

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC CẦN THƠ**

ĐOÀN THỊ KIỀU TIÊN

**NGHIÊN CỨU SỬ DỤNG THỰC KHUẨN THỂ
TRONG PHÒNG TRỊ BỆNH THỐI HẠT TRÊN LÚA
DO VI KHUẨN *Burkholderia glumae***

**LUẬN ÁN TIẾN SĨ
CHUYÊN NGÀNH BẢO VỆ THỰC VẬT
MÃ SỐ 62 62 01 12**

2022

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC CẦN THƠ**

**ĐOÀN THỊ KIỀU TIÊN
MÃ SỐ NCS: P0315002**

**NGHIÊN CỨU SỬ DỤNG THỰC KHUẨN THỂ
TRONG PHÒNG TRỊ BỆNH THỐI HẠT TRÊN LÚA
DO VI KHUẨN *Burkholderia glumae***

**LUẬN ÁN TIẾN SĨ
CHUYÊN NGÀNH BẢO VỆ THỰC VẬT
MÃ SỐ 62 62 01 12**

CÁN BỘ HƯỚNG DẪN

**PGS.TS. NGUYỄN THỊ THU NGÀ
PGS.TS. TRẦN THỊ THU THỦY**

2022

LỜI CẢM TẠ

Để hoàn thành luận án Tiến Sĩ, ngoài sự nỗ lực của bản thân trong quá trình học tập, tôi còn nhận được sự hỗ trợ và giúp đỡ tận tình của quý Thầy, Cô và đồng nghiệp.

Xin chân thành, đặc biệt bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc đến:

PGS.TS. Nguyễn Thị Thu Nga, người đã hướng dẫn, định hướng, hỗ trợ, tạo điều kiện và giúp đỡ tôi trong suốt quá trình nghiên cứu. Cô đã dành cho tôi nhiều thời gian, tâm sức, cho nhiều ý kiến, nhận xét quý báu để tôi hoàn thành luận án.

PGS.TS. Trần Thị Thu Thủy, người đã tận tình hướng dẫn, chỉ dạy, góp ý và luôn quan tâm, động viên, nhắc nhở kịp thời để tôi có thể hoàn thiện luận án.

Xin gửi lời cảm ơn chân thành đến:

PGS. TS. Lê Văn Vàng, PGS.TS. Lê Việt Dũng và GS. Kaeko Kamei đã tạo điều kiện để tôi được tham gia vào dự án JICA, tạo điều kiện cho tôi sang Nhật để học tập nâng cao kiến thức chuyên môn, phục vụ cho nghiên cứu luận án;

Chân thành gửi lời cảm ơn sâu sắc đến Ban Giám Hiệu trường Đại học Cần Thơ, Khoa sau Đại học, Khoa Nông nghiệp, phòng Đào tạo và các phòng ban chức năng khác của nhà trường đã tạo điều kiện thuận lợi cho tôi trong quá trình học tập và nghiên cứu.

Xin cảm ơn quý Thầy, Cô và các anh, chị đồng nghiệp trong Bộ môn Bảo vệ Thực vật, những người đã giảng dạy và giúp đỡ cho tôi trong suốt quá trình học tập, hướng dẫn các chuyên đề trong chương trình nghiên cứu sinh;

Cảm ơn các em sinh viên, những người đã không ngại khó khăn cùng với tôi đi thu mẫu, thực hiện nghiên cứu để hoàn thành luận án;

Cuối cùng, xin thành kính biết ơn Ba, Mẹ người đã sinh thành, nuôi dưỡng, dạy dỗ tôi nên người. Cảm ơn chồng và 2 con trai luôn ở bên cạnh, động viên, chia sẻ, giúp tôi có thêm động lực để phấn đấu, vượt qua những khó khăn trong suốt quá trình nghiên cứu luận án.

Đoàn Thị Kiều Tiên

CAM ĐOAN KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Tôi xin cam kết luận án là do bản thân nghiên cứu sinh thực hiện, không do người khác làm thay, các tài liệu tham khảo được nghiên cứu sinh xem xét, chọn lọc kỹ lưỡng và trích dẫn đầy đủ, kết quả nêu ra trong luận án được hoàn thành dựa trên 01 kết quả nghiên cứu học viên và 06 sinh viên, các kết quả của nghiên cứu này chưa được dùng cho bất cứ luận án cùng cấp nào khác.

CÁN BỘ HƯỚNG DẪN 1

CÁN BỘ HƯỚNG DẪN 2

TÁC GIẢ LUẬN ÁN



NGUYỄN THỊ THU NGA

TRẦN THỊ THU THỦY

ĐOÀN THỊ KIỀU TIÊN

TÓM TẮT

Luận án được thực hiện trong điều kiện phòng thí nghiệm Bệnh cây và nhà lưới thuộc Bộ môn Bảo vệ thực vật, Khoa Nông nghiệp, Trường Đại học Cần Thơ, vùng trồng lúa tại tỉnh Vĩnh Long và Viện Kỹ Thuật Kyoto Nhật Bản từ 2015 đến 2019. Luận án “Nghiên cứu sử dụng thực khuẩn thể trong phòng trị bệnh thối hạt trên lúa do vi khuẩn *Burkholderia glumae*” nhằm tuyển chọn những dòng thực khuẩn thể triển vọng có hiệu quả trong phòng trị bệnh thối hạt lúa do vi khuẩn *B. glumae* ở điều kiện ngoài đồng, từ đó khẳng định hiệu quả của biện pháp sinh học sử dụng thực khuẩn thể trong quản lý bệnh thối hạt lúa, góp phần giảm lượng thuốc hóa học trong môi trường. Luận án được hoàn thành với các nội dung chính như sau:

Nội dung một là phân lập, tuyển chọn thực khuẩn thể và vi khuẩn gây bệnh thối hạt lúa. Phân lập được 112 dòng thực khuẩn thể và 60 dòng vi khuẩn gây bệnh thối hạt lúa tại chín tỉnh đồng bằng sông Cửu Long của Việt Nam. Đã chọn được 8 dòng thực khuẩn thể (ΦBurTV25a, ΦBurDT46, ΦBurDT47a, ΦBurDT47b, ΦBurDT48a, ΦBurVL34, ΦBurVL39, ΦBurAG58) có phổ kí sinh rộng trên nhiều dòng vi khuẩn gây bệnh thối hạt (chiếm khoảng 75% trong tổng số vi khuẩn gây bệnh thối hạt), đồng thời cũng chọn 6 dòng vi khuẩn (BurVL21, BurDT46, BurDT50; BurDT51, BurKG52, BurKG57) gây bệnh thối hạt bị nhiều dòng thực khuẩn thể kí sinh (chiếm 55% dòng thực khuẩn thể kí sinh). Tiếp theo, xác định được 6 dòng vi khuẩn (BurVL21, BurDT46, BurDT50; BurDT51, BurKG52, BurKG57) gây bệnh thối hạt lúa bằng kỹ thuật sinh học phân tử với cặp mồi đặc hiệu 1416S/1414A là loài *Burkholderia glumae*. Qua đánh giá khả năng gây hại bệnh thối hạt lúa của 6 dòng vi khuẩn *B. glumae* (BurVL21, BurDT46, BurDT50; BurDT51, BurKG52, BurKG57) đã tìm ra dòng vi khuẩn BurDT46 được phân lập tại Đồng Tháp gây bệnh thối hạt cao hơn các dòng vi khuẩn còn lại. So sánh khả năng phân giải của 8 dòng thực khuẩn thể (ΦBurTV25a, ΦBurDT46, ΦBurDT47a, ΦBurDT47b, ΦBurDT48a, ΦBurVL34, ΦBurVL39, ΦBurAG58) trên vi khuẩn BurDT46 đã xác định được bốn dòng thực khuẩn thể (ΦBurVL 34, ΦBurAG58, ΦBurDT47a và ΦBurDT48a) cho đường kính phân giải cao hơn các dòng thực khuẩn thể còn lại.

Nội dung hai là đánh giá khả năng phòng trị bệnh thối hạt do vi khuẩn *B. glumae* của các dòng thực khuẩn thể triển vọng trong điều kiện nhà lưới. Đầu tiên, khảo sát khả năng phòng trị bệnh thối hạt lúa do vi khuẩn *B. glumae* DT46 của bốn dòng thực khuẩn thể triển vọng (ΦBurVL 34, ΦBurAG58, ΦBurDT47a và ΦBurDT48a) với việc xử lý từng dòng đơn lẻ hay hỗn hợp 4 dòng ở mật số 10^8 pfu/ml, kết quả cả bốn nghiệm thức xử lý TKT đơn hay HH TKT đều cho hiệu quả giảm bệnh thối hạt khác biệt với nghiệm thức đối chứng. Trong đó dòng thực khuẩn thể ΦBurAG58 cho hiệu quả giảm bệnh trên 70% cao hơn các nghiệm thức còn lại. Thứ hai, so sánh hiệu quả của dòng thực khuẩn thể ΦBurAG58 ở bốn mật số khác nhau (10^5 pfu/ml, 10^6 pfu/ml, 10^7 pfu/ml và 10^8 pfu/ml) trong phòng trị bệnh thối hạt lúa do vi khuẩn *B. glumae*, kết quả cả bốn mật số thực

khuẩn thể đều có tỷ lệ hạt nhiễm bệnh thấp hơn và khác biệt với nghiệm thức đối chứng, đặc biệt mật số 10^8 pfu/ml thể hiện hiệu quả phòng trị bệnh tốt nhất với tỷ lệ hạt bệnh thấp hơn và khác biệt so với các nghiệm thức còn lại. Hơn nữa, xác định được 2 thời điểm áp dụng thực khuẩn thể gồm phun thực khuẩn thể 2 giờ trước khi lây bệnh, hay phun thực khuẩn thể kết hợp 2 giờ trước khi lây bệnh và 5 ngày sau khi lây bệnh cho hiệu quả phòng trị bệnh cao hơn và khác biệt phun thực khuẩn thể 5 ngày sau khi lây bệnh.

Nội dung thứ ba là nghiên cứu định danh các dòng thực khuẩn thể triển vọng nhằm xác định tính an toàn của TKT khi áp dụng trong thực tế sản xuất. Về mặt hình thái cả ba dòng thực khuẩn thể (ΦBurVL34, ΦBurAG58, ΦBurDT47a) dưới kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM) đều thuộc họ *Podoviridae* với đặc điểm đầu là khối đa diện và đuôi ngắn. Về kết quả giải trình tự bộ genome của ba thực khuẩn thể ΦBurVL34, ΦBurAG58, ΦBurDT47a với kích thước bộ genome tuần tự là 44.657 bp, 36.275bp và 45.466 bp, đều có % G+C là 58%, đặc biệt cả ba thực khuẩn thể này đều thuộc nhóm thực khuẩn thể độc (virulent phage hay lytic phages) do bộ gen không có gen qui định enzyme integrase chỉ thể hiện ở thực khuẩn thể ôn hòa.

Nội dung thứ tư là đánh giá hiệu quả của các dòng thực khuẩn thể triển vọng phòng trị bệnh thối hạt lúa ở điều kiện ngoài đồng. Đầu tiên, khảo sát hiệu quả của việc xử lý thực khuẩn thể ΦBurAG58 đơn và hỗn hợp 3 dòng TKT (ΦBurVL 34, ΦBurAG58, ΦBurDT47a) ở mật số 10^8 pfu/ml với hai lần phun trước và sau khi trổ ở vụ Đông Xuân 2017-2018, kết quả đã ghi nhận nghiệm thức xử lý TKT ΦBurAG58 đơn hay hỗn hợp thực khuẩn thể giảm bệnh thối hạt tương đương với nghiệm thức xử lý oxolinic axit và khác biệt nghiệm thức đối chứng với hiệu quả giảm bệnh khoảng 50%, góp phần bảo vệ tỷ lệ hạt chắc và năng suất lúa. Thứ hai, khảo sát hiệu quả của nghiệm thức xử lý thực khuẩn thể ΦBurAG58 đơn và HH TKT (ΦBurVL 34, ΦBurAG58, ΦBurDT47a) ở hai mật số 10^7 pfu/ml và 10^8 pfu/ml, kết quả ΦBurAG58 (10^8 pfu/ml) và hỗn hợp thực khuẩn thể (10^8 pfu/ml) cho hiệu quả giảm bệnh thối hạt lúa cũng tương đương với nghiệm thức oxolinic axit với hiệu quả giảm bệnh khoảng 50%.

Nội dung thứ năm là khảo sát điều kiện nhân nuôi thực khuẩn thể ΦBurAG58 trong điều kiện phòng thí nghiệm. Kết quả ghi nhận môi trường King's B lỏng, Nutrient lỏng, PDA + Peptone lỏng cho mật số thực khuẩn thể cao hơn và khác biệt với môi trường PDA lỏng. Tiếp tục khảo sát thời gian cấy vi khuẩn kí chủ trước hay cùng lúc với thời gian cấy TKT lên khả năng nhân nuôi thực khuẩn thể ΦBurAG58 trên hai dạng môi trường King's B (King's B lỏng và King's B 0,8% agar). Kết quả thực khuẩn thể ΦBurAG58 cho mật số cao trong môi trường King's B lỏng ở điều kiện cấy vi khuẩn *B. glumae* trước 16 giờ sau đó bổ sung thực khuẩn thể. Ngoài ra, tìm ra chỉ số MOI là 1,0 cho log mật số thực khuẩn thể đạt giá trị 10,00 (tương ứng 10^{10} pfu/ml) cao hơn chỉ số MOI 0,01 và MOI 0,1. Cuối cùng, nhiệt độ 30°C cho log mật số thực khuẩn thể cao hơn và khác biệt với hai nhiệt độ 27°C và 37°C vào thời điểm 24 giờ sau khi nhân nuôi.

Từ khóa: bệnh thối hạt, *Burkholderia glumae*, cây lúa, thực khuẩn thể.

ABSTRACT

The thesis was conducted under the plant pathology laboratory and greenhouse conditions of the Plant Protection Department, College of Agriculture, Can Tho University, the location of Vinh Long Province and Kyoto Institute of Technology from 2015 to 2019. The thesis “Study on using of bacteriophages in controlling rice grain rot disease caused by *Burkholderia glumae*” aimed to select promising bacteriophage strains that are effective in the prevention of rice grain rot caused by *B. glumae* in the field, thereby confirming the effectiveness of biological control used by bacteriophages in the management of rice grain rot, contributes to reduce the amount of chemicals in the environment. The thesis is completed with the following main contents:

The first content was to isolate, screen the bacteriophages and bacteria that cause rice grain rot. There were to isolate 112 bacteriophages and 60 bacterial strains causing grain rot were isolated from nine provinces in the Mekong Delta of Vietnam. Collected eight bacteriophages (Φ BurTV25a, Φ BurDT46, Φ BurDT47a, Φ BurDT47b, Φ BurDT48a, Φ BurVL34, Φ BurVL39, Φ BurAG58) were selected based on their wide parasitic spectrum on many bacterial strains causing grain rot (about 75% of total bacteria causing grain rot disease), and also selected six bacterial strains causing grain rot (i. e. BurVL21, BurDT46, BurDT50; BurDT51, BurKG52, BurKG57) were lysed by bacteriophage (about 55% in a total 112 bacteriophages). Determination of the bacterial causal agent of rice grain rot was *Burkholderia glumae* by using PCR technique with specific primers 1416S/1414A. Evaluating pathogenicity of six *B. glumae* strains (i. e. BurVL21, BurDT46, BurDT50, BurDT51, BurKG52 and BurKG57) on rice, the result was that BurDT46 isolated in Dong Thap caused high grain rot disease than the remaining bacterial strains. Comparison of the lytic ability of these 8 bacteriophages to *B. glumae* DT46 showed that 4 bacteriophages as Φ BurDT47a, Φ BurDT48a, Φ BurVL34, Φ BurAG58 lysed this bacterium higher others.

The second content was to evaluate of the control ability of rice grain rot caused by *B. glumae* of four promising bacteriophages (Φ BurVL34, Φ BurAG58, Φ BurDT47a, Φ BurDT48a) in the greenhouse conditions. Firstly, examination of the control ability of bacteriophages to prevent bacterial grain rot caused by *B. glumae* DT46 with the treatment of individual phages or a four- phages mixture at titer 10^8 pfu/ml, results in all four single or mixed bacteriophages treatments that effectively reduce grain rot disease compared to the control treatment. In which, bacteriophage Φ BurAG58 gave a disease reduction efficiency of over 70% which was higher than other treatments. Secondly, comparing four different titers of Φ BurAG58 (10^5 pfu/ml, 10^6 pfu/ml, 10^7 pfu/ml, 10^8 pfu/ml) for controlling of rice bacterial grain rot caused by *B. glumae*, the result showed that all treatments gave lower the percentage of infected grains than the control, especially the titer of 10^8 pfu/ml gave lower percentage of infected grains than the other treatments.

Furthermore, determination of phage application including spraying bacteriophages at 2 hours before pathogen inoculation or combined spraying phage at 2 hours before pathogen inoculation and 5 days after pathogen inoculation expressed higher percentage of infected grains than the spraying bacteriophage at 5 days after pathogen inoculation.

The third content was the study of the identification of promising bacteriophages to determine the safety when applied in production practice. Morphology of three promising bacteriophage (i. e. Φ BurVL34, Φ BurAG58, Φ BurDT47a) under a transmitted electron microscope (TEM) belong to the family *Podoviridae* with icosahedral head and short tail. On the results of genome sequencing of the three phages Φ BurVL34, Φ BurAG58, Φ BurDT47a with a sequencing genome size of 44,657 bp, 36,275bp and 45,466 bp, all have a G+C% of 58%. Especially all of three bacteriophages belonged to virulent phages (or lytic phages) based on their genome do not consist gene encoding for integrase enzyme which only expressed on temperate phages.

The fourth content was to evaluate the effect of promising bacteriophages to control bacterial grain rot of rice in the field conditions. The first field trial was investigated the disease control efficiency of application as Φ BurAG58 single or phage cocktail (Φ BurVL 34, Φ BurAG58, Φ BurDT47a) at the density of 10^8 pfu/ml with two sprays before and after flowering stage in Winter – Spring crop (2017 – 2018), the results showed that Φ BurAG58 single and phage cocktail were equaled to the oxolinic acid and significantly lower percentage of infected grains, compared to the control, with disease reduction about 50%, and contributing to protect the percentage of filled grains and yield. The second field trial, examined the disease control efficiency of application as Φ BurAG58 single or phage cocktail (Φ BurVL 34, Φ BurAG58, Φ BurDT47a) at two titers 10^7 pfu/ml and 10^8 pfu/ml in Early Summer-Autumn crop (2018), the results showed that Φ BurAG58 (10^8 pfu/ ml) and phage cocktail (10^8 pfu/ml) expressed equal disease control ability to the oxolinic acid with control efficacy of bacterial grain rot disease about 50%.

The fifth content was study on the culture conditions of phage Φ BurAG58 in *in vitro*. Firstly, investigation of four kinds of medium in culturing phage, result showed that three media i.e. King's B broth, Nutrient broth and PDA + Peptone broth gave higher phage titer than PDA broth. Next, survey the time of culturing host bacteria before or at the same time as the time of culturing phage in multiplying phage Φ BurAG58 on two types of King's B medium (King's B liquid and King'B 0.8% agar). Phage Φ BurAG58 gave high density in a liquid King's B medium under the condition of culturing *B. glumae* bacteria 16 hours before adding bacteriophages. In addition, result found that MOI of 1.0 for the log of phage population reached a value of 10.00 (corresponding to 10^{10} pfu/ml) which was higher than the MOI of 0.01 and the MOI of 0.1. Lastly, investigation of temperature 30°C gave higher log of bacteriophage titer and was significant different from two temperatures of 27°C and 37°C at 24 hours after inoculation.

Keywords: bacteriophage, bacterial grain rot, *Burkholderial glumae*, rice

MỤC LỤC

LỜI CẢM TẠ.....	XV
CAM ĐOAN KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU.....	XVI
TÓM TẮT	XVII
ABSTRACT	XIX
MỤC LỤC	XXI
DANH SÁCH BẢNG.....	XXVI
DANH SÁCH HÌNH.....	XXVIII
DANH SÁCH CHỮ VIẾT TẮT	XXX
CHƯƠNG 1. GIỚI THIỆU.....	1
1.1 Tính cấp thiết của luận án	1
1.2 Mục đích nghiên cứu	2
1.3 Nội dung nghiên cứu.....	2
1.4 Tính mới của luận án	3
1.5 Đối tượng và phạm vi nghiên cứu	3
1.5.1 Đối tượng nghiên cứu	3
1.5.2 Phạm vi nghiên cứu.....	3
1.6 Ý nghĩa khoa học và thực tiễn	4
1.6.1 Ý nghĩa khoa học	4
1.6.2 Ý nghĩa thực tiễn.....	4
CHƯƠNG 2. TỔNG QUAN TÀI LIỆU	5
2.1 BỆNH THỐI HẠT LÚA	5
2.1.1 Lịch sử và tình hình gây hại.....	5
2.1.2 Triệu chứng bệnh thối hạt	5
2.1.3 Tác nhân	7
2.1.4 Sự xâm nhiễm và lưu tồn của vi khuẩn <i>Burkholderia glumae</i>	9
2.1.4.1 Sự xâm nhiễm	9
2.1.4.2 Sự lưu tồn.....	11
2.1.5 Các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình xâm nhiễm của vi khuẩn <i>Burkholderia glumae</i>	11
2.1.6 Phổ kí chủ.....	12
2.1.7 Các yếu tố ảnh hưởng độc tính của vi khuẩn <i>Burkholderia glumae</i>	12
2.1.7.1 Độc tố toxoflavin	12
2.1.7.2 Enzyme lipase	13
2.1.7.3 Khả năng di chuyển của chiên mao (Flagella)	13
2.1.7.4 Hệ thống cảm ứng III (type III effectors)	13
2.1.7.5 Exopolysaccharide (EPSs).....	13
2.1.7.6 Enzyme polygalacturonases	14
2.1.8 Biện pháp quản lí	14
2.1.8.1 Biện pháp hóa học	14
2.1.8.2 Biện pháp canh tác.....	15
2.1.8.3 Biện pháp sinh học.....	15

2.1.8.4 Biện pháp tổng hợp.....	16
2.2 TỔNG QUAN VỀ THỰC KHUẨN THỂ.....	16
2.2.1 Khái niệm về thực khuẩn thể	16
2.2.2 Lịch sử xuất hiện thực khuẩn thể	17
2.2.3 Phân loại thực khuẩn thể	20
2.2.3.1 Thực khuẩn thể dạng đuôi (tail phage)	22
2.2.3.2 Một số họ thực khuẩn thể khác	25
2.2.4 Quá trình xâm nhiễm của thực khuẩn thể vào tế bào vi khuẩn kí chủ	26
2.2.4.1 Chu trình sinh tan (lytic cycle)	27
2.2.4.2 Chu trình tiềm tan (lysogenic cycle).....	34
2.2.5 Nuôi cấy thực khuẩn thể	37
2.2.6 Hình dạng đốm tan (plaque).....	38
2.3 ỨNG DỤNG THỰC KHUẨN THỂ TRONG PHÒNG TRỪ SINH HỌC BỆNH HẠI DO VI KHUẨN TRÊN THỰC VẬT	39
2.3.1 Khái niệm phòng trừ sinh học	39
2.3.2 Các yếu tố ảnh hưởng đến khả năng kiểm soát vi khuẩn bằng liệu pháp thực khuẩn thể	39
2.3.2.1 Tỷ số thực khuẩn thể/vi khuẩn.....	40
2.3.2.2 Khả năng tiếp cận đến vi khuẩn mục tiêu.....	40
2.3.2.3 Điều kiện môi trường.....	40
2.3.2.4 Tính đặc hiệu của thực khuẩn thể	45
2.3.2.5 Sự kháng thực khuẩn thể của vi khuẩn	45
2.3.3 Biện pháp bảo vệ thực khuẩn thể	46
2.3.4 Một số nghiên cứu sử dụng thực khuẩn thể trong phòng trị bệnh do vi khuẩn trên cây trồng.....	47
2.3.4.1 Trên thế giới.....	47
2.3.4.2 Trong nước.....	49
2.3.4.3 Sử dụng hỗn hợp thực khuẩn thể trong phòng trừ bệnh vi khuẩn trên cây trồng	51
2.4 Oxolinic axit	54
2.5 Sơ lược về giống lúa OM4900.....	54
CHƯƠNG 3. PHƯƠNG TIỆN VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	55
3.1 THỜI GIAN VÀ ĐỊA ĐIỂM NGHIÊN CỨU	55
3.2 PHƯƠNG TIỆN NGHIÊN CỨU	55
3.2.1 Dụng cụ thiết bị và vật liệu	55
3.2.2 Vật liệu	55
3.3 NỘI DUNG PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	57
3.3.1 Nội dung 1: Phân lập, tuyển chọn thực khuẩn thể và vi khuẩn gây bệnh thối hạt lúa ...	57
3.3.1.1 Phân lập thực khuẩn thể và vi khuẩn gây bệnh thối hạt ở các tỉnh đồng bằng sông Cửu Long.....	57
3.3.1.2 Đánh giá khả năng kí sinh của các dòng thực khuẩn thể trên các dòng vi khuẩn gây bệnh thối hạt lúa	59

3.3.1.3 Định danh vi khuẩn gây bệnh thối hạt bằng kỹ thuật PCR (polymerase Chain Reaction)	59
3.3.1.4 Đánh giá khả năng gây hại của các dòng vi khuẩn <i>Burkholderia glumae</i> gây bệnh thối hạt trong điều kiện nhà lưới	60
3.3.1.5 Đánh giá khả năng tiêu diệt vi khuẩn <i>Burkholderia glumae</i> của những dòng thực khuẩn thể triển vọng	63
3.3.2 Nội dung 2: Đánh giá khả năng phòng trị bệnh thối hạt của các dòng thực khuẩn thể triển vọng trong điều kiện nhà lưới	63
3.3.2.1 Đánh giá hiệu quả phòng trị bệnh thối hạt trên lúa do vi khuẩn <i>Burkholderia glumae</i> bằng các dòng thực khuẩn thể triển vọng	63
3.3.2.2 Đánh giá hiệu quả của các mật số thực khuẩn thể khác nhau trong phòng trị bệnh thối hạt lúa do vi khuẩn <i>Burkholderia glumae</i>	65
3.3.2.3 Khảo sát thời điểm xử lý của thực khuẩn thể trong phòng trị bệnh thối hạt do vi khuẩn <i>B. glumae</i>	65
3.3.3 Nội dung 3: Xác định tính an toàn của các dòng thực khuẩn thể triển vọng trong thực tiễn sản xuất	66
3.3.3.1 Khảo sát hình thái của thực khuẩn thể dưới kính hiển vi điện tử truyền qua (Transmission electron microscopy).....	66
3.3.3.2 Giải mã trình tự bộ gen của những dòng thực khuẩn thể triển vọng	67
3.3.4 Nội dung 4: Đánh giá hiệu quả của các dòng thực khuẩn thể triển vọng phòng trị bệnh thối hạt lúa ở điều kiện ngoài đồng	68
3.3.4.1 Đánh giá hiệu quả phòng trị bệnh thối hạt do vi khuẩn <i>Burkholderia glumae</i> trên lúa bằng các dòng thực khuẩn thể triển vọng vụ Đông Xuân 2017 - 2018.....	68
3.3.4.2 Đánh giá hiệu quả phòng trị bệnh thối hạt do vi khuẩn <i>Burkholderia glumae</i> trên lúa bằng các dòng thực khuẩn thể triển vọng ở ngoài đồng vụ Hè Thu sớm	71
3.3.5 Nội dung 5: Khảo sát điều kiện nhân nuôi thực khuẩn thể triển vọng.....	73
3.3.5.1 Khảo sát các loại môi trường lên khả năng nhân mật số thực khuẩn thể ..	73
3.3.5.2 Khảo sát thời gian cấy vi khuẩn lên khả năng nhân mật số thực khuẩn thể	74
3.3.5.3 Khảo sát chỉ số MOI ảnh hưởng đến khả năng nhân mật số của dòng thực khuẩn thể triển vọng	75
3.3.5.4 Khảo sát nhiệt độ ảnh hưởng đến khả năng nhân mật số thực khuẩn thể triển vọng	75
CHƯƠNG 4. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....	77
4.1 Nội dung 1: Kết quả phân lập, tuyển chọn thực khuẩn thể và vi khuẩn gây bệnh thối hạt lúa	77
4.1.1 Kết quả phân lập các dòng thực khuẩn thể phân bố ở các tỉnh đồng bằng sông Cửu Long.....	77
4.1.2 Kết quả khả năng kí sinh của thực khuẩn thể đối với các dòng vi khuẩn <i>Burkholderia glumae</i> phân lập ở một số tỉnh ĐBSCL.....	80

4.1.3 Kết quả xác định vi khuẩn gây bệnh thối hạt lúa bằng kỹ thuật sinh học phân tử	84
4.1.4 Kết quả khả năng gây hại của các dòng vi khuẩn <i>Burkholderia glumae</i> gây bệnh thối hạt trong điều kiện nhà lưới	85
4.1.4.1 Tỷ lệ hạt bệnh	85
4.1.4.2 Ảnh hưởng của sáu dòng vi khuẩn <i>Burkholderia glumae</i> đến chỉ tiêu năng suất lúa	87
4.1.5 Kết quả khảo sát khả năng phân giải của các dòng thực khuẩn thể trên vi khuẩn <i>Burkholderia glumae</i> DT46 gây hại cao trong điều kiện phòng thí nghiệm	90
4.2 Nội dung 2: Kết quả đánh giá khả năng phòng trị bệnh thối hạt của các dòng thực khuẩn thể triển vọng trong điều kiện nhà lưới	91
4.2.1 Hiệu quả của thực khuẩn thể trong phòng trị bệnh thối hạt do vi khuẩn <i>Burkholderia glumae</i> DT46 trong điều kiện nhà lưới.....	92
4.2.1.1 Tỷ lệ hạt bệnh	92
4.2.1.2 Mật số của các dòng thực khuẩn thể trên bông và hiệu quả giảm bệnh	93
4.2.1.3 Ảnh hưởng của các dòng thực khuẩn thể đến chỉ tiêu năng suất	95
4.2.2 Hiệu quả phòng trị bệnh thối hạt của thực khuẩn thể ở các mật số khác nhau trong điều kiện nhà lưới	100
4.2.3 Khảo sát thời điểm xử lý thực khuẩn thể trên bông trong phòng trị bệnh thối hạt do vi khuẩn <i>B. glumae</i> DT46 ở điều kiện nhà lưới	104
4.2.3.1. Tỷ lệ hạt bệnh trên bông và tỷ lệ hạt chắc trên bông.....	104
4.2.3.2 Mật số thực khuẩn thể tồn tại trên bông	105
4.3 Nội dung 3: Xác định tính an toàn của các dòng thực khuẩn thể triển vọng trong thực tiễn sản xuất	108
4.3.1 Khảo sát đặc điểm hình thái thực khuẩn thể triển vọng dưới kính hiển vi điện tử (TEM)	108
4.3.2 Kết quả giải trình tự các dòng thực khuẩn thể triển vọng.....	109
4.4 Nội dung 4: Đánh giá hiệu quả của các dòng thực khuẩn thể triển vọng phòng trị bệnh thối hạt lúa ở điều kiện ngoài đồng.....	112
4.4.1 Hiệu quả của thực khuẩn thể phòng trị bệnh thối hạt trên lúa do vi khuẩn <i>Burkholderia glumae</i> DT46 ở điều kiện ngoài đồng vụ Đông Xuân 2017-2018	112
4.4.1.1 Tổng quan thí nghiệm.....	112
4.4.1.2 Tỷ lệ hạt bệnh và hiệu quả giảm bệnh	112
4.4.1.3 Tỷ lệ hạt chắc và năng suất thực tế.....	114
4.4.2 Hiệu quả của thực khuẩn thể phòng trị bệnh thối hạt do vi khuẩn <i>Burkholderia glumae</i> DT46 ở điều kiện ngoài đồng vụ Hè Thu sớm 2018.....	117
4.4.2.1 Tổng quan thí nghiệm.....	117
4.4.2.2 Tỷ lệ hạt bệnh trên bông	117
4.4.2.3 Khả năng tồn tại của thực khuẩn thể trên bông	119
4.4.2.4 Hiệu quả giảm bệnh	120
4.4.2.5 Ảnh hưởng của các nghiệm thức xử lý thực khuẩn thể đến tỷ lệ hạt chắc và năng suất thực tế	121

4.5 Nội dung 5: Khảo sát điều kiện nhân nuôi thực khuẩn thể triển vọng	124
4.5.1 Kết quả khảo sát các loại môi trường lên khả năng nhân mật số thực khuẩn thể	124
4.5.2 Kết quả khảo sát thời gian cấy thực khuẩn thể lên khả năng nhân mật số thực khuẩn thể	126
4.5.3 Kết quả khảo sát chỉ số MOI ảnh hưởng đến khả năng nhân mật số của dòng thực khuẩn thể triển vọng.....	129
4.5.4 Kết quả khảo sát nhiệt độ ảnh hưởng đến khả năng nhân mật số thực khuẩn thể triển vọng	130
CHƯƠNG 5. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ XUẤT	133
5.1 Kết luận	133
5.2 Đề xuất	134
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	135
PHỤ CHƯƠNG	145

DANH SÁCH BẢNG

Bảng	Tên bảng	Trang
2.1	Sự kí sinh của họ thực khuẩn thể trên ngành vi khuẩn	22
2.2	Tóm tắt về kích thước và hình dạng các họ thực khuẩn thể	26
2.3	Tóm tắt cơ chế hấp phụ của nhóm thực khuẩn thể đuôi với vi khuẩn Gram âm và dương	30
2.4	Tóm tắt khả năng chịu đựng với môi trường sống của một số họ thực khuẩn thể	42
2.5	Tóm tắt sử dụng hỗn hợp thực khuẩn thể phòng trị một số bệnh trên cây trồng	52
3.1	Mật số và liều lượng phun của các nghiệm thức trong thí nghiệm	70
3.2	Các nghiệm thức thực hiện trong thí nghiệm vụ Hè Thu 2018	72
3.3	Mật số vi khuẩn và TKT tương ứng các chỉ số MOI	75
4.1	Danh sách vi khuẩn <i>Burkholderia glumae</i> và thực khuẩn thể được phân lập ở một số tỉnh ĐBSCL	80
4.2	Khả năng ký sinh của 112 dòng TKT đối với 60 dòng vi khuẩn phân lập ở một số tỉnh ĐBSCL	81
4.3	Số lượng thực khuẩn thể kí sinh trên các dòng vi khuẩn gây bệnh thối hạt	83
4.4	Tỷ lệ hạt bệnh trên bông được xử lý với sáu dòng vi khuẩn <i>B. glumae</i>	86
4.5	Ảnh hưởng của sáu dòng vi khuẩn <i>B. glumae</i> đến chỉ tiêu năng suất lúa	88
4.6	Đường kính đốt tan của 8 dòng thực khuẩn phân giải vi khuẩn <i>B. glumae</i> DT46 gây bệnh thối hạt lúa	91
4.7	Tỷ lệ hạt bệnh được xử lý với các dòng thực khuẩn thể đơn lẻ hoặc hỗn hợp thực khuẩn thể qua các thời điểm	93
4.8	Mật số các dòng TKT trên bông ở từng thời điểm khảo sát	94
4.9	Hiệu quả giảm bệnh thối hạt được xử lý TKT qua các thời điểm	95
4.10	Hiệu quả của thực khuẩn thể ảnh hưởng đến chỉ tiêu năng suất lúa	96
4.11	Hiệu quả phòng trị bệnh thối hạt ở các mật số thực khuẩn thể khác nhau trong điều kiện nhà lưới	102
4.12	Ảnh hưởng các thời điểm xử lý thực khuẩn thể đến bệnh thối hạt lúa trong điều kiện nhà lưới	105
4.13	Mật số thực khuẩn thể tồn tại trên bông ở các thời điểm xử lý trong điều kiện nhà lưới	106
4.14	Dữ liệu bộ genome của ba dòng thực khuẩn thể kí sinh vi khuẩn <i>Burkholderia glumae</i>	110
4.15	Tỷ lệ hạt bệnh thối hạt được xử lý thực khuẩn thể qua các thời điểm khảo sát	113
4.16	Hiệu quả giảm bệnh thối hạt được xử lý thực khuẩn thể qua các thời điểm khảo sát	113
4.17	Chỉ tiêu năng suất của các nghiệm thức vụ Đông Xuân 2017-2018	115
4.18	Tỷ lệ hạt bệnh trên bông của các nghiệm thức qua các thời điểm	119

4.19	Mật số thực khuẩn thể trên bông qua các thời điểm khảo sát	120
4.20	Hiệu quả giảm bệnh thối hạt của thực khuẩn thể qua các thời điểm khảo sát	121
4.21	Chỉ tiêu năng suất lúa vụ Hè Thu Sớm 2018	122
4.22	Ảnh hưởng các loại môi trường đến mật số thực khuẩn thể Φ BurAG58	125
4.23	Ảnh hưởng điều kiện nhân nuôi đến mật số thực khuẩn thể Φ BurAG58	127
4.24	Ảnh hưởng của chỉ số MOI đến mật số thực khuẩn thể Φ BurAG58 và OD	130
4.25	Mật số thực khuẩn thể chịu ảnh hưởng bởi nhiệt độ qua các thời điểm khảo sát	130

DANH SÁCH HÌNH

Hình	Tên hình	Trang
2.1	Triệu chứng bệnh bạc bông lúa do vi khuẩn <i>Burkholderia glumae</i>	6
2.2	Triệu chứng bệnh thối hạt do vi khuẩn <i>Burkholderia glumae</i>	6
2.3	Triệu chứng thối cây mạ do vi khuẩn <i>Burkholderia glumae</i>	7
2.4	Một số đặc điểm hình thái của vi khuẩn <i>Burkholderia glumae</i>	8
2.5	Chu trình bệnh thối hạt hay bạc bông lúa do vi khuẩn <i>Burkholderia glumae</i>	10
2.6	Sơ đồ sự phát triển 100 năm nghiên cứu về thực khuẩn thể	19
2.7	Hình dạng các họ thực khuẩn thể	21
2.8	Hình thái cấu trúc thực khuẩn thể T4	23
2.9	Hình thái cấu trúc thực khuẩn thể Lamda	24
2.10	Hình thái cấu trúc thực khuẩn thể T7	25
2.11	Cấu trúc tiêu biểu của họ thực khuẩn thể đuôi	29
2.12	Chu trình xâm nhiễm của thực khuẩn thể T4	34
2.13	Chu trình sinh sản của thực khuẩn thể ôn hoà	35
2.14	Mô hình chung về cấu trúc gen so sánh giữa nhóm thực khuẩn thể độc và nhóm thực khuẩn thể không độc	36
2.15	Sơ đồ đường cong tăng trưởng đơn của thực khuẩn thể	38
2.16	Sự khác nhau về hình dạng đốm tan giữa thực khuẩn thể độc và thực khuẩn thể không độc	39
2.17	Tổng hợp các yếu tố ảnh hưởng hiệu quả của thực khuẩn thể với vi khuẩn kí chủ	46
3.1	Phương pháp kiểm tra khả năng kí sinh của các dòng thực khuẩn thể lên từng dòng vi khuẩn <i>Burkholderia glumae</i>	59
3.2	Sơ đồ bố trí các nghiệm thức ngoài đồng vụ Đông Xuân 2017 - 2018	69
3.3	Sơ đồ bố trí các nghiệm thức vụ Hè Thu sớm 2018	72
4.1	Triệu chứng bệnh thối hạt và đặc điểm thực khuẩn thể	79
4.2	Khả năng kí sinh của một số dòng thực khuẩn thể trên vi khuẩn BurKG52 vào thời điểm 24 giờ sau khi cấy	83
4.3	Sản phẩm PCR khuếch đại bằng cặp mồi đặc hiệu 1414S và 1416A	85
4.4	Mức độ nhiễm bệnh thối hạt của sáu dòng vi khuẩn <i>B. glumae</i> tại thời điểm 10 NSKLB	86
4.5	Sự hình thành sắc tố của các dòng vi khuẩn <i>B. glumae</i> trên môi trường King's 2% agar sau 48 giờ	89
4.6	Đường kính đốm tan của 8 dòng thực khuẩn thể trên vi khuẩn <i>B. glumae</i> DT46 vào thời điểm 24 giờ sau khi nuôi cấy	91
4.7	Hiệu quả phòng trị của các dòng TKT đối với bệnh thối hạt do vi khuẩn <i>B. glumae</i> DT46 tại thời điểm 5 NSKLB	99

4.8	Hiệu quả phòng trị bệnh thối hạt lúa do vi khuẩn <i>B. glumae</i> DT46 ở các mật số thực khuẩn thể khác nhau ở thời điểm 10 NSKLB	103
4.9	Hiệu quả phòng trị bệnh thối hạt trên lúa do <i>B. glumae</i> BurDT46 bằng thực khuẩn thể ΦBurAG58 ở thời điểm 5 NSKLB	107
4.10	Hình thái các dòng thực khuẩn thể triển vọng dưới kính hiển vi điện tử (TEM)	109
4.11	Chức năng từng gen trong bộ genome của thực khuẩn thể: (A) ΦBurVL34; (B): ΦBurAG58; (C) ΦBurDT47a	111
4.12	Hiệu quả của thực khuẩn thể phòng trị bệnh thối hạt lúa do vi khuẩn <i>B. glumae</i> DT46 ở thời điểm 10 NSKLB trong vụ Đông Xuân 2017-2018	116
4.13	Hiệu quả của TKT phòng trị bệnh thối hạt lúa do vi khuẩn <i>B. glumae</i> DT46 vào thời điểm 10 NSKLB trong vụ Xuân Hè sớm 2018	123
4.14	Mật số thực khuẩn thể trên bốn loại môi trường với hệ số pha loãng 10^{-7} tại thời điểm 72 giờ sau khi bố trí	125
4.15	Mật số thực khuẩn thể ở các nghiệm thức với hệ số pha loãng 10^{-6} tại thời điểm 24 giờ	128

DANH SÁCH CHỮ VIẾT TẮT

TT	Thuật ngữ viết tắt	Thuật ngữ
1.	AUDPC	Area Under the Disease Progress Curve (chỉ số tích lũy bệnh theo thời gian)
2.	ĐBSCL	Đồng Bằng sông Cửu Long
3.	ĐC	Đối chứng
4.	Cfu	Colony forming unit (đơn vị hình thành khuẩn lạc)
5.	GSKC	Giờ sau khi cấy
6.	GSKLB	Giờ sau khi lây bệnh
7.	GTKLB	Giờ trước khi lây bệnh
8.	GSKXL	Giờ sau khi xử lí
9.	HH TKT	Hỗn hợp thực khuẩn thể
10.	ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses
11.	NSKLB	Ngày sau khi lây bệnh
12.	NT	Nghiệm thức
13.	NCBI	National Center for Biotechnology Information
14.	MOI	Multiplicity of infection
15.	OD	Optical Density (mật số quang truyền)
16.	Pfu	Plaque forming unit (đơn vị hình thành đốm thực khuẩn)
17.	TKT	Thực khuẩn thể
18.	TEM	Transmission electron microscopy
19.	VK	Vi khuẩn

CHƯƠNG 1. GIỚI THIỆU

1.1 Tính cấp thiết của luận án

Bệnh thối hạt hay bệnh lép vàng trên lúa do vi khuẩn *Burkholderia glumae* (Ou, 1985, Tsushima *et al.*, 1986; Betancur, 2011; Kim, 2015; Cui *et al.*, 2016; Zhou, 2019) được ghi nhận đầu tiên tại Nhật Bản vào năm 1950 (CPC, 2007) là tác nhân gây thiệt hại về năng suất, phẩm chất lúa gạo trên thế giới nói chung và Việt Nam nói riêng. Tại Việt Nam, bệnh thối hạt được ghi nhận đầu tiên tại Đồng bằng sông Hồng vào năm 1992 và gây thiệt hại năng suất lúa khoảng 75% (Trung *et al.*, 1993). Vi khuẩn tấn công nhiều giai đoạn phát triển của cây lúa như giai đoạn mạ làm bẹ lá của cây mạ bị thối nâu, nhũn nước và cuối cùng làm chết cây mạ, giai đoạn lúa ngâm sữa làm ảnh hưởng đến quá trình tạo hạt và chính là nguyên nhân gây thất thu năng suất quan trọng (Tsushima *et al.*, 1986; Li *et al.*, 2017). Trước sự chuyển đổi khí hậu toàn cầu gây ảnh hưởng nặng nề trên nhiều vùng lãnh thổ của thế giới, đặc biệt bệnh thối hạt trên lúa do vi khuẩn *B. glumae* được tiên đoán sẽ trở thành mối đe dọa nền an ninh lương thực khi nhiệt độ trái đất nóng lên (Zhou-qi *et al.*, 2016; Mizobuchi *et al.*, 2020) vì nhiệt độ tối hảo cho sự phát triển của vi khuẩn *B. glumae* từ 30–35°C. Theo một nghiên cứu tại Hoa Kỳ, nếu nhiệt độ trái đất tăng 1°C thì bệnh thối hạt (hay bệnh bạc bông) gây thiệt hại nghiêm trọng đến các vùng sản xuất lúa, hậu quả có thể ảnh hưởng 2,7 triệu người không có đủ gạo ăn. Vì vậy, việc nghiên cứu về bệnh thối hạt và biện pháp quản lý nên cần được quan tâm để xác định giải pháp khắc phục nhằm giảm tác động đến nền an ninh lương thực trên thế giới khi nhiệt độ của trái đất ngày càng nóng lên (Shew *et al.*, 2019).

Tại Việt Nam, để quản lý bệnh do vi khuẩn trên lúa chủ lực dựa vào biện pháp hóa học như oxolinic axit, thuốc gốc đồng, thuốc gốc kháng sinh (Kim, 2015). Tuy nhiên, trở ngại của biện pháp hóa học là làm gia tăng tính kháng thuốc của vi khuẩn gây bệnh, bằng chứng đã ghi nhận tại Nhật Bản vi khuẩn *B. glumae* đã kháng oxolinic axit trên nhiều vùng như Toyama, Nagano, Iwate, Niigata, Fukushima, và Chiba (Mizobuchi *et al.*, 2020). Ngoài ra, mặt trái của thuốc bảo vệ thực vật không những tác động trực tiếp đến môi trường mà còn gián tiếp giảm tính đa dạng sinh học, gây ảnh hưởng phẩm chất nông sản và sức khỏe con người.

Chính vì vậy, việc nghiên cứu các chế phẩm sinh học để góp phần hạn chế việc sử dụng thuốc hóa học là một hướng đi đã và đang được nghiên cứu nhằm nâng cao sản phẩm nông nghiệp và tạo ra sản phẩm an toàn cho con người cũng như môi sinh. Trong đó, thực khuẩn thể (bacteriophages hoặc phages) là virus kí sinh chuyên tính tế bào vi khuẩn kí chủ, đã được trên thế giới nghiên cứu và ứng dụng trong phòng trừ sinh học bệnh hại vi khuẩn trên cây trồng (Adams, 1959, Duckworth & Gulig, 2002, Hyman *et al.*, 2012). Mặt thuận lợi của thực khuẩn thể là (1) hiện diện phong phú trong tự nhiên với mật số 10^{31-32} (Adams, 1959), (2) khả năng sinh sản rất nhanh trong

vòng 15 phút đến 1 giờ đã hoàn thành một chu kì (Duckworth & Gulig, 2002), (3) không độc với tế bào nhân thật (Greer, 2005), (4) đặc biệt TKT là một giải pháp tiềm năng trong xu thế vi khuẩn kháng thuốc này càng gia tăng (Principi *et al.*, 2019; Brives & Pourraz, 2020). Ngày nay, nhiều thành công về liệu pháp thực khuẩn thể trong việc quản lí bệnh do vi khuẩn trên thực vật như: *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* gây bệnh loét trên cam (Balogh *et al.*, 2008), *Ralstonia solanacearum* gây bệnh héo xanh trên cà chua (Fujiwara *et al.*, 2011), *X. axonopodis* pv. *allii* gây bệnh cháy lá trên hành (Lang *et al.*, 2007, Nga *et al.*, 2021), *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* gây bệnh thối nhũn cây hoa loa kèn (Ravensdale *et al.*, 2007), *X. oryzae* pv. *oryzae* gây bệnh cháy bìa lá trên lúa (Ou, 1985; Dong *et al.*, 2018). Tiếp nối những thành công trên, sản phẩm từ TKT đầu tiên là AgriPhage được Cục bảo vệ Môi sinh Hoa Kỳ (EPA) cho phép thương mại hóa vào năm 2005 trong quản lí bệnh đốm lá cà chua do vi khuẩn *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* và đốm lá ớt do vi khuẩn *X. campestris* pv. *vesicatoria* (Nagy *et al.*, 2012) đã được đưa vào sản xuất đến ngày nay. Vì vậy thực khuẩn thể được xem là tác nhân rất tiềm năng trong phòng trừ bệnh hại do vi khuẩn trong nhiều lĩnh vực như y học, thực phẩm và nông nghiệp.

Riêng ở Việt Nam, chưa có nghiên cứu nào ghi nhận về hiệu quả quản lí bệnh thối hạt lúa bằng thực khuẩn thể ở điều kiện ngoài đồng, đặc biệt đi sâu về mặt hình thái cũng như di truyền của những dòng thực khuẩn thể, là cơ sở khoa học mới nhằm ứng dụng liệu pháp thực khuẩn thể an toàn trong phòng trừ bệnh do vi khuẩn. Trên cơ sở đó “**Nghiên cứu sử dụng thực khuẩn thể trong phòng trị bệnh thối hạt trên lúa do vi khuẩn *Burkholderia glumae***” được thực hiện nhằm góp phần giảm thiểu lượng thuốc bảo vệ thực vật trong quản lí bệnh thối hạt lúa, đồng thời kết quả nghiên cứu đi sâu về mặt di truyền của những dòng thực khuẩn thể là tác nhân phòng trừ mới trong chiến lược quản lí bệnh theo hướng an toàn tại Việt Nam.

1.2 Mục đích nghiên cứu

Mục đích tổng quát của luận án là xác định hiệu quả và tính an toàn của thực khuẩn thể trong quản lí bệnh thối hạt lúa do vi khuẩn *Burkholderia glumae* gây hại, từ đó tìm ra điều kiện nhân nuôi thực khuẩn thể tối hảo nhằm ứng dụng thực khuẩn thể trong quản lí bệnh thối hạt lúa ở điều kiện thực tế nhằm góp phần giảm việc sử dụng thuốc hóa học trong quản lí bệnh hại ở ĐBSCL nói riêng và cả nước nói chung.

1.3 Nội dung nghiên cứu

Đề tài thực hiện gồm những nội dung năm nội dung chính:

- **Nội dung 1:** Phân lập, tuyển chọn thực khuẩn thể và vi khuẩn gây bệnh thối hạt lúa.
- **Nội dung 2:** Đánh giá khả năng phòng trị bệnh thối hạt của các dòng thực khuẩn thể triển vọng trong điều kiện nhà lưới.

- **Nội dung 3:** Xác định tính an toàn của các dòng thực khuẩn thể triển vọng trong thực tiễn sản xuất.
- **Nội dung 4:** Đánh giá hiệu quả của các dòng thực khuẩn thể triển vọng phòng trị bệnh thối hạt lúa ở điều kiện ngoài đồng.
- **Nội dung 5:** Khảo sát điều kiện nhân nuôi thực khuẩn thể triển vọng.

1.4 Tính mới của luận án

- Xác định vi khuẩn gây bệnh thối hạt chủ yếu trên lúa ở ĐBSCL là do loài *Burkholderia glumae*

- Xác định được ba dòng thực khuẩn thể có tiềm năng cao trong phòng trị bệnh thối hạt ở điều kiện ngoài đồng với hiệu quả giảm bệnh trên 50% tương đương thuốc hóa học. Ba dòng thực khuẩn thể này được xác định thuộc nhóm thực khuẩn thể độc (virulent phages) nên đạt tính an toàn trong quản lý bệnh thối hạt do vi khuẩn *B. glumae*.

- Xác định được điều kiện nhân nuôi tối hảo của dòng thực khuẩn thể triển vọng đạt được mật số cao tương đương 10^{10} pfu/ml, có thể đáp ứng được yêu cầu sử dụng trên diện rộng.

1.5 Đối tượng và phạm vi nghiên cứu

1.5.1 Đối tượng nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu của luận án là cây lúa, bệnh thối hạt lúa do vi khuẩn *Burkholderia glumae* và thực khuẩn thể kí sinh vi khuẩn *B. glumae*.

1.5.2 Phạm vi nghiên cứu

Phạm vi nghiên cứu của luận án được thực hiện thu thập mẫu bệnh và thực khuẩn thể từ việc khảo sát thu mẫu TKT và vi khuẩn gây bệnh thối hạt ngoài đồng ở các tỉnh ĐBSCL, sau đó thực hiện phân lập và tuyển chọn TKT triển vọng trong điều kiện phòng thí nghiệm và điều kiện nhà lưới. Nghiên cứu định danh các dòng TKT dựa vào đặc điểm hình thái dưới kính hiển vi điện tử (tại Viện Công Nghệ Kyoto, Nhật Bản) và đặc điểm trình tự bộ genome (tại Bộ môn Công Nghệ Gen, trường Đại học Leuven, Vương quốc Bỉ) để xác định tính an toàn TKT trước khi sử dụng ở diện rộng. Tiếp theo, thí nghiệm đánh giá hiệu quả phòng trị của thực khuẩn thể đối với bệnh thối hạt ở điều kiện ngoài đồng trên hai vụ lúa tại huyện Tam Bình, tỉnh Vĩnh Long. Cuối cùng là nghiên cứu khảo sát điều kiện nhân nuôi thực khuẩn thể được thực hiện ở điều kiện phòng thí nghiệm.

1.6 Ý nghĩa khoa học và thực tiễn

1.6.1 Ý nghĩa khoa học

Luận án là công trình nghiên cứu có giá trị khoa học đi từ các nghiên cứu cơ bản đến nghiên cứu ứng dụng về bệnh thối hạt và biện pháp phòng trừ bệnh bằng thực khuẩn thể. Kết quả của luận án đã xác định được loài gây bệnh thối hạt lúa chủ yếu là vi khuẩn *Burkholderia glumae*, tuyển chọn được các dòng thực khuẩn thể triển vọng trong phòng trừ bệnh thối hạt trên lúa và khẳng định được hiệu quả của TKT trong phòng trừ bệnh thối hạt ở điều kiện ngoài đồng. Ngoài ra, nghiên cứu cũng xác định tính an toàn của tác nhân sinh học TKT dựa trên khía cạnh sinh học phân tử cũng là một đóng góp mới về mặt khoa học.

1.6.2 Ý nghĩa thực tiễn

Kết quả nghiên cứu sẽ góp phần mở ra chiến lược quản lý bệnh do vi khuẩn theo hướng thân thiện với môi trường, đặc biệt bệnh thối hạt lúa tại Việt Nam. Đồng thời kết quả cũng thấy khả năng ứng dụng thực khuẩn thể mang tính khả thi dựa vào hiệu quả giảm bệnh và phương pháp nhân nuôi.

CHƯƠNG 2. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

2.1 BỆNH THỐI HẠT LÚA

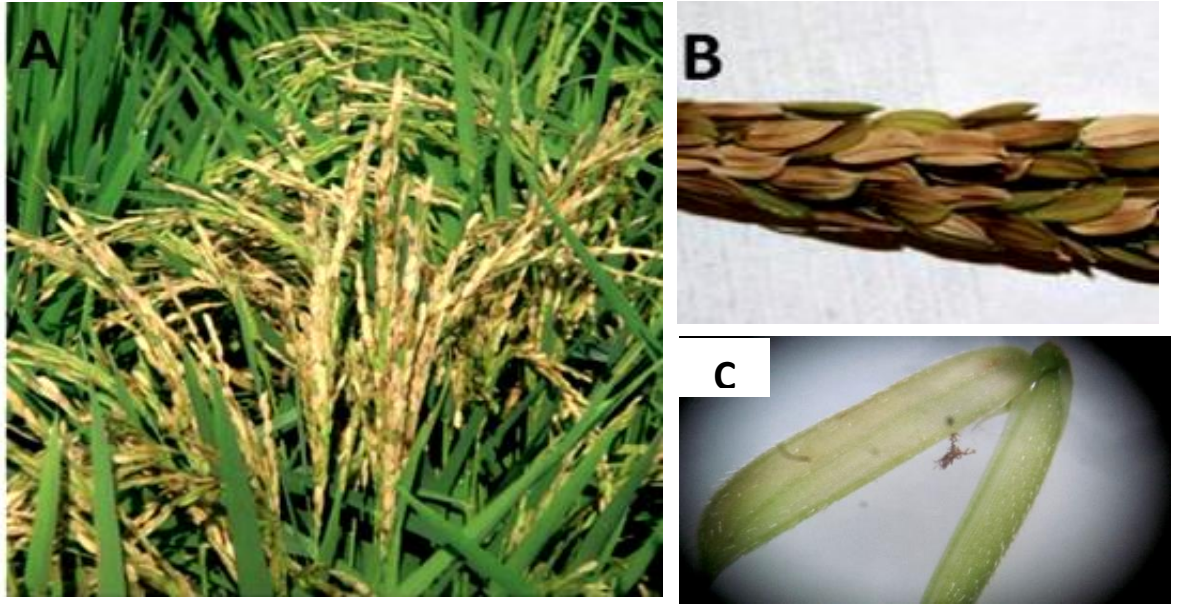
2.1.1 Lịch sử và tình hình gây hại

Bệnh thối hạt lúa (tên tiếng Anh là bacterial grain rot) còn được gọi là bệnh bạc bông lúa (tên tiếng Anh là bacterial panicle blight) được ghi nhận và gây thiệt hại trên nhiều vùng lãnh thổ khác nhau trên thế giới. Vào năm 1950, bệnh thối hạt được ghi nhận đầu tiên tại Nhật Bản, tuy nhiên vào thời điểm này bệnh không đáng quan tâm vì năng suất lúa bị ảnh hưởng không đáng kể. Đến năm 1970, bệnh thối hạt đã được chú ý do diện tích lúa bị nhiễm bệnh ngày càng tăng (CPC, 2007). Tiếp đến năm 1989 một báo cáo của Mew *et al.*, đã ghi nhận bệnh thối hạt đã làm ảnh hưởng 900.000 hecta lúa tại miền Bắc đảo Kyushu Nhật Bản. Tại Việt Nam, bệnh thối hạt được ghi nhận đầu tiên ở các tỉnh miền Trung và các tỉnh thuộc đồng bằng sông Hồng vào vụ Hè Thu năm 1991. Vào năm 1992 khoảng 100.000 hecta lúa bị nhiễm bệnh thối hạt gồm năm tỉnh Hà Tây, Thái Bình, Hà Nam, Thanh Hóa, Khánh Hòa được báo cáo là nơi xảy ra dịch bệnh nghiêm trọng nhất và thất thu năng suất lên đến 75% (Trung *et al.*, 1993). Và đến ngày nay, bệnh thối hạt được ghi nhận trên 18 quốc gia trên thế giới (CABI, 2021). Chi tiết tại Mỹ, bệnh thối hạt và bạc bông được ghi nhận tại Texas, Louisiana, Arkansas vào năm 1995 đến 1998, đã gây thiệt hại năng suất lúa khoảng 20% (Ham *et al.*, 2011). Đến năm 2013 bệnh thối hạt hay bạc bông gây thiệt hại khoảng 25% năng suất lúa trên giống lúa Presidio và WAB56-104 tại miền Nam Châu Phi (Zhou, 2014). Một công bố vào năm 2014 tại Ecuador, bệnh thối cây con và thối hạt cũng được ghi nhận vào năm 2013. Vào năm 2016, bệnh thối hạt cũng được ghi nhận là bệnh quan trọng trên lúa và được xem là một trong những nguy cơ dịch hại tại Trung Quốc (Zhou-qi *et al.*, 2016).

2.1.2 Triệu chứng bệnh thối hạt

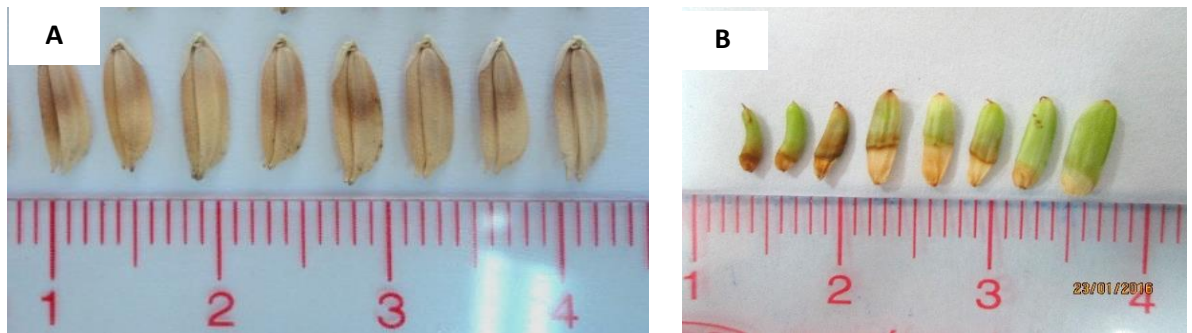
Bệnh thối hạt hoặc bệnh lép vàng gây thiệt hại nghiêm trọng vào giai đoạn cây lúa trở hoa với hai triệu chứng biểu hiện rõ như triệu chứng bạc bông, hoặc triệu chứng thối hạt dẫn đến hạt bị lép hoặc lửng. Các triệu chứng được miêu tả cụ thể như sau:

+ **Triệu chứng bạc bông:** mầm bệnh xâm nhiễm vào giai đoạn bông lúa đang tung phấn có thể làm hạt lép hoàn toàn gây nên triệu chứng bông bạc (Hình 2.1). Theo Kim (2015) bệnh xâm nhiễm nặng khi lúa chưa vào chắc làm nhánh gié lép nhẹ hơn những nhánh gié vào chắc sẽ nặng oằn xuống nên gọi là hiện tượng “bắn máy bay”.



Hình 2.1: Triệu chứng bệnh bạc bông lúa do vi khuẩn *Burkholderia glumae*: (A,B): Triệu chứng điển hình bệnh bạc bông (Ham *et al.*, (2011); (C): Nhụy hạt lúa bị thối hoàn toàn (Tiên, 2015, tài liệu chưa công bố)

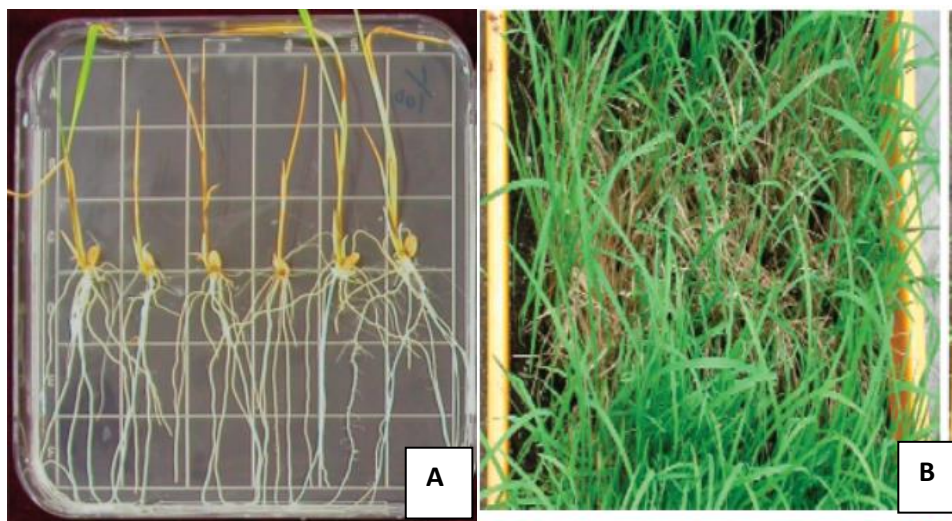
+ **Triệu chứng thối hạt:** mầm bệnh xâm nhiễm giai đoạn ngâm sữa sẽ làm hạt lúa bị lép lửng, biểu hiện vỏ trấu có màu xanh nhạt nhạt hoặc có màu vàng nhạt nhạt khi chín. Tách vỏ trấu của hạt lúa bị bệnh, phôi nhũ của hạt lúa bị thối, hạt lúa sẽ không vào chắc (Kim, 2015). Tương tự theo miêu tả của Ou (1985), những hạt lúa bị lép lửng biểu hiện đầu tiên bắt đầu ở cuống vỏ hạt màu trắng đục, sau đó vỏ trấu chuyển sang màu xám đen và cuối cùng vỏ trấu có màu vàng khi chín nên gọi là bệnh lép vàng (Hình 2.2).



Hình 2.2: Triệu chứng bệnh thối hạt do vi khuẩn *Burkholderia glumae*: (A, B): Triệu chứng bệnh thối hạt điển hình biểu hiện bên ngoài và bên trong hạt (Tiên, 2015, tài liệu chưa công bố)

Ngoài ra, triệu chứng thối cây con (seedling rot) là bệnh làm chết cây mạ, tuy nhiên không gây thiệt hại đáng kể với những biểu hiện triệu chứng như sau:

Biểu hiện đầu tiên trên bẹ lá lúa là những mảng bị hoại tử, màu nâu có viền phân biệt với vùng không bị bệnh; vết bệnh lan rộng theo thời gian khi gặp ẩm độ cao. Các lá trên cùng trở nên hơi vàng đến nâu sáng, thỉnh thoảng các lá bị nhiễm bệnh sẽ xoắn lại. Các cây mạ đã bị bệnh nhanh chóng chuyển màu vàng hoàn toàn và cuối cùng chết đi. Nếu cây lúa bị nhiễm bệnh nhẹ cũng biểu hiện triệu chứng vàng ở những lá non tuy nhiên cây mạ nhiễm bệnh ít vẫn tiếp tục phát triển đến giai đoạn thu hoạch (Cho *et al.*, 2007) (Hình 2.3).



Hình 2.3: Triệu chứng thối cây mạ do vi khuẩn *Burkholderia glumae*: (A) Triệu chứng thối cây mạ (rễ vẫn phát triển bình thường); (B): Bệnh thối cây con gây chết cây mạ từng chòm trong điều kiện nhà lưới (nguồn Cho *et al.*, 2007)

2.1.3 Tác nhân

Bệnh thối hạt hay lép vàng do vi khuẩn *Burkholderia glumae* (Urakami *et al.*, 1994) (CPC, 2007).

Giới: Bacteria

Ngành: Proteobacteria

Lớp: Betaproteobacteria

Bộ: Burkholderiales

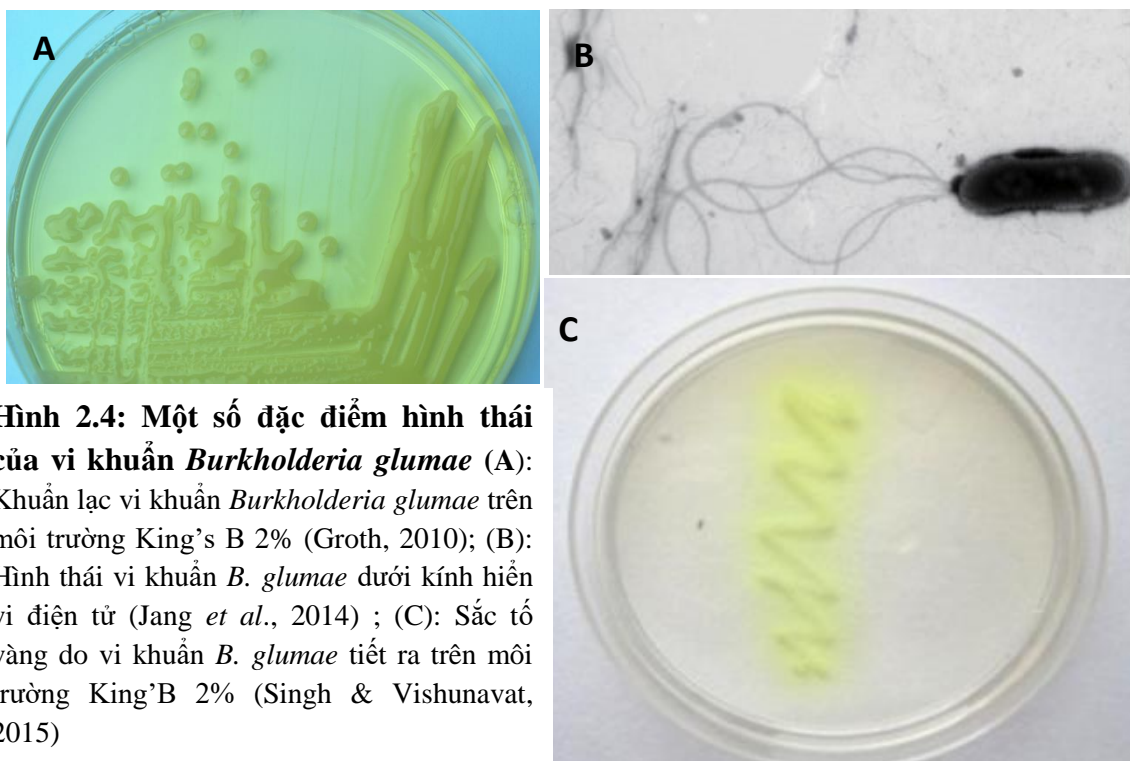
Họ: Burkholderiaceae

Chi *Burkholderia*

Tên vi khuẩn gây bệnh thối hạt trước đây là *Pseudomonas glumae* (Kurita & Tabei, 1967). Đến năm 1992 Yabuuchi *et al.*, đã dựa vào mức độ tương đồng của

đoạn ADN-ADN, rRNA, % G+C, sinh hóa đã phân loại lại một số loài thuộc chi *Pseudomonas* chuyển qua một số chi khác như *Burkholderia*, *Ralstonia*. Trong đó, hai loài *Pseudomonas glumae* và *Pseudomonas plantarii* cũng được định danh lại thành *B. glumae* và *B. plantarii* vào năm 1994 bởi Urakami. Hiện tại, trên 60 loài đã được xếp vào chi *Burkholderia*.

Burkholderia glumae là vi khuẩn Gram âm, hiếu khí với khuẩn lạc màu trắng đến kem hình tròn trên môi trường dinh dưỡng và không phát huỳnh quang, di chuyển bằng 2 - 4 chiên mao ở cực (Hình 2.4B), có chiều dài và chiều rộng: 0,5 - 0,7 μm x 1,5 - 2,5 μm (Hình 2.4B) và có khả năng hình thành sắc tố vàng trên môi trường King'B 2% agar (Ou, 1985, Yuan, 2004, Ham *et al.*, 2011) (Hình 2.4C). Vi khuẩn phát triển ở nhiệt độ từ 11 - 41 $^{\circ}\text{C}$, thích hợp nhất từ 30 - 35 $^{\circ}\text{C}$ và chết ở nhiệt độ 70 $^{\circ}\text{C}$ (Ham *et al.*, 2011; Zhou-qi *et al.*, 2016). Độc tính của vi khuẩn *Burkholderia glumae* được qui định chủ yếu bởi 2 loại độc tố là toxoflavin và ferenulin, chính hai độc tố gây thối hạt và chết cây con trên lúa (Zhou-qi *et al.*, 2016). Ngoài ra, sắc tố của vi khuẩn tiết ra khi nuôi cấy trên môi trường dinh dưỡng cũng là yếu tố quyết định độc tố của vi khuẩn *Burkholderia glumae* (Yuan, 2004).



Hình 2.4: Một số đặc điểm hình thái của vi khuẩn *Burkholderia glumae* (A): Khuẩn lạc vi khuẩn *Burkholderia glumae* trên môi trường King's B 2% (Groth, 2010); (B): Hình thái vi khuẩn *B. glumae* dưới kính hiển vi điện tử (Jang *et al.*, 2014) ; (C): Sắc tố vàng do vi khuẩn *B. glumae* tiết ra trên môi trường King'B 2% (Singh & Vishunavat, 2015)

2.1.4 Sự xâm nhiễm và lưu tồn của vi khuẩn *Burkholderia glumae*

2.1.4.1 Sự xâm nhiễm

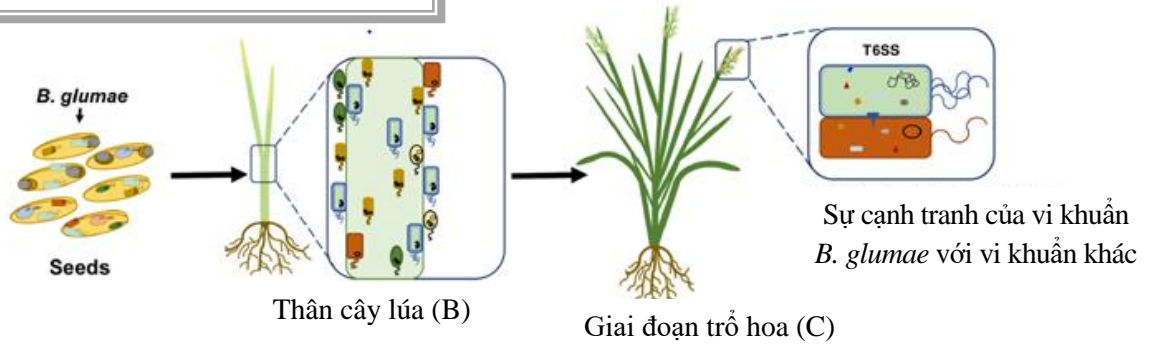
Chu trình xâm nhiễm của vi khuẩn *B. glumae* được mô tả bởi Tsushima (1996). Mầm bệnh được ghi nhận suốt quá trình phát triển của cây lúa từ hạt giống đến cả quá trình sinh trưởng và phát triển của cây lúa. Tuy nhiên, quá trình xâm nhiễm còn tùy thuộc vào điều kiện môi trường như nhiệt độ, ẩm độ, mật số vi khuẩn,... và các yếu tố khác chưa được xác định.

a) Sự xâm nhiễm sơ cấp: Vi khuẩn *B. glumae* lưu tồn trên hạt giống, nếu hạt lúa được gieo trồng đã nhiễm vi khuẩn, vi khuẩn sẽ định vị trên bẹ lá và xâm nhiễm đầu tiên dẫn đến triệu chứng thối cây mạ. Đối với những cây lúa được trồng trong chậu được lây bệnh bằng cách phun huyền phù vi khuẩn vào thời điểm 27 ngày trước khi cây lúa trở hoa, vi khuẩn sẽ được tìm thấy trên bẹ lá, cổ lá và lá cò. Cụ thể quần thể vi khuẩn trên bẹ lá được ghi nhận với mật số ít hơn 10^3 cfu/g đến 10^6 cfu/g và mật số trên lá cò thấp hơn rất nhiều trên bẹ lá. Sau đó, mật số vi khuẩn gia tăng cao nhất trên bẹ lá. Tổng cộng mật số vi khuẩn trên hoa lúa là 10^7 cfu/g ở giai đoạn lúa trở đều, nhưng mật số vi khuẩn tăng từ 10^8 cfu/g – 10^9 cfu/g và đến 6 ngày sau khi trở đều, mật số vi khuẩn tăng tiếp tục hơn 10^9 cfu/g trên tất cả hạt lúa. Một minh chứng của Li *et al.*, (2016) đã ghi nhận phun vi khuẩn *B. glumae* vào giai đoạn lúa đẻ nhánh sẽ không biểu hiện triệu chứng, tuy nhiên biểu hiện triệu chứng thối hạt rõ vào giai đoạn lúa trở. Như vậy, vi khuẩn xâm nhiễm và gây thiệt hại nặng giai đoạn lúa trở.

b) Sự xâm nhiễm thứ cấp: Là giai đoạn mầm bệnh đã xâm nhiễm vào hạt lúa, sau đó bắt đầu phán tán và lây lan sang các cây lúa khác với diện tích lây lan gia tăng rất nhanh. Theo Tsushima (1996) quá trình xâm nhiễm thứ cấp diễn ra 7 ngày sau khi lúa vào giai đoạn trở đều. Kết quả khảo sát trên 62 cánh đồng được phân tích 500 chồi lúa với tỷ lệ nhiễm bệnh trên 30% vào giai đoạn 7 ngày sau khi lúa trở đều. Do đó, 7 ngày sau khi lúa trở đều là giai đoạn quan trọng nhất để quản lý bệnh nhằm ngăn chặn sự xâm nhiễm từ sơ cấp sang thứ cấp.

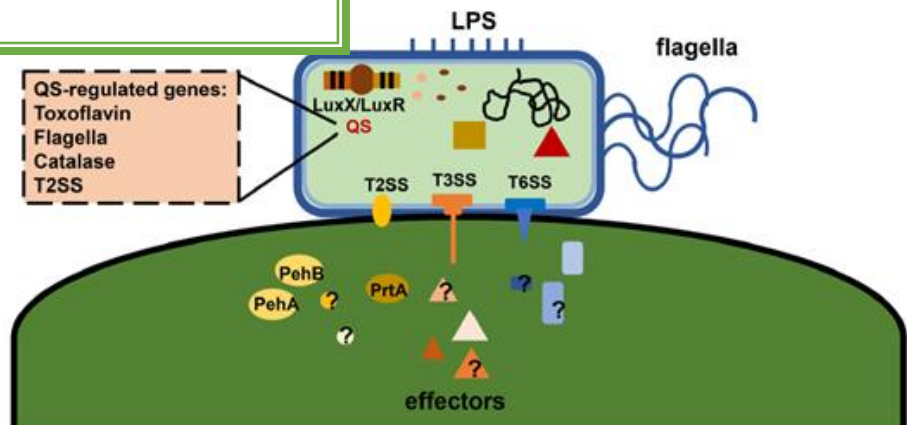
Tóm lại, chu trình xâm nhiễm của vi khuẩn *B. glumae* trải qua ba giai đoạn cụ thể: (1) thiết lập quần thể vi khuẩn; (2) xâm nhiễm vào hạt lúa; (3) nhân mật số vi khuẩn và biểu hiện triệu chứng được miêu tả cụ thể theo Ortega & Rojas (2021) (Hình 2.5).

Giai đoạn 1: Thiết lập quần thể



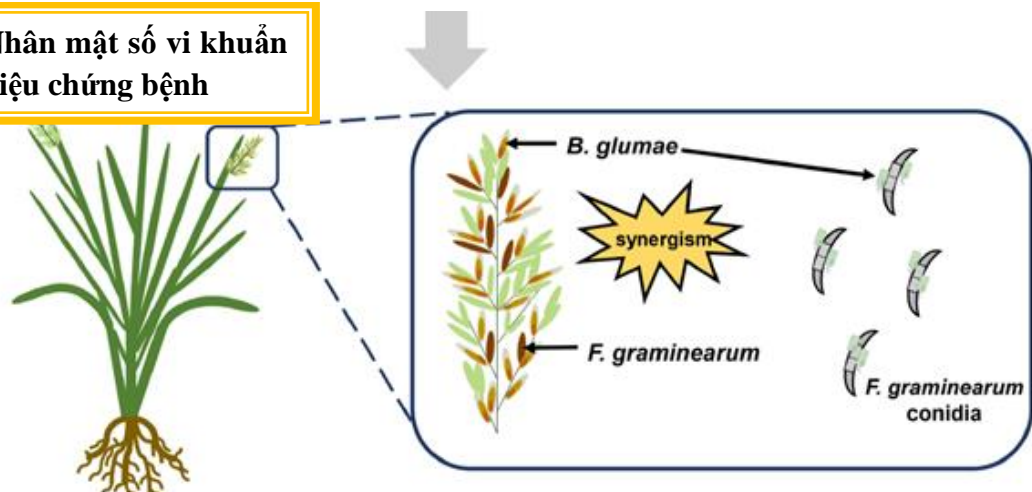
Giai đoạn 1: Vi khuẩn lưu tồn trong hạt giống và chung sống với các vi khuẩn nội sinh trên hạt và thân lúa (A, B). Vi khuẩn *B. glumae* làm giảm mật số vi khuẩn nội sinh thông qua cơ chế cạnh tranh bằng kích hoạt hệ thống T6SS vào giai đoạn lúa trổ (C)

Giai đoạn 2: Xâm nhiễm vào hạt lúa



Giai đoạn 2: Vi khuẩn *B. glumae* kích hoạt các hệ thống gây độc cho tế bào kí chủ như hệ thống tập hợp (QS- sensing), độc tố (toxiflavin), chiên mao, catalase, T2SS, T3SS, T6SS nhằm tạo ra các hiệu ứng xâm nhiễm vào hạt lúa

Giai đoạn 3: Nhân mật số vi khuẩn và biểu hiện triệu chứng bệnh



Giai đoạn 3: Giai đoạn gia tăng mật số và tạo ra triệu chứng thối hạt lúa

Hình 2.5: Chu trình bệnh thối hạt hay bạc bông lúa do vi khuẩn *Burkholderia glumae* (Ortega & Rojas, 2021)

2.1.4.2 Sự lưu tồn

Vi khuẩn *B. glumae* lưu tồn trong hạt giống, trên các bộ phận cây lúa bị bệnh. Sự phân bố của vi khuẩn trong môi trường tùy thuộc vào loại đất, độ pH, kỹ thuật canh tác và điều kiện thời tiết (Yuan, 2004). Nguồn bệnh tồn tại chủ yếu trên hạt lúa nhiễm bệnh, là nguồn duy nhất để truyền bệnh từ vụ này sang vụ khác. Ngoài ra, nguồn bệnh có thể tồn tại ở trong tàn dư cây bệnh trong đất, trên cây lúa chết (Mân, 2007).

2.1.5 Các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình xâm nhiễm của vi khuẩn *Burkholderia glumae*

Quá trình xâm nhiễm của vi khuẩn *B. glumae* chịu ảnh hưởng bởi nhiều yếu tố như sau:

- **Tính miễn cảm của giống:** Giai đoạn trổ hoa là giai đoạn miễn cảm nhất đối với vi khuẩn *B. glumae*. Theo Tsushima (1996) cũng đã khảo sát khả năng miễn cảm trên ba giống lúa (Koshihikari, Koganebare và Asominori) tại Nhật Bản về khả năng gây bệnh của vi khuẩn *B. glumae* bằng cách phun huyền phù vi khuẩn trên cỏ bông ở nhiều thời điểm khác nhau khi cây lúa vào giai đoạn trổ hoa. Kết quả thấy rằng hầu hết quá trình xâm nhiễm vào giai đoạn hoa ở cả ba giống lúa như nhau (1-3 ngày sau khi trổ hoa). Do đó, hầu hết các giống khác nhau nhưng giai đoạn nhiễm bệnh có thể giống nhau vào khoảng 1 - 3 ngày sau khi lúa trổ hoa. Ngược lại, một minh chứng của Li *et al.*, (2016) đã lây nhiễm bệnh trên 2 giống lúa Yongyou 12 và Eyi 105 của Trung Quốc với cách lây nhiễm vi khuẩn ở nhiều vị trí khác nhau như rễ, thân và lá. Kết quả thấy rằng khả năng vi khuẩn định vị trên 2 giống lúa như nhau. Tuy nhiên, khả năng xâm nhiễm trên hai giống lúa khác nhau ví dụ giống lúa Eyi 105 xâm nhiễm qua rễ cũng như biểu hiện triệu chứng héo và xoắn lá chậm hơn giống lúa Yongyou 12 bằng phương pháp nhiễm bệnh tại lá. Do đó, qua kết quả trên thấy rằng tùy giống lúa mà khả năng miễn cảm của vi khuẩn khác nhau có thể do đặc tính di truyền và cấu trúc các bộ phận cây lúa khác nhau.

- **Mật số vi khuẩn:** Theo Tsushima (1996), mật số vi khuẩn ít nhất 10^2 cfu/ml đến 10^4 cfu/ml có khả năng xâm nhiễm bông lúa ở ngoài đồng.

- **Ẩm độ và nhiệt độ:** Theo Tsushima (1996), bông lúa được lây bệnh với huyền phù vi khuẩn từ 2 - 4 ngày ủ ở ẩm độ thấp hơn 70% không biểu hiện triệu chứng bệnh. Ngược lại, khi ủ bông lúa đã lây bệnh ở ẩm độ trên 95% biểu hiện rõ triệu chứng bệnh. Nhiệt độ từ 20 - 32°C thích hợp cho vi khuẩn xâm nhiễm tuy nhiên còn tùy thuộc vào thời gian ủ bệnh. Theo CPC (2007), bệnh phát triển mạnh vào ban đêm ở nhiệt độ 28°C và ẩm độ cao.

2.1.6 Phổ kí chủ

Vi khuẩn *B. glumae* có phổ kí chủ chính trên lúa gây triệu chứng thối cây con, thối bẹ và thối hạt (Jeong *et al.*, 2003; CPC, 2007). Ngoài ra, vi khuẩn *B. glumae* còn gây hại trên nhiều loại cây trồng khác nhau như cây tiêu, cây khoai tây, cây cà phôi, cây mè và cây cà chua gây nên triệu chứng héo xanh tương tự triệu chứng héo xanh do vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* (Jeong *et al.*, 2003).

Vào năm 2009, bệnh thối hạt cũng được ghi nhận trên loài *Brachiaria humidicola* thuộc họ hòa bản ở Colombia. Bông cỏ cũng biểu hiện triệu chứng bạc bông, sau khi phân lập và định danh bằng cặp mồi 27F/1525 R. Kết quả giải trình tự được so sánh dữ liệu trên ngân hàng gen (NCBI) với mức độ tương đồng 99%. Tiếp tục dùng vi khuẩn này lây bệnh nhân tạo theo qui trình Koch với mật số vi khuẩn 10^8 cfu/ml, bệnh đã biểu hiện sau 6 ngày lây bệnh. Kết quả khẳng định rằng bệnh bạc bông trên loài cỏ *B. humidicola* do vi khuẩn *Burkholderia glumae* (Álvarez & Latorre, 2017).

2.1.7 Các yếu tố ảnh hưởng độc tính của vi khuẩn *Burkholderia glumae*

Theo Ham *et al.* (2011), độc tố toxoflavin và enzyme lipase hiện tại được tìm ra từ dòng vi khuẩn *B. glumae*. Nếu như toxoflavin và lipase trong vi khuẩn *B. glumae* bị đột biến thì vi khuẩn này trở nên không độc đối với cây trồng. Việc sản xuất hai độc tố này tùy thuộc vào hệ thống tập hợp (quorum - sensing) của vi khuẩn *B. glumae*, đồng thời hệ thống này cũng làm giảm tính độc của vi khuẩn. Hệ thống này hoạt động thông qua gen được kích hoạt dùng để tập hợp vi khuẩn lại thông qua cơ chế kết nối tế bào đến tế bào. Và hợp chất N- acyl homoserine lactones (AHLs) là hợp chất rất phổ biến được tìm thấy trong hệ thống tập hợp của 50 loài vi khuẩn nhân sơ. Đối với vi khuẩn *B. glumae* hệ thống tập hợp được thiết lập nhanh nếu sản xuất một số hoạt chất như AHLs, N- octanoyl homoserine lactone (C8-HSL) dùng để điều khiển tế bào sản xuất ra toxoflavin và lipase.

2.1.7.1 Độc tố toxoflavin

Toxoflavin, ferverulin và reumycin là những độc tố sinh học được sản xuất bởi vi khuẩn *B. glumae*. Những độc tố này có cấu trúc phân tử giống nhau nhưng khác biệt về công thức cấu tạo. Tuy nhiên, toxoflavin gây độc trên cây lúa, bản chất của toxoflavin được xác định là polycistronic được cấu tạo từ năm gen (toxABCDE) là những thành phần cấu tạo nên toxoflavin trong cơ chế sinh tổng hợp. Toxoflavin là một kháng sinh được phân lập đầu tiên từ vi khuẩn *B. cocovenenans*, và cấu trúc phân tử được tìm ra vào năm 1960. Toxoflavin là nguyên nhân làm giảm chiều cao cây mạ và giảm chiều dài rễ của cây lúa. Hơn nữa, toxoflavin được ghi nhận là thành phần

quan trọng quyết định tính độc của vi khuẩn *B. glumae* bởi vì độc tố toxoflavin bị đột biến thì vi khuẩn trở nên không độc (Ham *et al.*, 2011).

2.1.7.2 Enzyme lipase

Vi khuẩn *B. glumae* được dùng để sản xuất lipase vì khả năng tiết lipase rất nhiều như sử dụng trong sản xuất công nghiệp bao gồm công nghiệp chất tẩy rửa. Trong nghiên cứu gây đột biến hệ thống tiết II kết quả làm giảm hoạt động của lipase trên môi trường, trong trường hợp này hệ thống tiết II chưa được hiểu rõ về cơ chế hoạt động nhằm kích hoạt sản xuất lipase. Theo Kang *et al.* (2008) đã tìm thấy ít nhất có 16 loại protein chưa được biết đến tham gia vào cơ chế của hệ thống tiết II được phân tích bằng phương pháp protein. Trong trường hợp nếu hệ thống II bị biến đổi thì dòng vi khuẩn *B. glumae* cũng trở nên ít độc. Theo Devescovi *et al.* (2007), việc sản xuất lipase tương tự như quá trình sinh tổng hợp toxoflavin tùy thuộc vào TofI/TofR của hệ thống tập hợp bởi C8 – HSL. Các yếu tố ảnh hưởng đến việc sản xuất lipase còn chưa được biết đến. Từ đó thấy rằng lipase cũng góp phần quan trọng qui định dòng vi khuẩn độc hoặc ít độc.

2.1.7.3 Khả năng di chuyển của chiên mao (Flagella)

Mặc dù chiên mao của vi khuẩn không có ảnh hưởng trực tiếp đến kí chủ, nhưng khả năng di động của chiên mao đóng vai trò quan trọng đối với sự phát sinh bệnh vi khuẩn. Theo Kim *et al.* (2007) đã ghi nhận chiên mao ở cực của vi khuẩn *B. glumae* chịu trách nhiệm ít nhất hai chức năng của sự di chuyển của vi khuẩn như: bơi và tập trung lại thành quần thể trên môi trường Luria – Bertani (LB) 0,7% hoặc 0,4% agar. Do đó tất cả dòng vi khuẩn *B. glumae* bị đột biến gen qui định chiên mao thì hầu hết các dòng vi khuẩn cũng trở nên không độc. Cũng giống như toxoflavin, lipase thì quá trình sinh tổng hợp chiên mao và sự di động của chiên mao cũng liên quan đến TofI/TofR trên hệ thống tập hợp bằng tính hiệu C8-HSL.

2.1.7.4 Hệ thống cảm ứng III (type III effectors)

Hệ thống cảm ứng III (Type III secretion systems, T3SSs) được sử dụng bởi nhiều loại vi khuẩn Gram âm gây bệnh trên cây trồng có tác động trực tiếp đến protein ảnh hưởng đến độc tính lên tế bào nhân thật. Theo Kang *et al.* (2008) đã báo cáo có thể suy luận rằng phản ứng siêu nhạy cảm của vi khuẩn *B. glumae* trên cây thuốc lá phụ thuộc vào hệ thống T3SSs và hệ thống này được kích hoạt bởi 28 loại protein ngoại bào. Cũng tương tự như các gen khác nếu hệ thống T3SSs bị biến đổi thì mầm bệnh cũng trở nên ít độc hơn.

2.1.7.5 Exopolysaccharide (EPSs)

EPSs giữ vai trò trong sự phát sinh bệnh đối với mầm bệnh định vị trong mạch gỗ (xylem). Nhìn chung EPSs được sản xuất ra từ vi khuẩn làm mạch gỗ không vận

chuyển nước được dẫn đến hiện tượng cây bị héo khi gặp nhiệt độ cao. Giống như gen *hrp* là thành phần của T3SS. Sự sản xuất EPSs là yếu tố gây độc sơ khởi cho nhiều mầm bệnh gây bệnh trên cây trồng như vi khuẩn *Ralstonia solanacearum*, *Erwinia amylovora*, *Pantoea stewartii* sp. *stewartii* và *Xanthomonas campestris* (Denny, 1995). Ngoài ra, vi khuẩn *B. glumae* cũng gây triệu chứng héo trên cây mè, cây tiêu và cây cà phê có liên quan đến EPSs.

2.1.7.6 Enzyme polygalacturonases

Polygalacturonases cũng giống như enzyme pectolyase dùng để phân hủy pectin cấu tạo nên vách tế bào của cây trồng, do đó enzyme này có vai trò rất quan trọng ảnh hưởng tới tính độc do nhiều mầm bệnh như bệnh thối nhũn do *Erwinia* spp.. Trong chi *Burkholderia* gồm loài *B. cepacia* và *B. cenocepacia* có khả năng gây bệnh trên hành là do chức năng gen *pehA* mã hóa endopolygalacturonase ảnh hưởng độc tính của vi khuẩn này, trong trường hợp này *pehA* là yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến tính độc của vi khuẩn. Hiện tại, hai gen *pehA* và *pehB* mã hóa hai dạng iso - endopolygalacturonase được hiện diện trên vi khuẩn *B. glumae*, tuy nhiên chức năng của chúng có ảnh hưởng đến độc tính của vi khuẩn hay không thì chưa được xác định.

Để chứng minh các nhận định trên liên quan độc tố vi khuẩn *B. glumae* theo Karki (2010) đã xác định độc tính của vi khuẩn *B. glumae* khi vi khuẩn có khả năng tiết ra một số độc tố và enzyme như: độc tố toxoflavin, enzyme lipase, enzyme polygalacturonase, chiên mao, N- acyl homoserine lactones (AHL), phản ứng siêu nhạy cảm (Hypersensitive Response, HR).

Tóm lại, tính độc của vi khuẩn *B. glumae* chịu ảnh hưởng của các yếu tố như: tiết độc tố toxoflavin, tiết enzyme lipase, có khả năng di động, chiên mao, tạo phản ứng siêu nhạy cảm (HR), tiết enzyme pectinase, khả năng gây thối nhũn trên hành, và qui tắc Koch trên bông lúa. Nếu vi khuẩn thiếu một trong những đặc tính trên thì vi khuẩn sẽ giảm khả năng gây bệnh thối hạt trên lúa.

2.1.8 Biện pháp quản lý

Bệnh thối hạt do vi khuẩn *B. glumae* trên lúa rất khó quản lý nếu phát hiện không kịp thời, đặc biệt vào điều kiện có mưa nhiều. Vì vậy, để quản lý bệnh hiệu quả cần phòng bệnh là quan trọng nhất đồng thời cần kết hợp nhiều biện pháp quản lý như: biện pháp hóa học, biện pháp canh tác và biện pháp sinh học.

2.1.8.1 Biện pháp hóa học

Theo CPC (2007), phòng trị bệnh thối hạt trên lúa bằng một số hóa chất như kasugamycin, nonyl-phenyl-sulfonic copper, ammonium ethylenebis (dithiocarbamate) bằng cách phun thuốc vào giai đoạn trước trổ vì thời điểm này sẽ cắt đứt giai đoạn xâm nhiễm sơ cấp chính là nguyên nhân lây lan mầm bệnh khi cây lúa vào giai đoạn

trở đều (Tsushima, 1996). Ngoài ra, sau khi trở cũng là thời điểm quan trọng nếu vi khuẩn vẫn còn tồn tại trên cây lúa trước khi trở, chính giai đoạn này vi khuẩn sẽ nhân mật số và xâm nhiễm vào hoa lúa như nhụy hoa, mày hạt (Li *et al.*, 2016) và gây triệu chứng thối hạt. Do đó, cần phun thuốc trừ vi khuẩn vào 2 giai đoạn trước và sau khi trở là yêu cầu cấp thiết quản lí bệnh thối hạt đạt hiệu quả cao. Ngoài ra, vi khuẩn *B. glumae* còn lưu tồn trong hạt giống vì vậy theo Kim (2015) ngâm hạt giống với một trong các hoạt chất trừ vi khuẩn như oxolinic acid (Starner), bronopol (Totan) từ 18 – 24 giờ trước khi gieo sạ sẽ phòng được bệnh thối cây con vào giai đoạn sạ. Tuy nhiên, Maeda *et al.*, (2007) đã báo cáo rằng hoạt chất oxolinic acid đã kháng với vi khuẩn *B. glumae* do gen *gyrA* bị biến đổi.

2.1.8.2 Biện pháp canh tác

Theo CPC (2007) vào thời điểm trước khi gieo sạ nên chuẩn bị bề mặt ruộng bằng phẳng tránh những chỗ trũng nước vì mầm bệnh sử dụng chất dinh dưỡng thừa vụ trước kết hợp ẩm độ cao giúp cho vi khuẩn *B. glumae* gây bệnh thối cây con. Ngoài ra, có thể sử dụng giống kháng nhằm hạn chế sự lưu tồn của mầm bệnh. Một nghiên cứu của Groth *et al.*, (2007) đã tìm ra giống lúa LM-1 có khả năng kháng bệnh cao. Theo Ham *et al.* (2011), một số giống đã được thử khả năng kháng bệnh thối hạt, tuy nhiên kết quả khả năng kháng bệnh thối hạt chưa kháng hoàn toàn, có thể quá trình tương tác giữa mầm bệnh và cây trồng là quá trình đồng tiến hóa kết hợp với điều kiện môi trường. Vì vậy, giống kháng bệnh rất dễ phá vỡ hàng rào kháng bệnh nên quá trình tuyển chọn giống kháng không đạt hiệu quả cao như mong muốn.

2.1.8.3 Biện pháp sinh học

Trong việc quản lí bệnh thối hạt trên lúa nhiều nhà khoa học đã sử dụng nhiều tác nhân sinh học để phòng trừ như sử dụng vi khuẩn không độc như *B. glumae*, *B. gladioli*, hay vi khuẩn đối kháng *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus* sp. và thực khuẩn thể (Ham *et al.*, 2011). Theo Furuya *et al.*, (1991) đã sử dụng dòng vi khuẩn *B. glumae* N7503 không độc để phòng trị bệnh thối cây con do vi khuẩn *B. glumae* độc cho hiệu quả phòng trị bệnh thối cây con. Theo Ham *et al.* (2011), chi vi khuẩn *Burkholderia* có khả năng tiết kháng sinh ức chế dòng vi khuẩn *B. glumae* độc. Ngoài ra, theo Adachi *et al.* (2012) đã sử dụng hai dòng thực khuẩn thể BGPP-Ar và BGPP-Sa được phân lập từ nguồn nước xung quanh khu vực trồng lúa trong phòng trị bệnh thối cây con trong điều kiện nhà lưới. Kết quả, dòng thực khuẩn thể BGPP-Ar cho hiệu quả cao trong việc phòng trị vi khuẩn *B. glumae* MAFF 106715 với tỉ lệ bệnh thấp hơn các nghiệm thức xử lí còn lại. Tại Việt Nam đã có những nghiên cứu sơ khởi về việc sử dụng thực khuẩn thể trong việc phòng trị bệnh thối hạt trên lúa trong điều kiện nhà lưới. Cụ thể Huy và *ctv.* (2015) đã sử dụng dòng thực khuẩn thể Φ VL34, Φ VL39 và Φ AG58 với mật số 10^8 pfu/ml cho hiệu quả khác biệt so với nghiệm thức đối chứng không áp dụng

thực khuẩn thể. Một nghiên cứu của Phên và Nhân (2020) đã tìm ra chủng vi khuẩn *Bacillus* – THDT3, *Bacillus* – PTAG1 và *Bacillus* – PTAG12 có khả năng ức chế vi khuẩn Bg-AG9 trong điều kiện *in vitro* và mang lại hiệu quả phòng trị tương đương oxolinic acid ở biện pháp phun ngừa trước khi mầm bệnh hiện diện ở điều kiện nhà lưới. Cũng tương tự Nga và Khởi (2020) đã áp dụng hai chủng vi khuẩn (*Pseudomonas fluorescen* 28 và *Pseudomonas fluorescen* 44) được phân lập từ vùng rễ cũng cho hiệu quả giảm bệnh thối hạt trong điều kiện nhà lưới góp phần bảo vệ tốt nâng suất lúa.

2.1.8.4 Biện pháp tổng hợp

Vụ Hè Thu và Thu Đông tại Việt Nam là điều kiện thời tiết thích hợp để vi khuẩn xâm nhiễm hạt lúa đặc biệt vào giai đoạn trước trổ và sau khi trổ đều. Do đó, nên áp dụng biện pháp quản lý tổng hợp nhằm giảm đáng kể sự xâm nhiễm của vi khuẩn đồng thời giảm thiệt hại năng suất. Theo Kim (2015), biện pháp quản lý bệnh thối hạt do vi khuẩn *B. glumae* được đề xuất như sau:

- Sử dụng giống sạch bệnh nên xử lý hạt giống trước khi gieo trồng. Ngâm hạt giống với một trong những thuốc trừ vi khuẩn như Starner, Totan.

- Chuẩn bị bề mặt ruộng bằng phẳng tránh những chỗ trũng nước là nơi mà mầm bệnh sử dụng chất dinh dưỡng thừa vụ trước và ẩm độ cao giúp cho vi khuẩn *B. glumae* gây bệnh thối cây con.

- Thăm ruộng thường xuyên, phát hiện sự xuất hiện của mầm bệnh để phòng trị kịp thời.

- Bón phân tránh thừa đạm, bón theo nguyên tắc bón đúng.

- Phun thuốc kết hợp các biện pháp thực khuẩn thể và kích kháng ngừa vi khuẩn vào giai đoạn lúa bắt đầu trổ let xẹt và lúc lúa trổ đều (phun 2 lần cách nhau 5 -7 ngày).

- Khi phát hiện bệnh thối hạt nên phun thuốc hóa học nhằm ngăn sự lây lan của mầm bệnh ngay lập tức đặc biệt phun 2 lần (lần 1: lúc phát hiện bệnh; lần 2: 5-7 ngày sau khi phun lần 1 vì theo dịch tễ học 5-7 ngày sau khi vi khuẩn xâm nhiễm sơ cấp là lúc vi khuẩn xâm nhiễm thứ cấp, đó là lúc vi khuẩn lây lan rất nhanh khi gặp ẩm độ cao).

2.2 TỔNG QUAN VỀ THỰC KHUẨN THỂ

2.2.1 Khái niệm về thực khuẩn thể

Thực khuẩn thể (TKT) là virus ký sinh chuyên tính tế bào vi khuẩn, cấu trúc TKT gồm lõi là axit nucleic (là ADN hoặc ARN) và được bao bọc bên ngoài bởi bao protein. TKT nhỏ hơn tế bào vi khuẩn ký chủ, kích thước trong khoảng 24 - 200 nm, vì

vậy TKT chỉ được nhìn thấy qua kính hiển vi điện tử (Kutter & Sulakvelidze, 2005). TKT cũng như các virus khác, chúng có đặc tính ký sinh bắt buộc, chúng không có khả năng tự sinh sản mà phải thông qua tế bào ký chủ để nhân mật số do TKT không có bộ máy tổng hợp năng lượng cũng như không có ribosome để tổng hợp protein (trích dẫn Nga & Giang, 2016).

2.2.2 Lịch sử xuất hiện thực khuẩn thể

Thực khuẩn thể (tiếng anh gọi là bacteriophage hay phage) là virus có mặt khắp mọi nơi trên trái đất như nước biển, sông suối, ao hồ, trong đất, trên tán lá cây trồng, trên cơ thể động vật, trên người, trong thực phẩm. TKT hiện diện với mật số cao khoảng 10^{31} - 10^{32} trong trái đất. Vào những năm 1880 ngành Vi khuẩn học đã hình thành, sau đó đến năm 1896, Hankin đã ghi nhận nước của dòng sông Jumna và Ganges của Ấn Độ có thể trị được bệnh dịch tả của người gây ra bởi vi khuẩn *Vibrio cholera*. Tuy nhiên, lấy nước từ hai con sông này đun sôi thì không còn tác dụng trị bệnh và ông đã kết luận rằng trong nước chứa các hoạt chất dễ bay hơi có thể là nguyên nhân tiêu diệt vi khuẩn gây bệnh. Đến năm 1901, hai nhà khoa học Emmerich và Löw đã ghi nhận hiện tượng những đốm tan trên môi trường nuôi cấy có chứa vi khuẩn (trích dẫn Kutter & Sulakvelidze, 2004).

Với những phát hiện bí ẩn về một loại sinh vật không xác định được có khả năng tiêu diệt vi khuẩn. Một chuyển biến lớn vào năm 1915, Twort là nhà vi khuẩn học người Anh đã bắt đầu tìm hiểu và nghiên cứu về hiện tượng này. Ông đã ghi nhận sự phát triển của vi khuẩn và hình thành những đốm trong suốt như gương. Một điều lý thú ông đã lấy những vết trong như gương này lên kính hiển vi, kết quả là thấy vi khuẩn vỡ ra “granules” nhưng ông đã dừng lại những nghiên cứu ấy và xem hiện tượng đó như một lời đề nghị mở ra bước ngoặt lớn cho những nghiên cứu tiếp theo. Hai năm sau đó, Félix d’Herelle là nhà vi khuẩn học người Pháp-Canadian đã chứng minh lại hiện tượng của Twort, ông nhận thấy rằng một loại sinh vật có khả năng tiêu diệt vi khuẩn *Shigella* hình thành những đốm tan trên môi trường có sự hiện diện của tế bào vi khuẩn ký chủ gọi là plaque và ông nghĩ rằng sinh vật ấy rất nhỏ đó là virus ký sinh lên vi khuẩn. Ông đặt tên cho virus này là “bacteriophage” hoặc “bacteria eater” có nguồn gốc từ tiếng Hy Lạp “phagein” có nghĩa là “ăn” (Kutter & Sulakvelidze, 2004). Ông đã sử dụng TKT để phòng trị bệnh kiết lỵ do vi khuẩn *Shigella* gây ra. Tương tự, một thử nghiệm trên thỏ đã thấy rằng TKT có hiệu quả trong phòng trị vi khuẩn *Shigella*. Do vậy, hầu hết những nghiên cứu về TKT từ năm 1920 đến cuối 1930 đã phát triển trong liệu pháp sử dụng TKT trong phòng trị bệnh do vi khuẩn và sản phẩm TKT đã được bán ra thị trường. Tuy nhiên, vào cuối năm 1930 hội đồng Y khoa và Hóa học của Hoa Kỳ đã thấy hiệu quả sử dụng liệu pháp TKT trong phòng trừ bệnh do vi khuẩn không rõ ràng và cần nghiên cứu thêm. Đồng thời, tại thời điểm này thuốc

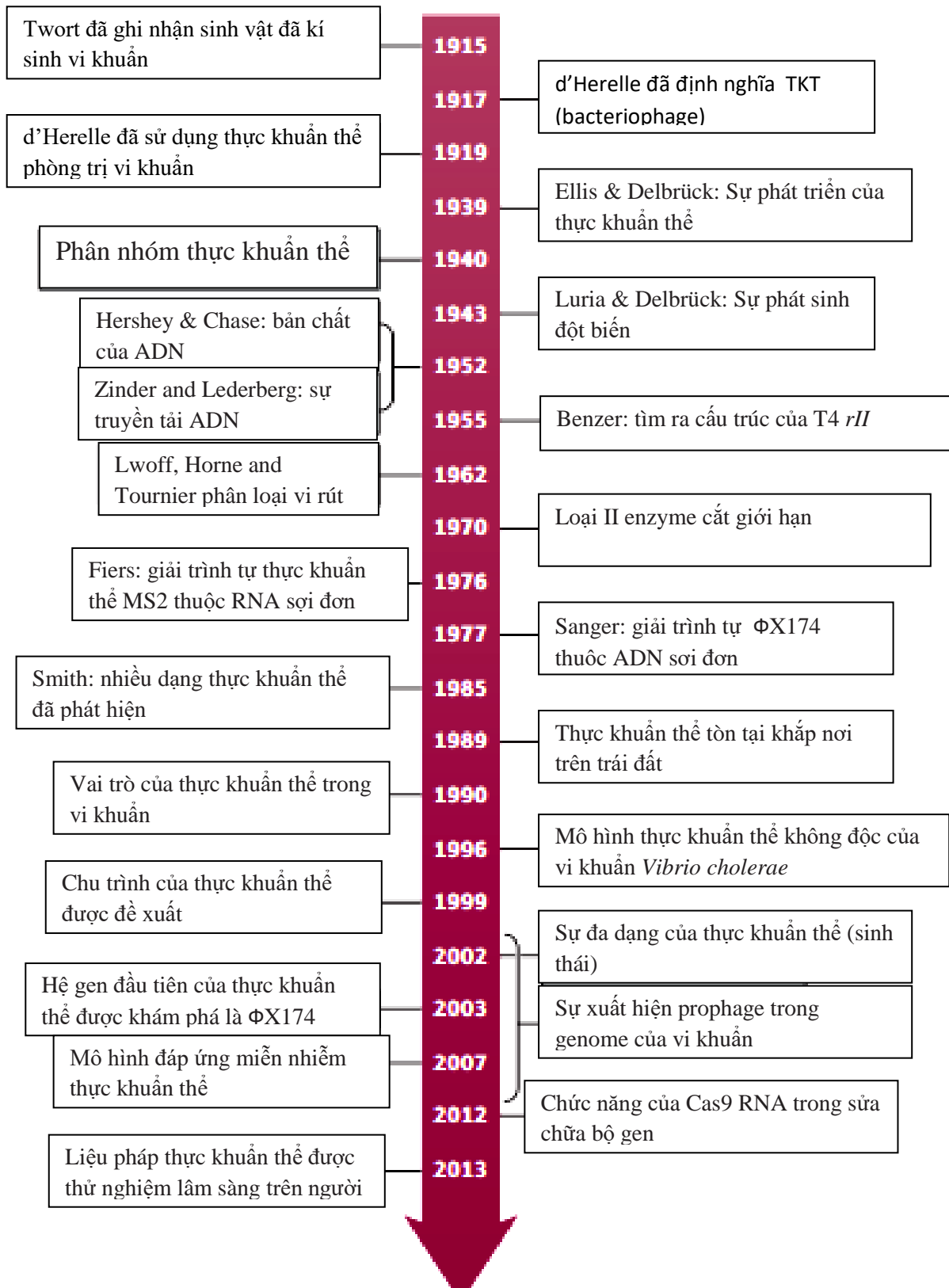
kháng sinh đã ra đời đã cho hiệu quả phòng trị vi khuẩn vượt trội. Do đó, nghiên cứu về TKT dần khép lại mặc dù nghiên cứu TKT rất thú vị (Salmond & Fineran, 2015). Tuy nhiên, những năm sau đó hiện tượng vi khuẩn kháng thuốc kháng sinh gia tăng, vì vậy TKT là một giải pháp nhằm giải quyết hiện tượng kháng thuốc kháng sinh của vi khuẩn, đã được chú ý nghiên cứu tiếp tục.

Vào những năm 1940, Liên Xô và các nước Đông Âu khác vẫn tiếp tục nghiên cứu về TKT, tuy nhiên hiểu biết rõ ràng về đặc điểm sinh học của TKT vẫn còn hạn chế như bản chất của TKT.

Vào năm 1950 đến 1960 trung tâm Công Nghệ Sinh học được hình thành, Jacob và Monod đã thấy hiện tượng “cảm ứng gen” được nghiên cứu từ tiền TKT Lamda trên vi khuẩn *E. coli*. Vào năm 1965, Jacob, Monod và Lwoff đã đạt giải Nobel về khám phá gen điều khiển hoạt động của enzyme và tổng hợp vi rút.

Đến năm 1970, Baltimore và Temin phát hiện ra men phiên mã ngược (reverse transcriptase) trong virus chỉ có một mạch đơn RNA, mở ra một tương lai hoàn toàn mới trong kỹ thuật di truyền, trong virus học, ung thư học,... Từ năm 1971 các nhà khoa học liên tiếp phát hiện ra các loại viroids; Fiers (1976) đã giải trình tự TKT MS2 thuộc RNA; Sanger (1977) giải trình tự Φ X174 thuộc ADN sợi đơn.

Nhờ các thành tựu mới nhất trong nghiên cứu kỹ thuật di truyền ở virus mà nhân loại đã phát minh được nhiều loại vacxin virus thế hệ mới, góp phần quan trọng vào việc đẩy lùi nhiều bệnh virus hiểm nghèo ở người và động vật. Quá trình khám phá TKT được tóm tắt bằng sơ đồ Hình 2.6.

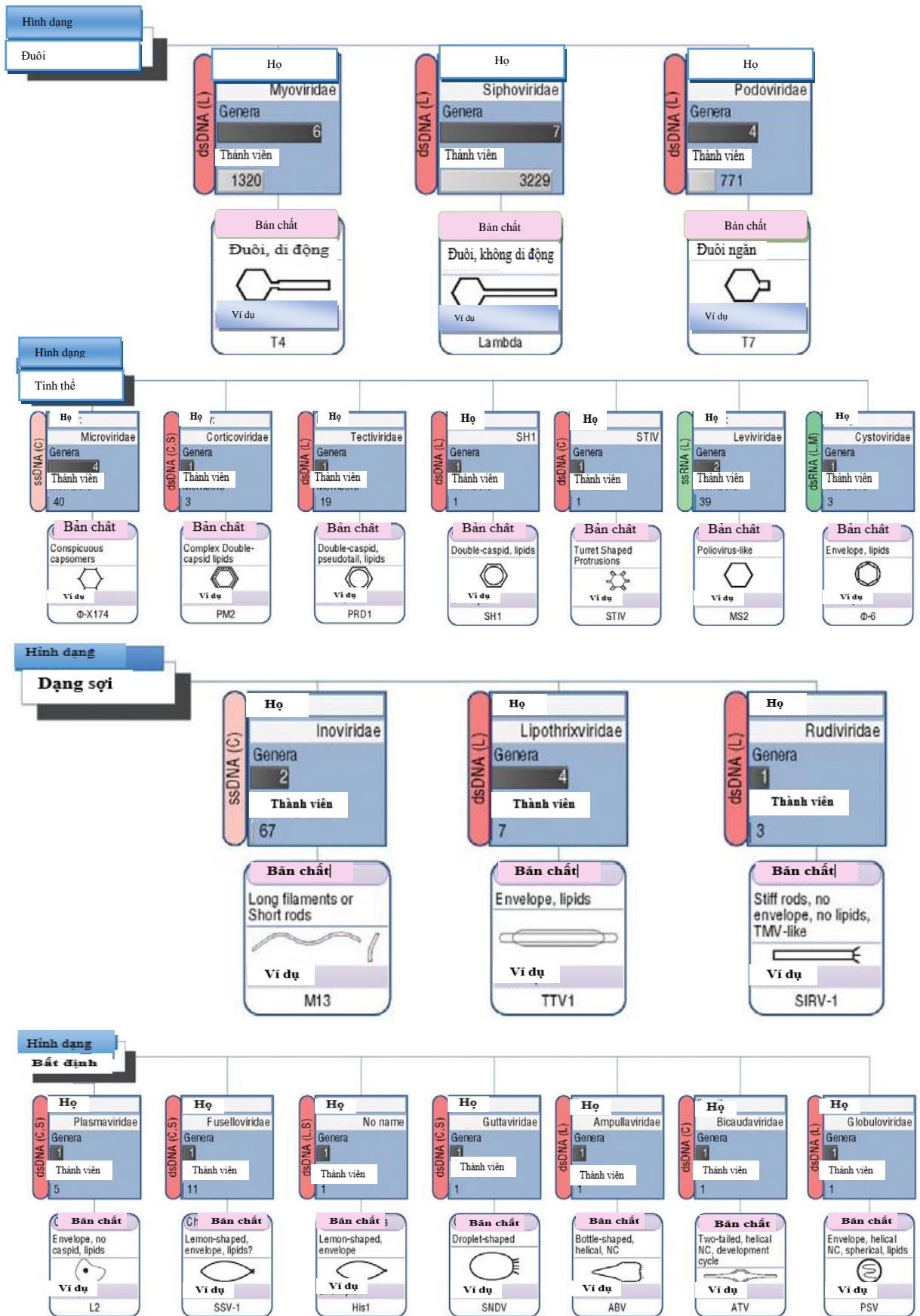


Hình 2.6: Sơ đồ sự phát triển 100 năm nghiên cứu về thực khuẩn thể (Salmond & Fineran, 2015)

2.2.3 Phân loại thực khuẩn thể

Đa số TKT có kích thước rất nhỏ, có thể lọt qua các màng lọc vi khuẩn, chính vì thế chúng ta không thể quan sát TKT dưới kính hiển vi quang học (kích thước TKT đo bằng đơn vị nanomet ($1\text{nm} = 10^9 \text{ m}$)). Ngày nay chúng ta có thể đo đạc một cách cụ thể hình thái từng họ TKT với kích thước từ 20 – 300 nm tùy theo họ TKT khác nhau. TKT có cấu trúc hình nòng nọc gồm 2 phần: Phần đầu và phần đuôi hoặc hình hạt (Dũng và *ctv.*, 2007).

Theo Ackermann (2007) có ít nhất 5.568 TKT được phân loại bởi kính hiển vi điện tử vào năm 1959. TKT được phân loại theo Ackermann (2007) gồm 17 họ và ba nhóm chưa được phân loại rõ ràng. Trong đó, nhóm TKT dạng đuôi thuộc một bộ Caudovirales chiếm 96% gồm họ *Myoviridae* (24,5%), họ *Siphoviridae* (61%) và họ *Podoviridae* (14%), ngoài ra chỉ có 208 TKT dạng khối đa diện, dạng sợi và dạng bất định chiếm 3,7%. TKT được tìm thấy trên 11 ngành vi khuẩn và ngành vi khuẩn cổ, chúng xâm nhiễm trên 154 kí chủ hầu hết thuộc ngành Actinobacteria, Firmicutes và Proteobacteria (Bảng 2.1). Phân loại TKT chủ yếu dựa trên cơ sở hình thái và về mặt di truyền (sợi đơn ADN, sợi đôi ADN, sợi đơn RNA, sợi đôi RNA). Năm 2009, Ackermann đã bổ sung và phân loại TKT được chia thành 19 họ gồm TKT dạng đuôi (*Myoviridae*, *Siphoviridae* và *Podoviridae*), TKT dạng khối đa diện (*Microviridae*, *Corticoviridae*, *Tectiviridae*, *SH1*, *STIV*, *Leviridae*, *Cystoviridae*), TKT dạng sợi (*Inoviridae*, *Lipothrixviridae*, *Rudiviridae*), thực khuẩn thể dạng bất định (*Plasmaviridae*, *Fuselloviridae*, *Guttaviridae*, *Ampullaviridae*, *Bicaudaviridae*, *Globuloviridae* và một họ chưa đặt tên dạng quả chanh). Đến năm 2013, Pelzek *et al.*, cũng dựa vào hình thái các họ TKT và đã bổ sung thêm 1 họ mới (chưa đặt tên) tương tự họ *Fuselloviridae* nhưng khác nhau về thành phần cấu tạo là họ mới này không chứa lipid, vì vậy hiện nay 20 họ TKT (Hình 2.7).



Hình 2.7: Hình dạng các họ thực khuẩn thể (Pelzek et al., 2013)

Bảng 2.1 Sự kí sinh của họ thực khuẩn thể trên ngành vi khuẩn

Ngành vi khuẩn nhân sơ	<i>Myoviridae</i>	<i>Siphoviridae</i>	<i>Podoviridae</i>	Thực khuẩn thể dạng đuôi	PF_P
Archaea	8	7		15	29
Eubacteria					
Actinobacteria	6	501	22	529	1
Bacteroidetes	35	23	1	59	2
Chlamydia					3
Cyanobacteria	26	7	12	45	
Deinococcus- Thermus	4	3		7	10
Firmicutes	377	1743	105	2275	33
Fusobacteria	3	1	3	7	
α -Proteobacteria	88	218	126	432	9
β -Proteobacteria	28	25	9	62	
γ -Proteobacteria	695	677	487	1859	112
δ -Proteobacteria	17	1	6	24	
-Proteobacteria	21	12		33	9
Spirochaetes	12	1		13	
Tổng cộng	1320	3269	771	5360	208

Chú thích: PFP (polyhedral: khối đa diện, filamentous: dạng sợi, và pleomorphic: dạng đa hình)(Ackermann, 2007)

Theo Kutter và Sulakvelidze (2004); Murphy *et al.* (2012), đặc điểm từng họ thực khuẩn thể được miêu tả như sau:

2.2.3.1 Thực khuẩn thể dạng đuôi (tail phage)

Theo Ackermann (2007) đã miêu tả TKT dạng đuôi là nhóm hiện diện lớn nhất và phân bố rộng nhất trên trái đất. Ít nhất 4.950 TKT dạng đuôi được ghi nhận dưới kính hiển vi điện tử trong tổng số hơn 5.500 TKT được quan sát. TKT được cấu tạo đặc biệt gồm lớp vỏ bọc là protein và bên trong là sợi đôi ADN với tỉ lệ nhiễm sắc thể

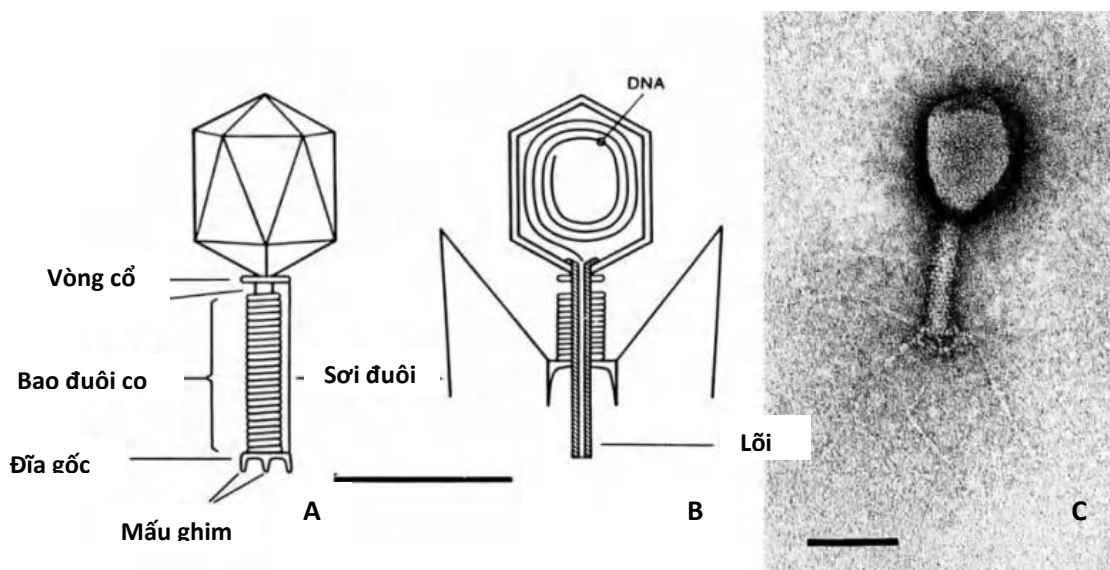
cao. Tất cả TKT dạng đuôi sở hữu đầu gồm 20 mặt và 12 góc. Kích thước TKT từ 24 - 400 nm và trọng lượng bộ gen từ 18 – 400 kb tùy từng loài TKT khác nhau. Trong nhóm TKT dạng đuôi gồm 3 họ phổ biến như sau:

a) Họ Myoviridae: virut chứa sợi đôi ADN dạng thẳng có đuôi có thể co lại, ở trung tâm được bao lớp protein bên ngoài chiếm 25%. Điển hình là TKT T4 (Hình 2.8) là một trong những TKT có trọng lượng bộ gen khoảng 168 kb với kích thước lớn nhất (chiều dài khoảng 200 nm và chiều rộng 80 -100 nm) được cấu tạo bởi vỏ protein (cấu tạo đầu gồm 20 mặt thon dài). Đuôi được cấu tạo gồm 2 lớp chính: ống đuôi và đuôi được bao bọc một lớp vỏ cứng và co trong suốt quá trình xâm nhiễm tế bào vi khuẩn. Vỏ đuôi được tách ra từ phần đầu gọi là phần cổ. Cuối đuôi có tám đĩa gốc được gắn bởi các sợi đuôi là nơi giúp TKT bám vào tế bào vi khuẩn.

Vỏ bọc của T4 (capsid) được cấu tạo bởi 3 loại protein chính gồm protein gp23* gp24* và gp20. Trong quá trình hấp phụ và bơm ADN đuôi có thể gia tăng kích thước từ 24 nm đến 33 nm.

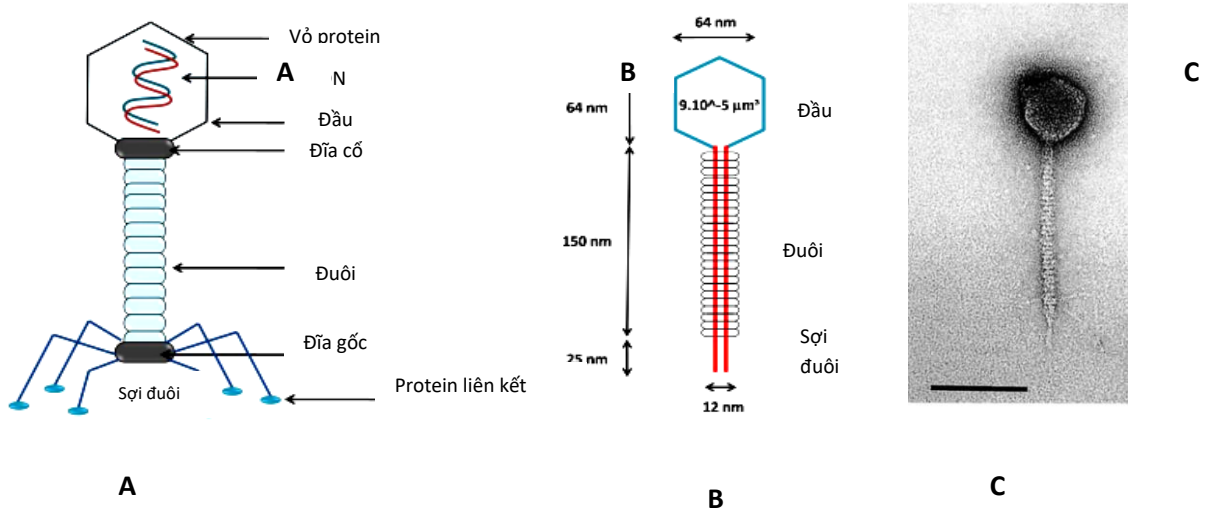
Đĩa gốc dùng để bám vào tế bào vi khuẩn cũng được cấu tạo phức tạp ở cuối đuôi với chiều dài khoảng 27 nm và đường kính khoảng 52 nm có hình vòm. Khi TKT hấp phụ trên bề mặt tế bào vi khuẩn thì đĩa gốc có thể thay đổi chiều dài giảm xuống 12 nm và gia tăng đường kính 61 nm.

Đuôi có 3 sợi protein: sợi đuôi dài, sợi đuôi ngắn và sợi mỏng manh. Sợi đuôi dài và sợi đuôi ngắn gắn vào đĩa gốc và sợi mỏng manh kéo dài nhằm kết nối đuôi đến capsid. Sợi đuôi dài có chiều dài khoảng 145 nm và đường kính 4 nm. Các sợi đuôi có nhiệm vụ quan trọng bám vào các thụ thể trên tế bào vi khuẩn là điều kiện giúp TKT tấn công vi khuẩn.



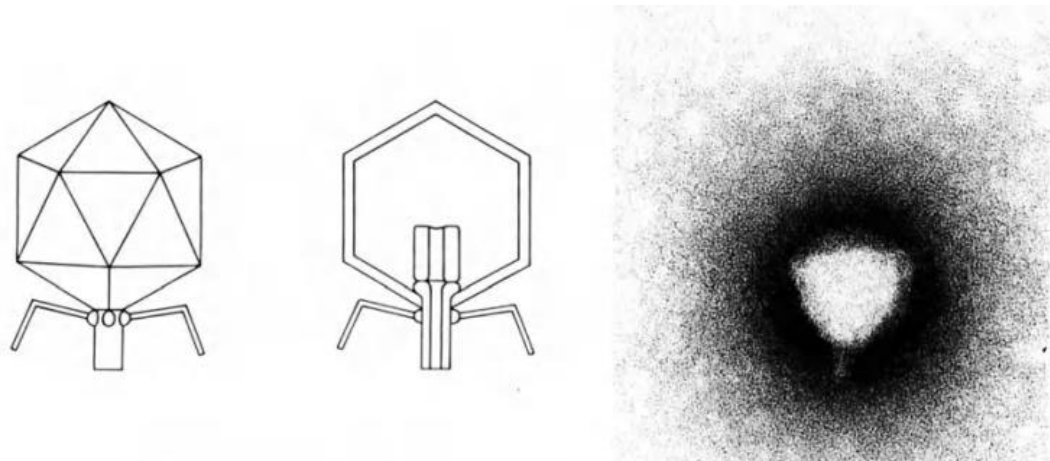
Hình 2.8: Hình thái cấu trúc thực khuẩn thể T4: (A, B): Mô hình T4; (C): Hình dạng T4 dưới kính hiển vi điện tử (Murphy *et al.*, 2012)

b) Họ Siphoviridae: Các TKT thuộc họ *Siphoviridae* chứa sợi đôi ADN dạng thẳng có đuôi dài không co lại chiếm 61% (tiêu biểu là TKT Lamda). TKT Lamda là TKT ôn hòa với ADN sợi đôi dạng thẳng và trọng lượng bộ gen khoảng 48,5 kb được bao bọc bởi lớp vỏ protein (Hình 2.9). Nhiễm sắc thể gồm 12 – 15 loại protein khác nhau. Đầu là một khối đa diện với đường kính (chiều dài và chiều rộng bằng nhau) khoảng 64 nm, đuôi dài khoảng 150 nm, sợi đuôi dài khoảng 25 nm và đường kính lõi thân khoảng 12 nm.



Hình 2.9: Hình thái cấu trúc thực khuẩn thể Lamda: (A,B): Mô hình thực khuẩn thể Lamda; (C): Hình dạng thực khuẩn thể Lamda dưới kính hiển vi điện tử (Murphy *et al.*, 2012).

c) Họ Podoviridae: Các loài thuộc họ *Podoviridae* cũng chứa sợi đôi ADN dạng thẳng có đuôi ngắn chiếm khoảng 14% trọng bộ Caudovirales. Đầu là khối đa diện cùng kích thước khoảng 60 nm, chứa 72 protein (T=7). Đuôi có kích thước 17 x 8 nm và có 6 sợi đuôi ngắn, trọng lượng bộ gen khoảng trên 40 kb. Tiêu biểu là TKT P22 xâm nhiễm vào vi khuẩn *Salmonella enterica* (Hình 2.10). Dạng trưởng thành của Φ P22 đầu được cấu tạo gồm 20 mặt (7I capsid có đường kính khoảng 650 Å). Lớp vỏ procapsid có hàng trăm bản sao của protein gp5 bao bên ngoài và protein gp8 làm khung, nhiều bản sao của ba loại protein như gp7, gp16, gp20. Cơ chế xâm nhiễm của họ *Podoviridae* vào vi khuẩn kí chủ chưa biết đến một cách rõ ràng. Tuy nhiên, Φ P22 là dạng đuôi ngắn và không thể co lại, chúng bám vào bề mặt của tế bào kí chủ bằng nhiều sợi đuôi, sau đó bơm ADN vào tế bào kí chủ.



Hình 2.10: Hình thái cấu trúc thực khuẩn thể T7: (A,B): Mô hình thực khuẩn thể T7; (C): Hình dạng thực khuẩn thể T7 dưới kính hiển vi điện tử truyền qua (Murphy *et al.*, 2012)

2.2.3.2 Một số họ thực khuẩn thể khác

- Thực khuẩn thể dạng đa diện (*Polyhedral phage*)

Các TKT không đuôi chỉ bao gồm khoảng 190 virus đã biết, tương ứng với ít hơn 4% virus vi khuẩn được công nhận (Ackermann, 2011). Chúng được phân loại thành 10 họ nhỏ gồm họ *Microviridae*, họ *Corticoviridae*, họ *Tectiviridae*, họ *Leviviridae*, *Cystoviridae*,....

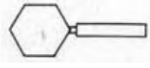
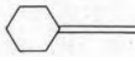








- Thực khuẩn thể dạng sợi (*Filamentous*)

Các TKT dạng sợi bao gồm một số họ như *Inoviridae*, *Lipothrixviridae*, *Rudiviridae*. Chúng có chiều dài khoảng 410 nm đến 1.950 nm và chứa ADN dạng thẳng hoặc vòng, sợi đôi hoặc sợi đơn tùy theo từng họ. Trọng lượng bộ gen khoảng 4,4 đến 8,5 kb (Murphy *et al.*, 2012)

- Thực khuẩn thể dạng đa hình hay bất định (*Pleomorphic*)

TKT dạng sợi bao gồm một số họ điển hình như *Plasmaviridae*, *Fuselloviridae*. Chúng có chiều dài khoảng 50 – 125 nm và chứa ADN dạng thẳng hoặc vòng tùy theo từng họ. Trọng lượng bộ gen khoảng 11,965 kb đến 15,465 kb (Murphy *et al.*, 2012).

Bảng 2.2 Tóm tắt về kích thước và hình dạng các họ thực khuẩn thể

Hình thái	Họ	Kích thước (nm)		Thực khuẩn thể điển hình
		Đầu	Đuôi	
	<i>Myoviridae</i>	65 x 95	25 x 100	T2
	<i>Siphoviridae</i>	60	570	Lamda
	<i>Podoviridae</i>	47	10 x 15	T3
	<i>Microviridae</i>	27	Không đuôi	X174
	<i>Corticoviridae</i>	63	Không đuôi	PM2
	<i>Tectiviridae</i>	60	Không đuôi	PRD1
	<i>Leviviridae</i>	23	Không đuôi	MS2
	<i>Cystoviridae</i>	70–80	Không đuôi	□6
	<i>Inoviridae</i>	85–1950 x 7	Không đuôi	fd
	<i>Plasmaviridae</i>	80	Không đuôi	MVL2

Nguồn: Ackermann (2011)

2.2.4 Quá trình xâm nhiễm của thực khuẩn thể vào tế bào vi khuẩn kí chủ

TKT được biết đến là virus kí sinh tế bào vi khuẩn kí chủ. Một thế kỉ nghiên cứu TKT đã cho thấy rằng chúng cực kì đa dạng và phổ biến trong sinh quyển của chúng ta. Theo đó, bộ gen của TKT biến động từ vài trăm base pair đến khoảng 498 kilobase.

Về bản chất, TKT mang bộ gen của chúng và dùng vi khuẩn kí chủ để nhân lên và sinh sản ra các TKT con. Mỗi TKT chỉ xâm nhiễm trên một loài vi khuẩn và đôi khi xâm nhiễm trên những loài họ hàng của chúng. Chu trình xâm nhiễm của TKT vào vi khuẩn được lập trình một cách chặt chẽ và phụ thuộc rất nhiều vào kí chủ như: tế bào

kí chủ (Gram âm hoặc Gram dương), chu trình xâm nhiễm (hấp phụ, sự xâm nhập, sự sao chép, sự lắp ráp và sự làm tan tế bào kí chủ).

Dựa vào đặc điểm kí sinh của TKT được chia làm 2 nhóm: (1) TKT độc (virulent phage) khi kí sinh chỉ sở hữu chu trình tan (lytic cycle). Ngược lại, TKT ôn hòa (temperate phage hay avirulent phage) khi kí sinh không giết tế bào kí chủ, như gặp điều kiện môi trường bất lợi sẽ chuyển sang chu trình tan (lytic cycle) và giết tế bào kí chủ.

2.2.4.1 Chu trình sinh tan (lytic cycle)

- Theo Sabour và Griffiths (2010) chu trình sinh tan gồm các bước sau:

- Sự hấp phụ (Adsorption)

Sự xâm nhiễm của TKT rất đa dạng về đuôi được bắt đầu bằng sự hấp phụ trên màng vi khuẩn kí chủ một cách đặc biệt như thông qua sợi đuôi, gai, liên kết với các protein chuyên biệt trên lớp màng của vi khuẩn kí chủ, hoặc capsule. Đối với vi khuẩn Gram âm hầu như bất kì loại protein, oligosaccharides và liposaccharides hiện diện trên bề mặt của tế bào vi khuẩn có thể sử dụng trong suốt quá trình hấp phụ của TKT. Vi khuẩn Gram dương được TKT hấp phụ thông qua cấu trúc phức tạp của murein. Thời gian hấp phụ của TKT lên tế bào kí chủ là rất ngắn, ở nhiệt độ thích hợp. Ví dụ với TKT T4 chỉ cần có 15 giây. Một số trường hợp, nếu có từ 2 TKT khác trở lên xâm nhập vào cùng một tế bào vật chủ thì cuối cùng chỉ có một TKT sinh sản mà thôi (Dũng và *ctv.*, 2007). Những vùng thụ thể của TKT nhận diện là chuỗi polypeptide. Rất nhiều TKT yêu cầu sự hiện diện của những cụm chứa các phân tử có nồng độ cao là những điểm để TKT dạng đuôi kết nối vào tế bào kí chủ.

Cơ chế hấp phụ của nhóm thực khuẩn thể đuôi

Nhóm TKT đuôi không những đa dạng về cấu trúc như đuôi dài (họ *Myoviridae* và họ *Siphoviridae*) và dạng đuôi ngắn như họ *Podoviridae* mà còn đa dạng về cách thức xâm nhiễm như sau (Hình 2.11):

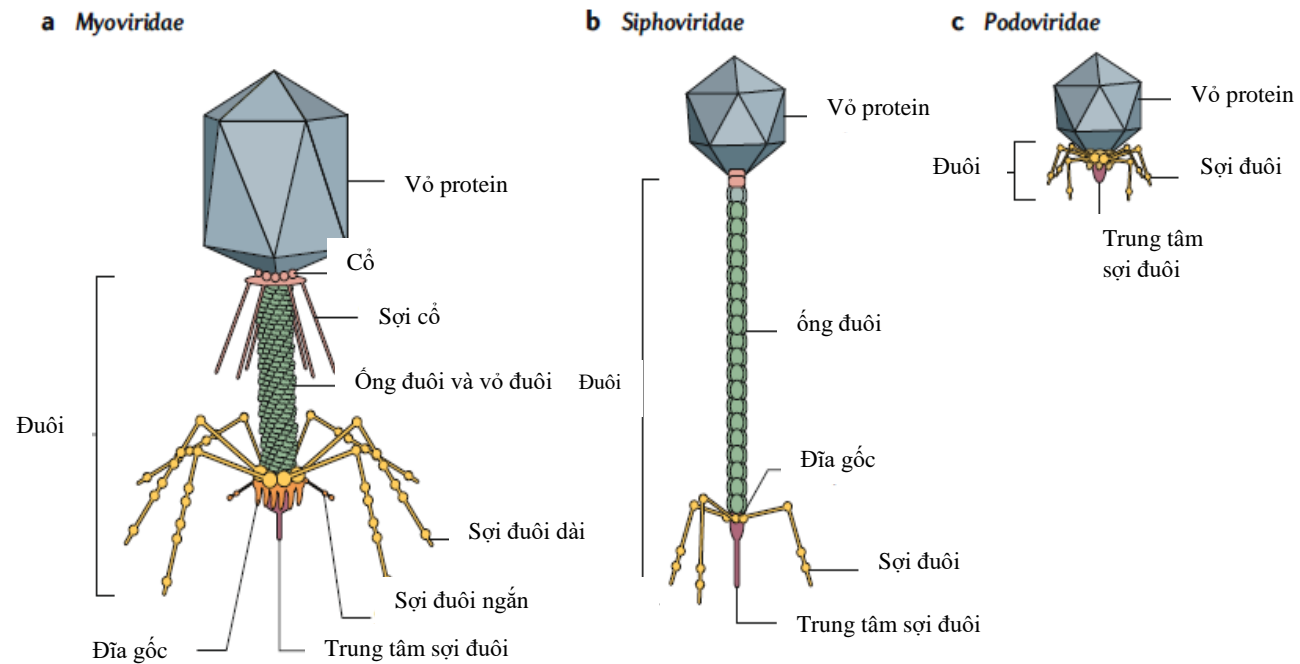
- Họ *Myoviridae*: cấu trúc chung họ *Myoviridae* gồm đầu, cổ, đuôi, ống đuôi, sợi đuôi dài, sợi đuôi ngắn, đĩa gốc, trung tâm đĩa gốc. Tiêu biểu của họ *Myoviridae* là TKT T4 và Mu có đuôi dài di động. Ống đuôi liên kết với vỏ protein, đế và một số bộ phận khác, đuôi có thể di động xung quanh lớp màng ngoài của vi khuẩn kí chủ nhằm tìm các thụ thể để hấp phụ vào tế bào kí chủ. Ví dụ TKT T4 hấp phụ vào tế bào kí chủ bằng cách định vị trên bề mặt kí chủ bằng sợi đuôi dài, chỉ có đĩa gốc hạ thấp xuống, sau đó tất cả sợi đuôi liên kết với các thụ thể trên màng tế bào kí chủ thông qua lipopolysaccharide (LPS), OmpC, cuối cùng TKT bơm ADN vào tế bào kí chủ. Tuy nhiên, đối với kí chủ Gram dương quá trình hấp phụ của TKT vào kí chủ khác so với

vi khuẩn Gram âm vì cấu trúc vách tế bào vi khuẩn dày, TKT phải sử dụng loại protein phức hợp mới có khả năng hấp phụ và bơm ADN vào tế bào kí chủ.

- *Họ Siphoviridae*: cấu trúc chung của họ *Siphoviridae* gồm đầu, đuôi dài không co, sợi đuôi, sợi đuôi trung tâm, đĩa gốc, tiêu biểu của họ *Siphoviridae* là TKT λ và T5. Quá trình TKT hấp phụ vào kí chủ khác nhau tùy vào TKT Gram âm hay Gram dương. TKT thuộc họ *Siphoviridae* hấp phụ vào tế bào kí chủ Gram âm hay dương bằng sợi đuôi và trung tâm sợi đuôi không có sự kết hợp giữa sợi đuôi và đĩa gốc giống họ *Myoviridae*. Chúng hấp phụ vào tế bào kí chủ thông qua polysaccharide trên màng tế bào kí chủ. Đặc biệt Coli phage DT57C và DT571/2 sẽ gia tăng khả năng hấp phụ vào tế bào kí chủ với sự hiện diện của Vitamin B12 làm gia tăng liên kết của sợi đuôi trung tâm của TKT với tế bào kí chủ. Cũng tương tự với họ *Myoviridae*, TKT thuộc họ *Siphoviridae* cũng xâm nhiễm vào vi khuẩn Gram âm và Gram dương khác nhau vì cấu trúc màng tế bào vi khuẩn, đặc biệt vi khuẩn Gram dương quá trình hấp phụ vào tế bào vi khuẩn kí chủ phải sử dụng phức hợp protein hiện diện trên đĩa gốc của TKT. Do đó, không thể tìm thấy TKT kí sinh cả 2 loại vi khuẩn Gram âm và Gram dương cùng lúc.

- *Họ Podoviridae*: cấu trúc chung họ *Podoviridae* gồm đầu, đuôi ngắn không co, 6 - 12 sợi đuôi, không có đĩa gốc. Ví dụ TKT T7 hấp phụ vào kí chủ bằng protein gp17 của sợi đuôi liên kết với LPS trên màng tế bào vi khuẩn, đối với TKT P22 hấp phụ vào tế bào vi khuẩn bằng sáu protein gp9 trên sợi đuôi. Đối với TKT thuộc họ *Podoviridae* cơ chế hấp phụ vào tế bào Gram âm và dương giống nhau.

Tóm lại, nhóm TKT có đuôi cơ chế hấp phụ vào tế bào kí chủ Gram âm hay Gram dương khác nhau tùy thuộc vào kí chủ cũng như bản chất TKT, ngoại trừ họ *Podoviridae* cơ chế hấp phụ vào tế bào kí chủ Gram âm và Gram dương giống nhau. Đặc biệt dựa vào cấu trúc họ *Myoviridae* có phổ kí chủ rộng hơn họ *Siphoviridae* và *Podoviridae*.



Hình 2.11: Cấu trúc tiêu biểu của họ thực khuẩn thể đuôi: Cấu trúc chung của họ TKT gồm vỏ bao bọc bên ngoài chứa ADN bên trong liên kết với cấu trúc đuôi (a) Cấu trúc họ *Myoviridae* gồm vỏ protein liên kết với đuôi di động co; (b) Cả hai họ *Siphoviridae* và họ *Myoviridae* có protein liên kết ở chóp đĩa gốc, sợi đuôi hấp phụ vào màng tế bào kí chủ; (c) Họ *Siphoviridae* và họ *Podoviridae* có protein ở chóp sợi đuôi trung tâm hoặc đĩa gốc (Nguồn Nobrega *et al.*, 2018)

Bảng 2.3 Tóm tắt cơ chế hấp phụ của nhóm thực khuẩn thể đuôi với vi khuẩn Gram âm và dương

Họ thực khuẩn thể	Dạng đuôi	Thụ thể liên kết	Loại vi khuẩn	Điểm hấp phụ trên màng tế bào kí chủ	Một số thực khuẩn thể điển hình	
<i>Siphoviridae</i>	Đuôi dài, không co	Sợi đuôi	Vi khuẩn Gram âm	O-antigen (smooth LPS)	T5	
				Core oligosaccharide (rough LPS)	SSU5	
				Proteins (ví dụ: LamB, TolC và FepA)	λ, TLS và H8	
				Chiên mao	Chi và iEPS5	
				Pili	DMS3	
				Vi khuẩn Gram dương	Teichoic acids	LL-H
		Sợi kim đuôi (Tail spike)	Vi khuẩn Gram âm	Capsule	Vi-II	
				LPS	9NA	
				Protein (ví dụ: YueB)	SPP1	
		Trung tâm sợi đuôi (Central tail fibre)	Vi khuẩn Gram âm	Proteins (ví dụ: BtuB and FhuA)	BF23, T5	
Đầu đuôi (Tail tip)	Vi khuẩn Gram âm	Protein (ví dụ: TonB)	H8			
Capsid filament	Vi khuẩn Gram âm	Chiên mao	phiChi13 and phiCbK			
<i>Myoviridae</i>	Đuôi dài,	Sợi đuôi (Tail)	Vi khuẩn Gram âm	LPS	Mu	

	co	fibre)		Proteins (ví dụ: OmpC and OmpF)	T4 and T2
				Flagella	SPN3US
			Vi khuẩn Gram dương	Protein (ví dụ: GamR)	γ
				Teichoic acids	A511
				Peptidoglycan	A511
		Sợi kim đuôi (Tail spike)	Vi khuẩn Gram âm	Capsule	MAM1
				LPS	Det7
Podoviridae	Đuôi ngắn, co	Sợi đuôi (Tail fibre)	Vi khuẩn Gram âm	LPS	T3 and T7
				Proteins (ví dụ: Ail and OmpF)	Yep-phi
				Type IV pili	MPK7
		Sợi kim đuôi (Tail spike)	Vi khuẩn Gram âm	Capsule	phiK1-5
				O-antigen (smooth LPS)	P22
				Protein (ví dụ: OmpA)	Sf6
			Vi khuẩn Gram dương	Teichoic acids	phi29

Nguồn: Nobrega *et al.*, (2018)

Bên cạnh đó, trong hệ sinh thái luôn luôn xảy ra quá trình đồng tiến hóa giữa TKT và vi khuẩn luôn đi đôi nên sự thay đổi của các thụ thể trên bề mặt kí chủ làm cho TKT cũng thay đổi theo để phù hợp.

Theo Dũng và *ctv.* (2007), việc hấp phụ của TKT trên màng tế bào vi khuẩn kí chủ chịu ảnh hưởng của nhân tố ngoại cảnh như:

- Số lượng TKT: Vì số điểm hấp phụ trên bề mặt tế bào vật chủ có giới hạn do đó số lượng TKT cũng có giới hạn. Tỉ số giữa số lượng TKT tương ứng có thể hấp phụ trên mỗi tế bào vi khuẩn được gọi là phức số MOI (Multiplicity of infection, MOI). Phức số MOI thường rất lớn khoảng 250 – 360. Nghĩa là có khoảng 250-360 TKT hấp phụ tế bào vi khuẩn kí chủ cùng một lúc và tiết enzyme phân hủy vách tế bào cùng thời điểm làm cho vi khuẩn tế bào vỡ ra như nghìn mũi kim châm. Trường hợp này sự phá vỡ tế bào không làm sản sinh ra các thể hệ TKT mới, người ta gọi là sự phá vỡ tự ngoại.

- Các ion dương: Các cation Ca^{2+} , Mg^{2+} , Ba^{2+} ,...đều có tác dụng xúc tiến sự hấp phụ, ngược lại cation Al^{3+} , Fe^{3+} , Cr^{3+} ...lại có tác dụng bất hoạt.

- Các nhân tố bổ trợ: Tryptophan có thể xúc tiến quá trình hấp phụ của TKT T4, biotin có thể xúc tiến sự hấp phụ của TKT ở vi khuẩn sinh axit glutamic.

- pH: môi trường trung tính có lợi cho sự hấp phụ. Ví dụ: khi $pH < 5$ hoặc $pH > 10$ TKT rất khó hấp phụ.

- Nhiệt độ: Nhiệt độ thích hợp cho sự phát triển cũng là thích hợp cho sự hấp phụ.

- Sự xâm nhập (Penetration)

Sau khi hấp phụ của TKT vào vi khuẩn kí chủ với tính hiệu đầu tiên từ đĩa gốc và sợi đuôi nhận được một sự kích thích, làm cho 144 capsome của bao đuôi sẽ có những vận động phức tạp. Chúng cần ATP để thâm nhập nên ống đuôi co lại chỉ còn một nửa chiều dài và đâm ống đuôi vào thành tế bào và màng tế bào chất. Trong quá trình này có men lysozyme ở đầu ống đuôi có tác dụng làm hòa tan peptidoglycan ở một bộ phận của thành tế bào.

- Sự sao chép (Replication)

Sau quá trình kết dính của TKT vào tế bào vi khuẩn thành công thông qua 2 hoặc ba lớp màng của vi khuẩn như: màng ngoài, lớp peptidoglycan và màng trong. Tiếp theo ADN của TKT được sao mã hay dịch mã tùy theo vi khuẩn Gram dương hoặc Gram âm. Quá trình sao chép xảy ra cùng với sự sao chép axit nucleic và sự sinh tổng hợp protein. Trong quá trình sao chép này TKT phải đối mặt với nhiều loại enzyme do vi khuẩn tiết ra

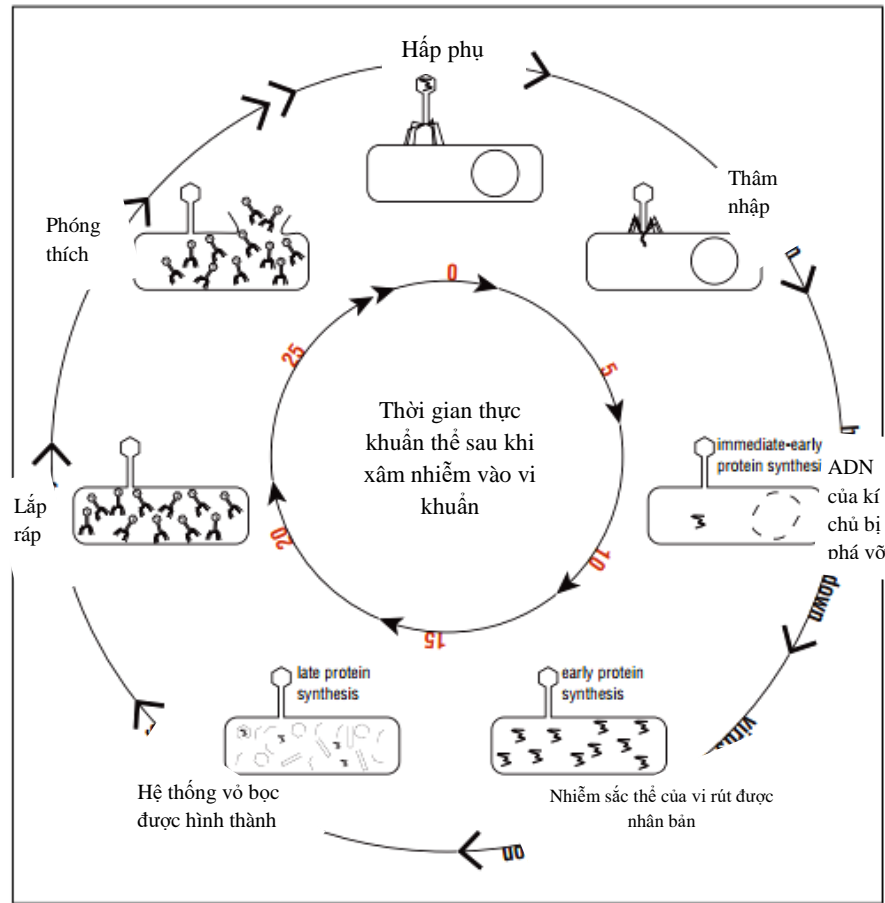
nhằm hạn chế sự xâm nhập của TKT như enzyme cắt giới hạn và exonucleases. Một hệ thống bảo vệ nhanh chóng được thiết lập từ TKT hình thành ADN tạo đầu dính hoặc một protein cuối chuỗi ADN được hình thành là gen kháng kết thúc quá trình sao mã. Sự sinh trưởng nội bào của TKT gây nên nhiều hậu quả có hại cho tế bào chủ như kiềm hãm tất cả các gen chủ do tổng hợp một số enzyme nuclease phân hủy ADN của tế bào kí chủ. Ví dụ T4, SPO1, và Sb-1 tổng hợp protein gây chết tế bào kí chủ ngay cả khi được tổng hợp riêng lẻ và dường như thay thế cho kí chủ điều khiển quá trình tổng hợp TKT mới (Sabour & Griffiths, 2010).

- Sự lắp ráp (Assembly processes)

Sau khi các vỏ protein capsid và axit nucleic của TKT được tích lũy phong phú trong tế bào kí chủ sẽ tiến hành lắp ráp. Hầu hết TKT lắp ráp tương đối phức tạp. Đầu tiên, ADN được đi vào trong khối đa diện 20 mặt và được kết hợp thành một khối chặt chẽ được gọi là procapsid và trở nên không thấm các phân tử lớn. Một số TKT dạng đuôi như *Siphoviridae* hoặc *Myoviridae* thì sự lắp ráp khác hơn một chút như gắn thêm đuôi và sợi đuôi. Cuối cùng trong giai đoạn lắp ráp của một số TKT có vỏ là việc tiếp nhận một phần màng của tế bào vật chủ bao lấy lõi nucleocapsid khi TKT đi qua màng tế bào chất của kí chủ. Virion thành thực sẽ chuyển tới mạng lưới nội chất chuẩn bị bước kế tiếp (Sabour & Griffiths, 2010).

- Sự phóng thích (Phage release)

Sự phóng thích của TKT khỏi tế bào là một phần của quá trình lắp ráp cuối cùng của virion. TKT dạng sợi phóng thích khỏi tế bào kí chủ thông qua vách tế bào kí chủ và không giết tế bào kí chủ. Ngược lại TKT chứa sợi đôi ADN phóng thích TKT con ra ngoài bằng cách tiết ra một số enzyme phân giải vách tế bào kí chủ và giết chết tế bào kí chủ. Suốt quá trình xâm nhiễm TKT tiết enzyme phân giải nội bào (endolysis) tích tụ và hoạt động trong màng tế bào. Để enzyme này tiếp cận với lớp peptidoglycan thì một phân tử kị nước là holin được chỉ định giữ vai trò quan trọng trong sự kết nối nội bào, phân hủy vách tế bào và các TKT trưởng thành phóng thích ra môi trường bên ngoài và tế bào kí chủ sẽ chết (Sabour & Griffiths, 2010).

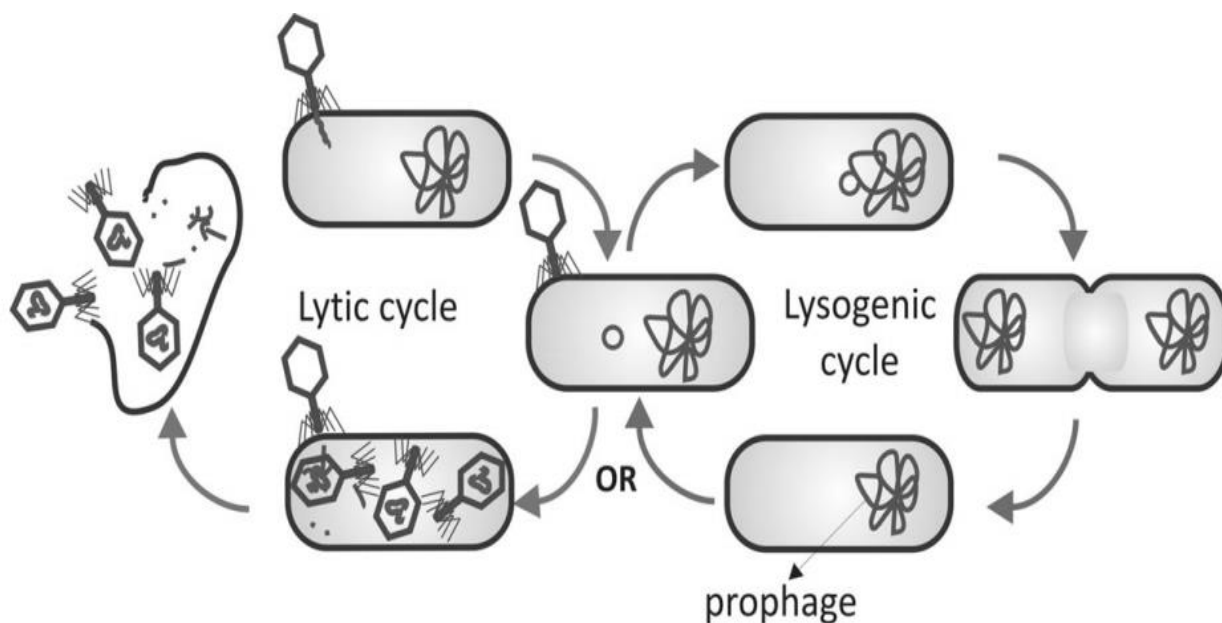


Hình 2.12: Chu trình xâm nhiễm của thực khuẩn thể T4. Nguồn (Pelzek *et al.*, 2013)

2.2.4.2 Chu trình tiềm tan (*lysogenic cycle*)

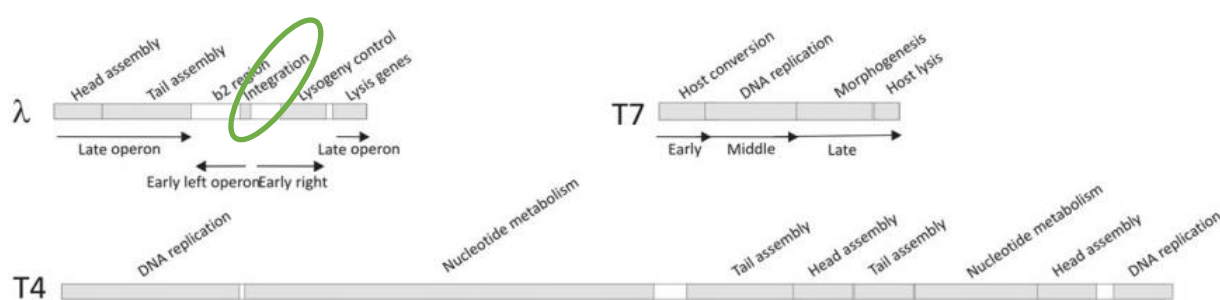
Bên cạnh chu trình tan thì TKT có thể thuộc chu trình tiềm tan (*lysogenic cycle*, Hình 2.13, bên phải) nghĩa là TKT không gây chết tế bào chủ mà ADN của TKT kết nối với nhiễm sắc thể của kí chủ thông qua gen quy định enzyme integrase (giúp chèn ADN của virut vào trong nhiễm sắc thể của tế bào vi khuẩn kí chủ), sau đó ADN của TKT nhân lên cùng với ADN của tế bào vi khuẩn, thể TKT này ở dạng ôn hòa không gây chết tế bào kí chủ. Thông thường TKT dạng ôn hòa tồn tại ở dạng vòng trong tế bào chất của vi khuẩn gọi là plasmid hoặc đi vào một đoạn của bộ gen vi khuẩn được gọi là prophage. Prophage được ghi nhận khoảng 10 – 20% tồn tại trong tế bào vi khuẩn. Chính sản phẩm của prophage kết hợp với bộ gen vi khuẩn góp phần làm cho vi khuẩn không bị xâm nhiễm bởi TKT khác hoặc tăng độc tính của vi khuẩn (Sabour & Griffiths, 2010). Tuy

nhân, khi TKT ở dạng prophage gặp điều kiện không thuận lợi như stress, tia UV, mitomycin và sự thiếu thức ăn kéo dài của vi khuẩn cũng ảnh hưởng đến TKT ôn hòa chuyển sang TKT độc, gọi là hiện tượng cảm ứng và prophage chuyển sang trạng thái TKT độc thực hiện chu trình sinh tan, nhân bản và phóng thích ra nhiều virion con từ tế bào kí chủ (Hình 2.13 trái) (Sabour & Griffiths, 2010). Tế bào mang prophage gọi là *lysogens* bởi vì bản chất có thể cảm ứng tạo nên TKT độc. Sự cảm ứng có thể xảy ra tự phát hoặc ngẫu nhiên trong một phần nhỏ của vi khuẩn chứa prophage hoặc tín hiệu đặc biệt từ môi trường là nguyên nhân sự cảm ứng của prophage trong tế bào vi khuẩn. Nhìn chung, sự cảm ứng của prophage có thể liên quan đến sự phá vỡ vật chất của protein và protein này kiềm hãm chu trình tan của TKT vì thế TKT ở dạng ôn hòa. Vì vậy vào thời điểm này TKT đi vào chu trình tan (lytic cycle): TKT xâm nhiễm vào tế bào chất của tế bào vi khuẩn kí chủ nhân lên và tạo ra các TKT con, cuối cùng phá vỡ màng tế bào phóng thích ra môi trường bên ngoài, tùy theo TKT, kí chủ, môi trường mà khả năng tạo ra số lượng TKT con khác nhau nhưng giao động khoảng 20 – 400 virion (Hình 2.13, bên trái) (Sabour & Griffiths, 2010).



Hình 2.13: Chu trình sinh sản của thực khuẩn thể ôn hòa. Sau khi ADN của thực khuẩn thể xâm nhiễm vào tế bào vi khuẩn kí chủ có thể đi vào chu trình tan hoặc tiềm tan: Chu trình tan (chu trình bên trái) thực khuẩn thể được sản sinh ra nhiều thực khuẩn thể con giết chết tế bào kí chủ; Chu trình tiềm tan ADN của thực khuẩn thể đi vào bộ gen của vi khuẩn và không giết chết tế bào vi khuẩn đến lúc có một số yếu tố tác động từ prophage sẽ chuyển thành thực khuẩn thể độc gọi là chu trình tan (Sabour & Griffiths, 2010).

Dựa vào đặc điểm cấu trúc: phần lớn bộ genome của TKT độc và TKT ôn hòa cùng nhóm hay khác nhóm phân loại đều sở hữu các gen giống nhau qui định về cấu trúc hay chức năng, tuy nhiên riêng chỉ có TKT ôn hòa mới sở hữu gen qui định enzyme integrase với chức năng chèn ADN của TKT vào sợi ADN của tế bào kí chủ mà TKT độc không có (Lucchini *et al.*, 1999), và đây cũng là đặc tính để phân biệt TKT độc và TKT ôn hòa về cấu trúc gen (Hình 2.14). Hình 2.14 thể hiện toàn bộ bộ gen của TKT Lamda, T4 và T7 về chức năng của toàn bộ bộ gen mà chúng sở hữu gồm gen qui định cấu trúc, gen qui định các loại enzyme trong quá trình sống của TKT. Tuy nhiên ở TKT Lamda là dạng TKT không độc trong bộ gen chứa gen qui định enzyme integrase, ngược lại TKT T4 và TKT T7 thuộc nhóm TKT độc nên trong bộ gen không chứa enzyme qui định enzyme integrase.



Hình 2.14: Mô hình chung về cấu trúc gen so sánh giữa nhóm thực khuẩn thể độc và nhóm thực khuẩn thể không độc: thực khuẩn thể ôn hòa *Siphovirus* Lamda chứa gen integrase (48.502 bp); thực khuẩn thể độc *Podovirus* T7 (39.937 bp) và *Myovirus* T4 (168.904 bp) (Sabour & Griffiths, 2010)

2.2.5 Nuôi cấy thực khuẩn thể

Theo Ty (2004), nuôi cấy TKT trước hết phải chọn tế bào chủ phù hợp cho chúng nhân lên. Ví dụ TKT T4 thì cần dùng quần thể vi khuẩn *E. coli* nuôi trong môi trường đặc hoặc lỏng và bổ sung TKT vào. Việc phát hiện TKT rất đơn giản, TKT nhiễm vào môi trường lỏng sẽ làm môi trường đục trở nên trong. Còn trên môi trường đặc sẽ hình thành đốm tan. Đầu tiên TKT xâm nhập vào tế bào vi khuẩn nhân lên và phá vỡ tế bào vi khuẩn cho ra khoảng 100 TKT con được giải phóng ra ngoài. Mỗi TKT lại xâm nhập vào tế bào lân cận để lặp lại quá trình nhân lên. Cứ như vậy sau vài giờ xuất hiện đốm tan. Mỗi đốm tan do một TKT tạo thành, do đó đếm số lượng đốm tan có thể tính được số lượng TKT hình thành. Người ta thường gọi đơn vị tạo thành đốm tan là PFU (plaque forming unit), tương tự như đơn vị hình thành khuẩn lạc CFU (Colony forming unit) trong đếm mật số vi khuẩn sống. Kỹ thuật đếm TKT theo cách này gọi là “kỹ thuật đốm tan” (plaque assay).

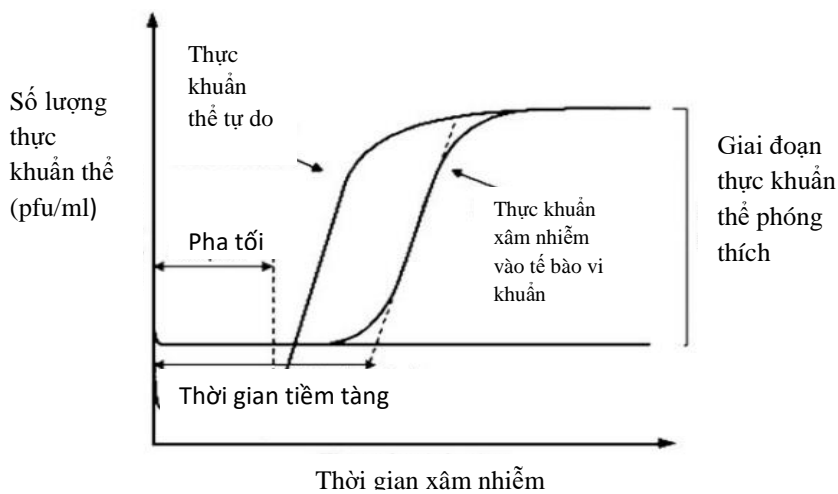
Cách tốt nhất phân lập TKT là tách chúng từ nơi cư trú của tế bào kí chủ. Ví dụ TKT kí sinh trong vi khuẩn *E. coli* có thể dễ dàng phân lập từ nước cống hoặc từ nước nhiễm phân. Mẫu được ly tâm để loại bỏ cặn, thêm chloroform để loại bỏ tế bào vi khuẩn. Lấy 0,1 ml trộn đều với tế bào kí chủ rồi dàn đều trên mặt thạch. Việc xuất hiện đốm tan chứng tỏ có TKT (Ty, 2004).

Đường cong sinh trưởng đơn: Chu trình nhân lên của TKT được tính từ một hạt TKT hấp phụ trên tế bào đến khi làm phá hủy tế bào chủ phóng thích ra ngoài, được biểu diễn bởi đường cong sinh trưởng đơn hoặc đường cong sinh trưởng một bậc (one – step growth curve, Hình 2.15). Đầu tiên người ta dùng một lượng nhỏ TKT nhiễm vào dịch nuôi sao cho chỉ một mà không nhiều TKT hấp phụ trên bề mặt tế bào. Sau một khoảng thời gian lại lấy mẫu để kiểm tra số lượng TKT được sinh ra (Ty, 2004).

Quá trình được tiến hành như sau:

- Cho TKT hấp phụ trên tế bào vi khuẩn kí chủ.
- Thêm kháng huyết thanh để làm bất hoạt TKT tự do trong môi trường.
- Pha loãng 1000 lần để các virion mới tạo thành không tấn công tế bào lành.
- Lấy mẫu định kỳ (5, 10, 15,.....50 phút) để xét nghiệm đốm tan. Mỗi PFU ứng với một TKT trong huyền phù ban đầu. Sau mỗi thời gian nuôi lại lấy mẫu. Số lượng đốm tan tăng phản ánh số lượng TKT trong tế bào tăng lên.

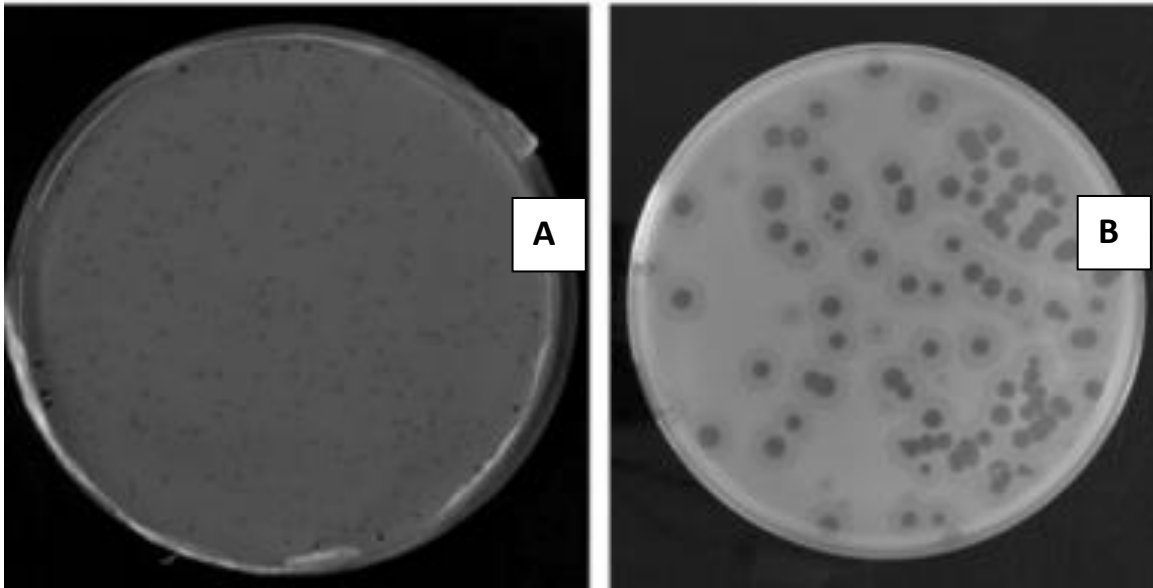
Sau khi hấp phụ, TKT xâm nhập vào tế bào vi khuẩn, khả năng gây nhiễm (infectivity) không còn nữa. Đó là lúc capsid bị phân giải (cởi áo) để giải phóng axit nucleic. Thời kỳ này gọi là thời kỳ tiềm ẩn (eclipse period) và không một virion nào tạo thành. Tiếp theo thời kỳ tiềm tàng (latent period), trong suốt thời kỳ này xảy ra quá trình tổng hợp axit nucleic và protein. Sau đó là thời kỳ trưởng thành (maturation period), các thành phần của TKT được lắp ráp hoàn chỉnh. Lúc này tế bào bị vỡ có thể xác định được TKT. Cuối cùng TKT ồ ạt phóng thích ra khỏi tế bào làm tế bào bị tan hoặc từ từ theo kiểu nảy chồi mà không làm chết tế bào kí chủ. Thời gian cho một chu kỳ sinh trưởng một bậc có thể thay đổi tùy vào TKT và tế bào kí chủ dao động trong khoảng 20-30 phút tùy tế bào kí chủ (Ty, 2004).



Hình 2.15: Sơ đồ đường cong tăng trưởng đơn của thực khuẩn thể (Kutter & Sulakvelidze, 2004)

2.2.6 Hình dạng đốm tan (plaque)

Dựa vào đốm tan hình thành trên môi trường bán đặc (soft agar) bằng cách TKT khuếch tán và kí sinh tế bào kí chủ của chúng. Kết quả tạo ra những đốm trong trên bề mặt đục của màng vi khuẩn kí chủ được gọi là đốm tan (plaque). Dựa vào hình thái đốm tan trong hay tâm đục có thể bước đầu phân loại nhóm TKT thuộc TKT đục (đốm tan trong) hay không đục (đốm tan có tâm đục). Kích thước plaque tỉ lệ thuận với khả năng hấp phụ đến thời gian tiềm ẩn và thời gian TKT làm tan vi khuẩn hoàn toàn để phóng thích TKT con ra môi trường, đồng thời kích thước của plaque chịu ảnh hưởng bởi nồng độ của agar. Bên cạnh đó, kích thước plaque sẽ gia tăng theo thời gian khi vi khuẩn liên tục bị làm tan (kích thước plaque to), ngược lại đối với kích thước plaque gia tăng chậm có thể vì sự phát triển của vi khuẩn chậm và đã đi vào giai đoạn ổn định. Do vậy, việc thực hiện kỹ thuật plaque assay là bước đầu dùng để phân biệt thực khuẩn thể ở dạng tan hoặc tiềm tan (Sabour & Griffiths, 2010) (Hình 2.16).



Hình 2.16: Sự khác nhau về hình dạng đốm tan giữa thực khuẩn thể độc và thực khuẩn thể không độc: (A) TKT không độc *Pseudomonas aeruginosa* LKR3; (B) TKT độc *Pseudomonas putida* 15 (Sabour & Griffiths, 2010)

2.3 ỨNG DỤNG THỰC KHUẨN THỂ TRONG PHÒNG TRỪ SINH HỌC BỆNH HẠI DO VI KHUẨN TRÊN THỰC VẬT

2.3.1 Khái niệm phòng trừ sinh học

Theo Kim (2006) biện pháp sinh học trong phòng trừ bệnh cây là điều khiển môi trường, cây trồng và vi sinh vật đối kháng một cách thích hợp để tạo nên một thể cân bằng sinh học cần thiết, giúp giảm mạnh mật số của mầm bệnh xuống dưới ngưỡng gây hại. Nhờ đó bệnh cây trồng chỉ xuất hiện ở mức độ nhẹ, không ảnh hưởng quan trọng về mặt kinh tế.

2.3.2 Các yếu tố ảnh hưởng đến khả năng kiểm soát vi khuẩn bằng liệu pháp thực khuẩn thể

Những năm gần đây sử dụng TKT độc kiểm soát vi khuẩn như một biện pháp triển vọng, đặc biệt trong thời điểm nhiều loại vi khuẩn kháng thuốc kháng sinh, chính là nguyên nhân này gây khó khăn kiểm soát bệnh do vi khuẩn trong nhiều lĩnh vực như y học, thú y và thủy sản. Hiệu quả phòng trừ của liệu pháp TKT chịu ảnh hưởng bởi nhiều yếu tố như điều kiện môi trường bên ngoài và cả bên trong các cá thể TKT như tỉ lệ giữa TKT và vi khuẩn kí chủ, phương thức và cách áp dụng, yếu tố môi trường (pH, nhiệt độ,...), sự trung hòa của TKT và vi khuẩn kí chủ.

2.3.2.1 Tỷ số thực khuẩn thể/vi khuẩn

Theo Gill và Hyman (2010), TKT được áp dụng kiểm soát vi khuẩn theo 2 cách thức khác nhau như con đường bị động và con đường chủ động. Đối với phương pháp bị động sử dụng TKT với mật số đủ để kiểm soát vi khuẩn kí chủ, kết quả sẽ tiêu diệt vi khuẩn trong thời gian ngắn. Ví dụ trong virus học tỷ số giữa TKT và vi khuẩn giải thích bằng thuật ngữ MOI (multiplicity of infection = mật số TKT/mật số vi khuẩn), theo Gill và Hyman (2010) đã tổng hợp rằng MOI bằng 100 có thể đảm bảo đầy đủ số lượng TKT kí sinh toàn bộ vi khuẩn kí chủ trong thời gian ngắn. Cụ thể, trong rất nhiều nghiên cứu sử dụng mật số TKT càng cao sẽ phòng trừ bệnh hiệu quả nhất. Ngược lại, theo cách chủ động thấy rằng áp dụng TKT với mật số thấp để chúng ký sinh vi khuẩn kí chủ và nhân mật số dần theo thời gian. Trong trường hợp này có thể sử dụng tỷ số MOI từ 0,001 đến 0,1 sẽ làm cho TKT nhân mật số từ thấp đến cao đồng thời áp dụng thêm một số thuốc bảo vệ thực vật nhằm gia tăng hiệu quả quản lý bệnh. Tuy nhiên, phương pháp thụ động sẽ hiệu quả cao hơn biện pháp chủ động.

2.3.2.2 Khả năng tiếp cận đến vi khuẩn mục tiêu

TKT không giống như các loại kháng sinh, chúng không thể tự khuếch tán qua màng tế bào. Do đó phải có phương pháp để áp dụng và đưa TKT đến với các tế bào vi khuẩn mục tiêu. Các nhà khoa học tin rằng, phương pháp vận chuyển là phương thức tốt nhất nhằm đưa TKT đến vi khuẩn mục tiêu nghĩa là có thể sử dụng các loài vi khuẩn không gây bệnh cùng loài để mang TKT đến với bệnh mục tiêu (Inal, 2003; trích dẫn Chatain-Ly, 2014). Tuy nhiên, việc áp dụng phương pháp này có thể nguy hiểm, vì dòng vi khuẩn không gây bệnh cùng loài với vi khuẩn gây bệnh có thể trong quá trình sinh sản trở nên loài gây bệnh chính vì vậy khi áp dụng ngoài thực tế cần thận trọng. Trong môi trường rắn (chẳng hạn như trong môi trường đất), nếu sự khuếch tán của TKT có thể bị hạn chế sẽ làm giảm sự hấp phụ TKT trên vi khuẩn, do đó ảnh hưởng khả năng nhiễm TKT lên các tế bào vi khuẩn (Chatain-Ly, 2014). Theo Guenther *et al.*, (2009) đã ghi nhận TKT giảm khả năng khuếch tán trong môi trường đặc như xúc xích, cá hồi xông khói và hải sản.

2.3.2.3 Điều kiện môi trường

a) Ánh sáng

Trong các tác nhân gây ra sự ức chế đối với TKT thì tia cực tím được nghiên cứu rộng rãi nhất. Tia cực tím làm ảnh hưởng đến sự ký sinh của TKT lên vi khuẩn (Wigginton *et al.*, 2012). Thật vậy, một số nghiên cứu đã chứng minh rằng áp dụng TKT trên tán lá cà chua vào buổi tối dẫn đến sự tồn tại của TKT trên bề mặt tán lá cây lâu hơn, cho phép TKT có nhiều thời gian hơn để lây nhiễm và tiêu diệt các vi khuẩn mục tiêu của chúng (Balogh *et al.*, 2003 ; Iriarte *et al.*, 2007; trích dẫn Buttimer *et al.*, 2017).

Iriarte *et al.* (2007) đã cho rằng các yếu tố gây hại đối với TKT là tia UV-A (320-400 nm) và UV-B (280-320 nm) có trong ánh sáng mặt trời, tia UV-B mang dòng năng lượng cao và có khả năng gây tổn hại trực tiếp đến ADN trong cấu trúc virion của TKT dẫn đến tắc nghẽn sự sao chép của ADN và ARN trong quá trình phiên mã, TKT có khả năng tồn tại lâu hơn khi áp dụng vào buổi chiều tối hoặc khi cường độ tia cực tím dưới $2\text{mW}/\text{cm}^2$. Trên môi trường tán lá cây là môi trường khắc nghiệt đối với TKT vì có tia cực tím và sự chiếu xạ ánh sáng.

b) Nhiệt độ

Nhiệt độ tối hảo thích hợp cho TKT hoạt động ở 37°C gồm một số họ như *Myoviridae*, *Podoviridae*, *Inoviridae* (Jończyk *et al.*, 2011). Ngoài ra, nhiệt độ cũng là yếu tố quan trọng nhất ảnh hưởng đến khả năng thực khuẩn của TKT như một khảo sát của Shan *et al.*, (2014) đã khảo sát khả năng phân giải của TKT trên vi khuẩn *B. thailandensis* ở hai điều kiện nhiệt độ 25°C và 37°C , kết quả TKT phân giải vi khuẩn của vi khuẩn *B. thailandensis* ở nhiệt độ 37°C , ngược lại ở nhiệt độ 25°C TKT không phân giải vi khuẩn kí chủ. Đặc biệt TKT bất hoạt ở nhiệt độ cao có thể gây biến tính các thành phần cấu tạo của TKT (Harvey & Ryan, 2004). Một số TKT bị bất hoạt khi đun nóng ở 75°C trong 30 phút (Adams *et al.*, 1959).

c) pH

TKT thường ổn định trong khoảng pH từ 5 đến 8. Nhiệt độ thấp thì TKT có thể tồn tại từ pH 4 đến 9 hoặc 10. TKT T2 có thể bị kết tủa ở pH 4 mà không mất đi tính nhiễm (Adams *et al.*, 1959). TKT không tồn tại lâu trên lá táo do pH thấp (pH bề mặt 4,37), nhưng tồn tại trên bề mặt lá dưa hấu có pH tương đối cao (pH bề mặt 5,77) (Leverentz *et al.*, 2003). Theo Giang (2016) đã khảo sát sự tồn tại của TKT phân lập trên vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* trong môi trường pH (3, 5, 6, 7, 9), kết quả TKT tồn tại tốt trong môi trường pH 6 và pH 7, tuy nhiên TKT giảm mật số trong môi trường pH3, pH5 và pH9.

Theo Jończyk *et al.* (2011) đã tổng hợp một số yếu tố ảnh hưởng của một số họ TKT (theo Bảng 4.2).

Bảng 2.4 Tóm tắt khả năng chịu đựng với môi trường sống của một số họ thực khuẩn thể

Họ TKT	Tên TKT	Khả năng chịu đựng của thực khuẩn thể trong môi trường sống				
		Nhiệt độ thích hợp	pH	Tồn trữ	Điều kiện tồn tại	Tài liệu tham khảo
<i>Myoviridae</i>	T4	37°C	pH 6–7,4, không thích hợp pH <5 > 9,2	có thể trữ 4 tuần trong urine ở 6– 20°C	tồn tại ở điều kiện –196°C trên 65%, chịu được điều kiện khô hạn	Klak <i>et al.</i> , (2010) Tsutsaeva <i>et al.</i> ,(1981)
<i>Siphoviridae</i>	Lamda	-	pH (3–11) trong 24 giờ ở 19°C	4°C trên 6 tháng	ổn định hơn trong nước vôi	Jepson and March(2004)
<i>Podoviridae</i>	T3	37°C	pH 5–9,2	-	tồn tại nhiệt độ –196°C đến 98%; Cực kì kháng với điều kiện khô hạn	Międzybrodzki <i>et al.</i> , chưa công bố); Tsutsaeva <i>et al.</i> (1981)
<i>Microviridae</i>	ΦX174	-	-	-	tồn tại -196°C trên 80%	Tsutsaeva <i>et al.</i> ,(1981)

<i>Corticoviridae</i>	PM2	-	pH 6–8, giảm hoạt động sau 1 giờ ở pH 5,0 trong 37°C	-	tồn tại tốt trong môi trường NaCl (10 mmol/L và CaCl ₂ (5 mmol/L)	Faquet <i>et al.</i> ,(2005); Międzibrodzki <i>et al.</i> , chưa công bố)
<i>Tectiviridae</i>	PRD1	-	pH 5–8	trữ tốt ở 4°C	tồn tại ở –80°C	Faquet <i>et al.</i> ,(2005); Ackermann <i>et al.</i> ,(2004).
<i>Leviviridae</i>	MS2	-	pH 6–8	-	nhiệt độ từ 5 đến 35°C	Feng <i>et al.</i> ,(2003)
<i>Cystoviridae</i>	Phi6	-	ổn định pH 6			
<i>Lipothrixviridae</i>	TTV1	-	pH<3	-	có thể tồn tại nhiệt độ >85°C	Prangishvili <i>et al.</i> ,(2001); Goulet <i>et al.</i> , (2010)
<i>Rudiviridae</i>	SIRV1	-	-	-	tìm thấy trong môi trường axit ở suối nước nóng	Prangishvili <i>et al.</i> ,(2001)
<i>Fuselloviridae</i>	SSV1/	-	không nhạy cảm ở pH 2 nhưng	-	được tìm thấy trong môi trường axit ở	Prangishvili <i>et al.</i> , (2001), Faquet <i>et al.</i> ,(2005)

			pH<5 giảm sự ổn định, virion nhạy cảm ở pH>11		suối nước nóng, chịu được nhiệt độ khoảng 97°C	
<i>Inoviridae</i>	M13	37°C	pH 6 - 9			Tey <i>et al.</i> , (2009);

Ghi chú: -: chưa ghi nhận (Trích dẫn Jończyk *et al.* (2011))

2.3.2.4 Tính đặc hiệu của thực khuẩn thể

TKT là loại virut ký sinh chuyên tính trên loài vi khuẩn nhất định, nên khi áp dụng liệu pháp TKT thì cần phải nghiên cứu sự tác động của TKT lên các dòng vi khuẩn cần kiểm soát, và sau đó cần kiểm tra sự ảnh hưởng của các yếu tố gây ức chế TKT (Chatain-Ly, 2014). Nhắc đến hiệu quả của liệu pháp TKT thì cần phải xem tính đặc hiệu của TKT với bề mặt tế bào vi khuẩn, nếu trên bề mặt của vi khuẩn mất đi thụ thể tiếp nhận TKT thì xem như chúng đã kháng đối với TKT. Để khắc phục các vấn đề liên quan đến tính đặc hiệu của TKT thì Chatain-Ly (2014) đã đề ra các biện pháp sau:

- Phân lập TKT từ nơi gây hại của vi khuẩn và kiểm tra độ nhạy của chúng với vi khuẩn gây bệnh.
- Lựa chọn ra các dòng TKT có phổ ký chủ rộng với dòng của vi khuẩn gây hại.
- Nghiên cứu, phát triển ra HH TKT có thể kiểm soát được nhiều dòng vi khuẩn gây hại.

2.3.2.5 Sự kháng thực khuẩn thể của vi khuẩn

Cũng như trường hợp của thuốc kháng sinh, vi khuẩn cũng gây ra hiện tượng kháng với TKT đó là nguyên nhân gây bất lợi trong liệu pháp TKT phòng trị bệnh do vi khuẩn. Vi khuẩn thường có ba cơ chế chính để kháng lại sự tấn công của TKT bao gồm giảm khả năng hấp phụ trên bề mặt tế bào của TKT, tăng khả năng cản trở khi TKT đã xâm nhiễm và loại bỏ sự xâm nhiễm của TKT. Ví dụ, vi khuẩn sẽ thay đổi vị trí của chiên mao và vi mao hay tạo ra enzyme để làm suy giảm axit nucleic của TKT (Hyman & Abedon, 2010). Đồng thời, TKT cũng có nhiều cơ chế đáp ứng lại tính kháng của vi khuẩn thông qua sự thay đổi vị trí gắn vào vách tế bào vi khuẩn ký chủ, vị trí hấp phụ hoặc hình thành một thụ thể mới (Diaz-Munoz & Koskella, 2014).

Trong mọi trường hợp, tính kháng của vi khuẩn đối với TKT không gây ra vấn đề gì cho việc sử dụng TKT hoặc liệu pháp TKT vì tỷ lệ vi khuẩn phát triển tính kháng đối với các loại TKT thấp hơn khoảng 10 lần so với thuốc kháng sinh (Carlton, 1999; trích dẫn Chatain-Ly, 2014).



Hình 2.17: Tổng hợp các yếu tố ảnh hưởng hiệu quả của TKT kháng với vi khuẩn kí chủ

2.3.3 Biện pháp bảo vệ thực khuẩn thể

Một trong những phương pháp khiến chúng ta nghĩ đến đầu tiên để áp dụng liệu pháp TKT ra ngoài môi trường đó chính là bao bọc TKT, giúp chúng giảm sự tác động của điều kiện và các yếu tố bất lợi. Trong thời kỳ khoa học – kỹ thuật phát triển như hiện nay, kỹ thuật vi bao hay vi nang (micro-encapsulation) đã được ứng dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực.

Kỹ thuật vi bao là một giải pháp bao gói hữu hiệu giúp chuyển đổi các hợp chất dạng lỏng, khí sang dạng bột đồng thời bảo vệ hoạt tính của các hợp chất này trong một cấu trúc rất nhỏ có màng bao bọc nhằm hạn chế tác động của môi trường bên ngoài (ánh sáng, nhiệt độ, độ ẩm, oxy ...). Vỏ được dùng để bao là một loại vật liệu có kích thước bằng micrometer, làm bằng silic hoặc các chất đạm, polyme cao cấp như gelatin hoặc albumin. Đây là một công cụ mạnh mẽ giúp biến đổi và bảo vệ các hợp chất có hoạt tính sinh học cao như enzyme, tế bào (probiotic), chất thơm, chất màu thực phẩm ... và đặc biệt là TKT có thể tồn tại tốt kỹ thuật này từ đó ứng dụng liệu pháp TKT ra môi trường bên ngoài để nhân rộng và phát triển sản phẩm sinh học (Gharsallaoui *et al.*, 2007).

TKT được tồn trữ ở 4°C trong bóng tối hoàn toàn trong nhiều tháng mà không làm giảm mật số đáng kể. Phương pháp tốt nhất để bảo vệ TKT có đuôi là phương pháp đông khô hoặc ngâm trong nitơ lỏng có bổ sung 15-50% glycerol, tuy nhiên ở điều kiện này nhanh chóng làm bất hoạt một số TKT (Kutter & Sulakvelidze, 2005).

Balogh *et al.* (2008) đã sử dụng TKT quản lí bệnh do vi khuẩn *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* và *X. axonopodis* pv. *citrumelo* gây bệnh trên cây có múi. Kết quả đã nhận thấy TKT kết hợp sữa tách béo và đường sucrose có hiệu quả bảo vệ TKT tránh tác động có hại của tia UV và các yếu tố khác của môi trường, đồng thời duy trì mật số TKT kéo dài trên tán lá, tuy nhiên không gia tăng hiệu quả phòng trị.

TKT có thể dùng ở dạng đông khô và chuyển thành thuốc mà không ảnh hưởng đến hiệu lực. Khi tồn trữ ở dạng thuốc viên TKT có thể tồn tại kéo dài đến 14 tháng ở nhiệt độ 55°C. Ngoài ra, một số TKT có thể tồn trữ được trong một thời gian dài với pH trung tính trong dung dịch hoặc dạng khô (Jónczyk *et al.*, 2011).

Trong nghiên cứu về chất phụ gia phục hồi TKT sau đông khô của Suól và *ctv.* (2017) đã ghi nhận Glucose 10% cho hiệu quả tốt nhất, sau đó là Mannitol (5% và 10%). Khảo sát thời gian tồn trữ TKT cho thấy dạng bột đông khô trữ nhiệt độ phòng duy trì mật số TKT ổn định đến 5 tháng, trong khi dạng lỏng có mật số TKT giảm mạnh sau 1 tháng tồn trữ (ở nhiệt độ phòng) và sau 3 tháng tồn trữ (ở 4°C).

2.3.4 Một số nghiên cứu sử dụng thực khuẩn thể trong phòng trị bệnh do vi khuẩn trên cây trồng

2.3.4.1 Trên thế giới

Sau giai đoạn phát triển nhanh chóng của thuốc kháng sinh trên thế giới. Con người đã nhận thấy sự ảnh hưởng bất lợi của thuốc kháng sinh đối với sức khỏe và vi khuẩn có nguy cơ kháng thuốc kháng sinh đã gây ra sự đe dọa lớn đối với con người về nhiều mặt, cùng với sự gia tăng về các dòng vi khuẩn mới. Chính điều này đã kích thích sự quan tâm của các nghiên cứu đối với TKT và liệu pháp TKT được hồi sinh (Wittebole *et al.*, 2014).

Năm 1926, Moore và D'Herelle đã đưa ra đề xuất sử dụng TKT để kiểm soát mầm bệnh thực vật do tác nhân là vi khuẩn (Balogh *et al.*, 2010). Giống như các phương pháp kiểm soát sinh học khác, một ưu điểm quan trọng của liệu pháp TKT là giảm sử dụng các tác nhân hóa học đối với các loài gây hại, từ đó sẽ giúp đảm bảo sức khỏe cho con người (Gill & Abedon, 2003).

Năm 2012, Ackermann đã trích lọc và cho rằng có đến 30.000 bài viết được ban

hành công khai từ những năm 1965 đến 2010, các tác giả đại diện cho hơn 40 vùng lãnh thổ, khu vực địa lý và có ít nhất 70 loại ngôn ngữ khác nhau viết về TKT. Từ đó, ông đã đưa ra nhận định về sự nghiên cứu TKT có thể diễn ra trên toàn thế giới (Balogh *et al.*, 2010).

Khi nghiên cứu vi khuẩn *Pseudomonas tolaasii* gây bệnh đốm nâu trên nấm rơm ở Cheongju, Hàn Quốc, Kim *et al.*, (2011) đã phân lập được 21 loài TKT từ bốn địa điểm khác nhau ở Hàn Quốc có khả năng kiểm soát sinh học đối với bệnh đốm nâu trên nấm rơm. Ông đã chia TKT ra làm 3 nhóm để kiểm tra và so sánh khả năng điều trị bệnh của chúng bằng cách so sánh kích thước các đốm mà vi khuẩn gây bệnh để lại. Kết quả cho thấy các loài TKT này đều có khả năng ức chế mầm bệnh. Từ đó ông đã nghiên cứu và cho ra điều kiện thích hợp để áp dụng TKT cho hiệu quả kiểm soát bệnh đốm nâu trên nấm rơm cao nhất.

Ralstonia solanacearum là một loại vi khuẩn Gram âm và là tác nhân gây bệnh héo xanh ở nhiều loại cây trồng quan trọng, trong đó có cà chua. Fujiwara *et al.*, (2011) đã sử dụng các dòng TKT bao gồm ϕ RSA1, ϕ RSB1 và ϕ RSL1 để điều trị bệnh héo trên cà chua. Ông đã áp dụng TKT bằng các biện pháp khác nhau để kiểm tra độ hiệu quả, như là sử dụng đơn lẻ hoặc kết hợp các dòng TKT, áp dụng TKT khi xử lý hạt giống hoặc sau khi cây bị nhiễm bệnh. Từ đó ông đã kết luận về độ hiệu quả và lợi ích của việc áp dụng TKT nhằm kiểm soát bệnh héo do vi khuẩn *R. solanacearum* trên cà chua.

Vi khuẩn *Burkholderia glumae* gây bệnh thối cây con, thối hạt hoặc bạc bông lúa được ghi nhận đầu tiên tại tỉnh Kyushu của Nhật Bản vào năm 1950 (Goto, 1956). Theo Adachi *et al.*, (2012) đã nghiên cứu TKT trong phòng trừ bệnh thối cây con do vi khuẩn *B. glumae*. Tác giả đã phân lập được ba dòng TKT xung quanh vùng trồng lúa như kênh, sông, ao, hồ tại quận Ishikawa thành phố Kanazawa và quận Ibaraki thuộc thành phố Tsukuba, nơi đây được ghi nhận là nơi tự nhiên ít bị tác động của các yếu tố khác như thuốc bảo vệ thực vật, công nghiệp hóa... ba dòng TKT với kí hiệu như sau BGPP-Ar; BGPP-Sa và BPP-Ya. Khi kiểm tra khả năng kí sinh của ba dòng TKT trên 12 dòng vi khuẩn *B. glumae*, kết quả hai dòng TKT BGPP-Ar và BGPP-Sa có khả năng kí sinh 7 dòng vi khuẩn *B. glumae* (MAFF 106666, MAFF 106715, MAFF 106716, MAFF 106719, MAFF 106720, MAFF 106734 và MAFF 106735). Tác giả chọn hai dòng TKT BGPP-Ar và BGPP-Sa phòng trị bệnh thối cây con trong điều kiện vườn ươm. Tiếp tục tác giả sử dụng dòng TKT BGPP-Ar với bốn mật số 10^5 pfu/ml; 10^6 pfu/ml; 10^7 pfu/ml và 10^8 pfu/ml đều cho hiệu quả phòng trị bệnh thối cây con trên lúa do *B. glumae*.

Vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* là vi khuẩn Gram âm và cũng chính là

nguyên nhân quan trọng gây bệnh cháy bìa lá lúa. Theo Chae (2014) đã phân lập được 34 dòng TKT thu từ nước của ruộng lúa. Trong đó 29 dòng TKT thuộc họ *Mycoviridae* là TKT dạng đuôi có triển vọng trong phòng trừ sinh học. Ông đã sử dụng HH TKT kết hợp với sữa tách béo phun trên tán lá lúa phòng trừ vi khuẩn *X. oryzae* pv. *oryzae*. Kết quả TKT có hiệu quả giảm bệnh cháy bìa lá lúa ở điều kiện ngoài đồng và ông đã kết luận rằng sử dụng TKT như một biện pháp sinh học kiểm soát bệnh nhằm giảm việc sử dụng thuốc bảo vệ thực vật.

Vi khuẩn *Pectobacterium atrosepticum* là một trong những mầm bệnh trên khoai tây gây thiệt hại sản lượng khoai tây trên thế giới. Các phương pháp kiểm soát bệnh này ít được nghiên cứu chủ yếu là dùng biện pháp canh tác. Trong nghiên cứu của Carstens *et al.*, (2019) đã sử dụng 12 dòng TKT độc phòng trị vi khuẩn này. Các dòng TKT này chủ yếu là TKT có đuôi. Kết quả thấy rằng bệnh thối nhũn trên khoai tây giảm từ 62% đến 64% theo chỉ số bệnh và tỉ lệ bệnh trong điều kiện tồn trữ. Qua đó, thấy rằng TKT rất triển vọng và giúp ít rất nhiều trong giảm thiệt hại sản lượng khoai tây trong điều kiện tồn trữ.

Qua các kết quả nghiên cứu ngoài nước thấy rằng TKT là một trong những tác nhân kiểm soát hiệu quả bệnh do vi khuẩn được các nhà khoa học trên thế giới nghiên cứu và ứng dụng hiệu quả. Đó là một cơ sở khoa học có ý nghĩa để khai thác và cũng là tiền đề cho những nghiên cứu ứng dụng TKT phòng trị bệnh trong nước.

2.3.4.2 Trong nước

Các công trình nghiên cứu về liệu pháp TKT nhằm kiểm soát bệnh hại cây trồng do tác nhân là vi khuẩn ngày càng phát triển. Các công trình nghiên cứu về TKT tại Việt Nam ngày càng tiến bộ từ bước đầu phân lập, đánh giá hiệu quả kiểm soát bệnh của TKT cho đến thử nghiệm ở điều kiện ngoài đồng và nghiên cứu về việc bảo vệ TKT nhằm hạn chế sự tác động của các yếu tố môi trường đến tồn tại của TKT đã được thực hiện cụ thể như sau:

Vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* gây bệnh cháy bìa lá lúa rất quan trọng tại những vùng canh tác lúa thuộc các tỉnh ĐBSCL. Nghiên cứu đầu tiên của Tâm và *ctv.* (2013) đã phân lập được 07 dòng TKT từ 24 mẫu bệnh cháy bìa lá lúa thuộc 5 tỉnh ở ĐBSCL, trong đó dòng TKT P-KG4 có khả năng kí sinh vi khuẩn cao nhất. Tiếp tục, nhóm nghiên cứu đã ghi nhận môi trường Wakimono 0,6% agar cho mật số TKT cao nhất. Tiếp tục nghiên cứu này Giang và *ctv.* (2016) đã tiếp tục phân lập thêm những dòng TKT và tuyển chọn các dòng TKT triển vọng có phổ kí chủ rộng và đường kính đốm tan lớn, đặc biệt bốn dòng TKT (Φ XaVL12, Φ XaDT60b, Φ XaDT63c, Φ XaAG68A) cho

hiệu quả phòng trị bệnh cháy bìa lá lúa trên 50%. Song song đó, nhóm nghiên cứu đã khảo sát ảnh hưởng của ánh sáng và pH ảnh hưởng đến sự tồn tại của TKT, kết quả ghi nhận điều kiện pH từ 6 đến 7TKT của Xoo sẽ tồn tại ổn định theo thời gian. Khảo sát sự tồn tại của TKT trên tán lá lúa trong điều kiện nhà lưới, nhóm cũng đã ghi nhận TKT không còn tồn tại trên bề mặt tán lá cây sau 28 giờ khi không có vi khuẩn ký chủ ở điều kiện không có bóng râm. Vào năm 2018, Bảo đã chứng minh dòng TKT đơn ΦXaDT60b (10^8 pfu/ml) và HH TKT ở mật số 10^8 pfu/ml cho hiệu quả phòng trị bệnh cháy bìa lá lúa và góp phần gia tăng năng suất ở điều kiện ngoài đồng.

Vi khuẩn *Erwinia chrysanthemi* là vi khuẩn gây bệnh thối thân trên lúa vào giai đoạn sinh sản dinh dưỡng kết hợp với bệnh đạo ôn gây thất thu năng suất đáng kể. Nhóm nghiên cứu Minh và *ctv.*, (2016) đã phân lập 35 dòng TKT và 14 dòng 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. Kết quả tuyển chọn dựa vào khả năng ký sinh, đường kính phân giải vi khuẩn trong điều kiện phòng thí nghiệm. 8 dòng TKT ΦEchST19a, ΦEchCT12, ΦEchKG3b, ΦEchKG5a, ΦEchKG8b, ΦEchKG11b, ΦEchST19b và ΦEchST22 có khả năng ký sinh nhiều dòng vi khuẩn *E. chrysanthemi*, đặc biệt dòng TKT ΦEchKG8b cho đường kính phân giải vi khuẩn cao nhất. Tiếp tục so sánh 4 mật số TKT khác nhau (10^5 pfu/ml; 10^6 pfu/ml; 10^7 pfu/ml và 10^8 pfu/ml) trong phòng trị bệnh thối gốc lúa ở điều kiện nhà lưới. Cả bốn mật số 10^6 pfu/ml; 10^7 pfu/ml và 10^8 pfu/ml thể hiện hiệu quả giảm bệnh, rõ ràng nhất mật số 10^8 pfu/ml thể hiện hiệu quả cao trên 50%.

Vi khuẩn *Burkholderia glumae* gây bệnh thối hạt trên lúa, đặc biệt vụ Hè Thu và Thu Đông và gây thiệt hại năng suất đáng kể. Một nghiên cứu mở đầu của Huy và *ctv.*, (2016) đã phân lập được 41 dòng TKT ký sinh trên 61 dòng thuộc 6 tỉnh/thành ở ĐBSCL. Kết quả ghi nhận được cho thấy tất cả các dòng TKT đều có khả năng ký sinh trên vi khuẩn và đã tuyển chọn được 6 dòng TKT bao gồm ΦHG17, ΦVL30, ΦVL34, ΦVL39, ΦAG58 và ΦAG60 có khả năng tiêu diệt vi khuẩn gây bệnh cao nhất. Trong đó, các dòng TKT ΦVL34, ΦVL39, ΦAG58 cho hiệu quả phòng trừ bệnh cao hơn và khác biệt ý nghĩa so với các dòng TKT còn lại trong điều kiện nhà lưới.

Vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* là vi khuẩn gây bệnh héo xanh trên nhiều loài cây trồng tại Việt Nam như cây ớt, cây cà chua, khoai tây, ... kết quả nghiên cứu của An và *ctv.* (2017) đã phân lập và tuyển chọn ba dòng TKT (ΦCT18, ΦĐT3, ΦĐT4) khi áp dụng ba dòng TKT đơn lẻ hoặc hỗn hợp 3 dòng TKT ở mật số 10^8 PFU/ml tưới vào đất trong phòng trừ bệnh héo xanh do vi khuẩn *R. solanacearum*, kết quả cho thấy dòng thực khuẩn thể ΦĐT4 cho hiệu quả phòng trị trên 50% ở thời điểm 17 ngày sau khi lây bệnh. Tiên và *ctv.*, (2017) đã sử dụng dòng TKT ΦRaAG12a phòng trừ bệnh héo xanh trên dưa leo

trong điều kiện nhà lưới, cho kết quả giảm bệnh trên 70% ở thời điểm 16 ngày sau khi lây bệnh. Thông (2019) đã sử dụng dòng TKT ΦBT, Φ54, Φ67, HH TKT đều thể hiện khả năng phòng ngừa bệnh héo xanh trên cà phôi do vi khuẩn *R. solanacearum* gây ra trên 50% trong điều kiện nhà lưới. Tương tự, nghiên cứu của Ngân (2019) cũng đã sử dụng dòng TKT OM và HH TKT (OM, 54, BT) thể hiện hiệu quả phòng trị bệnh héo xanh trên cây khô qua rừng trên 60% trong điều kiện nhà lưới.

2.3.4.3 Sử dụng hỗn hợp thực khuẩn thể trong phòng trừ bệnh vi khuẩn trên cây trồng

Hỗn hợp TKT (HH TKT, phage mixture hay phage cocktail) được các nhà nghiên cứu trên thế giới sử dụng rất nhiều trong quản lý bệnh trên cây trồng. Về tính ưu việt của hỗn hợp này được biết đến với 2 lí do. Đầu tiên, TKT luôn luôn kí sinh chuyên tính trên một loài vi khuẩn hoặc một số vi khuẩn cùng chung một loài. Trong trường hợp sử dụng TKT đơn thì khả năng kí sinh thường bị giới hạn ở điều kiện ngoài đồng vì khả năng vi khuẩn kí chủ tiến hóa rất nhanh và có thể làm thay đổi một số thụ thể trên lớp màng vi khuẩn, do đó TKT đơn không thể kí sinh và liệu pháp TKT không thành công. Vì vậy, sử dụng HH TKT được ứng dụng nhiều nhằm tăng khả năng kí sinh của TKT cụ thể là tăng phổ kí chủ thông qua việc nhiều TKT có thể hấp phụ nhiều thụ thể khác nhau trên màng tế bào vi khuẩn kí chủ từ đó tăng hiệu quả kiểm soát mầm bệnh. Thứ 2, HH TKT ngăn chặn sự kháng của vi khuẩn kí chủ. Sự chạy đua vũ trang liên tục giữa TKT và vi khuẩn sẽ tạo nên những loài vi khuẩn kháng TKT thông qua cơ chế như thay đổi các thụ thể nhằm ức chế hấp phụ TKT, thay đổi cấu trúc ADN, thay đổi hệ thống miễn dịch hoặc hệ thống chỉnh sửa gen. Bằng cách sử dụng HH TKT làm cho vi khuẩn kí chủ không thể thay đổi các cơ chế cùng một lúc từ đó hạn chế sự kháng vi khuẩn (Kering, 2019). Một số kết quả nghiên cứu về sử dụng HH TKT được thể hiện qua Bảng 2.5.

Bảng 2.5 Tóm tắt sử dụng hỗn hợp thực khuẩn thể phòng trị một số bệnh trên cây trồng

Bệnh	Cây trồng	Vi khuẩn gây bệnh	Số lượng TKT	Hiệu quả giảm bệnh
Nứt thân	Nho	<i>Xylella fastidiosa</i> subsp. <i>fastidiosa</i>	4	Áp dụng phòng và trị bằng liệu pháp TKT giảm triệu chứng bệnh bệnh có ý nghĩa trong điều kiện phòng thí nghiệm
Đốm lá	Cà chua	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	4	Nghiệm thức sử dụng HH TKT giảm chỉ số bệnh khoảng 17% ở điều kiện ngoài đồng
Đốm lá	Cà chua	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	6–8	hỗn hợp thực khuẩn thể có chất bảo vệ giảm 12-43% trong khi HH TKT giảm bệnh 9-20% ở điều kiện ngoài đồng
Đốm lá	Cây có múi	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citrumelo</i>	3	HH TKT giảm bệnh đốm lá từ 35-48% trong 2 lần thử nghiệm ở điều kiện ngoài đồng
Loét	Cây bưởi	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i>	4	áp dụng hỗn hợp thực khuẩn thể giảm bệnh khoảng 59% trong điều kiện nhà lưới
Cháy vi khuẩn	Cây phong	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>pelargonii</i>	4	Sử dụng HH TKT có hiệu quả phòng trị bệnh thể hiện giảm về tỉ lệ bệnh 50% và mức độ bệnh 75% trong điều kiện nhà lưới

Cháy vi khuẩn	Tỏi	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>porri</i>	6	Kết quả nghiên cứu sử dụng HH TKT chưa thấy rõ hiệu quả phòng trị ở điều kiện ngoài đồng
Héo xanh	Khoai tây	<i>Ralstonia solanacearum</i>	6	Áp dụng HH TKT phòng bệnh héo xanh đạt hiệu quả giảm bệnh cây trồng khoảng 80%
Thối nhũn	Khoai tây	<i>Dickeya solani</i> <i>Pectobacterium atrosepticum</i> <i>P. carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	2	Áp dụng HH TKT cùng với vi khuẩn kí chủ trên miếng khoai tây cắt lát làm giảm bệnh thối nhũn từ 80-95%
Thối nhũn	Khoai tây	<i>Pectobacterium atrosepticum</i>	3	Sử dụng hỗn hợp thực khuẩn thể hiệu quả phòng trừ bệnh thối mềm củ khoai tây bằng cách áp dụng thực khuẩn thể và vi khuẩn cùng nhau.
Thối nhũn	Khoai tây	<i>Dickeya solani</i>	6	Sử dụng hỗn hợp thực khuẩn thể hiệu quả phòng trừ bệnh thối mềm củ khoai tây bằng cách áp dụng thực khuẩn thể và vi khuẩn cùng nhau.

Nguồn: Kering *et al.*, 2019

2.4 Oxolinic axit

- Tên thương mại: Starner 20 WP

- Công thức phân tử: $C_{13}H_{11}NO_5$.

- Đặc tính: Thuốc trừ vi khuẩn nội hấp, tiếp xúc mạnh, dạng bột, tan hoàn toàn trong nước, LD₅₀ 525mg/kg đối với chuột và LD₅₀ 1890mg/kg đối với chuột nhắt. Rất ít độc đối với con người, vật nuôi và môi trường. Thời gian cách ly 7 ngày trước khi thu hoạch. Không thả vật nuôi vào nơi mới phun thuốc.

- Sử dụng: Có tác dụng phòng và trừ các bệnh do vi khuẩn nhuộm Gram âm, như các loài *Xanthomonas*, *Pseudomonas* và *Erwinia* hại lúa, rau và cây ăn trái. Có thể pha thuốc với nồng độ 0,1 % phun lên cây khi bệnh mới xuất hiện (tỷ lệ nhiễm bệnh dưới 5%), dùng xử lý hạt giống theo 2 cách:

- Xử lý hạt khô: 30 – 50 gram thuốc trộn với 10 kg hạt giống rồi đem gieo.
- Xử lý nước: pha nồng độ nước thuốc 5% ngâm hạt giống
(trích dẫn Công Ty Sumitomo chemical- Nhật Bản)

Hoạt chất oxolinic axit là dẫn xuất của hoạt chất Quinoline, là thuốc nội hấp có hiệu quả cao với vi khuẩn gram âm. Oxolinic axit ức chế vi khuẩn làm cho quá trình phân bào không diễn ra thông qua ức chế enzyme ADN gyrase là một trong những enzyme tham gia vào gen mã di truyền và nhân đôi ADN vì vậy tế bào vi khuẩn chết nhanh. Một số nghiên cứu đã ghi nhận hiệu quả của oxolinic axit trong phòng trừ bệnh do vi khuẩn như *Pseudomonas glumae*, *P. plantarii*, *P. avenae*, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* và *E. carotovora* subsp. *atroseptica* ở nồng độ 0,4µg/ml (Hikichi, 1993).

2.5 Sơ lược về giống lúa OM4900

Giống lúa thuần OM 4900 đã được lai tạo chọn lọc bởi các cán bộ khoa học tại Bộ môn di truyền chọn giống thuộc Viện Lúa đồng bằng sông Cửu Long. Tác giả là GS. TS. Nguyễn Thị Lang và GS.TS. Bùi Chí Bửu. Phương pháp lai cổ truyền được áp dụng với giống bố là Jasmine 85 và giống mẹ là C53 (Lemont). Trong quá trình chọn lọc các đời con lai có áp dụng kỹ thuật trợ giúp của dấu chuẩn phân tử (MAS= marker assisted selection) từ năm 2002. Giống OM 4900 có thời gian sinh trưởng từ 95-100 ngày, cao 114 cm, thân rạ cứng, khả năng đẻ nhánh khá, số bông trên khóm biến thiên từ 8 đến 12, số hạt chắc trên bông là 156. Trọng lượng 1.000 hạt là 29,8 gram; chiều dài hạt gạo từ 7 đến 7,3 mm; độ bạc bụng cấp 0 (đánh cấp từ 0-9); hàm lượng amylose từ 16- 16,8%; tỷ lệ protein đạt 8,4%, có mùi thơm nhẹ. Giống tương đối chịu mặn; chống chịu khá tốt với rầy nâu, đạo ôn và bạc lá. Giống trồng được trong cả vụ hè thu và đông xuân, phù hợp cho vùng đồng bằng sông Cửu Long và Đông Nam bộ, năng suất biến thiên từ 5-7 tấn/ha, gia tăng 10-15% so với các giống đối chứng đang được trồng phổ biến trong vùng (Viện lúa đồng bằng sông Cửu Long; <https://clrri.org/ver2/index.php?option=content&view=chitiet&id=163>).

CHƯƠNG 3. PHƯƠNG TIỆN VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

3.1 THỜI GIAN VÀ ĐỊA ĐIỂM NGHIÊN CỨU

- Thời gian: từ tháng 5 năm 2015 đến tháng 5 năm 2019
- Địa điểm: Bộ môn Bảo Vệ Thực Vật, Khoa Nông Nghiệp, Trường Đại Học Cần Thơ và Viện Công Nghệ Kyoto, Nhật Bản, vùng trồng lúa tại huyện Tam Bình, tỉnh Vĩnh Long.

3.2 PHƯƠNG TIỆN NGHIÊN CỨU

3.2.1 Dụng cụ thiết bị và vật liệu

Kính hiển vi quang học, kính hiển vi điện tử (HD-2700, Hitachi High-Technologies Corp, Japan ở 200 kV), lame, lamelle, máy đo pH, cân điện tử, tủ thanh trùng ướt, tủ thanh trùng khô, đèn cồn, đĩa Petri, bình tam giác, waterbath, ống falcon (15 ml, 50 ml), micropipette (0,5 µl – 1000 µl), tủ lạnh, tủ úm, tủ âm -80°C, tủ âm -20°C.

3.2.2 Vật liệu

- Giống lúa: giống OM4900 xác nhận (thực hiện thí nghiệm từ nhà lưới đến ngoài đồng).
- Nguồn thực khuẩn thể và vi khuẩn gây bệnh thối hạt được phân lập tại tỉnh An Giang, Bạc Liêu, Kiên Giang, Sóc Trăng, Trà Vinh, Vĩnh Long, Đồng Tháp, Hậu Giang và TP. Cần Thơ, vi khuẩn *Burkholderia glumae* MAFF 106551 (Research Center of Genetic Resources, NARO, <http://www.gene.affrc.go.jp>, Nhật Bản).
- Hóa chất: các hóa chất cần thiết cho môi trường King's B, SM Buffer, PDA, PDAP, Nutrient.
- Các loại môi trường và hóa chất sử dụng trong nghiên cứu sinh học

➤ Các loại môi trường sử dụng trong nghiên cứu

1. Công thức môi trường King's B (King *et al.*, 1954)

Protein peptone	20 g
K ₂ HPO ₄	1,5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,5 g
Glycerol	15 ml
Agar	20 g
Nước cất	1000 ml

pH 7,0-7,4

2. Môi trường King's B 0,8% agar được dùng nuôi thực khuẩn thể

3. SM Buffer

400 mM Tris HCl (pH = 7,5) 125 ml

2 M NaCl 50 ml

Gelatin 100 mg

Nước cất 1000 ml

4. Môi trường Potato D-glucose agar (PDA) (Atlas, 2010)

Khoai tây 200 g

Đường D-glucose 20 g

Nước cất 1000 ml

pH 6,5 – 6,8

5. Môi trường Potato D-glucose agar peptone (PDAP) (Louis & Cooke, 1985)

Khoai tây 200 g

Đường D-glucose 20 g

Peptone 5 g

Nước cất 1000 ml

pH 6,5 – 6,8

6. Môi trường Nutrient (Himedia)

HM peptone 1,5 g

Peptone 5 g

Sodium chloride 5 g

Yeast extract 1,5 g

Nước cất 1000 ml

pH 7,0

➤ **Các hóa chất dùng trong ly trích ADN từ thực khuẩn thể**

Phenol (Merk), chloroform (Việt Nam), isoamyl alcohol (Merk), sodium acetate (Merk), ethanol 95%, ethanol 70%, nước cất 2 lần, Tris HCl (pH 8,0), TE buffer 1X (10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 0,1 mM EDTA).

➤ Các hóa chất dùng cho phản ứng PCR

Milli Q (nước cất 2 lần), Mastermix (Phusa), cặp mồi đặc hiệu cho vi khuẩn *B. glumae*: đoạn mồi (1416S: (5'-GAGAGAATCGACCATGAAC-3'; 1414A: (3'-GAGCGCATCCAGAACGAAGT-5') (Schaad *et al.*, 2001, Phụ bảng).

➤ Các hóa chất dùng trong điện di

Ethium Bromide (Merk), loading buffer 10 X, ladder 1 kb (Thermo scientific), ladder 100 bp (Thermo scientific), agarose (Merk), 1X TAE buffer (400mM Tris acetate, 1 mM EDTA, pH 8).

3.3 NỘI DUNG PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

3.3.1 Nội dung 1: Phân lập, tuyển chọn thực khuẩn thể và vi khuẩn gây bệnh thối hạt lúa

Mục tiêu: chọn ra nguồn TKT và vi khuẩn gây bệnh thối hạt làm nguồn nguyên liệu từ đó tuyển chọn ra một số dòng thực khuẩn thể tiềm năng trong phòng trị bệnh thối hạt lúa.

3.3.1.1 Phân lập thực khuẩn thể và vi khuẩn gây bệnh thối hạt ở các tỉnh đồng bằng sông Cửu Long

Mục tiêu: chọn ra nguồn TKT và vi khuẩn gây bệnh thối hạt làm nguồn vật liệu cho các thí nghiệm sau.

Phương pháp phân lập vi khuẩn gây bệnh (Goszczyńska *et al.*, 2000)

– Phương pháp thu mẫu bệnh thối hạt: thu thập mẫu bệnh từ những ruộng có diện tích lúa từ 1.000 m² trở lên, mỗi ruộng là một địa điểm, thu 5 điểm trên một ruộng vào giai đoạn lúa trổ đến trước khi thu hoạch. Triệu chứng bệnh điển hình trên bông lúa là những hạt bị thối nhưng không quá khô, khi tách vỏ trấu thấy hạt gạo bị lũng có vết nâu ngậm nước (water-soaked) ở phần phôi.

– Phương pháp phân lập vi khuẩn gây bệnh: các mẫu hạt khi thu về phải đặt trong túi ni-lông riêng biệt và ghi nhãn cụ thể, phân lập mẫu trong ngày hoặc một ngày sau đó. Tại phòng thí nghiệm, mẫu bệnh được quan sát dưới kính hiển vi để ghi nhận hiện tượng tuôn dịch vi khuẩn từ mẫu hạt lúa bệnh.

➤ Các bước phân lập vi khuẩn

Bước 1: Tách vỏ hạt lúa và khử trùng bề mặt hạt bằng cồn 70%.

Bước 2: Lam đã được khử trùng cất phần phôi giới hạn giữa mô khỏe và mô bệnh, sau đó cắt nhỏ mẫu bệnh và thêm vào 1-2 giọt nước cất vô trùng, để yên khoảng 1 phút cho vi khuẩn trong mẫu bệnh tuôn vào nước.

Bước 3: Rút 20 µl huyền phù vi khuẩn cho vào đĩa Petri chứa môi trường King's B 2% agar.

Bước 4: Vạch giọt huyền phù vi khuẩn trên môi trường dinh dưỡng King's B 2% agar.

Bước 5: Sau 24 giờ tiến hành tách rỗng và trữ nguồn vi khuẩn.

➤ **Cách đặt tên các chủng vi khuẩn:** kí tự chữ là từ viết tắt tên vi khuẩn – tỉnh nơi thu mẫu bệnh, kí hiệu số là chỉ số dòng vi khuẩn thu thập được tại một tỉnh từ 1 đến 100.

Ví dụ: BurCT1, trong đó: Bur: viết tắt vi khuẩn *Burkholderia glumae*; CT: vi khuẩn phân lập tại tỉnh Cần Thơ; số 1: là số dòng vi khuẩn được thu thập tại 1 địa điểm của tỉnh Cần Thơ trong nhiều ruộng được thu mẫu.

Phương pháp phân lập thực khuẩn thể (Nga & Giang, 2016 có hiệu chỉnh)

+ **Bước 1:** Mẫu hạt lúa có triệu chứng bệnh điển hình được tách bỏ vỏ trấu, lấy phần phôi nhũ thối được nghiền trong cối sứ. Rút 5 ml nước cất vô trùng vào trong cối chứa những hạt gạo bị bệnh và nghiền đến khi hạt gạo mịn, ly tâm (6.000 vòng/phút trong 5 phút). Rút phần dung dịch phía trên chuyển vào ống tuýp mới được bổ sung 5% chloroform (v/v), tiếp tục ly tâm dung dịch trên (6.000 vòng/phút trong 5 phút), cuối cùng thu được dung dịch trong dùng để kiểm tra sự hiện diện của TKT.

+ **Bước 2:** Rút 100 µl huyền phù vi khuẩn (OD_{600nm} : 0,3) được phân lập trước đó trên cùng 1 mẫu bệnh + 10 ml môi trường King's B 0,8 % agar đã nấu tan để nguội ở 50°C, hòa đều dung dịch bên trên. Sau đó rút 5 µl dung dịch TKT (thu từ bước 1) vào đĩa Petri đã chứa vi khuẩn kí chủ. Cuối cùng đĩa được ủ trong điều kiện phòng và quan sát sự hình thành các đốm tan (plaque) (nếu có đốm tan trong xuất hiện trên đĩa chứa vi khuẩn kí chủ sẽ có TKT).

+ **Bước 3:** Thực hiện phương pháp tách rỗng bằng cách chọn đốm tan đơn lẻ và cấy truyền bằng tâm bông vô trùng sang đĩa Petri chứa môi trường King's B 0,8 % agar đã hòa vi khuẩn kí chủ, sau 24 giờ TKT được thu hoạch bằng cách thêm vào 5 ml nước cất vô trùng, thu được phần dung dịch chứa TKT (bổ sung 5% Chloroform (v/v)). Ly tâm huyền phù chứa TKT và vi khuẩn kí chủ (6.000 vòng/phút trong 5 phút) thu được phần dung dịch trong chỉ chứa TKT và trữ nguồn ở nhiệt độ 4°C trong tối.

➤ **Cách đặt tên các dòng thực khuẩn thể:** kí hiệu thực khuẩn thể là Φ; kí tự chữ là từ viết tắt tên vi khuẩn kí chủ (Bur) – tỉnh nơi thu mẫu bệnh, kí hiệu số là chỉ số dòng thực khuẩn thể thu thập được tại một tỉnh với số thứ tự từ 1 đến 100; chữ a hay b là trên một kí chủ có 2 hình dạng đốm tan dựa vào đường kính đốm tan

Ví dụ: Φ BurCT1a, trong đó: Φ: thực khuẩn thể; Bur: vi khuẩn *B. glumae* kí chủ; CT: phân lập tại tỉnh Cần Thơ; số 1: là số dòng vi khuẩn được thu thập tại 1 địa điểm của tỉnh Cần Thơ trong nhiều ruộng được thu mẫu; a: mẫu TKT hình thành cùng mẫu phân lập có sự hiện diện hơn 1 TKT.

3.3.1.2 Đánh giá khả năng kí sinh của các dòng thực khuẩn thể trên các dòng vi khuẩn gây bệnh thối hạt lúa

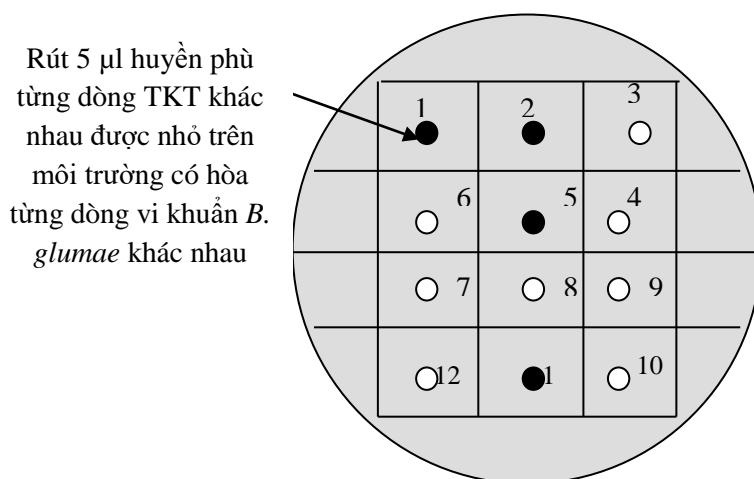
Mục tiêu: Nhằm tìm ra dòng TKT có khả năng kí sinh nhiều dòng vi khuẩn *B. glumae* và dòng vi khuẩn bị TKT kí sinh nhiều nhằm phục vụ cho các nghiên cứu tiếp theo.

Vật liệu: 112 dòng TKT và 60 dòng vi khuẩn gây bệnh thối hạt.

Phương pháp nhỏ giọt (spot test, Kutter & Sulakvelidze (2004)).

Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên gồm 2 lặp lại.

Chuẩn bị đĩa Petri vô trùng đã được kẽ và đánh số nghiệm thức tương ứng, rút 10 ml môi trường King's B 0,8% agar hòa chung 100 µl huyền phù vi khuẩn kí chủ và phơi đĩa trong 10 phút. Cuối cùng rút 5 µl huyền phù từng dòng TKT nhỏ vào ô nghiệm thức tương ứng (Hình 3.3).



Hình 3.1: Phương pháp kiểm tra khả năng kí sinh của các dòng thực khuẩn thể lên từng dòng vi khuẩn *Burkholderia glumae*

Chỉ tiêu ghi nhận: Xác định sự phân giải của các dòng TKT trên các ký chủ khác nhau thông qua hình thành đốm tan trên đĩa Petri sau 24 giờ.

3.3.1.3 Định danh vi khuẩn gây bệnh thối hạt bằng kỹ thuật PCR (polymerase Chain Reaction)

Mục tiêu: nhằm xác định ở mức độ loài tác nhân gây bệnh thối hạt lúa tại ĐBSCL

Vật liệu: 06 dòng vi khuẩn bị nhiều dòng TKT kí sinh (chọn ra từ thí nghiệm 3.3.1.2)

Các bước tiến hành:

- Ly trích ADN của vi khuẩn dựa vào phương pháp đun sôi tế bào vi khuẩn (Unior *et al.*, 2016)

Bước 1: Đặt vít một vòng lúp mẫu vi khuẩn đã tinh rỗng cho vào ống eppendorf đã chứa 400 µl nước cất vô trùng hoặc TE buffer.

Bước 2: Đun sôi eppendorf đã chứa sẵn dung dịch ở bước 1 trong 20 phút.

Bước 3: Chuyển eppendorf đã đun sôi vào nước đá và ủ trong 5 phút.

Bước 4: Trộn đều hỗn hợp và li tâm ở vận tốc 13.200 vòng/phút trong 5 phút.

Bước 5: Thu được phần ADN của vi khuẩn ở phía trên của dung dịch đã ly tâm.

Bước 6: Rút 2 μ l dung dịch nổi phía trên chứa ADN này vào ống tuýp PCR.

Giữ ADN của vi khuẩn đã được ly trích ở nhiệt độ 4⁰C.

➤ **PCR:** Dựa trên nguyên tắc khuếch đại đoạn 16S rRNA có kích thước 873 bp với cặp mồi đặc hiệu cho vi khuẩn *B. glumae* (Schaad *et al.*, 2001):

+ Mồi xuôi: 1416S: (5'-GAGAGAATCGACCATGAAC-3')

+ Mồi ngược: 1414A: (3'-GAGCGCATCCAGAACGAAGT-5')

Chu trình nhiệt:

- **Làm biến tính ADN:** 95⁰C trong 5 phút (1 chu kỳ)

- **Gắn mồi:** 29 chu kỳ gồm (95⁰C trong 30 giây; 63⁰C trong 30 giây; 72⁰C trong 45 giây)

- **Sự kéo dài ADN:** 1 chu kỳ (72⁰C trong 5 phút)

➤ **Xác định sản phẩm PCR bằng kỹ thuật điện di trên gel agarose 1%**

+ Sản phẩm PCR của từng dòng vi khuẩn được điện di trên gel agarose 1% sử dụng máy điện di ngang chứa dung dịch TAE buffer 1X ở 100 voltase trong 30 phút. Sau đó gel chứa ADN được nhuộm bằng dung dịch Ethium bromide (1 μ g/ml). Ladder sử dụng 100 bp (Thermo scientific).

+ Ghi nhận sự hiện diện băng ADN bằng máy chụp gel UV2000.

3.3.1.4 Đánh giá khả năng gây hại của các dòng vi khuẩn *Burkholderia glumae* gây bệnh thối hạt trong điều kiện nhà lưới

Mục tiêu: Tìm ra dòng vi khuẩn *B. glumae* gây hại nặng nhất phục vụ cho nghiên cứu tiếp theo.

Vật liệu: 06 dòng vi khuẩn *B. glumae* (được tìm từ thí nghiệm 3.3.1.3), giống lúa xác nhận OM900, chậu chứa đất (đường kính 25 cm, chiều cao 20 cm), đất trồng lúa từ vùng đất trồng lúa tại ruộng lúa 91B của TP. Cần Thơ, bình nhựa phun 500 ml (sử dụng đầu phun kết hợp ống Falcon 50 ml), phân bón (Kali 61% (Kali Canada Tân Tạo); Đạm Ure (46%); Supe Lân Long Thành 16%).

Chuẩn bị cây lúa

- Đất trồng lúa được cho vào chậu nhựa, mỗi chậu chứa 5 kg đất. Sau đó ngâm đất với nước 3 ngày, tiến hành xả phèn. Giống lúa xác nhận OM4900 được ngâm trong

nước ấm (50°C) trong 15 phút, sau đó hạt lúa được ủ trong tủ ủ ở 40°C. Sau 48 giờ hạt đã nảy mầm, tiến hành gieo hạt vào chậu đã chuẩn bị trước, mỗi chậu gieo 15 hạt.

- Bón phân cho lúa theo công thức 120 N - 40 P₂O₅ - 50 K₂O (kg/ha). Phân được hòa tan vào nước và tưới đều cho các chậu (Đệ, 2008).

- Bón lót (1 ngày trước sạ): Toàn bộ lượng phân lân.
- Bón thúc đợt 1 (10 NSKS): 30% lượng phân đạm + 50% lượng phân kali.
- Bón thúc đợt 2 (20 NSKS): 30% lượng phân đạm.
- Bón thúc đợt 3 (45 NSKS): 40% lượng phân đạm.

Giữ mực nước trong chậu phù hợp từng giai đoạn tăng trưởng, hạn chế thấp nhất sự phá hoại của côn trùng và mầm bệnh khác.

Phương pháp thí nghiệm: Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên một nhân tố gồm 06 nghiệm thức (mỗi nghiệm thức tương ứng từng dòng vi khuẩn) với 5 lần lặp lại, trong đó mỗi lần lặp lại là một chậu lúa với 10 bông lúa ở giai đoạn lúa trổ đều (70 ngày sau khi gieo).

1. Dòng vi khuẩn BurVL21
2. Dòng vi khuẩn BurDT46
3. Dòng vi khuẩn BurDT50
4. Dòng vi khuẩn BurDT51
5. Dòng vi khuẩn BurKG52
6. Dòng vi khuẩn BurKG57

Chuẩn bị vi khuẩn gây bệnh: Các dòng vi khuẩn *B. glumae* được nuôi cấy trên môi trường King's B 2% agar trong 48 giờ. Sau đó cho nước cất vô trùng vào đĩa Petri và thu hoạch huyền phù vi khuẩn. Xác định mật số vi khuẩn trong huyền phù bằng phương pháp đo độ quang truyền ở bước sóng 600 nm, thực hiện pha loãng để đạt OD_{600nm} = 0,3 (9 x 10⁸ cfu/ml, Phụ hình1).

Lây bệnh nhân tạo: Vào thời điểm cây lúa đang trổ hoa đồng loạt, tiến hành phun vi khuẩn với liều lượng 50 ml/chậu. Cây lúa sau khi lây bệnh được đặt trong điều kiện nhà lưới có che mưa

Ghi nhận chỉ tiêu

a) Tỷ lệ hạt bệnh (TLHB)

Đếm tổng số hạt bị nhiễm bệnh trên tổng số hạt trên bông vào các thời điểm 5, 15 và 25 NSKLB (ghi nhận 10 bông/chậu).

$$\text{TLHB (\%)} = \frac{\text{Số hạt bị nhiễm bệnh/bông}}{\text{Tổng số hạt/bông}} \times 100$$

b) *Chỉ số tích lũy bệnh theo thời gian (AUDPC)*

Được tính theo công thức (Shanner & Finney, 1977)

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

Trong đó

N: Số lần đánh giá bệnh; y_i : Tỷ lệ hạt bệnh tại lần đánh giá thứ i ; t_i : Thời gian tại lần đánh giá thứ i

Chỉ tiêu năng suất

c) Tỷ lệ hạt chắc: Vào thời điểm thu hoạch tiến hành cắt 10 bông lúa/chậu cho vào túi riêng biệt và ghi nhãn. Sau đó, phơi khô và tiến hành tách chắc, lép trên bông để ghi nhận chỉ tiêu.

$$\text{Tỷ lệ hạt chắc (\%)} = \frac{\text{Số hạt chắc/bông}}{\text{Tổng số hạt/bông}}$$

d) Trọng lượng 1000 hạt (g): Cân 1000 hạt lúa, chọn hạt chắc (không lép hay lửng) sau đó đo ẩm độ để quy đổi về trọng lượng ở ẩm độ 14%.

$$\text{W 1000 hạt ẩm độ 14\%} = \frac{\text{W 1000 hạt (100 - H}_0\text{)}}{86}$$

Trong đó: W 1000 hạt: trọng lượng 1000 hạt (g); H_0 : Ẩm độ lúc cân mẫu (%)

e) Trọng lượng thực tế (g/chậu) lấy toàn bộ hạt chắc trên mỗi chậu cân trọng lượng, sau đó đo ẩm độ và quy về trọng lượng ở ẩm độ 14%

$$\text{W}_{\text{ẩm độ 14\%}} = \frac{\text{W}_0 (100 - H_0)}{86}$$

Trong đó: W_0 : Trọng lượng lúc cân mẫu (g/chậu); H_0 : Âm độ lúc cân mẫu (%)

3.3.1.5 Đánh giá khả năng tiêu diệt vi khuẩn *Burkholderia glumae* của những dòng thực khuẩn thể triển vọng

Mục tiêu: Tìm ra dòng TKT có khả năng tiêu diệt cao đối với dòng vi khuẩn *B. glumae* DT46 trong điều kiện phòng thí nghiệm.

Vật liệu: Nguồn vi khuẩn *B. glumae* DT46 có khả năng gây hại cao (từ thí nghiệm 3.3.1.4) và 08 dòng TKT có phổ ký chủ rộng các dòng vi khuẩn *B. glumae* DT46 (từ thí nghiệm 3.3.1.5)

Chuẩn bị thực khuẩn thể: Các dòng TKT nuôi trên môi trường King's B 0,8% agar trong 24 giờ, sau đó thu hoạch huyền phù TKT và đếm mật số TKT bằng phương pháp pha loãng và đổ đĩa. Dựa vào mật số xác định sau 24 giờ, thực hiện pha loãng huyền phù các dòng TKT khác nhau về cùng mật số 10^3 pfu/ml.

Rút 30 μ l huyền phù từng dòng TKT (10^3 pfu/ml) + 100 μ l huyền phù vi khuẩn *B. glumae* ($OD_{600\text{ nm}} = 0,3$) cho vào đĩa Petri, sau đó tiến hành hòa môi trường King's B 0,8% đã được nấu tan giữ nhiệt ở 50°C , mỗi đĩa Petri là một lần lặp lại, đĩa được đặt trong điều kiện phòng.

Phương pháp: Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên gồm 08 nghiệm thức (số dòng TKT có phổ ký chủ rộng) với 3 lần lặp lại.

Ghi nhận chỉ tiêu: đường kính đốm tan (plaque) của từng dòng TKT phân giải vi khuẩn trên đĩa Petri vào các ngày sau khi bố trí (đo đường kính 10 đốm tan ngẫu nhiên và lấy trung bình của mỗi đĩa Petri tương ứng với 1 lần lặp lại).

3.3.2 Nội dung 2: Đánh giá khả năng phòng trị bệnh thối hạt của các dòng thực khuẩn thể triển vọng trong điều kiện nhà lưới

3.3.2.1 Đánh giá hiệu quả phòng trị bệnh thối hạt trên lúa do vi khuẩn *Burkholderia glumae* bằng các dòng thực khuẩn thể triển vọng

Mục tiêu: Tìm ra một số dòng TKT triển vọng đạt hiệu quả cao trong phòng trừ bệnh thối hạt do vi khuẩn *B. glumae* DT46 ở điều kiện nhà lưới.

Vật liệu: Nguồn vi khuẩn *B. glumae* DT46 (từ thí nghiệm 3.3.1.4) và 04 dòng TKT triển vọng (từ thí nghiệm 3.3.1.5), chậu chứa đất (đường kính 25 cm, chiều cao 20 cm), đất trồng lúa từ vùng đất trồng lúa tại ruộng lúa 91B của TP. Cần Thơ, bình nhựa phun 500 ml (sử dụng đầu phun kết hợp ống Falcon 50 ml), phân bón (Kali 61% (Kali CANADA Tân Tạo); Đạm Ure (46%); Supe Lân Long Thành 16%).

- Chuẩn bị cây lúa: Tương tự thí nghiệm 3.3.1.4

- Chuẩn bị nguồn thực khuẩn thể: Các dòng TKT đơn lẻ được nuôi trên môi trường 0,8% agar trong 24 giờ, sau đó thu hoạch các dòng TKT khác nhau bằng nước cất vô trùng. Tiếp theo, huyền phù TKT được xử lý 5% chloroform trong 5 phút, sau đó li tâm với vận tốc 6.000 rpm/5 phút. Cuối cùng thu hoạch dung dịch phía trên chứa TKT và tiếp tục đếm mật số từng dòng TKT bằng phương pháp pha loãng và đổ đĩa. Sau 24 giờ đếm số đốm tan hình thành trên đĩa và qui về mật số từng dòng TKT ở mật số 10^8 pfu/ml. Đối với nghiệm thức HH TKT đưa về mật số từng dòng TKT ở mật số 10^8 pfu/ml và hòa vào hỗn hợp với tỷ lệ từng dòng là 1:1:1:1.

Phương pháp thực hiện: Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên một nhân tố gồm sáu nghiệm thức với 4 lần lặp lại.

1. Dòng thực khuẩn thể ΦBurVL34
2. Dòng thực khuẩn thể ΦBurAG58
3. Dòng thực khuẩn thể ΦBurDT47a
4. Dòng thực khuẩn thể ΦBurDT48a
5. Hỗn hợp thực khuẩn thể (ΦBurVL34, ΦBurAG58, ΦBurDT47a và ΦBurDT48a, tỷ lệ 1:1:1:1)
6. Đối chứng không xử lý thực khuẩn thể

- Phương pháp lây bệnh: Vào thời điểm cây lúa đang trổ hoa đồng loạt (69 ngày sau khi gieo), phun 50 ml vi khuẩn *B. glumae* /chậu (OD_{600 nm} = 0,3).

- Khảo sát sự tồn tại của các dòng TKT trên bông lúa: Thực hiện cắt một bông lúa cho vào bình tam giác dung tích 250 ml (mỗi lặp lại của từng nghiệm thức xử lý TKT), cân trọng lượng bông sau đó + 100 ml nước cất vô trùng, lắc trong 20 phút trên máy lắc ngang với vận tốc 100 rpm/phút. Sau đó, rút 1 ml huyền phù vào ống eppendorf + 5% chloroform và ly tâm với vận tốc 6.000 rpm/phút trong 5 phút. Rút 700 μl huyền phù phía trên và pha loãng đếm mật số TKT hiện diện trên bông lúa.

Ghi nhận chỉ tiêu

- (1) Tỷ lệ hạt bệnh tại các thời điểm 5, 10, 15 và 20 NSKLB.
- (2) Hiệu quả giảm bệnh (Abbott, 1925):

$$HQGB(\%) = \frac{DC - NT}{DC} \times 100$$

Trong đó:

DC: Tỷ lệ hạt bệnh trên bông của nghiệm thức DC

NT: Tỷ lệ hạt bệnh trên bông của nghiệm thức có xử lý TKT

(3) Chỉ tiêu năng suất: số hạt chắc/bông; tỷ lệ hạt chắc; trọng lượng 1000 hạt, trọng lượng thực tế (g/chậu) (tương tự thí nghiệm 3.3.1.4)

(4) Mật số TKT tồn tại trên bông lúa (pfu/g bông) ở thời điểm 0 GSKLB (giờ sau khi lây bệnh), 12 GSKLB, 24 GSKLB và 7 ngày sau khi lây bệnh (NSKLB).

3.3.2.2 Đánh giá hiệu quả của các mật số thực khuẩn thể khác nhau trong phòng trị bệnh thối hạt lúa do vi khuẩn *Burkholderia glumae*

Mục tiêu: Tìm ra mật số TKT hiệu quả trong phòng trừ bệnh thối hạt lúa.

Vật liệu: 01 TKT ΦBurAG58 đạt hiệu quả cao trong phòng trị bệnh thối hạt (từ thí nghiệm 3.3.2.1), dòng vi khuẩn *B. glumae* DT46 (từ thí nghiệm 3.3.1.4).

Chuẩn bị cây lúa: tương tự thí nghiệm 3.3.1.4.

Chuẩn bị thực khuẩn thể: tương tự thí nghiệm 3.3.2.1. Pha loãng huyền phù TKT với các mật số tuần tự gồm 10^5 pfu/ml, 10^6 pfu/ml, 10^7 pfu/ml, 10^8 pfu/ml.

Chuẩn bị vi khuẩn: tương tự thí nghiệm 3.3.1.4

Phương pháp: Thí nghiệm được bố trí theo hoàn toàn ngẫu nhiên gồm 5 nghiệm thức với 4 lần lặp lại.

1. Mật số TKT ở 10^5 pfu/ml.
2. Mật số TKT ở 10^6 pfu/ml.
3. Mật số TKT ở 10^7 pfu/ml.
4. Mật số TKT ở 10^8 pfu/ml.
5. Nghiệm thức đối chứng (không áp dụng TKT).

Áp dụng TKT và vi khuẩn *B. glumae* DT46 tương tự thí nghiệm 3.3.2.1.

Ghi nhận chỉ tiêu: tỷ lệ hạt bệnh, AUDPC, tỷ lệ hạt chắc trên bông.

3.3.2.3 Khảo sát thời điểm xử lý của thực khuẩn thể trong phòng trị bệnh thối hạt do vi khuẩn *B. glumae*

Mục tiêu: Tìm ra thời điểm xử lý TKT có hiệu quả phòng trị đối với bệnh thối hạt để phục vụ cho các nghiên cứu tiếp theo.

Vật liệu: 01 TKT ΦBurAG58 đạt hiệu quả cao trong phòng trị bệnh thối hạt (từ thí nghiệm 3.3.2.1), dòng vi khuẩn *B. glumae* DT46 (từ thí nghiệm 3.3.1.4).

Chuẩn bị cây lúa: tương tự thí nghiệm 3.3.1.4.

Chuẩn bị thực khuẩn thể: tương tự thí nghiệm 3.3.2.1 và mật số TKT là 10^8 pfu/ml.

Chuẩn bị vi khuẩn: tương tự thí nghiệm 3.3.1.4

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

1. Phun TKT 2 giờ trước khi lây bệnh (GTKLB).
2. Phun TKT 5 ngày sau khi lây bệnh (NSKLB).
3. Phun TKT kết hợp 2 GTKLB + 5 NSKLB.
4. Nghiệm thức đối chứng (không xử lý TKT).

Vào thời điểm cây lúa đang trở hoa đồng loạt (60 NSKG, chọn 10 bông lúa/chậu) phun 50 ml/chậu huyền phù TKT ở hai nghiệm thức: 2 GTKLB và 2 GTKLB + 5 NSKLB, sau đó tiến hành cắt bông khảo sát mật số của TKT, nghiệm thức đối chứng phun 50 ml nước cất vô trùng. Hai giờ sau, tiến hành phun 50 ml vi khuẩn *B. glumae* /chậu ($OD_{600nm} = 0,3$) (tương ứng với mật số 9×10^8 cfu/ml) phun ướt đều từng bông trên chậu lúa (tất cả các nghiệm thức). Cây lúa sau khi lây bệnh được đặt trong điều kiện nhà lưới. Vào thời điểm 5 NSKLB, tiến hành phun 50 ml TKT/chậu ở 2 nghiệm thức 5 NSKLB và 2 GTKLB + 5 NSKLB.

Ghi nhận chỉ tiêu:

- (1) Khảo sát mật số của TKT trên bông (pfu/g bông): tương tự 3.3.2.1 ở thời điểm 0 giờ, 12 giờ, 24 giờ và 15 ngày sau khi áp dụng TKT.
- (2) Tỷ lệ hạt bệnh.
- (3) Chỉ số tích lũy bệnh theo thời gian (AUDPC)
- (4) Tỷ lệ hạt chắc/bông: Vào thời điểm 95 NSKS tiến hành cắt 10 bông lúa/chậu cho vào từng túi riêng biệt và có ghi nhãn. Sau đó, tiến hành tách chắc, lép trên bông để ghi nhận chỉ tiêu.

3.3.3 Nội dung 3: Xác định tính an toàn của các dòng thực khuẩn thể triển vọng trong thực tiễn sản xuất

3.3.3.1 Khảo sát hình thái của thực khuẩn thể dưới kính hiển vi điện tử truyền qua (Transmission electron microscopy)

Mục tiêu: Xác định hình thái của 03 dòng TKT triển vọng để xếp loại TKT đến cấp phân loại họ theo phương pháp mô tả Ackermann (2009)

Vật liệu: 03 dòng TKT triển vọng (ΦBurVL34, ΦBurAG58, ΦBurDT47a) (từ thí nghiệm 3.3.2.1), kính hiển vi điện tử truyền qua (HD-2700, Hitachi High-Technologies Corp, Japan ở 200 kV), vi khuẩn *Burkholderia glumae* MAFF 106551 (Research Center of Genetic Resources, NARO, <http://www.gene.affrc.go.jp>, Nhật Bản).

Phương pháp (Kutter & Sulakvelidze, 2004)

Từng dòng TKT đã được chuẩn bị riêng lẻ với mật số 10^{10} pfu/ml, sau đó nhuộm trong thuốc nhuộm Sodium phosphotungstate 1%. Rút 1 giọt TKT nhỏ vào tấm lưới với mắt lưới 300 mesh (grid). Sau 2 phút rửa lại bằng nước cất vô trùng. Sau đó nhỏ một giọt Sodium phosphotungstate 1% vào mẫu đã chứa TKT trong 1 phút. Cuối cùng ghi nhận hình thái từng dòng TKT dưới kính hiển vi điện tử truyền qua TEM (Transmission electronic microscope, HD – 2700, Hitachi High – Technologies Corp, Japan) ở 200 kV tại Viện Công Nghệ Kyoto, Nhật Bản.

Ghi nhận chỉ tiêu: Xác định hình dạng virion các dòng TKT triển vọng dưới độ phóng đại phù hợp và dựa vào hình thái virion để xác định họ của các dòng TKT triển vọng theo phân loại Ackermann (2009).

3.3.3.2 Giải mã trình tự bộ gen của những dòng thực khuẩn thể triển vọng

Mục tiêu: Xác định các dòng TKT triển vọng thuộc nhóm TKT độc hay ôn hòa dựa vào bộ genome của TKT không có/có gen qui định enzyme integrase nhằm đảm bảo tính an toàn khi ứng dụng TKT ở điều kiện thực tiễn.

Vật liệu: 03 dòng TKT triển vọng (ΦBurVL34, ΦBurAG58, ΦBurDT47a) (được chọn từ thí nghiệm 3.3.2.1), vi khuẩn *B. glumae* DT46 (được chọn từ thí nghiệm 3.3.1.4).

Phương pháp: Ly trích ADN theo phương pháp Balogh (2006)

- Bước 1:** Rút 150 µl huyền phù TKT riêng lẻ với mật số TKT đạt 10^{10} pfu/ml thêm vào 12,3 (đơn vị/mẫu) DNase I và 9 (đơn vị/mẫu) RNase A vào ống eppendorf 1,5 ml được ủ ở 37°C trong 30 phút.
- Bước 2:** Bổ sung nước cất vô trùng đủ 500 µl.
- Bước 3:** Bổ sung 375 µl Phenol/chloroform/isoamyl alcohol (PCI) (25:24:1) vào ống eppendorf đã chứa sẵn mẫu và trộn đều bằng vortex.
- Bước 4:** Ly tâm với vận tốc 10.000 g trong 5 phút. Sau đó rút phần bên trên vào ống tuýp mới được bổ sung nước cất vô trùng đủ 500 µl.
- Bước 5, 6 và 7:** tương tự bước 2, 3 và 4.
- Bước 8:** Rút 250 µl dung dịch phía trên vào tuýp mới, và bổ sung 250 µl chloroform/isoamyl alcohol (24:1), và trộn đều bằng vortex.
- Bước 9:** Ly tâm với vận tốc 10.000 g trong 5 phút.
- Bước 10:** Rút 100 µl dung dịch phía trên vào tuýp mới và bổ sung 40 µl sodium acetate (3M, pH 5.2).
- Bước 11:** 800 µl ethanol 95% (-4°C) và trộn đều.

Bước 12: Ủ mẫu ở nhiệt độ -80°C trong 30 phút.

Bước 13: Ly tâm với vận tốc 10.000 g trong 30 phút.

Bước 14: Rửa kết tủa với 1 ml ethanol 70%.

Bước 15: thu được kết tủa là ADN và để khô ở điều kiện nhiệt độ phòng.

Bước 16: Hòa kết tủa ADN với 40 μl TE buffer và trữ ở nhiệt độ -20°C .

Mẫu sau khi ly trích ADN được giải trình tự bởi Bộ môn Công Nghệ gen thuộc Trường Đại học KU Leuven tại Vương Quốc Bỉ bằng máy giải trình tự Illumina Mini Seq. Sau đó kết quả trình tự bộ genome của từng dòng thực khuẩn thể được phân tích bằng phần mềm Patric 3.6.8 (<https://www.patricbrc.org/>). Trình tự bộ genome của TKT được so sánh sự tương đồng trên ngân hàng gen NCBI bằng BLASTn. Trình tự protein được xác định bằng BLASTp trên NCBI và phần mềm Artemis, sau đó bản đồ gen được vẽ bằng EasyFig (Nga *et al.*, 2021).

Kết quả ghi nhận: Trình tự bộ genome chứa từng gen qui định chức năng từng bộ đọc mở (open reading frame, ORF) của các dòng TKT triển vọng.

3.3.4 Nội dung 4: Đánh giá hiệu quả của các dòng thực khuẩn thể triển vọng phòng trị bệnh thối hạt lúa ở điều kiện ngoài đồng

3.3.4.1 Đánh giá hiệu quả phòng trị bệnh thối hạt do vi khuẩn *Burkholderia glumae* trên lúa bằng các dòng thực khuẩn thể triển vọng vụ Đông Xuân 2017 - 2018

Mục tiêu: Xác định hiệu quả của TKT dòng $\Phi\text{BurAG58}$ và hỗn hợp ($\Phi\text{BurVL34}$, $\Phi\text{BurAG58}$, $\Phi\text{BurDT47a}$) trong phòng trị bệnh thối hạt trên cây lúa ở điều kiện ngoài đồng.

Thời gian: Thí nghiệm được thực hiện từ tháng 10/2017 đến 3/2018.

Địa điểm: ấp Bình Điền, xã Bình Ninh, huyện Tam Bình, tỉnh Vĩnh Long.

Vật liệu: 03 dòng TKT ($\Phi\text{BurVL34}$, $\Phi\text{BurAG58}$, $\Phi\text{BurDT47a}$, chọn ra từ thí nghiệm 3.3.2.1), dòng vi khuẩn *B. glumae* DT46 (được chọn từ thí nghiệm 3.3.1.4), Oxolinic axit (Sumitomo chemical), giống lúa OM 4900, phân bón (Phụ chương), Bảng cắm (tự chế), bình phun thuốc 25 lít (Oshima).

Chuẩn bị:

Ruộng thí nghiệm được canh tác trên vùng chuyên canh lúa. Sau khi thu hoạch lúa, cho nước vào ngâm rồi tháo nước. Sau đó chuẩn bị đất và sạ lúa với lượng giống là 10 kg/1000m². Đến giai đoạn lúa được 10 ngày, tiến hành nhổ mạ ở các đường giới hạn của các lô thí nghiệm tạo đường phân cách giữa các lô và dặm vào vị trí lúa không nảy mầm.

Thực khuẩn thể: TKT được nuôi trên môi trường King's B 0,8% agar, sau 24 giờ thu hoạch huyền phù TKT bằng nước cất vô trùng (tương tự thí nghiệm 3.3.2.1). Sau đó đếm mật số TKT bằng phương pháp pha loãng và đổ đĩa, sau đó đưa huyền phù TKT về mật số 10^8 pfu/ml, đối với nghiệm thức TKT đơn và hỗn hợp (với tỷ lệ 3 TKT trong hỗn hợp 1:1:1).

Vi khuẩn: Vi khuẩn được nuôi trên môi trường King's B 2% agar trong 48 giờ, tiếp tục hòa vào nước muối 0,9% thành huyền phù vi khuẩn, sau đó đo độ đục huyền phù vi khuẩn với bước sóng 600 nm và đưa huyền phù vi khuẩn với $OD_{600nm} = 0,15$ (tương đương mật số 2×10^8 cfu/ml).

Chăm sóc ruộng: Ruộng lúa được theo dõi, chăm sóc và bón phân dựa theo kinh nghiệm của nông dân (các thuốc hóa học và phân bón của ruộng theo Phụ bảng).

- Nước: Nước được bơm vào ruộng từ ao kế bên, cách ruộng 1 vườn cam.
- Quản lý sâu, bệnh hại: Sâu và bệnh hại do tác nhân nấm được nông dân theo dõi, quản lý và phun thuốc. Dưới đây là thời điểm cũng như liều lượng phun các loại thuốc hóa học mà nông dân đã sử dụng (Phụ bảng).

Phương pháp:

Thí nghiệm được thực hiện ngoài đồng có diện tích 1.000 m². Diện tích mỗi lô thí nghiệm là 49 m² (7x7 m) và, giữa các lô có dây phân cách rộng 0,5 m. Thí nghiệm được trí theo khối hoàn toàn ngẫu nhiên một nhân tố với 4 nghiệm thức và 4 lần lặp lại. Các nghiệm thức được bố trí như Hình 3.2 và cụ thể các nghiệm thức như sau:

1. Xử lý 01 dòng ΦBurAG58 đơn (10^8 pfu/ml).
2. Xử lý HH TKT (ΦBurVL 34, ΦBurAG58, ΦBurDT47a, 10^8 pfu/ml, tỷ lệ 1:1:1).
3. Xử lý Oxolinic axit.
4. Đối chứng (không xử lý tác nhân phòng trừ).

Lặp lại I	NT 1	NT 2	NT 3	NT 4
	0,5m			
Lặp lại II	NT 2	NT 4	NT 1	NT 3
Lặp lại III	NT 4	NT 3	NT 1	NT 2
Lặp lại IV	NT 3	NT 2	NT 1	NT 4

Hình 3.2: Sơ đồ bố trí các nghiệm thức ngoài đồng vụ Đông Xuân 2017 - 2018

Bảng 3.1 Mật số và liều lượng phun của các nghiệm thức trong thí nghiệm

STT	Nghiệm thức	Mật số/liều lượng	Lượng nước phun/lô	Thời gian xử lý (NSKS)
1	TKT ΦBurAG58 đơn	10^8 pfu/ml	2 lít	55
2	HH TKT(ΦBurVL34, ΦBurAG58, ΦBurDT47a)	10^8 pfu/ml	2 lít	55
3	Starner 200WP (hoạt chất oxolinic axit chiếm 20%)	2,5 g/l	2 lít	58
4	Đối chứng	Nước ruộng	2 lít	55

Cách tiến hành

Xử lý thực khuẩn thể và vi khuẩn:

- Thực khuẩn thể: Phun TKT 2 lần tuần tự tương ứng từng nghiệm thức vào giai đoạn lúa trổ hoa (the flowering stage, Reissig (1985)).
 - + Lần 1: Phun 2 lít huyền phù TKT trên bông lúa/lô (49 m^2) vào giai đoạn 55 NSKS.
 - + Lần 2: Phun 2 lít huyền phù TKT trên bông lúa/lô (49 m^2) vào giai đoạn 60 NSKS.
- Vi khuẩn: Phun huyền phù vi khuẩn *B. glumae* cho toàn ruộng ($40 \text{ lít/công } 1000 \text{ m}^2$) sau 1 giờ phun TKT (phun 1 lần duy nhất) với $\text{OD}_{600\text{nm}} = 0,15$ ($2 \times 10^8 \text{ cfu/ml}$).
- Oxolinic axit: phun 2 lít oxolinic axit đều trên bông trong ô nghiệm thức theo nồng độ khuyến cáo vào giai đoạn 58 NSKS khi cây lúa bắt đầu xuất hiện bệnh (Phun 1 lần duy nhất).

Ghi nhận chỉ tiêu

Mỗi lô thí nghiệm được đánh dấu 5 điểm theo đường chéo góc. Ghi nhận chỉ tiêu bệnh thối hạt lúa tại các thời điểm 10, 15, 20 NSKLB và thu hoạch. Các bông lúa được chọn ngẫu nhiên trên 5 điểm và tránh thu các bông lúa ở sát lối đi. Các điểm cách lối đi khoảng 0,5 m nhằm tránh sự ảnh hưởng do tiếp xúc làm ảnh hưởng đến chỉ tiêu.

(1) *Tỷ lệ hạt bệnh*: Mỗi lô thí nghiệm, chọn ngẫu nhiên 50 bông nằm trên 5 điểm đánh dấu thuộc 2 đường chéo góc. Đếm tổng số hạt bị nhiễm bệnh và tổng số hạt trên bông vào các thời điểm 10, 15 và 20 NSKLB.

- (2) Chỉ số tích lũy bệnh theo thời gian (AUDPC)
- (3) Hiệu quả giảm bệnh (HQGB)
- (4) Tỷ lệ hạt chắc

$$\text{Tỷ lệ hạt chắc (\%)} = \frac{\text{Số hạt chắc/bông}}{\text{Tổng số hạt/bông}} \times 100$$

(5) Năng suất thực tế (NSTT) (tấn/ha): tiến hành chọn và cắt ngẫu nhiên lúa trong phạm vi 5 m² ở mỗi lô nghiệm thức. Lấy toàn bộ hạt chắc cân trọng lượng (quy về trọng lượng ở ẩm độ 14 (%)).

$$W_{(5m^2)(\text{ẩm độ}14\%)}(\text{kg}) = \frac{W_{(5m^2)} \times (100 - H_0)}{86} \times 100$$

Trong đó: H₀ là ẩm độ của hạt tại thời điểm cân (%)

W_{5m²}: trọng lượng hạt ở thời điểm cân

NSTT (tấn/ha): 2 x W_{5m²} (14%)

3.3.4.2 Đánh giá hiệu quả phòng trị bệnh thối hạt do vi khuẩn *Burkholderia glumae* trên lúa bằng các dòng thực khuẩn thể triển vọng ở ngoài đồng vụ Hè Thu sớm 2018

Mục tiêu: Đánh giá hiệu quả của TKT ΦBurAG58 đơn lẻ hay HH TKT (ΦBurVL 34, ΦBurAG58, ΦBurDT47a) ở các mật số khác nhau lên hiệu quả phòng trị thối hạt ở điều kiện ngoài đồng.

Thời gian: Thí nghiệm được thực hiện từ tháng 2/2018 đến 6/2018.

Địa điểm: ấp Bình Điền, xã Bình Ninh, huyện Tam Bình, tỉnh Vĩnh Long.

Vật liệu: 03 dòng TKT (ΦBurVL34, ΦBurAG58, ΦBurDT47a, được chọn ra từ thí nghiệm 3.3.2.1), dòng vi khuẩn *B. glumae* DT46 (được chọn từ thí nghiệm 3.3.1.4), Oxolinic axit (Sumitomo chemical), giống lúa OM 4900.

- Chuẩn bị thực khuẩn thể: tương tự thí nghiệm 3.3.4.1

- Vi khuẩn *B. glumae*: tương tự thí nghiệm 3.3.4.1

Phương pháp: Thí nghiệm được bố trí theo khối hoàn toàn ngẫu nhiên gồm 6 nghiệm thức với 4 lần lặp lại (mỗi lần lặp lại 50 m²) và bao gồm các nghiệm thức:

1. Xử lý dòng TKT ΦBurAG58 đơn ở mật số 10⁸ pfu/ml
2. Xử lý dòng TKT ΦBurAG58 đơn ở mật số 10⁷ pfu/ml
3. Xử lý HH TKT (ΦBurVL 34, ΦBurAG58, ΦBurDT47a) ở mật số 10⁸ pfu/ml
4. Xử lý HH TKT ở mật số 10⁷ pfu/ml
5. Xử lý Oxolinic axit
6. Đối chứng

Bảng 3.2 Các nghiệm thức thực hiện trong thí nghiệm vụ Hè Thu sớm 2018

STT	Nghiệm thức	Mật số/liều lượng	Lượng nước phun/lô 50m ²	Thời gian xử lí (NSKS)
1	ΦBurAG58 đơn	10 ⁸ pfu/ml	2 lít	57
2	ΦBurAG58 đơn	10 ⁷ pfu/ml	2 lít	57
3	HH TKT (ΦBurVL 34, ΦBurAG58, ΦBurDT47a)	10 ⁸ pfu/ml	2 lít	57
4	HH TKT (ΦBurVL 34, ΦBurAG58, ΦBurDT47a)	10 ⁷ pfu/ml	2 lít	57
5	Starner 200WP (Hoạt chất oxolinic axit chiếm 20%)	2,5 g/l	2 lít	59
6	Đối chứng	nước ruộng	2 lít	57

Lặp lại I		NT 1	NT 2	NT 3	NT 4	NT 5	NT 6
	0,5 m						
Lặp lại II		NT 2	NT 4	NT 6	NT 1	NT 5	NT 3
Lặp lại III		NT 6	NT 4	NT 5	NT 3	NT 1	NT 2
Lặp lại IV		NT 3	NT 2	NT 1	NT 6	NT 5	NT 4

Hình 3.3 Sơ đồ bố trí các nghiệm thức vụ Hè Thu sớm 2018Xử lý thực khuẩn thể và vi khuẩn:

-Thực khuẩn thể: Phun TKT 2 lần tuần tự tương ứng từng nghiệm thức

+ Lần 1: Phun 2 lít huyền phù TKT trên bông lúa/lô (50 m²) vào giai đoạn 57 NSKS khi cây lúa trở đều.

+ Lần 2: Phun 2 lít huyền phù TKT trên bông lúa/lô (50 m²) vào giai đoạn 62 NSKS.

- Vi khuẩn: Phun huyền phù vi khuẩn *B. glumae* cho toàn ruộng (40 lít/công 1000 m²) sau 1 giờ phun TKT (phun lần 1).

- Oxolinic axit: Phun 2 lít Oxolinic axit đều trên bông trong ô nghiệm thức theo nồng độ khuyến cáo vào giai đoạn 59 NSKS khi cây lúa bắt đầu xuất hiện bệnh trên ô nghiệm thức hóa học.

Ghi nhận chỉ tiêu: Ghi nhận chỉ tiêu khi cây lúa bắt đầu xuất hiện bệnh, cắt 50 bông lúa theo đường chéo gốc tương ứng từng lần lặp lại của từng nghiệm thức. Tiến hành lấy chỉ tiêu 3 lần: lần đầu tiên vào giai đoạn 67 NSKS khi quan sát thấy bông lúa biểu hiện triệu chứng bệnh, lần hai là 72 NSKS, lần thứ ba ở giai đoạn 77 NSKS.

- Các chỉ tiêu: (1) Tỷ lệ hạt bệnh; (2) Chỉ số tích lũy bệnh theo thời gian (AUDPC); (3) Hiệu quả giảm bệnh (HQGB); (4) Mật số TKT trên bông; (5) Tỷ lệ hạt chắc; (6) Năng suất thực tế (NSTT) (tấn/ha) (tương tự thí nghiệm 3.3.4.1)

3.3.5 Nội dung 5: Khảo sát điều kiện nhân nuôi thực khuẩn thể triển vọng

3.3.5.1 Khảo sát các loại môi trường lên khả năng nhân mật số thực khuẩn thể

Mục tiêu: Xác định môi trường nhân nuôi TKT đạt mật số cao.

Vật liệu: dòng TKT ΦBurAG58, môi trường King's B lỏng, Nutrient lỏng, PDA lỏng, PDA + Peptone lỏng.

Phương pháp: Thí nghiệm được bố trí theo hoàn toàn ngẫu nhiên một nhân tố với bốn lần lặp lại gồm:

1. Môi trường King's B lỏng
2. Môi trường Nutrient lỏng
3. Môi trường PDA lỏng
4. Môi trường PDA + Peptone lỏng

Chuẩn bị thực khuẩn thể: TKT được nuôi trên môi trường KB 0,8% agar, sau đó thu hoạch huyền phù TKT và đưa về mật số 10^8 pfu/ml. Rút 1 ml huyền phù TKT và 1 ml huyền phù vi khuẩn *B. glumae* ($OD_{600\text{ nm}} 0,3$) vào 98 ml môi trường King's B lỏng, cuối cùng đặt bình tam giác chứa vi khuẩn và thực khuẩn thể trên máy lắc ngang với vận tốc 100 rpm/phút.

Chỉ tiêu ghi nhận: Mật số thực khuẩn thể (pfu/ml) vào thời điểm 24 giờ, 48 giờ, 72 giờ, 96 giờ

Phương pháp xác định mật số thực khuẩn thể: Vào từng thời điểm ghi nhận chỉ tiêu rút 1,2 ml dung dịch môi trường đã chứa TKT tương ứng từng nghiệm thức. Sau đó ly tâm dung dịch thu được với tốc độ 6.000 vòng/phút trong 5 phút. Tiếp tục chuyển 1 ml dung dịch ở phía trên sang ống eppendorf mới với 5% chloroform, sau đó trộn đều và để yên trong 5 phút, tiếp tục ly tâm dung dịch với tốc độ 6.000 vòng/phút trong 5 phút sẽ thu được 700 µl dung dịch TKT. Cuối cùng đếm mật số TKT bằng phương pháp pha loãng và đổ đĩa và xác định được mật số TKT (pfu/ml).

3.3.5.2 Khảo sát thời gian cấy vi khuẩn lên khả năng nhân mật số thực khuẩn thể

Mục tiêu: Tìm ra thời điểm cấy vi khuẩn cũng như dạng môi trường King's B nhằm đạt mật số TKT cao.

Vật liệu: dòng TKT ΦBurAG58, môi trường King's B lỏng, môi trường King's B 0,8% agar.

Phương pháp: Thí nghiệm được bố trí theo hoàn toàn ngẫu nhiên hai nhân tố (Nhân tố A: 2 loại môi trường King' B (lỏng và 0,8% agar); Nhân tố B: hai thời điểm cấy vi khuẩn (cấy vi khuẩn trước 16 giờ và cấy vi khuẩn và TKT cùng lúc)) với bốn lần lặp lại gồm:

1. Cấy vi khuẩn *B. glumae* trên môi trường King's B lỏng trước 16 giờ sau đó bổ sung thực khuẩn thể.
2. Cấy vi khuẩn *B. glumae* và TKT vào môi trường King's B lỏng cùng lúc.
3. Cấy vi khuẩn *B. glumae* trên môi trường King's B 0,8% agar trước 16 giờ sau đó bổ sung TKT.
4. Cấy vi khuẩn *B. glumae* và TKT vào môi trường King's B 0,8% agar cùng lúc.

Thực hiện:

(1) Rút 100 µl huyền phù vi khuẩn *B. glumae* (OD: 0,3) vào đủ 10 ml môi trường King's B lỏng và lắc trên máy lắc ngang với vận tốc 100 rpm trong 16 giờ, sau đó bổ sung 100µl huyền phù TKT (10^8 pfu/ml)

(2) Rút 100 µl huyền phù vi khuẩn *B. glumae* (OD: 0,3) + 100 µl huyền phù TKT (10^8 pfu/ml) vào đủ 10 ml môi trường King's B lỏng và đặt trên máy lắc ngang với vận tốc 100 rpm/phút.

(3) Rút 100 µl huyền phù vi khuẩn *B. glumae* (OD: 0,3) vào đủ 10 ml môi trường King's B 0,8% agar trong 16 giờ, sau đó bổ sung 100 µl huyền phù TKT (10^8 pfu/ml) được đặt ở điều kiện phòng.

(4) Rút 100µl huyền phù vi khuẩn *B. glumae* (OD₆₀₀: 0,3), sau đó rút 100µl huyền phù TKT (10^8 pfu/ml) vào đủ 10 ml môi trường 0,8% agar được đặt ở điều kiện phòng.

Chỉ tiêu ghi nhận: Mật số TKT (pfu/ml) vào thời điểm 24 giờ, 48 giờ và 72 giờ sau khi bố trí.

Phương pháp xác định mật số TKT: Nghiệm thức (1) và (2) tương tự thí nghiệm 3.3.5.1. Nghiệm thức (3) và (4) vào mỗi thời điểm ghi nhận chỉ tiêu thêm 10 ml nước cất vô trùng vào từng nghiệm thức và cũng xác định mật số tương tự thí nghiệm 3.3.5.1.

3.3.5.3 Khảo sát chỉ số MOI ảnh hưởng đến khả năng nhân mật số của dòng thực khuẩn thể triển vọng

Mục tiêu: Tìm ra hệ số MOI có khả năng nhân TKT triển vọng đạt mật số cao.

Vật liệu: dòng TKT ΦBurAG58, môi trường King's B lỏng

Phương pháp: Thí nghiệm được bố trí theo hoàn toàn ngẫu nhiên một nhân tố gồm ba nghiệm thức với bốn lần lặp lại gồm

1. Chỉ số MOI là 0,01
2. Chỉ số MOI là 0,1
3. Chỉ số MOI là 1

Thực hiện:

- Chuẩn bị vi khuẩn *B. glumae*: vi khuẩn được nuôi trong môi trường King's B lỏng trong 24, sau đó đếm mật số bằng phương pháp nhỏ giọt và đưa về mật số $5 \cdot 10^7$ cfu/ml.

- Chuẩn bị thực khuẩn thể: bốn dòng TKT được nhân nuôi trên môi trường King's B 0,8% trong 24 giờ, sau đó hòa nước vào môi trường chứa từng dòng TKT và đếm mật số TKT bằng phương pháp đổ đĩa. Cuối cùng xác định mật số TKT sau 24 giờ.

- Tiến hành: Rút 1 ml huyền phù vi khuẩn + 1 ml huyền phù từng mật số TKT tương ứng để đạt chỉ số MOI 0,01; 0,1 và 1 vào ống nghiệm 3 ml chứa môi trường King's B lỏng (tổng cộng 5 ml). Các nghiệm thức được đặt trên máy lắc với tốc độ 100 rpm/phút.

Bảng 3.3 Mật số vi khuẩn và TKT tương ứng các chỉ số MOI

Mật số vi khuẩn (cfu/ml)	Mật số TKT (pfu/ml)	MOI	Tỷ lệ thể tích (TKT: vi khuẩn)
$5 \cdot 10^7$	$5 \cdot 10^7$	1	1:1
$5 \cdot 10^7$	$5 \cdot 10^6$	0,1	1:1
$5 \cdot 10^7$	$5 \cdot 10^5$	0,01	1:1

Chỉ tiêu ghi nhận: Mật số TKT (pfu/ml) ở thời điểm 6 giờ và 24 giờ sau khi bố trí.

Phương pháp xác định mật số TKT: tương tự thí nghiệm 3.3.5.1

3.3.5.4 Khảo sát nhiệt độ ảnh hưởng đến khả năng nhân mật số thực khuẩn thể triển vọng

Mục tiêu: Tìm ra thời điểm cấy vi khuẩn cũng như dạng môi trường King's B nhằm đạt mật số TKT cao.

Vật liệu: dòng TKT ΦBurAG58, môi trường LB lỏng.

Phương pháp: Thí nghiệm được bố trí theo hoàn toàn ngẫu nhiên 1 nhân tố gồm ba nghiệm thức với bốn lần lặp lại gồm:

1. Nhiệt độ 27⁰C
2. Nhiệt độ 30⁰C
3. Nhiệt độ 35⁰C.

Chuẩn bị thực khuẩn thể: Nuôi TKT trên môi trường LB 0,8 % agar sau 24 giờ thu hoạch TKT và pha loãng đếm mật số. Sau đó đưa huyền phù TKT về mật số 10³ pfu/ml.

Chuẩn bị vi khuẩn: vi khuẩn được nuôi trên môi trường LB lỏng trong 24 giờ thu hoạch TKT và pha loãng đếm mật số. Sau đó đưa huyền phù TKT về mật số 10⁵ pfu/ml.

Tiến hành: Rút 1 ml huyền phù TKT + 1 ml huyền phù vi khuẩn vào 3 ml môi trường LB lỏng đặt ở các điều kiện nhiệt độ khác nhau (27⁰C, 30⁰C, 35⁰C) trên máy lắc ngang với vận tốc 170 rpm/phút.

Ghi nhận chỉ tiêu: Mật số TKT (pfu/ml) sau 6 giờ, 12 giờ và 24 giờ.

Phương pháp xác định mật số TKT: tương tự thí nghiệm 3.3.5.1

3.3.6 Xử lý số liệu: Số liệu được xử lý bằng Excel, số liệu mật số TKT được chuyển sang logarit và phân tích thống kê bằng phần mềm MstatC qua phép thử Duncan.

CHƯƠNG 4. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

4.1 Nội dung 1: Kết quả phân lập, tuyển chọn thực khuẩn thể và vi khuẩn gây bệnh thối hạt lúa

4.1.1 Kết quả phân lập các dòng thực khuẩn thể phân bố ở các tỉnh đồng bằng sông Cửu Long

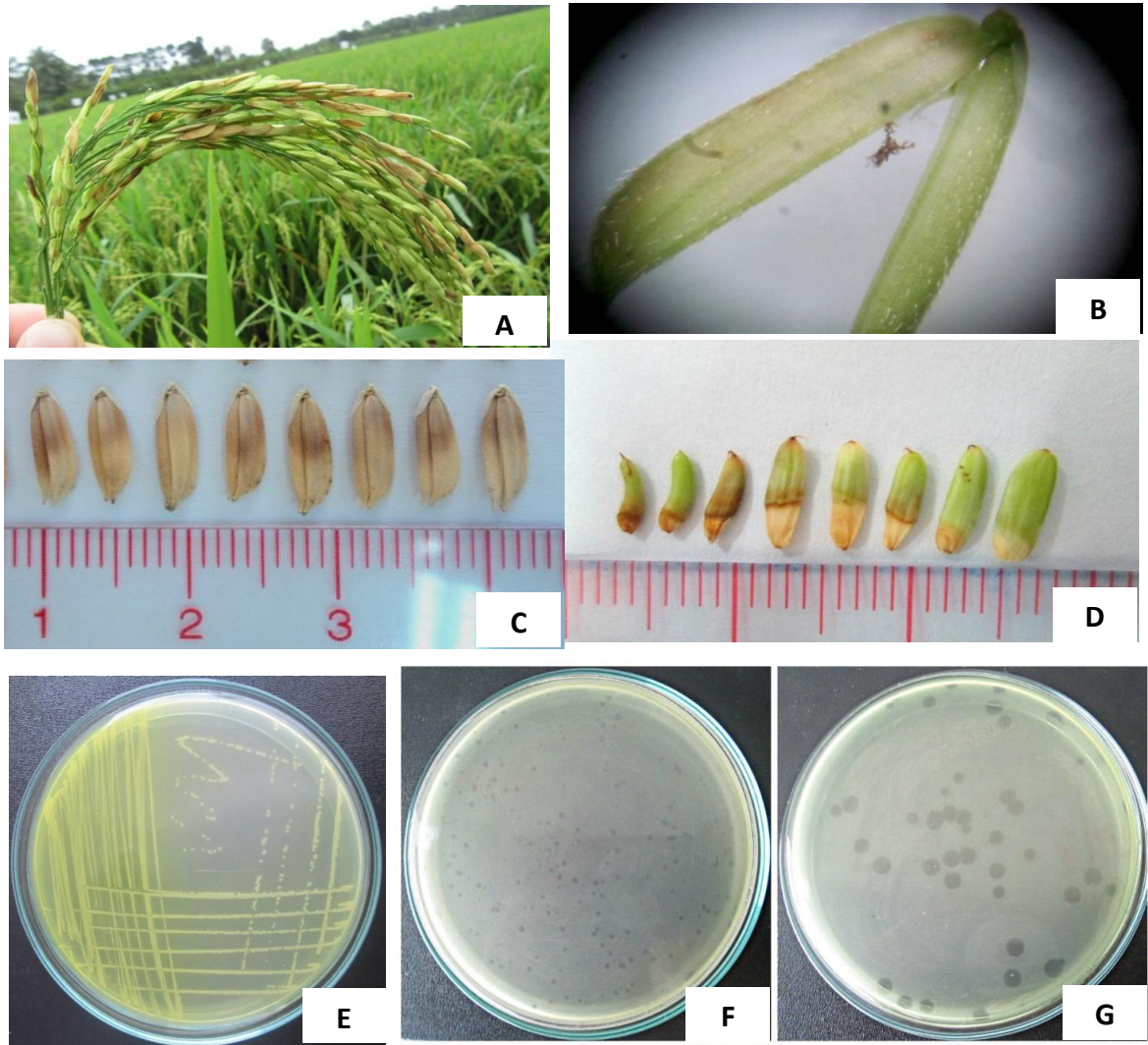
Qua thu thập được các mẫu hạt lúa bị bệnh thối hạt thuộc 9 tỉnh ĐBSCL gồm Đồng Tháp, Vĩnh Long, Cần Thơ, Trà Vinh, An Giang, Hậu Giang, Kiên Giang, Sóc Trăng, và Bạc Liêu, đã ghi nhận bệnh thối hạt lúa biểu hiện triệu chứng rõ rệt trên nhiều giống lúa khác nhau như OM 4900, OM 4218, OM 5451, IR 50404 và một số giống chưa xác định. Trong quá trình thu mẫu bệnh ngoài đồng chủ yếu thu lúa bệnh vào giai đoạn trổ đến giai đoạn trước thu hoạch với nhiều triệu chứng khác nhau trên hạt lúa: (1) hạt lúa bị lép hoàn toàn hay bạc bông có thể do vi khuẩn xâm nhiễm vào giai đoạn bông lúa vừa trổ đều (Hình 4.1 B); (2) hạt lúa bị thối phân phi nhũ có thể do vi khuẩn tấn công hạt lúa vào giai đoạn ngâm sữa (Hình 4.1 C-D). Kết quả về sự xuất hiện và biểu hiện triệu chứng thối hạt hay bạc bông rất phù hợp với Li *et al.*, (2017) đã thực hiện một thí nghiệm nghiên cứu suốt quá trình xâm nhiễm của vi khuẩn *B. glumae* vào giai đoạn lúa trổ. Kết quả vi khuẩn định vị nhiều ở mày lúa (glume), vi khuẩn nhân mật số cao khoảng 10^8 cfu/g và lan rộng ra các bộ phận của bông lúa như phấn hoa (stamen) và nhụy (gynoecium). Chính vì vậy ngăn cản quá trình thụ phấn làm cho hạt lúa lép hoàn toàn hoặc sự thụ phấn không diễn ra hoàn chỉnh ảnh hưởng đến sự hình thành hạt gạo gây ra hạt phát triển không bình thường như teo hạt, lép lửng (Hình 1D).

Kết quả Bảng 4.1 đã phân lập được 60 dòng vi khuẩn trên môi trường King s'B agar 2%. Khuẩn lạc từ các dòng vi khuẩn gây bệnh thối hạt phân lập được có đặc điểm như sau: khuẩn lạc tròn, nhẵn, nhô màu trắng đục đến vàng xanh không phát huỳnh quang trên môi trường King's B agar 2%, một số dòng vi khuẩn có khả năng tiết sắc tố vàng xanh trên môi trường King's B agar 2% phù hợp theo miêu tả CPC (2007). Vì vậy, căn cứ vào triệu chứng gây bệnh thối hạt điển hình kết hợp với khuẩn lạc hình thành trên môi trường có thể những dòng vi khuẩn này thuộc loài *Burkholderia glumae*. Để xác định loài vi khuẩn là nguyên nhân gây bệnh thối hạt cần sử dụng một số kỹ thuật như kỹ thuật sinh học phân tử dựa vào trình tự ADN, hoặc phương pháp phage typing là một phương pháp sử dụng thực khuẩn thể nhằm phát hiện sự tồn tại

của vi khuẩn kí chủ. Trên cơ sở đó, tiếp tục phân lập TKT nhằm xác định loài và cũng làm nguồn vật liệu trong phòng trừ sinh học bệnh thối hạt lúa.

Bên cạnh đó, kết quả phân lập được 112 dòng TKT từ mẫu lúa bệnh (Bảng 4.1). Số lượng TKT được phân lập trên mẫu lúa bị bệnh rất cao (gấp đôi số lượng vi khuẩn kí chủ). Thực vậy, để phân lập TKT hiệu quả đã sử dụng phương pháp tăng sinh là một phương pháp thu được nhiều TKT hơn vì theo Balogh *et al.*, (2010) đã nhận định rằng nếu TKT không được phát hiện trong mẫu, biện pháp tăng sinh được sử dụng nhằm tăng cơ hội phân lập được TKT xuất hiện ở nồng độ vi khuẩn thấp vì TKT không thể hấp phụ vào tế bào vi khuẩn khi mật số của vi khuẩn thấp hơn 10^4 - 10^6 cfu/ml. Rõ ràng, kết quả của Viazis *et al.*, (2011) đã chứng minh rằng TKT kí sinh vi khuẩn *Escherichia coli* O157 chỉ được phân lập khoảng 27% trong tổng số mẫu bằng phương pháp phân lập trực tiếp. Ngược lại, số lượng TKT được phân lập tăng lên bằng phương pháp tăng sinh khoảng 65% đến 95% trong tổng số mẫu phân lập. Tương tự, trong kết quả này cũng thấy rằng dễ dàng phân lập được TKT bằng phương pháp tăng sinh. Ngoài ra, trên một mẫu lúa bệnh có thể tồn tại trên 2 dòng TKT dựa theo đốm tan hình thành trên vi khuẩn kí chủ. Hơn nữa, một số mẫu lúa không phân lập được vi khuẩn gây bệnh chỉ phân lập TKT, do vậy TKT phân lập được nhiều so với vi khuẩn kí chủ. Kết quả này chứng minh rằng TKT vẫn tồn tại ngoài tự nhiên khi vắng mặt kí chủ hoặc mật số vi khuẩn kí chủ thấp.

Tóm lại, kết quả đã phân lập được 112 dòng TKT và 60 dòng vi khuẩn gây bệnh thối hạt lúa trên nhiều giống lúa khác nhau tại đồng bằng sông Cửu Long là nguồn nguyên liệu khởi đầu cho các thí nghiệm phòng trừ sinh học.



Hình 4.1: Triệu chứng bệnh thối hạt và đặc điểm thực khuẩn thể: (A) triệu chứng bệnh thối hạt ở điều kiện ngoài đồng vào giai đoạn lúa ngâm sữa; (B) triệu chứng bệnh thối hạt vào giai đoạn lúa thụ phấn; (C) triệu chứng vỏ hạt bị bệnh thối hạt vào giai đoạn lúa chín; (D) triệu chứng hạt gạo bị bệnh thối hạt; (E) hình thái khuẩn lạc vi khuẩn *Burkholderia glumae* trên môi trường King's B 2% agar; (F) hình thái đốm thực khuẩn đại diện nhóm TKT có đường kính plaque ~ 1-2 mm; (G) hình thái đốm thực khuẩn đại diện nhóm TKT có đường kính plaque > 2 mm

Bảng 4.1. Danh sách vi khuẩn gây bệnh thối hạt và thực khuẩn thể được phân lập ở một số tỉnh ĐBSCL

STT	Địa điểm thu mẫu	Số dòng vi khuẩn	Số dòng TKT	Giống lúa
1	Vĩnh Khánh – Thoại Sơn – An Giang	7	13	OM4218
2	Huyện Hồng Dân – Bạc Liêu	4	8	OM 4900
3	Trường Thạnh – Thới Lai – Cần Thơ	2	4	OM5451
4	Thới Thạnh – Thới Lai – Cần Thơ	2	3	OM4218
5	Long Hưng – Ô Môn – Cần Thơ	3	8	IR50404
6	Phước Thới – Ô Môn – Cần Thơ	3	6	IR50404
7	Lai Vung – Đồng Tháp	7	10	IR50404
8	Tân Bình – Phụng Hiệp – Hậu Giang	7	12	OM5451
9	Thạnh Hưng – Giồng Riềng – Kiên Giang	4	7	-
10	Phước Thạnh – Giồng Riềng – Kiên Giang	3	5	-
11	Ngọc Trúc – Giồng Riềng – Kiên Giang	2	5	-
12	Thới An – Trần Đề – Sóc Trăng	1	3	OM4900
13	Liêu Tú – Trần Đề – Sóc Trăng	2	4	OM4900
14	Trung Bình – Trần Đề – Sóc Trăng	3	6	OM4900
15	Tân Sơn – Trà Cú – Trà Vinh	3	5	IR50404
16	Thông Hòa – Cầu Kè – Trà Vinh	1	3	-
17	TT Cầu Kè – Trà Vinh	1	3	-
18	Mang Thít – Vĩnh Long	2	3	OM5451
20	Long Hồ – Vĩnh Long	3	6	OM5451
Tổng cộng		60	112	

Ghi chú: (-): chưa biết

4.1.2 Kết quả khả năng kí sinh của thực khuẩn thể đối với các dòng vi khuẩn *Burkholderia glumae* phân lập ở một số tỉnh ĐBSCL

Kết quả Bảng 4.2 đã cho thấy khả năng kí sinh của 112 dòng TKT trên 60 dòng vi khuẩn gây bệnh thối hạt lúa có sự biến động lớn của các dòng TKT từ 3 đến 50. Đặc biệt có 8 dòng TKT có khả năng kí sinh nhiều dòng vi khuẩn gây bệnh thối hạt lúa (>44 dòng vi khuẩn, chiếm tỷ lệ 75%) gồm ΦBurTV25a, ΦBurDT47b, ΦBurDT46, ΦBurDT47a, ΦBurDT48a, ΦBurDT48b, ΦBurVL34, ΦBurVL39 với số dòng vi khuẩn bị kí sinh lần lượt là 48, 46, 45, 50, 49, 49, 45, 47, 50. Đáng chú ý là hai dòng TKT có số ký chủ cao nhất là ΦBurDT47a và ΦBurAG58 có cùng số lượng ký chủ là 50 (chiếm tỷ lệ 83,33%).

Song song đó, Bảng 4.3 cũng cho thấy rằng mức độ bị kí sinh của 60 dòng vi khuẩn gây bệnh thối hạt bởi 112 dòng TKT thay đổi từ 5 - 86. Đặc biệt, dòng vi khuẩn BurKG52 bị TKT kí sinh nhiều nhất trong tổng số 60 vi khuẩn khảo sát với số lượng dòng TKT kí sinh là 86 (chiếm tỷ lệ là 76,78%). Ngược lại, dòng vi khuẩn BurBL41 chỉ có 5 dòng TKT kí sinh (chiếm tỷ lệ 4,46%).

Qua kết quả trên đã nhận thấy rằng một số dòng TKT có khả năng kí sinh khá rộng, nhưng một số dòng TKT khác kí sinh hẹp hơn. Theo Dũng (2007), khả năng kí sinh của TKT phụ thuộc vào đặc điểm như cấu trúc của từng dòng TKT, dòng vi khuẩn kí chủ ví dụ các thụ thể trên bề mặt tế bào vi khuẩn kí chủ khác nhau sẽ miễn cảm với sự kí sinh của TKT khác nhau. Kết quả này cũng phù hợp với Rahmani *et al.* (2015), ông kiểm tra các TKT được phân lập từ mẫu bệnh do vi khuẩn *E. coli* gây ra. Mỗi loài *E. coli* có những dòng TKT đặc thù của chính nó dựa vào đặc điểm đặc thù về cấu tạo của từng loài vi khuẩn quy định đặc điểm, miễn cảm của chúng đối với TKT. Từ đó, ông cho rằng phạm vi ký chủ TKT thường hẹp do hầu hết TKT chỉ tấn công một loài và thậm chí một số dòng trong một loài. Khả năng kí sinh hẹp của TKT là một điều bất lợi trong liệu pháp TKT. Chính vì vậy, việc áp dụng phối hợp nhiều dòng TKT để tăng hiệu quả kí sinh các dòng vi khuẩn khác nhau thường được đề xuất trong nghiên cứu liệu pháp TKT trong phòng trị bệnh do tác nhân vi khuẩn (Jones *et al.*, 2007). Ngoài ra để hạn chế sự kháng vi khuẩn thì sử dụng HH TKT được biết đến là một phương pháp hạn chế sự kháng ấy. Một số chi vi khuẩn đột biến làm giảm tính độc của TKT được ghi nhận như: *Ralstonia solanacearum*, *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* và *Pantoea stewartii* (Hendrick & Squeriia, 1984; Randhawa & Coverolo, 1986; Thomas, 1935; trích dẫn bởi Reddy, 2012).

Từ kết quả trên, 6 dòng vi khuẩn (BurVL21, BurDT46, BurDT50, BurDT51, BurKG52, BurKG57) bị các dòng TKT kí sinh cao được chọn để nghiên cứu xác định chính xác loài gây bệnh tại đồng bằng sông Cửu Long bằng kỹ thuật sinh học phân tử. Bên cạnh đó, 8 dòng TKT gồm ΦBurTV25a, ΦBurDT46, ΦBurDT47a, ΦBurDT47b, ΦBurDT48a, ΦBurVL34, ΦBurVL39, ΦBurAG58 cũng được chọn dựa trên khả năng kí sinh vi khuẩn gây bệnh thối hạt rộng làm nguồn vật liệu cho các nghiên cứu sau.

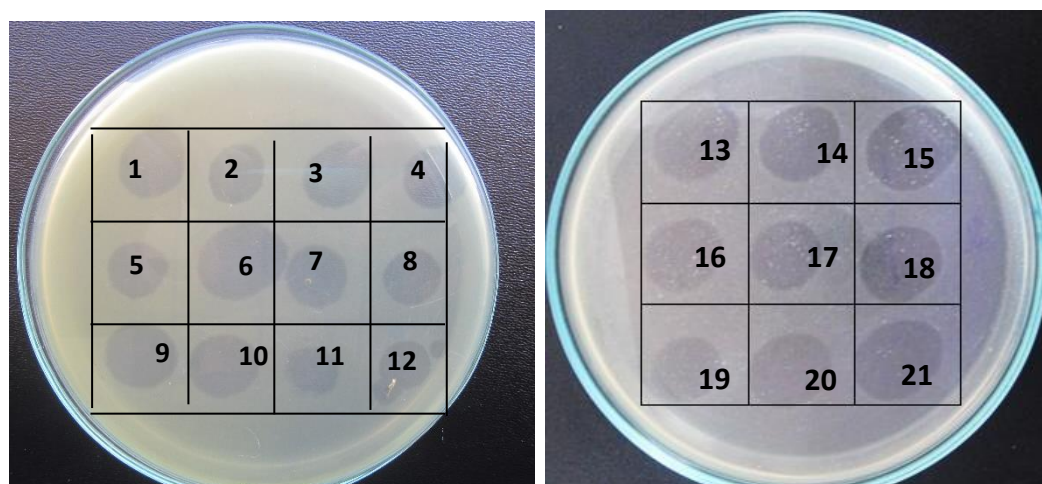
Bảng 4.2 Khả năng ký sinh của 112 dòng TKT đối với 60 dòng vi khuẩn phân lập ở một số tỉnh ĐBSCL

Phổ kí chủ	TKT	Tổng vi khuẩn bị kí sinh	TKT	Tổng vi khuẩn bị kí sinh	TKT	Tổng vi khuẩn bị kí sinh	TKT	Tổng vi khuẩn bị kí sinh
Phổ kí chủ <10	ΦBurCT1b	4	ΦBurAG13b	7	ΦBurKG59	3	ΦBurAG11a	6
	ΦBurTV26b	4	ΦBurAG12b	7	ΦBurVL19	4	ΦBurCT1a	6
	ΦBurTV27b	4	ΦBurCT10b	8	ΦBurHG28a	4	ΦBurAG12a	7
	ΦBurAG15b	4	ΦBurHG30b	8	ΦBurAG13a	5	ΦBurCT10a	8
	ΦBurHG34	5	ΦBurDT45b	9	ΦBurTV27a	5	ΦBurAG14a	8
	ΦBurHG28b	5	ΦBurKG54b	9	ΦBurKG57	5	ΦBurKG58	9
	ΦBurAG11b	5	ΦBurVL18b	9	ΦBurAG15a	6		
	ΦBurAG14b	6			ΦBurTV26a	6		
10 < Phổ kí chủ <24	ΦBurHG31b	10	ΦBurKG51b	18	ΦBurCT3a	10	ΦBurKG54a	13
	ΦBurST37 b	10	ΦBurCT2b	19	ΦBurKG60	10	ΦBurCT9	14
	ΦBurKG53b	11	ΦBurST40b	20	ΦBurST39	11	ΦBurKG53a	15
	ΦBurCT9 b	11	ΦBurVL21b	21	ΦBurST37	11	ΦBurKG56a	17
	ΦBurCT8b	14	ΦBurDT50b	23	ΦBurHG33	11	ΦBurCT8a	18
	ΦBurVL20b	14			ΦBurVL18a	12	ΦBurST38a	18

	ΦBurCT3b	15			ΦBurDT45a	12	ΦBurBL44a	21
	ΦBurKG56b	16			ΦBurHG31a	12	ΦBurCT6a	21
	ΦBurKG55b	16			ΦBurTV24a	13	ΦBurKG55a	23
	ΦBurTV24b	17			ΦBurHG30a	13		
	ΦBurAG16b	25	ΦBurBL44b	34	ΦBurVL20a	25	ΦBurBL42a	32
	ΦBurVL22b	27	ΦBurTV25b	35	ΦBurKG51a	25	ΦBurVL22a	33
	ΦBurST35b	27	ΦBurST36b	36	ΦBurAG16a	26	ΦBurDT50a	33
	ΦBurAG17b	28	ΦBurCT6b	38	ΦBurVL21a	26	ΦBurCT7a	35
25 < Phổ kí chủ < 44	ΦBurDT49b	28	ΦBurCT5b	38	ΦBurCT2a	26	ΦBurDT49a	35
	ΦBurHG29b	29	ΦBurST38b	39	ΦBurBL43a	27	ΦBurHG32a	35
	ΦBurBL42b	30	ΦBurCT4b	41	ΦBurST40a	27	ΦBurST36a	35
	ΦBurBL43b	30	ΦBurCT7b	42	ΦBurHG29a	28	ΦBurAG17a	37
	ΦBurKG52b	31	ΦBurDT48b	43	ΦBurCT5a	28	ΦBurBL41a	38
	ΦBurBL41b	32			ΦBurST35a	28	ΦBurKG52a	43
	ΦBurHG32b	33			ΦBurCT4a	31		
	ΦBurDT47b	46			ΦBurDT46	45	ΦBurDT48a	49
Phổ kí chủ > 44					ΦBurVL34	45	ΦBurAG58	50
					ΦBurVL39	47	ΦBurDT47a	50
					ΦBurTV25a	48		

Bảng 4.3. Số lượng thực khuẩn thể kí sinh các dòng vi khuẩn gây bệnh thối hạt

STT	Chủng VK	Số TKT ký sinh	STT	Chủng VK	Số TKT ký sinh	STT	Chủng VK	Số TKT ký sinh
1	BurBL41	5	21	BurAG11	36	41	BurDT47	48
2	BurHG32	9	22	BurST40	36	42	BurST38	49
3	BurCT8	9	23	BurBL43	36	43	BurTV23	49
4	BurTV25	10	24	BurST35	37	44	BurKG60	49
5	BurBL44	18	25	BurKG59	38	45	BurVL18	51
6	BurCT6	20	26	BurAG15	40	46	BurHG30	54
7	BurDT49	20	27	BurST39	40	47	BurST36	54
8	BurHG34	21	28	BurAG16	42	48	BurVL22	55
9	BurCT7	24	29	BurCT4	43	49	BurKG54	57
10	BurCT10	25	30	BurAG13	43	50	BurBL42	58
11	BurAG17	25	31	BurDT48	43	51	BurDT45	58
12	BurCT3	27	32	BurHG31	44	52	BurKG53	59
13	BurCT9	27	33	BurST37	45	53	BurAG14	59
14	BurTV26	28	34	BurCT5	45	54	BurHG33	61
15	BurKG56	28	35	BurAG12	45	55	BurDT46	62
16	BurKG58	30	36	BurVL19	45	56	BurDT50	62
17	BurCT2	32	37	BurVL20	45	57	BurVL21	62
18	BurKG55	33	38	BurTV24	46	58	BurDT51	64
19	BurCT1	35	39	BurHG28	46	59	BurKG57	69
20	BurTV27	35	40	BurHG29	48	60	BurKG52	86



Hình 4.2: Khả năng kí sinh của một số dòng thực khuẩn thể trên vi khuẩn BurKG52 vào thời điểm 24 giờ sau khi cấy: (1) ΦBurTV25a, (2) ΦBurDT46, (3) ΦBurDT47a, (4) ΦBurDT47b, (5) ΦBurDT48a, (6) ΦBurVL34, (7) ΦBurVL39, (8) ΦBurAG58, (9) ΦBurHG33, (10) Φ BurHG34, (11) Φ BurST35a, (12) ΦBurST35b, (13) ΦBurST36a, (14) ΦBurST36b, (15) ΦBurST37, (16) ΦBurST38a, (17) Φ BurST38b, (18) ΦBurBL43b, (19) ΦBurBL44b, (20) ΦBurDT49b, (21) ΦBurKG52b

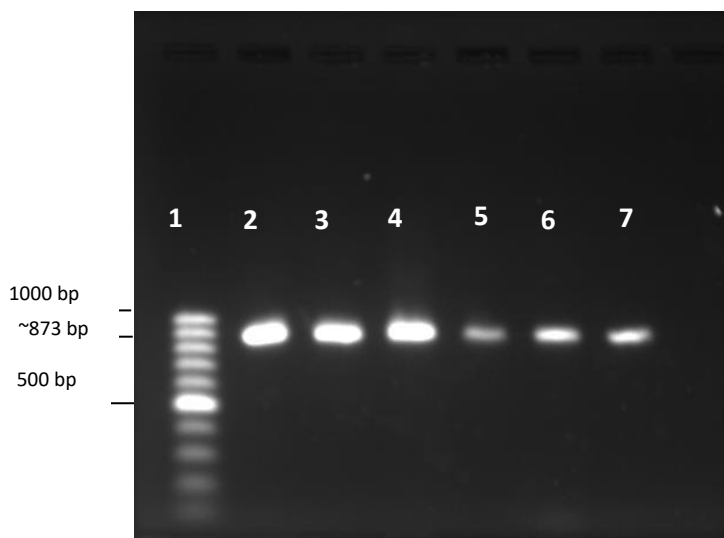
4.1.3 Kết quả xác định vi khuẩn gây bệnh thối hạt lúa bằng kỹ thuật sinh học phân tử

Kết quả định danh vi khuẩn gây bệnh thối hạt dựa vào kỹ thuật PCR khi sử dụng cặp mồi đặc hiệu 1416S/1414A cho vi khuẩn *Burkholderia glumae* ghi nhận được sản phẩm khuếch đại của 6 dòng vi khuẩn BurVL21, BurDT46, BurDT50, BurDT51, BurKG52, BurKG57 với kích thước khoảng 873 bp (Hình 4.3). Theo Schaad *et al.*, (2001), dòng vi khuẩn chứa ADN được khuếch đại bằng cặp mồi đặc hiệu 1416S/1414A cho sản phẩm PCR khoảng 873 bp là dòng vi khuẩn *Burkholderia glumae*.

Như vậy qua kết quả nghiên cứu này, 6 chủng vi khuẩn phân lập từ mẫu bệnh thối hạt lúa tại các tỉnh ĐBSCL và có tính miễn cảm với các dòng TKT được phân lập là vi khuẩn *Burkholderia glumae*.

Theo công bố trong các nghiên cứu của Jeong *et al.*, (2003); Nandakumar *et al.*, (2005); Sayler *et al.*, (2006); Cho *et al.*, (2007); Ham *et al.*, (2011); Adachi *et al.*, (2012); Riera- Ruiz *et al.*, (2014a); Riera- Ruiz *et al.*, (2014b) đã ghi nhận bệnh thối hạt, bạc bông, thối cây con trên lúa do hai tác nhân là vi khuẩn *B. glumae* và *B. gladioli* với mức độ xuất hiện khác nhau tại nhiều quốc gia trên thế giới. Cụ thể một nghiên cứu của Nandakumar *et al.*, (2005) đã phân lập vi khuẩn gây thối bẹ hay thối hạt tại các vùng trồng lúa của Louisiana, Mississippi, Arkansas, và Texas của Nam Mỹ, kết quả đã ghi nhận 75% là vi khuẩn *B. glumae* và 5% là vi khuẩn *B. gladioli* trong 292 mẫu lúa bệnh với triệu chứng bệnh rất giống nhau cũng như sự phát sinh và phát triển cũng tương đồng nên rất khó phân biệt, vì vậy để phân biệt chỉ dựa vào đoạn mồi đặc hiệu cho từng loài vi khuẩn. Tương tự tại quốc gia Ecuador, một nghiên cứu của Riera-Ruiz *et al.*, (2014a) đã xác định tác nhân gây bệnh thối hạt hay bạc bông do vi khuẩn *B. glumae* tại vùng Palestina. Cũng vào năm 2014, Riera-Ruiz *et al.*, (2014b) cũng đã công bố tác nhân gây bệnh thối hạt hay bạc bông do vi khuẩn *B. gladioli* tại vùng Coastal. Trong hai nghiên cứu của Riera-Ruiz *et al.* (2014a, 2014b) đã xác định bệnh bạc bông hay thối hạt trên hai vùng khác nhau là một trong hai tác nhân gồm vi khuẩn *B. glumae* hoặc *B. gladioli*. Do đó, bệnh thối hạt hay bạc bông trên lúa nguyên nhân chính gồm *B. glumae* hoặc *B. gladioli*, hay cả hai loại vi khuẩn tùy thuộc vào khả năng gây hại trên giống lúa OM 4900 trong điều kiện nhà lưới nhằm chọn ra dòng vi khuẩn có khả năng gây hại cao để sử dụng trong nghiên cứu tuyển chọn các dòng thực khuẩn thể trong phòng trừ bệnh.

Từ kết quả này, 6 dòng vi khuẩn *B. glumae* gồm BurVL21, BurDT46, BurDT50, BurDT51, BurKG52, BurKG57 đã được định danh tiếp tục so sánh khả năng gây hại trên giống lúa OM 4900 trong điều kiện nhà lưới nhằm chọn ra dòng vi khuẩn có khả năng gây hại cao để sử dụng trong nghiên cứu tuyển chọn các dòng thực khuẩn thể trong phòng trừ bệnh.



Hình 4.3: Sản phẩm PCR khuếch đại bằng cặp mồi đặc hiệu 1414S và 1416A:

Giếng 1: Ladder 100 bp (Thermo scientific); Giếng 2: BurVL21, Giếng 3: BurDT46, Giếng 4: BurDT50, Giếng 5: BurDT51, Giếng 6: BurKG52, Giếng 7: BurKG57

4.1.4 Kết quả khả năng gây hại của các dòng vi khuẩn *Burkholderia glumae* gây bệnh thối hạt trong điều kiện nhà lưới

Khả năng gây hại của 6 dòng vi khuẩn *B. glumae* gồm BurVL21, BurDT46, BurDT50, BurDT51, BurKG52 và BurKG57 được thể hiện qua tỷ lệ hạt bệnh (Bảng 4.4), và thành phần năng suất (Bảng 4.5)

4.1.4.1 Tỷ lệ hạt bệnh

Kết quả Bảng 4.4 cho thấy qua 3 thời điểm khảo sát gồm 5 NSKLB, 15 NSKLB và 25 NSKLB cả 6 nghiệm thức được xử lý các dòng vi khuẩn BurVL21, BurDT46, BurDT50, BurDT51, BurKG52 và BurKG57 có tỷ lệ hạt bị bệnh khác biệt ý nghĩa. Đặc biệt dòng vi khuẩn BurDT46 có tỷ lệ hạt bệnh cao hơn và khác biệt với các dòng vi khuẩn còn lại. Các thời điểm được ghi nhận cụ thể như sau:

Tại các thời điểm 5 NSKLB, 15 NSKLB, 25 NSKLB, bệnh bắt đầu xuất hiện triệu chứng điển hình từ cuống hạt bị thối tại thời điểm 5 NSKLB. Tất cả các thời điểm ghi nhận với tỷ lệ hạt bệnh từ 1,82% đến 77,64%. Trong đó, nghiệm thức BurDT46 có tỷ lệ hạt bệnh lần lượt là 43,84%, 70,07%, 77,64% cao hơn và khác biệt với nghiệm thức BurVL21, BurDT50, BurDT51, BurKG52, BurKG57. Kế đến là nghiệm thức BurKG52 với tỷ lệ hạt bệnh lần lượt là 29,73%, 49,83%, 55,34% cao hơn và khác biệt với nghiệm thức BurDT51, BurVL21, BurKG57, BurDT50. Tiếp theo là nghiệm thức BurDT51 với tỷ lệ hạt bệnh lần lượt là 17,65%, 32,55%, 35,34% cao hơn và khác biệt nghiệm thức BurVL21, BurKG57, BurDT50. Tiếp theo hai nghiệm thức BurVL21 và BurKG57 có tỷ lệ hạt bệnh cao hơn và khác biệt với nghiệm thức BurDT50.

Bên cạnh đó, AUDPC là chỉ số tích lũy bệnh theo thời gian (Bảng 4.4) cho thấy nghiệm thức BurDT46 có chỉ số AUDPC cao nhất đạt 1308,44 và khác biệt ý nghĩa so

với các nghiệm thức BurVL21 (249,63), BurDT51 (590,49), BurKG52 (923,70), BurKG57 (296,50) và BurDT50 có chỉ số AUDPC thấp nhất là 64,89.

Bảng 4.4 Tỷ lệ hạt bệnh trên bông được xử lý với sáu dòng vi khuẩn *B. glumae*

Nghiệm thức	Tỷ lệ hạt bệnh trên bông (%)			AUDPC
	5 NSKLB	15 NSKLB	25 NSKLB	
BurVL21	5,01 ^d	12,97 ^d	18,96 ^d	249,63 ^d
BurDT46	43,84 ^a	70,07 ^a	77,64 ^a	1308,44 ^a
BurDT50	1,82 ^e	3,52 ^e	4,11 ^e	64,89 ^e
BurDT51	17,65 ^c	32,55 ^c	35,34 ^c	590,49 ^c
BurKG52	29,73 ^b	49,83 ^b	55,34 ^b	923,70 ^b
BurKG57	7,30 ^d	15,50 ^d	21,01 ^d	296,50 ^d
Mức ý nghĩa	*	*	*	*
CV (%)	25,85	12,45	11,00	19,96

Ghi chú: Số liệu được chuyển sang \sqrt{x} (5NSKLB) hoặc $\arcsin \sqrt{x \pm \frac{1}{4n}}$ (15NSKLB, 25 NSKLB) trước khi xử lý thống kê. Trong cùng một cột những số có cùng chữ cái theo sau giống nhau thì không khác biệt ở mức ý nghĩa 5% trong phép thử Duncan* khác biệt ở mức ý nghĩa 5%

Tóm lại, kết quả về tỷ lệ hạt bệnh (Bảng 4.4), tất cả 6 dòng vi khuẩn đều có khả năng gây bệnh với mức độ gây hại khác nhau. Trong đó, nghiệm thức BurDT46 có tỷ lệ hạt bị nhiễm bệnh, chỉ số AUDPC cao nhất và ổn định so với các dòng vi khuẩn còn lại qua các thời điểm khảo sát.



Hình 4.4: Mức độ nhiễm bệnh thối hạt của sáu dòng vi khuẩn *B. glumae* tại thời điểm 10 NSKLB

4.1.4.2 Ảnh hưởng của sáu dòng vi khuẩn *Burkholderia glumae* đến chỉ tiêu năng suất lúa

Kết quả Bảng 4.5 đã ghi nhận thành phần năng suất khác biệt ý nghĩa giữa các nghiệm thức khi xử lý với sáu dòng vi khuẩn khác nhau ở mức ý nghĩa 5%.

Về chỉ tiêu số hạt chắc/bông giữa các nghiệm thức có sự khác biệt với nhau ở mức ý nghĩa 5%. Trong đó, nghiệm thức BurDT50 có số hạt chắc/bông 127,60 cao hơn và khác biệt so với các nghiệm thức BurVL21, BurDT51, BurKG52, BurKG7 có số hạt chắc /bông lần lượt là 85,18; 72,55; 70,72; 85,08 và nghiệm thức BurDT46 có số hạt chắc/bông thấp nhất 58,02.

Về chỉ tiêu tỷ lệ hạt chắc (%), các nghiệm thức vẫn có sự khác biệt ý nghĩa với nhau. Nghiệm thức BurDT50 có tỷ lệ hạt chắc cao nhất 88,01% và khác biệt so với các nghiệm thức còn lại. Kế đến là hai nghiệm thức BurVL21 và BurKG57 có tỷ lệ hạt chắc không khác biệt lần lượt là 75,54% và 73,45%. Cuối cùng nghiệm thức BurDT46 có tỷ lệ hạt chắc thấp nhất 39,53% và khác biệt so với các nghiệm thức còn lại.

Về chỉ tiêu trọng lượng 1000 hạt không có sự khác biệt giữa các nghiệm thức. Theo Đệ (2008) cho rằng trọng lượng 1000 hạt do đặc tính di truyền của giống quyết định, còn môi trường chỉ ảnh hưởng một phần. Do đó, trọng lượng 1000 hạt không có sự khác biệt.

Về chỉ tiêu trọng lượng thực tế, các nghiệm thức có sự khác biệt nhau dao động từ 18,47 (g/chậu) đến 34,51 (g/chậu). Trong đó, nghiệm thức BurDT46 có trọng lượng thấp nhất (18,47 g/chậu) và khác biệt so với các nghiệm thức còn lại. Kế đến là nghiệm thức BurKG52 có trọng lượng 24,16 (g/chậu) khác biệt so với BurVL21 và BurDT50, nhưng không khác biệt với hai nghiệm thức BurDT51 và BurK57 có năng suất thực tế lần lượt là 27,28 và 27,83 (g/chậu).

Bảng 4.5 Ảnh hưởng của sáu dòng vi khuẩn *B. glumae* đến chỉ tiêu năng suất lúa

Nghiệm thức	Chỉ tiêu năng suất			
	Số hạt chắc/bông	Tỷ lệ hạt chắc (%)	Trọng lượng 1000 hạt (g)	Trọng lượng thực tế (g/chậu)
BurVL21	85,18 ^b	75,54 ^b	25,93	29,11 ^b
BurDT46	58,02 ^d	39,53 ^e	23,30	18,47 ^d
BurDT50	127,60 ^a	88,01 ^a	24,94	34,51 ^a
BurDT51	72,55 ^c	64,22 ^c	24,85	27,28 ^{bc}
BurKG52	70,72 ^c	54,64 ^d	23,97	24,16 ^c
BurKG57	85,08 ^b	73,45 ^b	25,77	27,83 ^{bc}
Mức ý nghĩa	*	*	ns	*
CV (%)	10,08	3,11	7,76	12,60

Ghi chú: Số liệu tỷ lệ hạt chắc được chuyển sang $\arcsin \sqrt{x \pm \frac{1}{4n}}$ trước khi xử lý thống kê. Trong cùng một cột những số có cùng chữ cái theo sau giống nhau thì không khác biệt ở mức ý nghĩa 5% trong phép thử Duncan* khác biệt ở mức ý nghĩa 5%. ns khác biệt không ý nghĩa.

Từ kết quả tỷ lệ hạt bệnh sẽ thể hiện ảnh hưởng qua thành phần năng suất (Bảng 4.5) của sáu dòng vi khuẩn *B. glumae* về số hạt chắc/bông, tỷ lệ hạt chắc và năng suất thực tế. Trong đó, nghiệm thức BurDT46 có các chỉ tiêu về năng suất thấp nhất, ngược lại nghiệm thức BurDT50 có các chỉ tiêu thành phần năng suất cao hơn các nghiệm thức còn lại. Kết quả này cũng khẳng định rằng nếu vi khuẩn xâm nhiễm vào bông lúa trong giai đoạn trổ đều ảnh hưởng đến năng suất đáng kể phù hợp với Trung *et al.*, (1993) bệnh thối hạt ảnh hưởng khoảng 75% năng suất lúa tại đồng bằng sông Hồng. Từ đó nhận thấy rằng đây là một mầm bệnh quan trọng gây thiệt hại năng suất lúa đặc biệt vào điều kiện có mưa nhiều là một trong những yếu tố góp phần lây lan mầm bệnh đáng kể. Và trong kết quả khảo sát 6 dòng vi khuẩn gây bệnh thối hạt lúa đã chọn được dòng vi khuẩn BurDT46 là dòng vi khuẩn có khả năng gây hại cao nhất. Tuy nhiên khả năng gây hại của 6 dòng vi khuẩn ở mức độ nặng hay nhẹ khác nhau có thể tùy theo khả năng sở hữu các gen qui định độc tố gây hại trên cây lúa như toxoflavin, lipase, khả năng di chuyển của vi khuẩn, hệ thống cảm ứng III, exopolysaccharide, đồng thời nồng độ các độc tố khác nhau trên từng dòng vi khuẩn cũng gây bệnh ở mức độ khác nhau. Ngoài yếu tố gây độc thì tính nhạy cảm của cây ký chủ, nhiệt độ, ẩm độ trên bông lúa cũng cần thiết cho quá trình xâm nhiễm (Tsushima *et al.*, 1996). Đặc biệt, đối với vi khuẩn *B. glumae* độc tố thực vật có màu vàng bao gồm toxoflavin và fervenulin là yếu tố quan trọng nhất trong quá trình gây hại (Zhou-qi *et al.*, 2016). Theo kết quả quan sát trong quá trình nuôi cấy vi khuẩn trên môi trường King's B 2% agar cho thấy cả 6 dòng vi khuẩn *B. glumae* đều tạo sắc tố màu vàng với mức độ ít nhiều khác nhau (Hình 4.5) có liên hệ với khả năng gây hại trên hạt lúa. Cụ thể dòng vi khuẩn BurDT46 tạo sắc tố vàng nhiều hơn 5 dòng vi khuẩn còn lại và dòng vi khuẩn

này cũng cho tỷ lệ hạt bệnh cao hơn các dòng còn lại, ngược lại dòng vi khuẩn BurDT50 cho sắc tố màu vàng không nhiều cũng tương đồng cho tỷ lệ hạt bệnh ít hơn các dòng vi khuẩn còn lại. Điều này phù hợp với miêu tả của Yuan (2004); Ham *et al.* (2011); và Zhou-qi *et al.* (2016) thấy rằng độc tố thực vật có màu vàng bao gồm toxoflavin và ferverulin do vi khuẩn *B. glumae* tiết ra là yếu tố quan trọng nhất trong quá trình gây hại của vi khuẩn (Zhou-qi *et al.*, 2016). Độc tố này là nguyên nhân gây ra triệu chứng thối hạt (Iiyama *et al.*, 1995). Tương tự nghiên cứu của Nandakumar *et al.* (2009) cũng đã khảo sát khả năng gây hại của các dòng vi khuẩn *B. glumae* trên lúa. Trong 364 dòng vi khuẩn được khảo sát khả năng gây hại thì có đến 292 dòng vi khuẩn có khả năng gây hại vào giai đoạn cây con và trở đều. Có 80% trong tổng số 292 dòng vi khuẩn gây ra triệu chứng điển hình của bệnh thối hạt, 72 dòng vi khuẩn có độc lực cao gây các triệu chứng điển hình trên bông và cây con, 93 dòng vi khuẩn gây ra triệu chứng điển hình trên bông. Các dòng vi khuẩn *B. glumae* còn lại biểu hiện triệu chứng gây hại nhẹ chỉ trên bông hoặc cây con. Các kết quả nghiên cứu trên cũng tương đồng với thí nghiệm đánh giá khả năng gây hại của 6 dòng vi khuẩn *B. glumae*, rằng khả năng gây độc cho cây lúa tùy theo khả năng sở hữu các gen qui định độc tố của từng dòng vi khuẩn *B. glumae* gây bệnh trên lúa.



Hình 4.5: Sự hình thành sắc tố của các dòng vi khuẩn *B. glumae* trên môi trường King's 2% agar sau 48 giờ:(A) BurKG52, (B) BurDT50, (C) BurDT46, (D) BurVL21, (E) BurDT51 và (F) BurKG57

Như vậy, dòng vi khuẩn *B. glumae* DT46 có khả năng gây hại cao nhất được chọn nhằm đánh giá hiệu quả của các dòng thực khuẩn thể triển vọng trong phòng trị bệnh thối hạt lúa tiếp theo trong điều kiện phòng thí nghiệm, nhà lưới và ngoài đồng.

4.1.5 Kết quả khảo sát khả năng phân giải của các dòng thực khuẩn thể trên vi khuẩn *Burkholderia glumae* DT46 gây hại cao trong điều kiện phòng thí nghiệm

Tiếp theo so sánh khả năng phân giải vi khuẩn *B. glumae* BurDT46 của tám dòng TKT gồm ΦBurTV25a, ΦBurDT46, ΦBurDT47b, ΦBurDT48a, ΦBurVL34, ΦBurVL39 trong điều kiện phòng thí nghiệm. Nhìn chung vào thời điểm 24 giờ sau khi nuôi cấy đã xuất hiện đốm tan (plaque) trên môi trường King's B 0,8% agar chứa vi khuẩn kí chủ và có sự khác biệt giữa các dòng TKT khác nhau ở mức ý nghĩa 5% thông qua đường kính đốm tan.

Vào thời điểm 24 giờ sau khi nuôi cấy, cả 8 dòng TKT đều có khả năng phân giải vi khuẩn *B. glumae* DT46 thể hiện qua sự hình thành plaque trên đĩa. Cụ thể, dòng TKT ΦBurAG58, ΦBurDT47a và ΦBurDT48a cho đường kính phân giải tương đương nhau và cao hơn khác biệt ý nghĩa với các nghiệm thức còn lại (Bảng 4.6 và Hình 4.6).

Tương tự vào thời điểm 36 giờ, khả năng tiêu diệt vi khuẩn *B. glumae* DT46 có sự gia tăng thông qua đường kính plaque tăng. Cả ba dòng TKT ΦBurAG58, ΦBurDT47a và ΦBurDT48a với đường kính plaque lần lượt là 5,0 mm, 5,0 mm và 5,0 mm vẫn duy trì khả năng phân giải vi khuẩn *B. glumae* DT46 cao hơn và khác biệt với các dòng TKT còn lại. Kế đến là dòng TKT Φ BurVL 34 có đường kính plaque là 3,5 mm cao hơn và khác biệt so với các dòng TKT còn lại.

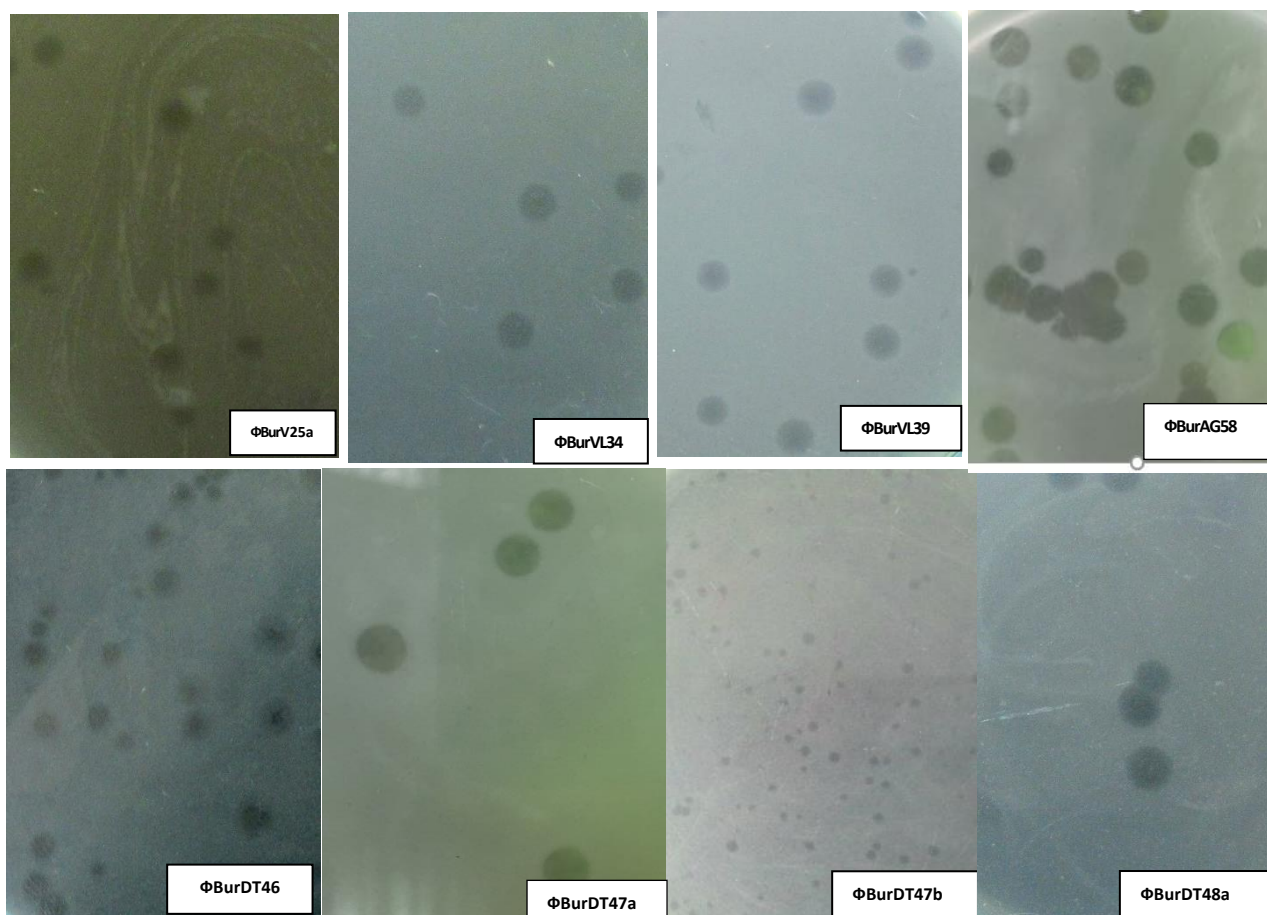
Đến thời điểm 48 giờ, khả năng phân giải của sáu dòng TKT cũng có sự khác biệt nhau. Trong đó, hai dòng TKT ΦBurDT47a và ΦBurDT48a vẫn duy trì khả năng phân giải vi khuẩn *B. glumae* DT46 cao hơn và khác biệt ý nghĩa so với các dòng TKT còn lại với đường kính phân giải lần lượt là 5,9 mm và 6,0 mm. Tiếp theo là dòng TKT ΦBurAG58 và ΦBurVL34 có đường kính phân giải lần lượt là 5,1 mm và 4,0 mm cao hơn và khác biệt với các dòng TKT ΦBurTV25a, ΦBurVL39, ΦBurDT46, ΦBurDT47b với đường kính phân giải lần lượt là 2,9 mm, 3,6 mm, 3,5 mm và 2,1 mm (Bảng 4.6).

Tóm lại, qua kết quả đánh giá khả năng phân giải của tám dòng TKT trên vi khuẩn *B. glumae* DT46 thể hiện qua đường kính đốm tan, thấy rằng ba dòng TKT **ΦBurAG58, ΦBurDT47a và ΦBurDT48a** được phân lập từ mẫu thu thập tại tỉnh An Giang và đồng Tháp có khả năng phân giải vượt trội so với các dòng TKT còn lại nên được chọn khảo sát cho các thí nghiệm khảo sát đặc điểm phân loại tiếp theo. Mặt khác nhằm tăng tính đa dạng cá dòng TKT ở vùng sinh thái khác nhau và hạn chế tính kháng của vi khuẩn đối với TKT nên dòng TKT **ΦBurVL 34** được phân lập từ Vĩnh Long cũng được chọn bổ sung để khảo sát trong các thí nghiệm tiếp theo.

Bảng 4.6 Đường kính đốm tan của 8 dòng thực khuẩn phân giải vi khuẩn *B. glumae* DT46 gây bệnh thối hạt lúa

Nghiệm thức	Đường kính đốm tan (mm)		
	24 giờ	36 giờ	48 giờ
ΦBurTV25a	2,3 ^c	2,9 ^d	2,9 ^e
ΦBurVL 34	2,9 ^b	3,5 ^b	4,0 ^c
ΦBurVL39	3,1 ^b	3,2 ^c	3,6 ^d
ΦBurAG58	3,9 ^a	5,0 ^a	5,1 ^b
ΦBurDT46	3,3 ^b	3,1 ^{cd}	3,5 ^d
ΦBurDT47a	3,8 ^a	5,0 ^a	5,9 ^a
ΦBurDT47b	1,0 ^d	2,0 ^e	2,1 ^f
ΦBurDT48a	4,0 ^a	5,0 ^a	6,0 ^a
Mức ý nghĩa	*	*	*
CV (%)	8,92	6,58	6,16

Ghi chú: 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%. NSKCB: ngày sau khi chủng bệnh*



Hình 4.6: Đường kính đốm tan của 8 dòng thực khuẩn thể trên vi khuẩn *B. glumae* DT46 vào thời điểm 24 giờ sau khi nuôi cấy

4.2 Nội dung 2: Kết quả đánh giá khả năng phòng trị bệnh thối hạt của các dòng thực khuẩn thể triển vọng trong điều kiện nhà lưới

4.2.1 Hiệu quả của thực khuẩn thể trong phòng trị bệnh thối hạt do vi khuẩn *Burkholderia glumae* DT46 trong điều kiện nhà lưới

Kết quả đánh giá hiệu quả của 4 dòng TKT (ΦBurVL34, ΦBurAG58, ΦBurDT47a, ΦBurDT48a) triển vọng đơn lẻ hoặc HH TKT phòng trừ bệnh thối hạt lúa thông qua tỷ lệ hạt bệnh (Bảng 4.7), mật số thực khuẩn thể trên bông (Bảng 4.8), hiệu quả giảm bệnh (Bảng 4.9), thành phần năng suất (Bảng 4.10).

4.2.1.1 Tỷ lệ hạt bệnh

Kết quả Bảng 4.7 cho thấy tỷ lệ hạt bệnh trên bông có sự khác nhau giữa các nghiệm thức có xử lý đơn dòng TKT hoặc HH TKT đều thấp hơn và khác biệt ý nghĩa so với nghiệm thức đối chứng ở mức ý nghĩa 5%.

Tại thời điểm 5 NSKLB, cả 5 nghiệm thức xử lý TKT đơn hoặc hỗn hợp đều có tỷ lệ hạt bệnh thấp hơn và khác biệt so với đối chứng. Đặc biệt nghiệm thức ΦBurAG58 và ΦBurDT47a có tỷ lệ hạt bệnh lần lượt là 4,22% và 4,30% thấp hơn và khác biệt các nghiệm thức ΦBurDT48a, tuy nhiên không khác biệt ý nghĩa so với nghiệm thức ΦBurVL34 (7,88%) và HH TKT (8,75%).

Đến thời điểm 10, 15 và 20 NSKLB tỷ lệ hạt bệnh của các nghiệm thức đều tăng. Tất cả các nghiệm thức xử lý đều có tỷ lệ hạt bị bệnh thấp hơn và khác biệt ý nghĩa so với nghiệm thức đối chứng, trong đó nghiệm thức ΦBurAG58 có tỷ lệ hạt bệnh thấp nhất, kể đến là 3 nghiệm thức xử lý TKT đơn ΦBurVL34, ΦBurDT47a và ΦBurDT48a. Nghiệm thức xử lý HH TKT cho hiệu quả thấp nhất.

Bên cạnh đó, chỉ số AUDPC của các nghiệm thức xử lý TKT trong khoảng 141,74 – 468,45 đều thấp hơn và khác biệt so với ĐC (723,57). Trong đó, ΦBurAG58 có chỉ số AUDPC là 141,74 thấp nhất và khác biệt so với nghiệm thức còn lại. Kể đến là các nghiệm thức ΦBurVL34, ΦBurDT47a, ΦBurDT48a có chỉ số AUDPC không khác biệt nhau lần lượt là 247,20; 243,69 và 289,36. Cuối cùng là nghiệm thức HH TKT là 468,35.

Bảng 4.7 Tỷ lệ hạt bệnh được xử lý với các dòng thực khuẩn thể đơn lẻ hoặc hỗn hợp thực khuẩn thể qua các thời điểm

Nghiệm thức	Tỷ lệ hạt bệnh trên bông (%)				AUDPC
	5 NSKLB	10 NSKLB	15 NSKLB	20 NSKLB	
ΦBurVL34	7,88 ^{bc}	11,33 ^c	18,25 ^c	28,58 ^c	247,20 ^c
ΦBurAG58	4,22 ^c	5,58 ^d	9,20 ^d	21,05 ^d	141,76 ^d
ΦBurDT47a	4,30 ^c	12,35 ^c	18,88 ^c	28,77 ^c	243,69 ^c
ΦBurDT48a	9,15 ^b	14,20 ^c	22,65 ^c	29,10 ^c	289,36 ^c
HH TKT	8,75 ^{bc}	23,25 ^b	36,88 ^b	44,03 ^b	468,35 ^b
Đối chứng	27,40 ^a	35,00 ^a	54,10 ^a	70,18 ^a	723,57 ^a
Mức ý nghĩa	*	*	*	*	*
CV (%)	28,72	11,93	14,99	3,02	17,43

Ghi chú: Số liệu được chuyển sang \sqrt{x} (5NSKLB) hoặc $\arcsin \sqrt{x \pm \frac{1}{4n}}$ (10 NSKLB, 15 NSKLB, 20 NSKLB) trước khi xử lý thống kê. Trong cùng một cột những số có cùng chữ cái theo sau giống nhau thì không khác biệt ở mức ý nghĩa 5% trong phép thử Duncan* khác biệt ở mức ý nghĩa 5%

Nhìn chung, kết quả về tỷ lệ hạt bệnh (Bảng 4.7) đã cho thấy rằng tất cả nghiệm thức xử lý TKT đều có tỷ lệ hạt bệnh và chỉ số AUDPC đều thấp hơn so với đối chứng. Trong đó, nghiệm thức xử lý dòng TKT ΦBurAG58 thể hiện hiệu quả giảm bệnh cao nhất với mức độ bệnh luôn thấp hơn so với các nghiệm thức còn lại, kể đến là 3 nghiệm thức xử lý TKT đơn còn lại và cuối cùng là nghiệm thức HH TKT.

4.2.1.2 Mật số của các dòng thực khuẩn thể trên bông và hiệu quả giảm bệnh

Kết quả khảo sát sự tồn tại của các dòng TKT trên bông lúa được thể hiện ở Bảng 4.8 qua 4 thời điểm ghi nhận (0 GSKLB, 12 GSKLB, 24 GSKLB, 7 NSKLB). Nhìn chung, các dòng TKT có sự gia tăng mật số đáng kể từ 0 giờ đến 12 giờ và mật số sau đó sẽ giảm dần theo thời gian.

Tại thời điểm 0 GSKLB, mật số TKT của các nghiệm thức không có sự khác biệt với log mật số TKT dao động từ 5,35 đến 5,55.

Đến thời điểm 12 GSKLB, log mật số TKT đều tăng so với thời điểm 0 GSKLB. Nghiệm thức ΦBurVL34, ΦBurAG58 và ΦBurDT47a có log mật số TKT (pfu/g bông) lần lượt là 7,98; 8,09 và 7,98 cao hơn và khác biệt so với nghiệm thức ΦBurDT48a (7,10) và HH TKT có mật số thấp nhất là 5,75.

Vào thời điểm 24 GSKLB, log mật số TKT bắt đầu giảm và dao động từ 4,38 đến 6,43. Nghiệm thức ΦBurVL34, ΦBurAG58 và ΦBurDT47a có log mật số TKT cao hơn và khác biệt so với nghiệm thức ΦBurDT48a (5,28) và HH TKT (4,38).

Riêng thời điểm 7 NSKLB, TKT vẫn còn tồn tại trên bông lúa và mật số TKT giảm so với thời điểm 24 GSKLB. Trong đó, nghiệm thức ΦBurAG58 có log mật số

TKT đạt 4,90 cao hơn và khác biệt so với các nghiệm thức còn lại Φ BurVL34 (3,38), Φ BurDT47a (3,20), Φ BurDT48a (3,15) và HH TKT (3,25).

Bảng 4.8 Mật số các dòng TKT trên bông ở từng thời điểm khảo sát

Nghiệm thức	Log mật số TKT (pfu/g bông)			
	0 GSKLB	12 GSKLB	24 GSKLB	7 NSKLB
Φ BurVL34	5,38	7,98 ^a	6,15 ^a	3,38 ^b
Φ BurAG58	5,35	8,09 ^a	6,43 ^a	4,90 ^a
Φ BurDT47a	5,55	7,98 ^a	6,10 ^a	3,20 ^b
Φ BurDT48a	5,45	7,10 ^b	5,28 ^b	3,15 ^b
HH TKT	5,53	5,75 ^c	4,38 ^c	3,25 ^b
Mức ý nghĩa	ns	*	*	*
CV (%)	5,77	5,23	5,53	7,46

*Ghi chú: Số liệu được chuyển sang log_x trước khi xử lý thống kê. Trong cùng một cột những số có cùng chữ cái theo sau giống nhau thì không khác biệt ở mức ý nghĩa 5% trong phép thử Duncan. * khác biệt ở mức ý nghĩa 5%*

Hiệu quả giảm bệnh: Kết quả Bảng 4.9 đã ghi nhận các dòng TKT đơn và HH TKT đều cho hiệu quả giảm bệnh tại các thời điểm 5 NSKLB, 10 NSKLB, 15 NSKLB và 20 NSKLB. Đặc biệt nghiệm thức Φ BurAG58 thể hiện hiệu quả giảm bệnh cao hơn so với các nghiệm thức còn lại.

Vào thời điểm 5 NSKLB, các nghiệm thức đều có hiệu quả giảm bệnh cao. Trong đó, nghiệm thức Φ BurAG58 và Φ BurDT47a có hiệu quả giảm bệnh lần lượt là 84,59% và 84,27% cao hơn và khác biệt so với các nghiệm thức Φ BurVL34 (71,21%), Φ BurDT47a (66,61%) và HH TKT (41,22%).

Đến thời điểm 10 NSKLB, nghiệm thức Φ BurAG58 vẫn duy trì hiệu quả giảm bệnh cao nhất (84,02%) và khác biệt so với các nghiệm thức Φ BurDT47a (64,66%), Φ BurDT48a (59,43%) và HH TKT (33,54%), tuy nhiên không khác biệt so với Φ BurVL34 có hiệu quả giảm bệnh là 67,68%.

Tương tự vào thời điểm 15 NSKLB, các nghiệm thức vẫn duy trì được hiệu quả giảm bệnh. Nghiệm thức Φ BurAG58 có hiệu quả giảm bệnh cao nhất là 83,01% và khác biệt so với Φ BurDT47a (58,10%) và HH TKT (31,85%), tuy nhiên không khác biệt so với các nghiệm thức Φ BurVL34, Φ BurDT48a có hiệu quả giảm bệnh lần lượt là 66,25 và 65,13%.

Riêng thời điểm 20 NSKLB, hiệu quả giảm bệnh của nghiệm thức Φ BurAG58 (70,01%) cao hơn và khác biệt so với các nghiệm thức còn lại.

Bảng 4.9 Hiệu quả giảm bệnh thối hạt được xử lý TKT qua các thời điểm

Nghiệm thức	Hiệu quả giảm bệnh (%)			
	5 NSKLB	10 NSKLB	15 NSKLB	20 NSKLB
ΦBurVL34	71,21 ^b	67,68 ^{ab}	66,25 ^{ab}	59,26 ^b
ΦBurAG58	84,59 ^a	84,02 ^a	83,01 ^a	70,01 ^a
ΦBurDT47a	84,27 ^a	64,66 ^b	65,13 ^{ab}	58,95 ^b
ΦBurDT48a	66,61 ^b	59,43 ^b	58,10 ^b	58,53 ^b
HH TKT	41,22 ^c	33,54 ^c	31,85 ^c	37,23 ^c
Mức ý nghĩa	*	*	*	*
CV (%)	5,45	14,22	18,84	3,15

Ghi chú: Số liệu được chuyển sang $\arcsin \sqrt{x \pm \frac{1}{4n}}$ trước khi xử lý thống kê. Trong cùng một cột những số có cùng chữ cái theo sau giống nhau thì không khác biệt ở mức ý nghĩa 5% trong phép thử Duncan. * khác biệt ở mức ý nghĩa 5%.

Nhìn chung, qua 4 thời điểm khảo sát tất cả các nghiệm thức đều cho hiệu quả giảm bệnh trên 50%. Trong đó, nghiệm thức ΦBurAG58 có hiệu quả giảm bệnh cao nhất và ổn định qua các thời điểm, tiếp theo là các nghiệm thức ΦBurVL34, ΦBurDT47a, ΦBurDT48a và HH TKT.

4.2.1.3 Ảnh hưởng của các dòng thực khuẩn thể đến chỉ tiêu năng suất

Kết quả Bảng 4.10 cho thấy các nghiệm thức xử lý TKT đều có thành phần năng suất cao hơn so với đối chứng không xử lý TKT.

Về chỉ tiêu số hạt chắc/bông, các nghiệm thức TKT đơn và HH TKT đều khác biệt ý nghĩa thống kê so với đối chứng. Trong đó, nghiệm thức ΦBurAG58 có số hạt chắc/bông là 103,90 cao nhất và khác biệt so với tất cả nghiệm thức còn lại ΦBurVL34 (87,05), ΦBurDT47a (86,43), ΦBurDT48a (85,97), HH TKT (73,63) và ĐC (60,25).

Về tỷ lệ hạt chắc, nghiệm thức ΦBurAG58 với tỷ lệ hạt chắc là 80,65% cao hơn và khác biệt so với các nghiệm thức còn lại. Kế đến là các nghiệm thức ΦBurVL34, ΦBurDT47a, ΦBurDT48a có tỷ lệ hạt chắc không khác biệt nhau lần lượt là 71,27%; 70,50% và 69,98%. Riêng nghiệm thức HH TKT có tỷ lệ hạt chắc thấp nhất trong số 5 nghiệm thức có xử lý TKT (55,74%), nhưng vẫn cao hơn và khác biệt so với đối chứng (44,31%).

Về trọng lượng 1000 hạt thấy rằng tất cả các nghiệm thức có trọng lượng 1000 hạt không khác biệt nhau. Theo Đệ (2008) cho rằng trọng lượng 1000 hạt là một trong những yếu tố góp phần vào thành phần năng suất, do hai yếu tố cấu thành là trọng lượng vỏ trấu chiếm 20% và trọng lượng hạt chiếm 80%. So với các chỉ tiêu thành

phần năng suất khác thì trọng lượng 1000 hạt ít biến động. Vì vậy, trọng lượng 1000 hạt ở các nghiệm thức có xử lý TKT và đối chứng không khác biệt ý nghĩa thống kê dao động từ 26,14 đến 26,82 g.

Về trọng lượng thực tế (g/chậu), hầu hết các nghiệm thức xử lý TKT đều có trọng lượng thực tế cao hơn và khác biệt so với đối chứng, ngoại trừ nghiệm thức HH TKT. Đặc biệt, nghiệm thức Φ BurAG58 có trọng lượng thực tế 34,66 (g/chậu) cao hơn và khác biệt so với các nghiệm thức còn lại. Kế đến là các nghiệm thức Φ BurVL34, Φ BurDT47a và Φ BurDT48a có trọng lượng thực tế (g/chậu) không khác biệt nhau. Nghiệm thức HH TKT có trọng lượng thực tế là 22,56 thấp hơn và khác biệt so với các nghiệm thức có xử lý TKT còn lại và không khác biệt so với đối chứng.

Bảng 4.10 Hiệu quả của thực khuẩn thể ảnh hưởng đến chỉ tiêu năng suất lúa

Nghiệm thức	Chỉ tiêu năng suất			
	Số hạt chắc/bông	Tỷ lệ hạt chắc (%)	Trọng lượng 1000 hạt (g)	Trọng lượng thực tế (g/chậu)
Φ BurVL34	87,05 ^b	71,27 ^b	26,35	27,34 ^b
Φ BurAG58	103,90 ^a	80,65 ^a	26,35	34,66 ^a
Φ BurDT47a	86,43 ^b	70,50 ^b	26,82	27,80 ^b
Φ BurDT48a	85,97 ^b	69,98 ^b	26,06	27,88 ^b
HH TKT	73,63 ^c	55,74 ^c	25,82	22,56 ^c
Đối chứng	60,25 ^d	44,31 ^d	26,14	20,45 ^c
Mức ý nghĩa	*	*	ns	*
CV (%)	2,67	3,68	3,06	9,23

Ghi chú: Số liệu được chuyển sang $\arcsin \sqrt{x \pm \frac{1}{4n}}$ trước khi xử lý thống kê. Trong cùng một cột những số có cùng chữ cái theo sau giống nhau thì không khác biệt ở mức ý nghĩa 5% trong phép thử Duncan. * khác biệt ở mức ý nghĩa 5%. ns: không khác biệt ý nghĩa 5%

Qua tỷ lệ hạt bệnh (Bảng 4.7), mật số thực khuẩn thể trên bông (Bảng 4.8), hiệu quả giảm bệnh (Bảng 4.9) và chỉ tiêu năng suất (Bảng 4.10) cho thấy các nghiệm thức xử lý các dòng TKT khảo sát khi xử lý đơn lẻ hay phối hợp đều mang lại hiệu quả cao trong phòng trị bệnh thối hạt lúa ở điều kiện nhà lưới, tuy nhiên hiệu quả giữa các nghiệm thức khác nhau. Theo Jones *et al.*, (2007), hiệu quả áp dụng TKT để kiểm soát mầm bệnh phụ thuộc vào nhiều yếu tố khác nhau như việc áp dụng TKT như thế nào, khả năng tồn tại của TKT trên tán lá cây, thời gian xử lý TKT trên bông và sự hiện diện của vi khuẩn ký chủ. Điều này thể hiện trong thí nghiệm này như sau: (1) các dòng TKT đơn hoặc HH TKT được phun trên bông lúa vào buổi chiều, vì vậy TKT có cơ hội gia tăng mật số trên bông do tránh được tác động của ánh sáng mặt trời đồng thời có sự hiện diện của vi khuẩn ký chủ góp phần gia tăng mật số và sự tồn tại của TKT trên bông lúa, (2) việc áp dụng TKT trên bông lúa khác với trên tán lá (chịu tác dụng trực tiếp bởi ánh sáng) trên bông đã tạo điều kiện thuận lợi cho TKT có thể định vị bên trong hoa sẽ tiếp cận và tiêu diệt vi khuẩn *B. glumae*. Thực tế, trong thí nghiệm này nghiệm thức HH TKT có hiệu quả kém hơn so với TKT đơn lẻ trong điều kiện lây bệnh nhân tạo ở nhà lưới, có thể trong HH TKT là mỗi dòng TKT đơn sẽ tấn công vi

khuẩn độc lập nhau. Cho nên tế bào kí chủ nào bị tấn công trước bởi một dòng TKT đơn nào đó có thể ức chế sự xâm nhiễm của các dòng TKT đơn còn lại nên mật số TKT trên bông thấp hơn nghiệm thức TKT đơn vì thế liên quan đến hiệu quả phòng trị thấp hơn TKT đơn, hiện tượng này còn gọi là hiện tượng cản nhiễu (interference) là hiện tượng xuất hiện nhanh khi 2 virus cùng xâm nhiễm vào tế bào theo một thứ tự nhất định, virus thứ nhất sẽ ngăn cản trong một thời gian dài sự nhân lên của virus thứ hai. Do vậy, trong nghiệm thức HH TKT mật số TKT sinh ra sẽ thấp dẫn đến khả năng phòng trừ bệnh kém hiệu quả hơn nên hiệu quả kém hơn TKT đơn. Một nghiên cứu khác của Trân (2016) đã ghi nhận tương tự khi khảo sát hiệu quả phòng trị bệnh cháy lá trên cây hành của các dòng TKT đơn và HH TKT ($\Phi 16$, $\Phi 17A$ và $\Phi 31$) ở mật số 10^8 pfu/ml, đã thấy rằng HH TKT có hiệu quả phòng trị thấp hơn TKT đơn và hiệu quả giảm bệnh tương quan thuận với mật số TKT tồn tại trên tán lá cây. Tuy nhiên, hiện tượng xảy ra khi cây được lây nhiễm nhân tạo với 1 dòng vi khuẩn trong điều kiện nhà lưới. Thực tế, trong điều kiện tự nhiên cây lúa có thể nhiễm bệnh bởi nhiều dòng vi khuẩn khác nhau, nên việc sử dụng HH TKT có thể mang lại hiệu quả khác hơn. Ngày nay, trong thực tế HH TKT được các nhà nghiên cứu trên thế giới khuyến cáo nên sử dụng trong quản lý bệnh trên cây trồng (Kering, 2019). Lý do chính là hỗn hợp thực khuẩn thể ngăn chặn sự kháng của vi khuẩn kí chủ vì ngoài tự nhiên vi khuẩn kí chủ luôn biến đổi các thụ thể trên lớp màng vi khuẩn nhằm hạn chế bị TKT tiêu diệt tăng khả năng kí sinh thông qua các TKT khác nhau. Sự đồng tiến hóa liên tục giữa TKT và vi khuẩn sẽ tạo nên những loài vi khuẩn kháng TKT thông qua cơ chế như thay đổi các thụ thể nhằm ức chế hấp phụ TKT, thay đổi cấu trúc ADN, thay đổi hệ thống miễn dịch hoặc hệ thống chỉnh sửa gen. Bằng cách sử dụng HH TKT làm cho vi khuẩn kí chủ không thể thay đổi các cơ chế cùng một lúc từ đó hạn chế sự kháng vi khuẩn (Kering, 2019). Thứ hai, hỗn hợp TKT làm mở rộng phổ kí sinh nhiều chủng vi khuẩn kí chủ khác nhau nhiều hơn vì mỗi dòng TKT có giới hạn phổ kí chủ, do TKT thuộc các họ khác nhau sẽ hấp phụ vào tế bào kí chủ bằng thụ thể khác nhau. Minh chứng cho vấn đề này theo Nobrega *et al.*, (2018) thấy rằng họ *Siphoviridae* hấp phụ vào vi khuẩn kí chủ thông qua các thụ thể trên màng tế bào như LPS, LamB, TolC FepA, chiên mao, sợi pili, teichoic acid; đối với họ *Myoviridae* hấp phụ vào vi khuẩn kí chủ thông qua các thụ thể trên màng tế bào như OmpC and OmpF, Peptidoglycan. Do vậy, hỗn hợp TKT được ưu tiên sử dụng phòng trị bệnh trên cây trồng ở điều kiện ngoài đồng.

Tóm lại, qua kết quả đánh giá hiệu quả phòng trị của 4 dòng TKT đơn (Φ BurVL34, Φ BurAG58, Φ BurDT47a và Φ BurDT48a) hay hỗn hợp 4 dòng TKT đều thể hiện hiệu quả phòng trị bệnh thối hạt thông qua các chỉ tiêu đã ghi nhận trong điều kiện nhà lưới. Trong đó dòng TKT Φ BurAG58 cho hiệu quả rõ và cao hơn các nghiệm thức khác, tiếp theo là dòng TKT Φ BurVL34, Φ BurDT47a, Φ BurDT48a và hỗn hợp 4 dòng TKT. Vì vậy tiếp tục sử dụng dòng TKT Φ BurAG58 cho các thí nghiệm về mật số, thời gian áp dụng TKT, phòng trị bệnh thối hạt ở điều kiện ngoài đồng. Về HH TKT ở thí nghiệm ngoài đồng chỉ sử dụng hỗn hợp 3 dòng TKT (Φ BurAG58,

ΦBurVL34, ΦBurDT47a) mà không sử dụng dòng TKT ΦBurDT48a mặc dù dòng TKT này có hiệu quả tương đương dòng TKT ΦBurDT47a và ΦBurVL34 với những lý do sau: (1) sử dụng đa dạng vùng sinh thái các dòng TKT (ΦBurVL34 được phân lập ở Vĩnh Long, ΦBurAG58 được phân lập ở An Giang, ΦBurDT47a và ΦBurDT48a được phân lập ở Đồng Tháp), (2) khả năng kí sinh dòng TKT ΦBurDT48a có 49 trong khi dòng ΦBurDT47a là 50, (3) về khả năng tồn tại và nhân mật số trên bông lúa của ba dòng TKT (ΦBurAG58, ΦBurVL34, ΦBurDT47a) có mật số cao hơn và khác biệt so với dòng TKT ΦBurDT48a ở thời điểm 12 giờ SKLB và 24 giờ SKLB, đây là thời điểm quan trọng nếu ngăn chặn mật số vi khuẩn *B. glumae* giảm sẽ cho hiệu quả quản lí bệnh cao theo chu trình xâm nhiễm sơ cấp của Tsushima (1996), (4) giảm thiểu thời gian nhân nuôi TKT đạt hiệu quả kinh tế cao. Do đó, chọn ba dòng TKT gồm ΦBurAG58, ΦBurVL34, ΦBurDT47a cho các nghiên cứu tiếp theo.



Đối chứng



ΦBurVL34



ΦBurAG58



ΦBurDT47a



ΦBurDT48a



Hồn hợp TKT

Hình 4.7: Hiệu quả phòng trị của các dòng TKT đối với bệnh thối hạt do vi khuẩn *B. glumae* DT46 tại thời điểm 5 NSKLB

4.2.2 Hiệu quả phòng trị bệnh thối hạt của thực khuẩn thể ở các mật số khác nhau trong điều kiện nhà lưới

Kết quả đánh giá các mật số TKT khác nhau phòng trị bệnh thối hạt được thể hiện tại Bảng 4.11 qua 3 thời điểm ghi nhận (10 NSKLB, 15 NSKLB và 20 NSKLB), tất cả các nghiệm thức xử lý TKT đều cho hiệu quả phòng trị bệnh thông qua tỷ lệ hạt bệnh trên bông, AUDPC, và tỷ lệ hạt chắc trên bông. Các mật số TKT có sự khác biệt so với đối chứng ở mức ý nghĩa 5%. Trong đó, nghiệm thức xử lý TKT ở mật số 10^8 pfu/ml cho hiệu quả phòng trị bệnh vượt trội. Cụ thể là:

Ở thời điểm 5 NSKLB, nghiệm thức xử lý TKT ở các mật số 10^5 pfu/ml (5,11%), 10^6 pfu/ml (6,00%), 10^7 pfu/ml (7,13%) có tỷ lệ hạt bệnh không khác biệt so với nghiệm thức ĐC (6,40%) ở mức ý nghĩa 5%. Tuy nhiên, nghiệm thức xử lý TKT ở mật số 10^8 pfu/ml thể hiện hiệu quả phòng trị bệnh cao nhất với tỷ lệ hạt bệnh 0,00% thấp hơn và khác biệt hơn so với các nghiệm thức còn lại.

Vào thời điểm 10 NSKLB, hầu hết tất cả các nghiệm thức xử lý TKT có tỷ lệ hạt bệnh trong khoảng 7,89% đến 27,57% thấp hơn so với nghiệm thức ĐC (47,08%). Trong đó, nghiệm thức xử lý TKT ở mật số 10^8 pfu/ml có tỷ lệ hạt bệnh thấp nhất (7,89%) và khác biệt so với 3 mật số còn lại. Kể đến là nghiệm thức xử lý TKT ở mật số 10^7 pfu/ml, 10^6 pfu/ml có tỷ lệ hạt bệnh lần lượt là 14,37% và 17,71% thấp hơn và khác biệt so với mật số 10^5 pfu/ml (27,57%).

Tiếp theo vào thời điểm 15 NSKLB, các nghiệm thức xử lý TKT đều có tỷ lệ hạt bệnh tăng so với 10 NSKLB nhưng vẫn thấp hơn và khác biệt so với nghiệm thức ĐC (53,71%). Trong đó, nghiệm thức xử lý TKT ở mật số 10^8 pfu/ml vẫn có tỷ lệ hạt bệnh thấp nhất (8,37%) kể đến là nghiệm thức xử lý TKT ở mật số 10^7 pfu/ml và 10^6 pfu/ml có hiệu quả phòng trị bệnh tương đương nhau về mặt ý nghĩa thống kê với tỷ lệ hạt bệnh lần lượt là 23,11% và 27,36 % và khác biệt so với mật số 10^5 pfu/ml (33,29%).

Đến thời điểm 20 NSKLB, các nghiệm thức xử lý TKT tiếp tục có tỷ lệ bệnh tăng so với 2 thời điểm trước nhưng thấp hơn và khác biệt so với nghiệm ĐC (82,21%). Trong đó nghiệm thức xử lý TKT ở mật số 10^8 pfu/ml tiếp tục cho hiệu quả phòng trị bệnh hiệu quả nhất với tỷ lệ hạt bệnh (8,98%) thấp hơn so với các nghiệm thức còn lại. Tiếp đến là nghiệm thức xử lý TKT ở mật số 10^7 pfu/ml có tỷ lệ hạt bệnh (29,33%) thấp hơn và khác biệt so với nghiệm thức xử lý TKT ở mật số 10^5 pfu/ml (36,98%). Tuy nhiên, về mặt thống kê nghiệm thức xử lý TKT ở mật số 10^6 pfu/ml có tỷ lệ hạt bệnh (32,95%) không có sự khác ý nghĩa đối với hai nghiệm thức xử lý TKT ở mật số 10^5 pfu/ml và 10^7 pfu/ml.

Về chỉ số AUDPC của các nghiệm thức xử lý TKT ở các mật số khác nhau dao động trong khoảng 103,8 đến 409,5 thấp hơn và có khác biệt ý nghĩa so với nghiệm thức ĐC (725,5). Trong đó, nghiệm thức xử lý TKT ở mật số 10^8 pfu/ml có chỉ số AUDPC thấp hơn (103,8) khác biệt so với 3 mật số còn lại. Tiếp theo là nghiệm thức

xử lý TKT ở mật số 10^7 pfu/ml và 10^6 pfu/ml có chỉ số AUDPC lần lượt là 278,6; 322,7 thấp hơn nghiệm thức xử lý TKT ở mật số 10^5 pfu/ml (409,5) nhưng xét về mặt thống kê giữa 2 nghiệm thức 10^7 pfu/ml và 10^6 pfu/ml có diện tích tiến triển bệnh không có sự khác biệt. Kết quả này cho thấy, quá trình tiến triển bệnh ở nghiệm thức xử lý TKT ở mật số 10^8 pfu/ml tiến triển chậm hơn so với các nghiệm thức còn lại.

Về tỷ lệ hạt chắc/bông, tất cả các nghiệm thức xử lý TKT đều có tỷ lệ hạt chắc/bông cao hơn và khác biệt ý nghĩa so với đối chứng. Trong đó, nghiệm thức xử lý TKT ở mật số 10^8 pfu/ml có tỷ lệ hạt chắc/bông là 76,51% cao nhất và khác biệt so với các nghiệm thức còn lại. Kế đến là nghiệm thức 10^7 pfu/ml là 63,44% và nghiệm thức 10^6 pfu/ml (52,14 %) không khác biệt nhau. Tuy nhiên, nghiệm thức 10^5 pfu/ml và nghiệm thức 10^6 pfu/ml không khác biệt về mặt thống kê.

Tóm lại, qua kết quả khảo sát mật số TKT khác nhau (10^5 pfu/ml; 10^6 pfu/ml; 10^7 pfu/ml; 10^8 pfu/ml) đều thể hiện giảm bệnh cho tỷ lệ hạt bệnh, AUDPC thấp hơn, và tỷ lệ hạt chắc trên bông cao hơn và khác biệt so với nghiệm thức đối chứng. Trong đó, nghiệm thức 10^8 pfu/ml cho tỷ lệ hạt nhiễm bệnh thấp nhất và tỷ lệ hạt chắc trên bông cao nhất, vượt trội so với các nghiệm thức còn lại qua các thời điểm khảo sát. Thực ra trong nghiên cứu này cũng như các nghiên cứu khác (Adachi *et al.*, 2012) cũng đã chứng minh rằng mật số thực khuẩn tương đồng với hiệu quả giảm bệnh. Nguyên nhân có thể được giải thích như sau: (1) Mật số cao từ ban đầu sẽ tăng khả năng tiếp xúc giữa TKT với vi khuẩn kí chủ là cơ hội TKT kí sinh vào kí chủ làm cho vi khuẩn kí chủ không thể gia tăng mật số và ngăn chặn được mầm bệnh ngay từ ban đầu, (2) Tác nhân phòng trừ với mật số ban đầu cao sẽ tăng khả năng tồn tại trong môi trường đặc biệt tán lá cây bị giới hạn nhiều yếu tố như nhiệt độ, khô hạn và tia UV. Đó là những lí do mật số thực khuẩn thể ở 10^8 pfu/ml trong thí nghiệm này cho hiệu quả phòng trị bệnh thối hạt lúa cao.

Bảng 4.11 Hiệu quả phòng trị bệnh thối hạt ở các mật số thực khuẩn thể khác nhau trong điều kiện nhà lưới

Nghiệm thức	Tỷ lệ hạt bệnh trên bông (%)				AUDPC	Tỷ lệ hạt chắc/bông (%)
	5 NSKLB	10 NSKLB	15 NSKLB	20 NSKLB		
10 ⁵ (pfu/ml)	5,11 ^a	27,57 ^b	33,29 ^b	36,98 ^b	409,5 ^b	48,51 ^c
10 ⁶ (pfu/ml)	6,00 ^a	17,71 ^c	27,36 ^c	32,95 ^{bc}	322,7 ^c	52,14 ^{bc}
10 ⁷ (pfu/ml)	7,13 ^a	14,37 ^c	23,11 ^c	29,33 ^c	278,6 ^c	63,44 ^b
10 ⁸ (pfu/ml)	0,00 ^b	7,89 ^d	8,37 ^d	8,98 ^d	103,8 ^d	76,51 ^a
Đối chứng	6,40 ^a	47,08 ^a	53,71 ^a	82,21 ^a	725,5 ^a	15,38 ^d
Mức ý nghĩa	*	*	*	*	*	*
CV (%)	23,80	8,38	7,2	8,96	10,55	15,11

Ghi chú: Số liệu được chuyển sang \sqrt{x} (5NSKLB) hoặc $\arcsin \sqrt{x \pm \frac{1}{4n}}$ (10 NSKLB, 15 NSKLB, 20 NSKLB) trước khi xử lý thống kê. Trong cùng một cột những số có cùng chữ cái theo sau giống nhau thì không khác biệt ở mức ý nghĩa 5% trong phép thử Duncan* khác biệt ở mức ý nghĩa 5%



ĐC

10⁵ pfu/ml

10⁶ pfu/ml

10⁷ pfu/ml

10⁸ pfu/ml

Hình 4.8: Hiệu quả phòng trị bệnh thối hạt lúa do vi khuẩn *B. glumae* DT46 ở các mật số thực khuẩn thể khác nhau ở thời điểm 10 NSKLB

4.2.3 Khảo sát thời điểm xử lý thực khuẩn thể trên bông trong phòng trị bệnh thối hạt do vi khuẩn *B. glumae*DT46 ở điều kiện nhà lưới

Kết quả khảo sát thời điểm áp dụng TKT lên hiệu quả phòng trị bệnh thối hạt lúa do vi khuẩn *B. glumae* được ghi nhận qua tỷ lệ hạt bệnh trên bông, AUDPC, và tỷ lệ hạt chắc trên bông (Bảng 4.12) và mật số TKT trên bông (Bảng 4.13).

4.2.3.1. Tỷ lệ hạt bệnh trên bông và tỷ lệ hạt chắc trên bông

Kết quả tỷ lệ hạt bệnh, AUDPC và tỷ lệ hạt chắc thể hiện qua Bảng 4.12 cả ba nghiệm thức có sự khác biệt ở mức ý nghĩa 5%.

Ở thời điểm 5 NSKLB tỷ lệ hạt bệnh của các nghiệm thức dao động trong khoảng từ 10,23% đến 40,58%. Nghiệm thức xử lý TKT 2 giờ trước khi lây bệnh (GTKLB) hoặc 2 GTKLB + 5 NSKLB có tỷ lệ hạt bệnh lần lượt là 11,93% và 10,23% thấp hơn và khác biệt so với nghiệm thức 5 NSKLB và đối chứng với tỷ lệ hạt bệnh lần lượt là 26,24% và 40,68% (Hình 4.9).

Đến thời điểm 10 NSKLB và 15 NSKLB bệnh thối hạt có chiều hướng gia tăng, tất cả các nghiệm thức có sự khác biệt về mặt thống kê. Trong đó nghiệm thức xử lý TKT 2 GTKLB hoặc 2 GTKLB + 5 NSKLB vẫn cho tỷ lệ hạt bệnh thấp hơn so với nghiệm thức 5 NSKLB.

Về chỉ số AUDPC nghiệm thức 2 GTKLB hoặc 2 GTKLB + 5 NSKLB cho chỉ số AUDPC lần lượt là 152,9 và 111,6 thấp hơn và khác biệt so với nghiệm thức 5 NSKLB với chỉ số AUDPC là 343,8.

Về tỷ lệ hạt chắc trên bông nghiệm thức xử lý TKT 2 GTKLB (87,81%) hoặc 2 GTKLB + 5 NSKLB (86,69%) đạt cao hơn nghiệm thức 5 NSKLB (64,68%) và nghiệm thức đối chứng (41,53%), kết quả này phù hợp với mức độ hạt bệnh và AUDPC thể hiện ở các nghiệm thức.

Như vậy, qua kết quả khảo sát việc áp dụng TKT và mầm bệnh trên bông lúa vào giai đoạn lúa trở đều trong điều kiện nhà lưới kết luận được thời điểm phun TKT trước 2 GTKLB hoặc phun TKT 2 GTKLB + 5 NSKLB cho hiệu quả cao trong phòng trị bệnh thối hạt lúa so với thời điểm 5 NSKLB.

Bảng 4.12 Ảnh hưởng các thời điểm xử lý thực khuẩn thể đến bệnh thối hạt lúa trong điều kiện nhà lưới

Nghiệm thức	Tỷ lệ hạt bệnh trên bông (%)				Tỷ lệ hạt chắc/bông (%)
	5 NSKLB	10 NSKLB	15 NSKLB	AUDPC	
2 GTKLB	11,93 ^c	15,76 ^c	17,71 ^c	152,9 ^c	87,81 ^a
2 GTKLB + 5 NSKLB	10,23 ^c	11,30 ^c	11,30 ^c	111,6 ^c	86,69 ^a
5 NSKLB	26,24 ^b	35,18 ^b	40,93 ^b	343,8 ^b	64,68 ^b
Đối chứng	40,58 ^a	55,11 ^a	60,83 ^a	529,1 ^a	41,53 ^c
Mức ý nghĩa	*	*	*	*	*
CV(%)	15,86	15,25	14,15	22,49	6,37

Thi chú: Số liệu được chuyển sang arcsin $\sqrt{x \pm \frac{1}{4n}}$ trước khi xử lý thống kê. Các số trung bình trong cùng một cột theo sau bởi những chữ cái giống nhau thì không khác biệt ở mức ý nghĩa 5% trong phép thử Duncan khác biệt ở mức ý nghĩa 5%. NSKLB: ngày sau khi lây bệnh. GTKLB: giờ trước khi lây bệnh.*

4.2.3.2 Mật số thực khuẩn thể tồn tại trên bông

Kết quả khảo sát mật số TKT tồn tại trên bông qua các thời điểm xử lý được thể hiện ở Bảng 4.13 thấy rằng tất cả 3 nghiệm thức 2 GTKLB, 2 GTKLB + 5 NSKLB, 5 NSKLB có sự khác biệt ở thời điểm 12 GSKXL và 24 GSKXL.

Ở thời điểm 0 GSKXL, log mật số TKT của các nghiệm thức không có sự khác biệt về mật thống kê với mật số dao động từ 8,45 đến 8,71.

Đến thời điểm 12 GSKXL, log mật số TKT ở 2 nghiệm thức 2 GTKLB (9,52) hoặc 2 GTKLB + 5 NSKLB (9,32) cao hơn và khác biệt so với nghiệm thức 5 NSKLB (7,14).

Vào thời điểm 24 GSKXL, log mật số TKT giảm ở tất cả các nghiệm thức. Trong đó nghiệm thức 2 GTKLB có log mật số TKT tồn tại trên bông lúa là 7,98 cao và khác biệt với nghiệm thức 5 NSKLB (5,34). Riêng đối với nghiệm thức 2 GTKLB + 5 NSKLB với log mật số TKT trên bông (6,90) không khác biệt 2 GTKLB và 5 NSKLB.

Bên cạnh đó, ở thời điểm 15 NSKLB, cả ba nghiệm thức vẫn còn tồn tại TKT trên bông lúa và các nghiệm thức không có sự khác biệt dao động từ 5,06 đến 6,24 (pfu /g bông) nhưng kết quả cho thấy mật số vẫn tiếp tục giảm so với thời điểm 12 giờ SKXL và 24 GSKXL.

Bảng 4.13 Mật số thực khuẩn thể tồn tại trên bông ở các thời điểm xử lý trong điều kiện nhà lưới

Nghiệm thức	Log mật số TKT trên bông (pfu/g bông)			
	0 GSKXL	12 GSKXL	24 GSKXL	15 NSKLB
2 GTKLB	8,61	9,52 ^a	7,98 ^a	5,55
2 GTKLB + 5 NSKLB	8,71	9,32 ^a	6,90 ^{ab}	5,06
5 NSKLB	8,45	7,14 ^b	5,34 ^b	6,24
Mức ý nghĩa	ns	*	*	ns
CV (%)	6,16	6,11	19,10	18,79

Ghi chú: Số liệu được chuyển sang log x trước khi xử lý thống kê. Các số trung bình trong cùng một cột theo sau bởi những chữ cái giống nhau thì không khác biệt ở mức ý nghĩa 5% trong phép thử Duncan* khác biệt ở mức ý nghĩa 5%, ns khác biệt không ý nghĩa. GSKXL: Giờ sau khi xử lý. NSKLB: ngày sau khi lây bệnh. GTKLB: giờ trước khi lây bệnh.

Nhìn chung, qua kết quả Bảng 4.12 và Bảng 4.13 đã ghi nhận tỷ lệ hạt bệnh, AUDPC, và tỷ lệ hạt chắc trên bông tương quan thuận với sự tồn tại của TKT trên bông lúa. Trong thí nghiệm này đã chứng minh rằng việc áp dụng TKT trước khi có sự hiện diện của vi khuẩn kí chủ sẽ góp phần gia tăng hiệu quả quản lí bệnh, cụ thể là xử lí TKT 2 GTKLB hoặc 2 GTKLB kết hợp 5 NSKLB cho các chỉ tiêu về bệnh và sự tồn tại của TKT trên bông hiệu quả hơn nghiệm thức áp dụng TKT 5 NSKLB. Vì vậy, trong kết quả này thấy rằng thời điểm áp dụng TKT và sự xuất hiện của vi khuẩn gây bệnh có liên quan đến khả năng kiểm soát bệnh. Thật vậy, Jones *et al.*, (2007) cũng đã nhận định thời điểm áp dụng TKT có liên quan rất nhiều cũng như quyết định thành công của biện pháp sinh học đến hiệu quả giảm bệnh: Xử lí TKT trước khi mầm bệnh xuất hiện và xâm nhiễm vào cây trồng mang lại hiệu quả cao hơn sau khi xử lí TKT có sự hiện diện của mầm bệnh vì mầm bệnh đã thiết lập sự xâm nhiễm vào cây trồng. Mặt khác, việc TKT thiết lập quần thể sớm tạo điều kiện cho TKT có khả năng tiêu diệt mầm bệnh trực tiếp ngay sau khi vi khuẩn xuất hiện. Một nghiên cứu của Civerolo và Keil (1969) đã khảo sát thời điểm áp dụng TKT trên cây đào phòng trị bệnh đốm lá do vi khuẩn *Xanthomonas purni*. Nếu xử lí TKT 1 ngày hoặc 1 giờ trước khi lây bệnh sẽ có hiệu quả. Ngược lại xử lí TKT 1 ngày hoặc 1 giờ sau khi lây bệnh sẽ có hiệu quả thấp hoặc không có hiệu quả. Tương tự, theo nghiên cứu của Giang (2016) cũng cho thấy thời điểm phun trước kết hợp sau hoặc phun trước có hiệu quả phòng trị vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* gây bệnh cháy bìa lá lúa tương đương nhau ở thời điểm 3 NSKLB với tỷ lệ bệnh lần lượt là 9,7%;10,8% và hiệu quả hơn so với nghiệm thức phun sau (18,7%) và đối chứng (31,3%). Do đó, với rất nhiều nghiên cứu đã khẳng định thời điểm áp dụng TKT rất quan trọng là một trong những nhân tố quyết định thành công hay thất bại cho liệu pháp thực khuẩn thể trên cây trồng. Vì vậy trong thí nghiệm này đối với vi khuẩn *B. glumae* được áp dụng phun TKT trước ngay sau khi có sự xuất hiện của vi khuẩn kí chủ sẽ mang hiệu quả phòng trị bệnh cao hơn cũng

như góp phần bảo vệ hạt chắc trên bông trong giai đoạn chín và thu hoạch. Như vậy, việc áp dụng TKT một lần đúng vào thời điểm vi khuẩn chưa xuất hiện và xâm nhiễm vào bông lúa sẽ mang lại hiệu quả phòng trị bệnh cao. Do đó, đối với bệnh thối hạt trên lúa có thể phun TKT trước (1 lần) khi có sự xuất hiện của vi khuẩn sẽ tiết kiệm thời gian so với việc phun TKT 2 lần (5 NSKLB).



2 GTKLB



2 GTKLB + 5 NSKLB



5 NSKLB



Đôi chứng

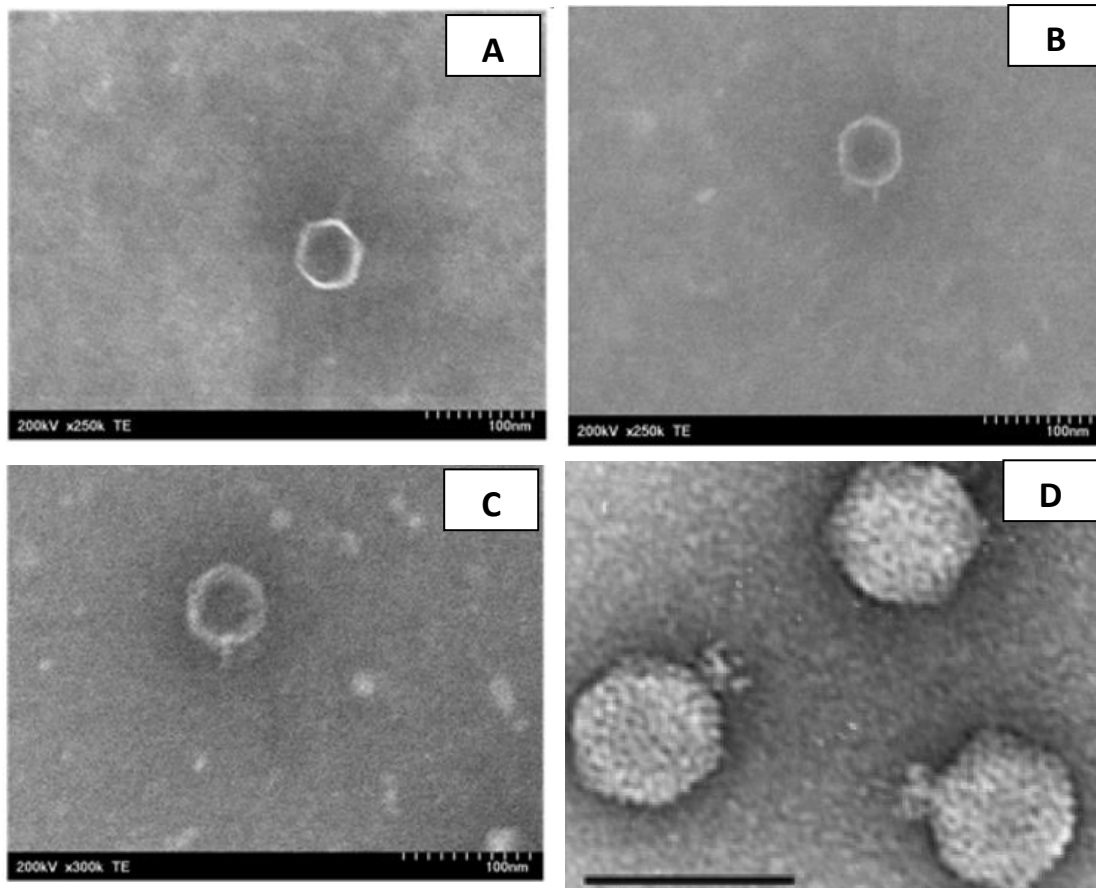
Hình 4.9: Hiệu quả phòng trị bệnh thối hạt trên lúa do *B. glumae* BurDT46 bằng thực khuẩn thể ΦBurAG58 ở thời điểm 5 NSKLB

4.3 Nội dung 3: Xác định tính an toàn của các dòng thực khuẩn thể triển vọng trong thực tiễn sản xuất

Qua kết quả đã phân lập được 112 dòng TKT tại 9 tỉnh đồng bằng sông Cửu Long. Sau đó, qua các phương pháp đánh giá khả năng kí sinh, so sánh đường kính đốm tan, và sử dụng phòng trừ bệnh thối hạt trong điều kiện nhà lưới. Kết quả đã tìm ra 3 dòng TKT triển vọng gồm ΦBurAG58, ΦBurVL34, ΦBurDT47a có hiệu quả phòng trị bệnh thối hạt cao trong điều kiện nhà lưới. Tuy nhiên, để áp dụng 3 dòng TKT này ra điều kiện ngoài đồng cần hiểu rõ 3 dòng TKT này thuộc nhóm TKT độc hay nhóm TKT ôn hòa. Vì vậy, tiếp tục khảo sát hình thái 3 dòng TKT này dưới kính hiển vi điện tử nhằm xác định 3 dòng thực khuẩn thuộc nhóm thực khuẩn thể nào theo phân loại của Ủy ban quốc tế về Phân loại Virus (International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV) kết hợp với giải trình tự bộ genome của TKT để xác định nhóm phân loại và tính an toàn của TKT trước khi áp dụng ngoài thực tế.

4.3.1 Khảo sát đặc điểm hình thái thực khuẩn thể triển vọng dưới kính hiển vi điện tử (TEM)

Kết quả Hình 4.10 đã ghi nhận 3 dòng thực khuẩn thể ΦBurAG58, ΦBurVL34, ΦBurDT47a có đầu là khối đa diện và đuôi ngắn. Dựa theo phân loại của Ackermann (2009) thực khuẩn thể chứa đầu là khối đa diện và đuôi ngắn thuộc họ *Podoviridae*. Hiện nay, theo ICTV (2011) đã phân loại họ *Podoviridae* gồm 2 phụ họ (*Autographivirinae* và *Picovirinae*), 11 chi, 43 loài với đặc điểm hình thái TKT có đầu hình đa diện và đuôi ngắn. Do đó, dựa vào đặc điểm hình thái kết luận ban đầu 3 dòng TKT gồm ΦBurAG58, ΦBurVL34, ΦBurDT47a thuộc họ *Podoviridae*.



Hình 4.10: Hình thái các dòng thực khuẩn thể triển vọng dưới kính hiển vi điện tử
 (A) ΦBurVL34; (B) ΦBurAG58; (C) ΦBurDT47a; (D) TKT P22 thuộc họ *Podoviridae* (ICTV, 2011)

Tuy nhiên, việc định danh dựa vào đặc điểm hình thái virion của TKT sẽ không xác định được đến mức độ phụ họ. Nhằm để định danh chính xác đến phụ họ và cũng để xác định TKT tan hay TKT tiềm tan dựa vào không có hay có sự hiện diện gen qui định enzyme integrase trong bộ genome của TKT để đảm bảo tính an toàn trước khi sử dụng là rất cần thiết, từ đó làm cơ sở áp dụng ngoài thực tiễn sản xuất phòng trị bệnh thối hạt lúa.

4.3.2 Kết quả giải trình tự các dòng thực khuẩn thể triển vọng

Dựa vào kết quả định danh họ TKT (Hình 4.10) về cấu trúc TKT chưa kết luận được nhóm TKT thuộc nhóm TKT sinh tan (lytic/virulent phage) hay nhóm TKT tiềm tan (lysogenic/temperate phage), nhằm xác định tính an toàn của dòng TKT trước khi áp dụng thực nghiệm ở điều kiện ngoài đồng cũng như tương lai áp dụng trên diện tích rộng. Vì vậy nghiên cứu tiếp tục giải trình tự bộ gen của 3 dòng TKT được thực hiện dựa trên phương pháp Nga *et al.*, (2021). Kết quả giải trình tự bộ genome của TKT ΦBurVL34, ΦBurAG58, ΦBurDT47a (Hình 4.11) cụ thể như sau:

TKT ΦBurVL34 có kích thước bộ genome khoảng 44.657 bp bao gồm 69 CDS (coding sequence) quy định 69 ORFs (open reading frames) cụ thể gồm các nhóm như ORF qui định protein cấu trúc có màu vàng, các ORFs qui định một số protein chức năng có màu xanh như primase, helicase, ligase, DNA/RNA polymerase,

endonuclease, exonuclease; ngoài ra còn các ORFs qui định các enzyme phân hủy vách tế bào vi khuẩn có màu đỏ như O- spanin (phân hủy vách tế bào), lysozyme (phân hủy peptidoglycan). Các ORFs màu trắng là các gen chưa xác định được chức năng (hypothetical protein). Trong toàn bộ genome của ΦBurVL34 hoàn toàn không có gen quy định enzyme integrase chỉ định cho nhóm TKT ôn hòa, vì vậy TKT ΦBurVL34 thuộc nhóm TKT sinh tan.

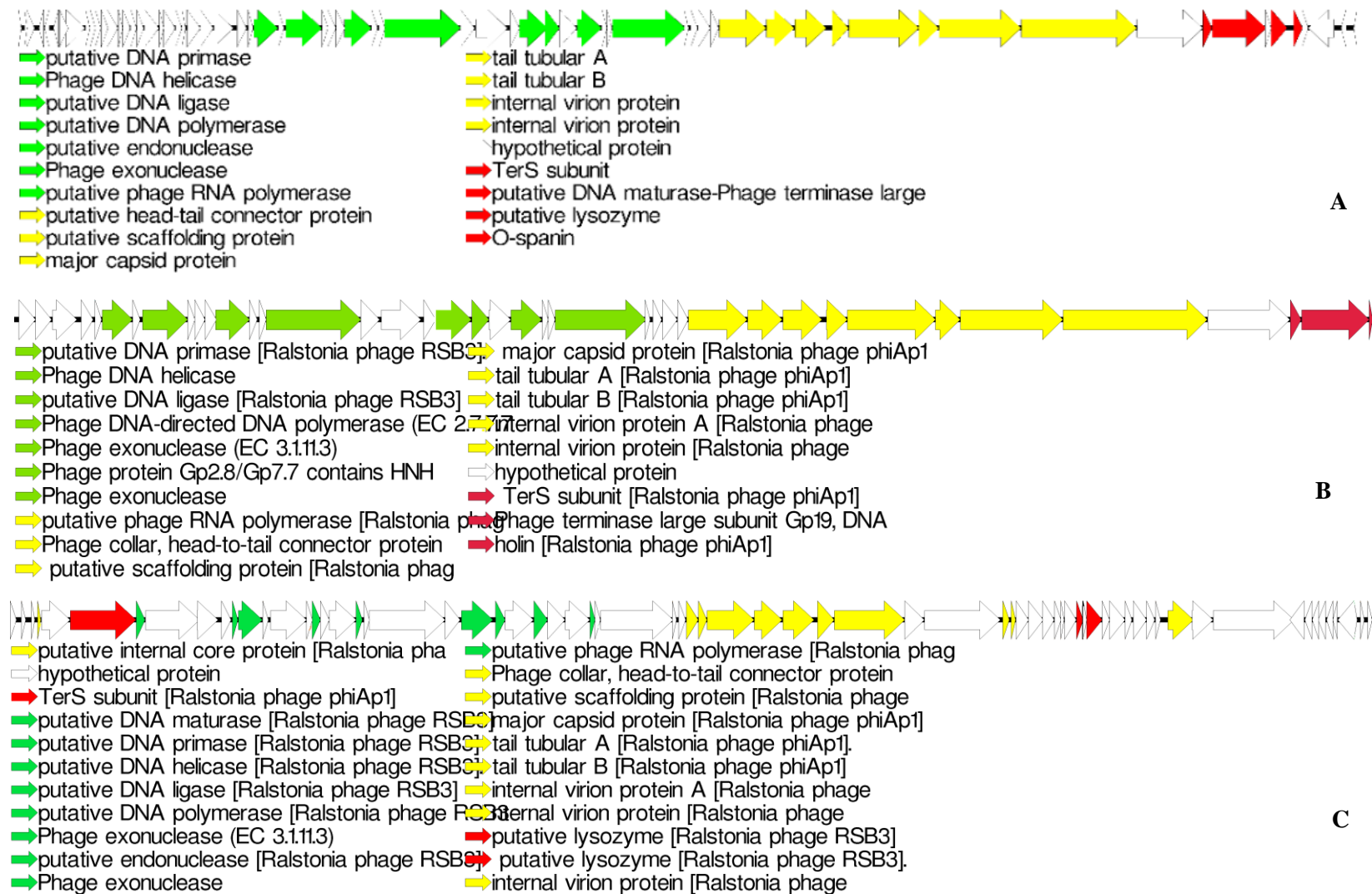
TKT ΦBurAG58 có kích thước bộ genome khoảng 36.275 bp chứa 41 CDS quy định 41 ORFs (open reading frames), bao gồm các ORFs qui định protein cấu trúc có màu vàng, các ORFs qui định một số protein chức năng có màu xanh như primase, helicase, ligase, polymerase, endonuclease, exonuclease; ngoài ra còn các ORFs qui định các enzyme phân hủy vách tế bào vi khuẩn có màu đỏ như O- spanin (phân hủy vách tế bào), lysozyme (phân hủy peptidoglycan), TerS subunit (enzyme có chức năng đóng gói TKT). Các ORFs màu trắng là các gen chưa xác định được chức năng (hypothetical protein). Tương tự, TKT ΦBurAG58 không có ORF quy định enzyme integrase nên TKT này cũng thuộc nhóm TKT sinh tan.

Tương tự, TKT ΦBurDT47a có kích thước bộ genome khoảng 45.466 bp chứa 71 CDS qui định 71 ORFs, bao gồm các ORF qui định protein cấu trúc có màu vàng (đầu, đuôi, vỏ protein), một số ORFs qui định các protein chức năng có màu xanh như primase, helicase, ligase, polymerase, endonuclease, exonuclease. Ngoài ra, còn có một số ORFs qui định các enzyme phân hủy vách tế bào vi khuẩn có màu đỏ như O- spanin (phân hủy vách tế bào), lysozyme (phân hủy peptidoglycan). Các ORFs màu trắng là các gen chưa xác định được chức năng (hypothetical protein). Do vậy, TKT ΦBurDT47a không có ORF qui định enzyme integrase nên TKT ΦBurDT47a cũng thuộc nhóm TKT sinh tan.

Vì vậy, theo kết quả giải trình tự bộ genome của ba dòng TKT (Hình 4.11) đã chứng minh rằng trong toàn bộ genome của ba dòng TKT (ΦBurVL34, ΦBurAG58, ΦBurDT47a) không sở hữu gen qui định enzyme integrase, TKT sở hữu gen này không những không tiêu diệt tế bào kí chủ mà còn có chức năng chèn ADN của TKT vào sợi ADN của tế bào vi khuẩn kí chủ và nhân lên cùng bộ gen của vi khuẩn kí chủ tức là nhóm TKT ôn hòa hay tiềm tan. Do đó, ba dòng TKT (ΦBurVL34, ΦBurAG58, ΦBurDT47a) thuộc nhóm TKT độc. Kết quả này kết luận được 3 dòng TKT thuộc nhóm TKT độc (sinh tan) nên là tác nhân phòng trừ sinh học bệnh thối hạt an toàn ở điều kiện ngoài đồng.

Bảng 4.14 Dữ liệu bộ genome của ba dòng thực khuẩn thể kí sinh vi khuẩn *Burkholderia glumae*

Thực khuẩn thể	Chiều dài bộ gen (bp)	% G+C
ΦBurVL34	44.657	58
ΦBurAG58	36.275	58
ΦBurDT47a	45.466	58



**Hình 4.11: Chức năng từng gen trong bộ genome của thực khuẩn thể:
(A) ΦBurVL34; (B) ΦBurAG58; (C) ΦBurDT47a**

4.4 Nội dung 4: Đánh giá hiệu quả của các dòng thực khuẩn thể triển vọng phòng trị bệnh thối hạt lúa ở điều kiện ngoài đồng

4.4.1 Hiệu quả của thực khuẩn thể phòng trị bệnh thối hạt trên lúa do vi khuẩn *Burkholderia glumae* DT46 ở điều kiện ngoài đồng vụ Đông Xuân 2017-2018

4.4.1.1 Tổng quan thí nghiệm

Thí nghiệm đánh giá hiệu quả phòng trị bệnh thối hạt trên lúa ở điều kiện ngoài đồng TKT đơn ΦBurAG58 và HH TKT (ΦBurAG58, ΦBurVL34 và ΦBurDT47a) ở mật 10^8 pfu/ml được thực hiện tại ấp Bình Điền, xã Bình Ninh, huyện Tam Bình, tỉnh Vĩnh Long vào thời điểm vụ Đông Xuân (2017-2018) với nhiệt độ trung bình trong khoảng $27,3^{\circ}\text{C} - 33,8^{\circ}\text{C}$ và không mưa, bệnh thối hạt xuất hiện với tần số thấp, vì vậy ruộng thí nghiệm được thực hiện lây bệnh nhân tạo. Giữa các lô thí nghiệm được phân rãnh phân cách khoảng 0,5 m nhằm hạn chế sự lây nhiễm TKT giữa các nghiệm thức. Trong quá trình thực hiện thí nghiệm, ngoài bệnh thối hạt (được lây bệnh nhân tạo) còn xuất hiện bệnh đạo ôn lá (giai đoạn 25-45 NSKS) và bệnh đạo ôn cổ bông (giai đoạn sau khi trổ đều) tuy nhiên tỷ lệ bệnh không cao vì nông dân xử lý bằng cách phun thuốc hóa học có hoạt chất diệt nấm (Phụ chương). Ngoài ra bệnh cháy bìa lá lúa cũng xuất hiện với tỷ lệ thấp và không đồng đều nhau. Mặt khác, đối với thuốc trừ vi khuẩn không được sử dụng trong suốt quá trình canh tác. Kết quả thí nghiệm được ghi nhận qua các thời điểm 10 NSKLB, 15 NSKLB, 20 NSKLB và thu hoạch lúa bao gồm chỉ tiêu về tỷ lệ hạt bệnh trên bông (Bảng 4.15), hiệu quả giảm bệnh (Bảng 4.16) và tỷ lệ hạt chắc và chỉ tiêu năng suất (Bảng 4.17).

4.4.1.2 Tỷ lệ hạt bệnh và hiệu quả giảm bệnh

Kết quả thí nghiệm đánh giá hiệu quả phòng trị bệnh thối hạt của dòng TKT đơn (ΦBurAG58) và HH TKT ở mật số 10^8 pfu/ml được ghi nhận thông qua tỷ lệ hạt bệnh, AUDPC (Bảng 4.15) và hiệu quả giảm bệnh (Bảng 4.16) và tỷ lệ hạt chắc và chỉ tiêu năng suất (Bảng 4.17).

Về tỷ lệ hạt bệnh trên bông (Bảng 4.16), tất cả các nghiệm thức xử lý TKT đơn (ΦBurAG58), HH TKT và Oxolinic axit có tỷ lệ hạt bệnh thấp hơn và khác biệt với nghiệm thức đối chứng qua 3 thời điểm khảo sát là 10 NSKLB, 15 NSKLB và 20 NSKLB.

Tại ba thời điểm ghi nhận chỉ tiêu cả hai nghiệm thức TKT ΦBurAG58 đơn và HH TKT tương đương thuốc hóa học oxolinic axit với tỷ lệ hạt bệnh lần lượt là (11,92% đến 21,66%); (8,02% đến 14,59%); (10,02% đến 19,87%). Cả ba nghiệm thức có tỷ lệ hạt bệnh thấp hơn và khác biệt nghiệm thức đối chứng (29,39% đến 37,37%) ở cả ba thời điểm 10 NSKLB, 15 NSKLB và 20 NSKLB.

Đồng thời tương tự tỷ lệ hạt bệnh, chỉ số AUDPC của các nghiệm thức có xử lý dao động trong khoảng 147,7-166,0 tương đương nhau về mặt thống kê. Cả ba nghiệm thức xử lý phòng trị thấp hơn và khác biệt với nghiệm thức đối chứng với chỉ số AUDPC là 345,8.

Như vậy, qua 3 thời điểm khảo sát cho thấy giữa các nghiệm thức có xử lý TKT ΦBurAG58 đơn, HH TKT ở mật số 10^8 pfu/ml và Oxolinic axit có tỷ lệ hạt bệnh và chỉ số AUDPC thấp hơn khác biệt so với nghiệm thức đối chứng.

Bảng 4.15 Tỷ lệ hạt bệnh thối hạt được xử lý thực khuẩn thể qua các thời điểm khảo sát

Nghiệm thức	Tỷ lệ hạt bệnh (%)			AUDPC
	10 NSKLB	15 NSKLB	20 NSKLB	
ΦBurAG58	11,92 ^b	16,42 ^b	21,66 ^b	166,0 ^b
HH TKT	8,02 ^b	13,69 ^b	14,59 ^b	125,0 ^b
Oxolinic axit	10,02 ^b	14,58 ^b	19,87 ^b	147,7 ^b
Đối chứng	29,39 ^a	34,18 ^a	37,37 ^a	345,8 ^a
Mức ý nghĩa	*	*	*	*
CV(%)	15,89	18,5	16,58	20,79

Ghi chú: Số liệu được chuyển sang $\arcsin \sqrt{x \pm \frac{1}{4n}}$ (10NSKLB, 15 NSKLB, 20 NSKLB) trước khi xử lý thống kê. Trong cùng một cột những số có cùng chữ cái theo sau giống nhau thì không khác biệt ở mức ý nghĩa 5% trong phép thử Duncan, (*) khác biệt ở mức ý nghĩa 5%. HH TKT: hỗn hợp 3 TKT (ΦBurVL34, ΦBurAG58, ΦBurDT47a)

Về hiệu quả giảm bệnh (HQGB), kết quả ở Bảng 4.16 cho thấy giữa cả hai nghiệm thức xử lý TKT ΦBurAG58 đơn và HH TKT tương đương và không khác biệt với Oxolinic axit qua 3 thời điểm khảo sát theo phép thử Duncan với HQGB của TKT ΦBurAG58 đơn và HH TKT trên 50%.

Bảng 4.16 Hiệu quả giảm bệnh thối hạt được xử lý thực khuẩn thể qua các thời điểm khảo sát

Nghiệm thức	Hiệu quả giảm bệnh (%)		
	10 NSKLB	15 NSKLB	20 NSKLB
ΦBurAG58	56,16	47,69	38,80
HH TKT	70,03	57,88	59,63
Oxolinic axit	65,56	55,65	43,65
Mức ý nghĩa	ns	ns	ns
CV(%)	12,02	22,7	24,5

Ghi chú: Số liệu được chuyển sang $\arcsin \sqrt{x \pm \frac{1}{4n}}$ trước khi xử lý thống kê. Trong cùng một cột những số có cùng chữ cái theo sau giống nhau thì không khác biệt ở mức ý nghĩa 5% trong phép thử Duncan. HH TKT: hỗn hợp 3 TKT (ΦBurVL34, ΦBurAG58, ΦBurDT47a); ns: không khác biệt.

4.4.1.3 Tỷ lệ hạt chắc và năng suất thực tế

Về tỷ lệ hạt chắc/bông: hai nghiệm thức xử lý TKT (ΦBurAG58 và HH TKT) có tỷ lệ hạt chắc/bông lần lượt là 66,32% và 69,91% cao hơn và khác biệt ý nghĩa so với đối chứng với tỷ lệ hạt chắc/bông là 58,88%. Riêng nghiệm thức Oxolinic axit có tỷ lệ hạt chắc/bông (64,29%) không khác biệt ý nghĩa so với nghiệm thức đối chứng không xử lý.

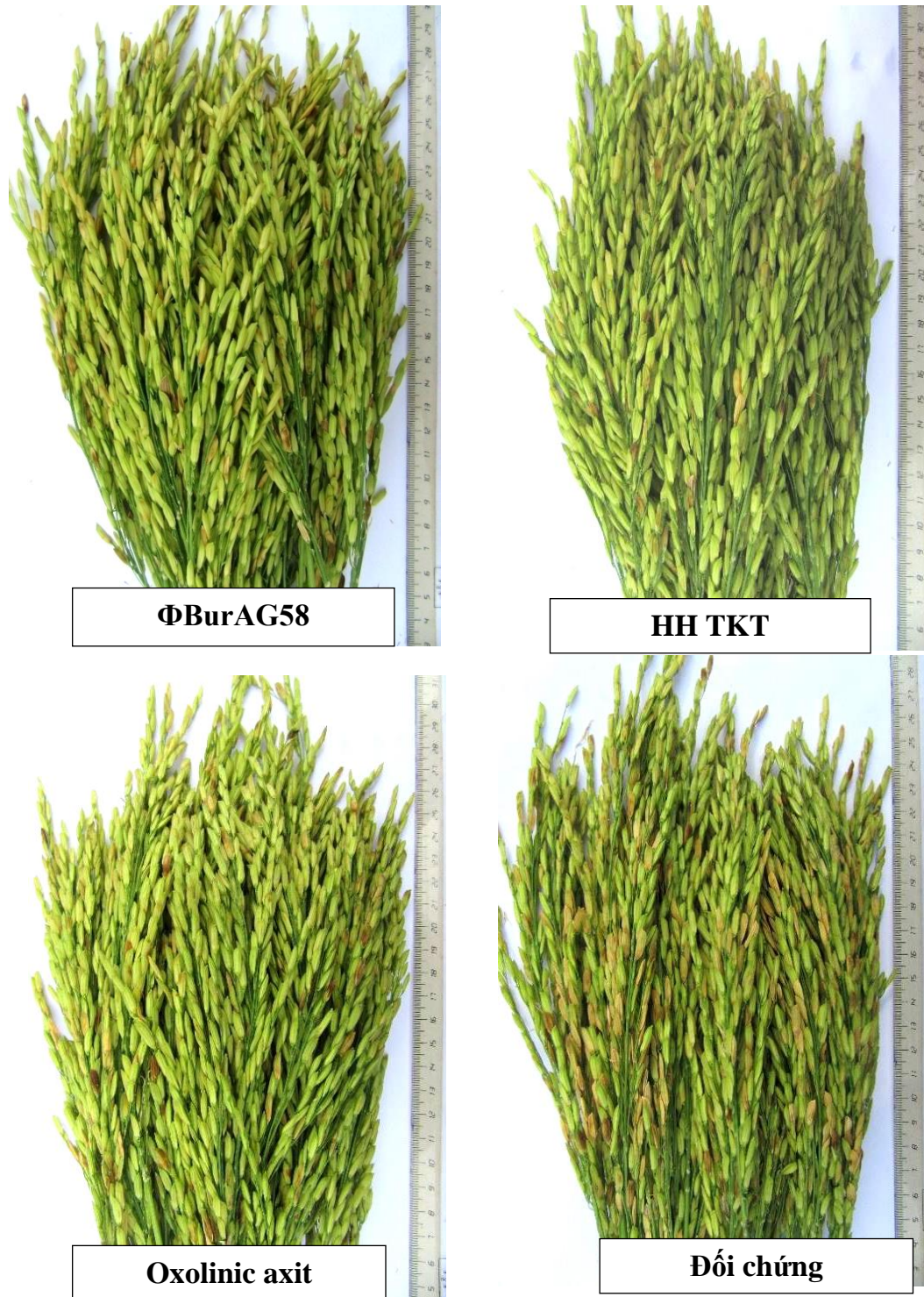
Về năng suất thực tế (NSTT): nghiệm thức xử lý TKT ΦBurAG58 đơn hay HH TKT có năng suất thực tế lần lượt là 3,49 tấn/ha và 3,70 tấn/ha cao hơn và khác biệt nghiệm thức đối chứng (2,97 tấn/ha) ở mức ý nghĩa 10%. Tuy nhiên oxolinic axit với NSTT lần lượt là 3,36 (tấn/ha) tương đương và không khác biệt nghiệm thức đối chứng.

Tóm lại, qua kết quả đánh giá hiệu quả của TKT ΦBurAG58 đơn và HH TKT ở điều kiện ngoài đồng vụ Đông Xuân 2017-2018 trong điều kiện nhiễm bệnh nhân tạo, hai nghiệm thức áp dụng TKT ΦBurAG58 đơn hay HH TKT được thể hiện hiệu quả phòng trừ bệnh thông qua chỉ tiêu tỷ lệ hạt bệnh trên bông, AUDPC, hiệu quả giảm bệnh và thành phần năng suất. Tương tự trong điều kiện nhà lưới, hiệu quả giảm bệnh của TKT ΦBurAG58 đơn trên 80% hay HH TKT cho hiệu quả giảm bệnh trên 30%. Tuy nhiên trong kết quả thí nghiệm ngoài đồng có phần khác so với kết quả ở điều kiện nhà lưới vì HH TKT (10^8 pfu/ml) thể hiện hiệu quả tương đương với nghiệm thức ΦBurAG58 đơn với hiệu quả trên 50%. Lý do có thể lý giải như sau: trong điều kiện nhà lưới, cây lúa ít bị tác động bởi điều kiện môi trường hơn so với ngoài đồng nên sự ảnh hưởng của bệnh đa số chỉ do vi khuẩn BurDT46 gây ra. Đối với điều kiện ngoài đồng, không những có lây bệnh nhân tạo với dòng vi khuẩn BurDT46 mà còn là không gian mở nên nguồn bệnh trong ruộng có thể hơn một dòng vi khuẩn gây bệnh do nhiều nơi (ruộng lân cận, giống, mầm bệnh trong đất,...) (Kim, 2015), vì vậy nghiệm thức HH TKT đã thể hiện hiệu quả rõ tương tự nghiệm thức ΦBurAG58 trong phòng trị bệnh thối hạt.

Bảng 4.17 Chỉ tiêu năng suất của các nghiệm thức vụ Đông Xuân 2017-2018

Nghiệm thức	Chỉ tiêu năng suất	
	Tỷ lệ hạt chắc/bông (%)	Năng suất thực tế (tấn/ha)
ΦBurAG58	66,32 ^a	3,49 ^a
HH TKT	69,91 ^a	3,70 ^a
Oxolinic axit	64,29 ^{ab}	3,36 ^{ab}
Đối chứng	58,88 ^b	2,97 ^b
Mức ý nghĩa	*	10%
CV (%)	4,35	9,72

Ghi chú: Số liệu được chuyển sang $\arcsin \sqrt{x \pm \frac{1}{4n}}$ trước khi xử lý thống kê. Trong cùng một cột những số có cùng chữ cái theo sau giống nhau thì không khác biệt ở mức ý nghĩa 5% trong phép thử Duncan, (*) khác biệt ở mức ý nghĩa 5%. HH TKT: hỗn hợp 3 TKT (ΦBurVL34, ΦBurAG58, ΦBurDT47a)



Hình 4.12: Hiệu quả của thực khuẩn thể phòng trị bệnh thối hạt lúa do vi khuẩn *B. glumae* DT46 ở thời điểm 10 NSKLB trong vụ Đông Xuân 2017-2018

4.4.2 Hiệu quả của thực khuẩn thể phòng trị bệnh thối hạt do vi khuẩn *Burkholderia glumae* DT46 ở điều kiện ngoài đồng vụ Hè Thu sớm 2018

Trong kết quả sử dụng TKT đơn hay HH TKT ở mật số 10^8 pfu/ml cho hiệu quả phòng trị bệnh thối hạt trên 48% vụ Đông Xuân 2017-2018. Để khẳng định hiệu quả của TKT trong vụ Hè Thu trong năm 2018, tiếp tục bố trí thử nghiệm hiệu quả của TKT đối với bệnh thối hạt vào vụ Hè Thu sớm. Tuy nhiên, trong thí nghiệm này có sự so sánh mật số TKT khác nhau (10^8 và 10^7 pfu/ml) có khả năng ức chế bệnh thối hạt ở điều kiện ngoài đồng nhằm xác định mật số 10^7 pfu/ml có mang lại hiệu quả phòng trừ bệnh không, sẽ góp phần giảm chi phí nhân nuôi và tăng khả năng áp dụng liệu pháp TKT phòng trị bệnh thối hạt khả thi trên diện rộng.

4.4.2.1 Tổng quan thí nghiệm

Vào vụ Hè Thu sớm (2018) là thời điểm vào mùa mưa ở giai đoạn trổ và thu hoạch, nhiệt độ trung bình $27,3^{\circ}\text{C} - 28,4^{\circ}\text{C}$, ẩm độ không khí cao, đây là điều kiện thuận lợi cho bệnh phát triển nên mức độ bệnh thối hạt nhiễm bệnh cao hơn vụ Đông Xuân. Thí nghiệm đánh giá hiệu quả phòng trừ bệnh thối hạt trên lúa của TKT ΦBurAG58 hoặc HH TKT (ΦBurVL34, ΦBurAG58, ΦBurDT47a) ở 2 mật số 10^8 và 10^7 pfu/ml được bố trí theo thể thức khối hoàn toàn ngẫu nhiên một nhân tố ở điều kiện ngoài đồng tại ấp Bình Điền, xã Bình Ninh, huyện Tam Bình, tỉnh Vĩnh Long.

Thí nghiệm được thực hiện trên giống lúa OM4900 với thời gian sinh trưởng 95 – 105 ngày, lúa sinh trưởng và phát triển bình thường trong điều kiện vụ Hè Thu sớm năm 2018. Trong vụ Hè Thu sớm, ruộng lúa xuất hiện một số sâu, bệnh hại như: bệnh đạo ôn lá (20 NSKS), bệnh đốm nâu (35 NSKS), sâu cuốn lá (30 NSKS) và một số sâu bệnh khác nhưng không đáng kể. Vào gần thời điểm xử lý TKT, thời tiết xuất hiện mưa nhiều, đặc biệt vào buổi chiều nên phải tiến hành xử lý TKT và lây bệnh nhân tạo vào buổi sáng (kết thúc xử lý TKT trước 8 giờ 30 phút sáng). Kết quả thí nghiệm được thể hiện qua tỷ lệ hạt bệnh trên bông (Bảng 4.18), mật số TKT trên bông (Bảng 4.19), hiệu quả giảm bệnh (Bảng 4.20) và thành phần năng suất (Bảng 4.21) giữa các nghiệm thức có sự khác biệt ý nghĩa 5% qua các thời điểm khảo sát.

4.4.2.2 Tỷ lệ hạt bệnh trên bông

Kết quả Bảng 4.18 cho thấy các nghiệm thức có xử lý TKT có tỷ lệ hạt bệnh trên bông thấp hơn và khác biệt về ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức đối chứng không có xử lý TKT. Nhìn chung hai nghiệm thức xử lý TKT ΦBurAG58 hoặc HH TKT ở mật số

10^8 pfu/ml cho hiệu quả cao hơn thông qua có tỷ lệ hạt bệnh thấp hơn và khác biệt ý nghĩa so với nghiệm thức đối chứng không xử lý TKT.

Ở thời điểm 10 NSKLB, cả 4 nghiệm thức xử lý TKT và nghiệm thức Oxolinic axit đều có tỷ lệ hạt bệnh trên bông thấp hơn nghiệm thức đối chứng. Tuy nhiên, nghiệm thức HH TKT ở mật số 10^7 pfu/ml không khác biệt ý nghĩa so với nghiệm thức đối chứng (Hình 4.13).

Đến thời điểm 15 NSKLB, tỷ lệ hạt bệnh trên bông của tất cả các nghiệm thức đều tăng, dao động trong khoảng 21,86% đến 38,41%. Trong đó 4 nghiệm thức TKT ở mật số 10^8 và 10^7 pfu/ml và nghiệm thức Oxolinic axit có tỷ lệ hạt bệnh thấp hơn và khác biệt ý nghĩa so với nghiệm thức đối chứng, nghiệm thức xử lý HH TKT mật số 10^7 pfu/ml vẫn không khác biệt so với nghiệm thức đối chứng.

Đến giai đoạn 20 NSKLB, 2 nghiệm thức Φ BurAG58 và HH TKT ở mật số 10^8 pfu/ml có tỷ lệ hạt bệnh trên bông thấp và khác biệt ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức HH TKT mật số 10^7 pfu/ml.

Qua 3 thời điểm khảo sát, có thể thấy tỷ lệ hạt bệnh trên bông ở tất cả nghiệm thức đều tăng. Trong đó, 2 nghiệm thức Φ BurAG58 và HH TKT ở mật số 10^8 pfu/ml lại tăng không đáng kể so với các nghiệm thức còn lại. Cụ thể từ 19,49% lên 23,88% ở nghiệm thức Φ BurAG58 mật số 10^8 pfu/ml và 21,36 lên 26,63% ở nghiệm thức xử lý HH TKT so với đối chứng là tăng từ 35,98% lên 53,42%

Mặt khác, chỉ số AUDPC của các nghiệm thức xử lý TKT và Oxolinic axit đều thấp hơn và khác biệt so với đối chứng. Trong đó chỉ số AUDPC ở 3 nghiệm thức Φ BurAG58 (10^8 và 10^7 pfu/ml), HH TKT (10^8 pfu/ml) thấp hơn và khác biệt so với nghiệm thức HH TKT (10^7 pfu/ml). Cả ba nghiệm thức này tương đương và không khác biệt so với nghiệm thức xử lý Oxolinic axit.

Bảng 4.18 Tỷ lệ hạt bệnh trên bông của các nghiệm thức qua các thời điểm

Nghiệm thức	Tỷ lệ hạt bệnh trên bông (%)			AUDPC
	10 NSKLB	15 NSKLB	20NSKLB	
ΦBurAG58 (10 ⁸ pfu/ml)	19,49 ^b	22,62 ^b	23,88 ^d	213,7 ^c
ΦBurAG58 (10 ⁷ pfu/ml)	18,29 ^b	26,16 ^b	30,48 ^{cd}	233,0 ^c
HH TKT (10 ⁸ pfu/ml)	21,36 ^b	21,86 ^b	26,63 ^d	228,0 ^c
HH TKT (10 ⁷ pfu/ml)	29,05 ^{ab}	30,32 ^{ab}	41,59 ^b	325,0 ^b
Oxolinic axit	22,69 ^b	25,43 ^b	39,83 ^{bc}	276,6 ^{bc}
Đối chứng	35,98 ^a	38,41 ^a	53,42 ^a	409,5 ^a
Mức ý nghĩa	*	*	*	*
CV (%)	17,96	12,14	12,2	17,34

Ghi chú: Số liệu được chuyển sang $\arcsin \sqrt{x \pm \frac{1}{4n}}$ trước khi xử lý số liệu thống kê. Các số trung bình trong cùng một cột những số có cùng chữ cái theo sau giống nhau thì không khác biệt ở mức ý nghĩa 5% trong phép thử Duncan, * khác biệt ở mức ý nghĩa 5%, NSKLB: ngày sau khi lấy bệnh. HH TKT: hỗn hợp 3 TKT (ΦBurVL34, ΦBurAG58, ΦBurDT47a)

4.4.2.3 Khả năng tồn tại của thực khuẩn thể trên bông

Khảo sát sự tồn tại và phát triển của TKT trên bông lúa của các nghiệm thức được biểu hiện qua mật số của từng dòng TKT tại 3 thời điểm khảo sát (0 GSKLB, 24 GSKLB và 7 NSKLB). Kết quả từng thời điểm được thể hiện qua Bảng 4.19.

Tại thời điểm 0 GSKXL, 4 nghiệm thức được xử lý TKT chưa biểu hiện sự khác biệt thông qua log (pfu/g) dao động từ 3,71 – 4,45. Hai nghiệm thức không xử lý TKT là Oxolinic axit và đối chứng không có sự tồn tại TKT chứng tỏ rằng hai nghiệm thức này không có sự nhiễm chéo của các nghiệm thức được xử lý TKT.

Vào thời điểm 24 GSKXL, cả bốn nghiệm thức xử lý TKT có log mật số TKT dao động từ 3,41 đến 4,42 cao hơn và khác biệt với nghiệm thức oxolinic axit và đối chứng với log mật số TKT là 0,00. Trong đó, nghiệm thức xử lý HH TKT ở mật số 10⁸ pfu/ml với log (pfu/ml) là 4,42 cao hơn và khác biệt ý nghĩa thống kê với các nghiệm thức ΦBurAG58 (10⁷pfu/ml, 10⁸pfu/ml) và HH TKT (10⁷pfu/ml) với log mật số TKT (pfu/ml) lần lượt là 3,41; 3,63 và 3,52.

Vào thời điểm 7 NSKLB cả 5 nghiệm thức có log mật số TKT từ 4,49 đến 6,21 tương đương và không khác biệt về mặt thống kê. Tuy nhiên tại thời điểm này nghiệm thức oxolinic axit và đối chứng không được xử lý TKT nhưng có sự tồn tại của TKT có thể do sự nhiễm chéo hoặc ngoài tự nhiên đã có sự xuất hiện TKT tiêu diệt vi khuẩn *B. glumae*.

Bảng 4.19 Mật số thực khuẩn thể trên bông qua các thời điểm khảo sát

Nghiệm thức	Log (pfu/g)	
	0 GSKXL	24 GSKXL
ΦBurAG58 (10 ⁸ pfu/ml)	3,84 ^a	3,41 ^b
ΦBurAG58 (10 ⁷ pfu/ml)	4,45 ^a	3,63 ^b
HH TKT (10 ⁸ pfu/ml)	3,95 ^a	4,42 ^a
HH TKT (10 ⁷ pfu/ml)	3,71 ^a	3,52 ^b
Oxolinic axit	0,00 ^b	0,00 ^c
Đối chứng	0,00 ^b	0,00 ^c
CV (%)	18,17	12,98
Mức ý nghĩa	*	*

*Ghi chú: Các số trung bình trong cùng một cột những số có cùng chữ cái theo sau giống nhau thì không khác biệt ở mức ý nghĩa 5% trong phép thử Duncan, * khác biệt ở mức ý nghĩa 5%, NSKXL: ngày sau khi xử lý. HH TKT: hỗn hợp 3 TKT (ΦBurVL34, ΦBurAG58, ΦBurDT47a)*

4.4.2.4 Hiệu quả giảm bệnh

Ở thời điểm 10 và 15 NSKLB, Bảng 4.20 đã ghi nhận tất cả các nghiệm thức đều cho hiệu quả giảm bệnh tương đương với nhau, không có sự khác biệt về ý nghĩa thống kê của hiệu quả giảm bệnh giữa các nghiệm thức. Hiệu quả giảm bệnh dao động từ 18,31% – 47,68% ở thời điểm 10 NSKLB và từ 21,25% - 43,13% ở thời điểm 15 NSKLB.

Đến thời điểm 20 NSKLB, 2 nghiệm thức ΦBurAG58 và HH TKT ở mật số 10⁸ pfu/ml vẫn có phần trăm hiệu quả giảm bệnh cao nhất nhưng thời điểm này 2 nghiệm thức này có sự khác biệt ý nghĩa so với 2 nghiệm thức HH TKT ở mật số 10⁷ pfu/ml và Oxolinic axit, hiệu quả tương đương so với nghiệm thức ΦBurAG58 mật số 10⁷pfu/ml.

Nhìn chung, qua 3 thời điểm khảo sát trong 4 nghiệm thức xử lý TKT có 3 nghiệm thức gồm ΦBurAG58 (10⁸ và 10⁷ pfu/ml), hoặc HH TKT (10⁸ pfu/ml) đều cho hiệu quả giảm bệnh từ 49,62% đến 55,46% ở thời điểm 20 NSKLB. Trong đó, 2 nghiệm thức ΦBurAG58 và HH TKT (10⁸ pfu/ml) cho hiệu quả cao nhất và ổn định qua các thời điểm. Như vậy, qua kết quả cho thấy khi xử lý TKT ở mật số càng cao thì hiệu quả giảm bệnh càng tốt. Theo Balogh (2007), mật số thực khuẩn thể có ảnh hưởng tới hiệu quả phòng trị bệnh cây trồng do vi khuẩn gây ra. Các nghiên cứu cho thấy thực khuẩn thể cần được áp dụng ở mật số cao sẽ kiểm soát hiệu quả bệnh. Tác giả đã áp dụng huyền phù thực khuẩn thể với mật số 10⁶ và 10⁸ pfu/ml làm giảm đáng kể bệnh đốm vi khuẩn trên cà chua, ngược lại áp dụng huyền phù TKT với mật số 10⁴ pfu/ml thì không có kết quả khả quan. Qua Bảng 4.20 thấy rằng hai nghiệm thức xử lý TKT cho hiệu quả giảm bệnh cao hơn

nghiệm thức Oxolinic axit và có thể thay thế dần biện pháp hóa học trong phòng trừ bệnh hại cây trồng.

Bảng 4.20 Hiệu quả giảm bệnh thời hạt của thực khuẩn thể qua các thời điểm khảo sát

Nghiem thức	Hiệu quả giảm bệnh (%)		
	10 NSKLB	15 NSKLB	20 NSKLB
ΦBurAG58 (10 ⁸ pfu/ml)	43,76	40,97	55,46 ^a
ΦBurAG58 (10 ⁷ pfu/ml)	47,68	31,78	44,16 ^{ab}
HH TKT (10 ⁸ pfu/ml)	39,69	43,13	49,62 ^a
HH TKT (10 ⁷ pfu/ml)	18,31	21,25	21,92 ^b
Oxolinic axit	39,37	33,78	25,58 ^b
Mức ý nghĩa	ns	ns	*
CV (%)	54,27	50,73	38

Ghi chú: Số liệu được chuyển sang $\arcsin \sqrt{x \pm \frac{1}{4n}}$ trước khi xử lý số liệu thống kê. Các số trung bình trong cùng một cột những số có cùng chữ cái theo sau giống nhau thì không khác biệt ở mức ý nghĩa 5% trong phép thử Duncan, * khác biệt ở mức ý nghĩa 5%, NSKLB: ngày sau khi lây bệnh. HH TKT: hỗn hợp 3 TKT (ΦBurVL34, ΦBurAG58, ΦBurDT47a)

4.4.2.5 Ảnh hưởng của các nghiệm thức xử lý thực khuẩn thể đến tỷ lệ hạt chắc và năng suất thực tế

Kết quả Bảng 4.21 cho thấy các nghiệm thức xử lý TKT và thuốc hóa học Oxolinic axit đều có thành phần năng suất cao hơn và khác biệt so với nghiệm thức đối chứng. Ngoài ra, 2 nghiệm thức xử lý TKT ΦBurAG58 (10⁸ pfu/ml) và HH TKT (10⁸ pfu/ml) khác biệt về ý nghĩa thống kê ở một số chỉ tiêu năng suất so với các nghiệm thức còn lại.

Về chỉ tiêu tỷ lệ hạt chắc, tất cả các nghiệm thức xử lý TKT đều có tỷ lệ hạt chắc cao hơn và khác biệt ý nghĩa thống kê so với đối chứng. Hai nghiệm thức HH TKT và ΦBurAG58 ở mật số 10⁸ pfu/ml có tỷ lệ hạt chắc lần lượt là 77,55% và 73,60% cao hơn và khác biệt so với nghiệm thức Oxolinic axit.

Về năng suất thực tế, tất cả các nghiệm thức đều có năng suất cao hơn và khác biệt so với nghiệm thức đối chứng. Trong đó, nghiệm thức HH TKT ở mật số 10⁸ pfu/ml có năng suất cao nhất (3,67 tấn/ha) và khác biệt so với HH TKT (2,94 tấn/ha), tuy nhiên lại không khác biệt so với nghiệm thức xử lý TKT ΦBurAG58 ở mật số 10⁸ pfu/ml (3,30 tấn/ha) và Oxolinic axit (3,26 tấn/ha).

Bảng 4.21 Chỉ tiêu năng suất lúa vụ Hè Thu Sớm 2018

Nghiệm thức	Chỉ tiêu năng suất	
	Tỷ lệ hạt chắc/bông (%)	Năng suất thực tế (tấn/ha)
ΦBurAG58 (10 ⁸ pfu/ml)	73,60 ^{ab}	3,30 ^{ab}
ΦBurAG58 (10 ⁷ pfu/ml)	60,04 ^c	2,91 ^b
HH TKT (10 ⁸ pfu/ml)	77,55 ^a	3,67 ^a
HH TKT (10 ⁷ pfu/ml)	56,83 ^c	2,94 ^b
Oxolinic axit	65,28 ^{bc}	3,26 ^{ab}
Đối chứng	46,62 ^d	1,67 ^c
Mức ý nghĩa	*	*
CV(%)	9,96	14,43

Ghi chú: Các số trung bình trong cùng một cột những số có cùng chữ cái theo sau giống nhau thì không khác biệt ở mức ý nghĩa 5% trong phép thử Duncan, * khác biệt ở mức ý nghĩa 5%, NSKLB: ngày sau khi lây bệnh. HH TKT: hỗn hợp 3 TKT (ΦBurVL34, ΦBurAG58, ΦBurDT47a)

Tóm lại qua kết quả đánh giá hiệu quả phòng trị bệnh thối hạt lúa bằng TKT qua 2 vụ lúa (Đông Xuân và Hè Thu sớm) đã nhận thấy rằng TKT đơn hay HH TKT có hiệu quả phòng trị bệnh trong điều kiện lây bệnh nhân tạo dòng vi khuẩn *B. glumae* DT46 và tương đương thuốc hóa học. Đặc biệt HH TKT phát huy hiệu quả rõ hơn sử dụng TKT đơn có thể liên quan đến khả năng kí sinh của HH TKT vì ngoài dòng vi khuẩn *B. glumae* DT46 được lây bệnh nhân tạo thì ở điều kiện ngoài đồng là một không gian mở nên có thể tồn tại nhiều dòng vi khuẩn *B. glumae* khác nhau, vì thế HH TKT đã sở hữu nhiều cơ chế kí sinh khác nhau nên HH TKT gia tăng hiệu quả hơn TKT đơn. Ngoài ra, từ kết quả so sánh bốn mật số TKT khác nhau (gồm 10⁵ pfu/ml, 10⁶ pfu/ml, 10⁷ pfu/ml, 10⁸ pfu/ml) trong kết quả nhà lưới đã tìm ra mật số 10⁸ pfu/ml là mật số TKT cho hiệu quả phòng trị cao nhất và khác biệt với ba mật số TKT còn lại nên đây là mật số TKT tối ưu để phòng trị bệnh thối hạt và dễ dàng nhân nuôi đạt mật số khi áp dụng vào sản xuất. Cuối cùng, thật may mắn TKT thuộc họ *Podoviridae* là họ có thể thích ứng cao trong điều kiện khô hạn và xử lý TKT vào bông lúa thì mật số TKT giảm nhưng duy trì và thể hiện hiệu quả cao. Chính vì ba lý do trên nên nhận thấy rằng HH TKT luôn thể hiện hiệu quả phòng trị bệnh thối hạt lúa cả hai vụ Đông Xuân và Hè Thu sớm. Bên cạnh đó, ưu điểm của việc áp dụng TKT sẽ không gây ô nhiễm môi trường, không ảnh hưởng đến sức khỏe con người, và đặc biệt là không tiêu diệt các vi khuẩn có lợi. Kết quả nghiên cứu này đã khẳng định được hiệu quả của thực khuẩn thể trong phòng trị bệnh thối hạt trên lúa ở điều kiện ngoài

đồng, mở ra hướng ứng dụng liệu pháp TKT trong phòng trừ bệnh hại vi khuẩn trong điều kiện canh tác lúa theo hướng hữu cơ ở Việt nam.

Vì vậy, từ kết quả nghiên cứu này có thể đề xuất để phòng trị bệnh thối hạt do vi khuẩn *B. glumae* ở điều kiện ngoài đồng nên phun thực khuẩn thể hai lần: (1) giai đoạn lúa vừa mới trổ (trổ khoảng 5%) vào buổi chiều ở mật số 10^8 pfu/ml và (2) giai đoạn lúa trổ đều sẽ cho hiệu quả giảm bệnh tương đương hoặc cao hơn thuốc hóa học axit oxolinic.



ΦBurAG58 (10^8 pfu/ml)



ΦBurAG58 (10^7 pfu/ml)



HH TKT (10^8 pfu/ml)



HH TKT (10^7 pfu/ml)



Oxolinic axit



Đôi chứng

Hình 4.13: Hiệu quả của TKT phòng trị bệnh thối hạt lúa do vi khuẩn *B. glumae* DT46 vào thời điểm 10 NSKLB trong vụ Hè Thu sớm 2018

4.5 Nội dung 5: Khảo sát điều kiện nhân nuôi thực khuẩn thể triển vọng

Dựa vào hiệu quả phòng trừ bệnh thối hạt của TKT ở điều kiện ngoài đồng cao cùng với tính an toàn của các dòng TKT này, thấy rằng đây là một tác nhân phòng trừ sinh học tiềm năng nhằm ứng dụng vào thực tế sản xuất nhằm giảm lượng thuốc hóa học được sử dụng vào giai đoạn lúa trở lẹc xọc hoặc lúa trở đều vào vụ Hè Thu và Thu Đông. Thực tế, phương pháp nhân nuôi TKT được sử dụng trong các thí nghiệm trên đạt mật số TKT chỉ đủ để sử dụng ở diện tích hẹp. Vì vậy để tăng khả năng ứng dụng TKT vào thực tế sản xuất cần tiếp tục khảo sát các điều kiện nhân nuôi TKT nhằm đạt được mật số cao. Vì vậy, tiếp tục khảo sát một số điều kiện nhân nuôi ảnh hưởng mật số TKT như môi trường tối hảo, thời điểm cấy vi khuẩn kí chủ, chỉ số MOI và nhiệt độ là những yếu tố chủ yếu để thiết lập mật số TKT cao.

4.5.1 Kết quả khảo sát các loại môi trường lên khả năng nhân mật số thực khuẩn thể

Kết quả khảo sát mật số của dòng TKT Φ BurAG58 trên 4 loại môi trường gồm King's B, Nutrient, PDA, và PDA + peptone khác nhau ở mức ý nghĩa 5% qua các thời điểm khảo sát (Bảng 4.22).

Ở thời điểm 24 giờ sau khi bố trí, ba loại môi trường gồm King's B, Nutrient, PDA+ Peptone cho log mật số TKT lần lượt là 10, 41; 10, 43 và 10, 67 cao hơn và khác biệt với môi trường PDA với log mật số TKT là 9,52.

Tương tự thời điểm 48 giờ, 72 giờ và 96 giờ, ba loại môi trường gồm King's B, Nutrient, PDA+ Peptone cho log mật số TKT cao hơn và khác biệt với môi trường PDA.

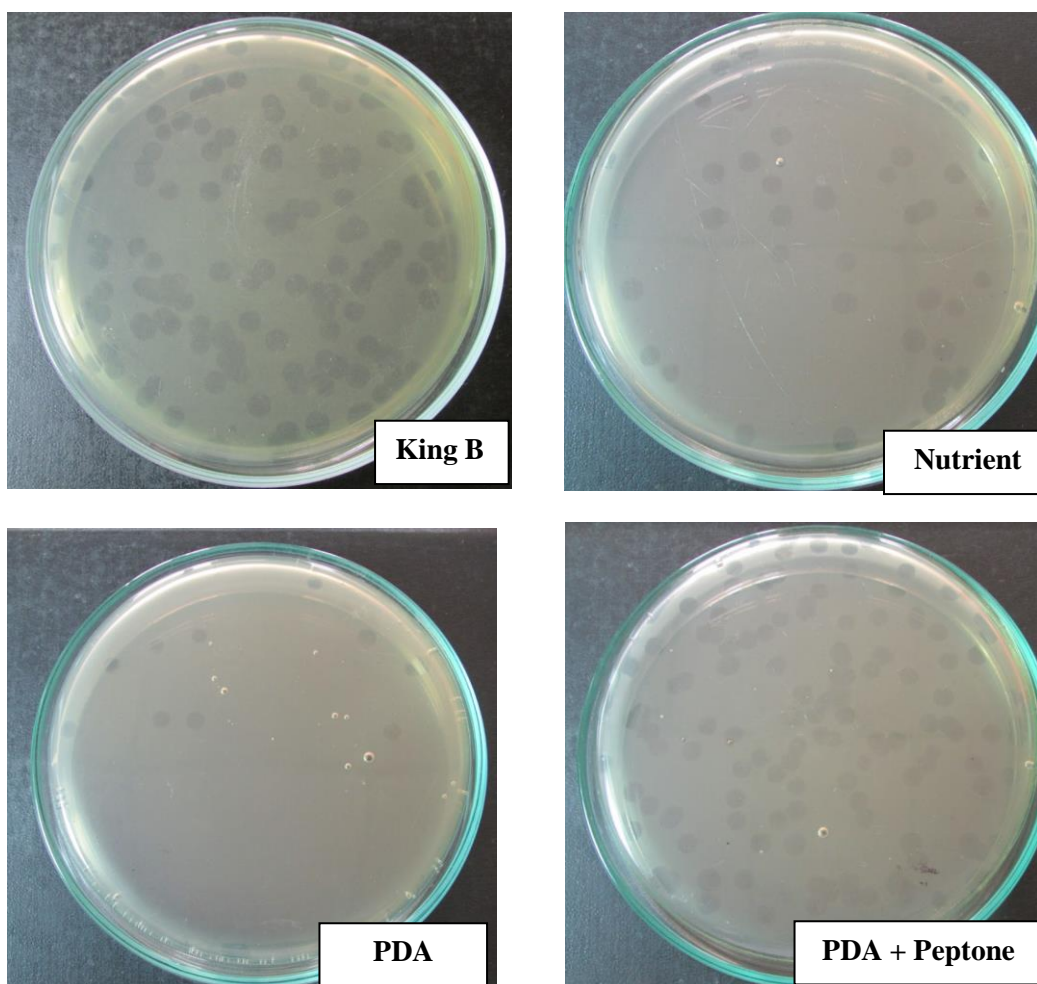
Tóm lại, qua kết quả khảo sát bốn loại môi trường (King's B, Nutrient, PDA, và PDA + peptone) có ba loại môi trường là King's B, Nutrient và PDA + peptone cho log mật số TKT cao và tương đương nhau ở thời điểm 24 giờ sau khi bố trí, tuy nhiên qua các thời điểm sau log mật số TKT giảm. Về mặt dinh dưỡng cả ba loại môi trường có hàm lượng dinh dưỡng cao như King's B, Nutrient, và PDA+ peptone với thành phần peptone là điều kiện thích hợp nhân nuôi vi khuẩn. Tương tự theo nghiên cứu của Kim *et al.*, (2021) thấy rằng peptone ảnh hưởng đến sự hấp phụ của TKT vào vi khuẩn *Staphylococcus aureus* cụ thể khi bổ sung peptone (0,4g/lít) vào môi trường sẽ gia tăng 100 lần khả năng TKT hấp phụ vào vi khuẩn kí chủ, do đó có thể là lí do mà ba loại môi trường này có log mật số TKT cao. Đối với môi trường PDA có thể dinh dưỡng không thích hợp cho vi khuẩn phát triển (không chứa peptone) cũng như không có chất hỗ trợ TKT hấp phụ vào vi khuẩn vì vậy có thể là lí do môi trường PDA có log mật số TKT thấp

hơn và khác biệt với môi trường còn lại. Tóm lại, chọn môi ba loại môi trường gồm King's B, Nutrient, hoặc PDA + peptone cho các nghiên cứu nhân nuôi TKT tiếp theo. Tuy nhiên, về kinh tế cũng như vật liệu sẵn có trong nghiên cứu, tiếp tục sử dụng môi trường King's B cho các nghiên cứu tiếp theo.

Bảng 4.22 Ảnh hưởng các loại môi trường đến mật số thực khuẩn thể Φ BurAG58

Nghiệm thức	Log (pfu/ml)			
	24 giờ	48 giờ	72 giờ	96 giờ
King's B	10,41 ^a	10,31 ^a	10,19 ^a	9,95 ^a
Nutrient	10,43 ^a	10,25 ^a	9,84 ^{ab}	9,65 ^a
PDA	9,52 ^b	9,49 ^b	9,19 ^b	8,35 ^b
PDA + Peptone	10,67 ^a	10,42 ^a	10,05 ^a	10,07 ^a
Mức ý nghĩa	*	*	*	*
CV (%)	1,65	2,68	3,60	4,0

Ghi chú: Trong cùng một cột những số có cùng chữ cái theo sau giống nhau thì không khác biệt ở mức ý nghĩa 5% trong phép thử Duncan khác biệt ở mức ý nghĩa 5%*



Hình 4.14: Mật số thực khuẩn thể trên bốn loại môi trường với hệ số pha loãng 10^{-7} tại thời điểm 72 giờ sau khi bố trí

4.5.2 Kết quả khảo sát thời gian cấy thực khuẩn thể lên khả năng nhân mật số thực khuẩn thể

Kết quả khảo sát thời gian cấy TKT ΦBurAG58 trên môi trường King's B (lông và 0,8% agar) được thể hiện tại Bảng 4.23 qua ba thời điểm khảo sát (24 giờ, 48 giờ và 72 giờ), giữa các nghiệm thức có sự khác biệt ở mức ý nghĩa 5%.

Về thời điểm nuôi cấy TKT ΦBurAG58, qua trung bình thời điểm gồm cấy vi khuẩn trước 16 giờ sau đó bổ sung TKT và cấy TKT cùng lúc cấy vi khuẩn đã ghi nhận cấy vi khuẩn trước 16 giờ sau đó bổ sung TKT có log mật số TKT cao hơn và khác biệt với nghiệm thức cấy vi khuẩn và TKT cùng lúc qua ba thời điểm ghi nhận (24 giờ, 36 giờ và 48 giờ).

Về môi trường nuôi cấy TKT ΦBurAG58, qua trung bình hai dạng môi trường King's B lông và 0,8% agar qua ba thời điểm đã nhận thấy rằng môi trường King's B lông có log mật số TKT cao hơn và khác biệt với môi trường King's B 0,8% agar.

Do có sự tương tác giữa môi trường và thời điểm cấy vi khuẩn nên một số nghiệm thức có sự khác biệt so với trung bình. Cụ thể qua ba thời điểm 24, 48 và 72 giờ sau khi nhân nuôi, trong điều kiện nuôi cấy vi khuẩn và TKT cùng lúc thì môi trường King's B lông và môi trường 0,8% agar không khác nhau về mật số TKT thu được và khác so với trung bình. Ngoài ra ở thời điểm 48 giờ, trong cùng loại môi trường nuôi cấy King's B 0,8% agar thì thời điểm cấy vi khuẩn trước 16 giờ và cấy vi khuẩn cùng lúc TKT thì mật số TKT nhân nuôi đạt được không khác biệt nhau và khác so với trung bình.

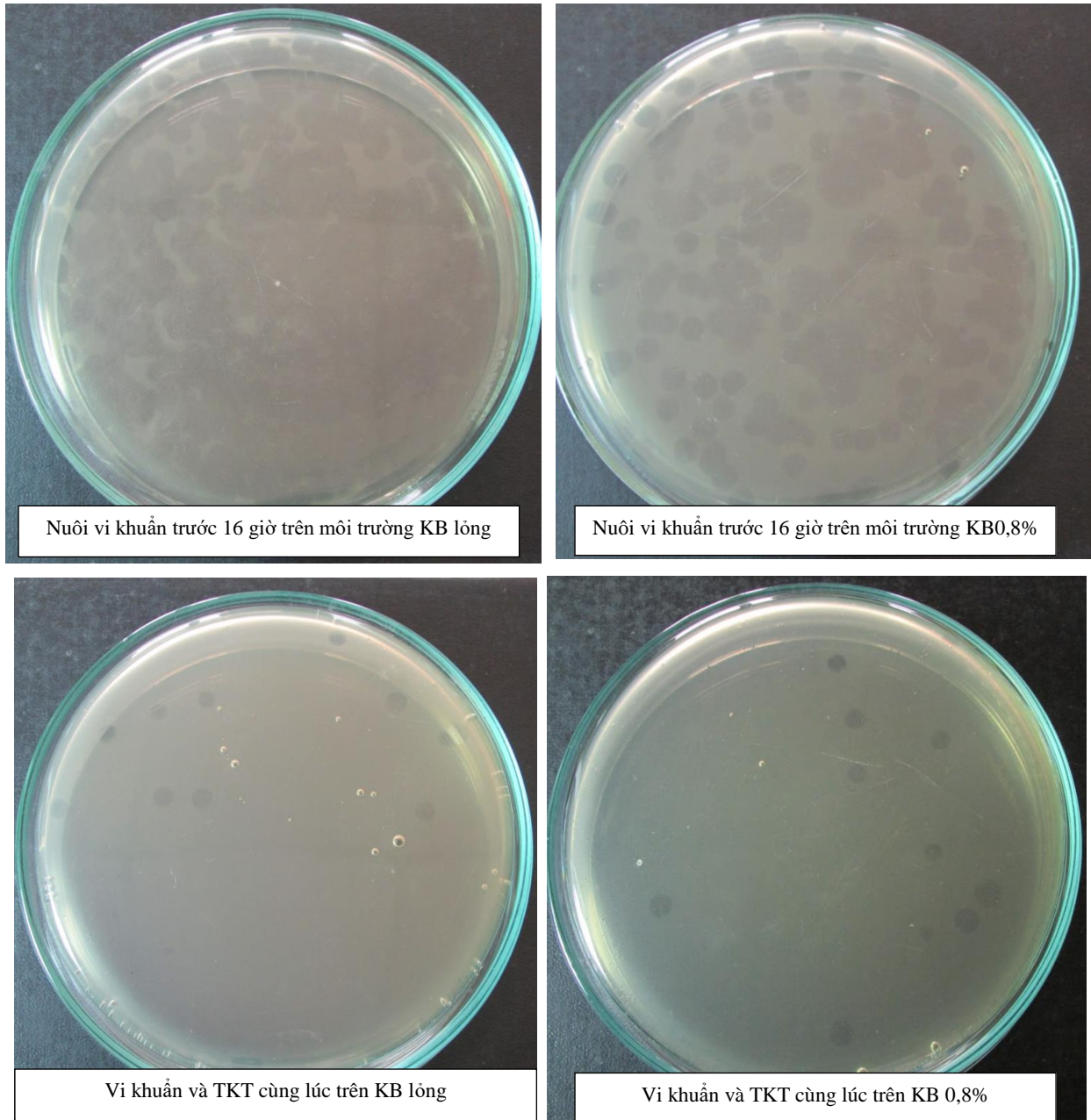
Tóm lại, qua kết quả khảo sát hai thời điểm cấy TKT (cấy vi khuẩn trước 16 giờ và cấy TKT cùng lúc vi khuẩn) trên môi trường King's B ở hai dạng lông và 0,8% agar đã tìm ra cấy vi khuẩn trước 16 giờ trên môi trường lông cho log mật số TKT cao hơn và khác biệt với các điều kiện còn lại. Bên cạnh đó, nhân nuôi TKT trên môi trường King's B lông có mật số TKT cao hơn trên môi trường King's B 0,8% agar.

Bảng 4.23 Ảnh hưởng điều kiện nhân nuôi đến mật số thực khuẩn thể Φ BurAG58

Tổ hợp nghiệm thức	Log (mật số TKT, pfu/ml) ở các thời gian nhân nuôi		
	24 giờ	36 giờ	48 giờ
Môi trường lỏng/trước 16 giờ	10,43 ^a	10,65 ^a	9,35 ^a
Môi trường 0,8% agar/ trước 16 giờ	9,02 ^b	8,47 ^b	8,07 ^b
Môi trường lỏng/cùng lúc	7,60 ^c	7,90 ^b	7,57 ^c
Môi trường 0,8% agar/ cùng lúc	7,52 ^c	8,12 ^b	7,60 ^c
TB(A): Dạng môi trường			
Môi trường lỏng	9,01 ^A	9,27 ^A	8,46 ^A
Môi trường 0,8% agar	8,27 ^B	8,30 ^B	7,83 ^B
TB(B): thời điểm cấy vi khuẩn			
Cấy vi khuẩn trước 16 giờ	9,75 ^A	9,56 ^A	8,71 ^A
Cấy vi khuẩn và TKT cùng lúc	7,56 ^B	8,13 ^B	7,58 ^B
F(A): Môi trường	**	**	**
F(B): Thời gian cấy vi khuẩn	**	**	**
F(AXB)	**	**	**
CV(%)	3,03	3,89	4,99

Ghi chú: Số liệu được chuyển sang log (mật số) trước khi xử lý thống kê. Các số trung bình trong cùng một cột theo sau bởi những chữ cái giống nhau thì không khác biệt ở mức ý nghĩa 1% trong phép thử Duncan.

** : khác biệt mức ý nghĩa 1%;



Hình 4. 15: Mật số thực khuẩn thể ở các nghiệm thức với hệ số pha loãng 10^{-6} tại thời điểm 24 giờ

4.5.3 Kết quả khảo sát chỉ số MOI ảnh hưởng đến khả năng nhân mật số của dòng thực khuẩn thể triển vọng

Kết quả khảo sát chỉ số MOI (0,01; 0,1 và 1) đến mật số TKT ΦBurAG58 cũng như chỉ số OD_{600nm} thể hiện độ đục của huyền phù vi khuẩn chỉ thị cho mật số vi khuẩn trong môi trường lỏng thể hiện qua Bảng 4.24 thấy rằng cả ba chỉ số có sự khác biệt ý nghĩa 5% cụ thể như sau:

Vào thời điểm 6 giờ sau khi bố trí thấy rằng cả ba chỉ số MOI (0,01; 0,1 và 1) có log mật số TKT từ 8,54 đến 9,18 tương đương và không khác biệt ở mức ý nghĩa 5%.

Đến thời điểm 24 giờ sau khi bố trí, giữa ba chỉ số có sự khác biệt nhau với log mật số TKT dao động từ 9,08 đến 10,00. Trong đó chỉ số MOI là 1,0 cho log mật số TKT bằng 10,00 cao hơn và khác biệt với chỉ số MOI là 0,01 và 0,1 với log mật số TKT lần lượt là 9,08 và 9,18.

Song song đó, vào thời điểm 6 giờ sau khi bố trí cũng được thể hiện qua giá trị OD_{600nm} giữa các nghiệm thức có sự khác biệt ý nghĩa 5%. Trong đó chỉ số OD là 1,00 có giá trị OD là 0,43 cao hơn và khác biệt với chỉ số MOI với chỉ số 0,001 và 0,1 với giá trị OD lần lượt là 0,24 và 0,26.

Đến thời điểm 24 giờ sau khi bố trí cả hai nghiệm thức có chỉ số MOI là 0,1 và 1,0 có giá trị OD lần lượt là 1,48 và 1,48 cao hơn và khác biệt với chỉ số MOI là 0,01 với giá trị OD là 0,86.

Tóm lại, qua ba chỉ số MOI (0,01, 0,1 và 1,0) qua 2 thời điểm khảo sát 6 giờ và 24 giờ sau khi bố trí nhận thấy rằng chỉ số MOI bằng 1,0 cho log mật số TKT cao hơn hai chỉ số MOI 0,01 và 0,1. Bên cạnh đó, giá trị OD ở chỉ số MOI là 1,0 cao hơn hai chỉ số còn lại vào thời điểm 6 giờ vì OD thể hiện qua độ đục huyền phù mà chỉ số MOI bằng 1,0 tức là mật số TKT bằng với mật số vi khuẩn ban đầu thêm vào môi trường thử nghiệm cho nên độ đục huyền phù môi trường đục hơn hai nghiệm thức còn lại với chỉ số OD lần lượt là 0,01 và 0,1. Tương tự đến thời điểm 24 giờ sau khi bố trí vi khuẩn kí chủ tiếp tục gia tăng mật số thông qua giá trị OD cao thể hiện qua chỉ số MOI bằng 0,1 và 1,0 tương quan thuận với mật số TKT ở chỉ số MOI bằng 1,0 cao hơn hai nghiệm thức còn lại.

Bảng 4.24 Ảnh hưởng của chỉ số MOI đến mật số thực khuẩn thể ΦBurAG58 và OD

Nghiệm thức	OD		Log (pfu/ml)	
	6 giờ	24 giờ	6 giờ	24 giờ
0,01	0,24 ^b	0,86 ^b	8,54	9,08 ^b
0,1	0,26 ^b	1,48 ^a	8,57	9,18 ^b
1,0	0,43 ^a	1,48 ^a	9,18	10,00 ^a
Mức ý nghĩa	*	*	ns	*
CV (%)	21,93	6,94	3,86	1,01

Ghi chú: Trong cùng một cột những số có cùng chữ cái theo sau giống nhau thì không khác biệt ở mức ý nghĩa 5% trong phép thử Duncan* khác biệt ở mức ý nghĩa 5%

4.5.4 Kết quả khảo sát nhiệt độ ảnh hưởng đến khả năng nhân mật số thực khuẩn thể triển vọng

Kết quả Bảng 4.25 log mật số TKT ΦBurAG58 được khảo sát ở 3 nhiệt độ gồm 27°C, 30°C và 37°C qua 4 thời điểm ghi nhận, các nghiệm thức có sự khác biệt ở thời điểm 3 giờ và 24 giờ sau khi bố trí. Tuy nhiên, tại thời điểm 6 giờ và 12 giờ giữa các nghiệm thức không có sự khác biệt ý nghĩa.

Đến thời điểm 6 giờ và 12 giờ giữa ba nhiệt độ không khác biệt ý nghĩa về mật thống kê 5%.

Đến thời điểm 24 giờ sau khi bố trí, nhiệt độ 30°C cho log mật số TKT ΦBurAG58 cao hơn và khác biệt với nhiệt độ 27°C và 37°C

Tóm lại, nhiệt độ 30°C là nhiệt độ thích hợp cho TKT ΦBurAG58 hơn nhiệt độ 27°C và 37°C thông qua log mật số TKT cao và ổn định qua các thời điểm quan sát. Có thể nhiệt độ 30°C là nhiệt độ mà TKT ΦBurAG58 tiếp xúc dễ dàng với vi khuẩn *B. glumae*.

Bảng 4.25 Mật số thực khuẩn thể chịu ảnh hưởng bởi nhiệt độ qua các thời điểm khảo sát

Nghiệm thức	Log (pfu/ml)		
	6 giờ	12 giờ	24 giờ
27°C	9,97	9,20	9,26 ^b
30°C	10,13	9,16	9,62 ^a
37°C	9,74	9,00	8,96 ^c
Mức ý nghĩa	ns	ns	*
CV (%)	2,24	1,69	1,47

Ghi chú: Trong cùng một cột những số có cùng chữ cái theo sau giống nhau thì không khác biệt ở mức ý nghĩa 5% trong phép thử Duncan* khác biệt ở mức ý nghĩa 5%

Về kết quả khảo sát môi trường nhân nuôi TKT thấy rằng TKT ΦBurAG58 nuôi trong môi trường King'B lỏng, Nutrient, PDA + Peptone cho mật số cao. Ngoài ra, thời điểm cấy vi khuẩn trước 16 giờ cho mật số TKT cao hơn cấy TKT cùng lúc vi khuẩn vì TKT là virus kí sinh chuyên tính tế bào vi khuẩn một cách bị động, cụ thể các bộ phận cấu tạo nên virus không có chức năng bơi tìm vi khuẩn kí chủ vì vậy mật số TKT cao hay thấp phụ thuộc rất nhiều vào mật số vi khuẩn kí chủ. Nếu mật số của vi khuẩn thấp hơn 10^4 - 10^6 cfu/ml thì TKT không thể hấp phụ vào tế bào vi khuẩn (Balogh *et al.*, 2010). Trong thí nghiệm này gia tăng mật số vi khuẩn bằng cách nuôi vi khuẩn trước 16 giờ sau đó bổ sung TKT nên mật số TKT cao hơn nghiệm thức bổ sung TKT và vi khuẩn cùng lúc. Kết quả này tương tự Rajnovic *et al.*, (2019) cũng đã khảo sát nhiều mật số vi khuẩn khác nhau (10^6 , 10^7 , 10^8 cfu/ml) với nhiều mật số TKT khác nhau được thể hiện qua giá trị OD. Kết quả nhận thấy bổ sung vi khuẩn vào môi trường ở mật số 10^8 cfu/ml sau khoảng 15 phút mật số TKT gia tăng trong khi bổ sung vi khuẩn ở mật số 10^7 cfu/ml thì TKT bắt đầu phân giải vi khuẩn khoảng 60 phút sau khi bố trí, tiếp tục ông đã bổ sung vi khuẩn ở mật số 10^6 cfu/ml đến khoảng 120 phút sau TKT mới bắt đầu phân giải vi khuẩn. Do đó với thí nghiệm này gia tăng mật số vi khuẩn kí chủ ngay thời điểm ban đầu là một trong những yếu tố quyết định mật số TKT cao hay thấp. Hơn nữa mật số vi khuẩn gia tăng cao cũng liên quan đến bản chất của môi trường nuôi cấy. Rõ ràng trong thí nghiệm này TKT được nuôi trong môi trường lỏng ở điều kiện lắc 100 rpm/phút để tăng mật số vi khuẩn kí chủ hơn môi trường 0,8% agar trong đĩa thạch. Vì vậy, mật số TKT cao khi bổ sung vi khuẩn trước 16 giờ trong môi trường lỏng ở điều kiện lắc 100 rpm/phút.

Về chỉ số MOI trong thí nghiệm này với chỉ số MOI là 1,0 cho mật số TKT cao vào thời điểm 24 giờ sau khi bố trí. Kết quả này có thể liên quan đến khả năng TKT hấp phụ vào vi khuẩn kí chủ vì mật số TKT càng cao tức nghĩa tỷ lệ gặp nhau giữa TKT với vi khuẩn càng cao nên chỉ số MOI là 1 có mật số TKT cao hơn chỉ số MOI là 0,01 và 0,1 vào thời điểm 24 giờ.

Về nhiệt độ ảnh hưởng đến khả năng nhân mật số TKT, trong thí nghiệm này nhiệt độ 30°C cho mật số TKT cao hơn nhiệt độ 27°C và 37°C . Thấy rằng ở nhiệt độ tối hảo để vi khuẩn *B. glumae* phát triển là 37°C (Ham *et al.*, 2011; Zhou-qi *et al.*, 2016) nhưng nhiệt độ này lại cho mật số TKT thấp hơn nhiệt độ 30°C . Lý do có thể liên quan đến màng bảo vệ sinh học (biofilm formation) của vi khuẩn *B. glumae*. Theo Pires *et al.*, (2021) thấy rằng màng bảo vệ sinh học hình thành từ vi khuẩn là một trở ngại lớn cho TKT khuếch tán và hấp phụ vào vi khuẩn do đó có thể ở nhiệt độ 37°C vi khuẩn *B. glumae* đã thiết lập màng bảo vệ sinh học nên TKT khó tiếp cận dẫn đến mật số TKT thấp. Cụ thể một nghiên cứu của González *et al.*, (2018) về ảnh hưởng của màng biofilm đến khả năng khuếch tán

cũng như xâm nhập của 2 loại staphylophages (vB_SauM_phiIPLA-RODI và vB_SepM_phiIPLA-C1C). Kết quả ghi nhận rằng khả năng 2 TKT này xâm nhập vào vi khuẩn chịu ảnh hưởng bởi nhiều yếu tố như mật số TKT ban đầu, sự hấp phụ của TKT vào vi khuẩn kí chủ, sự miễn cảm của vi khuẩn. Do đó khi màng biofilm hình thành là một trong những trở ngại lớn nhằm phát triển một chế phẩm sinh học từ TKT. Do vậy nhiệt độ là một trong những yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến sự hình thành màng biofilm đến khả năng phân giải vi khuẩn. Vì thế 3 mức độ nhiệt độ trong thí nghiệm này một phần nào đó nói lên những trở ngại cũng như yếu tố ảnh hưởng gián tiếp đến nghiên cứu mật số TKT ΦBurAG58 cao hay thấp.

Tóm lại, qua các thí nghiệm về điều kiện nuôi cấy TKT ΦBurAG58 đã khảo sát nhận thấy rằng TKT thích hợp môi trường giàu dinh dưỡng chứa thành phần peptone cũng như dạng môi trường lỏng thích hợp cho mật số TKT cao. Ngoài ra yếu tố mật số vi khuẩn kí chủ ban đầu, nhiệt độ và chỉ số MOI cũng là ba yếu tố cũng rất quan trọng góp phần nhân nuôi mật số TKT cao nhằm gia tăng mật số TKT để phát triển sản phẩm TKT trong tương lai giảm thiểu thuốc hóa học cũng đồng thời hạn chế sự kháng của vi khuẩn.

CHƯƠNG 5. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ XUẤT

5.1 Kết luận

- Phân lập được 112 dòng TKT và 60 dòng vi khuẩn gây bệnh thối hạt tại chín tỉnh đồng bằng sông Cửu Long của Việt Nam.

- Đã chọn được 8 dòng thực khuẩn thể (ΦBurTV25a, ΦBurDT46, ΦBurDT47a, ΦBurDT47b, ΦBurDT48a, ΦBurVL34, ΦBurVL39, ΦBurAG58) có phổ kí sinh rộng trên 75% trong tổng số vi khuẩn gây bệnh thối hạt.

- Xác định 6 dòng vi khuẩn gồm BurVL21, BurDT46, BurDT50, BurDT51, BurKG52 và BurKG57 mẫn cảm với các dòng thực khuẩn thể phân lập khoảng trên 55%, đồng thời xác định được 6 dòng vi khuẩn này là loài *Burkholderia glumae* bằng kỹ thuật sinh học phân tử với cặp mồi đặc hiệu 1416S/1414A. Trong đó, dòng vi khuẩn BurDT46 được phân lập tại Đồng Tháp gây bệnh thối hạt cao hơn các dòng vi khuẩn còn lại trên giống lúa OM4900 trong điều kiện nhà lưới

- Tuyển chọn được 4 dòng TKT (ΦBurAG58, ΦBurDT47a, ΦBurDT48a, ΦBurVL34) có khả năng phân giải *B. glumae* DT46 gây hại cao nhất.

- Bốn dòng TKT đơn (ΦBurVL 34, ΦBurAG58, ΦBurDT47a và ΦBurDT48a) cũng như hỗn hợp 4 dòng TKT đều cho hiệu quả giảm bệnh thối hạt trên 31% ở điều kiện nhà lưới. Trong đó, dòng TKT ΦBurAG58 cho hiệu quả giảm bệnh cao trên 70% khác biệt so với các nghiệm thức còn lại. Ngoài ra mật số TKT ở 10^8 pfu/ml với thời điểm áp dụng TKT 2 giờ trước khi lây bệnh hay phun TKT kết hợp 2 giờ trước khi lây bệnh và 5 ngày sau khi lây bệnh cho hiệu quả giảm bệnh cao.

- Về hình thái của cả 3 dòng TKT (ΦBurVL 34, ΦBurAG58 và ΦBurDT47a) dưới kính hiển vi điện tử (TEM) có đầu là khối đa diện và đuôi ngắn thuộc họ *Podoviridae*. Kết quả giải trình tự toàn bộ genome xác định được 3 dòng TKT đều thuộc nhóm TKT độc mang tính an toàn khi ứng dụng phòng trị ở điều kiện ngoài đồng.

- Áp dụng TKT ΦBurAG58 và HH TKT (ΦBurVL 34, ΦBurAG58, và ΦBurDT47a) ở mật số 10^8 pfu/ml đã cho hiệu quả giảm bệnh thối hạt trên 50% qua 2 vụ Đông Xuân và Hè Thu Sớm.

- Xác định được môi trường King's B, Nutrient, PDA + peptone là môi trường thích hợp nhân mật số TKT. Ngoài ra, thời điểm cấy vi khuẩn trước 16 giờ trên môi trường King's B lỏng đạt mật số TKTcao. Hơn nữa, chỉ số MOI 1,0 cũng thích hợp cho mật số TKT ΦBurAG58 đạt tương ứng 10^{10} pfu/ml và Nhiệt độ 30°C cũng phù hợp cho khả năng nhân mật số TKT.

5.2 Đề xuất

- Cần khảo nghiệm hiệu quả của HH TKT trong phòng trừ bệnh thối hạt trên diện tích rộng ở nhiều tỉnh ĐBSCL

- Cần tiếp tục nghiên cứu điều kiện tồn trữ chế phẩm TKT dài hạn ở nhiệt độ phòng góp phần đưa ứng dụng TKT tiếp cận thực tiễn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Abbott, W. S. (1925). A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. econ. Entomol*, 18(2), 265-267.
- Ackermann, H. W. (2007). 5500 Phages examined in the electron microscope. *Archives of virology*, 152(2), 227-243.
- Ackermann, H. W. (2009). Phage classification and characterization. In *Bacteriophages* (pp. 127-140). Humana press.
- Ackermann, H. W. (2011). Bacteriophage taxonomy. *Microbiology Australia*, 32(2), 90-94.
- Adachi, N., Tsukamoto, S., Inoue, Y., & Azegami, K. (2012). Control of bacterial seedling rot and seedling blight of rice by bacteriophage. *Plant disease*, 96(7), 1033-1036.
- Adams, M. H. (1959). *Bacteriophages*. Interscience Publishers.
- Álvarez, E., & Latorre, M. A. (2017). Bacterial blight, caused by *Burkholderia glumae*, is attacking Brachiaria in Colombia: First report. *Phytopathology*.
- An, N. T., Phụng, N. V. M., Nga, N. T. T. & Kim, P. V. (2017). Phân lập và tuyển chọn các dòng thực khuẩn thể trong phòng trừ bệnh héo xanh trên cây hoa vạn thọ (*Tagetes papula* L.) do vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* Smith. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 49b: 44-52.
- Atlas, R. M. (2010). Handbook of microbiological media. 4th Education. In *Library of Congress Cataloging-in-Publication Data. New York. USA*.
- Balogh, B. (2006). *Characterization and use of bacteriophages associated with citrus bacterial pathogens for disease control* (Doctoral dissertation, University of Florida).
- Balogh, B., Canteros, B. I., Stall, R. E., & Jones, J. B. (2008). Control of citrus canker and citrus bacterial spot with bacteriophages. *Plant Disease*, 92(7), 1048-1052.
- 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.
- Behlau, F., Canteros, B. I., Minsavage, G. V., Jones, J. B., & Graham, J. H. (2011). Molecular characterization of copper resistance genes from *Xanthomonas citri* subsp. *citri* and *Xanthomonas alfalfae* subsp. *citrumelonis*. *Applied and environmental microbiology*, 77(12), 4089-4096.
- Betancur, L. G. (2011). Manejo integrado del añublo bacterial de la panícula del arroz (*Oryza sativa* L.) causado por *Burkholderia glumae* Kurita & Tabei: una

- revisión. *propuesta metodológica para la evaluación de biodiversidad de nematodos en dos ecosistemas naturales*, 79.
- Buttimer, C., McAuliffe, O., Ross, R. P., Hill, C., O'Mahony, J., & Coffey, A. (2017). Bacteriophages and bacterial plant diseases. *Frontiers in microbiology*, 8, 34.
- Brives, C., & Pourraz, J. (2020). Phage therapy as a potential solution in the fight against AMR: obstacles and possible futures. *Palgrave Communications*, 6(1), 1-11.
- Carstens, A. B., Djurhuus, A. M., Kot, W., & Hansen, L. H. (2019). A novel six-phage cocktail reduces *Pectobacterium atrosepticum* soft rot infection in potato tubers under simulated storage conditions. *FEMS microbiology letters*, 366(9), fnz101.
- Cha, Y., Chun, J., Son, B., & Ryu, S. (2019). Characterization and genome analysis of *Staphylococcus aureus* podovirus CSA13 and its anti-biofilm capacity. *Viruses*, 11(1), 54.
- Chae, J. C., Nguyen, B. H., Yu, S. M., Lee, H. K., & Lee, Y. H. (2014). Diversity of bacteriophages infecting *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in paddy fields and its potential to control bacterial leaf blight of rice. *Journal of microbiology and biotechnology*, 24(6), 740-747.
- Chatain-Ly, M. H. (2014). The factors affecting effectiveness of treatment in phages therapy. *Frontiers in microbiology*, 5, 51.
- Cho, H. S., Park, S. Y., Ryu, C. M., Kim, J. F., Kim, J. G., & Park, S. H. (2007). Interference of quorum sensing and virulence of the rice pathogen *Burkholderia glumae* by an engineered endophytic bacterium. *FEMS microbiology ecology*, 60(1), 14-23.
- Civerolo, E. L., & Keil, H. L. (1969). Inhibition of bacterial spot of peach foliage by *Xanthomonas pruni* bacteriophage. *Phytopathology*.
- CPC, (2007). Crop Protection Compendium. Đĩa CD.
- CPC (hoặc CABI), (2021). Crop Protection Compendium. <https://www.cabi.org/isc/datasheet/44964>
- Cui, Z., Ojaghian, M. R., Tao, Z., Kakar, K. U., Zeng, J., Zhao, W., ... & Xie, G. (2016). Multiplex PCR assay for simultaneous detection of six major bacterial pathogens of rice. *Journal of Applied Microbiology*, 120(5), 1357-1367.
- Denny, T. P. (1995). Involvement of bacterial polysaccharides in plant pathogenesis. *Annual review of phytopathology*, 33(1), 173-197.
- Devescovi, G., Bigirimana, J., Degrassi, G., Cabrio, L., LiPuma, J. J., Kim, J., ... & Venturi, V. (2007). Involvement of a quorum-sensing-regulated lipase secreted by a clinical isolate of *Burkholderia glumae* in severe disease symptoms in rice. *Applied and environmental microbiology*, 73(15), 4950-4958.

- Díaz-Muñoz, S. L., & Koskella, B. (2014). Bacteria–phage interactions in natural environments. *Advances in applied microbiology*, 89, 135-183.
- Dong, Z., Xing, S., Liu, J., Tang, X., Ruan, L., Sun, M., ... & Peng, D. (2018). Isolation and characterization of a novel phage Xoo-sp2 that infects *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Journal of General Virology*, 99(10), 1453-1462.
- Duckworth, D. H., & Gulig, P. A. (2002). Bacteriophages. *BioDrugs*, 16(1), 57-62.
- Dũng, N. L., Quỳn, N. Đ. & Ty, P. V. (2007). *Vi sinh vật học*. Nhà xuất bản giáo dục.
- Đệ, N. N. (2008). *Giáo trình cây lúa*. Nhà xuất bản Đại Học Quốc Gia TP Hồ Chí Minh.
- Faostat, (2019). Food and Agriculture Organization of the United Nations <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>. Ngày: 10/5/2021.
- 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.
- Furuya, N., Okamoto, T., Kori, Y., Matsuyama, N., & Wakimoto, S. (1991). Control of bacterial seedling rot of rice by avirulent strains of *Pseudomonas glumae*. *Japanese Journal of Phytopathology*, 57(3), 371-376.
- Gharsallaoui, A., Roudaut, G., Chambin, O., Voilley, A., & Saurel, R. (2007). Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food research international*, 40(9), 1107-1121.
- Giang, N. T. T. (2016). *Nghiên cứu thực khuẩn thể trong phòng trị bệnh cháy bìa lá (Xanthomonas oryzae pv. oryzae) trên lúa và yếu tố môi trường tác động lên thực khuẩn thể*. Luận văn tốt nghiệp cao học ngành Bảo vệ thực vật, Trường Đại học Cần Thơ, TP. Cần Thơ.
- Gill, J., & Abedon, S. T. (2003). Bacteriophage ecology and plants. *APSnet Feature*, 1-17.
- Gill, J. J., & Hyman, P. (2010). Phage choice, isolation, and preparation for phage therapy. *Current pharmaceutical biotechnology*, 11(1), 2-14.
- Goszczyńska, T., Serfontein, J. J., & Serfontein, S. (2000). Introduction to Practical Phytobacteriology: A Manual for Phytobacteriology ARC-PPRI.
- González, S., Fernández, L., Gutiérrez, D., Campelo, A. B., Rodríguez, A., & García, P. (2018). Analysis of different parameters affecting diffusion, propagation and survival of staphylophages in bacterial biofilms. *Frontiers in microbiology*, 9, 2348.
- Goto, K. (1956). New bacterial diseases of rice-bacterial brown stripe and bacterial grain rot. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.*, 21, 46-47.
- Greer, G. G. (2005). Bacteriophage control of foodborne bacteria. *Journal of food protection*, 68(5), 1102-1111.

- Groth, D. E., Linscombe, S. D., & Sha, X. (2007). Registration of two disease-resistant germplasm lines of rice. *Journal of plant registrations*, 1(1), 63-64.
- Guenther, S., Huwyler, D., Richard, S., & Loessner, M. J. (2009). Virulent bacteriophage for efficient biocontrol of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. *Applied and environmental microbiology*, 75(1), 93-100.
- Ham, J. H., Melanson, R. A., & Rush, M. C. (2011). *Burkholderia glumae*: next major pathogen of rice?. *Molecular plant pathology*, 12(4), 329-339.
- Hikichi, Y. (1993). Antibacterial activity of oxolinic acid on *Pseudomonas glumae*. *Japanese Journal of Phytopathology*, 59(4), 369-374.
- Huy, P. Q., Trung, N. M., Thịnh, H. C. & Nga, N. T. T. (2016). Đánh giá hiệu quả của thực khuẩn thể trong phòng trừ bệnh thối hạt trên lúa do vi khuẩn *Burkholderia glumae*. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*. 45b: 70-78.
- Hyman, P., & Abedon, S. T. (2012). *Bacteriophages in Health and Disease: Bacteriophages in Health and Disease*. Cabi.
- Hyman, P., & Abedon, S. T. (2009). Practical methods for determining phage growth parameters. In *Bacteriophages* (pp. 175-202). Humana Press.
- Hwang, M. S., Morgan, R. L., Sarkar, S. F., Wang, P. W., & Guttman, D. S. (2005). Phylogenetic characterization of virulence and resistance phenotypes of *Pseudomonas syringae*. *Applied and environmental microbiology*, 71(9), 5182-5191.
- Iriarte, F. B., Balogh, B., Momol, M. T., Smith, L. M., Wilson, M., & Jones, J. B. (2007). Factors affecting survival of bacteriophage on tomato leaf surfaces. *Applied and environmental microbiology*, 73(6), 1704-1711.
- International Committee on Taxonomy of Viruses, (2021). <https://talk.ictvonline.org/> ngày 6/12/2021
- Iiyama, K., Furuya, N., Takanami, Y., & Matsuyama, N. (1995). A role of phytotoxin in virulence of *Pseudomonas glumae* Kurita et Tabei. *Japanese Journal of Phytopathology*, 61(5), 470-476.
- Jang, M. S., Goo, E., An, J. H., Kim, J., & Hwang, I. (2014). Quorum sensing controls flagellar morphogenesis in *Burkholderia glumae*. *PLoS One*, 9(1), e84831.
- Jeong, Y., Kim, J., Kim, S., Kang, Y., Nagamatsu, T., & Hwang, I. (2003). Toxoflavin produced by *Burkholderia glumae* causing rice grain rot is responsible for inducing bacterial wilt in many field crops. *Plant disease*, 87(8), 890-895.
- 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.

- Jończyk, E., Kłak, M., Międzybrodzki, R., & Górski, A. (2011). The influence of external factors on bacteriophages. *Folia microbiologica*, 56(3), 191-200.
- Junior, J. C. R., Tamanini, R., Soares, B. F., de Oliveira, A. M., de Godoi Silva, F., da Silva, F. F., ... & 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.
- Lang, J. M., Gent, D. H., & Schwartz, H. F. (2007). Management of Xanthomonas leaf blight of onion with bacteriophages and a plant activator. *Plant Disease*, 91(7), 871-878.
- Kang, Y., Kim, J., Kim, S., Kim, H., Lim, J. Y., Kim, M., ... & Hwang, I. (2008). Proteomic analysis of the proteins regulated by HrpB from the plant pathogenic bacterium *Burkholderia glumae*. *Proteomics*, 8(1), 106-121.
- Karki, H. S. (2010). Physiological, biochemical and molecular characteristics associated with virulence of *Burkholderia glumae*: the major causative agent of bacterial panicle blight of rice.
- Kering, K. K., Kibii, B. J., & Wei, H. (2019). Biocontrol of phyto-bacteria with bacteriophage cocktails. *Pest management science*, 75(7), 1775-1781.
- Kim, J., Kang, Y., Choi, O., Jeong, Y., Jeong, J. E., Lim, J. Y., ... & Hwang, I. (2007). Regulation of polar flagellum genes is mediated by quorum sensing and FlhDC in *Burkholderia glumae*. *Molecular microbiology*, 64(1), 165-179.
- Kim, M. H., Park, S. W., & Kim, Y. K. (2011). Bacteriophages of *Pseudomonas tolaasii* for the biological control of brown blotch disease. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 54(1), 99-104.
- King, E.O., Ward, M.K., Raney, D.E., 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *J. Lab. Clin. Med.* 44: 301–307
- Kim, P.V. (2000). Bài giảng Các nguyên lý về bệnh hại cây trồng. Tài liệu lưu hành nội bộ. Trường đại học Cần Thơ.
- Kim, P. V. (2006). *Vi sinh vật và chuyển hóa vật chất trong đất*. Giáo trình dành cho các ngành Trồng trọt, khoa học đất, Nông học. Tài liệu lưu hành nội bộ. Trường đại học Cần Thơ.
- Kim, P.V. (2015). Các bệnh hại lúa quan trọng ở Đồng bằng sông Cửu Long. NXB Nông nghiệp.
- King, E. O. MK Ward e DE Raney. (1954). Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *J. Lab. Clin. Med*, 44, 301-307.
- Khush, G. S. (1997). Origin, dispersal, cultivation and variation of rice. *Plant molecular biology*, 35(1), 25-34.

- Kutter, E., & Sulakvelidze, A. (Eds.). (2004). *Bacteriophages: biology and applications*. Crc press.
- Kurita, T. (1964). A few studies on factors associated with infection of bacterial grain rot of rice. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.*, 29, 60.
- Leverentz, B., Conway, W. S., Camp, M. J., Janisiewicz, W. J., Abuladze, T., Yang, M., ... & Sulakvelidze, A. (2003). Biocontrol of *Listeria monocytogenes* on fresh-cut produce by treatment with lytic bacteriophages and a bacteriocin. *Applied and environmental microbiology*, 69(8), 4519-4526.
- Li, L., Wang, L., Liu, L. M., Hou, Y. X., Li, Q. Q., & Huang, S. W. (2016). Infection process of *Burkholderia glumae* before booting stage of rice. *Journal of Phytopathology*, 164(10), 825-832.
- Li, L., Wang, L., Liu, L. M., Hou, Y. X., Huang, S. W., & Li, Q. Q. (2017). Infection process of *Burkholderia glumae* in rice spikelets. *Journal of Phytopathology*, 165(2), 123-130.
- Louis, I., & Cooke, R. C. (1985). Conidial matrix and spore germination in some plant pathogens. *Transactions of the British Mycological Society*, 84(4), 661-667.
- Lucchini, S., Desiere, F., & Brüssow, H. (1999). The genetic relationship between virulent and temperate *Streptococcus thermophilus* bacteriophages: whole genome comparison of cos-site phages Sfi19 and Sfi21. *Virology*, 260(2), 232-243.
- Maeda, Y., Kiba, A., Ohnishi, K., & Hikichi, Y. (2007). Amino acid substitutions in GyrA of *Burkholderia glumae* are implicated in not only oxolinic acid resistance but also fitness on rice plants. *Applied and environmental microbiology*, 73(4), 1114-1119.
- Mân, V. T. (2007). *Giáo trình bệnh cây chuyên khoa*. Trường Đại học Nông Nghiệp I Hà Nội.
- Mizobuchi, R., Fukuoka, S., Tsuiki, C., Tsushima, S., & Sato, H. (2020). Evaluation of major rice cultivars for resistance to bacterial seedling rot caused by *Burkholderia glumae* and identification of Japanese standard cultivars for resistance assessments. *Breeding science*, 70(2), 221-230.
- Minh, T. H., Chí, N. V., Phú, P. M. & Nga, N. T. T. (2016). Phân lập và bước đầu đánh giá hiệu quả của thực khuẩn thể trong phòng trừ bệnh thối gốc lúa do vi khuẩn *Erwiniachrysanthemi*. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. Số chuyên đề: Nôn g nghiệp (Tập 3): 185-192.
- Murphy, F. A., Fauquet, C. M., Bishop, D. H., Ghabrial, S. A., Jarvis, A. W., Martelli, G. P., ... & Summers, M. D. (Eds.). (2012). *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses* (Vol. 10). Springer Science & Business Media.

- Mukerji, K. G., & Garg, K. L. (2020). *Biocontrol of plant diseases* (Vol. 2). CRC press.
- Nagy, J., Király, L., & Schwarczinger, I. (2012). Phage therapy for plant disease control with a focus on fire blight. *Open Life Sciences*, 7(1), 1-12.
- Nandakumar, R., Rush, M., Shahjahan, A., O'reilly, K., & Groth, D. (2005). Bacterial panicle blight of rice in the southern United States caused by *Burkholderia glumae* and *B. gladioli*. *Phytopathology*, 95(6).
- Nga, N. T. T. & Khởi, V. K. (2020). Nghiên cứu tuyển chọn vi khuẩn vùng rễ trong phòng trừ bệnh thối hạt trên lúa do vi khuẩn *Burkholderia glumae*. Hội thảo quốc gia bệnh hại thực vật Việt Nam. Lần thứ 19 tại Học viện Nông Nghiệp Việt Nam 23-25/10/2020, trang 81-87, nhà xuất bản Nông Nghiệp.
- Nga, N. T. T., Tran, T. N., Holtappels, D., Kim Ngan, N. L., Hao, N. P., Vallino, M., ... & Jones, J. B. (2021). Phage Biocontrol of Bacterial Leaf Blight Disease on Welsh Onion Caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii*. *Antibiotics*, 10(5), 517.
- Nga, N. T. T. & Giang, N. T. T. (2016). Chủ biên Lê Văn Vàng và Nguyễn Thị Thu Cúc trong Chương Thực khuẩn thể và ứng dụng phòng trị bệnh hại vi khuẩn trên cây trồng. Trong “Quản lý dịch hại cây trồng thân thiện môi trường”. Nhà xuất bản Đại học Cần Thơ, 301 trang.
- Ngân, T. N. K. (2019). *Đánh giá hiệu quả của thực khuẩn thể trong phòng trừ bệnh héo xanh do vi khuẩn Ralstonia solanacearum trên khổ qua trong điều kiện nhà lưới*, Luận văn tốt nghiệp kỹ sư Bảo Vệ Thực vật, Trường Đại học Cần Thơ, TP. Cần Thơ.
- Nobrega, F. L., Vlot, M., de Jonge, P. A., Dreesens, L. L., Beaumont, H. J., Lavigne, R., ... & Brouns, S. J. (2018). Targeting mechanisms of tailed bacteriophages. *Nature Reviews Microbiology*, 16(12), 760-773.
- Ou, S. H. (1985). *Rice diseases*. IRRI.
- Ortega, L., & Rojas, C. M. (2021). Bacterial Panicle Blight and *Burkholderia glumae*: From pathogen biology to disease control. *Phytopathology*®, 111(5), 772-778
- Pelzek, A. J., Schuch, R., Schmitz, J. E., & Fischetti, V. A. (2013). Current Protocols in Essential Laboratory Techniques.
- Phén, T. V., & Nhân, P. H. (2020). Tuyển chọn vi khuẩn Bacillus sp. đối kháng với vi khuẩn *Burkholderia glumae* và có hiệu quả phòng trị bệnh lép vàng trên lúa trong điều kiện nhà lưới. Hội thảo quốc gia bệnh hại thực vật Việt Nam. Lần thứ 19 tại Học viện Nông Nghiệp Việt Nam 23-25/10/2020, trang 89 -98, nhà xuất bản Nông Nghiệp.
- Pires, D. P., Melo, L. D., & Azeredo, J. (2021). Understanding the complex Phage-Host interactions in biofilm communities. *Annual Review of Virology*, 8, 73-94.

- Reddy, P. P. (2012). Bacteriophages. In *Recent advances in crop protection* (pp. 25-36). Springer, New Delhi.
- Principi, N., Silvestri, E., & Esposito, S. (2019). Advantages and limitations of bacteriophages for the treatment of bacterial infections. *Frontiers in pharmacology, 10*, 513.
- Rajnovic, D., Muñoz-Berbel, X., & Mas, J. (2019). Fast phage detection and quantification: An optical density-based approach. *PloS one, 14*(5), e0216292.
- Ranasinghe, R. M. (2019). *Literature study of virus size, burst size, latent period and genome size across different lytic eukaryotic and prokaryotic virus groups-an overview of traits and possible trade-offs* (Master's thesis, The University of Bergen).
- Ravensdale, M., Blom, T. J., Gracia-Garza, J. A., Svircev, A. M., & Smith, R. J. (2007). Bacteriophages and the control of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *Canadian Journal of Plant Pathology, 29*(2), 121-130.
- Reddy, P. P. (2012). Recent advances in crop protection.
- Reissig, W. H. (1985). *Illustrated guide to integrated pest management in rice in tropical Asia*. Int. Rice Res. Inst..
- Riera-Ruiz, C., Vargas, J., Cedeño, C., Quirola, P., Escobar, M., Cevallos-Cevallos, J. M., ... & Peralta, E. L. (2014a). First report of *Burkholderia glumae* causing bacterial panicle blight on rice in Ecuador. *Plant Disease, 98*(7), 988-988.
- Riera-Ruiz, C., Vargas, J., Cevallos-Cevallos, J. M., Ratti, M., & Peralta, E. L. (2014b). First report of bacterial panicle blight of rice caused by *Burkholderia gladioli* in Ecuador. *Plant disease, 98*(11), 1577-1577.
- Sabour, P. M., & Griffiths, M. W. (Eds.). (2010). *Bacteriophages in the control of food- and waterborne pathogens*. American Society for Microbiology Press.
- Salmond, G. P., & Fineran, P. C. (2015). A century of the phage: past, present and future. *Nature Reviews Microbiology, 13*(12), 777-786.
- Sayler, R. J., Cartwright, R. D., & Yang, Y. (2006). Genetic characterization and real-time PCR detection of *Burkholderia glumae*, a newly emerging bacterial pathogen of rice in the United States. *Plant disease, 90*(5), 603-610.
- Schaad, N. W., Jones, J. B., & Chun, W. (2001). *Laboratory guide for the identification of plant pathogenic bacteria* (No. Ed. 3). American Phytopathological Society (APS Press).
- Schaad, N. W. (2008). Emerging plant pathogenic bacteria and global warming. In *Pseudomonas syringae Pathovars and Related Pathogens—Identification, Epidemiology and Genomics* (pp. 369-379). Springer, Dordrecht.

- Singh, D., & Vishunavat, K. (2015). Identification of a seed-borne rice bacterium, *Burkholderia glumae* using cultural, morphological and biochemical methods. *Journal of Applied and Natural Science*, 7(2), 562-566.
- Shew, A. M., Durand-Morat, A., Nalley, L. L., Zhou, X. G., Rojas, C., & Thoma, G. (2019). Warming increases Bacterial Panicle Blight (*Burkholderia glumae*) occurrences and impacts on USA rice production. *PloS one*, 14(7), e0219199.
- Shan, J., Korbsrisate, S., Withatanung, P., Adler, N. L., Clokie, M. R., & Galyov, E. E. (2014). Temperature dependent bacteriophages of a tropical bacterial pathogen. *Frontiers in microbiology*, 5, 599.
- Shaner, G., & Finney, R. E. (1977). The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in Knox wheat. *Phytopathology*, 67(8), 1051-1056.
- Suôi, H. T., Tước, N. B. & Nga, N. T. T. (2017). Nghiên cứu điều kiện tồn trữ và hiệu quả của chất bảo vệ sự tồn tại thực khuẩn thể trong quản lý bệnh cháy bìa lá lúa do vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* trong điều kiện nhà lưới. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 53b: 71-78.
- Tâm, L. H. (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 thạc sĩ. Trường Đại học Cần Thơ. TP. Cần Thơ.
- Thủy, T. T. T. (2011). Xác định nấm gây bệnh lem lép hạt lúa tại đồng bằng sông cửu long. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 155-163.
- Toàn, L. T., Sĩ, T. (2020). Thành phần nấm gây lem lép hạt lúa tại hòn đất–Kiên Giang và khảo sát hiệu quả của một số dịch trích thực vật đối với nấm *Curvularia* sp. và *Fusarium* sp. hại hạt lúa. *AGU International Journal of Sciences*, 24: 68 – 75
- Trân, T. N., Nga, N. T. T., & Trí, K. M. (2016). Phân lập và đánh giá hiệu quả của thực khuẩn thể trong việc phòng trừ bệnh cháy lá do vi khuẩn *Xanthomonas* sp. trên cây hành lá (*Allium fistulosum* L.). Hội thảo quốc gia Bệnh hại thực vật Việt Nam. Trang 1-9.
- Tsushima, S. (1996). Epidemiology of bacterial grain rot of rice caused by *Pseudomonas glumae*. *JARQ*, 30(2), 85-9. *JARQ*, 30, 85-89.
- Tsushima, S., Wakimoto, S., & Mogi, S. (1986). Selective medium for detecting *Pseudomonas glumae* Kurita et Tabei, the causal bacterium of grain rot of rice. *Japanese Journal of Phytopathology*, 52(2), 253-259.
- Trung, H. M., Van Van, N., Vien, N. V., & Lien, M. (1993). Occurrence of rice grain rot disease in Viet Nam. *International Rice Research Notes (Philippines)*
- Ty, P. V. (2004). *Virut Học*. Nhà Xuất Bản Giáo Dục.

- Urakami, T., Ito-Yoshida, C., Araki, H., Kijima, T., Suzuki, K. I., & Komagata, K. (1994). Transfer of *Pseudomonas plantarii* and *Pseudomonas glumae* to *Burkholderia* as *Burkholderia* spp. and Description of *Burkholderia vandii* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 44(2), 235-245.
- Wigginton, K. R., Menin, L., Sigstam, T., Gannon, G., Cascella, M., Hamidane, H. B., ... & Kohn, T. (2012). UV Radiation Induces Genome-Mediated, Site-Specific Cleavage in Viral Proteins. *ChemBioChem*, 13(6), 837-845.
- Wittebole, X., De Roock, S., & Opal, S. M. (2014). A historical overview of bacteriophage therapy as an alternative to antibiotics for the treatment of bacterial pathogens. *Virulence*, 5(1), 226-235.
- Viazis, S., Akhtar, M., Feirtag, J., Brabban, A. D., & Diez-Gonzalez, F. (2011). Isolation and characterization of lytic bacteriophages against enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Journal of Applied Microbiology*, 110(5), 1323-1331.
- Yuan, X. (2004). Identification of bacterial pathogens causing panicle blight of rice in Louisiana.
- Zhou, X. G. (2014). First report of bacterial panicle blight of rice caused by *Burkholderia glumae* in South Africa. *Plant Disease*, 98(4), 566-566.
- Zhou-qi, C., Bo, Z. H. U., Guan-lin, X., Bin, L., & Shi-wen, H. (2016). Research status and prospect of *Burkholderia glumae*, the pathogen causing bacterial panicle blight. *Rice Science*, 23(3), 111-118.

PHỤ CHƯƠNG

Phụ bảng 1: Bảng ANOVA tỷ lệ bệnh thối hạt khi xử lý với sáu chủng vi khuẩn *B. glumae* tại thời điểm 5 NSKLB

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Giá trị F	Xác suất
Nghiệm thức	5	4192,557	838,511	25,4278	0,0000
Sai số	24	790,031	32,918		
Tổng cộng	29	4982,588			

CV (%) = 25,85

Phụ bảng 2: Bảng ANOVA tỷ lệ bệnh thối hạt khi xử lý với sáu chủng vi khuẩn *B. glumae* tại thời điểm 15 NSKLB

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Giá trị F	Xác suất
Nghiệm thức	5	7196,169	1439,234	91,4665	0,0000
Sai số	24	377,642	15,735		
Tổng cộng	29	7573,811			

CV (%) = 12,45

Phụ bảng 3: Bảng ANOVA tỷ lệ bệnh thối hạt khi xử lý với sáu chủng vi khuẩn *B. glumae* tại thời điểm 25 NSKLB

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Giá trị F	Xác suất
Nghiệm thức	5	7931,253	1586,251	105,9507	0,0000
Sai số	24	359,318	14,972		
Tổng cộng	29	8290,571			

CV (%) = 11,00

Phụ bảng 4: Bảng ANOVA diện tích bên dưới đường cong tiến triển bệnh (AUDPC) khi xử lý với sáu chủng vi khuẩn *B. glumae*

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Giá trị F	Xác suất
Nghiệm thức	5	5513895,834	1102779,167	84,5742	0,0000
Sai số	24	312940,456	13039,186		
Tổng cộng	29	5826836,290			

CV (%) = 19,96

Phụ bảng 5: Bảng ANOVA trung bình cấp bệnh khi xử lý với sáu chủng vi khuẩn *B. glumae* tại thời điểm 5 NSKLB

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Giá trị F	Xác suất
Nghiệm thức	5	13,414	2,683	21,7813	0,0000
Sai số	24	2,956	0,123		
Tổng cộng	29	16,370			

CV (%) = 23,98

Phụ bảng 6: Bảng ANOVA trung bình cấp bệnh khi xử lý với sáu chủng vi khuẩn *B. glumae* tại thời điểm 15 NSKLB

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Giá trị F	Xác suất
Nghiệm thức	5	36,847	7,396	58,7198	0,0000
Sai số	24	3,012	0,125		
Tổng cộng	29	39,859			

CV (%) = 17,09

Phụ bảng 7: Bảng ANOVA trung bình cấp bệnh khi xử lý với sáu chủng vi khuẩn *B. glumae* tại thời điểm 25 NSKLB

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Giá trị F	Xác suất
Nghiệm thức	5	38,544	7,709	71,4287	0,0000
Sai số	24	2,590	0,108		
Tổng cộng	29	41,134			

CV (%) = 14,52

Phụ bảng 8: Bảng ANOVA ảnh hưởng của sáu chủng vi khuẩn *B. glumae* đến số hạt chắc/bông

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Giá trị F	Xác suất
Nghiệm thức	5	14428,273	2885,655	41,0387	0,0000
Sai số	24	1687,572	70,315		
Tổng cộng	29	16115,845			

CV (%) = 10,08

Phụ bảng 9: Bảng ANOVA ảnh hưởng của sáu chủng vi khuẩn *B. glumae* đến tỷ lệ hạt chắc

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Giá trị F	Xác suất
Nghiệm thức	5	2888,364	577,673	198,0997	0,0000
Sai số	24	69,986	2,916		
Tổng cộng	29	2958,350			

CV (%) = 3,11

Phụ bảng 10: Bảng ANOVA ảnh hưởng của sáu chủng vi khuẩn *B. glumae* đến trọng lượng 1000 hạt

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Giá trị F	Xác suất
Nghiệm thức	5	28,632	5,725	1,5513	0,2117
Sai số	24	88,564	3,690		
Tổng cộng	29	117,186			

CV (%) = 7,76

Phụ bảng 11: Bảng ANOVA ảnh hưởng của sáu chủng vi khuẩn *B. glumae* đến năng suất thực tế

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Giá trị F	Xác suất
Nghiệm thức	5	711,981	142,396	12,4093	0,0000
Sai số	24	275,399	11,475		
Tổng cộng	29	987,379			

CV (%) = 12,60

Phụ bảng 12: Bảng ANOVA đường kính đốm tan ở thời điểm 24 giờ

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Giá trị F	Xác suất
Nghiệm thức	7	20,396	2,914	39,0874	0,0000
Sai số	16	1,193	0,075		
Tổng cộng	23	21,589			

CV (%) = 8,92

Phụ bảng 13: Bảng ANOVA đường kính đốm tan ở thời điểm 36 giờ

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Giá trị F	Xác suất
Nghiệm thức	7	27,403	3,915	65,0597	0,0000
Sai số	16	0,963	0,060		
Tổng cộng	23	28,366			

CV (%) = 6,58

Phụ bảng 14: Bảng ANOVA đường kính đốm tan ở thời điểm 48 giờ

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Giá trị F	Xác suất
Nghiệm thức	7	41,293	5,899	89,8747	0,0000
Sai số	16	1,050	0,066		
Tổng cộng	23	42,343			

CV (%) = 6,16

Phụ bảng 15: Bảng ANOVA tỷ lệ bệnh thối hạt khi xử lý với các dòng TKT tại thời điểm 10 NSKLB

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Giá trị F	Xác suất
Nghiệm thức	5	1246,140	249,228	31,9159	0,0000
Sai số	18	140,560	7,809		
Tổng cộng	23	1386,700			

CV (%) = 11,93

Phụ bảng 16: Bảng ANOVA tỷ lệ bệnh thối hạt khi xử lý với các dòng TKT tại thời điểm 15 NSKLB

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Giá trị F	Xác suất
Nghiệm thức	5	2190,674	438,135	21,4100	0,0000
Sai số	18	368,352	20,564		
Tổng cộng	23	2559,026			

CV (%) = 14,99

Phụ bảng 17: Bảng ANOVA tỷ lệ bệnh thối hạt khi xử lý với các dòng TKT tại thời điểm 20 NSKLB

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Giá trị F	Xác suất
Nghiệm thức	5	2290,915	458,183	358,1887	0,0000
Sai số	18	23,025	1,279		
Tổng cộng	23	2313,940			

CV (%) = 3,02

Phụ bảng 18: Bảng ANOVA trung bình cấp bệnh khi xử lý với các dòng TKT tại thời điểm 5 NSKLB

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Giá trị F	Xác suất
Nghiệm thức	5	4,772	0,954	26,9482	0,0000
Sai số	18	0,638	0,035		
Tổng cộng	23	5,410			

CV (%) = 18,90

Phụ bảng 19: Bảng ANOVA trung bình cấp bệnh khi xử lý với các dòng TKT tại thời điểm 10 NSKLB

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Giá trị F	Xác suất
Nghiệm thức	5	5,692	1,138	22,9120	0,0000
Sai số	18	0,894	0,050		
Tổng cộng	23	6,587			

CV (%) = 16,44

Phụ bảng 20: Bảng ANOVA trung bình cấp bệnh khi xử lý với các dòng TKT tại thời điểm 15 NSKLB

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Giá trị F	Xác suất
Nghiệm thức	5	14,377	2,875	19,2945	0,0000
Sai số	18	2,683	0,149		
Tổng cộng	23	17,06			

CV (%) = 21,20

Phụ bảng 21: Bảng ANOVA mật số của các dòng TKT tồn tại trên bông tại thời điểm 0 GSKLB

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Giá trị F	Xác suất
Nghiệm thức	4	0,123	0,031	0,3367	
Sai số	15	1,374	0,098		
Tổng cộng	19	1,497			

CV (%) = 5,77

Phụ bảng 22: Bảng ANOVA mật số của các dòng TKT tồn tại trên bông tại thời điểm 12 GSKLB

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Giá trị F	Xác suất
Nghiệm thức	4	15,430	3,857	24,1333	0,0000
Sai số	15	2,398	0,150		
Tổng cộng	19	17,827			

CV (%) = 5,23

Phụ bảng 23: Bảng ANOVA mật số của các dòng TKT tồn tại trên bông tại thời điểm 24 GSKLB

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Giá trị F	Xác suất
Nghiệm thức	4	11,267	2,807	27,6158	0,0000
Sai số	15	1,530	0,098		
Tổng cộng	19	12,797			

CV (%) = 5,53

Phụ bảng 24: Bảng ANOVA mật số của các dòng TKT tồn tại trên bông tại thời điểm 7 NSKLB

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Giá trị F	Xác suất
Nghiệm thức	4	9,010	2,253	31,7523	0,0000
Sai số	15	1,064	0,071		
Tổng cộng	19	10,074			

CV (%) = 7,46

Phụ bảng 25: Bảng ANOVA hiệu quả giảm bệnh của các nghiệm thức xử lý TKT tại thời điểm 5 NSKLB

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Giá trị F	Xác suất
Nghiệm thức	4	1959,389	489,847	50,5981	0,0000
Sai số	15	145,217	9,681		
Tổng cộng	19	2104,606			

CV (%) = 5,45

Phụ bảng 26: Bảng ANOVA hiệu quả giảm bệnh của các nghiệm thức xử lý TKT tại thời điểm 10 NSKLB

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Giá trị F	Xác suất
Nghiệm thức	4	2148,910	537,227	9,7919	0,0004
Sai số	15	822,970	54,865		
Tổng cộng	19	2971,880			

CV (%) = 14,22

Phụ bảng 27: Bảng ANOVA hiệu quả giảm bệnh của các nghiệm thức xử lý TKT tại thời điểm 15 NSKLB

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Giá trị F	Xác suất
Nghiệm thức	4	2382,231	595,558	6,4063	0,0033
Sai số	15	1394,467	92,964		
Tổng cộng	19	3776,697			

CV (%) = 18,84

Phụ bảng 28: Bảng ANOVA hiệu quả giảm bệnh của các nghiệm thức xử lý TKT tại thời điểm 20 NSKLB

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Giá trị F	Xác suất
Nghiệm thức	4	779,234	194,808	82,1057	0,0000
Sai số	15	35,590	2,373		
Tổng cộng	19				

CV (%) = 3,15

Phụ bảng 29: Bảng ANOVA ảnh hưởng của các dòng TKT đến số hạt chắc/bông

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Giá trị F	Xác suất
Nghiệm thức	5	4325,007	865,001	176,7061	0,0000
Sai số	18	88,113	4,895		
Tổng cộng	23	4413,120			

CV (%) = 2,67

Phụ bảng 30: Bảng ANOVA ảnh hưởng của các dòng TKT đến tỷ lệ hạt chắc

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Giá trị F	Xác suất
Nghiệm thức	5	1245,701	249,140	62,5089	0,0000
Sai số	18	71,742	3,986		
Tổng cộng	23	1317,443			

CV (%) = 3,68

Phụ bảng 31: Bảng ANOVA ảnh hưởng của của các dòng TKT đến trọng lượng 1000 hạt

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Giá trị F	Xác suất
Nghiệm thức	5	2,322	0,464	0,7193	
Sai số	18	11,621	0,646		
Tổng cộng	23				

CV (%) = 3,06

Phụ bảng 32: Bảng ANOVA của các dòng TKT đến năng suất thực tế

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Giá trị F	Xác suất
Nghiệm thức	5	490,228	98,046	16,0426	0,0000
Sai số	18	110,008	6,112		
Tổng cộng	23				

CV (%) = 9,23

Phụ bảng 33: Thông số về trung bình nhiệt độ và ẩm độ ở vị trí bố trí thí nghiệm trong điều kiện nhà lưới

Thời gian	Nhiệt độ (°C)	Ẩm độ (%)
7 - 8 (giờ)	29,00	67,00
9 - 10 (giờ)	31,20	63,70
12 - 13 (giờ)	37,70	40,00
16 - 17 (giờ)	35,50	53,00

Phụ bảng 34: Bảng ANOVA tỷ lệ bệnh trên bông khi xử lý với các mật số thực khuẩn thể khác nhau tại thời điểm 5 NSKLB

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Giá trị F	Xác suất
Nghiệm thức	4	15,664	3,916	17,3156	0,0000
Sai số	15	3,392	0,226		
Tổng cộng	19	19,056			

CV (%) = 23,80

Phụ bảng 35: Bảng ANOVA tỷ lệ bệnh trên bông khi xử lý với các mật số thực khuẩn thể khác nhau tại thời điểm 10 NSKLB

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Giá trị F	Xác suất
Nghiệm thức	4	1730,260	432,565	80,6181	0,0000
Sai số	15	80,484	5,366		
Tổng cộng	19	1810,744			

CV (%) = 8,38

Phụ bảng 36: Bảng ANOVA tỷ lệ bệnh trên bông khi xử lý với các mật số thực khuẩn thể khác nhau tại thời điểm 15 NSKLB

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Giá trị F	Xác suất
Nghiệm thức	4	4883,235	1220,809	107,7456	0,0000
Sai số	15	169,957	11,330		
Tổng cộng	19	5054,058			

CV (%) = 8,96

Phụ bảng 37: Bảng ANOVA tỷ lệ bệnh trên bông khi xử lý với các mật số thực khuẩn thể khác nhau tại thời điểm 20 NSKLB

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Giá trị F	Xác suất
Nghiệm thức	4	1947,588	486,897	92,5081	0,0000
Sai số	15	78,949	5,263		
Tổng cộng	19	2026,538			

CV (%) = 7,20

Phụ bảng 38: Bảng ANOVA diện tích bên dưới đường cong tiến triển bệnh (AUDPC) khi xử lý với các mật số thực khuẩn thể khác nhau

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Giá trị F	Xác suất
Nghiệm thức	4	836990,874	209247,719	138,6618	0,0000
Sai số	15	22635,756	1509,050		
Tổng cộng	19	859626,631			

CV (%) = 10,55

Phụ bảng 39: Bảng ANOVA tỷ lệ bệnh trên bông của các thời điểm khảo sát khi xử lý với thực khuẩn thể tại thời điểm 5 NSKLB

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Giá trị F	Xác suất
Nghiệm thức	3	1188,738	396,246	21,4793	0,0000
Sai số	12	221,374	18,448		
Tổng cộng	15	1410,112			

CV (%) = 15,86

Phụ bảng 40: Bảng ANOVA tỷ lệ bệnh trên bông của các thời điểm khảo sát khi xử lý với thực khuẩn thể tại thời điểm 10 NSKLB

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Giá trị F	Xác suất
Nghiệm thức	3	2059,258	686,419	29,5382	0,0000
Sai số	12	278,860	23,238		
Tổng cộng	15	2338,118			

CV (%) = 15,25

Phụ bảng 41: Bảng ANOVA tỷ lệ bệnh trên bông của các thời điểm khảo sát khi xử lý với thực khuẩn thể tại thời điểm 15 NSKLB

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Giá trị F	Xác suất
Nghiệm thức	3	2501,274	833,758	36,4184	0,0000
Sai số	12	274,726	22,894		
Tổng cộng	15	2776.000			

CV (%) = 14,15

Phụ bảng 42: Bảng ANOVA diện tích bên dưới đường cong tiến triển bệnh (AUDPC) của các thời điểm khảo sát khi xử lý với thực khuẩn thể

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Giá trị F	Xác suất
Nghiệm thức	3	442299,213	147433,071	36,0391	0,0000
Sai số	12	49091,051	4090,921		
Tổng cộng	15	491390,263			

CV (%) = 22,49

Phụ bảng 43: Bảng ANOVA ảnh hưởng của các thời điểm khảo sát thực khuẩn thể đến tỷ lệ hạt chắc trên bông

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Giá trị F	Xác suất
Nghiệm thức	3	5737,605	1912,535	95,5656	0,0000
Sai số	12	240,153	20,013		
Tổng cộng	15	5977,758			

CV (%) = 6,37

Phụ bảng 44: Bảng ANOVA mật số của thực khuẩn thể tồn tại trên bông tại thời điểm 0 GSKXL

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Giá trị F	Xác suất
Nghiệm thức	2	0,131	0,065	0,2330	0,0000
Sai số	9	2,528	0,281		
Tổng cộng	11	2,659			

CV (%) = 6,16

Phụ bảng 45: Bảng ANOVA mật số của thực khuẩn thể tồn tại trên bông tại thời điểm 12 GSKXL

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Giá trị F	Xác suất
Nghiệm thức	2	13,991	6,995	24,9745	0,0002
Sai số	9	2,521	0,280		
Tổng cộng	11	16,512			

CV (%) = 6,11

Phụ bảng 46: Bảng ANOVA mật số của thực khuẩn thể tồn tại trên bông tại thời điểm 24 GSKXL

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Giá trị F	Xác suất
Nghiệm thức	2	14,042	7,021	4,2294	0,0507
Sai số	9	14,940	1,660		
Tổng cộng	11	28,982			

CV (%) = 19,10

Phụ bảng 47: Bảng ANOVA mật số của thực khuẩn thể tồn tại trên bông tại thời điểm 15 NSKLB

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Giá trị F	Xác suất
Nghiệm thức	2	2,809	1,404	1,2608	0,3291
Sai số	9	10,024	1,114		
Tổng cộng	11	12,833			

CV (%) = 18,79

Phụ bảng 48: Bảng ANOVA tỷ lệ hạt bệnh trên bông khi xử lý các nghiệm thức khác nhau tại thời điểm 10 NSKLB vụ Đông Xuân 2017-2018

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Giá trị F	Xác suất
Lặp lại	3	22,980	7,660	0,6360	
Nghiệm thức	3	658,917	219,639	18,2356	0,0004
Sai số	9	108,400	12,044		
Tổng cộng	15	790,298			

CV(%): 15,89

Phụ bảng 49: Bảng ANOVA tỷ lệ hạt bệnh trên bông khi xử lý các nghiệm thức khác nhau tại thời điểm 15 NSKLB vụ Đông Xuân 2017-2018

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Giá trị F	Xác suất
Lặp lại	3	107,035	35,678	1,5704	0,2633
Nghiệm thức	3	526,710	175,570	7,7281	0,0073
Sai số	9	204,466	22,718		
Tổng cộng	15	838,211			

CV(%): 18,50

Phụ bảng 50: Bảng ANOVA tỷ lệ hạt bệnh trên bông khi xử lý các nghiệm thức khác nhau tại thời điểm 20 NSKLB vụ Đông Xuân 2017-2018

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Giá trị F	Xác suất
Lặp lại	3	65,647	21,882	0,9884	
Nghiệm thức	3	514,183	171,394	7,7414	0,0073
Sai số	9	199,260	22,140		
Tổng cộng	15	779,089			

CV(%): 16,58%

Phụ bảng 51: Bảng ANOVA diện tích bên dưới đường cong tiến triển bệnh (AUDPC) khi xử lý ở các nghiệm thức vụ Đông Xuân 2017-2018

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Giá trị F	Xác suất
Lặp lại	3	887,985	295,995	0,1781	
Nghiệm thức	3	122847,023	40949,008	24,6376	0,0001
Sai số	9	14958,479	1662,053		
Tổng cộng	15	138693,487			

CV(%): 20,79%

Phụ bảng 52: Bảng ANOVA hiệu quả giảm bệnh khi xử lý ở các nghiệm thức khác nhau tại thời điểm 10 NSKLB vụ Đông Xuân 2017-2018

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Giá trị F	Xác suất
Lặp lại	3	473,744	157,915	3,8226	0,0763
Nghiệm thức	2	161,244	80,622	1,9516	0,2224
Sai số	6	247,867	41,311		
Tổng cộng	11	882,855			

CV(%): 12,02%

Phụ bảng 53: Bảng ANOVA hiệu quả giảm bệnh khi xử lý ở các nghiệm thức khác nhau tại thời điểm 15 NSKLB vụ Đông Xuân 2017-2018

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Giá trị F	Xác suất
Lặp lại	3	360,093	120,031	1,0475	0,4374
Nghiệm thức	2	75,869	37,934	0,3310	
Sai số	6	687,540	114,590		
Tổng cộng	11	1123,501			

CV(%): 22,70%

Phụ bảng 54: Bảng ANOVA hiệu quả giảm bệnh khi xử lý ở các nghiệm thức khác nhau tại thời điểm 20 NSKLB vụ Đông Xuân 2017-2018

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Giá trị F	Xác suất
Lặp lại	3	2109,307	703,102	6,5549	0,0254
Nghiệm thức	2	456,019	228,010	2,1257	0,2005
Sai số	6	643,586	107,264		
Tổng cộng	11	3208,912			

CV(%):24,50%

Phụ bảng 55: Bảng ANOVA tỷ lệ hạt chắc/bông khi xử lý ở các nghiệm thức khác nhau lúc thu hoạch vụ Đông Xuân 2017-2018

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Giá trị F	Xác suất
Lặp lại	3	12,201	4,067	0,7468	
Nghiệm thức	3	91,128	30,376	5,5775	0,0193
Sai số	9	49,016	5,446		
Tổng cộng	15	152,345			

CV (%) = 4,35

Phụ bảng 56: Bảng ANOVA năng suất thực tế khi xử lý ở các nghiệm thức khác nhau lúc thu hoạch vụ Đông Xuân 2017-2018

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Giá trị F	Xác suất
Lặp lại	3	0,288	0,096	0,8880	
Nghiệm thức	3	1,136	0,379	3,4976	0,0629
Sai số	9	0,974	0,108		
Tổng cộng	15	2,398			

CV(%):9,72

Phụ bảng 57: Bảng ANOVA tỷ lệ hạt bệnh trên bông khi xử lý các nghiệm thức khác nhau tại thời điểm 10 NSKLB vụ Hè Thu 2018

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Giá trị F	Xác suất
Lặp lại	3	166,098	55,366	2,0073	0,1562
Nghiệm thức	5	405,519	81,104	2,9404	0,0480
Sai số	15	413,742	27,583		
Tổng	23	985,359			

CV=17,96

Phụ bảng 58: Bảng ANOVA tỷ lệ hạt bệnh trên bông khi xử lý các nghiệm thức khác nhau tại thời điểm 15 NSKLB vụ Hè Thu 2018

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Giá trị F	Xác suất
Lặp lại	3	79,363	26,454	1,8191	0,1869
Nghiệm thức	5	297,455	59,491	4,0909	0,0153
Sai số	15	218,134	14,542		
Tổng	23	594,952			

CV=12,14

Phụ bảng 59: Bảng ANOVA tỷ lệ hạt bệnh trên bông khi xử lý các nghiệm thức khác nhau tại thời điểm 20 NSKLB vụ Hè Thu 2018

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Giá trị F	Xác suất
Lặp lại	3	74,221	24,740	1,2426	0,3292
Nghiệm thức	5	907,681	181,536	9,1178	0,0004
Sai số	15	298,650	19,910		
Tổng	23	1280,552			

CV=12,2

Phụ bảng 60: Bảng ANOVA diện tích bên dưới đường cong tiến triển bệnh (AUDPC) khi xử lý ở các nghiệm thức vụ Hè Thu 2018

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Giá trị F	Xác suất
Lặp lại	3	13080,6	4360,218	1,8379	0,1836
Nghiệm thức	5	112362,2	22472,453	9,4723	0,0003
Sai số	15	35586,6	2372,444		
Tổng	23	161029,5			

CV=17,34

Phụ bảng 61: Bảng ANOVA mật số thực khuẩn thể trên bông tại thời điểm 0 giờ sau khi xử lý

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Giá trị F	Xác suất
Lặp lại	3	0,863	0,288	1,2297	0,3335
Nghiệm thức	5	86,301	17,260	73,7419	0,0000
Sai số	15	3,511	0,234		
Tổng cộng	23	90,676			

CV (%) = 18,17

Phụ bảng 62: Bảng ANOVA mật số thực khuẩn thể trên bông tại thời điểm 12 giờ sau khi xử lý

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Giá trị F	Xác suất
Lặp lại	3	0,602	0,201	1,9043	0,1723
Nghiệm thức	5	77,571	15,514	147,2541	0,0000
Sai số	15	1,580	0,105		
Tổng cộng	23	79,754			

CV (%) = 12,98

Phụ bảng 63: Bảng ANOVA hiệu quả giảm bệnh khi xử lý ở các nghiệm thức khác nhau tại thời điểm 15 NSKLB vụ Hè Thu 2018

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Giá trị F	Xác suất
Lặp lại	3	1716,888	572,296	1,3629	0,3010
Nghiệm thức	4	2076,715	519,179	1,2364	0,3469
Sai số	12	5039,009	419,917		
Tổng	19	8832,613			

CV(%)=54,27

Phụ bảng 64: Bảng ANOVA hiệu quả giảm bệnh khi xử lý ở các nghiệm thức khác nhau tại thời điểm 20 NSKLB vụ Hè Thu 2018

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Giá trị F	Xác suất
Lặp lại	3	1530,254	510,085	1,6962	0,2207
Nghiệm thức	4	1196,459	299,115	0,9947	
Sai số	12	3608,666	300,722		
Tổng	19	6335,379			

CV=50,73

Phụ bảng 65: Bảng ANOVA tỷ lệ hạt chắc/bông khi xử lý ở các nghiệm thức khác nhau lúc thu hoạch vụ Hè Thu 2018

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Giá trị F	Xác suất
Lặp lại	3	166,834	55,611	0,2513	
Nghiệm thức	4	3639,333	909,833	4,1121	0,0252
Sai số	12	2655,106	221,259		
Tổng	19	6461,273			

CV=38%

Phụ bảng 66: Bảng ANOVA hiệu quả giảm bệnh khi xử lý ở các nghiệm thức khác nhau tại thời điểm 10 NSKLB vụ Hè Thu 2018

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Giá trị F	Xác suất
Lặp lại	3	55,263	18,421	0,4623	
Nghiệm thức	5	2575,537	515,107	12,9520	0,0001
Sai số	15	596,558	39,771		
Tổng	23	3227,358			

CV=9,96

Phụ bảng 67: Bảng ANOVA năng suất thực tế khi xử lý ở các nghiệm thức khác nhau lúc thu hoạch vụ Hè Thu 2018

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Giá trị F	Xác suất
Lặp lại	3	14,418	4,806	26,3488	0,0000
Nghiệm thức	5	9,511	1,902	10,4291	0,0002
Sai số	15	2,736	0,182		
Tổng	23	26,665			

CV=14,43

Phụ bảng 68: Bảng ANOVA mật số của thực khuẩn thể ở thời điểm 24 giờ sau khi nhân

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Giá trị F	Xác suất
Nghiệm thức	3	3,227	1,076	37,7996	0,0000
Sai số	12	0,342	0,028		
Tổng cộng	15	3,569			

CV (%) = 1,65

Phụ bảng 69: Bảng ANOVA mật số của thực khuẩn thể ở thời điểm 48 giờ sau khi nhân

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Giá trị F	Xác suất
Nghiệm thức	3	3,578	1,193	16,6256	0,0001
Sai số	12	0,861	0,072		
Tổng cộng	15	4,438			

CV (%) = 2,68

Phụ bảng 70: Bảng ANOVA mật số của thực khuẩn thể ở thời điểm 72 giờ sau khi nhân

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Giá trị F	Xác suất
Nghiệm thức	3	5,745	1,915	16,1901	0,0002
Sai số	12	1,419	0,118		
Tổng cộng	15	7,164			

CV (%) = 2,68

Phụ bảng 71: Bảng ANOVA mật số của thực khuẩn thể ở thời điểm 24 giờ sau khi bố trí

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Giá trị F	Xác suất
Môi trường	1	2,176	2,176	31,7416	0,0001
Thời gian cấy TKT	1	18,706	18,706	272,9088	0,0000
Môi trường x Thời gian cấy TKT	1	1,756	1,756	25,6140	0,0000
Sai số	12	0,822	0,069		
Tổng cộng	15	23,459			

CV (%): 3,03

Phụ bảng 72: Bảng ANOVA mật số của thực khuẩn thể ở thời điểm 36 giờ sau khi bố trí

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Giá trị F	Xác suất
Môi trường	1	3,803	3,803	32,4769	0,0001
Thời gian cấy TKT	1	9,610	9,610	82,0783	0,0000
Môi trường x Thời gian cấy TKT	1	5,760	5,760	49,1957	0,0000
Sai số	12	1,405	0,117		
Tổng cộng	15	20,578			

CV (%): 3,89

Phụ bảng 73: Bảng ANOVA mật số của thực khuẩn thể ở thời điểm 36 giờ sau khi bố trí

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Giá trị F	Xác suất
Môi trường	1	1,562	1,562	9,4458	0,0097
Thời gian cấy TKT	1	5,062	5,062	30,6045	0,0001
Môi trường x Thời gian cấy TKT	1	1,690	1,690	10,2166	0,0077
Sai số	12	1,985	0,165		
Tổng cộng	15	10,300			

CV (%): 4,99

Phụ bảng 74: Bảng ANOVA ảnh hưởng của OD đến mật số thực khuẩn thể ở thời điểm 6 giờ

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Giá trị F	Xác suất
Nghiệm thức	2	0,064	0,032	6,6170	0,0304
Sai số	6	0,029	0,005		
Tổng cộng	8	0,093			

CV (%) = 21,93

Phụ bảng 75: Bảng ANOVA ảnh hưởng của OD đến mật số thực khuẩn thể ở thời điểm 24 giờ

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Giá trị F	Xác suất
Nghiệm thức	2	0,783	0,391	49,7635	0,0002
Sai số	6	0,047	0,008		
Tổng cộng	8	0,830			

CV (%) = 6,94

Phụ bảng 76: Bảng ANOVA mật số thực khuẩn thể ở thời điểm 6 giờ

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Giá trị F	Xác suất
Nghiệm thức	2	0,771	0,386	3,3722	0,1043
Sai số	6	0,686	0,114		
Tổng cộng	8	1,458			

CV (%) = 3,86

Phụ bảng 77: Bảng ANOVA mật số thực khuẩn thể ở thời điểm 24 giờ

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Giá trị F	Xác suất
Nghiệm thức	2	1,521	0,761	83,2832	0,0000
Sai số	6	0,055	0,009		
Tổng cộng	8	1,576			

CV (%) = 1,01

Phụ bảng 78: Thời điểm và liều lượng sử dụng các loại thuốc hóa học (trừ sâu + thuốc trừ nấm) của nông dân trên ruộng thí nghiệm

Thời điểm	Tên thuốc	Liều lượng
2 NSKS	Sofit 300EC	55ml/ bình 20 lít
25 NSKS	BOOM FLOWER-n	35ml/ bình 20 lít
35 NSKS	Filia 525SE	25ml/bình 20 lít
	VALIDACIN 5I	30ml/ bình 20 lít
43 NSKS	Filia 525SE	25ml/bình 20 lít
	Tilt Super 300EC	12ml/bình 20 lít
	BOOM FLOWER – n	35ml/ bình 20 lít
50 NSKS	Filia 525SE	25ml/bình 20 lít
	Tilt Super 300EC	15ml/bình 20 lít
	BOOM FLOWER – n	35ml/ bình 20 lít
65 NSKS	Amistar Top 250SC	20ml/bình 20 lít
	Chess 50WG	16g/bình 20 lít
78 NSKS	Tilt Super 300EC	15ml/bình 20 lít
	Filia 525SE	25ml/bình 20 lít

- Bón phân: được chia làm 3 thời điểm bón phân với các loại phân Urea, DAP, Kali, NPK (20-20-15). Thời điểm bón phân và lượng phân được trình bày trong Bảng 79 sau:

Phụ bảng 79 : Thời điểm và liều lượng bón phân

Loại phân	Liều lượng (kg/1000 m ²)	Thời điểm bón phân (NSKS)		
		8	20	47
Urea	18	5	8	5
DAP	10	5	5	-
Kali	6	-	-	6
NPK (20-20-15)	5	-	5	-

Phụ bảng 80: Thời điểm và lượng phân bón trong cả vụ Hè Thu sớm 2018

Loại phân	Liều lượng (kg/1000 m ²)	Thời điểm bón phân (NSKS)		
		10	20	30
Urea	15	5	5	5
DAP	10	5	5	-
Kali	5	-	-	5
NPK (20-20-15)	5	-	5	-

Ghi chú: - không bón phân.

Phụ bảng 81: Thời điểm và liều lượng các loại thuốc trừ cỏ, sâu và bệnh do nấm vụ Hè Thu sớm 2018

Thời điểm	Loại thuốc sử dụng và liều lượng	Hoạt chất
02 NSKS	Sofit 300EC (70ml/ 25 lít)	Pretilachlo, Fenclorim
25 NSKS	BOM FLOWER –n (30ml/bình 16 lít)	Nitro benzen
32 NSKS	VALIDACIN 5L (0,7-1,1 lít/ha) + Filia 525SE (25ml/bình 25 lít)	Validamycin + Tricyclazole, Propiconazole
40 NSKS	Filia 525SE + Tilt Super 300EC (15ml/bình 25 lít)	Tricyclazole, Propiconazole + Difenoconazole, Propiconazole
50 NSKS	Filia 525SE + Tilt Super 300EC + BOM FLOWER –N	Tricyclazole, Propiconazole + Difenoconazole, Propiconazole + Nitro benzen
60 NSKS	Amistar Top 250SC (25ml/bình 25 lít) + Chess 50WG (20g/bình 25 lít)	Azoxystrobin, Difenoconazole + Pymetrozine
70 NSKS	Amistar Top 250SC	Azoxystrobin, Difenoconazole
78 NSKS	Tilt Super 300EC + Filia 525SE	Difenoconazole, Propiconazole + Tricyclazole, Propiconazole

Ghi chú: Ruộng thí nghiệm không dùng thuốc trừ vi khuẩn

Phụ bảng 82: Kết quả phân lập vi khuẩn *Burkholderia glumae* ở một số tỉnh ĐBSCL

STT	Chủng vi khuẩn	Địa điểm thu mẫu
1-2	BurCT1, BurCT2	Trường Thạnh – Thới Lai – Cần Thơ
3-4	BurCT3, BurCT4	Thới Thạnh – Thới Lai – Cần Thơ
5-7	BurCT5, BurCT6, BurCT7	Phường Long Hưng – Ô Môn – Cần Thơ
8-10	BurCT8, BurCT9, BurCT10	Phước Thới – Ô Môn – Cần Thơ
11-17	BurAG11, BurAG12, BurAG13, BurAG14, BurAG15, BurAG16, BurAG17	Vĩnh Khánh – Thoại Sơn – An Giang
18-19	BurVL18, BurVL19	Mang Thít – Vĩnh Long
20-22	BurVL20, BurVL21, BurVL22	Long Hồ – Vĩnh Long
23	BurTV23	Tân Sơn – Trà Cú – Trà Vinh
24	BurTV24	Thông Hòa – Cầu Kè – Trà Vinh
25-27	BurTV25, BurTV26, BurTV27	TT Cầu Kè – Trà Vinh
28-34	BurHG28, BurHG29, BurHG30, BurHG31, BurHG32, BurHG33, BurHG34	Tân Bình – Phụng Hiệp – Hậu Giang
35	BurST35	Thới An – Trần Dề – Sóc Trăng
36-37	BurST36, BurST37	Liêu Tú – Trần Dề – Sóc Trăng
38-40	BurST38, BurST39, BurST40	Trung Bình – Trần Dề – Sóc Trăng
41-44	BurBL41, BurBL42, BurBL43, BurBL44	Hồng Dân – Bạc Liêu
45-51	BurDT45, BurDT46, BurDT47, BurDT48, BurDT49, BurDT50, BurDT51	Huyện Tháp Mười – Đồng Tháp
52-55	BurKG52, BurKG53, BurKG54, BurKG55	Thạnh Hưng – Giồng Riềng – Kiên Giang
56-58	BurKG56, BurKG57, BurKG58	Phước Thạnh – Giồng Riềng – Kiên Giang
59-60	BurKG59, BurKG60	Ngọc Trúc – Giồng Riềng – Kiên Giang

Phụ bảng 83: Kết quả phân lập thực khuẩn thể ở một số tỉnh DBSCL

STT	Kí hiệu	Địa điểm thu mẫu
1-4	ΦBurCT1a, ΦBurCT1b, ΦBurCT2a, ΦBurCT2b,	Trường Thạnh – Thới Lai – Cần Thơ
5-8	ΦBurCT3a, ΦBurCT3b, ΦBurCT4a, ΦBurCT4b	Thới Thạnh – Thới Lai – Cần Thơ
9-16	ΦBurCT5a, ΦBurCT5b, ΦBurCT5c, ΦBurCT6a, ΦBurCT6b, ΦBurCT6c, ΦBurCT7a, ΦBurCT7b,	Phường Long Hưng – Ô Môn – Cần Thơ
17-21	ΦBurCT8a, ΦBurCT8b, ΦBurCT9, ΦBurCT10a, ΦBurCT10b	Phước Thới – Ô Môn – Cần Thơ
22-35	ΦBurAG11a, ΦBurAG11b, ΦBurAG12a, ΦBurAG12b, ΦBurAG13a, ΦBurAG13b, ΦBurAG14a, ΦBurAG14b, ΦBurAG15a, ΦBurAG15b, ΦBurAG16a, ΦBurAG16b, ΦBurAG17a, ΦBurAG17b	Vĩnh Khánh – Thới Sơn – An Giang
36-38	ΦBurVL18a, ΦBurVL18b, ΦBurVL19	Mang Thít – Vĩnh Long
39-44	ΦBurVL20a, ΦBurVL20b, ΦBurVL21a, ΦBurVL21b, ΦBurVL22a, ΦBurVL22b	Long Hồ – Vĩnh Long
45-46	ΦBurTV24a, ΦBurTV24b	Thông Hòa – Cầu Kè – Trà Vinh
47-52	ΦBurTV25a, ΦBurTV25b, ΦBurTV26a, ΦBurTV26b, ΦBurTV27a, ΦBurTV27b	TT Cầu Kè – Trà Vinh
53-64	ΦBurHG28a, ΦBurHG28b, ΦBurHG29a, ΦBurHG29b, ΦBurHG30a, ΦBurHG30b, ΦBurHG31a, ΦBurHG31b, ΦBurHG32a, ΦBurHG32b, ΦBurHG33, ΦBurHG34	Tân Bình – Phụng Hiệp – Hậu Giang
65-66	ΦBurST35a, ΦBurST35b	Thới An – Trần Dề – Sóc Trăng
67-69	ΦBurST36a, ΦBurST36b, ΦBurST37	Liêu Tú – Trần Dề – Sóc Trăng
70-74	ΦBurST38a, ΦBurST38b, ΦBurST39, ΦBurST40a, ΦBurST40b	Trung Bình – Trần Dề – Sóc Trăng
75-82	ΦBurBL41a, ΦBurBL41b, ΦBurBL42a, ΦBurBL42b, ΦBurBL43a, ΦBurBL43b, ΦBurBL44a, ΦBurBL44b	Hồng Dân – Bạc Liêu
83-97	ΦBurDT45a, ΦBurDT45b, ΦBurDT46, ΦBurDT47a, ΦBurDT47b, ΦBurDT48a, ΦBurDT48b, ΦBurDT49a, ΦBurDT49b, ΦBurDT49c, ΦBurDT50a, ΦBurDT50b, ΦBurDT50c, ΦBurKG51a, ΦBurKG51b,	Huyện Thập Mười – Đồng Tháp
98-106	ΦBurKG52a, ΦBurKG52b, ΦBurKG53a, ΦBurKG53b, ΦBurKG54a, ΦBurKG54b, ΦBurKG54c, ΦBurKG55a, ΦBurKG55b	Thạnh Hưng – Giồng Riềng – Kiên Giang
107-111	ΦBurKG56a, ΦBurKG56b, ΦBurKG57, ΦBurKG58a, ΦBurKG58b	Phước Thạnh – Giồng Riềng – Kiên Giang
112	ΦBurKG59	Ngọc Trúc – Giồng Riềng – Kiên Giang

Phụ bảng 84: Khả năng ký sinh của 115 dòng thực khuẩn thể Đối với 60 chủng vi khuẩn *Burkholderia glumae* phân lập ở một số tỉnh ĐBSCL

STT	Bur TKT																							Tổng (1)
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	
1	ΦBurCT1a	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
2	ΦBurCT1b	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
3	ΦBurCT2a	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	4
4	ΦBurCT2b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	3
5	ΦBurCT3a	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	4
6	ΦBurCT3b	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	4
7	ΦBurCT4a	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	8
8	ΦBurCT4b	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	12
9	ΦBurCT5a	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	9
10	ΦBurCT5b	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	8
11	ΦBurCT5c	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	6
12	ΦBurCT6a	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	7
13	ΦBurCT6b	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	10
14	ΦBurCT7a	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	11
15	ΦBurCT7b	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	11
16	ΦBurCT8a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	2
17	ΦBurCT8b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
18	ΦBurCT9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	1
19	ΦBurCT10a	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	2
20	ΦBurCT10b	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	3
21	ΦBurAG11a	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4
22	ΦBurAG11b	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
23	ΦBurAG12a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	1
24	ΦBurAG12b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	1
25	ΦBurAG13a	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	3

STT	Bur TKT																					Tổng (1)		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20		21	22
50	ΦBurTV27a	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	3	
51	ΦBurTV27b	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	
52	ΦBurHG28a	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	
53	ΦBurHG28b	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	
54	ΦBurHG29a	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	18
55	ΦBurHG29b	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	15
56	ΦBurHG30a	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	3	
57	ΦBurHG30b	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	4	
58	ΦBurHG31a	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	3	
59	ΦBurHG31b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	2	
60	ΦBurHG32a	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	13
61	ΦBurHG32b	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	13
62	ΦBurHG33	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	2	
63	ΦBurHG34	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	
64	ΦBurST35a	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	8
65	ΦBurST35b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	3
66	ΦBurST36a	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	10
67	ΦBurST36b	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	11
68	ΦBurST37	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	5
69	ΦBurST38a	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	5
70	ΦBurST38b	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	13
71	ΦBurST39	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	5
72	ΦBurST40a	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	11
73	ΦBurST40b	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	5
74	ΦBurBL41a	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	12

STT	Bur TKT	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	Tổng (1)
75	ΦBurBL41b	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	12
76	ΦBurBL42a	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	11
77	ΦBurBL42b	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	11
78	ΦBurBL43a	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	10
79	ΦBurBL43b	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	11
80	ΦBurBL44a	-	-	-		+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	6
81	ΦBurBL44b	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	12
82	ΦBurDT45a	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	2
83	ΦBurDT45b	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	3
84	ΦBurDT46	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	20
85	ΦBurDT47a	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	20
86	ΦBurDT47b	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	16
87	ΦBurDT48a	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	16
88	ΦBurDT48b	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	18
89	ΦBurDT49a	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	13
90	ΦBurDT49b	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	12
91	ΦBurDT50a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	7
92	ΦBurDT50b	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	2
93	ΦBurDT50c	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	19
94	ΦBurKG51a	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	10
95	ΦBurKG51b	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	7
96	ΦBurKG52a	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	18
97	ΦBurKG52b	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	9
98	ΦBurKG53a	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	6
99	ΦBurKG53b	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	4

STT	Bur TKT	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	Tổng (1)
100	ΦBurKG54a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	2
101	ΦBurKG54b	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
102	ΦBurKG55a	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	4
103	ΦBurKG55b	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	7
104	ΦBurKG56a	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	7
105	ΦBurKG56b	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	16
106	ΦBurKG57	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	2
107	ΦBurKG58	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	2
108	ΦBurKG59	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
109	ΦburKG60	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	5
110	ΦBurVL34	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	17
111	ΦBurVL39	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	15
112	ΦBurAG58	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	17
Tổng		35	32	27	43	45	20	25	9	27	26	36	45	43	59	40	42	25	51	45	45	62	55	

STT	Bur TKT	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	Tổng (2)
50	ΦBurTV27b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
51	ΦBurHG28a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	1
52	ΦBurHG28b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	1
53	ΦBurHG29a	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	10
54	ΦBurHG29b	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	11
55	ΦBurHG30a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	3
56	ΦBurHG30b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
57	ΦBurHG31a	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	4
58	ΦBurHG31b	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	3
59	ΦBurHG32a	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	16
60	ΦBurHG32b	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	15
61	ΦBurHG33	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
62	ΦBurHG34	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	3
63	ΦBurST35a	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	11
64	ΦBurST35b	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	15
65	ΦBurST36a	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	13
66	ΦBurST36b	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	14
67	ΦBurST37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
68	ΦBurST38a	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	2
69	ΦBurST38b	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	16
70	ΦBurST39	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
71	ΦBurST40a	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	7
72	ΦBurST40b	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6
73	ΦBurBL41a	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	14
74	ΦBurBL41b	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	11

STT	Bur TKT	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	Tổng (2)	
75	ΦBurBL42a	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	9	
76	ΦBurBL42b	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	10	
77	ΦBurBL43a	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	8	
78	ΦBurBL43b	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	9	
79	ΦBurBL44a	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	
80	ΦBurBL44b	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	15	
81	ΦBurDT45a	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	3	
82	ΦBurDT45b	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	2	
83	ΦBurDT46	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	11	
84	ΦBurDT47a	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	17	
85	ΦBurDT47b	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	15
86	ΦBurDT48a	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	16
87	ΦBurDT48b	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	9	
88	ΦBurDT49a	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	13
89	ΦBurDT49b	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	8	
90	ΦBurDT49c	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	12	
91	ΦBurDT50a	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	13
92	ΦBurDT50b	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	15
93	ΦBurDT50c	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	17
94	ΦBurKG51a	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	8	
95	ΦBurKG51b	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	3	
96	ΦBurKG52a	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	12	
97	ΦBurKG52b	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	10	
98	ΦBurKG53a	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	3	
99	ΦBurKG53b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	1	

STT	TKT	Bur																				Tổng (2)		
		23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42		43	
100	ΦBurKG54a	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	4	
101	ΦBurKG54b	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	4	
102	ΦBurKG55a	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	6	
103	ΦBurKG55b	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	2	
102	ΦBurKG56a	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	
105	ΦBurKG56b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	
106	ΦBurKG57	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	3	
107	ΦBurKG58	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	3	
108	ΦBurKG59	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	
109	ΦBurKG60	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	5	
110	ΦBurVL34	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	13	
111	ΦBurVL39	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	16
112	ΦBurAG58	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	17
		49	46	10	28	35	46	49	54	44	9	61	21	37	54	45	49	40	36	5	58	36		

STT	Bur TKT	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	Tổng (3)	Tổng 1+2+3
1	ΦBurCT1a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	6
2	ΦBurCT1b	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	4
3	ΦBurCT2a	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	26
4	ΦBurCT2b	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	19
5	ΦBurCT3a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	10
6	ΦBurCT3b	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	15
7	ΦBurCT4a	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	11	31
8	ΦBurCT4b	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	14	41
9	ΦBurCT5a	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	7	28
10	ΦBurCT5b	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	14	38
11	ΦBurCT6a	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	9	21
12	ΦBurCT6b	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	12	38
13	ΦBurCT6c	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	11	19
14	ΦBurCT7a	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	8	35
15	ΦBurCT7b	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	14	42
16	ΦBurCT8a	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	10	18
17	ΦBurCT8b	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	10	14
18	ΦBurCT9	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	8	14
19	ΦBurCT10a	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	1	8
20	ΦBurCT10b	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	1	8
21	ΦBurAG11a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	1	6
22	ΦBurAG11b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	1	5
23	ΦBurAG12a	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	3	7
24	ΦBurAG12b	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	3	7
25	ΦBurAG13a	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	2	5

STT	Bur TKT																		Tổng (3)	Tổng 1+2+3
		44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60		
26	ΦBurAG13b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	2	7
27	ΦBurAG14a	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	5	8
28	ΦBurAG14b	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	4	6
29	ΦBurAG15a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	6
30	ΦBurAG15b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	4
31	ΦBurAG16a	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	11	26
32	ΦBurAG16b	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	6	25
33	ΦBurAG17a	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	8	37
34	ΦBurAG17b	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	9	28
35	ΦBurVL18a	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	8	12
36	ΦBurVL18b	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	5	9
37	ΦBurVL19	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	4
38	ΦBurVL20a	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	9	25
39	ΦBurVL20b	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	5	14
40	ΦBurVL21a	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	12	26
41	ΦBurVL21b	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	9	21
42	ΦBurVL22a	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	13	33
43	ΦBurVL22b	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	8	27
44	ΦBurTV24a	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	8	13
45	ΦBurTV24b	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	8	17
46	ΦBurTV25a	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	13	48
47	ΦBurTV25b	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	11	35
48	ΦBurTV26a	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	6
49	ΦBurTV26b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	4

STT	Bur TKT	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	Tổng (3)	Tổng 1+2+3
50	ΦBurTV27a	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	2	5
51	ΦBurTV27b	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	2	4
52	ΦBurHG28a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	2	4
53	ΦBurHG28b	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	3	5
54	ΦBurHG29a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	28
55	ΦBurHG29b	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	3	29
56	ΦBurHG30a	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	7	13
57	ΦBurHG30b	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	4	8
58	ΦBurHG31a	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	5	12
59	ΦBurHG31b	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	5	10
60	ΦBurHG32a	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	6	35
61	ΦBurHG32b	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	33
62	ΦBurHG33	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	7	11
63	ΦBurHG34	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	1	5
64	ΦBurST35a	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	9	28
65	ΦBurST35b	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	9	27
66	ΦBurST36a	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	12	35
67	ΦBurST36b	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	11	36
68	ΦBurST37	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	5	11
69	ΦBurST38a	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	11	18
70	ΦBurST38b	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	10	39
71	ΦBurST39	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	3	11
72	ΦBurST40a	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	9	27
73	ΦBurST40b	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	9	20
74	ΦBurBL41a	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	12	38

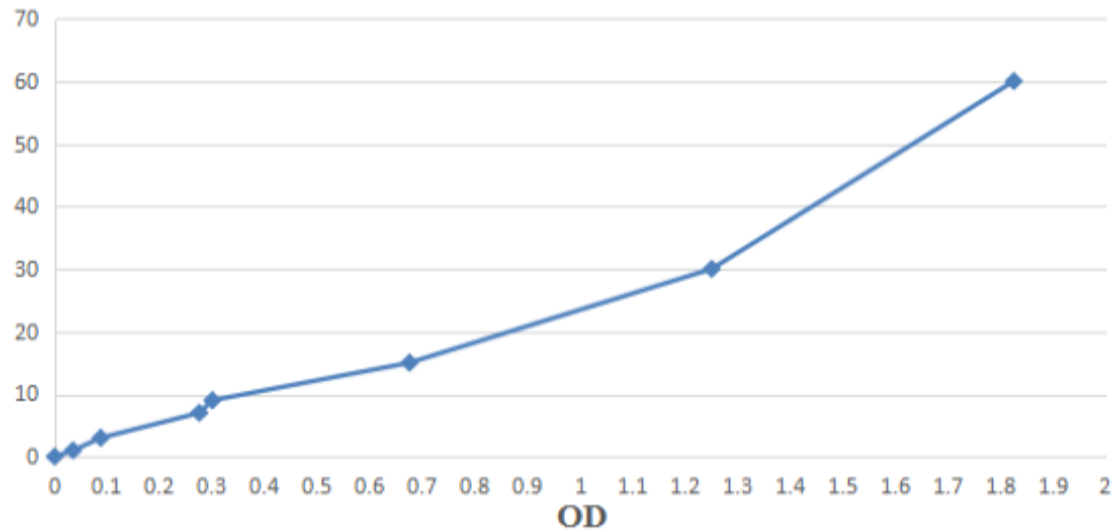
STT	Bur TKT	Bur																Tổng (3)	Tổng 1+2+3	
		44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59			60
75	ΦBurBL41b	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	9	32
76	ΦBurBL42a	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	12	32
77	ΦBurBL42b	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	9	30
78	ΦBurBL43a	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	9	27
79	ΦBurBL43b	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	10	30
80	ΦBurBL44a	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	12	21
81	ΦBurBL44b	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	7	34
82	ΦBurDT45a	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	7	12
83	ΦBurDT45b	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	4	9
84	ΦBurDT46	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	14	45
85	ΦBurDT47a	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	15	50
86	ΦBurDT47b	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	14	46
87	ΦBurDT48a	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	15	49
88	ΦBurDT48b	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	16	43
89	ΦBurDT49a	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	9	35
90	ΦBurDT49b	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	8	28
91	ΦBurDT50a	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	13	33
92	ΦBurDT50b	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	6	23
93	ΦBurKG51a	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	7	25
94	ΦBurKG51b	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	8	18
95	ΦBurKG52a	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	13	43
96	ΦBurKG52b	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	12	31
97	ΦBurKG53a	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	6	15
98	ΦBurKG53b	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	6	11
99	ΦBurKG54a	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	7	13

STT	Bur TKT	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	Tổng	Tổng 1+2+3
100	ΦBurKG54b	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	9
101	ΦBurKG54c	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	4	6
102	ΦBurKG55a	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	13	23
103	ΦBurKG55b	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	7	16
104	ΦBurKG56a	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	8	17
105	ΦBurKG56b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	16
106	ΦBurKG57	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	5
107	ΦBurKG58	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	4	9
108	ΦBurKG59	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	1	3
109	ΦBurKG60	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	10
110	ΦBurVL34	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	15	45
111	ΦBurVL39	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	16	47
112	ΦBurAG58	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	16	50
Tổng		18	58	62	48	44	20	62	64	86	59	57	33	28	69	30	38	49		

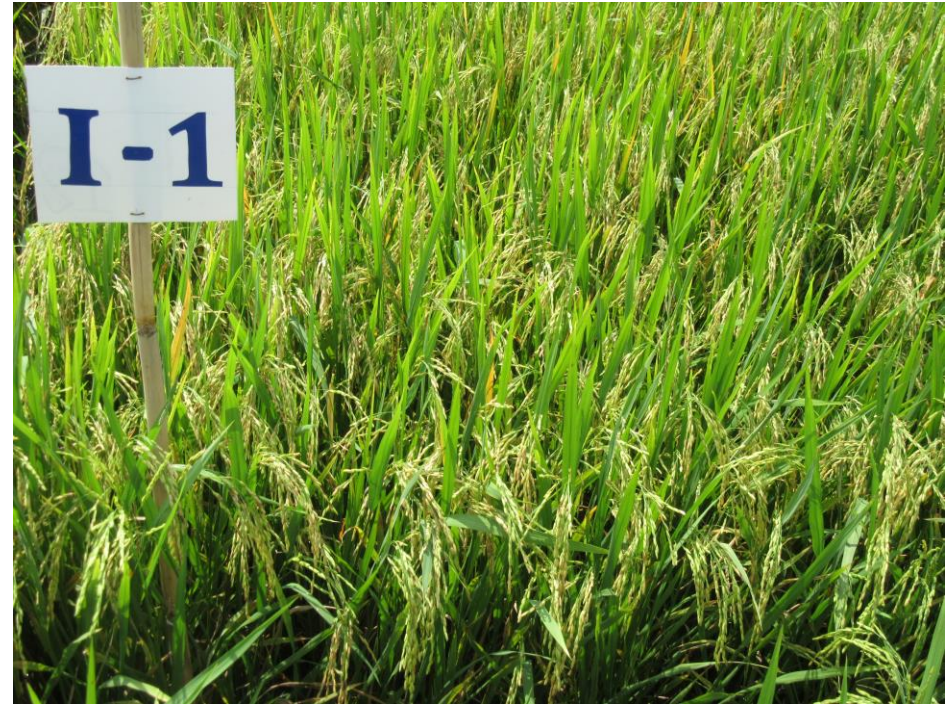
PHỤ HÌNH

Phụ hình 1: Đường chuẩn mật số vi khuẩn *B. glumae* tương ứng với giá trị $OD_{600nm} = 0,3$

Mật số 10^8 cfu/ml



Đường chuẩn vi khuẩn *B. glumae*







Hình: Hình ảnh bố trí thí nghiệm ngoài đồng vụ Đông Xuân 2017-2018



**Hình: Hình ảnh ruộng lúa thí nghiệm tại ấp Bình Điền, xã Bình Ninh,
huyện Tam Bình, tỉnh Vĩnh Long**

KẾT QUẢ GIẢI TRÌNH TỰ BA DÒNG THỰC KHUẨN THỂ

ΦBurVL34:

CCGTGTGGTTTCATAGGGTACTGTAGCGGCTCGCTCCCCTCGCCCGTATCTGTCTCTTTTCGTACAGGTATCTATGAGGGTATTGCTAGGGATACTCTAGTGATCTCTACATGTATCACTAGGTAAGTGTAGGTATCTCTAGGATCTACTG
TAGTGTCTCTGGTGTATCTCTGGTGTACTGCTAGGTATCATGTCTTGTATCCGTGCATCGCCTGTTCTCGGCTCGCCGGCTACGCTTTGTTTGCCTTTCCATCGTGTGGCACTTAACCGCTATGGTGTAGACTATAGCTCTCATGGTACT
AAGGAGATAGCATTGACTAGGGTAAGGGTAAGGCATTAACGACTACAGGAATGACTTAGTGCTGTTCAAAGCTACTCAGTACGCTAAGCTTAAGGAGTTACTAGCTAGTGGTGTAGATGCTAGTACAGCTAGTGTCCAAGCTACTGAG
TACGCTAAGGCTAGGGTAAGTGTAGTGGCTAAGGCTAGACGAGAAGCTGCTGTAGGAAGAAAGTGTGACAAGGCTTAGGAACTAGCCTAAGCTAAGCTAAGCAACAAGGTGCGGAGTACGCTAGGTAACAAGGCGAAG
AAGGCCAGCGCTCTAACGAGCAAGGCTAAGTAGCTGACAGGGCGTTACCGTTAGCTGATAGGATTACCTGCAACTCAGTGTCTAGTGTGACAGCAGTAACGCAAGTATGCTGTAAATGCAAGTACGCTAGGTAACAAGGCGAAG
GAGAACGTTAGCGGCTAGGTTGCTTCTGTTAAGACACAAGCGCTTGACACTAGCAGCACAGCAGTAGGATGACGTATGCAAGTGCAGTGTTCGCAAGTACCGGTGATTACAGCCGACGTAAGCGAGGCGCTGAGTAGTGATCC
CGGATAGCAACGGGGCGGTAGCGAAGCGATACGCGGCAAGTAGGCAAGTAGGGCTTAGCGGGTAGCAGAGTGATACGCGGAATTGCAAGGCCCTAGCAAAAAGTGGAGAGGCATACCCGCTATCCATGATGCAAGCGAGGGGCACTA
AGCGACGGTCTAGGATCGTTGACGAAGGGTGAAGCGCCGGATGATGACGGTCCGGGACAATAGGGCGGCTCAGTAATCTACGCCCTTAGCGTAGAGCTTCGCGCGATGGCTGAGACTGCGCTGTAGCTACGATCGGGTAGCGATGAC
AACGGCTTCGCGGGTGATTCGCGATACGATGACAGGGCGACAGTACGCGGACGAGGGCGATGGGTAGTGAATGGTGCCTGTTAAAGCGAGCAAGCTACGAAACCTCACCTCGCAAGAGGTGTTGTAATTCGGTGGCACTTGGCGTA
GCAGTAGCGGAGTGAACGCAATGCCCTGGGCGCATACGCCAGGACGGGACAGAGCGGGCCGCAACCTCGATAGTGCCACCGAATTAACAAGTGGAGAAATCATCATGCTTTACCAGACCGAACTTATGGACGTTGAGAATCTGGC
CACCGGTAAGCGCACCTACTACGTAAGAAATGTGACGTTTTACGCGCGTGTCTAAGGCTGAGTTTGACACTCGGTTGACAGTGTGATGGTATCAGTTCGTCGTTATCCGTACCGAAGGACGTTACCGTCGAGCTACCGCACTTGCA
TTTACGAGCAGTAATCACCTGACCTGAACAGGAGAATCATCATGGCAACGAAGAAAGTGAAGGAAAAGACCGCGCCGAAGCAAAAAGCGGTTCTCGCTTATCACAGCAAGCCGAGCTTAACGCGGCCATCAAGTCGATCGGCACTCGC
TCCGACGGCTTACGCGGACATCCACCGCGCGCAGTGAGCGTGTATGTACACAGCGCCAAGCACAACGATCCGGACGTTGCAAAGCGGCTGCTGGACGCGATGGGCAAAGCAGATGCGCAAGTGGCCATGACCGCATGGCTGTGCG
CATACGGCGCGTTGCAACCGACGAGCATGGCGCGCTGGTGTACGTGAAGGAGAAGCGTGAAGACGGTGCAGACTGAGGCCAAGCTTACGCGCGGATTGCCGAGCCGTTTTGGATGTTGCGCGCGGAACCGAAGTACGTGCAGTTCGAT
CTCCAGAAGTGGTGGCGCACTCTGCGCCGCGTGAAGATGCCCTGGCGAAGCAAGCACAGGACGCTACGCTTATTAAGCCCGATGCTCTCGCCGAGCTGCGCAAACTGGTCCCGGCGGACGCCAAGTAACCGAGCGTGCATCATGTA
CATCCTGTACGTATGGCTGATCGGCTCGTTAATGATTGGCGAGCCAGTGACGCTGAGCAGTGCAGAGGCGCAAGCCATCGCGGCCCGCAACAGCACGGAGTGCCTAATGTGAGTGCCTTCGAGTCCGGGAAATTTGAGGTGAAATGA
TGGAACAATTCATTGTGGTATGTTACCCAGCACACGAGGGGCGTTATGGTGGCGTGTGCACGACGAATCGGATGAGCCGTGCACAGGCACCCGCGCAGAAATGGAAGCGCTCCGCGATGACTTCATGCGCCGCTTTCCGGGCGAGCT
GCGAGGTGCGGGAGGATGCGTCATGGTAAATCTTCAAAGTGCAGCGGACCTTAAACGCCAATCCATGTTGCATCCTGCACGCAAGAACGTTAGCTGGGTTGAACTGGGCAATGGTTGGCAAGTTGCGGGCCGACATAAACGAGG
ATACCGCGCGTGCCTCGCGGCGAGTCTCGGCTTGCAGTCTACGTGGAGAAAGCATCGTATAATGGGATGATTTTCAATGCGACGCCGACCAAGCGGCGCCGCGATGTCGGCCCGCGTCTAACCGCTGCTGACAGCAGG
CATGCGGACAGCTCGGGGCGTACGCTACCTCAGTGACTGCACTCCACGTTGCGCAAGCGCTGCGCGATCGAGGACGCGGTATAACGGTACGCTGTCGTTTCTTCAACGCGAAATGGACTGTCAACGGAGTACCGGATCGGCTGTG
AACCACTTCTTGTAGTTTAAAGGATTGGCTTACTGGGCAGAAGCGAGCGCTCGATTAGATAGCGCTCCAGACGGGCGGTACTACCGAAGTGGGCTGTGCAACCAAGTGTGCCCTACTGGGATTGCGAGCGCGGATGCCCGC
GTGGCGATGATGCGAGACTACGAAAGCGCTGAGAAAGCGCTAGTAGATAGCGGCTGACCCATCGTATCCTTTTGGCGGCAACAACGTTACGCTGAGGATTACTGGGATAAACAGCGCACCTTAAACGAGCGCGGCTTGCCTG
GGTGCCTAAACCAATTGAGCGCTGGAGCGCTAGGAGGAACTGTGTACGCAATCCTGAGTGTATTGGGCGGCTTGTTCATCGCCAAAGTGTGGCCCTTACTAGCTTGGTTCGTGGTGCATACGAAACCATGGCGTGAAGCGCCA
AGCCACCAACAGTGGGACAACCAAGACTGGATGGACCTATGAGCCGCACTGAACAATGATTCTGACATGAGCCGCAAGCAGCGCTACCGCGCAGAGCAGCATGAATTTGAGCTCAGATCATGGTCCGACCTACCCGAGGATACG
CTTTCTGTTGCGCGCTAAGCCTGACTGGTACAGGATTGCTGCGCCCTTACGCTTGCAGTAACTGCTGAAAGAGGACGTTGCTAAACTGGCGAAAGCTCGGCTACGCGGCCAGGACCGATGGCCGCTATGGCGATAAGG
AGATAATGATGGACCAACAGAACTGAAGTTCTGCGTACCTTGAACGAAGCGGCGTAGACAACCCGCTGGAGTGGAAAGTGCAGATTGTCGCGCCGACGCGCACACCGGTTGTTGATTTTTCAGCAGGTTTCTGCTATGTAAGTGT
GGAGCAAACTCGCGGGAGCAGTGCATCCGTGTAAGTGCAGAACGAGGTGATGTGGTCAATCTTACTGCTGCTGACGCAATCGCTGACGTGCTGTGTCGCTGAGCGATAGGCGCAACACGCGCTGGAGTGTCCAGGTTATT
TGGGACGGGATTCGATACCGCATGCCGGAAGTCTTACGACGATGCGTTAGCGTGGTTGGCCTGCTACCGTTTTCGGCGAGGACCTCATCGATCGCACGTTTACGCGCACTACTGAGTGCCTGGCGGCGCATGCGCTACTGACAATTT
AAACGCGCAAACTACAGGAAAGACCATGCGTGCCTACAATTCGTACAGCAAGTTGCAATTCGACGCGAAAAAGTTCAACATGTGCGTAGCGCATTTCCGCGAGTGTATGCCACACTGCGTGAGCAGTTCAATTTGACACGATGTCATC
ACCGGCAAGTCCGGCGGCTGCTGGGTTTTGCAAGTTCAGCAGCGTGGCGCTTATGTCGTTGCAAGGGCGAGTGTGCGCACGCGGACTACATTGAGGGTGAAGGACGAGTTTGAAGACTACGCGTTCTTCGATGACTTC
GTGAGCAGTGGCGAAACTCGAAGCGCGTATTATGAGCTTGAAGGACTGGGCTTAGAAAAGATGCGAATACGCTAATGCGCTAAGTGCCTTCAACATTGAGTACGACGGGGAGCCGGCACTGCTAGGCTTATCTGCCGAAGAC
GCCAGGGGTTGACGGCCGAGATACACCGCGGTATGTAAGTGGTAGGAGATACATGCAAGCAACAACAGATCGAACGCGTTCGAAAGCAACGCTGGAGCAGACGGAAGGGCAAGCGCTGCGTCAACTGCGCAAACTGGAGAAAC
GAGCCCGCAAGCGGACCGCAACACGGCGCAACGATAAGCGCACAGGTGCTCTATGATCTACATTTCAACATCGGTAAAGCGGCGAGCAAGTGGCAGGCGAGCCCGCAGGCAACCGTCTAGAGGACGACCGAATCCAGCGAGTG
GTACGCGCGCTGGGTTGACATCCGACAGTACAACGGTGCAGCAAGTGCAGGCGGCAACCTTGCAGGCTACTGTTGGTGGAGGACACACGGCCACTGGCGCAGTACGGCGCACGACATCGCATCAACGTTGGTGGCATTGCA
TCTGATCAGGATCCATTGCCCGGTGCCATCCGTGTGCTGAACAGCATGGAAACACGGCCGACTGCTGGCCGCAACGTTGAACTGGGGCAGTTTCAACCGCAAGTCTTTTGTGAAACCGGAAGCACTTACCTGTAAGGAGCA
TCATGAACGGCGCACATACATCAAGATTCAAACGATCCGACATCACGAACAGCCGCTATCAAGCGCAGTACAAGGGCGGCTGTCGCGGAGTTTTGACAGACCCACCGCGGCTGGGGCAGCTGCGTACGATACGCGCGCGCT
GCTCAGGTTGCGTGCATTCATGAACGCTGGGCGCACGATCGAATTCGACAAGGTAGGGCACTTCTCATGAACATGGACCAATTGGTGAATTCGCTTGCACATAATCGTAGTTCGCGGTTTTGCAAGTAGGCACATTACTGCTACTGGCCGA
TCGAGCAGTTAGTGGCTGTTGGTAGACTTACTGGTAGACGCAAGGCAACTGCCAATTTTCTAAACGCAACTTCAACGAGGAGAACTCATGGAAGTGTAAACGTCGCGGTCGCTGAGCAAGCTGGCTAGTGCCTGTCCAA
CTTCGCGCAACAGCAGCAAGTGCATAAGATCGCGAAGGACTGGATACCGCACTCCGTCAAGCTTCCGCGCATGATGCATTGGCTGCGCCCTACGGCAGCAACAGCAGCGGATCCGTACAATCCGACCAAGGAGCGTTACCGGAAAA

GCGCAACGTTGCCCTCCATGCCAAGCGGGTCGGCCCGCATACCCGGCTACAGTACGGCCACGTGGCGCACAACCTCGGAACAACAAGACCATCCAACCTCATGAGCAACCCGCTCTGACTGGCCTGCTCTGGCGCAGCGGGCTATGGAT
GCCTCGACCAACCTGAACGCCCGGTACAGCAACGCTCAAGGTGCGCAGGATCGGCAACACGGACAACCTTTGAGGTGGCGTAATGCGCACTGAACTTCGACATCAAGCTTACCGGCAGCGTGACGTCGCCGACGACTGCTGCGCCGC
TACGCAGCGATGCCAGCGACCTGTAGAGCGGGCGGGGCGAGTACCTGCACTCGATCCACAAGGAGCATTACGAGGACGATGAGACGTTCTCCAGCTCGCCCTCAAGCATGCTCTGCGCAAGATGGCCCGGAAGGCTTCGCCGCC
GACATCCAGACCTGGGCGCAGCGAGGAATGCCGCGTCGGCTATCGTCTCGCCCAAGCGCGGTGACCGTAAGCATGCCGAGCGCTGCGCCGCTGCCGGTGGTACCGAGCCGAAGGCGGAATCGCCCATCGTGTGAGGGCTT
CGCCGCCGATGCCGAGATTCTAGCTTCGGTGTAGCCCGACACGCTGGAACAGGCCGAAGCTTAACCCCTTTCAACCAACCCATAGGAGATTTACATGCCCATCGTCAACCCGACCTCCCGCAACCCGAATCGACCTCGCCCGCCACTG
CCCAGGGCGCTGCTCAACTTCAAGCCGTTCTGCCGGCCTACAGGCCGCAACAGCGGCTGTGCGAGCCAGGTAGTGCCTACCCCGCAGTGTGTCGCCGACCGAACAGCCGCGCCGCTACGCAA GCCGAGGGGTAATCGAAGGCACG
AACATCCCGGCCCTGCCGAGCCGACCTGACGCGCGCAAGTCTGGGAAACGCTGCTGGCTGTGCGGCCGATGCGCAACGTCAGCGGCTGGTGCCTGCTACTGGTGAAGCCGAGTCAACTGACGCCGAGCCAGAAGTTGGCCGC
TAAGATCGCCGGAAGAAGGCGCAGCAAGAAAAGCTCGCCGCCGAGATCGCGAAGCTGGAGACGAGTTCGTTACGCGACCTGCTCGATAAGGTTACGGAAGGCAGTGTGATCGTGGCCCGTGGGCGGTGCCGAGACTGCCCGC
GAAGTCGCTGCGACCGTGTGCGGTGACAGCCCTGGAGAAGCGCGACCCGCGCTGAAGTTACTTCGCGCAGGGTTCGATGCCGAAACCGTGTGATCCAGGACAGCCAGATCGTGACATCCAACAGGTCTAAAGCCATAGCCT
GGTTCGAAGCCTTAGCATTCCCGTGGGCGGTGCCCGCGGCTACTACCTGGTGTGCTGCTGTGTTGATGACGCGGGCCATCACTACCATCATGAGGTGATTATGTGCAACTACACGCTAGAGGACTATTACATGGCGAAGTCG
GACTTCTACCGGGCGATGTCAGCCAGCGACTACGCTGGGTATCGTGTGCTAGTTAGCGCAATGAGCAATGAGATGGCCCGCTGAAGAAGGAACTCGTTGCCCTGAGCAACCGCTCGCAGTGGTACATCGCCGATGAAGTCGGTA
GGAAGCCAAACGGAACAGACGCGTCCAGCAAGCAGCAACCTGAGGACGCGTTGGAGCACGCGACGGAAGCGTTGACAACTTACGCCCTCGTGCAGGACATCAACAACCGCTGGAGCTGAAGTAGTAGCACAGCCTAAAGGGC
TGTGCTTGGTGTAGCTCAGATAGCAATGGGGAATTATGACGATAAATCCCGCTGAGCCTAAGTAGCTGGCATAGTAAGGGACGTGCTCCGAACGTTGCGTGAACCTCCGGAGACGAGCCCGCTGAGTACCTTTGCTGCGAACA
GTAGAGAGCGCCGAGCGAGTGCAGGAGTGCACACTGCCACCAAGGCATAGCCCTTTACTGGAGGCAACATGGCAGCTGTGCTGACGACGAATGTTGCACTTGCCAAGCGCGTGGCGATAGGACAGCAACGTGGCATCGGCA
CTTGCGGAGGGCGCGAGAATTTAGTGGTGGTAACGCGGGAGATAGATGGTGGAGTACTGCCAAAGCTGCAAGAGTGGTGGCTAGTGATGAAGGATCACGTGCTTGAACCTCAGCCCTCCGCGCCGATCATCGTGTGACGC
ACCCGACGGACGAAAGGAACTTGAAGTTGCCGAGTACGTGACGGCGCAGTTGGCTCATTCTGCGCGCAAAGGGGCTGGACCTATGTATGATGCCGACGCGAGTTCATGGAGTGGGAGCGTGGACGCTGTTATTAGCGTTT
CCCCAGGGCTGATGGCCGCGACACTCAGGGTCAAGCCCAATGAAGTGGATAACATACGATCGGCAGCATTCTGACTTCGCGAACTTGAAGCAGCAATCTCGAAATGGCTACTAGTGAAGACGCGTTTTCTTTGCTGAAGATA
AGCACGATTGCTACGTCGAGTGTGATTTGACTTGGGACGAGCGCACACTCAAGCGTTTGTAGCGTGTGAAAGTGAAGCCAGCAAGTGGAGTCTTACGACGCGGATGCGCCTGGCGGAAAGGCGCGGAAGCAAAC
GCGCTGCGCTAAGGGCTAGGAATCAAGTCAAGCGCGCGATAGCGTGCACCTGAAGGGTGGACCCGAAGGACATGACGCAAGCTGCGCTACGTGAACAGTGCAGCGCTACTGCAATTTAACGGGAGATCAITATGTGTAC
CTACGATGCACTGGAAGTGAAGCAGCTTGAATCAAGTATCGTGTTCCTGTCAAGTCAAGGCTGGAAGTGAAGCACTCTGGAACCTCCGCACTCCCGGATGGTGAAGTACGAGCTGAGGTGGCCGGATGACTTTGTAAGGCGCCTCAC
AAGACCTCACTGTGAGATTAGTATGAGTGTGCTGATACTTACGCGTTGCGGGATGACGCGCGGTATGCTCAACTGCGGCCGCGGTCCCGACGACATGCTTCCGGCGATACTACAGCCATGCTCGCGTGGTTCAGCTCTACT
TCAACACGTATGAGAGGCCGAGCGCGTGCAGGTTGACCAACTCAAGGCGCTGATCGCGTACGTGCCGATCCGAGCGGCGGGGCGAGGCTATCGCCATCGCGCAACACTTCGCGATCAGCTCCACCAAGAGCCGCGCTAGATGCTA
TCGTGCTGTGAGAACACGCTGCGTGAGCGGACCTGTCCGGCCGTGCTGGCGCACTACTGGCTCGATAAAGTCAAGGCGAGGAGTGCATCTCGCATACGAGTTACGGGCTCTCGCGTGGAGACGAGCCGCGAGATTACGAGGGC
GGCGTTTCTCGTGGCCGATGGTCCGATCTCCAATACCTCGACAGCATGCGGACGAGGGCGGCTGGTTCATGACGCTTTCGGGCCGCGCTCACCAAGTGAATCAAGGGGCTGCGCCTGGAACAACATCGCCATTGCGATGCCG
ACCGACAAGGGCAAAGACTCGTTGATCTGTGCGATCTTCGCAACATCGCGAAGCAGCGACGCGCTGAGTACGAGGCGACGCGCGCCGATCTGATCCTGATTAACGAGGGGCGAGCCGAGCGCATCACGCCTCGCATGTACCAGAC
GGTGTGAACATCGACCGGAGGCGATGTACCGCATGAGCAATGAGGGATTGCTGGAGCAGGCTTACGCCGACGCGATCGGTGGCGCGGGGCAATCCGCTTAAAGAACATCCATGGCAAGAACGATGCGAGTGGAGCAGATCATC
CAGCATACAACCCTGCAATCTGCGTCAAGGACATGACCGGGCGCATCCGCGCCGTGAGCAATCGCGCGGGGCGAACGACATCGGGCAACTGGAGGAAGTATGGAACGGCATGCGTGAAGTTCGCCCATCCACGACATGCTACA
CTGCGGACGCTACAAGTGTGAGCGAGGGATTGAAATGCTGTTCCCTCAATCTGCGATGAGCAAGCAGCAAGGTCGCGATACAGACCACACTTATGCTGCTCATGGCGGAGCGTTATCGAGCGCCAAATGTGCGCGCAT
CAGTACGCCAAGAACAACCTGGCTGCTGCGCCGCAAGAGCGAGAACCAGTTTACAGTGTGTTGACCCGCAACTTAAACATGACCGTCCCGGAGGCGTGTGGAACAATGAGTATTGGTGCCTGACGCGGAGCCGGGAACGG
TTGCGCAGGATGCGCATGCTTAAATGTAGACGACGCGAGTACGTGCCGACCTATCAGGTGTACGACAGCGCACCGCAGCCTGTGTGACGTTGTTGACTGCTCCAGCGCGGAACACATCTTATCAAGGAGATCAAAGCGTGAAGC
TTACTCAGAAAGGAAACGAAGGGCAAAGCCTACTCGCAAACTAAGTACCTAACAGTGCCTCAAGCAATCGTCTCGCACTGGCCGAGCAAGGTGTACATGACCCGCGCGAGATCAGCACGGCAACCGGATCGAGATCGCCAGCT
GTGTGGCGCTGTCCAAGCTCGTCAAGCGCGCGTGTGGCCGAGGGTTTCGCGGCAGGTCGAGACTACCGGCAAAGACGTGATCCACTACCGCTAAACCGTTTCGAGGACTGATGAAGACAACGCAACTACTTTTATGGGAAA
CCAGCCTGGAACCGTGCCTGGTCCGTCGACCACTGCGATCATCTGTCGCCATCGGCACAGCACTGTTGAATCCTGGTGAACCTGCAAGTTTCGTTGATCCAGATGCAAGTGGCGCGTGGCAACAGCGGAACTGTTATGCA
AACGCGAAGATTCTGGTCAACTCGTATCGAGATGACGCGGAAATGGATCGTGTAGGTATTGAGTTGCGCGCCCGCTTCTGTTGGGATTAAGGCGGAGGACCATGGCTCAAGCGCTGATGAAGGGCCACAGTGGCCAAAGGCA
AGCACAGATCAAGTGGCCCGCTTGGGAGATCAAGGTTGACGAGATTCGCTGCGACATTCGAGTACCCCGCGGATGAACAGCGCGCGGTGTACGCCACTATGAGCAGGGAGCACGCGTATCTTCGCGAGTTACGCGGACAAA
GTGCTGCAACCTGCGCACTTTGATAAGCCGTTAACGAGCTTATGGTGCATCAATGCGACTCGCTAGATTGCGGTGTAATCGTGAACGGCAATTTCAACGACAGTATCGATGGGTACGCTCGTAAAGGGCGTACCCCAAGACC
TGCGCAGGCTAAGGTGAGTTATCTCTGTTGACCTGCTGACTCCGCAACCTGCCATACGGGGGACGCGTTGGGCGCTGCTACTACGTGCAAAAAGTTGCGCAAGTTGCCGAGGGCTAGGCTACCGCTGCGCTTCCGAATGGT
CCTGTGGACAGCGAGCAGGATGTAGAGAAGCGTTCGAAGACGCGCTTGCACGAGGATTGAGGGTTGATGGTTAAGACGCGGGACACGCTGTACGAGCCCGCAAGCGCTCATACGGCTGGTGAAGTCAAACCGGAGGAAAGT
GCAGATGGCGTCACTGCGGATCAATCAAGGTTACAGCCTCGAAGGGTGCAGCTGGATCGAGTGGTAGCGTCTGTACTCTGGAAGACGGGAGCACAGCAACGTCGCGGTATCGAGATGCGCTTGGCCGGAAATGCTGGC
TAACCCAGCCGCTTATCGCCGCTGGTGCAGTTTATCATGATGCGCGATCGTCAAGTGGCTATCGCATCCCCGCTTCAAAGTTCGCGGAGGATAAGGATGAGATACGACGCTATAAGTACAAGAAGCAGAAGGATGCC
AGCGCCGATGCCATGGCTGCGCTTTCGAATACTACTCGGGTACTGCGCGAGCTAAACGACCATGCAAGCTAAGGGCAAACCGCGTGCACGGAGGAGTACTTTGATGAGCGGCTGAACTGGACAACCTGTTTCTCATCGG
ATCAAGTTGGCCGATTGAGCTGGAACTTATCGCGGAGGCGACGCAAGTGTAGAGTGTGTCGGGCTGGATGGCGCTTGAACACCTTGTAGGCAGGCTCAACATGGCAACTTATCGCACTCGCGAGATCGTCCGCGCCAT

CGCGACCTTGCGTTGCGTTGCGGCTGCGTGTGAGTGCAGACGACGGCACAACATACGTGCTCAACAATCCGTTAGGCAGACTAAGGGAGTCAGGATGCCTCGAATAATGTTTCATGGACCTTGAGACGGAGAACCACGCGTATTGTGGCG
CTACCGCTCACCGGCCACCCGACAACACTACGTGCTAAACGGCTGGGTACCGAAGAGACGCTTACAGCGGGGCGATCGAGTACCTGCGCAACGACTCGAAAGAGCAAGCCACTCGCGTCCATGGGTACCATCCCTGATGATG
TGTGTTGCTGCTGCTGCCACAATGCGCCATTGCAACTGGACTGGATGCTTGCAGCAGCGGTGCGGAACTCAAAGTTCTCAAGCGCGCGGGGGGTGTTCTGTACAGCTATCGCACACTACCTGCTCTCCAACCAGCGAGACACGTA
CCCCTGCTGGACGAGATTGCGCGCTGTACGGCGGGCAACACAAGGTGGACGGCATCAAGGCCTGTGGGAGAAGGTGTGCTGACTTCGACGATCGACCTGATCTTCTGCTGGAGTACCTGATCTCGCCGAGCGGGGCGACATCG
CAAACACCCGCAAGATTTCTACGGGAGTACCAGCAGCTACCGAGCGCGCATGTGGGACATGGCGCTGGAGCGGATGGAAGCCATGCTGTTCAACTGCTACGCGATGGATGACGGACTACTCATCAATCGGGACACAGCGCAGCGG
CATCTCAGGAGGGCGAGGAACCTATCGCAACTGCGCACGTGTTCCGCAAGTGGCGGACTGACTACCCGCGGAAAGTCAGTTCAAAGAGACGAGCGACTTCCACATGAGCGCGTGGCTCTACGGCGGTCCGATCAAGTACCGGCA
TCGAGTCCGCGCTTCGACAGCGATGGCAAGCCAGTTATGGTGAAGACCGATGCACTGACTCTCACGGAGATCGGCGGCATCAAGTGCAGACGATGCGCTCTGGACGAGAACGGACACTTAGCATTGCAGACCCCAACCAATGTGT
GGCGAGGCACGCCAGCGACGATGCAAGCTGTTCCGCGCGGACTTCGTGCGGTACAAGTCCGGCAAAAACAAGGTCTTGTCAAGTGGCGGAGTCGATACGGCAGAGCAGGCGCAGGTGTGGGCAGACACGATTACAACGCCCC
GCCGCTGCGACCTCAAGTGTGCCCCAGACGATTGCGGATGAGTTCTGCGCGAGTTACAGGCAAACGCAAGCTGGCAGACGAGTACCGGTGATCGCATATCGAAAGACGCGCTCGAATTCCTGTGAAGCGCAAGGAGTTCTC
GCCCAGGTCAGCAGGTTCTAAAGACTGAACAACCTCAACAAGGCCGACAAGGACATCGGCACGTAACCTTCGCCACGAGTATGACGACGATGGTAAATGTGCGTAAGACGAGCGGCATGCTTACGATACACCCGCTGTCGAT
CTGTCATACATGCTGAACATGACGGCCAGCGGACGACTCGGCTCAGTTGAAACCGCCCTAACTTCAGAACCTTCGCGCGGCGACGAAGGCGAAGACGAGGAGACTACCAATCCCGCTCAAGGAAATGTTGAGTCGCGGTACG
ACAGCAGGGGCTGCTGCTGTGGGCAAGGGGCTGATTGACGAGTCTACGCTGAGTCTGGCTAACATCAAGGCCGGCATCCGTAACCGATTCAATTGTCGAGATCGACTACAGCGCGCTAGAAGTTGTACGCTGGCG
GCGTCTCTCAGGACAAGAACCTAATCAATGCGTGGTCAACAACATCGACATGCACTGCATGCGCTCGCAAGAAGTAGGCGAGAGTACGAGTCAAGGCCAAGTCAAGGACGAGTACACCCCGAGCATGTTAAGTACAA
GCAGATGCGCACGGACATCAAACCGCCGAGCTTCGCGTATCAGTACGGTCCACGGCGATGGGTATTGCGTTCAGTACGGGTATGCCGGTCAAGAGGCGGAGCAGTTCATCGCAACGAGAAGGAGTGTCCCGGAAAGTCGAGGCG
TACTACGAGCGGAGGTGTTCCCTGCTGTCGAGAACAGCAAGACCATGCACCGGAGCAGGACGACGAGGGTAACTGGACGGTCTACGGTCCGCGCGTGTACCAGACGAAGGGCGGCACATGCTACGAGTTCGCCAGTACCCGAAGA
ACATCACGACGTTTGTGGCGGCAAGCGACAGCGGTGACGGTATGCACTTCAAGCCACACAGATGCGGAACTATCCGATTCAAGGCGAGTCAAGGTTCTTCGTCAGGGTATCACTGGACTCGTATCCGCTGGTTCGCAACG
ACTTCTTTGGTGGTGCAGTTCGTCATCAACACGGTACACGACGCTATATACCTCGATTGCCACCGCAGCGTACTAGACATCGTATGCGCTGGCTCAAGGGCATCATGGAATCCTTCCGCAATACTTCAGCCAGAAGTACGGCTAAC
CTCAACGTGCCCTTCCCGCGCTGCTGAGTTGGCCGAACATGGGTACGAAAAGCACTGGGAGCGGGTGTCTCGATAAGGAGGAGCATGACATTTTTCAAAGCGGGCAGTTCGCTGCTACAAGAAGACAGTAAATCGTAAGC
CTTACAGGGTTGTAAGCGAAGGCGCGGTGTGTGCGGTAGACTCCAACCCGCTCATTTGGCGGCATCTGACGACTCGAACTGCACAACCCGTACACCGGTATCACGCTGGACAAGGTGTTACAGATGAGCTGTTGATGTACAAGG
CTCAATGTCGAGCTTCTCAGTTTATCTGCGCTGGCCGAAATCGCGGGCTGCTGGCGTGGCCGAGCAGCAAGGGTTCAAGTTCAAGGGTTTCGAGAACCTGACGCCCCGACCAACCCGCGACGCTTACTGCGCCACATAAT
GGCGACGCAAAAAGACGGCAAGGGAACCGATGATGAGTCGGGCAAGATGCACGCCCTCCACGCTGCGGGCGCGCCCTGATGAACCTGCAAAACCTGCTCAAGAAGGGTCAAGGCCACTCGCAATTTTCGACAGCAAATCCACGTAAG
GAGAAACGCATGACGATGACCCCGAACAAGTAGCAGCATTGGCCGCACAACCTCGCAGAGTGCATGATGACATGAACGAGGCCAAGCGGGCGGTGGCAACTACGACAAGCTGTGGCCGAAGGCCGACGCTTCCCGCTCACCTC
ATACGTCGAGAAGGGCAAGCACATCGAGCTGTACCAGGGCAAGCCGAAAGACCCGGCTCTCATGTTCCAGCTCGGGTCTCTATGTTCTCCCCTGGCTATGTAACGACGATGGCACCCCGGCGAGATCGAGACGTACGATCTGGCACG
CAGCCGCAACGAGAAGGCCCGCGGTTCAAGCTGTTCAAGGACATGAATTACTTCGGGCAAGGTAAGAATTCGCGCAGCTCCTGGGCGAATGGTGTACATCCTCGTATTAAGCATCGCAGCTAAAGGGCAAGCCGGGCGAGAAGC
GCGGTACATCGAGAAGTTCGAGGCGGGATCGACATGGCAACCGGTGCGCTTACAACATCCCGCCGACCATCGCTGTTCTGTTCTGTTGCGGGTGGCGACGCTGGAGGCTGGGACGCTGTACATCGAGGGCACCCGCGAC
GATGGCAAGTCAAGAAGTGAAGCAGGAGAAGATCGCCGGTGGCAGCATTCAAGGGCTCGCCGTGGAGGCTTGTGTCGATCGCAACAACCCGCGATTCCGCTCGGCACCCCGCAGAAGGCAAGGTGCGCAGGAGACGCAAGCCG
CCGTACCGGCCGTGATGCGCGTCCGAGTCCCGAGTGGCAGTACCCACAGTCCGCTGGCAGCGGCTCTGTGGCCGCTACGCAAGCCGTAGTCCCAAGCTGGCTGGCTACCTGCCGTGCTGCGGTAGTCCCGACTGCGGCC
CGTCCCTACGCGAGTATCCAGGCTCTACTGTGACGACTGATCCCTTCTAGCGTGGCCGAAGTACCCGAGTCCGCGCCGTGCGACCCAGTGGTGTAGTGGGAAACGTCGCGGGTGGCGAGGTTGCTCTACTGTGGCAGT
ACCGCTACCGTCTAACAGACGCTGGGACGCGTATGTCGCGCTTCAATTTGTCGGCTGTCCTGGATGACGACATTCATTTTGGAGATAGGACATGCACACGACGATACGTAACCGACGTTGCTGCCAGCAACCACTTTGGCG
TCGGCGGGTAGATTACAGAGTTCGCGCGCGACGAACAAGTTCCGCGTGGCCGAACAACATTCATCACGCCCTGAACATCGTTCAAGGAGAAAGTAGGCGAGCTTGCAGAAAGCGTGTTCAGCTACTGAAGAAGGCAAGTAGTTA
CTTACGCCGAAGTTCGCGCAGAGGCGATTAGTCAATCGCAATGCTGCATCGGTTCTCGTGAAGCTTGCAGCGCAAGTATTCTACAGACGCGGGGAGCATGAGTCTTGTGTCATGATAAAACGGCGTTCGATGTTGACGCCCTTGGT
GACGACTTCGAGTTCGACTCGGGCCGGTGTACTGATCGACGGGATGGGCTGCATACGTTGACGAGCTACCGTCAAGACAGTGCATACCGGCTTTCTCGTTTCAATCAGAGGTGCTGAAGCAAATCTTCTGGCGAGTGTCT
CTACAGGTGAGGTGATCTCACACGAGCGCTGCTACAAGACAGGCGCTTTCGGCATCAAGGCTCAGAAGCCGTACCAGGGGCAACGCAAGAGCGGTGCAAGCCGCACTTTCAGGCACTGCGAGAAGTATCGCTGATCGTGGC
GAGCTTCAGGAATTCAGTAGCAATGGAGAGCATCATCGAGGCGGATGACGCGATGATGATCCGGCGTACCAGCTGGAGAGCAAGGCATATTCGCTCAGACGACAAGACTTGAGGATGACGCCGTTCCCGTACTACGAGATAGG
GAAAGTGTGGTGTCCCTCTGATCCGTTGGTGAGCTGTGGATCGCGGAGACAGAAGCGGTAACAAGAAGTCTCGGCCGCTGCTCAAGTCTTTGGGCGCAGATGGTGTGGTATACCGCCGATAACGTCAGGGCTTGC
TTAAGCTGACGGCAAGGCAAGTGGGCTCATGGGCGCTACGAACTACTGACCCGCTGCGCGACATCGAATCGGTGTGAACACAGTCAATTGACGCGTACCGCGCTATCGATCAGAACCCGCTGCCGAGGCGTGGCTGTGGCTGC
TACGCTGGCCCGGTGACAACGTGTGGCGTACTTACGCAACTGCCTTCTCGGAGGCTAACAGGAGGTTTTAGATGAATGTGTTGGACGAGACTGTTTCAGCCAGCCGCAATGCGCAAGCTTTCGCGCGATGATGCCTGCCTGGA
AGGTTAGACAGCTTCAAGTCGTGACGGGAGGACTGTGCGCAATCTGCGGCCGACCGGTGGATTTATCACTGCCTAAAGAGGGAGTGGTAGACCACAACCACTGACGGGCGAGATTCTGGTGTACTGCATCGCTGTGCAACGCCGCA
GAAGGCAAGATCAAGAAGTAGTGGATCGTGGGGCGGAAGACATTCGACCCGGCTGCGTGGTGCAGTATCTGAAACAGCTCGTGGCTTACTACGAGCGGCCGGATGCGGCCTGATCTACCCGACTACGTGGACGCGCAACGGC
TCGCCGCAAGGCGATGGACAACGCAATCTGCTGCAAGGAACGACGCGCCGAGATCAAAGCAGCAAGGCATTGCGTGACCAACGGGAGGGATGATGACGCAAGCACTTAGCGACATGCGCGATCTTACGAGTTGCTGAAAGATC
AGGGCGTGGAGTTCGATCTGTGGCGCGCAGCTCGGGATGTACTTGGCCGACGCCGAAGGATTGGACATGGCCGTGATTCGATAATCGAGCCGAGAACTACGTGAAGCTTCCGACAGTTCGTCGACAGTTGCTGTGGCAGTGTGC
AAGGACTTAGGTGAACAGGCAAGTAGACGCCGAAGTCAATCTGCTACCTCGAAGGCGACGCCGAGGATCGTGGCTGGAGAAGGTTTACGAATCAAGTCCACGGCTTGGCGTTCGCCCCACTGTACAGGTGCTCTGTAT

AACGAAGACAAGACAGCGTACTTTGCCGAAGACCCGCTACGGTTGTTGAGGAGCACGACTGCACGCTTAAACAAGGCGTGGCTGGAGTACGACCCAAAAGCGCAAGTGTGCGGGCGCGTGTAGCGGGTCCGTTCCCCAAGCCGGGCG
GCACGAACATGTTTTCTCGTGTGCGGGTCAACGGCGCTCGTCCGAGTACATCGGAACAAGTCCCCGAGTACAAGCACATTAAGGAGCGACATGACCAAGATCATCGCACACAAGCGCGCAAAGATTCTGACGCTGGACATCGAGAC
AGCGCCAATCGTGTGCTACGTGTGCGGCACGTTCAAGGAGAATGTGCGGTGAACCAGATTAGATGGACTGGTACATCCTGTCGGTATCCGCGAAGTGGCTGCACAGAGCCGGTCTTACAAGGACCAGTGAAGGCCGACGACAT
CGAGGACGACTTGAATCTACTGCGCGCGTGCATGCGCTGCTGGATGAAGCAGACATCGTGGTCCGACACAACGGCCGGCGCTTGCACATCAAGAAGCTAAACGCACGCTTACATCTGAATGGCTGCCGCCCATCGCCCTACGAGGT
TGTCGATACGCTCGACTGCTAAGCAGAAGTTCGCTTACCAGCAACCGCTTCAAGTTCCTGACGGACAACCTTGCACCGAGAAGAAGCTGACGCATTCAAGTTCAGGCTTGCAGCTGTGGTGCAGTGCATGAAGGGCAACCCG
GAAGCTGGAAGGAAATGAAGAAGTAACTGCCAGGATGTGCTCTCACTGGAAGAGCTGTACTGAAGTCCGTTGTGTGGATGGACGGACACCCGAACGTCGCGCCCTTGAAGGCCACGGAGTACGACGAGGACAACCTGCCGATCC
ACAAGTGCCCGCGTGGTTCGATGAACCTCAAGAGCAAGGGCATGCGCCATACCCGCCAGGGCGGCCAGTATCGTCTGCTACCAATGCGGCGACTGTGGCGGATGGTCCCGCGCCGCTTCAATCCAGCACCAGCGCAAGAGCGCGCC
GGCTGTCTGCTCAACTAAGGAGAACACATGAAACGAATCCTCAAGGGCGCAGTGTGACGCGCCGATACACAGCAGGCGTCATTGCCGTGCGGTTTACTTGTCTGTTTCCGTTTGGCTAGTGACGGCAAGCGTGAATCGGCC
GCATCCACCGTGTGTTACGTCGAGGCTGCCCTGATGACCTACGAGAAAAACAGGAAGTGTGGTCAACTGCGCGCAAGTGTGGCCGATGGAGACGGGAAACCACGGAGTGGCCCGTACCGTATCCGTGAAGTGGCCGAAAT
ACGACGCAACCGAATCAACCGACTGCGCGCCGACGTGGTGGCTGTACGGTATCGACATCCCTAAGGAGGATTAATGTCCCCTGACGCCAGCTTGCCTACGAAATGCTTGCAGTCCGGAAGCAGCAGCAGAGCGCTTGCAGCAGC
TTATGAAAGTGCAGCAACGGGGATGACAGCAGCACCAGGGCACAGAAGCTAGCGGCTTCGATGCACCAGGAGTGGTGGCGTACTGCAAGAGCGATCGATACGAAGACGCGAGGAAACCGCCGGGAAGTTCAAGACGTGGCTGC
GCCGCTTGGCGCTGAGAAGGCCGCTTATCTCCATTCTGAGTGCATCGCTTGTGCGAGATGGGTCTATGCGCAAGTCCAGTGTACGCTCAGAAGCTGACGATGCACATCGGCCGCTTGTGAAGTGAAGTGCGAATCATGG
AAGCAGAAGAAGTGAACCCATGTACATGGAGAAGATTACGCACAGGTTAAGCAGAACGCTACGAAGAAGTACGGGATCTGCGTGTCTGTACTCTGTGGCTACGATCGTGTATGAAGGGCAGCTTACAGCAGGCTTAGCGACT
CCGAGGCCGCGCAAGTCCGCAAGTTCGAGTGCATGCTGTACTCAAGCGGGCTTATCGACCTGCTCCGAGCAAGACTGGTGTACCTACGTACAAGCTCGATGACGACGTAGCGAGTACCTAAGTGCCTACGACCAGCAAGAGTGC
ATAGCGTGGTGGACCGGGCGCAGGTGCGATGATCTGCGAGCCGCTGCCCTGGTCAACCTAACGACGGGGGCTACCTCAGTGGCGGGCTCAGGCTCAGTCCCGCTGATGCAACTTCGCAAGTGGCAGCAGCGCCAGCGGAAGCGC
ATCCGTGCGAGTTACGGCAGAGAAGATGCCGCTGTTCGAGTGCAGCAACTTCTCCAGGGCAGGCGTTCAAAGTGCACGAGCCACCTGCGAGCCGTGCGCGGGGCTGGGATGCGGGCGGTGCCACGATGGGCTGCCGC
GCCGTGAGAAGCCGCCAAGCCGCTGTTCATTCCCGGATACCTGGGTGAAGCCGATGCCTCTGAGGCCGAGCTGGAGGCAATTCGCGGTGGAAGCGGGAAGCAACCCGCTATTACACCCGCTCAAGGAATGGAAGGGCCACGTA
CTGGAGATCGGGGCTTCTGAAGTCCGAAGCGCAAGGCCAGCCGATCTGGTTCCCGGTGATGATGGATAACCGAGCCGCTGGTATTACAATGACCGCCGAAATCCCGAGGCAGCGACGTGGCGAAGCTGCGTGCATTTCA
CGAGCGCCGGCCGTGGGCCGCGAGCGGCTTCTGGTCCGTGTTCAATTGCAACTGCTCGGCTACGACAAGCCCCGGCCGATTTGAAAGTGCCTACGTAGAATCGATTTGGAAGCGCTGGAGCGTCTTGGAGCCCGCGGA
GGACTGTCTGAGGTGTGGGTAAAGACAGCCATGTTGCGCTATGCGGCCGATACGAGTGCAGGAGGCAATTGCGTGTGCGAAACCTGAGCTGTACGAGACGGGCATCCCGATCCACATGGACGCGACGTGCTGGGCTCCAAC
ACTTCAGCGCATGTGCGCGACTGCACAGCGGCAAGTACGTGAACCTGTTGATGCGCGCGCGATGAGAAGCAGGACATTTACCGCCACGTTGGGAGTGGGGCCATGGAGTGCATGAGGCGGACAAGCTAGCCCTGCTCGGGAC
TTCTGGTGGCGCAGGATTCAGCGTACTGGGCAAAGAAGCCGCTATGACGTATGTGTATGGCGCAGCTGCGCGGTACGGCAGAGTTCCTTGAAGGTGAGGTGCTGCACGGACGAGAGGACAGAAAGGAGGAAAGGCCAGCGCA
ACATCGACTGAGTACCTACGGTGCAGAAAGCGCTGTTGCCGGGATCGAGTACGCGAGTCCGGCAGCAGCGGAAGCAATGCGCTGGCTTAAAGGAGGCCACAGTACAGTACCCAAAGGCTACGATGGAGTGGAACGCGCGAGGG
CTTCAAGGTGCAACATGACTACCTGAGGTGGAACATGCGAGTACGCTTGTCTAGCTGCGGAGTGGAGCGTATCAATGTACGAGGAACCGGATGGGGTTAATCCTTCAAGATGCAGAACGCAATAGCGCCGAACCTTGTGATGC
ATTAGATGCTAGTCTGACGTTCACTGCCTTAGCAATGAAGAAGCAGGGGCACGCCTTCTAGGTATCCATGATTCGTTTGGTACACACCTAGTCTGTAAAGTATGACAGGATACTGCGTGAGGAATTTGACGTATGTATGCAG
AGCATGATGACTAGGTGACTTCTGTGGGAGTAGGAGCTACAGGAGAGTTTCTAAGCGTGGTATTAACCTCTCAGATGACTTACTAGTGAATTTCTTCTGTAGTTAGAGTGCCACAGCGTGGAAAGCGCAACAAAGCGC
GAGCGGGAGGTTGATAGGACCGGACTCGCGAGCAAGACACAGTACATAGCGGTTACAATAGTTAGATAGTATAGAGTAACAGTATTATGATCTAGTGTAGATACATAAGCCTTACCATGTTGTGCGTAAGCCTAATTTAGAAATGCCCA
GATTGGAGATACTACATGGCTGAAACCGTACATAGCGCCGCTTGTCTCCGCGACGCTCCCGTGCATCCGAGCAAGGTAACCTTACGCACGACAGCAACTCGATGCTTGGAGCGGTGCTTCCCGAGTTGGTGTGTCAGAAAATCTACA
GAAGCAGCACTGCGCAACGACTAGGACAACGATCGGTGATTACCTGGATTCTGAGCGGGTCCGAAAGTGAAGATTCTTATAACAAGGCGTGGGCGATGCAAGATTGGGAAAGTGCACACTCTGAGCTACTGCGCATAGGACGC
AACAAAGGATCACACATGGCACAAGGTGCTGACGTTGCGTGGACCTTGCAGCATGCAAGGCGGCACGATCCACGCGGTCTGGATCAATGACCAGGCTGGCTGGTGTGACAGCGTGGTGCCTGCTGGTGAACCCGAACAAGTGA
CCTGCTGAGTTGCTAGTGATCGGCTAGCGCTACTCGCAATTTCTCCAGTACACCGAAGCGCTCAAGATTTTGGCACGGGTTCATTCTGCGTGGGATCGAAACAGGCAACGGTGTTCGCGTCCCGGACTACGACGCTCTACATGA
GGGACAGGGTCCGGCTCATAACGAATCGTATTTCTGGAGGTGACATGGGCAAGGTAGTCTCATGGTTACCGACACAATCGGGCTACGGACAGCGGTGCCGCCAACAGCAAGCAGGCTCAAGATCAAGCGAACCAGATTC
AGCAGCAGATCGCCGAGCAGACCGCAACCTATAACGCGAACCTCGCCGACTGGCGAACAACGAGACGCAACCCAAAGCCGCGAGGTAACCGCCGGCGGTACCGCTGCTGCTGACACATTGACCAAGCGCGCAATGCGTCGAA
GGTCTTGCTCGACCTTGGCGTCAACGTCTAAGGGAGGGCACATGGTAGGCAACAGTCTTACAAGTCTGTTGTCGAGAAAGTACCGGGATGACTCAGTATCTCAAGTCCGGCAGTACGCGCACTGGCAACTCATGGC
GGAATCTGTATCGTGGGACCGTGAAGTGTGACGCGAGTACCAGGAGATTGGCGCGCTTCTGTGAACAACCTCGGCGCAAGCTCGCGGGTCTTCTGTTCCCGGTGAACCGCGCAATTCTCGGTATCAAGCCGAGCAAGCAGCT
CAAGGAGCAGCCAAAGGCTAAGGGCATCGACATGAGCGAGTTTCAAGTCCGCGCTTGGCGCAGCTCGAAATGAGCAGCTCGCAACGGGTGTTCTGAACTCCAGCTACAACAGCTCAGCTGGAATCTGCTATTTGATCGTAACGGGCA
CTGCTGACGAAGCGAGACTCGAACTTAAAGCGCAGATACGTAACGCTTCAAGTCTGTCGGCGCACCGGCACAGGTTGAGCTGGCCGCTGCTGCTGAGTTTCAAGTCCGCGGGTGTGCGGTGAGATTCAAGT
AATGCTCGCTACGCGTTCCCGAACAAGTACCGCATGGACAAGTTGAAACGAACTCGAGGTGTACTCTGACATTCAGCGCTAACGATGGGACGCGCGAGTGAAGTACGCTGTGCGCAAGAGATCGAGTGCATGCCGATAGGTA
CACCCGGTGAAGTACCCTGCGCACTCTGCCCTGGCAAGCGCTACGTGGTCTTAATTCTGCGGAGCACTACGCGCGAGGACTGGTCGAGGACTACGCGGAGGTTTCCGCAAATCAGCGATGAGTGGAAAGCGCTAGCGCTACG
GTATCTCGGCATGAAGTTCTCAACCTCGTGCAGCCGGCAGTGGGAACGAGCTGGACGATCTGAACAACGCTGAGACTGGCGAATACGTGACGGGACGCAAGGCTGATCCAAGTGCAGGAGTCCGGCAGCGCAAGAAAGATTCAA
GCGATGATGGAGTTGATCTCATCGACTTACGAATCTGTGCGGGCTTCAATGTACAGGCCAATGTGCGGGACGCTGAACGCGTCACTGCATACGAACTGCGCCAGCAGGCAAGGCTAACCAAGCTTGGTGGGACGATACGC
GCACTGGCTGAGTATTCAAGTCCGCTGGCCACGTGCTGGTGGTGAAGAGAAGCCAGACGCGTTGGAAGGTATCCTGTGCAATACGTTGGTGTGCTGACGTGATCGCCGCTATCCCGCTCAGTCCGGCATCGAGTGCAGAAAC

ATACTCAAAGCCGCCAGGACGCAGCAGCCATCGCTAACGCCCTCACGTCGATCGATGATCGCGTGGACCCACGCAAGCTGATGGATGTTATCTACGCAGGTGCCTCTGTCGATACTACGACCATCTGCGCGACAAGGAAGCCAGGCCA
AGTTCGATGCGGCCAAGCAACAGATGCAGCAGGCGCAGACTCAACTCGCCGCTACCAATCCGCAGCACAGACAGCAGCCATCGGCTCGCTGCCCGTGCCAACAATAAGGAGGCCACACAATGGCAGAGCAAGTCGAGTCCCGCC
GGTTTCGATCGTCCAAAGCTGTACCGGCTGACGCAGTGACGCTGGGCAGTCTGACCCGACGCCGGCTCCGATTCCCCAGTCCGCCGCTGAACCCAGCAACGACGACGCGCCGTCCAACTCCCGCCGGCACCCGGTGGCGAA
CCAGTGCCCGACAGCCCGATGCTGATCCCGAGTATGCAGCATTCAAAGCTGGAAGAAGGGCGCAAGCTGCTGACCCGACTCCGGGTAAAGTGGACGACACGGCCGCTGCGCAACCGGTGCTTATCCAAGATGACCAGACGCTTAC
GGCCGTTGCGAGGGCGGCAAGAACGACCCGGTAGTCACTAGCGCGTTCCTGCTGTTCTGCTGGCCGCGCCGAACCTCGACGTGAACCGTGCAGTGAGCACGGCCATCGCACGAGCCGACGCGGGCCTTGTGACGAAGCGTACCTCA
AGGAAGTAGGGCGGATAAGGCCGATCACCTGATTACGGTTGCCAAGAATCTTGTAACCCATCAACCGCGCAGTGGAACTGCTGATTAATCCATCGAGGACATGGCCGGTGGGGCGGCTGGTTGGAAGGGCTCCGTGGCGGTATTC
AACGCAAAGGCACCGGCATACCTCAAGGAGTTCGTAGGCCATGGCTCAACTCCATGGACCCCGCAAGATCAAGAGCGCAAGTGTGCGTACTCGACTTCGCGAAGCAATCGGGATCGTTCGCGCGATCCCTAGGCCACGTGCGC
GCTGGCGGTGGGGCACCTGACGGCACCATTGGGCTGTCCAAGGAGCAGTATCAAGCGGAGCGCTTAAAGTCAACCGCAACGCGTGGGACTTTGCCGACCGTGAACGTGAGCTTACCGCGCGCCGACAGCTTGGCAAGAATGGGCT
GTAAGCCCAACCAAGGAGGATTAATGGCAGACGTAGATAACAAGGGTCAACTGACCCGCACTTGGTGGCCGGTAGCGATGCGGACGACATCCACATTGAAGCGTACGAGGGGACATTGAAGTTGCTTCCGCGTGAGTCCG
CTGTTCCGCGCTCGGGCTCACGAATAACAATCGGTGACAGAACCAACCAACGCTGGCGCGGCGACCCGATCGCGCGGGTGTGTGAAGGGTCCGCGTGGGGCAGACGCTTACTCGGCTCGCATCGCAACGAGAAGTTCATC
TGCGCGCGTACGTTCCGCGGCTCGCTGGTGGCGCATTCCATCCGGGCATCAGCGCTGTATGACGGGCTACCAAGCCGCACTCGCGATCGGCGAGCGATGTCGTGGAAGTCGGCCGCGATCTCACCAGCTTCGAGAAAGCAGCCGAC
ATCATCGTCCAGAACCACAAGGAAGTGTGACTGAGTTCGTGAAGCGCCGCTCGGTGCGGGCTCGCGCAGACCGTACGCTGATCCATCCGGACGCTTCAACGTGCTGCTGGAGCACAAGAAGCTGATGAACGTGGACTTCCAAGG
AGCTCGCGTGAACGACTACGCCAGCGCCGATCGCGGTCTGAATGGCGTGCAGTGTGAGGCTCCGATCTTCCGACTGCCGTTGTGTCGACCCGCTGGGCTCGGCTTTCGACGTGTCGGCCGAGAGGCCAAGGCGTGTG
ATCGTGTCTTCCCGCAGAAGGCACTCGTACCGTGAAGCCCAAGGATGACGGTCAAAGTGTGGGAGTACCCGAAGGAGTTCAATCGTACTGGACTCGTTCAAATGTACACGGTCCGGCAAGGCGACCGGACCGGTTGGCGTC
ATCTCAGCGACTAATCGAAGACGTAGGTTCTGCGGGTGGAGCAGGAATCCGCCGCTAGTTGCGCCAGCCCGGATCCTAACAGGGTTCGCGGGCTTTTTTTTTTGTCTCGACCATAGGGGATTCCATGGACTTGCGCCAGCC
CGGATCCTAACAGGGTTCGCGGGCTTTTTTTTTTGTCTCGACCATAGGGGATTCCATGGACTTGTCAACGGTGTCAACGAAATCTGCCGAAGTAGGAGAATCCGGTGACATCGTGAATCGAAGTCTCTACGCTCGCGTAA
TCCTTCTCAGATCGACTCAGAGATCGACCTGCTGCTGCAACCCGGCTGGTGGTCAACAGTATCACCACGTGAGCTGTTTCTGATCCGAACGGCTACATCGATGTCGGGAGGATACGCTGTCTGTTGTCGCGGAGCCGAGTACGGC
ATAGTGACTGCACGCGTGAACGCTTTTACAATCAGCGAACCCGTAGCTACGTGTTCCCGTGAAGATCAAGGGCAAGCTCATTCAACGCTGGGAGTTCAACGACCTGCCGAGTCCGCTGCAAGTACGTCCTGTTCTGCGCGTGGTCC
CCATCTACGTGACCGACATCGGGCTTAGCAAAACGTACAGCTGCGCAGTCTACGCGTGTGATCGCGGGGCAACATGGAGCAAGAGCATCTGCCAGATGCGCTACACAATCAAGCAGTCCGCGGCTACCGGAAGCTGCGCAACG
CTATGAGGGGGTAAACATGGCTGCATTGAGTCTCGCAGAAGTCTCAGATTCAGGGCTGAGCCAGCAGATTGCGCGCAACGGCTCGACGGTCAAGTTAGCGCGCAAGAGAATGCTGTGCGATGTCGTCACCGGGCTGCTGCGCC
GTCCAGGTGCATGGGCTCGGCGACTCTACAACCTGGCACCGTTGGTACTCCGTGAGAGTGTGTTGGTTTCGATGCAGACCTTCCGGCTCACGTGTACGTGGTGTGTTGAATACGGCTGATGGGGTGTGCGCTGTACACGGAAGC
CTGGGCACCCATTAAACACTGCCGGCAATCCCTACTTGCAGACGCCAGCGGTGTAACCGGATTCGATGACGAGTGTGGGCTGATGTTTCTCGCTAACCTAGAGCACACGCTGTACCTTGTACGGGGCGCTGGGCTGATG
CTAGCCGTGTCGGTCTTACTACATCAAGACCGGAGCATTCTCGAAACAGTACTGTTCTGTTGGCAGACTCAGCTTTCGCGCGGTACATACGAAACGACCCAGCCGCAACTGCTACCGGGCCGATAATGCGTCTACGCTGA
GGGATCGCAGGACAGCTGTGGCATTATCAATGCGGACACGGCCACACAGGGTGGACTCGTACTGGTATGGCTGTTCTGATCGATCCACGGCCCGTGTGTTATGACGGTGGGCACGGTACCTCCACGTGACGTGGGCGT
GTCGGGCGAGGGCAACGTGCTACGTGCGGATCTACCGTCCGCTGCGGTCACAGGCAGATGGTCTGGTTATCGCGGTAGGCAGTACAGCGTTCGCGACTACTACAAGTACATCTTCCGAAACAGCGGTGGACGGAAGTGGCC
AATACGGCTCACCAACGCACTAGCCAACATGCCCTTGCSCCTAACCCATAACAGCGCCGGTACGGCATTGAGTACGACAGCGGCGGTACGCAAGGGCGGTACGCAAGGCGACGATGACAGTAACCCGCTGCGTACTTCTGACGAATGGTA
TCACTGGTATAGGAAGTTACCAGGGCCGCTGGTGATACTGAGCGGGCCGAGTATCAACATGAGCGCAAGTATCAACACACCGCGTTCCTCCGCTCGACGGTACGTCGTGTTGGTGGCAAGCGATCCGATTGAAGTGGCGCGTGGGTA
ACTCCTCGTCCGCTTATAGGTATGCTGTCCATTCCAGAAAGACTTGTGCTGTTCACTCAGTCAAGAGTACCAAGCAGTGTGCCGGTGGGAATGTTGCCATTACGCCGTAACACGCGACGGTGGTGTACCTCTACGTACGAAGGTGACAT
GACTTGTGCTCGCCGTTGACGCTAGGGCGGACCTTGTATGACCTGCGCCACGTAACACGCAAGTTTACGGTATGCTCGAAATGGTCCGTCGCACTGACTGACTCGCAGTACGTTCCACTGATGTAACGGACACTACCAAAGTATCTG
CCTGGGCGTCCGCTTGTGTGTCGTCGTCGTTGCTAACATCGCGTGTTCGAGCACAACCGACCATCGGCAGCTCATTGTTATGAGTACCTGTGGAGCGGTGCAGATAAAGTGCAGCAAGCTTGGACCGTTGGGCTCCCGT
ACGACATCGAGATGCCCTTTTACAGGTAGCGAGATTAACCTGCTGTTCTGTAATGGGACCAATGTTCTGTTGGTACGATCGACCTCGCGTAGGTACGCTAGATGCGGCGAGCGACCCGCAAGGTTCTCGACCTGTACACCAAC
GACGGTAAAGGATCACGAGGCACCTGTCCCGCCGGGCACTTGTCTTACCCGAACTTGTGATCGGCTGCTATTGGCAGATCAGTCTAGCAGCGGTGGCGAAGAGGTTGGCATCGAGTGCACACTTCCAGCGTGTACACAGG
TGACTCATAACCACTGGCAATGTTGACGCGGCATCAAGTTACCTCATCGTTCACTCAGTCAACTACGCCAATGGTGAAGGATCAGAAATGGCGTGAATCAGCAGCAATAGCTGACTATCTGCGCTACATGATCGGCACTGTAACCTG
CAGAGTTCAACGCGTTGGTTAGCGATGCAGCCAGTATTCCGACAACACTGATATAGACGTAGGCCAGTGTACTGGTGCAGCCCTGAGCTTGGCCTTGGCCGCGTGGGCTACGTTGACGCTACTACGATCATCCATGTGATACAG
AGCGCAAGCACTACGCTGTGCTATCGACGGATGGCTTGGCGAGCTAAACATCGTGGCAGTAGAAACAACCAACCGCTACAACCAAGAACTTCGAGGGCGTAAATGCTTGGTACGTTCCAGCTTGCATGCTGGGGCTGAACTTCGCA
AGCGGGTACTCGGGTGCAGAAAGCAGCAGAGCGTGCCTCGACCAAGGCGTGAAGGAGTCAACGCTCAGAATCAGGCGATTGCGGAGGGCAACACCGCAACATGATCCGTACCGGCTACATGGTGGTATTAGAA
CCTACAGCTTGTCCGCGAGCGTGCAGCAGCAGCCGAGCAAAAGCGAGTCAATCTCCAGCAAGGGCGTGGCTGCTGTGGGCAATGCCGTAGCGAATGCGGCGGGCTGCTGTTGTTGGGCGGCTGGTACTGTGGGCGGCTGGTACTGCGACATCC
AGAAGAAGCAAGACGAGGGCGAGATTGGCCTTACGAAAGTTTCTCGAAACCTGGAGAACCGCGCAGATCGCTATCGAGCAGACCGGATGTCGGCAAGGACTCGCTACAGGCTGCTGGCAGTACAACCAACATGCCTACGCAG
AGCTTGGCGCATGTTGCTGTCCGGCTTACCAAGCCGGTGGGGCCGCTTGCAGCTCTACGCGGGCGATAAATTTGCTTGGTCCGACCAACGCGCAAGAGCGATGCAGGTTGATTCCTATAAGTCCATCTTGTCTGGGCTGG
GTACTATTGACTAAGGAGGAAACATGGCAGTTGACGCGGATGCGCAAAGCATAGATTTGGCAGTGCCTCAAGCGGGCGTGTCCCTGGTAAAGTATGTTGCGGGCCGATCCCGGTAAGTCTATGACCCCTCAACTCCACAG
CCTTGGTGTGACGGGCATCTCGACAACGTAAGTACGTTACGAAAGCCGTCACCCAGCTCGCACAGCAGGAGGTAGGTAACGAGCGGAGGAAAGCGTACTTGCAGGAGCGGCGAGCGGCTGGCAGCAGCATGCGCAGGCTG

CAATCGACGAACCCGATACCAAGAAGTGGACCGGTGCGGGTTGGCGGACACGCGGGCGCTCTCGACAAGCAGACGCGGAAGCACAGACCGCCGCGGATGAAGACCTTGGGAGCAGTCTCCGAGCAGTTCAAGCAGTA
CCTCGCCGAGCGTGGCAGAAAGGTGCTGGACAACATGCAGGGCATGTCGCTGGATGCCGGAAGGGCTGATCGCGCAGCAGCTCACCAGCGATCGATCGGCCATCGTAAGCACGCTGTAGAGCACAGAAAGTTCATCATCGACCAGA
TTGGCAAGGGTGTGAGACGGACCTTAGCTGTCGGCTTACGCGCTCAACAACGCGAAGACCGACCCGGTTGCGTACAACGCTGCGCGGATGACGCGTTCGACAGGGCTGTACAGCAACGTGTGGTGAATCTAACCTGCCCGCAGAG
AACCGCCAGAAGCTCACCACACAAGCCCTGTGCTCGCTCCAGAACAACGAAGTGTGTACGAGAAGCGCGGGACACGAAGCTGCCGCGGGGACGCTGCTCGACCAACTGGATTGAGGATCAGACTGCGCTGCAAA
GGCGTATGAGCAGTACGCAAGGACACGAGCAGATGCGGCTCGCAACTACAACGACAGCGTGGCCATGGAAGGACAGTTTCAAGACCCGCTGACGCCGCCATGCCCTACGATCAGTTCAAGCCCTTGTGGCGAAAGGGCGTGC
AGATCGGTGCCATCAAAGCGGGGACATCACATCACTGACAAAGGATGGGCCGAGGGCAACGAGAAGAAGGTGCTTACGAAACCTTGGCAAGCGTACGTAACCGGCAACGTGAAAGCTATGTTGCGCATGGGCAAGGTGCGAGGA
CCAGGGTTACCAAGCATTCACTCAAGTACAAGCCGTAATAACGTTGACCCAGCAACGACCGTAGCACAGCTTTACAAATCGGAGTAAAGACAGGCCAAGGTTTGCATTCAAGGGCGTAGGGGACTTACTGATCGGCGAGTGTGAT
GATCGGAATGGGCAACAACATCGACCAAGGGCAGTTGAACATGCTCAAGACGGTCTCACGACTCTGACACTGCCAAGGCGCGGGCAAGCCATGCGCTGGGCGGTACTGTGCTCATTTAAGGATGACGAGCGTTGGAAGATCAT
GCTGTTCCGCGAGCGGTTGACGGCAGGTGATGATCCGATGGTCGACGCGCAGACCGCAGCAGATACGTTCCGCAAGCAGTCTCAGCTCACGATCGAGCAGCGAAATGTGTAGCCGAAACCACGCTAAGGCCGATGCTGCTGTGCTCG
CTGAGATCAGCCACGCGGTGTGGGGTAGCATTGCCAATGCGGTGCTGACTTCTGCGCCGCGAGTCTAACATCGATAAAAAAAGCTGCGCAGTATCAAGGATTTTTGAGAACGACGAGCGTGTGAACGCTGCCCTAGCTCCGGC
CAAGGTAGCGCTGTGGAAAGAGTTGAATTACATTTACGTAAGTATGCTGCGGATGCGCTGCGGATGACACTCGACGCAAGCTCGCAGTGGCAAGGTTGACGGCCGAACGCTGATTTGATGGCGGACCGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
GGCGTCCATGCAATCTACTTCCGCGTCAATCCTTCCGTTGGGGCCGACACCATCGCGCTACGCTTAAACGAGCTGCATAAGCCGGGGACGGAACCCGTGTGGTCTACAAGCAACCGCGACGCTCAACTCAGTGGCAGGAGTTC
GGGAAGAATGGTGAAGTGTAGTAAACCCGTTGGTGTGTTGATCCGAAGTCTATAGCCAGGCAAGTCAAGCAAAAGCAGGATCGTATTACTGACGAGTTCAATCGACCAATGGTCCAGGTGTGACGGCTAAGGGTACTACCGCGTACC
GGTACAGTACAACGCGGATAACTCGGCAGGTGTGGTAATCCGCTCATGCTCCAGTGGCGTAACGATCTCGTAGCGATGAGGACGTGCGGGATACCCCTTACGACGACGCTAGCGGTAAGGTGGTGAATGGTAAGCGGGTCCAGACGG
TTGGAGTGGGAGTTAGCTCGCAATCCGTTTACCCGCGAGTGGATGACAGCGCAAGGTATCCGACGAAACATTAGCCGCTCCTCACCTAGCGTGAATGACGACGCGCAGACAGCGGTACGCGCACAGGGCGCGGCTGGCGTG
CAGACGGACAACAGTTTCCGTTGTTGCGCTCGCTCGCTATCAGGGCGGACGCTACCGCCAGAGCTGATCGCCGCTTAAAGCAGAGCAAGGCCGACGAGGCGAGCGGCTTGCACGCGTCCAGCAGTACCGCATGGCCCACTC
AGCCGCAAGCAGTATTGACTCGATGTTAGTTCGATCACCACGCCGCACTGGGGCACTCAGTAAGGAGGAAACATGGCAGAGCCCATGTTAATGTGGACCCGCTATCTACGGCGGGATGACGATACCCGCTACGCGGTTCC
GGAGTTACTCCGCGGATGGGCGGCAGCAGCTCCGATTGCTCCGCTGCACAAGTCTCGCAGCGGGCATAGCGAGCGGAACGGCATCGGAAGAACAGGGGCGTGTGATTGCGGCAAGCTCGCGCAACAGGCTACCGCATGG
CAGGCCGCGAAAGCGGCTGTTCAATCGTGGACCACTACCGAGTGTGGGATTGGGCCAGATGCCGCACTCGACGCCACCGGAATTCGATCCCAAGCCGATGTGAACCGCACCCCGTTCCA GCTCAGTGAAGACGAGCACAAGTTC
CTGGCAAAGTCGAGTCTGTCGGCAGTACCACTACCGGGCAACGCTTTGACGAGCAACCGAGCTGTACCGGAGATGGGCGACCATCCGTTTCTGTCGGGATCCTGAGCTTGCAGACCCAGTGTATCTGCCATCGATCTCGCGT
CATTGGCACCGCCACAACCCGACGGCAGCAGGTGACGGGTACGTAAGTCCCGTGTACTCGGAGCCGCTACAAGCGCCGCTGTAACCTCGCGGTGGGTGCGGACGACAGACCCAGGCTGCGATCTCCGATACGGAAGTATCGCC
AATGCACTGGTCAATGGAGCGGCCACAGCGGCCCTGTATCGCCCGCAAGGGCTTGGTTCGCGCGCAGAGGCGTACCCCTGACCGAGCTGACGAGCGCCGCCACGGCCCTCCAGCGGGAGGCTGCGCCAGCGGAGCGCGGTTGT
CGCAGAGCAGGCGGACGTGGCCGCTCGCTCCGACGCCGAGCCTGCCATACCTACTCGACCGATTACGGGACGCTACACAGCGAGATTGCGGACCGGATTGTGTCGCCACGCTACCAGACGGATGCGTACGCCGATGACAGAAGG
TATCTAATGACCCACTTTTGGCCGATGATTAACAGGTTCTGGAGGACCAACTGACGCATTGGCGTCTGCTGTCAGGTTGAGTAAATGCGCCGCTTGGGGTGAAGTTCGCGGCTCAGCACATGGTCCATCAGTTCGCAACTGGAAGCCTGCGCAG
CGAGCTTAACGCATACCTCGACGTAATCCTGCTGCTGGGCGGACGCAAGTATTCGCGAGTAACTTCTGAGTTTGTGGCGGGGCTGACTCCGGCGATACGGAGTTCACGCGGACCCCTTTCGAGATTCTGTTGACGTTGCAACC
AATGCGCTGTCTAAGATGGTGCAGTTGGTTCGTAAGCTCCTGGCATTGCTCCCAATCAAGAGAGCGCATTGACCAAGCGCTGCTCCCTAACGGACGAGTTGATTAATACTCGTCTTAACGTGCGCCGACCGGTTACCGGTTAGTGTGCTGG
AACTGTCACCTACAGGCTCACAGCAGCAACTCGCAACCAGTATCCGTTAAGCTGGAACGTGCTAGCAAAGCTGCGGGTTCAAAGTTGAGTTGCTACTCCATAAGACCATGAGTGTCTAAGGGTACGGAGGGCGGAGGGTCTAATC
TGCTGTGGAGAGCCGACTAATCTTCCGGTAACCTGCTGCGGCTCAACGCCAAGCTATTCGTTAGACCTCGCAGCAAAGCAGTATGCTACGAGGATTGCTCAAGGCAGAAATGGTCCGCGCAATGCCGGGCTGTTGACGCGCT
GCTGCAACCGGACAAGCTGCTACGGCTCAACGTACGATCGAACGTGAAGTCTTGAAGAACTGGCACGTCGGGACAACGTGATCCGTCGAGGTAACCTCAACATCACTGACCCGCTGTGCCGAAGGCAATCTGAGCTTGGCAGCGC
ACACGCCCGCTACCCAACCTGCACTTCCGAAATGAAGGCAGCGGGTGTGCTGGGTGCTGACGTGGTGGACGAGAACGTTTCTGACTTCTCCCGGAAGTGGAGCGTACCAACATCGAAGCTGCTGAGGCTAAGTTCGTTGACGCGG
GACTGACTCAGAAAGCAGCGGCGGTGCGGTTGTTGATGTCGATGCTGAGCCGATGGTATCATGCGCGCAAAATCCGCAATGGACGCGGACTTGGCCGAGGATGTCGCGCATGCAATTCTGCACCGCTCGGGCTAAGGGTACTTCCGAGGAT
CAAGCATTTCGCGGACAGTCCGTAACGGGGCAGCAGAAAGTGCAGTCCATTCTGGAGACGACTGGCATTTCGAGAAGCGTATTACGATGCGATGGACGCTGCTCACAACGTAAGTACGGAAGCAGGTAAGACTTCGCGCTCAA
GCATCGCATTGAAATGGACATGCTAACTAGCACGCAAGTGGCAATAGCCGCTGTCCATCGTTGATCTTCTGGATGGGAACCTTACCCGAACTGGACAGTATCTCGACAATGACGCGGGCACTGCTAGCCTTGAAGGGTGGGCTT
AAGACCAACACGACATCGATAACTTGCGCCGACTTGGATGACAGCATGAAAACCCCGCAGAGCGTCAAGAGGCTGCTGACTTGTTCGACAACGTAATTGCGGCTTGCAGCGGCAACAGTGTGGTGAAGCGGTAGCAGACGGGCT
GCGCAAAGTCCAGGCACTTACTCAGATGGTGGGCTCGATCCTCGGGCTGTGGCAAGCAACAAGTACGCTAATGCCGCTGCGCGCTATGGGATTGTGGCTACTACGCGGGAAACTGAAAGCAGATCCGCGTGTCCCGCAGCTCCT
AGGTGACACGTCGACGCAAAATGCGGAGAGCTGCAAAGTATCTTGGCGGCAACTCGTACCAAGACATTCGATTCGCTTACGTCAAAAGATGGAGGACAACCTTGAAGTGGCGGTTAGCGATCAGTAATGCTAGCTATGCAACAA
AGTAAGCAGCTCGTCCGATCTGAACGCAATGCGATTCAACCAACAACCAAGCAACGTAACAGCTAACTTGGTGTGCTGATACTGTTGCAAGCTGCCAGGGAACGAAGCCTGGGCGCTACACGGAAGTCTGAGCCGCTACGGCT
TAGAGGGCCGACACTGGACAACGTACGGGACAGCTGCTAGCGCATGGCGCAATACCGAGCGCTGGGCGGACGGTACGTGGGAGCAGCTTCGAGTCCGCTAGCCAAGATGATGGACGAGTCCGCTGCTGCTAATCGCATCGGTGA
GATCCCGCTTTCGCGAGTTCGCTGTGCGCAAGTTCATCTTACGTTCCGCTCATTGCTGCTGGCGCGCAACAAGTGTAGCCGTTACGCTGACCGTAACGGATTTGCTGGGCTTGTGTTGCTGATGCTGTACCAGTCCCGCT
TACTGTTGCTGCAAGCTATGCAATAGCGTACTACGCGTAAACCTGAATCGGATGTAGGCAAACTGGCTGGGCTCGCAGTTGGGCGAGTGGGCTATGGGCTTGTCTCAGAAGTGTGGGCAATTGTGTCGGGTGATAAGCAACAGTT
TGGCGCTAGTGGCTTATGAGCTATCGACCGTGTACAAGACTGGTAGCCAAGCGGCTAGCGGTAACCTCAGTGGCGCAGTACGACGCACTTACGCGTGTGCCGATCCTGGCTATTCTCGCGGGGCTTAAAGCGTTTGCAGCTTCTGTT

CGTACTGACGCTAGCAGCTGCCGAACCTGTCGGCCACTGTCACGGTGTCTGGCGGCGGGCTACAGCTACGCTGCCGCTACTGCTGCGGTACTCCAGAATGGCGACCAAGTCACGATCACAAATGCATCGGGACGACCAGCGCGAC
CTTTCCGATCACCAGTACGGAACGGCGTCCGACCACGCTGACGCTGCCGATAACCGGGCGCTGATCGGGCAACGCGTACACGATCCAGTACCCGGCACGTACACCACAACGTTACACCGA CTATCACGAACGCCAGCTGTTGG
CATTGTA CTAGTTAAGGAGGAAGTATGGCAGCAGCATTCTGACGCAAACCGTGGATGCACGTACCAAGCTCGTAAACGCGCTCGACAAGGCTGCGGCCCTCTGTCGCGCTAACGTGCAGCATCAACCGGTGCGCTACCAAACGGACGT
AGTTGCTGCGCTCGTCAGCTCAGGCTCAACTACTACGGCGTTGGTGGGTAACAGCTAAGAGGTAGGAGGGTAGACATGCTAGTAGTAGTGGCTAATGGCGTCTACCCCTTAGGGTATAAGGATTGACGAGTGGAAGGCTTAGGGGT
TAGGCTGTGGGAGTGGTAACTAGCAATGCCAGTTGAAAAATTTTTGTGAGGCAGTCTCCGACCCGATGGCGCATGCCTTTCCCCCTAGGCCCGCTTTGCAACCATCCACGATGTCGGTAGGAATTGCGGAGGGTCTAGCTAACAGCT
ACTAGCGTCTAGCTCGACGCATACATAGCTTAGCGCATAGCAGCGCAGGATGTCAAGCGGTTAGTGATTGAGGTTGGTGGTAGTGGTGGTCAATGCGCCAGGGTGCCAACACAGCGACAGCACAGCGCCTGGGAATGTGCCAG
GATTGACCAGGATGGCTCAGGACGGGCTGCGAGGGCTCAGGGTAGGGTAGGCAAGGGTAGTGGAGGATGTCTCAGCGGCTCTAGGGCTTCTTAGGCTTCTGAGGGATTACATGCCTTTCCAGCGCAAAGGGACAGGAGTGTCTAGGGGA
AACCTAGGATTCATAGGATA.

ΦBurAG58

CCGTTTGCAGTAGGCACATTACTGCTACTGGCCGATCGAGCAGTTAGTTGGCTGCTTGGTAGACTTACTGGTAGACGCAAGGCCAACTGCCAATTTTCTAACGCAACTTCAACGCAGGAGAATCATGGAAGTGTAAACGTGCCGGT
CGCGTCTGAGCAAGCTGGCTAGTGCCTGTCCAATTGCGACAAAACGACGAAGTCGATAAGATCGCGGAAGGACTGGATACCGCACTCCGTAAGCTT GCCGGCATGATGCATTGGCTGCGCCCTACGGCCAGAACAGCAGCCGATC
CCGTACAATCCGGCCAAAGGAGCGCTACCGCGAAAAGCGCAACGTGGCCTTCCATGCCAAGCGGGTGGCCCGCATCACC GGCTACAGTACGGCCACGTGGCGCAACAACCTCGCGAACAACAAGACCATCCAACCTCATGAGCAACCGCTC
CTGACTGGCCTGCTCTGGCGCAGCGGCGCTATGGATGCCTCGACCAACCTGAACGCCGGTACAGAAGCTCAAGGTGCGCAGGATCGGCAACACGGACAACCTTTGAGGTGGCGTAATGCGCACACTGAACCTCGACATCAAGCTTACCG
CAGCGTGACGGTCCCGGACGCACTGCTGCGCCGCTACGCAGCGATGCCAGCGACCCGTAGAGGGCGGGCGGGCAGAGTACCTGCACTCGATCCACAAGGAGCATTACGAGGACGATGAGACGTTCCTCCAGCTGCGCCCTCAAGCATG
CTCTGCGCAAGATGGCCCGGAAGGCTTCCGCCCGACATCCAGACCCCTGGCGGACAGCGAGGAATGCCGCTGCGCTATCGTCTGCCCCAGCGGGCTGACCGTAAGCATGCGCAGCGCTGCGCGCTGCGCGCTGCGCGGCTGGCTACCGAG
CCGAAGGGGAGATCGCCCATCGTGTGAGGGGCTTCCCGCCGATGCCGAGACTCTAGCTTGGTGAGTCCGACACGCTGGAACAGGGCCGAAGCTTAAACCCCTTCAACCAACCCATAGGAGATTTACATGCCCATCGTCAACCCGACCC
TCCCGCAAACCCGAATCGACCTCGCGCCGCACTGCCAGGGCGCTGCTCAACTTAAGCCGTTTCCCGGCCGTACAGGCCGCAAGCGGCTGTCGACGCCAGGTAGTGCCTACCCCGCA GTGCTGCGCCGACCGAACAGCCGG
CCGCTACGCAAGCCGAGGGGTAATCGAAGGCACGAACATCCCGCCCTGCCGAGCCCGACCTGACGGCGCAAGTCTGGGAAACGCTGCTGGCTTCTGCGCCGATGCAGCAACGTGACGGCTGGTGGCTGCTACTGGTGAGCCC
GCAGTGAACCTGACCGCGAGCCAGAAGTTGGCCGCTAAGATCGCCGCAAGAAGGGCGACGAAGAAAAGCTCGCCCGGAGATCGCGAAGCTGGAGACGCAAGTCCGTTACGCCGACCTGCTCGATAAGGTTACGGAAGGCAGTGTGA
TCGTGGCCCGCTGGCCGCTGCCGAGACTGCCCGGAAAGTGCCTGCGACCGTATCGCGCTGCAGACCCTGGAGAACGGCGACCGCCGGCTGAAGATTTACTTCGGCCAGGGTTTCGATGCCGAAACCGCTGATCCAGGACAGCCAG
ATCTGGACATCCAACAGGTCTAAAGCCATAGCCTGGTTGCGAAGCCTTAGCATTCGCCGTGGGCCGCTGCCCGGCGGCTACTACTGCTGGTGCCTGCTGCTGCTGCTGATGCAGCGGGCCATCACATCATGAGGTGATTATGTCGAA
CTACACGCTAGAGGACTATTACATGGCGAAAGTCGGACTTCTACCGGGCGATGTCCCGAGCCGAGCCTACGCTGGGTATCGTCTGCTCAGTTAGGCGCAATGAGCAATGAGATGGCCCGCTGAAGAAGGAACTCGTTGCCCTGAGCAACGC
GCTCGCAGTGGTACATCGCCGATGAAGTCGGTAGGAAGCCAAACGGAACAGACGCGTCCAGCAAGCACGAACCTGAGGACGCGTTTGCAGCACGCACGGAAGCGGTTGCAGAGCTTACAGCCCTGTCAGGACATCAACAACCGCC
TGGAGCTGTAAGTAGTAGCACAGCCTAAAGGGCTGTGCCTTGGTGTAGCTCAGATAGCGAATGGGGAATTATGACGATAAGTCCCGCTAGCGTAAGTAGCTGGCAGTAAAGGGAGCTGCTCCGAACTTGGCTGCAACTCCGGAG
ACGGAGCCCGCTGAGTACCTTTGCTGCGAACAGTAGAGAGCGCCGAGCGAGTGCAGGAGTGCAGACTGCCACCAAGGCATAGCCCTTACTGGAGGCAACATGGCACGCTGCTGCTGACGACGAATGGTTGCACCTTCCAAAGC
GCGTGCCGATAGACAGCAACGTGCGCATCGGCACTTGGCGAGGGCGCGGAGAATTTAGTGGTGGTAACCGGGGAGATAGATGGTGGAGTACTGCCAAAGCTGCAAGAGTGGTGCCGATGATGAAGGATCACGTGCTTGTAAAC
CTCAGCCCTCCGGCCGATCATGCTGTTGACGCACCCGACGGACCGAAAGGAACTTGAAGTTTCCGAGCTACGTGACGGCGCAGTTGGCCTATTCTGTTGGCGCAAAGGGGCTGGACCTATGATGATGCCGACGGCAGTTCATG
GAGTCGGGAGCGTGACGCGCTGTTATTAGCGTTTCCCGAGGGCTGATGGCCGCGACACTTACGGGTCAAGCCAAATGAAGTGGATAACATACGATCGGCAGCATTTCTGTGACTTCCGCGAAGTTGACGAGCGAATCCTCGAAATGGCT
ACTAGTGAAGACGCGTTTTCTTTGCTGAAGATACAGCACGCATTGCTACGTCGAGTGTGATTTGTACACTTGGGACGAGCGCACACTCAAGCGTTTTGTTAGCGCTGCTGAAGTGCAAAAGCCAGCAAGTGGAGTCTTACGACGGC
GATGCGCTGGCGGAAAGGCGCGGAAGCAACGCGCTGCGCTAAGGGCTTAGGAATCAAGTCAAGCGGCGGATAGCGTGCACACTGAAGGGCTGGAACCGAAGGACATGACGCAAGCCGCGCTACGTGAACAGTGCAGCGC
CTACTCGCAATTTAACTGGAGATAATTATGCCTACCTTCGATTGCTGGAACCTGAAGCACGTTGAATCAAGTATCGTGTCTTGTCAAGTACAGGGGCTGGAGCTGAAGCACTCTGGAACCTCCGCACTCCCGGATGGTGAGTACGAGCT
GAGGTGGCCGATGACTTTGTAAGGCGCCTACCAAGACCTCACTGTGCGAGATTAGTATGAGTGTGATGCCCTGATCCTTACCGGTTGCGGGATCGACGGCGGTATGCTCAACTGCGGCGGGCGGTCGCCGACGATGCTTTCCGGCG
ATACTACAGCCATGCTCGCTGTTCCAGCTCTACTTCAACACGATGTCAGAGGCCGAGCGGTCGAGGTTGACCAACTCAAGGCGCTGATCGCGCTACGTGCGGATCCGAGCGGGCGGGGCGAGGCTATGCCATCGCGCAACACTTCG
CCGATCAGCTCCACCAAGAACCCCGCTAGATGCTATCGTGGTGTGAGAACACGCTGCGTGAAGCGCACTTCCCGCCGCTGCTGGCGCACTACTGGCTCGATAACAACAGGCGAGGAAGTGCATCTGCATACGAGTTACGGGCTC
TCGCGCTGGAGACGAGCCGAGATTACGAGGGGCGGCTTCTCTGTTGGCCGATGGTCCGATCTCCAATACCTGCAGACGATGCGGACGAGGGCGGCTGGTCACTGCAGCTTTCCGGCCGGCGCTACCAGTGCATCAAGGGG
CAGGCCGATCAGCCTACGCATGTACAGAGCGTGTGAACATCGAACCGGAGGCGATGACCGCATGAGCAATGAGGGATTGCTGGAGCAGGCTTACGCCGACGCGATCGTGGCGCGGCGCAATCCGCTTAAAGAACATCCA
TGGAAGAACGATCGCAGGTGGAGCAGATCATCCAGCATCAACCCCTGCAATCTGCGTACGGACATGACCGGGCGCATCCGCGCTGAGCAATCGCGCGGGGGGGAACGACATCGGCAACTGGAGGAAGTATGGAACGGC
ATGCGTGAGCTTCCGCCATTACGACATGCTACTGCGGCACGGTACAAGTGTGAGCGAGGGATTGAAATGCTGTTCCCTCAATCTCTGCGATGAGAACAGCAAGGTGCGCATCCAGACCACACTTGTCTGCTGCTCATGGCGC
GGGCGTTATCGAGCGCGCGAATGTGCGCGGCATCAGTACGCCAAGAACAACCTGGCTGCTGGTGCAGAGCGAGAACCAGTTTACAGTGTGTTGACCCGCAACTCAACATGAGCCGTCGCCGAGGCGTGTGGACTACT

GGATTACAGCAGCAGGACGAGAAGTTAGCCTGCCTCGGCTGCACGTTTCTAGACGTGTGGGTAGACGGCGGCGACGCTGGATGCCCCGGCCGTTTTCGATGGCGAGGTGCAAAGCAAACCCATCTGCAAGACGCTGAACGAAATGCAC
GGCGGCTCGCACATTTGGCTGAAGGAGGTTAAGGCATGAGCTTACTCAGCAAGGAGACGAAGGGCAAAGCCTACTCGAAACTAAGTACCTAACAGTGCCGCAAGCAATCGTATCGGCACTGGCTGGTAGCAAGGTGTACATGACCCGG
CGCGAGATCAGCACGGCAACCGGCATCGAGATGCCACGCTGTGTGGCGCGCTGTCCAAGCTCGTCAAGCGCGCGCTGTGGCCGAGGGTTTCGCGGCACGGTGCAGACTACCGGCAAAGACGTGATCCACTACCGCCTAAACCGTTC
GGAGGACTGATGAAGACAACGCAACTACTTTATGGGAAACCAGCACCTGGAACCGTGCCTGGTTCGGTTCGACCACTGCGATCATCTGTCCGCCATCGGCACAGCACTGTTGAATCCTGGTGAACCTGCAAGTTTCGGTGATCCA
GATGCAGTGGCGCGTGGCAACAGCGGAACTGTTATGCAGAACGCGCAAGATTCTGGGTCAACTCGGTATCGAGATGCACGCGGAATGGATCGGTGTAGGTATTGAGTTGCGCGCCCGCTTCGTTGGATTAAAGCGGAGGCACCAT
GGCTCAAGCGCTGATGAAGGGCCACACGTGGGCCAAGGGCAAGCACAAGATCAAGTGGCCCGCCTTGGGAGATCAAGGTTGACGAGATTGCTGCGACATTCGACGTACCCCGCCGATGAACAGCGCGCGGTGTACGCCGACTAT
GAGCAGGGAGCACGCTCATCTCCGCAATTACCGGGACAAAGTGTGCACAACCTGCGCCACTTTGATAAGCCGTTAACGAGCTTATGGTTCGCATCAATGCGACTCGCTAGATTGCGGTGTAATCGTGAACGGCAATTTCAACGACA
CGTATCGATGGGTACGCTCGTCAAAGGGCGTACCCCAAGACCTGCGCGACGCTAAGGTCGAGTTCATCTGTTGACCTGCCTGACTCCGACCCCTGCCATACGGGGCACGTTGGGCGCTGCGTACTACGTGCAAAAGTTGCGCAAG
TTGCCGAGGGCTAGGCGTACCGCTGCGCCTCCCGAATGGTCCCTGTGGACAGCGAGCAGGATGTAGAGAACCGGTTGAAAGACGCGCTTGCACGAGGATTGAGGGTTTATGGTTAAGACGCGGGACCACGTGTACGAGCCCGC
AAGCGCTCATACGGCTGAAGTACAACCCGAGGAAGATGCAGATGGCGTCACTGCGGATCAATCAAGGTACAGCCCTGAAAGGGTTCGCGCTGGATCGAGCTGGTAGCGTCTGTACTCCTGAAAGACGGGAGCACAGCCA
ACGTGCGCGGTATCGAGCATGCGCTTGGCCGGAAATGCTGGCTAACCCAGCCGCTTATCGGCCGTTGGTTCATCTACATGATGCGCGATCGTCAAGGTGGCTATCGGCATCCCGCTTCAAACGTTCCGGGAGGATAAAG
CATGAGATACGACGCTATAAGTACAAGAAGCAGAAGGATGCCAGCGCCGATGCCATGGCTGCGCTTTCGAATACTACTCGGGTCACTACTCGCGGAGCTAAACGACCATCGACAAGCTAAGGGCAAACCGCGTGGCACGGAGGAC
GTACTTTGGATGAGCGGCTGAACTGGAACAACCTGTTTCTGATCAAGGTGGCCGATTGAGCTGGGAACCTATCGCGGAGGCCAGCGCAAGGTAGAGGTGTTGCGGGTGGATGGCGCTTGAACACCTTGTAGGCACGCTCA
ACAATGGCAACTTATCCGCACTGCCGAGATCGTCCGCGCCATCGCAGACTTGCCTGCGTTCGCTGCGCCTGCATGTCGAGTGCAGCAGCGCACAAACATCGTCTCAACAATCCGTTAGGCAGACTAAGGGAGTCAGGATGCCTCGAAT
AATGTTTATGGACTTGGAGCGGAGAACCACGCGTATTGTGGCGTACCGCTACCGCGCCACCCCGACAACCTACGCTGCTGCTAAACGCTGGCTACCGAAGAGACGCTTACAGCGGGCGATCGAGTACCTGCGCAACGACTCGAA
AGAGCAAGCCACTCGCTCCATGGGTACCATCCCTGATGATGTGTGGTGTCTGCTGCCAATGCGCATTGAACTGGACTGGATGCTTGCAGCAGCGCTGCGGAACTTCAAAGTTCTCAAGCGCGGCGGGCGGGTGTCTGT
ACAGCTATCGCACACTACCTGCTCTCAACAGCGAGACACGTACCCGCGCTGGACGAGATTGCGCCGCTGTACGCGCGCAACACAAGGTGGACGGCATCAAGCGCTGTGGGAGAAGGGTGTGCTGACTTCGAGATCGACCTGA
TCTTCTGCTGGAGTACCTGATCTCGCCGAGCGGGGCGACATCGAAACACCCGCAAGATTTTCTACGGGCGTACCAGCAGCTACCGAGCGCGCATGTGGGACATGGCGCTGGAGCGGATGGAAGCCATGCTGTTCACTGCTACGC
GATGGATGACGACTACTCATCAATCGGGACACAGCGCAGCGGCATCTCAGGAGGGCGAGGAACTTATCGCAACCTGCGCAGCTGTTCCGCAAGTGGCGGACTGACTACCCGGCGGAAGTCGAGTTCAAAGAGACGAGCGACTTCC
ACATGAGCGCGTGGCTTACGGCGTCCGATCAAGTACCGCATCGAGTCCCGCTTCGACAGCGATGGCAAGCCAGTTATGGTGAAGACCGATGCAAGTACTCTACGGAGATCGGCGGCATCAAGTGCAGACGATGCGCTCTG
GACGAGAACGGACACTTAGCATTGCAGACCCCAACCAATGTGTGGCGAGGCACGCCAGCCGACGATGCAAGCTGTTGCGCGCGGACTTCTGCGGTACAAGTCCGGCAAACAAAGGGTCTTGTCAAGGTGGCGGAGTGCATACGGC
AGAGCAGGGCAGGTGTGGGCGAGACGCATTACAACGCCCGCCGCTCTGCGACCTCAAGTGTGTCGCCGAGACGATTGCGGATGAGTTCCTGCGCGAGTTACAGGGCAAACGCAAGCTGGCAGACGAGTACCAGGTGATCGCATCAT
CGAAAGACGCGCTCGAATTCCTTGTGAAGCGCAAGGAGTTCGCGCCGAGGTGCAGCAGGTTCTTAAAGACCTGAACAACCTTCAAAGGCCGACAAGGACATCGGCAGTACTACCTCGCCACGAGTATGACGACGATGGTAATGTGC
GTAAGACGAGCGGATGCTTCAAGTACATGACCCCGTGTGATCGTGCATCATGCTGAACATGACGGCCACGGCGACTACTCGGCTCAGTTGAAACCGCCCTAATTCAGAACCTTCCGAGAACCTTCCGCGCGGCGACGAAGGGCAGAACGAGGGAG
ACTACCAATCCCGCTCAAGGAAATGTTGAGTTCGCGGTACGACAGCGAGGGTGGTGTGTGGCAGTGGGCAAGGGGCTGATTGACGAGTCTTACGCTGAGTCTTGGTAACTCAAGGCCGCGATCCGTAACGATTCAAT
GTCGAGATCGACTACAGCGCTAGAAGTTGTGACGTTGGCGGCTTCTACAGGACAAGAACCTAATCAATGCGCTGGTCAACAACATCGACATGCACTGATGCGCCTCGCAAGAAGTGGGCGAGAGCTACGAGTTCGTTCAAGGC
CAAGTGAAGACGAGTACACCCCGAGCACACTAAGTACAAGCAGATGCGTACCGACATCAAACCGCGAGCTTCCGCTATCAGTACGGTCCAGCAGTGGTATTGCGTTTCAAGTGGGTAAGTGGGTAAGGAGGCGGAGCAGT
TCATCGCCAACGAGAAGGAGTGTCCCGAAGTTCGAGGCGTACTACGAGCGCGAGGTGTTCCCTGCTGTGAGAAACAGCAAGACCATGACCCGCGAGCAGGACGAGGGTAACTGGACGGTCTACGGTTCGCGGCTGTACAGAC
GAAGGGCGGCAGTGTACGAGTTCGCCAGTACCCGAAGAACATCACGACGTTTGTGGCGGCAAGCGACAGCGGTGACGGTGTGCAAGTCAAGCCACGAGATGCGTAACTATCCGATTCAAGCGAGTGGGTTTCTTCTGTTCA
GGGCATCACAGGATTGGTATTGCTGGCTGATCGTAAACGACTTCTTGGCGGACGCGTGTTCGTAATCAACACGGTCCATGACGCTATCTATCTGATTGCCATCGCAGCGTGTGACACGGTATGCGCTGGCGTCAAAGGGCATATG
GAATCCTTCCGCAATACTTACGCCAGAAGTACGGCTACAACCTCAACGTACCTTTCCCTGCTGCTGCTGAGTTCGCGCCGAACATGGGCACGAAGAAGCACTGGGAGCCGGGCTTTCGATAAGGAGGCAGCATGACGGTTTTCAAAGT
AGGCGATGCTGTATGTTCAAAGCAACGATGGTGTAGGCTTCAAGAACGGCGTCCCTGCAAGGCGCTACATAGTCTCGAAAGTAGACAGCTGATCACAAGACAACGAATCCGGCTACAGTCAAGCCCGCAATCGGCGTTCGC
TGACGTTTTCAACCGTATACAGACCCGGCCCTAGGGAAGGCACTCGGTGGTGTGATGCTGAGGCAAGCCCGATGTCTCAGCTCCTCAGTTTACCTCGCGCTGGTGGTGTCTGCTGCTGACTTCGACACTTCGACAGATTCAAAA
GGGTACGATTTAAGGGCTTTGAGACGATGACGCCGACCAAGCATCGTGTGCTTACTGCGCCAGTAAAGGCGACGCAAAAGACGGCAAGGGAACCGATGATGAGTTCGGGAAACTTACGCGCTTACGCGCGTTCAGCCGCGACTCGCGACT
GATGTATCTGCAACCCCTGCTCAAGAAGGGTAAAGGCCACTCGCAATTTTCGACAGCAAATCCAGTAAGGAGAAACGATGACGATGACCCCGCAACAGTAGCAGATTGGCCGCAACTCGCAAGTGCATGATGACATGAACG
AGGCCAAAGCGGGCGGTGGCAACTACGACAAGCTGTGGCCGAAGGCCGACGCTTTCGCCGCTCACTCATAGTTCGAGAAGGGCAAGCAGATCGAAGTGTACCGGGCAAGCCGAAAGACCCGCGCTCATGTTCCAGCTCGGGTTC
TCTATGTTCTCCCGGCTATGTCAACGACGATGGCACCCCGGCGAGATCGAGACGTACGATCTGGCGCGAGCCGCAACGAGAAGGCCGCGCTTAAAGTGTCAAGGACATGAATTACTTCGGGCGAGCTAAGAACTTCGCGCAG
CTCTGGGCGGAATGGTGTACATCTCGTATTAAGCATCGCGACGTTAAGGGCAAGCCGGGCGAGAAGCGCGGTACATCGAGAAGTTCGAGGCCGGATCGACATGGCAACCGGTGCGCCTTACAACATCCCGCCCGCGCTGCGT
GTTCTGTTCTGTGGGCTGTGCCGACGCTGGAAGCGTGGGACGCCATGTACATCGAGGGCACCCGCGACGATGGCAAGTCCAAGAAGTGGAAACAGGAGAAGATCGCGGTGCGACCGACTTCAAGGGCTCGCCGCTGGAGGCTGCTG
TGATCGCAACAACCCCGGATTCCGGTTCGACCCCGCAGAAGGGGGTGCAGGAGACGCAAGCCCGTACCGGCCGTCAGTCCGCTGCGATGCCCAAGTGGCAGCTACCCCAAGTTCGCGTGGCAGCGGCACCTGCGGCC
GCTACGCAAGCCGATGTTCAAACGTTGGCTGGCGTACCTGCCGTGCTGCGTAGTCCGACTCGGCCCGCTGCGCTACGCGAGTATCCAGGCTTACTGTGACGACTGCATCCCTTCTAGCGTCCGCAAGCGGCGGTGGTTGCGC
CGATCGTTCCGACGTTAGCGTGGTGGGAAACGTTCCGGCGGTGCCGACGTTGCTCCTACTGTGGCAGTACCGCTACCGTCAACAGACGCTGGGACGCGCTAGGACGCGCGCTTCAATTTGCGGCTGCTGCTGGATGACGACAT

TCCATTTTGGAGATAGGACATGCACACACGCAGATACGTAACCGACGTTGCTGCCAGCAACCACTTTGGCGTCGGCGGGGTAGATT CAGAGCTGCGCCGCGCGACGAACAAGTTCCGCGTTGGCCGAACAACATTCATCACGCACTGAAC ATCGTTCAAGGAGGAAGTAGGCGAGCTTGCAGAAAGCCGTTGTTCACTACTGAAAGAAGGCAAAGTAGTTACTACGCCGAAGTTCGCGCAGAGGCGATT CAGTCAATCGCAATGCTGCATCGGTT CCTCGTGAGCCTTGACAGCGACAAG TATTCTACAGACGCCGGGGAGCATGAGTTCTTGATCATGATAATAAACGGCGTCGATGTTGACGCCCTTGGTGACGACTTCGACGTTAGCGACTCGGGCCGGGTGCTACTGATCGACGGGGATGGGCTGCATACGTTGACGCGGTACCG TCAAGACAGTGATACCGGCCCTTCTCGTTTTAGTCAGAGGTGCTGAAGCAAATCTTCTGCGGAGTGTCTGACTGGTGAGGTGTACCTCACACAGAGCGCTGCTACAAGACAGGGCGTTTTGCGCATCAAGGCTCAGAAGCCGTACCA GGGGCAACGCAAGAGCGGAGCAAAGCCGCCACTCTTGCAAGCGCTCGCAGAAAGCTATCGCTGATCGTGCGGAGCTTCAGGAATTCACAGTCGAATGGAGAGCATATCGAGCGGGATGACGCGATGATGATCCGGGGATATCAGCTC GCGGAGCAAGGCGTCAATTCGCTCAGACGACAAAGACTTGAGGATGACGCGCTTCCCCTACTACGAGATAGGGAAGGTGTGGTGTGCCCTCTGATCCGTTCCGGTGTGAGCTGTGGATCGCGGAGACAGAAGGGCGTAACAAGAAGCTGT CGGCCGCTCGCTCAAGTTCTTTGGGCGCAGATGGTGTGGTGTATACCGCCGATAACGTCAGGGGCTTGCTCAAGCTCGATGGCAAGTCAGTCGGACTCATGGGCGCGTATGAACTGTGCACCCGCTGCGTGACATCGAGCGGTGTG CAACACGGTGTATCGACGCGTACCGCGCTATCGACCAGAATCCGCTGCCGAGGCGTGGTGTGTGGTGTGCTGCGCTGGCCGGTGACAACGTGTGGAGTACTTCAATGAGTACCCTTTTCTGTGCAAAACCGCGCTTCTCGATGAC TCGGTTACCCGCGACTGGTTCGACCCAGCAGCAAGTCAACGCTTGGCTGCCGGCGAATTCGATAACGACGAGGCTGGAACCCGTGATGCAATCTGGAGGGAATGAACGACAACGAAAGCGCCGCGAGAATGCGCAAGCTTCAACGC GCTATGATGCCAGCTGGAAGTAAGGCAGCTTCAAATCGTGACGGGCGGACTGTGCGCAATCTGCGACGCCGGTGGATTTACTGCTAAGGAGGGCGTGGTAGACCACAACACGTGACGGGAGAGATTGCGGGCGTGTGGCA TCGCTCGTGCAACGCCGAGAAGGCAAGATCAAGAAGCTGGTGGCTCATGGGTGCTAAGACCTTCGACCCGGCTGCGTGGTGTGAGTATGAAACAGCTGTAGCGTACTACGAGCGGCAAGGATCGGCCTGATTACCCGACGCA CGTTGACGCAGCAACAGCGCCGCTAAGGCGATGGACAACGCAATCTGCTGCGAAGGAACGTCGCGCTGAGATCAAAGCACGCAAGGCATTGCGTACCAACGGGAGGGATGATGACGCAAGCACTTAGAGACATGACAGACCTTA TCGCACTTCTGAAAGACGAGGGCGTAGAGGTGCTGATCTGTGGCGGGCAGCCCGCATGTCTACCTTGCCGTAACCTCAAGGATTGGACATGTTAGTACGACTACGTCGAACCGGTTGCGCTCAAGCGCAAGCTGCGCAAGTT GCCGTGTGGGCGGTGGTTAAAGACTGGGCGAACTCGGCCAAGTGAATGCTGCTCGTCAAGTGGAAACCTCGAAGGTGACGCAGAGGATCGCGGGTGGAGAAGGTGTACGAGTTTCAAGTACCAAGTGTGCCGCGTACACGGTGC AGGTGCTTGTACTACTGAAGCAAGACCCAGTTCCATCATGGCGATCCGCTTACGATCGTGGGAGCAGATTGACGCTGAATCAGGCGTGGCTGGAGCAGATGCTAATGCCAAGTTCTCGGGCACGAGTCTCGGGCGCATTCCC TCAGCCCGGGCGCACGAACGCTTTCGCTGTGTCGGGGCAACGCGCTGTGCGGAGTACATCGCAACAAGTTCCCGAGTACAACCACATTTAAGGAGCGACATGACCAAGATCATCGACA CAAGCGCGCAAAGATCTGACGCTG GACATCGAGACAGCGCAATCGTGTGCTGACGTCGTTCAAGGAGAAGCTCGGGTGAACCAGATTGATGGACTGGTACATCTGTGCTATCCGCAAGTGGTGCACCAGAGCCGGTCTTCTACAAGGACAGTCGAA AGCCGACGACATCGAGGACGACTAGAAGTACTGCGGCTGTGCATGCGCTGCTGGATGAAGCAGACATCGTGGTGCACACAACGGCCGGCGCTTCGACATCAAGAAGTGAACGCAGCTTATCCTGAATGGTCTGCCGCCCGCTC GCCCTACGAGGTTTGTGATACGCTCGAGTGGCGAAGCAGAAGTTCGCTTACCAGCAACCCGCTTCAGTTCTGACGGACAACCTTTGACCCGAGAAGAAGCTGACGCATTGAAAGTTCCAGGCTTCGAGCTGTGGTGCAGTGCATG AAGGGCAACCCGGAAGCCTGGAAGGAAATGAAGAAGTACAAGTCCAGGATGTCGTCTGCTGGAAGAGCTGTACCTGAAAGTTGCGTGTGGATGGACGGACACCCGAACGTCGCGCCTTGAAGCCACGGATACGACGAGGACA ACCTGCCGATCCACAAGTGCCCGCTGCGGTTTCGATGAACCTCAAGAGCAAGGGCATGCGCCATACCCGCCAGGGCGGCCAGTATCGTGTACCAATGCGCGACTGTGGCGGATGGTCCCGCGCCGCTTCCAATCCAGCACCCGGC AAGAGCGCGCCGGCTGCTGTCAACTAAGGAGAACACATGAAACGAATCTCAAGGGCGCACTGCTTGCAGCCCGGTACACAGCAGGCGTATTGCCGTGCGTTTACTTGTGTTCTGCTGTTTCGTTTGGTAGTGACGGCAAGCG TGAATCGGCCCGCATCCACCGCTGTTACGTCGAGGCTGCCCTGATGACCTACGCAGAAAAACAGGAAGTGTGGTGAACCTGCGCCGCAAGTGTGGCCGATGGAGACGGGAAACCACGGAGTGGCCCGTACCATCGTCCGTGA ACTGGCCGAGTACGACGCAACCGAATCAACCGACTGCGCGCCGACGTTGGTGCCTCGTACGGTATCGACATCGCTAAGGAGGATTAATGTCCCGTACGCGCCAGCTTGCCTACGAAATTGCTTGCATGCCGAAGCAGCAGAGAGCG CTTGCGCGAGCTTATGGAAGCTGCGCGCAACGGGATGACAGCACCAGGGCACAGAAGTACGGCTTCGATGCACAGGAGGTGGTGGCGTACTGCAAGAGCGGATCGATACGAAGACGCGAGGAACCGCGGGGAAGTTCAA GACGTGGCTGCGCCGCTTGGCGTGAAGAGCGCGCTTATCTCCATTGTCGATGCATGCGGTTGTGCGAGATGGTGTATGCGCAAGTCCAGTGTACGGCTCAGAAGTACGATGCACA TCGGCCGCTGTTTGAAGTGAAGT GCGAATCATGGAAGCAGAAGAAGTGAACCCATGTACATGGAGAAGATTACGCACAGGTGAAGCAAGCCTACGAAGAACTACGGGATCTGCGTGGTTGACTCTGTGGCTACGATGTTTGAAGGGCGAGCTTGACAGCG AGCTTAGCGACTCCGAGGCCGCAAGTCGCAAGTTGCGAGTTCGATGCTTGTACCAAGCGGGCTTATCGACTGCTCCCGAGCAAGACTGGTGTGCCACGTAACAAGCTCGATGATGACGTA GCGCAGTACCTCACTGCATACGATC AGCAAGACGTGCATAGCGTGGTGGACGGGGCGCCGGTGCATGATTTGCGAGCCGTTGCCCTGGTGAACCTGAACGACGTTGGATACTCAGCGCACGGCGACAGGCCAGTTCCCGTAATGCAACTGCGGAAGTGCACGCGC TCAGCGGAAGCGCATCCGCGCACAGTTCACGGCAGAGAAGATGCCGCTCGTTCGAGTGCAGCAACTTCTCCAGGGGACGGGCTTCAAAGTGCACGAGCCGACCTGCGAGCGTGGCGGGGCTGGGATGCGGGCGGTGCCAG ATGGGCTGCGCGCGGTGAGAAGCCCGCAAGCCGCTGTTCCATTCCCGGATACTGGGTGAAGGCCGACGCATCTGAGGCCGAGTGGAGGCAATACGCGGTGGAAGCGGGAAGCAACCGGTATTACACCGGCTGAAGGAGTG GAAGGGCCACGTAAGTGGAGATCGCGGGCTTCTGAAGTTCGCAAGCGGCAAGGCCAGCCGATCGTGGTCCCGGTGATGATGGATAACCGAGGCCGCTGGTATTACAATGGCACGCCAATCCCGAGGACAGCTGGCGAAGGCT GCGCTGCACTTCCAGAGCGCGGCGCTGGGCGCGACGGCTGTTCTGGCTCCGTTTACATTGCGAACTCGCTCGGCTACGACAAGGCCCGGCGCATTTGAAGTGCCTACGTAAGTATGATTGGAAGCGCTGGAGCGTCT CTGGACGCCCCGAGGACTGTCTGGGGTGTGGGTAAGACAGCCATGTTGCGCTATGCGGCCATACGAGCTGCGGGAGGCATTGCGTGTGCGAAACCTGAGTGTACGAGACGGGCATCCGATCCATGACGCGACG TGTGCGGCTTCAACACTTCAGCGCCATGCTGCGGACTCGACAGCGGCAAGTACGTGAACCTGTTGATGCCGCGGCGATGAGAAGCAGGACATTTACCGCCAGTGGGAGTGGGGCATGAGTGCATCAGGCGGACAAGCCT AGCCCTGCTCGGACTTCTGGCTGGCGCACGAGATTACGCTGACTGGGCAAGAAGCCGCTCATGACGTATGTGATGCGCGACGCTGCGCGGATCGGCAGAGTTTCTGAAGGTGAGGTGCTGACGAGCAGAGGACACGAAGG AGGAAGGCCAGCGCAACATCGACTGAGTACCTACGGTGCAGAAAGCGCTGTTTCCGGGATCGAGTACGAGTGCAGGAGCAGCGGAAGCAATGCGCTGGCTTAAAGGAGGCCACAGTACAGTACCCAAAGGCTCACGCATGGAGTG GACAACGCCGACGGGCTTAAAGGTGCAACATGACTACCTGAGGTGGAACCTCATGCGAGTACGTTGCTAGCTGCGGAGTGGAGCGTATCACAATGTACGAGGAACCGCATGGGGTTAATCCTTGAAGATGCAGAACGCAATAGCGC CGAATTCGTGCATGCAATAGATGCTAGTACTGACTGCTTACTGCTTAGCAATGAAGAAGCAGGGGACGCCTTCGTAGGTATCCATGATTGTTTTGGTACACACCTAGTTCTGTAAGTATGACAGGATACTGCGTGGAGAAATTT GTACGTATGATGCAGAACATGATGACTAGGTGACTTCTTGTGGGAGGTAGGAGCTACAGGAGAGTTCCCTAAGCGTGGTGTATTAACCTCTCAGATGACTTACTAGTGTGTTCTTCTGTTAGTTAGAGTGCCACACGGTGGAAA GCGCAAAACAAGCGCAGCGGGGAGGTTTGCATAGGACCGACTCGCGAGCAAGACAGTACATAGCGGTTACAATAGTTAGATAGTATAGAGTAACAGTATTATGATCTAGTGTAGTACATAAGCCTTACCATGTTGTGCGTAAGCCT AATTTAGAAATGCCCCAGATTGGAGATACCTACATGGCTGAAACCGTACATAGCGCCGGCTTGTCTCCGGACGTCCTCGATCCGAGCAAGGTAACCTTACGACGACGCAACTCGATGTTTTGGAGCGGTGTTCCCGAGTTGGTGT

GCAGAAAATCTCACAGAAGCAGCACTGCGCCAACGACTAGGACAACGATCGGTGATTACCTGGATTCTGTGAGCGGGTGCCGAAGTGAGGATTCTTCATAACAAGGCGTGGGCGATGCAAGATTGGGAAAGTGCACTCTGAGCTGACT
GCGCATCTAGGACGCAACAAGGATCACCATGGACAAGGTGCTGACGTTGCGTGGACCTTGCGCCAGATCGAAGGCGGCAGATCCACGCGGTCTGGATCAATGACCGGACTGGCTGGTGTGTACAGCGCTGGTGCCTGTGGTG
CAACCCGAACAAGTACCTTGCTGAGTTGCTAGTGATCGGCGTAGCGCTACTCGCAATTTCTCCACGTACACCGAAGCGCTCAAGATTTTGGCACGGGTTCACTTCTGCGTGGGATCGAAACAGGCAACGGTGTTCGCTCCCGACTAC
GACGCTCTACATGAGGGCAGGGTTCGGCCCTATAACGAATCGTATTTCTGGAGGTGTAGACATGGGCAAGGTAGTCTCATGGGTTACCGACACAATCGGGCTACGGACAGCGGTGCCGCAACGAGCAGCAAGGCTCAAGATC
AAGCGAACAGATTACGAGCAGATCGCCGAGCAGACCGCAACCTATAACGCGAACCTCGCCGACTGGCGAACACGAGACGCAACCAAGCCGCGACGGTAACCGCCGGCGGTACGGCTGCTGCTGCTGACACATTGACCAAGCGG
CGCAATGCGTCGCAAGGTCTTGCTTCGACCTTGGGCGTCAACGTTAAGGGAGGGACATGGTAGGCAACCAAGTCTTACAAGTCTGTTTCGAGAAGTACCGGGATGACTCAGTGATCCTCAAGTGGCCGAGTACGCGACTGGACT
GCCGAAACTCATGGCGAACTCTGTATCGTGGGACCGTGAAGTGTAGCAGCGAGACTACCAGGAGATTGGCGCGTCTCTGTGAACAACCTCGGCAGCAAGCTCGCGGGTCTTCTGTTCCCGGTGAACCGCGCATTCTTCGGTATCAA
GCCGAGCAAGCAGCTCAAGGAGCAGCCAAGGCTAAGGGCATCGACATGAGCGAGTTTTCAGTGGCCCTGGCGCAGCTCGAAATGGACGCCTCGCAACGGGTGTTCTGAACTCCAGTACAACAGCTCACGCTGGCAATCCTGCATT
GATCGTAACGGGCAACTGCCTGACGAAGCAGACTCGAACTTAAGCGCACGATCACGTACGGCCTTTCAGTGGCTTCTGTGCGGGCGCACGGGACAGGTGAGCTGGCCGACTGCATTCTGCGTGAGTTCAATCGTTCGCCGGTTGTC
GCGTGAGATTACAGTAATGCTCGCTACGCGGTTCCCGAACAAAGTACCGCATGGACAAGTTCGAAACGAACGCTGAGGTGTACACTCGCATTACGCGCTAACGATGGACAGCGCGACGTGAAGTACGCTGTGCGAAGAGATCGAGT
GCATGCCGATAGGTACACCGGTGAGTACCTGCGCACCTCTGCCCTGGCAAGCGCTACGTGGTCTTAATTCCTGGCGAGCACTACGGCGAGACTGGTGTGAGGACTACGCCGAGGTTTCGCCAAATCAGCGATGAGTCGGAAG
CGTAGCGCTCTATGGTATCTCGGCCATGAAGTCTCAACCTCGTACAGCCCGCAGTGGCAACGACGTTGACGATCTGAACAACGCTGAGACTGGCAATACGTGCAAGGACAGCGAGGGCTCGATCCAAGTGCAGGAGTCCGGCGACG
CGAAGAAGATTCAAGCGATGATGGAGTTGATCTCCTCGACGTTACGAACTGTGCGGGCCTTATGTACACGGCAATGTGCGGGACGCTGAACGCGTCACTGCATACGAACTGCGCCAGCAGGCGAGCAGAGGCTAACCAAGCTCTTG
GTGGCAGTACAGCGACTGGCTGAGTCAATCCAGTTCGCTGGCCACGTGCTGGTGGTGAAGAGAAAGCCAGACGCGTTGGAAGTATCCTGTGAAATACGTTGGTCTTACGCTGATCGCGGATTCCCGCCTCAGTCGCGGCA
TCGACGTGACAGAACTACTCCAAGCCGCCAGGACGAGCAGCCATCGTAAACGCCCTCACGTCGATCGATGATCGCGTGGACCCACGCAAGCTGATGGATGTTATCTACGCGAGTGCCTCTGTGATACTACGACCTCTGCGCGCAA
GGAAGCCAGGCAAGTTCGATCGCGCCAAGCAACAGATGCAGCAGGCGCAGACTCAACTCGCCGCTACCAATCCGAGCACAGACAGCCATCGGCTCGCTGCCCGGTGCCAACAACTAAGGAGGCCACACAATGGCAGAGCAAG
TCGACGTCCCGCGGTTTCGATCCGTTCAAAGCTGTACCGGCTGACGAGTACGCTGGGCGTGTGACCGCACGCGGCTCCGATTCCCCAGTCCCGCGTGAACAGCAACGCAACGACGCGAGCGCGTCAACCTCCCGCGG
ACCGGTGCGGAACAGTCCCGCAGGCGCGGATGCTGATCCGAGTATGCAGCATTCAAAGCGTGAAGAGGGCGCAAGCTGCTGCACCGACTCCGGTAAAGTGGACGACAGCGCGCTGCGCAACGGTGCCTGTTATCAAAGATG
ACCAGACGCTTACGCGGTTTCGAGAGCGGGCAAGAAGCAGCCGGTAGTACTAGCGCCTTTCGCTGTTCTGCTGGCCGCGCGAACCTCGACGTGAACCGTGCAGTGTGAGCAGCGCCATCGCAGAGCCGACGCGGGCCTTGTGAC
GAAGCGTACCTCAAGGAAGTAGGCGCGGATGAAGCCGATCACCTGATTACGCGTTGCCAAGAATCTTGTCAACCCATCAACGCGCAGTCCGAACTGCTGATTAATCCATCGAGGACATGGCCGTTGGGCGGCTGGTTGGAAGGCGTC
CGTGGCGGATTCAACGCAAGGCAACCGGCATACCTCAAGGAGTTCGTAGGCCATGGCCTCAACTCCTGACCCCGCAAGATCAAGAGCGCAAGTGTGCGCTACTCGACTTCGCAAGCAATCGGGATCGCTTCCGCGGATCCCT
AGGCCAGTGCAGCGTGGCGTGGGGCACCTGACGGCACCATTTGGGCTGTCAAAGGAGCAGTATCAAGCGGAGCGTCTTAAAGTCAACCGCAACGCGTGGACTTTGCCGACCGTGAACGTGAGCTTACCGCGCGCCGACAGCTTGGCA
AGAATGCGCCTGTAAGCCCTAACCAAGGAGGATTAATGGCAGACGTAGATAACAAGGGTCAACTGACCCGCACTTGGTGGGCGGATAGCGATGCGGACGAGACATCCACATTGAAGCGTACGAGGGGACATTGAAGGTTCTGTT
CCGCGTGTGATCGCTGTTCCGCGCTCGGGCTCACGAACTACAATCGGTGACGAACCAACCAACGTTGGCGCGGCGACCGCATCGGCGCGGCTGCTGTGAAGGGTCCGCGCTCGGGCGAGACGCTTACTCGGCTCGCATCGCAA
ACGAGAAGTTCATGTCGACGGTTCGATACACGTTGCTACATCCGACGCGGTTTCGACTGGCAAGACGACTGGACCTCGCCGACTTCAAGAGCGAGTACGCGCGGAGCAGCATCGGCGACGCTATCTGTTTACGAGGCCACGTTGA
TTAAGTCAAGTGGCGCGTACGTTCCGCCGCTCGCTGGCTGGCGCATTCCATCCGGCATCAGCGCTGTATGACGGGCTACCAAGCCGACTCGCATCGGCGAGCATGCTGTGGAAGTCCGCCGCGATCTACCGGCTTCGA
GAAAGCAGCCGACATCATGTCGAGAACCACAAGGAAGTGTGACTGAGTTCTGTAAGCGCCGCTCGGTGCGGGCCTCGGTGCGGGCCTCGCGCAGACCGTGCAGCTGATCCATCGGACGCGTTCAACGCTGTCTGAGCAACAAGAGCTGATGAACG
TGGACTTCAAGGACGCTCGCGCTGAACGACTACGCCAGCGCGCATCGCGGCTGAATGGCGTGCAGTGTGAGGCTCCGATCTTCCGACCGCGGTTGTGTCGACCCGCTGGGCTCGGCTTTCGACGTGTCGCGCGCAGAGG
CAAAGGCGTGTGATCGTGTCTTCCCGCAGAAGGCACTGTGACCGTGAAGCCAAAGGATGACGGTCAAAGTGTGGGAGTACCCGAAGGAGTTCGAATCGTACCTGGACTGTTCAAATGTACACGTTGCGCCAGAAGCGACCGG
ACGCGGTTGGGTCATCTTACGCGACTAATCGAAAGACGTAGGTTCTGCGCGGTGGAGCAGGAATCCGCGCTTAGTTCGCCAGCCCGCGATCTTAAAGGTTGCGGGGCTTTTTTTTTTGTCTGACCATAGGGGATTCCATGGA
CTTGTAACGGCTGTCAACGAAATCTGCCGAAGCTAGGAGAATCCGGTACATCGTGAATCGAAGTCTCTACGCTCGCGGTAATTTCCGAGATCGACTCTGAGATCGATCTGCTGCTGCAACCCGGTGGTGGTTCAACACGT
ATCACCGCTGAGCTGTTTCTGATCCGAACGGCTACATCGATGTGCCGAGGATACGCTGTGTTTGTGCGGAGCCGAGTACGGCATCGTACGGCACGCGGTGAACGCTTTTACAATCAGCGAACCCGAGTACGTTTCCCGTC
GAAGATCAAGGGCAAGCTCATTCAACGCTGGGAGTTCAACGACTGCCGAGTCCGCTGCAAAGTACGCTCTGTTTCGCGCTGGTCCGATCTACGTACCGACATCGGGCTTGAGCAAACCGTACAGCTTGGCAGTCTACGCGTCG
ATCGCGGGGCAACATGGAGCAAGAGCATCTGCGCCAGATGCGCTACACAATCAAGCAGTCCCGCGCTACCGGAAGCTGCGCAACGCTATGAGGGGTAACCATGGCTGCACTCGAGTCTTGCAGAAGTCTCAGATTAAGGCGTG
AGCCAGCAGATTGCGCGCAACGGCTCGACGGTCAAGTTAGCGCGCAAGAGAATGCTGTGCGGATGTGTCACCGGGTGTGTCGCGCTCCAGGTGCATGGGCTCGGCAGTCTTACAACCTCGGCACCGTGGTACTTCCGTGAGAGT
GTGCTGTTTCGATGACAGACTTCCGCGCTCACGTGTACGTGGTGTGTTGAATACGGCTGATGGGTTGTCGCGCTGTACACGGAAGCCTGGGCACCCATTCAAACACTGCCGCAATCCCTACTTGCAGACGCCAGCGGTGTAACG
CGATTGCGATGACGAGTGTGGGCTGATCTGTTCTCGCTAACCTAGAGCACACGCTGTACCTTGTACGGGGCCGCTGGGCTAGTCTTACGCGTGTGCGGCTTACTACATCAAGACCGGAGCATTCTCGAAACAGTACACTGTTCTC
GTGGCAGACTCAGCTTTCGCGCGGCTACATACGAAACGACCACGCCGCCAGCAACTGCTACCGGGGCGGATAATGCGTACGCGCTAGGGCGATCGCAGGACAGCTCGTGGCACTTATCAATGCGGACAGGCCACCACAGGGTGGACT
GCGTACTGGTATGGCTGTTCTGATCGATCCACGGCCCGCTGATGGTATGACGGTGGGCACGGCCACTCCACGTCGTACGTCGGCGTGTGCGGGCAGGGCAACGTGCCTACGTTGCGGATCTGCCGTGCGTGTGCCGTACAGGCA
GATGGTCTGTTATCGCGTAGGACGATACAGGTTCCCGACGTAACAAGTACACTTCCGAAACAGGCGTGGGCGGAAGTGGCCAGTACGGTTACCAACAGCACTAGCCAACATGCCCTTGCCTAACCTAACAGCGCGGCT
ACGGCATTGAGTACGACGAGATACGAAGGGGATACGAGGCGACGATGACAGTAAACCGCTGCCGACTTCTGTCAGCAATGGTATCACTGGTATAGGACGCTACCAAGGCGCTGTTGATACTGAGCGGGCCGAGTATCAACAT
GAGCGCAAGCATCAACACAGCGGTTCTTCCGCTGACGGTTACCTCTGTGGTGGCAAGCGATCCGATTGAGGTGGCGCATCGGTAACCTCTGTCGCTTATCGGTATGCTGTCCGTTCCAGAAAAGACTTGTGCTGTTCAAGTACAG

AGTACCAAGCAGTTGTGCCCGTGGGAATGTTGCCATTACGCCGTCAAACGCGACGGTGGTAGTACCTCTTCTGACGAAGGTGACATGACTTGCTCGCCGGTGACGCTAGGGCGGACCTTGATGTACCCTGCGCCACGTAACACGCAGTT
TTACGGTATGCTAGAAATGGTCCGCTGCAATACACCGACTCGCAGTACGTGTCAACCGACGTAACCTGGGCACCTACCAAGTACCTACCGGGCGTTGCCGCTTTGCTGTGCATCGTCGGTGGCTAACATCGCGTGTTCGCGAGCACA
ACCGACCATCGGCAGCTCATTGTTTCATGAGTACCTGTGGAGCGGTGCAGATAAAGTGCAGCAAGCTTGGCACCGTTGGAGCTTCCCGTACGACATCGCAGATGCCTCTTTACAGGTAGCGAGATTAACCTGCTGTTCTGTAATGGGACCA
ATGTTCTCGTGGCTACGATCGACCCTCGCGTAGGTACGTAGATGCGGCGAGCGACCGCCGACCGTTCTCGACCTGTACACCAACACGACGGTAACGGATCAGGAGCACTGTCCCGCCGGGCACTTGATCTTTGACCCGAACATTGC
TGATCGGCTGTCATTGGCAGATCAGTCTAGCGACGGTGGCAAGAGGTTGGCATCGAGTGCACACTCCAGCGTGTTACCACAGGTGACTCATACCAACTGGCAATGTTGACGCGGCATCAAGTTCACCTCATGTTCACTCAACT
ACGCCAATGGTGAAGGATCAGAATGGCGTCTAATCAGCAGCAATAAGTGAATCCTGCGCTACATGATCGGCACTGTAACCTGTCAGAGTTCAACGCGTTGGTTAGCGATGCAGCCAGTGATCCGACAACACTGATATAGACGTAG
GCCAGTGTACTGGTCGAGCCCTGAGCTTGGCCCTGGCCGGCGTGGGCTACGGTTGACGCTACTACGATCATCCATGTCTGACAGCAGCGGCAAGCACTACGCTTGTGCTATCGACGGATGGCCTTGGCGAGCTAAACATCGTGGCAGT
AGAAACAACCAACCGCTACAACAGAACTTCGGAGGCGCTAATGCTTGGTACGTTCCAGCTTGCATCGCTGGGGCTGAACTTCGCAAGCGGGTTACTCGGGTCGAGCAAGCAGCAGAGCGCTGCGCTCGACCAGTACACCAAGCGTG
AAGGCAGTCACAGCTCAGAATCAGGCGATTGCGGAGGCCAACACCGCAACATGATCCGTACCGTTACATGGTGGTATTAGAACTACAGCTTGTCTGGCAGCGTGCAGCAGCAGCCGAGCAAGCGAGTCAATCTCCAGCAAGGG
CGTGGCTGCTGGGCAATGCCGTAGCGAATGCGGCGCGCTGGTACTGTGGGCGCGTGGTGGATGCTACTGTTAGCGACATCCAGAAGAAGCAGCAGGCGCAAAATCGGCCCTGACGAAAATTTCTCGCAGACACTGGAGAAGC
CACAGATTGCGATCGAGCAGACCGCCATGTCCGGTAAGGACTACTACAGCCGCTCGGCAGTACAACCAACATGCCTACCGCAGAGCTTTGGCGCATGTTGCTGTCCGGCTTACCAAGCCGGTGGGCGCGCTTGCAGCTACGC
GGGCGATAAACTTTCGCTTGGTCCGACCAACACGCCAAGAGCGATGCAGTTCTATTCTATAAGTCCATCTTGTCTGGGCTGGGTACTCATTAGCTAAGGAGGAACATGGCAGTTCAGCGCGATGCGCAAGCATAGATTTTGGC
AGTGCCTCAAGCGGCGCTGTCCCTGGTAACGTAGGATTTGTGCGGGCCGATCCCGTAAAGTCTATGACCCTCAACTCCACAGCCTCGGTGATGACGGGCATCCTCGACAACGTAAGTCAAGTTCACGAAGCCCGTACCCAGC
TCGCACAGCAGGAGGTAGGTAACGAGCGGAGGAAGCGTACTTGCAGCGAGCGGACGCGCTGGCAGCGACGATGCGCAGGCTGCAATCGACAGCAACCCGATCACCAGAAGTGGACCGGTGCGGGTGGGCGGACACGCGGGCG
CGTCTCGCACAAGCAGACGCGGAAGCACAGACCGCCGCGACATGAAGACCTTGCGGGAGCAGTCTCCGAGCAGTTCAAGCAGTACTCGCGAGCGTGGCAGAAGGTGCTGGACAACATGCAAGGATGTCGCTGGATGCCGGGA
AAGGGCTGATCGCGCAGCAGCTACCAGCGATCGATCGCCATCGTAAGCAGCGTGTAGAGCACACGAAGTTCATCATCGACCAGATTGGCAAGGGTGTGCAAGCAGCCTTAGCGTGGCGCTCAACAACGCGAAGACC
GACCCGGTTCGTAACAACGCTGCGGCGGATGACGCGTTCGACGGGTGTACAGCAACGTGTGGTCAATCCTAACCTGCCCGCAGAGAACCAGCAAGCTCACCACACAAGCCCTGTGCTCGCTCGCTCCAGAACAACAAGAGTGTG
TACGAGAAGGCGCGGGACAGAAAGCTGCCGCGGGCGGACGCTGCTCGACCAACTGGATTGAGGATCAGACTGCGCTGTCAAAGCGTATGAGCAGTACGCAAGGACACGAGCAGGATGCGGCTCGCAACTACAACGCACAGC
GTGGCTCATGGAGGCAGATTTCAAGACCCGCTGACGCCGGCCATGCCCTACGATCAGTTCGAAGCCTTCTGTCGCAAGGGCGTGCAGATCGGTGCCATCAAAGCGGGGACATCACATCACTGACAAGGCATGGGCGGAGGGCAAC
GAGAAGAAGTTCGCTTACGCAACCTTGCAGAAAGCTACGTAACCGGCAACGTGAAAGCTATGTTCCGATGGGCAAGGTCGAGGACCAAGGTTACCAAGCATTATCCAAAGTACAAGCCCGTAATAACGTTGACCCAGCAACGACCGTA
GCACAGCTTTTACAATCGGAGTAAAGACAGGCCAAGGTTCTGCATTCAAGGGCGTAGGGGACTTGACTCGATCGGAGTGTGATGATCGGAATGGCAACAACATCGACCAAGGGCAGTTGAAATGCTCAAGACGGTCTCACGACT
CTCGACTGCCCAAGGCGCGGGAAGGCAATGCGCTGGGCGCGTACCTGTGCTATTTAAGGATGACGAGCGTTGGAAGATCATGCTGTTCCGCGAGCGGTTGACGGCAGGTGATGATCCGATGGTTCGAGCGCAGACCCGACGAGA
TACGTTCCGCAAGCAGTCTCAGTCCAGATCGAGCAGCGAAATGTGCTAGCCGCAAAACACGCTAAGGCCGATGCTGCTGTGCTCGCTGAGATCAGCCACGCGGCTGTGGGGTAGCATTGCAATGCGGTGCCTGACTTCTGCGCCG
CAGTCTAACATCGATAAAAAAAGCTGCGCAGTATCAAGGATTTTTGAGAAGCAGCAGCGTGTGAACGCTGCCCTAGCTCCGGCAAGGTAGCGCTGGTGAAGAGTTGAATTACATTTACGTAAGTATCGCTATGCGTCGGATGAC
ACTCGACGAAGCTCGACTGGCCAAGGTTGCAGGCCGAACGCTCGATCTTGATGGCGGACCGCTGGTATTCTCGCTACCATCAGGCGTCTCCATGCAGTCTACTTCCGGCTCAATCTTGGTGGGGCCGAGACCATCGCGGCTA
CGTTAACGAGTGCATAAGCCGGGGACGGAACCGTGTGGTCTACAAGGCAACCGGCGACGGTCAACTTCAGTGGCAGGAGTTCGGAAGAATGGTGAAGTGTAGTGAACCCGGTGGTGTTCGATCCGAAGTCTATAGCCAGGCA
GTTCAAGCAAAGCAGGATCGTATTACTGACGAGTTCAATCGCACCAATGTTCCAGTGTGCAGGCTAAGGGTACTACCGCGTACCAGGTAACAGTACAACGCGGATAACTCGGAGGTGGGTAATCCGCTCATGCTCCAGTGGCGTAAC
GATCTCGTAGCGATGAGGACGTGCGGGATACCCCTTACGACACGCTAGCGGTAAGGTGATGATGGAAGCGGGTCCAGACGCGTGGAGTGGAGTTAGCTCGCACAATCCGTTCTACCCGCCAGTGGATGACAGCGCAAGGTATC
CGCAGCAAACATTAGCCGGTCTTACCCTAGCGTCAATGCAGCAGCGCAGACGCGGTACGCGCACAGGCGCGGCTGGCGTGCAGACGGACAACAGTTCCGGTGTTCGGCTCGCTCGCTATCAGGGCGGACGCTACCCGAG
AGCTGATCGCCGCTTAAAGCAGAGCAAGGCCGACGAGGACGAGCGGCTTGCACGCTCCACGACGATCCGATGGCCACTCAGCCGCAAGCAGTATTGACTCGATGTTGAGTTCGATACCAACGCCCGCACCTGGGGCACTC
AGTAAGGAGGAAACATGGCAGAGCCATCGTTAATGTGACCCGCGTATCTACGCGGGGATGACGATACCCGCTACGCGGTCGCGGAGTTCACTCCGCGGATGGGCGCGCAGCAGCTCCGATTGCTCGTCTGCACAAGTCTCGCAG
GCGGGCATAGCGAGCGGAACGGCATCGGAAGAACAGGGGAGTCTGTTGATTGCGCAGAAGTCCGCGCAACAGGCTACCGCATGGCAGGCGCGAAAGCGGCTGTTCAATCGTGACCACTACCCGAGTGTGGATTGGGCCACGATGC
CGCACTTCGACGCGGACCCGAATTGATCCCAAGCCGATGTGAACGGCACCCGTTCCAGTCAAGTGGAGCAGCACAAGTTCCTGGCAAAGTGCAGTCTGCGCAGAGTACCAGTACCGGGCAACGCTTTGGCAGGCAACGCA
GCCTGTACCGGCAGATGGGCGACCATCCGTTTCTGTCGGGCATCCTGAGCTTCGACAGACCCAGTGTATCTTGCATCGATCTCGCGTCAATTTGGCACCGCCACAACCCCTGACGGCAGCAGGTGCAAGGGTACGTAAGTCTGCTGCTG
AGCCGCTACAAGCGCCGCTGTTAATCTCGCGTGGTGGGCGAGCAGACCCAGGCTGCGATCTCCGATACGGAAGTATCGCAATGCACTGGTCAATGGAGCGGCCACAGCGCCCTGTATCGCCCGGCAAGGGCTTCTGTTCCG
CCGACGAGCGTACCCCTGACCCGAGCTGACGAGCGCGCCACGGCCCTCAGCGGGAGGCTGCGCCAGCGGAGCGCGGTTGTCGAGAGCAGGCGGACGTTGGCCGCTCGCTCCGAGCCGAGCCTGCCATACCTACTCGACC
GATTACGGGCACGGTACACAGCGAGATTGCGGACCGGATTGTGTCGCCACGCTACCAGACGGATGCGTACGCCGATGCAAGAAGGATCTAATGACCCCACTTTGGGCGGATGATTAACAGGTTCTGGAGGACCAACCTGACGCATT
GGCGTCTGCTGTGACAGGTGAGTGAATGCGCCGCTTGCGGGTGAGCTTGGTGTGCTGTTCTACGAGCCGAATACGCAACAAGTTCACATGAACCAGACGAGATCGATAATCCCAAATTTCTGCTGACGAGGTGATGACCGG
CCTGACAGTGCAGAAGTCTTACGGTGGCGAATCCGGCCTCAGCACATGGTGCATCAGTTCGCAACTGGAAGCCTGCGCAGCGAGCTTAACGCATACCTCGCAGTAACTCTGCTGCTGGCGGACAGGCAAGTATTTCGGCAG
TAACGTTCTGAGTTTGGCCGGGCTGACTCCGGGATACGGAGTTCACGCGGACCCCTTCGAGATTCTGTTGCAAGTGAACCAATGCGCTGTCTAAGATGGTGGAGTTGGTTCGTAAGCTCCTGGGCATTGCTCCCAATCAAGAG
AGCGCATTGACCAAGGCGCTGTCCCTAACGGACGAGTGTATTAATACTGCTTAACTGTCGCCGACCGTGTACCAGTGTGCTGGAAGTGTCACTACAGGCTCACAGCAGCAACTCGCAACCGCAGTATCCGTAAGCTGGAAGCTG
CTAGCAAAGCTCGGGTTCCAAGTTGAGTTGCTACTCCATAAGACCATGAGTGTAAAGGTACGGAGGGCGGAGGGTGCCTAATCTGCTTGTGGAGAGCCCGACTAATCTTTCGGGTAACCTGCTGCGGCTCAACGCCAAGCTATTCC

TTCAGACCTCGCAGCAAAGCAGTATGCCTACGAGGATTTGCTCAAGGCAGAAATGGCTCGGCGCAATGCCGGGCTGTTGCAGCGCGTGTGCAACCGCAGCAAGCTGCTACGGCTCAACGTACGATCGAACGTGAAGTTCTTGAGGAACT
GGCAGCTCGGGACAACGTGATCCGTCGAGGTAACCTCAACATCACTGACCCGCTGTGCGCAAGGCAATCTCTGAGCTTGCCGACGCACACGCCCGCTACCCAACCTGCACTTCGCGAAATGAAGGCAGC GGGTGTGCTGGGTGCTGA
CGTGGTGGACGAGAACGTTTCGACTTCTCCGGAAGTGGAGCGTCACCAACATCGAAGCTGCTGAGGCTAAGTTCTGTCAGCGGGACTGACTCAGAAAGCAGCGGCGCGTGCGGTTCGTGATGTCGTAGCCGATGGTATCATGCGCG
CAAATCCGCAATGGACGCGCAGCTTGGCCGAGGATGTCGCGCATGCAATTTCTGCACCGCGCTCGGGCTAAGGGCTACTTCGAGGATCAAGCATTTTCGCGGACACGTGCGTAACGGGGCAGCAGAA CAAGTGCGGTCCATTCTGGAGACG
ACTGGCATTTCGAGAACGCTATTCAGGATGCGATGGACGTGCTCACAACGTAACCTGACGAAGCAGGTAAGACTTCGGCGCTCAAGCATCGCATTGAAATGGACATGTAACCTAGCACGCAAGTGGGCAATAGCCCGTGTCCATCGTT
GATCTTCTGGATGGGAACCTTACCCGGAACCTGGACAGCTATCTCGACAATGCAGCGGGCACTGCTAGCCTTGCAGGGTGGGCTTAAAGACCAACACGGACATCGTAACCTTGCGCCGTACTTGGATGCACAGCATCGAAAACCCCGCA
GAGCGTCAAGAGGCTGCTGACTTGTTCGACAACGTAATTGCGGCGTTGCGCGGGCAACCAAGTTGGTGAGCGGGTAGCAGACGGGCTGCGCAAAGTCCAGGCAGTTACTCAGATGGTGGGCTCGCATCCTCGGGCTGTGGCAAGCAAC
AGAATACGCTAATGCCGCTGCGCGCTATGGGATTGTGGCTACTACGCGGGAAATACTGAAGACGATGCCGGTGTCCGCCAGCTCTAGGTGACACGTGCGCACGCAAATGCGGAGAGCCTGCAAAGTATCTTGGCGCGCAACTCGTACCA
AGACATTCGATTCTGCTTACGTCAAAAAGATGGAGGACAACCTTGAACCTGCCGGTGTAGCGATCACGTAATGCTAGCTATGCAACAAAGTAAGCAGCTGTTCCGTATCTGAACGCAATGCGATTCATCCACCACAACCAAGCAAACGTAA
CAGTAACCTTGGTTGCGATACTCTGTTCAAGCTGCCAGGGAAACGAAGCTGGGCGCTACACGGAAGTCTGAGCCGCTACGGCTTAGAGGGCCGCACACTGGACAACGTACGGGACAGCTGCTAGCGCATGGCGGAATACCGAG
CGCTGGGCGGACGGTACGTGGGAGCAGCTTCGAGTCCGCTAGCCAAGATGATGGACGAGTCCGTGCTGCGTAATCGCATCGGTGAGATCCCGCTTTCGCGAGTTCTCGTCTGCGCAAGTTCATCTTACGTTCCGCTCATTCTGTGCT
CGGCGCGCACAAAGTGTAGCCGGTACGCTGCACCGTAACGGATTTGCTGGGCTTGTGCTGATGCTGTACCAGTTCGCCGCTTACTGTTGCTGCAAGCTATGCGAATAGCGTACTACGCGGTAACCTGAATCGGATGTAGGCAAA
CTGCTGGGCTCGCAGTTGGGAGATGGGCTCTATGGGCTTGTCTCAGAACTGTGGGCACTTGTGTCGGGTGATAAGCAACAGTTTGGCGCTAGTGGCTTGTGCTATCGACCGTCTGTACAAGACTGGTAGCCAAGCGGCTAGCGGT
AACTCAGTGGCGCAGCTAGCAGCGCACTTAGCGCTGTGCCGATCTGGCTATTGCGGGGCTTAAAGCGTTTGCAGCTTCTTCAAGGCTCCGCGCCACAACAAAGATAGGAGGGTTAATGTCATACAGTAACAGCTCGCGTCTC
CGACGGCAGCTGGCTTACCTGGACATTTCCATTGCGTACGAGAAGCGGGCGGACATTTCCGCTACTTTGACGAGGTTGAGCAAACGCTCGACAGCAGTGGAGCTGGGTAGGCACAACGGATAAGCGGATCAGCTTCTCACCTAACGT
GGCCGACGGCGTACAGTACGAGTACACCGCGCTCGCGCATCGACCGGGCTATCAATGTACTCTCTCGGAGCGAGCTTTACCAACGAGTCACTGGATACGAACTCCGCCAGATGGTTTATCTCGCGCAGGAGTACGCCAGGGCGC
AGGAATCACCGAGTATTTACGACCTGGACATGCATGGCAGCGTACTAAAGAACCTGGGCACTGCCACCAATGACGGGGATTCTGTGCTGCTAGCCAGCTTAAAGCAGTACAGTGTGGATACGGTGC GCGATGACCTTGAAGCACCAC
GAACCCCTCACTGGGAGCGGCGTGTGCGGCTTCTCGGAGGCATAGCAGGAGAGGTGGCATTACGCTCGCAGACTGTTCAAGGGCCGCATCAGCGTATCCCGCTGGGGTATCCGCCCCAGCGCCACAGGGGCTACAATCCCAACA
GCTTAACAGCTGATTGCCGCTAAGCCCAAGGCCGGCTGTACTTTGACGAGGCGGGCAGTACCCTTCAACGAGTACACAGCTTACCGAGCTTACGTAAGGCAAGGCGCACAGCTTACCGAGTGTGTCAGGAGCAGCTTA
TCGAAAGTCTATTCAAGTGGGAACCTCGGGTACAAGCAGGGCGGTGGTATAGAGGGCATGACAATCCGGAGCAACCTGGCGTTTGGCGCGCAGGGCTCTTCGGGGCAGGCGGTGAGATCACCAACGCTAACGCAATTTGAGATCA
AGAATTTGATATACAGTCTTTGCGGAGGGCATCGTGGTCAACGGCTTACTACGTGAAGATTGCCACGGCGACTTCTGTTCTGCCAGCTAACGGCATCCGCTCTCCAGTACAGCGGAGCAGGGACGGAGACTGCGGGCACAAT
GATCGAGTACCTGAAGATCAGCGGATTGCGTTACACAGGTTCTGACCCATAACAACAGCACTGGTATCTGTTCTCGCAGGGCTTGGCGAGTCTGAAACACAGTGGACGTTACACAATGCGGTGCTGGTATCGTGTGCGCACCGCCGGCG
GGTCTCGGGTGCCTTCTGAAGTTCAACCAAGTGTGGCGGATACCTCATACTATGAGGGCTGGACGTTGACGCGCTCGCAGGCTCCTGTGCTGGACATTGAGTGCACCAACTGCTGGTCTGCGGGTCCGGGGCGGCGCAGCACGC
CCTCCGGCTCAGAGCGTGGCGTGGGTGTTGCCCTTATCGGTCCGAACCTGGACGACATCCGCTGGAACGCGGGTGGAGTTCGAGACAATGACTGTGGAGGCGTGCAGCTCGGAGGCGGTAACACGTCGTAATTTACAACGCTTCGATC
TCCCGCAATAGCCGTCGATTGGCTTCAAGTAACTTACCCTGGTGTGCATGTGCTCTCGGGCTTTTAACTGGATGTTGATCGGTAACCGTATCGGTAACCTTCTCAGGGCGTGTAAATGTAGAACAGGCTGAGGGGCTGGTATCGA
TGCGGGGCGCAGCTCTGGCTTATTGTTGACTCAACGACTTCCGGGTTCCAGGAACAGGCAAGCCGCCATCGCCAACGGCTTTCATCGGTGGATTATGTTATGGCACAGAAATCTCCGAGACTGACGCTAGGCACTAACCTACGACT
CGGCGGACACACCTATCGGCTCAGGTGGCCCTGTAGCTGGAGGCACAGCTGGTTTCTAACTAGCGGTGGCCTGTGGGGCTCAACTATGAGTCTGCCGATGTGGCATCGCGCCAAGAACGCTTATGCAATTTGACGTCGCGCAAGT
TTGCACCGGGGTTGGGCAAGTGGGACGACTGCGCCTTACTACAATAACGCTTATACAGGGCTACAGGCTACATAGGCGATAGCGCAATCTCTGTGAACGTCGATGTGAACCTTGGTCTGAATCCTGGTACGAAAGTTACTATCGAGAT
TGTGACGAGCGGAGACGCACTCCAGTATCTACCGAGGTTACCTCGGCTTCGAGGATTAAGGAGGAACAATGAGCAACGCGGCATCAACCGCTCGCTCAACGAACTGCATCGAAACTAGCAGAGCAGATGACCAAGACGCTTAAATC
GCGACTTGAAAGACGACATGCCTACGGATGCCGCGACTATGTCGGTGTCCGTGGGTTTCTGTCGGAACAACATCACCTGCGATCTGCCACCAAGATACACGGCAGAGTTGCGGCGCAAGTTACTGAGCAGACGCAAGCAGCAG
AACAGCGCAAAGAGAGCGCGCTAGCTCGTGTGGTTGAGCAGACGCTAACACAGGGGCAACTTAAACAAGGAGGACCGATGGACATCGCAGAGCGATTCAAGATTGCCATCATTATGGCGGAGCACTA CAAGGACTTTGCAACCTTTGCC
GCTGACGGGATGGTGTATCTTGGTTTCACTTACTGACGTTGAGGAAGACATCGCGAGTTTATGGCCACCGTCCCGCTACGATGGTGTGTCGCAACGAGGGGAAGCAAAGTCTACCTCGCTGCTTATACGAGTGTGGTGTCT
TGATGCAGAAACCAACACGCGGGTCTTATCTGCTGTGGTGGTGGAGTCAAGCATCCGAAGTAGCAACCTGATCGTGGACTTATCACGACCTGGGAAATTTTCGAGTACCTACGACCTGATCGCAGCGAGGTGACCGCACTTCTAT
CACGGATGGCTTTCGCTTCAATGGGCAATTCGCGGGAACGTTGACAAATCGCCGTCGCTGAGCCTGTGTTGGGATCACCGCCAGCTCCAAGGCAAGCGGGTGTCTCTTATCCGGATGACATCGAGACGACGAAAGTGGCTTAC
CGCTGCGCAGCAGCGCACCTTCTGCTGCTGTCGAAGGAATTCAGTGCATCTGCGCGGATGGGCACATTCTGTACCTGGGCACGCTCAGACGAAAGATTGATCTACAACACGCTTCCGGGCGTGGCTTGAAGTGCATCTGGCCG
GGACGATACCCAACCTGCTAGCGAGCTGGAGAAATGATGTCGCGCTCGCTCCGAGCATCCTGCCCGCTGCGTGTGATCTACATTGCAAGTCCGGCGCGGCTTGTGATGGCACAGTGGCAAGCTACAGACCCGGAACGCTATGGC
GAATCGGCACTGTGTGAGAAGGAGTAGACACGGGACCCGAGGGCTTCCAGTTGCAAGTACATGCTAGATACTCGCTCGCTGACGAGGCGCGGCAACAGCTTCCGCTGAGTGACCTCGTTGTGCTAACTTCGGCTGGGAGACTGTACCT
GAAGTATCCCGTACCGCGCGGAGCCGCACTTACTTGTGCCATTAGCCGCTACCTTCCCGTGGCGCAGACGCGCATGACTACGCGAGTAGCAGCCAAACCGCATAACCGGAGCTGACCGACTGATGATGACTGCGATCCAGCGGGCG
GCGGGGAGGATGAGCTTGCATTCGCTGTTCCGGTGCCTAGGCCCGTACATCCACTGCTACGATGGGCGGGTGGAGGGCGGCTCCGTACCGAGAATGTGCGCGTGTGCTGAGCAGCTGCTGGAGTACAAGTCAAGTACGTG
CGCTGTGAGTCAACATGGGCCACGGCTGTTGAGATCAACCTACGTGGTGGCTTGAAGGGCCGCAAAGGATTGGAATGGTGCCTGAGCCGTTCTTCAAGACGGTGTGCTGAGGGTGAATACAGCACAGGCCAGAAGGAGCG
CCGATCATCGACTCGCTGAGTGTATGCAGCGTACCGTGTGATCGTGCATCAACAGGTTTCGCTGATGACGAGAAGTACAACGCCAGCACAGCTTGAAGCGCAGTCACTACAGCATGTGTCGAGATGAGCAACATCAC
TACTGATCGTGGTTCATTGGCCCATGATACCGCTTGAAGCCGTGGCGGGTGTATACGCTTCCACAAGACTCGTTGGTGCAGGATGAAGAAAAGCAGCAGAGAAGCGCGCAGCAGAGGCGCGAGAGTTTATGAACAATCCAA

TGGGGTACGAGGATGCCGCACGCGAGAAGCGTGGTGGCGGTGCTCGCTCGTTGGCCGCTCGTCGGAGGGCTAGGAAATGAGCATCAAAGAACAATTGGTAGGGGAGGCGCTCAAGGCCATCCCGCTACCGGCACGCTTACGCTGACG
CTGTTCCGGCGTACCCCTTGCACAGTGGGCCGCGAGGACAGAGATTGCCATGTGCGTGCAGCCTGGGCGCGGAGGACAAATGAAGTTTGAACAGTACCTCATGATCGGCGCAGTGGTGTTCGCTGCGCTGATTGGCGGTACGTGGCGT
GGAGCTTCAACCACAGCAAGCTCGTGGAACAGGAGCAGACCATCAAGGATCAGCGCGCAGCTTTGAGGCGCAGGCTGTCTGCTGCTGCTGACAAGAACGCCAACGCTGCTAAGGCTGCTGCTGTGCCACAACCAACACGCGCTA
AGGAGGCAACTGATGCGCTCAACAAAGCTGCGGATGCTAACCGCGCTTGGGCTGATGAGCCTGTGCTGCTGACGTTGTCAGGGCTGTTGCTCAACGCGAGTGCAGTTCGCGCTCCCTGATCCCAGCTGTACCAGTCCGACATCGCAGTCC
CCTCGGGTAAGCCTGTATGACGAACCAAGACCTAGCCAGCTCTGCATCGACACGCGCACCGCGCTGAACTGGCTAACGCTGATCGTGCCGCTGCGCGCTGGGCCAAACCATCCAGAAGGAGAACAAGCAATGAGCATCGCAAA
CCAGACCACGAACGAAGTGTATGCCCTACCGGCCAGATGGAGAACACCCTCAAGGCGCTGCTGCTTACCCTCGGACAGTCGAATCCGGCCCTGTTACCTCGGCCAATGCCAGCATGGCGGCGCTGAAGACTTTGCTCGACGCGGT
ATCGCGGACGCCACGCCCGCGCTCAGGCACCTAAAGCGTCTAATCGCCTCGTGGCGGGTTTCGGCTCGCCAGGGTAGGCAACCATAACAGCCCATGAGCGCGAGCCCGCTACGGCCCGCTCGAAGTCCAGGAGGATTATGGCT
TTCACAATCGCGCAGGCGTACGACATCATCCAGTGTCCGCCGGCTCAGCTCGGCGCGTACGCCCGCACCTGACAAACAACCCAGCGCAGGAATCGTCGACAGCTCGAAATCGGGCCGCTGAGACGATCAGGACCTGGGCGGT
ACTGTGGTCCATCCACTCTGCCGTGTCGAAACGGCGCTCAGCCAGCGTGAAGAACAGCGCGGGCACCGTACCATCGCGGGCACGGCCACGGTGCCTCGGGCAGCCTCACAGGCGTGTCCCTGCCGCCACTGTGGCCCTCGTG
AGCAACGCGGGTACTGTCCCTGTGAAGAACAGCGCTGGGTCTACCGTGCCTGATCCGCCGTGCAACCGTGGCAGCCGGCTCGTTACTGGCGTGCAGTCCCGGCGAGCTAGCCGACTACTACTGGCGGCACCGTACCGTCACT
GACGCTAGCAGCTCGCCGAACCTGTCCGCCACTGTACGGTGTCTGGCGGCGGGCTACAGCTACGCTGCCGCTACTGCTGCGGTACTCCAGAATGGCGACCAAGTACGATCACAATGCATCGGGCAGCAGCCAGCGACCTTTCCG
ATCACCGTAGCGAACGCGTCCCGACCAAGCTGACGCTGCCGATAACCGGGCGCTGATCGGGCAACCGCTACACGATCCAGTACCAGTACCGGCGCACGTACACCACAACGTTACACCGACCATCACGAACGCGCAGCTCGTTGGCATTGTA
CTCAGTTAAGGAGGAAGTATGGCAGCAGCATTTCTGACGAAACCGTGGATGACAGTACCAAGCTCGTAACGCGCTCGACAAGGCTGCGGCCCTCGTGCAGCTAACGTCAGCATCAACCGGTGCGCTACCAACGAGCAGTAGTTGCT
GCGCTCGTCGACGCTCAGGCTCAACTCACTACGCGTGGTGGGTAACAGCTAAGAGGTAGGAGGGTAGACATGCTAGTAGTGTGGTAATGGCGTACCCCTTAGGGTATAAGGATTGACGAGTGAAGGCTTAGGGATTAGGCTG
TGGGAGTGGTAACTAGCAATGCCAGTTGAAAAATTTTTCGAGGCGAGTCCGACCCGATGGCGCATGCCCTTCCCGTAGGCCCGCTTTCGAACCATCCAGATGTCGGCTAGGAATTCGCGAGGGTCTAGCCTAACGCTACTAGCG
TCTAGCAGCGACGATGTTGATTCTAGACCATAGCTTAGCGCATAGCATCGCAGAGTGAACGCGTGTGATTGAGGTTGGTGGGAGCGGTGGTAGATGCGCCAGGGTGCAACACAGCGACAGCACAGCGCCTGGGAATGTGCC
CAGGATTGACCAGGACGGCTCAGGACGGGCTGGCAGGGCTCAGGGTAGGCAAGGGTAGCTGAGGATGTCTCAGCGCTCCTAGGGCTTCTATGGCTTCTGAGGGATTACATGCCTTCCAGCGCAAAGGGACAGGAGTGTCTAGGG
GAAACCCTAGGATTCATAGGATACCGTGTGGTTTATAGGGTACTGTAGCGGCTGCTCCCGTCCCGCTATCTGTCTTTTCGTACAGGTATCTATGAGGGATTGCTAGGGATACTCTAGTGATCTCATATGTATCACTAGGTAAGT
TGTAAGTATCTTAGGATCTACTGTAGTGTCTCTGGTGTATCTCTGGTGTACTCTGGTGTACTGCTAGGATATCATGTCTTGTATCCGTGCATCGCTGTTCTCGGCTCGCCGGCTACGCTTTGTTTGGCTTTCCATCGTGGCAGCTCAA
ACGCTATGGTGTAGACTATAGCTCTCATGTTACTAAGGAGATAGCATGACTAGGGTAAGGGTAAGGCATCAACGACTACAGGAATGACTTAGTGCTTCAAAGCTACTAGTACGCTAAGCTAAGGAGTACTAGTATGTTGGT
AGATGCTAGTACAGTGTCCAAAGTACTGAGTACGCTAAGGCTAGGGTAAGTGTAGGGCTAAGGCTAGACGAGAAGCTGCTGCTAGGAAGAAAGTCTTGACAAGGCTTAGGAACTAGCGCATAGTTCGATCCAAGCACTAAGCA
ACAAGGTGCAGACGCTAGGTAACAAGGCGAAGAAGGCCAGCGCTCTAACGAGCAAGGCTAAGTAGCTGACAGGGCGTTACCGTTAGCTGATAGGATTACCTGCAACTCAGCTAGTGTCTAGTA GTTGACAGCAGTAACGAGTATGC
TGTAATGCAAGTACGGTGTAGCGCAGTGTTCGAGAAGTTCAGCGCCTAGGTTGCTTCTGGTAAAGACACAAAGCGCTTGACACTAGCAGCAGCAGAGTAGGATGCAATGATGAGTGCAGTGTTCGAGTACCGGTGATTGAGG
CCGGACGTAAGCGAGGCGCTGAGTAGTGTCCGGATAGCAACGGGGCGGGTAGCGAAGCGATACGCGGCAAGTAGGCAAGTGGGCTTAGCGGGTAGCAGAGTATACGCGGAATGCAAGGCCCTAGCAAAAAGTGGAGAGGCA
TACCCGCTATCCATGATGCAAGCGAGGGGCACTAAGCGACGGTCTAGGATGTTGACGAAGGGTAGCGCCGGATGATGCAAGTCCGGGACAAATAGGGCGGCTCAGTAATCTCAGCCCTATAGC GTAGAGCTTCGGCCGATGGCTGAG
ACTGCGCTGTAGTACGATCGGTTAGCGATGACAACGGCTTCCGGGTGATTGCGGATACGATGACAGGGCGACAGTACGCGGCAAGTCCGGGAAATTTGAGGTGAAATGATGGAACAATTCATTGTGGTAGTTACCCAGCACACGA
GGGGCTTATGGTGGCGTGTGCACGACGAATCGGATGAGCCGTGACAGGCAACCGCGCAGAAATGGAAGCGCTCCGAGTACTTATGCGCCGCTTTCCGGGCGAGCTGCTGCGAGGTGCGGGAGGATCGATACGAAACCCCTGGCG
GGAGAAGCGCCACGCCGCTAAACAGTGGGACAACCGAGATTGGATGGACCTATGATACCCGACTACGAAGAAGCGTTAGAGCTTCTGCGCAAAAGACCAGCATCAACTCGCGACGCGGATCTCAGGAACAGACTACCCGAAGATGCGCTT
CCGAGATGTCGTAAGCCGACTGGTATCGCATAGCGCTGCGCTGTGGGCGTACCAAAATTTGGTTGCTGCTGATCGCGACCGCTTTCGCAAGCAGGTAAGGGGAACTACGCCGCCAGGCA CCGATGGCCGCTATGGCCGATAAG
GAGATAATGGTGGACCAACAGAACCTGAAGTTCCTGCGTGACCTTCTGAACGAAGCGGGCGTAGACAACCCGCTGGAGCTGGAAGTCGAGATTGTGCGCGCCGACGGCACACGCGTGTGTTGATTTTCAGCAGGTTTCGCTATGTAAGT
TGGAGCAAATCGCCGGGAGCAGTGCAGTCCGTGTAACGCGAAGGAGGTGAGTGTGGTTCATTGCAATCTTACTGCTGCTGACGCAATCGCTGACGTGCTGTGTCGCGTGGAGGATAGGCGCAACACGCGCTGGAGTGTCCAGGTTAT
TTGGGACGCGGATTCTGACCCTGATCCGCGAAGTCTTACGACGATGCGTTAGCGTGGTGGCCTGCTACCGTTTCGGCGAGGCACTCATGATCGCACGTTTACGGCACTACTAGTGCCTGGCGCGCGCATCGCTACTGACAAATTT
CAAACGCGCAAACACTACAGGAAAGACCATGCGTGCTACAATTCGTACAGCCAAGTTGCATTCGACGCGAAAAAGTTCAACATGTGCGTAGCGCAATTCGCGAGGTTGATGCCACACTGCGTGAGCAGTTCAATTTGACACGATCGTCAT
CACCGGCAAGTCCGGCGCTGCTGGGTTTGCAGTTGACGAGCGTGGCGCTTATGTCGTGTACGTTGAAAGGAAAAAGACC GCGCGAAGCAAAGGCGTTCTCGTTATCACCAGCAAGCCGAGCTTAAACGCGCCATCAAGT
GATCGGCACTGCTCCGACGGCTTACGCGGACATCCACCGCGCCGACGAGTACGCTGATCGTACACAGCGCAAGCAACGATCCGGACGTTGGCAAAGCGCTGCTGGACGCGATGGGCAAGACGATGCGCAAGTCCGCCATGACC
GCATGGCTGTGCGCATACGCGCGTTCGCAACCGACGAGCATGGCGCGTGGTGTACGTTGAAAGGAGAAGCGTGGAGCGGTGACAGCTGAGGCCAACGTTACGCGCGGATTGCGGAGCGGTTTTGATGTTGCGCGCGAAACCGAAGT
ACGTGCAAGTTCGATCTCCAGAAGTGGTGGCGCACTCTGCGCGCGCTGAGAATGCCCTGGCGAACGAAGCACAGGACGCTACGCTTATTAAGCCGATGTCTCAGCGAGCTGCGCAAACCTGTTCCCGCGGACGCCAAGTAACCGA
GCGTCGATCATGTACATCTGTACGTATGGCTGATCGGCTGTTAATGATTGGCGAGCCAGTACGCGCTGAGCAGTGCAGGCGCAAGCCATCGCGGCCCGGCAACAGCACGAGTGCGTAATGTCGAGTGCCTTACCGCTTTCGACCGCTTCTGAT
GCCATTGTGGATCTTGGTGGCCGGCTGCGTCCAGTTAGCCAGGGCATGGCAGGCGTACGCGACTTGCCTGCGTTGAGCAAAGCGCACGTGTGACGGCACCGCGCTGAGCGCAGTACGCACATGCCGCTCTTACGCTTTCGACCGGG
ACCGACGTTGTATGTGAAGTCGGTCCATGCCGCCACTCGCCTCTGTATCGGAACCTTGACACAACCTGCGACGACGCGCATGGCGTACGGCATAGCCTTCTGCTCAGCAGCGTGCAGTGTGCTTACTCGCGCTTTCGCCA
GCTCGCCGTTATCCCGCAGAGATCGTGGGACTCCCAACGGTGCAGATAAGTGGCGTCACTTGGCGCCCTCGAACTGCTGAGCAGCTGAAATGCGCCGCCAATCCAAGCAAGGACGCTAGCGCTGTTCCGCGTGTGATCTTCTT
CATTACGTTTGCCTCCGAGGTTGTTGCGCAGCAGGAAGTAGAGTGCGCCAGCAGTACGATGAGGACATCAGTCCGCCCACTGTGCAAGTGCCGCGCTTCTGATGCCATTGTGAATCTTGGTCCCGGCTGCGTCCAGTTAGCCAGG

CATGGCAGGCGCTACGCGACTTGCCCGGTTGAGCAAGCGCACATGTGACGGCACCGCGCTGAGCGCAGTACGCACATGCCGTCTTTACGCCCTTACGACCGGGACCGACGTTGTACGTGAAGTCAGTCCATGCAGCCCACTGCCCTC
AGTCATTGGAACCTTGACACAACCTGCGACGACTGCATAGCTTCAGCCATAGCCTTCTGCTCCGACGATCGACTGTGCCTTAGTCCGCACTCCGCGCTTCGCCAGCTCGCCCGTATCCCGC GACAGATCGTGGGGACTCCCAACGGGT
CTAGATAAGTACGCGTCACTTGCGGCCCTCGAAGTGCCTAGCGAGCTGAAATGCGCCGCCAATCCAAGCAAGGACGCTAGCGCGGTTGCCCTGTGATCTTCTTATTACGTTTGCCCTCCGAGGTTGTTGCGCAGCAGGAAGTAGAGCT
GCACCAGAGTACGATGATGGACAGCAGTGTGCCACTGTGCAAGTGTCACTTCTTCTGTCATGATGATTCTCTGTTAGGTCAGGTCAGGGTGATTACTGTCTGTAATGCAAGTGCAGGAGTGCAGCGTAACGTCCTTCGGTACGG
ATAACCGACGAACTGATACCATCACACTGGTCAAACCGAGTGTCAAACCTAGCCTTAGACACGCGGCTGAAAACGTCACATTTCTTGACGTAGTAGGTGCGCTTACCGGTGGCCAGATTCTCAACGTCCTAAGTTCCGGTCTGTAAGCAT
GATGATTCTCTACGTTGTAATTCCGTGGCCTACTCGAGGTTGCGGGCCCGCTCTGCCCGTCTGGCGTATGCGCCAGGGCATTGCGTTGCACTCCGCTACTGCTACGCCAAGTGCACCGAATTACAACACCTCTTGGCAGGTGAGG
TTTCGTAGCTTGCTCGCTTAAACAGGGCACCACTTACTACCCATCGCTCGACGTTGCGGGCAGCAGTGGCCCGTGTCCCATGCTGTTTACGCACACCGGATGGGCACGCGGCAATGGCATCCTGATCGAGATCGAATGCCACCACGTT
GATGCGATGTGCTGCGCCGACTGCGCCAGTGGCCGTGTCTCCACCACGAGTACCGCCAAGGTTGCGCTGTGCGGGGCACTGTTGCGCACCGTTGACTGTGCGATGTGCAACCCAGCGCCGCTACCACTCGCTGGATTCCGGTGC
TCCTTATGACGGTGCCTGCGGGCTGGCCTGCCACTTGTCTGCGCCGTTACCGATGTTGAGAATGTAGATCATAGACACCTGTGCGCTTACGTTGCGCGCCGTTGCGGGTCCGCTTGGCGG GCTCGTTTCCAGTTTGGCAGTTGA
CGGTTCCGGCCGAGCAGTGGCCGTTTCCATGCTGGTTCACGCACACGGATGGGCACGCGGCAATGGCATCCTGATCGAATCGAATGCCGCCAGTGGCCGTTGCTCTCCACC
ACGAGAACAGCAGGTTGCGCTGTGCGGGGCACTGTTGCGCACCGTTGACTGTGCGATGTGCAACCCAGCGCGTACCACCTCGTGGATTCCGTTGCGGCTGCTGCGGGTGGCCTGCGGACTGGCCTGCGGACTTGGCCTCT
TGCCGATGTTGAGAATGTAGATCATAGAGTGCCTATCGCTTATCGTTGCGCGCCGTTGCGGGGCTGTTTCCAGCTTCCGCAATTGCAAGGGGAGTGCCTGCGCACGGCACTTACATTGAGGGTACGCGCCACGA
GTTTGAGAACTACGCTTCTGATGACTTCTGAGCAGTGGCGAAACTGCAAGCGCGTGAATTTAGAGCTTGAAGACTGGGCCTAGAAAAGTGCGAATACGCTAATGCGCCTAAGTGCCTTCTACCATTGAGTACGACGGGAGCC
GGACTGCTAGGCTTATCTGCCAAGACGCCAGGGGTTGACGGCCGAGATACCCGGCGGATGTAAGTGTAGGAGGATACATGAAAAGCAACACGATCGAACGCGTTCGAAAGCAACGCTGGAGCAGACGGAAGGGCAAG
CGCTGCG

ΦBurDT47a

TTCACCACCTTACCCTAGCGTCTGCTAAGGGGTATCCCGCACGTCTCATGCGCTACGAGATCGTTACGCCACTGGAGCATGAGCGGATTACCCACACCTGCCGAGTTATCGCCGTTGACTGTACCGGTACGCCGGT AGTACCCTTAGC
CTGCACACCTGGACCATTAGTGCATTGAACTGTCAAGTAAACGATCTGCTTTCGTTGAACTGCCTGGGCTATAGACTTCGGATCGAACACACCACCGGGTTTACTAACTCACCATTCTTCCCAGAACTCCTGCCACTGAAGTGCCTATC
GCCTGTTGCTTTGTAGACCACACGGTTCCGTCCTCCCGGCTTATGACGCTCGTTAAGCGTAGCCGCGATGGTCTGCGGTCCACCCGAAGGATTGACGCCGAAGTAGGACTGCATGGAGACGCTGATGGTAGGCGAGGAATCACCAGCGG
TCGCGCATCAAGATCGAGCGTTCGCGCTGCAACCTTGGCCAGCGCCAGCTTGCCTGAGTGTATCCGACGCATACGGATCACTACGTGAAATGTAATCAACTCTTCCACCAGCGCTACCTTGGCCGGAGCTAGGGCAGCGTTACACGCT
GTTGCTCTGAAAATCTTGCATGACTGCGCAGCTGTTTTATCGATTGAGACTGCGGGCGCAGGAAGTCAAGCACCGCATTTGGCAATGCTACCCACAGACCGCGTGCGGTGATCTCAGCGAGCACAGCAGCAGCAGCCTTAGCGCTG
GTTTGGGCTAGCACATTTGCTGCTGATCGTGAAGTGTGACTGCTTGGCGAAGCTATCTGCTGCGGTCTGCGCTGCGACCATCGGATCATCACTGCTGCAACCGCTCACGGAACAGCATGATCTTGAACGCTCGTCTCTTAAATG
ACGATAGGTACGCGCCAGCGCAATTGGCTTTGCCGCGCCTTGGCAGTGTGAGAGTGTGAGGACCGTCTTGTGAGCATGTTAACTGCCCTTGTGATGTTGTTGCCATGCCGATCATGACACTGCCATCGAGTCAAGTCTCTACG
CCCTGAATGCAGAACCTTGGCCTGTCTTACGCCGATTTGTAAGGCTGTGCTACGGTGTGCTGGGTCAACGTTATTACGGGCTTGTACTTGGATGAATGCTTGGTAACCTGGTCTCGACTTGCCTATGGCGAACATAGCTTTCAG
TTGCCGTTACGTATGCTTGGCAAGGTTTGTGAAGCGACCTTCTTCTGTTGCCCTCGGCCATGCCTTGTGAGTGTGATGTCCCGCTTGGATGGCACCGATCTGCACGCCCTTCCGCCAAGGCTTGGAACTGATCGTAGGGC
ATGGCCGGCTCAGCGGGTCTTGAACCTGTGCTCCATGAGGCCAGCTGTGCGTTGTAGTTCGCGAGCCGCATGCTGCTGCTTGCGCGACTGCTCATAACGCTTGGACAGCGAGTCTGATCCTCGAATCCAAGTTGGTGCAGCA
GCGTGGCCCGCCGGGAGCTTGTGCTCCCGCCTTCTCGTACAGAACTTCTGTTGTTCTGGAGCGCGAGCGACAGCGCTGTGTTGGTGTGAGCTTCTGCGGGTCTCTGCGCGCAAGTTAGGATTCAGCCACAGTGTGCTACAGCCC
TGCGAACGCGTATCCGCGCAGCGTTGTACGCAACCGGGTGGTCTTCCGCTTGTGAGCGCGTCAAGCCGACGCTAAGGTCGCTGTACACCTTCCGCGATCGGTGATGAACTCGTGTGCTTACAGCGTGTAGCGATG
GCCGATCGATCGCTGAGTGTGCGCGATCAGCCCTTCCGGGCATCCAGCGACATGCCCTGCATGTTGTCCAGACCTTCTGCCAGCTCGCGCAGGTAAGTCTGCTGAACTCGTGGAGACTGTCTCCGCAAGGCTTCTATGTCGG
CGGGGCTGTGCTTCCGCTGTCTTGTGCGAGACGCGCCCGTGTCCGCCAACCCGACCGGTTCAAGTCTTGTGATCGGGTGTGTCGATTGACGCTGCGCATCGTCTGCCAGCCGCTGCCGCTCCGCGCAAGTACGCTTCC
TCGCGCTGTTACCTACCTCTGCTGTGCGAGCTGGGTGACGGGCTTCTGAAAGTATTAGTACGTTGTCGAGGATGCCGTCATCACCGAAGGCTGTGGAGTTGAGGGGTATAGAAGTACCAGGATCGGCCCGCAAAATCCTACGT
TACCAGGGACAGCGCCGCTTGAAGCGCACTGCCAAAATCTATGCTTGGCGCATCGCGCTGAACTGCCATGTTCTCTCTTAGCTGAATGAGTACCAGGCCCAGACAAGTGGACTTATAGGAATACGAACCTGCATCGCTTGGGCGT
GTTGGTCCGACCAAGCGAAAGTTTATCGCCCGGTAGAGCTGCAACGCGGCCACCGGCTTGGGTAAGGCCGGACAGCAACGATGCGCCAAAGCTCTGCGTAGGCATGTTGGTGTGTTACTGCCGAGCGGCTGTAGTGAATCCTTACC
GGACATGGCGGTGCTGCTGATCGAATCTGTGCGTTCTCCAGTGTCTGCGAGAACTTCTGTAAGGCCGATTTGTGCTCTGCTTCTTCTTGGATGTGCTAACAGTAGCATCACCGACGCGCCACAGTACCAGACGCGCCGCAAT
CGCTACGGCATTGCCACAGCAGCCAGCCCTTGTGGAGATTGACTGCTTGTGCTGCGCTGTGCTGCAAGCTGCGGAGCAAGCTGTAGGTTCTGAATACC GACCATGTAACCGGTACGGATCATGTTCCGCGTTGTTGGCCTCCGCAATCG
GGTTGAGCGGTTGGTTGTTTACTAGCCAGATGTTTACTGCGCAAGCCATCCGCTGATAGACAAGCGTAGTGCTTCCCGCTGCTGACGACATGGGATGATCGTAGTGCCTCAACCGTAGCCGACGCGCCGCAAGGCCAAGCTC
AGGGCTCGACAGTACTGGGCTACGCTATATCAAGTGTGCGAATCACTGGTGCATCGCTAACCAACCGGTTGAACTCTGACGAGTTAGCAGTGGCGATCATGTAGCGAGGATAGTCA GCTTATTGCTGCTGATTACGACGCCAT
TCTGATCCTTACCATTGGCGTAGTTGGACTGAACGATGAGGTGAACTGATGCCCGTGCACATTTGCCAGTTGGGTATGAGTACCTGTGGTAAGCACGCTGGAAGTGTGCGACTCGATGCCAACCTTCTCGCACCGTGTAGACTG
ATCTGCCAATGACAGCGGATCAGCAATGTTCCGGTCAAAGATCAAGTGCCTCCGGCGGGACAGGTGCCCTGATCCGTTACCGTCTGTTGGTGTACAGGTCGAGGAACGGTCCGGGTCGCTGCGCGCATCTAGCTACCTACGCGAGG

GTCGATCGTAGCCACGAGAACATTGGTCCATTACGAACAGCAGGTTAATCTCGTACTGTAAAGAAGGCATCTGCGATGTCGTACGGGAACGTCCAACGGTGCCAAGCTTGCTGCACCTTATCTGCACCGCTCCACAGGACTCATGAA
CAATGAGCTGCCGATGGTCGGTTGTCTCGAAAACACGCGATGTAGCCACCGACGATGACACAGCAAAGCGGCAACGCCCGTAGGTAAGTGGGTAGGTGCCAGTTACGTCGGTTGACACGTAAGTGCAGTCTGCGAGTCCGTTGCGACG
GCACCATTTCTAGCATACCGTAAACTGCGTGTACGTGGCGCAGGGTACATCAAGGTCGCCCTAGCGTACCAGGGCAGCAAGTATGTACCTTCTGACGAAGAGGTGACTACCACCGTCGCGTTTGACGGCGTAATGGCAACATCCC
ACCGGGCAACTGCTTGGTACTTCTGACTGAACAGCAGCAAGTCTTTCTGGAACGGGACAGCATACCGATAAGCCGACAGGAGTTAGCCGATGCCGCCACCTCAATCGGATCGCTTGCCACCACAGAGGTAACCGTCGAGCGGAAGAA
CCGCGCTGTGTTGATGCTTGCCTCATGTTGATACTCGGCCCTCAGTATACCAGACGGCCCTGGTAGCTGCCTATACCAGTGATACCATTCTGTACGAAGTACGGCAGCGGGTACTGTCATCGTCGCCCTGCGTATCGCCCTCGTACG
TCTGGTCGTAATGCGGTACCGGCGCTGTTAGGGTTAGGGCGCAAGGGCATGTTGGCTAGTGTCTGGTGAACCGTACTGGCCACTTCCGCCACGCTGTTTCCGGAAGGTGACTTGTAGTACGTCGGGAACGCTGTAAGTGC
TACCGCGATAACCAGACCATCTGCTGTGACGGCAGACGGCAGACGGCAGATCGCCAGACGTAAGGCAGCTGCCCTGCCCGACACGCCGACGTAAGGAGTGGAGGTGGCCGTGCCACCGTCATACCATCACGCGGGCGTGGATCGATA
GAACGAGCCATACCAGTACGCGATCCACCTGTGGTGGCCGTGCCATTGATAAGTGCACAGCTGTCTGCGATCGCCTCAGGCGTAGACGATTATCGGCCCGGTAGCAGTTGCTGGCGCGTGGTGGTTCGTTATGACGCGG
GCGAAAGCTGAGTCTGCCACGAGAAGTGTACTGTTTCGAGAATGTCGCCGTTCGATGTAGTAGAAGCCGACACGGCTAGGACTAGGCCAGCGGCCGTACAAAGGTACAGGCGTGTCTAGGTTAGCGAAGACAGATCAGG
CCCAACTCGTCATGCGAATCGCGTACGACCGCTGGCGTCTGCAAGTAGGGATTGGCCGGCAGTGTGAATGGTGCCAGGCTCCGTGTACAGGCGCAGCACCCCATCAGCCGTATTCAACACACCAGTACACGTGAGCCGGC
AAGGTCTGCATCGAAACCAAGCACACTCTGACGGAAGTACCAACGGTGGCAGTGTAGGAGCTGCCGAGCCATGCACCTGGACGGCAGCACCCGGTACGACATCCGACAGATGTTCTTTGCGCGTAACTTGACCGTCGAG
CCGTTCCGCGCAATCTGCTGGCTCACGCCTTGAATCTGAGACTTCTGCGAAGACTCGAATGCAGCCATGGTTACCCCTCATAGCGTTGCGCAGCTCCGGTAGCGCCGGACTGCTTGATTGTGTAGCGCATCGGCCAGATGCTCTTG
CTCCATGTTGCCCGCGCATGACGCGTAGGACTGCCAGAGCTGTACGTTTTGCTCAAGCCGATGTCGTTACGTAGATGGCGACCAGCGCCGAGAAGCAGGACTACTTTCAGCGGACTCGGCGAGGTGTTAACTCCAGCGTTG
AATGAGCTTGCCTTGTCTGACGGGAACACGTAGCTACGGTTCGCTGATTGTAAAGCGTTCACCGCTGCCGTACGATGCCGTACTCGGGTCCGCGAACAACGACAGCGTATCCTCCGCGACATCGATGTAGCGTTCCGATCA
GGAAACAGCTCGACGTGGTGATACGTGTTGAACCACAGCCGGTTGCAGCAGCAGATCGATCTCAGAGTCTGCGGAAGAATTACCGCGAGCGTAGGAGACTTCGATTCCAGCGATGTACCAGGATGTTCTCTAGCTTCGGCAGA
ATTTGTTGACAGCGTTAGCAAGTCCATGGAATCCCTATGGTCGAGACAAAAAAAGCCCGCAACCCTGTTAAGGATCGCGGGGCTGGGCGAACTAAGCGGGGATTCTGCTCCACCGCCGACGAACCTACGTCTTCGATTAGT
CGCTGAAGATGACGCCAACGGCGTCCGGTCTGCTTGGCCGACCGTGTACATTTGAAACGAGTCCAGGTACGATTGAACTCCTTCGGGACTCCACACTTTGACCGTATGCCTGGGCTTGACGGTACAGGTGCTTTCGCGGAA
GAACAGATCAGCAGCGCTTGGCTCTGCGCGGACAGCTGAAAGCCGAGCCAGCGGGTGCACACACCGCGGTCGGGAAGATCGGAGCCTCGATACCGCGCACGCCATTAGGACCGCGATGCGCGCTGGGCGTAGTCGTTT
GACGCCGAGCTGCTTGAAGTCCACGTTTCATCAGTCTTGTGCTCCAGCAGCAGTGAACGCGTCCGATGATACGCGTACGCGTCCGCGAGGCGCCGACCGAGGCGGCGTTCAGAACTCAGTACGACTTCTTGTGGTTCT
GGACGATGATGTCGGTCTTTCTGAAGCCGGTGAGATGCGCGCCGACTTCCACAGCATCGTCCGATCGCGAGTGGCGCTTGGTAGCCGTCATGACAGCGCTGATGCCCGATGGAATGCGCCAGCCAGCGAGGCGGCGGAACG
TACGCCCGCACTTGATGAGCTGAATCACGTGGGCTCTGAACAGAGATAGCGTGTCCGATGCGTGTCCGCGCGTACTCGCTCTTGAAGTCCGCGGAGGTCAGTCTGCTTCCAGTCAACCGCGTGCGGATGTAGCACGTGGTA
TCGACCGTACGATGAATCTCTGTTTGCATGCGAGCCGAGTCAAGCGTCTCGCCGAGCGGCGACCCCTCACAGCAGCCGCGCGATGCGGTGCGCGGCCACGTTGGTGGTTCGACCGATTGTAGTTCGTGAGGCCGAGG
CGCGGAACAGCGACTAGCGCGGAACGAACCTTCAATGTGCCCTCGTACGTTCAATGTGGATGTCGCTCCGATCGCTACCGGCCACCAAGTGCGGGTGAGTTGACCTTGTATCTACGTCTGCCATTAATCTCTTGTGGTTAG
GGTTACAGGCCATGTTCTTCCAAGCTGTCCGCGCGCGGTAAGTCAAGTTCACGGTCCGCAAAGTCCGACGCGTTCGCGTTGAGCTTAAAGACGCTCCGCTTGAATGCTCCTTGACAGCCCAATGGTGGCGTCAAGTGCCTTCCG
CCAGCGGACGTGGCTAGGGGATCGCGCGGAAGCGATCCGATTGCTTCGCGAAGTGCAGTAGCGCAGCACTTGCCTCTTGTATCTTCGCGGGTCCATGGAGTTGAGGCCATGGCTACGAACTCCTTGAAGTATGCCGGTGCCTTT
GCTTGAATACCGCCACGCGCCTTCCAACAGCCGCCACCGCCATGTCTCGATGGATTAATCAGCAGTCCGACTGCGCTTGTATCTTCGCGGGTCCATGGAGTTGAGGCCATGGCTACGAACTCCTTGAAGTATGCCGGTGCCTTT
CTTGAGGTACGCTTGTCAACAAGGCCGCGTCCGCTCGTATGCGCGGCTGCTCACTGCAGGTTACGTCAGGTTGCGCGCGCCAGCGAGAAGCAGCGAAAGCGCGCTAGTACTACCGGTTAGTCCGCGCTCGCAACGGC
CGTAAGCGTCTGGTCTTGGATAAAGCAGGACCGGTTGCGCAGCGGCGTGTCTCACTTTACCCGAGTCCGTTGACGAGCTTCCGCTTCTTCCAGCTTGAATGCTGCATACTCGGGATCAGCATCCGCGCTGCGGGACTGCT
TCCGACCGGGTCCGCGCGGAGGTTGAGCGGCGTGCCTGTTGCTGTTGACGCGGCGACTGGGGAATCGGAGCCGGCGTGCAGTACGACTGCCAGCGTACTGCGTACGCGGATACAGCTTGGACGATCGAAAC
CGCGGGGACTGCGACTTGTCTGCCATTGTGTGGCTCCTTGTGTTGGCACCGGGCAGCGAGCCGATGGTGTCTGTGCTGCGGATTGGGTAGCGCGGAGTTGAGTGTGCGCTGCTGCATCTGTTGTTGGCCGATCGAACT
GGCTGGGCTTCTTGTGCGCGAGGATGGTGTAGTATCGACAGAGGCACCTGCGTAGATAACATCCATCAGCTTGCCTGGTCCACGCGATCATCGATGACGTTGAGGGGCTTAGCGATGGTGTCTGCGCTTGGCGGCTTGGAGTAT
GTTTGCAGCTCGATGCCGCGACTGAGGGCGGGAATACCGCGATCAGTCAAGCACCAAGTATTGACAGGATACTTCCAACGCGTCTGGTCTTCTTCCACCACAGCAGTGGGCCAGCGGAACCTTGAATGACTCAGCCAGTGC
GCTGTACTGCCACCAAGAGCTTGGTTAGCCTCTGCTGCTGCTGGCGAGTTCGATGACGTTGACGCGTTCAGCGTCCGCGACATTGGCCGTGTACATGAAGGCCCGCAGAGATTGTAACGTCGAGGAGATCACTCCATCATCGT
TGAATCTTTCGCGTCGCGGACTCCTGCACTTGGATCGAGCCCTGCGTGCCTGACGATTCGCCAGTCTCAGCGTGTTCAGATCGTCAACGTCGTTGCCACTGCCGGGTGTACGAGGTTGAGGAACCTCATGGCCGAGATACCATA
GAGCGTAGCGCTTCCGACTCATCGTGAATTTGGCGAAACCTCCGCGTAGTCTCGACAGTCTCGGCCGTAGTGTGCGCAGGAATTAAGGACCAGTAGGCGCTTCCAGGGGCGAGAGTGCAGGGTACTCACCGGGTGTACC
TATCGGCATGCACTCGATCTTTCGACAGCAGCTACTTACGTCGCGCTGCCATCGTTACGCGTGAATGCGAGTGTACCTCGACGTTGTTTTGAACCTTGCATGCGGACTTGTTCGGGAACCGGTAGCGAGCATTACCTGAAT
CTCACGCGAACAACCGCGCAACGATTGAACTCACGCAAGTGCAGTCGGCCAGCTCACCTGTGCCGTGCGCGGCGACGAGAAGCACTGAAGGCCGTACGTTGATCGTGCCTAAAGTTTCGAGTCTCGCTTGTGAGGCGAGTTGCCCGT
TACGATCAAATGCAGGATTGCCAGCGTAGCTGGTGTAGCTGGAGTTCAGGAACACCCGTTGCGAGGCGTCCATTTCGAGCTGCGCCAGGGCGGACTGAAACTCGCTCATGTGATGCCCTTAGCCTTGGCGTGTCTTGTAGCTGCTT
CTCGGTTGATACCGAAGAATGCGCGTTACCGGGAAACAGAAACCCGCGAGCTTGTCCGAGGTTTTCACGAGAAGCGCGCAATCTCTGTTAGTCTCGTGCATCACTTACGCGGTCCCACGATGACAGAGTCCCGCATGAGTT
TCGGCAGTGTCCAGTGCAGTACTGCCGCACTTGAAGTACTTGTGCTTCCATACCTGTCGCTTCCCTTAGACGTTGACGCCAAAGGTGGAAGCAAGACCTTGCAGCGATT
GCGCCGCTTGGTCAATGTGTGACGAGCAGCGCTACCGCCGGGTTACCGTCCGCGCTTGGTTCGCTGCTGCTTGTGCGCAGTGCAGGAGTTGCGCTTATAGTTGCGGTGCTGCTCGCGATCTGCTGCTGAATCTGGTTCGCT
TGATCTTGTAGCCTGCTGCTGTTGGCGCACCGCTGTCGTTGAGCCGATTGTGTCGTTAACCATGAGACTACCTTCCCATGTCTACACCTCCAGGAATAAGATTGTTAGGCGCGAACCCTGCCCTCATGTAGAGGCGTCTG

AGTCCGGGACGCAGAACACCGTTGCCTGTTTCGATCCCAGCGCAGGAATGAACCCGTGCCAAAATCTTGAGCGCTTCGGTGTACGTGGAGAAATTGCGAGTAGGGCTACGCCGATCACTAGCAACTCAGCAAGGTAAGTGTTCGGGTTG
CACCACGACGCACCAGCGCTGTACAGCACCAGCAGTCGCGGTCATTGATCCAGACCCGCTGGATCGTGCCGCTTCGATCTGGCGCAAGGTCACGCAACCTCAGCACCTTGTCCATGTGGTGATCCTTGTTCGCTCCTAGATGCGCAG
TCAGCTCAGAGTGTGCATCTTCCAATCTTGATCGCCACGCTTGTATGAAGAATCCTCACTTCGGCACCCGCTCAGCAATCCAGGTAATCACCAGTGTGCTTCTAGTGTGGCGCAGTGTCTGCTTGTGAGATTTTCGCAAACACC
AACTCGGGGAAGCACCGCTCAAAGCATCGAGTTGCTGCTGCGTGAAGGTTACCTTGTCTCGGATCGACGGGAGCTGCGGAGCAAAGCCGCGCTATGTACGGTTTCAGCCATGTAGTATCTCCAATCTGGGGCATTCTAAATTAGGCTT
ACCGACAACATGGTAAGGCTTATGTACTACACTAGATAACATAACTGTTACTCTATACTATACTAATTGTAACCGCTATGTACTGTGCTTGTCTCGCAGGTCGGTCTATCGAACCTCCCCGCTCGCGCTTGTTCGCGCTTCCACCGTG
TGGCACTAAACTAACAGAAGAAGAACTACTAGTAAGTACATCTGAGAGGTTAAGATCACCACGCTTAGGGAATCTCTGTAGTCTACTCTCCACAAGAAGTCACTAGTACATCATGTTCTGCATACATACGTACAAAATTCCTCACG
CAGTATCCTGTGCATACTACTTACAGAACTAGGGTGTGTACCAACGAATCATGGATACCTACGAAGGCGTGCCCTGCTTCTTATTGTAAGGCAGTGAACGTGAGTACTAGTACATTAATGCATGCACGAAGTTCGGCGCTATTGCGT
TCTGCATCTTCAAGGATTAACCCATCGCGTTCCTCGTACATTGTGATACGCTCCACTCCGACGTAGACAAGCGTACTCGCATGAGTTCACCTCAGGGTAGTCATGTTGCACCTTGAAGCCGTCGGCGTGTCCACTCCATGCGTGAGC
CTTTGGTACTGTACGTGTGGCTCCTTAAGCCAGCGCATTGCTTCGCTGCTGCCGCACTGCGTACTCGATCCGCGCAAACAGCGCTTTCGACCCGTAGGTAAGTACTCAGGTCGATGTTGCGCTGGCCTTCTCTTGTGTCCTCTGTCGCT
GCAGACCTCACCTCAAGAACTCTGCCGTACCGCGCAGCTCGCGCCATACACATACGTATGACGGGCTTCTTTCGCGTACGCTGAATCTGTGCGCCAGCAGAAGTCCCAGCAGGGTAGGCTTGTGCGCCTGATCGACTCC
ATGGCCCACTCCCAACGTGGCGGTAATGTCTGCTTCTCATCGCCGCGGCATCGAACAGGTTACGTAATTGCCGCTGTGAGTGCAGCAGCATGGCGCTGAAGTGTGGAGGCCGAGCAGCTCGCGTCCATGTGGATCGGGATGC
CCGTCTCGTACAGCTCAGGGTTCGACAGCGCAATGCCTCCGCGAGCTCGTATGCGGCCATAGGGCACCATTGGGCTGTCTTACCCACACCCAGGACAGTCTCCGGGGCGTCCAGAGACGCTCCAGCGCTTCCAATCGATTCT
ACGTAGGCGACCTCAAATGCGGCCGGCTTGTCTAGCCGAGCGAGTTCGCAATGTAACACGAGCCAGAACAGCCGTCGCGGCCAGCGCCGCGCTCGTGGAAAGTGCAGCGCAGCCTCGCCACGTGCTGCGCTGGGGATT
CGGCGTGCCATTGTAATACCAGCGGCTCGGGTATCCATCATACCAGGAAACAGATCGGCTGGCTTGGCGTTCGCGTTCAGGAAGCCGCGATCTCCAGTACGTGGCCCTTCCACTCCTTACAGCGGGTGAATACGCGGTTGCTT
CCGCTTCCACCGGTAATGCCTCAGCTCGGCTCAGATGCGTGGCTTACCAGGATCCGGGAATGGAACAGCGGCTTGGCGGGCTTCTACGCGCGGCGAGGCCATCGTGGCACCCCGCGATCCAGGCCCGCGCACGG
CTCGCAGGGTGGCTGCACTTGAACGCGCTGCCCTGGAGAAAGTTCGCGCACTGAAACAGAGCGGCATCTTCTGCGGTGAAGTGTGCGGGATGCGCTTCCGCTGAGCGGTGCGACCTTCCGAGTTGCATTAGCGGGAAGT
GGCCTGTGCGCGTGGCTGAGGTATCCACCGTGTTCAGGTTGACACAGGGCAACGCTCGAAATCATCGACCCGCGCCCGGTCACCAAGCTATGCACGTCTTGTGATGATGAGTGAAGTACTGCGTACGTATCATCGAGC
TTGTACGTGGGCACACAGTCTTGTGCGGAGCAGGTGATAAGGCCGCTTGGTAGCAAGCATGCACTCCGAATTCGCGACTTGGCGACTTGGCGGCTCGGAGTCGTAAGTCTGCTGTCAAGTCTGCTGTCAAGTCTGCGCTTATAACAGATC
GTAGGCCACAG
AGTACAAGCGACGAGATGCCGTAAGTCTTCTGAGCGTTCGCTTCACTGTGCGTGAATCTTCCATGTACATGGGTTCACTTCTTGTGCTTCCATGATTGCACTTCCAGTTCAAACAGCCGGCCGATGTGCATCGTACGCTTGTGAGC
CGTAGCACTGGACTTGGCATAGACCCATCTCGCACAACGCGATGCACTCACGAATGGAGATAAGCGCGGCTTCTACGCGCAAGCCGCGCAGCCAGTCTTGAAGTCTCCGCGGTTCTCTGCGTCTGATGATCGCTTGTGA
GTACGCGCACCACTCTGGTGCATCGAAGCCGCTAGCTTCTGTGCCCTCGTGGTGTGATCGCCGTTGCGCGCAGCTTCCATAAGCTCGCGCAAGCGCTCTGCTGCTTGGCATCGAAGCAATTCGTAGGCAAGCTGGGCGTCA
CGGGACATTAATCTCTTAGGCGATGTGATACCGTACGAGCGCACCACTCGGCGCGCAGTGGTTGGATTGCGTTCGCTGACTCGGCCAGTTCACGGACGATGGTACGGGCCACTCCGTGTTTCCCGTCTCCATCGCGGCCATCA
CTTGGCGGCGCAGTTGACCCAGCACTTCTGTTTTCTGCGTAGGTATCAGGGCAGCTCGAGTAACACGACGGTGGATGCGGGCCGATTACGCTTCCGCTACTAGCCAAAGCGAACAGCAGGAACAGCAAGTAGAACCGGACGCG
AATGACGCTGTGTACCGGGTGAAGCAGTGGCCCTTAGGAGTTCGTTTATGTGTTCTCCTTAGTTGACGAGCAGGCGGCGGCTTTCGCGGGTGTGGATTGGAAGCGGGCGGGACCATTCCGCCACAGTCGCGCATTG
GTAGCGAGATACTGGCCGCTGGCGGATGGCGCATGCCCTGCTTGAAGTTCATGAAACCGCAGCGCGGCACTTGTGGATCGGCAGGTTGTCTGCTGTAAGTCTGCTGTAAGTCTGCTGTAAGTCTGCTGTAAGTCTGCTGTAAGTCTGCTG
CACACGCAACTCAGTACAGCTTCCAGCGAGACGATCTGGCAGTTGACTTCTTATTTCTCCAGGCTTCCGGGTTGCCCTTATGCACTGCGACACAGCTCGAAGCTTGGAACTTCAAGTCTGCAATGCGTACGCTTCTTCCGGTG
CAAAGGTTGTCCGTCAGGAACTGAAGCGGTTGCTGGTGAAGGCGAACTTCTGCTTCCGACGTCGAGCGTATCGACAACCTAGGGCGCAGGGCGGCGCAGACCATCAGGATGAAGCGTGCCTTTCAGTCTTGTGATGTCGAAGCG
CCGCGCTTGTGTCGACACGATGTCTGCTTATCCAGCAGCGCATGCAACGCGCAGTAGTTCTAGTGTGCTTCTGATGTCGTCGGCTTTCGACTGCTTGTAGAAGACCCGGCTTGGTGCAGCCACTTCCGGGATACCGACAGG
ATGTACCAGTCCATCTGAATCTGTTTACGCCGACGTTCTCCTTGAACGTGCGCCACAGTACGCGAGGATTGGCGTGTCTGATGTCAGCGTCAGGATCTTTCGCGCTTGTGTCGATGATCTTGGTATGTCGCTCCTTAAATGTGGT
TGTAAGTCCGGGAACTTGTTCGCGATGTAAGTCTCGCAGCAGCGGCTTGGCCCGACACGAGCGAAGACGTTCTGTCGCGGGGCTGAGGGAATGCGCCGAGACTCGTCCCGGAGAACGTTGGCATTAGCATCGTCTCCAGCCACGCT
GATTCAGCGTGAATCGTCTCCCGCAGATCGTAAGCGGATCGCCATGATGGAAGTGGGTTGGTTCAGTGTACAGAAGCACCTGCACCGTGTAGCGCGGCACACTGTGGTACTGAAACTCGTACACCTTCTCCAGCCCGGATCCTCT
GCGTACCTTCCGAGTTTCCGACTGACGAGCAGCATTACTTGGCCGAGTTCGCCAGGCTTTAAACCACCGCCACACGGCAACTTCGCGCAGCTTGCCTTGGAGCGAACCGGTTGACGTAAGTCTGTAAGTACTTCCAAATCCTT
GGGAGTACGGCAAAGTAGACATCGCGGCTGCCCGCCACAGATCAGCACCTTACGCGCTGCTTTTCAAGTGTGATAAGGTTGTGATGTCCTAAGTGTGCTGCTATCATCCCTCCGTTGGTACGCAATGCCTTGGTGTCTT
GATCTCAGCGCAGCTTCTTCCGACGAGATTGCGTTTGTCCATCGCTTACGGCGCGCTTGTGCTGCTCAACGTGCGTGGGTAATCAGGCCGATCCTGGCGCTCGTATGCTACGCTACAAAGTGTTCAGATACTGACAGCGCAG
CCGGTTCGAAGGTTAGCACCCATGAGCCGACACGTTCTTGTGCTTCTGCGGCTTGCACGAGCGATGCAACACGCGCGAATCTCTCCGTCACGTGTTGTGCTTACCACGCCCTCCTTAGGCAGTGATAAATCCACCGGG
CGTCCGAGATTGCGCAGATCCGCCCTGCACGATTGAAGTGCCTTACTTCCAGGCTGGCATTATAGCGGTGAGAGCTTGCATTCTCGGCGCGCTTTCGTTGTGTTATGTTCCCTCAGATTGCATCAGGGTTTCCAGCCTCGT
CGTTATCGAATTCGCCCAGCAAGCGTTGACTTGTGCTGGTTCGAACAGTTCGCGGTAACGCGATCATCGAGGAACGCGCGGTTTGCAGAGAAAAGGTAAGTACTTGAAGTACTCCACAGTGTACCAGGGCCAGCGCAGCA
GCCACAGCAGCCACGCTCGGGCAGCGGATTCTGGTGCATAGCGCGGTACGCGTGCATACCGTGTGACACCGCTCGATGTACGCGAGCGGGTGCAGCAGTTCATACGCGCCATGAGTCCGACTGACTTGCATCGAGCTTGAAGCA
AGCCCTTGAAGTATCGCGGATACCCATCACCATCTGCGCCAAAAGAACTTGAAGCAGCGCGGAGCAGCTTCTGTTACCGCTTCTGCTCAGCGATCCACAGCTCACCAGCGGATCAAGGGCAGCACCACACCTTCCCTATC
TCGTAGTACGGGAACGGCTCATCTCAAGTCTTGTGCTGAGCGAATGACGCTTGTGCGGAGCTGATACGCGCGGATCATCATCGCTATCCGCTCGATGATGCTCTCATTGCGACTGTGAATCCTGAAGTCTGCGCAGATC
AGCGATAGCTTCTCGCAGCGCTTGAAGAGTGGCGGCTTGTCCGCTTGTGCGTGGCCCTGTTACGCGCTTGTGAGCCTTGTGCGGAAACGCCCTGTCTTGTAGCAGCGCTGTTGTGAGGTACACCTCACCAGTGCAGCACTCCGCCA
GGAAGATTTGCTTACGCACTTGAAGTGAAGGCGGATGCACTGTCTTACGCGTACCGCTGCAACGATGTCAGGCCATCCCGTGCATAGTACACCCGCGCGGAGTGCCTAAGTGCAGGTCGTACCAAGGGCGT

CAACATCGACGCCGTTTATTATCATGACAAGAACTCATGCTCCCCGGCGTCTGTAGAATACTTGTGCTGTCAAGGCTCACGAGGAACCGATGCGACATTGCGATTGACTGAATCGCTCTGCGGAACTCGGCGTAAGTAACTACTTTGC
CTTCTCAGTGAGCTGAACAACGGCTTCGCAAGCTCGCTACTTCTCTGAACGATGTTGAGTGTGTTGTTGCGCAACCGGAACTTGTCTGCGCGGCGCAGCTCTGAACTACCCCGCCGACGCCAAAGTGGTTG
CTGGCAGCAACGTCGGTTACGTATCTCGGTGTGTGCATGTCCTATCTCAAAATGGAATGTCGTATCCAGGCACGAGCCGCACAATGAAGCGGCCGCTCTAGCGCGTCCAGGCGTCTGTTAGACGGTAGGCGGTACTGCCACAGTAG
GAGCAACCTGCGGCACCGCCGGGACGTTTTCCACCACGGTACCTGCGGAACGATGCGCGCAACACGGCCGCTTGGCGCACGCTAGAAGGGGATGCGATGTCACAGTAGAGGCTGGATACTGGCGTAGGCGACGGGGCCGAGT
CGGGACTACCGCAGCCACGGCAGGTACGCCAGCCACGTTTGGGACTACGGCTTGCGTAGCGGCCGAGGTGCCGTGCCACGGCGACCGTGGGGGTAGTGCCACTGGGCGATCGCAGCGGCATGACGGCCGTACGGCGGCTTC
GTCTCTGCGCACCCGCTTCTGCGGGGTGCCGACCGGAATCGGGCGGTTGTTGGCGATCAGCAGAGCCTCCAGCGCGAGCCCTGAAGTTCGGTGCACCGGCGATCTTCTCTGTTTCCAGTTCCTGACTTGGACTGGCATCGTCGGGGTGC
CCTCGATGTACATGGCGTCCCACGCTTCCAGCGTCGGCACAGCCACGAGAACAGGAACAGCGACGGCGCGGGGATGTTGTAAGGCGCACCGGTTGCCATGTCGATCCCGGCTCGACCTTCTCGATGTACGCGGCTTCTCGCCG
GCTTGCCCTAACGTCGCGATGCTTAATCACGAGGATGTACACCATTCCGCCAGGAGCTGCGCGAAGTTCCTAGCTGCCGAAGTAATTCATGTCCTGAACAGCTTGAACGCGCGGGCTTCTCGTTGCGGCTGCGCGCCAGATCGTAC
GTCTCGATCTCGCGGGGTGCCATGTCGTTGACATAGCCGGGGGAGAACATAGAGAACCAGCTGGAACATGAGCGCCGGTCTTTCGGCTTCCCTGGTACAGTTCGATGTGCTTGCCTTCTCGACGTATGAGGTGAGGCGGGCA
AGCGTGGCGCTTCGGGCCACAGCTTGTCTAGTTGCCACCGCCGCTTGGCCCTCGTTATGTCATCATGCACCTGCGAGTTGTCGGCCAATGCTGCTACTTGTTCGGGGTATCGTATCGTTTTCTCTTACGTGGATTGCTGT
GAAAATTCGAGTGGCCCTTAGCCCTTAGCAGAGGTTTGACAGATACATCAGTGCAGCTGCGGGTGAACGGCGTGAAGTTTTCCGACTCATATCGTTCCCTTCCGCTTTTTGCGTCGCCATTACGTGGCCGAGTAAGGCAT
CACGATGCTGGTGGGCGTCATCGTCTCAAAGCCCTAAATGCGTACCCTTGTGAATCTGTCCGAAGTCGAGCAGATGAGCAACCTCAGCCAGCGGAGGTCAAAGTGAAGGAGCTGAGACATCGGGGGCTTCTGCTCAGCAACTCAC
ACCGAGTGCCTTCCTAGGGCCGGGTCTGTATACGTTGAAAACGTCAGCGAAGCGCCAGATTGCGGGCTTACTGTAGCGGATTGTTGTCTTGTGATCGAGTGTCTACTTCCGAGACTATGTAGCGCCCTTGCAGGGACCGCCG
TTCTGAAGCTACACCATGTTGCTTTGAAGCATACAGCATCGCTACTTTGAAAACGTCATGTCCTCCTATCGAGAACCGCCGCTCCAGTGTCTTCTGTCCTGTTGCGGCCAAGTCAAGCAGCAGAGGAAAGGTACGT
TGAGTTGTAGCCGACTTCTGCTGAAGTATTGCGGCAAGGATTCCATGATGCCCTGACGCGCAGCATACCGTGTCAAGCAGCTGCGATGGCAATCGAGATAGATAGCGTATGAGCCGTTGATTACGAACACGCGTCCGCCGA
AGAAGTCTTAGCGATCAGCCAGCAATACCAATCCTGTGATGCCCTGGACGAAGAACCCGACTCGCTTGAATCGGATAGTTACGATCTGCGTGGGCTTGAAGTGCATACCGTACGCGCTGTGCTTCCGCCAACAAACGTCGT
GATGTTCTCGGGTACTGGCGAACTCGTAGCAGTCCGCCCTTGTCTGGTACAGCGCGACCGTAGACCGTCCAGTTACCCTGTCGTCTGCTCGCGGTGCATGGTCTTGTCTGTTCTCGACAGCAGGAAACACCTCGCGCTGTAGT
ACGCTCGACTTCCGGGAACAGCTCCTTCTGTTGGCGATGAAGTCTCCGCTTCTGATCGGCATACCCGACTGAAAGCAATACCCATCGCGTGGCAGCTACTGATACGCGAAGCTCGCGGTTGATGTCCGATCGCATCTGCTT
TACTTAGTGTCTGGGGTGTGACTCGTCTTGCATTTGCCCTTACCAGCTCGTAGCTCTCGCCAGCTTCTCGCAGGCGCATGCAAGTGCATGTCGATGTTGTTGACCAGCGCAATGATTAGGTTCTTGTCTGTGAGAACCGCCCAAC
GTCACAATTTAGCGCGCTGTAGTGCATCTCGACAATGAATCCGTTACGGATGCCGCGCTTGTGTTAGCCAAGCACTCAGCGTAGAACGACTGTAATCAGCCCTTGGCCACTGCCACAGCAGCCAGCCCTCGTGTGTCACCGGA
CTCGAACATTTCTGACGCGGATTGGTAGTCTCCCTGTTCTCGCTTGTGCGCCGCGGGAAGTTCGGAAGTTAGGGCGGTTGAACTGAGCCGAGTAGTCCGGTGGCCGTATGTTAGCATGTGATGACGATCGACAGCGGG
GTCATGTACTGAAGCATGCCGCTGTTACGCACATTACCATGTCGTACTCGTGGCGAAGGTAGTACGTGCCGATGTCCTGTGCGCTTGTGAAGTGTTCAGGTTTAAAGAACTGTCGCACCTCGGGCGAGAAGTCTTGC
TTCACAAGGAATTCGAGCGGCTTTCGATGATGCGATACCCGGTACTCGTCTGCCAGCTTGCCTTGTGAAGTGCAGCGAAGTCCGCGCAACAGCTTGCATGCGTGGCTGGCGTGCCTCGCCACACATTGGTTGGGGTCTG
GTGTCTGCCACACTGCGCCTGCTTCCGATCGACTCGGCCACCTTGACAAGACCCTTGTTCGCGGACTTGTACCAGCAAGTCCGCGCAACAGCTTGCATGCGTGGCTGGCGTGCCTCGCCACACATTGGTTGGGGTCTG
CAATGCTAAGTGTCCGTTCTCGTCCAGAGCGCATACTGCTCGCACTTGTGATGCCGCGATCTCCGTGAGAGTCACTGCATCGGTCTTACCATAACTGGCTTGCATCGTGTGGAAGCGCGCACTCGATGCCGGTACTTGTGCGGACCGC
CGTAGAGCCACGCGCTCATGTGGAAGTGCCTGCTCTTTGAACTCGACTCCGCCGGTGTAGTCACTCGCCACTTGGCGAAGCAGCTGCGCAGGTTCCGATAAGTCTCGCCCTCCTGAAGTGGCGTGGCTGTGTCGCGATTGATG
AGTAGTCTGCATCCATCGGTAGCAGTTGAACAGCATGGCTTCCATCCGCTCCAGCGCATGTCACATGCCGCGCTGCTGTTACTGCTGTTACTGAGAAAATCTTGGGGTGTTCGATGTCGCCCGCTCGGGCGAGATCA
GGTACTCCAGCAGAAGATCAGGGTGCATCTGCGAAGTCAGCACACCCTTCTCCACAGCGCTTGTGCGGCTCCACCTTGTTCGCGCCGTACAGCGGCAATCTCGTCCAGCGCGGGTACGTGTCTCGCTGTTGGAGAGCAGGTA
GTGTGCGATAGCTGTACAGAACACCCGCCCGCGCTTGAAGAACTTTGAAGTTCGACGCTGTCGCAAGCATCCAGTCCAGTTGCAATGGCGCATTGTGGCAGAGCAGCAACACACATCATCAGGGATGGTAGCCATGGACG
CGAGTGGGCTTGTCTTTCGAGTCTTGGCAGGTAAGTGCATCGCCCGCTGTAAGGCGTCTTCTCGGTAGCCAGCGGTTAGCACGACGATGTTGTCGGGGTGGCGGGTGGAGCGGTAGCGCCACAATACGCGTGGTTCTCGCTCA
AGGTCCATGAACATTATTCGAGGCATCTGACTCCCTTAGTCTGCCTAACGGATTGTTGAGCACGTATGTTGCGCGTGCCTGCACTGCATGCAAGCGGCAACGCAACGCAAGGTGCGATGGCCGGCAGATCTCGGCAGTGGCGAT
GAAGTTGCCATTGTTGAGCGTGCCTAGCAAGGTGTTTTCAAGCGCATCCAGCCGACAACACTTACTCTTGCCTGGCTCCGCCGATAGTTCAGCTCAATCGCCACTTGTATCCAGATGAACGAGTTGTCCAGTTTCCAGCGCTC
ATCAAAGTACGTCCTCGTGGCACCAGCGTTGGCCCTAGCTTGTGATGGTGTGTTAGCTCGCCGAGTATGACCCGAGTAGTATTGAAAAGCGCAGCCATGGCATCGGCCGCTGGCATCTTCTGCTTCTGACTTATGACCGTGTGTA
TCTCATGCCCTATCTCCGAAACGTTTTGAAGCGGGATGCCGATAGCCACCTTACGATCGCGCATCATGTAGTAGAACTCGACCCAGCGCGGATGAACGCGGCTGGGTTAGCCAGATTCCCGGCCAAGCGCATGCTCGATACCGG
CGAGTTGGCTGTGCTCCGCTTCCAGGATACAGAGACGCTACCAGCTCGATCCAGCGCACCCCTTGGAGGCTGTACCCTTGTATCCAGTGTGATGACGCCATCTGCATCTTCTCGGTTTGTACTTACGCGAGCGGTATGAGCGCT
TGCCGGGCTGTACAGTGGTCCCGCTTAACCATCAAACCTCGAATCTCGTGAAGCGCGTCTTGAAGCGGTTCTTACATCTGCTCGCTTCCACAAGGGACATTCCGGGAAGGCGCAGCGGTACGCCTAGGCCCTCGGCAACT
TGCGCAACTTTTGCACGTAGTACGACGCGCCAACCGTCCCCCGTATGGCAGGGGTGCGGAGTCAAGCAGGATGAAGTGCACCTTAGCGTGGCGAGGCTTGGGGTACGCCCTTGAAGAGCGTACCATCGATACGTTG
TCGTTGAAATTGCCGTTACGATTACACCGCAATCTAGGCGAGTGCATGATGCGACCCATAAGCTGTTAAACGGCTTATCAAAGTGGCGCAGGTTGTGACGACCTTGTCCGCGTAAGTGCAGGAGTACGCGGCTGCTCCCTGCTCATA
GTCGGCGTACACCGCGCTGTTTATCGGCCGGGTACGTGCAATGTCGCGCAATCTCGTCAAACCTTGTATCTCCGCAACGCGGGCCACTTGTCTTGTGCTTGCCTTGGCCACGTTGTCGCTTATCAGCGCTTGGCCATGGTGC
CTCCGCTTAAATCCACGAAGCGGGCGCGCAACTCAATACCTACCCGATCCATTCCGCTGATCTCGATAACGAGTTGACCCAGAATCTTGCCTTGTGCATAACAGTTCCCGCTTGTCCACGCGCCACTGCATCTGGATACCCGAA
ACTGCAGTTTACCAGGATTCAACAGTGTGTGCCGATGGCGGACAGGATGATCGAGTGGTGCACCGGACCCACGCGCTTCCAGGTGCTGGTTCCATAAAGAGTAGTTGCGTTGTCTTACATAGTCTCCGAAACGCTTAGGC
GGTAGTGGATCAGCTTTGCCGGTAGTCTCGCACCGTCCCGGAAACCTCGGCCACGACCGCGCTTACGAGCTTGGACAGCGCGCCACACAGCGTGGCGATCTCGATGCCGTTGCCGTGCTGATCTCGCGCGGTCATGTACA

GCGCCGACGTACAAATGCATAAGGGCTTCTGGCGCATGCCACATACGGCAGACTCATAGTTGAGCCCCACAGGCCACCGCTAGTTAAGAAACAGTCGTGCCTCCAGCTACAGGGCCACCTGAGCCGATAGGGTGTGCCGCCGAGTC
GTAGTGTAGTGCTAGCGTCAGTCTCGGAAGATTCTGTGCCATAACATAATCCACCGATGAAGAGCCGTTGGCGATGGGCGGCTTGCCTGTTCTGGAACCCGGAAGTCGTTGAGTC

CAACAATGAAGCCAGAGCTGGCCCCGCATCGATCACCAGCCCCTCAGCCTGTTCTACATTAACACGCCCTGAGAGAAGTTACCGATACGTTACCGATCAACATCCAGTTAGAAACGCCCGAGAGCACATGCACACCAGGGTAGACGTT
ACTGAAGCCAATGCGACGGCTATTGCGGGAGATCGAAGCGTTGTAATACGCACGTTGTTACCGCCTCCGAGCTGCACGCCCTCCACAGTCATTGTCTCGAATCTCACGCCGTTCCAGCGGATGTCGTCAGGTTCCGACCCGATGAAGGCA
ACACCCACGCCACGCTCTGAGCCGGGAGGGCGTGTGCGCCGCCCGGAACCCGCAGACCAGCAGTTGGTGCCTCAATGTCCAGCACAGGAGCCTGCGAGCCGTCGAACGTCACGCCCTCATAGTATGAGGTATCCGCCAGCAGCTTGG
TTGAACTTCAGGAAGCGCACCCAGGAACCCGCCGGTGCACACAGTACCACGACCCGATTGTAACTGTCCTGTTGTAACGTCCTGTTGTTGAGGAACTGCCAGAGCCCTGCGAGAACAGGATACCAAGTGTGTTGATGGGTGAGAACCTGTAA
CCGAATCCGCTGATCTTCAAGTACTCGATCATTGTGCCCGCAGTCTCCGTCCTGCTCCGCTGACTGGGAGAGCCGATGCCGTTAGCGTGGCAGAACAAGTCGGCCGTGGCAATCTTACGTAGTAAAGAGCCGTTGACCACGATGC
CCTCCGCAAACGATGATATCGAAATCTTGATCTCGAAATGTCGTTAGCGTTGGTGTATCTCGACCCGCTCCCGGAAAGCCCTGCGCCAAACCCAGCTTCTCCGATTGTATGCCCTATACCACCCGCTGCTGTACCCGGA
GTTCCCACTTGAATAGACCTTTCGATAAGTCTGCTGCACACACTCGGTAAGCTGTGCGCCTTGGCCTTGAAGTACGTAACGTCGTTGAAAGTGGTACGTGCCCGCTCGTCAAAGTACAGCCGGGCTTGGGG
TTAGCGGAATCAGCTTGAAGCTGTTGGAAATTGACGCCCTGTGGCCTGGGGCGGATACCCAGCGGATACGCTGATGCGGCCCTTGAACAGTCTGCGAGCGTAATGCCACCTCTCTGCTATGCTCCGAAAGCCGACAA
GCGCCGCTCCAGTGAGGGGTTCTGGTCTTGAAGTCTCGCGACCCGATCCACACTGTACTGCTTAAAGCTGGTAGCGACACAGAATCCCCGTCATTGGTGGCAGTGCACAGGTTCTTGTAGTACGCTGCCATGCATGTCCAGGTC
GTGAAATACGTCGGTGATTCTGCGCCCTCGGCTACTCTGCGCGAGATAAACCATCTGGCGGAAGTTCGTATCCACTGACTCGTTGGTAAAGCTCGCTCCGAGAGAGTACACATTGATAGCCCGGTGATGCGCGAGGCGCGGTGACT
CGTACTGTCACGCCGTCGGCCACGTTAGGTGAGAAGCTGATCCGCTTATCCGTTGTGCTACCCAGCTCCATGTGCTGTCGAGCGTTTGTCAACCTCGTCAAAGTACAGCGAAATGTCGCCCGCTTCTGTCGCAATGGAATGTCCAG
GTAAGCCAGCGTCCGTCGGAGACGGCAGCTGGTACTGTATGCCATTAACCTCTATTCTTGTGGTGGCCGAGCCTTGAACGAAGTCAACAGCCTTAAAGCCCGCAGAATAGCCAGGATCGGCACAGCGCTAAGTGGCGTG
CTAGCTGCGCCACTGAAGTACCCTAGCCGTTGGCTACCAGTCTGTACAGACGGTGCATAGCCATCAAGCCACTAGCGCAAAGCTTGTCTTATCACCCGACACATGCCCCAGCTTCTGAGAGCAAGCCATAGAGCCCATCTGCC
AACTGCGAGCCAGCAGTTTGCCTACATCCGATTAGTTTACCAGTGTAGTACGCTATTGCGATAGCTGACAGCAACAGTAAGCGGGAAGTGTACAGCATTAGCAAAACCAAGCCAGCAAATCGTTACGGTGCAGCGTACCGGCTAGC
ACTTGTGTGCGGCCGAGCAGGAATGAGCGGAACGTGAAGATGAACTTGCAGACAGCAGAACTGCGCAAAGCGGGAATCTCACCGGTGCGATTACGACAGCAGACTCGTCCATCATCTTGGTACGGGACTGCGAAGCTGTTC
CACGTACCATCCGCCAGCGCTCGGTATTGCCCCATGCGCTAGCAGGTCTGCCGTACGTTGTCCAGTGTGCGGCCCTTAAGCCGTAGCGGCTCAGGACTTCCGTGTAACGCCAGGCTTAGTTTCCCTGGCAGCTTGAACAGAGTATC
GACAACCAAGTTAGCTGTTACGTTTGTGGTGTGGTGGATGAATCGCATTGCGTTGATACCGAACAGAGCTGCTACTTGTGTCATAGCTAGCATTACGTTGATCGCTAACCCGCGAGTCAAAGTTGCTCCATCTTTGGACGTAAG
GACGAATGCGAATGCTTGGTACGAGTTGCGCGCAAGATACTTGCAGGCTCTCCGATTTGCGTGCAGCGTGTACCTAGGAGCTGGCGGAACACCCGCGATCGTCTCAGTATTTCCCGAGGATGCTCAGCGGCTCCTAGGGCTTCT
ATGGCTTCTGAGGGATTACATGCCTTCCAGCGCAAAGGGACAGGAGTGTCTAGGGGAAACCCTAGGATTATAGGATACCGTGTGGTTTATAGGGTACTGTAGCGGCTCGCTCCCGCTCGCCGCTATCTGTCTTTTGTACAGGTA
TCTATGAGGGTATTGCTAGGGTACTCTAGTGTATCTACATGTATCACTAGGTAAGTGTAGGTAATCTAGGATCTACTGTAGTGTCTGTTGTATCTCTGGTGTATCTCTGGTGTACTGCTAGGTATCATGTTGTATCCGTGCATCGC
CTCGTTCCTCGGCTCGCCGCTACGCTTTGTTGCGCTTCCATCGTGTGGCACTAAACGCTATGGTGTAGACTATAGCTCTCATGGTACTAAGGAGATAGCATTGACTAGGGTAAGGGGTAAGGCATCTAACACTACAGGAATGACT
TAGTGTCTTCAAAGTACTCAGTACGCTAAGCTTAAGGAGTACTAGTGTGTAGATGCTAGCAGCTAGTGTCCAAGTACTGAGTACGCTAAGGCTAAGGTAAGTGTAGAGGCTAAGGTAAGGCTAGACGAGAAAGCTGCTGTAGGA
AGAAAGCTTGAACAAGGCTTAGGAATGAGCAGATGTTGATCCCAAGCTAAGCAACAAGGTGACGAGCAGTAGTAAACAGGCAAGGCAAGGCTTAAACAGCAAGGCTAAGTGAAGTGAAGTGAAGGCGGCTTACCTTAGTGTAT
AGGATTACCCTGCAACTCAGCTAGTGTCTAGTAGTTGACAGCAGTAACGCAAGTATGCTGTAATGCAGTACGCGTGTAGCGCAGTATGATCGAGAACGTTAGCGGCTAGGTTGCTTCTGGTAA GACACAAGCGCTTGAAGTACAG
CACAGCAGAGTAGGATGCAAGTATGCAAGTACAGTGTTCGCAAGTACCGGTGATTACAGCCGAGCCTAAAGCGAGGCGCTGAGTGTGATCCCGATAGCAACGGGGCGGGTAGCGAAGCGATACGCGGCAAGTAGGCAAGTAGGGCTTA
GCGGGTAGCAGAGTATACGAAAATTGCAAGTGTAGGCAAGTACTACCGCGAGGCGCAACCTGCTAGCGGATACGAGCCGAGACACTAAGGCGCTAGGCGCACGAATGGGCGCACCCGCTTAGGCGGGAATGGATGCGCCGG
GAAACAGGCATCTACATGCGTAGAGCTTCCGCCGATGGCTGAGACTGCGCTGTTAGCTACGATCGGGTAGCGATGACAACGGCTTCCCGGGTATTGCGGATACGATGACAGGGCGACAGTACGCGGCAAGGCGATGGGTAGTG
AATGGTGCCTGTTAAAGCGAGCAAGCTACGAAACCTCACCTCGAAAGAGGTGTTGTAATTTGGTGCCTCGACCCTAGGAATCAAGTCCGGCCAGTCTAGTACCTGAGTCAACGCAATGCGAAACTGCCTAGTCTGTTGACTACTG
GCCGGGACGAGAGAAGCGGGCAGGAAAGCAACGGCAGGCAAGGATGACGCGCCGGGCGACCAAATTACAAGTGTAGTACCAACCTGACTGAACAGGAGAATCATCATGGCAACCAAGGAAGTAAAGGAAAAGACCGCGCGAA
GCAAAGGGCTTCTCGCTTATCACAGCAAAGCCGAGCTTAAAGCGGCCATCAAGTGCATCGGCACTCGCTCCGACCGCTTACGCGGACATCCACCGCGCCGCTGAGCGTGTACACAGCGCAAAGCACAACGATCCGGACGT
GGCAAAGCGCTGCTGAGCGGATGGCAAGACGATGCGCAAGTGGCCATGACCCGATGCTGTGCGCATACGTTGCGTTCGCAACCGACAGCATGGCGCACTGGTGTACGTTGAAGGAGAAGCGTGAAGTGGTGCAGACTGAGGC
CAACGTTACGCGCGGATTGCCAGCCGTTTTGGATGTTGCGCCGGAACCGAAGTACGTTGCAAGTTCGATCCAGAAGTCGGTGGCGGCACTCTGCGCCGCTGAGAATGCCCTGGCGAACGAAGCACAGGACGCTACGCTATTAA
GCCCGATGCTCTGCGGAGCTGCGCAAACCTGGTCCCGCGGACGCCAAGTAACCGAGCGTCGATCATGTACATCTGTACGTTATGGCTGATCGGCTCGTTAATGATTGGCGAGCCAGTACGCTGAGCAGTGCAGGGCGCAAGCCATCG
CGGCCCGCAACAGCACGGAGTGCCTAATGTGAGTGCCTTCCGAGTCCGGGAAATTTGAGGTGAAATGATGGAACAATCATTGTGGTAGTTACCCAGCACCACGAGGGGCGTTATGGTGGCTGTGTCACGACGAATCGGATGAGCCG
TGCACAGGCACCCGCGCAGAAATGGAAGCGCTCCGCGATGACTTATGCGCCGCTTCCGGGACGCTGCGAGGTGCGGGAGGATCGATACGAAACCTGGCGGAGAAAGCGCCACGCGCTAAACAGTGGGACAACCGAGATTGG
ATGGACCTATGATACCGACTACGAAGAAGCGTTAGAGCTTCTGCGCAAAGACCAGCATCACTCGCAGCGCGATCTCAGGAACAGACTACCCGAAGATGCGCTCCGAGATGTCGTCAGCCGACTGGTATCGCATAGCCGTGCGC
TGTGGCGTACCAAAATTTGGTGTGCTGATCGCGACCGTTTTCGCAAGCAGGTAAGGGGAACTACGCCGCGCCAGGACCGATGGCCGCTATGGCCGATAAGGAGATAATGGTGGACCAACAGAACGTAAGTCTGCTGACCT
TCTGAACGAAGCGGGCTAGACAACCCGCTGGAGCTGGAAGTCGAGATTGTGCGCGCCGACGGCACACGCGTTGTTGATTTTTCAGCAGTTCGCTCTATGACTGTGGAGCAAATCGCCGGGAGCAGTGCATCCGTGTAACGCGAA
CGAGGTGTAGTGTGTCATTGCAATCTTACTCGTGTACGCAATCGCTGACGTGCTGTGTCGCTGAGCGATAGGCGCAACACGCCGCTGGAGTGTCCAGGTTATTTGGGACGGCGATTCTGACCGCCGCAAGTCTTACGACG

ATGCGTTAGCGTGGTTGGCCTGCTACCGTTTTCGGCGAGGCATTATCGATCGCACGTTTACGGCCACTACTGAGTGCCTGGCGGGCGCATCGCCTACTGACAATTTCAAACGCGCAAACACTACAGGAAAGACCATGCGTGCCTACAATTCG
TACAGCCAAGTTGCATTCGACGCGAAAAAGTTCAACATGTGCGTAGCGCATTTCCGCGAGGTGATGCCCACTGCGTGAGCAGTTCAATTTGACACGATCGTATCACCGGCAAGTCCGGCGCGTGCCTGGGTTTGCAGTTGCAGCAG
CGTGCGGCCTTATGTCGTGTACGTTGAAAAGGGCGAGTGTGCGCACGGCGACTACATTGAGGGTGACGGCCACGAGTTTGAAGACTACGCGTTCTTCGATGACTTGTGAGCAGTGGCGAAAACCTCGCAAGCGCGTGATTTATGAGCTTG
AGGCTGGGCTTAGAAAAGATGCGAATACGCTAATGCGCCTAAGTGCCTTCTACCATTAGTACGACGGGGAGCCGGACACTGCTAGGCTTATCTGCGCAAGACGCCAGGGGTTGACGGCCCGAGATACACCGGCGGTATGACTGGT
AGGAGGATACATGCAAAGCAACAACGATCGAACGCGTTCGAAAGCAACGCTGGAGCAGACGGAAGGGCAAGCGCTGCGTGTGAGCGCCGAAAGTCTTACCTGCTTCGTGAGTACGTTTGTGAGCACGTCCATCGCATCTGAATA
CGTTCTGCGAAATGCCAGTGTCTCCAGAATGGACCGCACTTGTCTGCTGCCCCGTTACCGACGTGTCCGCGAAATGCTGATCTCGAAGTAGCCCTTAGCCCGAGCGCGGTGACAGAATTGCATGCGCGACATCTCCGCGCAAGTCCGCG
CGTCCATTGCGGATTTGCGCGCATGATACCATCGCTACGACATCACGAACCGCACGCGACGCTCTTCTGAGTCACTCCCTGCAACGAACTTAGCCTCAGCAGCTTCGATGTTGGTGACGCTCCATTTCCGAGAGAAGTACGAAACGT
TCTGCTCCACTGCGTCAGCACCCAGCACACCCGCGCCTTATTTCGCGAAGTGCAGGTTGCGTAGCGGGTGTGCGTACGAAATTCGAGATTGCCTTCGGCACAGACGGGTGAGTGTGGAGTTACCTCGACGGATCACGTT
GTCCCGACTGCCAGTTCTCAAGAATTCACGTTGATCGTACGTTGAGCCGTAGCAGTTGTGCGGTTGACGACGCGCTGCAACAGCCCGGATTGCGCCGAGCCATTTCGCTTACGCAAACTCTCGTAGGCATACTGCTTGTGCTG
CGAGGTGTAACGAATAGCTTGGCCTTGGCCGAGCAGAGTACCCGAAAGATTAGTGGGCTCTCCACAAGCAGATTAGCGACCTCGCGCCCTCCGTAACCTTAGCATTGTTGAGTGAACAATCAACTTGGAAACCCGCG
AGCTTGTAGCAGCTCCAGTTACCGGATACTGCGGCTGCGAGCTGTTGCTGCGAACTGTAGGTGACAGTTCCAGCACATCACCGGTAACACGCTGCGGACGTTAAGACGAGTATTAATCAACTGCTCCGTTAGGGACAGCGCCTTG
GTCAATGCGCTCTTGTATTGGGCGCAATGCCAGGAGCTTACGAACCAACTCTACCATCTTAGACAGCGCATTGGTTGCACCTGCAACAGGAATCTGCGAAAGGTTCCGCGTGAACCTCCGTATCGCCGAGTACAGCCCGGCCACAACT
CACGACGTTACTGCCGAAATACTTGCCTGCCGCCAGCAGCAGGATTGCGTGCAGGATGCGTTAAGCTGCTGCGCAGGCTTTCAGTTGCGACGTGATGGACCATGTGCTGAGGCCGATTCTCCGACCCGTAGAGAAGCTTCTG
CACTGTGAGCCGTCATCACCTCGTGCAGCAGAATTTGCGGATTATCGATCTGCGTCTGTTTATGTGAACCTTGTGCTATTGCGTCTGTAGAACAAGCATCACCAAGCTCACCCGCAAGGCGGGCATTACTCACCTGCACAGGCA
GCGACGCCAATGCGTCAGGTTGGTCTCCAGAACCTGTTAATCATCGGCCAAAAGTGGGGTATTAGATACCTTCTGCATGCGGGCTACGCATCCGTCTGGTAGCGTGGCGACACAATCCGGTCCGCAATCTCGCTGTGTACCGTGCC
GTAATCGGGCGAGTAGGTATGGCAGGCTCGGGCTGCGGACGCGACGCGCCACGCTCCGCTGCTCTGCGACCACCGCACGCTCCGCTGGCGCAGCTCCCGTGGAGGGCGTGGCGGGCTCGTCACTCGGTCGAGGGGTACGCTC
GTCGGCGGCAACGAAGCCCTTCCGGGGGCGATACAGGGCCGCTGTGGCCGCTCATTGACCAGTGCATTGGCGATGACTTCCGTATCGGAGATCGACGCTGGGTCTGTGCTGCCGACCCACCGCGAAGTTACCAGCGCGCTTGTAGC
GGCTCCGAGTACAGGGCAGTACGTACCCCTGCACCTGCTGCTGTGAGGCTCGTGGCGGTGCCAATGACGCGAGATCGATGGCAAGGTACTGTTGGTCTGCGAAGCTCAGGATGCCCAGACAGAAACGGATGGTCGCCATCTGCCGT
ACAGGCTCGTGTCTGCTCCAGAGCGTTGGCCCGTACTGTTACTCTGCCAGCGACTGCGACTTTCGCGAAGTGTGCTGCTCCTACTGAGTGAACGGGGTCCGTTACATACGGCTTGGATCGAATTCGGGTCGGCGTGGAA
GTGGGGCATCGTGGCCAGTCCATACGCGGGTAGTGGTCCAGACTGCACAGCCGCTTTCGCGCCTGCCATGCGGTAGCCTGTTGCGCGAGTTCGCGCAATCAACGACTGCCCTGTTCTCCGATGCCGTTCCGCTCGCGATGCC
GCCTGCGAGACTTGTGACAGCGGGACAATCGGAGCTGTGCGCGCCATCGCCGGGAGTGAACCTCCGGGACGGCGTAGCGGGTACTGCTTCCCGCCGTAGATACGCGGGTCCACATTAACGATGGCTCTGCCATGTTCTCCTTACT
GAGTGGCCAGGTGCGGGCGTTGGTGTGATCGAACTCAACATCGAGTCATAATACTGCTTGGGGGTGAGTGGGCGATGCGGTACTGCGTGAGCCTCGCTGCTGACAAGAACGCCAACGCTGCTAAGGCTGCTGCTGTGGCCACAACCA
CCAACGCGCTAAGGAGGCAACTGATGCGCTCAACAAAGCTGCGGATGCTAACCCGCGTTGGGCTGATGAGCCTGTGCTGCTGACGTTGACGGGCTGTTCTGTAACGCGAGTGCAGTTGCGCTCCCTGATCCCACGCTGTACCAGTCCG
ACATGCGAGTCCCTCGGTAAGCCTGCTATGACGAACCAAGACCTAGCCAGCTGTATGACACGCGCACCCGCGCTGAACTGGTAACGCTGATCGTCCGCGCTGCGCGCTGGGCCGAAACCATCCAGAAGGAGAAACAAGCAAT
GAGCATCGAAACCAGACCAGCAAGCAAGTGTATGACTCACCGGCCAGATGGAGAACCCTCAAGGCGCTGCTGCTTACCCTCGGACAGTGCAGTCCGCGCCTCGTTACCTCGGCAATGCCAGCATGGCGGGCTGAAGACTTT
GCTGACGCGGCTATCGCGGACGCCAGCCCCGGCGGAGGCACTAAAGCGTCTAATCGCTCGTGGCGGGTTTCGGCTGCCAGGGTAGGCAACCATACCAGCCATGAGCGCGAGCCGCTACGGCCCGCTCGAAGTCCAGG
AGGATTATGGCTTTCACAATGCGCGAGGCGTACGACATCATCCAGTGTCCGCCCCGCTCAGCTGCGCGGCTACGCCGCCACCTGACAACAACCCAGCGAGGAATCGTCGAGACCTCGAAAATCGGGCCGCTGAGACGATCAC
GACCTGGGCGGTACTGTGGTCCCATCCACTCTGCCGTGCTGCAAACGCGCCCTCAGCCAGCGTGAAGAACAGCGCGGGCACCGTACCATGCGGGGACGCGCCACGTTGCTCCCTCGGGCAGCCTCACAGGCGTCTCCCTCCCCGCCAC
TGTGGCCCTCGTGAACGCGGGTACTGTCCCTGTGAAGAACAGCGCTGGGTACTCCGTGCGCGCATCTGCTGTGCAACCGTGGCCGCTGGCCTCGTACTGGCGTGCAGTCCCGCGAGCGTAGCAGCACTGCTACTGGCGGCAC
CGTAACCGTCACTGACGCTAGCAGCTCGCCGAACTGTGAGCCACTGTACGCGTGTGTTGGCGCGCGGCTACAGCTACGCTGCCCGTACTGCTGCGGTACTCCAGAATGGCGACCAAGTACGATCACAAATGCATCGGGCACGACCAGC
GCGACCTTTCCGATCACCCTGGCGAACGGCGTGGCCACCGCTGACGCTGCCGATAACCGGGCGCTGATCGGGCAACGCGTACACGATCCAGTACCAGCGACGTACACCAACGTTACACCGACCATCACGAACGGCCAGCTC
GTTGGCATTGACTCAGTTAAGGAGGAAGTATGGCAGCAGCATTTCGACGCAAACCGTGGATGACGTAACCAAGCTGCTAACGCGCTGACAAAGGCTGCGGCCCTCGTGCAGCTAACGTCAGCATCAACCGGTGCGCTACCAAACG
GACGTAGTTGCTGCGCTCGTGCAGCTCAGGCTCAACTACTACGGCTTGGTGGGTAACAGCTAAGAGGTAGGAGGGTAGACATGCTAGTAGTGTGCTAATGGCGTCTACCTTAGGGTATAAGGATTGACGAGTGAAGGCTTA
GGGATTAGGCTGTGGAGTGGTAACTAGCAATGCCAGTTGAAAAATTTTGGGAGGCACTCCGACCCGATGGCGCATGCTTCCCGCTAGGCGCCGCTTGAACCATCCACGATGTGCGGTAGGAATTGCGGAGGGTCTAGCTAA
CAGTACTAGCTGTAGCCATTCTCGCTGTGCGCCAGGGTCTGGATGTGCGCGCGGAAGCCTTCCGCGGCCATCTTGCAGAGCATGCTTGGGGCGAGCTGGAGGAACGCTCTATGCTCCTCGTAAATGCTCCTTGTGGATCGAGTGC
GGTACTTCCCCCGCCGCTTACAGGGTCTGCTGGCATTGCTGCTGAGGCGGCGAGCAGTGCCTCCGGGACCGTACGCTGCCGTAAGCTTGTGTCGAAAGTTAGTGTGCGCATTACGCCA CCTCAAAGTTGTCGCTGTTGCCGATC
CTGCGCACCTTGACGTTGCTGTACCGGGCGTTACGTTGGTTCGAGGCATCCATAGCGCCGCTGCGCCAGAGCAGGCCAGTACAGGAGCGGGTGTCTATGAGTTGGATGGTCTTGTGTTGTCGCGAGGTTGTGCCACGTTGCCGTA
AGCCGGTGTGCGGGCCGACCCGCTGGCATGGAAGGCCACGTTGCGCTTTTCCGCGTAGCGCTCCTTGGCCGATTGTACGGGATCGGCTGCTGTTGCTGGCCGATGGGCGCAGCCAAATGCATATGCCGGCAAGCTTACGGAGTGC
GGTATCCAGTCTTCCGCGATTTATCGACTTCTGCTTTGTCGCGAAGTTGGACAGCGCACTAGCCAGCTTGTGACGACGCGACCCGCGCAGTTAAACAGTTCCATGAGTTCTCCTGCGTTGAAGTTGCGTTTAGAAAATGGCAGTTGG
CCTTGCCTTACAGTCAAGTCTACCAAGCAGCAACTAAGTGTGCTGATGCGCCAGTAGCAGTAATGTGCTACTGCAACGGGAGCACGGCCTGCGCCTCAAGACGTGCGCGCTGGTCTTGTGTTGCTCCTGTTCCACGAGCTTGT
GTGGTTGAAGCTCCAGCCACATAGCCGCAATCAGCGCAGCGAACCACTGCGCCGATCATGAGTACTGTTCAAATTCATTTGCTCCCGGCCAGGTGCGCACGACATGGCAATCTGCTCCTCGCGGCGCTTCTGATGCCATT
GTGAATCTTGGTCCCGGCTGCGTCCAGTTAGCCAGGGCATGGCAGGCGCTACGCGACTTCCCGCGTTGAGCAAGCGCACATGTGACGGCACCGCGCTGAGCGCAGTACGCACATGCCGCTTTACGCCCTTACGACCCGGACCGAC

GTTGTACGTGAAGTCAGTCCATGCAGCCACTGCCCTCAGTCATTGGAACCTTGACACAACCTGCGACGACTCGCATAGCTTACGCCATAGCCTTCTGCTCCGACGATCGACTGTGCCTTAGTCGCCACTCCGCGCTTCGCCAGCTCGCC
CGTGATCCC CGGACAGATCGTGGGACTCCCAACGGGTCTAGATAAGTACGCGTCACTTGC GGCCCTCGAACTGCGTAGCGAGCTGAAATGCGCCGCCAATCCAAGCAAGGACGCTAGCGCGGTTGCCGCTGTGATCTTCTTATTACG
TTTGCCTCCGAGGTTGTTGCGCAGCAGGAAGTAGAGCTGCACCAGCAGTACGATGATGGACAGCAGTGTGCCACTGTGCAAGTGTCTAGGACAGCCTGCGCCTCAAGACGTGCGCGCTGATCCTTGTAGGTTCTGCTCTGTTCCACGAG
CTTGCTGTGGTTGAAGCTCCACGCCAGTAGCCGCAATCAGCGCAGCGAACCACTGCGCCGATCATGAGGACTGTTCAAATTCATTTGTCTCCGCGCCAGGTGCGCAGCAGCATGGCAATCTCTGCCCTCGCGCCGCTTCTTGAT
GCCATTGTGGATCTTGGTGCCCGCTGCGTCCAGTTAGCCAGGGCATGGCAGGCGTACGCGACTTGCCTGCGTTGAGCAAGCGCACGTGTGACGGCACCGCGCCTGAGCGCAGTACGCACATGCCGTCTTTACGCCCTTGCACCGGG
ACCGACGTTGTATGTGAAGTCGGTCCATGCCGCCACTGCCCTCTGTATCGGAACCTTGACACAACCTGCGACGACGCGCATGGCGTCAGCCATAGCCTTCTGCTCAGCAGCGTCGCACTGTGCCTTAGTCGTA CTCCGCGCTTCGCCA
GCTCGCCCGTTATCCC CGGACAGATCGTGGGACTCCCAACGGGTGAGATAAGTGC GCGTCACTTGC GGCCCTCGAACTGCGTAGCGAGCTGAAATGCGCCGCCAATCCAAGCAAGGACGCTAGCGCTGTTGCCGCTGTGATCTTCT
CATTACGTTTTGCCTCCGAGGTTGTTGCGCAGCAGGAAGTAGAGCTGCCCAGCAGTACGATGATGGACATCAGTGCCAGGACTACGATTAGTGC GAACGCAATCACC AATGGTGCCATGTT CATGAGAAGTGCCCTACCTTGGTTACTTC
GACCGTCCGCGCTGCGTTCATGGAGTCGACAGGATTGCGCAGCGGGCCGTGTCGTGCGGCACGCTACCCAGCCGCGGTGTGTGTGTCGAACACGCGCCACGAACCGCCCTTGTACTGCGCCTGATAGCGGTGTCGCGTATGGT
CGGATCGTTTTGAATCTTGATGTA CTGTGCGCGTTCATGATGCTCCTTACAGGTAGAGTGCTTCGGGTCGACAAAAGAAATCGCGGTTGAAACTGCCCAACGTT CAGCGTTCGGGCGGAGCAGTCGGCCGTGTTCCCATGCTGGTTCAG
CACACGGATGGGCACGGCGCAATGGCATCCTGATCGAGATCGAATGCCGCCAGTTGATGCGATGTCGTGCGCCGTA CTGCGCCAGTGGCCGTGTGTCCTCCACCACGAGAACAGCGCAGGGTT CGCCTGTCGCGGGGCACTGTTGCG
CACCGTTGACTGTGCGATGTCGAACCCAGCACCGCTACCACTCGCTGGATTGCTGCTCCTCTATGACGGTGCCTGCGGGCTGCGCCTGCCGACTTGTCTCGGCCTTGGCCGATGTTGAGAATGTAGATCATAGAGTGCCCATGCGCTTAT
CGTTGCGCGCCGTGTTGCGGTCCGTTTGCGGGGCTCGTTTTCTCCAGCTTGC GCAATTGCGGCGACTACGATTAGTGC GAACGCAATCACC AATGGTGCCATGTT CATGAGAAGTGCCCTACCTTGTGCAATTCGATCGTGCGCCAGCGTTC
ATGGAATCGCACGCAACCTGAGCAGCGCGCGGTATCGTGAGGCACGCTGCCCCAGCCGCGGTGTGGTGTGCAAAA CTGCCACGAGCCGCTTGTACTGCGCTTGATAGCGGTGTTCTGT GATGGTCGGATCGTTTTGAATCTTGA
TGTA CTGTGCGCGTTCATGATGCTCCTTACAGGTAGAGTGCTTCGGGTCGACAAAAGAAATCGCGGTTGAAACTGCCCAACGTTCAACGTTGCGGCCGAGCAGTCGGCCGTGTTCCCATGCTGGTTCACGCACACGGATGGGCACGGCG
GCAATGGCATCCTGATCGAGATCGAATGCCACCAGTTGATGCGATGTCGTGCGCCGTA CTGCGCCAGTGGCCGTGTGTCCTCCACCACGAGTACCGCGCAAGGTTGCGCTGTGCGGGGCACTGTTGCGCACCGTTGTA CTGTGCGGATGT
CGAACCAGCGCCGTA CCACTCGTGGAATCGGTCGCTCTATGACGGTGCCTGCGGGCTGGCCTGCCGACTTGTCTCGGCCGTTACCGATGTTGAGAATGTAGATCATAGACACCTGTGCGCTTATCGTTGCGCGCCGTGTTGCGG
TCCGCTTGGCGGGCTCGTTTTCTCCAGTTTGC CAGTTGAGCGTAGTAGCCACAATCCCATAGCGCGCAGCGGCATTAGCGTATTCTGTTGCTTGCCACAGGCCCGAGGATGCGAGGCCACCATCTGAGTAACTGCCTGGACTTTGCGCAG
CCCCTGTCTACCCGCTACCAACTGGTTGCCCGCGCAACGCGCAATTACGTTGTGCAACAAGTCAGCAGCCTCTTGACGCTGTGCGGGGTTTTCGATGCTGTGCATCCAAGTACGGCGCAAGTTATCGATGTCGCTGTTGTTGTTAAGGC
CCACCCTTGCAAGGCTAGCAGTGCCCGCTGCATTGTCGAGATAGCTGCCAGTTCCGGGTAAGGTTCCCATCCAGAAGATCAACGATGGACACGCGGCTATTGCCCACTTGCCTGCTAGTTAGCATGTCATTTCAATGCGATCGTAGTAG
CCACAAGCCCATAGCGCGCAGCGGCATTAGCGTATTCTGTTGCTTGCACAGGCCGAGGATGCGAGTCTACCATCTGAGTAACTGCCTGGACTTTGCGCAGTCCGTCTGCCACTCGCTCACC AACTGGTTGACCGCGCAACGACGCAATT
ACGTTGTGCAACAAGTCAGCAGCCTCTTGCCGTTCTGCGGGATTTTGCATACTGTGCATCCAGGTACGGCGTAAGTTATCGATGTCGCTGTTGGTCTTAAGGCCACCCCTTGCAAGGCTAGCAGTGCCCGCTGCATTGTGCGAGATAGCTGTC
CAGGTTCCGGGTAAGGTTCCCATCCAGAAGTACAACGATCGACACTCGGCTATTGCCA ACTTGTGTGCTAGTCAGCATGTCCATTTCAATGCGGTGCGCTGCGGCTATCGTCTCGCCCCAGCGGCCGTGACGGTAAGCATGCCCGACGCGT
CGCCGCTCGCCGGTGGCTACCGAGCCGAAGGCGGAGATCGCCATCGTGTGAGGGCTTCGCCCGCGATGCCGAGATTCTAGCTTCGGTGAGTCCGACACGCTGGAACAGGCCGAAGCCTAACCCCTTCAACCAACCCATAGGAGAT
TTACATGCCATCGTCAACCCGACCTCCCGCAAACCGGAATCGACCTAGCCGCCCACTGCCAGGGCGTGTCTCAACTTCAAGCCGTTCTGCCGCGGTACAGGCCGACAAGCGGCTGTGCCCCGCGTGGCTATCGTCTGCCCCA
GCGGCCGTGACCGTAAGCATGCCGACGCGCTGCGCGCTGCGGGCTGGCTACCGAGCCGAAGGCGGAGATCGCCATCGTGTGAGGGCTTCGCCCGCGATGCCGAGACTCTAGCTTCGGTGA GTCCGACACGCTGGAACAGGCCGA
AGCTTAACCCCTTCAACCAACCCATAGGAGATTTACATGCCATCGTCAACCCGACCTCCCGCAAACCGGAATCGACCTGCGCGCCCACTGCCAGGGCGTGTCTCAACTTCAAGCCGTTCTGCCGCGGTACAGGCCGACAAGCGG
CTGTCGACGCCAGGTGCGACGCCAGGTAGTGCTCGCA

Laboratory Guide for Identification of

PLANT PATHOGENIC BACTERIA

Third Edition

Edited by N. W. Schaad, J. B. Jones, and W. Chun For the Bacteriology
Committee of The American Phytopathological Society

Table 3. rca Primers for *Burkholderia* spp.

Specificity	Primer Designation	Sequence	Size (bp)	Reference
<i>B. andropogonis</i>	Pf	(5' AAGTCGAACGGTAACAGGGAJ)	410	4
	Pr	(5' AAAGGAT ATT AGCCCTCGCC3')		
<i>B. gladioli</i>	CMG-23-1	(5' ATAGCTGGTTCTCTCCGAJ)	388	
	G-23-2	(5'CCTACCATGCAY AT AAAT3')		6
<i>B. cepacia</i>	CMG-16-1	(5' AGAGTTGATCMTGGCTC3')	468	
	G-16-2	(5' CGAAGGATATT AGCCCTC3')		
	CMG-23-1	(5' ATAGCTGGTTCTCTCCGAJ)	388	
	CM-23-2	(5'CTCTCTTACCATGCGYGC3')		6
	CMG-16-1	(5' AGAGTTGATCMTGGCTC3')	468	
	CM-16-2	(5' CGAAGGATATT AGCCCTC3')		
<i>B. glumae</i>	1416S:	(5' GAGAGAATCGAGCCATGAAC)	873	A Hasebe,
	1414A:	(5' GAGCGCATCCAGAACGAAGT)		pers. Comm
	1417S:	(5' GACTCACACCAGGCAGGAAGT)	925	N. W. Schaad
	1417A:	(5' ATTCGGACTCGGTATGCAGC)		
	1418S:	(5' GCGATATGGCAAGACGAAA)	571	
	1418A:	(5' AGTCAT ACCCTTTGTCAGCGT)		
	1419S:	(5' ACCCGTTTTGATAGAGGTGCG)	628	
	1419A:	(5' ACGAAGGTCGCTGGTAAATCC)		

For details see Appendix A.

b. Serological techniques