

ĐỊNH DANH VI KHUẨN GÂY BỆNH THỐI NHŨN TRÊN KHOAI MÔN Ở ĐỒNG BẰNG SÔNG CỬU LONG

Lê Minh Tường¹, Ngô Thành Trí¹, Nguyễn Thị Thanh Xuân²

TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện tại Bộ môn Bảo vệ thực vật, Trường Đại học Cần Thơ. Mục tiêu của nghiên cứu nhằm xác định đến loài tác nhân vi khuẩn gây bệnh thối nhũn trên khoai môn ở đồng bằng sông Cửu Long. Trong nghiên cứu này, các dòng vi khuẩn được xác định dựa vào đặc điểm hình thái, đặc tính sinh hóa và triệu chứng bệnh. Kết quả cho thấy cả 8 dòng vi khuẩn phân lập đều thuộc chi *Erwinia* và được chia thành 2 nhóm: nhóm 1 gồm 4 dòng (ErĐT2, ErĐT3, ErĐT4 và ErĐT5) với các đặc điểm có thể thuộc loài *Erwinia carotovora* và nhóm 2 gồm 4 dòng (ErAG1, ErAG2, ErĐT1 và ErĐT6) với các đặc điểm có thể thuộc loài *Erwinia chrysanthemi*. Cả 8 dòng vi khuẩn thí nghiệm đều có khả năng gây bệnh trên khoai môn với triệu chứng điển hình của bệnh thối nhũn. Trình tự đoạn gene 16S rDNA của các dòng vi khuẩn thí nghiệm cũng đã được xác định và so sánh với trình tự gene vùng 16S rDNA của các mẫu sẵn có trên ngân hàng gene. Kết quả cho thấy, dòng vi khuẩn ErĐT4, đại diện cho 4 dòng vi khuẩn thuộc nhóm 1, có mức độ tương đồng với loài *Erwinia carotovora* là 100% và dòng vi khuẩn ErAG1, đại diện cho 4 dòng vi khuẩn thuộc nhóm 2, có mức độ tương đồng với loài *Erwinia chrysanthemi* là 100%. Kết quả của nghiên cứu này làm cơ sở cho những nghiên cứu tiếp theo nhằm góp phần tìm ra biện pháp phòng trị bệnh thối nhũn trên khoai môn một cách có hiệu quả.

Từ khóa: Bệnh thối nhũn trên khoai môn, định danh, *Erwinia carotovora*, *Erwinia chrysanthemi*.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Hiện nay, vi khuẩn *Erwinia* spp. gây thối nhũn trên khoai môn luôn là mối lo ngại nghiêm trọng đối với nông dân đồng bằng sông Cửu Long nói riêng và cả nước nói chung, đặc biệt là vào mùa mưa. Theo Agrios (2005), dịch bệnh gây hại trên cây trồng do tác nhân vi khuẩn là một trong những nguyên nhân gây thất thu năng suất, giảm hiệu quả đầu tư và thiệt hại về kinh tế. Bệnh nặng có thể gây ảnh hưởng 100% năng suất, bệnh nhẹ làm thất thu và giảm chất lượng sản phẩm (Ooka, 1990). Do tính chất thâm canh liên tục, sự lan truyền của tác nhân gây bệnh qua nước tưới, nước mưa, cây giống không sạch bệnh và khí hậu nhiệt đới ẩm là những điều kiện thuận lợi cho sự phát triển của bệnh thối nhũn trên khoai môn do vi khuẩn *Erwinia* spp. gây ra. Bệnh thường xuất hiện khi khoai môn đã tạo củ, vi khuẩn gây bệnh xâm nhiễm từ vỏ củ vào trong thịt củ; thường là phần tiếp giáp giữa thân giả và củ, sau đó lan ra các mô xung quanh. Cây bị bệnh lúc đầu phát triển kém, héo xanh, lá rũ xuống, củ bị thối có mùi hôi khó chịu, mô

củ bị phân rã và khi nắm phần thân nhỏ lên sẽ dễ bị đứt rời ra khỏi phần gốc. Mặt ngoài của vùng bị nhiễm có thể vẫn còn giữ được trạng thái nguyên vẹn trong khi bên trong thì các mô đã chuyển đổi hoàn toàn thành một khối chất nhầy. Hiện nay, những thông tin chính xác tác nhân gây bệnh thối nhũn khoai môn vẫn chưa được công bố nhiều. Vì vậy, việc xác định chính xác tác nhân gây bệnh thối nhũn trên khoai môn để tìm ra phương pháp phòng trừ hiệu quả là một trong những vấn đề quan trọng góp phần giảm thiệt hại, gia tăng năng suất và chất lượng trong sản xuất khoai môn.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Thu thập và phân lập tác nhân gây thối nhũn củ khoai lang

Thu các mẫu bệnh khoai lang có biểu hiện triệu chứng bệnh điển hình và có mùi đặc trưng của bệnh thối nhũn ở ngoài đồng ruộng. Tiến hành phân lập vi khuẩn gây bệnh dựa theo phương pháp của Burgess *et al.* (2009).

2.2. Xác định đặc điểm hình thái và đặc điểm sinh hóa của vi khuẩn

2.2.1. Khảo sát đặc điểm hình thái

Sau khi các khuẩn lạc vi khuẩn phát triển từ huyền phù vi khuẩn ban đầu, tiến hành tách rông vào

¹ Khoa Nông nghiệp, Trường Đại học Cần Thơ

² Khoa Nông nghiệp và Tài nguyên thiên nhiên, Trường Đại học An Giang

Email: lmtuong@ctu.edu.vn

đĩa petri chứa môi trường King's B, tiến hành quan sát, ghi nhận đặc điểm hình thái của khuẩn lạc sau 48 giờ nuôi cấy.

2.2.2. Kiểm tra phản ứng siêu nhạy cảm trên lá ớt

Tiến hành đánh giá phản ứng siêu nhạy cảm của 8 dòng vi khuẩn trên lá cây ớt (giai đoạn cây ớt có 8-10 lá). Tiêm huyền phù vi khuẩn (mật số 10^9 cfu/ml) vào mô của mặt dưới lá ớt bằng bơm kim tiêm y tế, mỗi dòng vi khuẩn được thực hiện 2 lần lặp lại trên 2 cây ớt khác nhau. Theo dõi và ghi nhận sự xuất hiện của phản ứng tại thời điểm 48 giờ sau khi tiêm huyền phù vi khuẩn.

2.2.3. Kiểm tra khả năng phân hủy và oxy hóa carbohydrate

Tiến hành đánh giá khả năng phân hủy và oxy hóa carbohydrate của 8 dòng vi khuẩn phân lập. Thực hiện thí nghiệm theo phương pháp của Hanson (2008): Cho vi khuẩn vào từng ống nghiệm và phủ lên bề mặt môi trường một lớp paraffin loãng và quấn băng keo xung quanh ống nghiệm để tạo điều kiện yếm khí và một ống nghiệm không phủ paraffin và không quấn băng keo để tạo điều kiện hiếu khí. Làm tương tự như vậy cho nghiệm thức đối chứng dương là vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* và nghiệm thức đối chứng âm là không có chứa vi khuẩn. Các nghiệm thức được thực hiện với 4 lần lặp lại. Đặt các ống nghiệm ở nhiệt độ phòng, theo dõi kết quả thông qua sự thay đổi màu của chất chỉ thị màu ở thời điểm 48 giờ sau khi tiến hành thí nghiệm.

2.2.4. Kiểm tra phản ứng Indole

Tiến hành đánh giá phản ứng indole của 8 dòng vi khuẩn phân lập. Thực hiện thí nghiệm theo phương pháp của MacWilliams (2009): Cho 5 ml môi trường Indole vào ống nghiệm và đem khử trùng ở 121°C trong 20 phút. Để nguội và cho vi khuẩn vào ống nghiệm sau đó đem nuôi lắc trong 24 giờ, đối với nghiệm thức đối chứng là không có vi khuẩn. Tiếp tục cho vào 2,5 ml môi trường Kovacs indole reagent vào ống nghiệm, để yên và quan sát. Nếu là vi khuẩn *Erwinia chrysanthemi* dung dịch trong ống nghiệm sẽ xuất hiện vòng màu hồng trên bề mặt, do loài vi khuẩn này có khả năng tạo enzyme tryptophanase.

2.3. Lây bệnh nhân tạo trong điều kiện phòng thí nghiệm

Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 5 lần lặp lại, mỗi lần lặp lại là 1 lát khoai lang có độ

dày 1 cm, số nghiệm thức là số chủng vi khuẩn phân lập. Chọn củ khoai lang có kích thước đều nhau, đem rửa sạch, khử trùng xung quanh bề mặt bằng cách lau bằng cồn 70° , sau đó được cắt ra ở giữa củ theo từng lát khoai lang có độ dày 1 cm. Tiến hành cho 10 μl huyền phù vi khuẩn (mật số 10^9 cfu/ml) vào vết thương trên bề mặt lát khoai lang đã được tạo ra bằng bó kim thanh trùng. Lát khoai lang được đặt trong một đĩa petri (không đậy nắp), đặt trong một túi nilon có chứa bông gòn tẩm 3 ml nước cất thanh trùng và đặt túi trong buồng tối ở điều kiện 25°C . Quan sát và ghi nhận triệu chứng bệnh ở các thời điểm 18, 24, 30 và 40 giờ sau khi lây bệnh nhân tạo.

2.4. Lây bệnh nhân tạo trong điều kiện nhà lưới

Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 5 lần lặp lại, mỗi lần lặp lại là chậu trồng 1 cây khoai môn khoảng 3 tháng tuổi, những cây được chọn để chủng bệnh là những cây phát triển tốt, không có triệu chứng bệnh. Chủng bệnh nhân tạo bằng cách tưới 400 ml huyền phù vi khuẩn (mật số 10^8 cfu/ml) vào mỗi chậu khoai môn. Cây sau khi chủng bệnh được đặt trong phòng ủ bệnh có nhiệt độ 25°C , ẩm độ $\geq 96\%$ trong 24 giờ. Sau đó, cây được chuyển ra nhà lưới điều kiện ánh sáng bình thường, cung cấp nước để tạo ẩm độ thích hợp cho vi khuẩn phát triển. Quan sát và ghi nhận triệu chứng bệnh ở các thời điểm cây xuất hiện triệu chứng bệnh cho đến khi cây bị gãy ngang và củ thối hoàn toàn sau khi chủng bệnh.

2.5. Xác định loài vi khuẩn gây bệnh thối nhũn củ khoai môn bằng kỹ thuật phân tử

DNA tổng số của các dòng vi khuẩn được chiết suất theo phương pháp của Weisburg *et al.* (1991) và sử dụng cặp mồi 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTC-3') và 1492R (5'-TACGGTTACCTTGTACGACT-3') để khuếch đại đoạn gene 16S rRNA (Weisburg *et al.*, 1991). Thành phần 1 phản ứng PCR bao gồm: DNA tổng số của vi khuẩn (30 ng); 2,5 μl buffer 1X; 2 mM MgCl_2 ; 30 ng cho mỗi dNTP; 0,2 μM mồi xuôi 27F; 0,2 μM mồi ngược 1495R; 0,5 μl Taq DNA polymerase. Phản ứng PCR với chu kỳ nhiệt: 95°C trong 5 phút, 30 chu kỳ (95°C trong 1 phút, 53°C trong 30 giây và 72°C trong 90 giây), 72°C trong 5 phút. Sản phẩm PCR được điện di trên agarose gel 1,5% và được tinh sạch bằng QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN). Sản phẩm PCR được giải trực tiếp cả hai chiều bằng mồi xuôi 27F và mồi ngược 1492R trên hệ thống máy ABI

3130XL tại Trường Đại học Nông nghiệp và Công nghệ Tokyo, Nhật Bản.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả phân lập các dòng vi khuẩn gây bệnh thối nhũn trên khoai môn

Từ những mẫu bệnh thu thập ở các ruộng trồng khoai môn tại 2 tỉnh Đồng Tháp và An Giang và được phân lập trên môi trường King's B, kết quả thu được 8 dòng vi khuẩn *Erwinia* spp. gây bệnh thối nhũn trên khoai môn (Bảng 1). Ở ngoài đồng, bệnh xuất hiện nhiều vào mùa mưa và gây hại nặng ở những nơi trũng, kém thoát nước và bón nhiều phân đạm. Bệnh thường gây hại khi cây khoai môn được 2,5 tháng tuổi đến thu hoạch, thậm chí bệnh còn gây hại nghiêm trọng đối với hom giống sau thu hoạch.

Triệu chứng bệnh: Vết bệnh ban đầu là những đốm màu nâu, sau đó lan rộng ra, bệnh nặng làm mô bị hoại tử, nhũn nước, có mùi hôi khó chịu, vết bệnh có màu trắng xám đến xanh đen; bệnh thường xuất hiện khi khoai môn đã tạo củ, vi khuẩn gây bệnh xâm nhiễm từ vỏ củ vào trong thịt củ qua các vết thương sau đó lan ra các mô xung quanh, phần vỏ củ bên ngoài không có triệu chứng thối. Ngoài ra, triệu chứng bệnh còn thể hiện trên bẹ khoai môn, khi

bệnh nặng bẹ lá có màu nâu dạng thấm nước, mềm nhũn. Đồng thời, phần thân giả và lá khoai môn có triệu chứng héo xanh khi trời nắng, khi dùng tay kéo nhẹ phần thân giả dễ dàng tuột ra khỏi phần củ dưới mặt đất.

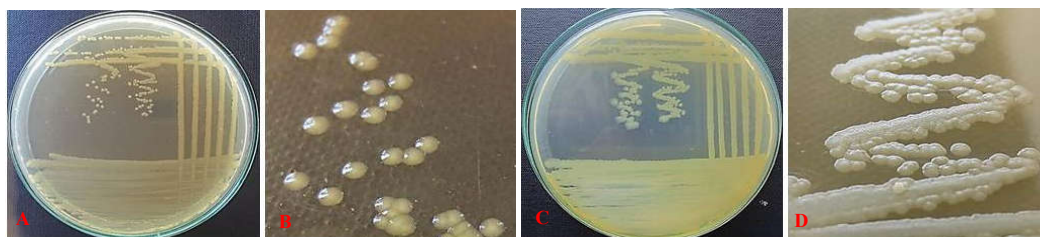
Bảng 1. Các dòng vi khuẩn *Erwinia* spp. gây bệnh thối nhũn trên khoai môn phân lập được

TT	Ký hiệu	Địa điểm thu mẫu bệnh
1	ErAG1	Xã Hội An, huyện Chợ Mới, tỉnh An Giang
2	ErAG2	Xã Hội An, huyện Chợ Mới, tỉnh An Giang
3	ErĐT1	Xã Bình Thạnh Trung, huyện Lấp Vò, tỉnh Đồng Tháp
4	ErĐT2	Xã Mỹ An Hưng B, huyện Lấp Vò, tỉnh Đồng Tháp
5	ErĐT3	Xã Tân Mỹ, huyện Lấp Vò, tỉnh Đồng Tháp
6	ErĐT4	Xã Hội An Đông, huyện Lấp Vò, tỉnh Đồng Tháp
7	ErĐT5	Xã Tân Mỹ, huyện Lấp Vò, tỉnh Đồng Tháp
8	ErĐT6	Xã Vĩnh Thạnh, huyện Lấp Vò, tỉnh Đồng Tháp



Hình 1. Triệu chứng bệnh thối nhũn trên khoai môn do vi khuẩn *Erwinia* spp. gây ra ở ngoài đồng

3.2. Đặc điểm hình thái của các dòng vi khuẩn *Erwinia* spp. gây bệnh thối nhũn trên khoai môn



Hình 2. Đặc điểm khuẩn lạc của vi khuẩn *Erwinia* sp. dòng ErAG1 (A, B) và dòng ErĐT4 (C, D) gây bệnh thối nhũn trên khoai môn trên môi trường King's B sau 48 giờ nuôi cấy

Quan sát khuẩn lạc vi khuẩn trên môi trường King's B cho thấy có 2 dạng khuẩn lạc khác nhau thuộc 8 dòng vi khuẩn phân lập được: Dạng 1: gồm 4 dòng ErAG1, ErAG2, ErĐT1, ErĐT6 với khuẩn lạc có

màu trắng xám, bóng tròn, lồi, nhẵn và hơi phát huỳnh quang (Hình 1A, 1B). Các đặc điểm hình thái của 4 dòng vi khuẩn này tương tự như mô tả của Vũ Triệu Mân và ctv (2007) về đặc điểm của loài *E.*

carotovora. Dạng 2: gồm 4 dòng ErĐT2, ErĐT3, ErĐT4, ErĐT5 với khuẩn lạc có màu trắng kem, rìa gợn sóng và nhảy (Hình 1C, 1D). Theo CABI (2007) cho rằng, những đặc điểm trên phù hợp với mô tả về đặc điểm của loài *E. chrysanthemi*.

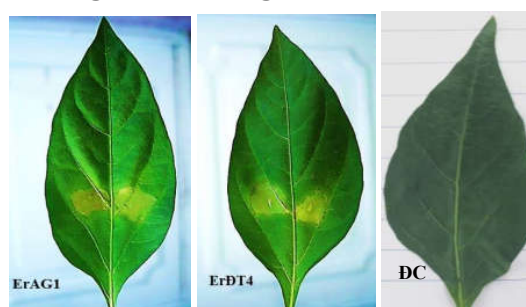
3.3. Đặc điểm sinh hóa của các dòng vi khuẩn *Erwinia* spp. gây bệnh thối nhũn trên khoai môn

3.3.1. Phản ứng siêu nhạy cảm

Kết quả ghi nhận 8 dòng vi khuẩn thí nghiệm đều có phản ứng siêu nhạy cảm với mô tả như sau: khi tiêm huyền phù vi khuẩn vào mô lá của cây ớt, quan sát sau 24 giờ những tế bào tại vị trí tiêm trở nên trong suốt, đến 48 giờ thấy xuất hiện những mô bị hoại tử, chứng tỏ vi khuẩn được tiêm vào là vi khuẩn ký sinh có khả năng gây bệnh. Theo Janse (2009) mô tả, khi tiêm huyền phù vi khuẩn vào phần thịt lá của cây thuốc lá sẽ có hai trường hợp: Nếu tiêm vi khuẩn gây bệnh cho cây trồng thì sẽ xảy ra phản ứng siêu nhạy cảm, biểu hiện là sau 24 giờ những tế bào tại vị trí tiêm sẽ suy yếu và chết làm cho phần mô tại vị trí này trở nên trong suốt, sau đó trở nên hoại tử còn nếu tiêm vi khuẩn không gây bệnh hoặc vi khuẩn hoại sinh thì lá sẽ hơi vàng sau vài ngày hoặc không xảy ra một phản ứng nào.

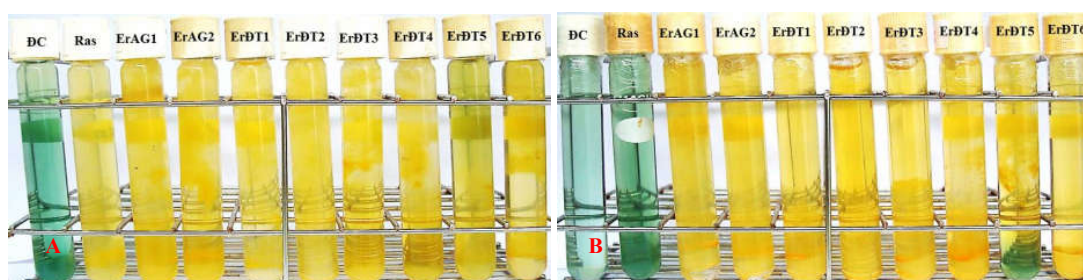
Kết quả cho thấy cả 8 dòng vi khuẩn thí nghiệm đều có khả năng làm đổi màu môi trường từ màu xanh sang vàng ở cả 2 điều kiện kỵ khí và hiếu khí, do đó dòng vi khuẩn này thuộc chi *Erwinia*. Theo Janse (2009), trong các nhóm vi khuẩn gây bệnh cho

cây trồng chỉ có vi khuẩn *Erwinia* thuộc nhóm kỵ khí tùy ý, nó có thể phát triển được ở cả 2 điều kiện hiếu khí và yếm khí, trong khi đó các nhóm vi khuẩn thuộc nhóm hiếu khí (*Xanthomonas*, *Ralstonia*) chỉ có thể phát triển được ở điều kiện có đầy đủ oxy. Phản ứng O/F là phản ứng dùng để xác định nhóm vi khuẩn thuộc nhóm hiếu khí hay kỵ khí tùy ý. Sự chuyển màu là do trong quá trình sinh trưởng, vi khuẩn đã sinh ra acid nên làm cho pH môi trường chuyển từ tính kiềm (pH = 7,1) sang tính acid. Điều này chứng tỏ vi khuẩn có khả năng sinh trưởng, phát triển, sử dụng nguồn dinh dưỡng là glucose có trong môi trường và có khả năng sản sinh acid.



Hình 3. Phản ứng siêu nhạy cảm biểu hiện hoại tử trên mô lá ớt ở 48 giờ sau khi tiêm huyền phù của 2 dòng vi khuẩn thí nghiệm và đối chứng tiêm nước cất thanh trùng (ĐC)

3.3.2. Phản ứng O/F (khả năng phân hủy và oxy hóa carbohydrate)



Hình 4. Khả năng phân hủy glucose của các dòng vi khuẩn thí nghiệm

(A: ống nghiệm có phủ paraffin; B: ống nghiệm không phủ paraffin; Ras: vi khuẩn *Ralstonia solanacearum*; ĐC: Đối chứng sử dụng nước cất thanh trùng).

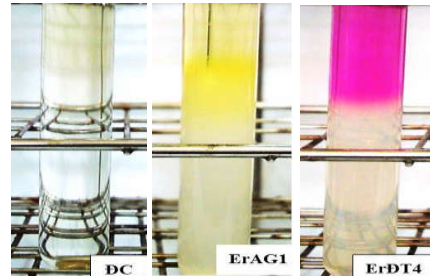
3.3.3. Kết quả phản ứng Indole

Kết quả 1 phút sau khi nhỏ thuốc thử Kovac vào ống nghiệm có chứa vi khuẩn đã nuôi lắc trong 24 giờ, 8 dòng vi khuẩn thí nghiệm chia thành 2 dạng. Dạng 1 gồm 4 dòng vi khuẩn là ErĐT2, ErĐT3, ErĐT4, ErĐT5 có phản ứng dương tính khi môi trường trong ống nghiệm tạo một lớp màu hồng phía

trên chứng tỏ 4 dòng vi khuẩn này cho phản ứng dương tính tạo Indole do vi khuẩn có khả năng tiết ra enzyme tryptophanase. Dạng 2 gồm 4 dòng là ErAG1, ErAG2, ErĐT1, ErĐT6 không cho phản ứng dương tính tạo Indole.

Qua kết quả về đặc điểm hình thái và đặc điểm sinh hóa (Bảng 2) có thể kết luận rằng cả 8 dòng vi

khuẩn thí nghiệm thuộc chi *Erwinia*. Vì vậy, 8 dòng vi khuẩn này được sử dụng để lây bệnh nhân tạo theo quy trình Koch nhằm khẳng định tác nhân gây bệnh thối nhũn trên khoai môn trong điều kiện phòng thí nghiệm.



Hình 5. Kết quả kiểm tra phản ứng sinh indole của các dòng vi khuẩn thí nghiệm

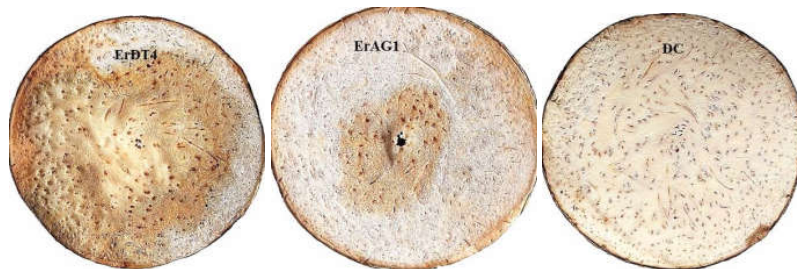
Bảng 2. Xác định loài của vi khuẩn *Erwinia* spp. gây bệnh thối nhũn trên khoai môn

Đặc điểm	Nhóm 1 (ErAG1, ErAG2, ErĐT1, ErĐT6)	Nhóm 2 (ErĐT2, ErĐT3, ErĐT4, ErĐT5)
Đặc điểm hình thái	khuẩn lạc có màu trắng xám, bóng tròn, lồi, nhẵn và hơi phát huỳnh quang	khuẩn lạc có màu trắng kem, rìa gợn sóng và nhầy
Phản ứng siêu nhạy cảm	+	+
Phản ứng O/F	+	+
Đặc điểm hình thái	Phù hợp với loài <i>E. carotovora</i>	Phù hợp với loài <i>E. chrysanthemi</i>
Phản ứng Indole	-	+
Kết luận loài	Có thể thuộc loài <i>E. carotovora</i>	Có thể thuộc loài <i>E. chrysanthemi</i>

3.4. Khả năng gây bệnh thối nhũn củ khoai môn của các dòng vi khuẩn phân lập

Triệu chứng bệnh bắt đầu xuất hiện sau 1 ngày sau khi chủng bệnh nhân tạo (NSCB) với vết bệnh ban đầu là những đốm màu nâu, hơi lõm xuống và sậm màu. Đến 2 NSCB, các vết bệnh lan rộng ra, nhũn nước. Đến 3 NSCB, bệnh xu hướng nặng hơn,

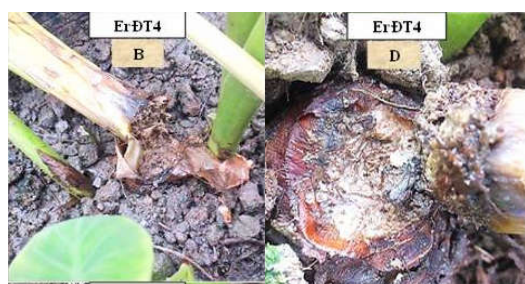
mô bệnh phát triển nhanh chóng và có mùi hôi đặc trưng được sản xuất ra từ các mô bị nhiễm bệnh. Đến 4 NSCB, mô bệnh chuyển sang màu xám trắng; tạo thành những mô mềm và có mùi thối nhũn đặc trưng giống như cháo (Hình 6). Kết quả trên phù hợp với mô tả của Huang *et al.* (2010) về các triệu chứng bệnh thối nhũn do vi khuẩn *Erwinia* spp. gây ra.



Hình 6. Khả năng gây bệnh thối nhũn trên củ khoai môn sau 4 ngày lây bệnh nhân tạo của một số dòng vi khuẩn thí nghiệm và đối chứng (ĐC)

Ngoài ra, dòng ErĐT4 là dòng vi khuẩn thể hiện khả năng gây hại cao nhất trong 8 dòng vi khuẩn phân lập và được chọn để phục vụ cho thí nghiệm đánh giá khả năng gây hại ở điều kiện nhà lưới. Kết quả ghi nhận trong điều kiện nhà lưới như sau: Ở thời điểm 3 NSCB, lá khoai môn có triệu chứng héo khi trời nắng đến chiều mát thì tươi lại. Đến 5 NSCB, lá khoai môn héo kết hợp với bẹ lá nhả lại. Các triệu chứng trên ngày càng nặng hơn,

bẹ lá khoai môn ứa vàng kết hợp vết nâu chạy dọc theo phần bẹ lá nằm sát gốc ở thời điểm 7 NSCB. Đến thời điểm 9 NSCB, phần thân giả bị gãy ngang, bẹ lá có màu nâu nhũn nước, phần thịt củ bên dưới bị thối nhũn, có mùi hôi khó chịu, màu trắng xám tuy nhiên phần vỏ củ bên ngoài vẫn giữ nguyên (Hình 7). Các triệu chứng mô tả trên tương tự với triệu chứng bệnh ngoài đồng quan sát được qua quá trình thu thập mẫu.



Hình 7. Khả năng gây hại của dòng vi khuẩn ErĐT4 gây bệnh thối nhũn trên khoai môn trong điều kiện nhà lưới ở thời điểm 9 ngày sau khi lây bệnh nhân tạo

Tóm lại, dựa vào đặc điểm hình thái, đặc điểm sinh hóa và triệu chứng bệnh trên củ và trên cây khoai môn có thể kết luận 8 dòng vi khuẩn thí nghiệm thuộc chi *Erwinia* và được chia thành 2 nhóm: nhóm 1 gồm 4 dòng ErĐT2, ErĐT3, ErĐT4, ErĐT5 (có thể thuộc loài *E. chrysanthemi*); và 4

dòng vi khuẩn ErAG1, ErAG2, ErĐT1, ErĐT6 (có thể thuộc loài *E. carotovora*). Do đó, đã chọn dòng vi khuẩn ErAG1 đại diện cho nhóm 1 (có thể thuộc loài *E. chrysanthemi*) và dòng vi khuẩn ErĐT4 đại diện cho nhóm 2 (có thể thuộc loài *E. carotovora*) để thực hiện thí nghiệm xác định tác nhân gây bệnh thối nhũn trên khoai môn bằng phương pháp sinh học phân tử.

3.5. Xác định tác nhân gây bệnh thối nhũn trên khoai môn bằng phương pháp sinh học phân tử

Dựa vào kết quả bảng 3 cho thấy 2 dòng vi khuẩn thí nghiệm có mức độ tương đồng là 100% khi so sánh với loài chuẩn dựa vào trình tự gen vùng 16S rRNA. Cụ thể là dòng ErAG1 có mức tương đồng với loài *Erwinia carotovorum* là 100% và dòng ErAG1 có mức độ tương đồng với loài *Erwinia chrysanthemi* là 100%.

Bảng 3. Mức độ tương đồng của 2 dòng vi khuẩn gây bệnh thối nhũn được so sánh trên NCBI

Mẫu xạ khuẩn	Loài xác định	Kích thước trình tự (bp)	Mức độ tương đồng (%)	Mã số của dòng tương đồng trên GenBank
ErAG1	<i>Erwinia carotovorum</i>	1412	100	AF373173.1
ErĐT4	<i>Erwinia chrysanthemi</i>	1987	100	AF373188.1

Theo Rahmanifar (2012), vi khuẩn *Erwinia carotovora* và vi khuẩn *E. chrysanthemi* là 2 loài thuộc nhóm “soft rot” gây bệnh thối nhũn trên khoai tây đã được ghi nhận tại Iran. Ooka (1990) cũng cho rằng tác nhân gây ra bệnh thối chao trên khoai môn ở Hawaii là vi khuẩn *E. carotovora* và *E. chrysanthemi*. Kotoujansky (1987), cũng đã ghi nhận loài vi khuẩn *E. chrysanthemi* gây bệnh thối nhũn trên khoai môn. Nguyễn Lê Thanh Mai và ctv. (2020) đã ghi nhận loài vi khuẩn *E. chrysanthemi* gây bệnh thối nhũn trên củ khoai lang. Như vậy, dựa vào kết quả thí nghiệm có thể kết luận rằng vi khuẩn *E. carotovora* và vi khuẩn *E. chrysanthemi* là 2 loài gây bệnh thối nhũn trên khoai môn ở đồng bằng sông Cửu Long.

4. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

- Phân lập được 8 dòng vi khuẩn *Erwinia* spp. gây bệnh thối nhũn trên khoai môn.

- Vi khuẩn *Erwinia carotovora* và vi khuẩn *Erwinia chrysanthemi* là 2 loài gây bệnh thối nhũn khoai môn ở đồng bằng sông Cửu Long.

- Đề nghị nghiên cứu biện pháp phòng trị bệnh thối nhũn khoai môn do vi khuẩn gây ra bằng tác nhân sinh học.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Agrios, G. N., 2005. Plant pathology (5th edition). Elsevier Academic Press. 952 pages.
- Burgess, L. W., T. E. Knight, L. Tesoriero và H. T. Phan, 2009. Cẩm nang chuẩn đoán bệnh cây ở Việt Nam. Trung tâm Nghiên cứu Nông nghiệp Quốc tế Australia (ACIAR), 212 pages.
- CABI, 2007. *Erwinia chrysanthemi*. CABI publishing. Crop protection compendium.
- Hanson, A., 2008. Oxidative-fermentative test protocol. *American Society for Microbiology*. 1-7.
- Huang, L. F., B. P. Fang, Z. X. Luo, J. Y. Zhang and Z. X. Wang, 2010. First report of Bacterial stem and root rot of sweetpotato caused by a *Dickeya* sp. (*Erwinia chrysanthemi*) in China. *Plant Disease*, 94: 1503-1515.
- Janse, J. D., 2009. *Phytopathology: Principles and Practice*. CABI Publishing. 368 pages.
- Kotoujansky A., 1987. Molecular Genetics of Pathogenesis by Soft-Rot *Erwinias*. *Annual Review of Phytopathology*, 25:405-430.
- MacWilliams, M. P., 2009. Indole test protocol. *American Society for Microbiology*. 1-7.

9. Nguyễn Lê Thanh Mai, Trần Thị Thu Thủy và Lê Minh Tường, 2020. Bước đầu nghiên cứu vi khuẩn *Dickeya chrysanthemi* (*Erwinia chrysanthemi*) gây bệnh thối nhũn củ khoai lang tại huyện Bình Tân, tỉnh Vĩnh Long. *Tạp chí Bảo vệ Thực vật*, 2: 10-15.
10. Ooka, J. J., 1990. Taro Diseases. In, Taking Taro into the 1990s. *University of Hawaii*, 51 - 59.
11. Rahmanifar, B, N. Hasanzadeh, J. Razmi and Ghasemi A., 2012. Genetic diversity of Iranian potato soft rot bacteria based on polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) analysis. *African Journal of Biotechnology*, 11(6): 1314 - 1320.
12. Vũ Triệu Mân, Ngô Bích Thảo, Lê Lương Tề, Nguyễn Kim Vân, Đỗ Tấn Dũng, Ngô Thị Xuyên Và Nguyễn Ngọc Châu, 2007. *Giáo trình bệnh cây chuyên khoa*. Trường Đại học Nông nghiệp I – Hà Nội, 135-138.
13. Weisburg, W. G., S. M. Barns, D. A. Pelletier, and D. J. Lane, 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of bacteriology*, 173(2): 697-703.

IDENTIFICATION OF BACTERIA CAUSING SOFT ROT DISEASE ON TARO AT MEKONG DELTA

Le Minh Tuong¹, Ngo Thanh Tri¹, Nguyen Thi Thanh Xuan²

¹*College of Agriculture, Can Tho University*

²*College of Agriculture and Natural Resources, An Giang University*

Summary

The research was carried out in Laboratory of Plant Protection Department, Can Tho University. The objective of this research was to identify the bacterial species causing bacterial soft rot disease on Taro in Mekong delta. In this study, the samples were determined based on morphological, biochemical and pathogenicity. The results showed that all 8 strains belonged to genus *Erwinia* and was divided into two groups: group 1 included 4 strains (ErĐT2, ErĐT3, ErĐT4 and ErĐT5) which were characteristics of *Erwinia carotovora* and group 2 included 4 strains (ErAG1, ErAG2, ErĐT1 and ErĐT6) which were characteristics of *Erwinia chrysanthemi*. They induced typical symptoms of soft rot disease on Taro. The nucleotide sequences of 16S rDNA were determined and compared with the 16S rDNA sequences existing on Genbank. The results indicated that the nucleotide sequence of ErĐT4 (belonged to group 1) showed 100% similarity with *Erwinia carotovora* and the nucleotide sequence of ErAG1 (belonged to group 2) showed 100% similarity with *Erwinia chrysanthemi*. The results of this study will be the basis for further researches to contribute to finding the effective methods to control bacterial soft rot disease on Taro.

Keywords: *Bacterial soft rot disease on Taro, Erwinia chrysanthemi, Erwinia carotovora, identification.*

Người phản biện: TS. Hà Minh Thanh

Ngày nhận bài: 20/7/2020

Ngày thông qua phản biện: 20/8/2020

Ngày duyệt đăng: 27/8/2020