

XÁC ĐỊNH TÁC NHÂN VI KHUẨN GÂY BỆNH LOÉT THÂN XÌ MỦ TRÊN CÂY MÍT (*Artocarpus heterophyllus* Lam.)

Hứa Thanh Hải¹, Nguyễn Huỳnh Cao Quí¹,
Đoàn Thị Kiều Tiên¹, Lê Thanh Toàn¹,
Mai Văn Trí², Nguyễn Thị Thu Nga¹

¹ Bộ môn Bảo vệ thực vật, Khoa Nông nghiệp, Đại học Cần Thơ

² Trung tâm Nghiên cứu Cây ăn quả miền Đông Nam Bộ,
Viện Cây ăn quả miền Nam

ABSTRACT

Identification of bacterial agent causing gummosis stem canker on jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lam.)

Gummosis stem canker is a new emerging disease on jackfruit cv. Sieu Som in Vietnam causing stem canker, gummosis, and vascular brownish discoloration. The disease may quickly kills the above parts of infected branches or trunks. This study was conducted to determine the causal agent of the disease through the Koch postulates combined with molecular and biochemical methods. The isolated bacterium from infected jackfruit is able to cause hypersensitive reaction on chili leaf by leaf infiltration. When the bacterial solution was injected into jackfruit stems, the bacteria were seen flowing to the upper xylem and turning the infected xylem to brown (stem canker) three weeks after the injection. Bacterial reisolation from the stem canker obtained bacterial strain similar to the initial artificial inoculation. Based on testing bacterial characteristics including solubilization on 3% KOH, using Glucose in both aerobic and anaerobic conditions, and white colony on YDC medium, the bacterial isolate was classified belong to Pectobacterium genus. By sequencing the 16S rRNA gene of the bacterial isolate after PCR amplification with 27F/1492R primers and then comparing with the published sequences on NCBI by BLAST, the bacterial isolate showed high similarity with two species P. carotovorum and P. aroidearum. Based on its characteristic without growth in Tween 80, the bacterial isolate was clarified as P. carotovorum. Therefore, the causal agent of gummosis stem canker and die-back on jackfruit cv. Sieu Som was proved as P. carotovorum.

Keywords: Gummosis stem canker, causal agent, jackfruit cv. Sieu Som.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây mít là cây ăn trái quan trọng có giá trị kinh tế cao ở Việt Nam. Hiện nay, giống mít Siêu Sớm đang được nông dân chú trọng phát triển do cho trái sớm, dễ trồng, phẩm chất và năng suất cao cũng như có lợi nhuận cao. Tỉnh Tiền Giang là một trong những tỉnh có diện tích trồng mít lớn nhất khu vực đồng bằng sông Cửu Long với tổng diện tích hơn 6.000 ha. Tuy nhiên, do quy mô diện tích và mức độ trồng tập trung thâm canh cao cùng một số yếu tố khác đã dẫn đến dịch bệnh gây hại ngày càng tăng. Từ năm 2017, bệnh loét thân xì mù (gọi theo triệu chứng bệnh) được ghi nhận ở huyện Cái Bè (Tiền Giang), ngày càng nghiêm trọng và trở thành yếu tố giới hạn sản xuất mít. Bệnh thường tấn công trên những cây từ 2 năm tuổi (Báo điện tử Tiền Giang, 2018). Triệu chứng được thấy khi những giọt nhựa cây (mủ) màu trắng tiết ra từ vết loét trên vỏ thân, khi lớp vỏ được cạo đi có thể thấy những vết hóa nâu chạy dọc theo mạch dẫn, mở rộng dần. Có thể có vết nứt dọc thân và có mùi thối. Lá phần phía trên vết bệnh vàng và rụng sớm; lá mới mọc thay thế thường nhỏ và phát triển kém; phần ngọn trụ lá khô dần và có thể chết. Ở Thái Lan, một bệnh trên mít có triệu chứng tương tự được gọi là loét (canker) hay chết ngược/ngọn (die-back) gây ra bởi vi khuẩn *Erwinia nigrifluens* (Chuenchitt và Wismitanant, 1996). Sau đó, bệnh chết ngược trên mít được ghi nhận và được báo cáo có liên quan đến hai loài vi khuẩn là *E. carotovora* và *E. nigrifluens* (Vareket *et al.*, 2005). Gần đây Lê Thanh Toàn và *ctv.* (2019) dùng phương pháp giải trình tự và phương pháp phân tích đặc điểm sinh hóa đã xác định bệnh loét thân xì mù trên mít ở Hậu Giang là do vi

khẩn *E. carotovora* gây ra. Nghiên cứu này nhằm xác định tác nhân gây bệnh loét thân xì mù trên mít Siêu Sớm tại tỉnh Tiền Giang bằng phương pháp lây bệnh nhân tạo theo quy trình Koch, phân tích đặc điểm sinh hóa kết hợp với giải trình tự gen nhằm cung cấp cơ sở cho các nghiên cứu phòng trừ bệnh trong tương lai.

II. PHƯƠNG TIỆN VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Phương tiện và vật liệu nghiên cứu

Mẫu bệnh loét thân xì mù trên mít Siêu Sớm được thu thập tại các vườn mít thuộc huyện Cái Bè, tỉnh Tiền Giang.

Môi trường phân lập và nuôi cấy King's B (peptone 20 gr, glycerol 15 ml, K_2HPO_4 1,5 gr, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1,5 gr, agar 20 gr, nước cất vừa đủ 1000 ml, pH 7,2) (Shurtleff và Averre, 1997).

Môi trường kiểm tra sự tăng trưởng trong điều kiện yếm khí (Anaerobic growth, Peptone 2 gr, NaCl 5gr, KH_2PO_4 0,3 gr, agar 3 gr, Bromthymol blue (1%) 3 ml, glucose 10 gr) (Janse, 2009; Schaad *et al.* 2001).

Môi trường YDC (Yeast extract - dextrose - $CaCO_3$, yeast extract 10 gr, dextrose 20 gr, $CaCO_3$ 20 gr, agar 20 gr, nước cất vừa đủ 1000 ml, pH 7).

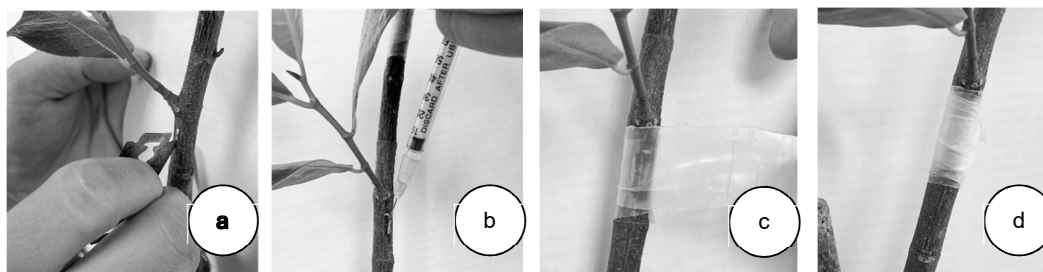
Hóa chất ly trích DNA, PCR, điện di: TE buffer, TAE buffer 1X, agarose 1%, loading dye blue, ethidium bromide, Phusa master mix 2X, cặp mồi phổ thông 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTC-3') và 1492R (5'-TACGGTTACCTTGTTACGACT-3'). Cặp mồi 27F/1492R sẽ khuếch đại vùng gen 16S rRNA với sản phẩm gen khuếch đại 1500 bp (Zhang *et al.*, 2020).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phân lập mẫu bệnh và kiểm chứng khả năng gây bệnh theo quy trình Koch

Áp dụng 4 bước của quy trình Koch (Agrios 2005; Burgess *et al.*, 2009) gồm: (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 nhân tạo ở điều kiện nhà lưới: Đầu tiên khử trùng bề mặt vị trí thân mít cần lây bệnh bằng cồn 70%, dùng dao mổ thanh

trùng tách phần vỏ thân một đoạn dài 1 - 2 cm ngang 3 - 5 mm ở vị trí phía trên mắt ghép, dùng kim tiêm đã thanh trùng với 1 ml huyền phù vi khuẩn tiêm vào phần cắt cho huyền phù đi vào mạch dẫn (huyền phù vi khuẩn ở $OD_{600nm} = 0,3$), sau đó lấp phần vỏ thân lại và cố định vị trí vết thương bằng parafilm (Hình 1) (Janse 2009). (iv). Quan sát triệu chứng xuất hiện, kiểm tra sự phát triển của vi khuẩn trong bó mạch dẫn sau thời gian lây bệnh và tái phân lập mầm bệnh và so sánh với mầm bệnh ban đầu.



Hình 1. Thực hiện lây bệnh nhân tạo lên cây mít Siêu Sớm

(a) Tạo vết thương, (b) Tiêm huyền phù vi khuẩn,
(c) Cố định vết thương bằng parafilm, (d) Sau khi đã cố định

2.2.2. Định danh bằng phương pháp sinh hóa

- Kiểm tra Gram vi khuẩn với dung dịch KOH 3% (Shurtleff và Averre, 1997):

Dùng đũa cấy vòng lúp vít ít khuẩn lạc vi khuẩn hòa đều trên phiến lam có nhỏ 1 giọt KOH 3%. Vi khuẩn gram âm (-) sau khi cho tiếp xúc với dung dịch KOH 3% sẽ thấy hiện tượng vi khuẩn tạo keo nhầy và kéo sợi. Vi khuẩn gram dương (+) sau khi cho vi khuẩn tiếp xúc dung dịch KOH 3% sẽ thấy hiện tượng vi khuẩn không tạo keo nhầy.

- Kiểm tra sử dụng carbohydrate trong điều kiện yếm khí (Janse, 2009):

Mục đích nhằm xác định vi khuẩn gây bệnh thuộc nhóm vi khuẩn hiếu khí hay kỵ khí. Chuẩn bị ống nghiệm chứa 5 ml môi trường Hugh và Leifson đã thanh trùng (pH 7,1) để ấm 50 - 55°C, sau đó cho 0,5 ml dung dịch glucose 10% vô trùng (bằng phương pháp qua màng lọc vi khuẩn) vào ống nghiệm. Thực hiện cấy vi khuẩn vào 2 ống nghiệm, sau đó phủ lên bề mặt môi trường một lớp sáp parafin tan chảy (vô trùng), sâu khoảng 5 mm vào 1 trong 2 ống nghiệm để tạo điều kiện yếm khí. Đặt các ống nghiệm

ở điều kiện nhiệt độ phòng và quan sát kết quả thông qua sự đổi màu của chất chỉ thị màu bromthymol blue trong 24 - 48 giờ. Vi khuẩn có khả năng sống yếm khí sẽ sử dụng glucose và sinh ra acid làm giảm pH của môi trường từ đó sẽ làm đổi màu ở ống nghiệm bromthymol blue từ màu xanh nhạt chuyển sang màu vàng.

- Kiểm tra khả năng tạo khuẩn lạc vàng trên môi trường YDC (Schaad *et al.*, 2001):

Việc kiểm tra nhằm xác định vi khuẩn thuộc chi *Pectobacterium* hay chi *Pantoea* dựa vào tạo khuẩn lạc màu vàng hay màu trắng trên môi trường YDC. Thực hiện cấy vạch đơn vi khuẩn trên đĩa Petri môi trường YDC (pH 7), sau đó đĩa được đặt trong điều kiện phòng quan sát và ghi nhận kết quả sau 24 - 48 giờ. Nếu vi khuẩn sinh trưởng được trên môi trường YDC và tạo khuẩn lạc màu trắng là chi *Pectobacterium* hoặc màu vàng là chi *Pantoea*.

2.2.3. Định danh dựa trên kỹ thuật giải trình tự gen của sản phẩm DNA khuếch đại bằng cặp mồi 27F/1492R (Zhang *et al.*, 2020)

- Ly trích DNA: Vít khuẩn lạc vi khuẩn để vào trong 400 μ l TE buffer 1X trong ống eppendorf. Đun sôi ống eppendorf 20 phút, sau đó để mẫu trong nước đá 5 phút. Thực hiện ly tâm 13.200 vòng/phút trong 5 phút. Rút 150 μ l phần dịch trong ở trên chứa DNA cho vào ống eppendorf khác và trữ ở -20°C để chạy PCR (Junior *et al.*, 2016).

- Phản ứng PCR: Thể tích phản ứng PCR 50 μ l (protocol PHUSA MASTER MIX) gồm Phusa master mix 2X 25 μ l, DNA mẫu 2 μ l, mồi F (27F) 2 μ l, mồi R (1492R) 2 μ l, 19 μ l nước PCR (Phusa PCR buffer 10X). Phản ứng PCR được thực hiện theo chu trình nhiệt: khởi đầu

biến tính ở 94°C trong 4 phút, tiếp theo là 35 chu trình gồm 3 bước: 94°C trong 45 giây (biến tính), 55°C trong 45 giây (bắt cặp mồi), 72°C trong 90 giây (tổng hợp kéo dài), cuối cùng là 72°C trong 10 phút và giữ ở 4°C. Sản phẩm PCR nhuộm với loading dye blue được điện di trên gel agarose 1% trong TAE buffer 1X chạy trên thiết bị điện di ở hiệu điện thế 50V trong 30 phút.

- Giải trình tự và phân tích trình tự: Sản phẩm PCR được gửi giải trình tự tại Công ty TNHH MTV Sinh hóa Phù Sa. 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>), so sánh độ tương đồng của các dòng đã công bố trên cơ sở dữ liệu của NCBI để xác định tên vi khuẩn.

2.2.4. Xác định đến mức độ loài bằng kiểm tra đặc tính gây thối mềm trên khoai tây và đặc tính sinh trưởng trên môi trường Tween 80 ở 37°C

Mục đích để phân biệt hai loài vi khuẩn *Pectobacterium carotovorum* và *Pectobacterium adroidearum* sau kết quả phân tích giải trình tự trên NCBI (Nabhan *et al.*, 2013).

Kiểm tra khả năng gây thối mềm khoai tây: Khoai tây được rửa sạch, sau đó cắt từng lát dày 7 - 8 mm. Trước khi xử lý vi khuẩn, lát khoai tây được khử trùng bằng cách lau qua cồn 70%. Mảnh khoai tây được đặt trong đĩa petri giữ ẩm bằng giấy thấm vô trùng. Một lúp khuẩn lạc vi khuẩn nuôi cấy trên môi trường King's B trong 36 giờ được đặt vào giữa miếng khoai tây. Sau đó, đĩa petri được đặt ở nhiệt độ 20 - 24°C trong 48 giờ. Quan sát và ghi nhận hiện tượng thối mềm xảy ra hay không sau khi gạt bỏ lớp vi khuẩn (Goszczyńska *et al.*, 2000).

Kiểm tra khả năng vi khuẩn tăng trưởng trong môi trường Tween 80: 4 ml môi trường Tween 80 (2 g KH_2PO_4 , 0,1 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5 g NaCl, 0,5g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 10 ml Tween 80, 1000 ml nước cất, pH 6,8) được chuẩn bị cho vào ống nghiệm và thanh trùng ở 121°C trong 20 phút. Sau đó, cấy nguồn vi khuẩn gây bệnh ở thể tăng trưởng vào ống nghiệm và đặt ở 37°C trên máy lắc ngang, ghi nhận sự phát triển vi khuẩn sau 24 giờ và 48 giờ. Môi trường trong ống nghiệm chuyển từ không màu sang màu trắng đục sau khi thêm vi khuẩn ở thời điểm 24 giờ và 48 giờ chứng tỏ vi khuẩn có sử dụng Tween 80 làm nguồn carbon duy nhất để phát triển, ngược lại môi trường vẫn như nguyên như ban đầu chứng tỏ vi khuẩn không có khả năng sử dụng Tween 80 làm nguồn carbon để phát triển (Arai *et al.*, 1970 có sửa đổi). Đối chứng dương là ống nghiệm nuôi cấy vi khuẩn *Xanthomonas*

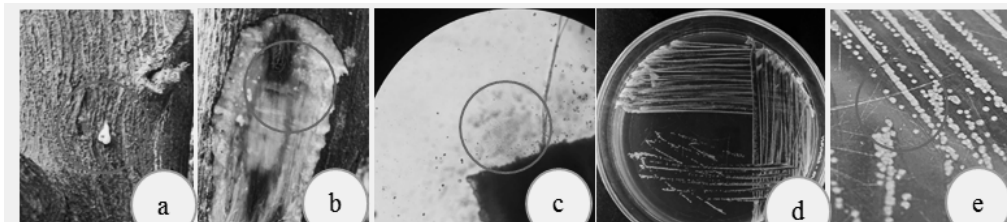
phát triển được trên môi trường Tween 80 (Goszczyńska *et al.*, 1998).

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân lập mẫu bệnh, kiểm chứng khả năng gây bệnh theo quy trình Koch

Bệnh loét thân xì mủ gây hại chủ yếu ở những cây từ 2 năm tuổi, triệu chứng ngoài vườn chủ yếu là các giọt mủ màu trắng chảy ra từ thân cây (Hình 2a), sau khi cạo lớp vỏ thân ra, ta thấy các mạch dẫn bị hóa nâu (Hình 2b), hiện tượng nứt thân chỉ xuất hiện khi cây đã chết một thời gian.

Mẫu được phân lập và quan sát dưới kính hiển vi để kiểm tra dòng tuôn vi khuẩn trên vật kính 10X (Hình 2c), tiến hành nuôi cấy và tách ròng sau đó quan sát đặc điểm hình thái của khuẩn lạc (Hình 2d, 2e).



Hình 2. Triệu chứng vết bệnh, dòng tuôn vi khuẩn và khuẩn lạc vi khuẩn đã tách ròng

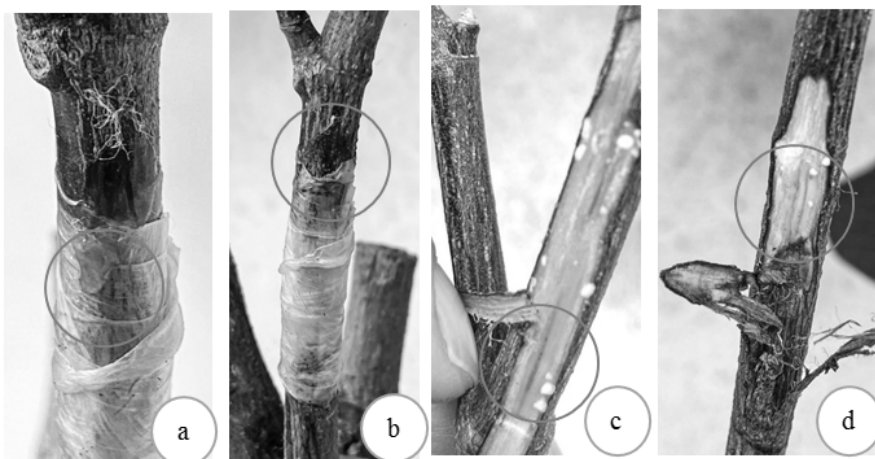
Kết quả kiểm tra khả năng gây phản ứng siêu nhạy cảm trên cây ớt để loại trừ khả năng là vi khuẩn hoại sinh cho thấy mẫu vi khuẩn phân lập có khả năng gây phản ứng siêu nhạy cảm trên ớt (Hình 3).



Hình 3. Phản ứng siêu nhạy cảm tạo ra trên lá ớt khi tiêm các dòng vi khuẩn phân lập được sau 24 giờ

Kết quả lây bệnh nhân tạo sau 3 tuần quan sát, có 1 dòng vi khuẩn gây bệnh thể hiện rõ các triệu chứng điển hình của

bệnh (Hình 4). Sau đó tiến hành tái phân lập và so sánh với mầm bệnh được phân lập lúc ban đầu (Hình 5).

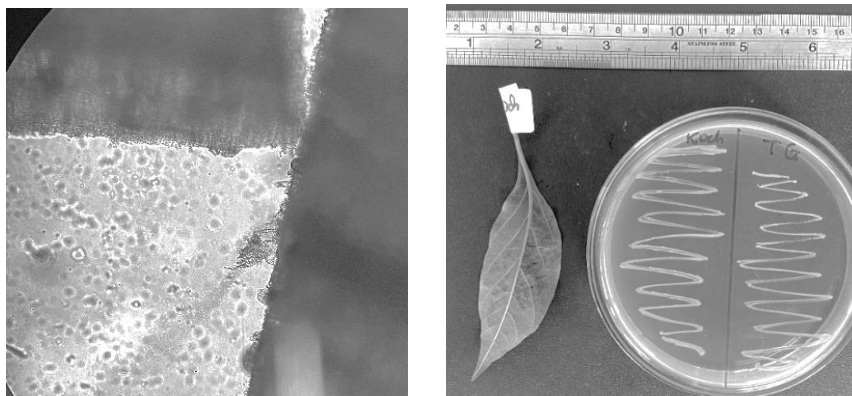


Hình 4. Triệu chứng vết bệnh quan sát được sau khi lây bệnh

- (a) Vết bệnh sau khi lây bệnh 7 ngày, (b) Vết bệnh sau khi lây bệnh 14 ngày, (c) Mạch dẫn hóa nâu sau 21 ngày lây bệnh (phía dưới vị trí đã lây bệnh), (d) Mạch dẫn hóa nâu sau 21 ngày lây bệnh (phía trên vị trí đã lây bệnh)

Kết quả kiểm tra dòng tuôn vi khuẩn tại vị trí mạch dẫn hóa nâu dưới kính hiển vi ghi nhận vi khuẩn tuôn dòng với mật số cao (Hình 5a). Mẫu vi khuẩn tái phân lập cho hình thái giống như nguồn vi

khuẩn lây bệnh phân lập được lúc ban đầu và cũng gây phản ứng siêu nhạy cảm trên ớt (Hình 5b). Như vậy, dòng vi khuẩn lây bệnh nhân tạo là tác nhân gây loét thân xì mủ trên mít Siêu Sớm.



Hình 5. Kiểm tra sự hiện diện vi khuẩn trong mô thực vật sau lây bệnh và kết quả tái phân lập vi khuẩn từ mô bệnh

- (a) Dòng tuôn vi khuẩn quan sát trên kính hiển vi ở vật kính 10X, (b) Kiểm tra phản ứng siêu nhạy cảm và so sánh hình thái khuẩn lạc với mầm bệnh ban đầu

3.2. Kết quả định danh tác nhân bằng phương pháp sinh hóa

- Kiểm tra Gram vi khuẩn với dung dịch KOH 3% (Shurtleff và Averre, 1997):

Khuẩn lạc vi khuẩn gây bệnh có hiện tượng tạo keo nhầy và kéo sợi chỉ (Hình 6a), vậy nên có thể kết luận vi khuẩn này thuộc nhóm vi khuẩn Gram âm gồm một số chi như: *Pectobacterium*, *Pantoea*, *Xylophilus*, *Xanthomonas*, *Pseudomonas*, *Acidovorax*, *Ralstonia* theo Schaad *et al.* (2010).

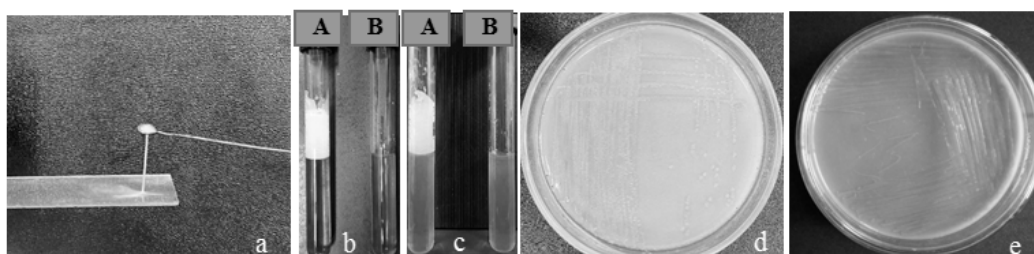
- Kiểm tra khả năng sử dụng carbonhydrate trong điều kiện hiếu và yếm khí:

Sau 48 giờ nuôi vi khuẩn trong ống nghiệm A ở điều kiện hiếu khí (không phủ lớp parafin) và ống nghiệm B ở điều kiện yếm khí (có phủ parafin), môi trường nuôi cấy đều đổi màu từ xanh sang vàng (Hình 6b và 6c). Sự chuyển màu là do trong quá trình sinh trưởng, vi khuẩn đã sinh ra acid làm cho pH trong môi

trường chuyển từ tính kiềm (pH 7,1) sang tính acid. Chứng tỏ mẫu vi khuẩn có khả năng sinh trưởng, phát triển và sử dụng nguồn dinh dưỡng là glucose có trong môi trường. Theo Schaad *et al.* (2001), dựa vào đặc tính có thể sinh trưởng và phát triển trong môi trường yếm khí và hiếu khí nên dòng vi khuẩn này được xác định thuộc một trong hai chi *Pantoea* và *Pectobacterium*.

- Kiểm tra khả năng sinh trưởng và phát triển của vi khuẩn trên môi trường YDC:

Mẫu vi khuẩn gây bệnh loét thân xì mù trên cây mít được cấy lên môi trường YDC. Sau 48 giờ đặt trong điều kiện phòng, kết quả cho thấy vi khuẩn được phân lập sinh trưởng, phát triển tạo khuẩn lạc màu trắng trơn bóng trên môi trường YDC (Hình 6d). Như vậy, ta có thể kết luận được đây vi khuẩn gây bệnh thuộc chi *Pectobacterium* (Schaad *et al.*, 2001).

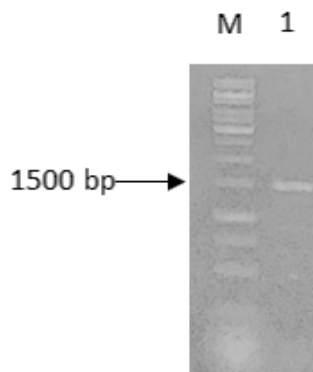


Hình 6. Kết quả định danh tác nhân bằng phương pháp sinh hóa
(a) Kiểm tra Gram vi khuẩn với KOH 3%; (b, c) Kiểm tra khả năng vi khuẩn sống ở điều kiện yếm khí và hiếu khí; (d) Vi khuẩn *Pectobacterium* tạo khuẩn lạc màu trắng trên môi trường YDC, (e) Vi khuẩn *Xanthomonas* tạo khuẩn lạc màu vàng trên môi trường YDC (Schaad *et al.*, 2001)

3.3. Định danh tác nhân bằng phương pháp sinh học phân tử

Dựa vào kết quả định danh bằng phương pháp sinh hóa thì bước đầu đã xác định được vi khuẩn phân lập được cây mít bị bệnh loét thân xì mủ là chi *Pectobacterium*.

Qua kết quả chạy PCR, sản phẩm khuếch đại bởi cặp mồi 27F/1492R thể hiện băng trên gel agarose 1% với trọng lượng phân tử 1500 bp (Hình 7). Sau khi giải trình tự, kết quả so sánh với các trình tự trên NCBI bằng công cụ tìm kiếm BLAST (Hình 8) ghi nhận tương đồng cao trên 98,8% với hai loài *Pectobacterium carotovorum* và *Pectobacterium aroidearum*.



M: Thang chuẩn 1kb,
Giếng 1: dòng VK gây bệnh

Hình 7. Kết quả điện di sản phẩm PCR
dòng vi khuẩn gây loét thân xì mủ sử
dụng cặp mồi 27F và 1492R

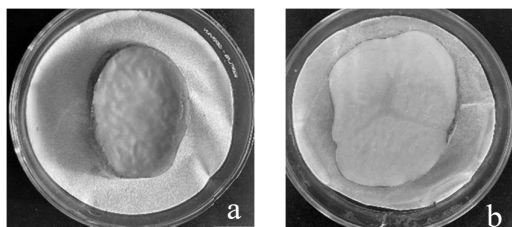
Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
☒ <i>Pectobacterium carotovorum</i> strain 141108 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1447	1447	98%	0.0	98.88%	K0525243.1
☒ <i>Pectobacterium aroidearum</i> strain 3998C 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1443	1443	98%	0.0	98.88%	KY446053.1
☒ <i>Pectobacterium aroidearum</i> strain 3998B 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1443	1443	98%	0.0	98.88%	KY446052.1
☒ <i>Pectobacterium aroidearum</i> strain 3998A 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1443	1443	98%	0.0	98.88%	KY446051.1
☒ <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> strain Pec1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1423	1423	97%	0.0	98.87%	MF532688.1
☒ <i>Pectobacterium</i> sp. strain 16-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1448	1448	99%	0.0	98.77%	MT613385.1
☒ Uncultured <i>Enterobacteriaceae</i> bacterium clone 2-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1448	1448	99%	0.0	98.77%	G0464391.1
☒ <i>Pectobacterium</i> sp. strain M1M1-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1443	1443	99%	0.0	98.66%	MT613390.1
☒ <i>Pectobacterium</i> sp. strain M1M1-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1443	1443	99%	0.0	98.66%	MT613389.1
☒ <i>Pectobacterium</i> sp. strain 41-3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1443	1443	99%	0.0	98.66%	MT613388.1
☒ <i>Pectobacterium</i> sp. strain 44-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1443	1443	99%	0.0	98.66%	MT613387.1
☒ <i>Pectobacterium</i> sp. strain 711028B 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1443	1443	99%	0.0	98.66%	MT613386.1
☒ <i>Enterobacteriaceae</i> bacterium A2JM 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1362	1362	93%	0.0	96.57%	AY338233.2
☒ <i>Pectobacterium aroidearum</i> 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1354	1354	93%	0.0	98.56%	KP151651.1
☒ <i>Pectobacterium aroidearum</i> strain MPS06 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1402	1402	96%	0.0	98.49%	MF454224.1
☒ <i>Pectobacterium carotovorum</i> 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1386	1386	95%	0.0	98.48%	

Hình 8. Kết quả so sánh kết quả giải trình tự gen 16S rDNA với ngân hàng gen NCBI bằng công cụ BLAST

Vì vậy, để xác định chính xác loài gây hại trên mít Siêu Sớm, đặc tính sinh hóa của 2 loài này cần phải được khảo sát.

3.4. Khả năng gây thối mềm khoai tây và khả năng tăng trưởng trên môi trường Tween 80 của dòng vi khuẩn gây bệnh

Kết quả kiểm tra khả năng gây thối mềm trên củ khoai tây sau 48 giờ cho thấy củ khoai tây bị thối mềm và có mùi hôi. Kết quả này cũng giống như nghiên cứu của Nabhan *et al.* (2013) đã công bố các hai vi khuẩn *Pectobacterium carotovorum* và *P. aroidearum* có gây hiện tượng thối mềm trên khoai tây.

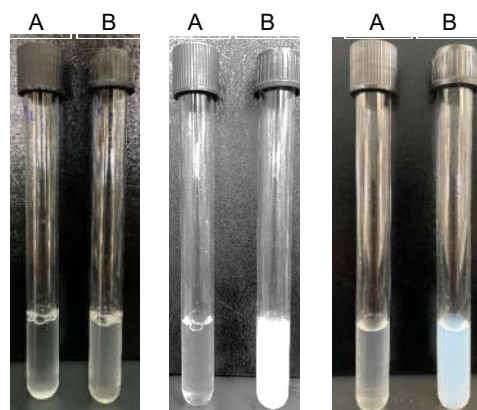


Hình 9. Khả năng gây thối mềm trên khoai tây của dòng vi khuẩn gây bệnh

- (a) Mảnh khoai tây bị thối nhũn khi có cấy vi khuẩn gây bệnh
- (b) Mảnh khoai tây đối chứng không có cấy vi khuẩn

Kết quả kiểm tra trên môi trường Tween 80 sau 24 giờ và 48 giờ (Hình 10) cho thấy vi khuẩn gây bệnh loét thân xì mủ không có khả năng sinh trưởng trong môi trường Tween 80 (ống nghiệm A vẫn giữ nguyên màu môi trường), còn đối với mẫu vi khuẩn *Xanthomonas* sp. (đối chứng) sinh trưởng được nên làm cho môi trường từ màu trắng sang màu trắng đục (ống nghiệm B). Dựa theo kết quả nghiên cứu của Nabhan *et al.* (2013) thì loài *Pectobacterium aroidearum* có khả năng

sinh trưởng trên môi trường Tween 80, còn loài *Pectobacterium carotovorum* không có khả năng sinh trưởng trên môi trường Tween 80.



Hình 10. Kết quả kiểm tra khả năng sinh trưởng trên môi trường Tween 80

- Ống nghiệm A: Đũa vi khuẩn gây bệnh loét thân xì mủ
- Ống nghiệm B: Đũa vi khuẩn *Xanthomonas* sp. (đối chứng)
- (a) Thời điểm vừa thêm vi khuẩn
- (b) Thời điểm 24 giờ sau khi nuôi cấy vi khuẩn
- (c) Thời điểm 48 giờ sau khi nuôi cấy vi khuẩn

Như vậy, mẫu vi khuẩn gây bệnh loét thân xì mủ trên mít là loài *Pectobacterium carotovorum*. Kết quả này tương đồng với ghi nhận của Varrket *et al.* (2015) và Lê Thanh Toàn (2019), chính là *Erwinia carotovora* hiện nay được gọi là *Pectobacterium carotovorum* là tác nhân gây bệnh loét thân xì mủ trên mít. Nghiên cứu này dựa vào phương pháp định danh truyền thống trước để xác định chi vi khuẩn, sau đó mới sử dụng kỹ thuật sinh học phân tử kết hợp với đặc tính sinh hóa để xác định đến mức độ loài. Kết quả này khẳng định được dòng vi khuẩn gây loét thân xì mủ trên mít tại Tiền Giang là *Pectobacterium carotovorum*.

IV. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

Tác nhân gây bệnh loét thân xì mù trên mít Siêu Sớm ở Tiền Giang được xác định là loài *Pectobacterium carotovorum* sử dụng phương pháp sinh hóa và sinh học phân tử. Việc xác nhận chính xác tác nhân là cơ sở khoa học cần thiết để nghiên cứu phát triển các biện pháp phòng trừ hiệu quả.

Để phát triển bền vững ngành sản xuất mít, việc nghiên cứu biện pháp quản lý bệnh loét thân cháy nhựa là cấp thiết.

Lời cảm ơn

Đề tài được thực hiện trong khuôn khổ đề tài cấp Bộ “Nghiên cứu chọn tạo giống và quy trình kỹ thuật thâm canh cây mít cho một số vùng chính ở các tỉnh phía Nam”.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Agrios, G. N. (2005). Plant Pathology. 5th edition. University of Florida. 992 pages.
- Arai T, Enomoto S., and Goto S. (1970). Determination of *Pseudomonas aeruginosa* by Biochemical Test Methods. *Japan. J. Microbiol. Vol.* 14 (4), 285 - 290.
- Burgess, L.W., E.K. Timothy, L. Tesoriero và Phan Thúy Hiền (2009). Cẩm nang chẩn đoán bệnh cây ở Việt Nam. ACIAR. 210 pages.
- Chuenchitt S. and Wismitanant B. (1996). Die-back: A new bacterial disease of champedak jack-fruit (*Artocarpus* sp. (Merr.) Thumb.). *Agris* 10(1-2): 19-29. Abstract in English.
- Goszczyńska T and 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: 65-72
- Goszczyńska T, Serfontein J.J. and Serfontein S. (2000). Introduction to practical phytopathology. Bacterial Diseases Unit ARC - Plant Protection Research Institute Pretoria, South Africa. 17 pages.
- Himel R. M., Khan A. A., Akanda A.M, Karim M. (2016). Characterization and identification of soft rot bacterial pathogens of different fruits in Bangladesh. *International Journal of Biosciences* 9(1) 1 - 9.
- <http://txcailay.tiengiang.gov.vn/chi-tiet-tin?Benh-nut-than-xi-mu-va-so-den-mui-mit-gay-thiet-hai-cho-nha-vuon/7957587>
- Nguyễn Sự, <https://baomoi.com/tien-giang-mo-rong-vung-chuyen-can-h-cay-an-qua/c/36310016.epi>
- <https://vov.vn/kinh-te/gia-mit-tang-cao-nong-dan-tien-giang-trong-o-at-bat-chap-khuyen-cao-967938.vov>
- Janse J.D. (2009). *Phytopathology principles and practice*. CABI.
- Junior J.C. R., Tamanini R., Fritegato B., de Oliveira A. M.; de Godoi Silva F., Fernandes F.; Augusto N. A., Beloti V. (2016). Efficiency of boiling and four other methods for genomic DNA extraction of deteriorating spore-forming bacteria from milk. *Ciências Agrárias, Londrina*, 37(5) 3069-3078.
- Lê Thanh Toàn, Lê Thị Thu Hà, Nguyễn Văn Chí Hải, Thái Ngọc Oanh, Phan Văn Hường, Đỗ Văn Bảo, Nguyễn Văn Măng (2019). Xác định tác nhân và hiệu quả phòng trị của một số nông dược đối với bệnh thối thân xì mù trên cây mít Changrai. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn* 2: 17 - 23
- Nabhan S, De Boer S.H., Maiss E. and Wydra K. (2013). *Pectobacterium aroidearum* sp. nov., a soft rot pathogen with preference for monocotyledonous plants. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 63, 2520 - 2525.
- Schaad N.W., Jones J.B. and W. Chun (2001). Laboratory Guide for identification of plant pathogenic bacteria. *Third edition. APS press*.
- Shurtleff, M. C. and C. W. Averre (1997). The plant disease clinic and field diagnosis of abiotic diseases. St Paul, MN, USA: APS Press.
- Vareket, R.; Thaveechai, N.; Hongprayoon, C.; Kositcharoenkul, N.; Chuenchitt, S.; W. Kositratana (2005). Identification and serological detection of bacterial organism causing die-back disease of jackfruit and champedak. *Proceedings of 43rd Kasetsart University Annual Conference, Subject: Plants*: 254 - 261.
- Zhang, W., Y. Chen, Q. Shi, B. Hou, and Q. Yang (2020) Identification of bacteria associated with periapical abscesses of primary teeth by sequence analysis of 16S rDNA clone libraries. *Microb. Pathog.* 141:103954.