

DOI:10.22144/ctu.jsi.2016.087

PHÂN LẬP VÀ BƯỚC ĐẦU ĐÁNH GIÁ HIỆU QUẢ CỦA THỰC KHUẨN THỂ TRONG PHÒNG TRỪ BỆNH THỐI GỐC LÚA DO VI KHUẨN *Erwinia chrysanthemi*

Trần Hưng Minh, Ngô Văn Chí, Phạm Minh Phú và Nguyễn Thị Thu Nga

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

Thông tin chung:

Ngày nhận: 05/08/2016

Ngày chấp nhận: 26/10/2016

Title:

Bacteriophage isolation and evaluation of the effectiveness in control rice food rot disease caused by *Erwinia chrysanthemi*

Từ khóa:

Bệnh thối gốc, *Erwinia chrysanthemi*, lúa, thực khuẩn thể

Keywords:

Bacteriophages, *Erwinia chrysanthemi*, foot rot disease, rice

ABSTRACT

There were 35 bacteriophages and 14 strains of bacteria *Erwinia chrysanthemi* were isolated from 59 rice diseased samples with foot rot symptom, collected in 4 provinces - Vinh Long, Can Tho, Kien Giang and Soc Trang. Assessing the parasitic ability of these phages on 14 strains of *E. chrysanthemi* showed that 8 phages (i.e. Φ EchST19a, Φ EchCT12, Φ EchKG3b, Φ EchKG5a, Φ EchKG8b, Φ EchKG11b, Φ EchST19b and Φ EchST22) could parasitize many bacterial strains, and 7 bacterial strains (i.e. EchCT5, EchCT12, EchST20, EchKG4, EchKG5, EchKG7 and EchKG8) were susceptible with all tested phages. The bacterial strain EchCT12 showed highest pathogenicity among other strains when artificial pathogen inoculation was done on rice in nethouse conditions. Surveying the lytic ability of 8 bacteriophages on *E. chrysanthemi* EchCT12 showed that phage Φ EchKG8b expressed highest diameter of plaque on bacterial lawn. The experiment controlling rice foot rot in nethouse conditions with four tested phage titers 10^5 ; 10^6 ; 10^7 and 10^8 pfu/ml showed that three titers i.e. 10^6 ; 10^7 and 10^8 pfu/ml expressed effect in disease reduction and 10^8 pfu/ml titer showed the best effectiveness.

TÓM TẮT

Có 35 dòng thực khuẩn thể (TKT) và 14 chủng vi khuẩn *Erwinia chrysanthemi* được phân lập trên 59 mẫu bệnh thối gốc lúa, phân bố ở 4 tỉnh Vĩnh Long, Cần Thơ, Kiên Giang và Sóc Trăng. Việc đánh giá khả năng ký sinh của các dòng TKT cho thấy 8 dòng thực khuẩn thể Φ EchST19a, Φ EchCT12, Φ EchKG3b, Φ EchKG5a, Φ EchKG8b, Φ EchKG11b, Φ EchST19b và Φ EchST22 có khả năng ký sinh nhiều chủng vi khuẩn, và 7 chủng vi khuẩn *E. chrysanthemi* EchCT5, EchCT12, EchST20, EchKG4, EchKG5, EchKG7, EchKG8 mẫn cảm với tất cả các dòng TKT được phân lập, trong đó chủng EchCT12 là chủng có khả năng gây hại cao hơn các chủng còn lại khi thực hiện lây bệnh nhân tạo trong điều kiện nhà lưới. Khảo sát khả năng thực khuẩn của 8 dòng TKT trên chủng vi khuẩn EchCT12 cho thấy, dòng TKT Φ EchKG8b cho đường kính phân giải vi khuẩn cao nhất. Trong thí nghiệm đánh giá 4 nồng độ thực khuẩn thể áp dụng (10^5 ; 10^6 ; 10^7 và 10^8 pfu/ml) trong phòng trị bệnh thối gốc lúa ở điều kiện nhà lưới thì các nồng độ 10^6 ; 10^7 và 10^8 pfu/ml thể hiện hiệu quả giảm bệnh, trong đó nồng độ 10^8 pfu/ml cho hiệu quả cao nhất.

Trích dẫn: Trần Hưng Minh, Ngô Văn Chí, Phạm Minh Phú và Nguyễn Thị Thu Nga, 2016. Phân lập và bước đầu đánh giá hiệu quả của thực khuẩn thể trong phòng trừ bệnh thối gốc lúa do vi khuẩn *Erwinia chrysanthemi*. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. Số chuyên đề: Nông nghiệp (Tập 3): 185-192.

1 ĐẶT VẤN ĐỀ

Vi khuẩn *Erwinia chrysanthemi* là vi khuẩn gây thối gốc trên nhiều loại cây trồng (CABI, 2001). Trên lúa, bệnh thối gốc lúa được phát hiện gây hại tại Nhật Bản vào năm 1979 và được xác định là do vi khuẩn *E. chrysanthemi* gây ra (Goto, 1979). Gần đây, bệnh thối gốc do vi khuẩn *E. chrysanthemi* được ghi nhận gây hại tại Tiểu Cần, Trà Vinh trong năm 2000. Bệnh lây lan nhanh khắp các tỉnh Đồng bằng sông Cửu Long (ĐBSCL). Bệnh thường xuất hiện từ 15 - 35 ngày sau khi sạ. Đầu tiên, ở bẹ lá lúa, phần sát gốc có vết thối màu nâu sậm, dạng như thấm nước. Sau đó, cả bẹ lá bị thối nhũn. Lá lúa ở bẹ mắc bệnh, ngả màu vàng, rồi cháy khô và gục xuống. Bẹ lá bệnh có thể bị đứt dễ dàng và có mùi thối. Bệnh lan dần cho cả bụi lúa, làm cho tất cả bẹ đều thối. Cả gốc lúa và rễ lúa bệnh đều bị thối, ngả màu nâu đen. Bệnh làm cả bụi lúa bị chết khô. Bệnh nặng làm cả ruộng lúa bị cháy rụi. Bệnh thối gốc cũng thường kết hợp với bệnh đạo ôn làm bụi lúa chết nhanh chóng, khó phát hiện, dẫn đến sử dụng nhiều loại thuốc hóa học phòng trừ bệnh, song ruộng lúa vẫn không khỏi bệnh (Phạm Văn Kim, 2015).

Để khắc phục việc lạm dụng thuốc hóa học, nghiên cứu áp dụng các tác nhân sinh học như xạ khuẩn, vi khuẩn vùng rễ, dịch trích thực vật và gần đây nhất là thực khuẩn thể (bacteriophage) trong phòng trị bệnh là rất cần thiết (Tanaka *et al.*, 1990; Saccardi *et al.*, 1992; Schnabel *et al.*, 1999; Jones *et al.*, 2007). Thực khuẩn thể (TKT) là vi rút có khả năng ký sinh và giết chết tế bào vi khuẩn trong thời gian ngắn (Kutter and Sulakvelize, 2005). Ở nước ta, một số nghiên cứu áp dụng TKT trong phòng trị bệnh cháy bìa lá lúa đã được ghi nhận (Luong Hữu Tâm, 2013; Nguyễn Thị Trúc Giang *et al.*, 2014; Nguyễn Minh Tâm, 2015). Tuy nhiên, chưa có nhiều nghiên cứu về TKT trong phòng trị bệnh thối gốc lúa, vì vậy nghiên cứu được thực hiện nhằm tìm ra dòng TKT có hiệu quả phòng trị bệnh trong điều kiện phòng thí nghiệm và nhà lưới.

2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Phân lập vi khuẩn gây bệnh và thực khuẩn thể ở các tỉnh ĐBSCL

– Phân lập vi khuẩn gây bệnh: Chọn tép lúa bệnh điển hình, lau sạch bằng cồn 70°, dùng dao đã được khử trùng cắt một đoạn (giữa phần mô khỏe và mô bệnh) khoảng 1 cm, tiếp tục tách bỏ bẹ phía ngoài và lau bằng cồn 70° trước khi được cắt thành các đoạn ngắn 3 - 5 mm. Nhỏ một giọt nước cất vô trùng lên các đoạn vừa cắt, đợi 1 phút cho vi khuẩn phân tán vào giọt nước, dùng micropipette rút 50 µl huyền phù vi khuẩn cho vào đĩa Petri chứa môi

trường King's B. Dùng que cấy đã được khử trùng vạch đều vi khuẩn lên bề mặt đĩa. Ủ đĩa vi khuẩn trong 48 giờ ở điều kiện phòng. Sau đó, tiến hành tách rông và thử trong ống nghiệm chứa môi trường King's B đã tạo mật nghiêng ở 4°C. Xác định vi khuẩn gây bệnh dựa vào màu sắc, hình thái khuẩn lạc, kết hợp các phản ứng siêu nhạy cảm trên cây cà chua, khả năng thối nhũn khoai tây và bắp cải, lên men carbohydrate trong điều kiện yếm khí và hiếu khí (thử nghiệm O/F), phản ứng tạo indole, quy trình Koch... dựa theo Goszcynska *et al.* (2000) và Janse (2009).

– Phân lập TKT: Mẫu bệnh được rửa sạch và lau khô, dùng dao cắt phần gốc bị bệnh thành nhiều đoạn khoảng 1 cm và nghiền trong cối sứ, sau đó cho phần vừa nghiền vào ống Falcon chứa 5 ml nước cất vô trùng thực hiện ly tâm ở vận tốc 6000 vòng/phút trong 5 phút. Rút phần dịch trong phía trên cho vào ống eppendorf cộng thêm 50 µl chloroform lắc đều, tiếp tục ly tâm lại một lần nữa, thu được phần dung dịch trong chỉ chứa TKT (theo Balogh (2006) có hiệu chỉnh). Do mật số TKT thu được thấp nên tiến hành tăng sinh mật số TKT bằng cách phối hợp dịch trong suốt vào huyền phù các vi khuẩn đã phân lập, cho vào môi trường King's B lỏng trong điều kiện lắc 100 vòng/phút trong 24 giờ. Sau đó, rút 1 ml huyền phù hỗn hợp này cộng thêm 50 µl chloroform, lắc đều để yên 5 phút, ly tâm loại chloroform. Tiếp tục rút 50 µl dịch trong cho vào ống nghiệm chứa môi trường King's B 0,8 % agar đã nấu tan, để nguội ở 50°C, phối hợp với 100 µl huyền phù vi khuẩn *E. chrysanthemi* (OD = 0,3 tương ứng với mật số vi khuẩn là 10⁸ cfu/ml), hòa đều và đổ vào đĩa Petri vô trùng (VanTwist and Kropinski, 2009). Ủ đĩa trong điều kiện phòng, quan sát sự hình thành các vòng vô khuẩn. Thực hiện tách rông TKT bằng cách dùng tâm bông vô trùng tách vòng vô khuẩn đơn sang đĩa Petri mới chứa vi khuẩn ký chủ. Sau đó, thực hiện trừ nguồn TKT trong điều kiện tối ở nhiệt độ 4°C.

2.2 Đánh giá khả năng ký sinh của các dòng thực khuẩn thể trên các chủng *Erwinia chrysanthemi* khác nhau

– Thí nghiệm bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên 3 lần lặp lại với số nghiệm thức là 35 dòng TKT và 14 chủng vi khuẩn gây bệnh được phân lập.

– Cách tiến hành: Rút 5 µl từng dòng TKT nhỏ vào ô nghiệm thức được đánh dấu sẵn tương ứng trên đĩa Petri chứa 10 ml môi trường King's B 0,8% agar, chứa 250 µl huyền phù vi khuẩn *E. chrysanthemi* (OD = 0,3) ở 50°C đã được hòa đều và để nguội.

– Chỉ tiêu ghi nhận: Xác định khả năng tiêu diệt vi khuẩn của các dòng TKT trên các ký chủ

khác nhau thông qua sự hình thành vòng vô khuẩn trên đĩa Petri sau 24 giờ.

2.3 So sánh khả năng tiêu diệt vi khuẩn *Erwinia chrysanthemi* của một số dòng thực khuẩn thể có khả năng ký sinh rộng trong điều kiện phòng thí nghiệm

– Mục đích: nhằm tìm ra dòng TKT tiêu diệt vi khuẩn gây bệnh cao trong điều kiện phòng thí nghiệm, là cơ sở để áp dụng phòng trị bệnh trong điều kiện nhà lưới.

– Thí nghiệm bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên, 3 lặp lại với số nghiệm thức là 8 dòng TKT có khả năng ký sinh rộng và chủng vi khuẩn mầm cảm nhất được chọn ra từ thí nghiệm phần 2.2.

– Chuẩn bị: Các dòng TKT chọn từ thí nghiệm phần 2.2 được nhân mật số trong 24 giờ, thực hiện đếm mật số TKT có trong huyền phù bằng phương pháp pha loãng và đổ đĩa. Dựa vào mật số xác định sau 24 giờ, thực hiện pha loãng để tạo huyền phù các dòng TKT ở mật số 10^3 pfu/ml. Chủng *E. chrysanthemi* chọn từ thí nghiệm 2 được nuôi trong đĩa Petri trong 48 giờ.

– Cách thực hiện: Rút 50 μ l huyền phù từng dòng TKT (10^3 pfu/ml) + 50 μ l huyền phù vi khuẩn gây bệnh (OD = 0,3) vào đĩa Petri, tiến hành đổ đĩa bằng môi trường King's B 0,8% agar đã được nấu tan giữ ở 50°C, sau đó lắc nhẹ và để nguội.

– Chỉ tiêu ghi nhận: Xác định sự phân giải vi khuẩn của các dòng TKT trên đĩa Petri vào sau 24 giờ bằng cách đo đường kính 10 vòng vô khuẩn ngẫu nhiên và lấy trung bình. Số liệu được phân tích và xử lý bằng phần mềm MstatC qua phép thử Duncan.

2.4 Đánh giá hiệu quả phòng trị bệnh thối gốc lúa ở các mật độ thực khuẩn thể khác nhau trong điều kiện nhà lưới

– Thí nghiệm bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên 5 lặp lại với 5 nghiệm thức gồm: Dòng TKT ký sinh rộng được áp dụng ở mật số lần lượt là 10^5 ; 10^6 ; 10^7 ; 10^8 pfu/ml và nghiệm thức đối chứng chủng bệnh không xử lý TKT.

– Vật liệu thí nghiệm: Nguồn TKT được dùng là dòng có khả năng ký sinh rộng và tiêu diệt vi khuẩn cao nhất tìm được ở thí nghiệm phần 2.2 và 2.3 cùng chủng vi khuẩn *E. chrysanthemi* mầm cảm nhất.

– Chuẩn bị: TKT được nhân nuôi, xác định mật số bằng phương pháp pha loãng và đổ đĩa. Quy ra mật số ở 10^5 ; 10^6 ; 10^7 và 10^8 pfu/ml. Vi khuẩn *E. chrysanthemi* được nuôi cấy trên môi trường King's B trong 48 giờ, cho nước cất thanh trùng vào đĩa thu huyền phù, pha loãng để đạt OD = 0,3.

– Chủng bệnh khi lúa được 20 ngày sau khi gieo (NSKG). Trước khi chủng bệnh 1 ngày lúa

được chuyển vào phòng ủ bệnh (25°C). Tuổi đều TKT trước khi chủng bệnh 2 giờ với thể tích 30 ml/chậu và với mật số tương ứng của từng nghiệm thức. Tiến hành chủng bệnh nhân tạo bằng biện pháp châm kim vào gốc lúa (châm 2 lần/cây), tưới đều 30 ml huyền phù vi khuẩn gây bệnh vào mỗi chậu. Từng chậu lúa đã lây bệnh được đặt trong túi nylon giữ ẩm và ủ tối. Sau 24 giờ, chuyển cây ra nhà lưới.

– Chỉ tiêu ghi nhận: Trên mỗi cây tiến hành đánh giá số lá bị héo trên tổng số lá, từ đó tính được tỷ lệ lá bệnh. Trên mỗi chậu, tiến hành đánh giá số cây nhiễm bệnh trên tổng số cây, từ đó tính được tỷ lệ cây bệnh ở các thời điểm 2,3 và 4 NSLB tương tự phương pháp của Phùng Thị Thanh Thảo (2014). Số liệu được phân tích thống kê bằng phần mềm MstatC qua phép thử Duncan.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Kết quả phân lập vi khuẩn gây bệnh và thực khuẩn thể ở các tỉnh ĐBSCL

Trong 59 mẫu bệnh thu thập, qua quá trình phân lập và kết hợp kiểm tra phản ứng siêu nhạy cảm, khả năng thổi nhũn khoai tây và bắp cải, khả năng phân hủy và oxy hóa carbohydrate - thử nghiệm O/F, phản ứng tạo indole, quy trình Koch... đã thu được 14 chủng *Erwinia chrysanthemi* gây bệnh thối gốc lúa đạt kết quả dương tính với tất cả các kiểm nghiệm (số liệu không công bố) và phân lập được 35 dòng TKT phân bố ở các tỉnh Vĩnh Long, Cần Thơ, Kiên Giang và Sóc Trăng.

Như vậy, TKT có thể được phân lập từ đất xung quanh các cây nhiễm bệnh. Theo Wommack và Colwell (2000), TKT có thể tìm thấy ở hầu hết những nơi có vi khuẩn tồn tại bao gồm cả đất và tế bào thực vật bị bệnh. Tương tự, kết quả này cũng được ghi nhận trong nghiên cứu của Lương Hữu Tâm (2013) về thí nghiệm phân lập các dòng TKT trên mẫu bệnh cháy bìa lá lúa.

3.2 Kết quả khả năng ký sinh của các dòng thực khuẩn thể trên các chủng *Erwinia chrysanthemi* khác nhau trong điều kiện phòng thí nghiệm

Kết quả đánh giá khả năng ký sinh của 35 dòng TKT trên 14 chủng vi khuẩn *E. chrysanthemi* cho thấy: có 7 chủng *E. chrysanthemi* bị TKT ký sinh nhiều nhất là EchCT5, EchCT12, EchST20, EchKG4, EchKG5, EchKG7, EchKG8 với 35 dòng TKT ký sinh. Có 2 dòng không bị TKT ký sinh đó là EchCT8 và EchST1. Các chủng vi khuẩn còn lại EchCT1, EchCT7, EchST14, EchST19, EchST21 bị TKT ký sinh lần lượt là 3, 3, 1, 4, 5 (Ech = *E. chrysanthemi*).

Trong 7 chủng vi khuẩn bị ký sinh nhiều nhất: EchCT5, EchCT12, EchST20, EchKG4, EchKG5, EchKG7 và EchKG8 thì chủng EchCT12 có khả năng gây hại cao nhất sau khi dựa trên kết quả đánh giá khả năng gây hại trên lúa ở giai đoạn 20 NSKG (số liệu không công bố).

Kết quả Bảng 1 cũng cho thấy, dòng TKT ΦEchST19a ký sinh trên nhiều vi khuẩn nhất đạt 11/14 chủng *E. chrysanthemi*, có 2 dòng TKT ΦEchCT12, ΦEchKG3b ký sinh 10/14 chủng vi khuẩn, có 1 dòng TKT ΦEchKG5a ký sinh trên 9/14 chủng vi khuẩn. Các dòng TKT ΦEchKG8b, ΦEchKG11b, ΦEchST19b, ΦEchST22 ký sinh 8/14 chủng *E. chrysanthemi*, các dòng TKT còn lại đều ký sinh 7/14 chủng. Kết quả này cho thấy, các

dòng TKT phân lập có khả năng ký sinh khá cao với tỷ lệ ký sinh cao nhất đạt 78,6% (dòng TKT ΦEchST19a). Tương tự, nghiên cứu của Nguyễn Thị Trúc Giang và ctv. (2014) cũng đã ghi nhận dòng TKT 12 có tỷ lệ ký sinh cao nhất đạt 69,2% trên vi khuẩn gây bệnh cháy bìa lá lúa. Ngoài ra có thể nhận ra rằng, khả năng ký sinh của các dòng TKT khá khác nhau (một số dòng có khả năng ký sinh khá rộng, một số khác có khả năng ký sinh hẹp), từ đó cho thấy TKT ký sinh chuyên tính và bắt buộc trên tế bào của vi khuẩn ký chủ. Phạm vi ký chủ của TKT thường hẹp do hầu hết TKT chỉ tấn công cụ thể một loài và đôi khi chỉ một số dòng trong một loài (Abhilash et al., 2009; Karin et al., 2013).

Bảng 1: Khả năng ký sinh của 35 dòng TKT trên 14 chủng vi khuẩn *E. chrysanthemi*

STT	Mã số	SCVK bị ký sinh	STT	Mã số	SCVK bị ký sinh	STT	Mã số	SCVK bị ký sinh
1	ΦEchVL2a	7	13	ΦEchKG3a	7	25	ΦEchKG11a	7
2	ΦEchVL2b	7	14	ΦEchKG3b	10	26	ΦEchKG11b	8
3	ΦEchVL3a	7	15	ΦEchKG4a	7	27	ΦEchST5	7
4	ΦEchVL3b	7	16	ΦEchKG4b	7	28	ΦEchST11a	7
5	ΦEchCT1a	7	17	ΦEchKG5a	9	29	ΦEchST11b	7
6	ΦEchCT1b	7	18	ΦEchKG5b	7	30	ΦEchST14	7
7	ΦEchCT5	7	19	ΦEchKG6a	7	31	ΦEchST19a	11
8	ΦEchCT7	7	20	ΦEchKG6b	7	32	ΦEchST19b	8
9	ΦEchCT8	7	21	ΦEchKG7a	7	33	ΦEchST20	7
10	ΦEchCT12	10	22	ΦEchKG7b	7	34	ΦEchST21	7
11	ΦEchCT14a	7	23	ΦEchKG8a	7	35	ΦEchST22	8
12	ΦEchCT14b	7	24	ΦEchKG8b	8			

Ghi chú: SCVK: số chủng vi khuẩn, Φ: TKT, CT: Cần Thơ, KG: Kiên Giang, VL: Vĩnh Long, ST: Sóc Trăng

3.3 Kết quả so sánh khả năng tiêu diệt vi khuẩn *E. chrysanthemi* của một số dòng thực khuẩn thể có khả năng ký sinh rộng trong điều kiện phòng thí nghiệm

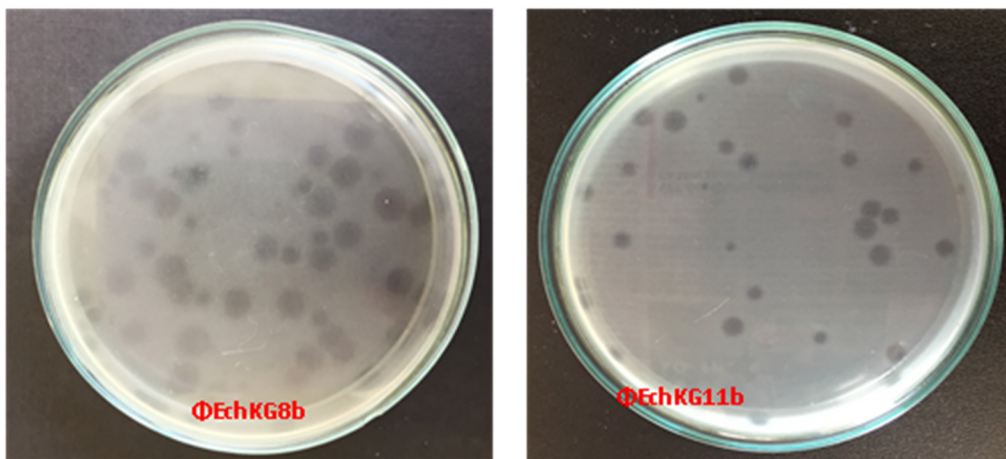
Kết quả so sánh khả năng tiêu diệt vi khuẩn *E. chrysanthemi* của 8 dòng TKT có khả năng ký sinh rộng trình bày ở Bảng 2 cho thấy, ở 3 thời điểm so sánh, khả năng tiêu diệt vi khuẩn EchCT12 của các

dòng TKT có sự khác biệt và đường kính phân giải có chiều hướng gia tăng theo thời gian. Ở thời điểm 24 giờ, các nghiệm thức đều thể hiện hiệu quả với đường kính phân giải từ 1,80 - 4,58 mm. Trong đó, các dòng TKT ΦEchST22, ΦEchCT12, ΦEchST19a và ΦEchKG8b có đường kính phân giải cao tương đương và khác biệt ý nghĩa thống kê so với các dòng còn lại.

Bảng 2: Khả năng phân giải của 8 dòng thực khuẩn thể đối với vi khuẩn *Erwinia chrysanthemi* EchCT12 trong điều kiện phòng thí nghiệm

Nghiệm thức	Địa điểm phân lập	Đường kính phân giải (mm) qua các thời điểm		
		24 giờ	48 giờ	72 giờ
ΦEchKG5a	Tân Hiệp - Kiên giang	3,95 b	4,23 c	4,82 cd
ΦEchCT12	Phong Điền - TPCT	4,52 a	6,97 a	7,72 b
ΦEchST19a	Trần Đề - Sóc Trăng	4,38 a	5,45 b	6,87 b
ΦEchST19b	Trần Đề - Sóc Trăng	3,20 c	3,57 d	5,52 c
ΦEchKG8b	Tân Hiệp - Kiên giang	4,38 a	5,67 b	9,25 a
ΦEchST22	Trần Đề - Sóc Trăng	4,58 a	5,37 b	5,63 c
ΦEchKG11b	Tân Hiệp - Kiên giang	3,25 c	3,75 d	4,52 d
ΦEchKG3b	Tân Hiệp - Kiên giang	1,80 d	2,13 e	2,25 e
Mức ý nghĩa		*	*	*
CV(%)		6,33	5,76	8,90

Ghi chú: Các số trung bình trong cùng một cột theo sau bởi một hoặc nhiều ký tự giống nhau thì không khác biệt ý nghĩa ở mức 5% theo phép thử Duncan. * khác biệt ý nghĩa ở mức 5%



Hình 1: Khả năng phân giải vi khuẩn *Erwinia chrysanthemi* EchCT12 của dòng thực khuẩn thể ΦEchKG8b và ΦEchKG11b vào 72 giờ sau khi cấy

Thời điểm 48 giờ, dòng ΦEchCT12 có đường kính phân giải (6,97 cm) cao hơn và khác biệt ý nghĩa so với các dòng còn lại. Các dòng TKT ΦEchST19a (5,45 mm), ΦEchKG8b (5,67 mm) và ΦEchST22 (5,37 mm) có hiệu quả không khác biệt nhau.

Đến thời điểm 72 giờ, hiệu quả phân giải vi khuẩn của ΦEchKG8b vẫn tiếp tục tăng đạt 9,25 mm cao nhất và khác biệt ý nghĩa thống kê so với các dòng khác.

Kết quả này cho thấy, khả năng thực khuẩn của TKT khác nhau theo từng dòng, dòng thực khuẩn ΦEchKG8b có khả năng ký sinh rộng và khả năng phân giải vi khuẩn mạnh sẽ có triển vọng tốt hơn trong việc ức chế sự phát triển của vi khuẩn gây bệnh. Tương tự, Nguyễn Minh Tâm (2015) đã đánh giá khả năng thực khuẩn của 5 dòng TKT phân lập từ rễ và phần thân gần gốc cây bị bệnh héo xanh do vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* gây ra trên dưa leo và ghi nhận 2 dòng TKT ΦRaVL1a và ΦRaAG12a cho đường kính phân giải vi khuẩn gây bệnh cao từ 4,62 đến 8,11 mm trong thời gian từ 24 – 72 giờ.

3.4 Kết quả hiệu quả phòng trị bệnh thối gốc lúa ở các mật độ thực khuẩn thể khác nhau trong điều kiện nhà lưới

Kết quả ở Bảng 3 và 4 cho thấy hiệu quả phòng trị của TKT khác nhau tùy theo mật độ xử lý.

Về tỷ lệ cây bệnh (Bảng 3): nhìn chung, các mật độ 10⁶, 10⁷ và 10⁸ pfu/ml đều thể hiện hiệu quả giảm bệnh với tỷ lệ thấp và khác biệt so với đối chứng. Tuy nhiên, mật độ 10⁵ pfu/ml không mang lại hiệu quả. Ở thời điểm 2 NSKLB, nghiệm thức xử lý TKT ở mật số 10⁶, 10⁷ và 10⁸ pfu/ml đều cho hiệu quả cao và khác biệt ý nghĩa thống kê so với

các nghiệm thức còn lại, tỷ lệ bệnh lần lượt là 33,33%; 28,33% và 18,33%, trong khi nghiệm thức đối chứng có tỷ lệ bệnh là 83,33%

Thời điểm 3 NSKLB, tỷ lệ cây bệnh ở các nghiệm thức đều tăng, 3 nghiệm thức xử lý 10⁶, 10⁷ và 10⁸ pfu/ml vẫn thể hiện hiệu quả giảm bệnh tương đương nhau với tỷ lệ bệnh thấp hơn và khác biệt ý nghĩa so với đối chứng.

Đến thời điểm 4 NSKLB, chỉ còn hai nghiệm thức 10⁷ và 10⁸ pfu/ml thể hiện tương đương hiệu quả giảm bệnh với tỷ lệ cây bệnh lần lượt là 41,67% và 30,00% thấp hơn và khác biệt ý nghĩa thống kê so với đối chứng

Bảng 3: Tỷ lệ cây bệnh khi xử lý ở các mật độ thực khuẩn thể khác nhau

Nghiệm thức	Tỷ lệ cây bệnh (%) qua các thời điểm		
	2 NSKLB	3 NSKLB	4 NSKLB
T-10 ⁵ pfu/ml	55,00 ab	75,00 ab	78,33 a
T-10 ⁶ pfu/ml	33,33 bc	41,67 bc	53,33 abc
T-10 ⁷ pfu/ml	28,33 bc	38,33 bc	41,67 bc
T-10 ⁸ pfu/ml	18,33 c	26,67 c	30,00 b
Đối chứng	83,33 a	88,33 a	91,67 a
Mức ý nghĩa	*	*	*
CV (%)	43,79	44,34	39,61

Ghi chú: Số liệu được chuyển sang arcsin $\sqrt{x \pm \frac{1}{4n}}$

trước khi xử lý thống kê. Các số trong cùng một cột theo sau bởi một ký tự giống nhau thì không khác biệt ý nghĩa ở mức 5% theo phép thử Duncan. * khác biệt ý nghĩa ở mức 5

Về tỷ lệ lá bệnh (Bảng 4): Nhìn chung ở tất cả các thời điểm, các nghiệm thức có xử lý TKT đều có tỷ lệ lá bệnh thấp và khác biệt ý nghĩa thống kê so với đối chứng. Ở thời điểm 2 NSKLB, các

nghiệm thức xử lý TKT đều cho thấy khả năng phòng trị với tỷ lệ lá bệnh dao động từ 8,33% đến 28,06%. Nghiệm thức 10^8 pfu/ml có tỷ lệ lá bệnh thấp nhất (8,83%)

Thời điểm 3 NSKLB, tỷ lệ lá bệnh của tất cả nghiệm thức đều tăng nhưng các nghiệm thức xử lý TKT vẫn thể hiện hiệu quả giảm bệnh với tỷ lệ bệnh thấp hơn, khác biệt ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức đối chứng. Trong đó, nghiệm thức 10^7 và 10^8 pfu/ml không khác biệt ý nghĩa thống kê và thể hiện hiệu quả cao hơn nghiệm thức 10^5 pfu/ml. Trong đó, nghiệm thức 10^8 pfu/ml thể hiện hiệu quả cao nhất với tỷ lệ lá bệnh thấp hơn và khác biệt ý nghĩa so với nồng độ 10^5 và 10^6 pfu/ml

Đến điểm 4 NSKLB, tất cả 4 nồng độ xử lý đều thể hiện sự giảm bệnh. Nghiệm thức 10^8 pfu/ml vẫn là nghiệm thức có tỷ lệ lá bệnh thấp nhất (14,17%), thấp hơn và khác biệt ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức còn lại. Kế đến là nghiệm thức 10^7 pfu/ml với tỷ lệ bệnh là 26,87%, song không khác biệt so với với nghiệm thức 10^6 pfu/ml (31,33%) và cuối cùng là nghiệm thức 10^5 pfu/ml (44,56%), trong khi nghiệm thức đối chứng không xử lý TKT có tỷ lệ lá bệnh là 70,92%.

Bảng 4: Tỷ lệ lá bệnh khi xử lý ở các mật độ thực khuẩn thể khác nhau

Nghiệm thức	Tỷ lệ lá bệnh (%) qua các thời điểm		
	2 NSKLB	3 NSKLB	4 NSKLB
T- 10^5 pfu/ml	28,06 b	43,01 b	44,56 b
T- 10^6 pfu/ml	19,61 b	27,59 c	31,33 bc
T- 10^7 pfu/ml	16,47 bc	23,16 cd	26,87 c
T- 10^8 pfu/ml	8,83 c	13,83 d	14,17 d
Đối chứng	64,47 a	69,23 a	70,92 a
Mức ý nghĩa	*	*	*
CV (%)	20,88	19,18	19,50

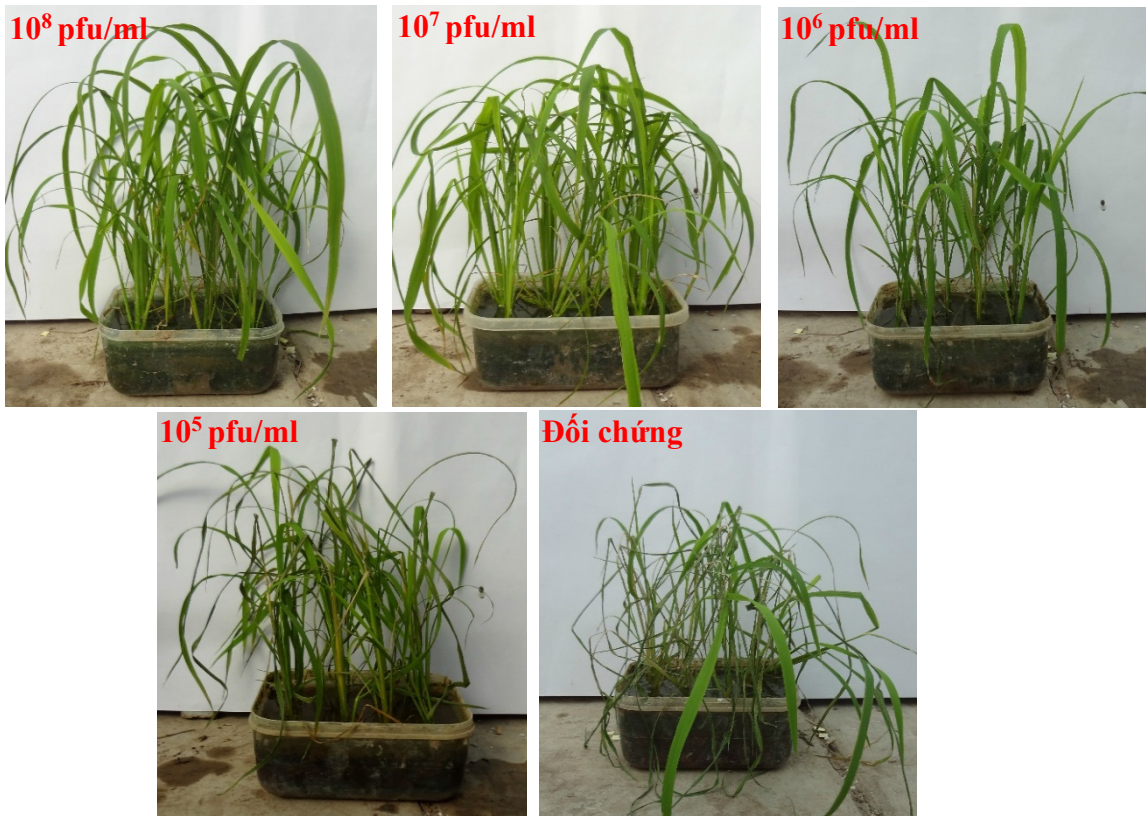
Ghi chú: Số liệu được chuyển sang arcsin $\sqrt{x \pm \frac{t}{4n}}$

trước khi xử lý thống kê. Các số trong cùng một cột theo sau bởi một ký tự giống nhau thì không khác biệt ý nghĩa ở mức 5% theo phép thử Duncan. * khác biệt ý nghĩa ở mức 5%

Tóm lại, qua kết quả tỷ lệ cây bệnh và tỷ lệ lá bệnh, các nghiệm thức có xử lý TKT đều cho thấy hiệu quả giảm bệnh và hiệu quả giảm bệnh tăng theo nồng độ TKT. Nghiệm thức xử lý TKT ở nồng độ 10^8 pfu/ml cho hiệu quả phòng trị bệnh tốt nhất trong 4 nồng độ.

Từ kết quả thí nghiệm cho thấy, TKT có khả năng ức chế mầm bệnh hiệu quả thông qua cơ chế ký sinh trực tiếp lên vi khuẩn gây bệnh. Kết quả tương tự cũng đã được ghi nhận trong nghiên cứu của Tanaka *et al.* (1990), Saccardi *et al.* (1992). Hiệu quả kiểm soát bệnh thối gốc lúa do vi khuẩn *Erwinia chrysanthemi* gây ra phụ thuộc vào nồng độ TKT ban đầu khi phun. Trong nghiên cứu về biện pháp cải thiện hiệu quả của TKT trong kiểm soát bệnh đốm vi khuẩn trên cà chua của Balogh (2003) thì nồng độ 10^6 và 10^8 pfu/ml cũng cho hiệu quả giảm bệnh, tuy nhiên nồng độ 10^4 pfu/ml không hiệu quả trong điều kiện nhà lưới. Ở điều kiện ngoài đồng, khi áp dụng nồng độ 10^7 và 10^8 pfu/ml bệnh đều thể hiện khả năng kiểm soát bệnh. Các nghiên cứu đã chứng minh rằng TKT cần áp dụng ở nồng độ cao để kiểm soát bệnh hiệu quả. Vài năm sau, Lang *et al.* (2007) cũng đã khảo sát hiệu quả của TKT ở nồng độ từ 10^5 đến 10^8 pfu/ml trong việc quản lý bệnh cháy lá hành bởi vi khuẩn *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii* đều thể hiện hiệu quả ở tất cả các nồng độ xử lý.

Bên cạnh việc áp dụng nồng độ cao, TKT cần phải tiếp xúc với tế bào ký chủ trước khi thể thực khuẩn bị phá hủy (Jones *et al.*, 2007). Việc chúng bệnh bằng biện pháp châm kim (ủ bệnh 24 giờ) đã tạo điều kiện thuận lợi cho vi khuẩn gây bệnh xâm nhiễm vào mô cây theo vết thương cơ học, do đó chúng có thể hạn chế sự tác động của TKT. Kết quả nghiên cứu đã chỉ ra rằng thời gian ứng dụng TKT là một trong những yếu tố quan trọng để kiểm soát vi khuẩn gây bệnh. Việc tưới TKT trước khi lây bệnh ở các nghiệm thức đều cho hiệu quả giảm bệnh, điều này cho thấy TKT có khả năng quản lý tốt bệnh thối gốc lúa do vi khuẩn *Erwinia chrysanthemi* gây ra khi tiếp xúc sớm và đồng hành với sự xuất hiện của vi khuẩn gây bệnh. Balogh *et al.* (2008) cũng đã ghi nhận TKT có thể kiểm soát được bệnh nếu như được áp dụng ở nồng độ cao và hiện diện trước khi có sự xuất hiện của vi khuẩn gây bệnh vài giờ. Kết quả này liên quan đến điều kiện thí nghiệm nhà lưới có thực hiện lây bệnh nhân tạo, có nghĩa là mầm bệnh sẽ hiện diện sau khi xử lý vi khuẩn trong thời gian ngắn, chính điều kiện này làm cho liệu pháp thực khuẩn thể có hiệu quả. Tuy nhiên ở điều kiện ngoài đồng, việc chọn thời điểm xử lý thực khuẩn thể cần dựa vào sự chớm xuất hiện của vi khuẩn gây bệnh ngoài đồng, nếu bệnh chưa xuất hiện thì việc xử lý thực khuẩn thể trước sẽ không mang lại hiệu quả



Hình 2: Hiệu quả phòng trị bệnh thối gốc trên lúa do vi khuẩn *E. chrysanthemi* ở các nghiệm thức xử lý với các nồng độ khác nhau ở thời điểm 4 NSKLB

4 KẾT LUẬN

Kết quả đã phân lập được 35 dòng TKT ký sinh trên 14 chủng vi khuẩn *Erwinia chrysanthemi* gây bệnh thối gốc lúa, phân bố ở các tỉnh Vĩnh Long, Cần Thơ, Kiên Giang và Sóc Trăng. Có 8 dòng TKT Φ EchST19a, Φ EchCT12, Φ EchKG3b, Φ EchKG5a, Φ EchKG8b, Φ EchKG11b, Φ EchST19b và Φ EchST22 phân bố ở 3 tỉnh: Cần Thơ, Kiên Giang và Sóc Trăng có khả năng ký sinh nhiều chủng vi khuẩn. Trong đó, dòng TKT Φ EchKG8b cho đường kính phân giải vi khuẩn cao nhất. Ở điều kiện nhà lưới, 4 mật độ độ áp dụng TKT 10^5 , 10^6 , 10^7 và 10^8 pfu/ml đều mang lại hiệu quả phòng trị bệnh thối gốc lúa. Mật độ 10^8 pfu/ml cho hiệu quả phòng trị cao nhất.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Abhilash, M., Vidya, A., Agadevi, T., 2008. Bacteriophage Therapy: A War Against Antibiotic Resistant Bacteria. The Internet Journal of Alternative Medicine. Volume 7 Number 1.

Balogh, B., 2006. Characterization and use of bacteriophages associated with citrus bacterial pathogens for disease control, Athesis presented to the graduate school of the University of

Florida in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy, University of Florida, 112p.

Balogh, B., Canteros, B.I., Stall R.E., Jones, J.B., 2008. Control of citrus canker and citrus bacterial spot with bacteriophages. Plant Dis.92:1048-1052.

Balogh, B., Jones J.B., Momol M.T., Olson S.M., Obradovic A., 2003. Improved efficacy of newly formulated bacteriophages for management of bacterial spot on tomato. Plant Dis.87:949-954.

CABI, 2001. Crop protection Compendium. *Erwinia chrysanthemi*. CABI publishing.

Goszczyńska, T., Serfontein, J., Serfontein, S., 2000. Introduction to practical phyto bacteriology. Switzerland: SAFRINET.

Goto, M., 1979. Bacterial foot rot of rice caused by a strain of *Erwinia chrysanthemi*. Phytopathology 69:213-216.

Janse, J. D., 2009. Phytop bacteriology PRINCIPLES AND PRACTICE: CABI.

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 45:245-262.

- Karin, C.V., Robert, J. H., William, G.V., 2013. Microbiology for the Healthcare Professional. Elsevier Health Sciences. P.147.
- Kutter, E. and Sulakvelidze, A., 2005. Bacteriophages: Biology and Applications, CRC Press, 405p.
- Lang, J. M., Gent D. H. and Schwartz H. F., 2007. Management of *Xanthomonas* leaf blight of onion with bacteriophages and a plant activator. Plant Dis. 91:871-878.
- 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* pv. *oryzae* của một số chủng thực khuẩn thể ở Đồng bằng sông Cửu Long. Luận văn tốt nghiệp cao học. Khoa Nông nghiệp và Sinh học ứng dụng. Trường Đại học Cần Thơ.
- Nguyễn Minh Tâm, 2015. Phân lập và khảo sát hiệu quả phòng trị của thực khuẩn thể đối với bệnh héo xanh dưa leo do vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* trong điều kiện in vitro và nhà lưới. Luận văn tốt nghiệp kỹ sư Bảo vệ Thực vật. Khoa Nông nghiệp và Sinh học Ứng dụng. Trường Đại học Cần Thơ.
- Nguyễn Thị Trúc Giang, Đoàn Thị Kiều Tiên và Nguyễn Thị Thu Nga, 2014.
- Phạm Văn Kim, 2015. Các bệnh hại lúa quan trọng ở Đồng bằng sông Cửu Long. Nhà xuất bản Nông nghiệp.
- Phùng Thị Thanh Thảo, 2014. Hiệu quả của vi khuẩn vùng rễ trong phòng trừ bệnh thối gốc lúa do vi khuẩn *Erwinia* sp. trong điều kiện nhà lưới. Luận văn tốt nghiệp thạc sĩ Bảo vệ Thực vật. Khoa Nông nghiệp và Sinh học Ứng dụng. Trường Đại học Cần Thơ.
- Saccardi, A., Gambin, E., Zaccardelli, M., Barone, G. and Mazzucchi, U., 1993. *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* control trials with phage treatments on peaches in the orchard. Phytopathol Mediterr. 32:206-10.
- Schnabel, E.L., Fernando, W.G.D., Meyer, M.P., Jones, A.L., Jackson, L.E., 1999. Bacteriophage of *Erwinia amylovora* and their potential for biocontrol. Acta Hort. 489:649-54.
- Tanaka, H., Negishi, H., and Maeda, H., 1990. Control of tobacco bacterial wilt by an avirulent strain of *Pseudomonas solanacearum* M4S and its bacteriophage. An. Phytopathol. Soc. Japan 56:243-246.
- VanTwest, R. and Kropinshki, A. M., 2009. Bacteriophage enrichment from water and soil. Bacteriophages: Methods and Protocols, Volume 1: Isolation, Characterization, and Interactions, 15-21. Springer Protocols.
- Wommack, K. E. and Colwell, R. R., 2000. Virioplankton: Viruses in Aquatic Ecosystems. Microbiology and Molecular Biology Reviews (1): 69-114.