

PHÂN LẬP THỰC KHUẨN THỂ VÀ ĐÁNH GIÁ HIỆU QUẢ PHÒNG TRỊ BỆNH CHÁY BÌA LÁ LÚA DO VI KHUẨN *XANTHOMONAS ORYZAE* PV. *ORYZAE*

Nguyễn Thị Trúc Giang, Đoàn Thị Kiều Tiên và Nguyễn Thị Thu Nga¹

¹ Khoa Nông nghiệp & Sinh học Ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ

Thông tin chung:

Ngày nhận: 26/9/2014

Ngày chấp nhận: 07/11/2014

Title:

Isolation bacteriophages and evaluation of their effect in controlling bacterial leaf blight disease on rice caused by *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae*

Từ khóa:

Bệnh cháy bìa lá, phòng trừ sinh học, thực khuẩn thể, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*

Keywords:

Bacteriophage, bacterial leaf blight disease, biological control, *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae*

ABSTRACT

Study on bacteriophages in controlling bacterial leaf blight disease on rice caused by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) was conducted in laboratory and nethouse, Can Tho University. There were ten bacteriophages isolated from 26 strains Xoo original from 4 provinces of Mekong Delta i.e An Giang, Can Tho, Hau Giang, Bac Lieu with 38.46% percentage of infection by phages. Evaluation on the parasitized ability of ten phages on total 26 strains of Xoo showed that one phage could infect many bacterial strains, four phages with coded 10, 12, 13, and 17 showed higher efficiency in parasiting of many Xoo strains, and bacterial strain Xoo 44 (from Thoi Lai- Can Tho) and 52 (Long My - Hau Giang) were higher sensitive with almost isolated bacteriophage strains. Phage 12 (isolated from Chau Thanh A- Hau Giang) showed higher effect in killing strain Xoo 44 compared to phages 10,13 and 17. In nethouse, all four phages with coded 10, 12, 13 and 17 showed effect in reduction of bacterial leaf blight infection by spraying phage suspension (10^8 pfu/ml) on leaf surface before or after pathogen inoculation. Spraying phage suspension 10 or 12 before pathogen inoculation showed better disease reduction than spraying phage after pathogen inoculation, they showed higher disease control than two others.

TÓM TẮT

Kết quả nghiên cứu phân lập Thực khuẩn thể (TKT) kí sinh và tiêu diệt vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) gây bệnh cháy bìa lá lúa được thực hiện tại phòng thí nghiệm và nhà lưới Bộ môn Bảo vệ Thực vật, Trường Đại học Cần Thơ. Kết quả trong tổng số 26 chủng vi khuẩn Xoo gây bệnh phân lập tại 4 tỉnh Đồng bằng sông Cửu Long gồm An Giang, Cần Thơ, Hậu Giang, Bạc Liêu thì phân lập được 10 dòng TKT, chiếm tỉ lệ kí sinh 38,46%. Khi đánh giá về khả năng kí sinh của các dòng TKT cho thấy 4 dòng TKT có mã số 10, 12, 13, và 17 (TKT 10, 12, 13 và 17) có khả năng kí sinh trên nhiều chủng vi khuẩn, và hai chủng vi khuẩn Xoo có mã số 44 (phân lập tại huyện Thới Lai- Cần Thơ, Xoo 44) và 52 (phân lập tại Long Mỹ- Hậu Giang, Xoo 52) là mẫn cảm cao nhất đối với các dòng TKT được phân lập. Khi khảo sát khả năng thực khuẩn của 4 dòng TKT 10, 12, 13, và 17 trên chủng vi khuẩn Xoo 44, thì dòng TKT 12 (phân lập tại Châu Thành A – Hậu Giang) có khả năng tiêu diệt vi khuẩn Xoo 44 cao hơn các dòng TKT 10, 13, 17. Đánh giá hiệu quả phòng trị bệnh trong điều kiện nhà lưới, cả 4 dòng TKT 10, 12, 13, và 17 qua hai biện pháp xử lý (phun trước hoặc phun sau với huyền phù mang mật số 10^8 pfu/ml) đều thể hiện hiệu quả giảm bệnh cháy bìa lá do vi khuẩn Xoo 44 gây ra, biện pháp phun trước thể hiện hiệu quả cao hơn đối với hai dòng TKT 10 và 12, và hai dòng TKT 10 và 12 thể hiện hiệu quả phòng trị bệnh cao hơn hai dòng còn lại.

1 ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh cháy bìa lá lúa do vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) là bệnh hại quan trọng trên lúa, bệnh gây thiệt hại năng suất lúa nghiêm trọng được ghi nhận trên thế giới. Ở Việt Nam, bệnh xuất hiện thường xuyên và gây thiệt hại nặng trong điều kiện mùa mưa, thiệt hại năng suất được ghi nhận trong khoảng 25-65 % (Tạ Minh Sơn, 1993). Biện pháp phòng trị bệnh ngày nay chủ yếu dựa vào giống kháng và thuốc hóa học. Tuy nhiên, hiện nay Việt Nam vẫn chưa có nhiều giống kháng đối với bệnh này, bên cạnh đó các giống kháng cũng không bền vững nếu sử dụng trong thời gian dài do sự biến đổi liên tục của quần thể vi khuẩn gây bệnh. Do đó, biện pháp hoá chất vẫn là biện pháp chủ lực được sử dụng, tuy nhiên biện pháp này thường gây ô nhiễm môi trường, gây mất cân bằng sinh học và dễ làm cho mầm bệnh hình thành nội mới kháng thuốc. Vì thế trong xu thế sản xuất nông nghiệp sạch ngày nay thì biện pháp phòng trị sinh học bệnh được quan tâm bởi nhiều nhà khoa học. Phòng trị sinh học là biện pháp sử dụng các vi sinh vật có lợi có đặc tính ức chế sự phát triển của mầm bệnh, biện pháp này đã được ghi nhận nhiều thành tựu trên thế giới (Agrios, 2005). Phòng trừ sinh học đối với bệnh do tác nhân là vi khuẩn được ghi nhận thành công khi sử dụng các vi khuẩn đối kháng, hay kích kháng cây trồng bằng hoá chất hay dịch trích thực vật (Raupach và Kloeppe, 1998; Phan Thị Hồng Thúy và ctv., 2010; Nguyễn Thị Tầm, 2013). Ngoài ra, sử dụng TKT cũng được ghi nhận thành công đối với các bệnh do vi khuẩn (Flaherty và ctv., 2000; Schnabel và Jones, 2001; Balogh và Jones, 2003; Obradovic và ctv., 2004; Iriarte và ctv., 2007; Jones và ctv., 2007; Lang và ctv., 2007). TKT là vi rút có khả năng kí sinh tế bào vi khuẩn và giết chết tế bào vi khuẩn trong thời gian ngắn (Kutter và Sulakvelize, 2005). Ngày nay, sử dụng TKT cũng được xem là tác nhân phòng trừ sinh học quan trọng và thuốc trừ bệnh bằng TKT đã được thương mại hoá gần đây để phòng trừ bệnh do vi khuẩn (Balogh và ctv., 2010). Ở Việt Nam, chưa có nghiên cứu ghi nhận về sử dụng TKT trong phòng trị bệnh do vi khuẩn trên cây trồng đặc biệt là đối với bệnh cháy bìa lá lúa. Nghiên cứu được thực hiện nhằm phân lập các dòng TKT đối với vi khuẩn Xoo ở các tỉnh Đồng bằng sông Cửu Long (ĐBSCL), đánh giá khả năng tiêu diệt vi khuẩn Xoo trong điều kiện phòng thí nghiệm và hiệu quả phòng trị bệnh của TKT đối với bệnh trong điều kiện nhà lưới, với mục đích nhằm tìm ra chủng TKT có khả năng tiêu diệt nhiều chủng vi

khẩn Xoo và hiệu quả phòng trị bệnh hiệu quả để có thể ứng dụng trong nghiên cứu ngoài đồng.

2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Phân lập các dòng TKT phân bố ở các tỉnh ĐBSCL

– Thu thập mẫu bệnh cháy bìa lá lúa ở các tỉnh ĐBSCL, sau đó thực hiện phân lập TKT trong phòng thí nghiệm.

– Phân lập vi khuẩn Xoo: Mẫu lá bị bệnh được thanh trùng bề mặt bằng cồn 70%, sau đó lá bệnh được cắt nhỏ ra trên miếng lam thanh trùng, dùng micropipette rút vài giọt nước cất thanh trùng nhỏ lên mẫu bệnh sau khi cắt. Đợi khoảng 1 phút cho vi khuẩn trong mô lá phân tán vào giọt nước bên ngoài. Dùng micropipette rút 1 giọt huyền phù chuyển vào đĩa Petri chứa môi trường King'B agar hoặc Wakimoto đã được thanh trùng, và dùng thìa vạch vi khuẩn phân tán giọt huyền phù vi khuẩn đều trên bề mặt đĩa chứa môi trường King'B agar. Đĩa được ủ trong điều kiện phòng trong 2-3 ngày. Dựa vào hình thái khuẩn lạc và thực hiện tách rông để thu được vi khuẩn Xoo. Các chủng vi khuẩn phân lập được kiểm tra khả năng gây hại bằng cách chủng bệnh nhân tạo trên lúa, và các chủng vi khuẩn Xoo này sẽ được dùng làm nguồn để phân lập TKT ở thí nghiệm sau.

– Phân lập TKT: mẫu lá lúa 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 thanh trùng cộng thêm 5 ml nước cất thanh trùng, sau đó thực hiện ly tâm ở vận tốc 6000 vòng/ phút trong 10 phút. Tế bào thực vật lắng dưới đáy ống nghiệm, phần dung dịch trong chứa TKT và vi khuẩn được lọc qua dụng cụ lọc vi khuẩn (có đường kính lỗ lọc 0,2 μ m), thu được phần dung dịch qua lọc chỉ chứa TKT. Rút 500 μ l dung dịch qua lọc cho vào ống nghiệm chứa môi trường King B agar đã nấu tan để nguội 50°C phối hợp với 100 μ l huyền phù vi khuẩn Xoo phân lập từ mẫu bệnh tương ứng, hoà đều và đổ vào đĩa Petri thanh trùng. Đĩa được ủ trong điều kiện phòng và quan sát sự hình thành các vòng vô khuẩn (plaque), đó là nơi vi khuẩn đã bị tiêu diệt bởi virút. Mẫu TKT được trữ nguồn trong điều kiện tủ lạnh 4°C.

2.2 Khảo sát khả năng kí sinh của các dòng thực khuẩn thể trên các chủng Xoo gây bệnh khác nhau

Thí nghiệm kiểm tra khả năng kí sinh của 10 dòng TKT trên 26 chủng vi khuẩn Xoo phân lập tại

các tinh ĐBSCL. Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 3 lần lặp lại.

Các TKT được chọn từ thí nghiệm 1 nuôi trong đĩa petri cho nhân mật số trong 24 giờ. Thực hiện phương pháp pha loãng và đổ đĩa để thu đơn plaque từng dòng TKT.

Chuẩn bị đĩa cấy chứa vi khuẩn Xoo bằng cách rút 250 µl huyền phù vi khuẩn Xoo (10^9 cfu/ml) (xác định mật số vi khuẩn trong huyền phù bằng phương pháp đo độ quang truyền ở bước sóng 600 nm, sau đó dựa vào đường chuẩn để quy ra mật số, từ đó thực hiện pha loãng để tạo ra huyền phù vi khuẩn Xoo) cho vào 10 ml môi trường King's B agar đã nấu tan để nguội ở 50°C, hòa đều và đổ ra đĩa Petri thanh trùng. Dùng tăm bông vô trùng vớt plaque đơn tương ứng từng dòng trên đĩa Petri, sau đó vạch đường Ziczac vào đĩa petri chứa vi khuẩn Xoo. Mỗi đĩa Petri vạch 5 dòng TKT khác nhau và mỗi đĩa là một lần lặp lại. Đĩa được đặt ở điều kiện phòng.

Chi tiêu ghi nhận: Xác định khả năng tiêu diệt vi khuẩn của các dòng TKT trên các kí chủ khác nhau thông qua sự hình thành vòng vô khuẩn trên đĩa Petri sau 24 giờ.

2.3 Đánh giá khả năng tiêu diệt vi khuẩn Xoo của TKT trong điều kiện phòng thí nghiệm

Thí nghiệm được bố trí ngẫu nhiên, 3 lần lặp lại, với số nghiệm thức là số dòng TKT có phổ kí chủ rộng và 1 chủng vi khuẩn bị kí sinh nhiều nhất bởi các dòng TKT từ thí nghiệm 2.2.

Các dòng TKT được chọn từ thí nghiệm 2.2 được nuôi trong đĩa petri cho nhân mật số trong 24 giờ. Thực hiện đếm mật số TKT có trong huyền phù bằng phương pháp pha loãng và đổ đĩa. Đếm số plaque hình thành sau 24 giờ từ đó xác định được mật số TKT trong huyền phù (PFU/ml), thực hiện phương pháp pha loãng để đạt huyền phù của các dòng TKT khác nhau với mật số 10^3 PFU/ml.

Rút 100 µl huyền phù TKT (10^3 plaques/ml) của mỗi dòng + 250 µl huyền phù vi khuẩn Xoo (10^9 cfu/ml) cho vào ống nghiệm chứa 10 ml môi trường King' B agar đã nấu tan để nguội ở 50°C, hòa đều và đổ ra đĩa Petri thanh trùng, mỗi đĩa Petri là một lần lặp lại. Đĩa được đặt ở điều kiện phòng thí nghiệm.

Chi tiêu ghi nhận: quan sát và ghi nhận đường kính vòng vô khuẩn (plaque) mà từng dòng TKT phân giải trên đĩa Petri vào các ngày sau khi nuôi cấy bằng cách đo 20 vòng vô khuẩn ngẫu nhiên trên đĩa và lấy trung bình, số liệu được phân tích

thống kê bằng phần mềm MstatC qua phép thử Duncan.

2.4 Đánh giá hiệu quả phòng trị bệnh cháy bìa lá (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) của một số dòng TKT triển vọng trong điều kiện nhà lưới

Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên, với 5 lần lặp lại và 9 nghiệm thức trong đó gồm: 4 dòng TKT được chọn từ thí nghiệm 2.2 ở mật số 10^8 plaques/ml với hai biện pháp xử lý TKT khác nhau (phun trước hoặc phun sau khi chủng bệnh 1 ngày), và một nghiệm thức đối chứng chủng bệnh không xử lý TKT.

Chuẩn bị cây lúa: Chuẩn bị chậu trồng lúa bằng nhựa có kích thước 17,5 x 12 cm, cho vào mỗi chậu 1 kg đất. Cho nước vào ngâm và xả phen trong 2 tuần. Hạt giống lúa Jasmine 85 được xử lý 2 sôi 3 lạnh trong 30 phút, sau đó đem ủ với nhiệt độ 37°C trong 48 giờ cho hạt nảy mầm. Đem hạt gieo vào chậu, mỗi chậu gieo 20 hạt, 10 hạt/hàng. Sau khi gieo được 7 ngày thì tỉa lại còn 5 cây/hàng. Lúa được chăm sóc, tưới nước, bón phân đảm bảo cho lúa phát triển tốt. Lượng phân bón được quy ra diện tích chậu nhựa từ công thức phân bón của Nguyễn Ngọc Đệ (1998) với công thức 120 N - 40 P₂O₅ - 30 K₂O và chia ra thành 5 lần bón gồm bón lót (100% P₂O₅); bón thúc lần 1 vào 7 NSKG ($\frac{1}{4}$ N + 100% K₂O); bón thúc lần 2, 3 và 4 vào thời điểm 15, 20 và 30 NSKG. Phân bón được hòa tan vào 2750 ml H₂O, tưới 50 ml/chậu và sử dụng phân đơn dạng hạt. Phân urê và KCl được hòa tan vào nước và tưới đều cho mỗi chậu. Mực nước trong chậu khoảng 2 cm, chăm sóc và bảo vệ cây lúa không bị sâu bệnh tấn công.

Chuẩn bị nguồn TKT: TKT được nuôi trong đĩa Petri chứa môi trường Wakimoto 0,6% agar + vi khuẩn Xoo, sau 24 giờ thu hoạch huyền phù TKT, xác định mật số bằng phương pháp pha loãng và đổ đĩa, đếm số lượng plaques hình thành sau 24 giờ và suy ra mật số TKT trong huyền phù ban đầu, sau đó thực hiện pha loãng đưa về mật số như nhau là 10^8 PFU/ml.

Chuẩn bị nguồn vi khuẩn gây bệnh Xoo: Chủng vi khuẩn Xoo bị nhiều TKT kí sinh nhất được nuôi trên đĩa Petri chứa môi trường Wakimoto trong 4 ngày, sau đó cho 10 ml nước muối sinh lý vô trùng 0,9% vào để thu hoạch huyền phù vi khuẩn. Xác định mật số vi khuẩn trong huyền phù bằng phương pháp đo độ quang truyền ở bước sóng 600 nm, sau đó dựa vào đường chuẩn để quy ra mật số, từ đó thực hiện pha loãng để tạo ra huyền phù vi khuẩn Xoo mật số ($2,5 \times 10^{11}$ cfu/ml).

Phương pháp chủng bệnh: khi lúa được 45 NSKG, thực hiện chủng bệnh nhân tạo bằng kéo nhún vào huyền phù vi khuẩn Xoo sau đó cắt các chóp lá lúa (khoảng 2 cm từ chóp vào), mỗi lần nhún kéo vào huyền phù sẽ thực hiện cắt 1 lá. Các lá có chủng bệnh sẽ được đánh dấu để ghi nhận chỉ tiêu.

Phương pháp xử lý TKT: thực hiện phun TKT trước hoặc sau khi chủng bệnh với huyền phù TKT ở mật số 10^8 PFU/ml, phun đều khắp bề mặt lá lúa tương ứng từng nghiệm thức và áp dụng phun vào buổi chiều. Cây lúa sau khi chủng bệnh và xử lý TKT được đặt trong điều kiện nhà lưới có phun sương định kỳ 2 giờ lần.

Chỉ tiêu ghi nhận: (1) Đo chiều dài vết bệnh của từng lá trên cây, lấy giá trị trung bình; (2) ghi nhận cấp bệnh theo thang đánh giá của Kauffman và ctv. (1973) phân ra 5 cấp bệnh như sau: Cấp 1: Không có vết bệnh; Cấp 3: Vết bệnh <1/4 chiều dài lá; Cấp 5: Vết bệnh từ 1/4 -1/2 chiều dài lá; Cấp 7:

Vết bệnh >1/2 chiều dài lá; Cấp 9: Vết bệnh lan ra toàn lá.

Xử lý số liệu: Số liệu được xử lý bằng phần mềm MsStatC qua phép thử Duncan.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

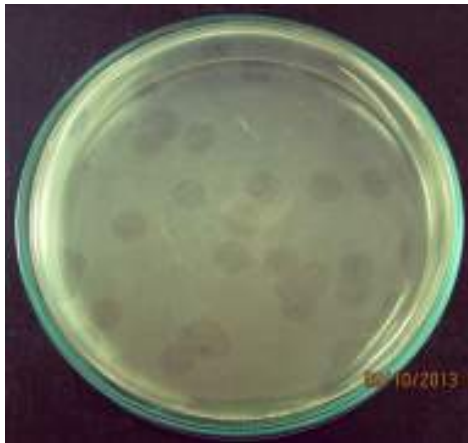
3.1 Phân lập các dòng TKT phân bố ở các tỉnh ĐBSCL

Bằng phương pháp phân lập TKT của vi khuẩn *X.oryzae* pv. *oryzae* trên mẫu lá lúa bị bệnh cháy bìa lá ở các tỉnh ĐBSCL, kết quả ghi nhận trong tổng số 26 chủng vi khuẩn Xoo phân lập từ các huyện khác nhau thuộc bốn tỉnh gồm An Giang, Cần Thơ, Hậu Giang, Bạc Liêu thì chỉ có sự hiện diện của 10 dòng TKT chiếm tỉ lệ 38,46% phân bố tại các huyện khác nhau thuộc 3 tỉnh Cần Thơ, Hậu Giang và Bạc Liêu (Bảng 1), trong đó Cần Thơ (4 chủng), Hậu Giang (5 chủng) và Bạc Liêu (1 chủng).

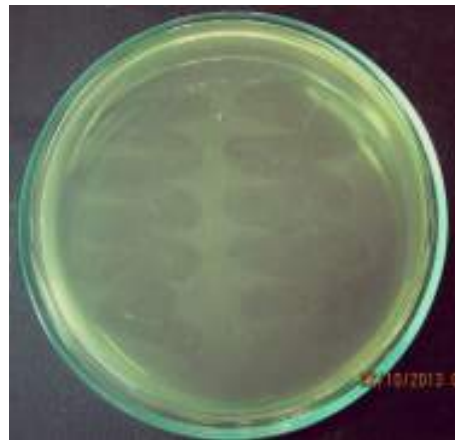
Bảng 1: Danh sách chủng vi khuẩn *X.oryzae* pv. *oryzae* và TKT tại bốn tỉnh ĐBSCL

STT	Mã số	Vị trí phân lập vi khuẩn Xoo trên lúa	TKT
1	7	Phong Điền - Cần Thơ	+
2	9	Châu Thành A - Hậu Giang	+
3	10	Châu Thành A - Hậu Giang	+
4	12	Châu Thành A - Hậu Giang	+
5	13	Phong Điền - Cần Thơ	+
6	14	Châu Thành A - Hậu Giang	+
7	17	Thới Lai - Cần Thơ	+
8	27	Châu Thành A - Hậu Giang	+
9	29	Châu Thành A - Hậu Giang	-
10	38	Bình Mỹ - Châu Phú - An Giang	-
11	39	Bình Mỹ - Châu Phú - An Giang	-
12	40	Bình Long - Châu Phú - An Giang	-
13	41	Bình Long - Châu Phú - An Giang	-
14	42	Thới Lai - Cần Thơ	-
15	43	Thới Lai - Cần Thơ	-
16	44	Thới Lai - Cần Thơ	-
17	45	Thới Lai - Cần Thơ	-
18	49	Ninh Hòa - Hồng Dân - Bạc Liêu	-
19	50	Lương Nghĩa - Long Mỹ - Hậu Giang	-
20	51	Lương Tâm - Long Mỹ - Hậu Giang	-
21	52	Lương Tâm - Long Mỹ - Hậu Giang	-
22	53	Hồng Dân - Bạc Liêu	-
23	54	TT. Ngang Dừa - Bạc Liêu	-
24	55	Ninh Hòa - Hồng Dân - Bạc Liêu	-
25	58	Tân Hưng - Thốt Nốt - Cần Thơ	+
26	2BL	Ninh Hòa - Hồng Dân - Bạc Liêu	+

Chú thích: +: có thực khuẩn ký sinh; -: không có thực khuẩn ký sinh



Hình 1: Dòng thực khuẩn 12 được phân lập trên đĩa Petri chứa môi trường King' B và vi khuẩn kí chủ



Hình 2: Dòng thực khuẩn 12 được tách rỗng và nhân mật số lập trên đĩa Petri chứa môi trường King'B và vi khuẩn kí chủ

Bảng 2: Khả năng kí sinh của 10 dòng TKT trên 26 chủng vi khuẩn *X. oryzae* pv. *Oryzae*

STT	Mã số VK Xoo	Mã số các dòng thực khuẩn thể kí sinh của vi khuẩn Xoo										Tổng số TKT kí sinh VK
		7	2BL	10	9	12	14	13	40	17	58	
1	7	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	5
2	9	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	4
3	10	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
4	12	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	1
5	13	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	4
6	17	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	3
7	27	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	5
8	29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
9	38	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	2
10	39	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	2
11	40	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	1
12	41	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	6
13	42	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	5
14	43	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	6
15	44	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	8
16	45	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	2
17	48	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	4
18	49	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	1
19	50	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	5
20	51	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	6
21	52	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	7
22	53	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	5
23	54	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	4
24	55	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	4
25	58	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	1
26	59	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Tổng số VK bị kí sinh bởi TKT		7	8	16	4	18	1	14	4	14	5	

Ghi chú: VK: vi khuẩn, TKT: thực khuẩn thể, +: có thực khuẩn ký sinh; -: không có thực khuẩn ký sinh

Kết quả cho thấy rằng có thể phân lập TKT của vi khuẩn Xoo từ môi trường trên không (tán lá cây). Theo một số nghiên cứu về TKT của *Erwinia amylovora* đã ghi nhận rằng, TKT ít được phân lập từ các phần trên không (aerial portions) của cây, thậm chí trong suốt thời gian hoạt động xâm nhiễm của vi khuẩn lên kí chủ (trích dẫn Gill và Abedon, 2003). Ngược lại, hầu hết TKT luôn được phân lập từ đất xung quanh cây bị nhiễm bệnh. Điều này cho thấy rằng, nơi chứa TKT nằm trong đất, có TKT kí sinh bên trong vi khuẩn rơi từ cây xuống mặt đất. Một nghiên cứu khác về TKT trên cùng một vi khuẩn kí chủ như trên, đã tìm thấy TKT *E. amylovora* phong phú trong môi trường tán lá cây bị nhiễm bệnh (Ritchie và Klos, 1977; trích dẫn Gill và Abedon, 2003). Điều này có thể được giải thích là do TKT từ đất xâm nhập vào tán lá cây khi hạt nảy mầm. Ngoài ra, TKT có thể di chuyển từ cây này sang cây khác trong môi trường tán lá, còn đất là nơi chứa TKT của môi trường tán lá cây chứ không phải là môi trường sống (Gill và Abedon, 2003).

3.2 Khả năng kí sinh của 10 dòng TKT trên vi khuẩn *X. oryzae* pv. *oryzae* trong điều kiện phòng thí nghiệm

Kết quả (Bảng 2) cho thấy rằng, 26 chủng vi khuẩn Xoo có sự biến động về số lượng TKT kí sinh, thấp nhất là 1 TKT và cao nhất là 8 TKT kí sinh. Trong đó, chủng vi khuẩn Xoo 44 và 52 (Thới Lai - Cần Thơ và Long Mỹ - Hậu Giang) bị kí sinh nhiều nhất bởi các dòng TKT được phân lập từ các vị trí khác nhau trong 26 chủng vi khuẩn Xoo khảo sát với số lượng dòng thực khuẩn kí sinh lần lượt là 8 và 7 dòng TKT. Chủng vi khuẩn Xoo 29 được ghi nhận không bị tấn công bởi 10 dòng TKT.

Như vậy, kết quả ghi nhận được dòng thực khuẩn 10, 12, 13 và 17 kí sinh cao với nhiều chủng vi khuẩn Xoo trong 26 chủng được phân lập từ các địa điểm khác nhau, với số lượng chủng vi khuẩn Xoo bị kí sinh lần lượt là 16, 18, 14 và 14 chủng. Các dòng TKT 7, 9, 2BL, 14, 40, và 58 kí sinh dưới 10 chủng vi khuẩn Xoo được phân lập.

3.3 Khả năng tiêu diệt chủng vi khuẩn Xoo 44 của 4 dòng thực khuẩn thể 10, 12, 13, và 17

Kết quả Bảng 3 cho thấy qua bốn thời điểm khảo sát của 4 dòng TKT 10, 12, 13, và 17 thể hiện qua đường kính phân giải vi khuẩn với mức độ khác nhau.

Ở thời điểm 12 giờ sau khi nuôi cấy (GSKNC) TKT lên môi trường chứa vi khuẩn Xoo thì giữa các dòng thực khuẩn đều cho hiệu quả tiêu diệt vi khuẩn với đường kính phân giải (plaque) từ 1,6 – 2,0 mm khác biệt ý nghĩa thống kê. Trong đó dòng TKT 12 có đường kính phân giải là 2,0 mm cao hơn và khác biệt so với các dòng TKT còn lại. Tiếp đến là đường kính phân giải dòng TKT 13 (1,7 mm) và 17 (1,7 mm) không khác biệt nhau và khác biệt với dòng TKT 10 (1,6 mm).

Ở thời điểm 24 GSKNC thì bốn dòng TKT đều cho hiệu quả tiêu diệt vi khuẩn với đường kính phân giải từ 3,8 – 5,1 mm. Trong đó, dòng thực khuẩn 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 phân giải lần lượt là 4,9 mm; 5,1 mm; 5,1 mm và 3,8 mm.

Ở thời điểm 36 GSKNC thì bán kính phân giải vi khuẩn Xoo của bốn dòng TKT tăng lên đạt từ 5,9 – 8,3 mm, dòng TKT 12 có đường kính phân giải cao nhất (8,3 mm) khác biệt ý nghĩa thống kê so với các dòng còn lại. Tiếp theo là hai dòng TKT 10 (7,2 mm) và 13 (7,3 mm) có hiệu quả tiêu diệt vi khuẩn không khác biệt nhau và khác biệt với dòng TKT 17 (5,9 mm).

Ở thời điểm 48 GSKNC thì đường kính phân giải của bốn chủng TKT đạt từ 8,1 – 11,7 mm, dòng TKT 12 (11,7 mm) có đường kính phân giải khác biệt ý nghĩa thống kê so với các dòng còn lại. Tiếp theo là hai dòng TKT 10 (10,8 mm) và 13 (10,3 mm) có hiệu quả tiêu diệt vi khuẩn không khác biệt nhau, tuy nhiên đạt cao hơn và khác biệt với dòng TKT 17 (8,1 mm).

Như vậy, dòng TKT 12 phân lập từ mẫu lá lúa bị bệnh cháy bìa lá ở huyện Châu Thành A, Hậu Giang có khả năng tiêu diệt vi khuẩn Xoo 44 cao hơn các dòng TKT 10, 13, 17 trong điều kiện *in vitro*. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Tan và *ctv.* (2009), trong việc phân lập 132 dòng thực khuẩn từ nước cống, với 30 dòng thực khuẩn cho kết quả đối kháng với *R. solanacearum* và 5 dòng TKT ức chế *Erwinia chrysanthemi* thể hiện qua đường kính phân giải từ khoảng 6 – 17 mm trong 24 – 48h.

Ngoài ra, dòng TKT 12 cũng được ghi nhận có khả năng kí sinh nhiều dòng vi khuẩn nhất trong tất cả các dòng TKT phân lập được (kết quả phần 3.2). Như vậy, đây là dòng TKT có khả năng thực khuẩn cao nhất trong các dòng TKT phân lập trong nghiên cứu trong điều kiện phòng thí nghiệm.

Bảng 3: Đường kính phân giải của 4 dòng thực khuẩn thể với vi khuẩn *X. oryzae pv.oryzae* trong điều kiện phòng thí nghiệm

Dòng thực khuẩn thể	Địa điểm phân lập	Đường kính phân giải (mm)			
		12 giờ	24 giờ	36 giờ	48 giờ
10	Châu Thành A - Hậu Giang	1,6 c	4,9 a	7,2 b	10,8 b
12	Châu Thành A - Hậu Giang	2,0 a	5,1 a	8,3 a	11,7 a
13	Phong Điền - Cần Thơ	1,7 b	5,1 a	7,3 b	10,3 b
17	Thới Lai - Cần Thơ	1,7 b	3,8 b	5,9 c	8,1 c
Mức ý nghĩa		*	*	*	*
CV (%)		2,8	3,7	2,8	1,9

Chú thích: Các số trung bình trong cùng một cột theo sau bởi một hoặc nhiều chữ giống nhau thì không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 5% theo phép thử Duncan. *: Khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 5%

3.4 Hiệu quả phòng trị bệnh cháy bìa lá do vi khuẩn *X. oryzae pv. oryzae* của một số dòng thực khuẩn thể triển vọng trong điều kiện nhà lưới

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 10⁸ pfu/ml) trong phòng trị đối với bệnh cháy bìa lá do vi khuẩn *X. oryzae pv.oryzae* (Xoo 44) gây ra. Chủng Xoo 44 (phân lập từ huyện Thới Lai- Cần Thơ) là chủng vi khuẩn mầm cảm cao với nhiều dòng TKT được chọn từ thí nghiệm 2.2.

Về chiều dài vết bệnh (Bảng 4): Ở thời điểm 8 NSKLB, biện pháp xử lý phun trước đối với dòng TKT 10 và 12 với chiều dài vết bệnh lần lượt là 10,40 cm và 11,01 cm, đạt thấp hơn và khác biệt ý nghĩa thống kê so với đối chứng (13,69 cm). Biện pháp xử lý phun trước đối với dòng TKT 13 (11,29 cm) và 17 (12,13 cm) không khác biệt ý nghĩa so với đối chứng. Biện pháp xử lý phun sau đối với 4 dòng TKT không khác biệt so với đối

chứng về mặt thống kê.

Ở thời điểm 14 NSKLB, biện pháp xử lý phun trước cũng như biện pháp phun sau đối với 4 dòng TKT 10, 12, 13 và 17 đều có chiều dài vết bệnh không khác biệt nhau và thấp hơn khác biệt ý nghĩa thống kê với đối chứng.

Về cấp bệnh (Bảng 4) cho thấy ở thời điểm 8 NSKLB, nhìn chung tất cả các nghiệm thức xử lý TKT chưa thể hiện hiệu quả giảm bệnh, trong đó biện pháp xử lý phun sau đối với dòng thực khuẩn thể 10 (3,60), 12 (3,68) và 13 (3,66) có cấp bệnh cao hơn và khác biệt ý nghĩa thống kê so với đối chứng (3,04).

Ở thời điểm 14 NSKLB, biện pháp xử lý phun trước đối với dòng thực khuẩn thể 10 (7,08) và 12 (6,84), 13 (7,04) và biện pháp xử lý phun sau đối với dòng TKT 10 (7,10) đều thấp hơn và khác biệt ý nghĩa thống kê so với đối chứng (7,46). Các nghiệm thức còn lại không khác biệt ý nghĩa thống kê so với đối chứng.

Bảng 4: Chiều dài vết bệnh và cấp bệnh cháy bìa lá (*X. oryzae pv. oryzae*) của các nghiệm thức xử lý với bốn dòng TKT trong điều kiện nhà lưới

Dòng TKT	Biện pháp xử lý	Chiều dài vết bệnh (cm)		Cấp bệnh	
		8 NSKLB	14 NSKLB	8 NSKLB	14 NSKLB
10	Phun trước	10,40 d	29,68 b	3,10 b	7,08 bc
12		11,01 cd	27,29 b	3,10 b	6,84 c
13		11,29 bcd	28,23 b	3,36 ab	7,04 bc
17		12,13 ad	30,15 b	3,08 b	7,14 abc
10	Phun sau	13,11 abc	29,69 b	3,60 a	7,10 bc
12		14,31 a	29,03 b	3,68 a	7,34 ab
13		12,20 ad	29,26 b	3,66 a	7,16 abc
17		13,94 a	30,00 b	3,36 ab	7,22 ab
ĐC		13,69 ab	34,00 a	3,04 b	7,46 a
Mức ý nghĩa		*	*	*	*
CV (%)		14,68	7,05	9,55	3,38

Chú thích: Các số trung bình trong cùng một cột theo sau bởi một hoặc nhiều chữ giống nhau thì không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 5% theo phép thử Duncan. *: Khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 5%



Hình 3: Chiều dài vết bệnh cháy bìa lá lúa (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) ở thời điểm 14 NSKLB

(a) Dòng thực khuẩn thể 10 phun trước (b) Dòng thực khuẩn thể 13 phun sau
(c) Dòng thực khuẩn thể 12 phun trước (d) Đối chứng

Nhìn chung, qua kết quả chiều dài vết bệnh thấy rằng, tất cả 4 dòng TKT qua hai biện pháp xử lý đều thể hiện được hiệu quả giảm bệnh cháy bìa lá, tuy nhiên về cấp bệnh chỉ có 3 dòng TKT gồm 10, 12 và 13 thể hiện hiệu quả giảm bệnh, trong đó dòng TKT 10 và 12 ở biện pháp phun trước cho hiệu quả ức chế bệnh cháy bìa lá do vi khuẩn Xoo ổn định qua các thời điểm khảo sát. Kết quả này tương đồng với kết quả trong *in vitro* là dòng TKT 12 có đường kính phân giải vi khuẩn cao và khả năng kí sinh nhiều dòng vi khuẩn cao nhất.

Qua kết quả này cho thấy hiệu quả phòng trị bệnh của các dòng TKT là khác nhau, có liên quan đến đường kính phân giải vi khuẩn trong *in vitro*. Qua kết quả này cho thấy rằng TKT có khả năng ngăn chặn sự phát triển của mầm bệnh vi khuẩn trên cây trồng, điều này đã được ghi nhận qua nhiều nghiên cứu (Fujiwara và *ctv.*, 2011). Kết quả này chứng minh rằng, TKT giúp giảm bệnh cháy bìa lá do vi khuẩn Xoo gây ra, tuy nhiên hiệu quả chưa thực sự cao vì có thể là do việc chùng bệnh nhân tạo bằng cách cắt lá lúa đã tạo điều kiện thuận lợi cho vi khuẩn gây bệnh xâm nhập vào mô cây và phát triển, một khi vào mô cây vi khuẩn sẽ tránh tiếp xúc trực tiếp với TKT nên hiệu quả giảm bệnh không thực sự rõ ràng.

Ngoài ra, hiệu quả của việc áp dụng thực khuẩn còn dựa vào nhiều yếu tố khác như việc áp dụng TKT như thế nào, về khả năng tồn tại của TKT trên bề mặt tán lá cây, sự hiện diện của vi khuẩn kí chủ v.v (Jones và *ctv.*, 2007). Một trong những thách thức lớn nhất trong việc sử dụng thực khuẩn để kiểm soát bệnh thực vật là khả năng hoạt

động rất ngắn trên môi trường tán lá cây (Balogh, 2008). Các nghiên cứu và thực nghiệm đã chứng minh rằng TKT bị bất hoạt khi tiếp xúc với nhiệt độ cao, độ pH cao hoặc thấp, ánh sáng mặt trời và mưa rửa trôi (Ignoffo và Garcia, 1992; Ignoffo và *ctv.*, 1989) (trích dẫn Jones và *ctv.*, 2007).

Theo Ignoffo và Garcia (1992), các tia UV-A và UV-B phổ (280-400 nm) của ánh sáng mặt trời có ảnh hưởng bất lợi lên sự tồn tại của TKT. Theo Iriarte và *ctv.* (2007), TKT trên lá cà chua tiếp xúc với cường độ cao của ánh sáng mặt trời vào ban ngày đã giảm mật số nghiêm trọng trên bề mặt lá trong vòng vài giờ sau khi áp dụng ở điều kiện ngoài đồng. TKT có thể kéo dài thời gian sống khi áp dụng trước mặt trời mọc hoặc buổi chiều hoàng hôn. Do đó, việc áp dụng vào chiều tối sẽ cho kết quả kiểm soát đốm vi khuẩn cà chua tốt hơn vào ban ngày với hiệu quả giảm bệnh 27% so với 13% (Balogh và *ctv.*, 2003). Ngoài ra, nhiệt độ và ẩm độ cũng ảnh hưởng đến cả tuổi thọ thực khuẩn thể trên lá cây (Iriarte và *ctv.*, 2007) và khả năng phân giải vi khuẩn của các thể thực khuẩn (Civerolo, 1972; trích dẫn Jones và *ctv.*, 2007). Ehrlich và *ctv.* (1964) cũng đã thử nghiệm hàng loạt các độ ẩm tương đối để đánh giá sự tồn tại của T3 coliphage trong không khí và nhận ra rằng coliphage gia tăng sự tồn tại khi độ ẩm tăng (trích dẫn Iriarte và *ctv.*, 2007). Ở nhiệt độ 32°C và độ ẩm thấp hơn 40% sẽ có ảnh hưởng tiêu cực đến sự tồn tại của thể TKT không dùng công thức bảo vệ (Iriarte và *ctv.*, 2007). Tuy nhiên, nhiệt độ và độ ẩm tương đối khác nhau đối với các dòng TKT khác nhau và phụ thuộc điều kiện thực hiện thí nghiệm.

Ngoài ra, các nghiên cứu đã chứng minh rằng TKT cần phải được áp dụng ở nồng độ cao để kiểm soát bệnh hiệu quả (Balogh, 2002). Hơn nữa, một nghiên cứu trước đây chứng minh rằng TKT chỉ cung cấp đủ kiểm soát nếu có trên những tán lá cây trước khi sự xuất hiện nguồn bệnh do vi khuẩn, và nó là không hiệu quả trong việc làm giảm quần thể vi khuẩn sau khi xâm nhập vào cây trồng (Civerolo, 1969; trích dẫn Balogh và *ctv.*, 2008). Balogh (2002) ghi nhận TKT cho kết quả kiểm soát bệnh đốm vi khuẩn cà chua nếu áp dụng ở 10^6 hoặc 10^8 PFU/ml và không hiệu quả đối với 10^4 PFU/ml. Lang và *ctv.* (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. Theo Lang và *ctv.* (2007), việc áp dụng thực khuẩn có khả năng quản lý tốt nhất bệnh cháy lá do *Xanthomonas* trên hành tây, nếu thực khuẩn có thể định vị và tồn tại trên mô thực vật trước khi bệnh xâm nhiễm và phát triển.

TKT là một thuốc trừ khuẩn sinh học (biobactericide), việc kết hợp nó với các biện pháp kiểm soát khác có thể gia tăng đáng kể hiệu quả trong kiểm soát dịch bệnh. Thể thực khuẩn đã được kết hợp thành công với tác nhân gây cảm ứng SAR trong quản lý của bệnh đốm vi khuẩn cà do vi khuẩn và *Xanthomonas* gây cháy lá của củ hành (Obradovic và *ctv.*, 2004; Lang và *ctv.*, 2007). Ứng dụng kết hợp TKT với các tác nhân kiểm soát sinh học khác như vi khuẩn đối kháng, hay bổ sung vi khuẩn kí chủ không có đặc tính gây bệnh cho các thể thực khuẩn nhằm tạo nguồn thực phẩm cho nhân mật số đủ mạnh để có thể hạn chế hiệu quả vi khuẩn gây bệnh khi chúng xuất hiện và xâm nhiễm, đây là một chiến lược thành công trong việc kiểm soát bệnh cháy lụi (fire blight) trên lê và héo xanh vi khuẩn trên thuốc lá (Tanaka và *ctv.*, 1990, Svircev và *ctv.*, 2006; trích dẫn Balogh và *ctv.*, 2008).

4 KẾT LUẬN VÀ ĐỀ XUẤT

Kết quả phân lập được 10 dòng TKT trên tổng số 26 chủng vi khuẩn Xoo khác nhau tại các tỉnh An Giang, Cần Thơ, Hậu Giang, Bạc Liêu.

Bốn dòng thực khuẩn có phổ kí chủ rộng là 10, 12, 13, và 17, và hai chủng vi khuẩn Xoo 44 và 52 là mẫn cảm cao nhất đối với các dòng TKT được phân lập.

Khảo sát khả năng thực khuẩn của 4 dòng TKT 10, 12, 13, và 17 trên chủng vi khuẩn Xoo44, thì dòng TKT 12 có khả năng tiêu diệt vi khuẩn Xoo 44 cao hơn các dòng TKT 10, 13, 17.

Đánh giá hiệu quả phòng trị bệnh trong điều kiện nhà lưới: cả 4 dòng TKT 10, 12, 13, và 17 qua hai biện pháp xử lý (phun trước hoặc phun sau với huyền phù mang mật số 10^8 pfu/ml) đều thể hiện hiệu quả bệnh cháy bìa lá do vi khuẩn Xoo 44 gây ra. Hai dòng thực khuẩn thể 10 và 12 phân lập tại Châu Thành A- Hậu Giang là hai dòng TKT thể hiện hiệu quả phòng trị bệnh cao hơn các dòng TKT còn lại ở biện pháp phun trước.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Agrios, G.N. (2005). Plant pathology, Academic Press, 922p.
2. Balogh, B., Canteros B.I., Stall R.E., and Jones J.B. (2008). Control of citrus canker and citrus bacterial spot with bacteriophages. Plant Dis.92:1048-1052.
3. Balogh, B., Jones J.B., Iriarte F.B and Momol M.T. (2010). Phage Therapy for Plant Disease Control, Current Pharmaceutical Biotechnology 11(1):48-57.
4. 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.87:949-954.
5. Flaherty, J.E., Jones J.B., Harbaugh B.K., Somodi G.C., and Jackson L.E. (2000). Control of Bacterial Spot on Tomato in the Greenhouse and Field with H-mutant Bacteriophages. HortScience 35:882-884.
6. Fujiwara, A., Fujisawa M., Hamasaki R., Kawasaki T., Fujie M., and Yamada T. (2011). Biocontrol of *Ralstonia solanacearum* by Treatment with Lytic Bacteriophages, Applied and environmental microbiology, American Society for Microbiology, pp. 4155-4162.
7. Gill, J. and Abedon S.T. (2003). Bacteriophage Ecology and Plants. APSnet Features, Online. doi: 10.1094/APSnetFeature-2003-1103.
8. Gill, J.J., Svircev, A.M., Smith, R. and Castle, A.J. (2003) Bacteriophages of *Erwinia amylovora*. Appl. Environ. Microbiol. 69, 2133-2138.
9. 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. Appl. Environ. Microbiol.73:1704-1711.

10. Jones, J.B., Jackson L.E., Balogh B., Obradovic A., Iriarte F.B., and Momol M.T. (2007). Bacteriophages for Plant Disease Control, *Annu. Rev. Phytopathol* 45:245-262.
11. Kauffman, H.E., Reddy, A.P.K., Hsieh, S.P.Y and Merca, S.D. (1973). An improved technique for evaluating resistance of rice varieties to *Xanthomonas oryzae*. *Plant Diseases Reporter* 57:537:541.
12. Kutter, E. and Sulakvelidze A. (2005). *Bacteriophages: Biology and Applications*, CRC Press, 405p.
13. Lang, J. M., Gent D. H. and Schwartz H. F. (2007). Management of *Xanthomonas* leaf blight of onion with bacteriophages and a plant activator. *Plant Dis.* 91:871-878.
14. Nguyễn Thị Tâm (2013). Đánh giá hiệu quả phòng trị bệnh của vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa* 231-1 đối với bệnh đốm vằn do nấm *Rhizoctonia solani* và cháy bìa lá lúa do vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* trong điều kiện in vitro và nhà lưới. Luận văn tốt nghiệp kỹ sư Bảo vệ thực vật, Khoa Nông nghiệp và Sinh học Ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ.
15. 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. *PlantDis.*88:736–40.
16. Phan Thị Hồng Thúy, Nguyễn Chơn Tinh, Bào Thanh Loan và Trần Thị Thu Thủy. 2010. Khả năng hạn chế một số bệnh trên lúa khi xử lý với dịch trích củ cút heo (*Ageratum coryzoides*) trong điều kiện nhà lưới. Hội thảo quốc gia bệnh hại thực vật Việt Nam. trang 195-201.
17. Raupach,G.S. and Kloepper,J.W. (1998) Mixtures of plant growth-promoting rhizobacteria enhance biological control of multiple cucumber pathogens. *Phytopathology* 88, 1158-1164.
18. Schnabel,E.L. and Jones,A.L. (2001) Isolation and characterization of five *Erwinia amylovora* bacteriophages and assessment of phage resistance in strains of *Erwinia amylovora*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 59-64.
19. Ta Minh Sơn (1993). Breeding Rice Cultivars Resistant to Bacterial Leaf Blight (*Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*) in Vietnam. *Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture* 18:351
20. Tan, G.H., Nordin M.S., Napsiah A.R. and 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.