



DOI:10.22144/ctujos.2025.012

ĐÁNH GIÁ HIỆU QUẢ CỦA THỰC KHUẨN THỂ TRONG PHÒNG TRỪ BỆNH HÉO XANH TRÊN CÂY CÀ CHUA DO VI KHUẨN *Ralstonia solanacearum* SMITH

Huỳnh Hữu Trí, Cao Xuân Vinh, Lâm Ngọc Bích, Nguyễn Gia Huy, Đoàn Thị Kiều Tiên và Nguyễn Thị Thu Nga*

Trường Nông Nghiệp, Trường Đại học Cần Thơ, Việt Nam

*Tác giả liên hệ (Corresponding author): ntnnga@ctu.edu.vn

Thông tin chung (Article Information)

Nhận bài (Received): 10/07/2024

Sửa bài (Revised): 29/08/2024

Duyệt đăng (Accepted): 22/12/2024

Title: Evaluation of the effectiveness of bacteriophages controlling bacterial wilt disease on tomato caused by *Ralstonia solanacearum* Smith

Author(s): Huynh Huu Tri, Cao Xuan Vinh, Lam Ngoc Bich, Nguyen Gia Huy, Doan Thi Kieu Tien and Nguyen Thi Thu Nga*

Affiliation(s): College of Agriculture, Can Tho University, Viet Nam

TÓM TẮT

Bệnh héo xanh do vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* gây thiệt hại nghiêm trọng ở các vùng trồng cà chua trên toàn thế giới. Trong nghiên cứu này, hai mươi dòng thực khuẩn thể (TKT) đã được đánh giá khả năng nhân mật số trên hỗn hợp vi khuẩn *R. solanacearum*. Sáu dòng TKT (gồm ΦOM , $\Phi R0$, $\Phi R1$, $\Phi CT4$, ΦRLV và $\Phi BT67$) được chọn để đánh giá khả năng phân giải vi khuẩn *R. solanacearum* qua sự hình thành đốm tan trên đĩa petri. Kết quả ghi nhận, sáu dòng TKT có log mật số từ 6,61 đến 6,73 cao hơn và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các dòng TKT còn lại, đường kính đốm tan của các dòng TKT này dao động từ 5,88 mm đến 7,18 mm tại thời điểm 48 giờ sau khi cấy, trong đó ba dòng TKT $\Phi BT67$, $\Phi R0$ và ΦRLV thể hiện đường kính đốm tan cao hơn. Trong điều kiện nhà lưới, khi đánh giá hiệu quả phòng trừ bệnh héo xanh trên cây cà chua bằng cách xử lý đơn lẻ dòng $\Phi BT67$ hay kết hợp ba dòng ($\Phi BT67$, $\Phi R0$ và ΦRLV) ở mật số 10^7 PFU/mL hoặc 10^8 PFU/mL, xử lý tưới vào gốc cây một giờ trước khi lây bệnh nhân tạo. Kết quả nghiên cứu cho thấy, nghiệm thức $\Phi BT67$ và hỗn hợp TKT ở mật số 10^8 PFU/mL có tỷ lệ bệnh và trung bình cấp bệnh thấp hơn so với nghiệm thức đối chứng tại các thời điểm khảo sát.

Từ khóa: Bệnh héo xanh, cà chua, phòng trừ sinh học, *Ralstonia solanacearum*, thực khuẩn thể

ABSTRACT

Bacterial wilt disease caused by *Ralstonia solanacearum* causes significant damage in tomato-growing regions worldwide. In this study, twenty bacteriophages were assessed for their multiplication on a mixture of *R. solanacearum*. Six phages (ΦOM , $\Phi R0$, $\Phi R1$, $\Phi CT4$, ΦRLV , and $\Phi BT67$) were selected to evaluate their lytic activity against *R. solanacearum* through plaque formation assays in vitro. The results indicated that these six phages exhibited logarithmic titers ranging from 6.61 to 6.73, which were significantly higher compared to the other phages tested. Plaque diameters of six bacteriophages ranged from 5.88 mm to 7.18 mm at 48 hours-post-inoculation, in which three bacteriophages i.e. $\Phi BT67$, $\Phi R0$ and ΦRLV expressed higher plaque diameters. In greenhouse conditions, evaluation of the effectiveness of single bacteriophage $\Phi BT67$ or mixture of three bacteriophages ($\Phi BT67$, $\Phi R0$ and ΦRLV) application at concentrations of 10^7 PFU/mL and 10^8 PFU/mL for preventing bacterial wilt disease in tomato plants. Bacteriophages were applied through soil drenching one hour before pathogen inoculation. Results found that the $\Phi BT67$ treatment and the phage mixture at a concentration of 10^8 PFU/mL significantly reduced both disease incidence and disease scale compared to the control treatment throughout the study period.

Keywords: Bacterial wilt disease, bacteriophages, biocontrol, *Ralstonia solanacearum*, tomatoes

1. GIỚI THIỆU

Cây cà chua (*Lycopersicon esculentum* Mill.) là cây rau ăn quả quan trọng, mang lại nhiều giá trị dinh dưỡng cho sức khỏe con người và được trồng phổ biến ở khắp nơi trên thế giới chỉ sau cây khoai tây (Tran & Vo, 2019). Hiện nay, theo thống kê của tổ chức Lương Nông Thế giới năm 2022 thì diện tích trồng cà chua trên toàn thế giới là hơn 4,91 triệu ha với sản lượng hàng năm vào khoảng 186 triệu tấn, cho thấy nhu cầu tiêu thụ cà chua rất lớn và có ý nghĩa quan trọng về mặt kinh tế (Food and agriculture organization of the United Nations, 2022). Ở Việt Nam, cà chua được canh tác nhiều nhất ở các tỉnh phía Bắc, Lâm Đồng và các tỉnh tại đồng bằng sông Cửu Long, diện tích canh tác luôn được mở rộng với kỹ thuật thâm canh tăng vụ đã mang lại thu nhập đáng kể cho người nông dân (Tran & Vo, 2019). Tuy nhiên, canh tác liên tục trong thời gian dài đã làm cho các mầm bệnh trong đất tích lũy và gây hại nghiêm trọng, nổi bật là bệnh héo xanh đã làm giảm đáng kể năng suất và là mối quan tâm hàng đầu của nông dân trồng cà chua (Rivard & Louws, 2008). Cây bị bệnh có biểu hiện triệu chứng điển hình với các lá bị héo trong thời tiết nắng nóng, sau đó tươi trở lại vào buổi chiều tối và sáng sớm. Sau vài ngày, lá bị héo hoàn toàn và sau đó cây chết (Poussier et al., 2000; Mohammed et al., 2020). Bệnh héo xanh gây hại nghiêm trọng, làm thất thu năng suất từ 10% đến 80% ở các vùng trồng cà chua và rất khó quản lý do chúng có thể lưu tồn trong đất thời gian dài (Zheng et al., 2014).

Bệnh héo xanh trên cà chua gây ra bởi vi khuẩn *Ralstonia solanacearum*, đây là vi khuẩn gram âm, hiếu khí, xâm nhiễm và gây bệnh thực vật qua đất (Hayward, 1991; Brown & Allen, 2004; Khokhani et al., 2018). Vi khuẩn phân bố ở hầu hết các vùng trồng cà chua trên toàn thế giới, nhưng gây hại nặng ở vùng có khí hậu nhiệt đới và cận nhiệt đới (Mansfield et al., 2012; He et al., 2021). *R. solanacearum* được đánh giá là một trong những loài vi khuẩn gây bệnh thực vật nghiêm trọng nhất trên toàn thế giới do chúng là một phức hợp loài bao gồm một nhóm lớn các chủng khác nhau về nguồn gốc địa lý, phạm vi ký chủ trên hơn 200 loài cây trồng thuộc 50 họ thực vật (Hayward, 1991; Agrios, 2005). Vi khuẩn lây nhiễm vào thực vật thông qua các vết thương ở rễ, tại các vị trí mọc rễ thứ cấp và ở đầu rễ, rồi di chuyển giữa các tế bào qua các khoảng không bào đến các mạch xylem, nơi chúng nhân lên và làm nghẽn mạch (Genin, 2010; Peeters et al., 2013).

Phòng trị bệnh héo xanh bằng thuốc hóa học được áp dụng phổ biến, tuy nhiên dễ tạo các nòi kháng thuốc (Islam et al., 2024). Việc xử lý tưới gốc bằng thuốc hóa học trong thời gian dài còn làm ảnh hưởng đến môi trường và cộng đồng vi sinh vật đất (Maji & Chakrabarty, 2014; Doan et al., 2022). Hiện nay, nghiên cứu các biện pháp phòng trừ sinh học để quản lý bệnh héo xanh do vi khuẩn được xem là có hiệu quả và thân thiện với môi trường (Nion & Toyota, 2015). TKT là virus ký sinh vi khuẩn rất đặc hiệu và việc sử dụng TKT nhằm kiểm soát các bệnh do vi khuẩn có tiềm năng rất lớn để giảm việc sử dụng thuốc hóa học (Jones et al., 2007; Balogh et al., 2010; Loc-Carrillo & Abedon, 2011). Liệu pháp sử dụng TKT đã được chứng minh là có hiệu quả trong kiểm soát *R. solanacearum* điều kiện phòng thí nghiệm (Addy et al., 2012; Yamada, 2012) và tỷ lệ bệnh héo cũng giảm đáng kể khi sử dụng TKT đơn lẻ hoặc hỗn hợp TKT trong điều kiện nhà kính (Álvarez et al., 2019). Sử dụng hỗn hợp TKT làm hạn chế sự hình thành tính kháng của *R. solanacearum* và xử lý TKT sớm giúp mang lại hiệu quả tốt trong việc ngăn ngừa *R. solanacearum* gây bệnh trên cây trồng (Fujiwara et al., 2011; Wei et al., 2017; Doan et al., 2022).

Trên cơ sở đó, nghiên cứu về hiệu quả của TKT trong phòng trị bệnh héo xanh do vi khuẩn *R. solanacearum* trên cây cà chua được thực hiện nhằm tìm ra dòng TKT và mật số xử lý TKT có hiệu quả phòng trị bệnh trong điều kiện phòng thí nghiệm và nhà lưới.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Nguồn TKT gồm 20 dòng: Φ11, Φ40, ΦAG20, ΦAG21 (phân lập từ cây cà chua); ΦVL54, ΦCT60 (phân lập từ cây ớt); ΦBT67 (phân lập từ cây cúc); Φ1D, Φ2D (phân lập từ cây khoai lang); ΦOM (phân lập từ cây khế qua rừng); ΦR0, ΦR1, Φ1G, Φ2G (phân lập từ cây gừng); ΦBT (phân lập từ cây cà phôi); ΦĐT3, ΦCT4, ΦTG4 (phân lập từ cây vụn thối); ΦRCT, ΦRLV (phân lập từ cây dưa leo). Ba chủng vi khuẩn *R. solanacearum* đã phân lập được từ mẫu bệnh thu tại tỉnh Kon Tum (Rs08), Đắk Lắk (Rs09) và Lâm Đồng (Rs11) (được cung cấp bởi Khoa Bảo vệ thực vật, Trường Nông Nghiệp, Trường Đại học Cần Thơ).

Giống cà chua hữu hạn F1 Nicola TN797 được mua từ Công ty TNHH TM Trang Nông.

Nguồn đất: Sử dụng đất trộn tỷ lệ xơ dừa và đất là 1:2 được thanh trùng 2 lần với nhiệt độ 121°C,

thời gian 30 phút với áp suất 1 atm nhằm loại bỏ toàn bộ nguồn sinh vật có trong đất. Sau đó, cân 3 kg đất cho vào chậu, sử dụng chậu nhựa size C10 có đường kính 25 cm.

Hóa chất: Các hóa chất cần thiết cho môi trường King's B 0,8% agar dùng để nuôi thực khuẩn thể, môi trường King's B 2% agar dùng để nuôi vi khuẩn gồm 20 g Peptone, 1,5 g $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, 1,5 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 15 mL glycerol, nước cất cho 1000 mL môi trường và pH 7,2 - 7,4 (King et al., 1954); Chloroform (Chemsol, Việt Nam); thuốc trừ bệnh vi khuẩn Starner 20 WP (hoạt chất Oxolinic acid) (Sumitomo Chemical, Nhật Bản).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Tuyển chọn TKT triển vọng thông qua khả năng nhân mật số của các dòng TKT trên các chủng vi khuẩn *Ralstonia solanacearum*

Phương pháp: Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên 1 nhân tố với 3 lần lặp lại, gồm 20 nghiệm thức tương ứng với 20 dòng TKT, 3 chủng vi khuẩn *R. solanacearum* phân lập từ cây cà chua (Rs08, Rs09, Rs11).

Chuẩn bị huyền phù vi khuẩn: Các dòng vi khuẩn này được nuôi riêng lẻ trên môi trường King's B 2% agar trong 48 giờ, chọn đơn khuẩn lạc của mỗi dòng vi khuẩn vào ống falcon 15 mL có chứa nước cất vô trùng và lắc đều, xác định độ đục của huyền phù $OD_{600nm} = 0,3$ tương đương mật số 10^8 CFU/mL bằng máy đo quang phổ. Sau đó, huyền phù hỗn hợp vi khuẩn *R. solanacearum* được chuẩn bị bằng cách lấy huyền phù của mỗi dòng vi khuẩn với tỷ lệ thể tích 1: 1: 1.

Chuẩn bị nguồn thực khuẩn thể: 20 dòng TKT được nhân nuôi và ghi nhận mật số dựa trên hệ số pha loãng để xác định mật số TKT (PFU/mL), đưa 20 dòng TKT sau khi đếm mật số về cùng mật số 10^7 PFU/mL và thực hiện thí nghiệm.

Tiến hành: Đĩa Petri được ký hiệu theo từng nghiệm thức tương ứng với 20 dòng TKT đã đưa về cùng mật số, 3 lần lặp lại. Các ống chứa TKT sau khi được pha loãng về cùng mật số. Tiếp đến, hút 100 μ L huyền phù hỗn hợp vi khuẩn ($OD_{600nm} = 0,3$ tương đương mật số 10^8 CFU/mL) và 100 μ L huyền phù từng dòng TKT đã pha loãng vào từng đĩa Petri đã ký hiệu. Sau đó thêm vào 10 mL môi trường King's B 0,8% đã nấu tan và để nguội giữ ở $50^\circ C$, hòa đều đĩa bằng cách lắc tròn 20 vòng, đĩa được che tối và giữ ở nhiệt độ phòng $28^\circ C \pm 2$. Mỗi đĩa Petri là 1 lần lặp lại. Đĩa được ủ ở điều kiện phòng trong 24 giờ và tiến hành quan sát các đốm tan.

Chỉ tiêu ghi nhận: Quan sát và đếm số lượng đốm tan của TKT hình thành trên đĩa, dựa vào hệ số pha loãng để tính mật số.

2.2.2. Tuyển chọn TKT triển vọng thông qua khảo sát khả năng phân giải hỗn hợp vi khuẩn *R. solanacearum* của các dòng TKT trong điều kiện phòng thí nghiệm

Phương pháp: Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên một nhân tố, sáu nghiệm thức tương ứng với sáu dòng TKT (ΦOM , $\Phi R0$, $\Phi R1$, $\Phi CT4$, ΦRLV và $\Phi BT67$) được chọn từ thí nghiệm 2.2.1, 3 lần lặp lại, mỗi lần lặp lại là một đĩa petri.

Chuẩn bị huyền phù hỗn hợp vi khuẩn được thực hiện tương tự như ở thí nghiệm 2.2.1.

Chuẩn bị nguồn TKT: Nhân mật số từng dòng TKT ΦOM , $\Phi R0$, $\Phi R1$, $\Phi CT4$, ΦRLV và $\Phi BT67$ trong 24 giờ. Thực hiện đếm mật số và pha loãng để tạo huyền phù các dòng TKT khác nhau ở mật số 10^2 PFU/mL để có thể quan sát được 10 đốm tan riêng lẻ, mô tả theo phương pháp của Nga et al., (2021).

Tiến hành đổ đĩa bằng môi trường King's B 0,8% agar đã được nấu tan để nguội ở $50^\circ C$ và hòa đều đĩa bằng cách lắc tròn 20 vòng, đĩa được che tối và giữ ở nhiệt độ phòng $28^\circ C \pm 2$.

Chỉ tiêu ghi nhận: Quan sát và ghi nhận đường kính đốm tan của từng dòng TKT trên đĩa petri vào các thời điểm 12, 24, 36 và 48 giờ sau khi cấy (GSKC) bằng cách đo đường kính 10 đốm tan cố định và lấy trung bình của mỗi đĩa petri tương ứng với 1 lần lặp lại.

2.2.3. Đánh giá hiệu quả của TKT trong phòng trị bệnh héo xanh trên cây cà chua do vi khuẩn *R. solanacearum* trong điều kiện nhà lưới

Phương pháp: Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên một nhân tố gồm 6 nghiệm thức (nghiệm thức TKT đơn lẻ và nghiệm thức hỗn hợp 3 dòng TKT (với tỷ lệ phối trộn là 1: 1: 1 về mật số) có đường kính phân giải lớn nhất được chọn từ thí nghiệm 2.2.2 xử lý ở mật số 10^7 PFU/mL và 10^8 PFU/mL, xử lý thuốc Starner 20 WP theo liều lượng khuyến cáo và đối chứng xử lý nước cất vô trùng), 4 lần lặp lại và mỗi lần lặp lại là 10 cây cà chua/chậu, chậu nhựa C10 (d=25 cm) có chứa 3 kg đất đã thanh trùng.

Chuẩn bị TKT: Tăng sinh mật số dòng các TKT được chọn, thực hiện đếm mật số và pha loãng để tạo huyền phù TKT đơn lẻ và hỗn hợp có mật số 10^7 PFU/mL và 10^8 PFU/mL.

Chuẩn bị vi khuẩn: Các chủng vi khuẩn được nuôi cấy riêng biệt trên đĩa petri chứa môi trường King's B trong 48 giờ. Sau đó, cho nước cất vô trùng vào để thu hoạch huyền phù vi khuẩn, kết hợp huyền phù của ba chủng vi khuẩn *R. solanacearum* thành hỗn hợp vi khuẩn, thực hiện pha loãng để đạt huyền phù có giá trị $OD_{600nm} = 0,3$, tương ứng với mật số vi khuẩn là 10^8 CFU/mL.

Phương pháp xử lý TKT: Cây con sau khi trồng được 20 ngày, khi cây có 2 lá thật hoàn chỉnh, cây cao khoảng 15 cm, tưới huyền phù từng dòng TKT tương ứng với từng nghiệm thức xung quanh gốc cây (5 mL/cây) vào buổi chiều mát. Nghiệm thức xử lý thuốc Starner 20 WP (Oxolinic acid) và nghiệm thức đối chứng không xử lý TKT thì tưới nước cất (5 mL/cây). Sau khi xử lý TKT 1 giờ, tiến hành lây bệnh bằng cách tưới huyền phù hỗn hợp 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.

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 (TLB) 3 ngày/ lần.

TLB (%) được tính như sau:

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

Diện tích bên dưới đường cong tiến triển bệnh theo Shaner and Finney (1977):

$$AUDPC = \sum_{i=1}^{n-1} \left(\frac{y_i + y_{i+1}}{2} \right) (t_{i+1} - t_i)$$

Trong đó: n = số lần lấy chỉ tiêu; y_i = TLB hoặc phần trăm diện tích lá bệnh tại lần đo thứ i; t_i = thời gian của lần đo thứ i.

Cấp bệnh được ghi nhận theo thang đánh giá của (Fujiwara et al., 2011) gồm có cấp độ bệnh từ 0 đến 5 (cấp 0: không bệnh; cấp 1: có 1 lá héo; cấp 2: có 2 hoặc 3 lá héo; cấp 3: tất cả lá đều héo trừ 2 - 3 lá trên ngọn; cấp 4: tất cả lá đều héo; cấp 5: cây chết).

2.3. Phân tích thống kê

Xử lý số liệu bằng Microsoft Excel 2016, phân tích thống kê bằng phần mềm SPSS 26 qua phép thử Duncan ở mức ý nghĩa 5%.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả đánh giá khả năng nhân mật số của các dòng TKT trên các chủng vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* trong phòng thí nghiệm

Tại Bảng 1, kết quả này cho thấy mặc dù 20 dòng TKT đều có khả năng ký sinh trên ba chủng vi khuẩn phân lập từ cây cà chua (Rs08, Rs09, Rs11), trong đó có 6 dòng TKT ΦOM , $\Phi R0$, $\Phi R1$, $\Phi CT4$, ΦRLV và $\Phi BT67$ được ghi nhận khả năng nhân mật số. Với log mật số TKT (PFU/mL) dao động từ 6,61 đến 6,76 cao hơn và khác biệt rất có ý nghĩa so với các dòng TKT còn lại ở mức ý nghĩa 1%, kể đến là TKT $\Phi VL54$ với log mật số (PFU/mL) là 6,51.

Bảng 1. Khả năng nhân mật số của một số dòng TKT trên cà chua

STT	Nghiệm thức	Log mật số (PFU/mL)	STT	Nghiệm thức	Log mật số (PFU/mL)
1	ΦOM	6,71 ^{ab}	11	ΦRCT	6,44 ^{cd}
2	$\Phi R0$	6,73 ^{ab}	12	$\Phi 1D$	5,95 ^{fg}
3	$\Phi R1$	6,61 ^{abc}	13	$\Phi 2D$	5,88 ^{fg}
4	$\Phi 1G$	6,46 ^{cd}	14	$\Phi 11$	4,99 ^h
5	$\Phi 2G$	6,09 ^{ef}	15	$\Phi AG20$	6,10 ^{ef}
6	$\Phi DT3$	5,94 ^{fg}	16	$\Phi AG21$	5,77 ^g
7	$\Phi CT4$	6,76 ^a	17	$\Phi 40$	6,45 ^{cd}
8	$\Phi TG4$	6,27 ^{de}	18	$\Phi VL54$	6,51 ^{bc}
9	ΦBT	6,04 ^{fg}	19	$\Phi CT60$	5,73 ^g
10	ΦRLV	6,72 ^{ab}	20	$\Phi BT67$	6,66 ^{abc}

Mức ý nghĩa $P < 0,01$

CV (%) 1,43

Ghi chú: số liệu được chuyển sang log x trước khi phân tích thống kê. Trong cùng một cột những số có cùng chữ cái theo sau giống nhau thì không khác biệt thì không khác biệt ở mức ý nghĩa 5% trong phép thử Duncan. $P < 0,01$: khác biệt ở mức ý nghĩa 1%.

Sự khác biệt này là do đặc tính ký sinh của mỗi dòng TKT trên vi khuẩn ký chủ là khác nhau và quá trình làm phá vỡ tế bào vi khuẩn dẫn đến giải phóng

TKT mới có liên quan đến nhóm protein của TKT, bao gồm: lysin, holins hoặc chất ức chế tổng hợp murein chịu trách nhiệm cho sự phân giải tế bào vi

khuẩn ký chủ và sự phóng thích virion vào môi trường (Drulis-Kawa et al., 2012). Như vậy, các dòng TKT khác nhau sẽ có khả năng nhân mật số khác nhau khi ký sinh trên vi khuẩn ký chủ trong thời gian nhất định và dòng TKT tiềm năng phải có khả năng nhân mật số cao trên vi khuẩn gây hại (Dennehy & Abedon, 2021).

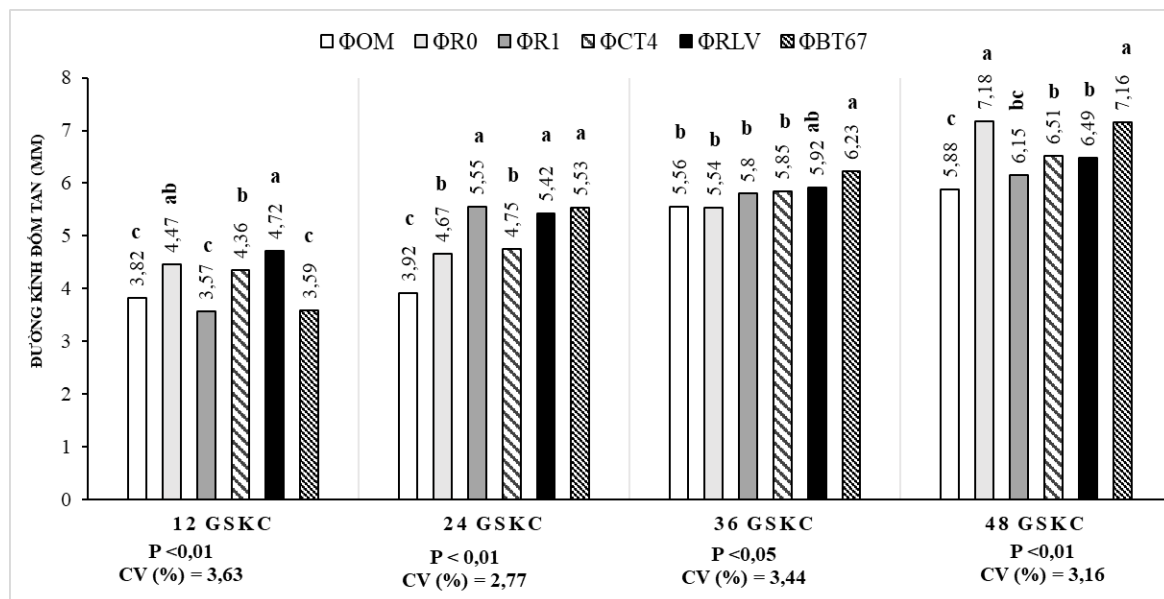
Tóm lại, dựa trên kết quả về khả năng nhân mật số thông qua hình thành đốm tan của các dòng TKT trên hỗn hợp vi khuẩn phân lập từ cây cà chua, có thể thấy 6 dòng TKT được chọn ra gồm Φ OM, Φ R0, Φ R1, Φ CT4, Φ RLV và Φ BT67. Những dòng này thể hiện khả năng nhân mật số tốt và có tiềm năng cao trong việc kiểm soát vi khuẩn trên cây cà chua.

3.2. Khả năng phân giải của các dòng thực khuẩn thể theo thời gian trong điều kiện phòng thí nghiệm

Ở thời điểm khảo sát 12 GSKC, các dòng TKT Φ R0 và TKT Φ RLV cho đường kính phân giải lần lượt là 4,47 mm và 4,72 mm cao hơn và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các dòng TKT còn lại. Tại thời điểm ghi 24, 36, 48 ghi nhận TKT Φ BT67 phát

triển đường kính đốm tan nhanh chóng, cao hơn và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức còn lại, tuy nhiên không có sự khác biệt về mật thống kê với nghiệm thức TKT Φ R0.

Qua Hình 1, khả năng phân giải khác nhau của các dòng TKT và đã chọn được dòng TKT Φ BT67 làm nghiệm thức xử lý đơn. Đồng thời, dòng TKT Φ BT67 kết hợp với TKT Φ R0, Φ RLV thành hỗn hợp TKT để làm nguồn vật liệu cho thí nghiệm đánh giá khả năng phòng trị của các nghiệm thức trên cây cà chua ở điều kiện nhà lưới. Kết quả so sánh về khả năng phân giải của các dòng TKT trên hỗn hợp vi khuẩn *R. solanacearum* trên cây cà chua (Hình 1) cho thấy rằng, 6 dòng TKT được chọn để thực hiện thí nghiệm này đều thể hiện được khả năng nhân mật số tốt trên hỗn hợp vi khuẩn ký chủ. Tuy nhiên, khi đánh giá khả năng phân giải vi khuẩn thông qua đường kính đốm tan tại các thời điểm khảo sát 12, 24, 36 và 48 giờ lại thể hiện sự khác biệt. Điều đó cũng phù hợp với nghiên cứu của Gallet et al. (2011) cho rằng khả năng phân giải vi khuẩn của các dòng TKT khác nhau thông qua việc hình thành các đốm tan.



Hình 1. Khả năng phân giải của 6 dòng TKT trên các chủng vi khuẩn *R. solanacearum* phân lập từ cây cà chua

Ghi chú: Các số trung bình trong cùng một cột theo sau bởi một hoặc nhiều chữ cái giống nhau thì không khác biệt ý nghĩa qua phép thử Duncan ở mức ý nghĩa 5%. P < 0,01: khác biệt ở mức ý nghĩa 1%, P < 0,05: khác biệt ở mức ý nghĩa 5%, GSKC: Giờ sau khi cấy.

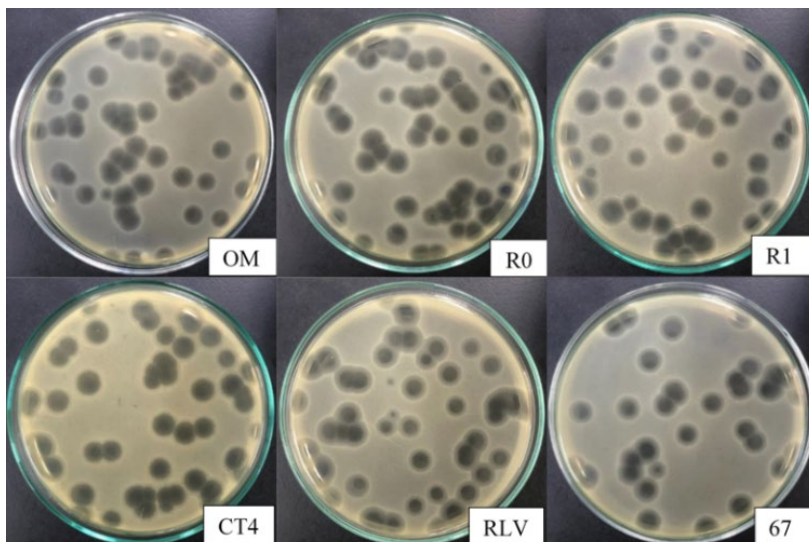
Đường kính đốm tan khác nhau giữa các dòng TKT, vi khuẩn ký chủ và thời gian phân giải. Kích thước đốm tan càng lớn chứng tỏ dòng TKT có khả năng phân giải vi khuẩn ký chủ càng mạnh (Abedon

& Culler, 2007). Tuy nhiên, hiệu quả phòng trị bệnh trên cây trồng ngoài khả năng tiêu diệt vi khuẩn nhanh còn phụ thuộc vào các yếu tố khác như khả năng tồn tại và thích nghi của TKT đối với điều kiện môi trường (Jones et al., 2007). Vì vậy, cần đánh giá

khả năng phòng trị bệnh héo xanh trên cây cà chua ở điều kiện nhà lưới.

Trong nghiên cứu ở điều kiện nhà lưới, dòng TKT ΦBT67 đã được chọn làm đối tượng xử lý đơn lẻ do TKT này ghi nhận sự phát triển đốm tan nhanh chóng và đồng thời kết hợp TKT ΦBT67 với hai

dòng TKT khác là ΦR0 và ΦRLV để tạo thành hỗn hợp TKT và các nghiệm thức được xử lý ở mật số 10^7 PFU/mL và 10^8 PFU/mL. Hỗn hợp này sau đó được sử dụng làm vật liệu cho thí nghiệm nhằm đánh giá khả năng phòng trị bệnh cho cây cà chua trong điều kiện nhà lưới.



Hình 2. Sự phân giải của 6 dòng TKT trên hỗn hợp vi khuẩn *R. solanacearum* phân lập từ cây cà chua tại thời điểm 36 GSKC trên đĩa petri

3.3. Khả năng phòng trị của TKT trong điều kiện nhà lưới

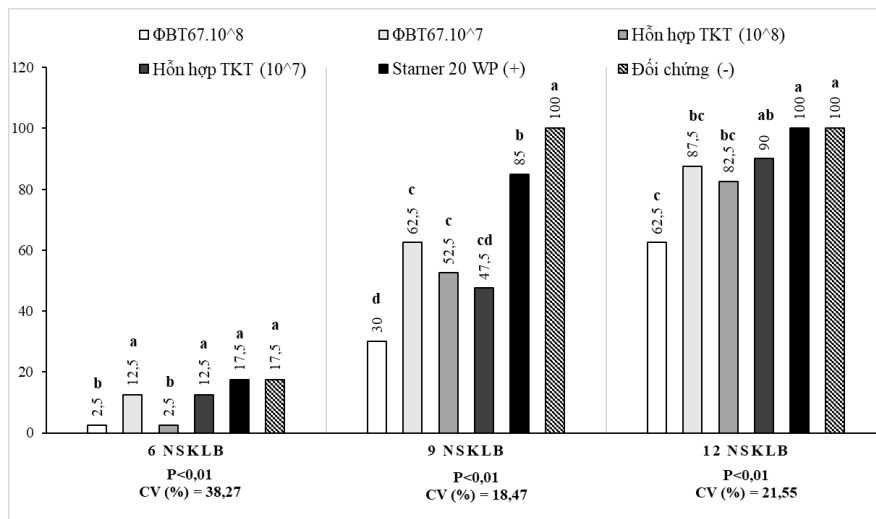
Về TLB (Hình 3):

Tại thời điểm 6 NSKLB, hai nghiệm thức xử lý TKT ΦBT67 và HH TKT ΦBT67, ΦR0 và ΦRLV ở mật số 10^8 PFU/mL có TLB là 2,5% thấp hơn khác biệt ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức xử lý còn lại và đối chứng với TLB trong khoảng 12,5-17,5%. Ở thời điểm 9 NSKLB, các nghiệm thức xử lý TKT ghi nhận TLB trong khoảng từ 30% đến 62,5%, thấp hơn và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức xử lý Starner 20 WP (85%) và đối chứng (100%), trong đó nghiệm thức xử lý TKT ΦBT67 ở 10^8 PFU/mL có TLB thấp nhất.

Thời điểm 12 NSKLB, các nghiệm thức đều gia tăng TLB lên cao từ 62,5% đến 100%. Nghiệm thức đối chứng và thuốc Starner ghi nhận TLB 100% cao nhất và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức có xử lý TKT ΦBT67 mật số 10^8 PFU/mL (62,5%), TKT ΦBT67 mật số 10^7 PFU/mL (87,5%), HH TKT ΦBT67, ΦR0, ΦRLV ở mật số 10^8 PFU/mL (82,5%), nhưng không khác biệt có ý nghĩa thống kê so với HH TKT mật số 10^7 PFU/mL

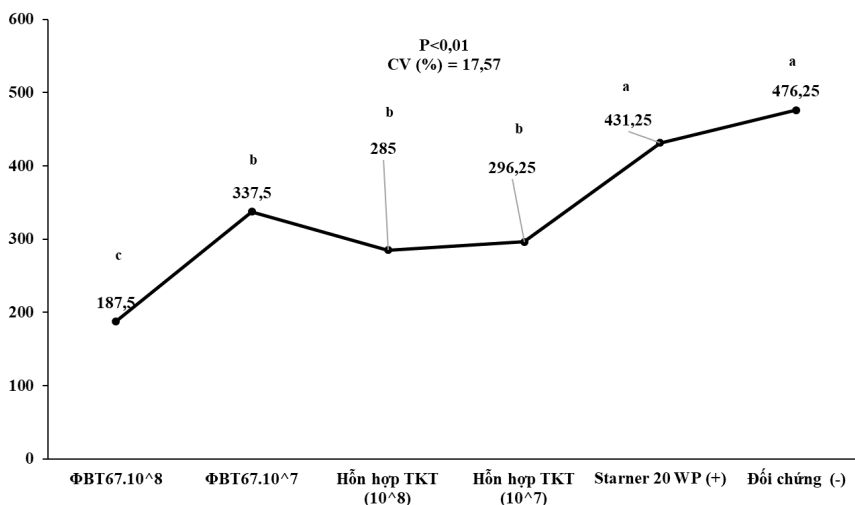
(90%). Qua đó, các nghiệm thức xử lý TKT ở mật số 10^8 PFU/mL ghi nhận khả năng giúp cây cà chua hạn chế sự xâm nhiễm của *R. solanacearum* trong điều kiện nhà lưới, nghiệm thức TKT đơn ΦBT67 mật số 10^8 PFU/mL cho thấy khả năng vượt trội hơn so với các nghiệm thức còn lại. Trong nghiên cứu của Fujiwara et al. (2011) ghi nhận rằng khi áp dụng các TKT đơn lẻ hoặc kết hợp với các TKT khác ở mật số $1,3.10^{10}$ PFU/chậu đã làm giảm mức độ nghiêm trọng của bệnh héo xanh trên cây cà chua.

Diện tích bên dưới đường cong tiến triển bệnh hay chỉ số tích lũy bệnh AUDPC (Hình 4) của các nghiệm thức có sự khác biệt, nghiệm thức TKT ΦBT67 mật số 10^8 PFU/mL có sự tích lũy bệnh qua các thời điểm khảo sát là (187,50) thấp hơn và khác biệt có ý nghĩa thống kê 1% so với các nghiệm thức còn lại, kể đến là nghiệm thức HH TKT mật số 10^8 PFU/mL (285,00), TKT ΦBT67 mật số 10^7 PFU/mL (337,50) và HH TKT mật số 10^7 PFU/mL (296,25) thấp hơn và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với thuốc Starner (431,25) và đối chứng (476,25). Sử dụng TKT đã làm giảm mức độ nhiễm bệnh héo xanh theo thời gian và điều này cũng được chứng minh trong nghiên cứu của Álvarez et al. (2019).



Hình 3. TLB héo xanh (%) do vi khuẩn *R. solanacearum* của các nghiệm thức trên cây cà chua trong điều kiện nhà lưới ở thời điểm 6, 9, 12 ngày sau khi lây bệnh

Ghi chú: Số liệu được chuyển sang $\sqrt{x}$ (6 NSKLB) và $\arcsin \sqrt{x \pm \frac{1}{4n}}$ (9 NSKLB, 12 NSKLB) trước khi phân tích thống kê. Các số trung bình trong cùng một cột theo sau bởi một hoặc nhiều chữ cái giống nhau thì không khác biệt ý nghĩa qua phép thử Duncan ở mức ý nghĩa 5%. $P < 0,01$: khác biệt ở mức ý nghĩa 1%, NSKLB: Ngày sau khi lây bệnh.



Hình 4. Chỉ số tích lũy bệnh AUDPC của bệnh héo xanh do vi khuẩn *R. solanacearum* trên cà chua của các nghiệm thức trong điều kiện nhà lưới

Ghi chú: Các số trung bình trong cùng một cột theo sau bởi một hoặc nhiều chữ cái giống nhau thì không khác biệt ý nghĩa qua phép thử Duncan ở mức ý nghĩa 5%. $P < 0,01$: khác biệt ở mức ý nghĩa 1%, NSKLB: Ngày sau khi lây bệnh.

Về trung bình cấp bệnh (Hình 5):

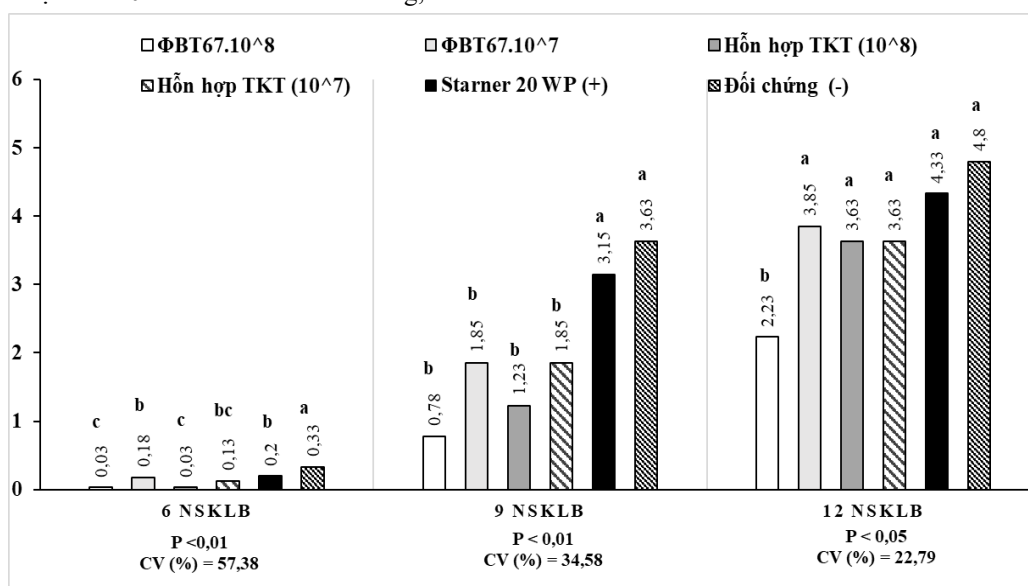
Trung bình cấp bệnh ở thời điểm 6 NSKLB, ghi nhận các nghiệm thức có trung bình cấp bệnh dao động từ 0,03 đến 0,33. Trong đó, trung bình cấp bệnh cao nhất là nghiệm thức đối chứng và thấp nhất là nghiệm thức TKT ΦBT67 và HH TKT ở mật số 10⁸ PFU/mL, điều này phù hợp với ghi nhận của

Balogh et al. (2009) cho rằng khi xử lý với mật số TKT càng cao thì mang lại hiệu quả kiểm soát bệnh tốt hơn. Kể đến là các nghiệm thức xử lý thuốc Staner, HH TKT mật số 10⁷ PFU/mL và TKT ΦBT67 mật số 10⁷ PFU/mL cũng cho thấy trung bình cấp bệnh thấp hơn và khác biệt có ý nghĩa so với đối chứng. Tại thời điểm 9 NSKLB, ở thời điểm này các nghiệm thức đối chứng và thuốc Staner có

trung bình cấp bệnh lần lượt là 3,63 và 3,15 cao hơn và khác biệt có ý nghĩa so với các nghiệm thức có xử lý thực khuẩn thể. Vào thời điểm 12 NSKLB, với áp lực mầm bệnh phát triển nhanh chóng, các nghiệm thức đều có sự gia tăng về trung bình cấp bệnh, trung bình cấp bệnh thấp nhất là nghiệm thức TKT đơn lẻ Φ BT67 mật số 10^8 PFU/mL thấp hơn và khác biệt ý nghĩa 5 % so với các nghiệm thức còn lại.

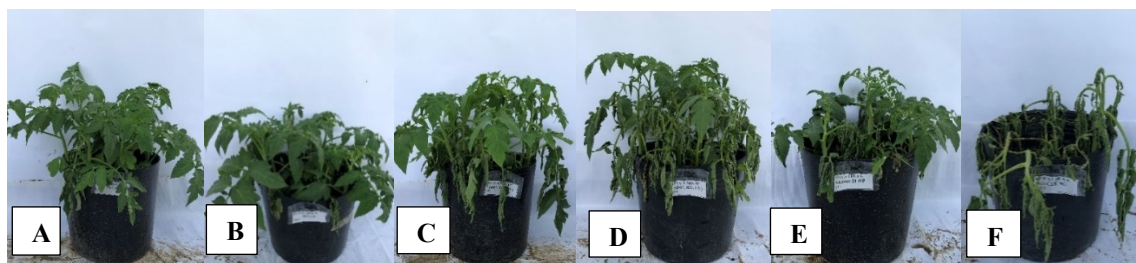
Tuy ở thời điểm 6 NSKLB và 9 NSKLB các nghiệm thức xử lý cho thấy hiệu quả giảm bệnh so với đối chứng nhưng ở thời điểm 12 NSKLB vi khuẩn phát triển nhanh và tấn công vào mạch của cây nên giữa các nghiệm thức xử lý đều không cho thấy sự khác biệt ngoại trừ nghiệm thức TKT đơn lẻ Φ BT67 mật số 10^8 PFU/mL. Nhìn chung, các

ng nghiệm thức xử lý TKT đều có hiệu quả giảm bệnh thông qua các chỉ số đánh giá như tỷ lệ bệnh, trung bình cấp bệnh và AUDPC so với đối chứng (Hình 6), nghiệm thức Starner 20 WP chưa mang lại hiệu quả khi sử dụng là do vi khuẩn đã xâm nhập vào mô cây và nhân mật số nên việc phòng trị kém hiệu quả. Các nghiệm thức xử lý TKT đơn lẻ và HH TKT ở mật số 10^8 PFU/mL cho hiệu quả phòng trị bệnh ổn định qua từng thời điểm ghi nhận. Kết quả này cho thấy rằng TKT có khả năng làm giảm sự phát triển của mầm bệnh héo xanh trên cây cà chua. Hiệu quả của dòng TKT Φ RSL1 xử lý đơn lẻ cao hơn hỗn hợp ba TKT Φ RSA1, Φ RSB1 và Φ RSL1 khi xử lý ngâm cây cà chua vào huyền phù TKT trước khi lây bệnh nhân tạo đã được ghi nhận trong nghiên cứu của Fujiwara et al. (2011).



Hình 5. Trung bình cấp bệnh héo xanh do vi khuẩn *R. solanacearum* của các nghiệm thức trên cây cà chua trong điều kiện nhà lưới ở thời điểm 6, 9, 12 ngày sau khi lây bệnh (NSKLB)

Ghi chú: Các số trung bình trong cùng một cột theo sau bởi một hoặc nhiều chữ cái giống nhau thì không khác biệt ý nghĩa qua phép thử Duncan ở mức ý nghĩa 5%. $P < 0,01$: khác biệt ở mức ý nghĩa 1%, $P < 0,05$: khác biệt ở mức ý nghĩa 5%, ns: không khác biệt, NSKLB: Ngày sau khi lây bệnh.



Hình 6. Biểu hiện bệnh héo xanh trên cây cà chua ở các nghiệm thức tại thời điểm 9 NSKLB

Ghi chú: A: TKT Φ BT67 (10^8 PFU/mL); B: TKT Φ BT67 (10^7 PFU/mL); C: Hỗn hợp TKT Φ BT67, Φ R0 Φ RLV (10^8 PFU/mL); D: Hỗn hợp TKT Φ BT67, Φ R0, Φ RLV (10^7 PFU/mL); E: Starner 20 WP; F: Đối chứng

Tuy nhiên, trong điều kiện canh tác tự nhiên nơi mà cây trồng có thể bị tấn công bởi nhiều dòng vi khuẩn cùng lúc hay các dòng vi khuẩn có tính kháng. Đối với các dòng TKT đơn lẻ thì việc sử dụng hỗn hợp TKT mang lại hiệu quả kiểm soát vi khuẩn bền vững hơn (Balogh et al., 2009).

4. KẾT LUẬN

Dựa trên kết quả sàng lọc hai mươi dòng TKT, ba dòng TKT tiềm năng ΦBT67, ΦR0 và ΦRLV đã được chọn, thể hiện khả năng nhân mật số và đường kính phân giải vượt trội trên hỗn hợp vi khuẩn *R. solanacearum* ở điều kiện phòng thí nghiệm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO (REFERENCES)

- Abedon, S. T., & Culler, R. R. (2007). Optimizing bacteriophage plaque fecundity. *Journal of theoretical biology*, 249(3), 582-592. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2007.08.006>
- Addy, H. S., Askora, A., Kawasaki, T., Fujie, M., & Yamada, T. (2012). Utilization of filamentous phage φRSM3 to control bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum*. *Plant disease*, 96(8), 1204-1209. <https://doi.org/10.1094/PDIS-2-11-1023-RE>
- Agrios, G. N. (2005). *Plant Pathology* (5th ed.). Elsevier, 647-649.
- Álvarez, B., López, M. M., & Biosca, E. G. (2019). Biocontrol of the major plant pathogen *Ralstonia solanacearum* in irrigation water and host plants by novel waterborne lytic bacteriophages. *Frontiers in Microbiology*, 10, 2813. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02813>
- Balogh, B., Jones, J. B., Iriarte, F. B., & Momol, M. T. (2010). Phage therapy for plant disease control. *Current pharmaceutical biotechnology*, 11(1), 48-57. <https://doi.org/10.2174/138920110790725302>
- Balogh, B., Momol, T., Obradovic, A., & Jones, J. (2009). Bacteriophages as agents for the control of plant pathogenic bacteria. *Disease Control in Crops: Biological and Environmentally Friendly Approaches*, 246-256. <https://doi.org/10.1002/9781444312157.ch13>
- Brown, D. G., & Allen, C. (2004). *Ralstonia solanacearum* genes induced during growth in tomato: an inside view of bacterial wilt. *Molecular microbiology*, 53(6), 1641-1660. <https://doi.org/10.1111/j.13652958.2004.04237.x>
- Dennehy, J. J., & Abedon, S. T. (2021). Phage infection and lysis. *Bacteriophages: biology, technology, therapy*, 341-383. https://doi.org/10.1007/978-3-319-41986-2_53
- Doan, T. K. T., Lu, C. T., Pham, V. L., & Nguyen, T. T. N. (2022). Efficacy of bacteriophages in controlling bacterial vascular wilt caused by *Ralstonia solanacearum* Smith on eggplants. *CTU Journal of Innovation and Sustainable Development*, 14(Special issue: CBA), 81-85. <https://doi.org/10.22144/ctu.jen.2022.032>
- Drulis-Kawa, Z., Majkowska-Skrobek, G., Maciejewska, B., Delattre, A. S., & Lavigne, R. (2012). Learning from bacteriophages-advantages and limitations of phage and phage-encoded protein applications. *Current Protein and Peptide Science*, 13(8), 699-722. <https://doi.org/10.2174/138920312804871193>
- Food and agriculture organization of the United Nations. (2022). *Crops and livestock products: Tomatoes production quantity in the world*. <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>
- Fujiwara, A., Fujisawa, M., Hamasaki, R., Kawasaki, T., Fujie, M., & Yamada, T. (2011). Biocontrol of *Ralstonia solanacearum* by treatment with lytic bacteriophages. *Applied and environmental microbiology*, 77(12), 4155-4162. <https://doi.org/10.1128/AEM.02847-10>
- Gallet, R., Kannoly, S., & Wang, I. N. (2011). Effects of bacteriophage traits on plaque formation. *BMC microbiology*, 11, 1-16. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-11-181>
- Genin, S. (2010). Molecular traits controlling host range and adaptation to plants in *Ralstonia solanacearum*. *New Phytologist*, 187(4), 920-928. <https://doi.org/10.1111/j.14698137.2010.03397.x>
- Hayward, A. C. (1991). Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annual review of phytopathology*, 29(1), 65-87. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.29.090191.000433>
- He, Y., Chen, Y., Zhang, Y., Qin, X., Wei, X., Zheng, D., Lin, W., Li, Q., & Yuan, G. (2021).

- Genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* species complex strains obtained from Guangxi, China and their pathogenicity on plants in the Cucurbitaceae family and other botanical families. *Plant Pathology*, 70(6), 1445-1454. <https://doi.org/10.1111/ppa.13389>
- Islam, T., Haque, M. A., Barai, H. R., Istiaq, A., & Kim, J. J. (2024). Antibiotic Resistance in Plant Pathogenic Bacteria: Recent Data and Environmental Impact of Unchecked Use and the Potential of Biocontrol Agents as an Eco-Friendly Alternative. *Plants*, 13(8), 1135. <https://doi.org/10.3390/plants13081135>
- Jones, J. B., Jackson, L. E., Balogh, B., Obradovic, A., Iriarte, F. B., & Momol, M. T. (2007). Bacteriophages for plant disease control. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 45(1), 245-262. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.45.062806.094411>
- Khokhani, D., Tran, T. M., Lowe-Power, T. M., & Allen, C. (2018). Plant assays for quantifying *Ralstonia solanacearum* virulence. *Bio-protocol*, 8(18), e3028-e3028. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.3028>
- King, E. O., Ward, M. K., & Raney, D. E. (1954). Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluoresein. *The Journal of laboratory and clinical medicine*, 44(2), 301-307. <https://doi.org/10.5555/uri:pii:002221435490222X>
- Loc-Carrillo, C., & Abedon, S. T. (2011). Pros and cons of phage therapy. *Bacteriophage*, 1(2), 111-114. <https://doi.org/10.4161/bact.1.2.14590>
- Maji, S., & Chakrabarty, P. K. (2014). Biocontrol of bacterial wilt of tomato caused by *Ralstonia solanacearum* by isolates of plant growth promoting rhizobacteria. *Australian Journal of Crop Science*, 8(2), 208-214. <https://doi.org/10.3316/informit.198693189132052>
- Mansfield, J., Genin, S., Magori, S., Citovsky, V., Sriariyanum, M., Ronald, P., Dow, M., Verdier, V., Beer, S. V., Machado, M. A., Toth, I., Salmond, G., & Foster, G. D. (2012). Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Molecular plant pathology*, 13(6), 614-629. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2012.00804.x>
- Mohammed, A. F., Oloyede, A. R., & Odeseye, A. O. (2020). Biological control of bacterial wilt of tomato caused by *Ralstonia solanacearum* using *Pseudomonas* species isolated from the rhizosphere of tomato plants. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 53(1-2), 1-16. <https://doi.org/10.1080/03235408.2020.1715756>
- Nga, N. T. T., Tran, T. N., Holtappels, D., Kim Ngan, N. L., Hao, N. P., Vallino, M., Tien, D. T. K., Khanh Pham, N. H., Lavigne, R., Kamei, K., Wagemans, J., & Jones, J. B. (2021). Phage biocontrol of bacterial leaf blight disease on welsh onion caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii*. *Antibiotics*, 10(5), 517. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10050517>
- Nion, Y. A., & Toyota, K. (2015). Recent trends in control methods for bacterial wilt diseases caused by *Ralstonia solanacearum*. *Microbes and environments*, 30(1), 1-11. <https://doi.org/10.1264/jisme2.ME14144>
- Peeters, N., Guidot, A., Vailleau, F., & Valls, M. (2013). *Ralstonia solanacearum*, a widespread bacterial plant pathogen in the post-genomic era. *Molecular plant pathology*, 14(7), 651-662. <https://doi.org/10.1111/mpp.12038>
- Poussier, S., Prior, P., Luisetti, J., Hayward, C., & Fegan, M. (2000). Partial sequencing of the hrpB and endoglucanase genes confirms and expands the known diversity within the *Ralstonia solanacearum* species complex. *Systematic and applied microbiology*, 23(4), 479-486. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(00\)80021-1](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(00)80021-1)
- Rivard, C. L., & Louws, F. J. (2008). Grafting to manage soilborne diseases in heirloom tomato production. *HortScience*, 43(7), 2104-2111. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.43.7.2104>
- Tran, T. B., & Vo, T. B. T., (2019). Chapter: Solanaceae. In Tran, T. B. & Vo, T. B. T, *Vegetable textbook* (pp.118-131). Can Tho University Publishing House (in Vietnamese).
- Wei, C., Liu, J., Maina, A. N., Mwaura, F. B., Yu, J., Yan, C., Zhang, R., & Wei, H. (2017). Developing a bacteriophage cocktail for biocontrol of potato bacterial wilt. *Virologica sinica*, 32, 476-484. <https://doi.org/10.1007/s12250-017-3987-6>
- Yamada, T. (2012). Bacteriophages of *Ralstonia solanacearum*: their diversity and utilization as biocontrol agents in agriculture. *Bacteriophages*, 113-139. <https://doi.org/10.5772/33983>
- Zheng, X. F., Zhu, Y. J., Liu, B., Zhou, Y., Che, J. M., & Lin, N. Q. (2014). Relationship between *Ralstonia solanacearum* diversity and severity of bacterial wilt disease in tomato fields in China. *Journal of Phytopathology*, 162(9), 607-616. <https://doi.org/10.1111/jph.12234>