

**PHÂN LẬP VÀ ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG LY GIẢI  
CỦA THỰC KHUẨN THỂ TRÊN VI KHUẨN *Pectobacterium* spp.  
GÂY BỆNH THỐI NHŨN RAU CẢI THẢO (*Brassica rapa* subsp. *pekinensis*)**

Võ Thị Ngọc Hà\*, Trương Thị Ngọc Hân

*Khoa Nông học, Đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh*

\*Tác giả liên hệ: ha.vothingoc@hcmuaf.edu.vn

Ngày nhận bài: 27.11.2023

Ngày chấp nhận đăng: 07.08.2024

**TÓM TẮT**

Bệnh thối nhũn do vi khuẩn *Pectobacterium* spp. và *Dickeya* spp. (trước kia thuộc *Erwinia* spp.) gây ra là một trong những bệnh hại nghiêm trọng gây hại nhiều loại cây trồng trong quá trình sản xuất, thu hoạch và bảo quản. Nghiên cứu này thực hiện với mục tiêu phân lập và phân loại thực khuẩn thể kiểm soát vi khuẩn *Pectobacterium* spp. từ đất trồng rau cải thảo tại Lâm Đồng, đồng thời đánh giá khả năng ký sinh và khả năng ly giải của các dòng thực khuẩn thể trên các dòng *Pectobacterium* spp. Kết quả cho thấy đã phân lập được 14 dòng thực khuẩn thể được chia làm 6 nhóm với đặc trưng hình thái vết tan có tâm trong hoặc tâm đục lớn hoặc nhỏ và được bao bởi quầng ngoài mờ với kích thước khác nhau. Tất cả 14 dòng thực khuẩn thể đều có phổ ký chủ hẹp và có khả năng ly giải vi khuẩn *Pectobacterium* sp. dòng DT2, trong đó hai dòng TKT ΦDR05 và ΦDR07 thuộc họ *Podoviridae* của bộ *Caudovirales* với phần đầu dạng khối đa diện và đuôi ngắn, không co rút, có khả năng ly giải vi khuẩn cao với đường kính vết tan tương ứng là 13,58mm và 9,37mm.

Từ khóa: *Pectobacterium* spp., khả năng ly giải, hình thái vết tan, đường kính vết tan.

**Isolation and Evaluation of the Lytic Ability  
of Bacteriophages on *Pectobacterium* spp. Causing Soft rot Disease  
of Chinese Cabbage (*Brassica rapa* subsp. *pekinensis*)**

**ABSTRACT**

Soft rot disease, caused by *Pectobacterium* spp., is one of the most dangerous pathogens causing damage to numerous crops during production, harvesting, and storage. This study aimed to isolate and classify bacteriophages from Chinese cabbage-growing soil in Lam Dong and evaluate the parasitic and lytic properties of bacteriophage isolates on *Pectobacterium* spp. The results revealed that 14 bacteriophage isolates were identified and assigned to six groups. The plaque morphology was characterized by a big or small inner or opaque center surrounded by a translucent outer halo of varying diameters. All 14 bacteriophage isolates had a narrow host range and were capable of lysing *Pectobacterium* sp. isolate DT2. Two bacteriophage isolates ΦDR05 and ΦDR07 belonging to the *Podoviridae* family of the *Caudovirales* order with a polyhedral head and a short, non-contractile tail showed high bacterial lysis ability and plaque diameters were 13.58mm and 9.37mm, respectively.

Keywords: *Pectobacterium* spp., lysis ability, plaque morphology, plaque diameters.

**1. ĐẶT VẤN ĐỀ**

Bệnh thối nhũn do vi khuẩn *Pectobacterium* spp. và *Dickeya* spp. (trước kia thuộc *Erwinia* spp.) gây hại trên nhiều loại cây trồng có giá trị kinh tế như cải thảo, cà chua,

khoai tây (Xie & cs., 2017; Golkhandan & cs., 2013; Toth & cs., 2003) trong quá trình canh tác, vận chuyển và trong kho tồn trữ (Bhat & cs., 2010; Glasner & cs., 2008). Vi khuẩn *Erwinia* được liệt kê là một trong 10 mầm bệnh thực vật quan trọng nhất trong nông nghiệp

(Mansfield & cs., 2012). Đặc biệt, bệnh thối nhũn tàn phá nghiêm trọng đến cải thảo (Kim & cs., 2014) và gây thiệt hại kinh tế cho người sản xuất cũng như sử dụng.

Kiểm soát mầm bệnh bằng biện pháp hóa học như sử dụng thuốc gốc đồng (Cu) hoặc thuốc trừ bệnh dựa trên kháng sinh đã được áp dụng phổ biến. Tuy nhiên, việc sử dụng kháng sinh không còn được khuyến khích do tác động tiêu cực đến môi trường bằng cách đẩy nhanh sự xuất hiện của vi khuẩn kháng kháng sinh. Theo Nguyen & cs. (2022) một số chủng *Erwinia* phân lập trong đất nông nghiệp ở Hàn Quốc có khả năng kháng đối với streptomycin thương mại ở nồng độ 250 ìg/ml. Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của streptomycin và tetracycline ở các chủng *Erwinia* phân lập vào năm 2021 đã tăng gấp đôi so với các chủng phân lập vào những năm 2000 (Kim & cs., 2021).

Các chiến lược kiểm soát sinh học bền vững, bao gồm liệu pháp thực khuẩn thể (TKT), đã được đề xuất như là giải pháp cho gen kháng kháng sinh. Thực khuẩn thể là loài phong phú nhất trong sinh quyển, với số lượng ước tính là  $10^{32}$  thực khuẩn thể trong tự nhiên và khoảng  $10^9$  virion trong mỗi gram đất (Weinbauer, 2004; Wommack & Colwell, 2000). So với kháng sinh hóa học, thực khuẩn thể có hiệu quả cao và tiết kiệm chi phí do khả năng tự sao chép trong tế bào chủ và tính đặc hiệu cao đối với vi khuẩn chủ là ưu điểm nổi an toàn vì không ảnh hưởng đến những vi sinh vật khác (Romero-Calle & cs., 2019).

Thực khuẩn thể đã được chứng minh có khả năng kiểm soát bệnh thối nhũn trên khoai tây do *Pectobacterium* spp. và *Dickeya* spp. (Czajkowski & cs., 2015; Nguyen & cs., 2022), phòng trừ bệnh cháy bìa lá lúa do *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae* (Lương Hữu Tâm & Nguyễn Thị Thu Nga, 2014; Nguyễn Thị Trúc Giang & cs., 2014), kiểm soát bệnh thối hạt lúa do vi khuẩn *Burkholderia glumae* (Phan Quốc Huy & cs., 2016) và phòng trừ bệnh héo xanh trên cây vạ thọ do *Ralstonia solanacearum* (Nguyễn Thúy An & cs., 2017). Tuy nhiên, hiện nay chưa có nhiều nghiên cứu về thực khuẩn thể đối với vi khuẩn *Pectobacterium* spp. gây bệnh thối nhũn trên

cây cải thảo. Do đó, việc phân lập và khảo sát các dòng thực khuẩn thể có khả năng kiểm soát vi khuẩn *Pectobacterium* spp. gây bệnh thối nhũn trên cải thảo trong nghiên cứu này là tiền đề cho các nghiên cứu tiếp theo về định hướng phát triển chế phẩm sinh học kiểm soát *Pectobacterium* từ thực khuẩn thể.

## 2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Hóa chất và vật liệu

Nguồn vi khuẩn: 6 dòng *Pectobacterium* spp. (TM01, TM02, ĐR01, ĐR02, DT1, DT2) đã được xác định là tác nhân gây bệnh trên cây cải thảo được Bộ môn Bảo vệ thực vật, Khoa Nông học, Trường Đại học Nông Lâm thành phố Hồ Chí Minh cung cấp.

Hóa chất: Pepton (Yeast Extract FP101, Trung Quốc), Glycerol (Cas 56-81-5, Xilong, Trung Quốc),  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$  (Cas 16788-57-1, Xilong, Trung Quốc),  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (Cas 10034-99-8, Xilong, Trung Quốc), agar (Robika Hải Long, Việt Nam), NaCl (Cas 7647-14-5, Xilong, Trung Quốc), Tris-HCl (CAS 1185-53-1, Biobasic, Canada).

Môi trường King's B (KBA) (Burgess & cs., 2009)

Thành phần: Peptone (20g), Glycerol (10g),  $K_2HPO_4$  khan (1,5g),  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (1,5g), Agar (15g), nước cất (1.000ml). Trộn chung tất cả các thành phần ngoại trừ  $MgSO_4$ . Điều chỉnh pH đến 7,2 bằng pH kế Hanna Edge HI2020 sử dụng NaOH 1M. Từ từ thêm  $MgSO_4$  và lắc đều. Hấp khử trùng ở 121°C trong 20 phút.

Đệm Saline - magnesium (SM) (Kropinski, 2009)

Thành phần: NaCl (5,8g),  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (2g), 1M Tris-HCl (pH 7,5) 50ml, nước cất (1.000ml). Hấp khử trùng ở 121°C trong 21 phút.

### 2.2. Thu mẫu đất và phân lập thực khuẩn thể

Trên những ruộng bệnh thối nhũn thường xuyên xuất hiện theo ghi nhận của nông dân, tại thời điểm thu mẫu cải thảo trên ruộng có triệu chứng bệnh thối nhũn lấy mẫu đất ở 4 vị trí khác nhau (200 g/vị trí) với bán kính 50cm

Phân lập và đánh giá khả năng ly giải của thực khuẩn thể trên vi khuẩn *Pectobacterium* spp. gây bệnh thối nhũn rau cải thảo (*Brassica rapa* subsp. *pekinensis*)

xung quanh cây bị bệnh ở độ sâu 0-20cm, sau đó trộn lẫn vào nhau thành 1 mẫu gộp đại diện cho vườn. Mẫu đất thu được bảo quản trong túi zip, viết tên nhãn cho từng mẫu và bảo quản trong tủ lạnh cho đến khi sử dụng (Roger & Dean, 2005). TKT được phân lập bằng phương pháp tăng sinh và khảo sát vết tan trên agar hai lớp theo mô tả của Kropinski (2009) gồm hai bước như sau: Bước 1: Thu dịch TKT thô: Cho 1 g đất thu được vào ống falcon chứa 10ml môi trường King's B lỏng và 100 $\mu$ l huyền phù vi khuẩn *Pectobacterium* sp. dòng DT2 ( $OD_{600} = 0,3$ ), lắc với vận tốc 150rpm trong 24 giờ. Sau đó dung dịch được ly tâm với vận tốc 6.000 rpm trong 10 phút để loại bỏ chất cặn lắng bên dưới ống. Phần dung dịch nổi được chuyển qua ống falcon chứa 100 $\mu$ l chloroform lắc đều bằng vortex và ly tâm ở 6.000rpm trong 10 phút để loại bỏ tế bào vi khuẩn và chloroform, thu dịch nổi và ly tâm ở 6.000rpm trong 10 phút lần 2, dịch nổi thu được là dịch TKT thô bảo quản trong tối ở 4°C.

Bước 2: Tách đơn dòng TKT: Cho 100 $\mu$ l dịch TKT thô và 100 $\mu$ l dịch huyền phù vi khuẩn *Pectobacterium* sp. dòng DT2 ( $OD_{600} = 0,3$ ) vào 5 ml môi trường KBA 0,8% agar ở 45°C, lắc đều và trải trên đĩa môi trường KBA, sau đó ủ đĩa trong tủ định ôn ở 28°C trong 24 giờ và quan sát sự hình thành vết tan. Ở các đĩa có xuất hiện vết tan dùng tăm bông vô trùng chấm vào các vết tan đơn lẻ vạch truyền sang đĩa petri mới chứa vi khuẩn ký chủ và ủ ở 28°C trong 24 giờ. Sau đó cho 5ml đệm SM vào đĩa petri và ngâm đĩa trong 30 phút rồi thu phần huyền phù vào ống falcon, bổ sung 50 $\mu$ l chloroform và ly tâm hai lần với vận tốc 6.000rpm trong 10 phút, thu dịch nổi và ly tâm ở 6.000rpm trong 10 phút lần 2. Sau đó thu phần dịch nổi chỉ chứa TKT vào ống falcon mới và trữ trong điều kiện che tối ở nhiệt độ 4°C. Tên của dòng TKT được đặt theo tên mẫu đất thu được tại các điểm thu mẫu.

### 2.3. Đánh giá khả năng ký sinh và khả năng ly giải của các dòng TKT trên các dòng *Pectobacterium* spp.

Khả năng ký sinh của các dòng TKT được đánh giá thông qua phương pháp nhỏ giọt trên agar hai lớp (Kropinski & cs., 2009). Chuẩn bị đĩa môi trường KBA đã được kể ở và đánh số

nghiệm thức tương ứng với số dòng TKT phân lập được, và cho vào đĩa 5ml môi trường KBA 0,8% agar đã nấu tan để nguội ở 45°C chứa 100 $\mu$ l từng dòng vi khuẩn *Pectobacterium* spp. ( $OD_{600} = 0,3$ ) và để khô đĩa trong tủ cấy 15-20 phút. Dùng micropipette rút 5 $\mu$ l huyền phù từng dòng TKT nhỏ vào ô kẻ tương ứng và ủ đĩa ở 28°C trong 24 giờ.

Khả năng ly giải của các dòng TKT cũng được đánh giá bằng phương pháp khảo sát đường kính vết tan trên agar hai lớp của Kropinski & cs. (2009). Chuẩn bị sinh khối vi khuẩn *Pectobacterium* sp. dòng DT2 nồng độ  $10^8$  CFU/ml ( $OD_{600} = 0,3$ ) và tất cả các dòng TKT nồng độ  $10^3$  PFU/ml. Lấy 100 $\mu$ l huyền phù từng dòng TKT mật độ  $10^8$  PFU/ml và 100 $\mu$ l huyền phù vi khuẩn *Pectobacterium* sp. nồng độ  $10^8$  CFU/ml ( $OD_{600} = 0,3$ ) vào ống nghiệm chứa 5ml môi trường KBA 0,8% agar đã nấu tan để nguội ở 45°C, lắc nhẹ và trải trên môi trường KBA sau đó đặt đĩa trong tủ định ôn 28°C, quan sát và ghi nhận đường kính của 10 vết tan (không bao gồm quang mờ bao ngoài) ngẫu nhiên và lấy trung bình của mỗi lần lặp lại ở các thời điểm 24 giờ, 48 giờ và 72 giờ.

Các thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên đơn yếu tố, mỗi dòng TKT là 1NT, 3 LLL, mỗi LLL là 3 đĩa petri.

### 2.4. Phân loại TKT dựa trên đặc điểm hình thái

Hai dòng TKT có khả năng ly giải vi khuẩn cao nhất là TKT  $\Phi$ DR05 và  $\Phi$ DR07 được nhân mật số đạt  $10^{10}$  PFU/ml theo phương pháp tăng sinh TKT (theo mô tả ở bước 1 mục 2.2) và xác định hình thái học bằng kính hiển vi điện tử truyền qua - Transmission electron microscopy (TEM), model máy JEOL JEM 1010 ở chế độ STEM, 120kV tại phòng cấu trúc siêu hiển vi, Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương (Hà Nội). Dựa trên đặc điểm hình thái, các dòng TKT được phân loại dựa trên khóa phân loại của Ủy ban Quốc tế về phân loại virus (ICTV) (Murphy & cs., 1995).

### 2.4. Phân tích số liệu

Số liệu của các thí nghiệm được xử lý bằng Excel 2016 và phân tích phương sai (ANOVA) một nhân tố, trắc nghiệm phân hạng Duncan ở mức ý nghĩa alpha 0,01 bằng phần mềm SAS 9.1.

### 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. Kết quả phân lập các dòng TKT từ đất trồng cải thảo

Các mẫu đất từ vùng đất trồng cải thảo ở Đơn Dương và thành phố Đà Lạt tỉnh Lâm Đồng đã phân lập được 14 dòng TKT (Bảng 1). Trong đó, 7 dòng TKT được phân lập ở xã Đạ Ròn và 4 dòng TKT phân lập ở xã Thạnh Mỹ huyện Đơn Dương, 3 dòng TKT phân lập ở xã Xuân Thành thành phố Đà Lạt. Kết quả cho thấy rằng ở các nơi có xuất hiện vi khuẩn gây bệnh đều phân lập được TKT.

Hình thái vết tan của các dòng TKT thể hiện sự đa dạng khá rõ ràng và xếp vào 6 nhóm với đặc trưng như sau: nhóm 1 gồm có các dòng  $\Phi XT02$ ,  $\Phi XT03$ ,  $\Phi TM02$ ,  $\Phi ĐR01$ ,  $\Phi ĐR03$  có tâm trong lớn, quầng ngoài mờ; nhóm 2 gồm các dòng  $\Phi XT01$ ,  $\Phi TM03$ ,  $\Phi TM04$ ,  $\Phi ĐR04$  có tâm trong nhỏ, viền ngoài mờ và có vòng màu trắng; nhóm 3 chỉ có dòng  $\Phi ĐR02$  với đặc trưng có tâm đục, quầng ngoài mờ; nhóm 4 gồm các dòng  $\Phi TM01$ ,  $\Phi ĐR06$  có tâm trong nhỏ, quầng ngoài nhỏ mờ; nhóm 5 chỉ có 1 dòng  $\Phi ĐR07$  có tâm trong lớn, quầng ngoài lớn mờ và nhóm 6 là

dòng  $\Phi ĐR05$  có tâm trong nhỏ, quầng ngoài lớn mờ (Hình 1).

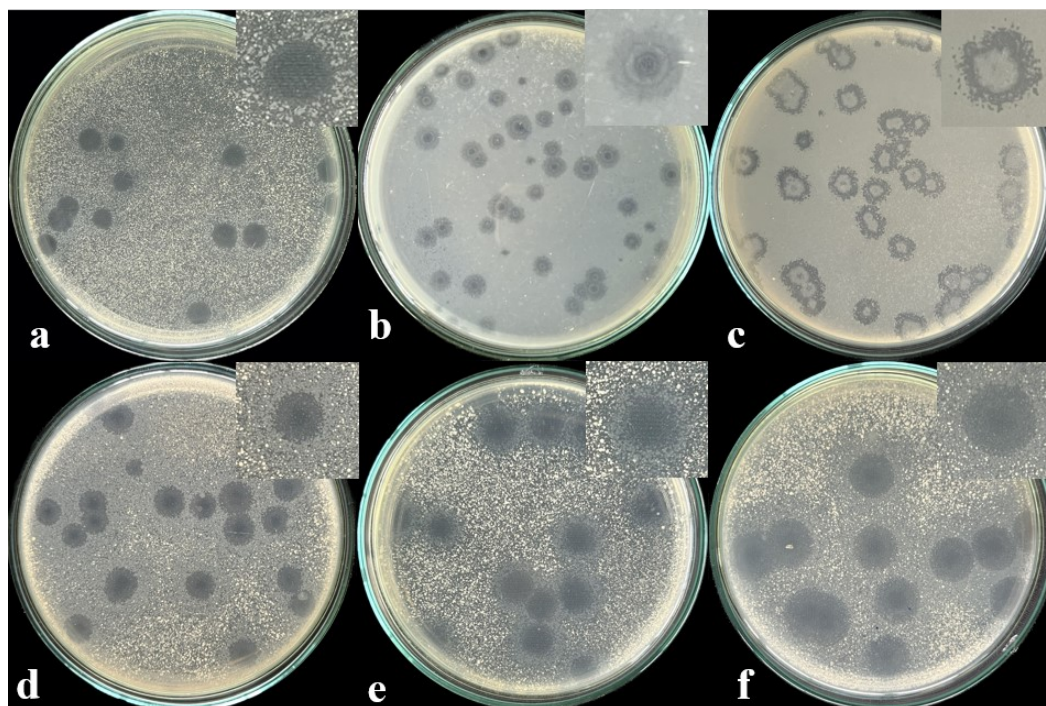
Kiểu hình thái vết tan có tâm trong thường được thể hiện ở các dòng TKT sinh tan, điều này có thể do khả năng ly giải của vi khuẩn giảm hoặc do sự ức chế ly giải bởi sự khuếch tán và hoạt động của enzyme lipopolysaccharide depolymerase được sinh ra từ TKT, có tác dụng phân hủy màng lipopolysaccharide của vi khuẩn tạo vết tan có quầng hoặc viền mờ xung quanh (Jurczak-Kurek & cs., 2016; Lai & cs., 2016). Mặt khác, sự hình thành các vết tan trong có thể điển hình cho các TKT độc (virulent phage), trong khi đó sự hình thành các vết tan đục có thể là các TKT ôn hoà (temperate phage) (Jurczak-Kurek & cs., 2016). Sự khác nhau về hình thái vết tan giữa các dòng TKT có thể là do sự khác nhau về cách thức xâm nhiễm cũng như về tốc độ sinh trưởng của TKT. Abbas & cs. (2015), khi phân lập TKT kiểm soát bệnh thối nhũn trên khoai tây do *Dickeya dadantii* cũng thu được TKT có hai loại hình thái vết tan khác nhau gồm mảng lớn có đường kính 5mm, có quầng sáng mờ ở rìa và mảng nhỏ có đường kính 1-2mm với quầng mờ và đục.

**Bảng 1. Danh sách 14 dòng TKT phân lập ở Lâm Đồng (năm 2023)**

Dòng TKT	Địa điểm thu mẫu	Tọa độ
$\Phi XT01$	Xã Xuân Thành - TP Đà Lạt	11°56'33,6"N 108°31'06,1"E
$\Phi XT02$		11°56'36,3"N 108°31'05,5"E
$\Phi XT03$		11°56'39,5"N 108°31'00,6"E
$\Phi TM01$	Xã Thạnh Mỹ - Đơn Dương	11°45'22,9"N 108°28'32,2"E
$\Phi TM02$		11°45'16,5"N 108°28'21,0"E
$\Phi TM03$		11°45'19,2"N 108°28'16,4"E
$\Phi TM04$		11°45'58,4"N 108°28'57,8"E
$\Phi ĐR01$	Xã Đạ Ròn - Đơn Dương	11°44'57,8"N 108°27'26,7"E
$\Phi ĐR02$		11°45'13,4"N 108°27'25,0"E
$\Phi ĐR03$		11°45'11,5"N 108°27'37,5"E
$\Phi ĐR04$		11°45'18,8"N 108°27'46,6"E
$\Phi ĐR05$		11°45'07,9"N 108°27'36,2"E
$\Phi ĐR06$		11°45'07,9"N 108°27'36,2"E
$\Phi ĐR07$		11°45'07,9"N 108°27'36,2"E
Tổng		14

Ghi chú: Tên TKT được đặt theo thứ tự:  $\Phi$  - Xã lấy mẫu - số thứ tự. VD:  $\Phi XT01$  (Mẫu TKT số 1 ở Xuân Thọ).

Phân lập và đánh giá khả năng ly giải của thực khuẩn thể trên vi khuẩn *Pectobacterium* spp. gây bệnh thối nhũn rau cải thảo (*Brassica rapa* subsp. *pekinensis*)



Ghi chú: a: Nhóm 1; b: Nhóm 2; c: Nhóm 3; d: Nhóm 4; e: Nhóm 5; f: Nhóm 6.

**Hình 1. Các dạng vết tan của các dòng TKT**

**Bảng 2. Đường kính vết tan của các dòng TKT với vi khuẩn *Pectobacterium* sp. dòng DT2 trong điều kiện phòng thí nghiệm**

Dòng TKT	Đường kính vết tan (mm)		
	24 giờ	48 giờ	72 giờ
ΦXT01	2,14 <sup>e</sup>	3,76 <sup>e</sup>	6,28 <sup>ef</sup>
ΦXT02	1,48 <sup>g</sup>	3,49 <sup>ef</sup>	6,26 <sup>ef</sup>
ΦXT03	1,52 <sup>g</sup>	3,81 <sup>e</sup>	5,73 <sup>h</sup>
ΦTM01	1,90 <sup>ef</sup>	2,50 <sup>g</sup>	6,09 <sup>g</sup>
ΦTM02	1,83 <sup>f</sup>	2,80 <sup>g</sup>	6,66 <sup>d</sup>
ΦTM03	1,28 <sup>g</sup>	3,28 <sup>f</sup>	6,15 <sup>fg</sup>
ΦTM04	2,03 <sup>of</sup>	3,79 <sup>e</sup>	5,88 <sup>gh</sup>
ΦĐR01	1,27 <sup>e</sup>	4,83 <sup>d</sup>	6,25 <sup>ef</sup>
ΦĐR02	2,14 <sup>e</sup>	4,93 <sup>d</sup>	6,54 <sup>de</sup>
ΦĐR03	2,70 <sup>d</sup>	4,70 <sup>d</sup>	6,03 <sup>gh</sup>
ΦĐR04	2,82 <sup>d</sup>	4,62 <sup>d</sup>	6,26 <sup>ef</sup>
ΦĐR05	8,67 <sup>a</sup>	11,55 <sup>a</sup>	13,58 <sup>a</sup>
ΦĐR06	6,68 <sup>b</sup>	7,40 <sup>b</sup>	8,43 <sup>c</sup>
ΦĐR07	4,45 <sup>c</sup>	6,85 <sup>c</sup>	9,37 <sup>b</sup>
CV (%)	3,90	3,30	1,90
Mức ý nghĩa	0,01	0,01	0,01

Ghi chú: Trong cùng một cột, các giá trị trung bình có cùng ký tự theo sau thì sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê theo phân hạng Duncan ở mức  $\alpha = 0,01$ .

### 3.2. Khả năng ký sinh và ly giải của TKT trên các dòng vi khuẩn *Pectobacterium* spp.

Tất cả 14 dòng TKT đều có phổ ký chủ hẹp, chỉ ký sinh trên dòng vi khuẩn ký chủ *Pectobacterium* spp. dòng DT2 được dùng để tăng sinh TKT ở giai đoạn phân lập. Kết quả này tương tự của Buttimer & cs. (2018), khi phân lập dòng TKT vB\_PatP\_CB5 từ mẫu đất tại nhà máy phân loại củ khoai tây ghi nhận phạm vi ký sinh hẹp chỉ có khả năng hình thành các vết tan trên vi khuẩn ký chủ của TKT (DSM 30186) và hai chủng *P. atrosepticum*. Thực khuẩn thể CUB19 có phạm vi ký chủ hẹp, ký sinh 4 trong số 40 chủng *Stenotrophomonas maltophilia* được thử nghiệm và không ký sinh chủng *Pseudomonas aeruginosa* (Fanaei & cs., 2022). Thực khuẩn thể RpY1 được phân lập từ vùng rễ của cây cà chua chỉ có thể ký sinh 3 chủng trong số 20 chủng *Ralstonia solanacearum* (Lee & cs., 2021).

Khả năng ly giải TKT được thể hiện qua đường kính vết tan và đường kính vết tan càng lớn khả năng ly giải của TKT càng cao. Thực khuẩn thể có khả năng ly giải cao là TKT có đường vết tan từ 6-17mm trong khoảng 24 đến 48 giờ (Tan & cs., 2009). Đường kính vết tan của 14 dòng TKT đối với vi khuẩn *Pectobacterium* spp. dòng DT2 qua 3 thời điểm 24 giờ, 48 giờ và 72 được ghi nhận tại bảng 2.

Tất cả các dòng TKT phân lập được đều có khả năng ly giải vi khuẩn ký chủ bắt đầu từ 24 giờ sau cấy (GSC) và tăng dần lên ở các thời điểm tiếp theo. Ba dòng TKT ΦĐR05, ΦĐR06 và ΦĐR07 có khả năng ly giải vi khuẩn cao, các dòng còn lại có khả năng ly giải thấp và duy trì khả năng ly giải ở tất cả các thời điểm theo dõi.

Ở thời điểm 24 GSC đường kính vết tan dao động từ 1,28-8,67mm. Trong đó, 3 dòng TKT ΦĐR05, ΦĐR06 và ΦĐR07 có đường kính vết tan cao nhất (lần lượt là 8,67mm, 6,68mm và 4,45mm) khác biệt có ý nghĩa thống kê đối với các dòng TKT còn lại.

Tương tự, ở thời điểm 48 GSC và 72 GSC, đường kính vết tan của các dòng TKT đều tăng so với thời điểm 24 giờ, đạt từ 2,8-11,55mm (48 giờ) và 5,73-13,58mm (72 giờ), ba dòng TKT ΦĐR05, ΦĐR06 và ΦĐR07 vẫn thể hiện khả năng ly giải cao có đường kính vết tan sau 72 giờ lần lượt là

13,58mm; 8,43mm và 9,37mm, khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các dòng TKT còn lại.

### 3.3. Phân loại TKT dựa trên đặc điểm hình thái

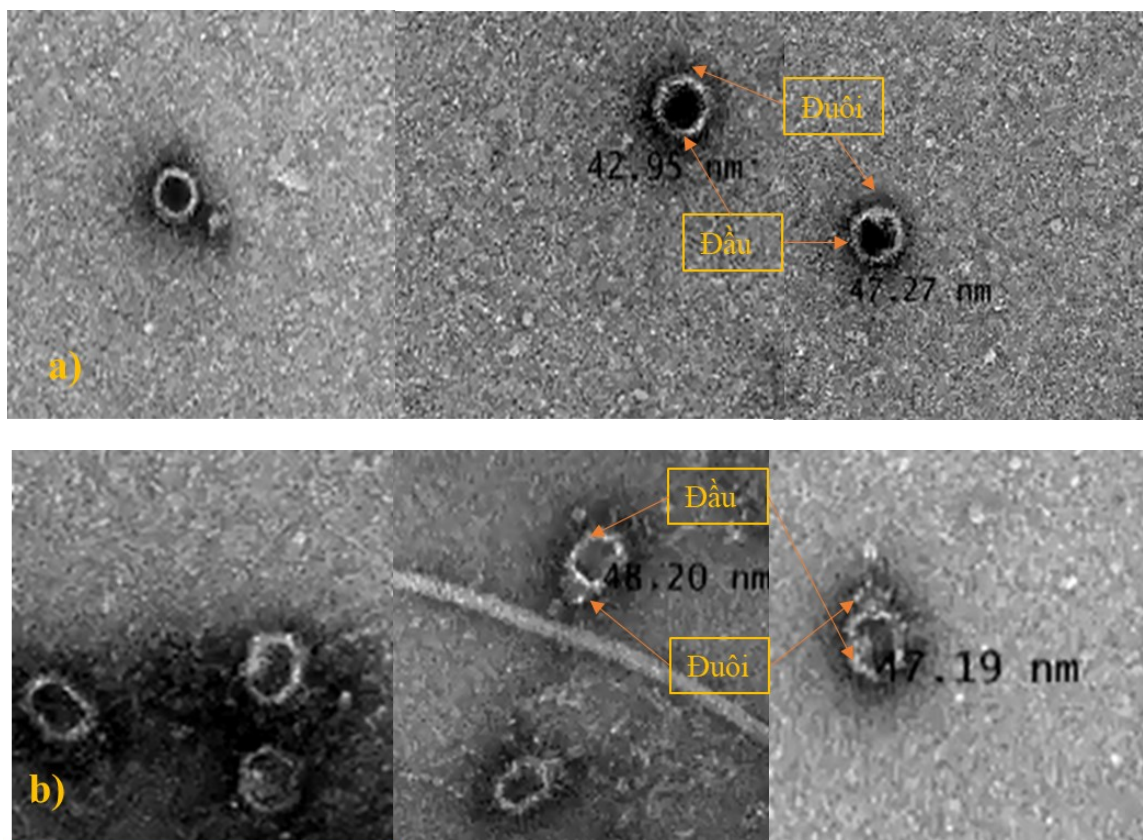
Hai dòng TKT ΦĐR05 và ΦĐR07 có khả năng ly giải mạnh vi khuẩn *Pectobacterium* spp. và tạo ra các vết tan rõ ràng, có tâm trong lớn hoặc nhỏ và quầng ngoài lớn mờ (Hình 1e và 1f) được lựa chọn để chụp TEM và phân loại.

Khi quan sát 2 dòng TKT này dưới kính hiển vi điện tử truyền qua cho thấy cả 2 TKT đều có phần đầu dạng khối đa diện có kích thước từ 40-50nm và có đuôi ngắn không có sợi đuôi (Hình 2). Theo thang phân loại Ủy ban Quốc tế về phân loại virus (ICTV) cả 2 TKT thuộc họ *Podoviridae* của bộ Caudovirales. Lim & cs. (2013); Buttimer & cs. (2018) và Kabanova & cs. (2018) đã phân lập được các TKT thuộc họ *Podoviridae* có tiềm năng ứng dụng kiểm soát vi khuẩn *Pectobacterium* spp. với kích thước phần đầu khoảng 60nm với đuôi ngắn và không có rút từ đất trồng cải thảo, hoặc khoai tây nhiễm bệnh thối nhũn. Bên cạnh đó, các TKT đặc trưng cho *Pectobacterium* còn được phân lập từ mẫu bệnh, đất, dung dịch phân bón hoặc hồ chứa nước (Ravensdale & cs., 2007; Eayre & cs., 1995; Gross & cs., 1991), hầu hết những nơi có vi khuẩn tồn tại bao gồm cả mẫu thực vật nhiễm bệnh (Wommack & Colwell, 2000).

Theo Ackermann (2007) các loài thuộc họ *Podoviridae* cũng chứa sợi đôi AND dạng thẳng có đuôi ngắn chiếm khoảng 14% trọng bộ Caudovirales. Đầu là khối đa diện cùng kích thước khoảng 60nm, chứa 72 protein ( $T = 7$ ). Đuôi có kích thước  $17 \times 8$ nm và có 6 sợi đuôi ngắn và không thể co lại, trọng lượng bộ gen khoảng trên 40kb. Cơ chế xâm nhiễm của họ *Podoviridae* vào vi khuẩn ký chủ chưa biết đến một cách rõ ràng. Tuy nhiên, các loài thuộc họ *Podoviridae* sử dụng các sợi đuôi ngắn này để bám vào bề mặt của tế bào ký chủ, sau đó bơm ADN vào tế bào ký chủ. Trong nghiên cứu này hai TKT ΦĐR05 và ΦĐR07 có phổ ký chủ hẹp, chỉ ký sinh trên vi khuẩn ký chủ của chúng, kết quả này cũng phù hợp với công bố của Sabour & Griffiths (2010) rằng các TKT có đuôi thuộc họ *Podoviridae* và *Siphoviridae* thường có phổ ký chủ hẹp hơn so họ *Myoviridae*.



Phân lập và đánh giá khả năng ly giải của thực khuẩn thể trên vi khuẩn *Pectobacterium* spp. gây bệnh thối nhũn rau cải thảo (*Brassica rapa* subsp. *pekinensis*)



Hình 2. Hình chụp TEM của 2 dòng TKT ΦDR05 (a) và ΦDR07 (b)

#### 4. KẾT LUẬN

Từ 12 mẫu đất thu thập được ở các vùng trồng cải thảo tại Lâm Đồng đã phân lập được 14 dòng thực khuẩn thể với đặc trưng hình thái vết tan có tâm trong hoặc tâm đục lớn hoặc nhỏ và được bao bởi quầng ngoài mờ với kích thước khác nhau, chia làm 6 nhóm. Tất cả 14 dòng TKT đều có phổ ký chủ hẹp và có khả năng ly giải vi khuẩn *Pectobacterium* sp. dòng DT2, trong đó hai dòng TKT ΦDR05 và ΦDR07 có khả năng ly giải vi khuẩn cao với đường kính vết tan tương ứng là 13,58mm và 9,37mm. Hai dòng TKT ΦDR05 và ΦDR07 thuộc họ *Podoviridae* của bộ *Caudovirales* với phần đầu dạng khối đa diện và đuôi ngắn.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

Abbas S.D., Zahra E., Giti E. & Majid B. (2015). Isolation of *Dickeya dadantii* strains from potato disease and biocontrol by their bacteriophages. *Brazilian Journal of Microbiology*. 46(3): 791-797.

Ackermann H.W. (2007). 5500 Phages examined in the electron microscope. *Archives of virology*. 152(2): 227-243.

Bhat K.A., Masood S.D., Bhat N.A., Bhat M.A., Razvi S.M., Mir M.R., Sabina A., Wani N. & Habib M. (2010). Current status of post harvest soft rot in vegetables: A review. *Asian Journal of Plant Sciences*. 9(4): 200-208.

Burgess L.W., Timothy E.K., Len T. & Phan Thúy Hiền (2009). Cẩm nang chuẩn đoán bệnh cây ở Việt Nam. Nhà xuất bản Trung tâm Nghiên cứu Nông nghiệp Quốc tế Australia (ACIAR). tr. 195.

Buttimer C., Lucid A., Neve H., Franz C., O'mahony J., Turner D.J., Lavigne R. & Coffey A. (2018). *Pectobacterium atrosepticum* phage vB\_PatP\_CB5: a member of the proposed genus 'Phimunavirus.' *Viruses*. 26(10): 394.

Czajkowski R., Pérombelon M.C.M., Jafra S., Lojkowska E., Potrykus M., van der Wolf J.M. & Sledz W. (2015). Detection, identification and differentiation of *Pectobacterium* and *Dickeya* species causing potato blackleg and tuber soft rot: a review. *Annals of Applied Biology*. 166(1): 18-38.

Eayre C.G., Bartz J.A. & Concelmo D.E. (1995). The Bacteriophages of *Erwinia carotovora* and *Erwinia*

- ananas* isolated from freshwater lakes. *Plant Disease*. 79: 801-804.
- Fanaei P.R., Wagemans J., Kunisch F., Lavigne R., Trampuz A. & Gonzalez M. M. (2022). Novel *Stenotrophomonas maltophilia* bacteriophage as potential therapeutic agent. *Pharmaceutics*. 14(10): 2216.
- Glasner J.D., Marquez-Villavicencio M., Kim H.S., Jahn C.E., Ma B., Biehl B.S., Rissman A.I., Mole B., Yi X., Yang C.H., Dang J.L., Grant S.R., Perna N.T. & Charkowski A.O. (2008). Niche-specificity and the variable fraction of the *Pectobacterium* pan-genome. *Molecular Plant-Microbe Interaction*. 21:1549-1560.
- Golkhandan E., Kamaruzaman S., Sariah M., Abidin M. A., Nazerian E. & Yassoralipour A. (2013). First Report of Soft Rot Disease Caused by *Pectobacterium wasabiae* on Sweet Potato, Tomato, and Eggplant in Malaysia. *Plant Disease*. 97(5): 685
- Gross D.C., Powelson M.L., Regner K.M., & Rademaker G.K. (1991). A bacteriophage-typing system for surveying the diversity and distribution of strains of *Erwinia carotovora* in potato fields. *Phytopathology*. 81: 220-226.
- Jurczak-Kurek A., Gąsior T., Nejman-Faleńczyk B., Bloch S., Dydecka A., Topka G., Necel A., Jakubowska-Deredas M., Narajczyk M., Richert M., Mieszkowska A., Wróbel B., Węgrzyn G. & Węgrzyn A. (2016). Biodiversity of bacteriophages: morphological and biological properties of a large group of phages isolated from urban sewage. *Scientific Reports*. 6: 34338.
- Kabanova A., Shneider M. M., Bugaeva E., Ha V.T.N., Miroshnikov K.A., Korzhenkov A., Kulikov E.E., Toschakov S., Ignatov A. & Miroshnikov K.A. (2018). Genomic characteristics of vB\_PpaP\_PP74, a T7-like *Autographivirinae* bacteriophage infecting a potato pathogen of the newly proposed species *Pectobacterium parmentieri*. *Advanced Virology*. 163:1691-1694.
- Kim D., Kim N., Kim C., Jeong M.I., Oh K.K., Kim B.E., Ryu J.G., Jung J., Jee S., Ryu K.Y. (2021). Investigation of antimicrobial minimum inhibitory concentration of *Pectobacterium* spp. isolated from agricultural produce. *The Korean Journal of Pesticide Science*. 25: 333-342.
- Kim H.S., Park Y.H., Nam H.; Lee Y.M., Song K., Choi C., Ahn I., Park S.R., Lee Y.H., Hwang D.J. & Van Wees S. (2014). Overexpression of the Brassica rapa transcription factor WRKY12 results in reduced soft rot symptoms caused by *Pectobacterium carotovorum* in Arabidopsis and Chinese cabbage. *Plant Biology*. 16(5): 973-981.
- Kropinski A.M., Mazzocco A., Waddell T.E., Lingohr E. & Johnson R.P. (2009). Enumeration of Bacteriophages by Double Agar Overlay Plaque Assay. In: Clokie M.R., Kropinski A.M. (eds) *Bacteriophages. Methods in Molecular Biology*<sup>TM</sup>. Humana Press. Vol. 501.
- Lai M.J., Chang K.C., Huang S.W., Luo C.H., Chiou P.Y., Wu C.C. & Lin N.T. (2016). The tail associated protein of *Acinetobacter baumannii* phage ÖAB6 is the host specificity determinant possessing exopolysaccharide depolymerase activity. *PloS One*. 11(4): e0153361.
- Lee S.Y., Magar R.T., Kim H.J., Choi K. & Lee S.W. (2021). Complete genome sequence of a novel bacteriophage RpY1 infecting *Ralstonia solanacearum* strains. *Current Microbiology*. 78: 2044-2050.
- Lim J.A., Jee S., Lee D.H., Roh E., Jung K., Oh C. & Heu S. (2013). Biocontrol of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* using bacteriophage PP1. *Journal of Microbiol Biotechnology*. 23(8): 1147-1153.
- Lương Hữu Tâm & Nguyễn Thị Thu Nga (2014). Bước đầu phân lập và đánh giá khả năng ký sinh, tính đặc hiệu của một số chủng thực khuẩn thể của vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Hội thảo quốc gia Bệnh hại thực vật*. 13: 76-84.
- Mansfield J., Genin S., Magori S., Citovsky V., Sriariyanum M., Ronald P., Dow M., Verdier V., Beer S.V., Machado M.A., Toth I., Salmond G. & Foster D.R. (2012). Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Molecular plant pathology*. 13(6): 614-629.
- Murphy A. Frederick, Claude M. Fauquet, Bishop D.H., Ghabrial S.A., Jarvis A.W., Martelli G.P., Mayo M.A. & Summers M.D. (1995). *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses*, Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Springer.
- Nguyen T.V., Roh E., Nguyen T.T. & Oh C.S. (2022). Antibiotic Resistance of *Pectobacterium* Korean Strains Susceptible to the Bacteriophage phiPccP-1. *Res. Plant Disease*. 28(3): 166-171.
- Nguyễn Thị Trúc Giang, Nguyễn Thị Thu Nga & Đoàn Thị Kiều Tiên (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 Đại học Cần Thơ*. (Chuyên đề Nông nghiệp): 194-203.
- Nguyễn Thúy An, Nguyễn Thị Thu Nga, Phạm Văn Kim và Nguyễn Văn Minh Phụng (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*



Phân lập và đánh giá khả năng ly giải của thực khuẩn thể trên vi khuẩn *Pectobacterium* spp. gây bệnh thối nhũn rau cải thảo (*Brassica rapa* subsp. *pekinensis*)

- solanacearum* Smith. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 49b: 44-52
- Phan Quốc Huy, Hồ Cảnh Thịnh, Nguyễn Thị Thu Nga & Phạm Nguyễn Minh Trung (2016). Đánh giá hiệu quả của thực khuẩn thể trong phòng trừ bệnh thối hạt trên lúa do vi khuẩn *Burkholderia glumae*. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 45b: 70-78.
- Ravensdale M., Blom T.J., Gracia-Garza J.A., Svircev A.M. & Smith R.J. (2007). Bacteriophages and the control of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. Canadian Journal of Plant Pathology. 29: 121-130.
- Roger Shivas & Dean Beasley (2005). Management of plant pathogen collections. Department of Agriculture Fisheries Forestry Australia Government.
- Romero-Calle D., Guimarães B.R., Góes-Neto A. & Billington C. (2019). Bacteriophages as alternatives to antibiotics in clinical care. Antibiotic (Basel). 8 : 138.
- Sabour P.M. & Griffiths M.W. (2010). Bacteriophages in the control of food and waterborne pathogens. American Society for Microbiology Press.
- Toth I.K., Bell K.S., Holeva M.C. & Birch P.R.J. (2003). Soft rot *erwiniae*: from genes to genomes. Molecular Plant Pathology. 4(1): 17-30. doi:10.1046/j.1364-3703.2003.00149.
- Weinbauer M.G. (2004). Ecology of prokaryotic viruses. FEMS Microbiology Reviews. 28: 127-81.
- Wommack K.E. & Colwell R.R. (2000). Virioplankton: viruses in aquatic ecosystems. Microbiology and Molecular Biology. Review. 64: 69-114.
- Xie H., Li X.Y., Ma Y.L. & Tian Y. (2017). First report of *Pectobacterium aroidearum* causing soft rot of Chinese cabbage in China. Plant Disease, PDIS-07-17-1059-PDN. doi:10.1094/PDIS-07-17-1059-PDN.