. solani* (bảng 4). Trong các thí nghiệm được tiến hành, tổ hợp vi khuẩn PSB31 và GPE giúp tăng nhiều nhất chiều dài chồi ($139,57 \pm 1,27$ cm), trong khi thí nghiệm chỉ sử dụng GPE giá trị tăng chiều dài chồi được ghi nhận là $111,34 \pm 1,47$ cm. Trong trường hợp chiều dài rễ, tổ hợp vi khuẩn PSB31+GPE cũng giúp tăng đáng kể chiều dài rễ ($22,79 \pm 1,16$ cm) so với các thí nghiệm chỉ sử dụng chủng vi khuẩn hoặc GPE trong đó chiều dài rễ được ghi nhận lần lượt là $18,76 \pm 1,32$ cm và $15,32 \pm 2,13$ cm.

Bảng 4. Ảnh hưởng vi khuẩn PSB31 và dịch chiết từ củ gừng đến khả năng tăng trưởng thực vật trong điều kiện vườn ươm.

Thí nghiệm	Chiều dài chồi (cm)	Chiều dài rễ (cm)	Khối lượng chồi tươi (g)	Khối lượng chồi khô (g)	Khối lượng rễ tươi (g)	Khối lượng rễ khô (g)
Vi khuẩn PSB31 + <i>A. solani</i>	$124,21 \pm 1,35^{ab}$	$18,76 \pm 1,32^{bc}$	$209,82 \pm 2,11^{bc}$	$28,78 \pm 0,25^{bc}$	$2,76 \pm 0,15^{bc}$	$1,12 \pm 0,26^b$
Dịch chiết từ củ gừng + <i>A. solani</i>	$111,34 \pm 1,47^b$	$15,32 \pm 2,13^b$	$204,35 \pm 1,73^b$	$25,91 \pm 1,25^b$	$2,13 \pm 0,21^b$	$1,08 \pm 0,09^{ab}$
Vi khuẩn PSB31 + dịch chiết từ củ gừng + <i>A. solani</i>	$139,57 \pm 1,27^a$	$22,79 \pm 1,16^d$	$229,12 \pm 1,36^d$	$37,78 \pm 1,23^d$	$3,57 \pm 0,17^d$	$1,52 \pm 0,14^c$
Đối chứng dương (Antracol)	$131,21 \pm 2,26^c$	$20,61 \pm 1,23^c$	$214,82 \pm 1,25^c$	$35,57 \pm 2,51^c$	$3,22 \pm 0,15^c$	$1,38 \pm 0,22^{bc}$
Đối chứng âm (nước)	$100,81 \pm 2,15^c$	$10,28 \pm 1,34^d$	$138,23 \pm 1,78^c$	$16,83 \pm 1,23^c$	$1,78 \pm 0,12^c$	$0,86 \pm 0,05^c$

^aCác giá trị trong cùng một cột có cùng (các) chữ cái không khác biệt đáng kể như đã xác định bằng thử nghiệm LSD ($p=0,01$).

Kết quả thí nghiệm cũng cho thấy trong quá trình kiểm soát nấm *A. solani*, cây cà chua được xử lý chỉ bằng chủng vi khuẩn PSB31 hoặc GPE có giảm về khối lượng của rễ và chồi (bảng 4).

Khối lượng chồi tươi và khô tối đa (lần lượt là $229,12 \pm 1,36$ và $37,78 \pm 1,23$ g) được ghi nhận ở những cây cà chua được xử lý bằng cách sử dụng kết hợp vi khuẩn PSB31 và GPE với sự có mặt của *A. solani*. Xu hướng tương tự cũng được quan sát cho trường hợp khối lượng rễ tươi và khô. Tất cả các phương pháp xử lý đều cải thiện hai chỉ số này so với đối chứng âm và đối chứng dương (bảng 4). Trong đó, cây cà chua lây nhiễm nấm *A. solani* được xử lý bằng tổ hợp vi khuẩn PSB31 và GPE đã làm tăng đáng kể khối lượng rễ tươi (1,79 g) và khối lượng rễ khô (0,66 g) so với các cây bị gây nhiễm *A. solani* (đối chứng).

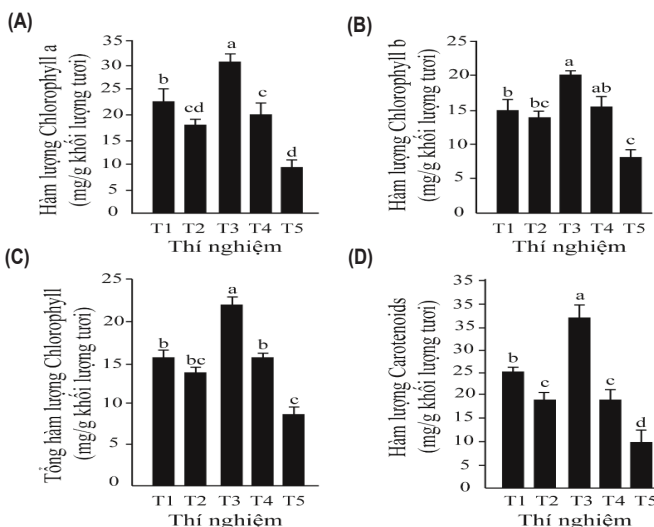
Ngoài ra, tỷ lệ mắc bệnh giảm được ghi nhận trong sử dụng PGPR+GPE so với xử lý bằng hóa chất cho thấy tác dụng hiệp đồng của các tác nhân kiểm soát sinh học và các sản phẩm thực vật. Các kết quả này tương tự với kết quả của P. Latha và cs [19], trong đó hỗn hợp dựa trên chiết xuất lá cây Zimmu (cây lai giữ hành tây và tỏi) và PGPR đã làm giảm 18% mức độ gây hại của bệnh so với đối chứng, đồng thời cũng cải thiện khả năng nảy mầm của hạt và năng suất quả. Một số báo cáo khác cũng cho thấy, sử dụng các tập đoàn vi sinh vật, bao gồm các PGPR thích hợp, dẫn đến giảm tỷ lệ mắc bệnh thông qua tác dụng hiệp đồng [30], bên cạnh đó, điều này có thể có lợi khi xử lý nhiều bệnh thực vật [19].

Ngoài việc kích thích khả năng phòng vệ kháng lại bệnh EB, tất cả các phương pháp xử lý còn thúc đẩy sự phát triển của cây, trong đó việc áp dụng tổ hợp vi khuẩn với GPE thu được kết quả tốt nhất về chiều dài chồi và rễ cũng như trọng lượng khô và tươi của chúng. Tuy nhiên, mặc dù việc sử dụng thuốc diệt nấm ở liều lượng khuyến nghị, giúp kiểm soát bệnh hiệu quả, nhưng lại gây ra rủi ro cho sức khỏe con người, khả năng kháng thuốc và tác động đến môi trường sẽ là những vấn đề tiềm ẩn. Sự kết hợp của các tác nhân kiểm soát sinh học với thuốc trừ sâu tổng hợp vừa có thể làm giảm nguy cơ xuất hiện tính kháng thuốc trừ sâu, vừa cải thiện khả năng kiểm soát dịch bệnh so với việc áp dụng từng tác nhân kiểm soát sinh học [31]. Nhiều nghiên cứu khác nhau đã chỉ ra rằng, sự kết hợp giữa các tác nhân phòng trừ sinh học với thuốc diệt nấm có hiệu quả hơn so với các phương pháp điều trị đơn lẻ. Ví dụ, S. Xu và cs (2022) [32] đã báo cáo rằng, việc sử dụng đồng thời difenoconazole với *B. amyloliquifaciens* đã làm tăng hiệu quả hiệp đồng của thuốc diệt nấm kháng lại bệnh héo do nấm *Fusarium*. Do đó, việc phát triển các chiến lược kiểm soát sinh học bằng PGPR cần có cả tiềm năng kiểm soát sinh học và thúc đẩy tăng trưởng để đảm bảo tính bền vững của cây trồng, chẳng hạn như cà chua.

3.4. Hàm lượng chất diệp lục

Các sắc tố quang hợp bị giảm đáng kể ở những cây bị nhiễm nấm *A. solani* (hình 2). Tất cả các phương pháp xử lý vi khuẩn riêng lẻ và kết hợp với GPE đã cải thiện đáng kể hàm lượng chất diệp lục (chlorophyll) và carotenoids. Trong trường hợp có hàm lượng chất diệp lục a, cây bị nhiễm nấm *A. solani* được xử lý với tổ hợp vi khuẩn+GPE (T3) đã làm tăng đáng kể hàm lượng chất diệp lục a ($29,85$ mg/g khối lượng tươi), trong khi tất cả các phương pháp xử lý khác bao gồm cả việc sử dụng vi khuẩn PSB31 (T1) và GPE (T2) cho thấy ít hiệu quả hơn trong việc tăng hàm lượng chất diệp lục a so với đối chứng dương (T4) (hình 2A). Tương tự, trong

trường hợp chất diệp lục b (hình 2B), chất diệp lục tổng số (hình 2C) và carotenoid (hình 2D), cây bị nhiễm nấm *A. solani* được xử lý bằng cách kết hợp vi khuẩn PSB31 + GPE (T3) cải thiện đáng kể hàm lượng các sắc tố quang hợp so với các phương pháp xử lý khác (T1, T2 và T4). Mặt khác, các sắc tố quang hợp được quan sát thấy thấp hơn đáng kể ở những cây bị nhiễm *A. solani* (T5).



Hình 2. Ảnh hưởng của vi khuẩn PSB31 và dịch chiết từ củ gừng đến hàm lượng chlorophyll a (A), chlorophyll b (B), tổng số chlorophyll (C) và carotenoid (D) trong lá cây cà chua với sự có mặt của nấm *A. solani*. Các cột với các ký tự khác nhau cho thấy sự khác biệt có ý nghĩa ($p < 0,05$) (thử nghiệm LSD). T1=Vi khuẩn PSB31+A. solani; T2=GPE+A. solani; T3=Vi khuẩn PSB31+GPE+A. solani; T4=Antracol (Đối chứng dương); T5=chỉ lây nhiễm nấm *A. solani* (Đối chứng âm).

Tất cả các bộ phận trên mặt đất của cây cà chua đều có thể bị EB làm hại. Do diện tích lá không đủ, sự oxy hóa tăng nhanh và sự gia tăng hoạt động của các enzyme phân hủy chất diệp lục trong điều kiện nhiễm bệnh, cây không thể hấp thụ ánh sáng, làm chậm tốc độ quang hợp [33]. Điều này được quan sát thấy trong hình 2, khi chất diệp lục (A, B) và carotenoids giảm mạnh. Tuy nhiên, những cây bị nhiễm nấm *Alternaria* được xử lý bằng PGPR đơn lẻ và kết hợp với GPE cho thấy sự gia tăng chất diệp lục A, B, tổng chất diệp lục và carotenoid so với phương pháp xử lý bằng thuốc diệt nấm (Antracol). Tương tự như vậy, Z.A. Awan và cs (2022) [34] đã báo cáo tác động tương tác của *B. subtilis* với các chất dinh dưỡng thực vật mang lại sức đề kháng ở cây cà chua bị nhiễm bệnh kháng lại EB bằng cách thay đổi hàm lượng chất diệp lục, carotenoids và phenolics. Điều này có thể là do vai trò của PGPR trong quá trình cố định N_2 cùng với xu hướng sản xuất IAA và chuyển hóa photphat [35].

4. Kết luận

Nghiên cứu này cung cấp bằng chứng cho thấy, vi khuẩn PSB31 tương thích và ức chế hiệu quả sự phát triển của nấm *A. solani*. Sự kết hợp giữa chủng PSB31 với GPE ngăn chặn bệnh EB và cải thiện sự phát triển của cây cà chua. Do đó, dựa trên các thử nghiệm *in vitro* và trong chậu, sự kết hợp của vi khuẩn PSB31 với GPE là một giải pháp thay thế đầy hứa hẹn để kiểm soát bệnh EB ở cà chua.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] A.E. Nagar, A.A. Elzaawely, N.A. Taha, et al. (2020), "The antifungal activity of gallic acid and its derivatives against *Alternaria solani*, the causal agent of tomato early blight", *Agronomy*, **10**(9), DOI: 10.3390/agronomy10091402.
- [2] A. N. Babu, S. Jogaiah, S. Ito, et al. (2015), "Improvement of growth, fruit weight and early blight disease protection of tomato plants by rhizosphere bacteria is correlated with their beneficial traits and induced biosynthesis of antioxidant peroxidase and polyphenol oxidase", *Plant Sci.*, **231**, pp.62-73, DOI: 10.1016/j.plantsci.2014.11.006.
- [3] V.A. Chavan, R.A. Yumlembam, K. Sewakram, et al. (2017), "Fungicide resistance in *Alternaria* leaf blight pathogen in tomato crop grown in Satara district", *J. Pharm. Phytochemistry*, **6**(6), pp.1736-1739.
- [4] M.L.P.D. Silva, F.S. Moen, M.R. Liles, et al. (2023), "Orange peel in combination with selected PGPR strains as seed treatment can improve soybean yield under field conditions", *Plant Soil*, **491**, pp.401-420, DOI: 10.1007/s11104-023-06121-4.
- [5] Y. Gao, Y. Lu, N. Zhang, et al. (2022), "Preparation, pungency and bioactivity of gingerols from ginger (*Zingiber officinale* Roscoe): A Review", *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **62**, pp.1-26, DOI: 10.1080/10408398.2022.2124951
- [6] P.K. Bordoh, A. Ali, M. Dickinson, et al. (2020), "Antimicrobial effect of rhizome and medicinal herb extract in controlling postharvest anthracnose of dragon fruit and their possible phytotoxicity", *Sci. Hortic.*, **265**, DOI: 10.1016/j.scienta.2020.109249.
- [7] S. Kumar, G. Stecher, K. Tamura, et al. (2016), "MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets", *Mol. Biol. Evol.*, **33**(7), pp.1870-1874, DOI: 10.1093/molbev/msw054.
- [8] M. Fritz, I. Jakobsen, M.F. Lyngkjær, et al. (2006), "Arbuscular mycorrhiza reduces susceptibility of tomato to *Alternaria solani*", *Mycorrhiza*, **16**(6), pp.413-419, DOI: 10.1007/s00572-006-0051-z.
- [9] H. Kaur, L.M. Nyochembeng, S.R. Mentreddy, et al. (2016), "Assessment of the antimicrobial activity of *Lentinula edodes* against *Xanthomonas campestris* pv. *Vesicatoria*", *Crop. Prot.*, **89**, pp.284-288, DOI: 10.1016/j.cropro.2016.08.001.
- [10] Q.T. Do, T.A. Luu, M.V. Dinh, et al. (2022), "Biocontrol of *Alternaria alternata* YZU, a causal of stem end rot disease on pitaya, with soil phosphate solubilizing bacteria", *Hue University Journal of Science: Natural Science*, **131**(1B), pp.39-46, DOI: 10.26459/hueunijns.v131i1B.6505.
- [11] R. Fukui, M. Schroth, M. Henderson, et al. (1994), "Interaction between strains of *Pseudomonads* in sugar beet spermospheres and their relationship to pericarp colonization by *Pythium ultimum* in soil", *Phytopathol.*, **84**(11), pp.1322-1330.
- [12] J. Sudisha, S. Niranjana, S. Sukanya, et al. (2012), "Relative efficacy of strobilurin formulations in the control of downy mildew of sunflower", *J. Pest Sci.*, **83**, pp.461-470, DOI: 10.1007/s10340-010-0316-3.
- [13] M. Rasool, A. Akhter, M.S. Haider et al. (2021), "Molecular and biochemical insight into biochar and *Bacillus subtilis* induced defense in tomatoes against *Alternaria solani*", *Sci. Hortic.*, **285**, DOI: 10.1016/j.scienta.2021.110203.
- [14] F. Naz, C.A. Rauf, N.A. Abbasi, et al. (2008), "Influence of inoculum levels of *Rhizoctonia solani* and susceptibility on new potato germplasm", *Pak. J. Bot.*, **40**(5), pp.2199-2209.
- [15] H. Zheng, J. Zhao, T. Wang, et al. (2015), "Characterization of *Alternaria* species associated with tomato foliar diseases in China", *Plant Pathol.*, **64**(2), pp.425-433, DOI: 10.1111/ppa.12274.
- [16] W.S. Abbott (1987), "A method of computing the effectiveness of an insecticide", *J. Am. Mosq. Control Assoc.*, **3**(2), pp.302-303.
- [17] J. Hiscox, G. Israelstam (1979), "A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration", *Can. J. Bot.*, **57**(12), pp.1332-1334, DOI: 10.1139/b79-163.
- [18] O.H. Hansen, B. Riemann (1978), "Chlorophyll a determination: Improvements in methodology", *Oikos*, **30**, pp.438-447, DOI: 10.2307/3543338.
- [19] P. Latha, T. Anand, N. Ragupathi, et al. (2009), "Antimicrobial activity of plant extracts and induction of systemic resistance in tomato plants by mixtures of PGPR strains and Zimmu leaf extract against *Alternaria solani*", *Biol. Control*, **50**(2), pp.85-93, DOI: 10.1016/j.biocontrol.2009.03.002.
- [20] D. Zhang, S. Yu, Y. Yang, et al. (2020), "Antifungal effects of volatiles produced by *Bacillus subtilis* against *Alternaria solani* in potato", *Front. Microbiol.*, **11**, DOI: 10.3389/fmicb.2020.01196.
- [21] A.E. Khetabi, R. Lahlali, S. Ezrari, et al. (2022), "Role of plant extracts and essential oils in fighting against postharvest fruit pathogens and extending fruit shelf life: A review", *Trends Food Sci. Technol.*, **120**, pp.402-417, DOI: 10.1016/j.tifs.2022.01.009
- [22] K.J.J. Polo, H.L.M. Campos, C.C. Olivera, et al. (2021), "Biofungicide for the control of *Botrytis cinerea* and *Fusarium oxysporum*: A laboratory study", *Chem. Eng. Trans.*, **87**, pp.517-522, DOI: 10.3303/CET2187087.
- [23] H. Rizwana (2016), "Exploiting antifungal potential of ginger for the management of *Alternaria alternata*, the cause of leaf spot disease of spinach", *Mycopath.*, **13**(2), pp.97-104.
- [24] K.Y. Xi, S.J. Xiong, G. Li, et al. (2022), "Antifungal activity of ginger rhizome extract against *Fusarium solani*", *Horticulturae*, **8**(11), DOI: 10.3390/horticulturae8110983.
- [25] S. Hyder, A.S. Gondal, A. Sehar, et al. (2024), "Use of ginger extract and bacterial inoculants for the suppression of *Alternaria solani* causing early blight disease in tomato", *BMC Plant Biol.*, **24**(1), DOI: 10.1186/s12870-024-04789-z.
- [26] M. Kisiriko, M. Anastasiadi, L.A. Terry, et al. (2021), "Phenolics from medicinal and aromatic plants: Characterisation and potential as biostimulants and bioprotectants", *Molecules*, **26**(21), DOI: 10.3390/molecules26216343.
- [27] M.I.R. Conde, S.A. Ocampo, G.C. Castañeda, et al. (2018), "Effect of fluorescent *Pseudomonas* on tomato seed germination and seedling vigor", *Rev. Chapingo Ser. Hortic.*, **24**(2), pp.121-131, DOI: 10.5154/rchsh.2017.06.023.
- [28] L.A.P. García, J.S. Mata, M.F. Hernández, et al. (2023), "Plant-growth-promoting rhizobacteria improve germination and bioactive compounds in cucumber seedlings", *Agronomy*, **13**(2), DOI: 10.3390/agronomy13020315.
- [29] G.C. Castaño, J.C. Cabrera, M. Pernas, et al. (2020), "An updated overview on the regulation of seed germination", *Plants*, **9**(6), DOI: 10.3390/plants9060703.
- [30] Z. Minchev, O. Kostenko, R. Soler, et al. (2021), "Microbial consortia for effective biocontrol of root and foliar diseases in tomato", *Front Plant Sci.*, **12**, pp.1-12, DOI: 10.3389/fpls.2021.756368.
- [31] U.B. Singh, A. Sahu, N. Sahu, et al. (2013), "Arthrotrichy oligospora-mediated biological control of diseases of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) caused by *Meloidogyne incognita* and *Rhizoctonia solani*", *J. Appl. Microbiol.*, **114**(1), pp.196-208, DOI: 10.1111/jam.12009.
- [32] X. Xu, Y. Wang, T. Lei, et al. (2022), "Synergistic effects of *Bacillus amyloliquefaciens* SDB009 and difenoconazole on *Fusarium* wilt of tomato", *Plant Dis.*, **106**(8), pp.2165-2171, DOI: 10.1094/PDIS-12-21-2650-RE.
- [33] M.A. Albalawi, A.M. Abdelaziz, M.S. Attia, et al. (2022), "Mycosynthesis of silica nanoparticles using *Aspergillus niger*: Control of *Alternaria solani* causing early blight disease, induction of innate immunity and reducing of oxidative stress in eggplant", *Antioxidants*, **11**(12), DOI: 10.3390/antiox11122323.
- [34] Z.A. Awan, A. Shoaib, M.S. Iftikhar, et al. (2022), "Combining biocontrol agent with plant nutrients for integrated control of tomato early blight through the modulation of physio-chemical attributes and key antioxidants", *Front. Microbiol.*, **13**, DOI: 10.3389/fmicb.2022.807699.
- [35] N. Mishra, S.K. Sundari (2015), "Native PGPM consortium: A beneficial solution to support plant growth in the presence of phytopathogens and residual organophosphate pesticides", *J. Bioprocess Biotech.*, **5**, DOI: 10.4172/2155-9821.1000202.