

PHÂN LẬP, SÀNG LỌC VÀ XÁC ĐỊNH VI KHUẨN *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* GÂY BỆNH THỐI NHŨN TRÊN MỘT SỐ LOẠI CÂY TRỒNG

Nguyễn Xuân Cảnh*, Trịnh Thị Hường, Trần Thị Đào

Khoa Công nghệ sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

Email*: nxcanh@vnua.edu.vn

Ngày gửi bài: 20.10.2016

Ngày chấp nhận: 09.11.2017

TÓM TẮT

Thối nhũn (Soft-rot disease) là bệnh phổ biến gặp trên nhiều loại cây trồng khác nhau, tác nhân gây bệnh chính được biết đến là vi khuẩn *Erwinia carotovora*. Nghiên cứu này đã tiến hành thu thập 41 mẫu khác nhau từ các tỉnh Hà Nội, Bắc Ninh, Hưng Yên, Bắc Giang, Ninh Bình. Sau khi sàng lọc sơ bộ đã thu được 29 chủng vi khuẩn giống với *Erwinia carotovora*. Thực hiện các phản ứng sinh lý, sinh hóa đã xác định được 4 chủng bao gồm M12-2, M17-4, M21-4 và M12ydc mang các đặc điểm giống hoàn toàn với chủng vi khuẩn chuẩn *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* ATCC15713. Thông qua các thí nghiệm lây nhiễm nhân tạo trong phòng thí nghiệm nhận thấy ngoài khả năng gây bệnh trên khoai tây, 04 chủng phân lập này còn có khả năng gây bệnh cho bắp cải và cà chua. Bằng phương pháp PCR với cặp mồi đặc hiệu Ec001 đã xác định được cả 4 chủng đều mang gen gây độc giống như *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* ATCC15713. Kết hợp các đặc điểm nghiên cứu đã xác định 4 chủng vi khuẩn đã phân lập là *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* có khả năng gây bệnh thối nhũn trên một số loại cây trồng.

Từ khóa: Bệnh thối nhũn, vi khuẩn, *Erwinia carotovora*, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, ATCC15713.

Isolation, Screening and Identification of *Erwinia Carotovora* subsp. *carotovora* Causing Soft Rot Disease on Some Crops

ABSTRACT

Soft rot disease caused by *Erwinia carotovora* is commonly encountered in many crops. In this study, 41 different diseased plant samples from Ha Noi, Bac Ninh, Hung Yen, Bac Giang, and Ninh Binh provinces were collected. By preliminary screening 29 bacterial strains were isolated. Based on physiological and biochemical characteristics, four strains, M12-2, M17-4, M21-4 and M12ydc showing similarities with *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* ATCC15713 strain were identified. These strains were capable of causing soft rot in potato, cabbage and tomato by artificial inoculation in the laboratory. PCR analysis using specific primers of Ec001 indicated that these strains carried virulent gene like *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* ATCC15713.

Keywords: Soft rot disease, bacteria, *Erwinia carotovora*, ATCC15713.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh thối nhũn còn gọi là bệnh thối ướt hay thối mềm (soft-rot disease), là một bệnh rất nguy hiểm gây hại trên nhiều loại cây trồng và xảy ra trên toàn thế giới. Bệnh có các triệu chứng giống nhau trên các kí chủ khác nhau. Triệu chứng thối mềm bắt đầu bằng sự tổn thương chảy nước nhỏ, nó nhanh chóng được mở

rộng, vùng bị ảnh hưởng trở nên mềm xốp, bề mặt bị biến màu và mô suy yếu trong vùng bị ảnh hưởng trở nên nhớt, cuối cùng tạo ra mùi khó chịu (Walker *et al.*, 1998). Bệnh có thể gây hại trên đồng ruộng, trong quá trình vận chuyển, bảo quản và bày bán nông sản. Do có phổ kí chủ rộng và gây hại trong nhiều giai đoạn khác nhau nên thiệt hại do bệnh gây ra rất lớn. Ước tính thiệt hại do bệnh thối nhũn gây ra

Phân lập, sàng lọc và xác định vi khuẩn *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* gây bệnh thối nhũn trên một số loại cây trồng

khoảng 15-30% giá trị cây trồng (FAOSTAT data, 2012). Nguyên nhân của bệnh được xác định là do nhiều loài vi khuẩn thuộc các chi *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp. và *Erwinia* sp., tuy nhiên *Erwinia carotovora* được xem là nguyên nhân chính và gây thiệt hại lớn nhất (FAOSTAT data, 2012).

Erwinia carotovora được chia thành 5 dưới loài (subspecies) gồm: *Erwinia carotovora* supsp. *atroseptica* (Eca), *Erwinia carotovora* supsp. *carotovora* (Ecc), *Erwinia carotovora* supsp. *betavascularum* (Ecb), *Erwinia carotovora* supsp. *wasabiae* (Ecw) và *Erwinia carotovora* supsp. *odorifera* (Eco) (Seo *et al.*, 2001). Ecc là tác nhân gây bệnh có phổ kí chủ rộng, nó gây bệnh thối gốc cây khoai tây, thối mềm củ khoai tây và nhiều loại rau quả khác. Eca chủ yếu gây triệu chứng thối gốc ở khoai tây trên cánh đồng. Ecb chủ yếu gây hại trên các cây họ cải (Czajkowski *et al.*, 2011). Tính độc chủ yếu của *Erwinia* sp. gây bệnh trên thực vật được xác định là do các enzyme phá hủy thành tế bào, chủ yếu là pectinase và cellulose. Nhiều gen tương ứng đã được nhân dòng, mối liên quan và vai trò của chúng trong gây độc đã được nghiên cứu chi tiết (Perombelon & Van Der Wolf, 2002).

Cũng giống như các nước nông nghiệp khác trên thế giới, thiệt hại do vi khuẩn *Erwinia carotovora* gây ra ở Việt Nam cũng rất lớn. Chính vì vậy, việc tìm ra biện pháp phòng và trừ tác nhân gây bệnh này là hết sức cần thiết. Để làm được điều đó, việc đầu tiên cần phải thực hiện là khảo sát, đánh giá và xác định chính xác tác nhân gây bệnh để từ đó có những chiến lược phù hợp. Chính vì vậy chúng tôi đã thực hiện nghiên cứu này nhằm xác định tác nhân gây bệnh thối nhũn gây ra trên một số đối tượng cây trồng ở một số địa phương khác nhau. Thông qua các kết quả thu được bao gồm sự phân bố, đặc điểm sinh học, đặc điểm gây bệnh của vi khuẩn *Erwinia carotovora* sẽ đề xuất biện pháp phòng trừ bệnh đặc hiệu, hiệu quả.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Các mẫu thực vật bị bệnh thối nhũn bao gồm cải bắp, cà chua, khoai tây, lan hồ điệp,

hành được thu thập được từ các địa điểm khác nhau tại các tỉnh/thành phố Hà Nội, Bắc Ninh, Hưng Yên, Bắc Giang, Ninh Bình trong khoảng thời gian từ tháng 12/2014 đến tháng 3/2015. Các mẫu được đặt riêng biệt trong túi ni lông có ghi thông tin về thời gian, địa điểm lấy mẫu sau đó được trữ trong phòng thí nghiệm ở điều kiện 4°C. Việc phân lập vi khuẩn được tiến hành ngay sau khi thu mẫu.

Chủng vi khuẩn *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* ATCC15713 và *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 được cung cấp bởi Viện Di truyền Nông nghiệp Việt Nam thông qua hợp tác nghiên cứu khoa học.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phân lập vi khuẩn

Mẫu thực vật bị bệnh được cắt thành những mảnh nhỏ được đưa vào ống eppendorf chứa 1 ml nước cất vô trùng. Sử dụng 100 µl dung dịch để cấy trang trên đĩa petri có chứa môi trường MPA (5 g cao thịt, 10 g pepton, 5 g NaCl, 20 g agar, 1 lít nước cất, pH 6,8 - 7), ủ ở 30°C, sau 48 giờ quan sát hình thái khuẩn lạc và tế bào vi khuẩn thông qua nhuộm Gram. Thu nhận các khuẩn lạc riêng rẽ mang đặc điểm giống với *Erwinia carotovora* bao gồm các khuẩn lạc có màu vàng trứng hoặc trắng, tròn, lồi nhẩy, bóng, mép khuẩn lạc tròn nhẵn, tế bào bắt màu thuốc nhuộm Gram âm (Perombelon *et al.*, 2002).

2.2.2. Xác định các đặc điểm sinh hóa

Đặc điểm sinh hóa của các chủng phân lập được nghiên cứu theo các phương pháp vi sinh thường quy được mô tả bởi Perombelon (Perombelon & Van Der Wolf, 2002).

Kiểm tra khả năng sinh sắc tố trên môi trường YDC (lít): 10 g cao nấm men, 20 g CaCO₃, 20 g dextrose, 15 g agar, pH 7,2). Các chủng phân lập được cấy chấm điểm trên môi trường YDC sau 24 giờ nuôi cấy ở 30°C quan sát sắc tố được tạo thành thông qua màu sắc khuẩn lạc.

Kiểm tra khả năng sinh trưởng trong môi trường chứa 5% NaCl (lít): 5 g cao thịt, 10 g pepton, 50 NaCl, pH 7,3 ở 30°C. Các chủng phân

lập được nuôi trong môi trường lỏng chứa 5% NaCl, kiểm tra sự sinh trưởng của vi khuẩn sau 2 ngày nuôi cấy.

Kiểm tra khả năng sinh catalase: Các chủng phân lập được nuôi trên môi trường MPA lỏng, lắc 180 vòng/phút, sau 24 giờ nuôi cấy bổ sung H_2O_2 vào dịch nuôi cấy. Bọt khí xuất hiện trong môi trường chứng tỏ vi khuẩn có khả năng sinh catalase.

Kiểm tra khả năng sinh H_2S (lít): 7,5 g cao thịt, 10 g peptone, 5 g NaCl, 5 g $FeCl_2$ 10%, 15 g agar, pH7. Các chủng vi khuẩn phân lập được cấy trích sâu vào môi trường sinh H_2S ở $30^\circ C$, sau 3 ngày kiểm tra khả năng sinh H_2S thông qua màu sắc môi trường.

Kiểm tra khả năng phân giải tinh bột (lít): 5 g cao thịt, 10 g pepton, 5 g NaCl, 2 g tinh bột, 20 g agar, pH 7. Các chủng vi khuẩn phân lập được cấy chấm điểm trên môi trường thủy phân tinh bột ủ ở $30^\circ C$ sau 3 ngày nuôi cấy đĩa môi trường có chứa khuẩn lạc vi khuẩn được nhuộm bằng dung dịch lugol 1% quan sát khả năng phân giải tinh bột của các chủng phân lập thông qua vòng sáng xuất hiện quanh khuẩn lạc.

Kiểm tra khả năng phân giải Esculine (lít): 5 g cao thịt, 10 g pepton, 5 g NaCl, 1,5 g citrate sắt, 1 g esculine, 20 g agar, pH 7). Các chủng phân lập được thử nghiệm trên môi trường ủ ở $30^\circ C$ sau 5 ngày nuôi cấy nếu vi khuẩn tạo thành sắc tố đen trong môi trường chứng tỏ chủng đó có khả năng phân giải esculine.

Kiểm tra khả năng sinh lecithinase (lít): 5 g cao thịt, 10 g pepton, 5 g NaCl, 20 g agar, nước muối lòng đỏ trứng 100 ml, pH 7. Các chủng phân lập được cấy chấm điểm trên môi trường ủ ở $30^\circ C$, sau 48 giờ nuôi cấy xung quanh khuẩn lạc các chủng vi khuẩn có khả năng sinh lecithinase sẽ có vòng sáng.

Kiểm tra khả năng sinh trưởng ở nhiệt độ cao: Các chủng phân lập được nuôi cấy trên môi trường MPA ở $37^\circ C$, quan sát khả năng sinh trưởng sau 24 giờ nuôi cấy.

2.2.3. Phương pháp tái lây nhiễm

Phương pháp tái lây nhiễm được thực hiện theo hướng dẫn của Perombelon và Van Der

Wolf (2002). Các mẫu thực vật không bị sâu, bệnh (khoai tây, cà chua, bắp cải) được rửa sạch, ngâm 10 phút trong 0,1% nước Javel, sau đó rửa lại 3 lần với nước cất vô trùng. Đặt mẫu đã khô bề mặt được đặt vào đĩa petri có lót giấy thấm đã được tẩm ướt, dùng pipet cấy trích chủng vi khuẩn thử nghiệm lên mẫu vật, đậy nắp đĩa petri, đặt ở nhiệt độ phòng. Kiểm tra sự hình thành vết bệnh sau 2 - 4 ngày. Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Chủng vi khuẩn *Erwinia carotovora* supsp. *carotovora* ATCC15713 được sử dụng làm đối chứng dương, chủng vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa* và nước cất vô trùng được sử dụng làm đối chứng âm.

2.2.4. Xác định gen gây bệnh bằng phương pháp PCR

Phương pháp được thực hiện theo mô tả trong nghiên cứu trước đây (Mohammed & Selman, 2013) với cặp mồi Ec001 có trình tự mồi xuôi (5'-CGGTTACGATCAGCGTCTCG-3') và mồi ngược (5'-GATGTGCCGATGCCGATAC-3') đặc hiệu cho vi khuẩn *Erwinia carotovora* supsp. *carotovora*. Sản phẩm PCR được kiểm tra trên gel agarose 1%, chủng ATCC15713 được sử dụng làm đối chứng dương.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân lập và sàng lọc vi khuẩn gây bệnh thối nhũn

Tiến hành phân lập các chủng gây bệnh như đã mô tả, sau 48 giờ nuôi cấy trên đĩa môi trường xuất hiện rất nhiều các dạng khuẩn lạc khác nhau, lựa chọn những khuẩn lạc riêng rẽ, đặc trưng cho vi khuẩn *Erwinia carotovora* gồm 02 dạng chính: 1) khuẩn lạc màu vàng trứng, tròn, lồi nhầy, bóng, mép khuẩn lạc tròn nhẵn; 2) khuẩn lạc màu trắng đục, tròn, lồi nhầy, bóng, mép khuẩn lạc tròn nhẵn (Hình 1A). Kết quả từ 41 mẫu khác nhau đã phân lập được 73 chủng vi khuẩn mang các đặc điểm nói trên. Trong số 73 chủng này có 33 chủng bắt màu nhuộm Gram âm, tế bào hình que ngắn, xếp riêng lẻ hoặc chuỗi ngắn giống như *Erwinia carotovora* (Hình 1B).

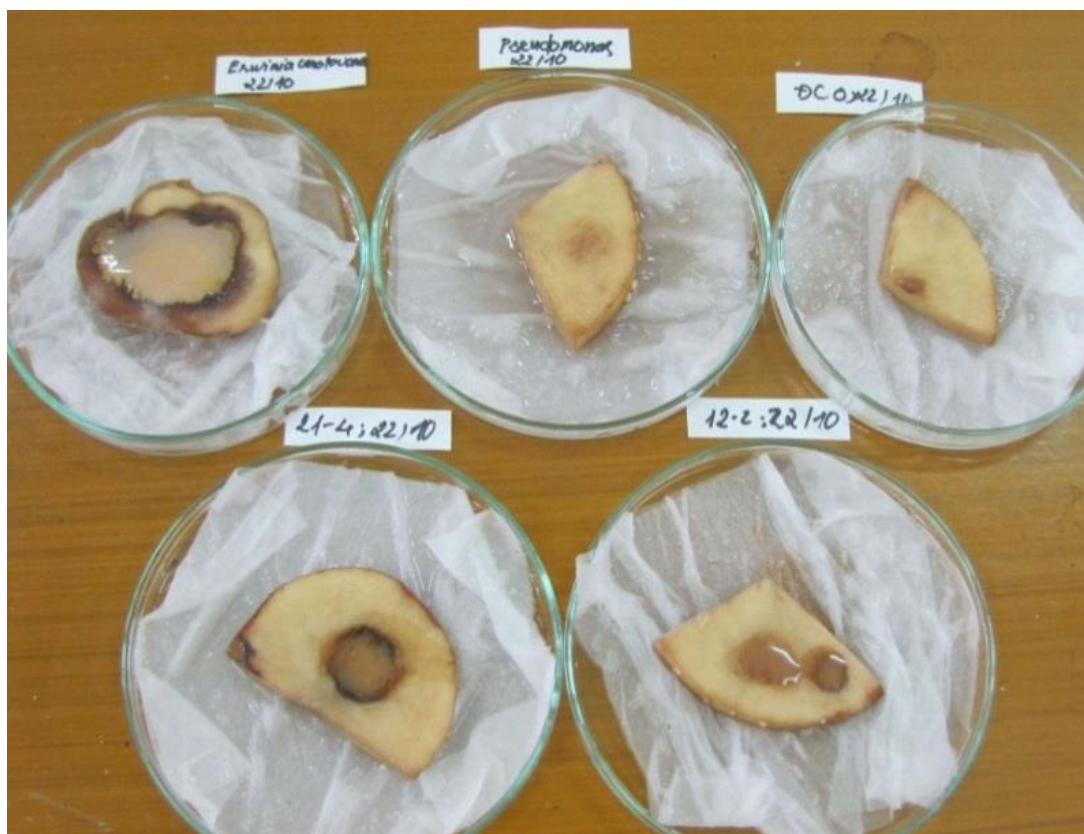
Phân lập, sàng lọc và xác định vi khuẩn *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* gây bệnh thối nhũn trên một số loại cây trồng



Hình 1. Hai dạng hình thái khuẩn lạc của các chủng vi khuẩn phân lập được (A) và hình thái tế bào chủng vi khuẩn M21-4 sau khi nhuộm Gram được quan sát dưới kính hiển vi quang học ở độ phóng đại 1.000 lần (B)

Tiến hành thử nghiệm tái lây nhiễm trong phòng thí nghiệm với mẫu vật là củ khoai tây, đã xác định được 29 trong số 33 chủng phân lập có khả năng gây bệnh cho khoai tây, các chủng

này cho ra vết bệnh có màu sẫm, nhũn và có mùi đặc trưng và giống với chủng chuẩn ATCC15713. Kết quả lây nhiễm được thể hiện qua hình 2 và bảng 1.



Hình 2. Thử nghiệm khả năng gây bệnh bằng phương pháp tái lây nhiễm trong phòng thí nghiệm của một số chủng phân lập trên khoai tây

Ghi chú: Các mẫu thí nghiệm tính từ trên xuống dưới và từ trái qua phải lần lượt như sau: *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* ATCC15713, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, nước cất, chủng 21-4, chủng 12-2.

Bảng 1. Kết quả phân lập và sàng lọc vi khuẩn gây bệnh thối nhũn

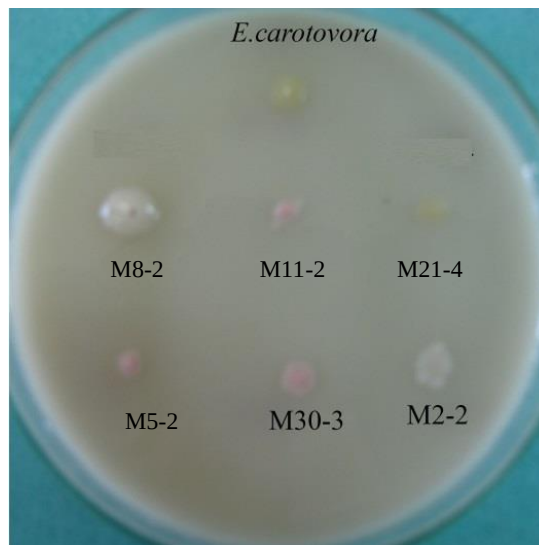
Loại mẫu thu thập	Địa điểm lấy mẫu	Ký hiệu chủng phân lập
Mẫu đất trồng cải bắp	Mộc Châu - Sơn La	M1-1, M1-2, M2-2
	Gia Lâm - Hà Nội	M5-2
Lá cải bắp	Gia Lâm - Hà Nội	M29-2
Quả cà chua	Gia Lâm - Hà Nội	M7-2, M8-2, M16-2, M17-4, M17-5, M18-2
	Như Quỳnh - Hưng Yên	M10-2
	Yên Mô - Ninh Bình	M21-4
Thân cây cà chua	Như Quỳnh - Hưng Yên	M11-2
Củ khoai tây	Yên Mô - Ninh Bình	M12-2, M40-3
	Gia Lâm - Hà Nội	M12 ydc
Rễ củ khoai tây	Từ Sơn - Bắc Ninh	M30-3, M30-4
Đất trồng khoai tây	Từ Sơn - Bắc Ninh	M31-6
Quả cà ghém	Yên Mô - Ninh Bình	M19-3, M23-1, M24-4
Lá cây cà ghém	Yên Mô - Ninh Bình	M41-1
Lan Hồ Điệp	Gia Lâm - Hà Nội	M27-2, M27-3, M36-4
Lá hành củ	Từ Sơn - Bắc Ninh	M39-3, M39-4

3.2. Xác định đặc điểm nuôi cấy và sinh hóa của các chủng vi khuẩn phân lập

Việc nghiên cứu các đặc điểm sinh học của các chủng vi khuẩn gây bệnh thối nhũn được phân lập là cần thiết nhằm xác định chính xác chủng nào là vi khuẩn *Erwinia carotovora*.

3.2.1. Khả năng sinh sắc tố trên môi trường YDC

Sau 24 giờ nuôi cấy môi trường YDC ở 30°C, khuẩn lạc của các chủng phân lập xuất hiện với các màu sắc khác nhau, trong đó có 6 màu chính gồm màu vàng, màu kem, màu hồng, trắng, nâu và nâu nhạt (Hình 3). Các chủng sinh khuẩn lạc màu hồng có số lượng nhiều nhất với 16 chủng. 7 chủng cho khuẩn lạc có màu vàng giống với chủng chuẩn bao gồm: M12-7, M12-2, M16-2, M17-4, M21-4, M24-4, 27-3, M12ydc.



Hình 3. Thử nghiệm khả năng sinh sắc tố trên môi trường YDC của một số chủng vi khuẩn phân lập

Phân lập, sàng lọc và xác định vi khuẩn *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* gây bệnh thối nhũn trên một số loại cây trồng

3.2.2. Một số đặc điểm sinh hóa khác

Ngoài ra đã thử nghiệm xác định các đặc điểm hóa sinh khác cho các chủng vi khuẩn phân lập bao gồm: kiểm tra khả năng sinh trưởng trên môi trường 5% NaCl, khả năng phân giải esculine, khả năng phân giải tinh bột, khả năng sinh catalase, khả năng sinh

lecithinase, khả năng sinh H_2S , khả năng phát triển ở nhiệt độ cao. Các kết quả thử nghiệm được thống kê trong bảng 2.

Erwinia carotovora có nhiều đặc điểm sinh học đặc trưng như: tạo thành sắc tố trên môi trường YDC, phát triển trên môi trường 5% NaCl, phân giải esculine nhưng không phân giải

Bảng 2. Một số đặc điểm sinh hóa của các chủng vi khuẩn gây bệnh thối nhũn được phân lập

Chủng	Sinh catalase	Phân giải tinh bột	Phân giải esculine	Sinh H_2S	Sinh lecithinase	Phát triển ở 37°C	Phát triển ở 5% NaCl
ATCC15713	+	-	+	+	-	+	+
M1-1	+	-	+	-	+	+	+
M1-2	+	-	+	-	+	+	+
M2-2	+	+	+	+	+	+	+
M5-2	+	-	-	+	-	+	+
M7-2	+	+	-	+	+	+	-
M8-2	+	-	-	+	-	+	+
M10-2	+	-	-	+	+	+	+
M11-2	+	-	-	-	-	+	-
M12-2	+	-	+	+	-	+	+
M 16-2	+	-	-	+	-	+	+
M17-4	+	-	+	+	-	+	+
M17-5	+	-	-	+	-	+	+
M18-2	+	-	-	+	+	+	+
M19-3	+	-	-	+	-	+	-
M21-4	+	-	+	+	-	+	+
M23-1	+	-	-	-	-	+	+
M24-4	+	-	+	+	+	+	+
M27-2	+	+	+	+	+	+	+
M27-3	+	-	-	-	-	+	+
M29-2	+	-	-	+	-	+	-
M30-3	+	+	+	-	-	+	+
M30-4	+	-	-	-	-	+	+
M31-6	+	-	+	+	-	+	+
M36-4	+	-	-	+	-	+	+
M39-3	+	+	+	+	+	+	+
M39-4	+	-	-	+	-	+	+
M40-3	+	-	+	+	+	+	-
M41-1	+	-	-	+	+	+	+
M12ydc	+	-	+	+	-	+	+

Ghi chú: “+” có phản ứng dương tính, “-” có phản ứng âm tính

ting bột, có phản ứng catalase dương tính, không sinh lecithinase, sinh H_2S , phát triển ở nhiệt độ cao (Bhat *et al.*, 2010; Fiori & Schiaffino, 2003; Helias *et al.*, 1998). Từ các kết quả đã nghiên cứu cho thấy, mặc dù 29 chủng vi khuẩn phân lập có đặc điểm hình thái giống với vi khuẩn *Erwinia carotovora* và chúng đều có khả năng gây bệnh thối nhũn khi lây nhiễm trở lại trên củ khoai tây nhưng khi nghiên cứu đặc điểm sinh hóa đặc trưng và so sánh với chủng vi khuẩn chuẩn *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* ATCC15713 thì chỉ có 4 chủng phân lập mang các đặc điểm sinh hóa giống hoàn toàn với chủng chuẩn. Các chủng được xác định và lựa chọn bao gồm chủng M12-2 và M12ydc được phân lập từ củ khoai tây bị bệnh, chủng M17-4 và M21-4 được phân lập từ quả cà chua bị bệnh thối nhũn. Từ kết quả này cho thấy 4 chủng phân lập được lựa chọn nhiều khả năng là *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. Các chủng còn lại có thể là vi khuẩn gây bệnh thuộc loài khác hoặc vi khuẩn *Erwinia carotovora* nhóm khác, để xác định chính xác cần thực hiện nghiên cứu tiếp bổ sung. Trên thế giới, để nghiên cứu và xác định vi khuẩn *Erwinia carotovora* gây bệnh, các nhà khoa học cũng chủ yếu sử dụng phương pháp hình thái và sinh lý, sinh hóa (Perombelon & Van Der Wolf, 2002). Thông qua các nghiên cứu tương tự, Bibi *et al.*

đã phân lập được 44 chủng vi khuẩn, trong đó xác định được 20 chủng là *Erwinia carotovora* ssp. *atroseptica* và 24 chủng còn lại là *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora* hoặc *Erwinia chrysanthemi* (Bibi *et al.*, 2013).

3.3. Xác định khả năng gây bệnh trên các đối tượng thực vật khác nhau của 4 chủng vi khuẩn *Erwinia carotovora* phân lập

Erwinia carotovora subsp. *carotovora* được biết đến như là nhóm vi khuẩn gây bệnh phổ rộng, nó có khả năng gây hại trên nhiều đối tượng thực vật khác nhau. Nhằm đánh giá thêm về mức độ gây bệnh của 4 chủng đã tuyển chọn, việc tái lây nhiễm cho 4 chủng này đã được thực hiện trên các đối tượng khác nhau bao gồm khoai tây, cà chua và bắp cải. Kết quả tái lây nhiễm cho thấy sau 2 ngày lây nhiễm, cả 4 chủng vi khuẩn đều tạo ra vết bệnh trên cả cải bắp, cà chua, khoai tây với triệu chứng đặc trưng (Hình 4).

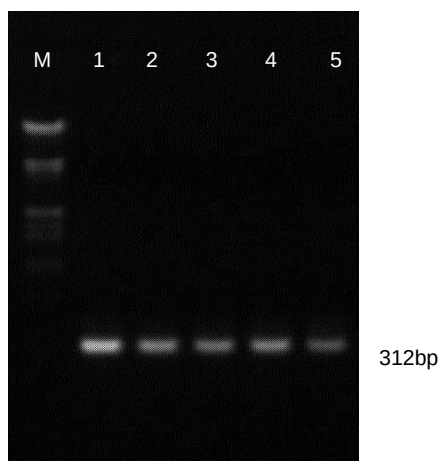
3.4. Xác định các chủng vi khuẩn *Erwinia carotovora* phân lập bằng phương pháp PCR

Các phương pháp nghiên cứu hình thái, sinh lý, sinh hóa được sử dụng để xác định vi khuẩn *Erwinia carotovora* đã mang lại những kết quả nhất định, nhiều chủng vi khuẩn đã



Hình 4. Thử nghiệm khả năng gây bệnh bằng phương pháp tái lây nhiễm trong phòng thí nghiệm của 4 chủng vi khuẩn *Erwinia carotovora* phân lập trên bắp cải

Phân lập, sàng lọc và xác định vi khuẩn *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* gây bệnh thối nhũn trên một số loại cây trồng



Hình 5. Kết quả điện di sản phẩm PCR với cặp mồi Ec001

Ghi chú: Giếng M: Marker, giếng 1: chủng chuẩn *Erwinia carotovora* supsp. *carotovora* ATCC15713, giếng 2 - 5: các chủng phân lập lần lượt là M12-2, M17-4, M21-4 và M12ydc

được phân lập và xác định trên các đối tượng khác nhau. Tuy nhiên hạn chế của phương pháp này là khó phân biệt chính xác vi khuẩn thuộc các nhóm *Erwinia carotovora* khác nhau, đặc biệt là giữa *Erwinia carotovora* supsp. *carotovora* và *Erwinia carotovora* supsp. *atroseptica* bởi vì chúng mang rất nhiều đặc điểm tương tự nhau kể cả phổ ký chủ. Vì vậy, các nhà khoa học đã phát triển phương pháp xác định thông qua phản ứng PCR và trong nghiên cứu này đã sử dụng cặp mồi đặc hiệu Ec001 để thực hiện phản ứng PCR với DNA được tách chiết từ 4 chủng vi khuẩn đã phân lập, *Erwinia carotovora* supsp. *carotovora* ATCC15713 được sử dụng làm đối chứng. Sản phẩm của phản ứng PCR được điện di trên gel agarose 1%, kết quả được thể hiện trong hình 5.

Kết quả trong hình 6 cho thấy cặp mồi Ec001 có khả năng khuếch đại đoạn gen có kích thước khoảng 312 bp ở cả 4 chủng phân lập giống như chủng chuẩn ATCC15713. Phương pháp PCR để xác định vi khuẩn *Erwinia carotovora* supsp. *atroseptica* thường được thực hiện với cặp mồi Eca (Bibi *et al.*, 2013; De Boer & Ward, 1995). Để xác định vi khuẩn *Erwinia carotovora* supsp. *carotovora*, Maitham *et al.* đã sử dụng cặp mồi Ec001 nhằm khuếch đại một đoạn gen đặc hiệu có kích thước 312 bp (Maitham & Ehab, 2013). Với cặp mồi này các tác giả đã xác định

được 5 trong số 10 chủng phân lập chính là *Erwinia carotovora* supsp. *carotovora*. Từ kết quả này kết hợp với các kết quả đã thực hiện và so sánh với các nghiên cứu khác có thể khẳng định 4 chủng phân lập M12-2, M17-4, M21-4 và M12ydc là vi khuẩn *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* có khả năng gây bệnh.

4. KẾT LUẬN

Từ 35 mẫu bệnh thực vật và 6 mẫu đất trồng cây bị bệnh thối nhũn đã phân lập được 73 chủng vi khuẩn khác nhau. Thông qua thử nghiệm tái lây nhiễm trong phòng thí nghiệm xác định được 29 chủng có khả năng gây bệnh thối nhũn trên củ khoai tây. Bốn chủng gồm M12-2, M17-4, M21-4 và M12ydc được xác định là mang các đặc điểm hoàn toàn giống với chủng vi khuẩn chuẩn *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* ATCC15713 bao gồm: tạo thành sắc tố trên môi trường YDC, có khả năng sinh enzym catalase, sinh H_2S , phân giải esculine nhưng không sinh lecithinase, không phân giải tinh bột và có khả năng phát triển ở 37°C cũng như nồng độ muối 5%, chúng cũng đều có khả năng gây bệnh đối với khoai tây, cà chua, bắp cải.

Sử dụng cặp mồi đặc hiệu cho vi khuẩn *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* đã xác định được cả 4 chủng M12-2, M17-4, M21-4 và

M12ydc đều mang gen mã hóa độc tố giống như chủng chuẩn. Từ đó có thể kết luận, đã phân lập tuyển chọn và xác định được 4 chủng vi khuẩn *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* gây bệnh thối nhũn trên thực vật.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bhat K.A., Masoodi S.D., Bhat N.A., Ahmad M., Zargar M.Y., Mir S.A., and Ashraf B. M. (2010). Studies on the effect of temperature on the development of soft rot of cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*) caused by *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. J. Phytol., 2: 64-67.
- Bibi A., Rafi A., Junaid M., and Ahamd M. (2013). Studies on the characterization and PCR identification of the pathogen of the bacterial blackleg/soft rot of potato. Sarhad J. Agric. 29(2): 225-234.
- Czajkowski R., Pérombelon M.C.M., van Veen J.A., and van der Wolf J.M. (2011). Control of blackleg and tuber soft rot of potato caused by *Pectobacterium* and *Dickeya* species: A review. Plant. Pathol., 60: 999-1013.
- De Boer S.H. and Ward L.J. (1995). PCR detection of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* associated with potato tissue. J. Phytopathol., 85: 854-858.
- FAOSTAT data. (2012). The top 5 potato producing countries, Potato world, commodity report.
- Fiori M., and Schiaffino A. (2003). Bacterial stem rot in greenhouse pepper (*Capsicum annuum* L.): Occurrence of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. J. Phytopathol., 152, 28-33.
- Helias V., Le Roux A., and Bertheau Y. (1998). Characterization of *Erwinia carotovora* subspecies and detection of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* in potato plants, soil and water extracts with PCR-based methods. Europ. J. Plant Pathol., 104: 685-699.
- Maitham J.M., and Ehab D.S. (2013). Detection of local *Erwinia* isolates causing diseases in potato by using DNA amplification by polymerase chain reaction technique (PCR). J. Al-Nahrain Univ., 16(3): 224-229.
- Perombelon M.C.M., and Van Der Wolf J.M. (2002). Methods for the detection and quantification of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (*Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum*) on potatoes: a laboratory manual. Scottish Crop Research Institute Occasional Publication No.10, Revised Version 2002.
- Seo S.T., Furuya N., Lim C.K., Takanami Y., and Tsuchiya K. (2001). Phenotypic and genetic diversity of *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora* strains from Asia. J. Phytopathol., 150: 120-127.
- Walker, J.C. (1998). Bacterial soft rots of carrot. Discovery Publishing House, New Delhi, pp: 78.