



DOI:10.22144/ctujos.2025.029

XÁC ĐỊNH TÁC NHÂN GÂY BỆNH THỐI NHŨN TRÊN CẢI BỆ ĐÚN VÀ HIỆU QUẢ PHÒNG TRỪ BỆNH CỦA CHI *Bacillus* *IN VITRO*

Đoàn Thị Kiều Tiên, Trần Võ Anh Phong, Trần Thị Bích Trâm và Nguyễn Thị Thu Nga*

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

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

Thông tin chung (Article Information)

Nhận bài (Received): 19/07/2024

Sửa bài (Revised): 02/09/2024

Duyệt đăng (Accepted): 10/11/2024

Title: Identification of the causal agent soft rot of Chinese cabbage and the efficacy of *Bacillus* genus in controlling the diseases in vitro

Author(s): Doan Thi Kieu Tien, Tran Vo Anh Phong, Tran Thi Bich Tram and Nguyen Thi Thu Nga*

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

TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện nhằm xác định tác nhân gây bệnh thối nhũn trên cải bẹ đún và hiệu quả của chi *Bacillus* trong phòng trừ bệnh. Bảy chủng vi khuẩn thuộc chi *Pectobacterium* đã được xác định là tác nhân gây thối nhũn trên cải bẹ đún theo quy tắc Koch và phương pháp sinh hóa. Trong đó, chủng vi khuẩn với kí hiệu AG7 gây hại nặng nhất là do vi khuẩn *Pectobacterium carotovorum* thông qua giải trình tự gen 16S rDNA so sánh trên ngân hàng gen thế giới kết hợp kiểm tra khả năng sinh trưởng trên môi trường Tween 80. Hiệu quả ba chủng vi khuẩn *Bacillus* spp. trong phòng trị bệnh thối nhũn cải bẹ đún được xác định với ba biện pháp xử lí (trước khi nhiễm bệnh, sau khi nhiễm bệnh, kết hợp trước và sau khi nhiễm bệnh) trong điều kiện phòng thí nghiệm. Kết quả đã ghi nhận vi khuẩn *Bacillus* 41 có chiều dài vết bệnh thấp hơn nghiệm thức đối chứng. Ngoài ra, thời điểm xử lí vi khuẩn *Bacillus* 41 trước hoặc trước – sau khi nhiễm bệnh cho chiều dài vết bệnh thấp hơn biện pháp xử lí sau khi nhiễm bệnh.

Từ khóa: *Bacillus*, cải bẹ đún, *Pectobacterium carotovorum*, plant growth promoting rhizobacteria

ABSTRACT

The study was conducted to identify the causal agent of soft rot disease in Chinese cabbage and the efficacy of *Bacillus* genus in controlling the disease. Seven strains of the *Pectobacterium* genus gave the symptom of soft rot belonging to Koch's postulate and biochemical method. In which, the bacteria with the code of AG7 gave the best pathogenicity and identified the species of *Pectobacterium carotovorum* by 16SrRNA gen sequencing compared to National Center for Biotechnology Information combined with tested the ability growth on the Tween 80. Evaluation of the efficacy of three *Bacillus* spp. strains in controlling the soft rot on Chinese cabbage with three applications (before infection, after infection, combined before and after infection) in vitro. The result showed that *Bacillus* 41 gave lower in the infected lesion length than the control untreated. Furthermore, the timing application of *Bacillus* 41 before infection or combined before and after infection expressed lower in the infected lesion length than after infection method.

Keywords: *Bacillus*, Chinese cabbage, *Pectobacterium carotovorum*, plant growth promoting rhizobacteria

1. GIỚI THIỆU

Pectobacterium và *Dickeya* là hai chi vi khuẩn gây triệu chứng thối nhũn trên nhiều loại cây trồng bao gồm rau màu và cây ăn trái trong suốt giai đoạn sinh trưởng, vận chuyển, tồn trữ và sau thu hoạch (Mansfield et al., 2012). Đây được xem là một trong những nguyên nhân gây ảnh hưởng nặng nề nhất quan trọng nhất đối với cây họ cải ở vùng nhiệt đới và cận nhiệt đới, trong đó có Việt Nam (Pérombelon et al., 1980, Mansfield et al., 2012). Tại Việt Nam, diện tích trồng cây họ cải khoảng 38.740 ha với sản lượng thu được đạt 1.174.614 tấn (Faostat, 2022). Bệnh thối nhũn xuất hiện đặc biệt nghiêm trọng vào mùa mưa và rất khó quản lý (Agrios, 2005). Theo Nguyen và Pham (2007), các biện pháp xử lý bệnh tại Việt Nam như: bón vôi và phun ngừa các loại thuốc gốc đồng, Kasuran, Cuprimicin, Starner gây ảnh hưởng xấu đến môi trường. Chính vì vậy, một trong những giải pháp nhằm thay thế hay giảm dần thuốc hóa học trong quản lý dịch hại là kiểm soát sinh học (Tariq et al., 2020). Ngày nay, vi khuẩn vùng rễ phòng trừ bệnh cây được sử dụng như một trong các công cụ tiềm năng trong phòng trừ bệnh cây do vi khuẩn và nấm gây ra (El-saadony et al., 2022). Việc phòng trừ sinh học bệnh thối nhũn trên cải đã được ghi nhận trong các nghiên cứu của Togashi et al. (2000), Guerra et al. (2014), Sang et al. (2015), Cui et al. (2019). Trên cơ sở đó, nghiên cứu được thực hiện nhằm mục tiêu xác định tác nhân gây bệnh thối nhũn trên cải bẹ dún thuộc chi vi khuẩn *Pectobacterium* hay *Dickeya*. Bên cạnh đó, việc sử dụng chủng *Bacillus* trong phòng trừ bệnh được thực hiện là bước đầu nhằm góp phần vào biện pháp quản lý thân thiện với môi trường.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Xác định tác nhân gây bệnh thối nhũn trên cải bẹ dún

2.1.1. Phân lập vi khuẩn gây bệnh

Mẫu cải bị thối nhũn được thu tại Vĩnh Long, Sóc Trăng, An Giang với những triệu chứng điển hình và mùi đặc trưng. Mẫu bệnh được phân lập theo phương pháp của Burgess và ctv., (2009). Các đồng phân lập được sàng lọc qua kiểm tra phản ứng siêu nhạy cảm nhằm chọn lọc ra vi khuẩn gây bệnh: Các dòng vi khuẩn riêng lẻ được nuôi cấy trên môi trường King's B sau 48 giờ. Huyền phù vi khuẩn được pha với nước cất vô trùng vào ống Falcon, sau đó huyền phù vi khuẩn được tiêm vào mô ở mặt dưới lá ớt. Mỗi chủng vi khuẩn được tiêm vào mỗi lá riêng biệt, được tiến hành ghi nhận và theo dõi trong 1-2 ngày tiếp theo (Agrios, 2005).

Chủng bệnh nhân tạo được thực hiện theo quy tắc Kock nhằm kiểm chứng khả năng gây bệnh của vi khuẩn gồm bốn bước: (i) Mô tả triệu chứng bệnh, quan sát sự hiện diện của vi sinh vật, (ii) Phân lập mẫu bệnh và làm thuần, (iii) Lây bệnh trở lại mẫu sống sạch bệnh, (iv) Khảo sát triệu chứng bệnh xuất hiện và so sánh với triệu chứng ban đầu, (v) Tái phân lập mẫu bệnh và so sánh với mẫu bệnh ban đầu.

2.1.2. Khảo sát đặc tính sinh hóa của các chủng vi khuẩn gây thối nhũn cải bẹ dún

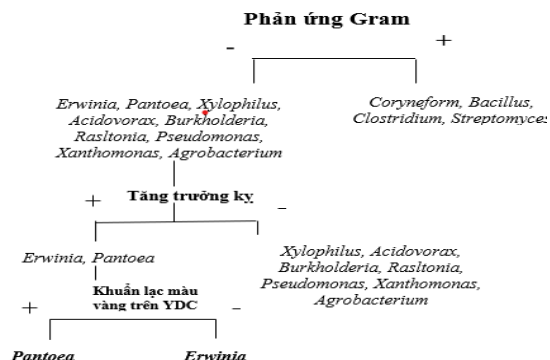
Vi khuẩn gây bệnh thực vật thuộc một số chi chủ yếu, các chi vi khuẩn tương đối dễ phân biệt với nhau dựa trên các đặc điểm được trình bày trong sơ đồ (Hình 1).

Việc nhuộm Gram được thực hiện theo Schaad et al., (2001) liên quan đến các đặc tính cấu trúc và hóa học của thành tế bào, đặc điểm này đóng vai trò quan trọng trong việc xác định ban đầu của các vi khuẩn gây bệnh thực vật chưa biết. Vi khuẩn được nuôi cấy trên môi trường King's B trong 48 giờ, sau đó cho một vòng loop vi khuẩn hòa vào dung dịch KOH 3%. Nếu vi khuẩn tạo nhớt trong dung dịch KOH 3% thì thuộc vi khuẩn Gram âm, ngược lại thuộc vi khuẩn Gram dương.

Thử nghiệm kỵ khí là một thử nghiệm quan trọng để phân biệt các chi *Erwinia*, *Pantoea* và *Clostridium*. Vi khuẩn được nuôi cấy trên môi trường King's B sau 48 giờ được cấy vào 2 ống nghiệm môi trường Hugh và Leifson (2g/L Peptone, 5g/L NaCl, 0,3g/L KH₂PO₄, 3 g/L agar, 0,03g/L Bromthymol blue, 10g/L Glucose, pH 7,1). Sau đó, một ống nghiệm chứa môi trường được chọn để phủ lên bề mặt một lớp parafin tan chảy (chiều sâu parafin khoảng 5 mm) tạo điều kiện yếm khí và ống nghiệm còn lại không được phủ parafin tạo điều kiện hiếu khí. Ống nghiệm đối chứng là ống nghiệm được cấy vi khuẩn *Xanthomonas* sp.. Các ống nghiệm được đặt ở nhiệt độ phòng và tiến hành quan sát kết quả thông qua sự đổi màu của chất chỉ thị màu bromthymol blue trong 1 - 2 ngày tiếp theo. Vi khuẩn có khả năng sống yếm khí sẽ làm đổi màu ở ống nghiệm bromthymol blue từ màu xanh chuyển sang màu vàng ở các ống nghiệm có phủ parafim và không phủ parafim.

Khả năng sinh trưởng trên môi trường Yeast extract – dextrose – CaCO₃ (YDC) được khảo sát Bảy chủng vi khuẩn gây bệnh được cấy vạch trên môi trường YDC (10 g/L Yeast extract, 20 g/L glucose, 20g/L CaCO₃, 20g/L agar, pH 7,0) và đối chứng dương là vi khuẩn *Xanthomonas* sp., tất cả các đĩa cấy được đặt trong điều kiện nhiệt độ phòng, được

quan sát và ghi nhận kết quả sau 24 – 48 giờ. Vi khuẩn phản ứng dương tính với môi trường sẽ phát triển và tạo khuẩn lạc màu vàng và ngược lại, phản ứng âm tính sẽ tạo khuẩn lạc màu vàng hoặc không phát triển.



Hình 1. Sơ đồ xác định một loài hoặc tác nhân gây bệnh cụ thể (Schaad et al., 2001)

2.1.3. Đánh giá khả năng gây hại của bảy chủng vi khuẩn phân lập trên cải bẹ dún

Thí nghiệm được bố trí theo thể thức hoàn toàn ngẫu nhiên một nhân tố với 7 nghiệm thức (tương ứng 7 chủng vi khuẩn phân lập), 4 lần lặp lại.

Lá cải bẹ dún được chọn phải tương đồng với nhau về độ tuổi, kích thước, màu sắc. Sau đó, lá cải bẹ được rửa sạch, để ráo và khử trùng bề mặt bằng cồn 70%. Vi khuẩn từng chủng riêng lẻ được nuôi trên môi trường King's B sau 48 giờ, hòa nước cất vô trùng thu được huyền phù vi khuẩn (OD_{600nm} 0,3); 10 ml nước cất vô trùng được hút vào đĩa Petri có chứa giấy thấm để giữ ẩm và đặt lá cải bẹ dún vào đĩa, mỗi lá vào một đĩa, mỗi đĩa là một lần lặp lại, tạo vết thương (bó kim gồm 10 cây kim) vào trung tâm gân chính của lá để tạo vết thương, nhỏ 10 µl huyền phù vi khuẩn lên vị trí gân lá, đặt đĩa Petri trong điều kiện 25°C, quan sát và ghi nhận kết quả trong 1-2 ngày tiếp theo.

Chỉ tiêu ghi nhận: đo chiều dài vết bệnh (cm) vào thời điểm 24 giờ và 48 giờ sau khi chủng bệnh.

2.2. Định danh vi khuẩn gây bệnh thối nhũn cải bẹ dún bằng kỹ thuật sinh học phân tử

DNA được ly trích theo phương pháp đun sôi tế bào vi khuẩn của Junior et al. (2016), vi khuẩn được nuôi trên môi trường King's B trong 48 giờ, sau đó hòa 400 µl TE buffer 1X (Tris base: 242 g Glacial acetic acid: 57,1 ml; 0,5 M EDTA (pH 8,0): 100 ml; nước cất: 1000 ml) thu được huyền phù vi khuẩn.

Ống eppendorf được thả vào bể nước sôi và đun trong 20 phút, chuyển ống Eppendorf vào nước đá trong 5 phút. Tiếp theo ly tâm 13.000 vòng/phút trong 5 phút, rút 150 µl phần trong ở trên và trữ 4°C để thực hiện các thao tác tiếp theo.

– Phản ứng PCR dựa trên cặp mồi phổ thông 27F/1492R (Lane, 1991) (27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTC-3', 1492R: 5'-TACCGGTTACCTTGTACGACT-3'). Thể tích phản ứng được sử dụng là 50 µl (Protocol PHUSA MASTER MIX), bao gồm: Phusa master mix 2X 25 µl, DNA mẫu 10 µl, mồi F (27F) 2 µl, mồi R (1492R) 2 µl, nước PCR (Phusa PCR buffer 10X) 11 µl. Phản ứng PCR được thực hiện theo quy trình nhiệt như sau: Khởi đầu biến tính ở 94°C trong 4 phút, tiếp theo là 35 chu trình gồm 3 bước là 94°C biến tính trong 45 giây (biến tính), 55°C trong 45 giây (bắt cặp), 72°C trong 90 giây (bắt cặp), cuối cùng là 72°C trong 10 phút và giữ ở 4°C.

– Sản phẩm PCR được nhuộm với Loading dye Blue, điện di trên gel agarose 1,5 % trong TAE buffer 1X chạy trên thiết bị điện di ở hiệu điện thế 50V trong 90 phút. Gel được ngâm trong Ethidium bromide với thời gian 30 phút và được tiến hành chụp hình gel dưới đèn UV ở bước sóng 302 nm.

– Giải trình tự và phân tích trình tự: Sản phẩm PCR được gửi giải trình tự tại Công ty First BASE Laboratoire. Trình tự được so sánh với trình tự trong cơ sở dữ liệu đã được công bố nhờ công cụ tìm kiếm BLAST tại NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Sau đó vẽ cây phả hệ bằng phần mềm MEGA 11, chọn bootstrap a neighbor-joining.

Khả năng sinh trưởng của vi khuẩn trên môi trường Tween 80 ở 37°C được tiến hành kiểm tra. Phân biệt hai loài vi khuẩn *Pectobacterium carotovorum* và *Pectobacterium parmentieri* sau kết quả phân tích trình tự trên NCBI.

Bốn ml môi trường Tween 80 lỏng được cho vào ống nghiệm vô trùng. Vi khuẩn được nuôi cấy trên môi trường King's B sau 48 giờ và được cấy vào ống nghiệm chứa môi trường Tween 80, ống nghiệm đối chứng được cấy vi khuẩn *Xanthomonas* sp. là vi khuẩn có khả năng dụng nguồn dinh dưỡng Tween 80 (Goszczyńska et al., 1998), sau đó đặt tất cả ống nghiệm vào máy lắc ngang ở 37°C. Sự phát triển của vi khuẩn được ghi nhận ở thời điểm 1 và 2 ngày tiếp theo. Kết quả môi trường trong ống nghiệm chuyển từ không màu sang màu trắng đục chứng tỏ vi khuẩn có sử dụng Tween 80 làm nguồn cacbon duy nhất để phát triển, ngược lại môi trường vẫn ở trạng thái

không màu chứng tỏ vi khuẩn không có khả năng sử dụng Tween 80 để phát triển.

2.3. Đánh giá hiệu quả phòng trị bệnh thối nhũn trên cải bẹ dún ở các biện pháp xử lý vi khuẩn *Bacillus* spp. trong điều kiện phòng thí nghiệm

Vật liệu: Ba chủng vi khuẩn vùng rễ thuộc chi *Bacillus* với kí hiệu *Bacillus* 41, *Bacillus* 42, *Bacillus* 150 được phân lập tại các vùng đất trồng cải bẹ dún, có khả năng đối kháng vi khuẩn *Pectobacterium carotovorum* với bán kính vòng vô khuẩn lần lượt là 6,7 mm, 5,4 mm và 6,0 mm (6 ngày sau khi cấy, được cung cấp bởi Khoa Bảo vệ Thực vật).

Phương pháp: Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên 2 nhân tố với 4 lần lặp lại, bao gồm:

- Nhân tố 1: starter 20WP, *Bacillus* 41, *Bacillus* 42, *Bacillus* 150, hỗn hợp vi khuẩn (*Bacillus* 41, *Bacillus* 42, *Bacillus* 150), đối chứng;
- Nhân tố 2 là thời điểm xử lý vi khuẩn vùng rễ: Vi khuẩn vùng rễ được xử lý trước khi chùng bệnh 12 giờ, sau khi chùng bệnh 12 giờ và trước 12 giờ và sau khi chùng bệnh 12 giờ.

Cách thực hiện: Các dòng vi khuẩn *Pectobacterium carotovorum* và vi khuẩn vùng rễ được nuôi cấy trong môi trường King's B lỏng trong 24 giờ. Mật số vi khuẩn được xác định bằng phương pháp pha loãng và nhỏ giọt (đạt mật số 10^7 cfu/ml).

Lá cải bẹ dún được chuẩn bị và được lao sạch bằng cồn đặt trong đĩa Petri có lót giấy thấm và 10 ml nước cất vô trùng. Trung tâm gân chính của lá được tạo vết thương (bó kim gồm 10 cây kim)

Sau đó, 10 µl huyền phù vi khuẩn gây bệnh và 10 µl vi khuẩn vùng rễ được nhỏ lên vùng được châm kim trên gân lá theo các nghiệm thức và biện pháp xử lý. Đĩa Petri được đặt trong điều kiện phòng.

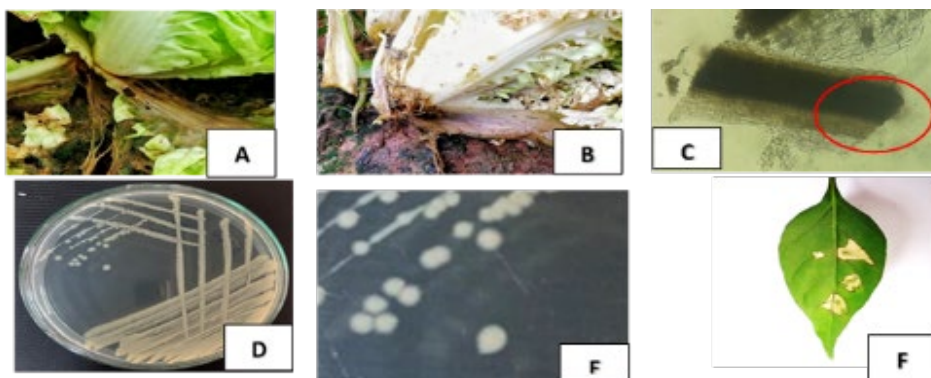
Ghi nhận chỉ tiêu: Chiều dài vết bệnh qua các thời điểm 12 giờ, 24 giờ sau khi chùng bệnh.

Xử lý số liệu: Bảng Excel và phân tích thống kê bằng phần mềm MSTATC qua phép thử Duncan ở mức ý nghĩa 5%.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả xác định tác nhân gây bệnh thối nhũn trên cải bẹ dún

Mẫu bệnh được thu về đều có triệu chứng điển hình như lá bị úng, mô ở phần thân và phần gốc rễ có màu nâu sậm, ngâm nước và mùi thối đặc trưng. Những mẫu bệnh nặng hơn có tình trạng thối và nhũn nước, mùi khó chịu đặc trưng (Hình 2A, B). Mẫu bệnh thu về được tiến hành kiểm tra nhanh sự hiện diện của vi khuẩn thể hiện qua sự tuôn dòng vi khuẩn dưới kính hiển vi (Hình 2C). Vi khuẩn trên môi trường thạch dinh dưỡng King's B 2% được nuôi cấy và làm thuần sau 48 giờ, kết quả ghi nhận cả 7 chủng vi khuẩn có khuẩn lạc dạng tròn trơn láng có màu trắng xám hơi đục (Hình 2 D, E).



Hình 2. Triệu chứng và đặc điểm hình thái khuẩn lạc vi khuẩn gây thối nhũn trên cải bẹ dún

Ghi chú: (A, B) Triệu chứng thối nhũn; (C) dòng tuôn vi khuẩn từ mô bệnh dưới kính hiển vi quang học ở vật kính 10X; (D, E) Đặc điểm khuẩn lạc nuôi trên môi trường King's B sau 48 giờ; (F) tạo phản ứng siêu nhạy cảm hoại tử mô trên cây ớt vào thời điểm 48 giờ sau khi tiêm

Bảng 1. Kết quả phân lập vi khuẩn gây thối nhũn trên cải bẹ dún ở các tỉnh ĐBSCL

STT	Mã vi khuẩn	Phản ứng siêu nhạy cảm	Địa điểm
1	VL1	+	xã Thành Đông, huyện Bình Tân, tỉnh Vĩnh Long
2	VL2	+	xã Tân Quới, huyện Bình Tân, tỉnh Vĩnh Long
3	VL3	+	xã Tân Quới, huyện Bình Tân, tỉnh Vĩnh Long
4	AG4	+	xã Khánh Hòa, huyện Châu Phú, tỉnh An Giang
5	ST5	+	xã Đại Tâm, huyện Mỹ Xuyên, tỉnh Sóc Trăng
6	ST6	+	xã Đại Tâm, huyện Mỹ Xuyên, tỉnh Sóc Trăng
7	AG7	+	xã Kiến An, huyện Chợ Mới, tỉnh An Giang

Ghi chú: + tạo phản ứng siêu nhạy cảm

Phản ứng siêu nhạy cảm trên cây ớt được thực hiện nhằm loại bỏ vi khuẩn hoại sinh bởi vì phản ứng siêu nhạy cảm là dạng kháng bệnh chủ động của cây trồng chống lại mầm bệnh. Phản ứng này được ghi nhận trên mầm bệnh độc khi chúng tấn công trên cây trồng không là ký chủ và được ứng dụng để kiểm tra đặc tính gây bệnh hay hoại sinh của dòng vi khuẩn được phân lập (Janse, 2005). Dễ dàng nhận thấy khi một trong những biểu hiện của cây sau khi thực hiện phản ứng siêu nhạy cảm là sự xuất hiện của những mô bị hoại tử tại vị trí tiêm do tế bào bị mầm bệnh xâm nhiễm chết nhanh chóng nhằm cản trở sự phát triển của mầm bệnh (Agrios, 2005). Ngược lại, vi khuẩn được tiêm vào lá là vi khuẩn không gây bệnh hoặc vi khuẩn hoại sinh thì sau vài ngày lá sẽ hơi vàng hoặc không xảy ra một hiện tượng nào (Janse, 2005). Kết quả thu được sau 48 giờ thực hiện, ở vùng tiêm xuất hiện những mô bị hoại tử chứng tỏ vi khuẩn tiêm vào là vi khuẩn gây bệnh (Hình 2F). Những dòng vi khuẩn này được giữ lại và thực hiện chủng bệnh nhân tạo dựa và quy trình Koch để kiểm chứng khả năng gây bệnh.

Tiếp tục, tất cả 7 chủng vi khuẩn trên mô lá cải bẹ dún được lấy bệnh nhân tạo và được ghi nhận kết quả sau 24 giờ chủng bệnh. Tại vùng mô được chủng vi khuẩn xuất hiện vết bệnh có màu nâu ngâm nước, tế bào mô trở nên mềm và có mùi thối đặc trưng (Hình 3A). Vi khuẩn được tái phân lập từ vết bệnh có đặc điểm hình thái và màu sắc tương tự như ban đầu (Hình 3B), điều này chứng tỏ vi khuẩn phân lập là vi khuẩn gây bệnh thối nhũn.

3.2. Kết quả kiểm tra các phản ứng sinh hóa của các chủng vi khuẩn gây bệnh thối nhũn trên cải dún

Cả bảy chủng vi khuẩn tiếp xúc với dung dịch KOH 3% cho hiện tượng tạo keo nhớt và kéo sợi (Hình 4A). Theo Halebian (1981), thử nghiệm KOH dựa trên sự khác biệt về hóa học của thành tế bào vi khuẩn, vi khuẩn Gram âm có thành tế bào dễ phá vỡ

khi tiếp xúc với dung dịch kiềm loãng, khi thành tế bào bị phá vỡ, vi khuẩn tiếp xúc với KOH 3% trở nên nhớt do giải phóng các sợi axit deoxyribonucleic không phân mảnh. Từ đó, kết luận cả 7 chủng vi khuẩn này thuộc nhóm vi khuẩn Gram âm. Theo Schaad et al. (2001), 7 chi vi khuẩn gây thối nhũn sẽ là một trong các chi vi khuẩn Gram âm là: *Erwinia*, *Pantoea*, *Xylophilus*, *Xanthomonas*, *Pseudomonas*, *Acidovorax*, *Ralstonia*.

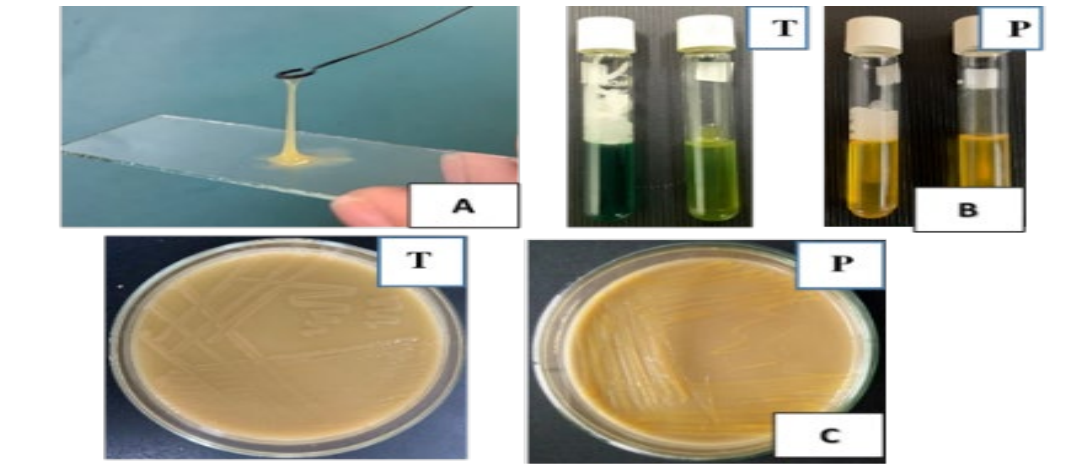
Khả năng phân hủy và oxy hóa carbohydrat được tiến hành kiểm tra (Hanson, 2008), kết quả ghi nhận tất cả các ống nghiệm của 7 dòng vi khuẩn gây bệnh ở điều kiện có và không phủ parafin đều chuyển màu môi trường từ xanh sang màu vàng (Hình 4B, T). Tuy nhiên, ống nghiệm nuôi cấy *Xanthomonas* sp. chỉ có sự thay đổi màu từ xanh sang vàng ở ống nghiệm không phủ parafin (có oxy) (Hình 4B, P). Do trong quá trình sinh trưởng và phát triển vi khuẩn sử dụng glucose cho quá trình biểndưỡng tạo nên acid làm cho pH của môi trường chuyển từ tính kiềm (pH= 7) sang tính acid, làm cho chất chỉ thị màu bromothymol blue chuyển từ màu xanh sang màu vàng, vi khuẩn *Xanthomonas* sp. thuộc nhóm hiếu khí chỉ sống được trên môi trường có oxy (Hanson, 2008). Do đó, trong điều kiện yếm khí, chúng không thể phát triển nên không làm thay đổi pH của môi trường. Điều này cho thấy vi khuẩn gây bệnh được phân lập là vi khuẩn kỵ khí.

Để kiểm tra vi khuẩn gây bệnh được phân lập thuộc chi *Pectobacterium* (*Erwinia*) hay chi *Pantoea* ta cần tiến hành khảo sát khả năng sinh trưởng trên môi trường YDC. Kết quả cho thấy tất cả các đĩa môi trường YDC cấy vi khuẩn của 7 dòng gây đều tạo khuẩn lạc màu trắng xám (Hình 4C), ở đĩa cấy vi khuẩn *Xanthomonas* sp. tạo khuẩn lạc màu vàng (Hình 4D) điều này tương tự với sự sinh trưởng và phát triển của chi *Pantoea* trên môi trường YDC (Schaad et al., 2001). Tóm lại, 7 chủng vi khuẩn gây bệnh được phân lập là vi khuẩn thuộc chi *Pectobacterium* (hay *Erwinia*).

Bảng 2. Tổng hợp các phản ứng sinh hóa của 7 chi vi khuẩn gây bệnh thối nhũn cải bẹ dún

STT	Mã vi khuẩn	Gram	O/F	Môi trường YDC
1	VL1	-	+	Khuẩn lạc trắng
2	VL2	-	+	Khuẩn lạc trắng
3	VL3	-	+	Khuẩn lạc trắng
4	AG4	-	+	Khuẩn lạc trắng
5	ST5	-	+	Khuẩn lạc trắng
6	ST6	-	+	Khuẩn lạc trắng
7	AG7	-	+	Khuẩn lạc trắng

Ghi chú: Gram (-): âm; +: có phản ứng dương tính; O/F: phản ứng hiếu khí và kỵ khí



Hình 4. Phản ứng sinh hóa của 7 chủng vi khuẩn gây bệnh thối nhũn cải

(A) Tạo sợi chỉ trong KOH 3%; (B) Vi khuẩn trong môi trường Hugh và Leifson trong điều kiện hiếu khí và yếm khí; (C) Khuẩn lạc của vi khuẩn trên môi trường YDC; (T) Vi khuẩn *Xanthomonas*; (P) Vi khuẩn phân lập; (T) Vi khuẩn gây bệnh thối nhũn trên cải (khuẩn lạc màu trắng đục); (B) Vi khuẩn *Xanthomonas* sp. (khuẩn lạc màu vàng)

3.3. Kết quả đánh giá khả năng gây bệnh thối nhũn cải bẹ dún của các chủng vi khuẩn *Pectobacterium* sp.

Qua kết quả tại Bảng 3, các chủng vi khuẩn đều thể hiện khả năng gây hại và phát triển nhanh chóng qua các thời điểm. Ở 24 giờ sau chủng bệnh (GSCB), chủng vi khuẩn AG7 cho kết quả chiều dài vết bệnh là 2,07 cm cao hơn và khác biệt ý nghĩa thống kê so với 2 chủng VL1 và ST6 với chiều dài vết bệnh lần lượt là 1,03 cm và 1,37 cm. Tuy nhiên, không khác biệt ý nghĩa so với VL2, VL3, AG4, và ST5. Vào thời điểm 24 GSCB, diện tích gây bệnh tăng nhanh chóng và tương tự như ở 24 GSCB, chủng vi khuẩn AG7 có chiều dài vết bệnh là 7,17 cm, không khác biệt ý nghĩa so với VL2 và ST5 lần lượt là 5,8 cm và 5,93 cm. Tuy nhiên, chiều dài vết bệnh của chủng vi khuẩn AG7 có chiều dài vết bệnh cao hơn chủng vi khuẩn VL1, VL3 và ST6.

Kết quả thí nghiệm đánh giá khả năng gây bệnh cho thấy các chủng vi khuẩn được thu thập ở các

tỉnh khác nhau có tốc độ và khả năng gây bệnh khác nhau. Kết quả tương tự cũng được ghi nhận bởi Phạm (2009) đã đánh giá khả năng gây hại của các chủng vi khuẩn *Erwinia carotovora* phân lập trên bắp cải ở các tỉnh Vĩnh Long, Cần Thơ, Sóc Trăng. Trong đó chủng vi khuẩn *Erwinia carotovora* được phân lập tại huyện Bình Tân – tỉnh Vĩnh Long gây hại mạnh nhất. Từ đó, cho thấy khả năng gây bệnh có thể liên quan đến bản chất từng dòng vi khuẩn ở các vùng địa lý khác nhau do liên quan đến độc tính từng dòng. Vì vậy, kết quả thí nghiệm này cho thấy ở các vùng địa lý khác nhau các chủng vi khuẩn thể hiện khả năng gây bệnh nặng nhẹ khác nhau. Chủng vi khuẩn AG7 được thu thập tại xã Kiến An, huyện Chợ Mới, tỉnh An Giang cho kết quả gây bệnh cao và ổn định trên mô cải bẹ dún qua các thời điểm, do đó chủng vi khuẩn AG7 được chọn để phục vụ định danh đến loài và là nguồn vật liệu cho phòng trừ sinh học cho các thí nghiệm tiếp theo.

Bảng 3. Chiều dài vết bệnh trên lá cải dún của các chủng vi khuẩn *Pectobacterium* sp.

Nghiệm thức	Chiều dài vết bệnh (cm)	
	24 GSCB	48 GSCB
VL1	1,03c	3,57c
VL2	1,50abc	5,80ab
VL3	1,57abc	5,00bc
AG4	1,87ab	4,70bc
ST5	1,70ab	5,93ab
ST6	1,37bc	4,73bc
AG7	2,07a	7,17a
Mức ý nghĩa	*	*
CV (%)	19,89	15,68

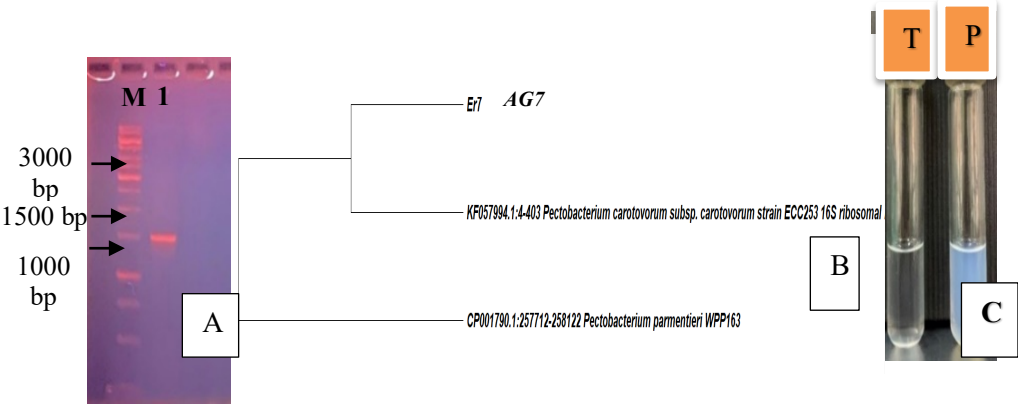
Trong cùng một cột, những số có chữ theo sau khác nhau thì có khác biệt ý nghĩa thống kê ở mức 5% (*). GSCB: Ngày sau chủng bệnh.

3.4. Kết quả định danh vi khuẩn bằng phương pháp sinh học phân tử

Kết quả sản phẩm PCR sau khi khuếch đại bởi cặp mồi 27F/1492R cho trọng lượng phân tử khoảng 1.500 bp (Hình 5A). Trình tự DNA được so sánh trên NCBI bằng công cụ tìm kiếm BLAST, cho mức độ tương đồng với: *Pectobacterium carotovorum* là 98,75%, *Pectobacterium parmentieri* là 98,25%, *Pantoea* sp. là 98,25%. Phân biệt chi *Pectobacterium* và *Pantoea* đã ghi nhận cả 7 chủng vi khuẩn có khuẩn lạc màu trắng trên môi trường YDC, vì vậy cả 7 chủng vi khuẩn thuộc chi *Pectobacterium*. Tuy nhiên, theo kết quả mức độ tương đồng sau khi so sánh trình tự gen với cơ sở dữ liệu ngân hàng gen thế giới, nhận thấy chủng vi khuẩn gây bệnh thối nhũn với kí hiệu AG7 tương

đồng cao với 2 loài *Pectobacterium carotovorum* và *Pectobacterium parmentieri*.

Do đó, dựa vào phản ứng sinh hóa của Nabhan et al. (2013) để phân biệt các loài thuộc chi *Pectobacterium*, thí nghiệm kiểm tra khả năng sinh trưởng trên môi trường Tween 80 ở 37°C đã thực hiện. Kết quả ghi nhận ở ống nghiệm chứa vi khuẩn AG7 không có sự thay đổi màu môi trường, chứng tỏ vi khuẩn không sinh trưởng và phát triển trên môi trường Tween 80 lỏng ở 37°C sau 48 giờ (Hình 6C, T). Ngược lại, ở ống nghiệm đối chứng chứa vi khuẩn *Xanthomonas* sp. màu môi trường chuyển từ không màu sang trắng đục chứng tỏ vi khuẩn có sử dụng Tween 80 làm nguồn cacbon duy nhất để phát triển (Hình 6C, P). Vì vậy, chủng vi khuẩn gây bệnh thối nhũn trên cải bẹ dún với đại diện dòng AG7 là *Pectobacterium carotovorum*.

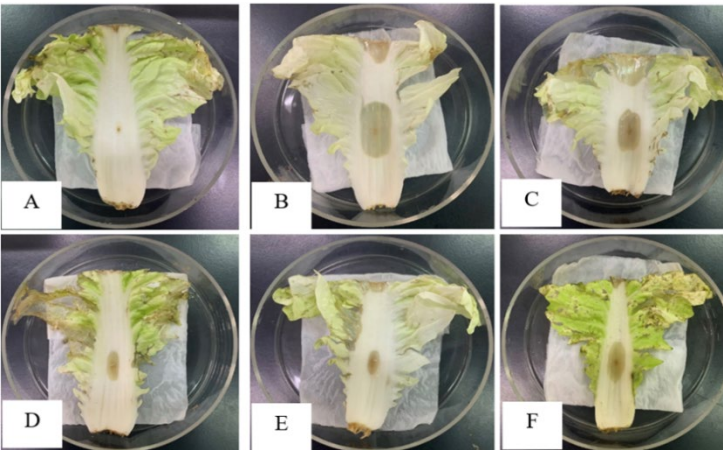


Hình 5. (A) Kết quả điện di sản phẩm PCR chủng vi khuẩn AG7 sử dụng cặp mồi 27F/1492R

M: thang chuẩn 1 kb (Thermo Scientific); **Giếng 1:** vi khuẩn AG7

(B) Cây phả hệ so sánh sự tương đồng đoạn 16S của chủng vi khuẩn *Pectobacteria* AG7 với chủng *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* và *Pectobacterium parmentieri* trên NCBI; (C) Khả năng sinh trưởng của vi khuẩn trên môi trường Tween 80 lỏng ở thời điểm 48 giờ

Ống nghiệm A: vi khuẩn AG7; Ống nghiệm B: vi khuẩn *Xanthomonas* sp.



Hình 6. Mức độ nhiễm bệnh thối nhũn do vi khuẩn *Pectobacterium carotovorum* trên lá cải vào thời điểm 24 giờ SKCB ở các nghiệm thức xử lý vi khuẩn đối kháng vào thời điểm trước khi chủng bệnh

A: Nghiệm thức Stanner B: Nghiệm thức Đối chứng C: Nghiệm thức *Bacillus* 42
D: Nghiệm thức *Bacillus* 150 E: Nghiệm thức *Bacillus* 41 F: Nghiệm thức hỗn hợp vi khuẩn

3.5. Hiệu quả phòng trị bệnh thối nhũn trên cải bẹ dún ở các biện pháp xử lý vi khuẩn vùng rễ khác nhau

Trung bình chiều dài vết bệnh tại thời điểm 12 giờ sau khi chủng bệnh (SKCB) tại Bảng 4, cho thấy nghiệm thức Stanner 20 WP (0,41 cm) có chiều dài nhỏ hơn và khác biệt ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức còn lại. Tiếp theo là nghiệm thức vi khuẩn *Bacillus* 41 (1,18 cm), các nghiệm thức *Bacillus* 42 (1,69 cm), *Bacillus* 150 (1,41 cm), HH vi khuẩn (1,51 cm), không khác biệt ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức đối chứng (1,83 cm). Trong 3 biện pháp xử lý thì 2 biện pháp xử lý vi khuẩn vùng rễ trước (1,02 cm) và trước – sau (1,27 cm) khác biệt ý nghĩa với biện pháp xử lý vi khuẩn vùng rễ sau (1,73 cm) .

Ở Bảng 5 trung bình chiều dài vết bệnh qua các thời điểm xử lý, kết quả ghi nhận thời điểm xử lý vi khuẩn vùng rễ trước (1,55 cm) và thời điểm xử lý vi khuẩn vùng rễ trước – sau (1,96 cm) mang lại hiệu quả phòng trị cao và khác biệt ý nghĩa thống kê so với thời điểm xử lý vi khuẩn vùng rễ sau (3,02 cm). Về trung bình chiều dài vết bệnh tại thời điểm 24 giờ SKCB, cho thấy nghiệm thức Stanner 20 WP (0,67 cm) có chiều dài nhỏ hơn và khác biệt ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức còn lại. Tiếp theo là nghiệm thức vi khuẩn *Bacillus* 41 (1,90 cm), các nghiệm thức *Bacillus* 42 (2,68 cm), *Bacillus* 150 (2,37 cm), HH vi khuẩn (2,47 cm) không khác biệt ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức đối chứng (2,97 cm).

Bảng 4. Chiều dài vết bệnh ở tất cả các nghiệm thức tại thời điểm 12 giờ SKCB

TĐXL(A)		Chiều dài vết bệnh (cm)		
NT(B)	Trước	Trước – Sau	Sau	TB(B)
Starner 20 WP	0,00	0,00	1,23	0,41C
<i>Bacillus</i> 41	0,63	0,90	2,00	1,18 B
<i>Bacillus</i> 42	1,43	1,60	2,05	1,69 A
<i>Bacillus</i> 150	1,03	1,73	1,48	1,41AB
HH Vi khuẩn	1,53	1,40	1,60	1,51AB
Đối chứng	1,50	1,98	2,00	1,83A
TB(A)	1,02 B	1,27 B	1,73 A	
Mức ý nghĩa	F(A)*; F(B)*; F(AxB) ^{ns}			
CV (%)	39,38			

Trong cùng một bảng, những số có chữ theo sau khác nhau thì có khác biệt ý nghĩa thống kê ở mức 5% (*). ns: khác biệt không ý nghĩa; TĐXK: thời điểm xử lý; NT: nghiệm thức; SKCB: sau khi chủng bệnh; HH: hỗn hợp

Bảng 5. Chiều dài vết bệnh ở tất cả các nghiệm thức tại thời điểm 24 giờ SKCB

NT(B)	DXL(A)	Chiều dài vết bệnh (cm)		
	Trước	Trước – Sau	Trước	TB(B)
Starter 20 WP	0,03	0,00	1,98	0,67C
Bacillus 41	0,95	1,13	3,63	1,90B
Bacillus 42	2,08	2,70	3,25	2,68AB
Bacillus 150	1,45	2,63	3,03	2,37AB
HH Vi khuẩn	2,13	2,10	3,18	2,47AB
Đối chứng	2,65	3,20	3,05	2,97A
TB(A)	1,55 B	1,96B	3,02A	
Mức ý nghĩa		F(A)*; F(B)*; F(AxB) ^{ns}		
CV (%)		41,43		

Nhìn chung, hiệu quả ức chế bệnh cao nhất được ghi nhận ở biện pháp xử lý vi khuẩn đối kháng trước và sau khi chủng bệnh, tiếp theo là biện pháp xử lý vi khuẩn đối kháng trước khi chủng bệnh và sau đó là biện pháp xử lý vi khuẩn đối kháng sau khi chủng bệnh. Điều này tương tự với kết quả thí nghiệm Thẩm (2011) khi xử lý vi khuẩn vùng rễ đối kháng ức chế bệnh thối nhũn trên lá cải bắp do vi khuẩn *E. caratovora* gây ra trong điều kiện in-vitro.

Như vậy, chủng vi khuẩn *Bacillus* 41 có khả năng hạn chế được bệnh thối nhũn tương đương Starter 20 WP. Ngoài ra thời điểm xử lý trước, trước và sau khi lây bệnh mang lại hiệu quả cao hơn xử lý sau khi lây bệnh.

TÀI LIỆU THAM KHẢO (REFERENCES)

Agrios, G. N. (2005). *Plant pathology*. Elsevier Academic Press.

Burgess, L. W., Phan, H. T., Knight, T. E., & Tesoriero, L. (2008). *Diagnostic manual for plant diseases in Vietnam*.

Cui, W., He, P., Munir, S., He, P., He, Y., Li, X., Yang, L., Wang, B., Wu, Y., & He, P. (2019). Biocontrol of soft rot of Chinese cabbage using an endophytic bacterial strain. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1471. doi.org/10.3389/fmicb.2019.01471

Nguyen, C. M., & Pham, C. A. (2007). *Cultivation, Care, and Pest Control for Leafy Vegetables*. Agricultural Publishing House. Hanoi (in Vietnamese)

El-Saadony, M. T., Saad, A. M., Soliman, S. M., Salem, H. M., Ahmed, A. I., Mahmood, M., El-Tahan, A. M., Ebrahim, A. A. M., Abd El-Mageed, T. A., Negm, S.H., Selim, S., Babalghith, A. O., Elrys, A. S., El-Tarabily, K. A., & AbuQamar, S. F. (2022). Plant growth-promoting microorganisms as biocontrol agents

4. KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu cho thấy 7 chủng vi khuẩn gây bệnh thối nhũn trên Cải bẹ dún do chi *Pectobacterium* tại các tỉnh Vĩnh Long, Sóc Trăng, An Giang đã được phân lập và xác định. Trong đó chủng vi khuẩn AG7 là vi khuẩn *Pectobacterium carotovorum* được thu thập tại xã Kiến An, huyện Chợ Mới, tỉnh An Giang gây triệu chứng thối nhũn cao trên mô cải bẹ dún qua các thời điểm.

Hiệu quả phòng trị bệnh thối nhũn trên lá cải bẹ dún được xác định là do vi khuẩn *Pectobacterium carotovorum* AG7 trong điều kiện phòng thí nghiệm. Chủng vi khuẩn *Bacillus* 41 tương đương thuốc trừ khuẩn Starter 20WP có khả năng hạn chế chiều dài bệnh thối nhũn trên cải bẹ dún. Ngoài ra thời điểm xử lý trước, trước và sau khi lây bệnh mang lại hiệu quả cao hơn xử lý sau khi lây bệnh.

of plant diseases: Mechanisms, challenges and future perspectives. *Front. Plant Sci.* 13:923880. 10.3389/fpls.2022.923880.

Food and Agriculture Organization of the United Nation (Faostat), <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>.

Goszczyńska, T., & Serfontein, J. J. (1998). Milk–Tween agar, a semiselective medium for isolation and differentiation of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* and *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. *Journal of Microbiological Methods*, 32(1), 65-72. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(98\)00005-0](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(98)00005-0)

Guerra, M. D. L., Guerra, Y. D. L., Souza, E. B. D., & Mariano, R. D. L. R. (2014). Essential plant oils in reducing the intensity of soft rot in Chinese cabbage. *Revista Ciência Agronômica*, 45, 760-766. doi.org/10.1590/S1806-66902014000400014

- Hanson, A. (2008). Oxidative-fermentative test protocol. *American Society of Microbiology*. EUA. 1-7.
- Haleblian, S., Harris, B., Finegold, S. M., & Rolfe, R. D. (1981). Rapid method that aids in distinguishing Gram-positive from Gram-negative anaerobic bacteria. *Journal of Clinical Microbiology*, 13(3), 444-448. doi.org/10.1128/jcm.13.3.444-448.1981
- Janse, J. D. (2006). *Phytobacteriology: principles and practice*. Cabi. https://doi.org/10.1079/9781845930257.0000
- Junior, J. C. R., Tamanini, R., Soares, B. F., de Oliveira, A. M., de Godoi Silva F., da Silva F. Fernandes, Augusto A., & Beloti V. (2016). Efficiency of boiling and four other methods for genomic DNA extraction of deteriorating spore-forming bacteria from milk. *Semina: Ciências Agrárias*, 37(5), 3069-3078. https://doi.org/10.5433/1679-0359.2016v37n5p3069
- Lane, D. J. (1991). 16S/23S rRNA sequencing. *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*, Wiley, 115-175.
- Mansfield, J., Genin, S., Magori, S., Citovsky, V., Sriariyanum, M., Ronald, P., Dow, M., Verdier, V., Beer, S. V., Machado, M. A., Toth, L. Salmond, G., & Foster, G. D. (2012). Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Molecular plant pathology*, 13(6), 614-629. doi: 10.1111/j.1364-3703.2012.00804.x
- Pérombelon, M. C. M., Lowe, R., Quinn, C. E., & Sells, I. A. (1980). Contamination of pathogen-free seed potato stocks by *Erwinia carotovora* during multiplication: results of a six-year monitoring study. *Potato Research*, 23, 413-425. doi.org/10.1007/BF02356257
- Sang, M. K., Dutta, S., & Park, K. (2015). Influence of commercial antibiotics on biocontrol of soft rot and plant growth promotion in Chinese cabbages by *Bacillus vallismortis* EXTN-1 and BS07M. *Research in Plant Disease*, 21(4), 255-260. doi.org/10.5423/RPD.2015.21.4.255
- Schaad, N. W., Jones, J. B., & Chun, W. (2001). *Laboratory guide for the identification of plant pathogenic bacteria* (No. Ed. 3, pp. xii+-373). https://www.doi.org/10.5555/20013064240
- Tariq, M., Khan, A., Asif, M., Khan, F., Ansari, T., Shariq, M., & Siddiqui, M. A. (2020). Biological control: a sustainable and practical approach for plant disease management. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B—Soil & Plant Science*, 70(6), 507-524. doi.org/10.1080/09064710.2020.1784262
- Pham, T. T. (2009). The first step for using rhizobacteria to control soft rot caused by *Erwinia carotovora* on cabbage. The master thesis of sciences of plant protection, Can Tho University (in Vietnamese).
- Togashi, J., Uehara, D., & Namai, T. (2000). Biological control of the soft rot of Chinese cabbages [*Brassica chinensis*] by fluorescent antagonistic bacterium. *Bulletin of the Yamagata University. Agricultural Science (Japan)*, 13(3), 225-232.