

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

HUỲNH NGỌC TÂM

**NGHIÊN CỨU ỨNG DỤNG THỰC KHUẨN THỂ
TRONG PHÒNG TRỪ BỆNH HÉO XANH DO
VI KHUẨN *Ralstonia solanacearum* TRÊN CÂY
HOA CÚC (*Chrysanthemum* spp.)**

**LUẬN ÁN TIẾN SĨ
CHUYÊN NGÀNH: CÔNG NGHỆ SINH HỌC
MÃ SỐ: 62420201**

NĂM 2022

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

**HUỲNH NGỌC TÂM
MÃ SỐ NCS: P0915006**

**NGHIÊN CỨU ỨNG DỤNG THỰC KHUẨN THỂ
TRONG PHÒNG TRỪ BỆNH HÉO XANH DO
VI KHUẨN *Ralstonia solanacearum* TRÊN CÂY
HOA CÚC (*Chrysanthemum* spp.)**

**LUẬN ÁN TIẾN SĨ
CHUYÊN NGÀNH: CÔNG NGHỆ SINH HỌC
MÃ SỐ: 62420201**

**NGƯỜI HƯỚNG DẪN
PSG.TS. NGUYỄN THỊ THU NGÀ
TS. LƯU THÁI DANH**

NĂM 2022

LỜI CẢM TẠ

Xin gửi lời cảm ơn chân thành đến

Ban Giám Hiệu trường Đại Học Cần Thơ, Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ sinh học, Khoa Sau Đại học, khoa Nông nghiệp, phòng Đào tạo, phòng Quản lý Khoa học và các phòng ban chức năng khác của trường Đại học Cần Thơ đã tạo điều kiện thuận lợi cho tôi được học tập, nghiên cứu tại trường.

Xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc đến

PGS.TS. Nguyễn Thị Thu Nga, TS. Lưu Thái Danh đã tận tình hướng dẫn và cho những lời khuyên dạy hết sức quý báu để tôi hoàn thành luận án này.

Cảm ơn quý thầy, cô ở Viện Nghiên cứu và Phát Triển Công Nghệ Sinh Học trường Đại học Cần Thơ, Bộ môn Bảo vệ Thực vật - Khoa Nông nghiệp trường Đại học Cần Thơ đã truyền dạy kiến thức cho tôi trong thời gian học tập nghiên cứu tại trường.

Chân thành cảm ơn NCS. Đoàn Thị Kiều Tiên, các anh, chị và các bạn trên phòng thí nghiệm Bệnh cây - Bộ môn Bảo vệ thực vật, các bạn học viên lớp Bảo vệ thực vật các khóa 39, 40, 41 đã giúp đỡ cho tôi trong suốt thời gian học tập, nghiên cứu và hoàn thành luận án này.

Đặc biệt cảm ơn NCS. Lê Uyên Thanh, Trần Thanh Tùng, Thị Dim, Nguyễn Minh Đăng, Nguyễn Thanh Tâm, đã giúp đỡ và cùng tôi thực hiện luận án này.

Tôi xin gửi lời cảm ơn đặc biệt tới anh Lê Minh Nhật Tân và anh Nguyễn Văn Hùng chủ đất canh tác tại xã Tân Khánh Đông, Thành phố Sa Đéc, tỉnh Đồng Tháp đã trực tiếp hỗ trợ đất để tôi hoàn thành thí nghiệm ngoài đồng ruộng.

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn chân thành tới Sở Giáo Dục và Đào tạo tỉnh Đồng Tháp, BGH Trường THPT Tràm Chim, các đồng nghiệp,... đã cho phép, hỗ trợ và tạo điều kiện thuận lợi cho tôi, giúp tôi hoàn thành các hoạt động giảng dạy, học tập và nghiên cứu của mình.

Xin trân trọng ghi nhớ tất cả những đóng góp chân tình, sự động viên giúp đỡ nhiệt tình của bè bạn và các anh, chị, em mà tôi không thể liệt kê hết trong lời cảm tạ này.

Cuối cùng, tôi xin gửi tấm lòng ân tình tới gia đình, đặc biệt là vợ của tôi - nguồn động viên và truyền nhiệt huyết để tôi hoàn thành luận án này.

Huỳnh Ngọc Tâm

TÓM TẮT

Luận án “Nghiên cứu ứng dụng thực khuẩn thể trong phòng trừ bệnh héo xanh do vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* trên cây hoa Cúc (*Chrysanthemum* spp.)” được thực hiện nhằm tuyển chọn những dòng thực khuẩn thể hiệu quả cho việc quản lý bệnh héo xanh trên cây hoa Cúc. Luận án được hoàn thành với 4 nội dung. Nội dung thứ nhất là phân lập các dòng vi khuẩn *R. solanacearum* gây bệnh héo xanh trên cây hoa Cúc và các dòng thực khuẩn thể có khả năng kí sinh vi khuẩn gây bệnh. Kết quả ghi nhận 124 dòng thực khuẩn thể và 55 dòng vi khuẩn *R. solanacearum* được phân lập từ các tỉnh: Bến Tre, Cần Thơ, Hậu Giang, Tiền Giang, An Giang, Đồng Tháp, Bạc Liêu và Lâm Đồng. Dòng vi khuẩn ĐT-9 được phân lập từ Làng hoa Sa Đéc, tỉnh Đồng Tháp có độc lực cao nhất. Phân tích trình tự gen 16S rRNA cho thấy rằng dòng vi khuẩn ĐT-9 là thành viên của *Ralstonia solanacearum* và có giá trị tương đồng cao nhất (99,86%) với dòng vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* KX785160 từ cơ sở dữ liệu trên ngân hàng gen. Trình tự gen của dòng vi khuẩn ĐT-9 đã được đăng ký trên ngân hàng gen với mã số MK041548. Nội dung thứ 2 là tuyển chọn một số dòng thực khuẩn thể triển vọng trong phòng thí nghiệm và nhà lưới để phòng trị vi khuẩn *R. solanacearum* gây bệnh héo xanh trên cây hoa Cúc. 10 thực khuẩn thể (ΦĐT13, ΦAG29, ΦLĐ38, ΦCT44, ΦCT46, ΦBT56, ΦBT67, ΦBT75, ΦTG97, ΦHG109) có khả năng kí sinh rộng trên 50 trong tổng số 55 dòng vi khuẩn *R. solanacearum* được khảo sát (chiếm 90,9%). Hai dòng thực khuẩn thể ΦBT56 và ΦBT67 có hiệu quả phòng trừ bệnh tốt hơn so với các dòng thực khuẩn thể còn lại trong điều kiện nhà lưới. Thực khuẩn thể ΦBT56 được xử lý ở mật số 10^7 và 10^8 (PFU/mL) có hiệu quả giảm bệnh cao hơn so với nghiệm thức xử lý thực khuẩn thể ở mật số 10^6 (PFU/mL). Khảo sát đặc điểm hình thái của hai dòng thực khuẩn thể (ΦBT56 và ΦBT67) bằng kính hiển vi điện tử TEM, kết quả cả 2 dòng thực khuẩn thể ΦBT56 và ΦBT67 đều có đầu đa diện và đuôi ngắn, theo thang phân loại Ủy ban Quốc tế về phân loại virus (ICTV) cả 2 thực khuẩn thể ΦBT56 và ΦBT67 thuộc họ Podoviridae. Nội dung thứ 3 là mười bốn loại thuốc hóa học với các hoạt chất hóa học trừ vi khuẩn khác nhau được đánh giá hiệu quả phòng trị đối với bệnh héo xanh do vi khuẩn *R. solanacearum* trên cây hoa Cúc trong điều kiện in vitro và nhà lưới. Kết quả ghi nhận hai nghiệm thức áp dụng streptomycin + oxytetracycline và oxytetracycline hydrochloride + gentamicin sulphate có tác dụng đối kháng cao với dòng *R. solanacearum* gây bệnh. Nội dung thứ tư là đánh giá hiệu quả phòng trị của thực khuẩn thể đối với bệnh héo xanh do vi khuẩn *R. solanacearum* trên cây hoa Cúc ở điều kiện ngoài đồng. Trong điều kiện áp

lực bệnh thấp, nghiệm thức áp dụng TKT ΦBT56 phối hợp thuốc hóa học (streptomycin + oxytetracyline) không góp phần gia tăng hiệu quả giảm bệnh so với sử dụng đơn lẻ TKT ΦBT56. Tuy nhiên, trong điều kiện có áp lực bệnh cao, thì việc áp dụng TKT đơn phối hợp thuốc hóa học (streptomycin + oxytetracyline) mang lại hiệu quả giảm bệnh (71,3%) cao hơn nghiệm thức sử dụng TKT đơn lẻ (58,0%). Như vậy, TKT có thể được sử dụng để quản lý bệnh héo xanh do vi khuẩn *R. solanacearum* trên Cúc và chỉ sử dụng bổ sung thêm thuốc hóa học khi thật sự cần thiết (lúc có áp lực mầm bệnh trên ruộng cao).

Từ khóa: *Bệnh héo xanh, cây hoa Cúc, Ralstonia solanacearum, Thuốc trừ khuẩn, Thực khuẩn thể.*

ABSTRACT

This thesis, with the title of “Study of applying bacteriophages to control wilt disease caused by *Ralstonia solanacearum* on *Chrysanthemum* spp.” was conducted in order to screen for bacteriophages that has the great potential for controlling bacterial wilt disease on *Chrysanthemum* sp. with four main research contents. The first research content was to isolate the *R. solanacearum* strains causing bacterial wilt disease on *Chrysanthemum* plants and the bacteriophages capable of parasitizing pathogenic bacteria. As a result, there were 124 phages and 55 *R. solanacearum* strains isolated from Ben Tre, Can Tho, Hau Giang, Tien Giang, An Giang, Dong Thap, Bac Lieu and Lam Dong provinces. The ĐT-9 isolate from Sa Dec flower Village of Dong Thap province showed the highest pathogenicity. The analysis of 16S rRNA gene sequencing showed that ĐT-9 isolate shared the highest similarity values (99,86%) with *R. solanacearum* strain KX785160 from the GenBank database. ĐT-9 strain was identified as *Ralstonia solanacearum* and its 16S-rDNA region sequence was deposited in GenBank under the accession number MK041548. The second content was to screen for the potential bacteriophages *in vitro* and in greenhouse conditions for controlling bacterial wilt caused by *R. solanacearum* on *Chrysanthemum*. Ten bacteriophages (ΦĐT13, ΦAG29, ΦLĐ38, ΦCT44, ΦCT46, ΦBT56, ΦBT67, ΦBT75, ΦTG97, ΦHG109) were found to have the ability to parasitize more than 50 investigated *R. solanacearum* strains (accounting for 90.9%). Two phages ΦBT56 and ΦBT67 had higher disease control than the rest under net-house conditions. The treatment using 10^7 or 10^8 plaque-forming units (PFU/mL) of bacteriophage ΦBT56 had a higher disease-reducing effect than the treatment using 10^6 (PFU/mL). The morphological characteristics of ΦBT56 and ΦBT67 phages were investigated by TEM. Both phages had icosahedral head and short tail, according to the classification scale of the International Commission on Taxonomy of Viruses (ICTV), phage ΦBT56 and ΦBT67 belong to the family Podoviridae. The third content was fourteen commercial bacteriocide mixtures for controlling this pathogen were evaluated *in vitro* and under net-house conditions. The result showed that two treatments applied with streptomycin + oxytetracycline and oxytetracycline hydrochloride + gentamicin sulphate had the highest inhibition against *R. solanacearum*. The fourth content was to evaluate the effectiveness of bacteriophages for controlling this disease on *Chrysanthemum* sp. in field conditions. Under low disease pressure, the treatment which applied with single bacteriophage ΦBT56 gave similarly disease reduction efficiency to the treatment with

combining bacteriophage ΦBT56 and bactericide (streptomycin + oxytetracycline) respectively. By contrast, under high disease pressure, the treatment of combining bacteriophage ΦBT56 and bactericide (streptomycin + oxytetracycline) was expressed a disease reduction efficiency (at 71,3%) that more than the treatment applied with single bacteriophage ΦBT56 (at 58.0%). Therefore, the phage can be used to control wilt diseased on *Chrysanthemum* and only added with chemicals when absolutely necessary such as under the high disease pressure on fields.

Keywords: *Bacterial wilt, Bactericide, Bacteriophages, Chrysanthemum, Ralstonia solanacearum.*

CAM ĐOAN KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu mà chính tôi cùng với ThS. Trần Thanh Tùng và 3 em sinh viên đại học đã thực hiện và nghiên cứu dưới sự hướng dẫn của PGS.TS. Nguyễn Thị Thu Nga và TS. Lưu Thái Danh. Tất cả các số liệu trong luận án là trung thực và chưa được ai công bố trong bất kỳ công trình nghiên cứu cùng cấp nào khác.

Cán bộ hướng dẫn 1

Cán bộ hướng dẫn 2

Tác giả luận án

PGS.TS. Nguyễn Thị Thu Nga

TS. Lưu Thái Danh

Huyền Ngọc Tâm

MỤC LỤC

	Trang
TÓM TẮT.....	i
ABSTRACT.....	iii
CAM ĐOAN KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU	v
MỤC LỤC	vi
DANG SÁCH BẢNG.....	x
DANH SÁCH HÌNH.....	xiii
DANH MỤC TỪ VIẾT TẮT	xvi
Chương 1: Giới thiệu.....	1
1.1 Đặt vấn đề	1
1.2 Mục tiêu luận án	2
1.3 Nội dung nghiên cứu.....	3
1.4 Tính mới của luận án	3
1.5 Phạm vi và đối tượng 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 Khái quát về cây hoa Cúc	5
2.1.1 Nguồn gốc và giá trị sử dụng của cây hoa Cúc	5
2.1.2 Tình hình sản xuất hoa Cúc trong nước và trên thế giới	6
2.1.3 Vị trí phân loại và đặc điểm thực vật học	6
2.1.4 Một số bệnh hại trên cây hoa Cúc	7
2.2 Khái quát về bệnh héo xanh trên cây hoa Cúc	7
2.2.1 Triệu chứng và tác nhân gây bệnh	7

2.2.2 Vị trí phân loại vi khuẩn <i>Ralstonia solanacearum</i>	8
2.2.3 Đặc điểm hình thái, sinh học và lây lan của vi khuẩn <i>Ralstonia solanacearum</i>	8
2.2.4 Ảnh hưởng của điều kiện ngoại cảnh đến sự phát sinh phát triển của bệnh.....	11
2.2.5 Biện pháp phòng trị bệnh héo xanh do vi khuẩn <i>Ralstonia solanacearum</i>	11
2.3 Khái quát về thực khuẩn thể trong phòng trừ sinh học.....	12
2.3.1 Khái niệm phòng trừ sinh học.....	12
2.3.2 Khái quát về lịch sử nghiên cứu thực khuẩn thể và những ứng dụng của thực khuẩn thể trong kiểm soát mầm bệnh do vi khuẩn	13
2.3.3 Đặc điểm của thực khuẩn thể.....	16
2.3.4 Phân loại thực khuẩn thể.....	19
2.3.5 Những thách thức khi sử dụng thực khuẩn thể trong quản lý bệnh trên cây trồng	20
2.3.6 Một số biện pháp làm tăng hiệu quả khi ứng dụng TKT	23
2.3.7 Biện pháp hạn chế sự hình thành tính kháng của vi khuẩn đối với thực khuẩn thể	24
2.3.8 Chiến lược quản lý tổng hợp mầm bệnh.....	25
2.3.9 Thuận lợi và khó khăn khi sử dụng thực khuẩn thể trong kiểm soát mầm bệnh do vi khuẩn	26
2.4 Khái quát một số loại hoạt chất hóa học thường dùng phòng trừ vi khuẩn.....	28
Chương 3: Phương pháp nghiên cứu	31
3.1 Vật liệu.....	31
3.2 Phương pháp	32
3.2.1 Nội dung 1: Phân lập các dòng vi khuẩn gây bệnh héo xanh trên cây hoa Cúc và các dòng thực khuẩn thể có khả năng kí sinh vi khuẩn gây bệnh ở một số tỉnh ĐBSCL và tỉnh Lâm Đồng.....	32
3.2.2 Nội dung 2: Tuyển chọn một số dòng thực khuẩn thể triển vọng trong phòng thí nghiệm và nhà lưới để phòng trị vi khuẩn <i>Ralstonia solanacearum</i> gây bệnh héo xanh trên cây hoa Cúc.	35

3.2.3 Nội dung 3: Xác định loại thuốc hóa học có hiệu lực ức chế vi khuẩn <i>Ralstonia solanacearum</i> gây bệnh héo xanh trên cây hoa Cúc trong phòng thí nghiệm và hiệu quả phòng trừ bệnh ở điều kiện nhà lưới	43
3.2.4 Nội dung 4: Đánh giá hiệu quả phòng trị của thực khuẩn thể được chọn đối với bệnh héo xanh do vi khuẩn <i>Ralstonia solanacearum</i> trên cây hoa Cúc ở điều kiện ngoài đồng.....	46
Chương 4: Kết quả và thảo luận	53
4.1 Nội dung 1: Phân lập các dòng vi khuẩn gây bệnh héo xanh trên cây hoa Cúc và các dòng thực khuẩn thể có khả năng ký sinh vi khuẩn gây bệnh ở một số tỉnh ĐBSCL và tỉnh Lâm Đồng.....	53
4.1.1 Kết quả phân lập các dòng vi khuẩn gây bệnh héo xanh.....	53
4.1.2 Kết quả phân lập các dòng thực khuẩn thể	55
4.2 Nội dung 2: Tuyển chọn một số dòng thực khuẩn thể triển vọng trong phòng thí nghiệm và nhà lưới để phòng trị vi khuẩn <i>Ralstonia solanacearum</i> gây bệnh héo xanh trên cây hoa Cúc.	57
4.2.1 Kết quả đánh giá khả năng ký sinh của thực khuẩn thể đối với vi khuẩn gây bệnh héo xanh trong điều kiện phòng thí nghiệm.....	57
4.2.2 Kết quả đánh giá khả năng gây hại của các dòng vi khuẩn phân lập trên cây hoa Cúc ở điều kiện nhà lưới	61
4.2.3 Kết quả định danh vi khuẩn gây bệnh héo xanh trên Cúc	65
4.2.4 Kết quả đánh giá khả năng phân giải vi khuẩn <i>Ralstonia solanacearum</i> của thực khuẩn thể có phổ ký chủ rộng trong điều kiện phòng thí nghiệm	65
4.2.5 Kết quả đánh giá khả năng phòng trị bệnh héo xanh trên cây hoa Cúc của 5 dòng TKT triển vọng trong điều kiện nhà lưới.....	69
4.2.6 Kết quả đánh giá thời điểm xử lý 2 dòng thực khuẩn thể triển vọng lên khả năng phòng trị bệnh héo xanh trên cây hoa Cúc trong điều kiện nhà lưới	72
4.2.7 Kết quả đánh giá ảnh hưởng của mật số thực khuẩn thể lên khả năng phòng trị bệnh héo xanh trên cây hoa Cúc trong điều kiện nhà lưới	78

4.2.8 Kết quả khảo sát đặc điểm hình thái của 2 dòng thực khuẩn thể triển vọng bằng kính hiển vi điện tử Transmission Electron Microscopy (TEM)	81
4.3 Nội dung 3: Xác định loại thuốc hóa học có hiệu lực ức chế vi khuẩn <i>Ralstonia solanacearum</i> gây bệnh héo xanh trên cây hoa Cúc trong phòng thí nghiệm và hiệu quả phòng trừ bệnh ở điều kiện nhà lưới.....	84
4.3.1 Kết quả đánh giá hiệu quả ức chế <i>Ralstonia solanacearum</i> của một số loại thuốc hóa học trong điều kiện phòng thí nghiệm.....	84
4.3.2 Kết quả đánh giá khả năng phòng trị bệnh héo xanh trên cây hoa Cúc của thuốc hóa học trong điều kiện nhà lưới.....	87
4.4 Nội dung 4: Đánh giá hiệu quả phòng trị của thực khuẩn thể được chọn đối với bệnh héo xanh do vi khuẩn <i>Ralstonia solanacearum</i> trên cây hoa Cúc ở điều kiện ngoài đồng.....	93
4.4.1 Kết quả đánh giá hiệu quả phòng trị của thực khuẩn thể đối với bệnh héo xanh trên cây hoa Cúc bị lây bệnh nhân tạo ở điều kiện ngoài đồng tại Cần Thơ.....	93
4.4.2 Kết quả đánh giá hiệu quả phòng trị của thực khuẩn thể đối với bệnh héo xanh trên cây hoa Cúc bị lây bệnh nhân tạo ở điều kiện ngoài đồng tại tỉnh Đồng Tháp.	97
4.4.3 Kết quả đánh giá hiệu quả phòng trị của thực khuẩn thể đối với bệnh héo xanh trên cây hoa Cúc bị nhiễm bệnh tự nhiên ở điều kiện ngoài đồng tại tỉnh Đồng Tháp.	102
Chương 5: Kết luận và đề xuất.....	111
5.1 Kết luận.....	111
5.2 Đề xuất.....	112
Tài liệu tham khảo	113
Phụ lục	

DANH SÁCH BẢNG

	Trang
Bảng 3.1: Các loại thuốc hóa học được sử dụng trong nghiên cứu.....	44
Bảng 4.1: Số dòng vi khuẩn gây bệnh héo xanh được phân lập ở một số tỉnh ĐBSCL và tỉnh Lâm Đồng	53
Bảng 4.2: Số dòng TKT được phân lập từ một số tỉnh ở ĐBSCL và tỉnh Lâm Đồng	56
Bảng 4.3: Khả năng kí sinh của 124 dòng TKT đối với 55 dòng vi khuẩn phân lập ở một số tỉnh ĐBSCL và Lâm Đồng.....	58
Bảng 4.4: Số lượng TKT kí sinh trên các dòng vi khuẩn gây bệnh héo xanh trong tổng số 124 dòng TKT được khảo sát.....	60
Bảng 4.5: Tỷ lệ (%) bệnh héo xanh do các dòng vi khuẩn gây bệnh trong điều kiện nhà lưới.....	62
Bảng 4.6: Trung bình cấp bệnh héo xanh do các dòng vi khuẩn gây bệnh trong điều kiện nhà lưới	63
Bảng 4.7: Khả năng phân giải của 10 dòng TKT với 3 dòng vi khuẩn thời điểm 24 giờ	66
Bảng 4.8: Khả năng phân giải của 10 dòng TKT với 3 dòng vi khuẩn thời điểm 48 giờ	67
Bảng 4.9: Khả năng phân giải của 10 dòng TKT với 3 dòng vi khuẩn thời điểm 72 giờ	68
Bảng 4.10. Tỷ lệ (%) bệnh héo xanh vi khuẩn trên cây hoa Cúc của các nghiệm thức xử lý TKT khác nhau trong điều kiện nhà lưới	70
Bảng 4.11: Cấp độ bệnh héo xanh vi khuẩn trên cây hoa Cúc của các nghiệm thức xử lý TKT khác nhau trong điều kiện nhà lưới.....	71
Bảng 4.12. Tỷ lệ (%) bệnh héo xanh vi khuẩn trên cây hoa Cúc khi xử lý hai dòng TKT qua ba thời điểm xử lý khác nhau trong điều kiện nhà lưới ở 8 NSKLB	73
Bảng 4.13: Tỷ lệ (%) bệnh héo xanh vi khuẩn trên cây hoa Cúc khi xử lý hai dòng TKT qua ba thời điểm xử lý khác nhau trong điều kiện nhà lưới ở 12 NSKLB	74
Bảng 4.14: Tỷ lệ (%) bệnh héo xanh vi khuẩn trên cây hoa Cúc khi	

xử lý hai dòng TKT qua ba thời điểm xử lý khác nhau trong điều kiện nhà lưới ở 16 NSKLB	74
Bảng 4.15: Tỷ lệ (%) bệnh héo xanh vi khuẩn trên cây hoa Cúc khi xử lý hai dòng TKT qua ba thời điểm xử lý khác nhau trong điều kiện nhà lưới ở 20 NSKLB	75
Bảng 4.16: Tỷ lệ (%) bệnh héo xanh vi khuẩn trên cây hoa Cúc khi xử lý hai dòng TKT qua ba thời điểm xử lý khác nhau trong điều kiện nhà lưới ở 24 NSKLB	76
Bảng 4.17: Chỉ số AUDPC do vi khuẩn <i>R. solanacearum</i> khi xử lý hai dòng TKT qua ba thời điểm xử lý khác nhau trong điều kiện nhà lưới	76
Bảng 4.18: Tỷ lệ (%) bệnh héo xanh vi khuẩn trên cây hoa Cúc khi xử lý ΦBT56 ở các mật số khác nhau trong điều kiện nhà lưới	79
Bảng 4.19: Cấp bệnh héo xanh vi khuẩn trên cây hoa Cúc khi xử lý ΦBT56 ở các mật số khác nhau trong điều kiện nhà lưới	80
Bảng 4.20: Hiệu quả ức chế của các loại thuốc hóa học đối với vi khuẩn <i>R. solanacearum</i> gây bệnh héo xanh trên cây hoa Cúc ở điều kiện phòng thí nghiệm qua các thời điểm khảo sát	85
Bảng 4.21: Tỷ lệ (%) bệnh héo xanh trên cây hoa Cúc do vi khuẩn <i>R. solanacearum</i> của các nghiệm thức ở thời điểm 6 NSKLB.....	88
Bảng 4.22: Tỷ lệ (%) bệnh héo xanh trên cây hoa Cúc do vi khuẩn <i>R. solanacearum</i> của các nghiệm thức ở thời điểm 10 NSKLB.....	88
Bảng 4.23: Tỷ lệ (%) bệnh héo xanh trên cây hoa Cúc do vi khuẩn <i>R. solanacearum</i> của các nghiệm thức ở thời điểm 26 NSKLB.....	89
Bảng 4.24: Chỉ số AUDPC do vi khuẩn <i>R. solanacearum</i> qua các thời điểm xử lý hoạt chất hoá học trong điều kiện nhà lưới	90
Bảng 4.25: Tỷ lệ (%) bệnh héo xanh trên cây hoa Cúc của các nghiệm thức tại TP. Cần Thơ ở điều kiện có lây bệnh nhân tạo	94
Bảng 4.26: Trung bình cấp bệnh héo xanh trên cây hoa Cúc của các nghiệm thức tại TP. Cần Thơ ở điều kiện có lây bệnh nhân tạo	95
Bảng 4.27: Hiệu quả giảm bệnh héo xanh trên cây hoa Cúc của các nghiệm thức tại TP. Cần Thơ ở điều kiện có lây bệnh nhân tạo	96
Bảng 4.28: Tỷ lệ (%) bệnh héo xanh của cây hoa Cúc ở các nghiệm	

thức ngoài đồng tại tỉnh Đồng Tháp trong điều kiện có lây bệnh nhân tạo với 3 dòng vi khuẩn <i>Ralstonia solanacearum</i>	99
Bảng 4.29: Trung bình cấp bệnh héo xanh của cây hoa Cúc ở các nghiệm thức ngoài đồng tại tỉnh Đồng Tháp trong điều kiện có lây bệnh nhân tạo với 3 dòng vi khuẩn <i>Ralstonia solanacearum</i>	99
Bảng 4.30: Hiệu quả giảm bệnh héo xanh của thực khuẩn thể và thuốc hóa học trên cây hoa Cúc ở các nghiệm thức ngoài đồng tại tỉnh Đồng Tháp trong điều kiện có lây bệnh nhân tạo với 3 dòng vi khuẩn <i>Ralstonia solanacearum</i>	100
Bảng 4.31: Tỷ lệ (%) bệnh héo xanh trên cây hoa Cúc ở các nghiệm thức tại tỉnh Đồng Tháp trong điều kiện nhiễm bệnh tự nhiên.....	104
Bảng 4.32: Trung bình cấp bệnh héo xanh trên cây hoa Cúc ở các nghiệm thức tại tỉnh Đồng Tháp trong điều kiện nhiễm bệnh tự nhiên.....	105
Bảng 4.33: Hiệu quả giảm bệnh héo xanh trên cây hoa Cúc của thực khuẩn thể và thuốc hóa học ở các nghiệm thức tại tỉnh Đồng Tháp trong điều kiện nhiễm bệnh tự nhiên	106

DANH SÁCH HÌNH

	Trang
Hình 2.1: Cúc Tiger tại TP Sa Đéc, tỉnh Đồng Tháp.....	5
Hình 2.2: Cúc Tím (Thạch Bích) tại tỉnh Bến Tre.....	5
Hình 2.3: Ruộng trồng Cúc tại tỉnh Đồng Tháp	6
Hình 2.4: Ruộng trồng Cúc tại tỉnh Bến Tre	6
Hình 2.5: Khuẩn lạc vi khuẩn <i>R. solanacearum</i> trên một số loại môi trường.....	9
Hình 2.6: Chu kỳ phát triển và lưu tồn của <i>R.solanacearum</i>	10
Hình 2.7: Cấu trúc của thực khuẩn thể	16
Hình 2.8: Chu trình sinh tan và chu trình tiềm tan	18
Hình 2.9: Hình thái các nhóm thực khuẩn thể cơ bản	19
Hình 2.10: So sánh 3 họ trong bộ phage đuôi Caudoviriales: Myoviridae, Podoviridae và Siphoviridae	20
Hình 2.11: Ảnh hưởng của thời gian áp dụng đến sự tồn tại TKT của vi khuẩn Xacm 2004-16 trên tán cà chua ở điều kiện ngoài đồng	21
Hình 2.12: Sự phát triển của các dòng vi khuẩn kháng TKT và các TKT đột biến trong tế bào (h-mutant) trong tự nhiên	25
Hình 3.1: Hình minh họa đĩa cấy vi khuẩn trên môi trường King's B	33
Hình 3.2: Hình minh họa đánh giá khả năng kí sinh của TKT đối với vi khuẩn gây bệnh héo xanh	36
Hình 3.3: Sơ đồ bố trí thí nghiệm 1- Ngoài đồng.....	47
Hình 3.4: Sơ đồ bố trí thí nghiệm 2- Ngoài đồng.....	50
Hình 3.5: Sơ đồ bố trí thí nghiệm 3- Ngoài đồng.....	51
Hình 4.1: Khuẩn lạc vi khuẩn gây bệnh héo xanh trên môi trường King's B	54
Hình 4.2: Khuẩn lạc vi khuẩn gây bệnh héo xanh trên môi trường TZC.....	54
Hình 4.3: Bệnh héo xanh trên Cúc.....	55

Hình 4.4: Đốm tan đơn lẻ của hai dòng TKT ΦBT56 và ΦBT67 hình thành dựa trên phương pháp pha loãng và trải trên đĩa	57
Hình 4.5: Khả năng kí sinh của TKT dòng ΦĐT1, ΦĐT2, ΦĐT3, ΦĐT4, ΦĐT5, ΦĐT6, ΦĐT7, ΦĐT8, ΦĐT9, ΦĐT10, ΦĐT11, ΦĐT12, ΦĐT13, ΦĐT14, ΦĐT15, ΦĐT16 trên dòng vi khuẩn ĐT9	60
Hình 4.6: Mức độ bệnh do các dòng vi khuẩn gây ra ở thời điểm 22 NSKLB trong điều kiện nhà lưới.....	64
Hình 4.7: Kết quả Blast trình tự đoạn gen 16S rRNA của dòng vi khuẩn ĐT-9	65
Hình 4.8: Đường kính đốm tan của TKT (ΦBT67) trên 3 dòng vi khuẩn <i>R. solanacearum</i> ở thời điểm 48 GSKNN	69
Hình 4.9: Đường kính đốm tan của TKT (ΦBT56) trên 3 dòng vi khuẩn <i>R. solanacearum</i> ở thời điểm 48 GSKNN	69
Hình 4.10: Mức độ nhiễm bệnh héo xanh do vi khuẩn <i>R. solanacearum</i> trên các nghiệm thức xử lý TKT và đối chứng ở thời điểm 26 NSKLB trong điều kiện nhà lưới.....	72
Hình 4.11: Mức độ nhiễm bệnh héo xanh do vi khuẩn <i>R. solanacearum</i> khi xử lý dòng ΦBT56 ở các thời điểm xử lý khác nhau lúc 24 NSKLB.....	78
Hình 4.12: Mức độ nhiễm bệnh héo xanh do vi khuẩn <i>R. solanacearum</i> trên cây hoa Cúc khi xử lý ΦBT56 ở các mật số khác nhau trong điều kiện nhà lưới	81
Hình 4.13: Hình thái của hai dòng thực khuẩn thể ΦBT56 và ΦBT67	82
Hình 4.14: Bán kính vòng vô khuẩn thời điểm 48 giờ của một số hoạt chất thuốc hóa học	86
Hình 4.15: Hiệu quả giảm bệnh của nghiệm thức có sử dụng hoạt chất hóa học trong điều kiện nhà lưới.....	92
Hình 4.16: Bệnh héo xanh do vi khuẩn <i>R. solanacearum</i> trên cây hoa Cúc ở điều kiện ngoài đồng tại Cần Thơ ở thời điểm 49 NSKLB	97
Hình 4.17: Ảnh hưởng của xử lý TKT và thuốc hoá học trên cây	

hoa Cúc bị lây bệnh nhân tạo vào thời điểm 56 NSKLB ở điều kiện ngoài đồng tại tỉnh Đồng Tháp	102
Hình 4.18: Hiệu quả sử dụng TKT đối với bệnh héo xanh do vi khuẩn <i>R. solanacearum</i> trên cây hoa Cúc ở ngoài đồng tại tỉnh Đồng Tháp trong điều kiện nhiễm bệnh tự nhiên	107
Hình 4.19: Ảnh hưởng của xử lý TKT và thuốc hoá học trên cây hoa Cúc tại tỉnh Đồng Tháp trong điều kiện nhiễm bệnh tự nhiên ở thời điểm thu hoạch	108

DANH MỤC TỪ VIẾT TẮT

Viết tắt	Viết đầy đủ
AUDPC	Area Under Disease Progressive Curve (Chỉ số tích lũy bệnh theo thời gian)
CFU	Colony Forming Unit (đơn vị hình thành khuẩn lạc)
ĐBSCL	Đồng bằng sông Cửu Long
GSKNN	Giờ sau khi nhân nuôi
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NSKLB	Ngày sau khi lây bệnh
NSKT	Ngày sau khi trồng
PFU	Plaque Forming Unit (đơn vị hình thành đốm tan)
TĐXL	Thời điểm xử lý
TEM	Transmission electron microscopy (Kính hiển vi điện tử truyền qua)
TKT	Thực khuẩn thể
TZCA	Triphenyl Tetrazolium Chloride Agar

CHƯƠNG 1: GIỚI THIỆU

1.1 Đặt vấn đề

Hoa Cúc (*Chrysanthemum* spp.) là loại cây trồng mang lại lợi ích kinh tế rất lớn cho người trồng ở Đồng Tháp nói riêng và các tỉnh Đồng bằng sông Cửu Long nói chung. Tuy nhiên, trong canh tác cây hoa Cúc, tác nhân vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* gây bệnh héo xanh thường xuyên xuất hiện và gây hại ở mức độ cao. Vi khuẩn gây bệnh có khả năng tấn công nhiều loại cây trồng trên 250 loài thực vật thuộc khoảng 50 họ khác nhau (Guidot *et al.*, 2014) và được xếp thứ hai trong danh sách các tác nhân gây bệnh nguy hiểm nhất trên cây trồng (trích dẫn Vân và *ctv.*, 2019a). Mầm bệnh lưu tồn trong hom, củ giống và trong đất. Khi xâm nhiễm vào cây trồng thường định vị và phát triển quần thể trong bó mạch dẫn cây trồng làm cản trở quá trình vận chuyển nước, dẫn đến cây héo và chết (Allen *et al.*, 2005). Trên cây hoa Cúc, việc nhân giống từ việc giâm cành là nguy cơ lây bệnh gây hại nặng nếu cây mẹ và vườn nhân giống nhiễm mầm bệnh. Hiện tại, tập quán canh tác quản lý bệnh của nông dân chủ yếu dựa vào biện pháp hóa học trong phòng trị bệnh do vi khuẩn như các thuốc chứa hoạt chất là kháng sinh hoặc các thuốc gốc đồng (Frampton *et al.*, 2012). Tuy nhiên, đến thời điểm hiện tại một số vi khuẩn được ghi nhận đã kháng thuốc gốc đồng và một số loại thuốc kháng sinh như Ampicillin. Bên cạnh đó, tồn dư các thuốc bảo vệ thực vật cũng tác động trực tiếp đến môi trường và gián tiếp gây ra tính kháng thuốc của mầm bệnh, giảm tính đa dạng sinh học, gây ảnh hưởng phẩm chất nông sản và sức khỏe con người (Behlau *et al.*, 2011, Hwang *et al.*, 2005).

Trong hệ sinh thái tự nhiên và hệ sinh thái nông nghiệp luôn có sự hiện diện phong phú các quần thể vi sinh vật có lợi trong đất như xạ khuẩn, vi khuẩn, nấm và thực khuẩn thể (bacteriophages). Thực khuẩn thể (TKT) là virus kí sinh tế bào vi khuẩn đã được nghiên cứu rất nhiều trên thế giới và ứng dụng trong phòng trừ sinh học bệnh cây trồng. Vì chúng có nhiều ưu điểm, đặc biệt chúng kí sinh rất chuyên tính trên từng loài vi khuẩn kí chủ nên không gây tổn hại cho hệ sinh vật xung quanh (Duckworth & Gulig, 2002), TKT hiện diện rất phong phú trong tự nhiên như đất, nước, cây trồng, cơ thể động vật và con người và giữ vai trò kiểm hãm sự bùng phát của quần thể vi khuẩn trong tự nhiên (Kutter & Sulakvelidze, 2004; Adams, 1959). Hơn thế nữa TKT không độc với tế bào nhân thực (Greer, 2005) và khả năng TKT tự sao chép trong một chu kỳ chỉ trong vòng 15 phút đến một vài giờ, do đó mật số gia tăng rất nhanh (Duckworth & Gulig, 2002).

Hiện nay, trên thế giới đã có nhiều nghiên cứu về việc TKT có hiệu quả trong việc quản lý bệnh do các vi khuẩn gây ra, ví dụ 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), *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii* gây bệnh cháy lá trên hành (Lang *et al.*, 2007), *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* gây bệnh thối nhũn cây hoa loa kèn (Ravensdale *et al.*, 2007). Việc sử dụng TKT cũng được xem là tác nhân phòng trừ sinh học quan trọng. Chế phẩm sinh học bằng TKT đã được thương mại hoá lần đầu tiên vào năm 2005 với tên sản phẩm là AgriPhage, được ứng dụng trong quản lý bệnh đốm lá cà chua do vi khuẩn *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* và đốm lá ớt do vi khuẩn *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Nagy *et al.*, 2012).

Ở Việt Nam, Nga & Tâm (2014) bước đầu phân lập và đánh giá khả năng ký sinh của một số dòng TKT trên vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. Nga & Giang (2016) nghiên cứu TKT và ứng dụng trong phòng trị bệnh hại vi khuẩn trên cây trồng. Vân và *ctv.* (2019a) đã phân lập TKT từ đất trồng cây dược liệu có khả năng ức chế vi khuẩn *R. solanacearum* ở một số tỉnh Đồng bằng sông Cửu Long (ĐBSCL). Tuy nhiên, chưa có nghiên cứu sử dụng TKT trong phòng trị đối với bệnh héo xanh do vi khuẩn *R. solanacearum* trên cây hoa Cúc.

Xuất phát từ những vấn đề trên, đề tài “Nghiên cứu ứng dụng thực khuẩn thể trong phòng trừ bệnh héo xanh do vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* trên cây hoa Cúc (*Chrysanthemum* spp.)” được thực hiện nhằm tuyển chọn những dòng TKT hiệu quả cho việc quản lý bệnh héo xanh trên cây hoa Cúc, góp phần phục vụ sự phát triển ngành hàng hoa và cây kiểng tại vùng ĐBSCL nói riêng và trên cả nước nói chung.

1.2 Mục tiêu luận án

Phân lập các dòng vi khuẩn gây bệnh héo xanh có tính độc cao trên cây hoa Cúc và định danh đến mức độ loài.

Xác định được các dòng TKT cũng như thuốc hóa học và phương pháp áp dụng có khả năng kiểm soát bệnh héo xanh trên cây hoa Cúc ở điều kiện nhà lưới và ngoài đồng.

Xác định đặc điểm phân loại các dòng TKT triển vọng dựa vào đặc điểm hình thái được quan sát dưới kính hiển vi điện tử TEM theo thang phân loại của Ủy ban Quốc tế về phân loại virus.

1.3 Nội dung nghiên cứu

Để đạt được các mục tiêu trên, các nội dung chính sau đây được thực hiện:

Nội dung 1: Phân lập các dòng vi khuẩn gây bệnh héo xanh trên cây hoa Cúc và các dòng TKT có khả năng kí sinh vi khuẩn gây bệnh ở một số tỉnh ĐBSCL và tỉnh Lâm Đồng.

Nội dung 2: Tuyển chọn một số dòng TKT triển vọng trong điều kiện phòng thí nghiệm và nhà lưới để phòng trị vi khuẩn gây bệnh héo xanh trên cây hoa Cúc.

Nội dung 3: Xác định loại thuốc hóa học có hiệu lực ức chế vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* gây bệnh héo xanh trên cây hoa Cúc trong phòng thí nghiệm và hiệu quả phòng trừ bệnh ở điều kiện nhà lưới.

Nội dung 4: Đánh giá hiệu quả phòng trị của TKT được chọn đối với bệnh héo xanh do vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* trên cây hoa Cúc ở điều kiện ngoài đồng.

1.4 Tính mới của luận án

Xác định được tác nhân vi khuẩn gây bệnh héo xanh trên cây hoa Cúc ở một số tỉnh Đồng bằng sông Cửu Long và Lâm Đồng, để phục vụ cho nghiên cứu phòng trừ bằng biện pháp sinh học và hóa học.

Phân lập, tuyển chọn được các dòng TKT và thuốc hoá học có hiệu quả cao để kiểm soát bệnh héo xanh trên cây hoa Cúc, từ đó làm cơ sở xây dựng quy trình kiểm soát bệnh héo xanh trên cây hoa Cúc đạt hiệu quả.

1.5 Phạm vi và đối tượng nghiên cứu

1.5.1 Đối tượng nghiên cứu

Giống hoa Cúc được sử dụng trong thí nghiệm là Cúc Tiger.

Nguồn vi khuẩn gây bệnh và nguồn TKT được phân lập từ các mẫu bệnh của các giống hoa Cúc khác nhau được thu thập từ các tỉnh ĐBSCL và tỉnh Lâm Đồng.

Một số loại thuốc hóa học hiện có trên thị trường có hoạt chất ức chế vi khuẩn gây bệnh.

1.5.2 Phạm vi nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện trong phạm vi phòng thí nghiệm khi phân lập vi khuẩn và TKT cũng như tuyển chọn các loại thuốc hóa học ức chế vi khuẩn.

Nghiên cứu đánh giá khả năng gây hại của các dòng *R. solanacearum* và đánh giá hiệu quả phòng trị của TKT, thuốc hoá học hay phối hợp hai biện pháp được thực hiện ở cả hai điều kiện nhà lưới và ngoài đồng.

1.6 Ý nghĩa khoa học và thực tiễn

1.6.1 Ý nghĩa khoa học

Nghiên cứu đã xác định được tác nhân vi khuẩn gây bệnh héo xanh trên Cúc là loài *Ralstonia solanacearum*.

Nghiên cứu đã xác định được hiệu quả của TKT, tác nhân phòng trừ sinh học mới tại Việt Nam, trong kiểm soát bệnh héo xanh do vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* trên cây hoa Cúc. Kết quả của nghiên cứu cung cấp thông tin khoa học có giá trị cho lĩnh vực nghiên cứu phòng trừ sinh học bệnh hại cây trồng do tác nhân vi khuẩn tại Việt Nam.

1.6.2 Ý nghĩa thực tiễn

Kết quả nghiên cứu cung cấp cơ sở khoa học cho việc ứng dụng TKT trong kiểm soát bệnh héo xanh do *R. solanacearum* gây ra trên cây hoa Cúc trong điều kiện sản xuất thực tế để đạt được hiệu quả cao, qua đó góp phần vào quá trình quản lý dịch hại tổng hợp nhằm phục vụ cho sự phát triển sản xuất hoa kiểng một cách bền vững tại vùng ĐBSCL nói riêng và trên cả nước nói chung.

CHƯƠNG 2: TỔNG QUAN TÀI LIỆU

2.1 KHÁI QUÁT VỀ CÂY HOA CÚC

2.1.1 Nguồn gốc và giá trị sử dụng của cây hoa Cúc

Cây hoa cúc có tên khoa học là *Chrysanthemum* spp. được định nghĩa từ chrysos (vàng) và Anthemum (hoa) bởi Line 1753 (Đông & Lộc, 2003). Theo điều tra hiện nay, trên thế giới Cúc có khoảng 200 loài, các giống loài thuộc chi này chủ yếu sử dụng làm hoa và cây cảnh (Linh, 1998).

Hoa Cúc có nguồn gốc từ Trung Quốc và được trồng cách đây 3000 năm, bắt nguồn từ loài Cúc hoang dại (*Dendranthema*) (Zhenhua & Shouhe, 1995), người ta trồng với mục đích làm dược phẩm. Ở Nhật Bản, cây hoa Cúc được du nhập từ Trung Quốc vào năm 385 (Anderson, 2006). Một bông hoa cúc với 16 cánh hoa đã trở thành biểu tượng của hoàng đế Nhật Bản và nó được mệnh danh là “Hoàng thất quốc hoa” của Nhật Bản. Ngày nay, ngoài Trung Quốc và Nhật Bản thì hoa Cúc đã được du nhập và trồng ở nhiều nước trên thế giới như Hà Lan, Pháp, Đức, Mỹ, Colombia...(Vân & Nga, 2007).



Hình 2.1: Cúc Tiger tại TP Sa Đéc, tỉnh Đồng Tháp



Hình 2.2: Cúc Tím (Thạch Bích) tại tỉnh Bến Tre

Ở Việt Nam Cúc được trồng một phần để thưởng thức, một phần phục vụ việc cúng lễ và một phần dùng làm dược liệu (Đông & Lộc, 2003). Cúc là loại hoa có màu sắc phong phú, hình dáng đa dạng. Hoa Cúc dùng để cắm lọ nhờ cành dài, cứng, lá xanh tươi, hoa đẹp, lâu tàn và khi tàn héo cánh hoa không rụng (Hình 2.1 và Hình 2.2).

2.1.2 Tình hình sản xuất hoa Cúc trong nước và trên thế giới

Trên thế giới cây hoa Cúc được trồng nhiều nhất ở các nước như: Nhật Bản, Trung Quốc, Hà Lan, Pháp, Mỹ. Ở Việt Nam, cây hoa Cúc được nhập nội từ thế kỷ thứ 15. Từ đó đến nay Cúc được trồng rất nhiều bởi vì hoa vừa đẹp, lại vừa nở vào đúng dịp tết Nguyên Đán. Người Việt Nam coi hoa Cúc là biểu tượng của sự thanh cao, là một trong bốn loài thảo mộc được xếp vào hàng tứ quý “Tùng, Cúc, Trúc, Mai” (Hợp, 2000).

Khi xét riêng chi *Chrysanthemum* (Đại Cúc) thì ở Việt Nam có 5 loài, trên thế giới có khoảng 200 loài với hơn 1000 giống. Các giống loài thuộc chi này chủ yếu được sử dụng làm hoa hoặc cây cảnh nên hoa có kích thước từ trung bình đến to, nhiều màu sắc (Linh, 1998). Cây hoa Cúc được trồng tập trung ở các vùng hoa truyền thống như: Đà Lạt và một số tỉnh ĐBSCL (Hình 2.3, Hình 2.4).



Hình 2.3: Ruộng trồng Cúc tại tỉnh
Đồng Tháp



Hình 2.4: Ruộng trồng Cúc tại tỉnh
Bến Tre

2.1.3 Vị trí phân loại và đặc điểm thực vật học

Trong hệ thống phân loại thực vật cây hoa Cúc (*Chrysanthemum* sp.) được xếp vào lớp hai lá mầm Magnoliopsida (Dicotyledones) thuộc phân lớp Cúc (Asteridae), bộ Cúc (Asterales), họ Cúc (Asteraceae), chi *chrysanthemum* (Chi, 2007).

Rễ của cây hoa Cúc thuộc loại rễ chùm, mọc cạn, Cúc trồng chủ yếu bằng nhân giống vô tính. Cây hoa Cúc thường có lá đơn không có lá kèm, mọc so le, bản lá xẻ thùy lông chim, phiến lá mềm mỏng, màu sắc xanh đậm hay nhạt phụ thuộc vào từng giống. Cây thân thảo nhỏ, có nhiều đốt giòn dễ gãy. Mỗi hoa gồm nhiều hoa nhỏ gộp lại trên một cuống hoa, hình thành hoa tụ đầu

trạng mà mỗi đầu trạng là một bông hoa. Hoa Cúc có màu sắc đa dạng: Trắng, vàng, đỏ, tím, hồng, xanh (Đông & Lộc, 2003).

2.1.4 Một số bệnh hại trên cây hoa Cúc

Ở các làng hoa truyền thống của vùng ĐBSCL qua điều tra và giám định đã phát hiện trên cây hoa Cúc có các bệnh hại như: bệnh đốm đen do *Curvularia* sp., bệnh đốm lá do *Cercospora* sp., *Corynespora* sp. và *Phyllosticta* sp., bệnh thán thư do *Colletotrichum* spp., bệnh cháy lá do *Pestalotia* sp., bệnh thối hạch do *Sclerotium* sp., bệnh chết cây (lở cổ rễ) do *Rhizoctonia solani*, bệnh héo rũ do *Fusarium oxysporum*, bệnh rỉ do *Puccinia* sp., bệnh thối hoa do *Rhizopus* sp., bệnh phấn trắng do *Oidium chrysanthemi*., bệnh héo xanh do vi khuẩn *R. solanacearum* là một trong những bệnh quan trọng và phổ biến ở Cúc vùng nhiệt đới ẩm trong đó có Việt Nam. Bệnh gây hại trên nhiều giống Cúc và xuất hiện xuyên suốt từ giai đoạn cây đang tăng trưởng cho đến khi ra hoa. Vi khuẩn xâm nhập và làm tắc bó mạch dẫn khiến cho cây thiếu nước mà rũ xuống, sau đó cây bị chết vì khô (Cúc & Thủy, 2014).

2.2 KHÁI QUÁT VỀ BỆNH HÉO XANH TRÊN CÂY HOA CÚC

2.2.1 Triệu chứng và tác nhân gây bệnh

Bệnh héo xanh do vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* là một trong những bệnh nguy hiểm đối với nhiều loại cây trồng, đặc biệt là những cây họ cà, họ bầu bí, họ đậu và nhiều loại cây trồng khác (Wicker *et al.*, 2007). Bệnh xuất hiện trên cây con và cây lớn từ ra hoa đến thu hoạch. Khi cây còn non toàn bộ lá héo rũ đột ngột và chết nhanh chóng. Trên cây đã lớn thì héo đầu tiên ở các lá ngọn héo rũ có màu xanh tái, sau đó các lá phía dưới, các cành héo dần vào ban ngày và ban đêm có thể hồi phục, cây bị còi cọc, nhưng sau 2 - 5 ngày toàn cây héo hẳn và chết (Agrios, 2005). Trên thân vỏ vẫn còn xanh hoặc xuất hiện những sọc nâu, vỏ thân phía gốc sù sì, thân vẫn rắn chắc. Cắt ngang thân, cành nhìn rõ bó mạch dẫn, mô xylem có màu nâu sẫm, bên trong bó mạch chứa đầy dịch nhờn vi khuẩn, ấn nhẹ vào đoạn cắt hoặc ngâm đoạn cắt có mạch dẫn màu nâu vào cốc nước có thể thấy dịch vi khuẩn màu trắng sữa từ trong chảy qua miệng cắt ra ngoài. Đặc điểm này được xem là một cách chẩn đoán nhanh bệnh héo do vi khuẩn. Khi cây đã héo, nhổ lên thấy rễ bị thâm đen, thối hồng (Mân, 2007). Cho đến nay, bệnh rất phổ biến ở hầu hết các nước thuộc châu Á, Phi, Mỹ, Úc, bệnh gây hại nghiêm trọng chủ yếu ở các nước vùng nhiệt đới có khí hậu nóng, ẩm. Phạm vi kí chủ rộng gây hại trên

250 loài cây trồng thuộc khoảng 50 họ thực vật khác nhau (Guidot *et al.*, 2014)

2.2.2 Vị trí phân loại vi khuẩn *Ralstonia solanacearum*

Ban đầu vi khuẩn được Smith đặt tên là *Bacillus solanacearum*, sau được đổi thành *Pseudomonas solanacearum*, nhưng do *Pseudomonas solanacearum* không tạo được các sắc tố huỳnh quang nên được xếp vào chi *Burkholderia* và mang tên *Burkholderia solanacearum* (Yabuuchi *et al.*, 1992), các nghiên cứu phân loại sau đó lại chứng minh vi khuẩn hoàn toàn khác với các vi khuẩn thuộc chi *Burkholderia* và thuộc chi *Ralstonia*, dựa trên các nghiên cứu phân loại mới này nên đã đổi tên lại là *Ralstonia solanacearum* (Yabuuchi *et al.*, 1995).

Theo hệ thống phân loại hiện nay thì vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* thuộc:

Giới: Bacteria

Ngành: Proteobacteria

Lớp: β -proteobacteria

Bộ: Burkholderiales

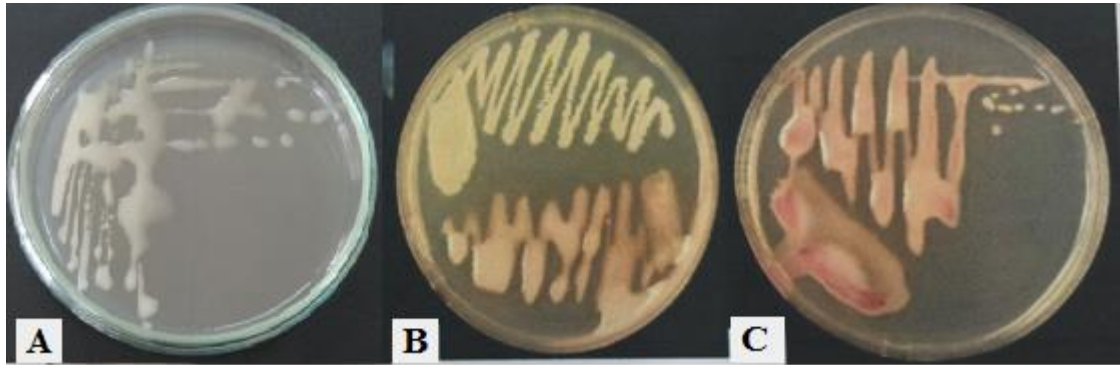
Họ: Ralstoniaceae

Chi: *Ralstonia* (Yabuuchi *et al.*, 1995; Tahat & Sijam, 2010).

2.2.3 Đặc điểm hình thái, sinh học và lây lan của vi khuẩn *Ralstonia solanacearum*

Vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* Gram âm, hình gậy 0,5-0,7 \times 1,5-2,0 μ m, hiếu khí, không hình thành bào tử, có 1-3 chiên mao ở đỉnh đầu để chuyển động. Các mẫu phân lập có độc tính cao phần lớn không có lông roi và không di động, ngược lại những mẫu phân lập có độc tính thấp thường có từ 1 đến 4 lông roi mọc đối nhau, có mức di động cao và đều có các lông roi nhỏ ở rìa (Mehan *et al.*, 1994; Anitha *et al.*, 2003, trích dẫn bởi Ngôn, 2015). Vi khuẩn phát triển thích hợp ở pH 7 - 7,2. Nhiệt độ thích hợp 25 - 30°C, nhiệt độ tối thiểu 10°C, tối đa 41°C. Nhiệt độ gây chết 52°C.

Trên môi trường King's B, khuẩn lạc có màu trắng kem nhẵn bóng, hơi chảy, nhòn (tính độc cao), môi trường TZC thì có màu hồng ở giữa và rìa trắng. Khuẩn lạc ban đầu có màu trắng sáng, mịn và trắng đục, nhưng trở nâu khi khuẩn lạc già. Nếu dòng phân lập vi khuẩn chuyển sang kiểu khuẩn lạc nâu, răn reo là dòng vi khuẩn mất tính độc (Hình 2.5).

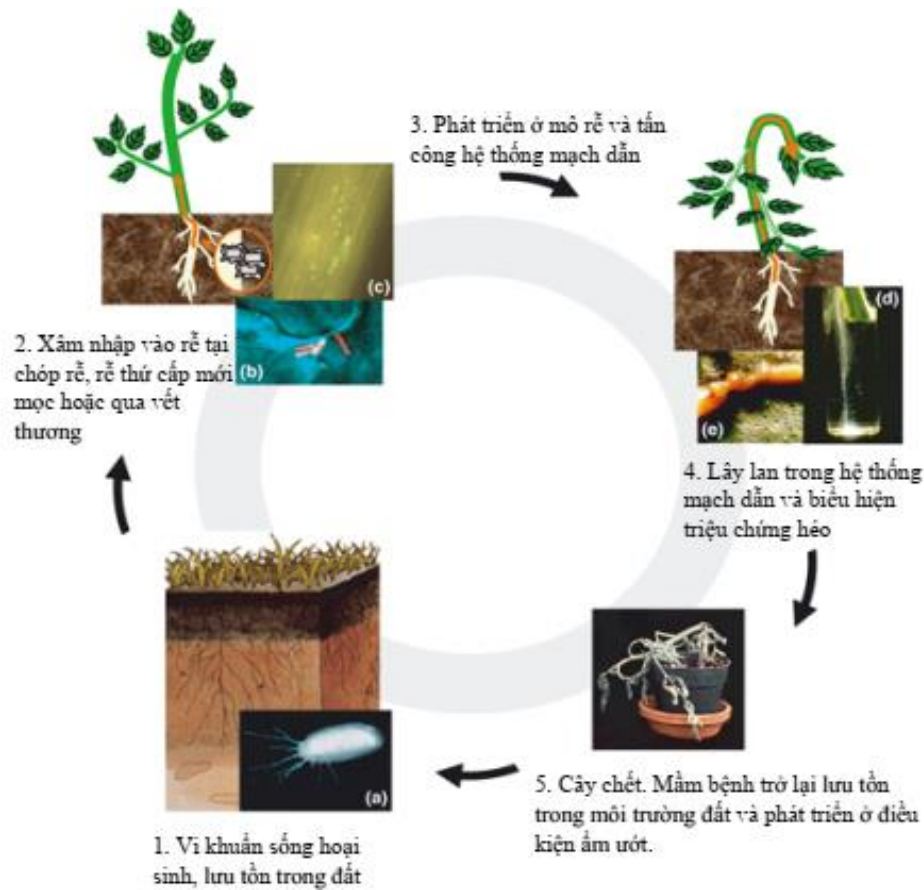


Hình 2.5: Khuẩn lạc vi khuẩn *R. solanacearum* trên một số loại môi trường (A) môi trường King's B; (B) môi trường CPG (không có tính độc ở trên, có tính độc ở dưới); (C) môi trường TZC (tetrazolium chloride) (Champoiseau & Momol, 2008).

Để phát hiện dòng vi khuẩn có tính độc thường dùng môi trường chọn lọc TZC (Tetrazolium Chloride), trên môi trường này dòng vi khuẩn có tính độc sẽ có khuẩn lạc ở giữa màu hồng rìa trắng (Hình 2.5) (Mân, 2007).

Vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* lưu truyền sang vụ sau qua đất, tàn dư thực vật, hạt giống, củ giống (khoai tây). Nhiều loài cỏ dại cũng là ký chủ của loài vi khuẩn này, chúng là cầu nối giữa nguồn bệnh với cây trồng. Ở Indonesia và Trung Quốc, hạt Lạc thu từ những cây nhiễm bệnh có thể truyền bệnh cho vụ sau. Vi khuẩn tồn tại trên vỏ hạt và trong phôi hạt (Hình 2.6) (Middleton & Hayward, 1990).

Vi khuẩn *R. solanacearum* lưu tồn trong đất rất lâu. Ở đất cát có thể tìm thấy vi khuẩn này dưới độ sâu 60 cm. Vi khuẩn tồn tại lâu trong đất khi trồng liên tục cây ký chủ nhiễm bệnh hoặc có sự kết hợp với cây ký chủ khác xen kẽ trên đồng ruộng. Độ ẩm đất cũng ảnh hưởng tới khả năng sinh sản và lưu tồn của vi khuẩn. Vi khuẩn tồn tại tốt ở đất đủ ẩm, thoáng khí, nhưng bị kìm hãm ở đất khô và đất bị ngập nước. Vi khuẩn có khả năng trú đông, lưu tồn, tiềm sinh ở trong rễ cây và cây dại ở trong đất. Khi mầm bệnh lưu tồn trong đất chịu ảnh hưởng của các yếu tố lý học, hóa học và sinh học, các yếu tố này có thể làm rút ngắn thời gian lưu tồn hoặc làm cho mầm bệnh kéo dài thời gian tiềm sinh của chúng. Ở trong đất vi khuẩn có thể tồn tại 5-6 năm hoặc 6-7 tháng tùy vào nhiệt độ, ẩm độ, loại đất, các yếu tố sinh vật và các yếu tố khác (Hình 2.6) (Cường, 2008).



Hình 2.6: Chu kỳ phát triển và lưu tồn của *R. solanacearum* (Genin, 2010)

Vi khuẩn gây bệnh không tồn tại trong hạt giống khi ẩm độ trong hạt dưới 8-9% sau khi sấy khô ở nhiệt độ phòng hoặc dưới 10% sau khi phơi khô bằng ánh sáng mặt trời (Zhang *et al.*, 1993). Vi khuẩn *R. solanacearum* cũng có giai đoạn ngoại sinh (epiphyte), là giai đoạn vi khuẩn có thể tồn tại bên ngoài cây trồng. Giai đoạn này có tầm quan trọng thứ yếu trong dịch tễ học của tác nhân gây bệnh vì vi khuẩn không thể tồn tại bên ngoài cây trồng trong thời gian dài khi tiếp xúc dưới điều kiện nóng và ẩm độ dưới 9,5% (Champoiseau & Momol, 2008).

Vi khuẩn gây bệnh có thể lan truyền chủ động trong đất, nước...di động nhờ có roi lan truyền ra chung quanh nhưng chỉ trong phạm vi nhỏ và với tốc độ chậm. Ngoài ra, bệnh còn có thể lan truyền thụ động nhờ gió, đất, con người (Hình 2.6) (Kim, 2006). Vi khuẩn *R. solanacearum* lây lan chủ yếu qua đất nhưng cũng dễ dàng truyền lan theo nguồn nước, mưa, gió, vết thương cơ giới, qua dụng cụ sản xuất của con người, cũng có thể qua vết thương ở rễ do côn trùng và tuyến trùng gây ra (Middleton & Hayvard, 1990). Vi khuẩn còn lan truyền thông qua các hạt giống, hom giống và củ giống bị nhiễm bệnh (Sharma & Rana, 1999).

Vi khuẩn *R. solanacearum* tồn tại trong đất sẽ xâm nhiễm vào cây qua các vết xây xát côn trùng chích hút. Rễ non đâm ra, những vi khuẩn này xâm nhiễm vào rễ, thân non, cuống lá qua các vết thương cơ giới, do côn trùng hoặc tuyến trùng tạo ra do chăm sóc vun trồng. Vi khuẩn cũng có thể xâm nhập qua lỗ hở tự nhiên. Sau khi đã xâm nhập vào rễ lan tới các bó mạch dẫn xylem, sinh sản phát triển ở trong đó, sản sinh ra các men pectinaza và cellulaza để phân hủy mô, sinh ra các độc tố ở dạng exopolysaccarit (EPS) và lipopolysaccarit (LPS) làm tắc nghẽn mạch dẫn cản trở sự vận chuyển nước và nhựa trong cây, dẫn tới cây héo nhanh chóng (Cook, Sequeira, 1991 trích dẫn bởi Mân, 2007).

2.2.4 Ảnh hưởng của điều kiện ngoại cảnh đến sự phát sinh phát triển của bệnh

Bệnh phát triển mạnh và nhanh trong điều kiện nhiệt độ cao, mưa gió, nhất là ở trên đất cát pha, thịt nhẹ hoặc đất đã nhiễm vi khuẩn, trồng các giống mẫn cảm từ trước. Nhiệt độ là yếu tố quan trọng ảnh hưởng tới sự phát sinh phát triển của bệnh. Nhiệt độ thích hợp nhất là lớn hơn 30°C. Triệu chứng xuất hiện rõ trên cây khi mà nhiệt độ ít nhất phải trên 20°C và nhiệt độ đất phải trên 14°C, ẩm độ cao, tưới nhiều, tưới ngập rãnh đều là điều kiện tốt cho bệnh xâm nhiễm, phát triển mạnh, dễ lan truyền (Mân, 2007).

2.2.5 Biện pháp phòng trị bệnh héo xanh do vi khuẩn *Ralstonia solanacearum*

Vi khuẩn *R. solanacearum* gây bệnh héo xanh có khả năng tồn tại rất lâu trong đất, trong tàn dư, giống nhiễm bệnh. Phổ biến nhất vẫn là các cây kí chủ thuộc họ cà, họ đậu, bầu bí, họ cúc. Vì vậy để phòng trừ bệnh hiệu quả cần áp dụng các biện pháp phòng trừ tổng hợp như: chọn giống cây sạch bệnh, ngâm liếp ngập nước trong 2 tuần (tạo điều kiện yếm khí) sẽ hạn chế được sự phát triển của mầm bệnh (Burgess *et al.*, 2009), trước khi trồng thu gom sạch sẽ tàn dư của cây trồng ở vụ trước, làm luống cao để thoát nước, không trồng quá dày, tăng cường bón phân hữu cơ hoại mục. Chọn giống kháng bệnh, đặc biệt là gốc ghép kháng có khả năng kiểm soát tốt mầm bệnh (Caldwell *et al.*, 2017).

Trong quá trình chăm sóc tránh tạo vết thương cơ giới cho cây, kiểm tra ruộng thường xuyên để phát hiện sớm và nhổ bỏ cây bị bệnh ra khỏi ruộng để tiêu hủy (Viên & Dũng, 2013).

Sử dụng một số vi khuẩn đối kháng như: *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens* để xử lý hạt trước khi gieo, nhúng rễ cây con trước khi trồng hoặc

đưa vi sinh vật đối kháng vào vùng rễ sau trồng làm ức chế, cạnh tranh và tiêu diệt vi khuẩn *R. solanacearum* bước đầu mang lại hiệu quả (Thắng và *ctv.*, 2011).

Một số nghiên cứu bước đầu cho thấy thực khuẩn thể có khả năng xâm nhiễm vi khuẩn *R. solanacearum* gây bệnh héo xanh trên một số cây trồng. Tanaka *et al.* (1990) đã khống chế bệnh héo xanh vi khuẩn *R. solanacearum* trên thuốc lá bằng cách áp dụng một chủng không độc của *R. solanacearum* và thực khuẩn thể của nó đạt được hiệu quả đối với cả chủng vi khuẩn độc lực cao, làm giảm 82% số lượng cây bị héo. Addy (2012) đã khống chế bệnh héo xanh vi khuẩn *R. solanacearum* trên cà chua bằng cách áp dụng thực khuẩn thể Φ RSM ở giai đoạn cây non trước khi trồng và các thực khuẩn thể này kiểm soát vi khuẩn *R. solanacearum* rất hiệu quả.

Do vi khuẩn *R. solanacearum* ký sinh trong mạch dẫn của cây và có khả năng lưu tồn trong đất rất lâu nên việc phòng trừ bệnh héo xanh vi khuẩn là vấn đề rất khó khăn. Các thuốc trừ khuẩn tiếp xúc hiện có trên thị trường ít có hiệu quả trong việc hạn chế bệnh này, bởi vì khi xuất hiện triệu chứng héo là cây đã bị nặng, rất khó trị. Cây chưa thể hiện triệu chứng nhưng có thể vi khuẩn đã tấn công và ký sinh trong bó mạch dẫn. Do đó nên tiêu hủy cây bệnh và phun thuốc trừ khuẩn có tác dụng lùn dẫn hoặc nội hấp để điều trị mới mang lại hiệu quả. Khi bệnh héo xanh vi khuẩn đã xuất hiện, việc kiểm dịch cần phải được áp dụng triệt để, nhằm tránh sự lây lan của vi khuẩn gây bệnh ra các cây khác chưa nhiễm bệnh. Vì vậy biện pháp quản lý tổng hợp là rất cần thiết trong việc giảm sự lây lan và phòng trừ bệnh héo xanh do vi khuẩn *R. solanacearum* (Burgess *et al.*, 2009).

2.3 KHÁI QUÁT VỀ THỰC KHUẨN THỂ TRONG PHÒNG TRỪ SINH HỌC

2.3.1 Khái niệm phòng trừ sinh học

Phòng trừ sinh học được định nghĩa là việc áp dụng các sinh vật sống để ngăn chặn quần thể của một loài sinh vật gây hại cụ thể, làm cho nó ít phong phú hơn hoặc ít gây thiệt hại hơn so với đặc tính vốn có (Eilenberg *et al.*, 2001) hay còn được hiểu là sử dụng sinh vật ký sinh, bắt mồi, sinh vật đối kháng, hoặc những quần thể cạnh tranh để ngăn chặn quần thể dịch hại, làm cho nó ít phong phú hơn hoặc tác hại ít hơn so với khi không có các tác nhân phòng trừ sinh học (Norris *et al.*, 2003).

Biện pháp sinh học trong phòng trừ bệnh cây là điều khiển môi trường, cây trồng và sinh vật đối kháng một cách thích hợp, để tạo nên một thế cân

bằng sinh học cần thiết, giúp giảm mật số của mầm bệnh xuống dưới ngưỡng gây hại. Nhờ đó, bệnh của cây trồng chỉ xuất hiện ở mức độ nhẹ, không gây ảnh hưởng về kinh tế. Biện pháp sinh học không có mục đích tiêu diệt toàn bộ mầm bệnh và cũng không có khả năng này (Kim, 2000).

Trong bệnh học thực vật, thuật ngữ phòng trừ sinh học được dùng khi sử dụng vi sinh vật để ngăn chặn sự phát triển của bệnh cây trồng hay kiểm soát mật số quần thể sinh vật gây bệnh (Pal & Gardener, 2006), trong trường hợp đó, các vi sinh vật không chế mầm bệnh được gọi là các tác nhân phòng trừ sinh học. Tác nhân phòng trừ sinh học được sử dụng có thể là nấm, vi khuẩn, tuyến trùng, virus,... hầu hết đều sống trong đất và không gây hại đối với chim, cá hay các sinh vật khác.

2.3.2 Khái quát về lịch sử nghiên cứu thực khuẩn thể và những ứng dụng của thực khuẩn thể trong kiểm soát mầm bệnh do vi khuẩn

2.3.2.1 Tình hình nghiên cứu và ứng dụng trên thế giới

Thực khuẩn thể (bacteriophage hay gọi tắt là phage) là một virus “ăn” vi khuẩn, chúng chỉ ký sinh và sao chép ở bên trong tế bào vi khuẩn kí chủ nhưng không gây ảnh hưởng vi khuẩn khác loài hay các sinh vật khác. Thuật ngữ này được bắt nguồn từ “bacteria - vi khuẩn” và “phagein” trong tiếng Hy Lạp có nghĩa là “nuốt chửng” (Grath & Sinderen, 2007), chúng xâm nhập vào tế bào vi khuẩn ngăn cản sự trao đổi chất và cuối cùng là phân giải vi khuẩn (Kurtboke, 2012).

Năm 1923, Viện Eliava đã được xây dựng ở Tbilisi, Gegergia để nghiên cứu về thực khuẩn thể và phát triển các liệu pháp thực khuẩn thể. Kể từ đó, liệu pháp thực khuẩn thể được nhiều nhà khoa học quan tâm nghiên cứu để chữa một số bệnh do vi khuẩn như: khuẩn tả, thương hàn, dịch hạch, các tụ cầu khuẩn, liên cầu,... trên người, động vật và cũng được sử dụng cho nhiều mục đích khác nhau. Ngoài ra, một số công ty cũng bắt đầu sản xuất thương mại các chế phẩm thực khuẩn thể để kiểm soát các loại vi khuẩn gây bệnh (trích dẫn Kurtboke, 2012).

Kể từ sau thập niên 40 của thế kỷ trước, liệu pháp thực khuẩn thể được nghiên cứu rất rộng rãi như là một phương tiện để kiểm soát dịch bệnh vi khuẩn trên cây trồng (Goto, 1992). Bergamin & Kimati (1981) đã nghiên cứu ảnh hưởng của thời gian xử lý thực khuẩn thể đến hiệu quả của việc kiểm soát bệnh vi khuẩn trên cây trồng trong các thử nghiệm ở nhà lưới với hai loại bệnh: thối đen bắp cải (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) và đốm vi khuẩn trên tiêu (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*), thực khuẩn thể

được xử lý một lần và thay đổi từ bảy ngày trước lây bệnh đến bốn ngày sau khi lây bệnh. Trên cải bắp, bệnh giảm đáng kể nếu xử lý thực khuẩn thể từ ba ngày trước khi lây bệnh đến một ngày sau khi lây bệnh, trong khi trên ớt là từ ba ngày trước lây bệnh đến ngày lây bệnh và hiệu quả giảm bệnh lớn xảy ra khi xử lý thực khuẩn thể và vi khuẩn gây bệnh cùng ngày với nhau đối với cả hai loại bệnh (Balogh *et al.*, 2009). Schnabel *et al.*, (1999) cũng đã ghi nhận một sự giảm đáng kể (37%) của bệnh bạc lá trên hoa táo khi xử lý hỗn hợp ba dòng thực khuẩn thể cùng lúc với các tác nhân gây bệnh (*Erwinia amylovora*), ngược lại, không có hiệu quả giảm bệnh khi thực khuẩn thể được xử lý một ngày sau khi lây bệnh. Balogh *et al.*, (2009) nhận thấy rằng một hỗn hợp thực khuẩn thể kiểm soát hiệu quả vi khuẩn đốm lá cà chua nếu được dùng ở nồng độ 10^6 hoặc 10^8 PFU/mL, nhưng không có hiệu quả tại 10^4 PFU/mL. Jackson (1989) đã phát triển một chiến lược để ngăn chặn sự xuất hiện của thể đột biến có khả năng kháng sự tấn công của thực khuẩn thể. Điều này liên quan đến việc sử dụng hỗn hợp của nhiều thực khuẩn thể đã đột biến có khả năng tấn công những dòng vi khuẩn kháng thực khuẩn thể ban đầu, trong khi vẫn duy trì các thực khuẩn thể có thể ký sinh trên các vi khuẩn tự nhiên. Sử dụng chiến lược này, một hỗn hợp của bốn thực khuẩn thể bao gồm cả tự nhiên và đột biến được áp dụng hai lần một tuần đã kiểm soát bệnh tốt hơn đáng kể và năng suất trên các loại cây ăn trái cao hơn so với khi sử dụng copper-mancozeb (Flaherty *et al.*, 2000).

TKT cũng được sử dụng để khống chế bệnh đốm lá vi khuẩn như một mô hình của chiến lược quản lý tổng hợp và phát triển toàn diện cho các bệnh vi khuẩn trên lá. Họ áp dụng kết hợp thực khuẩn thể với các chất kích kháng lưu dẫn (SAR – systemic acquired resistance), vi khuẩn vùng rễ kích thích cây trồng tăng trưởng (PGPR – plant growth promoting rhizobacteria) và vi khuẩn đối kháng để kiểm soát bệnh. Họ đã kiểm soát bệnh tốt hơn và hiệu quả cao hơn khi kết hợp các TKT với chất kích kháng lưu dẫn (Obradovic *et al.*, 2004, 2005). Một nghiên cứu tương tự đã đánh giá hiệu quả khi kết hợp TKT với acibenzolar-*S*-methyl (chất kích kháng lưu dẫn), hoặc với đồng mancozeb đều cho thấy sự tăng cường khả năng kiểm soát đối với *Xanthomonas* sp. gây cháy lá hành tây (Lang *et al.*, 2007). Bệnh cháy lá trên Lê do vi khuẩn *Erwinia amylovora* gây ra cũng đã được làm giảm bằng cách đồng thời áp dụng vi khuẩn đối kháng (*Pantoea agglomerans*) và TKT, cả hai đều tấn công và gây giảm mật số tác nhân gây bệnh tốt hơn so với khi điều trị bằng streptomycin (Svircev *et al.*, 2006). Trong nghiên cứu của Iriarte *et al.*, (2007) mật số TKT đã giảm mạnh trong những giờ đầu buổi chiều nhưng tiếp tục tồn tại ở mức cao khi áp dụng vào đầu buổi tối và đã được chứng minh là liên quan chặt chẽ

với cường độ chiếu xạ tia cực tím từ ánh sáng mặt trời. Tương tự, Balogh *et al.*, (2009) đã chứng minh rằng khi xử lý TKT vào buổi tối thì hiệu quả kiểm soát bệnh do vi khuẩn trên cà chua cao hơn khi xử lý vào buổi sáng, số liệu tương ứng là 26,9 % và 13,1 %.

2.3.2.2 Tình hình nghiên cứu và ứng dụng ở Việt Nam

Ở Việt Nam việc nghiên cứu và ứng dụng TKT để phòng trị các tác nhân vi khuẩn gây bệnh trên cây trồng còn rất hạn chế, nhưng bước đầu có một số nghiên cứu sau:

Nga & Tâm (2014) bước đầu đã phân lập và đánh giá khả năng ký sinh của một số dòng TKT của vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. Có 7 TKT đã được phân lập từ 24 mẫu bệnh do vi khuẩn trên lá ở 5 tỉnh đồng bằng sông Cửu Long, trong đó TKT P-KG4 phân lập từ Kiên Giang cho thấy khả năng phân giải tế bào vi khuẩn cao nhất với đường kính 15,5 mm ở 60 giờ sau khi nhân nuôi.

Giang và *ctv.* (2014) đã phân lập và tuyển chọn được 4 dòng TKT có khả năng ký sinh nhiều dòng vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* gây bệnh cháy bìa lá trên lúa. Kết quả đánh giá hiệu quả phòng trừ trong điều kiện nhà lưới cho thấy cả 4 dòng TKT 10, 12, 13 và 17 qua hai biện pháp xử lý phun trước hoặc phun sau với mật số 10^8 PFU/mL đều thể hiện hiệu quả giảm bệnh cháy bìa lá lúa.

Huy và *ctv.* (2016) đã phân lập và nghiên cứu hiệu quả phòng trị của TKT đối với bệnh thối hạt lúa trong điều kiện nhà lưới do vi khuẩn *Burkholderia glumae* gây ra. Kết quả ghi nhận khi phun huyền phù TKT Φ VL34 với mật số khác nhau 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 PFU/mL lên bông lúa đều thể hiện hiệu quả giảm bệnh so với nghiệm thức không xử lý TKT, trong đó mật số 10^8 PFU/mL cho hiệu quả cao nhất.

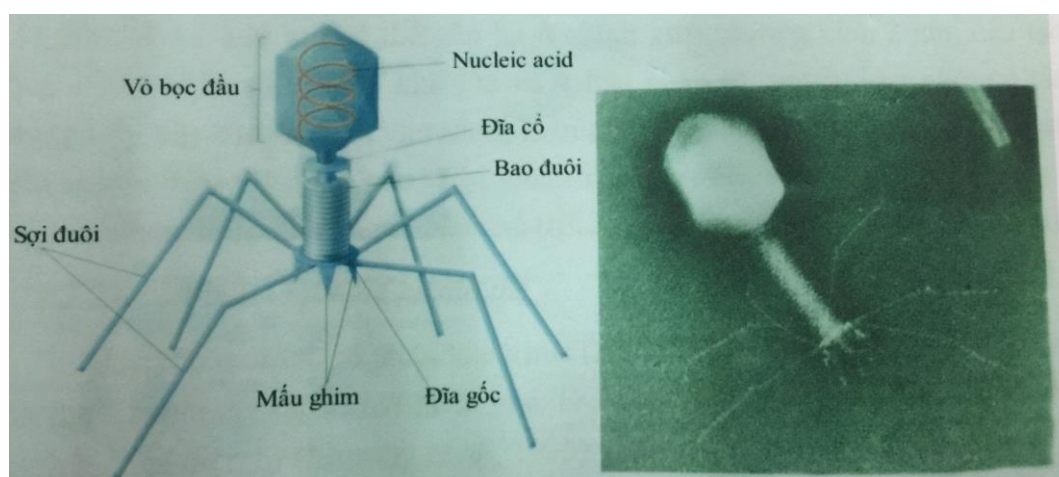
Vân và *ctv.* (2019a) đã phân lập TKT từ đất trồng cây dược liệu có khả năng ức chế vi khuẩn *R. solanacearum* ở một số tỉnh ĐBSCL, ba mươi lăm dòng TKT có khả năng ức chế vi khuẩn *R. solanacearum* đã được phân lập từ mẫu đất trồng cây dược liệu như cây gừng (*Zingiber officinale*), nghệ (*Curcuma longa* L.), húng chanh (*Coleus aromaticus* Benth) và đinh lăng (*Polyscias fruticosa* L.). Kết quả đánh giá phổ ký chủ của các dòng thực khuẩn thể phân lập cho thấy có 29 dòng TKT tạo vết tan rõ ràng đối với 9 dòng vi khuẩn gây bệnh *R. solanacearum*. Đặc biệt 7 dòng TKT ký hiệu Φ G7, Φ G8, Φ DL3, Φ DL6, Φ H6, Φ H23 và Φ H24 có khả năng phân giải vi khuẩn hơn 72 giờ trong điều kiện phòng thí nghiệm.

Kiểm soát dịch bệnh cây trồng dựa trên thực khuẩn thể là một lĩnh vực đang phát triển nhanh chóng trong nghiên cứu. Một loạt các chiến lược đã được sử dụng để tăng hiệu quả kiểm soát. Liệu pháp TKT hiện đang được sử dụng trong các nhà kính và các cánh đồng sản xuất ở Florida như là một phần của một chương trình quản lý tổng hợp tiêu chuẩn để quản lý bệnh đốm lá cà chua (Balogh *et al.*, 2009). Với những kết quả ban đầu đầy hứa hẹn, thực khuẩn thể đã được coi là một phương tiện hiệu quả, đáng tin cậy để kiểm soát vi khuẩn gây bệnh thực vật và trở thành một lĩnh vực có triển vọng, phát triển nhanh chóng ở trong nước và trên toàn thế giới.

2.3.3 Đặc điểm của thực khuẩn thể

TKT rất thường gặp trong tự nhiên, là loại sinh vật phổ biến và đa dạng nhất. Chúng tồn tại rất phong phú trong tất cả sinh vật sống: động vật, thực vật, côn trùng, vi khuẩn (Kurtboke, 2012) và có liên quan trực tiếp đến mật số của vi khuẩn ký chủ. Không có vi khuẩn nào trong đất mà không có loài TKT tương ứng.

TKT có bộ gen cấu tạo từ các acid nucleic là DNA hoặc RNA có sợi đơn hay sợi đôi dưới dạng mạch vòng hay mạch thẳng, được bao bọc bởi lớp vỏ protein (capsid) và đôi khi có các lớp màng bao bọc cấu tạo phức tạp gồm các carbohydrat, lipid, protein. Với sự khám phá của kính hiển vi điện tử, TKT được quan sát đầu tiên vào năm 1940. Sau đó, các nghiên cứu về hình thái của TKT đã được thực hiện, TKT có hình dạng tròn hoặc hình bầu dục dưới dạng que dày hay mỏng dài, có thể linh động hoặc cứng, có kích thước dao động từ 20 nm đến 500 nm. Một số TKT có đầu đa diện và có đuôi (Hình 2.7) (Kurtboke, 2012).



Hình 2.7: Cấu trúc của thực khuẩn thể T4 (Trái); thực khuẩn thể T4 dưới kính hiển vi điện tử (phải) (Kurtboke, 2012)

Bộ gen của TKT có thể mã hóa từ một vài gen cho đến hàng trăm gen nằm ở giữa tạo thành lõi, là nơi lưu trữ thông tin di truyền và điều khiển quá trình tổng hợp các thành phần cấu tạo nên thực khuẩn thể khi đã xâm nhập vào tế bào chủ (Hình 2.7) (Grath & Sinderen, 2007).

Vỏ capsid bên ngoài bao gồm các đơn vị capsome (hạt capsid) được cấu tạo từ protein chúng mang các kháng nguyên có chức năng bảo vệ và giúp thực khuẩn thể bám vào tế bào chủ. Hình thái của chúng được quan sát dưới kính hiển vi điện tử có dạng đối xứng xoắn, đối xứng 20 mặt (đối xứng đẳng trục) hoặc đối xứng phức hợp (Hình 2.7) (Hòa & Sơn, 2008). Khi quan sát đồng thời của các hạt có hình lục giác và ngũ giác đã thu được dạng hình khối hai mươi mặt của vỏ capsid (Ackermann, 2009).

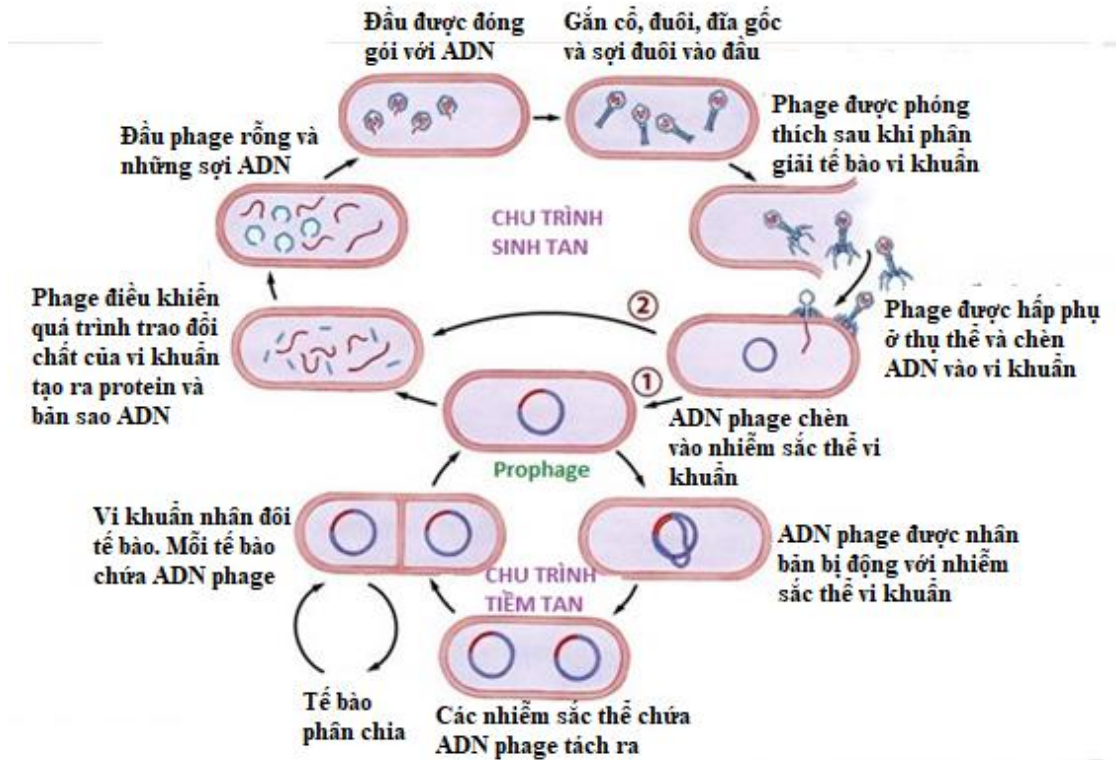
Lõi acid nucleic và vỏ capsid hợp lại với nhau tạo thành một cấu trúc gọi là nucleocapsid, một kết cấu cơ bản của thực khuẩn thể. Ở một số thực khuẩn thể khá phức tạp, bên ngoài vỏ capsid còn có một màng bao (hay còn gọi là vỏ ngoài) cấu tạo bởi chuỗi polypeptide hay lipoprotein. Màng bao thực chất là màng tế bào của vật chủ nhưng đã bị cải tạo để mang tính kháng nguyên đặc trưng cho TKT, có thể bị phá hủy bởi các dung môi hòa tan lipid (cồn, ether,...) (Hòa & Sơn, 2008).

TKT nhân mật số bên trong vi khuẩn sau khi đưa vật liệu di truyền vào bên trong tế bào chất của vi khuẩn (Grath & Sinderen, 2007). Các tính năng chính của TKT là làm tan tế bào. Một số TKT có thể gây nhiễm độc mãn tính suốt đời đối với vi khuẩn, TKT vẫn tiếp tục tái tạo cơ thể mới mặc dù cơ chế phòng vệ của ký chủ vẫn còn tồn tại (Kurtboke, 2012).

Các TKT tồn tại dưới hai giai đoạn trong vòng đời của chúng: bên ngoài và bên trong các tế bào của vật chủ. Ở bên ngoài tế bào chúng tồn tại dưới dạng nghỉ trong một thời gian dài ở điều kiện khắc nghiệt, lúc đó chúng được gọi là những thực thể trơ (virion) không có khả năng sinh sản bởi thiếu các nguyên liệu và thiết bị để tự tái tạo bộ gen và các protein cần thiết. TKT có hai cơ chế xâm nhiễm đặc trưng: làm tan tế bào (lytic), không làm tan tế bào (lysogenic), tương ứng với hai chu trình sinh sản của TKT: chu trình sinh tan (lytic cycle) và chu trình tiềm tan (lysogenic cycle) (Hình 2.8) (Kurtboke, 2012).

TKT độc (virulent phage) là TKT khi ký sinh và xâm nhiễm vào tế bào vi khuẩn chỉ xảy ra chu trình phân giải hay còn gọi chu trình sinh tan. TKT sẽ bơm DNA của chúng vào tế bào vi khuẩn rồi điều khiển tế bào vi khuẩn tổng hợp lõi acid nucleic và vỏ capsid sau đó ráp chúng lại thành nhiều TKT mới,

sau đó những TKT đó phá vỡ tế bào vi khuẩn và được phóng thích ra bên ngoài, quá trình này được xảy ra trong vài phút đến vài giờ tùy loại TKT (Hình 2.8) (Kutter & Sulakvelidze, 2004).



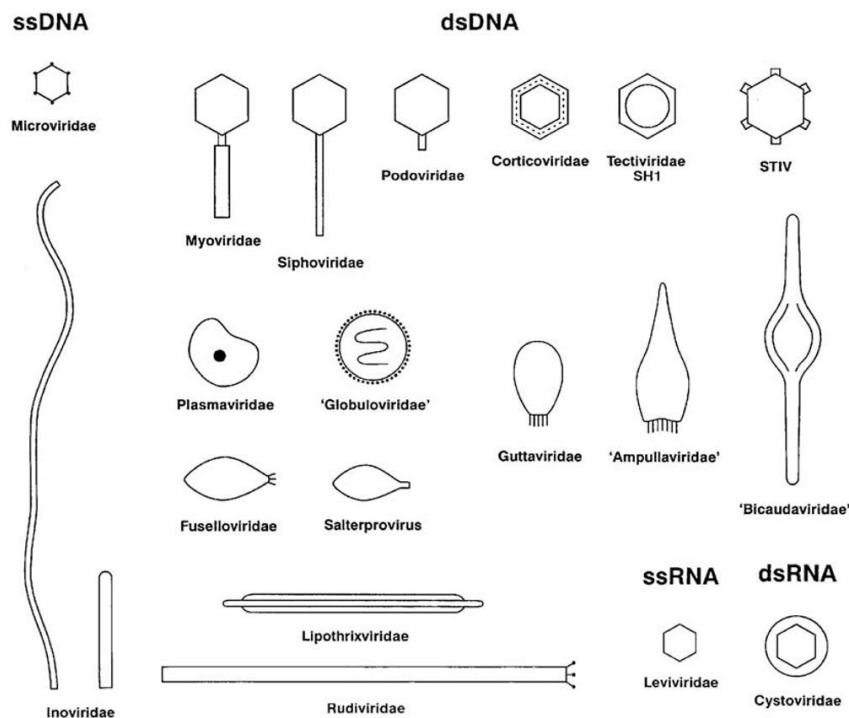
Hình 2.8: Chu trình sinh tan và chu trình tiềm tan (Kurtboke, 2012)

TKT ôn hòa (temperate phage) là TKT mà trong quá trình ký sinh của chúng có diễn ra chu trình tiềm tan. Bộ gen của thực khuẩn thể sẽ tích hợp vào bộ gen của vi khuẩn, tại đó gen của TKT được sao chép bị động khi bộ gen vi khuẩn tái bản, lúc này TKT tương đối vô hại, thậm chí có thể xem chúng như một plasmid. TKT sẽ không hoạt động cho đến khi môi trường sống của vi khuẩn trở nên xấu đi (thiếu chất dinh dưỡng, nhiều độc chất,...) sau đó, thể tiềm phage (prophages) sẽ bắt đầu chu trình phân giải để hình thành TKT mới và giết chết tế bào ký chủ. Ở giai đoạn tiềm tan, vi khuẩn vẫn còn tồn tại và sinh sản, chúng chỉ bị biến đổi các đặc tính di truyền (Hình 2.8) (Kutter & Sulakvelidze, 2004).

Để phân biệt được TKT độc hay ôn hòa, phương pháp giải trình tự bộ genome của TKT được áp dụng, TKT ôn hòa sẽ có sự hiện diện gen quy định enzyme integrase giúp TKT chèn nucleic acid của chúng vào bộ sợi nhiễm sắc thể của vi khuẩn (Sabour & Griffiths, 2010).

2.3.4 Phân loại thực khuẩn thể

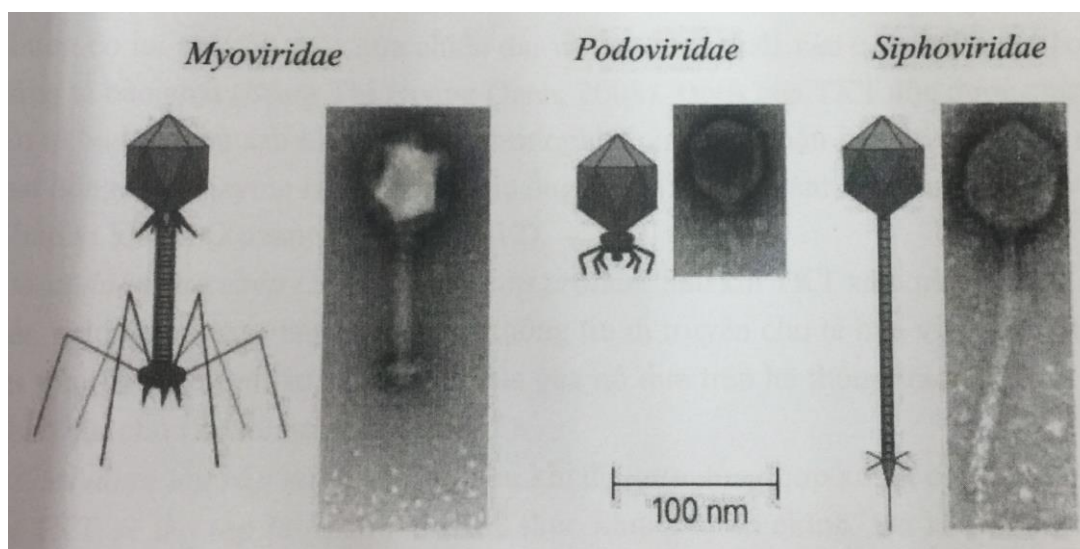
Trong tự nhiên, các TKT đa dạng về virion, bộ gen, cách thức tồn tại,... Ủy ban Quốc tế về phân loại virus (ICTV: International Committee on Taxonomy of Viruses) đã phân loại thực khuẩn thể dựa trên hình thái và acid nucleic. Có tất cả 19 họ được ICTV công nhận là có khả năng ký sinh trên vi khuẩn và vi khuẩn cổ. Trong số đó, chỉ có 2 họ có bộ gen là ARN, 5 họ được bao bọc bên ngoài (có vỏ ngoài). Trong số những họ có vật liệu di truyền là ADN thì chỉ có hai họ là sợi đơn; 8 họ có bộ gen là dạng vòng trong khi 9 họ còn lại là ADN dạng thẳng. Có 9 họ không gây bệnh trên vi khuẩn cổ, 9 họ chỉ gây bệnh trên vi khuẩn cổ và riêng họ Tectiviridae là gây bệnh trên cả vi khuẩn và vi khuẩn cổ (Hình 2.9) (Grath & Sinderen, 2007).



Hình 2.9: Hình thái các nhóm thực khuẩn thể cơ bản (Ackermann, 2009)

Dựa vào hình thái, thực khuẩn thể có thể có dạng sợi xoắn hay không xoắn, không đuôi hoặc có đuôi, và thậm chí một số thực khuẩn thể với một vỏ bọc chứa lipid hoặc có chứa chất béo trong vỏ hạt. Điều này làm cho thực khuẩn thể là nhóm virus lớn nhất trong tự nhiên với số lượng có khoảng 10^{32} thực khuẩn thể trong sinh quyển, cao hơn cả mật số vi khuẩn (Kutter & Sulakvelidze, 2004; Kurtboke, 2012). Hiện nay, hơn 5500 thực khuẩn thể đã được kiểm tra trong kính hiển vi điện tử. Trong đó, thực khuẩn thể không đuôi bao gồm khoảng 190 loài đã biết và phân thành 10 họ nhỏ. Thực khuẩn thể có đuôi chiếm 96% số thực khuẩn thể được biết đến và được tìm thấy ở khắp mọi

nơi, chúng được xếp vào bộ Caudoviriales và được chia thành ba họ (Myoviridae, Podoviridae, Siphoviridae) (Ackermann, 2004) (Hình 2.9 và Hình 2.10), những họ này là đối tượng được nghiên cứu nhiều nhất về sinh hóa và cấu trúc.



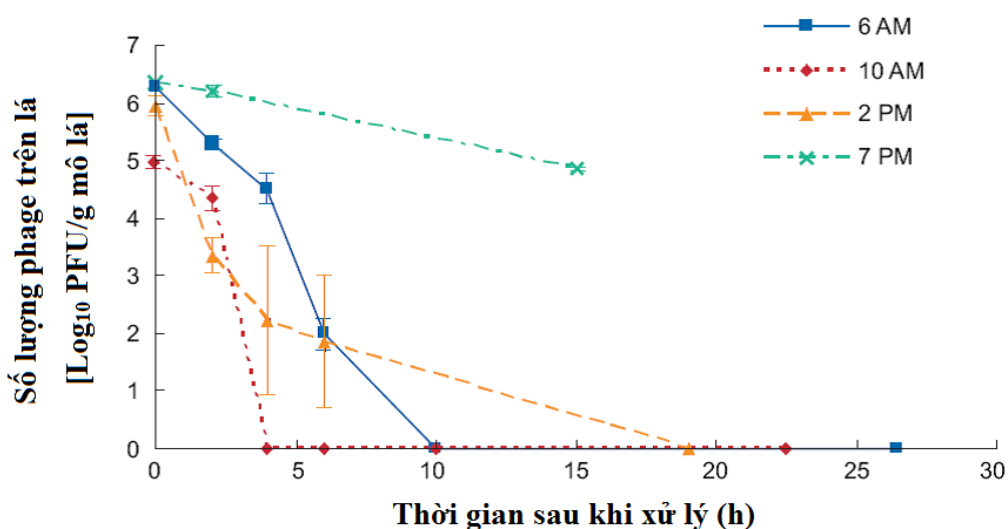
Hình 2.10: So sánh 3 họ trong bộ phage đuôi Caudoviriales: Myoviridae, Podoviridae và Siphoviridae (Nguồn: Harper, 2011; trích dẫn bởi Fariza & Zaman, 2014)

2.3.5 Những thách thức khi sử dụng thực khuẩn thể trong quản lý bệnh trên cây trồng

Sự thành công của bất kỳ biện pháp phòng trừ sinh học nào cũng bị ảnh hưởng bởi mật số tác nhân (Johnson, 1994). Trong trường hợp áp dụng biện pháp thực khuẩn thể, điều quan trọng là thực khuẩn thể phải tiếp xúc với vi khuẩn ký chủ trước khi nó bị phá hủy (Goodridge, 2004) và xác suất mà thực khuẩn thể lây nhiễm vào ký chủ phụ thuộc vào nhiều yếu tố: mật số ban đầu của thực khuẩn thể, khả năng nhân mật số trong cơ thể ký chủ, mật số và vị trí của các vi khuẩn ký chủ, sự hiện diện của nước đầy đủ trong môi trường làm cơ sở cho sự khuếch tán thực khuẩn thể ở tế bào thực vật. Ngoài ra, hiệu quả kiểm soát bệnh có thể bị ảnh hưởng bởi thời gian áp dụng TKT, khả năng xuất hiện các đột biến vi khuẩn kháng thực khuẩn thể và môi trường xung quanh thực khuẩn thể (Gill & Abedon, 2003).

Bề mặt lá là môi trường khắc nghiệt và thực khuẩn thể khi áp dụng ở đó sẽ bị phân hủy rất nhanh (Balogh *et al.*, 2003). Thời gian sống sót của các thực khuẩn thể trên bề mặt lá cây là một yếu tố hạn chế chủ yếu của việc kiểm soát bệnh vi khuẩn bằng phương pháp thực khuẩn thể. Các nghiên cứu ngoài thực địa và phòng thí nghiệm đã chứng minh rằng thực khuẩn thể không hoạt động

khi tiếp xúc với nhiệt độ cao, độ pH cao và ánh nắng mặt trời, hay bị rửa trôi bởi mưa (Ignoffo & Garcia, 1994). Tác động của môi trường tiêu diệt thực khuẩn thể nhiều nhất được xác định là tia quang phổ UV-A và UV-B (280-400 nm) của ánh sáng mặt trời (Jones *et al.*, 2007). Trong các thử nghiệm khi thực khuẩn thể được sử dụng vào giữa buổi sáng, sự kiểm soát vi khuẩn đốm lá trên cà chua đã không đạt được hiệu quả. Jones *et al.* (2007) cho rằng khả năng hoạt động ngăn của các thực khuẩn thể trên bề mặt lá đã cản trở hiệu quả của việc điều trị bằng phương pháp thực khuẩn thể khi dùng vào ban ngày. Trong một thí nghiệm, các thực khuẩn thể trên lá cà chua có cường độ ánh sáng mặt trời cao vào ban ngày đã bất hoạt và bị chết trong vài giờ sau khi được áp dụng trong điều kiện đồng ruộng (Hình 2.11) (Iriarte, 2007). Trong nhà kính, nơi không có bức xạ tia cực tím mặt trời, các thực khuẩn thể có thể tồn tại đến một tuần (Balogh, 2006).



Hình 2.11: Ảnh hưởng của thời gian áp dụng đến sự tồn tại TKT của vi khuẩn Xacm 2004-16 trên tán cà chua ở điều kiện ngoài đồng. (TKT đã được áp dụng lúc 6 giờ sáng, 10 giờ sáng, 2 giờ chiều và 7 giờ tối vào ngày 25 tháng 5 năm 2005 tại Citra, Florida) (Nguồn: Iriarte, 2007).

Thời gian xử lý TKT cùng với sự xuất hiện của tác nhân gây bệnh đã ảnh hưởng đến hiệu quả của việc kiểm soát dịch bệnh trong một vài trường hợp. Đối với điều kiện ngoài đồng ruộng, xử lý TKT vào các thời điểm khi bức xạ mặt trời ở mức tối thiểu sẽ cải thiện hiệu quả kiểm soát bệnh do vi khuẩn (Iriarte *et al.*, 2007). Balogh *et al.*, 2003) đạt được sự kiểm soát bệnh tốt hơn đáng kể về bệnh đốm lá cà chua khi xử lý TKT ở buổi tối so với các xử lý vào buổi sáng (Flaherty *et al.*, 2000).

Ảnh hưởng của mật số TKT đối với hiệu quả kiểm soát cũng đã được nghiên cứu. Việc xử lý cây cà chua với hỗn hợp thực khuẩn thể ở 10^6 hoặc 10^8

PFU/mL có hiệu quả giảm bệnh đốm lá cà chua, nhưng ở 10^4 PFU/mL thì không mang lại hiệu quả (Balogh *et al.*, 2003).

Sự tồn tại và phát triển của TKT còn bị ảnh hưởng bởi các điều kiện như pH, nhiệt độ và tia cực tím. Yếu tố gây hại nhất là sự chiếu xạ của tia cực tím trong ánh sáng mặt trời có ảnh hưởng mạnh đến sự phát triển hoặc khả năng tồn tại của TKT (Frampton *et al.*, 2012).

Nhiệt độ là một trong những yếu tố quan trọng đối với khả năng tồn tại của TKT. Nhiệt độ đóng vai trò trong sự hấp thụ, xâm nhiễm, nhân lên và khoảng thời gian tiềm ẩn trong chu trình tiềm tan (Olson *et al.*, 2004). Ở nhiệt độ thấp hơn nhiệt độ tối ưu, thì TKT ít truyền vật liệu di truyền vào tế bào kí chủ. Nhiệt độ cao hơn có thể kéo dài thời gian giai đoạn tiềm tan. Hơn nữa, nhiệt độ còn ảnh hưởng đến khả năng tồn tại và tồn trữ của TKT (Tey *et al.*, 2009; trích dẫn bởi Jonczyk *et al.*, 2011). Theo D'Herelle (1926) ghi nhận rằng một vài TKT bị bất hoạt khi bị đun nóng ở 75°C trong vòng 30 phút. Trái lại, một số TKT có thể tồn tại sau khi nung ở nhiệt độ 70°C (trích dẫn bởi Adams, 1959). Thực khuẩn thể T4 sau khi cho cua ăn, đem đun sôi trong 5 phút, nhiệt độ bên trong hơn 70°C thì khoảng 80% thực khuẩn bị bất hoạt. Tuy nhiên, 2,5% TKT tồn tại trong 20 phút ở nhiệt độ 84°C . Nhìn chung, TKT có khả năng chịu nhiệt tốt hơn ký chủ vi khuẩn, chúng có thể tồn tại sau khi ký chủ chết (DiGirolamo & Daley, 1973).

Độ pH quá cao hoặc quá thấp có thể cản trở sự kiểm soát bệnh bằng cách bất hoạt thực khuẩn thể. Nghiên cứu của Leverentz *et al.* (2003) cho thấy thực khuẩn thể không bền trên lát táo do pH thấp (pH bề mặt 4,37), nhưng tồn tại trên dưa hấu có (pH bề mặt 5,77) (Jones *et al.*, 2007). Một số nghiên cứu đã chỉ ra rằng thực khuẩn thể thường ổn định ở khoảng pH từ 5-8. Khi nhiệt độ thấp thì phạm vi pH có thể được mở rộng từ 4-9 hoặc 10. Feng *et al.*, (2003) đã nghiên cứu khả năng sống sót của coliphages (MS2 và Q β) trong nước và nước thải liên quan đến các ảnh hưởng ở những nhiệt độ và pH khác nhau trên TKT. Cả hai TKT ít bị bất hoạt trong phạm vi pH 6-8 và nhiệt độ $5-35^{\circ}\text{C}$. MS2 sống sót trong môi trường axit tốt hơn trong môi trường kiềm.

TKT nhạy cảm với tia cực tím và TKT có ssDNA là nhạy cảm nhất. Tia UV bao gồm: UVA (320-400 nm), UVB (280-320 nm) và UVC (100-280 nm). Trong đó, tia UV-B cao có hại cho sinh vật và gây hại DNA trực tiếp bằng cách gây tổn thương tế bào DNA dẫn đến tắc nghẽn quá trình sao chép DNA và phiên mã RNA. Còn tia UV-C thì ngăn TKT hấp phụ vào tế bào ký chủ. UV-C và UV-A kết hợp với UV-B gây hại TKT theo nhiều cơ chế khác nhau (Iriarte *et al.*, 2007). Trong tất cả các tác nhân có khả năng làm bất hoạt thực

khuẩn thể thì tia cực tím được nghiên cứu rộng rãi nhất. Ngoài việc làm bất hoạt các thực khuẩn thể, tia cực tím còn tác động lên sinh lí và di truyền quan trọng, chẳng hạn như phát triển thực khuẩn thể gây tan vi khuẩn, gây ra sự tăng trưởng chậm của các thực khuẩn thể còn sống sót sau chiếu xạ, kích thích sự tái tổ hợp di truyền và gây biến đổi gen. Ánh sáng tia cực tím cũng được sử dụng để nghiên cứu quá trình phát triển thực khuẩn thể nội bào. Sự bất hoạt bởi tia cực tím là yếu tố lớn nhất làm suy giảm thực khuẩn thể trên bề mặt cây. Do đó, chiến lược để giảm thiểu sự suy giảm số lượng thực khuẩn thể là vấn đề rất quan trọng (Jones *et al.*, 2012).

Loại đất khác nhau ảnh hưởng đến sự tồn tại của thực khuẩn thể. Ví dụ, đất sét pha và độ ẩm đất thấp sẽ duy trì thực khuẩn thể ở mức độ cao hơn so với các loại đất thịt pha cát (Ackermann, 2009). Thuốc diệt khuẩn có chứa đồng đã được xác nhận là có khả năng làm bất hoạt TKT (Alvarez *et al.*, 1991). Sự ức chế thực khuẩn thể được loại bỏ nếu được áp dụng ít nhất 3 ngày sau khi phun đồng (Iriarte *et al.*, 2007). Hầu hết các thực khuẩn thể có đuôi không có lipid trong cấu trúc nhưng khoảng 30% trong số chúng có thể bị bất hoạt bởi các dung môi lipid như acetone, chloroform, ether và toluene (Ackermann, 2004, 2009).

2.3.6 Một số biện pháp làm tăng hiệu quả khi ứng dụng thực khuẩn thể

Ảnh hưởng tác động của thời gian chiếu sáng trong ngày đến TKT rất lớn. Cường độ tia cực tím thấp hơn vào lúc hoàng hôn hoặc bình minh làm cho khả năng tồn tại của thực khuẩn thể được cải thiện. Nếu sử dụng thực khuẩn thể vào lúc trời nắng nóng thì mật số TKT sẽ bị giảm vài giờ sau đó dẫn đến hiệu quả phòng trị bệnh bị giảm đi rất nhiều (Frampton *et al.*, 2012). Tương tự, sử dụng thực khuẩn thể thích nghi tốt hơn với môi trường và áp dụng các biện pháp xử lý vào buổi tối hoặc sáng sớm (Balogh *et al.*, 2003; Flaherty *et al.*, 2000). Một số cách tiếp cận đã được nghiên cứu để tăng tính hiệu quả của việc kiểm soát bệnh trên bề mặt lá bằng cách tăng tuổi thọ của thực khuẩn thể khi sử dụng các chất bảo vệ (Balogh *et al.*, 2003; Obradovic *et al.*, 2004) sử dụng vi khuẩn không độc mang thực khuẩn thể để lan truyền thực khuẩn thể đến môi trường có vi khuẩn mục tiêu (Svircev *et al.*, 2006). Một hướng nghiên cứu nhằm duy trì mật số quần thể thực khuẩn thể cao là áp dụng đồng thời chúng với vi khuẩn có thể tồn tại trong cây trồng và vi khuẩn đó rất nhạy cảm với thực khuẩn thể. Vì vậy, nếu quần thể vi khuẩn được duy trì ở mật số cao, chúng có tác dụng như là ký chủ cho thực khuẩn thể tồn tại và có khả năng duy trì mật số thực khuẩn thể ở mức cao. Một dòng của vi khuẩn *Xanthomonas perforans* đã làm giảm tính độc và khả năng gây ra bệnh ít hơn

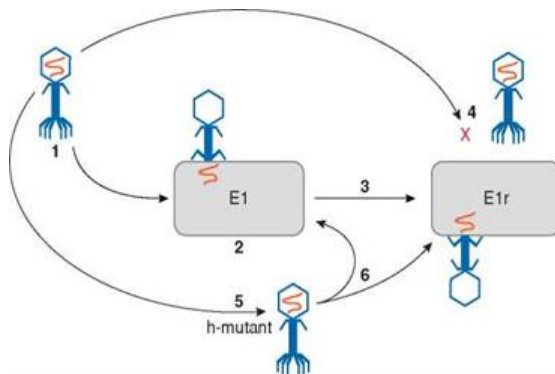
dòng hoang dại (ngoài tự nhiên) nhưng có thể được thiết lập quần thể với mật số cao trên cà chua đã hỗ trợ cho thực khuẩn thể tồn tại và nhân mật số trong nghiên cứu ở điều kiện nhà lưới (Balogh, 2006). Trong môi trường sống của vi khuẩn ký chủ, quần thể TKT biến mất khỏi bề mặt lá cây cà chua 6 ngày sau khi xử lý, bởi vì sự hiện diện của vi khuẩn ký chủ ở một tuần sau khi xử lý đã giảm mật số đáng kể. Svircev *et al.* (2006) đã kiểm soát được bệnh cháy lá (fire blight) của cây lê bằng cách sử dụng một dòng vi khuẩn *P. agglomerans* đã làm giảm tính độc nhằm duy trì mật số hỗn hợp bốn thực khuẩn thể, có khả năng phân giải các dòng vi khuẩn *P. agglomerans* và *E. amylovora*, tác nhân gây bệnh cháy lá (fire blight). Một chiến lược tương tự đã được sử dụng để kiểm soát bệnh héo do vi khuẩn trên cây thuốc lá, các thực khuẩn thể được sử dụng cùng với một dòng không có tính độc của vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* để kiểm soát bệnh (Tanaka *et al.*, 1990).

2.3.7 Biện pháp hạn chế sự hình thành tính kháng của vi khuẩn đối với thực khuẩn thể

Một bất lợi quan trọng trong việc sử dụng thực khuẩn thể trong việc kiểm soát các bệnh thực vật là sự phát triển các dòng vi khuẩn có khả năng kháng lại thực khuẩn thể. Năm 1989, Jackson đã đưa ra quy trình khái quát về sự phát triển của các dòng vi khuẩn kháng TKT và các TKT đột biến trong tế bào (h-mutant) đã được phát triển để ngăn ngừa sự xuất hiện của đột biến kháng thuốc bằng cách sử dụng hỗn hợp của các thể đột biến thực khuẩn thể (h-mutants). Các thể đột biến này có khả năng ly giải các dòng vi khuẩn kháng với thực khuẩn thể mẹ (1), trong khi vẫn có khả năng ly giải các vi khuẩn độc hoang dại (ngoài môi trường tự nhiên) (Jackson, 1989) (Hình 2.12) do đó chúng có một phổ ký chủ rộng hơn so với thực khuẩn thể mẹ. Sử dụng chiến lược thực khuẩn thể của Jackson, một hỗn hợp gồm bốn thực khuẩn thể bao gồm thực khuẩn thể đột biến gen hoang dại và thể đột biến được áp dụng hai lần mỗi tuần vào buổi sáng sớm trước khi mặt trời mọc để kiểm soát có hiệu quả vi khuẩn đốm lá ở cà chua. Các ứng dụng thực khuẩn thể cung cấp khả năng kiểm soát bệnh tốt hơn đáng kể so với điều trị bằng đồng-mancozeb (Flaherty *et al.*, 2000). Kết quả, năng suất quả của cây trồng cao hơn đáng kể trên các cây xử lý thực khuẩn thể so với điều trị bằng đồng mancozeb. Hỗn hợp thực khuẩn thể làm giảm mức độ nghiêm trọng của bệnh vi khuẩn đốm lá 17%, trong khi ứng dụng đồng-mancozeb chỉ làm giảm 11%.

Trong nghiên cứu này cho thấy các vi khuẩn có khả năng kháng thực khuẩn thể trong tự nhiên có tỉ lệ $1/10^6$, tuy nhiên cũng không quá lo lắng bởi vì trong tự nhiên cũng có khoảng $1/10^7$ - 10^9 thực khuẩn thể có thể đột biến (h-

mutant) có khả năng giết chết cả vi khuẩn mẹ hoang dại và các thể đột biến kháng thực khuẩn thể hoang dại (Jackson, 1989). Do đó trong chiến lược dùng thực khuẩn thể kiểm soát mầm bệnh do vi khuẩn điều quan trọng là phải tích cực phân lập và tuyển chọn thực khuẩn thể thường xuyên và đa dạng về địa điểm phân bố nhằm tuyển chọn được các thực khuẩn thể có khả năng tiêu diệt được vi khuẩn kháng thuốc và kháng cả thực khuẩn thể.



Hình 2.12: Sự phát triển của các dòng vi khuẩn kháng TKT và các TKT đột biến trong tế bào (h-mutant) trong tự nhiên.

- 1, thực khuẩn thể hoang dại (ngoài môi trường tự nhiên);
- 2, loại vi khuẩn hoang dại (E1);
- 3, $1/10^6$ biến đổi thành kháng thực khuẩn thể (E1r);
- 4, thực khuẩn thể hoang dã không thể giết được vi khuẩn kháng (E1r);
- 5, $1/10^7-10^9$ thực khuẩn thể có thể đột biến (h-mutant); h = host-range (mở rộng phạm vi ký chủ);
- 6, h-mutant giết chết cả vi khuẩn mẹ hoang dại và các thể đột biến kháng thực khuẩn thể hoang dại (Nguồn Jackson, 1989)

Một chiến lược tương tự đã được sử dụng để kiểm soát *Xanthomonas campestris* pv. *pelargonii* (Xcpl), tác nhân gây bệnh cháy lá do vi khuẩn trên cây hoa phong lữ (geranium) (Flaherty *et al.*, 2001). Mười sáu thực khuẩn thể được đánh giá về khả năng ly giải các dòng Xcpl được phân lập từ khắp thế giới, sau đó các đột biến được phát triển từ 5 thực khuẩn thể có phổ ký chủ rộng nhất và đã được sử dụng để tạo thành hỗn hợp nhằm kiểm soát dịch bệnh. Hỗn hợp thực khuẩn thể được sử dụng phun trên lá hàng ngày đã làm giảm đáng kể sự lây lan của bệnh. Tỷ lệ nhiễm bệnh giảm 50% hoặc nhiều hơn ở các lô được điều trị bằng thực khuẩn thể so với đối chứng và tỉ lệ bệnh thấp hơn đáng kể so với các lô được điều trị bằng thuốc hóa học theo khuyến cáo.

2.3.8 Chiến lược quản lý tổng hợp mầm bệnh

Một số cách tiếp cận đã được sử dụng để kết hợp biện pháp xử lý bằng thực khuẩn thể vào một phần của chiến lược quản lý tổng hợp các bệnh do vi khuẩn thực vật. Tanaka *et al.* (1990) đã làm giảm bệnh héo xanh trên cây

thuốc lá gây ra bởi *R. solanacearum* bằng cách áp dụng một dòng không gây độc của *R. solanacearum* và TKT của nó để kiểm soát bệnh. Kết quả tỷ lệ cây bị héo khi áp dụng một dòng không độc và TKT của nó thấp hơn nhiều so với các nghiệm thức chỉ xử lý dòng TKT một mình.

Gần đây, một cách tiếp cận khác về ứng dụng TKT cũng được báo cáo. Các khảo nghiệm ngoài đồng đã được thực hiện với các loại TKT có phổ ký chủ rộng đối với vi khuẩn *E. amylovora* và một cách kết hợp TKT với vi khuẩn *P. agglomerans* trong các thử nghiệm sinh học trên cây Lê - một tác nhân kiểm soát sinh học của vi khuẩn *E. amylovora* được sử dụng để phòng thích và duy trì mật số TKT. Biện pháp tổng hợp kết hợp hai tác nhân kiểm soát sinh học này (tức là các TKT và *P. agglomerans*) đã đạt được hiệu quả kiểm soát bệnh cháy lá (fire blight) tương đương với xử lý streptomycin (Svircev *et al.*, 2006). Một hướng tiếp cận mới đang được quan tâm để hướng đến phát triển các chiến lược bền vững hơn để giảm bệnh đốm lá vi khuẩn (bacteria spot) trên cà chua là sự kết hợp của các tác nhân kiểm soát sinh học, bao gồm các dòng vi khuẩn vùng rễ thúc đẩy tăng trưởng thực vật (PGPR), các vi khuẩn đối kháng, TKT và các chất kích kháng lưu dẫn SAR được so sánh trong các thí nghiệm ở nhà lưới (Obradovic *et al.*, 2005). Nghiên cứu về quản lý tổng hợp trong đó kết hợp TKT và tác nhân kiểm soát khác như chất kích kháng (SAR) (Louws *et al.*, 2001, Qui *et al.*, 1997), vi khuẩn vùng rễ kích thích cây trồng tăng trưởng PGPR (Ji *et al.*, 2006, Byrne *et al.*, 2005, Wilson *et al.*, 2002) để tăng hiệu quả kiểm soát bệnh đốm lá vi khuẩn trên cà chua. Khi TKT được áp dụng cho các cây trồng mà trước đó đã được xử lý chất kích kháng lưu dẫn (SAR), kết quả khả năng kiểm soát bệnh của TKT đã cải thiện đáng kể. Sự kết hợp của chất kích kháng lưu dẫn (SAR) và TKT làm giảm đáng kể mức độ nghiêm trọng của bệnh so với chỉ dùng SAR đơn độc (Obradovic *et al.*, 2004, 2005). Việc áp dụng các TKT đặc hiệu đối với vi khuẩn ký chủ có thể là một sự thay thế hiệu quả thuốc hóa học trong phòng trị bệnh do vi khuẩn trên cây trồng (Jones *et al.*, 2007).

2.3.9 Thuận lợi và khó khăn khi sử dụng thực khuẩn thể trong kiểm soát mầm bệnh do vi khuẩn

*** Thuận lợi**

TKT tồn tại đa dạng trong tự nhiên, chúng có mặt ở tất cả mọi nơi và có thể dễ dàng phân lập từ môi trường, số lượng TKT trong môi trường nước khoảng 10^4 - 10^8 virions/mL và trong đất có khoảng 10^9 virions/g đất (Matsuzaki *et al.*, 2005).

TKT chỉ ký sinh chuyên biệt trên tế bào vi khuẩn kí chủ đến mức độ loài, đôi khi mức dưới loài, không độc hại đến tế bào nhân thật và môi trường (Greer, 2005; Trun & Trempey, 2009). Áp dụng TKT để phòng trị bệnh do vi khuẩn được xem là liệu pháp sinh học an toàn trong phòng trị bệnh trên người, động vật và cây trồng (Kutter & Sulakvelidze, 2004). Vì vậy, TKT có thể được sử dụng trong các tình huống mà kiểm soát mầm bệnh bằng hóa chất không được phép sử dụng do các quy định pháp lý, chẳng hạn sử dụng TKT kiểm soát mầm bệnh trong nông sản tươi có thể sử dụng trực tiếp làm thức ăn (Leverentz *et al.*, 2003).

TKT có khả năng chuyên tính cao, chỉ loại bỏ vi khuẩn mục tiêu mà không làm hại đến hệ thống sinh vật khác. Vì vậy, có thể áp dụng chúng cùng với vi khuẩn đối kháng để tăng áp lực lên các tác nhân gây bệnh (Tanaka *et al.*, 1990).

TKT ít hoặc không bị ảnh hưởng bởi các nông dược, chúng có thể kết hợp với nhiều hóa chất bảo vệ thực vật mà không làm giảm hiệu quả (Balogh *et al.*, 2008). Ngoài ra, TKT có thể được sử dụng kết hợp với thuốc kháng sinh khác làm giảm sự phát triển của vi khuẩn kháng thuốc (Kutter, 1997 trích dẫn bởi Jones *et al.*, 2007).

TKT có thể chủ động tăng mật số trong môi trường tự nhiên, đặc biệt nơi có quần thể vi khuẩn ký chủ hoạt động khả năng này được khai thác để sử dụng nhằm kiểm soát những bệnh trên cây trồng (Balogh *et al.*, 2009).

Có thể chuẩn bị TKT để sử dụng một cách dễ dàng, ít tốn kém và có thể bảo quản ở trong bóng tối với nhiệt độ là 4°C trong suốt nhiều tháng mà không làm giảm đáng kể chất lượng (Greer, 2005, trích dẫn bởi Nga & Giang, 2016).

* **Khó khăn**

Một nhân tố chính hạn chế việc sử dụng các TKT để kiểm soát bệnh thực vật là khả năng phát triển tính kháng các dòng vi khuẩn đối với TKT. Nhiều phương pháp tiếp cận khác nhau để khắc phục vấn đề này như sử dụng TKT có phổ ký chủ rộng, hỗn hợp các TKT (Balogh *et al.*, 2009); hoặc kết hợp TKT với vi khuẩn vùng rễ (PGPR) (Ji *et al.*, 2006); hoặc kết hợp TKT với các chất kích kháng (SAR) (Louws *et al.*, 2001, Qui *et al.*, 1997) hoặc kết hợp TKT với vi khuẩn đối kháng (Byrne *et al.*, 2005, Wilson *et al.*, 2002).

TKT khó tiếp cận tế bào vi khuẩn khi mật số của vi khuẩn thấp hơn 10^4 - 10^5 CFU/mL, nhưng TKT vẫn chịu đựng được cho đến khi mật số vi khuẩn đạt trở lại (Nga & Giang, 2016). Do sự chuyên tính cao của TKT nên ảnh

hưởng bất lợi đến mối tương tác giữa TKT và vi khuẩn ký chủ (Balogh *et al.*, 2009).

Các yếu tố cản trở sự thành công của kiểm soát dịch bệnh trong vùng rễ là độ pH đất thấp sẽ làm bất hoạt TKT. Trong khi đó, trên bề mặt lá cây, mật số TKT suy giảm rất nhanh, sự tồn tại ngắn ngủi trên bề mặt lá cây cũng là một yếu tố hạn chế của liệu pháp TKT (Gill & Abedon, 2003).

Trong các nghiên cứu ở phòng thí nghiệm và ngoài đồng, TKT đã được chứng minh là bị bất hoạt ở nhiệt độ cao, pH thấp hoặc cao, sự chiếu xạ của ánh sáng mặt trời, hay bị rửa trôi bởi mưa, tia cực tím A và B là yếu tố gây hại nhất đối với TKT ở trong môi trường (Ignoffo & Garcia, 1994, 1995). Những nghiên cứu bước đầu đã cho thấy, áp dụng TKT vào buổi sáng không mang lại hiệu quả trong việc kiểm soát bệnh trên lá.

2.4 KHÁI QUÁT MỘT SỐ LOẠI HOẠT CHẤT HÓA HỌC THƯỜNG DÙNG PHÒNG TRỪ VI KHUẨN

Yasufumi (1993) nghiên cứu về cơ chế tác động của axit oxolinic chống lại vi khuẩn *Pseudomonas glumae* gây bệnh thối cây con trên lúa. Kết quả ghi nhận axit oxolinic như một chất khử trùng hạt giống trong việc kiểm soát bệnh thối nhũn cây lúa do vi khuẩn *P. glumae* gây ra. Khi hạt lúa được gieo cấy ở nhiệt độ 30°C trong quá trình nảy mầm vi khuẩn phát triển đáng kể gây ra bệnh thối cây lúa. Mức độ nghiêm trọng của bệnh tương quan với sự phát triển của vi khuẩn trong quá trình nảy mầm. Khi hạt được xử lý bằng axit oxolinic trước và sau khi ngâm hạt, quần thể vi khuẩn bị ức chế và hoạt chất này có hiệu quả cao trong việc kiểm soát dịch bệnh. Mặt khác, khi axit oxolinic được xử lý sau khi quá trình nảy mầm, quần thể vi khuẩn tăng lên nhiều như trên đối chứng không được xử lý, lúc này axit oxolinic đã không kiểm soát được vi khuẩn gây bệnh. Tương tự, Shtienberg *et al.*, (2001) đánh giá hiệu quả của axit oxolinic và các hoạt chất diệt khuẩn khác trong sự ức chế vi khuẩn *Erwinia amylovora* trong vườn lê ở Israel. Kết quả bốn hoạt chất: axit oxolinic, streptomycin sulphate, kasugarnycin và gentamicin sulphate đều có khả năng ức chế vi khuẩn *Erwinia amylovora* gây bệnh cháy lá ở lê, kết quả này đã được đánh giá trong 43 thí nghiệm ở vườn cây ăn quả trong năm 1997-2000 ở Israel. Trong đó axit oxolinic có hiệu quả cao đối với vi khuẩn *E. amylovora* và làm giảm đáng kể mức độ nghiêm trọng của bệnh trong tất cả các thí nghiệm, so với các lô thí nghiệm không được xử lý hoạt chất. Trong số các loại hoạt chất đã được thử nghiệm, thì có axit oxolinic và gentamicin sulphat là có hiệu quả giảm bệnh cao hơn các thí nghiệm còn lại. Axit oxolinic đã được sử dụng thương mại ở Israel từ năm

1998 với những thành công đáng kể.

Maia *et al.*, (2009) nghiên cứu đánh giá dư lượng oxytetracycline khi áp dụng trên cà chua trong điều kiện nhà lưới và ngoài đồng ruộng. Cây cà chua được xử lý một lần bằng hoạt chất oxytetracycline, khi quả đang ở giai đoạn chín, bằng cách áp dụng công thức thương mại với liều lượng theo khuyến cáo của nhà sản xuất. Các mẫu quả cà chua từ nhà lưới và ngoài đồng ruộng được lấy đồng thời và định kỳ cho đến khi thu hoạch và gửi đi phân tích dư lượng oxytetracycline. Kết quả cho thấy khoảng thời gian trước khi thu hoạch khuyến nghị của nhà sản xuất (thời gian cách ly 5 ngày), đã hạ mức dư lượng xuống mức giới hạn pháp lý có thể chấp nhận được và không có sự khác biệt thống kê giữa các hệ thống canh tác liên quan đến dư lượng của hoạt chất oxytetracycline.

Yu *et al.*, (2016) đã chứng minh rằng hoạt chất bismertiazol có thể kiểm soát hiệu quả bệnh thối nhũn trên cây có múi bằng cách ức chế cả sự phát triển của *Xanthomonas citri* ssp. *citri* và kích hoạt phản ứng bảo vệ vật chủ của cây thông qua sự biểu hiện của một số gen liên quan đến bệnh ở bưởi, đặc biệt là ở giai đoạn đầu thời gian điều trị. Ngoài ra, nhóm tác giả còn phát hiện ra rằng hoạt chất bismertiazol gây ra sự biểu hiện của các gen đánh dấu CitCHS và CitCHI trong con đường sinh tổng hợp axit salicylic (SA) tại các thời điểm khác nhau. Hơn nữa, hoạt chất bismertiazol cũng gây ra sự biểu hiện của gen liên quan đến bảo vệ môi AZI1. Tổng hợp những kết quả này chỉ ra rằng sự phản ứng phòng vệ trong cây bưởi bởi bismertiazol có thể liên quan đến con đường tín hiệu SA và bismertiazol có thể dùng thay thế cho thuốc diệt khuẩn có gốc đồng để kiểm soát bệnh thối rữa trên cây có múi.

Nguyen *et al.*, (2017) đã xác định hoạt chất quaternary ammonium được sử dụng như chất khử trùng mới để giảm sự lây lan mầm bệnh gây u ở cây ô liu do *Pseudomonas savastanoi* pv. *Savastanoi* gây ra, đây là một bệnh vi khuẩn nghiêm trọng có thể lây lan qua thiết bị vườn cây ăn quả. Các nghiên cứu trong nhà lưới xác nhận rằng các dụng cụ cắt bị nhiễm bẩn khi tiếp xúc với quả ô liu có thể lây lan mầm bệnh sang các mô ô liu khỏe mạnh. Các hợp chất quaternary ammonium compounds (QAC) được đánh giá là chất khử trùng cho thiết bị bị ô nhiễm như một chiến lược quản lý dịch bệnh. Trong các thử nghiệm trong phòng thí nghiệm, QAC thể hiện độc tính cao đối với vi khuẩn *Pseudomonas savastanoi* pv. *Savastanoi* trên phạm vi pH rộng từ 6 đến 9 khi sử dụng thời gian tiếp xúc ngắn (15 đến 60 giây) và nồng độ thấp (5 µg /mL). QAC được áp dụng cho các bề mặt cứng bị ô nhiễm làm

giảm mật số của vi khuẩn xuống $\geq 3,6 \log_{10}$ CFU/mL. Trong các thử nghiệm ngoài đồng, việc vệ sinh thiết bị đã bị nhiễm mầm bệnh (2×10^7 CFU/mL) đã thành công và đôi khi ngăn chặn hoàn toàn sự lây nhiễm mới xảy ra. Việc áp dụng các biện pháp phun bổ sung qua lá bằng hỗn hợp đồng hoặc đồng kết hợp kasugamycin sau khi phòng bệnh đã cải thiện đáng kể việc kiểm soát bệnh. Trong các nghiên cứu trong phòng thí nghiệm và ngoài đồng, sodium hypochlorite kém hiệu quả hơn đáng kể so với các hợp chất QAC. Dựa trên dữ liệu từ nghiên cứu này, một công thức QAC đã được đăng ký để sử dụng làm chất khử trùng cho thiết bị trên ô liu ở California vào năm 2015.

Suzanne *et al.*, (2021) đã đánh giá ảnh hưởng của ba loại hoạt chất (streptomycin, oxytetracycline và kasugamycin) đối với quần thể của mầm bệnh cháy lá do vi khuẩn *Erwinia amylovora* trên nhụy hoa táo trong ba vụ. Thời gian áp dụng các hoạt chất liên quan đến sự hiện diện của *E. amylovora* trên các nhụy hoa và tỷ lệ mắc bệnh. Mặc dù mật số vi khuẩn *E. amylovora* được xử lý trên hoa tăng lên $10^6 - 10^7$ CFU/mL trên hoa sau 4 đến 5 ngày trong mỗi thí nghiệm, nhưng hoạt chất streptomycin và kasugamycin đã làm giảm đáng kể mật số vi khuẩn sau 4 đến 5 ngày ở hai trong ba thí nghiệm. Ngược lại, ảnh hưởng của oxytetracycline đối với *E. amylovora* thì thay đổi nhiều hơn, với việc giảm số lượng *E. amylovora* chỉ được quan sát thấy một trong ba thí nghiệm, tỷ lệ mắc bệnh cao hơn đáng kể đối với hoa được xử lý bởi oxytetracycline so với hai hoạt chất còn lại trong suốt 2 đến 3 năm. Các phân tích thống kê về ảnh hưởng của các thông số thời tiết đến hoạt động của hoạt chất cho thấy rằng bức xạ mặt trời và nhiệt độ tác động tiêu cực đến hoạt động của cả kasugamycin và oxytetracycline. Tác giả đã đánh giá thêm về sự phân hủy của kasugamycin có công thức (kasumin 2L) và nhận thấy rằng kasumin 2L dễ bị phân hủy trong ống nghiệm sau khi tiếp xúc với chu kỳ quang 16 giờ của ánh sáng hàng ngày. Hiệu quả kiểm soát vi khuẩn vượt trội của kasugamycin và streptomycin với việc giảm đáng kể quần thể *E. amylovora* trên nhụy hoa táo nhưng chỉ ra rằng, tương tự như oxytetracycline, kasugamycin dễ bị phân hủy quang học.

CHƯƠNG 3: PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

3.1 VẬT LIỆU

3.1.1 Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Thời gian: Các thí nghiệm được thực hiện từ năm 2015 đến năm 2020.

Địa điểm:

- Nội dung thu mẫu để phân lập nguồn thực khuẩn thể và vi khuẩn gây bệnh được thực hiện ở một số tỉnh ĐBSCL và Lâm Đồng.
- Nghiên cứu ở điều kiện phòng thí nghiệm và nhà lưới được thực hiện tại phòng thí nghiệm bệnh cây và nhà lưới bộ môn Bảo vệ thực vật, khoa Nông nghiệp, trường Đại học Cần Thơ.
- Thí nghiệm ngoài đồng được thực hiện tại thành phố Cần Thơ và tỉnh Đồng Tháp.

3.1.2 Dụng cụ và hóa chất

Dụng cụ: Lame, đĩa petri, ống nghiệm, ống falcon, bình tam giác, đũa cấy vi khuẩn, ống eppendorf, micropipette ...

Thiết bị: tủ cấy đèn cực tím, máy đo pH, Vortex, máy li tâm, máy lắc ngang, Water bath, tủ hút, tủ úm, tủ lạnh trữ mẫu, kính hiển vi, tủ thanh trùng khô, cân điện tử,...

Hóa chất: Hóa chất cần thiết cho môi trường King's B, môi trường TZCA cùn, Chloroform, một số loại thuốc trừ bệnh héo xanh hiện có trên thị trường...

Môi trường sử dụng trong phòng thí nghiệm

Môi trường King's B (Burgess *et al.*, 2009)

Peptone	20 g
K ₂ HPO ₄	1,5 g
MgSO ₄	1,5 g
Agar	15 g
Glycerol	10 mL
Nước cất	1000 mL
pH	7,2 ± 0,2

Môi trường King's B agar 0,8 % sử dụng cho nhân nuôi thực khuẩn thể.

Môi trường King's B agar 2 % sử dụng cho nhân nuôi vi khuẩn.

Môi trường Triphenyl Tetrazolium Chloride (TZC) (Kelman, 1954; Mehan & McDonald, 1995)

Pepton	10g
Casein hydrolysate	1 g
Dextrose	10 g
Agar	18g
Nước cất	1000 mL
pH	7 - 7,2

Khử trùng ở 121°C trong 25 phút. Trước khi đổ môi trường ra hộp Petri lúc môi trường khoảng 50°C thêm 1 mL dung dịch 2,3,5-Triphenyl Tetrazolium Chloride (TZC) 1% vào 200 mL môi trường để đạt nồng độ 0,005%.

3.1.3 Vật liệu nghiên cứu

Giống hoa Cúc được sử dụng trong thí nghiệm là Cúc Tiger thế hệ F₁ được nhân bằng phương pháp nuôi cấy mô, do trại giống cây trồng “Út Hiệp” ở thành phố Sa Đéc, tỉnh Đồng Tháp cung cấp.

Giá thể trồng cây hoa Cúc gồm phân hữu cơ, xơ dừa và đất theo tỉ lệ 1:1:1. Giá thể phải tơi xốp, nhuyễn và thoát nước nhanh để rễ phát triển tốt. Giá thể đất được thanh trùng 2 lần cách nhau 2 ngày ở 121 °C trong 30 phút.

Nguồn vi khuẩn gây bệnh và nguồn TKT được phân lập từ các mẫu bệnh của các giống hoa Cúc khác nhau được thu thập từ các tỉnh ĐBSCL và tỉnh Lâm Đồng.

Các loại thuốc hoá học trừ vi khuẩn hiện có trên thị trường như: ViSen 20SC, Kasumin 2SL, Physan 20SL, Starner 20WP, Avalon 8WP, Coc 85WP, Strepgold 100WP, Basu 250WP, Xantocin 40WP, Norshield 86,2WG, Miksabe 100WP, Kocide 53,8WG, Bordeaux.

3.2 PHƯƠNG PHÁP

3.2.1 Nội dung 1: Phân lập các dòng vi khuẩn gây bệnh héo xanh trên cây hoa Cúc và các dòng thực khuẩn thể có khả năng kí sinh vi khuẩn gây bệnh ở một số tỉnh ĐBSCL và tỉnh Lâm Đồng

3.2.1.1 Phân lập các dòng vi khuẩn gây bệnh héo xanh

Mục tiêu: Phân lập các dòng vi khuẩn gây bệnh héo xanh ở một số tỉnh ĐBSCL và tỉnh Lâm Đồng nhằm tạo ra nguồn vi khuẩn phục vụ cho các nghiên cứu tiếp theo.

Phương pháp thu mẫu bệnh

Thực hiện thu mẫu bệnh và phương pháp phân lập vi khuẩn gây bệnh héo xanh được áp dụng theo Mehan & McDonald (1995) và Burgess *et al.* (2009).

Cách thu mẫu: Chọn thu 2 mẫu bệnh (đất + cây) mỗi ruộng Cúc ở những địa điểm khác nhau có triệu chứng héo xanh nhưng không quá khô, có mạch dẫn hóa nâu và khi cắt ngang thân quan sát có dòng dịch khuẩn màu trắng tuôn ra trong nước. Mẫu cây bệnh được đặt trong túi nilon riêng biệt, mẫu thu về cần phân lập vi khuẩn và TKT ngay trong ngày hoặc một ngày sau đó.

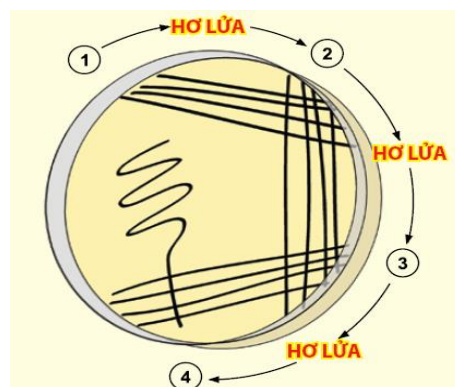
Phương pháp phân lập vi khuẩn

Mẫu bệnh được quan sát dưới kính hiển vi xác định có dòng tuôn vi khuẩn từ bó mạch hóa nâu trước khi đem phân lập trong đĩa petri.

Cách phân lập

1. Khử trùng bề mặt lam kính và dao lam, bằng cách hơ trên ngọn lửa đèn cồn
2. Dùng gòn thấm cồn 70% lau qua bề mặt thân Cúc để khử trùng.
3. Với dụng cụ đã được khử trùng nhẹ nhàng cắt một miếng nhỏ của vết bệnh dọc theo mạch dẫn hóa nâu khoảng 5mm², sau đó cắt nhỏ mẫu bệnh. Rút 1-2 giọt nước cất thanh trùng nhỏ lên mẫu bệnh đã cắt. Đợi khoảng 1 phút cho vi khuẩn có đủ thời gian phân tán vào giọt nước. Đưa vào kính hiển vi để quan sát dòng vi khuẩn tuôn ra trong giọt nước.
4. Dùng micropipette rút ra một giọt nhỏ vào rìa của đĩa petri chứa môi trường King's B 2% agar và dùng đũa cấy vi khuẩn đã khử trùng vạch giọt huyền phù vi khuẩn phân tán trên mặt đĩa (Hình 3.1)

Đĩa được ủ trong 48 giờ ở điều kiện phòng thí nghiệm. Quan sát hình thái khuẩn lạc và chọn các đơn khuẩn lạc có màu trắng kem nhẵn bóng, trơn láng, hơi chảy, thực hiện phương pháp tách dòng để thu được vi khuẩn thuần (Burgess *et al.*, 2009).



Hình 3.1: Hình minh họa đĩa cấy vi khuẩn trên môi trường King's B. (Nguồn: Burgess *et al.*, 2009)

Cấy truyền khuẩn lạc đơn từ đĩa cấy tách dòng sang ống nghiệm chứa môi trường King's B 2% agar, trữ làm nguồn để phân lập TKT và các thí nghiệm tiếp theo.

Cách đặt tên vi khuẩn: kí tự chữ là từ viết tắt tên tỉnh nơi mẫu của vi khuẩn được thu, kí tự số là chỉ số dòng vi khuẩn thu thập được ở các tỉnh ĐBSCL và Lâm Đồng.

3.2.1.2 Phân lập các dòng thực khuẩn thể

Mục tiêu: Phân lập các dòng TKT ở một số tỉnh ĐBSCL và Lâm Đồng nhằm tạo ra nguồn TKT ban đầu đa dạng về sinh học và thích ứng được điều kiện ở ĐBSCL.

Phương pháp thu mẫu: Mẫu đất và cây bệnh cùng địa điểm được dùng chung cho phân lập vi khuẩn gây bệnh và TKT.

Phương pháp phân lập thực khuẩn thể

Mẫu rễ, đất và thân cây bị bệnh được rửa sạch, lau khô, sau đó được nghiền ra trong cối sứ. Phần tế bào thực vật sau khi nghiền được cho vào ống falcon đã thanh trùng cộng thêm 5mL nước cất đã thanh trùng, sau đó thực hiện ly tâm ở vận tốc 6000 vòng/ phút trong 5 phút để loại bỏ tế bào thực vật. Thực hiện rút 1mL phần dịch trong của mỗi ống đã ly tâm vào ống eppendorf vô trùng thêm vào 50µl chloroform/mL lắc đều bằng vortex để yên trong 5 phút để loại bỏ vi khuẩn, nấm, sau đó tiếp tục đem ly tâm 6000 vòng/ phút trong 5 phút để loại bỏ Chloroform. Cuối cùng dùng micropipette rút 700µl phần dịch trong chỉ chứa thực khuẩn thể vào ống eppendorf vô trùng khác, đem giữ trong điều kiện che tối ở nhiệt độ 4°C.

Rút 50µl dung dịch huyền phù chứa thực khuẩn thể cho vào đĩa Petri đã thanh trùng chứa môi trường King's B agar đã nấu tan để nguội khoảng 50°C phối hợp với 100 µl huyền phù vi khuẩn phân lập từ mẫu bệnh tương ứng, hoà đều. Đĩa được ủ trong điều kiện phòng và quan sát sự hình thành các đốm thực khuẩn (plaques), đó là nơi vi khuẩn đã bị tiêu diệt bởi thực khuẩn thể. Thực hiện phương pháp tách dòng bằng cách chọn đốm thực khuẩn đơn lẻ và cấy truyền bằng tâm bông đã vô trùng sang đĩa petri mới chứa vi khuẩn ký chủ, sau 24 giờ thực khuẩn thể được thu hoạch bằng cách thêm vào 5mL nước cất vô trùng ngâm trong 30 phút, sau đó thu phần huyền phù chứa thực khuẩn thể. Thực hiện nhỏ ly tâm 2 lần kết hợp chloroform để loại bỏ vi khuẩn (như mô tả ở phần trên), sau đó rút phần dung dịch trong bên trên chỉ chứa thực khuẩn thể qua ống eppendorf khác và trữ nguồn dùng cho thí nghiệm tiếp theo. Mẫu thực

khuẩn thể được trữ nguồn trong điều kiện che tối ở nhiệt độ 4°C (Nga & Tâm, 2014).

Cách đặt tên thực khuẩn thể

Các dòng thực khuẩn thể phân lập được kí hiệu là Φ + tên tỉnh + số thứ tự (1,2,3,...). Trong đó: Φ : ký hiệu TKT, kế đó là tên tỉnh (viết tắt và viết hoa) nơi phân lập được TKT, phần số chỉ số dòng TKT thu thập được ở các tỉnh ĐBSCL.

Trong trường hợp, phân lập trực tiếp không có sự hiện diện TKT, thì mẫu sẽ được thực hiện phân lập theo phương pháp tăng sinh TKT

Phương pháp tăng sinh thực khuẩn thể

Bước 1: Nuôi tất cả các dòng vi khuẩn trên đĩa King's B 2% agar trong 24 giờ.

Bước 2: Dùng đũa cấy vi khuẩn vít từng dòng vi khuẩn khác nhau cho vào ống falcon 50ml đã chứa 10mL môi trường King's B lỏng, nuôi trên máy lắc ngang với vận tốc 100 vòng/phút trong 24 giờ.

Bước 3: Rút 100 μ l từng dòng thực khuẩn thể khác nhau vào 10mL môi trường King's B lỏng đã chứa vi khuẩn. Đặt dung dịch huyền phù đã chứa vi khuẩn và thực khuẩn thể trên máy lắc với vận tốc 100 vòng/phút trong 24 giờ.

Bước 4: Thực hiện ly tâm hai lần kết hợp Chloroform (như mô tả ở phần trên), sau đó rút phần dung dịch trong bên trên chỉ chứa thực khuẩn thể qua ống eppendorf khác và trữ nguồn ở điều kiện che tối ở nhiệt độ 4°C (Nga & Tâm, 2014).

3.2.2 Nội dung 2: Tuyển chọn một số dòng thực khuẩn thể triển vọng trong phòng thí nghiệm và nhà lưới để phòng trị vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* gây bệnh héo xanh trên cây hoa Cúc.

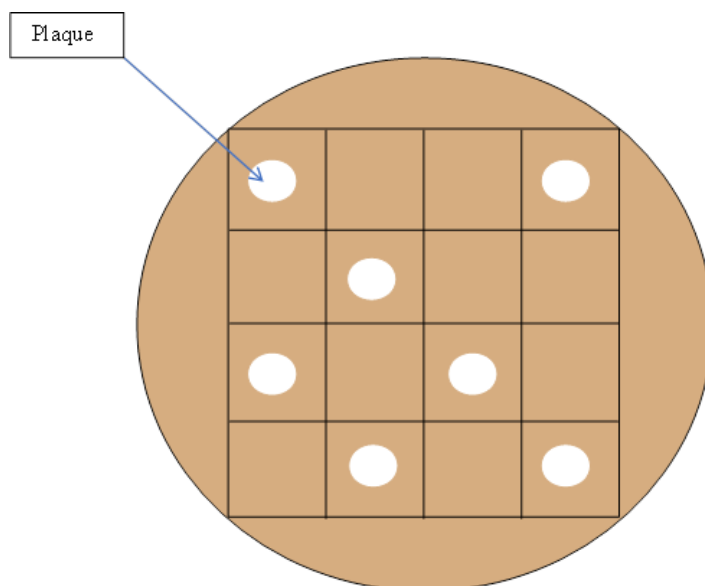
3.2.2.1 Đánh giá khả năng ký sinh của thực khuẩn thể đối với vi khuẩn gây bệnh héo xanh trong điều kiện phòng thí nghiệm

Mục tiêu: Tìm ra 10 dòng TKT có phổ ký chủ rộng nhất và những dòng vi khuẩn *R. solanacearum* mẫn cảm nhất, phục vụ cho nghiên cứu tiếp theo.

Phương pháp thực hiện: Thí nghiệm đánh giá khả năng ký sinh của 124 dòng TKT phân lập được (từ phần 3.2.1.2) trên 55 dòng vi khuẩn *R. solanacearum* được phân lập (từ phần 3.2.1.1.) được thực hiện trên đĩa Petri với 3 lần lặp lại.

Cách tiến hành: Cho 100 μ l huyền phù từng vi khuẩn *R. solanacearum* với OD = 0,3 tương đương mật số 10⁸ CFU/mL (đường chuẩn- phụ chương) trong đĩa petri kẻ vạch 16 ô chứa môi trường King's B 0,8% agar đã nấu tan để nguội ở 50°C, sau đó dùng micropipette hút 5 μ l huyền phù từng dòng thực khuẩn thể nhỏ vào từng ô tương ứng trên đĩa petri đã chứa sẵn vi khuẩn *R. solanacearum* (Hình 3.2). Sau đó đĩa được đặt ở điều kiện phòng (Nga & Tâm, 2014).

Chỉ tiêu ghi nhận: Xác định khả năng kí sinh của TKT thông qua việc hình thành đốm tan (plaques) trên từng dòng vi khuẩn khác nhau sau 24 giờ. Từ đó xác định được phổ kí chủ của mỗi dòng TKT và các dòng vi khuẩn miễn cảm nhất bằng cách đếm tổng số vi khuẩn bị kí sinh bởi mỗi dòng TKT và tổng số TKT kí sinh trên mỗi dòng vi khuẩn.



Hình 3.2: Hình minh họa đánh giá khả năng kí sinh của TKT đối với vi khuẩn gây bệnh héo xanh.

3.2.2.2 Đánh giá khả năng gây hại của các dòng vi khuẩn phân lập trên cây hoa Cúc ở điều kiện nhà lưới

Mục tiêu: chọn ra dòng vi khuẩn có khả năng gây hại cao nhất trên cây hoa Cúc để làm tiền đề cho các thí nghiệm tiếp theo.

Bố trí thí nghiệm: thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên một nhân tố với số nghiệm thức là số dòng vi khuẩn được chọn từ thí nghiệm 3.2.2.1, với 4 lần lặp lại:

Cách thức tiến hành:

- Chuẩn bị cây con: thanh trùng giá thể, cho vào chậu ni-lông có đường kính 20 cm (2,5 kg/chậu), tưới ẩm và trồng cây giống (10 cây/chậu), mỗi nghiệm thức trồng 4 chậu với 4 lần lặp lại, sau khi trồng 20 ngày thì bắt đầu lây bệnh nhân tạo.

- Chuẩn bị nguồn vi khuẩn: nuôi cấy các dòng vi khuẩn *R. solanacearum* trên đĩa petri trong môi trường King's B trong 48 giờ, sau đó cho nước cất thanh trùng vào đĩa và thu huyền phù vi khuẩn, pha loãng để tạo huyền phù vi khuẩn có $OD_{600nm} = 0,3$ tương đương mật số 10^8 CFU/mL (đường chuẩn- phụ chương).

- Phương pháp lây bệnh nhân tạo: tưới nước cho cây (nước máy) để đất ướt trước khi lây bệnh khoảng 1 giờ, tưới huyền phù từng dòng vi khuẩn ($OD_{600nm} = 0,3$) tương ứng với từng nghiệm thức vào đất xung quanh gốc cây (5 mL/cây).

Chỉ tiêu ghi nhận: Theo dõi và quan sát triệu chứng bệnh hàng ngày. Khi triệu chứng bệnh xuất hiện tiến hành ghi nhận tỷ lệ bệnh và cấp bệnh 2 ngày lần

- Tỷ lệ bệnh được tính như sau:

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

- Cấp bệnh: được đánh giá theo thang đánh giá của Ateka *et al.*, (2001) gồm các cấp bệnh như sau:

Cấp 0: cây không bệnh

Cấp 1: có 1 lá héo

Cấp 2: có 2-3 lá héo

Cấp 3: tất cả các lá của cây đều héo ngoại trừ 2-3 lá trên cây

Cấp 4: tất cả các lá của cây đều héo

Cấp 5: Cây chết

- Chỉ số AUDPC được tính theo công thức của Jeger & Viljanen-Rollinson (2001) như sau:

$$AUDPC = \sum_{i=1}^n [(Y_{i+1} + Y_i) \div 2] \times (t_{i+1} - t_i)$$

Trong đó:

i: lần theo dõi bệnh thứ i

n: tổng số lần theo dõi bệnh

Y: tỷ lệ bệnh (%)

t: số ngày đánh giá bệnh (ngày)

3.2.2.3 Định danh vi khuẩn gây bệnh héo xanh trên Cúc

Mục tiêu: Xác định tác nhân vi khuẩn gây bệnh héo xanh trên Cúc đến mức độ loài.

Phương pháp thực hiện: Định danh vi khuẩn bằng phương pháp giải trình tự gen 16S rRNA.

Vật liệu: dòng vi khuẩn gây hại cao (ĐT-9) được chọn từ thí nghiệm 3.2.2.2.

Phương pháp: Thực hiện ly trích DNA của vi khuẩn bằng cách đun sôi eppendorf chứa huyền phù tế bào vi khuẩn trong 20 phút, sau đó để lạnh trong đá, và thực hiện li tâm 13.200 vòng/phút, trong 5 phút, sau đó phần dung dịch bên trên được chuyển sang ống tube khác, đây là DNA của tế bào vi khuẩn.

Phản ứng khuếch đại đoạn gen 16S rRNA bằng cặp mồi chung cho vi khuẩn 27F và 1492R (Weisburg, 1991) có trình tự như sau:

27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTC-3'

1492R: 5'- TACGGTTACCTTGTTACGACT-3'

Hỗn hợp một phản ứng PCR (50microlit) bao gồm các thành phần sau: Nước cất thanh trùng (27 μ l), Buffer 10X (10 μ l), dNTP 10mM (1 μ l), MgCl₂ 100mM (2 μ l), primer 27F 10 μ M (2,5 μ l), primer 2 1492R 10 mM (2,5 μ l), Taq polymerase 5000U/mL (0,3 μ l), DNA khuôn của xạ khuẩn (4 μ l).

Sản phẩm PCR được chạy điện di trên gel agarose 1% tại điện thế 50V. Gel sau đó được nhuộm trong Ethium bromide (1 μ g/mL) trong 15 phút và đọc kết quả dưới máy chụp Gel. Gửi sản phẩm PCR sau khi khuếch đại để giải trình tự tại công ty Sinh Hóa Phù Sa. Kết quả trình tự được so sánh với cơ sở dữ liệu trên ngân hàng gen (NCBI) bằng kỹ thuật Blast, dựa vào mức độ tương đồng về trình tự gen của các dòng đã có trên cơ sở dữ liệu của ngân hàng gen, xác định tên của vi khuẩn. Sau đó, trình tự gen 16S rRNA của vi khuẩn được đăng ký mã số trên NCBI.

3.2.2.4 Đánh giá khả năng phân giải vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* của thực khuẩn thể có phổ ký chủ rộng trong điều kiện phòng thí nghiệm

Mục tiêu: Tuyển chọn được 5 dòng TKT có khả năng tiêu diệt vi khuẩn cao nhất, phục vụ cho các nghiên cứu tiếp theo ở nhà lưới.

Bố trí thí nghiệm: Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 3 lần lặp lại, trong đó gồm 10 dòng TKT có phổ ký chủ rộng nhất và 3 dòng vi khuẩn bị kí sinh nhiều nhất (được chọn ra từ thí nghiệm 3.2.2.1 của nội dung 2).

Các dòng vi khuẩn thí nghiệm được cấy thuần trên đĩa petri chứa môi trường King's B 2% agar.

TKT được nhân nuôi trong đĩa petri chứa môi trường King's B 0,8 % agar trong 24 giờ. Thu hoạch huyền phù TKT và xác định mật số TKT bằng phương pháp pha loãng và trải trên đĩa, sau đó thực hiện phương pháp pha loãng để tạo các huyền phù của các dòng TKT khác nhau với mật số 10^3 PFU/mL.

Cách tiến hành: Rút 100 μ l huyền phù TKT 10^3 PFU/mL + 100 μ L huyền phù vi khuẩn *R. solanacearum* $OD_{600nm} = 0,3$ tương đương mật số 10^8 CFU/mL (đường chuẩn- phụ chương) cho vào đĩa petri chứa 10 mL môi trường King's B 0,8 % agar, được hòa đều với nhau và được đặt ở điều kiện phòng.

Chỉ tiêu ghi nhận: Ghi nhận đường kính đốm tan (plaque) của từng dòng TKT với từng dòng vi khuẩn kí chủ tương ứng, ghi nhận 10 đốm tan (plaque) của mỗi lần lặp lại ở các thời điểm 24, 48, 72 giờ sau khi tiến hành thí nghiệm.

3.2.2.5 Đánh giá khả năng phòng trị bệnh héo xanh trên cây hoa Cúc của 5 dòng thực khuẩn thể triển vọng trong điều kiện nhà lưới

Mục tiêu: xác định được 2 dòng TKT có hiệu quả cao trong phòng trừ bệnh héo xanh trên Cúc làm tiền đề cho các nghiên cứu tiếp theo.

Vật liệu:

+ Dòng vi khuẩn có khả năng gây hại cao nhất (ĐT-9).

+ 5 dòng TKT có phổ kí chủ rộng và đường kính đốm tan cao (ΦBT75, ΦCT44, ΦBT67, ΦCT46, ΦBT56).

Bố trí thí nghiệm: thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên một nhân tố với 7 nghiệm thức và 5 lần lặp lại:

- Nghiệm thức 1: Đối chứng không xử lý TKT.

- Nghiệm thức 2, 3, 4, 5, 6: xử lý tương ứng với từng dòng TKT (ΦBT75, ΦCT44, ΦBT67, ΦCT46, ΦBT56).

- Nghiệm thức 7: xử lý hỗn hợp 5 TKT (Mix).

Cách thức tiến hành:

- Chuẩn bị cây con: thanh trùng giá thể, cho vào chậu ni-lông có đường kính 20cm (2,5kg/chậu), tưới ẩm và trồng cây giống (10 cây/chậu), mỗi nghiệm thức trồng 5 chậu với 5 lần lặp lại, sau khi trồng 20 ngày thì bắt đầu bố trí thí nghiệm.

- Chuẩn bị nguồn vi khuẩn: dòng vi khuẩn *R. solanacearum* có khả năng gây hại cao nhất (ĐT-9) được nuôi cấy ở môi trường King's B trong 48 giờ cho khuẩn lạc phát triển, sau đó cho nước cất thanh trùng vào đĩa và thu huyền phù vi khuẩn, pha loãng để tạo huyền phù vi khuẩn có OD_{600nm} = 0,3 tương đương mật số 10⁸ CFU/mL (đường chuẩn- phụ chương).

- Chuẩn bị nguồn TKT: 5 dòng TKT (ΦBT75, ΦCT44, ΦBT67, ΦCT46, ΦBT56) được nhân mật số trong 24 giờ, sau đó thu hoạch huyền phù TKT rồi tiến hành đếm mật số bằng phương pháp pha loãng và trải trên đĩa. Dựa vào mật số TKT được xác định sau 24 giờ, tiến hành pha loãng các dòng TKT khác nhau về mật số 10⁸ PFU/mL. Riêng hỗn hợp 5 dòng TKT với mật số 10⁸ PFU/mL (mỗi dòng TKT chiếm mật số 2.10⁷ PFU/mL).

- Phương pháp xử lý TKT: tưới huyền phù từng dòng TKT tương ứng với từng nghiệm thức vào đất xung quanh gốc cây (5mL/cây) vào buổi chiều lúc 17 giờ.

- Phương pháp lây bệnh nhân tạo: sau khi tưới TKT 1 giờ, tiến hành lây bệnh nhân tạo bằng cách tưới huyền phù vi khuẩn *R. solanacearum* OD_{600nm} = 0,3 tương đương mật số 10⁸ CFU/mL (đường chuẩn- phụ chương) đã được chuẩn bị vào đất xung quanh gốc cây (5 mL/cây).

Chỉ tiêu ghi nhận: Theo dõi và quan sát triệu chứng bệnh hàng ngày. Khi triệu chứng bệnh xuất hiện thì tiến hành ghi nhận tỷ lệ bệnh và cấp bệnh theo quá trình tiến triển của bệnh.

Tỷ lệ bệnh, cấp bệnh, chỉ số AUDPC được tính (tương tự thí nghiệm 3.2.2.2 - Nội dung 2).

3.2.2.6 Đánh giá thời điểm xử lý 2 dòng thực khuẩn thể triển vọng lên khả năng phòng trị bệnh héo xanh trên cây hoa Cúc trong điều kiện nhà lưới

Mục tiêu: chọn được một dòng TKT đạt hiệu quả cao nhất và cách xử lý TKT tối ưu nhất trong việc quản lý bệnh héo xanh trên Cúc trong điều kiện nhà lưới.

Vật liệu:

- + Dòng vi khuẩn có khả năng gây hại cao nhất (ĐT-9).
- + 2 dòng TKT có hiệu quả phòng trừ bệnh cao (ΦBT56 và ΦBT67).

Bố trí thí nghiệm: thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 8 nghiệm thức và 4 lần lặp lại:

- Nghiệm thức 1: cây khỏe không lây bệnh nhân tạo.

- Nghiệm thức 2: đối chứng lây bệnh.

- Nghiệm thức 3, 4, 5: xử lý TKT (ΦBT56) lần lượt vào thời điểm trước khi lây bệnh 1 giờ; thời điểm 5 ngày sau khi lây bệnh; kết hợp trước 1 giờ và sau khi lây bệnh 5 ngày.

- Nghiệm thức 6, 7, 8: xử lý TKT (ΦBT67) lần lượt vào thời điểm trước khi lây bệnh 1 giờ, thời điểm 5 ngày sau khi lây bệnh, kết hợp trước 1 giờ và sau khi lây bệnh 5 ngày.

Cách thức tiến hành:

- Chuẩn bị cây con: thanh trùng giá thể, cho vào chậu ni-lông có đường kính 20cm (2,5kg/chậu), tưới ẩm và trồng cây giống (10 cây/chậu), mỗi nghiệm thức trồng 4 chậu với 4 lần lặp lại, sau khi trồng 20 ngày thì bắt đầu bố trí thí nghiệm.

- Chuẩn bị nguồn vi khuẩn: dòng vi khuẩn có khả năng gây hại cao nhất (ĐT-9) được nuôi cấy ở môi trường King's B trong 48 giờ cho khuẩn lạc phát triển, sau đó cho nước cất thanh trùng vào đĩa và thu huyền phù vi khuẩn, pha loãng để tạo huyền phù vi khuẩn có $OD_{600nm} = 0,3$ tương đương mật số 10^8 CFU/mL (đường chuẩn- phụ chương).

- Chuẩn bị nguồn TKT: hai dòng TKT (ΦBT56 và ΦBT67) được nhân mật số trong 24 giờ, sau đó thu hoạch huyền phù TKT rồi tiến hành đếm mật số bằng phương pháp pha loãng và trải trên đĩa. Dựa vào mật số TKT được xác định sau 24 giờ, tiến hành pha loãng các dòng TKT khác nhau về mật số 10^8 PFU/mL.

- Phương pháp xử lý TKT: tưới huyền phù từng dòng TKT tương ứng với từng nghiệm thức vào đất xung quanh gốc cây (5 mL/cây) vào buổi chiều lúc 17 giờ (Iriarte *et al.*, (2007); Balogh *et al.*, (2003)).

- Phương pháp lây bệnh nhân tạo: sau khi tưới TKT 1 giờ, tiến hành lây bệnh nhân tạo bằng cách tưới huyền phù vi khuẩn ($OD_{600nm}=0.3$) đã được chuẩn bị vào đất xung quanh gốc cây (5 mL/cây).

Chỉ tiêu ghi nhận: Theo dõi và quan sát triệu chứng bệnh hàng ngày. Khi triệu chứng bệnh xuất hiện thì tiến hành ghi nhận tỷ lệ bệnh theo quá trình tiến triển của bệnh.

Cách tính tỷ lệ bệnh, AUDPC (tương tự thí nghiệm 3.2.2.2 - Nội dung 2)

3.2.2.7 Đánh giá ảnh hưởng của mật số thực khuẩn thể lên khả năng phòng trị bệnh héo xanh trên cây hoa Cúc trong điều kiện nhà lưới

Mục tiêu: xác định được mật số TKT xử lý cho hiệu quả phòng trừ bệnh héo xanh trên Cúc tốt nhất làm tiền đề cho nghiên cứu ngoài đồng.

Vật liệu:

- + Dòng vi khuẩn có khả năng gây hại cao nhất (ĐT-9).
- + Dòng TKT có hiệu quả phòng trừ bệnh cao (ΦBT56).

Bố trí thí nghiệm: thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên một nhân tố với 5 nghiệm thức và 4 lần lặp lại:

- Nghiệm thức 1: không lây bệnh nhân tạo.
- Nghiệm thức 2: đối chứng lây bệnh.
- Nghiệm thức 3, 4, 5: xử lý TKT (ΦBT56) lần lượt ở 10^6 , 10^7 , 10^8 PFU/mL.

Cách thức tiến hành:

- Chuẩn bị cây con: thanh trùng giá thể, cho vào chậu ni-lông có đường kính 20cm (2,5kg/chậu), tưới ẩm và trồng cây giống (10 cây/chậu), mỗi nghiệm thức trồng 4 chậu với 4 lần lặp lại, sau khi trồng 20 ngày thì bắt đầu bố trí thí nghiệm.

- Chuẩn bị nguồn vi khuẩn: dòng vi khuẩn có khả năng gây hại cao nhất (ĐT-9) được nuôi cấy ở môi trường King's B trong 48 giờ cho khuẩn lạc phát triển, sau đó cho nước cất thanh trùng vào đĩa và thu huyền phù vi khuẩn, pha loãng để tạo huyền phù vi khuẩn có $OD_{600nm} = 0,3$ tương đương mật số 10^8 CFU/mL (đường chuẩn- phụ chương).

- Chuẩn bị nguồn TKT: dòng TKT (ΦBT56) được nhân mật số trong 24 giờ, sau đó thu hoạch huyền phù TKT rồi tiến hành đếm mật số bằng phương pháp pha loãng và trải trên đĩa. Dựa vào mật số TKT được xác định sau 24 giờ, tiến hành pha loãng các dòng TKT khác nhau về mật số 10^6 , 10^7 , 10^8 PFU/mL.

- Phương pháp xử lý TKT: tưới huyền phù từng mật số (10^6 , 10^7 , 10^8 PFU/mL) TKT tương ứng với từng nghiệm thức vào đất xung quanh gốc cây (5 mL/cây) 1 lần vào buổi chiều lúc 17 giờ vào 1 giờ trước khi lây bệnh nhân tạo.

- Phương pháp lây bệnh nhân tạo: sau khi tưới TKT 1 giờ, tiến hành lây bệnh nhân tạo bằng cách tưới huyền phù vi khuẩn ($OD_{600nm}=0.3$) đã được chuẩn bị vào đất xung quanh gốc cây (5 mL/cây).

Chỉ tiêu ghi nhận: Ghi nhận tỷ lệ bệnh, cấp bệnh, AUDPC (trương tự thí nghiệm 3.2.2.2 - Nội dung 2).

3.2.2.8 Khảo sát đặc điểm hình thái của 2 dòng thực khuẩn thể triển vọng bằng kính hiển vi điện tử Transmission Electron Microscopy (TEM)

Mục tiêu: xác định họ của 2 dòng TKT triển vọng dựa vào phân loại theo đặc điểm hình thái của Ủy ban Quốc tế về phân loại virus (ICTV) (Grath & Sinderen, 2007; Ackermann, 2009).

Vật liệu: 2 dòng TKT có hiệu quả phòng trừ bệnh cao (ΦBT56 và ΦBT67).

Phương pháp:

+ Chuẩn bị nguồn TKT: hai dòng TKT tốt nhất (ΦBT56 và ΦBT67) được nhân mật số đạt 10^{10} PFU/mL gửi sang viện nghiên cứu công nghệ Kyoto (Nhật Bản) khảo sát đặc điểm hình thái.

+ Phương pháp quan sát mẫu dưới kính hiển vi điện tử TEM.

Huyền phù thực khuẩn thể với mật số 10^{10} PFU/mL được nhỏ lên grid có phủ màng Carbon Elastic, để trong 2 phút. Sau đó, dùng giấy thấm vô trùng thấm hết giọt dung dịch trên grid. Tiếp đến nhuộm với dung dịch sodium phosphotungstate (1% w/v) ở pH 7,0. Sau 2 phút cho hấp phụ, dùng giấy thấm vô trùng thấm hết giọt dung dịch trên đĩa và để qua đêm. Các thực khuẩn thể được quan sát ở chế độ TEM với kính hiển vi điện tử STEM HD-2700 (Hitachi High-Technologies Corn) ở 200 kV.

Xử lý kết quả: kết quả hình thái virion của TKT được phân loại dựa trên khóa phân loại theo Ủy ban Quốc tế về phân loại virus (ICTV) (Grath & Sinderen, 2007; Ackermann, 2009).

3.2.3 Nội dung 3: Xác định loại thuốc hóa học có hiệu lực ức chế vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* gây bệnh héo xanh trên cây hoa Cúc trong phòng thí nghiệm và hiệu quả phòng trừ bệnh ở điều kiện nhà lưới

3.2.3.1 Đánh giá hiệu quả ức chế *Ralstonia solanacearum* của một số loại thuốc hóa học trong điều kiện phòng thí nghiệm

Mục tiêu: chọn được 3 loại thuốc hóa học hiệu quả ức chế vi khuẩn *R. solanacearum* cao nhất để tiếp tục đánh giá hiệu quả phòng trừ bệnh ở nhà lưới.

Vật liệu:

+ Dòng vi khuẩn có khả năng gây hại cao nhất (ĐT-9).

+ 14 loại thuốc hóa học trừ vi khuẩn (Bảng 3.1).

Bố trí thí nghiệm: Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên gồm có 14 nghiệm thức thuốc hóa học với 4 lần lặp lại.

Bảng 3.1: Các loại thuốc hóa học được sử dụng trong nghiên cứu

Nghiệm thức	Tên thuốc	Hoạt chất	Nồng độ	Liều lượng/50 mL nước
1	ViSen 20SC	Saisentong	20%	0,04 mL
2	Kasumin 2SL	Kasugamycin	2%	0,125 mL
3	Physan 20SL	Quaternary Ammonium Salts	20%	0,05 mL
4	Starner 20WP	Oxolinic acid	20%	0,0625 g
5	Avalon 8WP	Oxytetracycline Hydrochloride và Gentamicin Sulphate	6% và 2%	0,078 g
6	Coc 85WP	Copper Oxychloride	85%	0,0625 g
7	Strepgold 100WP	Streptomycin sulfate	10%	0,03125 g
8	Basu 250WP	Bismethiazol	25%	0,125 g
9	Xantocin 40WP	Bronopol	40%	0,075 g
10	Norshield 86,2 WG	Cuprous Oxide	86,2%	0,05 g
11	Miksabe 100WP	Streptomycin và Oxytetracycline	5% và 5%	0,05 g
12	Kocide 53,8WG	Copper hydroxide	53,8%	0,078 g
13	Bordeaux	Calcium oxide + Cupric sulfate	1%	3 mL
14	Vôi	Calcium oxide	6%	3 mL

Cách tiến hành:

Nguồn vi khuẩn: dòng vi khuẩn gây hại cao nhất (ĐT-9) được nuôi cấy thuần trên đĩa petri chứa môi trường King's B 2% agar, sau 24 giờ pha với nước cất vô trùng để được huyền phù vi khuẩn ($OD_{600nm} = 0,3$).

Chuẩn bị thuốc hóa học: Các loại thuốc hóa học được pha với nước cất vô trùng trong ống Falcon 50 mL như nồng độ khuyến cáo ở (Bảng 3.1).

Đặt các khoanh giấy thấm (đường kính $d=5$ mm) trong 15 phút cho hoạt chất thấm vào giấy. Rút 100 μ l huyền phù vi khuẩn *R. solanacearum* $OD_{600nm} = 0,3$ và 10 mL môi trường King's B 2% agar vô trùng giữ nhiệt ở 50°C cho vào đĩa Petri, lắc nhẹ để hòa đều vi khuẩn trong môi trường. Khi agar đặc lại, thực hiện đặt các khoanh giấy thấm tẩm thuốc vào đĩa petri, sau đó giữ đĩa petri ở nhiệt độ phòng và ghi nhận chỉ tiêu (Balouiri *et al.*, 2016).

Chỉ tiêu ghi nhận: Ghi nhận bán kính vòng vô khuẩn của từng loại thuốc tương ứng của mỗi lần lặp lại ở các thời điểm 24, 48, 72 giờ sau khi tiến hành thí nghiệm.

3.2.3.2 Đánh giá khả năng phòng trị bệnh héo xanh trên cây hoa Cúc của thuốc hóa học trong điều kiện nhà lưới

Mục tiêu: chọn được 1 loại thuốc hóa học và thời điểm xử lý hiệu quả nhất trong việc quản lý bệnh héo xanh trên Cúc phục vụ nghiên cứu ngoài đồng.

Vật liệu:

+ Dòng vi khuẩn có khả năng gây hại cao nhất (ĐT-9).

+ 3 loại thuốc hóa học trừ vi khuẩn có hiệu quả (Starner 20WP, Miksabe 100WP, Avalon 8WP).

Bố trí thí nghiệm: thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 3 loại thuốc, 11 nghiệm thức và 4 lần lặp lại:

- Nghiệm thức 1: không lây bệnh nhân tạo.
- Nghiệm thức 2: chỉ lây bệnh nhân tạo.
- Nghiệm thức 3: xử lý thuốc (Starner 20WP) vào 1 ngày trước khi lây bệnh.
- Nghiệm thức 4: xử lý thuốc (Starner 20WP) vào 5 ngày sau khi lây bệnh.
- Nghiệm thức 5: xử lý thuốc (Starner 20WP) hai lần vào 1 ngày trước khi lây bệnh và 5 ngày sau khi lây bệnh.
- Nghiệm thức 6: xử lý thuốc (Miksabe 100WP) vào 1 ngày trước khi lây bệnh.
- Nghiệm thức 7: xử lý thuốc (Miksabe 100WP) vào 5 ngày sau khi lây bệnh.
- Nghiệm thức 8: xử lý thuốc (Miksabe 100WP) hai lần vào 1 ngày trước khi lây bệnh và 5 ngày sau khi lây bệnh.
- Nghiệm thức 9: xử lý thuốc (Avalon 8WP) vào 1 ngày trước khi lây bệnh.
- Nghiệm thức 10: xử lý thuốc (Avalon 8WP) vào 5 ngày sau khi lây bệnh.
- Nghiệm thức 11: xử lý thuốc (Avalon 8WP) hai lần vào 1 ngày trước khi lây bệnh và 5 ngày sau khi lây bệnh.

Cách thức tiến hành:

- Chuẩn bị cây con: thanh trùng giá thể, cho vào chậu ni-lông có đường kính 20cm (2,5 kg/chậu), tưới ẩm và trồng cây giống (10 cây/chậu), mỗi

nghiệm thức trồng 4 chậu với 4 lần lặp lại, sau khi trồng 20 ngày thì bắt đầu bố trí thí nghiệm.

- Chuẩn bị nguồn vi khuẩn: dòng vi khuẩn có khả năng gây hại cao nhất (ĐT-9) được nuôi ở môi trường King's B trong 48 giờ cho khuẩn lạc phát triển, sau đó cho nước cất thanh trùng vào đĩa và thu huyền phù vi khuẩn, pha loãng để tạo huyền phù vi khuẩn có $OD_{600nm}=0,3$.

- Chuẩn bị thuốc hóa học: 3 loại thuốc hóa học được pha ở nồng độ khuyến cáo (Bảng 3.1) và phun vào đất theo thời điểm từng nghiệm thức với 50mL/Chậu.

- Phương pháp lây bệnh nhân tạo: tiến hành lây bệnh nhân tạo ở thời điểm 20 ngày sau khi trồng, bằng cách tưới huyền phù vi khuẩn ($OD_{600nm}=0,3$) đã được chuẩn bị vào đất xung quanh gốc cây (5 mL/cây).

Chỉ tiêu ghi nhận: Theo dõi và quan sát triệu chứng bệnh hàng ngày. Khi triệu chứng bệnh xuất hiện thì tiến hành ghi nhận tỷ lệ bệnh và cấp độ bệnh, AUDPC tương tự (thí nghiệm 3.2.2.2 - Nội dung 2).

3.2.4 Nội dung 4: Đánh giá hiệu quả phòng trị của thực khuẩn thể được chọn đối với bệnh héo xanh do vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* trên cây hoa Cúc ở điều kiện ngoài đồng.

3.2.4.1 Đánh giá hiệu quả phòng trị của thực khuẩn thể đối với bệnh héo xanh trên cây hoa Cúc bị lây bệnh nhân tạo ở điều kiện ngoài đồng tại Cần Thơ.

Thời gian thực hiện: từ 15/9/2017 đến 15/12/2017.

Mục tiêu: đánh giá hiệu quả quản lý của TKT và thuốc hóa học đối với bệnh héo xanh trên cây hoa Cúc ở điều kiện ngoài đồng khi không có áp lực bệnh tự nhiên.

Vật liệu:

- + Dòng vi khuẩn có khả năng gây hại cao (ĐT-9).
- + 2 dòng TKT có hiệu quả phòng trừ bệnh cao (ΦBT56 và ΦBT67).
- + Thuốc hóa học trừ vi khuẩn có hiệu quả cao nhất (Miksabe 100WP với hoạt chất streptomycin + oxytetracycline).

Bố trí thí nghiệm: thí nghiệm được bố trí khối hoàn toàn ngẫu nhiên một nhân tố với 7 nghiệm thức và 4 lần lặp lại:

- Nghiệm thức 1: Đối chứng không lây bệnh.
- Nghiệm thức 2: Đối chứng có lây bệnh.

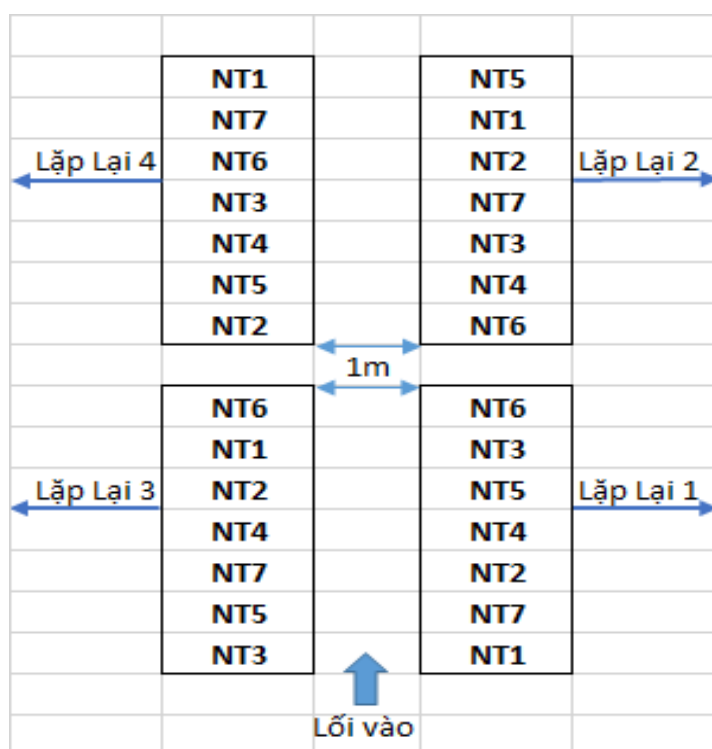
- Nghiệm thức 3: Xử lý TKT ΦBT56 ở mật số 10^8 PFU/mL định kỳ 10 ngày/lần.

- Nghiệm thức 4: Xử lý hỗn hợp hai TKT (ΦBT56 và ΦBT67) ở mật số 10^8 PFU/mL định kỳ 10 ngày/lần.

- Nghiệm thức 5: xử lý thuốc hóa học (Miksabe 100WP với hoạt chất streptomycin + oxytetracycline) định kỳ 10 ngày/lần.

- Nghiệm thức 6: xử lý TKT ΦBT56 mật số 10^8 PFU/mL định kỳ 10 ngày/lần kết hợp thuốc hóa học (Miksabe 100WP với hoạt chất streptomycin + oxytetracycline) khi tỉ lệ bệnh >10%.

- Nghiệm thức 7: xử lý hỗn hợp hai TKT (ΦBT56 và ΦBT67) mật số 10^8 PFU/mL định kỳ 10 ngày/lần kết hợp thuốc hóa học (Miksabe 100WP với hoạt chất streptomycin + oxytetracycline) khi tỉ lệ bệnh >10%.



Hình 3.3: Sơ đồ bố trí thí nghiệm 1- Ngoài đồng

Cách thức tiến hành:

Chuẩn bị ruộng trồng: giàn trồng được làm với chiều cao 1m và khoảng cách giữa hai hàng là 0,5m nhằm cách ly các chậu và hạn chế nguồn sâu bệnh từ dưới đất, các chậu hoa Cúc được đặt lên giàn theo khối với mỗi khối bao gồm một lần lặp lại và 7 nghiệm thức. Nước tưới được sử dụng là nguồn nước máy và tưới 2 lần/ngày.

Chuẩn bị cây con: chuẩn bị giá thể tương tự như nông dân bao gồm xơ dừa, đất, phân hữu cơ, sau đó cho vào chậu có đường kính 20cm (2,5kg/chậu), tưới ẩm và trồng cây giống (3 cây/chậu), mỗi nghiệm thức trồng 40 chậu tương đương với 4 lần lặp lại, sau khi trồng 20 ngày thì bắt đầu bố trí thí nghiệm.

Chuẩn bị nguồn vi khuẩn: dòng vi khuẩn có khả năng gây hại cao nhất (ĐT-9) được nuôi cấy trong đĩa petri chứa môi trường King's B trong 48 giờ cho khuẩn lạc phát triển, sau đó cho nước cất thanh trùng vào đĩa rồi thu huyền phù vi khuẩn và pha loãng để tạo huyền phù vi khuẩn có $OD_{600nm} = 0,3$.

Chuẩn bị nguồn TKT: 2 dòng TKT (ΦBT56 và ΦBT67) được nhân mật số trong 24 giờ, sau đó thu hoạch huyền phù TKT rồi tiến hành đếm mật số bằng phương pháp pha loãng và trải trên đĩa chứa vi khuẩn được nuôi trong môi trường King's B 0,8%. Dựa vào số lượng đốm tan (plaques) hình thành trên đĩa sau 24 giờ để xác định mật số TKT trong huyền phù, tiến hành pha loãng để được mật số 10^8 PFU/mL cho mỗi dòng TKT.

Chuẩn bị thuốc hóa học: Thuốc trừ vi khuẩn (Miksabe 100WP với hoạt chất streptomycin + oxytetracycline) được pha ở nồng độ khuyến cáo (Bảng 3.1).

Phương pháp lây bệnh nhân tạo: tiến hành lây bệnh nhân tạo ở thời điểm 20 ngày sau khi trồng, bằng cách tưới huyền phù vi khuẩn *R. solanacearum* $OD_{600nm} = 0,3$ tương đương mật số 10^8 CFU/mL (đường chuẩn-phụ chương) đã được chuẩn bị vào đất xung quanh gốc cây (5 mL/cây).

Phương pháp xử lý TKT: tưới huyền phù từng dòng TKT và hỗn hợp TKT tương ứng với từng nghiệm thức vào đất xung quanh gốc cây (5 mL/cây) vào buổi chiều lúc 17 giờ và định kỳ 10 ngày/lần.

Phương pháp xử lý thuốc hóa học: Đối với nghiệm thức thuốc hóa học đơn lẻ phun thuốc hóa học theo nồng độ và được xử lý trước khi lây bệnh 1 ngày và định kỳ 10 ngày/lần với 5mL/cây. Đối với nghiệm thức phối hợp TKT và thuốc hóa học phun thuốc hóa học khi tỉ lệ bệnh > 10% và định kỳ 10 ngày/lần.

Đối với các dịch hại khác như: bọ trĩ, nhện đỏ, sâu ăn tạp, rầy mềm, rầy phấn trắng, bệnh thán thư, bệnh đốm lá, bệnh cháy lá, bệnh héo rũ do nấm sử dụng luân phiên thuốc hóa học như tập quán của nông dân. Phun ngừa định kỳ 7 ngày/lần.

Chỉ tiêu ghi nhận: Theo dõi và quan sát triệu chứng bệnh hàng ngày. Khi triệu chứng bệnh xuất hiện thì tiến hành ghi nhận tỷ lệ bệnh, cấp độ bệnh, AUDPC (tương tự thí nghiệm 3.2.2.2 - Nội dung 2) và hiệu quả giảm bệnh.

Hiệu quả giảm bệnh: được tính theo công thức Abbott (1925) như sau:

$$\text{HQGB (\%)} = [(C - T) : C] 100$$

Trong đó: C: số cây bị bệnh ở công thức đối chứng (không xử lý); T: số cây bị bệnh héo xanh ở công thức thí nghiệm (có xử lý thực khuẩn thể hoặc thuốc hóa học).

3.2.4.2 Đánh giá hiệu quả phòng trị của thực khuẩn thể đối với bệnh héo xanh trên cây hoa Cúc bị lây bệnh nhân tạo ở điều kiện ngoài đồng tại tỉnh Đồng Tháp.

Thời gian thực hiện: từ 10/01/2018 đến 16/04/2018.

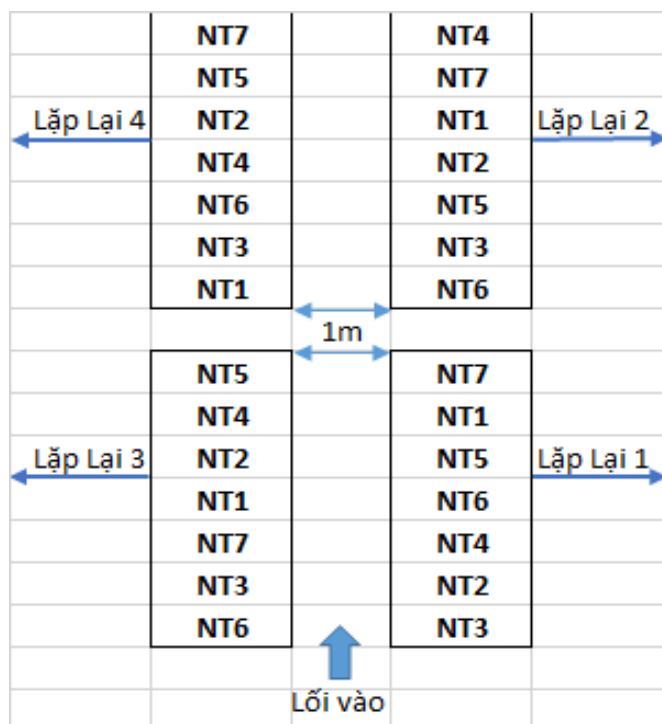
Mục tiêu: đánh giá hiệu quả quản lý của TKT và thuốc hóa học đối với bệnh héo xanh trên cây hoa Cúc ở điều kiện ngoài đồng.

Vật liệu:

- + 3 dòng vi khuẩn có khả năng gây hại cao (ĐT-9, BT-176, TG-189).
- + 2 dòng TKT có hiệu quả phòng trừ bệnh cao (ΦBT56 và ΦBT67).
- + Thuốc hóa học trừ vi khuẩn có hiệu quả cao (Miksabe 100WP với hoạt chất streptomycin + oxytetracycline).

Bố trí thí nghiệm: thí nghiệm được bố trí khối hoàn toàn ngẫu nhiên một nhân tố với 7 nghiệm thức và 4 lần lặp lại:

- Nghiệm thức 1: Đối chứng không lây bệnh nhân tạo.
- Nghiệm thức 2: Lây bệnh nhân tạo (phối hợp 3 dòng vi khuẩn gây hại cao (ĐT-9, BT-176, TG-189)).
- Nghiệm thức 3: Xử lý TKT (ΦBT56) mật số 10^8 PFU/mL định kỳ 10 ngày/lần.
- Nghiệm thức 4: Xử lý hỗn hợp 2 TKT mật số 10^8 PFU/mL định kỳ 10 ngày/lần.
- Nghiệm thức 5: Xử lý thuốc hóa học theo định kỳ 10 ngày/lần.
- Nghiệm thức 6: Xử lý kết hợp TKT (ΦBT56) và thuốc hóa học khi tỷ lệ bệnh >10%.
- Nghiệm thức 7: Xử lý kết hợp hỗn hợp 2 TKT và thuốc hóa học khi tỷ lệ bệnh >10%.



Hình 3.4: Sơ đồ bố trí thí nghiệm 2- Ngoài đồng

Cách thức tiến hành: thực hiện tương tự (thí nghiệm 3.2.4.1- Nội dung 4). nhưng có khác ở một số điểm sau:

Chuẩn bị nguồn vi khuẩn: huyền phù vi khuẩn để lây bệnh nhân tạo được chuẩn bị là hỗn hợp 3 dòng vi khuẩn gây hại cao (ĐT-9, BT-176, TG-189) được nuôi cấy ở môi trường King's B trong 48 giờ cho khuẩn lạc phát triển, sau đó cho nước cất thanh trùng vào đĩa và thu huyền phù vi khuẩn, pha loãng để tạo huyền phù vi khuẩn có $OD_{600nm}=0,3$ (10^8 CFU/mL).

Chỉ tiêu ghi nhận: Theo dõi và quan sát triệu chứng bệnh hàng ngày. Khi triệu chứng bệnh xuất hiện thì tiến hành ghi nhận tỷ lệ bệnh, cấp độ bệnh, AUDPC và hiệu quả giảm bệnh (như mô tả thí nghiệm 3.2.4.1- nội dung 4)

3.2.4.3 Đánh giá hiệu quả phòng trị của thực khuẩn thể đối với bệnh héo xanh trên cây hoa Cúc bị nhiễm bệnh tự nhiên ở điều kiện ngoài đồng tại tỉnh Đồng Tháp.

Thời gian thực hiện: từ 20/04/2018 đến 28/07/2018.

Mục tiêu: đánh giá hiệu quả quản lý của TKT và thuốc hóa học đối với bệnh héo xanh trên cây hoa Cúc ở điều kiện ngoài đồng trong điều kiện nhiễm bệnh tự nhiên (không lây bệnh nhân tạo) nhằm xây dựng quy trình quản lý tổng hợp bệnh héo xanh do vi khuẩn *R. solanacearum* trên cây hoa Cúc đạt hiệu quả.

Vật liệu:

+ 2 dòng TKT có hiệu quả phòng trừ bệnh cao (ΦBT56 và ΦBT67).

+ Thuốc hóa học trừ vi khuẩn có hiệu quả cao (Miksabe 100WP với hoạt chất streptomycin + oxytetracycline).

Bố trí thí nghiệm: thí nghiệm được bố trí khối hoàn toàn ngẫu nhiên một nhân tố với 7 nghiệm thức và 4 lần lặp lại ở điều kiện ngoài đồng tại tỉnh Đồng Tháp.

- Nghiệm thức 1: đối chứng không xử lý.

- Nghiệm thức 2: xử lý giống nông dân.

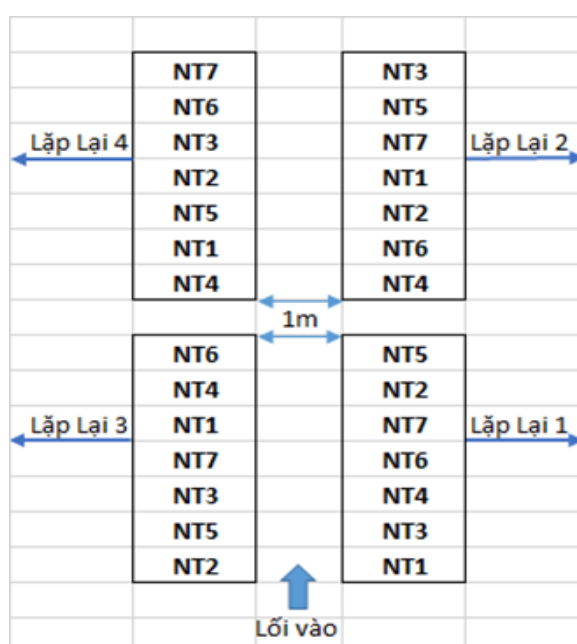
- Nghiệm thức 3: xử lý TKT ΦBT56 (10^8 PFU/mL) định kỳ 10 ngày/lần.

- Nghiệm thức 4: xử lý hỗn hợp 2 TKT ΦBT56 và ΦBT67 (10^8 PFU/mL) định kỳ 10 ngày/lần.

- Nghiệm thức 5: xử lý thuốc hóa học (Miksabe 100WP với hoạt chất streptomycin + oxytetracycline) theo định kỳ 10 ngày/lần.

- Nghiệm thức 6: xử lý kết hợp TKT ΦBT56 (10^8 PFU/mL) và thuốc hóa học (Miksabe 100WP với hoạt chất streptomycin + oxytetracycline) khi tỷ lệ bệnh >10%.

- Nghiệm thức 7: xử lý kết hợp hỗn hợp 2 TKT (ΦBT56 và ΦBT67) và thuốc hóa học (Miksabe 100WP với hoạt chất streptomycin + oxytetracycline) khi tỷ lệ bệnh >10%.



Hình 3.5: Sơ đồ bố trí thí nghiệm 3- Ngoài đồng

Cách thức tiến hành: thực hiện (tương tự thí nghiệm 3.2.4.2- Nội dung 4) nhưng không lây bệnh nhân tạo.

Phương pháp canh tác của nông dân: sau khi cây con trồng đã bắt rễ, cứ mỗi 7 ngày sẽ bón phân, phun thuốc phòng trị côn trùng (bọ trĩ, rầy mềm, sâu ăn tạp, rầy phấn trắng), nấm (thán thư, đốm lá, héo rũ) và vi khuẩn (héo xanh) gây bệnh. Ngoài ra, sau khi trồng vào chậu 20 ngày sẽ tiến hành ngắt chèo ngọn và sau đó cách 15 ngày sẽ tiến hành bấm ngọn một lần và mỗi cây hoa Cúc sẽ tiến hành bấm ngọn 3 lần trong suốt vụ trồng. Nước được tưới 2 lần mỗi ngày.

Chỉ tiêu ghi nhận: Theo dõi và quan sát triệu chứng bệnh hàng ngày. Khi triệu chứng bệnh xuất hiện thì tiến hành ghi nhận tỷ lệ bệnh, cấp độ bệnh, AUDPC và hiệu quả giảm bệnh (như mô tả thí nghiệm 3.2.4.1- nội dung 4).

3.2.5. Xử lý số liệu

Số liệu từ các nội dung nghiên cứu được xử lý bằng Excel và phân tích thống kê bằng phần mềm Mstat-C qua phép thử Duncan.

3.2.6. Công thức phân bón cho các thí nghiệm nhà lưới và ngoài đồng

Công thức phân bón dùng trong thí nghiệm: ở giai đoạn cây con sử dụng phân NPK 20-20-15+TE với lượng 1kg/2000 cây (pha loãng với nước và tưới 50mL/chậu). Khi cây lớn bón định kỳ với lượng phân 1kg/1000 cây (bón trực tiếp vào gốc cây không cần pha nước với 10g/chậu), mỗi 10 ngày bón phân một lần.

CHƯƠNG 4: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

4.1 Nội dung 1: Phân lập các dòng vi khuẩn gây bệnh héo xanh trên cây hoa Cúc và các dòng thực khuẩn thể có khả năng kí sinh vi khuẩn gây bệnh ở một số tỉnh ĐBSCL và tỉnh Lâm Đồng

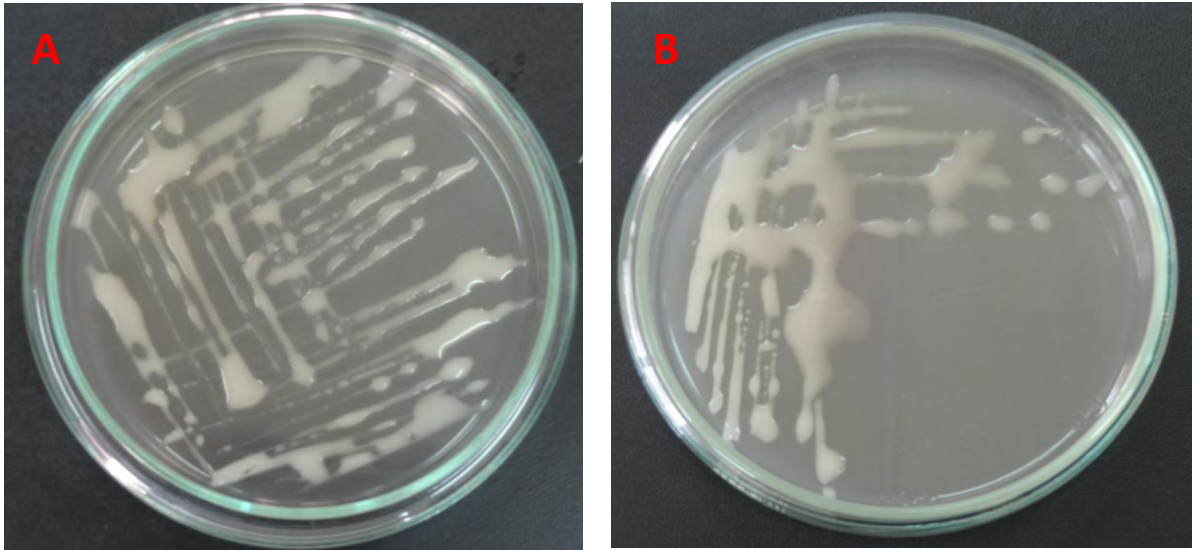
4.1.1 Kết quả phân lập các dòng vi khuẩn gây bệnh héo xanh

Kết quả phân lập được 55 dòng vi khuẩn gây bệnh héo xanh ở các tỉnh: Bến Tre, Cần Thơ, Hậu Giang, Tiền Giang, An Giang, Đồng Tháp, Bạc Liêu, Lâm Đồng. Trong đó, 13 dòng vi khuẩn được phân lập thuộc tỉnh Bến Tre, 13 dòng vi khuẩn phân lập từ Cần Thơ, 12 dòng vi khuẩn ở Tiền Giang, 8 dòng vi khuẩn ở Đồng Tháp và các dòng còn lại thuộc các tỉnh khác (Bảng 4.1).

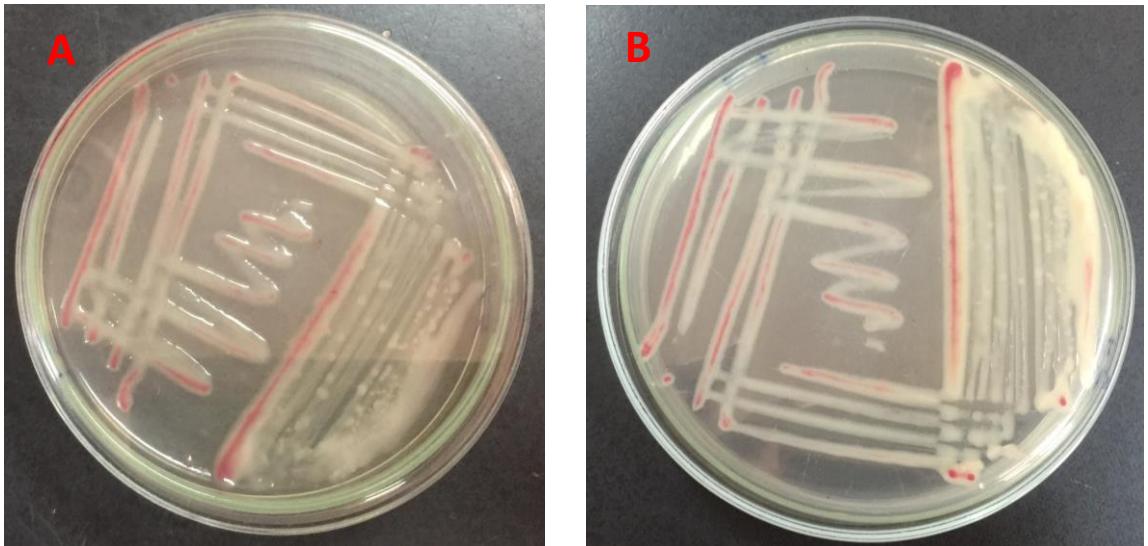
Bảng 4.1: Số dòng vi khuẩn gây bệnh héo xanh được phân lập ở một số tỉnh ĐBSCL và tỉnh Lâm Đồng

STT	Địa điểm thu mẫu	Số dòng vi khuẩn
1	Thành phố Sa Đéc - Đồng Tháp	8
2	Huyện Châu Phú - An Giang	3
3	Thành phố Đà Lạt - Lâm Đồng	3
4	Quận Thốt Nốt - Cần Thơ	7
5	Quận Bình Thủy - Cần Thơ	6
6	Huyện Chợ Lách - Bến Tre	13
7	Thành phố Mỹ Tho - Tiền Giang	12
8	Huyện Long Mỹ - Hậu Giang	1
9	Thị trấn Ngan Dừa - Bạc Liêu	1
10	Huyện Vĩnh Lợi - Bạc Liêu	1
Tổng		55

Khảo sát hình thái khuẩn lạc của vi khuẩn bằng môi trường King's B và môi trường TZC. Khuẩn lạc của vi khuẩn gây bệnh héo xanh trên Cúc ở môi trường King's B có màu trắng kem, nhẵn, bóng, hơi chảy, nhòn (Hình 4.1), trên môi trường TZC khuẩn lạc có màu hồng ở giữa và rìa có màu trắng, đây là đặc điểm của vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* và cũng phù hợp với miêu tả của (Mân, 2007; Agrios, 2005) (Hình 4.2)



Hình 4.1: Khuẩn lạc vi khuẩn gây bệnh héo xanh trên môi trường King's B
(A. Dòng vi khuẩn BT-13; B. Dòng vi khuẩn DT-9)



Hình 4.2: Khuẩn lạc vi khuẩn gây bệnh héo xanh trên môi trường TZC
(A. Dòng vi khuẩn BT-13; B. Dòng vi khuẩn DT-9)

Qua kết quả thu mẫu và phân lập mầm bệnh héo xanh ghi nhận được bệnh xuất hiện khá phổ biến trên cây Cúc ở ĐBSCL. Triệu chứng héo xanh xuất hiện rõ lúc trời nắng từ 9 - 15 giờ. Bệnh xuất hiện trên cây con và cây lớn từ ra hoa đến thu hoạch. Khi cây còn non toàn bộ lá héo rũ đột ngột và chết nhanh chóng. Trên cây đã lớn thì héo đầu tiên ở các lá ngọn héo rũ có màu xanh tái, sau đó các lá phía dưới, các cành héo dần vào ban ngày và ban đêm có thể hồi phục, cây bị còi cọc, nhưng sau 2 - 5 ngày toàn cây héo hẳn và chết (Hình 4.3) trên thân vỏ vẫn còn xanh hoặc xuất hiện những sọc nâu, vỏ thân phía gốc sù sì, thân vẫn rắn đặc.



Hình 4.3: Bệnh héo xanh trên Cúc

Cắt ngang thân, cành nhìn rõ bó mạch dẫn, mô xylem có màu nâu sẫm, bên trong bó mạch chứa đầy dịch nhờn vi khuẩn, ấn nhẹ vào đoạn cắt hoặc ngâm đoạn cắt có mạch dẫn màu nâu vào cốc nước có thể thấy dịch vi khuẩn màu trắng sữa từ trong chảy qua miệng cắt ra ngoài. Đặc điểm này được xem là một cách chẩn đoán nhanh bệnh héo do vi khuẩn. Khi cây đã héo, nhổ lên thấy rễ bị thâm đen, thối hỏng, điều này phù hợp với triệu chứng bệnh héo xanh (Mân, 2007; Agrios, 2005) đã mô tả trên cây khoai tây và cà chua và phù hợp với mô tả của Cúc & Thủy (2014) trên cây cúc và vụn thọt.

4.1.2 Kết quả phân lập các dòng thực khuẩn thể

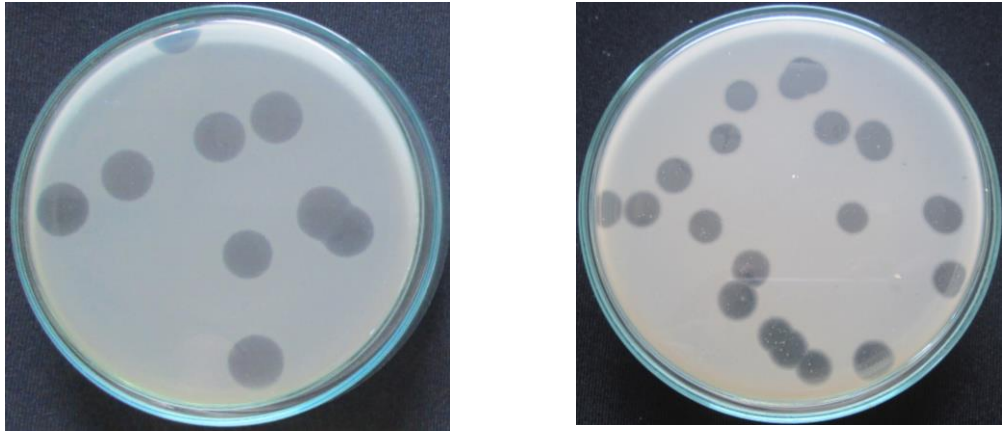
Tổng số 124 dòng TKT được phân lập từ các tỉnh: Bến Tre, Cần Thơ, Hậu Giang, Tiền Giang, An Giang, Đồng Tháp, Bạc Liêu, Lâm Đồng (Bảng 4.2). Trong đó, có 38 dòng TKT được phân lập ở huyện Chợ Lách, tỉnh Bến Tre, 33

dòng TKT ở thành phố Sa Đéc, tỉnh Đồng Tháp và 12 dòng TKT ở thành phố Mỹ Tho, tỉnh Tiền Giang, còn lại là các tỉnh khác. Đây cũng là 3 địa phương có diện tích trồng hoa lớn nhất ĐBSCL hiện nay.

Bảng 4.2: Số dòng TKT được phân lập từ một số tỉnh ở ĐBSCL và tỉnh Lâm Đồng

STT	Địa điểm thu mẫu	Số dòng TKT
1	Thành phố Sa Đéc - Đồng Tháp	33
2	Huyện Châu Phú - An Giang	5
3	Thành phố Đà Lạt - Lâm Đồng	9
4	Quận Thốt Nốt - Cần Thơ	8
5	Quận Bình Thủy - Cần Thơ	3
6	Huyện Chợ Lách - Bến Tre	38
7	Thành phố Mỹ Tho - Tiền Giang	12
8	Huyện Long Mỹ - Hậu Giang	9
9	Thị trấn Ngan Dừa - Bạc Liêu	3
10	Huyện Vĩnh Lợi - Bạc Liêu	4
Tổng		124

TKT được phát hiện khi chúng được nhân nuôi trong môi trường chứa tế bào vi khuẩn kí chủ. Khi cho một TKT lên một lớp vi khuẩn đang phân chia trên đĩa thạch dinh dưỡng sẽ tạo nên một vùng phân giải trong suốt trên nền lớp sáng, mờ đục của vi khuẩn đang phát triển. Vùng phân giải này gọi là đốm tan hay đốm thực khuẩn (tên tiếng Anh “plaque”) (Hình 4.4). Các đốm này được tạo thành do tế bào vi khuẩn bị TKT phân giải và phóng thích nhiều TKT mới, những TKT này liền xâm nhiễm những tế bào vi khuẩn kế cận. Quá trình này lặp lại tuần tự cho đến khi sự phát triển vi khuẩn ở trên đĩa thạch ngừng lại do hết thức ăn và tích tụ phẩm vật độc. Mỗi TKT tạo nên một plaque. Chính vì thế ta có thể định lượng TKT bằng cách pha loãng thích hợp và cho vào đĩa thạch dinh dưỡng chứa vi khuẩn kí chủ. Đếm số lượng plaque để định lượng mật số TKT/thể tích (PFU/mL) cũng giống phương pháp đếm khuẩn lạc trong định lượng vi khuẩn (CFU/mL). Số lượng đốm tan thể hiện mật số TKT nhiều hay ít, còn kích thước của đốm tan thể hiện khả năng phân giải vi khuẩn mạnh hay yếu của TKT nếu cùng kí chủ vi khuẩn, do đó dựa vào kích thước của đốm tan có thể tuyển chọn được những TKT tiềm năng, có khả năng phân giải vi khuẩn mạnh để ứng dụng TKT kiểm soát mầm bệnh do vi khuẩn trong nông nghiệp (Nga & Tâm, 2014; Minh, 2006).



Hình 4.4: Đốm tan đơn lẻ của hai dòng TKT ΦBT56 (trái) và dòng ΦBT67 (phải) hình thành dựa trên phương pháp pha loãng và trải trên đĩa để thực hiện tách dòng TKT.

4.2 Nội dung 2: Tuyển chọn một số dòng thực khuẩn thể triển vọng trong phòng thí nghiệm và nhà lưới để phòng trị vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* gây bệnh héo xanh trên cây hoa Cúc.

4.2.1 Kết quả đánh giá khả năng ký sinh của thực khuẩn thể đối với vi khuẩn gây bệnh héo xanh trong điều kiện phòng thí nghiệm

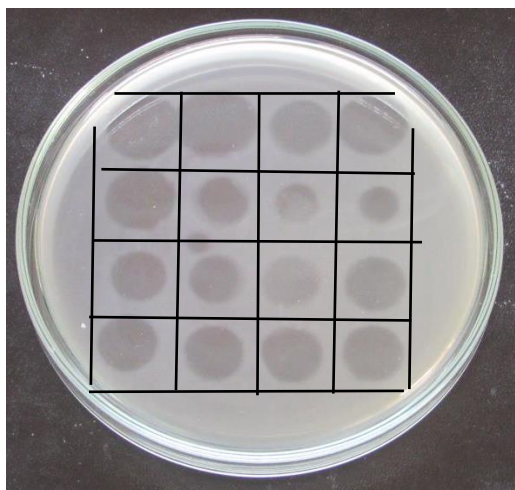
Kết quả đánh giá khả năng ký sinh của 124 dòng TKT đối với 55 dòng vi khuẩn gây bệnh héo xanh trên Cúc được phân lập ở một số tỉnh ĐBSCL và Lâm đồng (Bảng 4.3) cho thấy có sự biến động về khả năng ký sinh của các dòng TKT từ 23 đến 53. Trong đó có 14 dòng TKT có số lượng kí chủ dưới 40, thấp nhất là dòng TKT ΦBL121 có số kí chủ là 23. Bên cạnh đó, có 48 dòng TKT có số lượng kí chủ trên 50, trong đó có 5 dòng TKT gồm ΦBT77, ΦBT75, ΦBT71, ΦBT67, ΦBT53 có khả năng ký sinh nhiều dòng vi khuẩn nhất (53 dòng) và có 13 dòng TKT ΦĐT8, ΦĐT9, ΦĐT13, ΦĐT14 ΦCT42, ΦCT46, ΦCT49, ΦBT66, ΦBT72, ΦBT73, ΦBT78, ΦBT81, ΦHG115 có cùng số lượng kí chủ là 52. Trung bình số vi khuẩn kí chủ của mỗi TKT là 45,7 trong tổng số 55 dòng vi khuẩn được khảo sát chiếm tỉ lệ 83%.

Bảng 4.3: Khả năng kí sinh của 124 dòng TKT đối với 55 dòng vi khuẩn phân lập ở một số tỉnh ĐBSCL và Lâm Đồng

STT	Dòng TKT	Số bị sinh	VK kí	STT	Dòng TKT	Số bị sinh	VK kí	STT	Dòng TKT	Số bị sinh	VK kí
1	ΦĐT1	51		43	ΦCT43	42		85	ΦBT85	46	
2	ΦĐT2	51		44	ΦCT44	51		86	ΦBT86	51	
3	ΦĐT3	50		45	ΦCT45	51		87	ΦBT87	44	
4	ΦĐT4	50		46	ΦCT46	52		88	ΦBT88	42	
5	ΦĐT5	49		47	ΦCT47	51		89	ΦĐT89	41	
6	ΦĐT6	42		48	ΦCT48	37		90	ΦĐT90	40	
7	ΦĐT7	41		49	ΦCT49	52		91	ΦĐT91	43	
8	ΦĐT8	52		50	ΦCT50	47		92	ΦĐT92	40	
9	ΦĐT9	52		51	ΦBT51	37		93	ΦĐT93	32	
10	ΦĐT10	42		52	ΦBT52	41		94	ΦĐT94	45	
11	ΦĐT11	40		53	ΦBT53	53		95	ΦĐT95	46	
12	ΦĐT12	49		54	ΦBT54	51		96	ΦĐT96	48	
13	ΦĐT13	52		55	ΦBT55	38		97	ΦTG97	50	
14	ΦĐT14	52		56	ΦBT56	51		98	ΦTG98	50	
15	ΦĐT15	40		57	ΦBT57	51		99	ΦTG99	47	
16	ΦĐT16	42		58	ΦBT58	49		100	ΦTG100	46	
17	ΦĐT17	48		58	ΦBT59	51		101	ΦTG101	50	
18	ΦĐT18	51		60	ΦBT60	50		102	ΦTG102	48	
19	ΦĐT19	46		61	ΦBT61	38		103	ΦTG103	48	
20	ΦĐT20	48		62	ΦBT62	51		104	ΦTG104	45	
21	ΦĐT21	44		63	ΦBT63	43		105	ΦTG105	49	
22	ΦĐT22	48		64	ΦBT64	49		106	ΦTG106	49	
23	ΦĐT23	46		65	ΦBT65	50		107	ΦTG107	49	
24	ΦĐT24	51		66	ΦBT66	52		108	ΦTG108	49	
25	ΦĐT25	47		67	ΦBT67	53		109	ΦHG109	51	
26	ΦAG26	31		68	ΦBT68	32		110	ΦHG110	51	
27	ΦAG27	47		69	ΦBT69	38		111	ΦHG111	46	
28	ΦAG28	40		70	ΦBT70	42		112	ΦHG112	41	
29	ΦAG29	50		71	ΦBT71	53		113	ΦHG113	51	
30	ΦAG30	49		72	ΦBT72	52		114	ΦHG114	51	
31	ΦLĐ31	48		73	ΦBT73	52		115	ΦHG115	52	
32	ΦLĐ32	49		74	ΦBT74	44		116	ΦHG116	50	
33	ΦLĐ33	49		75	ΦBT75	53		117	ΦHG117	46	
34	ΦLĐ34	41		76	ΦBT76	45		118	ΦBL118	37	

STT	Đòng TKT	Số VK bị kí sinh	STT	Đòng TKT	Số VK bị kí sinh	STT	Đòng TKT	Số VK bị kí sinh
35	ΦLD35	43	77	ΦBT77	53	119	ΦBL119	38
36	ΦLD36	47	78	ΦBT78	52	120	ΦBL120	40
37	ΦLD37	50	79	ΦBT79	51	121	ΦBL121	23
38	ΦLD38	51	80	ΦBT80	47	122	ΦBL122	42
39	ΦLD39	38	81	ΦBT81	52	123	ΦBL123	40
40	ΦCT40	39	82	ΦBT82	48	124	ΦBL124	34
41	ΦCT41	50	83	ΦBT83	48	-	-	-
42	ΦCT42	52	84	ΦBT84	43	-	-	-
Trung bình số vi khuẩn kí chủ của mỗi TKT					45,7/55			

Qua (Bảng 4.4) kết quả về mức độ kí sinh bởi 124 đòng TKT của 55 đòng vi khuẩn *R. solanacearum* phân lập ở một số tỉnh ĐBSCL và Lâm Đồng cho thấy có 13 đòng vi khuẩn có bằng và hơn 120 TKT kí sinh gồm: ĐT6, ĐT9, ĐT12, LD34, CT30, BT134, TG187, TG189, TG190, TG192, TG194, TG198, TG199 và đòng vi khuẩn bị TKT kí sinh cao nhất là đòng ĐT9 bị kí sinh tất cả 124 đòng TKT chiếm tỉ lệ 100% (Hình 4.5). Trung bình số lượng TKT kí sinh trên mỗi vi khuẩn *R. solanacearum* là 100 TKT trong tổng số 124 TKT được khảo sát chiếm tỉ lệ 80,6%, kết quả này cho thấy, trong tự nhiên TKT của vi khuẩn *R. solanacearum* gây bệnh héo xanh trên Cúc đã tồn tại và hiện diện phong phú với tần suất cao trong đất và trong thân cây khi có hoặc không có sự hiện diện của vi khuẩn kí chủ. Điều này khẳng định rằng TKT là sinh vật hiện diện phong phú trong tự nhiên (mật số khoảng 10^{32}) và giữ vai trò cân bằng quần thể vi khuẩn trong môi trường (Kutter & Sulakvelidze, 2004). Mặt khác do mỗi vi khuẩn có thể có rất nhiều TKT kí sinh do đó trong việc kiểm soát mầm bệnh do vi khuẩn ta có thể phối hợp nhiều TKT (hỗn hợp TKT) để tiêu diệt vi khuẩn và hạn chế hiện tượng kháng TKT của vi khuẩn *R. solanacearum* trên cây hoa Cúc.



Hình 4.5: Khả năng kí sinh của TKT dòng ΦĐT1 ΦĐT2, ΦĐT3, ΦĐT4, ΦĐT5, ΦĐT6, ΦĐT7, ΦĐT8, ΦĐT9, ΦĐT10, ΦĐT11, ΦĐT12, ΦĐT13, ΦĐT14, ΦĐT15, ΦĐT16 trên dòng vi khuẩn ĐT9.

Bảng 4.4: Số lượng TKT kí sinh trên các dòng vi khuẩn gây bệnh héo xanh trong tổng số 124 dòng TKT được khảo sát

STT	Dòng VK	Số TKT kí sinh	STT	Dòng VK	Số TKT kí sinh	STT	Dòng VK	Số TKT kí sinh
1	ĐT4	119	20	CT71	102	39	BT160	0
2	ĐT5	119	21	CT78	95	40	BT176	120
3	ĐT6	122	22	CT79	117	41	ĐT172	116
4	ĐT7	117	23	CT80	97	42	TG187	121
5	ĐT9	124	24	CT81	105	43	TG189	122
6	ĐT12	121	25	CT87	115	44	TG190	121
7	ĐT25	119	26	CT88	119	45	TG191	118
8	AG57	118	27	BT101	96	46	TG192	122
9	AG28	94	28	BT104	72	47	TG194	120
10	AG30	114	29	BT112	102	48	TG196	119
11	CT32	93	30	BT118	70	49	TG197	115
12	LĐ34	122	31	BT133	46	50	TG198	120
13	LĐ37	88	32	BT134	120	51	TG199	122
14	LĐ39	118	33	BT135	117	52	TG202	118
15	CT30	120	34	BT145	74	53	TG204	117
16	CT59	114	35	BL152	73	54	HG206	109
17	CT65	101	36	BT156	45	55	BL223	111
18	CT68	96	37	BT157	50	-	-	-
19	CT69	116	38	BT158	105	-	-	-
Trung bình số lượng TKT kí sinh trên mỗi vi khuẩn gây bệnh héo xanh							100/124	

Qua kết quả cho thấy khả năng kí sinh của TKT trên các dòng vi khuẩn gây bệnh héo xanh là khá tốt. Trong đó không có dòng TKT nào hoàn toàn kí

sinh tất cả 55 dòng vi khuẩn, ngược lại dòng vi khuẩn ĐT9 bị tất cả các dòng TKT kí sinh. Điều này cho thấy phạm vi kí sinh của TKT tương đối rộng trên dòng vi khuẩn. Mỗi vi khuẩn có thể là vật chủ của một hoặc nhiều TKT (Minh, 2006). Vi khuẩn trong nhiều trường hợp có sự đa dạng di truyền, như vậy có sự khác nhau về tính miễn cảm trước TKT và vi khuẩn có thể dễ dàng biến đổi để đề kháng với một dòng TKT duy nhất, do đó việc phân lập mới TKT thường xuyên và đa dạng về địa điểm là cần thiết, nhằm chọn lọc được các TKT có phổ ký chủ rộng, và khả năng phân giải tốt để kiểm soát bệnh do vi khuẩn trên cây trồng đạt hiệu quả.

Dựa vào độ miễn cảm nhất của vi khuẩn (dòng vi khuẩn bị TKT kí sinh nhiều nhất) và địa điểm trồng hoa Cúc, chọn 6 dòng vi khuẩn đại diện cho mỗi tỉnh 1 vi khuẩn, Đồng Tháp (ĐT-9), Cần Thơ (CT-30), An Giang (AG-57), Lâm Đồng (LD-34), Bến Tre (BT-176), Tiền Giang (TG-189) để đánh giá khả năng gây hại của các dòng vi khuẩn gây bệnh héo xanh trên cây hoa Cúc trong điều kiện nhà lưới nhằm xác định dòng vi khuẩn gây hại cao để sử dụng trong nghiên cứu phòng trị.

4.2.2 Kết quả đánh giá khả năng gây hại của các dòng vi khuẩn phân lập trên cây hoa Cúc ở điều kiện nhà lưới

Kết quả đánh giá khả năng gây hại của 6 dòng vi khuẩn gây bệnh héo xanh cho thấy tất cả đều có khả năng gây hại trên cây hoa Cúc và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với đối chứng. Trong đó, dòng vi khuẩn ĐT-9 được ghi nhận khả năng gây hại cao hơn các dòng còn lại qua các thời điểm khảo sát.

Từ kết quả đánh giá tỷ lệ bệnh (Bảng 4.5) có thể thấy tỷ lệ bệnh héo xanh trên cây hoa Cúc của các nghiệm thức ở các thời điểm khảo sát đều khác biệt có ý nghĩa thống kê với nhau và với đối chứng. Bệnh bắt đầu xuất hiện ở thời điểm 6 ngày sau khi lây bệnh (NSKLB) ở tất cả các nghiệm thức trừ nghiệm thức đối chứng và nghiệm thức vi khuẩn AG-57.

Đến thời điểm 10 ngày sau khi lây bệnh (NSKLB) ngoại trừ nghiệm thức đối chứng, các nghiệm thức còn lại đều có cây bị bệnh, riêng vi khuẩn ĐT-9 thể hiện sự vượt trội khi có tỷ lệ bệnh cao hơn so với các nghiệm thức khác. Ở giai đoạn 14-18 NSKLB, bệnh đều phát triển ở các nghiệm thức có lây bệnh nhân tạo bằng vi khuẩn, trong đó nghiệm thức ĐT-9 có tỷ lệ bệnh cao nhất và khác biệt ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức khác.

Ở thời điểm 22 NSKLB, nghiệm thức ĐT-9 vẫn giữ tỷ lệ bệnh cao nhất, điều này chứng tỏ ĐT-9 là dòng vi khuẩn có khả năng gây hại cao hơn các

dòng vi khuẩn còn lại.

Về chỉ số tích lũy bệnh theo thời gian AUDPC (Bảng 4.5) ghi nhận nghiệm thức ĐT-9 cao nhất (811,5) và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức còn lại. Các nghiệm thức có các dòng vi khuẩn còn lại vẫn thể hiện khả năng gây bệnh với AUDPC cao hơn và khác biệt thống kê so với nghiệm thức đối chứng, trong đó dòng vi khuẩn TG-189 thể hiện khả năng gây bệnh cao có sự khác biệt so với hai dòng vi khuẩn AG-57 và LĐ-34.

Bảng 4.5: Tỷ lệ (%) bệnh héo xanh do các dòng vi khuẩn gây bệnh trong điều kiện nhà lưới

Nghiệm thức (vi khuẩn)	Ngày sau khi lây bệnh					AUDPC
	6	10	14	18	22	
Đối Chứng	0,0 ^b	0,0 ^c	0,0 ^c	0,0 ^c	0,0 ^d	0,0 ^d
ĐT-9	12,5 ^a	35,0 ^a	47,5 ^a	65,0 ^a	77,5 ^a	811,5 ^a
CT-30	7,5 ^a	20,0 ^b	30,0 ^b	35,0 ^b	42,5 ^b	492,5 ^{bc}
AG-57	0,0 ^b	15,0 ^b	25,0 ^b	32,5 ^b	32,5 ^c	419,5 ^c
LĐ-34	7,5 ^a	20,0 ^b	27,5 ^b	27,5 ^b	27,5 ^c	411,5 ^c
BT-176	7,5 ^a	12,5 ^b	22,5 ^b	30,0 ^b	32,5 ^c	533,5 ^{bc}
TG-189	10,0 ^a	20,0 ^b	25,0 ^b	27,5 ^b	27,5 ^c	561,5 ^b
Mức ý nghĩa	*	*	*	*	*	*
CV (%)	46,65	31,31	20,63	16,00	11,05	17,97

Ghi chú: Số liệu được chuyển sang dạng $\arcsin \sqrt{x}$ trước khi xử lý số liệu. Các số trung bình trong một cột theo sau bởi một hay nhiều chữ cái giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa, * khác biệt ở mức ý nghĩa 5% theo phép thử Duncan.

Về trung bình cấp bệnh, kết quả (Bảng 4.6) cũng cho thấy sự tương quan thuận giữa tỷ lệ bệnh và cấp độ bệnh (khi tỉ lệ bệnh càng cao thì cấp độ bệnh càng nặng). Ở giai đoạn 6 NSKLB, chỉ duy nhất nghiệm thức ĐT-9 có cấp bệnh cao hơn khác biệt so với đối chứng, tuy nhiên chưa khác biệt so với các nghiệm thức còn lại. Ở thời điểm từ 10 đến 22 NSKLB, cấp bệnh ở nghiệm thức ĐT-9 tiến triển nhanh, cao hơn và khác biệt ý nghĩa so với các nghiệm thức còn lại điều đó chứng tỏ vi khuẩn ĐT-9 có khả năng gây hại cao nên cây bị nhiễm bệnh nặng hơn so với các dòng vi khuẩn khác (Hình 4.6).

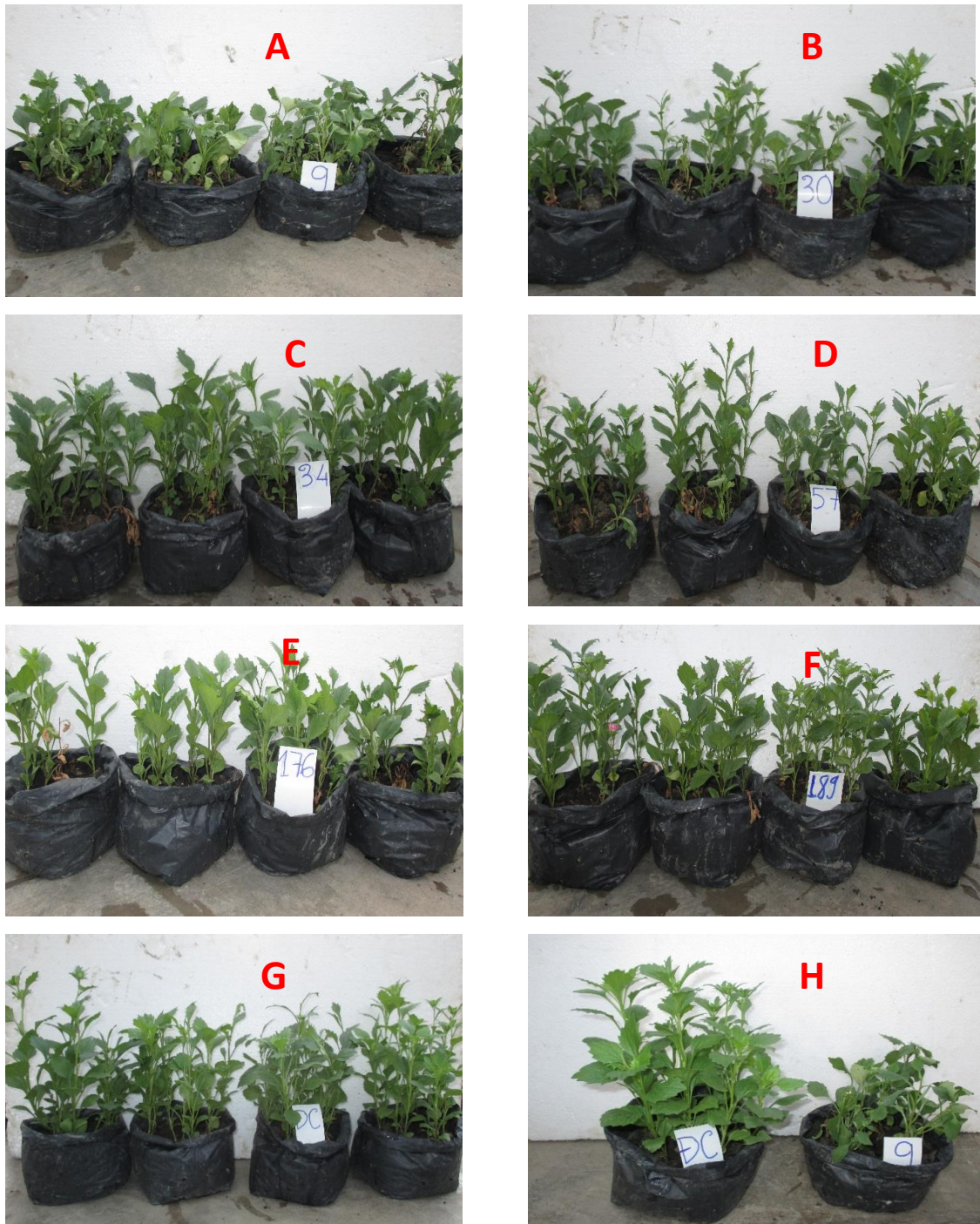
Bảng 4.6: Trung bình cấp bệnh héo xanh do các dòng vi khuẩn gây bệnh trong điều kiện nhà lưới

Nghiệm thức (vi khuẩn)	Ngày sau khi lây bệnh				
	6	10	14	18	22
Đối Chứng	0,00 ^b	0,00 ^d	0,00 ^c	0,00 ^c	0,00 ^d
ĐT-9	0,15 ^a	0,70 ^a	1,20 ^a	1,95 ^a	3,00 ^a
CT-30	0,08 ^{ab}	0,45 ^b	0,85 ^{ab}	1,43 ^b	1,98 ^b
AG-57	0,00 ^b	0,28 ^{bc}	0,80 ^b	1,35 ^b	1,53 ^c
LĐ-34	0,08 ^{ab}	0,40 ^{bc}	0,73 ^b	0,98 ^b	1,18 ^c
BT-176	0,10 ^{ab}	0,23 ^c	0,63 ^b	1,05 ^b	1,33 ^c
TG-189	0,10 ^{ab}	0,38 ^{bc}	0,73 ^b	1,03 ^b	1,18 ^c
Mức ý nghĩa	*	*	*	*	*
CV (%)	89,07	39,46	34,99	31,27	18,37

Ghi chú: Các số trung bình trong một cột theo sau bởi một hay nhiều chữ cái giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa, * khác biệt ở mức ý nghĩa 5% theo phép thử Duncan.

Kết quả cũng được ghi nhận ở một số nghiên cứu như: Thắng và *ctv.* (2011) khi các dòng vi khuẩn *R. solanacearum* được phân lập ở các vùng địa lý khác nhau thì thể hiện tính độc và có mức độ gây bệnh khác nhau. Nghiên cứu của Thủy và *ctv.* (2016) nhận thấy trong số những dòng vi khuẩn *R. solanacearum* gây bệnh héo xanh trên ớt sừng thì dòng vi khuẩn Rs2 và Rs5 luôn có tỷ lệ bệnh cao 60-80% (12 NSKLB) đạt đến 100% ở (32 NSKLB), còn nghiệm thức Rs3 có tỷ lệ bệnh là 56%. Từ đó có thể nhận thấy khả năng gây hại của các dòng vi khuẩn là khác nhau, nó có thể liên quan với tính độc do đặc tính di truyền của vi khuẩn đồng thời liên quan đến sự tương tác giữa tác nhân gây bệnh và giống cây trồng.

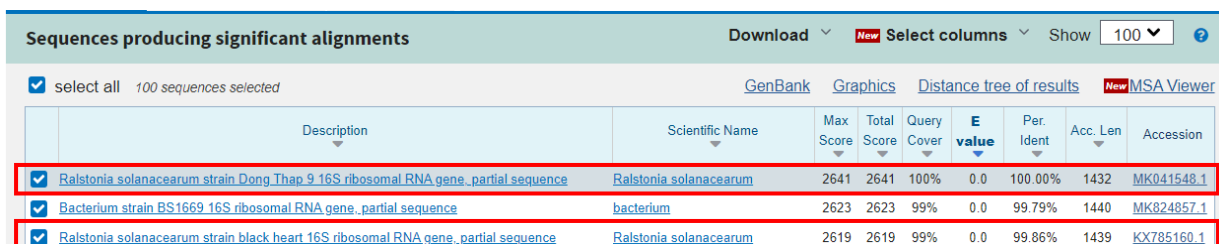
Qua kết quả tỷ lệ bệnh, chỉ số AUDPC và cấp độ bệnh cho thấy trong số 6 dòng vi khuẩn được dùng để lây bệnh nhân tạo trong điều kiện nhà lưới thì dòng vi khuẩn ĐT-9 có khả năng gây hại cao nhất trên cây hoa Cúc nên được sử dụng trong các thí nghiệm tiếp theo của luận án.



Hình 4.6: Mức độ bệnh do các dòng vi khuẩn gây ra ở thời điểm 22 NSKLB trong điều kiện nhà lưới (A: nghiệm thức lây bệnh dòng vi khuẩn ĐT-9, B: nghiệm thức lây lây bệnh dòng vi khuẩn CT-30, C: nghiệm thức lây bệnh dòng vi khuẩn LD-34, D: nghiệm thức lây bệnh dòng vi khuẩn AG-57, E: nghiệm thức lây bệnh vi khuẩn BT-176, F: nghiệm thức lây bệnh dòng vi khuẩn TG-189, G: nghiệm thức đối chứng, H: ảnh so sánh giữa nghiệm thức đối chứng và nghiệm thức lây bệnh dòng vi khuẩn ĐT-9)

4.2.3 Kết quả định danh vi khuẩn gây bệnh héo xanh trên Cúc

Kết quả giải trình tự cho thấy đoạn gen 16S rRNA của dòng vi khuẩn ĐT-9 có 99,86% tương đồng so với trình tự 16S rRNA của dòng vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* có mã số (KX785160.1) trên ngân hàng gen (NCBI) (Hình 4.7).



Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Ralstonia solanacearum strain Dong.Than.9.16S.ribosomal.RNA.gene.partial.sequence	Ralstonia solanacearum	2641	2641	100%	0.0	100.00%	1432	MK041548.1
Bacterium strain BS1669.16S.ribosomal.RNA.gene.partial.sequence	bacterium	2623	2623	99%	0.0	99.79%	1440	MK824857.1
Ralstonia solanacearum strain black heart.16S.ribosomal.RNA.gene.partial.sequence	Ralstonia solanacearum	2619	2619	99%	0.0	99.86%	1439	KX785160.1

Hình 4.7: Kết quả Blast trình tự đoạn gen 16S rRNA của dòng vi khuẩn ĐT-9

Trình tự gen 16S rRNA của vi khuẩn ĐT-9 đã được gửi vào GenBank với mã số là MK041548. Dòng vi khuẩn (ĐT-9) phân lập từ cây hoa Cúc biểu hiện triệu chứng héo xanh là *Ralstonia solanacearum*. Vì thế dòng vi khuẩn ĐT-9 được sử dụng cho những thí nghiệm tiếp theo trong luận án này.

4.2.4 Kết quả đánh giá khả năng phân giải vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* của thực khuẩn thể có phổ ký chủ rộng trong điều kiện phòng thí nghiệm

Từ kết quả (Bảng 4.7) cho thấy thời điểm 24 giờ sau khi nhân nuôi (GSKNN), dựa vào trung bình trên 3 dòng vi khuẩn cho thấy 10 dòng TKT đều thể hiện khả năng tiêu diệt vi khuẩn *R. solanacearum* với trung bình đường kính đốm tan từ 1,24 đến 6,92 mm, trong đó có 3 dòng TKT ΦCT44, ΦCT46, ΦBT75, có trung bình đường kính đốm tan cao nhất từ 6,68 đến 6,92 mm và khác biệt so với các dòng TKT còn lại, có trung bình đường kính đốm tan từ 1,24 đến 6,18 mm. Về trung bình đường kính đốm tan của mỗi dòng vi khuẩn bị phân giải bởi 10 dòng TKT dao động từ 3,74 đến 6,32 mm. Trong đó dòng vi khuẩn BT134 miễn cảm nhất có trung bình đường kính đốm tan cao 6,32 mm và khác biệt so với 2 dòng ĐT9 và LĐ34 có trung bình đường kính đốm tan lần lượt là 3,74 mm và 5,41 mm.

Bảng 4.7: Khả năng phân giải của 10 dòng TKT với 3 dòng vi khuẩn thời điểm 24 giờ

Đường kính đốm tan (plaque) (mm)				
TKT (B) \ VK(A)	ĐT9	LĐ34	BT134	TB(B)
ΦBT56	3,51 ^j	6,43 ^{fg}	7,32 ^{cde}	5,75 ^C
ΦAG29	6,34 ^{fg}	3,14 ^j	5,81 ^g	5,10 ^D
ΦLĐ38	3,46 ^j	6,46 ^{fg}	6,79 ^{ef}	5,57 ^C
ΦCT44	5,07 ^h	6,70 ^{ef}	8,65 ^a	6,81 ^A
ΦCT46	5,17 ^h	6,96 ^{def}	8,62 ^a	6,92 ^A
ΦĐT13	3,44 ^j	7,36 ^{cde}	7,75 ^{bc}	6,18 ^B
ΦBT67	3,19 ^j	7,20 ^{cde}	7,20 ^{cde}	5,86 ^{BC}
ΦTG97	1,87 ^k	1,19 ^{kl}	1,28 ^{kl}	1,45 ^E
ΦBT75	4,24 ⁱ	7,57 ^{cd}	8,24 ^{ab}	6,68 ^A
ΦHG109	1,12 ^l	1,14 ^l	1,48 ^{kl}	1,24 ^E
TB(A)	3,74 ^C	5,41 ^B	6,32 ^A	
CV(%)	7,44			
Mức ý nghĩa	F(A)*,F(B)*,F(A×B)*			

Chú thích: các số trung bình trong một cột hay một hàng theo sau bởi một hoặc nhiều chữ in thường hoặc in hoa giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức 5% theo phép thử Duncan, (*) Khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 5%, VK (vi khuẩn); TKT (thực khuẩn thể)

Thời điểm 48 GSKNN kết quả trình bày (Bảng 4.8), các nghiệm thức TKT đều cho kết quả đường kính đốm tan từ 2,13 đến 8,79 mm. 6 dòng TKT ΦCT46, ΦCT44, ΦBT67, ΦĐT13, ΦBT56, ΦBT75 có trung bình đường kính đốm tan cao đạt từ 8,32 đến 8,79 mm và khác biệt ý nghĩa thống kê so với các dòng còn lại. Các nghiệm thức vi khuẩn cũng cho thấy kết quả đường kính đốm tan từ 4,47 đến 9,74 mm. Đối với vi khuẩn thì trung bình đường kính đốm tan cao nhất là dòng BT134 là 9,74 mm, khác biệt ý nghĩa thống kê với 2 dòng ĐT9 và LĐ34 có trung bình đường kính đốm tan lần lượt là 4,47 mm và 6,24 mm.

Bảng 4.8: Khả năng phân giải của 10 dòng TKT với 3 dòng vi khuẩn thời điểm 48 giờ

Đường kính đốm tan (plaque) (mm)				
VK (A) TKT(B)	ĐT9	LĐ34	BT134	TB(B)
ΦBT56	3,80 ^{lm}	7,27 ^{efgh}	14,1 ^a	8,40 ^A
ΦAG29	7,14 ^{fgh}	3,33 ^{lmn}	6,73 ^{ghi}	5,73 ^C
ΦLĐ38	3,61 ^{lm}	7,42 ^{efgh}	9,59 ^d	6,87 ^B
ΦCT44	5,73 ^{ij}	8,07 ^{ef}	12,2 ^{bc}	8,65 ^A
ΦCT46	6,32 ^{hij}	7,47 ^{efgh}	12,6 ^b	8,79 ^A
ΦĐT13	3,77 ^{lm}	7,98 ^{efg}	13,3 ^{ab}	8,34 ^A
ΦBT67	4,47 ^{kl}	8,17 ^{ef}	12,9 ^b	8,51 ^A
ΦTG97	2,62 ^{mno}	2,09 ^{no}	1,68 ^o	2,13 ^D
ΦBT75	5,17 ^{jk}	8,52 ^{de}	11,3 ^c	8,32 ^A
ΦHG109	2,04 ^{no}	2,05 ^{no}	3,05 ^{mn}	2,38 ^D
TB(A)	4,47 ^C	6,24 ^B	9,74 ^A	
CV (%)	10,4			
Mức ý nghĩa	F(A)*,F(B)*,F(A×B)*			

Chú thích: các số trung bình trong một cột hay một hàng theo sau bởi một hoặc nhiều chữ in thường hoặc in hoa giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức 5% theo phép thử Duncan, * Khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 5%. VK (vi khuẩn); TKT (thực khuẩn thể)

Thời điểm 72 GSKNN kết quả trình bày (Bảng 4.9) cho thấy nghiệm thức TKT đều cho kết quả đường kính đốm tan từ 2,67 đến 11,4 mm. Trong đó, 2 dòng TKT ΦCT46 và ΦBT67, có trung bình đường kính đốm tan cao là 11,2 mm và 11,4 mm cao hơn và khác biệt ý nghĩa với các dòng TKT còn lại. Kế đó là 3 dòng TKT ΦCT44, ΦBT56, ΦBT75 có trung bình đường kính đốm tan cũng khá cao từ 10,0 mm đến 10,4 mm. Các nghiệm thức vi khuẩn cũng cho thấy độ miễn cảm của 3 dòng vi khuẩn, trong đó dòng vi khuẩn BT134 miễn cảm nhất có trung bình đường kính đốm tan cao 12,7 mm và khác biệt ý nghĩa so với 2 dòng vi khuẩn ĐT9 và LĐ34 có trung bình đường kính đốm tan lần lượt là 5,16 mm và 6,95 mm.

Bảng 4.9: Khả năng phân giải của 10 dòng TKT với 3 dòng vi khuẩn thời điểm 72 giờ

Đường kính đốm tan (plaque) (mm)				
VK(A) TKT(B)	ĐT9	LĐ34	BT134	TB(B)
ΦBT56	4,08 ^l	8,95 ^g	17,95 ^{ab}	10,3 ^B
ΦAG29	7,52 ^{ghij}	3,42 ^{lm}	7,77 ^{ghi}	6,24 ^D
ΦLĐ38	3,72 ^{lm}	7,78 ^{ghi}	12,1 ^e	7,85 ^C
ΦCT44	6,27 ^{jk}	8,45 ^{gh}	16,6 ^c	10,4 ^B
ΦCT46	7,13 ^{hijk}	8,82 ^g	8,82 ^g	11,2 ^A
ΦĐT13	4,02 ^l	8,10 ^{gh}	17,1 ^{bc}	9,73 ^B
ΦBT67	6,47 ^{ijk}	8,64 ^g	19,2 ^a	11,4 ^A
ΦTG97	3,20 ^{lm}	2,42 ^m	2,40 ^m	2,67 ^E
ΦBT75	6,08 ^k	10,7 ^f	13,3 ^d	10,0 ^B
ΦHG109	3,10 ^{lm}	2,30 ^m	3,19 ^{lm}	2,86 ^E
TB(A)	5,16 ^C	6,95 ^B	12,7 ^A	
CV(%)	9,35			
Mức ý nghĩa	F(A)*,F(B)*,F(A×B)*			

Chú thích: các số trung bình trong một cột hay một hàng theo sau bởi một hoặc nhiều chữ in thường hoặc in hoa giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức 5% theo phép thử Duncan, * Khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 5%. VK (vi khuẩn); TKT (thực khuẩn thể)

Như vậy qua 3 thời điểm ghi nhận khả năng phân giải vi khuẩn *R. solanacearum* qua đường kính đốm tan của 10 dòng TKT trên 3 dòng vi khuẩn *R. solanacearum* cho thấy các dòng ΦCT46, ΦCT44, ΦBT67, ΦBT56, ΦBT75 có khả năng phân giải vi khuẩn *R. solanacearum* cao, ổn định ở mỗi thời điểm và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với 5 dòng TKT còn lại.

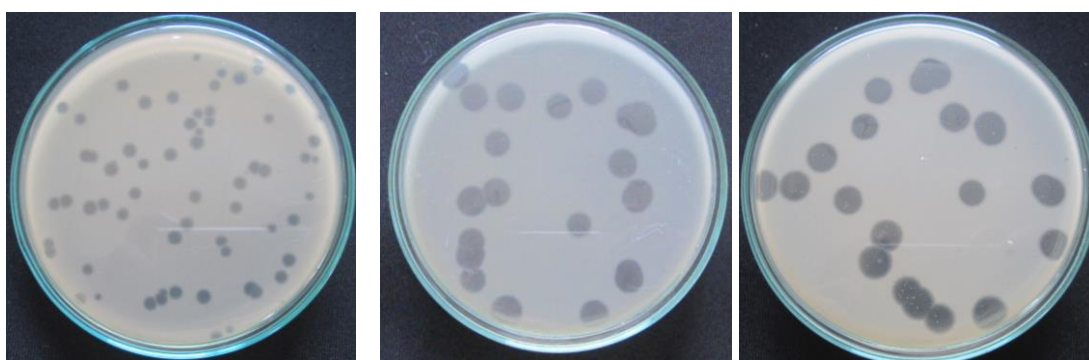
Đối với vi khuẩn, nhìn chung các dòng TKT đều có khả năng phân giải tốt ở 3 dòng vi khuẩn khảo sát, kết quả ở 3 thời điểm cho thấy vi khuẩn BT134 là dòng vi khuẩn mẫn cảm nhất có trung bình đường kính đốm tan mà TKT tạo ra lớn nhất (Hình 4.8, Hình 4.9).

Tóm lại, từ kết quả của trung bình đường kính đốm tan cao và khả năng phân bố kí chủ rộng, chọn 5 dòng TKT ΦCT46, ΦCT44, ΦBT67, ΦBT56, ΦBT75 có đường kính đốm tan cao cho thí nghiệm nhà lưới và dòng vi khuẩn BT134 để nhân nuôi TKT.

Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Giang và *ctv.* (2014) đã phân lập được 10 dòng TKT từ 26 dòng vi khuẩn, trong đó có 4 dòng TKT có khả năng phòng trị hiệu quả bệnh cháy bìa lá lúa do vi khuẩn *Xanthomonas oryzae*

pv. *oryzae*. Ở thời điểm 24 GSKNN thì bốn dòng TKT đều cho hiệu quả tiêu diệt vi khuẩn với đường kính đốm tan từ 3,8 – 5,1 mm. Trong đó, dòng TKT 10, 12 và 13 có hiệu quả tiêu diệt vi khuẩn cao hơn và khác biệt ý nghĩa thống kê với dòng TKT 17 với đường kính đốm tan lần lượt là 4,9 mm; 5,1 mm; 5,1 mm và 3,8 mm. Ở thời điểm 48 GSKNN thì đường kính đốm tan của bốn dòng TKT đạt từ 8,1 – 11,7 mm, trong đó, dòng TKT 12 có đường kính đốm tan cao nhất (11,7 mm) có sự khác biệt ý nghĩa thống kê so với các dòng TKT còn lại.

Bên cạnh đó, kết quả này phù hợp cũng với nghiên cứu của Tan *et al.* (2009), khi phân lập TKT từ nước cống, ghi nhận 30 dòng TKT kí sinh *R. solanacearum* và 5 dòng TKT kí sinh *Erwinia chrysanthemi* thể hiện qua đường kính đốm tan từ khoảng 6 – 17 mm trong 24 – 48 giờ.



Hình 4.8: Đường kính đốm tan của TKT (ΦBT67) trên 3 dòng vi khuẩn *R. solanacearum* DT9 (trái), LD34 (giữa), BT134 (phải) ở thời điểm 48 GSKNN



Hình 4.9: Đường kính đốm tan của TKT (ΦBT56) trên 3 dòng vi khuẩn *R. solanacearum* DT9 (trái), LD34 (giữa), BT134 (phải) ở thời điểm 48 GSKNN

4.2.5 Kết quả đánh giá khả năng phòng trị bệnh héo xanh trên cây hoa Cúc của 5 dòng thực khuẩn thể triển vọng trong điều kiện nhà lưới

Từ kết quả (Bảng 4.10) cho thấy, ở thời điểm 8 NSKLB, bệnh bắt đầu xuất hiện ở các nghiệm thức trừ hai nghiệm thức áp dụng TKT ΦBT67 và ΦBT56 chưa xuất hiện bệnh có sự khác biệt ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức còn lại và đối chứng. Thời điểm 14 NSKLB, nghiệm thức

ΦBT67 đã bắt đầu xuất hiện bệnh nhưng ở cả nghiệm thức ΦBT67 và ΦBT56 đều có tỷ lệ bệnh (trong khoảng 0-2%) thấp hơn và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức khác và đối chứng (40%). Thời điểm 20 NSKLB, tỷ lệ bệnh tăng dần ở tất cả các nghiệm thức, 4 nghiệm thức xử lý TKT gồm ΦBT67, ΦBT56, ΦCT44 và Mix (hỗn hợp các TKT) đều thể hiện hiệu quả giảm bệnh. Tại thời điểm 26 NSKLB, các nghiệm thức có xử lý TKT tỷ lệ bệnh đều thấp hơn và có sự khác biệt ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức đối chứng. Riêng hai nghiệm thức ΦBT67 và ΦBT56 có tỷ lệ bệnh héo xanh thấp nhất lần lượt là (12%) và (8%) so với đối chứng là (66%) và khác biệt thống kê so với các nghiệm thức còn lại, chứng tỏ TKT đã khống chế hiệu quả mật số vi khuẩn *R. solanacearum* để giảm thiệt hại bệnh do vi khuẩn *R. solanacearum* gây ra cho cây hoa Cúc.

Về chỉ số (AUDPC), nghiệm thức ΦBT67 đạt (96) và ΦBT56 là (48) đạt thấp nhất và khác biệt ý nghĩa thống kê so với đối chứng (828), tiếp đến là các nghiệm thức ΦCT44 (372), nghiệm thức Mix (hỗn hợp các TKT) (474). Trong khi đó, nghiệm thức ΦCT46 không thể hiện hiệu quả giảm bệnh so với đối chứng (Bảng 4.10).

Bảng 4.10: Tỷ lệ (%) bệnh héo xanh vi khuẩn trên cây hoa Cúc của các nghiệm thức xử lý TKT khác nhau trong điều kiện nhà lưới

Nghiệm Thức TKT	Ngày sau khi lây bệnh (NSKLB)				AUDPC
	8	14	20	26	
Đối Chứng	22,0 ^a	40,0 ^a	54,0 ^a	66,0 ^a	828 ^a
ΦBT75	20,0 ^a	36,0 ^a	42,0 ^{ab}	44,0 ^{bc}	660 ^{bc}
ΦCT44	10,0 ^b	18,0 ^b	26,0 ^c	26,0 ^d	372 ^d
ΦBT67	0,0 ^c	2,0 ^c	8,0 ^d	12,0 ^e	96 ^e
ΦCT46	22,0 ^a	36,0 ^a	44,0 ^{ab}	50,0 ^b	696 ^{ab}
ΦBT56	0,0 ^c	0,0 ^c	4,0 ^d	8,0 ^e	48 ^e
Mix	12,0 ^{ab}	24,0 ^{ab}	32,0 ^{bc}	34,0 ^{cd}	474 ^{cd}
Mức ý nghĩa	*	*	*	*	*
CV (%)	36,74	31,10	23,10	15,52	29,67

Ghi chú: Số liệu được chuyển sang dạng $\arcsin \sqrt{x}$ trước khi xử lý số liệu. Các số trung bình trong một cột theo sau bởi một hay nhiều chữ cái giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức ý nghĩa 5% theo phép thử Duncan. (Mix: hỗn hợp các thực khuẩn thể); TKT (thực khuẩn thể)

Về trung bình cấp bệnh, (Bảng 4.11) cho thấy có sự tương quan giữa cấp bệnh với tỷ lệ bệnh, các nghiệm thức đều có cấp bệnh tăng theo thời gian, trong đó nghiệm thức đối chứng luôn cao hơn hẳn và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức còn lại, điều này chứng tỏ tất cả các dòng

TKT đều có khả năng khống chế vi khuẩn *R. solanacearum* làm mức độ bệnh trên cây hoa Cúc giảm hơn so với đối chứng. Ở hai nghiệm thức ΦBT67 và ΦBT56 luôn có trung bình cấp độ bệnh thấp nhất, tốc độ phát triển bệnh chậm hơn và thời gian cây Cúc biểu hiện triệu chứng bệnh cũng muộn hơn so với các nghiệm thức khác (lần lượt là 14 và 20 NSKLB) tuy nhiên hai nghiệm thức vẫn không khác biệt ý nghĩa thống kê so với nhau, điều này cho thấy rằng TKT ΦBT67 và ΦBT56 có khả năng khống chế mức độ bệnh tương đương nhau và tốt hơn hẳn so với các dòng TKT còn lại.

Xét riêng nghiệm thức Mix (hỗn hợp các TKT) nhận thấy, cả tỷ lệ bệnh, cấp độ bệnh, chỉ số AUDPC đều thấp hơn, có ý nghĩa thống kê so với đối chứng và mức độ đối kháng với vi khuẩn *R. solanacearum* cũng đạt mức khá. Nghiệm thức TKT Mix tuy không vượt trội bằng hai nghiệm thức TKT đơn ΦBT67 hoặc ΦBT56 nhưng có thể được sử dụng ở những điều kiện canh tác tự nhiên nơi cây trồng bị nhiễm nhiều dòng vi khuẩn cùng lúc hay vi khuẩn biến tính thể hiện tính kháng đối với các dòng TKT đơn độc (Balogh *et al.*, 2009).

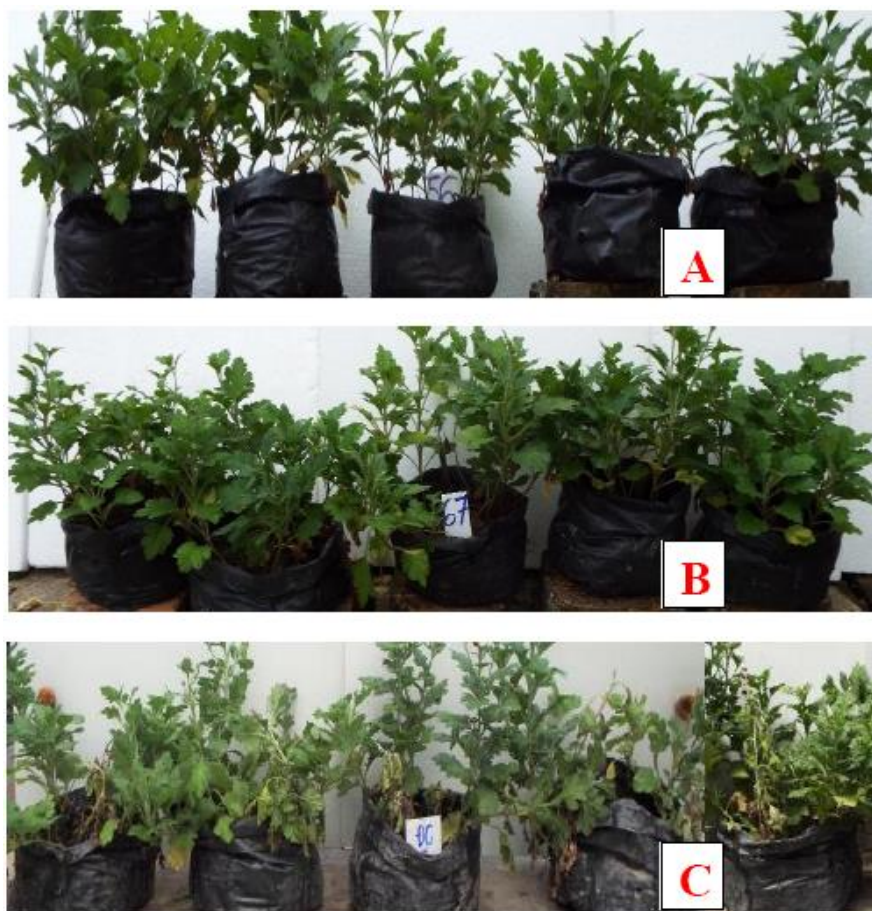
Bảng 4.11: Cấp độ bệnh héo xanh vi khuẩn trên cây hoa Cúc của các nghiệm thức xử lý TKT khác nhau trong điều kiện nhà lưới

Nghiệm (TKT)	Thức	Ngày sau khi lây bệnh			
		8	14	20	26
Đối Chứng		0,32 ^a	1,10 ^a	1,78 ^a	2,82 ^a
ΦBT75		0,26 ^{ab}	0,96 ^{ab}	1,48 ^{ab}	2,10 ^b
ΦCT44		0,14 ^{bc}	0,58 ^b	0,90 ^c	1,14 ^c
ΦBT67		0,00 ^c	0,06 ^c	0,24 ^d	0,42 ^d
ΦCT46		0,34 ^a	0,96 ^{ab}	1,54 ^{ab}	2,10 ^b
ΦBT56		0,00 ^c	0,00 ^c	0,04 ^d	0,22 ^d
Mix		0,18 ^{ab}	0,64 ^b	1,14 ^{bc}	1,46 ^c
Mức ý nghĩa		*	*	*	*
CV (%)		68,48	45,80	31,44	22,58

Ghi chú: Các số trung bình trong một cột theo sau bởi một hay nhiều chữ cái giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức ý nghĩa 5% bằng phép thử Duncan. (Mix :hỗn hợp các thực khuẩn thể). TKT (thực khuẩn thể)

Tóm lại, từ kết quả của thí nghiệm cho thấy, các dòng TKT được sử dụng đều có hiệu quả trong việc kiểm soát bệnh héo xanh trên cây hoa cúc. Hai dòng TKT ΦBT67 và ΦBT56 có khả năng hạn chế được sự gây hại của vi khuẩn *R. solanacearum* cao nhất (Hình 4.10). Các công trình nghiên cứu cho kết quả tương tự như: Giang và *ctv.* (2014) đã ghi nhận các dòng TKT khác

nhau có hiệu quả phòng trị bệnh cháy bìa lá lúa do vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) là khác nhau, các dòng TKT 10, 12, 13 và 17 có khả năng tiêu diệt vi khuẩn *Xoo*44 cao hơn các dòng khác.



Hình 4.10: Mức độ nhiễm bệnh héo xanh do vi khuẩn *R. solanacearum* trên các nghiệm thức xử lý TKT và đối chứng ở thời điểm 26 NSKLB trong điều kiện nhà lưới ((A): Φ BT56; (B): Φ BT67 và (C) đối chứng không xử lý TKT)

4.2.6 Kết quả đánh giá thời điểm xử lý 2 dòng thực khuẩn thể triển vọng lên khả năng phòng trị bệnh héo xanh trên cây hoa Cúc trong điều kiện nhà lưới

Kết quả đánh giá thời điểm xử lý thực khuẩn thể Φ BT67 và Φ BT56 đối với bệnh héo xanh trên cây hoa Cúc do vi khuẩn *R. solanacearum* được thể hiện qua phần trăm tỷ lệ bệnh và chỉ số AUDPC. Nhìn chung, các nghiệm thức xử lý TKT ở các thời điểm trước, sau và kết hợp trước sau khi lây bệnh ở cả hai dòng TKT đều có hiệu quả giảm bệnh có khác biệt ý nghĩa thống kê so với đối chứng.

Ở thời điểm 8 NSKLB, về trung bình tỷ lệ bệnh của các nghiệm thức xử lý qua 3 thời điểm xử lý ghi nhận 2 nghiệm thức xử lý TKT Φ BT67 và Φ BT56 đều có tỷ lệ bệnh tuần tự 2,5% và 0,0%, thấp hơn và khác biệt ý nghĩa thống

kê giữa các nghiệm thức đối chứng với tỷ lệ bệnh 15%. Trong đó nghiệm thức xử lý TKT ΦBT56 chưa xuất hiện bệnh và khác biệt ý nghĩa so với nghiệm thức ΦBT67 bệnh 2,5%. Về thời điểm xử lý, xử lý trước lây bệnh và thời điểm xử lý trước + sau lây bệnh có tỷ lệ bệnh thấp hơn và khác biệt ý nghĩa thống kê so với thời điểm xử lý sau khi lây bệnh (Bảng 4.12).

Bảng 4.12: Tỷ lệ (%) bệnh héo xanh vi khuẩn trên cây hoa Cúc khi xử lý hai dòng TKT qua ba thời điểm xử lý khác nhau trong điều kiện nhà lưới ở 8 NSKLB

TKT(A) \ TĐXL(B)	Thời điểm xử lý thực khuẩn thể			
	Trước	Sau	Trước + Sau	TB (A)
ΦBT67	0,0 ^c	7,5 ^b	0,0 ^c	2,5 ^B
ΦBT56	0,0 ^c	0,0 ^c	0,0 ^c	0,0 ^C
ĐC	15,0 ^a	15,0 ^a	15,0 ^a	15,0 ^A
TB (B)	5,0 ^B	7,5 ^A	5,0 ^B	
Mức ý nghĩa	F(A)*, F(B)*, F(AB)*			
CV (%)	30,67			

Ghi chú: Số liệu được chuyển sang dạng \sqrt{x} trước khi xử lý số liệu. Các số trung bình trong một cột hay một hàng theo sau bởi một hay nhiều chữ cái giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức ý nghĩa 5% bằng phép thử Duncan. * khác biệt ở mức ý nghĩa 5%. TĐXL (thời điểm xử lý), TKT (thực khuẩn thể), ĐC (đối chứng).

Ở thời điểm 12 NSKLB, tỷ lệ bệnh tăng chậm so với thời điểm 8 NSKLB (Bảng 4.13). Lúc này, cả hai thời điểm xử lý trước và xử lý trước sau của hai dòng TKT vẫn chưa xuất hiện bệnh. Riêng thời điểm xử lý sau chỉ có nghiệm thức TKT ΦBT67 là có bệnh (7,5%) không tăng so với thời điểm 8NSKLB.

Bảng 4.13: Tỷ lệ (%) bệnh héo xanh vi khuẩn trên cây hoa Cúc khi xử lý hai dòng TKT qua ba thời điểm xử lý khác nhau trong điều kiện nhà lưới ở 12 NSKLB

TKT(A) \ TĐXL(B)	Thời điểm xử lý thực khuẩn thể			
	Trước	Sau	Trước + Sau	TB (A)
ΦBT67	0,0 ^c	7,5 ^b	0,0 ^c	2,5 ^B
ΦBT56	0,0 ^c	0,0 ^c	0,0 ^c	0,0 ^C
ĐC	17,5 ^a	17,5 ^a	17,5 ^a	17,5 ^A
TB (B)	5,83 ^B	8,33 ^A	5,83 ^B	
Mức ý nghĩa	F(A)*, F(B)*, F(AB)*			
CV (%)	27,04			

Ghi chú: Số liệu được chuyển sang dạng \sqrt{x} trước khi xử lý số liệu. Các số trung bình trong một cột hay một hàng theo sau bởi một hay nhiều chữ cái giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức ý nghĩa 5% bằng phép thử Duncan. * khác biệt ở mức ý nghĩa 5%. TĐXL (thời điểm xử lý), TKT (thực khuẩn thể), ĐC (đối chứng).

Đến thời điểm 16 NSKLB (Bảng 4.14), tất cả các nghiệm thức đều đã xuất hiện bệnh, riêng đối chứng có tỷ lệ bệnh cao nhất (40%) và có khác biệt ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức có xử lý TKT. Giữa các nghiệm thức xử lý TKT đã có sự khác biệt với nhau, trong đó nghiệm thức xử lý TKT ΦBT56 thể hiện hiệu quả giảm bệnh tốt hơn khi có trung bình tỷ lệ bệnh là 6,7% so với 12,5% của các nghiệm thức xử lý TKT ΦBT67. Ở cả hai TKT, xử lý trước và xử lý kết hợp trước sau tỷ lệ bệnh thấp hơn so với xử lý sau nhưng chưa có khác biệt ý nghĩa thống kê giữa xử lý trước và trước sau.

Bảng 4.14: Tỷ lệ (%) bệnh héo xanh vi khuẩn trên cây hoa Cúc khi xử lý hai dòng TKT qua ba thời điểm xử lý khác nhau trong điều kiện nhà lưới ở 16 NSKLB

TKT(A) \ TĐXL(B)	Thời điểm xử lý thực khuẩn thể			
	Trước	Sau	Trước + Sau	TB (A)
ΦBT67	10,0	20,0	7,5	12,5 ^B
ΦBT56	5,0	10,0	5,0	6,7 ^C
ĐC	40,0	40,0	40,0	40,0 ^A
TB (B)	18,33	23,33	17,5	
Mức ý nghĩa	F(A)*, F(B) ^{ns} , F(AB) ^{ns}			
CV (%)	38,48			

Ghi chú: Số liệu được chuyển sang dạng $\arcsin \sqrt{x}$ trước khi xử lý số liệu. Các số trung bình trong một cột hay một hàng theo sau bởi một hay nhiều chữ cái in hoa giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức ý nghĩa 5% bằng phép thử Duncan. (ns) không khác biệt ý nghĩa thống kê, (*) khác biệt ở mức ý nghĩa 5%. TĐXL (thời điểm xử lý), TKT (thực khuẩn thể), ĐC (đối chứng).

Ở thời điểm 20 NSKLB (Bảng 4.15), nghiệm thức đối chứng tiếp tục có tỷ lệ bệnh cao nhất (52,5%) và khác biệt ý nghĩa thống kê so với các nghiệm

thức có xử lý TKT, nhưng giữa các nghiệm thức xử lý TKT đã có sự khác biệt với nhau, trong đó nghiệm thức xử lý TKT ΦBT56 thể hiện hiệu quả giảm bệnh tốt hơn khi có trung bình tỷ lệ bệnh là 11,7% so với 18,3% của các nghiệm thức xử lý TKT ΦBT67. Ở các nghiệm thức xử lý TKT trước (25,8%) và trước sau (24,2%) có tỷ lệ bệnh thấp hơn và khác biệt ý nghĩa thống kê so với xử lý sau (32,5%). Điều này chứng tỏ, TKT được xử lý trước và trước sau có hiệu quả giảm bệnh tốt hơn so với xử lý sau do thời gian xử lý TKT liên quan mật thiết đến sự xuất hiện của các tác nhân gây bệnh và ảnh hưởng đến hiệu quả của kiểm soát bệnh.

Bảng 4.15: Tỷ lệ (%) bệnh héo xanh vi khuẩn trên cây hoa Cúc khi xử lý hai dòng TKT qua ba thời điểm xử lý khác nhau trong điều kiện nhà lưới ở 20 NSKLB

TKT(A)	TĐXL(B)	Thời điểm xử lý thực khuẩn thể			
		Trước	Sau	Trước + Sau	
ΦBT67		17,5	27,5	10,0	18,3 ^B
ΦBT56		7,5	17,5	10,0	11,7 ^C
ĐC		52,5	52,5	52,5	52,5 ^A
TB (B)		25,8 ^B	32,5 ^A	24,2 ^B	
Mức ý nghĩa		F(A)*, F(B)*, F(AB) ^{ns}			
CV (%)		18,22			

Ghi chú: Số liệu được chuyển sang dạng $\arcsin \sqrt{x}$ trước khi xử lý số liệu. Các số trung bình trong một cột hay một hàng theo sau bởi một hay nhiều chữ cái in hoa giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức ý nghĩa 5% bằng phép thử Duncan. (ns) khác biệt không ý nghĩa thống kê, (*) khác biệt ở mức ý nghĩa 5%. TĐXL (thời điểm xử lý), TKT (thực khuẩn thể), ĐC (đối chứng).

Đến thời điểm 24 NSKLB (Bảng 4.16), trung bình tỷ lệ bệnh ở đối chứng (67,5%) vẫn cao nhất, kế đến là nghiệm thức có xử lý TKT ΦBT67 (25,8%) và thấp nhất là ΦBT56 (16,7%), các nghiệm thức đều có khác biệt ý nghĩa thống kê với nhau.

Lúc này, thời điểm xử lý TKT sau (44,2%) có sự khác biệt ý nghĩa thống kê so với xử lý TKT trước (34,2%) và trước sau (31,7%). Xử lý TKT trước và trước sau vẫn có hiệu quả giảm bệnh tốt hơn so với xử lý sau.

Bảng 4.16: Tỷ lệ (%) bệnh héo xanh vi khuẩn trên cây hoa Cúc khi xử lý hai dòng TKT qua ba thời điểm xử lý khác nhau trong điều kiện nhà lưới ở 24 NSKLB

TKT(A)	TĐXL(B)	Thời điểm xử lý thực khuẩn thể			TB (A)
		Trước	Sau	Trước + Sau	
ΦBT67		22,5	37,5	17,5	25,8 ^B
ΦBT56		12,5	27,5	10,0	16,7 ^C
ĐC		67,5	67,5	67,5	67,5 ^A
TB (B)		34,2 ^B	44,2 ^A	31,7 ^B	
Mức ý nghĩa		F(A)*, F(B)*, F(AB) ^{ns}			
CV (%)		16,43			

Ghi chú: Số liệu được chuyển sang dạng $\arcsin \sqrt{x}$ trước khi xử lý số liệu. Các số trung bình trong một cột hay một hàng theo sau bởi một hay nhiều chữ cái in hoa giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức ý nghĩa 5% bằng phép thử Duncan. (ns) khác biệt không ý nghĩa thống kê, (*) khác biệt ở mức ý nghĩa 5%. TĐXL (thời điểm xử lý), TKT (thực khuẩn thể), ĐC (đối chứng).

Về chỉ số AUDPC (Bảng 4.17) cho thấy kết quả cả hai nghiệm thức có xử lý TKT có AUDPC trong khoảng 100-175 thấp hơn khác biệt so với nghiệm thức đối chứng (547,5), trong đó nghiệm thức xử lý dòng ΦBT56 (100,0) thấp hơn và khác biệt ý nghĩa thống kê so với ΦBT67 (175,0). Điều đó cho thấy, TKT có khả năng khống chế sự phát triển của bệnh héo xanh do vi khuẩn *R. solanacearum* trên cây hoa Cúc và khả năng đó được thể hiện khác nhau giữa các dòng TKT. Đối với các thời điểm xử lý TKT, thì xử lý trước và trước sau có AUDPC trong khoảng 240,0-254,2 tương đương nhau, đều thấp hơn so với xử lý sau (328,3).

Bảng 4.17: Chỉ số AUDPC do vi khuẩn *R. solanacearum* khi xử lý hai dòng TKT qua ba thời điểm xử lý khác nhau trong điều kiện nhà lưới

TKT(A)	TĐXL(B)	Thời điểm xử lý thực khuẩn thể			TB (A)
		Trước	Sau	Trước + Sau	
ΦBT67		145,0 ^c	282,5 ^b	97,5 ^c	175,0 ^B
ΦBT56		70,0 ^c	155,0 ^c	75,0 ^c	100,0 ^C
ĐC		547,5 ^a	547,5 ^a	547,5 ^a	547,5 ^A
TB (B)		254,2 ^B	328,3 ^A	240,0 ^B	
Mức ý nghĩa		F(A)*, F(B)*, F(AB)*			
CV (%)		27,48			

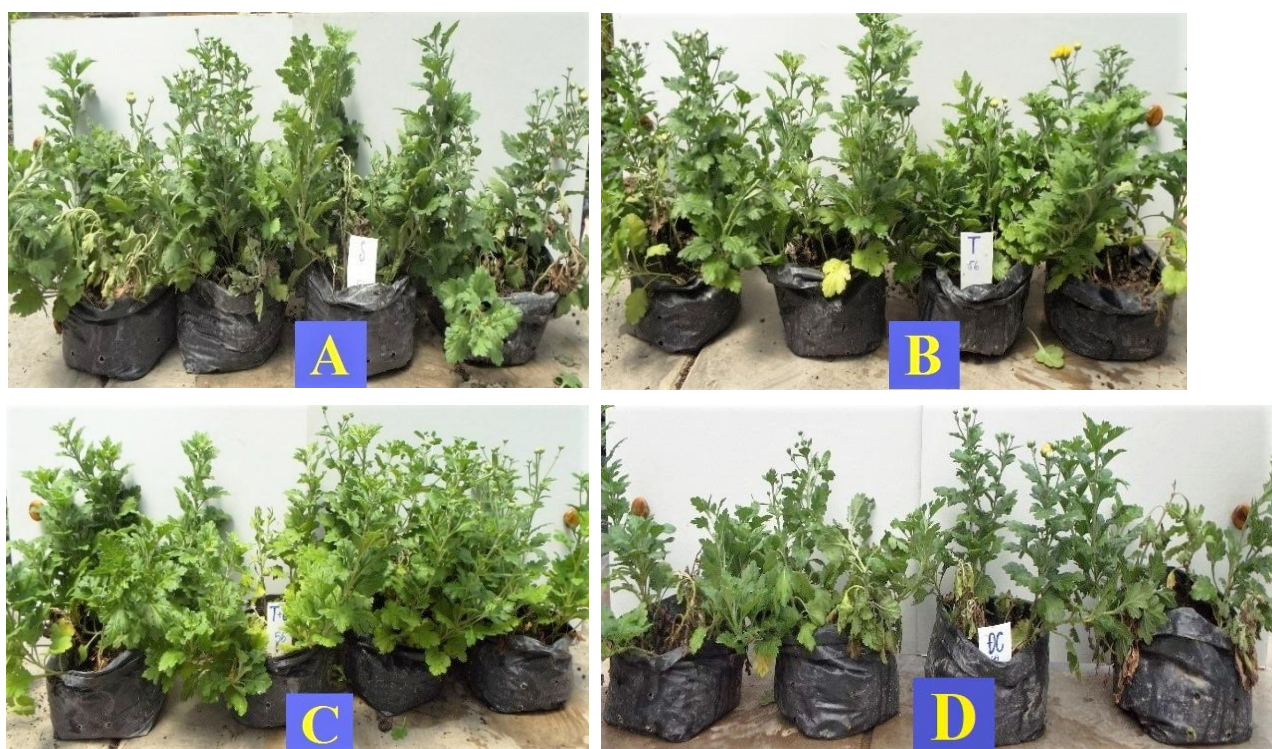
Ghi chú: Các số trung bình trong một cột hay một hàng theo sau bởi một hay nhiều chữ cái giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức ý nghĩa 5% bằng phép thử Duncan. * khác biệt ở mức ý nghĩa 5%. TĐXL (thời điểm xử lý), TKT (thực khuẩn thể), ĐC (đối chứng).

Tóm lại, qua các kết quả tỷ lệ bệnh, chỉ số AUDPC cho thấy, cả hai dòng TKT đều có hiệu quả giảm bệnh héo xanh do vi khuẩn *R. solanacearum* tốt hơn so với đối chứng không xử lý TKT. Riêng dòng TKT ΦBT56 thể hiện hiệu quả giảm bệnh trội hơn so với dòng TKT ΦBT67 (Hình 4.11). Vì thế TKT ΦBT56 được chọn cho các thí nghiệm tiếp theo của luận án ở điều kiện ngoài đồng.

Bên cạnh đó, thời điểm xử lý TKT cũng ảnh hưởng đến hiệu quả giảm bệnh, TKT khi được xử lý trước khi lây bệnh 1 giờ hay kết hợp cả trước 1 giờ và sau khi lây bệnh 5 ngày mang lại hiệu quả giảm bệnh tương đương nhau và tốt hơn so với chỉ xử lý TKT sau khi lây bệnh 5 ngày. Việc xử lý TKT trước khi mầm bệnh hiện diện và xâm nhiễm vào cây trồng sẽ cho hiệu quả tốt hơn so với xử lý TKT sau khi mầm bệnh xuất hiện và xâm nhập vào cây trồng bởi khi thiết lập quần thể sớm, TKT có khả năng tiêu diệt trực tiếp mầm bệnh trước khi chúng thực hiện xâm nhiễm vào bên trong nội bào cây trồng và thoát khỏi sự kí sinh của TKT. Kết quả này phù hợp với một số nghiên cứu của Civerolo & Keil (1969) sự giảm đáng kể các đốm lá vi khuẩn *Xanthomonas pruni* trên quả đào khi xử lý TKT trước một giờ hoặc một ngày trước khi lây bệnh nhân tạo và tỷ lệ bệnh đã giảm từ 86-100% (Trích dẫn Jones *et al.*, 2012). Trong trường hợp xử lý sau khi lây bệnh, TKT đã không thể tiếp cận vi khuẩn trong không gian gian bào, hoặc do mật số TKT không đủ để tiếp cận mầm bệnh. Schnabel *et al.* (1999) cũng đã ghi nhận một sự giảm đáng kể (37%) của bệnh bạc lá trên hoa táo khi xử lý hỗn hợp ba dòng TKT cùng lúc với các vi khuẩn gây bệnh, ngược lại, không có hiệu quả giảm bệnh khi TKT được xử lý sau khi lây bệnh một ngày. Bergamin & Kimati (1981) đã nghiên cứu ảnh hưởng của thời gian xử lý TKT đến hiệu quả của việc kiểm soát bệnh vi khuẩn trên cây trồng trong các thử nghiệm ở nhà kính với hai loại bệnh: thối đen bắp cải (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) và đốm vi khuẩn trên ớt (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*) cho hiệu quả giảm bệnh cao khi xử lý TKT và vi khuẩn gây bệnh cùng ngày với nhau đối với cả hai loại bệnh (Balogh *et al.*, 2009). Kết quả tương tự cũng được ghi nhận khi xử lý TKT để kiểm soát bệnh cháy bìa lá trên lúa do vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* gây ra (Giang và *ctv.*, 2014). Thí nghiệm khảo sát hiệu quả của bốn dòng TKT 10, 12, 13, và 17 qua hai biện pháp xử lý (phun trước và phun sau với huyền phù từng dòng TKT 10^8 PFU/mL) trong phòng trị đối với bệnh cháy bìa lá do vi khuẩn *X. oryzae* pv. *oryzae* (Xoo 44) gây ra. Kết quả cả 4 dòng thực khuẩn thể 10, 12, 13 và 17 đều thể hiện hiệu quả giảm bệnh cháy bìa lá

lúa. Biện pháp phun trước thể hiện hiệu quả cao hơn phun sau và hai dòng TKT 10 và 12 thể hiện hiệu quả phòng trị bệnh cao hơn hai dòng còn lại.

Việc áp dụng TKT có khả năng quản lý tốt nhất bệnh cháy lá do *Xanthomonas* trên hành tây, nếu TKT có thể định vị và tồn tại trên mô thực vật trước khi bệnh xâm nhiễm và phát triển (trích dẫn Giang và *ctv.*, 2014). TKT có một sự tương tác mật thiết với ký chủ. Trong môi trường, các quần thể ký chủ tồn tại với mật số cao và điều kiện thuận lợi, TKT sẽ tồn tại tốt hơn nhiều so với khi không có ký chủ bởi chúng có khả năng tấn công vào ký chủ trước khi bị phá hủy bởi các yếu tố vật lý bên ngoài.



Hình 4.11: Mức độ nhiễm bệnh héo xanh do vi khuẩn *R. solanacearum* khi xử lý dòng ΦBT56 ở các thời điểm xử lý khác nhau lúc 24 NSKLB. (A: TKT ΦBT56 xử lý sau, B: TKT ΦBT56 xử lý trước, C: TKT ΦBT56 xử lý trước sau, D: Đối chứng không xử lý TKT)

4.2.7 Kết quả đánh giá ảnh hưởng của mật số thực khuẩn thể lên khả năng phòng trị bệnh héo xanh trên cây hoa Cúc trong điều kiện nhà lưới

Từ kết quả đánh giá tỷ lệ bệnh (Bảng 4.18) có thể thấy tỷ lệ bệnh héo xanh trên cây hoa Cúc của các nghiệm thức xử lý TKT ΦBT56 ở các mật số ở các thời điểm khảo sát đều thể hiện tỷ lệ bệnh khác biệt thống kê với nhau, thấp hơn khác biệt so với đối chứng. Bệnh bắt đầu xuất hiện ở thời điểm 8 NSKLB nghiệm thức đối chứng và nghiệm thức xử lý TKT ở mật số 10^6 (PFU/mL), tuy nhiên tỷ lệ bệnh ở các nghiệm thức xử lý TKT không có sự khác biệt ý nghĩa thống kê. Đến thời điểm 16 NSKLB, bệnh đã xuất hiện ở tất cả các nghiệm

thức, riêng nghiệm thức đối chứng có tỷ lệ bệnh cao nhất và khác biệt ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức có xử lý TKT, nghiệm thức xử lý TKT mật số 10^8 (PFU/mL) có tỷ lệ bệnh thấp nhất nhưng không khác biệt so với nghiệm thức xử lý ở mật số 10^7 (PFU/mL). Ở giai đoạn 16-28 NSKLB, tỷ lệ bệnh có xu hướng tăng ở tất cả các nghiệm thức, trong đó nghiệm thức đối chứng có tỷ lệ bệnh cao nhất và khác biệt ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức có xử lý TKT, điều này thể hiện TKT có khả năng kiểm soát bệnh héo xanh do vi khuẩn *R. solanacearum*, các nghiệm thức xử lý TKT ở mật số 10^7 (PFU/mL) và 10^8 (PFU/mL) có tỷ lệ bệnh thấp hơn và khác biệt so với nghiệm thức xử lý TKT ở mật số 10^6 (PFU/mL) (Hình 4.12).

Bảng 4.18: Tỷ lệ (%) bệnh héo xanh vi khuẩn trên cây hoa Cúc khi xử lý ΦBT56 ở các mật số khác nhau trong điều kiện nhà lưới

Nghiệm thức	Ngày sau khi lây bệnh						AUDPC
	8	12	16	20	24	28	
Đối Chứng	15,0 ^a	22,5 ^a	32,5 ^a	45,0 ^a	52,5 ^a	65,0 ^a	770 ^a
ΦBT56 (10^6)	5,0 ^b	5,0 ^b	15,0 ^b	25,0 ^b	30,0 ^b	32,5 ^b	375 ^b
ΦBT56 (10^7)	0,0 ^b	0,0 ^b	5,0 ^{bc}	10,0 ^c	15,0 ^c	20,0 ^c	160 ^c
ΦBT56 (10^8)	0,0 ^b	0,0 ^b	2,5 ^c	10,0 ^c	12,5 ^c	15,0 ^c	130 ^c
Mức ý nghĩa	*	*	*	*	*	*	*
CV. (%)	44,74	54,52	44,58	21,17	15,99	13,02	23,42

Ghi chú: Số liệu được chuyển sang dạng $\arcsin \sqrt{x}$ trước khi xử lý số liệu. Các số trung bình trong một cột theo sau bởi một hay nhiều chữ cái in thường giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức ý nghĩa 5% bằng phép thử Duncan, * khác biệt ở mức ý nghĩa 5%.

Về chỉ số (AUDPC) (Bảng 4.18), kết quả cho thấy các nghiệm thức xử lý TKT ở các mật số khác nhau đều thấp hơn và khác biệt ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức đối chứng, nghiệm thức xử lý TKT ở mật số 10^6 (PFU/mL) thể hiện hiệu quả thấp hơn so với mật số 10^7 (PFU/mL) và 10^8 (PFU/mL).

Về cấp bệnh (Bảng 4.19) thể hiện sự tương quan với tỷ lệ bệnh, ở giai đoạn 8-12 NSKLB các nghiệm thức xử lý TKT 10^7 (PFU/mL) và 10^8 (PFU/mL) chưa có sự xuất hiện bệnh, trong khi đó nghiệm thức xử lý TKT 10^6 (PFU/mL) đã xuất hiện bệnh nhưng không khác biệt ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức xử lý TKT ở mật số 10^7 (PFU/mL) và 10^8 (PFU/mL). Đến thời điểm 16 NSKLB, bệnh đã xuất hiện ở tất cả các nghiệm thức, riêng nghiệm thức đối chứng có cấp bệnh cao nhất và khác biệt ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức có xử lý TKT, nghiệm thức xử lý TKT mật số 10^8 (PFU/mL) có cấp bệnh thấp nhất nhưng không khác biệt so với nghiệm thức xử lý ở mật số 10^7 (PFU/mL). Đến thời điểm 20, 24, 28 NSKLB, TKT được xử lý ở mật số 10^7 (PFU/mL) và 10^8 (PFU/mL) có trung bình cấp bệnh thấp hơn và khác biệt

ý nghĩa thống kê so với đối chứng và nghiệm thức xử lý TKT ở mật số 10^6 (PFU/mL) (Hình 4.13).

Bảng 4.19: Cấp bệnh héo xanh vi khuẩn trên cây hoa Cúc khi xử lý ΦBT56 ở các mật số khác nhau trong điều kiện nhà lưới

Nghiệm thức	Ngày sau khi lây bệnh					
	8	12	16	20	24	28
Đối Chứng	0,50 ^a	1,05 ^a	1,45 ^a	1,78 ^a	2,28 ^a	2,88 ^a
ΦBT56 (10^6)	0,13 ^b	0,18 ^b	0,65 ^b	0,98 ^b	1,23 ^b	1,35 ^b
ΦBT56 (10^7)	0,00 ^b	0,00 ^b	0,18 ^{bc}	0,35 ^c	0,55 ^c	0,78 ^c
ΦBT56 (10^8)	0,00 ^b	0,00 ^b	0,08 ^c	0,35 ^c	0,43 ^c	0,60 ^c
Mức ý nghĩa	*	*	*	*	*	*
CV. (%)	105,73	112,23	59,27	39,27	25,71	21,28

Ghi chú: Các số trung bình trong một cột theo sau bởi một hay nhiều chữ cái in thường giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức ý nghĩa 5% bằng phép thử Duncan, * khác biệt ở mức ý nghĩa 5%.

Mật số TKT là một yếu tố cực kỳ quan trọng ảnh hưởng đến hiệu quả phòng trị bệnh héo xanh trên cây hoa Cúc. Sự thành công của phòng trừ sinh học chịu ảnh hưởng bởi mật số của tác nhân phòng trừ sinh học (Johnson, 1994). Trong trường hợp sử dụng liệu pháp TKT, cần có mật số cao của cả quần thể TKT và vi khuẩn, để có thể bắt đầu "phản ứng dây chuyền" việc ly giải vi khuẩn (Gill & Abedon, 2003). Do đó, ngưỡng mật số TKT là mật số TKT cần thiết để kiểm soát tốt tác nhân gây bệnh nhưng dưới mật số đó thì TKT sẽ không gây một tác dụng rõ rệt đối với các quần thể vi khuẩn. Một số phát hiện ủng hộ cho giả thuyết này: Balogh *et al.*, (2009) nhận thấy rằng một hỗn hợp TKT kiểm soát hiệu quả vi khuẩn đốm lá cà chua nếu được dùng ở mật số 10^6 đến 10^8 PFU/mL, nhưng không có hiệu quả tại 10^4 PFU/mL. Lang *et al.* (2007) cũng quan sát tương tự mức độ như vậy trong kiểm soát bệnh cháy lá hành do *Xanthomonas* với khoảng 10^5 đến 10^9 PFU/mL thì có hiệu quả phòng trị, nếu mật số thấp hơn thì không còn hiệu quả.

Kết quả tương tự cũng được ghi nhận khi xử lý TKT để kiểm soát bệnh cháy bìa lá trên lúa do vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* gây ra (Giang và *ctv.*, 2014). Kết quả đánh giá hiệu quả phòng trừ trong điều kiện nhà lưới cho thấy cả 4 dòng TKT 10, 12, 13 và 17 qua xử lý với mật số 10^8 PFU/mL đều thể hiện hiệu quả giảm bệnh cháy bìa lá lúa. Kết quả tương tự cũng được ghi nhận trên bệnh thối hạt lúa trong điều kiện nhà lưới do vi khuẩn *Burkholderia glumae* gây ra khi sử dụng TKT để kiểm soát bệnh (Huy và *ctv.*, 2016). Kết quả ghi nhận khi phun huyền phù TKT ΦVL34 với mật số khác nhau 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 PFU/mL lên bông lúa đều thể hiện hiệu quả giảm bệnh

so với nghiệm thức không xử lý TKT, trong đó mật số 10^8 PFU/mL cho hiệu quả cao nhất.

Tóm lại, qua các kết quả tỷ lệ bệnh, chỉ số AUDPC, trung bình cấp bệnh đã cho thấy mật số TKT khác nhau có ảnh hưởng đến sự phòng trừ bệnh héo xanh khác nhau. Kết quả thí nghiệm cho thấy, TKT ΦBT56 được xử lý ở mật số 10^7 (PFU/mL) và 10^8 (PFU/mL) có hiệu quả giảm bệnh cao hơn so với nghiệm thức xử lý TKT ở mật số 10^6 (PFU/mL) (Hình 4.13).

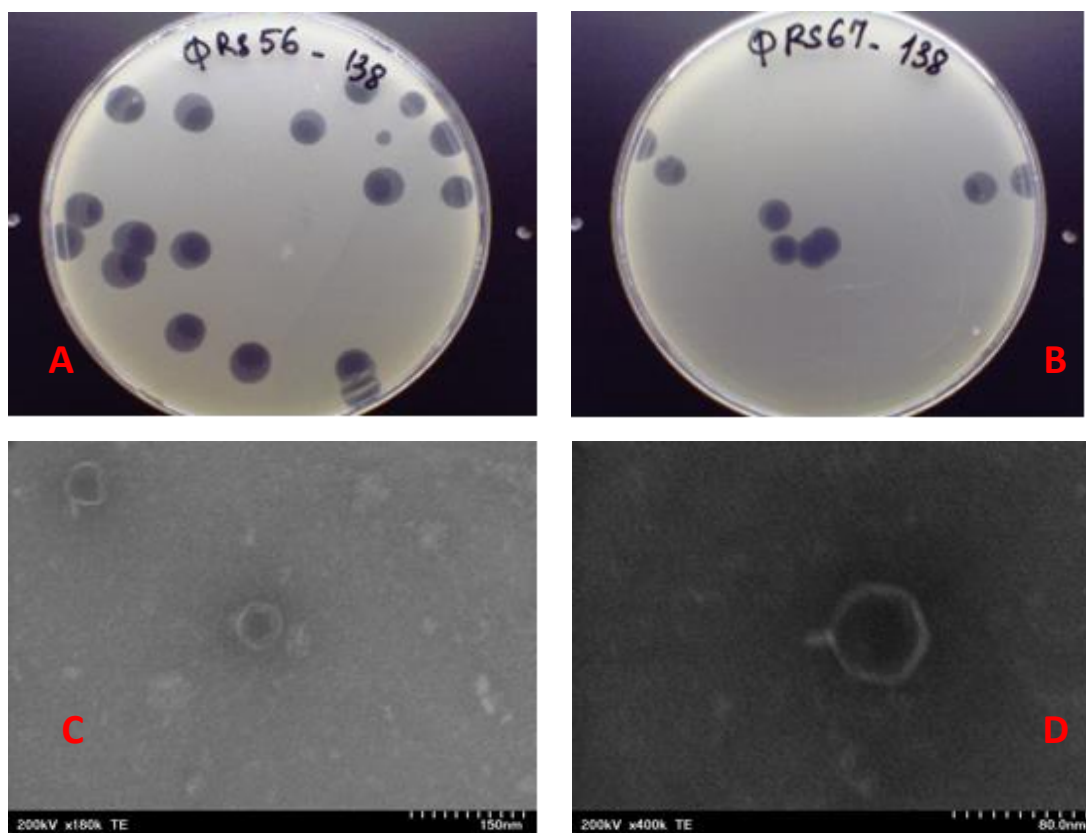


Hình 4.12: Mức độ nhiễm bệnh héo xanh do vi khuẩn *R. solanacearum* trên cây hoa Cúc khi xử lý ΦBT56 ở các mật số khác nhau trong điều kiện nhà lưới. ((A): TKT ΦBT56 ở 10^6 (PFU/mL); (B): TKT ΦBT56 ở 10^7 (PFU/mL); (C): TKT ΦBT56 ở 10^8 (PFU/mL); (D): đối chứng lây bệnh vi khuẩn không xử lý TKT, (E): đối chứng không lây bệnh)

4.2.8 Kết quả khảo sát đặc điểm hình thái của 2 dòng thực khuẩn thể triển vọng bằng kính hiển vi điện tử Transmission Electron Microscopy (TEM)

Qua kết quả khảo sát hình thái của TKT dưới kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM) cho thấy cả 2 dòng thực khuẩn thể ΦBT56 và ΦBT67 đều có đầu và đuôi ngắn (Hình 4.13 C và D), theo thang phân loại Ủy ban Quốc tế về phân loại virus (ICTV) cả 2 thực khuẩn thể ΦBT56 và ΦBT67 thuộc họ

Podoviridae của bộ phage đuôi Caudovirales (Grath & Sinderen, 2007; Ackermann, 2009).



Hình 4.13: Hình thái của hai dòng thực khuẩn thể ΦBT56 và ΦBT67

((A): Hình thái đốm thực khuẩn (plaque) của ΦBT56; (B): Hình thái đốm thực khuẩn (plaque) của ΦBT67 trên dòng *Ralstonia solanacearum* 138 được cung cấp bởi phòng thí nghiệm của Viện Công nghệ Kyoto- Nhật Bản ; (C): Hình thái của ΦBT56 được quan sát dưới kính hiển vi điện tử TEM; (D): Hình thái của ΦBT67 được quan sát dưới kính hiển vi điện tử TEM)

Kết quả này phù hợp với một số nghiên cứu như: Elhalag *et al.*, (2018) đã sử dụng TKT RsPod1EGY thuộc họ Podoviridae được phân lập và đánh giá hiệu quả kiểm soát vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* gây bệnh héo xanh trên cà chua tại Ai Cập có mã số trên ngân hàng gen là MG711516. Nhóm tác giả sử dụng thực khuẩn thể RsPod1EGY như một tác nhân kiểm soát sinh học chống lại vi khuẩn *R. solanacearum* gây bệnh héo trên cà chua. Hiệu quả của TKT này đã được đánh giá trong phòng thí nghiệm và trong điều kiện nhà lưới. TKT RsPod1EGY tạo ra đốm tan với đường kính 3,0-4,0 mm trên đĩa petri có vi khuẩn *R. solanacearum* và hoàn thành chu kỳ lây nhiễm của nó trong 180 phút sau khi nhiễm. Trên cơ sở phân tích kích thước bộ gen của TKT là khoảng 41 kb với DNA sợi kép. Các nghiên cứu in vitro cho thấy RsPod1EGY ổn định ở nhiệt độ cao (lên đến 60°C) và ở phạm vi pH rộng (5-9). TKT RsPod1EGY được chứng minh là có hiệu quả trong việc giảm và

ngăn ngừa sự hình thành các polysaccharid bề mặt của *R. solanacearum*. Trong điều kiện nhà lưới, tất cả các cây cà chua được xử lý TKT RsPod1EGY không có triệu chứng héo hoặc nhiễm bệnh tiềm ẩn nào trong suốt thời gian thí nghiệm, trong khi tất cả các cây không được xử lý RsPod1EGY đều bị héo sau 10 ngày kể từ khi nhiễm bệnh. Sự ổn định của thực khuẩn thể RsPod1EGY ở nhiệt độ cao hơn cũng như khả năng ngăn chặn hiệu quả các triệu chứng héo trong điều kiện nhà lưới sẽ góp phần kiểm soát sinh học bệnh héo xanh do vi khuẩn *R. solanacearum* ở Ai Cập trong điều kiện ngoài đồng ruộng. Tương tự, một nghiên cứu của Ahmad *et al.*, (2018) về trình tự bộ gene của TKT RsoP1EGY được phân lập từ đất của một ruộng khoai tây bị nhiễm vi khuẩn *R. solanacearum* vào năm 2017 ở tỉnh Al Qalyubia của Ai Cập. Qua chụp hình thái TKT RsoP1EGY bằng kính hiển vi điện tử cho thấy cấu trúc của TKT này có đầu hình đa diện đường kính 60 ± 5 nm với đuôi ngắn dài 15 ± 5 nm, điển hình của họ podoviridae.

Tương tự, Bae *et al.*, (2012) đã sử dụng TKT PE204 kiểm soát bệnh héo xanh do vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* gây bệnh héo xanh trên cà chua. TKT PE204 có cấu trúc hình tứ diện đuôi ngắn và bộ gen DNA sợi kép thuộc họ Podoviridae. PE204 ổn định trong phạm vi nhiệt độ và pH rộng, và cũng ổn định khi có mặt chất hoạt động bề mặt Silwet L-77. Trong khi TKT thường kém ổn định hơn dưới nhiệt độ tăng cao, thì sự hiện diện của vi khuẩn kí chủ đã giúp duy trì một quần thể TKT ổn định. Xử lý đồng thời TKT PE204 ở 10^8 PFU/mL với vi khuẩn kí chủ đã ức chế hoàn toàn sự xuất hiện bệnh héo xanh do vi khuẩn *R. solanacearum* gây ra. Tương tự, Park (2017) đã công bố TKT DU_RP_II, đây là một TKT mới được phân lập từ cây khoai tây bị bệnh héo xanh do vi khuẩn *R. solanacearum* ở Seogwipo, Hàn Quốc. Phạm vi ký chủ của TKT này được khảo sát với 33 dòng *R. solanacearum* được thu thập và phân lập từ các vùng sinh thái khác nhau và loài thực vật đa dạng do Trung tâm đa dạng nông nghiệp quốc gia tại Hàn Quốc cung cấp. TKT này có khả năng kiểm soát 23 trong tổng số 33 dòng vi khuẩn *R. solanacearum* được khảo sát (chiếm khoảng 70%). Qua chụp hình thái TKT bằng kính hiển vi điện tử TEM cho thấy cấu trúc của TKT DU_RP_II, bao gồm một đầu với đường kính khoảng 60 nm và đuôi rất ngắn. Cấu trúc tương tự như cấu trúc được xác định của các nhà khoa học trước đó Grath & Sinderen, (2007); Ackermann, (2009). Do đó, TKT DU_RP_II được đề xuất thuộc họ Podoviridae của bộ phage đuôi Caudovirales.

Tóm lại: cả 2 TKT ΦBT56 và ΦBT67 có đầu đa diện và đuôi ngắn thuộc họ Podoviridae của bộ phage đuôi Caudovirales theo thang phân loại Ủy

ban Quốc tế về phân loại virus (ICTV). TKT thuộc họ Podoviridae có DNA sợi kép và hàm lượng G + C là 59%, có tính ổn định cao ít bị biến đổi trong môi trường tự nhiên như nhiệt độ cao, pH rộng (5-9) đã được ứng dụng rộng rãi trên thế giới để kiểm soát bệnh héo xanh do vi khuẩn *R. solanacearum* trên nhiều loại cây trồng, đã được chứng minh là an toàn trong kiểm soát mầm bệnh do vi khuẩn trên đồng ruộng.

4.3 Nội dung 3: Xác định loại thuốc hóa học có hiệu lực ức chế vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* gây bệnh héo xanh trên cây hoa Cúc trong phòng thí nghiệm và hiệu quả phòng trừ bệnh ở điều kiện nhà lưới.

4.3.1 Kết quả đánh giá hiệu quả ức chế *Ralstonia solanacearum* của một số loại thuốc hóa học trong điều kiện phòng thí nghiệm

Hiệu quả đối kháng của 14 hoạt chất hóa học đối với vi khuẩn *R. solanacearum* được thể hiện qua số liệu bán kính vòng vô khuẩn và ghi nhận ở 3 thời điểm 24 giờ, 48 giờ, 72 giờ. Hầu hết hoạt chất đều có tác động ức chế vi khuẩn nhưng ở các mức độ khác nhau, riêng những hoạt chất như: saisentong, kasugamycin, bismertiazol, calcium oxide không tạo ra sự ảnh hưởng đối với vi khuẩn *R. solanacearum*. Các hoạt chất như streptomycin + oxytetracycline, oxytetracycline hydrochloride + gentamicin sulphate và oxolinic acid có hiệu quả ức chế tốt lên sự gia tăng mật số của vi khuẩn *R. solanacearum*.

Qua ghi nhận, các hoạt chất có hiệu quả đối kháng tốt đối với vi khuẩn *R. solanacearum* thể hiện cao nhất ở thời điểm 24 giờ và giảm dần theo thời gian. Tuy nhiên, nghiệm thức oxolinic acid lại đạt hiệu quả tăng dần. Do đó, khả năng kéo dài hiệu lực của oxolinic acid có thể tốt hơn so với oxytetracycline hydrochloride + gentamicin sulphate và streptomycin + oxytetracycline (Bảng 4.20).

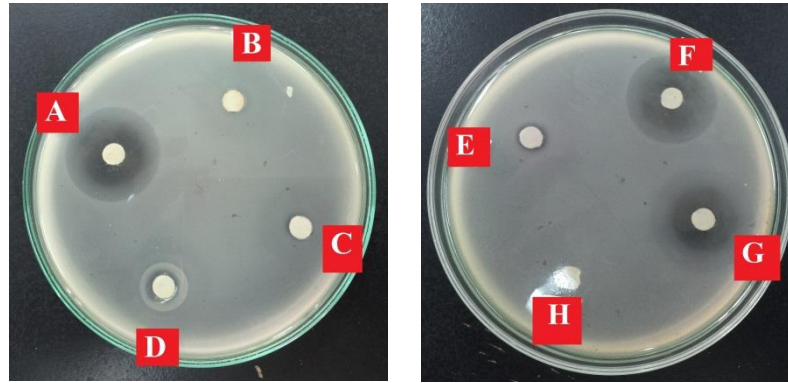
Ở thời điểm 24 giờ, kết quả ghi nhận nghiệm thức có bán kính vòng vô khuẩn cao nhất là streptomycin + oxytetracycline với 6,15 mm, kế đến là nghiệm thức oxytetracycline hydrochloride + gentamicin sulphate với 5,63 mm và nghiệm thức oxolinic acid là 5,00 mm. Ba nghiệm thức này có sự khác biệt ý nghĩa thống kê với nhau và khác biệt so với các nghiệm thức còn lại.

Đến thời điểm 48 giờ và 72 giờ bán kính vòng vô khuẩn của 3 nghiệm thức: streptomycin + oxytetracycline; oxolinic acid và oxytetracycline hydrochloride + gentamicin sulphate có bán kính vòng vô khuẩn cao hơn và khác biệt ý nghĩa thống kê với các nghiệm thức còn lại (Hình 4.14).

Bảng 4.20: Hiệu quả ức chế của các loại thuốc hóa học đối với vi khuẩn *R. solanacearum* gây bệnh héo xanh trên cây hóa Cúc ở điều kiện phòng thí nghiệm qua các thời điểm khảo sát

STT	Tên Thuốc	Hoạt chất	Bán kính vòng vô khuẩn (mm)		
			24 giờ	48 giờ	72 giờ
1	ViSen 20SC	Saisentong	0,00 ^e	0,00 ^f	0,00 ^f
2	Kasumin 2SL	Kasugamycin	0,00 ^e	0,25 ^{ef}	0,00 ^f
3	Physan 20SL	Quaternary ammonium salts	0,05 ^e	0,35 ^{ef}	0,40 ^{ef}
4	Starner 20WP	Oxolinic acid	5,00 ^c	5,25 ^{ab}	5,38 ^a
5	Avalon 8WP	Oxytetracycline hydrochloride + Gentamicin sulphate	5,63 ^b	4,88 ^b	4,63 ^b
6	Coc 85WP	Copper oxychloride	1,00 ^d	1,63 ^c	1,63 ^c
7	Strepgold 100WP	Streptomycin sulfate	0,15 ^e	0,33 ^{ef}	0,33 ^{ef}
8	Basu 250WP	Bismerthiazol	0,00 ^e	0,00 ^f	0,00 ^f
9	Xantocin 40WP	Bronopol	0,50 ^e	0,63 ^{de}	0,63 ^{de}
10	Norshield 86,2 WG	Cuprous oxide	0,30 ^e	0,30 ^{ef}	0,30 ^{ef}
11	Miksabe 100WP	Streptomycin + Oxytetracycline	6,15 ^a	5,63 ^a	5,63 ^a
12	Kocide 53,8WG	Copper hydroxide	0,50 ^e	0,45 ^{ef}	0,40 ^{ef}
13	Bordeaux	Calcium oxide Cupric sulfate	1,00 ^d	1,00 ^d	1,00 ^d
14	Vôi	Calcium oxide	0,00 ^e	0,00 ^f	0,00 ^f
Mức ý nghĩa			**	**	**
CV(%)			10,53	22,11	18,99

Chú thích: Số liệu % được chuyển sang \sqrt{x} trước khi phân tích thống kê. Các số trung bình trong một cột theo sau bởi một hay nhiều chữ cái giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê theo phép thử Duncan. (**) Mức ý nghĩa 1%.



Hình 4.14: Bán kính vòng vô khuẩn thời điểm 48 giờ của một số hoạt chất thuốc hóa học. (A) streptomycin + oxytetracycline; (B) cuprous oxide; (C) copper oxychloride; (D) copper hydroxide; (E) bronopol; (F) oxytetracycline hydrochloride + gentamicin sulphate; (G) oxolinic acid; (H) cancium oxide.

Tóm lại: Khi đánh giá hiệu lực ức chế vi khuẩn *R. solanacearum* gây bệnh héo xanh trên cây hoa Cúc của 14 hoạt chất hóa học trong điều kiện phòng thí nghiệm, kết quả ghi nhận có 3 bộ hoạt chất là: streptomycin + oxytetracycline; oxolinic acid và oxytetracycline hydrochloride + gentamicin sulphate có bán kính vòng vô khuẩn cao hơn và khác biệt ý nghĩa thống kê với các nghiệm thức còn lại. Vì thế 3 bộ hoạt chất này được sử dụng để đánh giá khả năng phòng trị bệnh héo xanh do vi khuẩn *R. solanacearum* trên cây hoa Cúc trong điều kiện nhà lưới.

Kết quả này phù hợp với một số nghiên cứu như: Lee *et al.*, (2015) đã đánh giá khả năng kiểm soát vi khuẩn *R. solanacearum* gây bệnh héo xanh được phân lập từ cây tiêu bệnh bằng 7 loại hoạt chất: copper hydroxide, copper oxychloride, copper sulfate, kasugamycin, oxytetracycline, validamycin và oxolinic acid. Trong số 7 loại hoạt chất, oxytetracycline có hoạt tính cao nhất chống lại sự phát triển của *R. solanacearum* trên đĩa petri, nhưng validamycin không có hoạt tính chống lại *R. solanacearum*. Các loại hoạt chất đồng như copper hydroxide, copper oxychloride và copper sulfate được ủ sau 48 giờ trên đĩa petri tạo đường kính vòng vô khuẩn lần lượt là 2.2 mm, 1.3 mm và 1.5 mm. Trong thử nghiệm cây tiêu ở điều kiện nhà lưới, oxytetracycline cho thấy hoạt động hoàn hảo ở tất cả các nghiệm thức đến 7 ngày sau khi áp dụng. Tuy nhiên, hoạt động của oxytetracycline đã giảm theo thời gian. Các loại hoạt chất đồng cho thấy hiệu quả phòng trừ thấp hơn các loại hoạt chất kháng sinh ngoại trừ validamycin. Dựa trên kết quả thu được, nhóm tác giả cho rằng nên sử dụng các loại hoạt chất kháng sinh (kasugamycin, oxytetracycline và oxolinic acid) hơn là thuốc có hoạt chất đồng (copper hydroxide, copper oxychloride, copper sulfate) để kiểm soát

bệnh héo xanh do vi khuẩn *R. solanacearum* trên tiêu ở điều kiện ngoài đồng ruộng. Verma *et al.*, (2014) đã đánh giá khả năng kiểm soát ba dòng vi khuẩn *R. solanacearum* gây bệnh héo xanh được phân lập từ cà chua, cà tím và ớt bằng bốn loại hoạt chất: kasugamycin, streptomycin, ceftriaxone và gentamicin. Các dòng *R. solanacearum* khác nhau và độ nhạy với kháng sinh cho thấy phản ứng khác nhau. Sau khi cấy vi khuẩn và bổ sung nồng độ các hoạt chất vào các đĩa được ủ trong 24 giờ phần trăm ức chế đã được tính toán. Trong số các hoạt chất được thử nghiệm, gentamicin cho thấy hiệu quả kháng khuẩn mạnh, ức chế 100% đơn vị hình thành khuẩn lạc (CFU) ở nồng độ rất thấp (1 ppm), tiếp theo là Ceftriaxone ức chế >50% CFU ở (1 ppm) đối với cả ba dòng *R. solanacearum*. streptomycin ức chế >50% CFU ở (3 ppm), nhưng kasugamycin được ghi nhận ít kháng khuẩn hơn so với các hoạt chất đã được thử nghiệm.

4.3.2 Kết quả đánh giá khả năng phòng trị bệnh héo xanh trên cây hoa Cúc của thuốc hóa học trong điều kiện nhà lưới

Kết quả đánh giá 3 loại thuốc hóa học streptomycin + oxytetracycline , oxytetracycline hydrochloride + gentamicin sulphate, oxolinic acid đối với bệnh héo xanh trên cây hoa Cúc do vi khuẩn *R. solanacearum* được thể hiện qua phần trăm tỷ lệ bệnh và diện tích bên dưới đường cong tiến triển bệnh. Nhìn chung, các nghiệm thức có xử lý hoạt chất ở các thời điểm trước, sau và phun trước + sau khi lây bệnh đều có hiệu quả giảm bệnh có khác biệt ý nghĩa thống kê so với đối chứng.

Ở thời điểm 6 ngày sau khi lây bệnh (NSKLB) (Bảng 4.21), trung bình TLB của 3 nghiệm thức xử lý thuốc đều thể hiện tỉ lệ bệnh héo xanh trong khoảng 4,2-5,0%, thấp hơn khác biệt ý nghĩa so với đối chứng với TLB 15%. Giữa các thời điểm xử lý thì xử lý hoạt chất hóa học ở thời điểm trước lây bệnh, trước + sau khi lây bệnh có trung bình tỷ lệ bệnh tương đương nhau và thấp hơn so với xử lý sau sau khi lây bệnh (Bảng 4.21).

Bảng 4.21: Tỷ lệ (%) bệnh héo xanh trên cây hoa cúc do vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* của các nghiệm thức ở thời điểm 6 NSKLB

Tên Thuốc	Hoạt chất hóa học	Thời điểm xử lý hoạt chất			
		Trước	Sau	Trước + sau	TB (A)
Starner 20WP	Oxolinic acid	2,5 ^b	12,5 ^a	0,0 ^b	5,0 ^B
Miksabe 100WP	Streptomycin + oxytetracycline	0,0 ^b	12,5 ^a	0,0 ^b	4,2 ^B
Avalon 8WP	Oxytetracycline hydrochloride + gentamicin sulphate	0,0 ^b	15,0 ^a	0,0 ^b	5,0 ^B
Đối chứng		15,0 ^a	15,0 ^a	15,0 ^a	15,0 ^A
TB (B)		4,4 ^B	13,8 ^A	3,8 ^B	
Mức ý nghĩa		F(A)*, F(B)*, F(AxB)*			
CV (%)		44,52			

Chú thích: Các số trung bình trong một cột hay một hàng theo sau bởi một hay nhiều chữ cái giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức ý nghĩa 5% bằng phép thử Duncan. (*) Mức ý nghĩa 5%.

Tại thời điểm 10 NSKLB (Bảng 4.22), về trung bình tỷ lệ bệnh ở các nghiệm thức có xử lý hoạt chất khác biệt không ý nghĩa thống kê với nhau nhưng thấp hơn và khác biệt so với đối chứng. Thời điểm xử lý hoạt chất trước lây bệnh và trước + sau khi lây bệnh có trung bình tỷ lệ bệnh vẫn tương đương nhau và thấp hơn so với xử lý sau khi lây bệnh.

Bảng 4.22: Tỷ lệ (%) bệnh héo xanh trên cây hoa cúc do vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* của các nghiệm thức ở thời điểm 10 NSKLB

Tên Thuốc	Hoạt chất hóa học	Thời điểm xử lý hoạt chất			
		Trước	Sau	Trước + sau	TB (A)
Starner 20WP	Oxolinic acid	5,0	15,0	5,0	8,3 ^B
Miksabe 100WP	Streptomycin + oxytetracycline	5,0	12,5	0,0	5,8 ^B
Avalon 8WP	Oxytetracycline hydrochloride + gentamicin sulphate	2,5	15,0	0,0	5,8 ^B
Đối chứng		22,5	22,5	22,5	22,5 ^A
TB (B)		8,8 ^B	16,3 ^A	6,9 ^B	
Mức ý nghĩa		F(A)*, F(B)*, F(AxB) ^{ns}			
CV (%)		63,02			

Chú thích: Các số trung bình trong một cột hay một hàng theo sau bởi một hay nhiều chữ cái in hoa giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức ý nghĩa 5% bằng phép thử Duncan. (*) Mức ý nghĩa 5%; (ns) khác biệt không ý nghĩa thống kê.

Đến thời điểm 14, 18 và 22 NSKLB, tất cả các nghiệm thức đều đã xuất hiện bệnh, riêng đối chứng có tỷ lệ bệnh cao nhất, khác biệt ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức có xử lý hoạt chất hóa học, và giữa các nghiệm thức xử lý hoạt chất hóa học chưa có sự khác biệt ý nghĩa thống kê (số liệu không trình bày).

Đến thời điểm 26 NSKLB (Bảng 4.23), các nghiệm thức xử lý hoạt chất đều thể hiện tỉ lệ bệnh (TLB) thấp hơn và khác biệt so với đối chứng, trong đó nghiệm thức xử lý hoạt chất streptomycin + oxytetracycline và hoạt chất oxytetracycline hydrochloride + gentamicin sulphate có TLB tuần tự 13,3% và 14,2%, tương đương nhau, thấp hơn khác biệt ý nghĩa thống kê so với hoạt chất Oxolinic acid. Về thời điểm xử lý, tương tự thời điểm 10 NSKLB (Bảng 4.22) thời điểm xử lý hoạt chất trước lây bệnh và trước + sau khi lây bệnh có trung bình tỷ lệ bệnh tuần tự 25,6% và 23,1%, tương đương nhau và thấp hơn so với thời điểm xử lý sau khi lây bệnh với TLB 35,6%.

Bảng 4.23: Tỷ lệ (%) bệnh héo xanh trên cây hoa cúc do vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* của các nghiệm thức ở thời điểm 26 NSKLB

Tên Thuốc	Hoạt chất hóa học	Thời điểm xử lý hoạt chất			
		Trước	Sau	Trước + sau	TB (A)
Starner 20WP	Oxolinic acid	17,5	32,5	15,0	21,7 ^B
Miksabe 100WP	Streptomycin + oxytetracycline	12,5	20,0	7,5	13,3 ^C
Avalon 8WP	Oxytetracycline hydrochloride + gentamicin sulphate	7,5	30,0	5,0	14,2 ^C
Đối chứng		65,0	65,0	65,0	65,0 ^A
TB (B)		25,6 ^B	35,6 ^A	23,1 ^B	
Mức ý nghĩa		F(A)*, F(B)*, F(AxB) ^{ns}			
CV (%)		28,94			

Chú thích: Các số trung bình trong một cột hay một hàng theo sau bởi một hay nhiều chữ cái in hoa giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức ý nghĩa 5% bằng phép thử Duncan. (*) Mức ý nghĩa 5%; (ns) khác biệt không ý nghĩa thống kê.

Như vậy, đối với bệnh héo xanh, khi sử dụng hoạt chất hóa học, việc phòng bệnh có thể đạt hiệu quả tốt hơn là trị bệnh. Bởi bệnh có khả năng xâm nhập và định vị bên trong mạch dẫn của cây nên hạn chế hiệu quả của hoạt chất hóa học đối với việc trị bệnh.

Bảng 4.24: Chỉ số AUDPC do vi khuẩn *R. solanacearum* qua các thời điểm xử lý hoạt chất hoá học trong điều kiện nhà lưới

Tên Thuốc	Hoạt chất hóa học	Thời điểm xử lý hoạt chất			
		Trước	Sau	Trước + sau	TB (A)
Starner 20WP	Oxolinic acid	210,0	410,0	190,0	270,0 ^B
Miksabe 100WP	Streptomycin + oxytetracycline	165,0	315,0	55,0	178,3 ^B
Avalon 8WP	Oxytetracycline hydrochloride + gentamicin sulphate	95,0	420,0	60,0	191,7 ^B
Đối chứng		770,0	770,0	770,0	770,0 ^A
TB (B)		310,0 ^B	478,8 ^A	268,8 ^B	
Mức ý nghĩa		F(A)*, F(B)*, F(AxB) ^{ns}			
CV (%)		34,53			

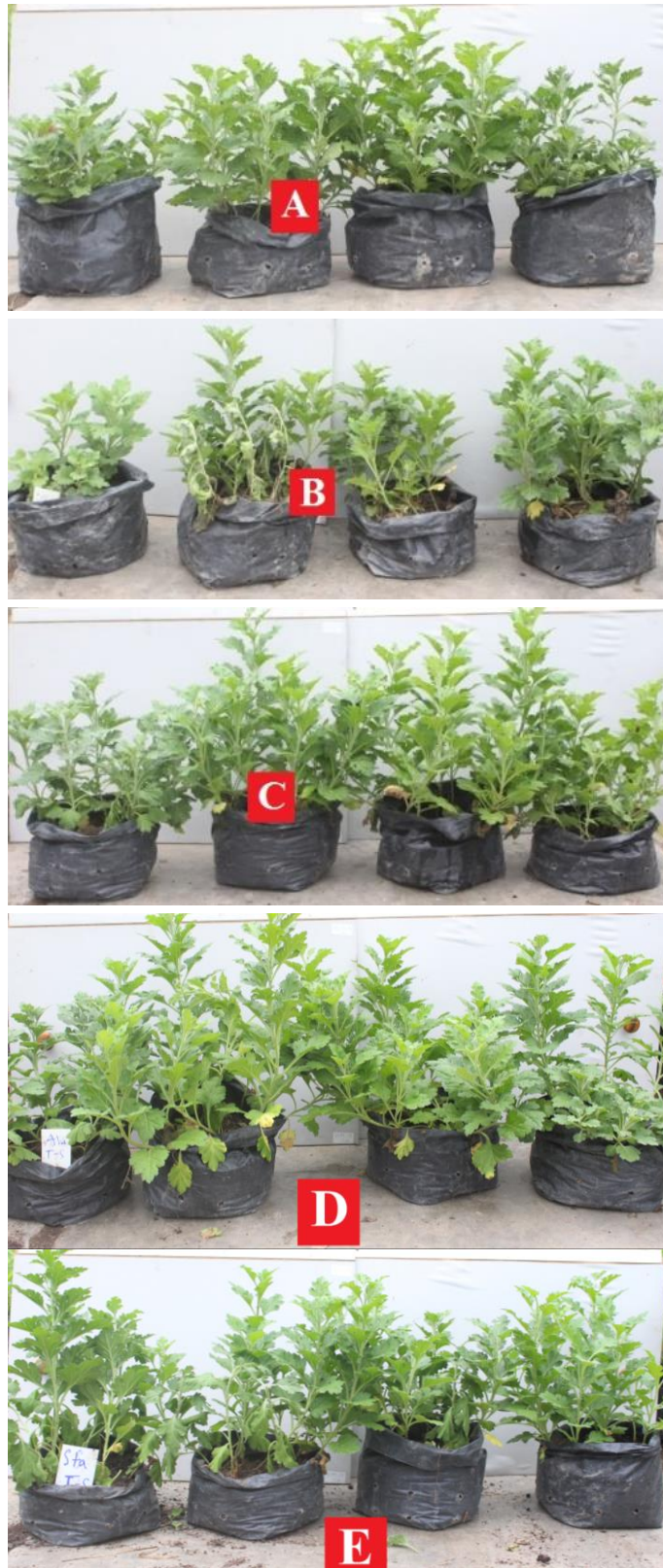
Chú thích: Các số trung bình trong một cột hay một hàng theo sau bởi một hay nhiều chữ cái in hoa giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức ý nghĩa 5% bằng phép thử Duncan. (*) Mức ý nghĩa 5%; (ns) khác biệt không ý nghĩa thống kê.

Về chỉ số AUDPC (Bảng 4.24) các nghiệm thức xử lý hoạt chất có AUDPC trong khoảng 178,3 – 270,0, thấp hơn và khác biệt ý nghĩa so với nghiệm thức đối chứng (770,0), và giữa các nghiệm thức thuốc hóa học không có sự khác biệt ý nghĩa với nhau. Về thời điểm xử lý hoạt chất, thì xử lý trước lây bệnh và xử lý thời điểm trước + sau lây bệnh có AUDPC tương tự 310,0 và 268,8 tương đương nhau và đều thấp hơn khác biệt ý nghĩa thống kê so với thời điểm xử lý sau (478,8).

Nhìn chung, qua các kết quả tỷ lệ bệnh, và chỉ số AUDPC cho thấy, ba loại thuốc hóa học được sử dụng đều có hiệu quả giảm bệnh héo xanh do vi khuẩn *R. solanacearum* so với đối chứng không xử lý. Riêng hoạt chất streptomycin + oxytetracycline và oxytetracycline hydrochloride + gentamicin sulphate có hiệu quả giảm bệnh cao hơn so với hoạt chất oxolinic acid trong việc phòng trừ bệnh héo xanh trên cây hoa Cúc. Bên cạnh đó, thời điểm xử lý cũng ảnh hưởng đến hiệu quả giảm bệnh, hoạt chất được xử lý trước khi lây bệnh 1 ngày hay cả thời điểm trước 1 ngày cùng với sau khi lây bệnh 5 ngày mang lại hiệu quả giảm bệnh tương đương nhau và cao hơn so với chỉ xử lý sau khi lây bệnh 5 ngày.

Tóm lại: Trong điều kiện phòng thí nghiệm, ba bộ hoạt chất streptomycin + oxytetracycline, oxytetracycline hydrochloride + gentamicin sulphate và oxolinic acid có tác dụng đối kháng cao với vi khuẩn *R. solanacearum* gây bệnh héo xanh trên cây hoa Cúc. Trong điều kiện nhà lưới, ba bộ hoạt chất này đều có tác dụng giảm bệnh héo xanh do vi khuẩn *R.*

solanacearum. Nghiệm thức xử lý streptomycin + oxytetracycline và oxytetracycline hydrochloride + gentamicin sulphate cho hiệu quả giảm bệnh tương đương nhau và cao hơn so với nghiệm thức xử lý axit oxolinic (Hình 4.15). Do đó, hai bộ hoạt chất này có thể được sử dụng nhằm tăng hiệu quả giảm bệnh ở điều kiện ngoài đồng. Bên cạnh đó, thời điểm xử lý các hoạt chất cũng ảnh hưởng đến hiệu quả giảm bệnh, hoạt chất được xử lý trước khi lây bệnh 1 ngày hay cả thời điểm trước 1 ngày kết hợp với sau khi lây bệnh 5 ngày đều đạt hiệu quả giảm bệnh tương đương nhau và cao hơn so với chỉ xử lý sau khi lây bệnh 5 ngày. Điều này làm cơ sở cho việc ứng dụng thuốc hóa học hiệu quả trong việc kiểm soát bệnh héo xanh trên Cúc trong những thí nghiệm tiếp theo ở điều kiện ngoài đồng. Tương tự, Yasufumi (1993) nghiên cứu về cơ chế tác động của oxolinic acid chống lại vi khuẩn *Pseudomonas glumae* gây bệnh thối cây con trên lúa. Kết quả ghi nhận axit oxolinic như một chất khử trùng hạt giống trong việc kiểm soát bệnh thối nhũn cây lúa do vi khuẩn *P. glumae* gây ra. Khi hạt được xử lý bằng axit oxolinic trước và sau khi ngâm hạt, quần thể vi khuẩn bị ức chế và hoạt chất này có hiệu quả cao trong việc kiểm soát dịch bệnh. Mặt khác, khi axit oxolinic được xử lý sau khi quá trình nảy mầm, quần thể vi khuẩn tăng lên nhiều như trên đối chứng không được xử lý, lúc này axit oxolinic đã không kiểm soát được vi khuẩn gây bệnh.



Hình 4.15: Hiệu quả giảm bệnh của nghiệm thức có sử dụng hoạt chất hóa học trong điều kiện nhà lưới. (A) Không lây bệnh nhân tạo; (B) Chỉ lây bệnh nhân tạo; (C) Xử lý (streptomycin + oxytetracycline); (D) Xử lý (oxytetracycline hydrochloride + gentamicin sulphate); (E) Xử lý (oxolinic acid) phun kết hợp trước và sau khi lây bệnh.

4.4 Nội dung 4: Đánh giá hiệu quả phòng trị của thực khuẩn thể được chọn đối với bệnh héo xanh do vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* trên cây hoa Cúc ở điều kiện ngoài đồng.

4.4.1 Kết quả đánh giá hiệu quả phòng trị của thực khuẩn thể đối với bệnh héo xanh trên cây hoa Cúc bị lây bệnh nhân tạo ở điều kiện ngoài đồng tại Cần Thơ.

Kết quả ghi nhận (Bảng 4.25) về tỉ lệ bệnh qua các thời điểm khảo sát cho thấy, ở thời điểm 9 NSKLB ba nghiệm thức có xử lý TKT đơn lẻ TKT ΦBT56 hay hỗn hợp TKT và nghiệm thức phối hợp TKT ΦBT56 cùng thuốc hóa học đều thể hiện hiệu quả phòng trừ bệnh với tỷ lệ bệnh lần lượt 1,7%, 3,3% và 2,5%, thấp hơn và khác biệt ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức đối chứng không xử lý với tỷ lệ bệnh 9,2%. Hai nghiệm thức còn lại là thuốc hóa học và thuốc hóa học kết hợp hỗn hợp 2 TKT với tỷ lệ bệnh lần lượt 4,2%, và 5,0% chưa thể hiện khác biệt so với nghiệm thức đối chứng không xử lý.

Đến thời điểm 29 NSKLB tất cả các nghiệm thức có xử lý TKT đơn lẻ hay hỗn hợp TKT, thuốc hóa học và nghiệm thức phối hợp TKT cùng thuốc hóa học đều thể hiện hiệu quả phòng trừ bệnh với tỷ lệ bệnh thấp hơn và khác biệt ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức đối chứng không xử lý. Tuy nhiên giữa các nghiệm thức vẫn khác biệt không ý nghĩa thống kê với nhau.

Đến thời điểm 49 NSKLB về sau, kết quả ghi nhận tỉ lệ bệnh (TLB) cho thấy tất cả các nghiệm thức có xử lý TKT đơn lẻ hay hỗn hợp TKT, thuốc hóa học và nghiệm thức phối hợp TKT cùng thuốc hóa học đều thể hiện hiệu quả phòng trừ bệnh với tỷ lệ bệnh thấp hơn và khác biệt ý nghĩa so với nghiệm thức đối chứng không xử lý. Trong đó, nghiệm thức xử lý đơn lẻ TKT ΦBT56 và nghiệm thức phối hợp thuốc hóa học với TKT ΦBT56 có tỷ lệ bệnh (lần lượt 6,7% và 5,8%) tương đương nhau và đều thấp hơn và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức còn lại (Hình 4.16).

Bảng 4.25: Tỷ lệ (%) bệnh héo xanh trên cây hoa Cúc của các nghiệm thức tại TP. Cần Thơ ở điều kiện có lây bệnh nhân tạo

Nghiệm thức	9 NSKLB	29 NSKLB	49 NSKLB	59 NSKLB	AUDPC
ĐC không lây bệnh	0,0 ^c	0,0 ^c	0,0 ^d	0,0 ^d	0,0 ^d
ĐC lây bệnh	9,2 ^a	15,0 ^a	30,8 ^a	36,7 ^a	1029,2 ^a
TKT ΦBT56	1,7 ^{bc}	4,2 ^b	6,7 ^c	7,5 ^c	245,8 ^c
Hỗn hợp 2 TKT	3,3 ^{bc}	7,5 ^b	13,3 ^b	15,8 ^b	470,8 ^b
Hóa học (Miksabe 100WP)	4,2 ^{ab}	6,7 ^b	11,7 ^b	15,0 ^b	437,5 ^b
Hóa học + TKT ΦBT56	2,5 ^{bc}	2,5 ^{bc}	5,8 ^c	8,3 ^c	220,8 ^c
Hóa học + Hỗn hợp 2 TKT	5,0 ^{ab}	6,7 ^b	11,7 ^b	14,2 ^b	437,5 ^b
Mức ý nghĩa	**	**	**	**	**
CV (%)	41,52	33,20	21,15	13,72	25,69

Chú thích: Trong cùng một cột, những số trung bình nghiệm thức được theo sau bởi một hoặc nhiều chữ giống nhau thì khác biệt không ý nghĩa thống kê theo phép thử Duncan. Mức ý nghĩa 1% (**). Số liệu % được chuyển sang $\arcsin\sqrt{x}$ trước khi phân tích thống kê. NSKLB (ngày sau khi lây bệnh); ĐC (đối chứng); AUDPC (chỉ số tích lũy bệnh theo thời gian); TKT (thực khuẩn thể). Thuốc hóa học được xử lý từ 29 NSKLB.

Qua chỉ số (AUDPC) (Bảng 4.25) nhận thấy tất cả các nghiệm thức có xử lý đều có hiệu quả giảm bệnh rõ rệt bởi chỉ số AUDPC của các nghiệm thức này dao động trong khoảng 220,8- 470,8 thấp hơn và khác biệt ý nghĩa so với đối chứng 1029,2. Trong đó, hai nghiệm thức xử lý đơn lẻ TKT ΦBT56 (245,8) và nghiệm thức phối hợp giữa thuốc hóa học với TKT ΦBT56 (220,8) có giá trị AUDPC thấp nhất và khác biệt ý nghĩa so với các nghiệm thức còn lại.

Kết quả ghi nhận (Bảng 4.26) về trung bình cấp bệnh qua các thời điểm khảo sát cho thấy, ở thời điểm 9 NSKLB tất cả các nghiệm thức có xử lý TKT đơn lẻ hay hỗn hợp thực khuẩn thể, thuốc hóa học và nghiệm thức phối hợp TKT cùng thuốc hóa học đều thể hiện hiệu quả phòng trừ bệnh với trung bình cấp bệnh dao động (từ 0,05 đến 0,15) và thấp hơn và khác biệt ý nghĩa so với nghiệm thức đối chứng không xử lý (0,28).

Ở thời điểm 29 NSKLB tất cả các nghiệm thức đều thể hiện hiệu quả phòng trừ bệnh với trung bình cấp bệnh dao động (từ 0,12 đến 0,33) thấp hơn và khác biệt ý nghĩa so với nghiệm thức đối chứng không xử lý (0,63).

Đến thời điểm 49 NSKLB về sau, kết quả ghi nhận trung bình cấp bệnh cho thấy tất cả các nghiệm thức có xử lý TKT đơn lẻ hay hỗn hợp TKT, thuốc hóa học và nghiệm thức phối hợp TKT cùng thuốc hóa học đều thể hiện hiệu quả phòng trừ bệnh với trung bình cấp bệnh thấp hơn và khác biệt ý nghĩa so với nghiệm thức đối chứng không xử lý. Trong đó, nghiệm thức xử lý đơn lẻ TKT ΦBT56 và nghiệm thức phối hợp thuốc hóa học với TKT ΦBT56 có trung bình cấp bệnh (lần lượt 0,25 và 0,27) tương đương nhau và đều thấp hơn và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức còn lại (Hình 4.16).

Bảng 4.26: Trung bình cấp bệnh héo xanh trên cây hoa Cúc của các nghiệm thức tại TP. Cần Thơ ở điều kiện có lây bệnh nhân tạo

Nghiệm thức	9 NSKLB	29 NSKLB	49 NSKLB	59 NSKLB
ĐC không lây bệnh	0,00 ^c	0,00 ^c	0,00 ^d	0,00 ^d
ĐC lây bệnh	0,28 ^a	0,63 ^a	1,28 ^a	1,71 ^a
TKT ΦBT56	0,05 ^{bc}	0,15 ^{bc}	0,25 ^c	0,34 ^c
Hỗn hợp 2 TKT	0,08 ^{bc}	0,33 ^b	0,60 ^b	0,73 ^b
Hóa học (Miksabe 100WP)	0,12 ^{bc}	0,27 ^b	0,52 ^b	0,66 ^b
Hóa học + TKT ΦBT56	0,08 ^{bc}	0,12 ^{bc}	0,27 ^c	0,40 ^c
Hóa học + Hỗn hợp 2 TKT	0,15 ^b	0,27 ^b	0,54 ^b	0,65 ^b
Mức ý nghĩa	**	**	**	**
CV (%)	75,37	56,46	27,21	21,74

Chú thích: Trong cùng một cột, những số trung bình nghiệm thức được theo sau bởi một hoặc nhiều chữ giống nhau thì khác biệt không ý nghĩa thống kê theo phép thử Duncan. Mức ý nghĩa 1% (**). NSKLB (ngày sau khi lây bệnh); ĐC (đối chứng); TKT (thực khuẩn thể). Thuốc hóa học được xử lý từ 29 NSKLB.

Từ kết quả (Bảng 4.27) hiệu quả giảm bệnh cho thấy ở thời điểm 9NSKLB, ở tất cả các nghiệm thức có xử lý biện pháp phòng trừ vi khuẩn *R. solanacearum* đều có hiệu quả giảm bệnh cao và dao động (từ 45,8% đến 79,2%) so với nghiệm thức đối chứng có lây bệnh. Trong đó, nghiệm thức xử lý TKT ΦBT56 cho hiệu quả cao nhất đạt (79,2%) nhưng không khác biệt ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức còn lại.

Ở thời điểm 29NSKLB, ở tất cả các nghiệm thức có xử lý biện pháp phòng trừ vi khuẩn *R. solanacearum* đều có hiệu quả giảm bệnh cao và dao động (từ 47,9% đến 81,3%) so với nghiệm thức đối chứng có lây bệnh. Trong đó, nghiệm thức xử lý TKT ΦBT56 kết hợp với thuốc hóa học cho hiệu quả cao nhất đạt (81,3%) nhưng không khác biệt ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức còn lại.

Đến thời điểm 49 NSKLB, ở nghiệm thức xử lý TKT ΦBT56 và nghiệm thức phối hợp giữa biện pháp hóa học với TKT ΦBT56 có hiệu quả giảm bệnh lần lượt là 83,4% và 81,1%, thể hiện cao hơn và khác biệt ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức còn lại.

Đến thời điểm 59 NSKLB, ở các nghiệm thức có xử lý biện pháp phòng trừ vi khuẩn *R. solanacearum* đều có hiệu quả giảm bệnh cao hơn 50% so với nghiệm thức đối chứng có lây bệnh. Trong đó, hai nghiệm thức xử lý thực khuẩn thể ΦBT56 và nghiệm thức phối hợp giữa biện pháp hóa học với TKT ΦBT56 có hiệu quả giảm bệnh cao nhất lần lượt là 79,6% và 77,5%, thể hiện cao hơn và khác biệt ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức còn lại.

Bảng 4.27: Hiệu quả giảm bệnh héo xanh trên cây hoa Cúc của các nghiệm thức tại TP. Cần Thơ ở điều kiện có lây bệnh nhân tạo

Nghiệm thức	9NSKLB	29NSKLB	49NSKLB	59NSKLB
Đối chứng lây bệnh	00,0 ^b	00,0 ^b	00,0 ^c	00,0 ^c
TKT ΦBT56	79,2 ^a	70,8 ^a	83,4 ^a	79,6 ^a
Hỗn hợp 2 TKT	66,7 ^a	47,9 ^a	56,7 ^b	56,7 ^b
Hóa học (Miksabe 100WP)	58,3 ^a	56,3 ^a	61,9 ^b	58,8 ^b
Hóa học + TKT ΦBT56	70,8 ^a	81,3 ^a	81,1 ^a	77,5 ^a
Hóa học + Hỗn hợp 2 TKT	45,8 ^a	54,2 ^a	61,7 ^b	61,3 ^b
Mức ý nghĩa	*	**	**	**
CV. %	55,83	43,25	18,38	14,83

Chú thích: Trong cùng một cột, những số trung bình nghiệm thức được theo sau bởi một hoặc nhiều chữ giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê theo phép thử Duncan. Mức ý nghĩa 5%(*). Mức ý nghĩa 1% (**). Số liệu % được chuyển sang $\arcsin\sqrt{x}$ trước khi phân tích thống kê. NSKLB (ngày sau khi lây bệnh); ĐC (đối chứng); TKT (thực khuẩn thể). Thuốc hóa học được xử lý từ 29 NSKLB.

Từ kết quả (Bảng 4.27) cho thấy, khi so sánh giữa hai nghiệm thức chỉ xử lý thực khuẩn thể để quản lý bệnh héo xanh do vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* gây ra thì nghiệm thức xử lý đơn TKT ΦBT56 thể hiện hiệu quả giảm bệnh cao hơn so với nghiệm thức xử lý hỗn hợp TKT qua các thời điểm khảo sát. Ngoài ra nghiệm thức xử lý TKT đơn ΦBT56 hay hỗn hợp TKT thể hiện tỉ lệ bệnh, cấp bệnh và hiệu quả giảm bệnh tương đương với nghiệm thức phối hợp giữa TKT với thuốc hóa học.

Nhìn chung, trong thí nghiệm ở điều kiện không có áp lực mầm bệnh cao và nguồn bệnh được lây nhiễm nhân tạo vào cây hoa Cúc, nhận thấy các nghiệm thức có xử lý TKT ΦBT56 và hỗn hợp hai TKT (ΦBT56 + ΦBT67) ở mật số 10^8 PFU/mL, hay xử lý thuốc hóa học với hoạt chất (streptomycin + oxytetracycline) đơn lẻ định kỳ 10 ngày/lần với liều lượng 0,05g/50mL nước (Bảng 3.1), hoặc các nghiệm thức xử lý phối hợp giữa TKT với thuốc hóa học khi cần thiết đều thể hiện hiệu quả giảm bệnh hơn 50% đối với bệnh héo xanh do vi khuẩn *R. solanacearum* ở điều kiện ngoài đồng. Trong đó, nghiệm thức xử lý thực khuẩn thể đơn ΦBT56 có hiệu quả giảm bệnh héo xanh trên cây hoa Cúc (79,6%) cao hơn so với xử lý hỗn hợp thực khuẩn thể (56,7%) và cao hơn nghiệm thức xử lý đơn lẻ thuốc hóa học (58,8%). Tuy nhiên, khi phối hợp thuốc hóa học với thực khuẩn thể ΦBT56 thì hiệu quả giảm bệnh (77,5%) vẫn chỉ tương đương với sử dụng đơn lẻ thực khuẩn thể ΦBT56. Như vậy, trong thí nghiệm này việc áp dụng thuốc hóa học đã không làm tăng hiệu quả giảm bệnh so với sử dụng đơn thuần TKT. Qua kết quả này cho thấy, việc áp dụng TKT định kỳ 10 ngày/lần sẽ mang lại hiệu quả giảm bệnh cao hơn nghiệm thức thuốc hóa học và việc xử lý bổ sung thêm thuốc hóa học sẽ không có tác dụng gia tăng hiệu quả giảm bệnh. Do đó khi áp lực mầm bệnh trên ruộng thấp

chỉ cần xử lý TKT định kỳ 10 ngày/ lần để làm giảm mật số của vi khuẩn gây bệnh mà không cần bổ sung thêm thuốc hóa học.

Như vậy, TKT có thể được sử dụng để phòng trừ bệnh héo xanh do vi khuẩn *R. solanacearum* bằng cách xử lý định kỳ 10 ngày/ lần để TKT làm giảm mật số của vi khuẩn gây bệnh và hạn chế khả năng xâm nhiễm, phát sinh phát triển của bệnh héo xanh do vi khuẩn *R. solanacearum*. Vì thế, có thể xử lý TKT trên ruộng trồng cây hoa Cúc để quản lý bệnh héo xanh và chỉ phối hợp thuốc hóa học với TKT để xử lý khi áp lực mầm bệnh trên ruộng cao, nhằm tăng hiệu quả giảm bệnh héo xanh.



Hình 4.16: Bệnh héo xanh do vi khuẩn *R. solanacearum* trên cây hoa Cúc ở điều kiện ngoài đồng tại Cần Thơ ở thời điểm 49 NSKLB. (NT 2: Đối chứng có lây bệnh; NT 3: Xử lý TKT $\Phi BT56$ (10^8 PFU/mL))

4.4.2 Kết quả đánh giá hiệu quả phòng trị của thực khuẩn thể đối với bệnh héo xanh trên cây hoa Cúc bị lây bệnh nhân tạo ở điều kiện ngoài đồng tại tỉnh Đồng Tháp.

Thí nghiệm này được thực hiện ở địa điểm có áp lực nguồn bệnh cao (xã Tân Khánh Đông, thành phố Sa Đéc, tỉnh Đồng Tháp) do sự thâm canh liên tục của bà con nông dân và việc sử dụng lại giá thể trồng cũ của vụ trước. Ngoài ra ruộng thí nghiệm còn được lây bệnh nhân tạo bằng hỗn hợp vi khuẩn *R. solanacearum* có độ độc cao, vì thế tỷ lệ bệnh và cấp bệnh ở các nghiệm thức cao, riêng ở nghiệm thức đối chứng không xử lý vi khuẩn gây bệnh cũng thể hiện bệnh. Thuốc hóa học được xử lý ngay ở lần lấy chỉ tiêu đầu tiên bởi tỷ lệ cây bệnh ở nghiệm thức đối chứng đã cao hơn 10%.

Kết quả (Bảng 4.28 và Bảng 4.29) qua các thời điểm khảo sát cho thấy, tất cả các nghiệm thức có xử lý các biện pháp phòng trừ đều có tỷ lệ bệnh, trung bình cấp bệnh cao hơn so với nghiệm thức không lây bệnh nhân tạo, nhưng lại thấp hơn và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức đối chứng chỉ lây bệnh bằng vi khuẩn. Tỷ lệ bệnh và trung bình cấp bệnh ở tất cả các nghiệm

thức trong thí nghiệm tăng dần sau những ngày theo dõi, tăng nhanh nhất ở nghiệm thức đối chứng chỉ xử lý vi khuẩn *R. solanacearum* và chậm hơn ở các nghiệm thức có xử lý các biện pháp phòng trừ, riêng nghiệm thức không xử lý vi khuẩn thì có tốc độ tăng rất chậm.

Ở thời điểm 16 NSKLB, nghiệm thức đối chứng chỉ xử lý vi khuẩn *R. solanacearum* có tỷ lệ bệnh (42,5 %) và trung bình cấp bệnh (1,22) cao nhất. Còn các nghiệm thức xử lý TKT hoặc thuốc hóa học thì tỷ lệ bệnh và trung bình cấp bệnh thấp hơn rất nhiều so với nghiệm thức đối chứng chỉ xử lý bệnh. Trong đó, nghiệm thức phối hợp thuốc hóa học với TKT ΦBT56 có tỷ lệ bệnh thấp nhất (5,8%) và nghiệm thức phối hợp thuốc hóa học với hỗn hợp TKT có tỷ lệ bệnh (8,3%) tương đương với nghiệm thức đối chứng không xử lý vi khuẩn gây bệnh (6,7%) và khác biệt ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức còn lại.

Ở thời điểm 36 NSKLB, nghiệm thức đối chứng chỉ xử lý vi khuẩn có tỷ lệ bệnh tăng lên (65,8%) và trung bình cấp bệnh cũng tăng lên (3,23) cao nhất. Lúc này, nghiệm thức phối hợp thuốc hóa học với TKT ΦBT56 vẫn có tỷ lệ bệnh thấp nhất (18,3%) và nghiệm thức xử lý đơn TKT ΦBT56 có tỷ lệ bệnh (23,3%) tương đương với nghiệm thức đối chứng không xử lý vi khuẩn gây bệnh (13,3%) và khác biệt ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức còn lại.

Đến thời điểm 56 NSKLB, nghiệm thức đối chứng chỉ xử lý vi khuẩn có tỷ lệ bệnh (71,7%) và trung bình cấp bệnh (3,53) cao nhất. Còn các nghiệm thức xử lý TKT hoặc thuốc hóa học thì tỷ lệ bệnh và trung bình cấp bệnh thấp hơn rất nhiều so với nghiệm thức đối chứng chỉ xử lý bệnh. Trong đó, nghiệm thức phối hợp thuốc hóa học với TKT ΦBT56 có tỷ lệ bệnh thấp nhất (20,8%), tương đương với nghiệm thức đối chứng không xử lý vi khuẩn gây bệnh (15,0%) và khác biệt ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức khác. Kế tiếp là nghiệm thức xử lý đơn TKT ΦBT56 (30,0%), nhưng không có sự khác biệt ý nghĩa thống kê với nghiệm thức xử lý thuốc hóa học (35,8%) và nghiệm thức xử lý phối hợp thuốc hóa học với hỗn hợp TKT ΦBT56 và ΦBT67 (35,0%).

Qua chỉ số (AUDPC) và tỉ lệ bệnh (Bảng 4.28) ở thời điểm 16 NSKLB, 36 NSKLB hay 56 NSKLB, tất cả các nghiệm thức có xử lý các biện pháp phòng trừ đều có tỉ lệ bệnh thấp hơn và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức đối chứng chỉ lây bệnh bằng vi khuẩn. Trong đó, khi xử lý đơn lẻ TKT ΦBT56 thể hiện hiệu quả tương đương với thuốc hóa học và cao hơn xử lý hỗn hợp hai TKT. Điều này dẫn đến khi sử dụng kết hợp giữa thuốc hóa học và thực khuẩn thể ΦBT56 mang lại hiệu quả cao hơn nghiệm thức TKT

ΦBT56 đơn lẻ, nghiệm thức thuốc hóa học đơn lẻ và nghiệm thức hóa học + hỗn hợp hai TKT.

Bảng 4.28: Tỷ lệ (%) bệnh héo xanh của cây hoa Cúc ở các nghiệm thức ngoài đồng tại tỉnh Đồng Tháp trong điều kiện có lây bệnh nhân tạo với 3 dòng vi khuẩn *R. solanacearum*

Nghiệm thức	16NSKLB	36NSKLB	56NSKLB	AUDPC
Không xử lý	6,7 ^{cd}	13,3 ^e	15,0 ^d	541,7 ^d
Xử lý vi khuẩn	42,5 ^a	65,8 ^a	71,7 ^a	2687,5 ^a
TKT ΦBT56	11,7 ^{bc}	23,3 ^{cde}	30,0 ^c	954,2 ^c
Hỗn hợp 2 TKT	15,8 ^b	37,5 ^b	43,3 ^b	1445,8 ^b
Hóa học (Miksabe 100WP)	11,7 ^{bc}	30,0 ^{bcd}	35,8 ^{bc}	1154,2 ^c
Hóa học + TKT ΦBT56	5,8 ^d	18,3 ^{de}	20,8 ^d	666,7 ^d
Hóa học + Hỗn hợp 2 TKT	8,3 ^{cd}	29,2 ^{bc}	35,0 ^{bc}	1066,7 ^c
Mức ý nghĩa	**	**	**	**
CV. (%)	15,71	15,89	11,31	15,37

Chú thích: Trong cùng một cột, những số trung bình nghiệm thức được theo sau bởi một hoặc nhiều chữ giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê theo phép thử Duncan. Mức ý nghĩa 1% (**). Số liệu % được chuyển sang $\arcsin\sqrt{x}$ trước khi phân tích thống kê. NSKLB (ngày sau khi lây bệnh); AUDPC (chỉ số tích lũy bệnh theo thời gian); TKT (thực khuẩn thể).

Bảng 4.29: Trung bình cấp bệnh héo xanh của cây hoa Cúc ở các nghiệm thức ngoài đồng tại tỉnh Đồng Tháp trong điều kiện có lây bệnh nhân tạo với 3 dòng vi khuẩn *Ralstonia solanacearum*

Nghiệm thức	16NSKLB	36NSKLB	56NSKLB
Không xử lý	0,16 ^c	0,63 ^d	0,75 ^e
Xử lý vi khuẩn	1,22 ^a	3,23 ^a	3,53 ^a
TKT ΦBT56	0,40 ^{bc}	1,08 ^{bcd}	1,49 ^{cd}
Hỗn hợp 2 TKT	0,53 ^b	1,70 ^b	2,17 ^b
Hóa học (Miksabe 100WP)	0,35 ^{bc}	1,50 ^{bc}	1,74 ^{bc}
Hóa học + TKT ΦBT56	0,15 ^c	0,88 ^{cd}	1,02 ^{de}
Hóa học + Hỗn hợp 2 TKT	0,18 ^c	1,59 ^{bc}	1,75 ^{bc}
Mức ý nghĩa	**	**	**
CV. (%)	36,76	29,48	18,04

Chú thích: Trong cùng một cột, những số trung bình nghiệm thức được theo sau bởi một hoặc nhiều chữ giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê theo phép thử Duncan. Mức ý nghĩa 1% (**). NSKLB (ngày sau khi lây bệnh); TKT (thực khuẩn thể).

Về hiệu quả giảm bệnh (Bảng 4.30) cho thấy ở thời điểm 16 NSKLB và 36 NSKLB, các nghiệm thức có xử lý biện pháp phòng trừ đều có hiệu quả giảm bệnh héo xanh trên 40%. Trong đó, hiệu quả giảm bệnh cao nhất ở nghiệm thức phối hợp biện pháp hóa học với TKT ΦBT56 với (86,2% - 16 NSKLB) và (72,1% - 36 NSKLB) và khác biệt ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức còn lại.

Đến thời điểm 56 NSKLB, các nghiệm thức có xử lý biện pháp phòng trừ đều có hiệu quả giảm bệnh héo xanh dao động từ (39,4% đến 71,3%). Hiệu quả giảm bệnh cao nhất vẫn ở nghiệm thức phối hợp biện pháp hóa học với TKT ΦBT56 với 71,3%, kế tiếp là nghiệm thức xử lý TKT đơn ΦBT56 (58%), nghiệm thức xử lý kết hợp thuốc hóa học với hỗn hợp TKT (51,5%), nghiệm thức xử lý thuốc hóa học đơn lẻ (50,0%) cũng có hiệu quả giảm bệnh cao. Như vậy, TKT có thể được sử dụng để phòng trừ bệnh héo xanh do vi khuẩn *R. solanacearum* bằng cách xử lý giá thể trước và sau khi trồng cây với định kỳ 10 ngày để TKT làm giảm mật số của vi khuẩn gây bệnh trong giá thể và hạn chế khả năng xâm nhiễm, phát sinh phát triển của bệnh héo xanh do vi khuẩn *R. solanacearum* gây ra. So sánh giữa các nghiệm thức chỉ xử lý TKT nhận thấy rằng khi xử lý đơn TKT ΦBT56 có hiệu quả cao hơn so với xử lý hỗn hợp TKT. Nhìn chung, hai nghiệm thức xử lý phối hợp TKT và biện pháp hóa học có hiệu quả giảm bệnh cao hơn xử lý đơn. Vì thế, có thể xử lý TKT phối hợp với biện pháp hóa học để nhằm tăng hiệu quả giảm bệnh héo xanh khi áp lực mầm bệnh ở điều kiện ngoài đồng cao.

Bảng 4.30: Hiệu quả giảm bệnh héo xanh của thực khuẩn thể và thuốc hóa học trên cây hoa Cúc ở các nghiệm thức ngoài đồng tại tỉnh Đồng Tháp trong điều kiện có lây bệnh nhân tạo với 3 dòng vi khuẩn *Ralstonia solanacearum*

Nghiệm thức	16NSKLB	36NSKLB	56NSKLB
Xử lý vi khuẩn	00,0 ^d	00,0 ^c	00,0 ^d
TKT ΦBT56	79,9 ^{bc}	64,4 ^{ab}	58,0 ^b
Hỗn hợp 2 TKT	62,4 ^c	43,3 ^b	39,4 ^c
Hóa học (Miksabe 100WP)	72,4 ^{bc}	54,2 ^{ab}	50,0 ^{bc}
Hóa học + TKT ΦBT56	86,2 ^a	72,1 ^a	71,3 ^a
Hóa học + Hỗn hợp 2 TKT	80,5 ^{ab}	55,8 ^{ab}	51,5 ^{bc}
Mức ý nghĩa	**	**	**
CV. (%)	8,13	24,20	17,10

Chú thích: Trong cùng một cột, những số trung bình nghiệm thức được theo sau bởi một hoặc nhiều chữ giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê theo phép thử Duncan. Mức ý nghĩa 1% (**). Số liệu % được chuyển sang $\arcsin\sqrt{x}$ trước khi phân tích thống kê. NSKLB (ngày sau khi lây bệnh); TKT (thực khuẩn thể).

Kết quả tương tự cũng được ghi nhận trong nghiên cứu về ứng dụng của TKT để kiểm soát mầm bệnh như: Trân và *ctv.*, (2016) đã phân lập và đánh giá hiệu quả của TKT trong việc phòng trừ bệnh cháy lá do vi khuẩn *Xanthomonas* sp. trên cây hành lá (*Allium fistulosum* L.). Kết quả ghi nhận trong điều kiện nhà lưới, áp dụng các dòng TKT Φ31, Φ16, Φ17A đơn lẻ và hỗn hợp 3 dòng TKT ở mật số 10^8 PFU/mL, tất cả các nghiệm thức có xử lý TKT và thuốc Starner đều cho hiệu quả phòng trị bệnh. Trong đó, nghiệm thức

xử lý với dòng TKT đơn Φ31 cho hiệu quả cao hơn các dòng TKT Φ16, Φ17A và hỗn hợp của 3 dòng TKT. Nghiệm thức xử lý hỗn hợp của 3 dòng TKT cho hiệu quả phòng trị bệnh thấp nhất. Tương tự, An và *ctv.*, (2017) đã phân lập và tuyển chọn các dòng TKT trong phòng trừ bệnh héo xanh trên cây hoa vạn thọ (*Tagetes papula* L.) do vi khuẩn *R. solanacearum* Smith. Kết quả ghi nhận trong điều kiện nhà lưới, áp dụng các dòng TKT ΦCT18, ΦĐT3, ΦĐT4 đơn lẻ và 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 tất cả các nghiệm thức xử lý TKT và thuốc Starner đều cho hiệu quả phòng trị bệnh, trong đó nghiệm thức dòng TKT đơn ΦĐT4 cho hiệu quả phòng trị cao nhất.

Ở điều kiện ngoài đồng với áp lực mầm bệnh cao, để kiểm soát bệnh héo xanh do vi khuẩn *R. solanacearum* đạt hiệu quả, nên phối hợp giữa TKT và thuốc hóa học. Bởi vì, khi vi khuẩn *R. solanacearum* đã xâm nhiễm vào bên trong rễ sau đó lan tới các bó mạch dẫn xylem, sản sinh ra các men pectinaza và cellulaza để phân hủy mô, sinh ra các độc tố ở dạng exopolysaccarit (EPS) và lipopolysaccarit (LPS) làm tắc nghẽn mạch dẫn cản trở sự vận chuyển nước và nhựa trong cây, dẫn tới cây héo nhanh chóng (Cook, Sequeira, 1991 trích dẫn bởi Mân, 2007). Do đó, khi cây đã bị bệnh TKT ít có hiệu quả trong việc hạn chế bệnh, nên việc áp dụng thêm thuốc hóa học có hoạt chất (streptomycin + oxytetracycline) góp phần tăng hiệu quả trị bệnh vì thuốc có khả năng lưu dẫn. Do đó áp dụng thuốc hóa học là cần thiết ở thời điểm thích hợp để tăng hiệu quả phòng trừ bệnh héo xanh do vi khuẩn *R. solanacearum* trên Cúc. Mặt khác, TKT ít hoặc không bị ảnh hưởng bởi các nông dược, chúng có thể kết hợp với nhiều hóa chất bảo vệ thực vật mà không làm giảm hiệu quả (Balogh *et al.*, 2008). Ngoài ra, TKT có thể được sử dụng kết hợp với thuốc kháng sinh khác làm giảm sự phát triển của vi khuẩn kháng thuốc (Kutter, 1997 trích dẫn bởi Jones *et al.*, 2007).

Tóm lại: Tất cả các nghiệm thức có xử lý các biện pháp phòng trừ đều có hiệu quả giảm bệnh đối với bệnh héo xanh do vi khuẩn *R. solanacearum* gây ra trên cây hoa Cúc ở điều kiện ngoài đồng (có lây bệnh nhân tạo), nghiệm thức xử lý TKT đơn ΦBT56 có hiệu quả giảm bệnh héo xanh trên cây hoa Cúc cao hơn so với xử lý hỗn hợp TKT. Nghiệm thức phối hợp biện pháp hóa học có hoạt chất streptomycin và oxytetracycline với TKT ΦBT56 có hiệu quả giảm bệnh héo xanh trên cây hoa Cúc cao hơn nghiệm thức xử lý đơn TKT và nghiệm thức chỉ xử lý đơn thuốc hóa học. Vì thế, ở điều kiện ngoài đồng với áp lực mầm bệnh cao có thể xử lý TKT phối hợp với biện pháp hóa học, nhằm tăng hiệu quả giảm bệnh héo xanh trên cây hoa Cúc. Kết quả này cho ta một hướng đi mới trong việc sử dụng kết hợp biện pháp sinh học và hóa học trong

việc kiểm soát bệnh khi cần thiết (khi áp lực mầm bệnh trên ruộng cao) (Hình 4.17)



Hình 4.17: Ảnh hưởng của xử lý TKT và thuốc hoá học trên cây hoa Cúc bị lây bệnh nhân tạo vào thời điểm 56 ngày sau khi lây bệnh ở điều kiện ngoài đồng tại tỉnh Đồng Tháp (1. không xử lý thực khuẩn thể và không lây bệnh nhân tạo; 2. chỉ lây bệnh nhân tạo (phối hợp 3 dòng vi khuẩn: DT9, BT176, TG189); 3 – 7: lây bệnh bằng vi khuẩn và tương ứng xử lý với TKT Φ BT56; hỗn hợp 2 thực khuẩn thể (Φ BT56 và Φ BT67); thuốc trừ vi khuẩn (Miksabe 100WP); kết hợp Φ BT56 và thuốc trừ vi khuẩn (Miksabe 100WP); kết hợp hỗn hợp 2 thực khuẩn thể (Φ BT56 và Φ BT67) và thuốc trừ vi khuẩn (Miksabe 100WP) theo định kỳ 10 ngày/lần).

4.4.3 Kết quả đánh giá hiệu quả phòng trị của thực khuẩn thể đối với bệnh héo xanh trên cây hoa Cúc bị nhiễm bệnh tự nhiên ở điều kiện ngoài đồng tại tỉnh Đồng Tháp.

Thí nghiệm được thực hiện ở địa điểm có áp lực nguồn bệnh (xã Tân Khánh Đông, thành phố Sa Đéc, tỉnh Đồng Tháp) bởi sự thâm canh của bà con nông dân nhưng các nghiệm thức không được lây bệnh nhân tạo mà dựa vào sự nhiễm bệnh tự nhiên, thuốc hóa học được xử lý ở thời điểm 31 NSKT (Ngày sau khi trồng) bởi tỷ lệ cây bệnh ở nghiệm thức đối chứng đã cao hơn 10% và xử lý cách mỗi 10 ngày/ lần và tổng cộng là xử lý 7 lần.

Từ kết quả (Bảng 4.31) ở thời điểm 41 NSKT, tỷ lệ bệnh của tất cả các nghiệm thức có xử lý TKT và thuốc hóa học đều thấp hơn và khác biệt ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức đối chứng (11,7%) và nghiệm thức nông dân (10,0%). Trong đó, hai nghiệm thức phối hợp TKT đơn Φ BT56 với thuốc hóa học và phối hợp hỗn hợp 2 TKT với thuốc hóa học đều (0,0%) cho tỉ lệ bệnh thấp hơn và khác biệt ý nghĩa so với các nghiệm thức sử dụng TKT Φ BT56 (3,3%) hay thuốc hóa học đơn lẻ (4,2%). Tuy nhiên, nghiệm thức TKT đơn Φ BT56 (3,3%) và hỗn hợp 2 TKT (2,5%) tương đương nhau. Nghiệm thức chỉ

xử lý thuốc hóa học có tỷ lệ bệnh (4,2%) cao hơn so với bốn nghiệm thức có xử lý còn lại.

Đến thời điểm 51 NSKT, tỷ lệ bệnh của tất cả các nghiệm thức có xử lý TKT và thuốc hóa học đều thấp hơn và khác biệt ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức đối chứng (15,8%) và nghiệm thức nông dân (10,8%). Trong đó, nghiệm thức TKT đơn ΦBT56 (4,2%) và hỗn hợp 2 TKT (3,3%) tiếp tục tương đương nhau và khác biệt không ý nghĩa thống kê với nghiệm thức phối hợp TKT đơn ΦBT56 với thuốc hóa học (0,8%) và phối hợp hỗn hợp 2 TKT với thuốc hóa học (0,8%). Nghiệm thức chỉ xử lý thuốc hóa học (7,5%) vẫn có tỷ lệ bệnh cao hơn so với bốn nghiệm thức có xử lý còn lại.

Tương tự, ở thời điểm 81 và 91 NSKT, tỷ lệ bệnh của tất cả các nghiệm thức có xử lý TKT và thuốc hóa học đều thấp hơn và khác biệt ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức đối chứng và nghiệm thức nông dân. Trong đó, nghiệm thức TKT đơn ΦBT56 (5,8%) và hỗn hợp 2 TKT (4,2%) tiếp tục tương đương nhau và khác biệt không ý nghĩa thống kê với nghiệm thức phối hợp TKT đơn ΦBT56 với thuốc hóa học (3,3%) và phối hợp hỗn hợp 2 TKT với thuốc hóa học (4,2%). Nghiệm thức chỉ xử lý thuốc hóa học (9,2%) vẫn có tỷ lệ bệnh cao hơn so với bốn nghiệm thức có xử lý còn lại.

Về chỉ số (AUDPC), tất cả các nghiệm thức có xử lý có AUDPC dao động (108,3 - 475,0) đều thấp hơn và khác biệt ý nghĩa so với nghiệm thức đối chứng (1170,8) và nông dân (858,3). Nghiệm thức TKT đơn ΦBT56 (312,5) và hỗn hợp 2 TKT (233,3) tương đương nhau. Khi so sánh giữa nghiệm thức hỗn hợp 2 TKT và hỗn hợp 2 TKT với thuốc hóa học có AUDPC lần lượt là (233,3 và 145,8) khác biệt không ý nghĩa thống kê với nhau. Nghiệm thức chỉ xử lý thuốc hóa học (475,0) có AUDPC cao hơn so với bốn nghiệm thức có xử lý còn lại.

Tóm lại: qua các thời điểm khảo sát (Bảng 4.31) cho thấy các nghiệm thức xử lý TKT đơn ΦBT56; hỗn hợp 2 TKT; phối hợp giữa TKT ΦBT56 với thuốc hóa học; hỗn hợp 2 TKT với thuốc hóa học đều thể hiện hiệu quả với tỷ lệ bệnh thấp hơn, khác biệt ý nghĩa thống kê với nghiệm thức nông dân và đối chứng không xử lý biện pháp phòng trừ. Trong đó, hiệu quả giảm bệnh của nghiệm thức chỉ xử lý thuốc hóa học thấp hơn so với bốn nghiệm thức có xử lý còn lại. Mặt khác, nghiệm thức TKT đơn ΦBT56 và nghiệm thức hỗn hợp TKT tương đương nhau; nghiệm thức xử lý hỗn hợp TKT và hỗn hợp TKT phối hợp với thuốc hóa học có hiệu quả tương đương nhau. Kết quả này có lẽ khi áp lực mầm bệnh trong ruộng không cao (<30% ở nghiệm thức đối chứng)

nên hiệu quả của TKT đã đủ khả năng phòng trừ tốt bệnh, nên việc áp dụng thêm thuốc hóa học không làm gia tăng hiệu quả phòng trừ bệnh.

Bảng 4.31: Tỷ lệ (%) bệnh héo xanh trên cây hoa Cúc ở các nghiệm thức tại tỉnh Đồng Tháp trong điều kiện nhiễm bệnh tự nhiên

Nghiệm thức	Tỷ lệ bệnh (%)				
	41 NSKT	51 NSKT	81NSKT	91 NSKT	AUDPC
Đối chứng	11,7 ^a	15,8 ^a	28,3 ^a	29,2 ^a	1170,8 ^a
Nông dân	10,0 ^a	10,8 ^b	16,7 ^b	16,7 ^b	858,3 ^b
TKT ΦBT56	3,3 ^b	4,2 ^{cd}	5,8 ^{cd}	5,8 ^{cd}	312,5 ^d
Hỗn hợp 2 TKT	2,5 ^{bc}	3,3 ^d	4,2 ^d	4,2 ^d	233,3 ^{de}
Hóa học (Miksabe 100WP)	4,2 ^b	7,5 ^{bc}	9,2 ^c	9,2 ^c	475,0 ^c
Hóa học + TKT ΦBT56	0,0 ^c	0,8 ^d	3,3 ^d	3,3 ^d	108,3 ^e
Hóa học + Hỗn hợp 2 TKT	0,0 ^c	0,8 ^d	4,2 ^d	4,2 ^d	145,8 ^e
Mức ý nghĩa	* *	**	**	**	**
CV. (%)	39,66	39,41	25,78	29,45	19,92

Chú thích: Trong cùng một cột, những số trung bình nghiệm thức được theo sau bởi một hoặc nhiều chữ giống nhau thì khác biệt không ý nghĩa thống kê theo phép thử Duncan. Mức ý nghĩa 1% (**). Số liệu % được chuyển sang \sqrt{x} trước khi phân tích thống kê. NSKT (ngày sau khi trồng); AUDPC (chỉ số tích lũy bệnh theo thời gian); TKT (thực khuẩn thể).

Từ kết quả (Bảng 4.32) qua các thời điểm 41, 51, 81, 91 NSKT cho thấy tất cả các nghiệm thức có xử lý biện pháp phòng trừ đều có trung bình cấp bệnh thấp hơn và khác biệt ý nghĩa với nghiệm thức nông dân và đối chứng. Trong đó, ở thời điểm 51, 81 và 91 NSKT bốn nghiệm thức: xử lý TKT ΦBT56; hỗn hợp 2 TKT; phối hợp TKT ΦBT56 với thuốc hóa học; hỗn hợp 2 TKT với thuốc hóa học đều có trung bình cấp bệnh tương đương nhau, thấp hơn và khác biệt ý nghĩa thống kê với nghiệm thức chỉ sử dụng thuốc hóa học. Do đó, khi áp lực mầm bệnh trên ruộng thấp, việc áp dụng thêm thuốc hóa học không làm gia tăng hiệu quả phòng trừ bệnh.

Bảng 4.32: Trung bình cấp bệnh héo xanh trên cây hoa Cúc ở các nghiệm thức tại tỉnh Đồng Tháp trong điều kiện nhiễm bệnh tự nhiên

Nghiệm thức	Trung bình cấp bệnh			
	41 NSKT	51 NSKT	81NSKT	91 NSKT
Đối chứng	0,29 ^a	0,53 ^a	1,21 ^a	1,27 ^a
Nông dân	0,25 ^a	0,36 ^b	0,73 ^b	0,78 ^b
TKT ΦBT56	0,08 ^{bc}	0,09 ^d	0,22 ^d	0,22 ^d
Hỗn hợp 2 TKT	0,06 ^{bc}	0,10 ^d	0,19 ^d	0,21 ^d
Hóa học (Miksabe 100WP)	0,13 ^b	0,23 ^c	0,38 ^c	0,40 ^c
Hóa học + TKT ΦBT56	0,00 ^c	0,03 ^d	0,13 ^d	0,13 ^d
Hóa học + Hỗn hợp 2 TKT	0,00 ^c	0,03 ^d	0,16 ^d	0,16 ^d
Mức ý nghĩa	**	**	**	**
CV. (%)	44,24	37,72	24,92	26,57

Chú thích: Trong cùng một cột, những số trung bình nghiệm thức được theo sau bởi một hoặc nhiều chữ giống nhau thì khác biệt không ý nghĩa thống kê theo phép thử Duncan. Mức ý nghĩa 1% (**). NSKT (ngày sau khi trồng); TKT (thực khuẩn thể).

Từ kết quả (Bảng 4.33) hiệu quả giảm bệnh qua các thời điểm khảo sát cho thấy cả 5 nghiệm thức có xử lý biện pháp phòng trừ đều cho hiệu quả giảm bệnh cao trên 50% và khác biệt ý nghĩa thống kê với nghiệm thức nông dân. Ở thời điểm 41 NSKT, các nghiệm thức có hiệu quả giảm bệnh dao động từ 64,3 đến 100% cao hơn và khác biệt ý nghĩa với nghiệm thức nông dân (14,3%). Trong đó, hiệu quả giảm bệnh của nghiệm thức chỉ xử lý thuốc hóa học (64,3%) thấp hơn so với bốn nghiệm thức có xử lý còn lại. Mặc khác, nghiệm thức TKT đơn ΦBT56 (71,4%) và nghiệm thức hỗn hợp 2 TKT (78,6%) tương đương nhau.

Đến thời điểm 51 NSKT, tất cả các nghiệm thức có xử lý biện pháp phòng trừ đều có hiệu quả giảm bệnh cao hơn 50% và khác biệt ý nghĩa với nghiệm thức nông dân. Hiệu quả giảm bệnh của nghiệm thức chỉ xử lý thuốc hóa học (52,6%) thấp hơn so với bốn nghiệm thức có xử lý còn lại. Nghiệm thức TKT đơn ΦBT56 (73,7%) và nghiệm thức hỗn hợp 2 TKT (79,0%) tương đương nhau. Nghiệm thức hỗn hợp 2 TKT (79,0%) và nghiệm thức hỗn hợp 2 TKT với thuốc hóa học (94,7%) có hiệu quả giảm bệnh khác biệt không ý nghĩa thống kê với nhau.

Tương tự, ở thời điểm 81 và 91 NSKT, tất cả các nghiệm thức có xử lý biện pháp phòng trừ đều có hiệu quả giảm bệnh từ (67,7% đến 88,6%) và khác biệt ý nghĩa với nghiệm thức nông dân từ (41,2% đến 42,9%). Hiệu quả giảm bệnh của nghiệm thức chỉ xử lý thuốc hóa học (67,7% đến 68,6%) thấp hơn so với bốn nghiệm thức có xử lý còn lại. Các nghiệm thức xử lý TKT đơn ΦBT56; hỗn hợp 2 TKT; phối hợp giữa TKT ΦBT56 với thuốc hóa học; hỗn hợp 2 TKT với thuốc hóa học đều thể hiện hiệu quả giảm bệnh từ (79,4% đến

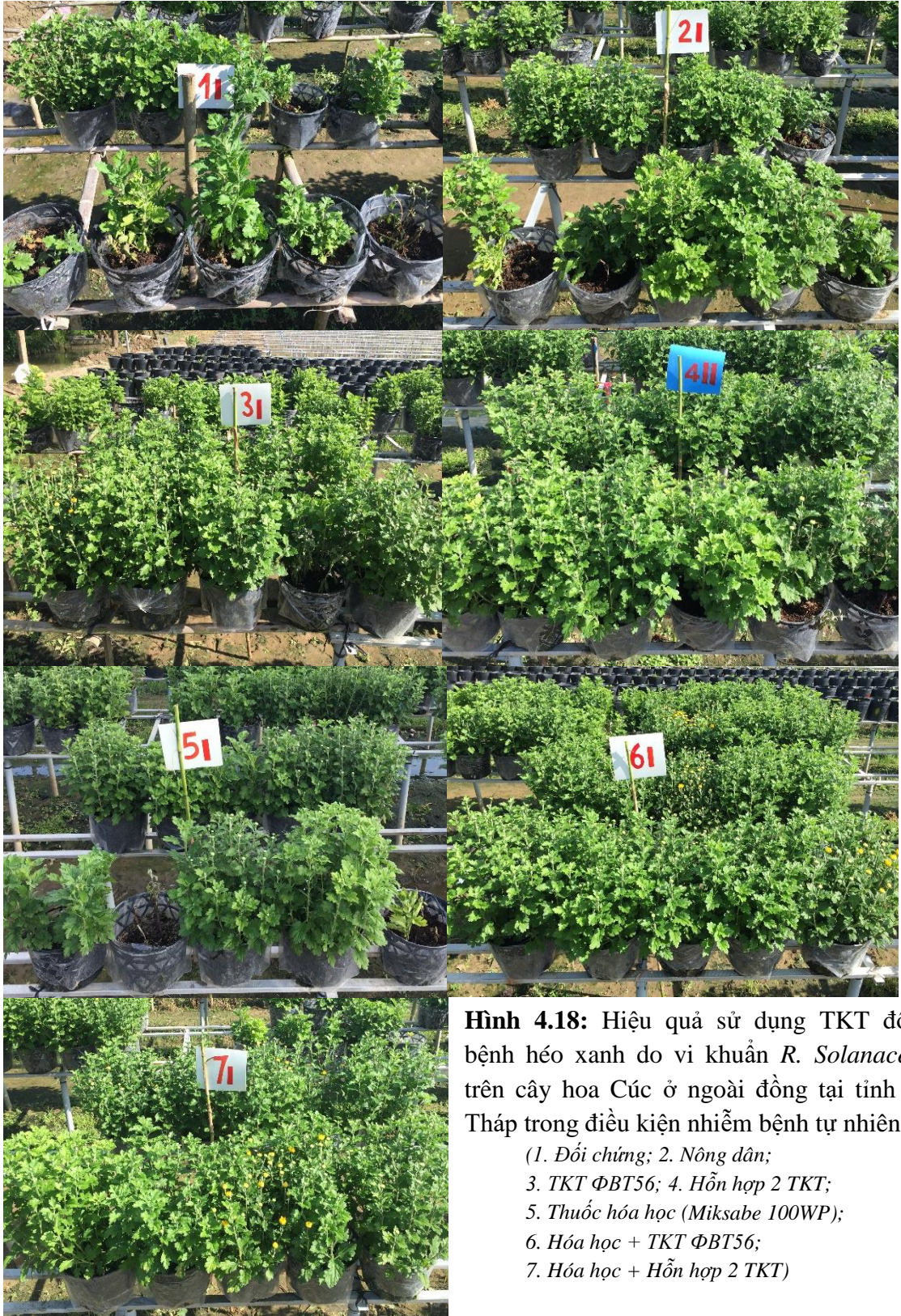
88,6%) tương đương nhau, khác biệt không ý nghĩa thống kê (Hình 4.18 và 4.19).

Bảng 4.33: Hiệu quả giảm bệnh héo xanh trên cây hoa Cúc của TKT và thuốc hóa học ở các nghiệm thức tại tỉnh Đồng Tháp trong điều kiện nhiễm bệnh tự nhiên

Nghiệm thức	Hiệu quả giảm bệnh (%)			
	41 NSKT	51 NSKT	81NSKT	91 NSKT
Nông dân	14,3 ^c	31,6 ^d	41,2 ^c	42,9 ^b
TKT ΦBT56	71,4 ^b	73,7 ^b	79,4 ^{ab}	80,0 ^a
Hỗn hợp 2 TKT	78,6 ^b	79,0 ^{ab}	85,3 ^a	85,7 ^a
Hóa học (Miksabe 100WP)	64,3 ^b	52,6 ^c	67,7 ^b	68,6 ^{ab}
Hóa học + TKT ΦBT56	100,0 ^a	94,7 ^a	88,2 ^a	88,6 ^a
Hóa học + Hỗn hợp 2 TKT	100,0 ^a	94,7 ^a	85,3 ^a	85,7 ^a
Mức ý nghĩa	**	**	**	**
CV. (%)	21,58	22,06	15,31	18,35

Chú thích: Trong cùng một cột, những số trung bình nghiệm thức được theo sau bởi một hoặc nhiều chữ giống nhau thì khác biệt không ý nghĩa thống kê theo phép thử Duncan. Mức ý nghĩa 1% (**). Số liệu % được chuyển sang $\arcsin\sqrt{x}$ trước khi phân tích thống kê. NSKT (ngày sau khi trồng); TKT (thực khuẩn thể).

Tóm lại: ở điều kiện ngoài đồng, khi áp lực mầm bệnh thấp, nghiệm thức chỉ xử lý thuốc hóa học có hiệu quả giảm bệnh thấp hơn so với bốn nghiệm thức có xử lý còn lại. Nghiệm thức TKT đơn ΦBT56 có hiệu quả tương đương với nghiệm thức hỗn hợp 2 TKT qua các thời điểm khảo sát. Ở thời điểm 51, 81, 91 NSKT nghiệm thức hỗn hợp 2 TKT có hiệu quả tương đương với nghiệm thức hỗn hợp 2 TKT với thuốc hóa học. Từ kết quả cho thấy, khi áp lực mầm bệnh thấp việc áp dụng thêm thuốc hóa học không làm gia tăng hiệu quả phòng trừ bệnh. Do đó, biện pháp sinh học dùng TKT đơn hay hỗn hợp TKT đều có khả năng kiểm soát bệnh héo xanh do vi khuẩn *R. solanacearum* trên cây hoa Cúc rất hiệu quả mà không cần bổ sung thêm thuốc hóa học. Từ kết quả này, có thể dùng TKT để thay thế thuốc hóa học (khi áp lực mầm bệnh thấp) nhằm mục đích quản lý bệnh héo xanh do vi khuẩn *R. solanacearum* trên cây hoa Cúc theo hướng sinh học nhằm giúp an toàn cho môi trường sinh thái.



Hình 4.18: Hiệu quả sử dụng TKT đối với bệnh héo xanh do vi khuẩn *R. Solanacearum* trên cây hoa Cúc ở ngoài đồng tại tỉnh Đồng Tháp trong điều kiện nhiễm bệnh tự nhiên

- (1. Đối chứng; 2. Nông dân;
 3. TKT ΦBT56; 4. Hỗn hợp 2 TKT;
 5. Thuốc hóa học (Miksabe 100WP);
 6. Hóa học + TKT ΦBT56;
 7. Hóa học + Hỗn hợp 2 TKT)



Hình 4.19: Ảnh hưởng của xử lý TKT và thuốc hoá học trên cây hoa Cúc tại tỉnh Đồng Tháp trong điều kiện nhiễm bệnh tự nhiên ở thời điểm thu hoạch. (7I: Hóa học + Hỗn hợp 2 TKT; 6I: Hóa học + TKT ΦBT56; 2I: Nông dân; 1I: Đối chứng).

Tóm lại: qua 3 thí nghiệm ngoài đồng đánh giá hiệu quả phòng trừ của TKT đối với bệnh héo xanh do vi khuẩn *R. solanacearum* trên Cúc trong các điều kiện có lây bệnh nhân tạo và nhiễm bệnh tự nhiên, kết quả cho thấy tất cả các nghiệm thức có xử lý TKT hoặc thuốc hóa học đều có hiệu quả giảm bệnh hơn 50%. Trong điều kiện có lây bệnh nhân tạo (thí nghiệm 4.4.1 và 4.4.2) nghiệm thức xử lý TKT đơn ΦBT56 có hiệu quả giảm bệnh (lần lượt qua 2 thí nghiệm là 79,6% (thí nghiệm 4.4.1) và 58% (thí nghiệm 4.4.2)) cao hơn so với nghiệm thức xử lý hỗn hợp TKT (lần lượt qua 2 thí nghiệm là 56,7% (thí nghiệm 4.4.1) và 39,4% (thí nghiệm 4.4.2)) và nghiệm thức đơn lẻ thuốc hóa học (lần lượt qua 2 thí nghiệm là 58,8% (thí nghiệm 4.4.1) và 50% (thí nghiệm 4.4.2)). Mặc khác, trong điều kiện nhiễm bệnh tự nhiên (thí nghiệm 4.4.3) áp lực bệnh thấp, nghiệm thức xử lý hỗn TKT hiện hiệu quả giảm bệnh (85,7%) tương đương nghiệm thức xử lý đơn TKT ΦBT56 (80%). Nghiệm thức sử dụng TKT ΦBT56 phối hợp thuốc hóa học có hiệu quả giảm bệnh là 88,6% không góp phần gia tăng hiệu quả giảm bệnh so với sử dụng đơn lẻ TKT ΦBT56 với hiệu quả giảm bệnh là 80,0%. Tuy nhiên, trong điều kiện có áp lực bệnh cao (thí nghiệm 4.4.2) thì việc áp dụng TKT đơn phối hợp thuốc hóa học mang lại hiệu quả giảm bệnh (71,3%) cao hơn nghiệm thức sử dụng TKT ΦBT56 đơn lẻ (58,0%). Như vậy, việc phối hợp TKT với thuốc trừ khuẩn có hoạt chất streptomycin và oxytetracycline giúp tăng hiệu quả giảm bệnh héo xanh do vi khuẩn *R. solanacearum* trên Cúc ở điều kiện ngoài đồng trong điều kiện áp lực bệnh cao. Vì vậy, có thể sử dụng TKT để quản lý bệnh héo xanh

do vi khuẩn *R. solanacearum* trên Cúc theo hướng sinh học nhằm giúp an toàn cho môi trường sinh thái, và chỉ sử dụng bổ sung thêm thuốc hóa học khi thật sự cần thiết lúc có áp lực mầm bệnh cao. Trong một số nghiên cứu, TKT không bị ảnh hưởng bởi các thuốc nông dược, chúng có thể kết hợp với nhiều hóa chất bảo vệ thực vật mà không làm giảm hiệu quả (Balogh *et al.*, 2009; Jones *et al.*, 2012; Lang *et al.*, 2007). Đây cũng là một phương pháp để làm giảm tính kháng của vi khuẩn với các biện pháp phòng trị. Ngoài ra, TKT cũng có thể được sử dụng kết hợp với các loại thuốc kháng sinh khác nhằm làm giảm sự phát triển của vi khuẩn kháng thuốc (Kutter, 1997).

Từ kết quả nghiên cứu nhận thấy rằng, TKT có thể được sử dụng để phòng trừ bệnh héo xanh do vi khuẩn *R. solanacearum* trên cây hoa Cúc bằng cách xử lý giá thể trước và sau khi trồng cây với định kỳ 10 ngày/lần để TKT làm giảm mật số của vi khuẩn gây bệnh trong giá thể và hạn chế khả năng xâm nhiễm, phát sinh phát triển của bệnh. Khi áp lực mầm bệnh thấp bệnh tiến triển với tốc độ chậm, TKT đủ khả năng quản lý mật số vi khuẩn gây bệnh, vì thế không cần bổ sung thêm thuốc hóa học. Huy và *ctv.* (2016) đã ghi nhận khi phun huyền phù TKT ΦVL34 lên bông lúa đều thể hiện hiệu quả giảm bệnh cao hơn so với nghiệm thức không xử lý. Việc xử lý TKT trước khi mầm bệnh hiện diện và xâm nhiễm vào cây trồng sẽ cho hiệu quả tốt hơn so với xử lý TKT sau khi mầm bệnh xuất hiện và xâm nhập vào cây trồng. Bởi khi thiết lập quần thể sớm, TKT có khả năng tiêu diệt trực tiếp mầm bệnh ngay khi chúng xuất hiện và hạn chế sự tương tác giữa mầm bệnh và cây trồng gây ảnh hưởng đến hiệu quả của TKT. Trong quản lý bệnh héo xanh trên cây hoa Cúc ở điều kiện ngoài đồng, khi lây bệnh nhân tạo kết quả cho thấy ở nghiệm thức hỗn hợp TKT có hiệu quả giảm bệnh thấp hơn so với nghiệm thức xử lý đơn TKT vì mật số TKT thấp nên hiệu quả quản lý vi khuẩn thấp hơn và nguồn bệnh lúc này là một hay một vài dòng vi khuẩn cụ thể. Tuy nhiên trong điều kiện nhiễm bệnh tự nhiên hiệu quả giảm bệnh của nghiệm thức hỗn hợp TKT tương đương với nghiệm thức xử lý đơn TKT bởi nguồn bệnh lúc này là tương đối phức tạp đa dạng về chủng loài với mật số không đồng đều nhau, hỗn hợp TKT có tác dụng gia tăng phổ ký chủ và khi sử dụng hỗn hợp TKT cũng làm giảm tính kháng của vi khuẩn. Jackson (1989) đã phát triển một chiến lược để ngăn chặn sự xuất hiện của thể đột biến có khả năng kháng sự tấn công của TKT khi sử dụng hỗn hợp của nhiều TKT đã đột biến có khả năng tấn công những dòng vi khuẩn kháng TKT ban đầu, trong khi vẫn duy trì các TKT có thể ký sinh trên các vi khuẩn tự nhiên. Sử dụng chiến lược này, một hỗn hợp của bốn TKT bao gồm cả tự nhiên và đột biến được xử lý hai lần một tuần đã

kiểm soát bệnh tốt hơn đáng kể và năng suất trên các loại cây ăn trái cao hơn so với dùng đồng mancozeb. Hỗn hợp TKT cũng làm giảm mức độ nghiêm trọng của bệnh vi khuẩn đốm lá 17%, trong khi ứng dụng đồng mancozeb chỉ làm giảm 11%. Một nghiên cứu tương tự đã được sử dụng để kiểm soát *Xanthomonas campestris* pv. *pelargonii* (Xcpl), tác nhân gây bệnh cháy do vi khuẩn trên cây hoa phong lữ (Geranium), một hỗn hợp gồm 5 TKT có phổ ký chủ rộng nhất được sử dụng phun trên lá hàng ngày đã làm giảm đáng kể sự lây lan của bệnh. Tỷ lệ nhiễm bệnh giảm 50% hoặc cao hơn ở các nghiệm thức được điều trị bằng TKT so với đối chứng và cao hơn đáng kể so với các nghiệm thức được điều trị bằng thuốc hóa học theo khuyến cáo (Flaherty *et al.*, 2000). Thời gian xử lý TKT cũng là yếu tố quyết định hiệu quả khi kiểm soát mầm bệnh, làm giảm sự bất hoạt của TKT bởi bức xạ ánh sáng mặt trời. Trong nghiên cứu của Iriarte *et al.* (2007) mật số TKT đã giảm mạnh trong những giờ đầu buổi chiều nhưng tiếp tục tồn tại ở mức cao khi áp dụng vào đầu buổi tối và đã được chứng minh là liên quan chặt chẽ với cường độ chiếu xạ tia cực tím từ ánh sáng mặt trời. Tương tự, Balogh *et al.* (2009) đã chứng minh rằng khi xử lý TKT vào buổi chiều tối thì hiệu quả kiểm soát bệnh do vi khuẩn trên cà chua cao hơn khi xử lý vào buổi sáng, hiệu quả tương ứng là 26,9 % và 13,1 %.

CHƯƠNG 5: KẾT LUẬN VÀ ĐỀ XUẤT

5.1 KẾT LUẬN

Có tổng số 55 dòng vi khuẩn *R. solanacearum* và 124 dòng TKT được phân lập từ các tỉnh: Bến Tre, Cần Thơ, Hậu Giang, Tiền Giang, An Giang, Đồng Tháp, Bạc Liêu và Lâm Đồng.

Dòng vi khuẩn ĐT-9 phân lập tại Đồng Tháp có khả năng gây hại cao nhất. Vi khuẩn ĐT-9 sau khi định danh bằng phương pháp giải trình tự gen 16S rRNA được ghi nhận là loài *Ralstonia solanacearum* và được đăng ký trên GenBank với mã số là MK041548.

Có 10 dòng TKT có khả năng kí sinh rộng là ΦĐT13, ΦAG29, ΦLĐ38, ΦCT44, ΦCT46, ΦBT56, ΦBT67, ΦBT75, ΦTG97, ΦHG109, chúng kí sinh trên 50 trong tổng số 55 dòng vi khuẩn khảo sát chiếm 90,9%.

Hai dòng TKT ΦBT67 và ΦBT56 có khả năng hạn chế được sự gây hại của vi khuẩn *R. solanacearum* tốt hơn những dòng TKT còn lại. Dòng TKT ΦBT56 thể hiện hiệu quả giảm bệnh tốt hơn so với dòng TKT ΦBT67 ở điều kiện nhà lưới.

Khi TKT được xử lý trước khi lây bệnh 1 giờ, hay kết hợp cả trước 1 giờ và sau khi lây bệnh 5 ngày mang lại hiệu quả giảm bệnh tương đương nhau và tốt hơn so với chỉ xử lý TKT sau khi lây bệnh 5 ngày.

Xử lý tưới đất với huyền phù TKT ở mật số 10^7 và 10^8 PFU/mL có hiệu quả giảm bệnh cao hơn so với nghiệm thức xử lý TKT ở mật số 10^6 PFU/mL.

Dựa vào hình thái virion dưới kính TEM, hai dòng TKT ΦBT56 và ΦBT67 đều thuộc họ Podoviridae theo ICTV.

Qua kết quả tuyển chọn từ *in vitro* đến nhà lưới của 14 loại hoạt chất hoá học có 2 nhóm hoạt chất streptomycin + oxytetracycline và oxytetracycline hydrochloride + gentamicin sulphate cho hiệu quả giảm bệnh cao hơn so với các hoạt chất còn lại.

Trong điều kiện áp lực bệnh thấp nghiệm thức áp dụng TKT ΦBT56 phối hợp thuốc hóa học không góp phần gia tăng hiệu quả giảm bệnh so với sử dụng đơn lẻ TKT ΦBT56. Tuy nhiên, khi có áp lực bệnh cao việc áp dụng TKT đơn phối hợp thuốc hóa học mang lại hiệu quả giảm bệnh cao hơn nghiệm thức sử dụng đơn lẻ TKT. Như vậy, TKT có thể được sử dụng để quản lý bệnh héo xanh do vi khuẩn *R. solanacearum* trên Cúc theo hướng sinh học nhằm giúp an toàn cho môi trường sinh thái, và chỉ sử dụng bổ sung thêm thuốc hóa học khi thật sự cần thiết (lúc có áp lực mầm bệnh trên ruộng cao).

5.2 ĐỀ XUẤT

Tiếp tục nghiên cứu giải mã trình tự bộ gene của hai dòng TKT ΦBT56 và ΦBT67 để xác định thuộc nhóm phage độc hay ôn hòa, nhằm ứng dụng an toàn ngoài thực tiễn.

Nghiên cứu hoàn thiện quy trình ứng dụng TKT và thử nghiệm diện rộng, nghiên cứu tạo ra chế phẩm sinh học từ TKT để kiểm soát bệnh héo xanh do vi khuẩn *R. solanacearum* trên cây hoa Cúc, nhằm nhân rộng ra thực tiễn sản xuất.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Abbott, W.S. (1925). A method for computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of economic entomology*, 18: 265 - 269.
- Adams, M.H. (1959). Bacteriophages. Interscience publishers. 526 pages.
- Ackermann, H.W. (2004). *Bacteriophage Classification*. Bacteriophages: Biology and applications, CRC press, 67 pages.
- Ackermann, H.W. (2009). Basic phage electron microscopy. In: M. R. J. Clokie and A. M. Kropinski. Bacteriophages: Methods and protocols. *Springer*. NewYork, US. 113-126.
- Ackermann, H.W. (2009). Phage classification and characterization. In: M. R. J. Clokie and A. M. Kropinski. Bacteriophages: Methods and protocols, Vol. 1: Isolation, characterization and interactions. NewYork, US. pp. 127-140.
- Addy, H.S., Askora, A., Kawasaki, T., Fujieand, M., & Yamada, T. (2012). Utilization of filamentous phage Φ RSM3 to control bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum*, *Plant Disease*, 96(8), 1204-1209.
- Ahmad, A.A., Elhalag, K.M., Addy, H.S., Mohamed, A.N.E., Hussien, A.S., Huang, Q. (2018). Sequencing, genome analysis and host range of a novel *Ralstonia* phage, RsoP1EGY, isolated in Egypt. *Archives of Virology*. doi:10.1007/s00705-018-3844-4.
- Alvarez, A.M., Benedict, A.A., Mizumoto, C.Y., Pollard, L.W., & Civerolo, E.L. (1991). Analysis of *Xanthomonas campestris* pv *citri* and *X c citrumelo* with monoclonal anti-bodies. *Phytopathology* 81:857-865.
- Ateka, E. M., Mwang'Ombe, A. W., & Kimenju, J. W. (2001). Reaction of Potato Cultivars to *Ralstonia solanacearum* in Kenya, *African Crop Science Journal*. Vol. 9, No. 1, pp. 251-256.
- Allen, C., Proir, P., & Hayward, A.C. (2005). Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex. American Phytopathological Society Press: St. Paul, Minnesota. 510 pp.
- Anderson, N.O. (2006). Chrysanthemum: *Dendranthemax grandiflora* Tzvelv. In: N.O. Anderson (editor). Flower breeding and genetics. *Springer Netherlands*. Dordrecht, Netherlands. 389-437.
- 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. DOI:10.22144/jvn.2017.021.
- Agrios, G.N. (2005). *Plant pathology*. 5th edition. *Academic Press*. San Diego, California, USA. 952 pp.
- Bae, J.Y., Wu, J., Lee, H.J., Jo, E.J., Murugaiyan, S., Chung, E., & Lee, S.W. (2012). Biocontrol potential of a lytic bacteriophage PE204 against bacterial

- wilt of tomato. *Journal of Microbiol Biotechnol.* 22(12):1613-20. doi: 10.4014/jmb.1208.08072.
- Balogh, B., Jones, J.B., Momol, M.T., Olson, S.M., & Obradovic, A. (2003). Improved efficacy of newly formulated bacteriophages for management of bacterial spot on tomato. *Plant Dis.* 87:949-54.
- Balogh, B. (2006). *Characterization and use of bacteriophages associated with citrus bacterial pathogens for disease control*. Athesis present to the graduate school of the University of Florida in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy, University of Florida. 112p.
- Balogh, B., Canteros, B., Stall, R., & Jones, J. (2008). Control of citrus canker and citrus bacterial spot with bacteriophages. *Plant Disease.* 92 (7): 1048-1052.
- Balogh, B., Momol, T., Obradovic, A., & Jones, J. (2009). Bacteriophages as Agents for the Control of Plant Pathogenic Bacteria. In: D. Walters. *Disease Control in Crops: Biological and Environmentally Friendly Approaches*. Blackwell Publishing. New Jersey, US. 246-256.
- Balouiri, M., Sadiki, M., Ibsouda, S.K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity. *Journal of Pharmaceutical Analysis.* (6): 71-79.
- 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.
- Bergamin, F. A., & Kimati, V. (1981). Estudos sobre um bacteriofago isolado de *Xanthomonas campestris*. II. seu emprego no controle de *X. campestris* e *X. vesicatoria*. *Sum. Phytopathol.* 7:35-43.
- Burgess, L.W., Knight, T.E., Tesoriero, L., & Phan, T.H. (2009). *Cẩm nang chẩn đoán bệnh cây ở Việt Nam*. ACIAR: Canberra, 210 pp.
- Byrne, J.M., Dianese, A.C., Ji, P., Campbell, H.L., & Cuppels, D.A. (2005). Biological control of bacterial spot of tomato under field conditions at several locations in North America. *Biol. Control* 32:408-18.
- Caldwell, D., Kim, B.S., & Lyer-Pascuzzi, A.S. (2017). *Ralstonia solanacearum* differentially colonizes roots of resistant and susceptible tomato plants. *Journal, Phytopathology*. doi: 10.1094/PHYTO-09-16-0353-R.
- Champoiseau, P.G., & Momol, M.T. (2008). Bacterial Wilt of tomato. In: The United States Department of Agriculture - National Research Initiative Program (2007-2010). 1-11.
- Chi, V.V. (2007). *Sách tra cứu tên cây cỏ Việt Nam*. NXB Giáo Dục. 891 trang.
- Cúc, N.T.T., & Thủy, T.T.T. (2014). *Dịch hại trên hoa hồng, cúc, mai, vạn thọ*. NXB Trường Đại học Cần Thơ. 117 trang.
- Cường, H.V. (2008). *Bệnh Cây Nông Nghiệp*. Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội. 120 trang.

- DiGirolamo, R., & Daley, M. (1973). Recovery of bacteriophage from contaminated chilled and frozen samples of edible West Coast crabs. *Applied and Environmental Microbiology*, 25(6): 1020- 1022.
- Duckworth, D.H., & Gulig, P.A. (2002). Bacteriophages: Potential treatment for bacterial infections. *BioDrugs*. 16 (1): 57-62.
- Đông, Đ.V., & Lộc, Đ.T. (2003). Công nghệ mới trồng hoa cho thu hoạch cao - Quyển 1 - Cây Hoa Cúc, Nhà xuất bản Lao động - Xã hội. 82 trang.
- Eilenberg, J., Hajek, A., & Lomer, C. (2001). Suggestions for unifying the terminology in biological control. *BioControl*, 46 (4): 387-400.
- Elhalag, K., Nasr-Eldin, M., Hussien, A., & Ahmad, A. (2018). Potential use of soilborne lytic Podoviridae phage as a biocontrol agent against *Ralstonia solanacearum*. *Journal of Basic Microbiology*, 58(8), 658–669. doi:10.1002/jobm.201800039.
- Fariza, S., & Zaman, J. (2014). Isolation and characterization of Bacteriophage from raw sewage specific for *Escherichia coli* O157:H7. Thesis submitted in fulfillment of the requirements for the degree of Master of science. University sains Malaysia, pp: 25-40.
- Feng, Y.Y., Ong, S.L., Hu, J.Y., Tan, X.L., & Nguyen, W.J. (2003). Effects of pH and temperature on the survival of coliphages MS2 and Qbeta. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 30: 549-552.
- Flaherty, J.E., Jones, J.B., Harbaugh, B.K., Somodi, G.C., & Jackson, L.E. (2000). Control of bacterial spot on tomato in the greenhouse and field with H-mutant bacteriophages. *HortScience*, 35 (5): 882-884.
- Flaherty, J.E., Harbaugh, B.K., Jones, J.B., Somodi, G.C., & Jackson, L.E. (2001). H-mutant bacteriophages as a potential biocontrol of bacterial blight of geranium. *HortScience* 36:98–100.
- Frampton, R.A., Pitman, A.R., & Fineran, P.C. (2012). Advances in bacteriophage-mediated control of plant pathogens. *International journal of microbiology*: 1-11.
- 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.
- Giang, N.T.T., Tiên, Đ.T.K., & Nga, N.T.T. (2014). Phân lập Thực khuẩn thể và đánh giá hiệu quả phòng trị bệnh cháy bìa lá lúa do vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Tạp chí khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 4: 194-203.
- Genin, S. (2010). Molecular traits controlling host range and adaptation to plants in *Ralstonia solanacearum*. *New phytologist*, 187: 920-928.
- Gill, J., & Abedon, S.T. (2003). Bacteriophage Ecology and Plants. *APSnet Features*, Online. doi: 10.1094/APSnetFeature-2003-1103.
- Goodridge, L.D. (2004). Bacteriophage biocontrol of plant pathogens: fact or fiction? *Trends Biotechnol.* 22:384-85.

- Goto, M. (1992). *Fundamentals of bacterial plant pathology*. Academic Press. San Diego, US. 342 pp.
- Grath M.S., & Sinderen, V.D. (2007). *Bacteriophage: Genetics and Molecular Biology*. Caister Academic Press, Poole, UK. 352 pp.
- Greer, G.G. (2005). Bacteriophage control of foodborne bacteria. *Journal of Food Protection*, 68 (5): 1102-1111.
- Guidot, A., Jiang, W., Ferdy, J.B., Thebaud, C., Barberis, P., Gouzy, J. & Genin, S. (2014). Multihost experimental evolution of the pathogen *Ralstonia solanacearum* unveils genes involved in adaptation to plants. *Mol. Biol. Evol.* 31:2913-2928
- Hòa, N.X., & Sơn, P.H. (2008). *Vi sinh vật đại cương*. Trường Đại học Nông Lâm Huế. Thừa Thiên - Huế. 154 trang.
- Hợp, T. (2000). *Cây cảnh, hoa Việt Nam*. In tái bản lần 2. Nhà xuất bản Nông Nghiệp. Hà Nội. 535 trang.
- 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*, 45: 70-78
- 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.
- Ignoffo, C.M., & Garcia, C. (1994). Antioxidant and oxidative enzyme effects on the inactivation of inclusion bodies of the *Heliothis* baculovirus by simulated sunlight - UV. *Environmental Entomology*, 23: 1025-1029.
- Ignoffo, C.M., & Garcia, C. (1995). Aromatic/heterocyclic amino acids and the stimulated sunlight-UV inactivation of the *Heliothis/Helicoverpa* baculovirus. *Environ. Entomol.* 24:480-82.
- 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: 1704-1711.
- Jackson, L.E. (1989). Bacteriophage prevention and control of harmful plant bacteria. *The Patent Cooperation Treaty, US 4828999 A*.
- Johnson, K.B. (1994). Dose-response relationships and inundative biological control. *Phytopathology* 84:780-84.
- Jonczyk., E., Klak, M., Miedzybrodzki, R., & Górski, A. (2011). The influence of external factors on bacteriophages review. *Folia Microbiol*, 56(3): 191-200.
- Jones, J., Jackson, L., Balogh, B., Obradovic, A., Iriarte, F., & Momol, M. (2007). Bacteriophages for Plant Disease Control. *Annu. Rev. Phytopathol.* 45: 245-262.

- Jones, J.B., Vallad, G.E., Iriarte, F.B., Obradovic, A., Wernsing, M.H., Jackson, L.E., Balogh, B., Hong, J.C., & Momol, M.T. (2012). Considerations for using bacteriophages for plant disease control. *Bacteriophage*, 2 (4):208-214.
- Ji, P., Campbell, H.L., Kloepper, J.W., Jones, J.B., Suslow, T.V., & Wilson, M. (2006). Integrated biological control of bacterial speck and spot of tomato under field conditions using foliar biological control agents and plant growth promoting rhizobacteria. *Biol. Control* 36:358-67.
- Jeger, M.J., & Viljanen-Rollinson, S.L.H. (2001). The use of the area under the disease-progress curve (AUDPC) to assess quantitative disease resistance in crop cultivars. *Theoretical and Applied Genetic*. 102 (1):32-40
- Kelman, A. (1954). The relationship of pathogenicity of *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance in a tetrazolium medium. *Plant Nutrition*, 54(1).pp: 1-32.
- Kim, P. V. (2000). *Vi sinh chuyên khoa*. Tài liệu lưu hành nội bộ. Trường Đại học Cần Thơ. 193 trang.
- Kim, P.V. (2006). Vi sinh vật và sự chuyển hóa vật chất trong đất. Giáo trình dành cho các ngành Trồng Trọt, khoa học Đất, Nông Học. Khoa nông nghiệp và Sinh học Ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ.
- Kurtboke, I. (2012). *Bacteriophage*. InTech. Rijeka, Croatia. 256 pp.
- Kutter, E., & Sulakvelidze, A. (2004). *Bacteriophages: Biology and Application*. CRC Press. Florida, US. 510 pp.
- Kutter, E. (1997): Phage therapy. Bacteriophages as antibiotics. Evergreen Stage College, Olympia WA 98505-NOV.15.
- 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.
- Lee, S.M., Kwak, Y.S., Lee, K.H., & Kim, H.T. (2015). Control Efficacy of Fungicides on Pepper Bacterial Wilt. *Korean J. Pestic. Sci.* Vol. 19, No. 3, pp. 323-328 (2015). <http://dx.doi.org/10.7585/kjps.2015.19.3.323>.
- Leverentz, B., Conway, W.S., Camp, M.J., Janisiewicz, W.J., Abuladze, T., Yang, M., Saftner, R., & 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.
- Linh, N.X. (1998). *Hoa và kỹ thuật trồng hoa*. NXB Nông Nghiệp Hà Nội. 226 trang.
- Louws, F.J., Wilson, M., Campbell, H.L., Cuppels, D.A., & Jones, J.B. (2001). Field control of bacterial spot and bacterial speck of tomato using a plant activator. *Plant Dis.* 85:481-88.

- Maia, P.P., da Silva, E.C., Rath, S., & Reyes, F.G.R. (2009). Residue content of oxytetracycline applied on tomatoes grown in open field and greenhouse. *Food Control*, 20(1), 11-16. doi:10.1016/j.foodcont.2008.01.00
- Matsuzaki, S., Rashel, M., Uchiyama, J., Sakurai, S., Ujihara, T., Kuroda, M., Ikeuchi, M., Tani, T., Fujieda, M., Wakiguchi, H. & Imai, S. (2005). Bacteriophage therapy: a revitalized therapy against bacterial infectious diseases, *Journal of infection and chemotherapy*, 11(5), 211-219.
- Mân, V.T. (2007). *Giáo trình bệnh cây chuyên khoa*. Trường Đại Học Nông Nghiệp 1 - Hà Nội. 233 trang.
- Mehan, V.K., Liao, B.S., Tan, Y.J., Robinson-Smith, A., McDonald, D., & Hayward, A.C. (1994). Bacterial wilt of groundnut. Information bulletin, 35. ICRISAT. *Patancheru, India*. 28 pp.
- Mehan, V.K., & McDonald, D. (1995). “Techniques for diagnosis of *Pseudomonas solanacearum*, and for resistance screening against groundnut bacterial wilt”, *Technical Report*, International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics.
- Middleton, K., & Hayward, A. (1990). Bacterial wilt of groundnut. *Australian centre for international agricultural research*. 58 pp.
- Minh, B.V. (2006). Phương pháp khảo sát phage. *Tạp chí khoa học Trường ĐH sư phạm Huế*. 65:24-26.
- Nagy, J. K., Kiraly, L., & Schwarczinger, I. (2012). Phage therapy for plant disease control with a focus on fire blight. *Central European Journal of Biology*. 7 (1): 1-12.
- Ngôn, N.V. (2015). Nghiên cứu đa dạng di truyền vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* Smit gây bệnh héo xanh lác và xác định các dòng, giống kháng bệnh ở một số tỉnh miền bắc Việt Nam, luận án tiến sĩ nông nghiệp ngành bảo vệ thực vật. Viện khoa học Nông nghiệp Việt Nam.
- Nguyen, K.A., Forster, H., & Adaskaveg, J.E. (2017). Quaternary Ammonium Compounds as New Sanitizers for Reducing the Spread of the Olive Knot Pathogen on Orchard Equipment. *Plant Disease*, 101(7), 1188–1193. doi:10.1094/pdis-11-16-1578-re.
- Nga, N.T.T., & Tâm, L.H. (2014). Bước đầu phân lập và đánh giá khả năng ký sinh, tính đặc hiệu một số chủng thực khuẩn thể của vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Tạp chí Hội thảo quốc gia Bệnh hại Thực vật*. 13: 76-84.
- Nga, N.T.T., & Giang, N.T.T. (2016). Thực khuẩn thể và ứng dụng trong phòng trị bệnh hại vi khuẩn trên cây trồng. *Trong “Quản lý dịch hại cây trồng thân thiện môi trường”*. NXB Đại học Cần Thơ. 301: 181-202.
- Norris, R.F., Caswell-Chen, E.P., & Kogan, M. (2003). *Concepts in Integrated Pest Management*. Prentice Hall. Upper Sadersey, USA. 586pp.
- Obradovic, A., Jones, J.B., Momol, M.T., Balogh, B., & Olson, S.M. (2004). Management of tomato bacterial spot in the field by foliar applications of bacteriophages and SAR inducers. *Plant Disease*, 88: 736-740.

- Obradovic, A., Jones, J.B., Momol, M.T., Balogh, B., Olson, S.M., Jackson, L.M., Guven, K. & Iriarte, F.B. (2005). Integration of biological control agents and systemic acquired resistance inducers against bacterial spot on tomato. *Plant Disease*, 89: 712-716.
- Olson, M.R., Axler, R. P., & Hicks, R.E. (2004). Effects of freezing and storage temperature on MS2 viability. *Journal of virological methods*, 122(2), 147-152.
- Park, T.H. (2017). Complete genome sequence of DU_RP_II, a novel *Ralstonia solanacearum* phage of the family Podoviridae . *Archives of Virology*, 163(1), 269–271. doi:10.1007/s00705-017-3577-9
- Pal, K.K. & Gardener, B.M. (2006). Biological control of plant pathogens. *The Plant Health Instructor*. 1-25.
- Qui, D., Wei, Z.M., Bauer, D.W., & Beer, S.V. (1997). Treatment of tomato seed with harpin enhances germination and growth and induces resistance to *Ralstonia solanacearum*. *Phytopathology* 87:S80.
- Ravensdale, M., Blom, T., Gracia-Garza, J., Svircev, A., & Smith, R. (2007). Bacteriophages and the control of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 29 (2): 121-130.
- Sabour, P. M., & Griffiths, M. W. (Eds.). (2010). Bacteriophages in the control of food-and waterborne pathogens. American Society for Microbiology Press.
- Schnabel, E.L., Fernando, W.G.D., Meyer, M.P., Jones, A.L., & Jackson, L.E. (1999). Bacteriophage of *Erwinia amylovora* and their potential for biocontrol. *Acta Horticulturae*, 489: 649-654.
- Sharma, B. & Rana, K. (1999). Bacterial wilt: a threat to ginger cultivation in Himachal Pradesh. *Plant Disease Research*, 14(2), 216-217.
- Shtienberg, D., Miriam, Z., Oppenheim, D., Herzog, Z., Shulamit, M., Shwartz, H., & Kritzman, G. (2001). Efficacy of Oxolinic Acid and Other Bactericides in Suppression of *Erwinia amylovora* in Pear Orchards in Israel. *Phytoparasitica* 29(2):143-154
- Suzanne, M.S., Walters, K.J., Outwater, C.A., & Sundin, G.W. (2021). Effect of Kasugamycin, Oxytetracycline, and Streptomycin on In-orchard Population Dynamics of *Erwinia amylovora* on Apple Flower Stigmas. *The American Phytopathological Society* (APS).doi.org/10.1094/PDIS-07-20-1469-RE.
- Svircev, A.M., Lehman, S.M., Kim, W.S., Barszcz, E., Schneider, K.E., & Castle, A.J. (2006). Control of the fire blight pathogen with bacteriophages. In: W. Zeller and C. Ullrich (editors). Proceedings of the 1st International Symposium on Biological Control of Bacterial Plant Diseases. *Biologische Bundesanstalt für Land-und Forstwirtschaft*. Berlin, Germany. 259-261.
- Tahat, M.M., & Sijam, K. (2010). *Ralstonia solanacearum*: The bacterial wilt causal agent. *Asian Journal of Plant Sciences*, 9(7), 385.

- Tanaka, H., Negishi, H., & Maeda, H. (1990). Control of tobacco bacterial wilt by an avirulent strain of *Pseudomonas solanacearum* M4S and its bacteriophage. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, 56: 243-246.
- Tan, G.H., Nordin, M.S., Napsiah, A.R., & Rosnah, H. (2009). Lysis activity of bacteriophages isolated from sewage against *Ralstonia solanacearum* and *Erwinia chrysanthemi* (Aktiviti lisis bakteriofaj daripada air kumbahan terhadap *Ralstonia solanacearum* dan *Erwinia chrysanthemi*), *J. Trop. Agric. and Fd. Sc.* 37(2): 203– 209.
- Thắng, N.T., Dũng, Đ.T., & Tuất, N.V., (2011). Nghiên cứu bệnh héo xanh vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* Smith hại cây khoai tây vùng Hà Nội - phụ cận và biện pháp phòng trừ. *Tạp chí Khoa học và Phát triển trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội*: 725 - 734.
- Thủy, V.T.B., Vẽ, N.T., Tiên, Đ.T.K., Nga, N.T.T., & Ba, T.T. (2016). Đánh giá khả năng gây bệnh của các chủng vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* và bước đầu khảo sát ảnh hưởng của các gốc ghép ớt đến khả năng chống chịu bệnh héo vi khuẩn trên ớt sừng trong điều kiện nhà lưới. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*,(3): 241-248.
- Trần, T.N., Trí, K.M., & Nga, N.T.T. (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 lần thứ 15*. NXB Nông nghiệp. Trang 1-9.
- Trun, N. & Trempey, J. (2009). *Fundamental Bacterial Genetics*. 3rd edition. John Wiley & Sons. Hoboken, New Jersey, USA. 309 pp.
- Vân, T.T.B., Uyên, N.N.H., Hân, N.S., Ngọc, N.T.N., Trúc, N.V., Kiệt, L.T., Thiên, M.N., Hiền, N.T.B., Vũ, N.H., Ngọc, L.H.B., & Nguyễn, L.N.K. (2019a). Phân lập thực khuẩn thể từ đất trồng cây dược liệu có khả năng ức chế vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* ở một số tỉnh Đồng bằng sông Cửu Long. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*. 55 (Số chuyên đề: Công nghệ Sinh học)(2): 65-73.
- Vân, T.T.B., Uyên, N.N.H., Ngọc, L.H.B., Hân, N.S., Ngọc, N.T.N., Kiệt, L.T., Trúc, N.V., Vũ, N.H., Nguyễn, L.N.K. (2019b). phân lập và tuyển chọn thực khuẩn (bacteriophage) có khả năng phòng trừ bệnh héo xanh do vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* gây ra trên cây ớt (capsicum sp.) ở các tỉnh Vĩnh Long, Cần Thơ và Sóc Trăng. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn*. (11): 125-132.
- Vân, H.T., & Nga, Đ.T.T. (2007). Giáo trình cây hoa. Nhà xuất bản nông nghiệp. Hà Nội. 110 trang.
- Verma, R., Dutta, A., Choudhary, A.K., & Maurya, S. (2014). Control of *Ralstonia solanacearum* Infection in Tomato, Brinjal and Capsicum by antibiotic sensitivity test. *Journal of Advanced Laboratory Research in Biology* E-ISSN: 0976-7614 Volume 5, Issue 3, July 2014 PP 35-40 <https://e-journal.sospublication.co.in>

- Viên, N.V., & Dũng, Đ.T. (2013). *Bệnh hại cà chua do nấm, vi khuẩn, và biện pháp phòng chống*, Nhà xuất bản Nông Nghiệp Hà Nội. 82 trang.
- Wicker, E., Grassart, L., Coranson, B.R., Mian, D., Guilbaud, C., Fegan, M., & Prior, P. (2007). *Ralstonia solanacearum* strains in Martinique (French West Indies) exhibiting a new pathogenic potential. *Applied and Environmental Microbiology*, 73 (21): 6790-7801.
- Wilson, M., Campbell, H.L., Ji, P., Jones, J.B., & Cuppels, D.A. (2002). Biological control of bacterial speck of tomato under field conditions at several locations in North America. *Phytopathology* 92:1284-92.
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., & Lane, D. J. (1991). 16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study. *Journal of bacteriology*. Vol. 173, No. (2): 697-703.
- Yabuuchi, E., Kosako, Y., Oyaizu, H., Yano, I., Hotta, H., Hashimoto, Y., Ezaki, T., & Arakawa, M. (1992). Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacian* (Palleroni and Holmes, 1981) comb. nov. *Microbiology and immunology*, 36 (12): 1251-1275.
- Yabuuchi, E., Kosako, Y., Yano, I., Hotta, H., & Nishiuchi, Y. (1995). Transfer of two *Burkholderia* and an *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen. *Microbiology and immunology*, 39 (11): 897-904.
- Yasufumi, H. (1993). Mode of Action of Oxolinic Acid against Bacterial Seedling Rot of Rice Caused by *Pseudomonas glumae*. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 59: 441-446.
- Yu, X., Armstrong, C. M., Zhou, M., & Duan, Y. (2016). Bismertiazol Inhibits *Xanthomonas citri* subsp. *citri* Growth and Induces Differential Expression of Citrus Defense-Related Genes. *Phytopathology*, 106(7), 693–701. doi:10.1094/phyto-12-15-0328-r.
- Zhang, Y., Hua, J., & He, L. (1993). Effect of infected groundnut seeds on transmission of *Pseudomonas solanacearum*. *Bacterial Wilt Newsletter* (9), 9-10.
- Zhenhua, P. & Shouhe, J. (1995). New chrysanthemum varieties developed by radiation breeding and micropropagation. *Acta Hort.* (ISHS) 404:128-130.

PHỤ LỤC

Nội dung 2: Tuyển chọn một số dòng thực khuẩn thể triển vọng trong điều kiện phòng thí nghiệm và nhà lưới để phòng trị vi khuẩn gây bệnh héo xanh trên cây hoa Cúc.

Phụ bảng 1: Bảng phân tích ANOVA tỷ lệ bệnh héo xanh do các dòng vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* trong điều kiện nhà lưới ở thời điểm 6 NSKLB (Thí nghiệm 4.2.2 – nội dung 2)

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	F tính	F bảng
Nghiệm thức	6	27,663	4,610	4,3639	0,0052
Sai số	21	22,186	1,056		
Tổng cộng	27	49,849			

Coefficient of Variation: 46,65%

Phụ bảng 2: Bảng phân tích ANOVA tỷ lệ bệnh héo xanh do các dòng vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* trong điều kiện nhà lưới ở thời điểm 10 NSKLB (Thí nghiệm 4.2.2 – nội dung 2)

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	F tính	F bảng
Nghiệm thức	6	2746,934	457,822	9,3349	0,0000
Sai số	21	1029,924	49,044		
Tổng cộng	27	3776,858			

Coefficient of Variation: 31,31%

Phụ bảng 3: Bảng phân tích ANOVA tỷ lệ bệnh héo xanh do các dòng vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* trong điều kiện nhà lưới ở thời điểm 14 NSKLB (Thí nghiệm 4.2.2 – nội dung 2)

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	F tính	F bảng
Nghiệm thức	6	3947,809	657,968	19,6590	0,0000
Sai số	21	702,849	33,469		
Tổng cộng	27	4650,658			

Coefficient of Variation: 20,63%

Phụ bảng 4: Bảng phân tích ANOVA tỷ lệ bệnh héo xanh do các dòng vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* trong điều kiện nhà lưới ở thời điểm 18 NSKLB (Thí nghiệm 4.2.2 – nội dung 2)

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	F tính	F bảng
Nghiệm thức	6	5717,764	952,961	37,1275	0,0000
Sai số	21	539,013	25,667		
Tổng cộng	27	6256,777			

Coefficient of Variation: 16,00%

Phụ bảng 5: Bảng phân tích ANOVA tỷ lệ bệnh héo xanh do các dòng vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* trong điều kiện nhà lưới ở thời điểm 22 NSKLB (Thí nghiệm 4.2.2 – nội dung 2)

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	F tính	F bảng
Nghiệm thức	6	7641,129	1273,521	91,1834	0,0000
Sai số	21	293,299	13,967		
Tổng cộng	27	7934,428			

Coefficient of Variation: 11,05%

Phụ bảng 6: Bảng phân tích ANOVA cấp bệnh héo xanh do các dòng vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* trong điều kiện nhà lưới ở thời điểm 6 NSKLB (Thí nghiệm 4.2.2 – nội dung 2)

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	F tính	F bảng
Nghiệm thức	6	0,072	0,012	2,9706	0,0292
Sai số	21	0,085	0,04		
Tổng cộng	27	0,157			

Coefficient of Variation: 89,07%

Phụ bảng 7: Bảng phân tích ANOVA cấp bệnh héo xanh do các dòng vi khuẩn *R. solanacearum* trong điều kiện nhà lưới ở thời điểm 10 NSKLB (Thí nghiệm 4.2.2 – nội dung 2)

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	F tính	F bảng
Nghiệm thức	6	1,117	0,186	9,9618	0,0000
Sai số	21	0,392	0,019		
Tổng cộng	27	1,509			

Coefficient of Variation: 39,46

Phụ bảng 8: Bảng phân tích ANOVA cấp bệnh héo xanh do các dòng vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* trong điều kiện nhà lưới ở thời điểm 14 NSKLB (Thí nghiệm 4.2.2 – nội dung 2)

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	F tính	F bảng
Nghiệm thức	6	3,117	0,52	8,5737	0,0001
Sai số	21	1,272	0,061		
Tổng cộng	27	4,389			

Coefficient of Variation: 34,99%

Phụ bảng 9: Bảng phân tích ANOVA cấp bệnh héo xanh do các dòng vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* trong điều kiện nhà lưới ở thời điểm 18 NSKLB (Thí nghiệm 4.2.2 – nội dung 2)

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	F tính	F bảng
Nghiệm thức	6	8,494	1,416	11,7394	0,0000
Sai số	21	2,530	0,121		
Tổng cộng	27	11,024			

Coefficient of Variation: 31,27%

Phụ bảng 10: Bảng phân tích ANOVA cấp bệnh héo xanh do các dòng vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* trong điều kiện nhà lưới ở thời điểm 22 NSKLB (Thí nghiệm 4.2.2 – nội dung 2)

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	F tính	F bảng
Nghiệm thức	6	19,812	3,302	46,3055	0,0000
Sai số	21	1,497	0,071		
Tổng cộng	27	21,309			

Coefficient of Variation: 18,37%

Phụ bảng 11: Bảng phân tích ANOVA diện tích dưới đường cong tiến triển bệnh héo xanh do các dòng vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* trong điều kiện nhà lưới (Thí nghiệm 4.2.2 – nội dung 2)

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	F tính	F bảng
Nghiệm thức	6	1423564,875	237260,810	34,4927	0,0000
Sai số	21	144450	6878,571		
Tổng cộng	27	1568014,857			

Coefficient of Variation: 17,97%

Phụ bảng 12: Bảng Anova đường kính phân giải của 10 dòng TKT với 3 dòng vi khuẩn thời điểm 24 giờ (thí nghiệm 4.2.4 - Nội dung 2)

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	F	Prob
Nhân tố A	9	353,804	39,312	266,8408	0,0000
Nhân tố B	2	102,244	51,122	347,0071	0,0000
Tương tác AB	18	91,270	5,071	34,4182	0,0000
Sai số	60	8,839	0,147		
Tổng cộng	89	556,158			

Coefficient of Variation: 7,44%

Phụ bảng 13: Bảng Anova đường kính phân giải của 10 dòng TKT với 3 dòng vi khuẩn thời điểm 48 giờ (thí nghiệm 4.2.4 - Nội dung 2)

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	F	Prob
Nhân tố A	9	540,466	60,052	118,9217	0,0000
Nhân tố B	2	431,874	215,937	427,6246	0,0000
Tương tác AB	18	248,000	13,778	27,2845	0,0000
Sai số	60	30,298	0,505		
Tổng cộng	89	1250,639			

Coefficient of Variation: 10,4%

Phụ bảng 14: Bảng Anova đường kính phân giải của 10 dòng TKT với 3 dòng vi khuẩn thời điểm 72 giờ (thí nghiệm 4.2.4 - Nội dung 2)

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	F	Prob
Nhân tố A	9	875,952	97,328	162,7185	0,0000
Nhân tố B	2	932,578	466,289	779,5678	0,0000
Tương tác AB	18	497,239	27,624	46,1840	0,0000
Sai số	60	35,888	0,598		
Tổng cộng	89	2341,658			

Coefficient of Variation: 9,35%

Phụ bảng 15: Bảng phân tích ANOVA tỷ lệ bệnh héo xanh vi khuẩn trên cây hoa Cúc của các nghiệm thức xử lý TKT khác nhau trong điều kiện nhà lưới vào thời điểm 8 NSKLB (thí nghiệm 4.2.5 - Nội dung 2)

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	F tính	F bảng
Nghiệm thức	6	88,992	14,832	12,2666	0,0000
Sai số	28	33,856	1,209		
Tổng cộng	34	122,847			

Coefficient of Variation: 36,74%

Phụ bảng 16: Bảng phân tích ANOVA tỷ lệ bệnh héo xanh vi khuẩn trên cây hoa cúc của các nghiệm thức xử lý TKT khác nhau trong điều kiện nhà lưới vào thời điểm 14 NSKLB (thí nghiệm 4.2.5 - Nội dung 2)

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	F tính	F bảng
Nghiệm thức	6	7319,685	1219,947	21,3185	0,0000
Sai số	28	1602,295	57,225		
Tổng cộng	34	8921,979			

Coefficient of Variation: 31,10%

Phụ bảng 17: Bảng phân tích ANOVA tỷ lệ bệnh héo xanh vi khuẩn trên cây hoa cúc của các nghiệm thức xử lý TKT khác nhau trong điều kiện nhà lưới vào thời điểm 20 NSKLB (thí nghiệm 4.2.5 - Nội dung 2)

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	F tính	F bảng
Nghiệm thức	6	6863,787	1144,131	23,0173	0,0000
Sai số	28	1391,811	49,708		
Tổng cộng	34	8256,598			

Coefficient of Variation: 23,10%

Phụ bảng 18: Bảng phân tích ANOVA tỷ lệ bệnh héo xanh vi khuẩn trên cây hoa cúc của các nghiệm thức xử lý TKT khác nhau trong điều kiện nhà lưới vào thời điểm 26 NSKLB (thí nghiệm 4.2.5 - Nội dung 2)

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	F tính	F bảng
Nghiệm thức	6	5799,329	966,555	33,5656	0,0000
Sai số	28	806,289	28,796		
Tổng cộng	34	6605,618			

Coefficient of Variation: 15,52%

Phụ bảng 19: Bảng phân tích ANOVA cấp độ bệnh héo xanh vi khuẩn trên cây hoa cúc của các nghiệm thức xử lý TKT khác nhau trong điều kiện nhà lưới vào thời điểm 8 NSKLB (thí nghiệm 4.2.5 - Nội dung 2)

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	F tính	F bảng
Nghiệm thức	6	0,590	0,098	6,6769	0,0002
Sai số	28	0,412	0,015		
Tổng cộng	34	1,002			

Coefficient of Variation: 68.48%

Phụ bảng 20: Bảng phân tích ANOVA cấp độ bệnh héo xanh vi khuẩn trên cây hoa cúc của các nghiệm thức xử lý TKT khác nhau trong điều kiện nhà lưới vào thời điểm 14 NSKLB (thí nghiệm 4.2.5 - Nội dung 2)

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	F tính	F bảng
Nghiệm thức	6	5,807	0,968	12,2286	0,0000
Sai số	28	2,216	0,079		
Tổng cộng	34	8,023			

Coefficient of Variation: 45,80%

Phụ bảng 21: Bảng phân tích ANOVA cấp độ bệnh héo xanh vi khuẩn trên cây hoa cúc của các nghiệm thức xử lý TKT khác nhau trong điều kiện nhà lưới vào thời điểm 20 NSKLB (thí nghiệm 4.2.5 - Nội dung 2)

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	F tính	F bảng
Nghiệm thức	6	13,286	2,214	21,6480	0,0000
Sai số	28	2,864	0,102		
Tổng cộng	34	16,150			

Coefficient of Variation: 31,44%

Phụ bảng 22: Bảng phân tích ANOVA cấp độ bệnh héo xanh vi khuẩn trên cây hoa cúc của các nghiệm thức xử lý TKT khác nhau trong điều kiện nhà lưới vào thời điểm 26 NSKLB (thí nghiệm 4.2.5 - Nội dung 2)

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	F tính	F bảng
Nghiệm thức	6	26,951	4,492	40,9943	0,0000
Sai số	28	3,068	0,110		
Tổng cộng	34	30,019			

Coefficient of Variation: 22,58%

Phụ bảng 23: Bảng phân tích ANOVA diện tích bên dưới đường cong tiến triển bệnh héo xanh vi khuẩn trên cây hoa cúc của các nghiệm thức xử lý TKT khác nhau trong điều kiện nhà lưới (thí nghiệm 4.2.5-Nội dung 2)

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	F tính	F bảng
Nghiệm thức	6	2526314,28	421052,381	24,5696	0,0000
Sai số	28	479840,000	17137,143		
Tổng cộng	34	3006154,28	6		

Coefficient of Variation: 29,67%

Phụ bảng 24: Bảng phân tích ANOVA tỷ lệ bệnh héo xanh vi khuẩn trên cây hoa cúc khi xử lý hai dòng TKT qua ba thời điểm xử lý khác nhau trong điều kiện nhà lưới vào thời điểm 8 NSKLB (thí nghiệm 4.2.6 - Nội dung 2)

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	F tính	F bảng
Thực khuẩn thể (A)	2	64,915	32,457	90,8120	0,0000
Thời điểm xử lý (B)	2	2,001	1,501	4,1986	0,258
AxB	4	6,003	1,501	4,1986	0,0090
Sai số	27	9,650	0,357		
Tổng cộng	35	83,569			

Coefficient of Variation: 30,67%

Phụ bảng 25: Bảng phân tích ANOVA tỷ lệ bệnh héo xanh vi khuẩn trên cây hoa cúc khi xử lý hai dòng TKT qua ba thời điểm xử lý khác nhau trong điều kiện nhà lưới vào thời điểm 12 NSKLB (thí nghiệm 4.2.6 - Nội dung 2)

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	F tính	F bảng
Thực khuẩn thể (A)	2	80,438	40,219	129,8465	0,0000
Thời điểm xử lý (B)	2	3,001	1,501	4,8447	0,0159
AxB	4	6,003	1,501	4,8447	0,0045
Sai số	27	8,363	0,310		
Tổng cộng	35	97,805			

Coefficient of Variation: 27,04%

Phụ bảng 26: Bảng phân tích ANOVA tỷ lệ bệnh héo xanh vi khuẩn trên cây hoa cúc khi xử lý hai dòng TKT qua ba thời điểm xử lý khác nhau trong điều kiện nhà lưới vào thời điểm 16 NSKLB (thí nghiệm 4.2.6 - Nội dung 2)

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	F tính	F bảng
Thực khuẩn thể (A)	2	4707,215	2353,607	29,3027	0,0000
Thời điểm xử lý (B)	2	282,264	141,132	1,7571	0,1917
AxB	4	179,784	44,946	0,5596	
Sai số	27	2168,654	80,321		
Tổng cộng	35	7337,917			

Coefficient of Variation: 38,48%

Phụ bảng 27: Bảng phân tích ANOVA tỷ lệ bệnh héo xanh vi khuẩn trên cây hoa cúc khi xử lý hai dòng TKT qua ba thời điểm xử lý khác nhau trong điều kiện nhà lưới vào thời điểm 20 NSKLB (thí nghiệm 4.2.6 - Nội dung 2)

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	F tính	F bảng
Thực khuẩn thể (A)	2	5028,720	2514,360	83,8563	0,0000
Thời điểm xử lý (B)	2	300,655	150,328	5,0136	0,0141
AxB	4	255,247	63,812	2,1282	0,1048
Sai số	27	809,572	29,984		
Tổng cộng	35	6394,195			

Coefficient of Variation: 18,22%

Phụ bảng 28: Bảng phân tích ANOVA tỷ lệ bệnh héo xanh vi khuẩn trên cây hoa cúc khi xử lý hai dòng TKT qua ba thời điểm xử lý khác nhau trong điều kiện nhà lưới vào thời điểm 24 NSKLB (thí nghiệm 4.2.6 - Nội dung 2)

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	F tính	F bảng
Thực khuẩn thể (A)	2	6919,526	3459,763	96,5431	0,0000
Thời điểm xử lý (B)	2	510,482	255,241	7,1224	0,0033
AxB	4	258,767	64,692	1,8052	0,1570
Sai số	27	967,585	35,836		
Tổng cộng	35	8656,360			

Coefficient of Variation: 16,43%

Phụ bảng 29: Bảng phân tích ANOVA chỉ số (AUDPC) do vi khuẩn *R. solanacearum* khi xử lý hai dòng TKT qua ba thời điểm xử lý khác nhau trong điều kiện nhà lưới (thí nghiệm 4.2.6 - Nội dung 2)

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	F tính	F bảng
Thực khuẩn thể (A)	2	1378550,000	689275,000	121,4185	0,0000
Thời điểm xử lý (B)	2	54016,667	27008,333	4,7576	0,0170
AxB	4	38033,333	95,08,333	1,6749	0,1848
Sai số	27	153275,000	5676,852		
Tổng cộng	34	1623875,000			

Coefficient of Variation: 27,48%

Phụ bảng 30: Bảng phân tích ANOVA tỷ lệ bệnh héo xanh vi khuẩn trên cây hoa cúc khi xử lý ΦBT56 ở các nồng độ khác nhau trong điều kiện nhà lưới 8 NSKLB (thí nghiệm 4.2.7 - Nội dung 2)

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	F tính	F bảng
Nghiệm thức	3	25,818	8,606	13,3795	0,0004
Sai số	12	7,719	0,643		
Tổng cộng	15	33,536			

Coefficient of Variation: 44,74%

Phụ bảng 31: Bảng phân tích ANOVA tỷ lệ bệnh héo xanh vi khuẩn trên cây hoa cúc khi xử lý ΦBT56 ở các nồng độ khác nhau trong điều kiện nhà lưới 12 NSKLB (thí nghiệm 4.2.7 - Nội dung 2)

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	F tính	F bảng
Nghiệm thức	3	38,920	12,973	11,2300	0,0008
Sai số	12	13,863	1,155		
Tổng cộng	15	52,783			

Coefficient of Variation: 54,52%

Phụ bảng 32: Bảng phân tích ANOVA tỷ lệ bệnh héo xanh vi khuẩn trên cây hoa cúc khi xử lý ΦBT56 ở các nồng độ khác nhau trong điều kiện nhà lưới 16 NSKLB (thí nghiệm 4.2.7 - Nội dung 2)

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	F tính	F bảng
Nghiệm thức	3	2032,539	677,513	10,4384	0,0012
Sai số	12	778,867	64,906		
Tổng cộng	15	2811,406			

Coefficient of Variation: 44,58%

Phụ bảng 33: Bảng phân tích ANOVA tỷ lệ bệnh héo xanh vi khuẩn trên cây hoa cúc khi xử lý ΦBT56 ở các nồng độ khác nhau trong điều kiện nhà lưới 20 NSKLB (thí nghiệm 4.2.7 - Nội dung 2)

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	F tính	F bảng
Nghiệm thức	3	1554,777	518,259	15,3051	0,0002
Sai số	12	406,343	33,862		
Tổng cộng	15	1961,120			

Coefficient of Variation: 21,17%

Phụ bảng 34: Bảng phân tích ANOVA tỷ lệ bệnh héo xanh vi khuẩn trên cây hoa cúc khi xử lý ΦBT56 ở các nồng độ khác nhau trong điều kiện nhà lưới 24 NSKLB (thí nghiệm 4.2.7 - Nội dung 2)

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	F tính	F bảng
Nghiệm thức	3	1701,356	567,119	23,6510	0,0000
Sai số	12	287,744	23,979		
Tổng cộng	15	1989,100			

Coefficient of Variation: 15,99%

Phụ bảng 35: Bảng phân tích ANOVA tỷ lệ bệnh héo xanh vi khuẩn trên cây hoa cúc khi xử lý ΦBT56 ở các nồng độ khác nhau trong điều kiện nhà lưới 28 NSKLB (thí nghiệm 4.2.7 - Nội dung 2)

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	F tính	F bảng
Nghiệm thức	3	2338,295	779,432	39,0583	0,0000
Sai số	12	239,467	19,956		
Tổng cộng	15	2577,762			

Coefficient of Variation: 13,02%

Phụ bảng 36: Bảng phân tích ANOVA chỉ số (AUDPC) do vi khuẩn *R. solanacearum* khi xử lý TKT ở các mật số khác nhau trong điều kiện nhà lưới (thí nghiệm 4.2.7 - Nội dung 2)

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	F tính	F bảng
Nghiệm thức	3	1046475,000	348825,000	48,7299	0,0000
Sai số	12	85900,000	7158,333		
Tổng cộng	15	1132375,000			

Coefficient of Variation: 23,42%

Phụ bảng 37: Bảng phân tích ANOVA cấp bệnh héo xanh vi khuẩn trên cây hoa cúc khi xử lý ΦBT56 ở các nồng độ khác nhau trong điều kiện nhà lưới 8 NSKLB (thí nghiệm 4.2.7 - Nội dung 2)

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	F tính	F bảng
Nghiệm thức	3	0,672	0,224	8,2061	0,0031
Sai số	12	0,328	0,027		
Tổng cộng	15	0,999			

Coefficient of Variation: 105,73%

Phụ bảng 38: Bảng phân tích ANOVA cấp bệnh héo xanh vi khuẩn trên cây hoa cúc khi xử lý ΦBT56 ở các nồng độ khác nhau trong điều kiện nhà lưới 12 NSKLB (thí nghiệm 4.2.7 - Nội dung 2)

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	F tính	F bảng
Nghiệm thức	3	3,032	1,011	8,5556	0,0026
Sai số	12	1,417	0,118		
Tổng cộng	15	4,449			

Coefficient of Variation: 112,23%

Phụ bảng 39: Bảng phân tích ANOVA cấp bệnh héo xanh vi khuẩn trên cây hoa cúc khi xử lý ΦBT56 ở các nồng độ khác nhau trong điều kiện nhà lưới 16 NSKLB (thí nghiệm 4.2.7 - Nội dung 2)

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	F tính	F bảng
Nghiệm thức	3	4,722	1,574	12,9828	0,0004
Sai số	12	1,455	0,121		
Tổng cộng	15	6,177			

Coefficient of Variation: 59,27%

Phụ bảng 40: Bảng phân tích ANOVA cấp bệnh héo xanh vi khuẩn trên cây hoa cúc khi xử lý ΦBT56 ở các nồng độ khác nhau trong điều kiện nhà lưới 20 NSKLB (thí nghiệm 4.2.7 - Nội dung 2)

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	F tính	F bảng
Nghiệm thức	3	5,567	1,856	15,4904	0,0002
Sai số	12	1,438	0,120		
Tổng cộng	15	7,004			

Coefficient of Variation: 39,27%

Phụ bảng 41: Bảng phân tích ANOVA cấp bệnh héo xanh vi khuẩn trên cây hoa cúc khi xử lý ΦBT56 ở các nồng độ khác nhau trong điều kiện nhà lưới 24 NSKLB (thí nghiệm 4.2.7 - Nội dung 2)

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	F tính	F bảng
Nghiệm thức	3	8,612	2,871	34,7078	0,0000
Sai số	12	0,992	0,083		
Tổng cộng	15	9,604			

Coefficient of Variation: 25,71%

Phụ bảng 42: Bảng phân tích ANOVA cấp bệnh héo xanh vi khuẩn trên cây hoa cúc khi xử lý ΦBT56 ở các nồng độ khác nhau trong điều kiện nhà lưới 28 NSKLB (thí nghiệm 4.2.7 - Nội dung 2)

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	F tính	F bảng
Nghiệm thức	3	12,835	4,278	48,2066	0,0000
Sai số	12	1,065	0,089		
Tổng cộng	15	13,900			

Coefficient of Variation: 21,28%

Nội dung 3: Xác định loại thuốc hóa học có hiệu lực ức chế vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* gây bệnh héo xanh trên cây hoa Cúc trong phòng thí nghiệm và hiệu quả phòng trừ bệnh ở điều kiện nhà lưới.

Phụ bảng 43 : Bảng phân tích ANOVA đường kính vòng vô khuẩn ở thời điểm 24 giờ (thí nghiệm 4.3.1-Nội dung 3)

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	F tính	F bảng
Nghiệm thức	13	2,699	0,208	894,4239	0,0000
Sai số	42	0,010	0,000		
Tổng cộng	55	2,709			

Coefficient of Variation: 10,53%

Phụ bảng 44: Bảng phân tích ANOVA đường kính vòng vô khuẩn ở thời điểm 48 giờ (thí nghiệm 4.3.1-Nội dung 3)

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	F tính	F bảng
Nghiệm thức	13	2,282	0,176	164,6608	0,0000
Sai số	42	0,045	0,001		
Tổng cộng	55	2,327			

Coefficient of Variation: 22,11%

Phụ bảng 45: Bảng phân tích ANOVA đường kính vòng vô khuẩn ở thời điểm 72 giờ (thí nghiệm 4.3.1-Nội dung 3)

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	F tính	F bảng
Nghiệm thức	13	2,281	0,175	231,4133	0,0000
Sai số	42	0,032	0,001		
Tổng cộng	55	2,313			

Coefficient of Variation: 18,99%

Phụ bảng 46: Bảng phân tích ANOVA tỷ lệ bệnh héo xanh vào thời điểm 6 NSKLB (thí nghiệm 4.3.2-Nội dung 3)

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	F tính	F bảng
Thuốc hóa học (A)	3	42,042	14,014	14,6255	0,0000
Thời điểm xử lý (B)	2	39,037	19,519	20,3700	0,0000
AxB	6	14,649	2,441	2,5480	0,0369
Sai số	36	34,495	0,958		
Tổng cộng	47	130,223			

Coefficient of Variation: 44,52%

Phụ bảng 47 : Bảng phân tích ANOVA tỷ lệ bệnh héo xanh vào thời điểm 10 NSKLB (thí nghiệm 4.3.2-Nội dung 3)

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	F tính	F bảng
Thuốc hóa học (A)	3	2506,405	835,468	9,2895	0,0001
Thời điểm xử lý (B)	2	1208,517	604,259	6,7187	0,0033
AxB	6	578,641	96,440	1,0723	0,3971
Sai số	36	3237,735	89,937		
Tổng cộng	47	7531,299			

Coefficient of Variation: 63,02%

Phụ bảng 48: Bảng phân tích ANOVA tỷ lệ bệnh héo xanh vào thời điểm 26 NSKLB (thí nghiệm 4.3.2-Nội dung 3)

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	F tính	F bảng
Thuốc hóa học (A)	3	10057,719	3352,573	46,4869	0,0000
Thời điểm xử lý (B)	2	1449,782	724,891	10,0514	0,0003
AxB	6	689,419	116,403	1,6141	0,1716
Sai số	36	2596,271	72,119		
Tổng cộng	47	14802,191			

Coefficient of Variation: 28,94%

Phụ bảng 49: Bảng phân tích ANOVA chỉ số AUDPC do vi khuẩn *R. solanacearum* qua các thời điểm xử lý hoạt chất hoá học trong điều kiện nhà lưới (thí nghiệm 4.3.2-Nội dung 3)

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	F tính	F bảng
Thuốc hóa học (A)	3	2847766,667	969255,556	64,0908	0,0000
Thời điểm xử lý (B)	2	396150,000	198075,000	13,3734	0,0000
AxB	6	173783,333	28963,889	1,9556	0,0982
Sai số	36	533200,000	14811,111		
Tổng cộng	47	3950900,000			

Coefficient of Variation: 34,53%

Nội dung 4: Đánh giá hiệu quả phòng trị của thực khuẩn thể được chọn đối với bệnh héo xanh do vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* trên cây hoa Cúc ở điều kiện ngoài đồng.

Phụ bảng 50: Bảng phân tích ANOVA tỷ lệ bệnh héo xanh trên cây hoa Cúc của các nghiệm thức tại Cần Thơ ở điều kiện có lây bệnh nhân tạo tại thời điểm 9 NSKLB (thí nghiệm 4.4.1-Nội dung 4).

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	F tính	F bảng
Lặp lại	3	2,162	0,721	1,3820	0,2803
Nghiệm thức	6	12,583	2,097	4,0213	0,0099
Sai số	18	9,387	0,522		
Tổng cộng	27	24,132			

Coefficient of Variation: 41,52%

Phụ bảng 51: Bảng phân tích ANOVA tỷ lệ bệnh héo xanh trên cây hoa Cúc của các nghiệm thức tại Cần Thơ ở điều kiện có lây bệnh nhân tạo tại thời điểm 29 NSKLB (thí nghiệm 4.4.1-Nội dung 4).

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	F tính	F bảng
Lặp lại	3	3,677	1,226	2,2678	0,1154
Nghiệm thức	6	23,288	3,881	7,1816	0,0005
Sai số	18	9,728	0,540		
Tổng cộng	27	36,694			

Coefficient of Variation: 33,20%

Phụ bảng 52: Bảng phân tích ANOVA tỷ lệ bệnh héo xanh trên cây hoa Cúc của các nghiệm thức tại Cần Thơ ở điều kiện có lây bệnh nhân tạo tại thời điểm 49 NSKLB (thí nghiệm 4.4.1-Nội dung 4).

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	F tính	F bảng
Lặp lại	3	62,490	20,830	1,5339	0,2400
Nghiệm thức	6	2370,013	395,002	29,0881	0,0000
Sai số	18	244,432	13,580		
Tổng cộng	27	2676,935			

Coefficient of Variation: 21,15%

Phụ bảng 53: Bảng phân tích ANOVA tỷ lệ bệnh héo xanh trên cây hoa Cúc của các nghiệm thức tại Cần Thơ ở điều kiện có lây bệnh nhân tạo tại thời điểm 59 NSKLB (thí nghiệm 4.4.1-Nội dung 4).

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	F tính	F bảng
Lặp lại	3	54,954	18,318	2,4838	0,0937
Nghiệm thức	6	2812,794	468,799	63,5649	0,0000
Sai số	18	132,752	7,375		
Tổng cộng	27	3000,500			

Coefficient of Variation: 13,72%

Phụ bảng 54: Bảng phân tích ANOVA trung bình cấp bệnh héo xanh trên cây hoa Cúc của các nghiệm thức tại Cần Thơ ở điều kiện có lây bệnh nhân tạo tại thời điểm 9 NSKLB (thí nghiệm 4.4.1-Nội dung 4).

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	F tính	F bảng
Lặp lại	3	0,041	0,014	2,0694	0,1401
Nghiệm thức	6	0,187	0,031	4,6667	0,0050
Sai số	18	0,120	0,007		
Tổng cộng	27	0,348			

Coefficient of Variation: 75,37%

Phụ bảng 55: Bảng phân tích ANOVA trung bình cấp bệnh héo xanh trên cây hoa Cúc của các nghiệm thức tại Cần Thơ ở điều kiện có lây bệnh nhân tạo tại thời điểm 29 NSKLB (thí nghiệm 4.4.1-Nội dung 4).

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	F tính	F bảng
Lặp lại	3	0,123	0,041	2,0436	0,1438
Nghiệm thức	6	0,974	0,162	8,0686	0,0002
Sai số	18	0,362	0,020		
Tổng cộng	27	1,459			

Coefficient of Variation: 56,46%

Phụ bảng 56: Bảng phân tích ANOVA trung bình cấp bệnh héo xanh trên cây hoa Cúc của các nghiệm thức tại Cần Thơ ở điều kiện có lây bệnh nhân tạo tại thời điểm 49 NSKLB (thí nghiệm 4.4.1-Nội dung 4).

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	F tính	F bảng
Lặp lại	3	0,068	0,023	1,2493	0,3213
Nghiệm thức	6	3,969	0,662	36,6023	0,0000
Sai số	18	0,325	0,018		
Tổng cộng	27	4,362			

Coefficient of Variation: 27,21%

Phụ bảng 57: Bảng phân tích ANOVA trung bình cấp bệnh héo xanh trên cây hoa Cúc của các nghiệm thức tại Cần Thơ ở điều kiện có lây bệnh nhân tạo tại thời điểm 59 NSKLB (thí nghiệm 4.4.1-Nội dung 4).

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	F tính	F bảng
Lặp lại	3	0,202	0,067	3,4671	0,0380
Nghiệm thức	6	6,827	1,138	58,4878	0,0000
Sai số	18	0,350	0,019		
Tổng cộng	27	7,379			

Coefficient of Variation: 21,74%

Phụ bảng 58: Bảng phân tích ANOVA chỉ số AUDPC bệnh héo xanh trên cây hoa Cúc của các nghiệm thức tại Cần Thơ (thí nghiệm 4.4.1-Nội dung 4).

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	F tính	F bảng
Lặp lại	3	100582,499	33527,500	2,2463	0,1178
Nghiệm thức	6	3438256,438	573042,740	38,3925	0,0000
Sai số	18	268666,102	14925,895		
Tổng cộng	27	3807505,039			

Coefficient of Variation: 25,69%

Phụ bảng 59: Bảng phân tích ANOVA hiệu quả giảm bệnh héo xanh trên cây hoa Cúc của các nghiệm thức tại Cần Thơ ở điều kiện có lây bệnh nhân tạo tại thời điểm 9 NSKLB (thí nghiệm 4.4.1-Nội dung 4).

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	F tính	F bảng
Lặp lại	3	2534,72	844,907	0,95	0,4423
Nghiệm thức	5	16307,87	3261,574	3,66	0,0230
Sai số	15	13368,06	891,204		
Tổng cộng	23	32210,65			

Coefficient of Variation: 55,83%

Phụ bảng 60: Bảng phân tích ANOVA hiệu quả giảm bệnh héo xanh trên cây hoa Cúc của các nghiệm thức tại Cần Thơ ở điều kiện có lây bệnh nhân tạo tại thời điểm 29 NSKLB (thí nghiệm 4.4.1-Nội dung 4).

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	F tính	F bảng
Lặp lại	3	5147,57	1715,856	3,43	0,0445
Nghiệm thức	5	15813,08	3162,616	6,32	0,0024
Sai số	15	7508,68	500,579		
Tổng cộng	23	28469,33			

Coefficient of Variation: 43,25%

Phụ bảng 61: Bảng phân tích ANOVA hiệu quả giảm bệnh héo xanh trên cây hoa Cúc của các nghiệm thức tại Cần Thơ ở điều kiện có lây bệnh nhân tạo tại thời điểm 49 NSKLB (thí nghiệm 4.4.1-Nội dung 4).

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	F tính	F bảng
Lặp lại	3	660,08	220,027	2,00	0,1571
Nghiệm thức	5	17778,81	3555,761	32,34	0,0000
Sai số	15	1649,18	109,945		
Tổng cộng	23	20088,07			

Coefficient of Variation: 18,38%

Phụ bảng 62: Bảng phân tích ANOVA hiệu quả giảm bệnh héo xanh trên cây hoa Cúc của các nghiệm thức tại Cần Thơ ở điều kiện có lây bệnh nhân tạo tại thời điểm 59 NSKLB (thí nghiệm 4.4.1-Nội dung 4).

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	F tính	F bảng
Lặp lại	3	361,37	120,457	1,77	0,1957
Nghiệm thức	5	16756,53	3351,307	49,28	0,0000
Sai số	15	1020,05	68,004		
Tổng cộng	23	18137,96			

Coefficient of Variation: 14,83%

Phụ bảng 63: Bảng phân tích ANOVA tỷ lệ bệnh héo xanh của cây hoa Cúc ở các nghiệm thức ngoài đồng tại tỉnh Đồng Tháp trong điều kiện có lây bệnh nhân tạo với 3 dòng vi khuẩn *R. solanacearum* tại thời điểm 16 NSKLB (thí nghiệm 4.4.2-Nội dung 4).

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	F tính	F bảng
Lặp lại	3	3,359	1,120	0,1002	
Nghiệm thức	6	2010,256	335,043	29,9696	0,0000
Sai số	18	201,229	11,179		
Tổng cộng	27	2214,844			

Coefficient of Variation: 15,71%

Phụ bảng 64: Bảng phân tích ANOVA tỷ lệ bệnh héo xanh của cây hoa Cúc ở các nghiệm thức ngoài đồng tại tỉnh Đồng Tháp trong điều kiện có lây bệnh nhân tạo với 3 dòng vi khuẩn *R. solanacearum* tại thời điểm 36 NSKLB (thí nghiệm 4.4.2-Nội dung 4).

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	F tính	F bảng
Lặp lại	3	51,977	17,326	0,6041	
Nghiệm thức	6	2747,144	457,857	15,9637	0,0000
Sai số	18	516,262	28,681		
Tổng cộng	27	3315,383			

Coefficient of Variation: 15,89%

Phụ bảng 65: Bảng phân tích ANOVA tỷ lệ bệnh héo xanh của cây hoa Cúc ở các nghiệm thức ngoài đồng tại tỉnh Đồng Tháp trong điều kiện có lây bệnh nhân tạo với 3 dòng vi khuẩn *R. solanacearum* tại thời điểm 56 NSKLB (thí nghiệm 4.4.2-Nội dung 4).

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	F tính	F bảng
Lặp lại	3	88,413	29,471	1,7425	0,1942
Nghiệm thức	6	3091,404	515,234	30,4631	0,0000
Sai số	18	304,441	16,913		
Tổng cộng	27	3484,258			

Coefficient of Variation: 11,31%

Phụ bảng 66: Bảng phân tích ANOVA chi số AUDPC bệnh héo xanh của cây hoa Cúc ở các nghiệm thức ngoài đồng tại tỉnh Đồng Tháp trong điều kiện có lây bệnh nhân tạo với 3 dòng vi khuẩn *R. Solanacearum* (thí nghiệm 4.4.2-Nội dung 4).

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	F tính	F bảng
Lặp lại	3	96111,108	32037,036	0,8987	
Nghiệm thức	6	12288808,805	2048134,801	57,4542	0,0000
Sai số	18	641666,683	35648,149		
Tổng cộng	27	13026586,597			

Coefficient of Variation: 15,37%

Phụ bảng 67: Bảng phân tích ANOVA trung bình cấp bệnh héo xanh của cây hoa Cúc ở các nghiệm thức ngoài đồng tại tỉnh Đồng Tháp trong điều kiện có lây bệnh nhân tạo với 3 dòng vi khuẩn *R. solanacearum* tại thời điểm 16 NSKLB (thí nghiệm 4.4.2-Nội dung 4).

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	F tính	F bảng
Lặp lại	3	0,020	0,007	0,2694	
Nghiệm thức	6	3,392	0,565	23,0348	0,0000
Sai số	18	0,442	0,025		
Tổng cộng	27	3,854			

Coefficient of Variation: 36,76%

Phụ bảng 68: Bảng phân tích ANOVA trung bình cấp bệnh héo xanh của cây hoa Cúc ở các nghiệm thức ngoài đồng tại tỉnh Đồng Tháp trong điều kiện có lây bệnh nhân tạo với 3 dòng vi khuẩn *R. solanacearum* tại thời điểm 36 NSKLB (thí nghiệm 4.4.2-Nội dung 4).

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	F tính	F bảng
Lặp lại	3	0,275	0,092	0,4603	
Nghiệm thức	6	17,553	2,926	14,6762	0,0000
Sai số	18	3,588	0,199		
Tổng cộng	27	21,417			

Coefficient of Variation: 29,48%

Phụ bảng 69: Bảng phân tích ANOVA trung bình cấp bệnh héo xanh của cây hoa Cúc ở các nghiệm thức ngoài đồng tại tỉnh Đồng Tháp trong điều kiện có lây bệnh nhân tạo với 3 dòng vi khuẩn *R. solanacearum* tại thời điểm 56 NSKLB (thí nghiệm 4.4.2-Nội dung 4).

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	F tính	F bảng
Lặp lại	3	0,475	0,158	1,5450	0,2373
Nghiệm thức	6	19,829	3,305	32,2241	0,0000
Sai số	18	1,846	0,103		
Tổng cộng	27	22,150			

Coefficient of Variation: 18,04%

Phụ bảng 70: Bảng phân tích ANOVA hiệu quả giảm bệnh héo xanh của thực khuẩn thể và thuốc hóa học trên cây hoa Cúc ở các nghiệm thức ngoài đồng tại tỉnh Đồng Tháp trong điều kiện có lây bệnh nhân tạo với 3 dòng vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* tại thời điểm 16 NSKLB (thí nghiệm 4.4.2-Nội dung 4).

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	F tính	F bảng
Lặp lại	3	195,66	65,221	1,88	0,1770
Nghiệm thức	5	19910,21	3982,041	114,54	0,0000
Sai số	15	521,47	34,765		
Tổng cộng	23	20677,34			

Coefficient of Variation: 8,13%

Phụ bảng 71: Bảng phân tích ANOVA hiệu quả giảm bệnh héo xanh của TKT và thuốc hóa học trên cây hoa Cúc ở các nghiệm thức ngoài đồng tại tỉnh Đồng Tháp trong điều kiện có lây bệnh nhân tạo với 3 dòng vi khuẩn *R. solanacearum* tại thời điểm 36 NSKLB (thí nghiệm 4.4.2-Nội dung 4).

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	F tính	F bảng
Lặp lại	3	491,67	163,889	0,74	0,5456
Nghiệm thức	5	13110,17	2622,034	11,81	0,0001
Sai số	15	3330,94	222,063		
Tổng cộng	23	16932,78			

Coefficient of Variation: 24,2%

Phụ bảng 72: Bảng phân tích ANOVA hiệu quả giảm bệnh héo xanh của thực TKT và thuốc hóa học trên cây hoa Cúc ở các nghiệm thức ngoài đồng tại tỉnh Đồng Tháp trong điều kiện có lây bệnh nhân tạo với 3 dòng vi khuẩn *R. solanacearum* tại thời điểm 56 NSKLB (thí nghiệm 4.4.2-Nội dung 4).

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	F tính	F bảng
Lặp lại	3	168,62	56,207	0,57	0,6413
Nghiệm thức	5	11919,36	2383,872	24,31	0,0000
Sai số	15	1470,89	98,060		
Tổng cộng	23	13558,88			

Coefficient of Variation: 17,1%

Phụ bảng 73: Bảng phân tích ANOVA tỷ lệ bệnh héo xanh trên cây hoa Cúc ở các nghiệm thức tại tỉnh Đồng Tháp trong điều kiện nhiễm bệnh tự nhiên tại thời điểm 41 NSKT (thí nghiệm 4.4.3-Nội dung 4).

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	F tính	F bảng
Lặp lại	3	14,29	4,762	1,48	0,2537
Nghiệm thức	6	510,32	85,053	26,42	0,0000
Sai số	18	57,94	3,219		
Tổng cộng	27	582,54			

Coefficient of Variation: 39,66%

Phụ bảng 74: Bảng phân tích ANOVA tỷ lệ bệnh héo xanh trên cây hoa Cúc ở các nghiệm thức tại tỉnh Đồng Tháp trong điều kiện nhiễm bệnh tự nhiên tại thời điểm 51 NSKT (thí nghiệm 4.4.3-Nội dung 4).

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	F tính	F bảng
Lặp lại	3	9,52	3,175	0,53	0,6653
Nghiệm thức	6	743,65	123,942	20,82	0,0000
Sai số	18	107,14	5,952		
Tổng cộng	27	860,32			

Coefficient of Variation: 39,41%

Phụ bảng 75: Bảng phân tích ANOVA tỷ lệ bệnh héo xanh trên cây hoa Cúc ở các nghiệm thức tại tỉnh Đồng Tháp trong điều kiện nhiễm bệnh tự nhiên tại thời điểm 81 NSKT (thí nghiệm 4.4.3-Nội dung 4).

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	F tính	F bảng
Lặp lại	3	7,84	2,646	0,38	0,7688
Nghiệm thức	6	2042,86	340,476	48,87	0,0000
Sai số	18	125,40	6,966		
Tổng cộng	27	2176,19			

Coefficient of Variation: 25,78%

Phụ bảng 76: Bảng phân tích ANOVA tỷ lệ bệnh héo xanh trên cây hoa Cúc ở các nghiệm thức tại tỉnh Đồng Tháp trong điều kiện nhiễm bệnh tự nhiên tại thời điểm 91 NSKT (thí nghiệm 4.4.3-Nội dung 4).

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	F tính	F bảng
Lặp lại	3	7,54	2,513	0,27	0,8461
Nghiệm thức	6	2165,87	360,979	38,80	0,0000
Sai số	18	167,46	9,303		
Tổng cộng	27	2340,87			

Coefficient of Variation: 29,45%

Phụ bảng 77: Bảng phân tích ANOVA trung bình cấp bệnh héo xanh trên cây hoa Cúc ở các nghiệm thức tại tỉnh Đồng Tháp trong điều kiện nhiễm bệnh tự nhiên tại thời điểm 41 NSKT (thí nghiệm 4.4.3-Nội dung 4).

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	F tính	F bảng
Lặp lại	3	0,01	0,005	1,84	0,1761
Nghiệm thức	6	0,32	0,054	20,70	0,0000
Sai số	18	0,05	0,003		
Tổng cộng	27	0,39			

Coefficient of Variation: 44,24%

Phụ bảng 78: Bảng phân tích ANOVA trung bình cấp bệnh héo xanh trên cây hoa Cúc ở các nghiệm thức tại tỉnh Đồng Tháp trong điều kiện nhiễm bệnh tự nhiên tại thời điểm 51 NSKT (thí nghiệm 4.4.3-Nội dung 4).

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	F tính	F bảng
Lặp lại	3	0,01	0,003	0,48	0,6992
Nghiệm thức	6	0,88	0,146	27,32	0,0000
Sai số	18	0,10	0,005		
Tổng cộng	27	0,98			

Coefficient of Variation: 37,72%

Phụ bảng 79: Bảng phân tích ANOVA trung bình cấp bệnh héo xanh trên cây hoa Cúc ở các nghiệm thức tại tỉnh Đồng Tháp trong điều kiện nhiễm bệnh tự nhiên vào thời điểm 81 NSKT (thí nghiệm 4.4.3-Nội dung 4).

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	F tính	F bảng
Lặp lại	3	0,02	0,006	0,52	0,6750
Nghiệm thức	6	3,88	0,646	56,01	0,0000
Sai số	18	0,21	0,012		
Tổng cộng	27	4,10			

Coefficient of Variation: 24,92%

Phụ bảng 80: Bảng phân tích ANOVA trung bình cấp bệnh héo xanh trên cây hoa Cúc ở các nghiệm thức tại tỉnh Đồng Tháp trong điều kiện nhiễm bệnh tự nhiên tại thời điểm 91 NSKT (thí nghiệm 4.4.3-Nội dung 4).

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	F tính	F bảng
Lặp lại	3	0,02	0,005	0,37	0,7729
Nghiệm thức	6	4,31	0,719	50,30	0,0000
Sai số	18	0,26	0,014		
Tổng cộng	27	4,59			

Coefficient of Variation: 26,57%

Phụ bảng 81: Bảng phân tích ANOVA chỉ số AUDPC bệnh héo xanh trên cây hoa Cúc ở các nghiệm thức tại tỉnh Đồng Tháp trong điều kiện nhiễm bệnh tự nhiên qua từng thời điểm (thí nghiệm 4.4.3-Nội dung 4).

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	F tính	F bảng
Lặp lại	3	35267,86	11755,953	1,18	0,3443
Nghiệm thức	6	5089920,74	848320,124	85,32	0,0000
Sai số	18	178968,26	9942,681		
Tổng cộng	27	5304156,86			

Coefficient of Variation: 19,92%

Phụ bảng 82: Bảng phân tích ANOVA hiệu quả giảm bệnh héo xanh trên cây hoa Cúc ở các nghiệm thức tại tỉnh Đồng Tháp trong điều kiện nhiễm bệnh tự nhiên tại thời điểm 41 NSKT (thí nghiệm 4.4.3-Nội dung 4).

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	F tính	F bảng
Lặp lại	3	9,92	3,307	0,02	0,9963
Nghiệm thức	6	37425,60	6237,599	35,65	0,0000
Sai số	18	3149,80	174,989		
Tổng cộng	27	40585,32			

Coefficient of Variation: 21,58%

Phụ bảng 83: Bảng phân tích ANOVA hiệu quả giảm bệnh héo xanh trên cây hoa Cúc ở các nghiệm thức tại tỉnh Đồng Tháp trong điều kiện nhiễm bệnh tự nhiên tại thời điểm 51 NSKT (thí nghiệm 4.4.3-Nội dung 4).

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	F tính	F bảng
Lặp lại	3	1426,98	475,661	2,78	0,0708
Nghiệm thức	6	29857,94	4976,323	29,10	0,0000
Sai số	18	3078,57	171,032		
Tổng cộng	27	34363,49			

Coefficient of Variation: 22,06%

Phụ bảng 84: Bảng phân tích ANOVA hiệu quả giảm bệnh héo xanh trên cây hoa Cúc ở các nghiệm thức tại tỉnh Đồng Tháp trong điều kiện nhiễm bệnh tự nhiên tại thời điểm 81 NSKT (thí nghiệm 4.4.3-Nội dung 4).

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	F tính	F bảng
Lặp lại	3	458,04	152,679	1,66	0,2115
Nghiệm thức	6	24245,98	4040,997	43,88	0,0000
Sai số	18	1657,59	92,088		
Tổng cộng	27	26361,61			

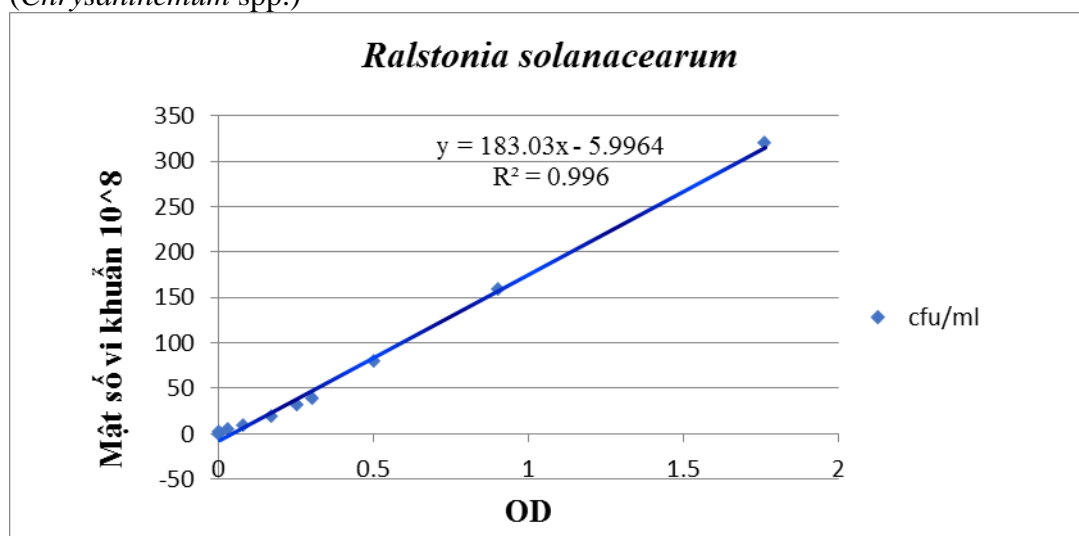
Coefficient of Variation: 15,31%

Phụ bảng 85: Bảng phân tích ANOVA hiệu lực phòng trừ bệnh héo xanh trên cây hoa Cúc ở các nghiệm thức tại tỉnh Đồng Tháp trong điều kiện nhiễm bệnh tự nhiên tại thời điểm 91 NSKT (thí nghiệm 4.4.3-Nội dung 4).

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	F tính	F bảng
Lặp lại	3	1450,89	483,631	3,79	0,0288
Nghiệm thức	6	22998,73	3833,121	30,00	0,0000
Sai số	18	2299,75	127,764		
Tổng cộng	27	26749,37			

Coefficient of Variation: 18,35%

Phụ hình 1: Đường chuẩn mật số vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* trên cây hoa cúc (*Chrysanthemum* spp.)



MỘT SỐ HÌNH THU MẪU, PHÂN LẬP VI KHUẨN, THỰC KHUẨN THỂ, CÁC THÍ NGHIỆM NHÀ LƯỚI VÀ NGOÀI ĐỒNG.



Thu mẫu tại tỉnh Bến Tre



Thu mẫu tại tỉnh Tiền Giang



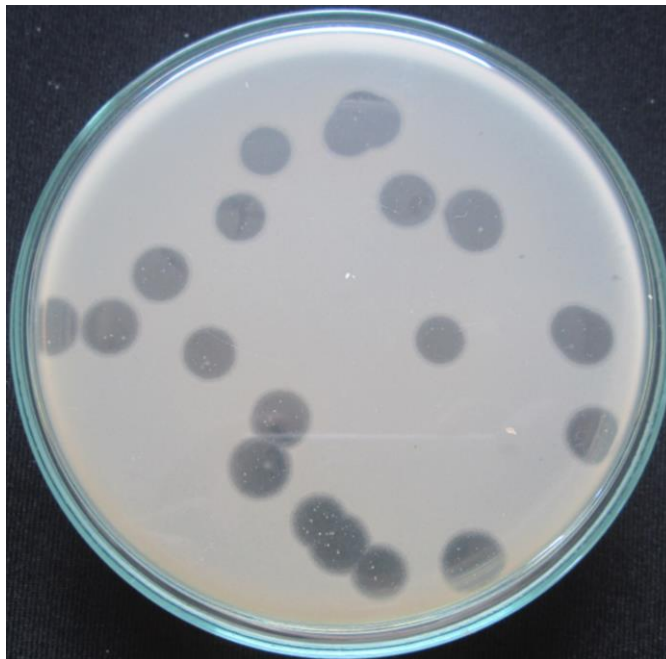
Thu mẫu tại tỉnh Tiền Giang



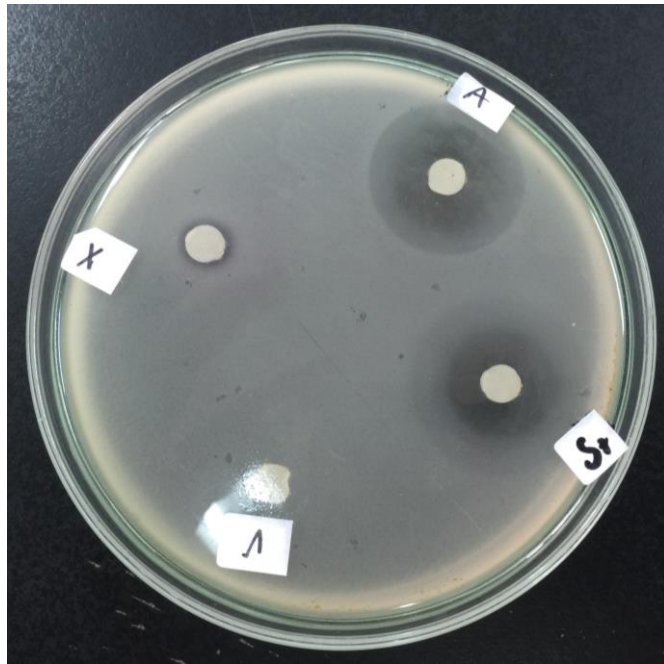
Hình Cúc bệnh ở TP. Sa Đéc, tỉnh Đồng Tháp



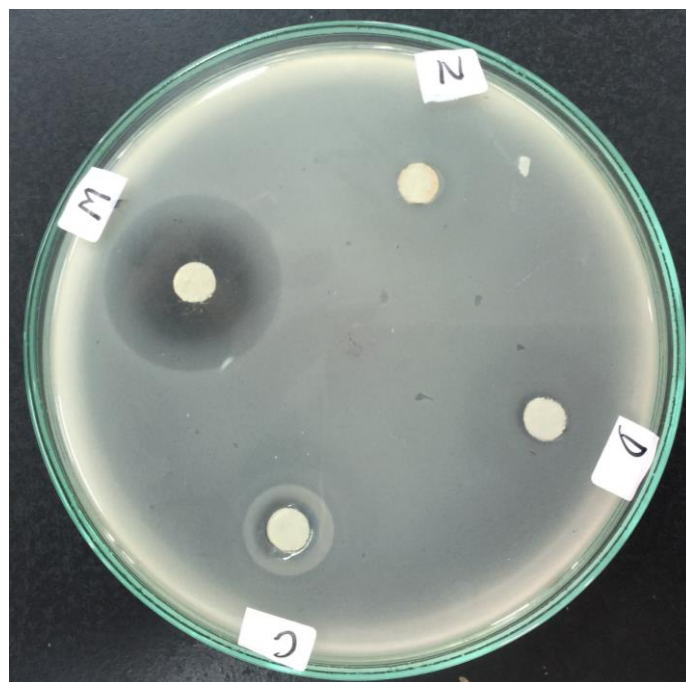
Hình phân lập vi khuẩn *Ralstonia solanacearum*



TKT (Φ BT67) ở thời điểm 48 GSKNN trên dòng vi khuẩn BT134



Hình thí nghiệm đánh giá khả năng ức chế của các hoạt chất hoá học ở điều kiện *in vitro*



Hình thí nghiệm đánh giá khả năng ức chế của các hoạt chất hoá học ở điều kiện *in vitro*



Hình thí nghiệm ở nhà lưới



Hình thí nghiệm ở nhà lưới



Hình thí nghiệm ở nhà lưới



Hình thí nghiệm ở ngoài đồng



Hình thí nghiệm ở ngoài đồng



Hình thí nghiệm ở ngoài đồng



Hình thí nghiệm ở ngoài đồng



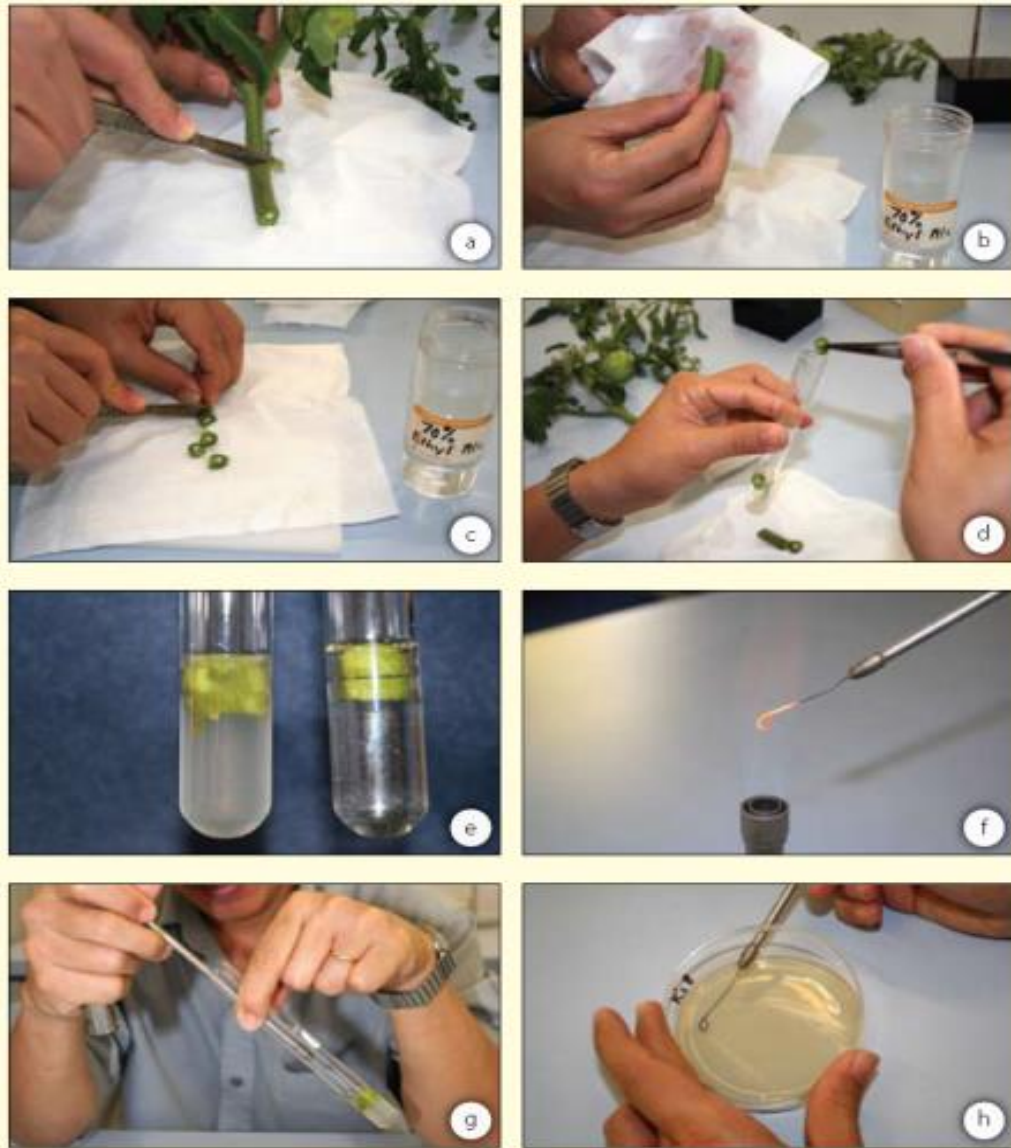
Hình thí nghiệm ở ngoài đồng



Hình thí nghiệm ở ngoài đồng

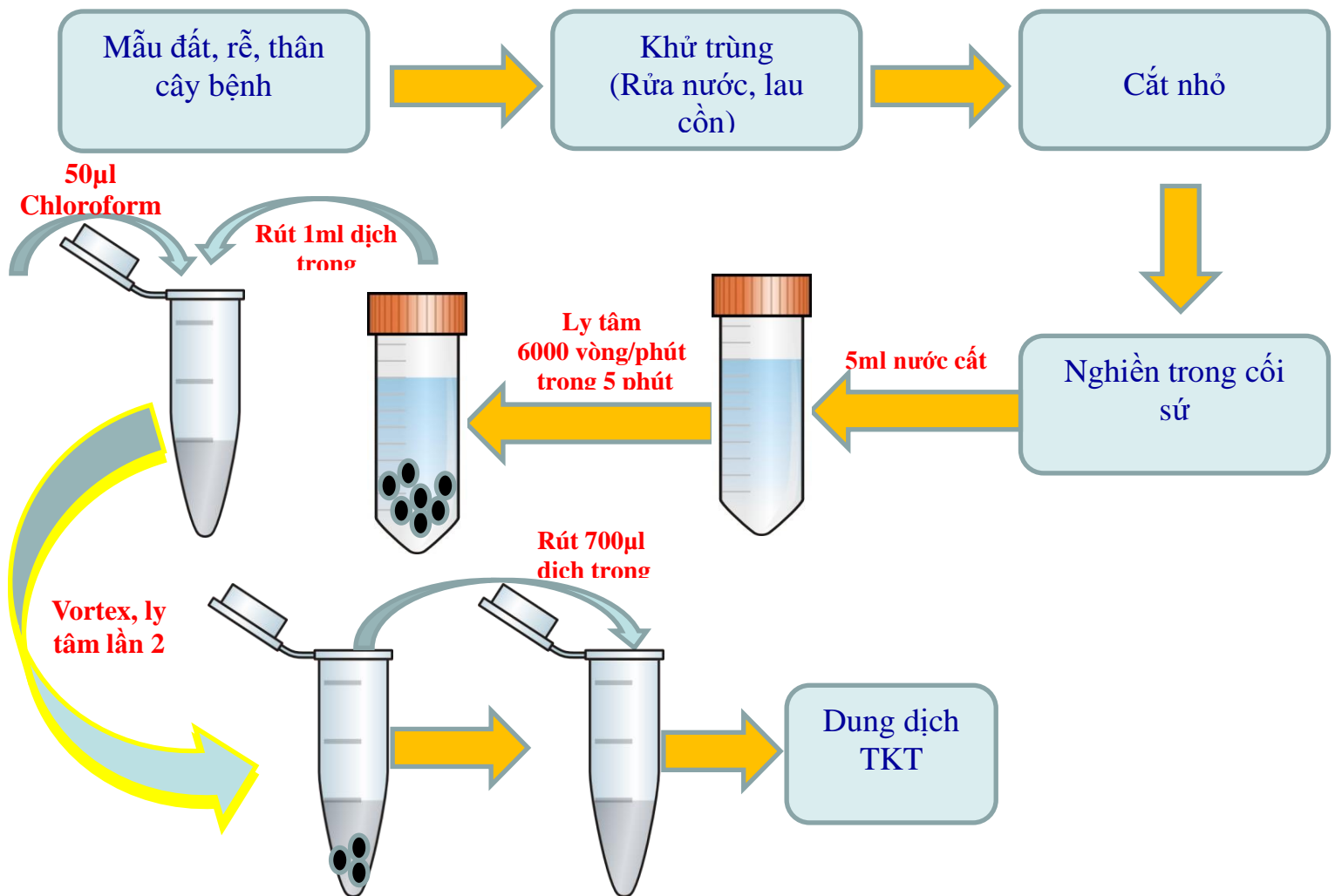
PHÂN LẬP VI KHUẨN *Ralstonia solanacearum*

(Mehan & McDonald 1995; Burgess *et al.*, 2009)



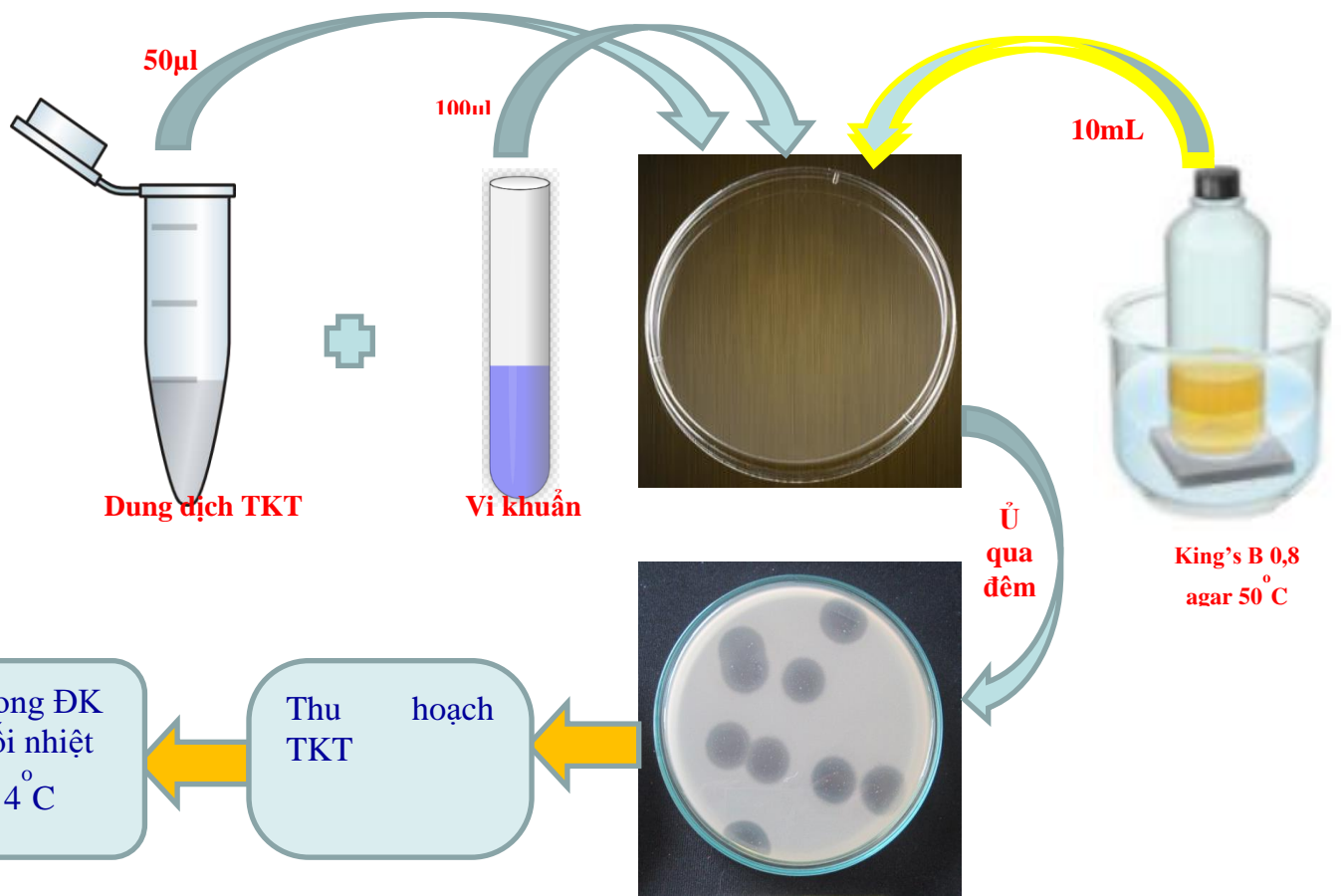
PHÂN LẬP THỰC KHUẨN THỂ

(Nga & Tâm, 2014)

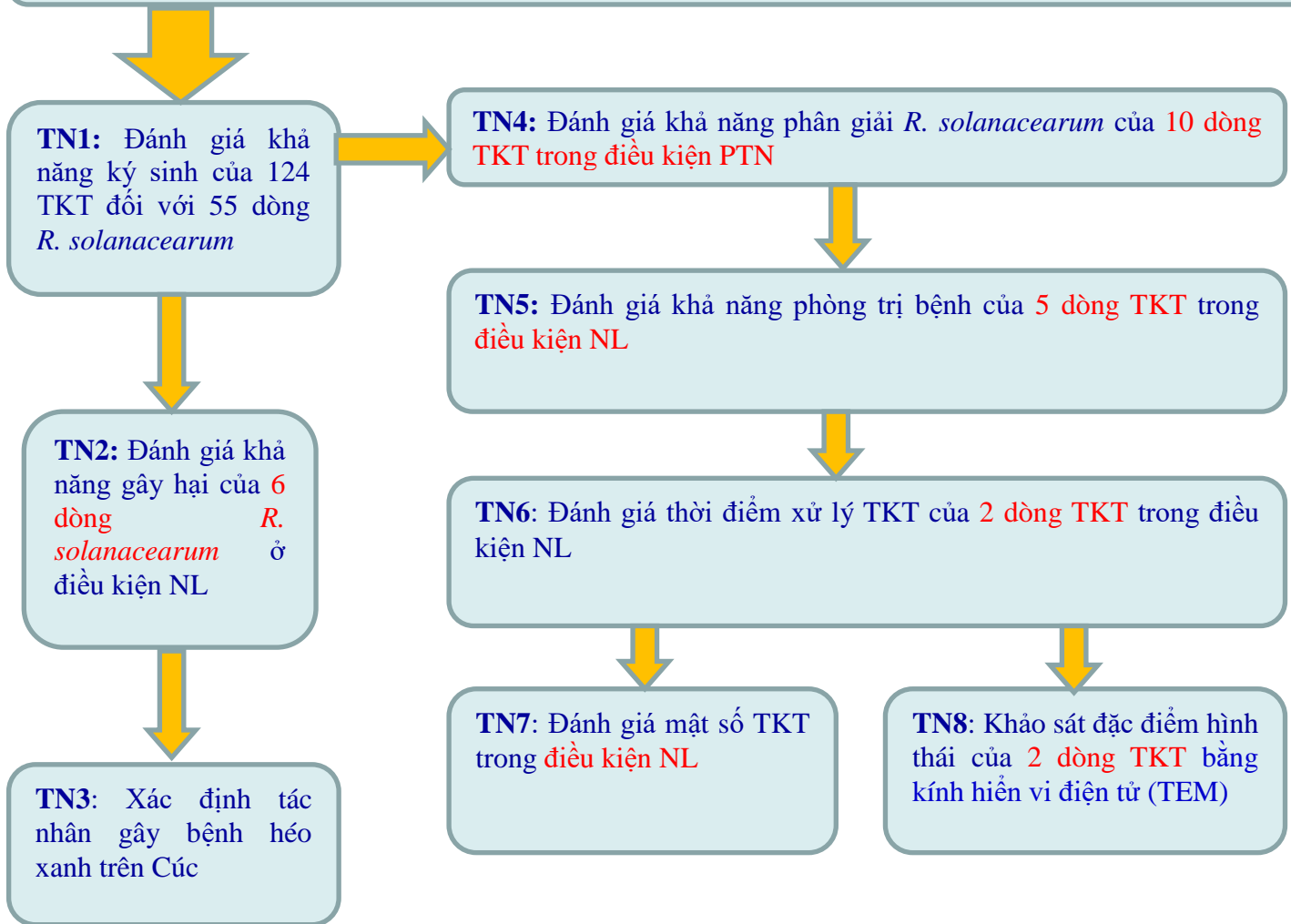


PHÂN LẬP THỰC KHUẨN THỂ (tt)

(Nga & Tâm, 2014)



Sơ đồ: Tuyển chọn một số dòng TKT trong PTN và NL





THÔNG TIN KẾT QUẢ KHUẾCH ĐẠI

1. **Khách hàng:** Huỳnh Ngọc Tâm
2. **Tên mẫu:** DT9
3. **Phương pháp sử dụng:**
 - Khuếch đại vùng gene 16S bằng cặp mồi 27F – 1492R
 - Giải trình tự kiểm tra và định danh vùng 16S
 - Chiều dài sản phẩm khuếch đại: ~1500 bp

a. Ly trích DNA bằng phương pháp sốc nhiệt

- Thu 1 ít khuẩn lạc (1-2 khuẩn lạc) cho vào tube 1,5ml
- Thêm 100ul dung dịch lysis buffer.
- Dùng pipet trộn mẫu để đồng nhất mẫu.
- Ủ ở 95°C trong 5 phút
- Ly tâm 12.000 vòng/phút trong 5 phút.
- Hút dịch trong chuyển qua tube 1,5ml mới.

b. PCR

DNA ly trích được khuếch đại bằng cặp mồi ITS1-ITS4

27F: 5' AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3'

1492R: 5' TACGGYTACCTTGTTACGACTT 3'

*Hỗn hợp PCR (thể tích phản ứng 50ul)

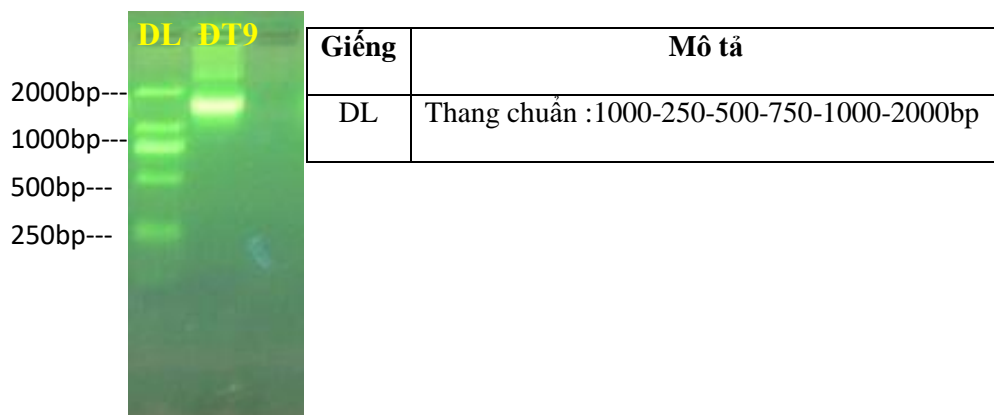
Thành phần	Thể tích (ul)
BiH20	37,5
PCR Buffer 10X	5
dNTPs 10mM	0,5
Mồi 27F 5uM	2
Mồi 1492R 5uM	2

Taq polymerase 2U	1
DNA ly trích	2
Tổng thể tích	50

*Chu kỳ nhiệt PCR

Nhiệt độ	Thời gian	Chu kỳ
95°C	5 phút	1
95°C	30 giây	35
58°C	30 giây	
72°C	1:45 giây	
72°C	5 phút	1
25°C	2 phút	1

c. Kết quả khuếch đại



Can Tho, July 13th, 2018

SEQUENCING DATA RECORD

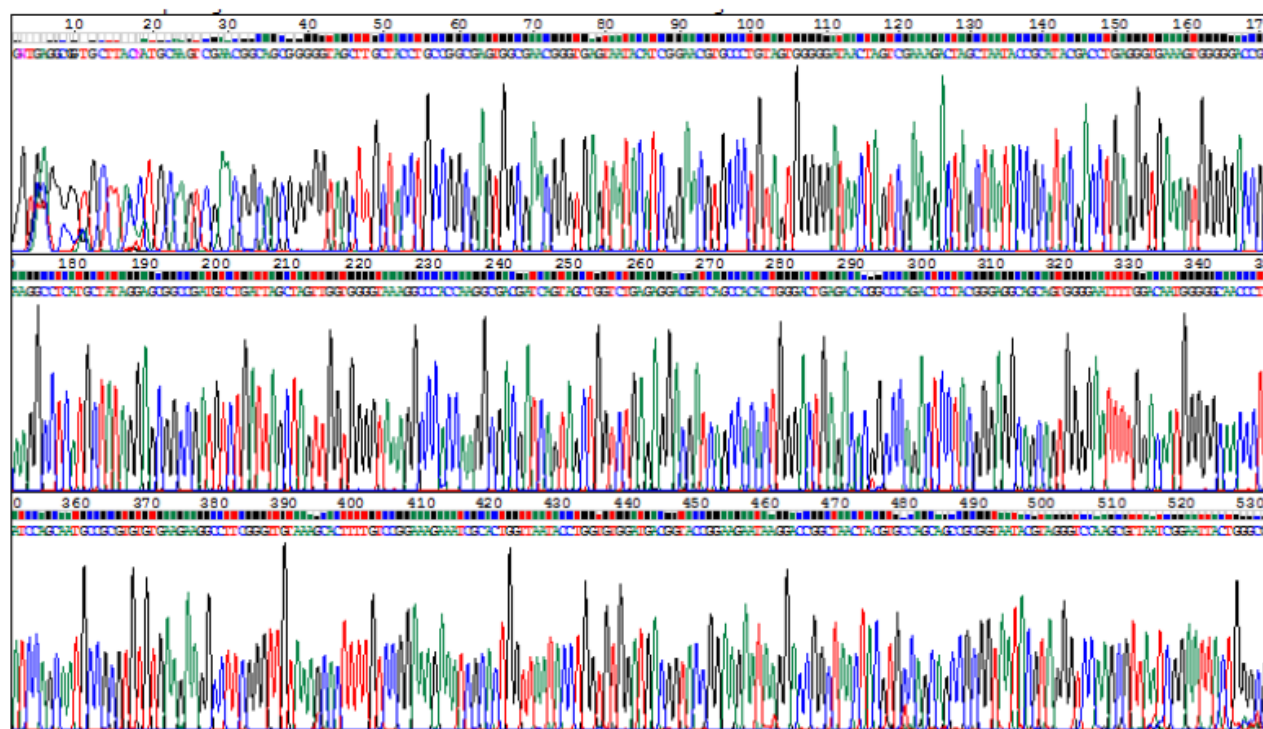
1. Sample name: ĐT9

2. Method used:

- Sequencing 16S rRNA region and BLAST SEARCH for Classification
- Amplified and sequencing region: 16S rRNA
- Length of product: ~1500 bp

3. Sequence (5'-3')_1421bp:

GGCGTGCTTACNATGCAAGTCGAACGGCAGCGGGGTTAGCTTGCTACCTGCCGGCAGTGGCGAACGGGTGA
GTAATACATCGGAACGTGCCCTGTAGTGGGGGATAACTAGTCGAAAGACTAGCTAATACCGCATACGACCTGAG
GGTCAAAGTGGGGGACC GCAAGCCCTCATGCTATAGGAGCGCCGATGTCTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAA
GGCCACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGACGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAG
ACTCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTGGACAATGGGGGCAACCCTGATCCAGCAATGCCCGTGTGTGA
AGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTTGTCCGAAAGAAATCGCACTGGTTAATACCTGGTGTGGATGACGG
TACCGGAAGAATAAGGACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTCCAAGCGTTAATCGG
AATTACTGGGCGTAAAGCGTGCAGGCGGTTGTGCAAGACCGATGTGAAATCCCCGGGCTTAACCTGGGAATT
GCATTGGTGACTGCACGGCTAGAGTGTGTGAGAGGGAGGTAGAATTCCACGTGTAGCAGTGAATGCGTAGAG
ATGTGGAGGAATACCGATGGCGAAGGCAGCCTCCTGGGATAACACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGGAG
CAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTAGTTGTTGGGGATTCAATTCCTTAGT
AACGTAGCTAACCGTGAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGTGCAGGATTAATAACTCAAAGGAATTGACGGG
GACCCGCACAAGCGGTGGATGATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCTACCCTTGACATGCCA
CTAACGAAGCAGAGATGCATTAGGTGCTCGAAAGAGAAAGTGGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTC
GTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCC GCAACGAGCGCAACCCTTGCTCTAGTTGCTACGAAAGGGCACTCTA
GAGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTATGGGTAGGGCT
TCACACGTCATAAATGGTGCATACAGAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCCAGAAAATGCATCGT
AGTCCGGATCGTAGTCTGCAACTCGACTACGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGT
GAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTGGGCTTACCAGAAGTAGTTAGCCTA
ACCGCAAGGAGGGCGATACCACGTAGGTCAACG



SEQUENCING SERVICE INFORMATION

I. Customer Information:

Customer:	Huỳnh Ngọc Tâm
Organization:	Đại Học Cần Thơ
Email:	tamchk15@gmail.com
Tel:	

II. Sample Information:

Date	7/9/2018
Requested	Amplification-Sequencing 16S region and BLAST SEARCH for Classification

III. Result:

Date	7/13/2018
------	-----------

Data list_Primer 27F-1492R

No	Sample Name	PCR	Data sequencing summary			
			Total Blast	Species Identification	File name	Note
1	ĐT9	YES	1421	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Mau DT9	

KẾT QUẢ ĐĂNG KÝ MÃ SỐ TRÌNH TỰ ĐOẠN GEN 16S RRNA CỦA ĐỒNG VI KHUẨN ĐT-9 TRÊN GENBANK

GenBank Send to: ▾

Ralstonia solanacearum strain Dong Thap 9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: MK041548.1
[FASTA](#) [Graphics](#)

[Go to:](#) (📄)

LOCUS MK041548 1432 bp DNA linear BCT 17-OCT-2018
DEFINITION Ralstonia solanacearum strain Dong Thap 9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
ACCESSION MK041548
VERSION MK041548.1
KEYWORDS .
SOURCE Ralstonia solanacearum
ORGANISM [Ralstonia solanacearum](#)
Bacteria; Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales; Burkholderiaceae; Ralstonia.
REFERENCE 1 (bases 1 to 1432)
AUTHORS Huynh,T.N.
TITLE Ralstonia solanacearum cause bacterial wilt on chrysanthemum in Vietnam
JOURNAL Unpublished
REFERENCE 2 (bases 1 to 1432)
AUTHORS Huynh,T.N.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (12-OCT-2018) Dong Thap education department, Tram Chim high school, tinh lo 844, Tam Nong, Dong Thap 81000, Viet Nam
COMMENT ##Assembly-Data-START##
Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
##Assembly-Data-END##

source 1..1432
/organism="Ralstonia solanacearum"
/mol_type="genomic DNA"
/strain="Dong Thap 9"
/isolation_source="disease sample of plant"
/host="Chrysanthemum sp."
/db_xref="taxon:305"
/country="Viet Nam"
<1..>1432
/product="16S ribosomal RNA"

[rRNA](#)

ORIGIN
1 ggcgggtgctt acnatscaag tcgaacggca ggggggtgag cttgtacct gccggcgagt
61 ggcgaacggg tgagtaatac atcggaaact gccctgtagt ggggataac tagtcgaaag
121 actagctaat accgcatacg acctgagggt gaaagtgggg gaccgcaagg cctcatgcta
181 taggaacggc cgatgtctga ttgctagtt ggtgggataa agcccaacca aggcgacgat
241 cagttagctgg tctgagagga cgatcagcca cactgggact gagacacggc ccagactcct
301 acgggaggca gcagtgggga atttgggaca atgggggcaa cctgatcca gcaatgccgc
361 gttgtgaaag aaggccttcg ggttgtaaag cactttgtc cggaaagaaa tcgcactggt
421 taatacctgg tgggatgac ggtaccggaa gaataaggac cgcctaacta cgtgccgaca
481 gccgcggtaa tacgtagggt ccaagcgtaa atcgaatta ctggcgtaa agcgtgcgca
541 ggcgggtgtg caagaccgat gtgaaatccc cgggcttaac ctgggaattg cattggtgac
601 tgcacggcta gagtgtgta gggggaggta gaattccagc tgtagcagt aaatgctgag
661 agatgtggag gaataccgat ggcgaaggca gcctcctggg ataacactga cgtcatgca
721 cgaagcgtg ggggcaaac aggattagat acctgtgtg tcacgccct aaacgatgc
781 aactagttg tgggattca tttccttagt aactgacta acgctgaag ttgaccgct
841 ggggagtcg gtcgcaagat taaaactcaa aggaattgac ggggaccgc acaagcgtg
901 gatgatgagg attaattcga tgcaacgca aaaaacttac ctaccctga catgccacta
961 acgaagcaga gatgcattag gtctcgaaa gagaagtgg acacaggtc tgcattgctg
1021 tctcagctc gtgtcgtgag atgtgggtt aagtcggca acgagcgaa cccttgctc
1081 tagttgctac gaaaggcac tctagagaga ctggcgta caaacggag gaagtgggg
1141 atgacgtcaa gtcctcatgg cccttatggg tagggcttca cagtcatac aatggtgcat
1201 acagaggtt gccaacggc ggggtggagc taatccaga aatgcctgc tagtccggat
1261 cgtagtctgc aactcacta cgtgaagctg gaatcctgag taatcgga tcagcatgcc
1321 gcggtgaata cgttccggg tctgtacac accgccctc acaccatgg agtggcctt
1381 accagaagta gttagcctaa ccgcaaggag gccgatacca cgtaggtcaa cg

Ralstonia solanacearum strain Dong Thap 9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
gi|1489304022|gb|MK041548.1|

Change region shown ▾

Whole sequence
 Selected region
from: begin to: end

Customize view ▾

Analyze this sequence ▾

Run BLAST

Pick Primers

Highlight Sequence Features

Find in this Sequence

Related information ▾

Taxonomy

LinkOut to external resources ▾

SILVA SSU Database [SILVA]

Recent activity ▾

[Turn Off](#) [Clear](#)

Ralstonia solanacearum strain Dong Thap 9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence [Nucleotide] See more...