



PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN CÁC DÒNG THỰC KHUẨN THỂ TRONG PHÒNG TRỪ BỆNH HÉO XANH TRÊN CÂY HOA VẠN THỌ (*Tagetes papula* L.) DO VI KHUẨN *Ralstonia solanacearum* SMITH

Nguyễn Thúy An¹, Nguyễn Văn Minh Phụng², Nguyễn Thị Thu Nga² và Phạm Văn Kim¹

¹Sở Nông nghiệp & Phát triển nông thôn, thành phố Cần Thơ

²Khoa Nông nghiệp và Sinh học Ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ

ABSTRACT

Thông tin chung:

Ngày nhận: 22/09/2016

Ngày chấp nhận: 29/04/2017

Title:

Isolating and screening promising bacteriophages in biological control of bacterial wilt on marigold (*Tagetes papula* L.) caused by *Ralstonia solanacearum* Smith

Từ khóa:

Bệnh héo vi khuẩn, cây vạn thọ, *Ralstonia solanacearum*, thực khuẩn thể

Keywords:

Bacterial wilt, bacteriophages, marigold, *Ralstonia solanacearum*

Isolating and screening promising bacteriophages for controlling bacterial wilt on marigold caused by *Ralstonia solanacearum* in the laboratory and screen house condition to screen bacteriophages expressed high effectiveness in managing bacterial wilt disease. Total 38 bacteriophages and 21 strains of *R. solanacearum* were isolated from infected plant and soil samples in provinces of Can Tho, Hau Giang, An Giang, Tien Giang and Dong Thap. Testing lytic ability of these phages on 21 strains of *R. solanacearum*, ten phages showed effective parasitizing of many strains of *R. solanacearum* (15-16 strains) i.e. phages Φ CT18, Φ DT3 and Φ DT4 showed potentially in lysing of bacterial lawn with diameter of plaque 6.09 mm, 5.88 mm and 7.99 mm respectively at 72 hours after inoculation. In the screenhouse, soil drenching with one of three phages Φ CT18, Φ DT3, Φ DT4 alone or either mixture of three phages at density 10^8 PFU/ml for controlling bacterial wilt on marigold, the result showed that phage Φ DT4 expressed good disease protection.

TÓM TẮT

Phân lập và tuyển chọn các dòng thực khuẩn thể (TKT) có hiệu quả phòng trừ bệnh héo xanh do vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* trên cây vạn thọ được thực hiện trong điều kiện phòng thí nghiệm và nhà lưới nhằm tìm ra dòng TKT có triển vọng trong quản lý bệnh héo vi khuẩn trên cây hoa vạn thọ. Kết quả phân lập được 38 dòng thực khuẩn thể và 21 chủng vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* từ các mẫu cây bệnh và đất được thu thập tại các tỉnh Cần Thơ, Hậu Giang, An Giang, Tiền Giang và Đồng Tháp. Các dòng thực khuẩn thể có khả năng ký sinh số lượng vi khuẩn ký chủ *R. solanacearum* khác nhau, ghi nhận 10 dòng thực khuẩn thể có khả năng ký sinh nhiều dòng vi khuẩn nhất (từ 15-16 chủng). Trong đó, ba dòng thực khuẩn thể Φ CT18, Φ DT3 và Φ DT4 có khả năng phân giải vi khuẩn ký chủ mạnh nhất với đường kính vòng vô khuẩn lần lượt là 6,09 mm, 5,88 mm và 7,99 mm ở thời điểm 72 giờ sau khi cấy. Trong điều kiện nhà lưới, áp dụng các dòng thực khuẩn thể Φ CT18, Φ DT3, Φ DT4 đơn lẻ và hỗn hợp 3 dòng thực khuẩn thể ở mật số 10^8 PFU/ml tưới vào đất trong phòng trừ bệnh héo xanh do vi khuẩn *R. solanacearum*, kết quả cho thấy dòng thực khuẩn thể Φ DT4 cho hiệu quả phòng trị cao nhất.

Trích dẫn: Nguyễn Thúy An, Nguyễn Văn Minh Phụng, Nguyễn Thị Thu Nga và Phạm Văn Kim, 2017. Phân lập và tuyển chọn các dòng thực khuẩn thể trong phòng trừ bệnh héo xanh trên cây hoa vạn thọ (*Tagetes papula* L.) do vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* Smith. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 49b: 44-52.

1 ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh héo xanh do vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* Smith là một trong những loại bệnh

quan trọng và điển hình nhất đối với nhiều loại cây trồng cạn ở vùng nhiệt đới, cận nhiệt đới và những vùng có nhiệt độ ẩm áp trên thế giới (Kelman,

1985). Vi khuẩn có nguồn gốc trong đất, gây hại trên 200 loài cây trồng thuộc trên 50 họ thực vật khác nhau (Yamada, 2012). Mondal *et al.* (2014) đã ghi nhận bệnh tấn công trên nhiều loại cây trồng có giá trị kinh tế như cà chua, khoai tây, ớt, chuối, gừng, dưa hấu, hoa giấy, cây vạn thọ (marigold) và nhiều loại cây trồng hoang dại khác. Theo Nguyễn Thị Thu Cúc và Trần Thị Thu Thủy (2014), bệnh héo xanh do vi khuẩn *R. solanacearum* rất phổ biến ở nhiều vườn trồng hoa tại Đồng bằng sông Cửu Long (ĐBSCL), gây hại nhiều trên các giống hoa cúc, vạn thọ. Vi khuẩn *R. solanacearum* có khả năng lưu tồn lâu dài trong hạt giống, trong đất và cỏ dại (Nguyễn Tất Thắng và *ctv.*, 2015) nên việc phòng trị bệnh gặp nhiều khó khăn. Việc lạm dụng thuốc hóa học đã gây ảnh hưởng không tốt đến sức khỏe con người, đất, nước và môi trường sinh thái. Mặt khác, nhiều vi khuẩn gây hại cây trồng xuất hiện tính kháng thuốc gốc đồng và kháng sinh đang là vấn đề đáng quan tâm hiện nay (Ronald, 2011). Ứng dụng thực khuẩn thể (TKT) trong phòng trị bệnh do vi khuẩn cũng là một phần của chiến lược quản lý bệnh tổng hợp trên cây trồng (Balogh *et al.*, 2010, Addy *et al.*, 2012). Hiện nay, ở Việt Nam đã có một số nghiên cứu về TKT trong phòng trị bệnh cháy bìa lá lúa (Lương Hữu Tâm, 2013; Nguyễn Thị Trúc Giang và *ctv.*, 2014), bệnh cháy lá do vi khuẩn *Xanthomonas* sp. trên hành lá (Trần Ngọc Trân và *ctv.*, 2016). Tuy nhiên, chưa có nghiên cứu về TKT đối với vi khuẩn *R. solanacearum* gây bệnh héo xanh trên cây cảnh nói chung và cây hoa vạn thọ nói riêng. Do đó, đề tài “**Phân lập và tuyển chọn các dòng thực khuẩn thể trong phòng trừ bệnh héo xanh trên cây hoa vạn thọ (*Tagetes papula* L.) do vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* Smith**” được thực hiện nhằm chọn được dòng TKT có khả năng ký sinh rộng và phân giải vi khuẩn *R. solanacearum* mạnh trong điều kiện phòng thí nghiệm, đồng thời thể hiện hiệu quả cao trong phòng trị được bệnh héo xanh trong điều kiện nhà lưới làm cơ sở ứng dụng phòng trừ bệnh ngoài đồng.

2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Phân lập các dòng TKT phân bố ở một số tỉnh ĐBSCL đối với vi khuẩn *Ralstonia solanacearum*

– **Phân lập vi khuẩn *R. solanacearum* gây bệnh:** Quan sát dòng vi khuẩn tuôn ra từ mẫu bệnh được cắt nhỏ dưới kính hiển vi, dùng micropipet nhỏ một giọt dung dịch trên đĩa petri chứa môi trường King's B agar, dùng que cấy vi khuẩn theo hình zic-zắc để tạo đơn khuẩn lạc. Ủ đĩa vi khuẩn trong 48 giờ ở điều kiện phòng thí nghiệm. Quan

sát hình thái khuẩn lạc và chọn các đơn khuẩn lạc có màu trắng kem nhẵn bóng, nhảy, thực hiện tách riêng vi khuẩn và trữ ở điều kiện phòng và 4°C.

– **Phân lập TKT:** Mẫu cây bệnh và đất được nghiền nhuyễn trong cối sứ, thêm vào 5 mL nước cất thanh trùng và cho mẫu vào ống falconly tâm với vận tốc 6000 vòng/phút trong 5 phút để loại bỏ xác bã thực vật. Khi ly tâm xong, rút 1 mL phần dung dịch trong chứa TKT, thêm 20 μ L chloroform, lắc đều và để trong 5 phút, tiếp tục ly tâm với vận tốc 6000 vòng/phút trong 5 phút để loại bỏ vi khuẩn, cuối cùng thu được phần dung dịch trong chỉ chứa TKT. Rút 50 μ L dung dịch chứa TKT cộng với 100 μ L huyền phù vi khuẩn *R. solanacearum* ($OD_{600nm} = 0,3$ tương đương mật số vi khuẩn sống là $6,25 \times 10^8$ CFU/mL) phân lập từ mẫu bệnh tương ứng cho vào đĩa, đổ đĩa bằng môi trường King's B 0,8% được nấu tan và giữ ở 50°C, hòa đều đĩa bằng cách lắc nhẹ. Đĩa được ủ trong điều kiện phòng và quan sát sự hình thành vòng vô khuẩn (plaque) sau 24 giờ. Dùng tăm bông thanh trùng cấy truyền từng vòng vô khuẩn sang đĩa petri mới có hòa sẵn vi khuẩn ký chủ, sau 24 giờ tiến hành thu TKT bằng cách thêm vào đĩa 5 mL nước cất thanh trùng cộng với 20 μ L chloroform lắc đều và để trong 5 phút, tiếp tục ly tâm với vận tốc 6000 vòng/phút trong 5 phút. Rút lấy phần dung dịch trong chỉ chứa TKT và trữ trong điều kiện tối ở nhiệt độ phòng và 4°C.

2.2 Đánh giá khả năng ký sinh của các dòng TKT đối với các chủng vi khuẩn *R. solanacearum* phân lập tại một số tỉnh ĐBSCL

– **Phương pháp:** Rút 5 μ L huyền phù từng dòng TKT nhỏ vào ô được kẻ và đánh số tương ứng trên đĩa petri có chứa 10 mL môi trường King's B 0,8% đã hòa sẵn 100 μ L huyền phù từng dòng *R. solanacearum* ($OD_{600nm} = 0,3$).

– **Chỉ tiêu ghi nhận:** Sự phân giải của các dòng TKT trên các chủng *R. solanacearum* khác nhau hình thành trên đĩa petri sau 24 giờ.

Xử lý số liệu bằng cách đếm tổng số vi khuẩn bị ký sinh bởi mỗi dòng TKT, và tổng số TKT ký sinh trên mỗi dòng vi khuẩn từ đó xác định được phổ ký chủ của TKT cũng như dòng vi khuẩn nào bị ký sinh bởi nhiều dòng TKT nhất.

2.3 Đánh giá khả năng tiêu diệt vi khuẩn *R. solanacearum* của các dòng TKT trong điều kiện phòng thí nghiệm

Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên, hai nhân tố (nhân tố A là 3 chủng vi khuẩn bị ký sinh nhiều nhất, nhân tố B là 10 dòng TKT có phổ ký chủ rộng nhất được chọn từ thí nghiệm 2.3) và 3 lần lặp lại, mỗi lần lặp lại là một đĩa petri.

– **Chuẩn bị nguồn TKT:** Nhân mật số các dòng TKT được chọn trong 24 giờ, thực hiện đếm mật số và pha loãng để tạo huyền phù các dòng TKT khác nhau ở mật số 10^3 PFU/mL.

– **Chuẩn bị nguồn vi khuẩn:** Nuôi cấy các dòng vi khuẩn *R. solanacearum* được chọn từ thí nghiệm 2.2 trên đĩa petri chứa môi trường King's B trong 48 giờ cho khuẩn lạc phát triển, pha loãng để tạo huyền phù vi khuẩn có giá trị $OD_{600nm} = 0,3$.

– **Tiến hành:** Rút 50 μ L huyền phù từng dòng TKT (10^3 PFU/mL) + 100 μ L huyền phù vi khuẩn *R. solanacearum* cho vào đĩa petri, sau đó tiến hành đổ đĩa bằng môi trường King's B 0,8% đã được nấu tan để nguội ở 50°C và hòa đều đĩa bằng cách lắc nhẹ, đĩa được đặt trong điều kiện phòng thí nghiệm.

Chỉ tiêu ghi nhận: Quan sát và ghi nhận đường kính vòng vô khuẩn (plaques) của từng dòng TKT trên đĩa petri vào các thời điểm 24, 48, 72 giờ sau khi bố trí bằng cách đo đường kính 10 vòng vô khuẩn cố định và lấy trung bình của mỗi đĩa petri tương ứng với 1 lần lặp lại.

Xử lý số liệu bằng Excel và phân tích thống kê bằng phần mềm MstatC qua phép thử Duncan.

2.4 Đánh giá khả năng phòng trị bệnh héo xanh do vi khuẩn *R. solanacearum* của các dòng TKT triển vọng trong điều kiện nhà lưới

Phương pháp: Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên một nhân tố gồm 6 nghiệm thức (3 dòng TKT có đường kính phân giải lớn nhất được chọn từ thí nghiệm 2.3, hỗn hợp 3 TKT được chọn, xử lý thuốc Starner 20WP theo liều lượng khuyến cáo và đối chứng không xử lý TKT), 4 lần lặp lại và mỗi lần lặp lại là 5 cây/chậu.

Cách tiến hành:

– **Chuẩn bị TKT:** Nhân mật số dòng các TKT được chọn, thực hiện đếm mật số và pha loãng để tạo huyền phù TKT có mật số 10^8 PFU/mL.

– **Chuẩn bị vi khuẩn:** Chủng vi khuẩn RsCT7 là chủng vi khuẩn mẫn cảm nhất được chọn từ thí nghiệm 2.3 được nuôi cấy trên đĩa petri chứa môi trường King's B trong 48 giờ cho khuẩn lạc phát triển, cho nước cất thanh trùng vào đĩa và thu huyền phù vi khuẩn, thực hiện pha loãng để đạt huyền phù có giá trị $OD_{600nm} = 0,3$.

– **Phương pháp xử lý TKT:** Cây con sau khi trồng được 20 ngày, tưới huyền phù từng dòng TKT tương ứng với từng nghiệm thức xung quanh gốc cây (5 ml/cây) vào buổi chiều sau khi tắt nắng. Nghiệm thức xử lý thuốc, nghiệm thức đối chứng không xử lý TKT thì tưới nước cất (5 ml/cây). Sau khi xử lý TKT 2 giờ, tiến hành lây bệnh bằng cách

tưới huyền phù vi khuẩn ($OD_{600nm} = 0,3$) đã được chuẩn bị vào đất xung quanh gốc cây (5 ml vi khuẩn/cây).

Chậu sau khi lây bệnh được đặt trong nhà lưới, tưới nước 2 lần/ngày bằng bình phun.

– **Phương pháp xử lý thuốc:** phun thuốc khi bệnh vừa xuất hiện (tỷ lệ bệnh từ 5-10%) theo nguyên tắc 4 đúng với liều lượng 1g/1 lít (tương đương 2 mL/cây).

Chỉ tiêu ghi nhận:

Theo dõi và ghi nhận triệu chứng thể hiện bệnh hàng ngày. Khi triệu chứng bệnh xuất hiện thì ghi nhận tỷ lệ bệnh 2 ngày/lần.

– Tỷ lệ bệnh (%) được tính như sau:

$$TLB (\%) = \frac{\text{Số cây bị bệnh}}{\text{Tổng số cây quan sát}} \times 100$$

– Diện tích dưới đường cong tiến triển bệnh AUDPC (Area Under Disease Progressvive Curve) được tính theo công thức sau:

$$AUDPC = \sum_{i=1}^n [(Y_{i+1} + Y_i)/2] [X_{i+1} - X_i]$$

Trong đó, Y_i : % tỷ lệ bệnh ở lần đánh giá thứ i ; X_i : số ngày đánh giá ở lần thứ i ; n : tổng số lần đánh giá.

Xử lý số liệu bằng Excel và phân tích thống kê bằng phần mềm MstatC qua phép thử Duncan.

– Đếm mật số thực khuẩn thể sau khi chủng vào đất xung quanh rễ cây ở các nghiệm thức xử lý:

Thực hiện đếm mật số TKT ở từng nghiệm thức xử lý TKT vào các thời điểm 0 GSKLB, 1 NSKLB, 3 NSKLB, 5 NSKLB và ngày cuối khi kết thúc thí nghiệm. Mục đích nhằm khảo sát khả năng tồn tại của các dòng TKT trong môi trường.

Phương pháp thực hiện: Ở nghiệm thức xử lý TKT bố trí đồng thời 3 chậu/nghiệm thức tương ứng với 3 lần lặp lại (5 cây/chậu) để xác định mật số thực khuẩn thể sau khi xử lý. Vào các thời điểm quan sát, tiến hành cắt rễ cây tính từ phần tiếp giáp ngang mặt đất cho vào bình tam giác, che tối và mang về phòng thí nghiệm cân trọng lượng (gram). Bình tam giác được đánh số tương ứng với số lần lặp lại và tương ứng với từng nghiệm thức. Sau khi cân, cho vào mỗi bình 100 mL nước cất vô trùng, che tối, lắc bằng máy lắc ngang trong thời gian 20 phút. Rút lấy phần dung dịch trong cho vào ống falcon cùng 20 μ L chloroform/mL dung dịch, lắc đều và để trong 5 phút, ly tâm với vận tốc 6000 vòng/phút trong 5 phút để loại bỏ vi khuẩn. Phần dung dịch thu được sử dụng để đếm mật số TKT,

thực hiện phương pháp pha loãng ở các nồng độ 10^{-1} , 10^{-3} , 10^{-5} . Sau đó rút ra 100 μL của mỗi nồng độ pha loãng cộng với 100 μL huyền phù vi khuẩn ($\text{OD}_{600\text{nm}} = 0,3$) vào đĩa Petri cùng với 10 ml môi trường King B agar 0,8 % ở 50°C , hòa đều. Đĩa được ủ 24 giờ, đếm số lượng vòng vô khuẩn (plaque) hình thành trên đĩa, dựa vào hệ số pha loãng để tính ra mật số TKT PFU/g rễ.

Xử lý số liệu bằng Excel, số TKT sau khi đếm được chuyển sang $\log_{10}(y+1)$ và phân tích thống kê bằng phần mềm MstatC qua phép thử Duncan.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Kết quả phân lập các dòng thực khuẩn thể phân bố ở một số tỉnh ĐBSCL

Kết quả phân lập được 21 chủng vi khuẩn *R. solanacearum* và 38 dòng TKT có khả năng ký

sinh vi khuẩn ký chủ từ các mẫu cây hoa vụn thối bệnh và mẫu đất thu thập ở các tỉnh thành Cần Thơ, Hậu Giang, An Giang, Tiền Giang và Đồng Tháp (Bảng 1). Kết quả cho thấy TKT có thể phân lập từ rễ và gốc thân cây bị bệnh héo xanh hoặc phân lập từ đất đã bị nhiễm bệnh. Tương tự, Kalpage và Costa (2015) đã phân lập được 6 dòng TKT ký sinh 19 chủng vi khuẩn *R. solanacearum* phân lập từ cây cà chua bị bệnh héo xanh, Addy *et al.* (2016) đã phân lập được 2 dòng TKT ΦRSSKD1 và ΦRSSKD2 từ đất trồng chuối bị nhiễm bệnh có khả năng ký sinh 9 dòng vi khuẩn *R. solanacearum* phân lập từ thân cây chuối bị héo do vi khuẩn. Ngoài ra, thực khuẩn thể còn được phân lập trên tán lá (Lương Hữu Tâm, 2013; Nguyễn Thị Trúc Giang và *ctv.*, 2014; Nguyễn Thị Trúc Giang và *ctv.*, 2016, Trần Ngọc Trân và *ctv.*, 2016).

Bảng 1: Danh sách các dòng TKT phân lập được từ các mẫu bệnh thu thập tại một số tỉnh ĐBSCL

STT	Mã số TKT	Nguồn gốc mẫu phân lập	Mẫu bệnh có hiện diện vi khuẩn	STT	Mã số TKT	Nguồn gốc mẫu phân lập	Mẫu bệnh có hiện diện vi khuẩn
1	ΦCT1	Bình Thủy - TP Cần Thơ	+	20	ΦAG5	Tri Tôn - An Giang	-
2	ΦCT7a	Bình Thủy - TP Cần Thơ	+	21	$\Phi\text{ĐT1a}$	TP Sa Đéc - Đồng Tháp	+
3	ΦCT7b	Bình Thủy - TP Cần Thơ	+	22	$\Phi\text{ĐT1b}$	TP Sa Đéc - Đồng Tháp	+
4	ΦCT12	Bình Thủy - TP Cần Thơ	+	23	$\Phi\text{ĐT2}$	TP Sa Đéc - Đồng Tháp	-
5	ΦCT13	Bình Thủy - TP Cần Thơ	+	24	$\Phi\text{ĐT3}$	TP Sa Đéc - Đồng Tháp	+
6	ΦCT14	Bình Thủy - TP Cần Thơ	+	25	$\Phi\text{ĐT4}$	TP Sa Đéc - Đồng Tháp	+
7	ΦCT15	Bình Thủy - TP Cần Thơ	+	26	$\Phi\text{ĐT5a}$	TP Sa Đéc - Đồng Tháp	+
8	ΦCT16	Bình Thủy - TP Cần Thơ	+	27	$\Phi\text{ĐT5b}$	TP Sa Đéc - Đồng Tháp	+
9	ΦCT17a	Bình Thủy - TP Cần Thơ	+	28	ΦHG1	Long Mỹ - Hậu Giang	+
10	ΦCT17b	Bình Thủy - TP Cần Thơ	+	29	ΦHG2	Long Mỹ - Hậu Giang	-
11	ΦCT18	Bình Thủy - TP Cần Thơ	+	30	ΦHG3a	Long Mỹ - Hậu Giang	+
12	ΦCT19	Bình Thủy - TP Cần Thơ	+	31	ΦHG3b	Long Mỹ - Hậu Giang	+
13	ΦCT20	Bình Thủy - TP Cần Thơ	-	32	ΦHG4	Long Mỹ - Hậu Giang	-
14	ΦAG1	Tri Tôn - An Giang	-	33	ΦHG5	Long Mỹ - Hậu Giang	-
15	ΦAG2a	Tri Tôn - An Giang	+	34	ΦHG6a	Long Mỹ - Hậu Giang	-
16	ΦAG2b	Tri Tôn - An Giang	+	35	ΦHG6b	Long Mỹ - Hậu Giang	-
17	ΦAG3	Tri Tôn - An Giang	+	36	ΦHG7	Long Mỹ - Hậu Giang	-
18	ΦAG4a	Tri Tôn - An Giang	+	37	ΦTG1	TP Mỹ Tho - Tiền Giang	+
19	ΦAG4b	Tri Tôn - An Giang	+	38	ΦTG2	TP Mỹ Tho - Tiền Giang	+

Chủ thích: +: có hiện diện VK ; -: không có hiện diện VK

3.2 Kết quả đánh giá khả năng ký sinh của các dòng TKT đối với các chủng vi khuẩn *R. solanacearum* phân lập tại một số tỉnh ĐBSCL

Kết quả ghi nhận khả năng ký sinh của các dòng TKT trên các chủng vi khuẩn *R. solanacearum* là khác nhau biến động trong khoảng 11-16 chủng trong tổng số 21 chủng vi khuẩn được kiểm tra. Các dòng TKT ΦCT12 , ΦCT13 , ΦCT14 , ΦCT18 , ΦCT19 , ΦCT20 , ΦAG4a , $\Phi\text{ĐT3}$, $\Phi\text{ĐT4}$ và ΦHG4 có khả năng ký sinh nhiều chủng vi khuẩn nhất (từ 15-16 chủng). Hai dòng ΦCT7b và ΦTG1 ký sinh ít nhất (11

chủng vi khuẩn), các dòng TKT còn lại ký sinh từ 12 đến 14 chủng vi khuẩn (Bảng 2).

Vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* có phổ ký chủ rộng, đa dạng kiểu gen và kiểu hình giữa các chủng (Hayward, 2000, trích dẫn bởi Kalpage và Costa, 2015). Vì vậy, xác định phổ ký chủ rộng của mỗi dòng TKT được phân lập là điều cần thiết trước khi quyết định chọn số lượng TKT sử dụng như tác nhân sinh học phòng trừ bệnh héo do vi khuẩn. Từ kết quả Bảng 2 và Bảng 3, chọn 10 dòng TKT ΦCT12 , ΦCT13 , ΦCT14 , ΦCT18 , ΦCT19 , ΦCT20 , ΦAG4a , $\Phi\text{ĐT3}$, $\Phi\text{ĐT4}$ và ΦHG4 có khả năng ký sinh nhiều chủng vi khuẩn ký chủ nhất và

03 chủng vi khuẩn RsCT, RsAG2, RsĐT3 là chủng vi khuẩn mẫn cảm nhất bị các dòng TKT khác

nhau ký sinh nhiều nhất để thực hiện các thí nghiệm tiếp theo.

Bảng 2: Khả năng ký sinh của 38 dòng TKT trên 21 chủng vi khuẩn *R. solanacearum*

Mã số TKT	SL vi khuẩn bị ký sinh	Mã số TKT	SL vi khuẩn bị ký sinh	Mã số TKT	SL vi khuẩn bị ký sinh	Mã số TKT	SL vi khuẩn bị ký sinh
1.ΦCT1	14	11.ΦCT18	15	21.ΦĐT1a	14	31.ΦHG3b	14
2.ΦCT7a	12	12.ΦCT19	15	22.ΦĐT1b	14	32.ΦHG4	15
3.ΦCT7b	11	13. ΦCT20	16	23.ΦĐT2	14	33.ΦHG5	14
4.ΦCT12	15	14.ΦAG1	14	24.ΦĐT3	15	34.ΦHG6a	12
5.ΦCT13	16	15.ΦAG2a	14	25.ΦĐT4	15	35.ΦHG6b	14
6.ΦCT14	15	16.ΦAG2b	14	26.ΦĐT5a	14	36.ΦHG7	13
7.ΦCT15	12	17.ΦAG3	14	27.ΦĐT5b	13	37.ΦTG1	11
8.ΦCT16	14	18.ΦAG4a	15	28.ΦHG1	14	38.ΦTG2	12
9.ΦCT17a	13	19.ΦAG4b	14	29.ΦHG2	13		
10.ΦCT17b	13	20.ΦAG5	13	30.ΦHG3a	14		
Trung bình khả năng ký sinh của các dòng TKT							13,8

Bảng 3: Số lượng TKT ký sinh trên các chủng vi khuẩn *R.solanacearum* được phân lập

Mã số vi khuẩn	SL TKT ký sinh	Mã số vi khuẩn	SL TKT ký sinh	Mã số vi khuẩn	SL TKT ký sinh	Mã số vi khuẩn	SL TKT ký sinh
1.RsCT1	35	7.RsCT16	37	13.RsAG4	36	19.RsĐT5	37
2.RsCT7	38	8.RsCT17	32	14.RsHG1	33	20.RsTG1	1
3.RsCT12	5	9.RsCT18	37	15.RsHG3	34	21.RsTG2	4
4.RsCT13	2	10.RsCT19	1	16.RsĐT1	37		
5.RsCT14	1	11.RsAG2	38	17.RsĐT3	38		
6.RsCT15	36	12.RsAG3	37	18.RsĐT4	5		
Trung bình số lượng TKT ký sinh trên một chủng vi khuẩn							25

3.3 Kết quả đánh giá khả năng phân giải vi khuẩn *R. solanacearum* của các dòng TKT có khả năng ký sinh rộng trong điều kiện phòng thí nghiệm

Khả năng thực khuẩn của các TKT khác nhau thông qua việc hình thành các vòng vô khuẩn (plaque). Kích thước vòng vô khuẩn càng lớn chứng tỏ dòng TKT có khả năng phân giải vi khuẩn ký chủ càng mạnh.

Ở thời điểm 24 giờ sau khi cấy (GSKC), tất cả các TKT đều thể hiện khả năng phân giải trên các vi khuẩn ký chủ, đường kính phân giải trung bình của các TKT từ 1,54 - 2,97 mm. Dòng TKTΦĐT4 có đường kính phân giải lớn nhất (2,97 mm), khác biệt thống kê so với các dòng TKT khác nhưng không khác biệt với dòng ΦCT18 (2,69 mm). Quá trình phân giải vi khuẩn của các TKT diễn ra mạnh mẽ nhất ở thời điểm 48 GSKC với đường kính vòng vô khuẩn đều tăng rất nhanh so với thời điểm 24 GSKC. Dòng TKTΦĐT4 có đường kính phân giải trung bình lớn nhất (6,38 mm), tăng gấp đôi so với thời điểm 24 GSKC, khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các dòng TKT khác. Ở thời điểm 72 GSKC, đường kính vòng vô khuẩn do các TKT

phân giải tiếp tục tăng nhưng tốc độ tăng chậm lại so với thời điểm 36 GSKC. Điều này có thể do tốc độ nhân mật số của vi khuẩn đã chậm lại và chuyển sang giai đoạn suy vong (death phase) (Lương Hữu Tâm, 2013). Các dòng TKT ΦCT18, ΦĐT3 và ΦĐT4 có đường kính phân giải trung bình lớn nhất (lần lượt là 6,09 mm, 5,88 mm và 7,99 mm), khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các dòng TKT khác. Chủng vi khuẩn RsCT7 có đường kính phân giải trung bình lớn nhất (5,26 mm), khác biệt có ý nghĩa thống kê so với chủng vi khuẩn RsAG2 và RsĐT3 (Bảng 4).

Nhìn chung, các dòng TKT đều có khả năng phân giải tốt trên các chủng vi khuẩn RsCT7, RsAG2 và RsĐT3. Dòng TKTΦCT18, ΦĐT3 và ΦĐT4 có khả năng phân giải các chủng vi khuẩn RsCT7, RsAG2 và RsĐT3 cao hơn so với các dòng TKT còn lại thể hiện qua kích thước vòng vô khuẩn, tính ổn định ở các thời điểm đánh giá. Chủng vi khuẩn RsCT7 được xem là chủng vi khuẩn mẫn cảm nhất, được chọn như là vi khuẩn ký chủ để nhân mật số các dòng TKTΦCT18, ΦĐT3 và ΦĐT4, đồng thời là nguồn vi khuẩn lây bệnh nhân tạo cho các nghiên cứu tiếp theo.

Bảng 4: Đường kính phân giải của 10 dòng TKT đối với 3 chủng vi khuẩn *R.solanacearum* ở thời điểm 24, 48, 72 GSKC trong điều kiện phòng thí nghiệm

TKT	Đường kính vòng vô khuẩn (mm)											
	24 GSKC				48 GSKC				72 GSKC			
	CT7	AG2	DT3	TB(B)	CT7	AG2	DT3	TB(B)	CT7	AG2	DT3	TB(B)
ΦCT12	2,66 cg	1,25 nop	2,32 ej	2,08 D	3,24 def	1,64 k	2,64 ghi	2,51 DE	3,77 ef	1,94 k	2,82 hij	2,84 DEF
ΦCT13	2,60 ch	1,72 jo	2,73 cg	2,35 CD	3,32 def	1,95 jk	3,05 eh	2,77 CD	3,93 de	1,95 k	3,29 fgh	3,06 DE
ΦCT14	2,40 di	1,91 im	2,89 be	2,40 BCD	3,12 dg	2,03jk	2,95 fgh	2,71 CD	3,95 de	2,18 k	3,27 fgh	3,13 D
ΦCT18	3,47 ab	1,61kp	3,00 ad	2,69 AB	6,23b	1,72 k	5,61 c	4,52 B	8,92 a	2,28 jk	7,06 b	6,09 B
ΦCT19	1,33 mp	1,21 op	2,42 di	1,65 E	2,09ijk	2,22 ijk	2,83 fgh	2,38 EF	2,92 hi	2,42 ijk	3,08 gh	2,81 EF
ΦCT20	2,17 gk	1,56 lp	2,97 ad	2,23 CD	2,94 fgh	1,97 jk	3,09 eh	2,66 CDE	3,69 ef	2,21 k	3,30 fgh	3,07 DE
ΦĐT3	3,52 a	2,00 hl	1,85 in	2,45 BC	6,79 a	3,00 eh	3,56 de	4,45 B	8,91 a	3,00 ghi	5,73 c	5,88 B
ΦĐT4	3,18 abc	2,69 cg	3,05 abc	2,97 A	6,85 a	6,05 bc	6,24 b	6,38 A	9,13 a	7,50 b	7,34 b	7,99 A
ΦAG4a	1,33 mp	1,08 p	2,20 fk	1,54 E	2,17 ijk	1,67 k	2,50 hij	2,11 F	3,00 ghi	1,97 k	2,83 hij	2,60 F
ΦHG4	2,79 cf	1,77 jo	2,92 be	2,49 BC	3,67d	2,13 ijk	2,92 fgh	2,91C	4,34 d	2,78 hij	3,56 efg	3,56 C
TB(A)	2,54 A	1,68B	2,63 A		4,04 A	2,44 C	3,54 B		5,26 A	2,82C	4,23 B	
Mức ý nghĩa	F(A)*, F(B)*, F(AxB)*				F(A)*, F(B)*, F(AxB)*				F(A)*, F(B)*, F(AxB)*			
CV(%)	13,92				9,23				7,68			

Ghi chú: Các số trung bình trong cùng một bảng theo sau bởi một hoặc nhiều chữ cái giống nhau thì không khác biệt ở mức ý nghĩa 5% qua phép thử Duncan. *: khác biệt ở mức ý nghĩa 5%. GSKC: giờ sau khi cấy

3.4 Hiệu quả phòng trị bệnh héo xanh do vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* của các dòng TKT triển vọng trong điều kiện nhà lưới

Kết quả đánh giá tỉ lệ bệnh cho thấy ở thời điểm 10 NSKLB, bệnh xuất hiện ở tất cả các nghiệm thức (tỷ lệ bệnh từ 10-20%), riêng nghiệm thức áp dụng dòng TKT ΦĐT4 chưa xuất hiện bệnh tuy nhiên chưa có khác biệt thống kê giữa các nghiệm thức. Quan sát ở thời điểm 15 NSKLB, nghiệm thức ΦĐT4 có tỷ lệ bệnh thấp nhất (15%) khác biệt có ý nghĩa thống kê so với đối chứng, các nghiệm

thức còn lại chưa thể hiện hiệu quả giảm bệnh kể cả nghiệm thức Starner. Vào 17 NSKLB, nghiệm thức ΦĐT4 vẫn thể hiện tỷ lệ bệnh thấp (20%) khác biệt ý nghĩa so với nghiệm thức Starner và đối chứng, giữa các nghiệm thức xử lý TKT không khác biệt. Về chỉ số AUDPC, nghiệm thức xử lý dòng TKT ΦĐT4 đạt thấp hơn và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với đối chứng (Bảng 5). Các nghiệm thức áp dụng dòng thực khuẩn thể ΦCT18, ΦĐT3, hỗn hợp 3 dòng TKT và sử dụng thuốc Starner không thể hiện hiệu quả phòng trừ qua các thời điểm.

Bảng 5: Tỷ lệ bệnh héo xanh do vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* trong điều kiện nhà lưới qua các thời điểm khảo sát

Nghiệm thức	Tỷ lệ bệnh (%)			AUDPC
	10 NSKLB	15 NSKLB	17 NSKLB	
ΦCT18	10,0	35,0 ab	35,0 ab	207,5 ab
ΦĐT3	20,0	40,0 ab	40,0 ab	275,0 ab
ΦĐT4	0,0	15,0 b	20,0 b	72,50 b
Hỗn hợp 3 TKT	20,0	50,0 ab	50,0 ab	337,5 ab
THUỐC STARNER	20,0	50,0 ab	60,0 a	335,0 ab
ĐỐI CHỨNG	20,0	65,0 a	75,0 a	380,0 a
Mức ý nghĩa	ns	*	*	*
CV(%)	44,91	43,11	31,79	63,06

Ghi chú: Các số trung bình trong cùng một cột theo sau bởi một hoặc nhiều chữ cái giống nhau thì không khác biệt ở mức ý nghĩa 5% trong phép thử Duncan; *: khác biệt ở mức ý nghĩa 5%; ns: không khác biệt ý nghĩa; NSKLB: ngày sau khi lây bệnh; AUDPC: diện tích dưới đường cong tiến triển bệnh. Tỷ lệ bệnh được chuyển đổi

sang $\sqrt{x \pm \frac{1}{4n}}$ và $\arcsin \sqrt{x \pm \frac{1}{4n}}$ khi phân tích thống kê

Khảo sát mật số các dòng thực khuẩn thể được áp dụng qua các thời điểm 0 giờ sau khi lây bệnh (GSKLB), 1 ngày sau khi lây bệnh (NSKLB), 3 NSKLB, 5 NSKLB và 17 NSKLB. Nhìn chung, nghiệm thức xử lý TKT ΦĐT4 luôn có mật số TKT cao hơn và khác biệt ý nghĩa so với các nghiệm thức khác qua các thời điểm ngoại trừ 17 NSKLB. Vào 1 NSKLB, mật số các dòng thực khuẩn thể đều tăng so với thời điểm 0GSKLB, riêng dòng ΦĐT3 có mật số giảm. Dòng TKT ΦĐT4 có mật số cao nhất, khác biệt ý nghĩa so với dòng TKT ΦĐT3 và hỗn hợp TKT. Mật số các dòng thực khuẩn thể bắt

đầu giảm vào thời điểm 3 NSKLB, dòng ΦCT18 và hỗn hợp 3 thực khuẩn thể có tốc độ giảm mật số nhanh nhất, dòng ΦĐT4 có giảm nhưng chậm, khác biệt có ý nghĩa thống kê với dòng ΦĐT3. Dòng ΦĐT4 có mật số cao hơn và khác biệt có ý nghĩa thống kê với các dòng ΦCT18 và ΦĐT3 nhưng không khác biệt với nghiệm thức áp dụng hỗn hợp 3 TKT vào thời điểm 5 NSKLB. Đến 17 NSKLB, mật số TKT ở các nghiệm thức tiếp tục giảm, cao nhất ở dòng ΦĐT3 nhưng không khác biệt ý nghĩa thống kê với dòng ΦĐT4 và áp dụng hỗn hợp 3 TKT (Bảng 6).



Hình 1: Mức độ nhiễm bệnh héo xanh do vi khuẩn *R. solanacearum* ở các nghiệm thức xử lý TKT ở thời điểm 17 NSKLB

- A. Xử lý ΦCT18; B. Xử lý ΦĐT3; C. Xử lý ΦĐT4;
D. Xử lý hỗn hợp 3 dòng TKT (ΦCT18, ΦĐT3 và ΦĐT4);
E. Xử lý thuốc Starnet; F. Đối chứng không xử lý TKT

Bảng 6: Mật số các dòng thực khuẩn thể áp dụng qua các thời điểm khảo sát

Thí nghiệm	Log mật số TKT (PFU/g rễ)				
	0 GSKLB	1 NSKLB	3 NSKLB	5 NSKLB	17 NSKLB
ΦCT18	7,27	7,63 ab	6,54 ab	5,35 b	3,20 b
ΦĐT3	7,97	7,51 b	6,46 b	5,61 b	5,40 a
ΦĐT4	7,69	7,97 a	7,11 a	6,46 a	5,18 ab
Hỗn hợp 3 TKT	7,04	7,52 b	6,71 ab	6,18 a	3,67 ab
Mức ý nghĩa	ns	*	*	*	*
CV (%)	8,81	3,02	4,60	4,99	24,51

Ghi chú: Các số trung bình trong cùng một cột theo sau bởi một hoặc nhiều chữ cái giống nhau thì không khác biệt ở mức ý nghĩa 5% trong phép thử Duncan; *: khác biệt ở mức ý nghĩa 5%; ns: không khác biệt ý nghĩa; NSKLB: ngày sau khi lây bệnh; GSKLB: giờ sau khi lây bệnh; Mật số được chuyển đổi sang log(x) khi phân tích thống kê

Tóm lại, áp dụng dòng TKT ΦĐT4 trong phòng trị bệnh héo trên cây vụn thối do vi khuẩn *R.solanacearum* cho hiệu quả giảm bệnh hơn các thí nghiệm còn lại (Hình 1). Mật số thực khuẩn thể có tương quan thuận với hiệu quả giảm bệnh, mật số càng cao thì tăng hiệu quả kiểm soát bệnh thể hiện qua tỉ lệ bệnh và chỉ số AUDPC thấp. Các TKT xâm nhiễm vào tế bào vi khuẩn ký chủ có thể phát triển và tiếp tục sản xuất các thể phage mới trong điều kiện thích hợp, có thể được xem như là một công cụ trong kiểm soát bệnh héo trên cây trồng bằng cách làm giảm tính độc của vi khuẩn (Addy *et al.*, 2012). Do đó, để áp dụng thực khuẩn thể một cách hiệu quả, điều quan trọng là các thực khuẩn thể phải tiếp xúc với vi khuẩn ký chủ (Goodridge, 2004, trích dẫn bởi Jones *et al.*, 2007), nồng độ thực khuẩn thể ban đầu đủ cao (Gill và Abedon, 2003). Khả năng lưu tồn của thực khuẩn thể tăng góp phần gia tăng khả năng kiểm soát bệnh (Baglogh, 2006). Vì vậy, sử dụng thực khuẩn thể có khả năng tồn tại lâu, nhân mật số với sự hiện diện của vi khuẩn ký chủ sẽ có hiệu quả kiểm soát mầm bệnh tốt hơn.

4 KẾT LUẬN

Kết quả phân lập được 38 dòng TKT có khả năng ký sinh 21 chủng vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* khác nhau tại các tỉnh An Giang, Hậu Giang, Tiền Giang, Đồng Tháp và thành phố Cần Thơ. Ghi nhận 10 dòng TKT có khả năng ký sinh rộng trên các chủng vi khuẩn phân lập, gồm: ΦCT12, ΦCT13, ΦCT14, ΦCT18, ΦCT19, ΦCT20, ΦAG4a, ΦĐT3, ΦĐT4, và ΦHG4. Trong đó, 3 dòng ΦCT18, ΦĐT3 và ΦĐT4 có khả năng phân giải vi khuẩn *R.solanacearum* cao nhất trong điều kiện phòng thí nghiệm.

Thí nghiệm xử lý dòng thực khuẩn thể ΦĐT4 phân lập tại tỉnh Đồng Tháp thể hiện hiệu quả giảm bệnh héo xanh trên cây vụn thối do vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* cao hơn dòng ΦCT18 và ΦĐT3 đến thời điểm 17 NSKLB trong điều kiện nhà lưới và duy trì mật số ổn định hơn so với các thí nghiệm còn lại.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Addy, H. S., Askora, A., Kawasaki, T., Fujie, M. and Yamada, T. (2012). Utilization of filamentous phage φRSM3 to control bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum*. *Plant Disease*, 96(8), 1204-1209.
- Addy, H. S., Azizi, N. F. and Mihardjo, P. A. (2016). Detection of bacterial wilt pathogen and isolation of its bacteriophage from Banana in Lumajang area, Indonesia. *International Journal of Agronomy* 2: 1-7.
- Balogh, B. (2006). Characterization and use of bacteriophages associated with citrus bacterial pathogens for disease control. A dissertation presented to the graduate school of University of Florida in partial fulfillment of the requirements for the degree of doctor of philosophy, University of Florida, 112pp.
- Balogh, B., Jones, J. B., Iriarte, F. and Momol, M. (2010). Phage therapy for plant disease control. *Current pharmaceutical biotechnology*, 11(1), 48-57.
- Jones, J., Jackson, L., Balogh, B., Obradovic, A., Iriarte, F. and Momol, M. (2007). Bacteriophages for Plant Disease Control. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 45, 245-262.
- Kalpage, M. and De Costa, D. (2014). Isolation of bacteriophages and determination of their efficiency in controlling *Ralstonia solanacearum* causing bacterial wilt of tomato. *Tropical Agricultural Research*, 26(1), 140 – 151.
- Kelman, A. (1985). Plant pathology at the crossroads. *Annual review of phytopathology*, 23(1), 1-12.
- Lương Hữu Tâm (2013). Phân lập và bước đầu đánh giá khả năng hạn chế bệnh cháy bìa lá lúa do vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* của một số chủng thực khuẩn thể ở ĐBSCL. Luận văn tốt nghiệp Thạc sĩ. Trường Đại học Cần Thơ.
- Mondal, B., Bhattacharya, I. and Khatua, D. (2014). Incidence of bacterial wilt disease in West Bengal, India. *Academic Journal of Agricultural Research*, 2(6), 139-146.

- Nguyễn Thị Thu Cúc, Trần Thị Thu Thủy (2014). *Dịch hại trên hoa hồng, cúc, mai, vạn thọ*. NXB Trường Đại học Cần Thơ.
- Nguyễn Thị Trúc Giang, Đoàn Thị Kiều Tiên và Nguyễn Thị Thu Nga (2014). Phân lập thực khuẩn thể và đánh giá hiệu quả phòng trị bệnh cháy bìa lá lúa do vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 4, 194-203.
- Nguyễn Thị Trúc Giang, Nguyễn Văn Nhó, Nguyễn Thị Bạc, Nguyễn Thị Thu Nga và Phạm Văn Kim (2016). Khảo sát phương pháp phân lập thực khuẩn thể và hiệu quả phòng trị của thực khuẩn thể đối với bệnh cháy bìa lá lúa do vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Kỷ yếu Hội thảo Quốc gia Bệnh hại thực vật Việt Nam lần thứ 15*. NXB Nông Nghiệp. Trang 30-39.
- Nguyễn Tất Thắng, Đỗ Tấn Dũng và Nguyễn Văn Tuất (2015). Nghiên cứu bệnh héo xanh vi khuẩn (*Ralstonia solanacearum* Smith) hại cây khoai tây vùng Hà Nội–phụ cận và biện pháp phòng trừ. *Tạp chí Khoa học và Phát triển*, 9(5), 725-734.
- Ronald, P. (2011). Plant genetics, sustainable agriculture and global food security. *Genetics*, 188(1), 11-20.
- Trần Ngọc Trân, Khương Minh Trí, Nguyễn Thị Thu Nga (2016). Phân lập và đánh giá hiệu quả của thực khuẩn thể trong việc phòng trừ bệnh cháy lá do vi khuẩn *Xanthomonas* sp. trên cây hành lá (*Allium fistulosum* L.). *Kỷ yếu Hội thảo Quốc gia Bệnh hại thực vật Việt Nam lần thứ 15*. NXB Nông Nghiệp, trang 1-9.
- Yamada, T. (2012). *Bacteriophages of Ralstonia solanacearum: Their Diversity and Utilization as Biocontrol Agents in Agriculture*. In “Bacteriophages”, Ipek Kurtboke (Ed.), ISBN: 978-953-51-0272-4, InTech. p: 113-138.