

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM TP HCM



NGUYỄN THỊ MỸ LỆ

**NGHIÊN CỨU KHẢ NĂNG ỨC CHẾ VI KHUẨN
Xanthomonas sp. GÂY BỆNH LOÉT TRÊN CÂY CHANH
CỦA HOẠT CHẤT CHIẾT XUẤT TỪ CÂY GIAO
(*Euphorbia tirucalli* L.)**

Chuyên ngành: CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Mã số ngành: 9.42.02.01

LUẬN ÁN TIẾN SĨ CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Thành phố Hồ Chí Minh

Tháng 4/2022

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM TP HCM



NGUYỄN THỊ MỸ LỆ

**NGHIÊN CỨU KHẢ NĂNG ỨC CHẾ VI KHUẨN
Xanthomonas sp. GÂY BỆNH LOÉT TRÊN CÂY CHANH
CỦA HOẠT CHẤT CHIẾT CHIẾT XUẤT TỪ CÂY GIAO
(*Euphorbia tirucalli* L.)**

Chuyên ngành: Công nghệ sinh học

Mã số: 9.42.02.01

Người hướng dẫn khoa học:

TS. Võ Thị Thu Oanh

PGS.TS. Trần Thị Lệ Minh

Thành phố Hồ Chí Minh

Tháng 4/2022

LỜI CẢM ƠN

Trong quá trình thực hiện luận án, tôi đã nhận được sự quan tâm tạo điều kiện, chỉ bảo, giúp đỡ của thầy cô, gia đình và bạn bè. Với lòng biết ơn chân thành nhất, cho phép tôi xin được gửi lời cảm ơn đến:

Ban Giám hiệu Trường Đại Học Nông Lâm Tp. Hồ Chí Minh đã tạo điều kiện cho tôi được học tập và nghiên cứu tại trường.

Ban Giám hiệu Trường Đại Học Công nghiệp Thực phẩm Tp. Hồ Chí Minh, Ban chủ nhiệm khoa Thủy sản đã hỗ trợ, tạo điều kiện về thời gian để tôi có thể học tập và hoàn thành luận án.

Ban Chủ nhiệm Bộ môn và Quý thầy cô trong khoa Khoa học Sinh học, Quý thầy cô bộ môn Bảo vệ thực vật Trường Đại học Nông Lâm Tp. Hồ Chí Minh đã tạo điều kiện thuận lợi cho tôi trong suốt quá trình học tập và nghiên cứu tại phòng thí nghiệm.

TS. Võ Thị Thu Oanh, Bộ môn Bảo vệ thực vật và PGS. TS. Trần Thị Lệ Minh, khoa Khoa học Sinh học Trường Đại học Nông Lâm Tp. Hồ Chí Minh đã tận tình hướng dẫn, giúp đỡ và hỗ trợ tôi trong suốt thời gian thực hiện luận án này.

Xin gửi lời biết ơn chân thành nhất tới Ba, Mẹ đã luôn lo lắng, cố vũ, ủng hộ tinh thần cho con trong suốt thời gian học tập và hoàn thành luận án.

Xin gửi lời cảm ơn đến tất cả bạn bè và anh chị em đồng nghiệp đã hỗ trợ tôi trong thời gian học tập và hoàn thành luận án.

Tp. Thủ Đức, tháng 04 năm 2022

Nghiên cứu sinh

Nguyễn Thị Mỹ Lệ

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu của tôi được thực hiện dưới sự hướng dẫn của TS. Võ Thị Thu Oanh và PGS. TS. Trần Thị Lệ Minh tại trường Đại Học Nông Lâm Tp. Hồ Chí Minh. Số liệu, kết quả nêu trong luận án là trung thực đã được công bố trong các tạp chí, hội nghị khoa học bởi tác giả, nhóm tác giả, cộng tác viên và chưa được ai công bố.

Tác giả luận án

Nguyễn Thị Mỹ Lệ

TÓM TẮT

Luận án “Nghiên cứu khả năng ức chế vi khuẩn *Xanthomonas* sp. gây bệnh loét trên cây chanh của cao chiết phân đoạn từ cây Giao (*Euphorbia tirucalli* L.)” được tiến hành từ tháng 7/2017 đến tháng 6/2021. Luận án nghiên cứu các nội dung tuần tự từ xác định loài vi khuẩn *Xanthomonas* sp. gây bệnh loét trên cây chanh không hạt (*Citrus latifolia*) và chanh giáy (*Citrus aurantiifolia*) theo phương pháp truyền thống dựa trên đặc điểm hình thái có kiểm chứng theo quy trình Koch’s sau phân lập; tiến hành các đặc điểm sinh hóa và sử dụng kỹ thuật phân tử dựa trên trình tự các vùng gene 16S rDNA, *hrpW*, *pthA* để so sánh; xác định các nhóm hợp chất, hàm lượng hoạt chất có trong cao chiết từ cây giao; xác định nồng độ và đánh giá hiệu quả ức chế vi khuẩn *Xanthomonas* sp. của dịch chiết từ cây giao trong điều kiện *in vitro*, nhà lưới và ngoài đồng.

Bảy mươi lăm mẫu phân lập từ vết bệnh loét trên lá, cành và quả chanh trồng tại Bến Lức, Thạnh Hóa và Đức Huệ tỉnh Long An đều có các đặc điểm hình thái, đặc điểm sinh hóa của loài vi khuẩn *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (*X. axonopodis* pv. *citri*). Trình tự vùng gene 16S rDNA của 9 mẫu phân lập *Xanthomonas axonopodis* trong nghiên cứu có độ tương đồng cao từ 94 ÷ 99%; vùng gene *hrpW* và *pthA* tương đồng 100% với loài vi khuẩn *X. axonopodis* pv. *citri* trên cơ sở dữ liệu Genbank với hệ số bootstrap 1.000 lần lặp lại. Trình tự 3 vùng gen của vi khuẩn *X. axonopodis* pv. *citri* trong nghiên cứu đã được đưa vào cơ sở dữ liệu Genbank.

Cao phân đoạn ethyl acetate (EA) từ dịch chiết cây giao có sự hiện diện của các nhóm hợp chất alkaloid, flavonoid, tannin, terpenoid nhiều nhất và không có sự hiện diện của nhóm saponin. Hàm lượng phenolic và flavonoid thu được trong cao chiết EA là cao nhất tương ứng 106,32 mgGAE/g và 450,83 µgQE/g cao chiết. Ở nồng độ 0,75%, khả năng ức chế vi khuẩn *X. axonopodis* pv. *citri* của cao chiết EA rất cao với đường kính vòng vô khuẩn lớn 17,67mm. Kết quả phân lập các hợp chất trong cao phân đoạn EA cho thấy có sự hiện diện của các chất scopoletin, gallic acid và piperic acid với hàm lượng lần lượt 21,81 mg/g cao chiết, 14,86 mg/g cao chiết và 13,52 mg/g cao chiết và đều có hoạt tính ức chế vi khuẩn *X. axonopodis* pv. *citri* gây bệnh loét trên cây chanh. Trong đó, hợp chất piperic acid là một chất mới thu nhận được trong dịch

chiết từ cây giao ở Bình Thuận. Trong điều kiện nhà lưới, nghiệm thức xử lý dịch chiết cao EA nồng độ 1,0% ức chế tốt sự lan truyền của vi khuẩn *X. axonopodis* trong tế bào thực vật, với kích thước vết bệnh nhỏ nhất 0,91 mm, nhỏ hơn so với đối chứng 1,9 mm và hiệu quả giảm bệnh đạt cao nhất 67,84% sau 3 lần xử lý. Ngoài đồng, sử dụng dịch chiết EA ở nồng độ 1,25% để trừ bệnh loét trên cây chanh cho hiệu quả giảm bệnh trên lá là 63,75%, trên quả là 61,29% và hiệu quả kéo dài đến 21 ngày sau xử lý.

Từ khóa: Bệnh loét, Cây giao, Chanh không hạt, Dịch chiết, *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*.

SUMMARY

The dissertation “Research on inhibition capacity of *Euphorbia tirucalli* fraction extract against *Xanthomonas* sp. causing citrus canker on lime trees” was conducted from July 2017 to June 2021. The research contents of the dissertation include identification of *Xanthomonas* sp. causing citrus canker disease on Persian lime (*Citrus latifolia*) and Key lime (*Citrus aurantiifolia*) using traditional method based on verified morphological characteristics in accordance with Koch's postulates; determination of biochemical characteristics of the bacterial species and comparison of biochemical characteristics by 16S rDNA, *hrpW*, *pthA* gene-based molecular technique; determination of compound groups, content of active ingredient in *Euphorbia tirucalli* extract; determination of inhibitory concentrations and evaluation of inhibitory effect against *Xanthomonas* sp. of *Euphorbia tirucalli* extracts under *in vitro*, greenhouse and natural conditions.

75 samples isolated from canker sores on leaves, branches and fruits of lemon trees grown in Ben Luc, Thanh Hoa and Duc Hue (Long An province) all showed the morphological and biochemical characteristics of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (*X. axonopodis* pv. *citri*). The 16S rDNA gene sequences of nine different isolates have a high similarity level of 94-99%; the *hrpW* and *pthA* gene sequences are homologous to those of *X. axonopodis* pv. *citri* available in GeneBank with bootstrap values of 1000 repetitions.

The ethyl acetate (EA) fraction of *Euphorbia tirucalli* extract contains alkaloids, flavonoids, tannins, terpenoids, but not saponins. The phenolic and flavonoid contents were found in EA extracts at the highest levels of 106,32 mgGAE/g and 450,83 µgQE/g, respectively. At a concentration of 0.75%, the ability to inhibit *X. axonopodis* pv. *citri* of the EA extracts was very high with inhibitory zone diameter of 17.67mm. Scopoletin, gallic acid, and piperic acid found in the EA fraction had concentrations of 21.81 mg/g, 14.86 mg/g and 13.52 mg/g, respectively, and all had antibacterial activity against *X. axonopodis* pv. *citri* causing canker disease on lime trees. Among those, piperic acid is a new compound obtained from extracts of *Euphorbia tirucalli* grown in Binh Thuan province. Under the greenhouse condition, the experiment with EA extract at a concentration of 1% showed a good inhibitory effect on *X. axonopodis* pv. *citri* with the smallest disease zone of 0.91mm, smaller than the control sample of 1.9 mm and the efficiency of disease reduction at 67.84% after 3 times of treatment. Under

natural conditions, using the EA extract at a concentration of 1.25% to control the cankers in lime revealed a disease reduction of 63.75% in leaf and 61.29% in fruit, and its effective time was 21 days after treatment.

Từ khóa: Canker disease, *Euphorbia tirucalli* L., Seedless lemon, Extract, *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*.

MỤC LỤC

LỜI CẢM ƠN	I
LỜI CAM ĐOAN	II
TÓM TẮT	III
SUMMARY	IV
MỤC LỤC	V
DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT	VI
DANH SÁCH CÁC BẢNG	IVII
DANH SÁCH CÁC HÌNH	VIII
MỞ ĐẦU	1
Tính cấp thiết của luận án	1
Mục tiêu của luận án	2
Ý nghĩa khoa học của luận án	2
Ý nghĩa thực tiễn của luận án	2
Đối tượng nghiên cứu của luận án	2
Những đóng góp mới của luận án	2
CHƯƠNG 1:TỔNG QUAN TÀI LIỆU	4
1.1. Tổng quan về cây chanh	4
1.1.1. Nguồn gốc.....	4
1.1.2. Vị trí phân loại.....	4
1.1.3. Đặc điểm thực vật.....	5
1.1.4. Tình hình sản xuất chanh ở Long An.....	6
1.2. Tổng quan về bệnh loét do vi khuẩn trên cây chanh	8
1.2.1. Lịch sử và phân bố.....	8
1.2.2. Triệu chứng bệnh và thiệt hại về kinh tế.....	9

1.2.3. Nguồn bệnh và điều kiện phát sinh bệnh	11
1.2.4. Các dạng bệnh loét do vi khuẩn trên cây chanh	12
1.2.5. Biện pháp phòng trừ	13
1.3. Tổng quan về vi khuẩn <i>Xanthomonas axonopodis</i> gây bệnh loét trên cây chanh	17
1.3.1. Vị trí phân loại	17
1.3.2. Phổ ký chủ	18
1.3.3. Đặc điểm hình thái, sinh lý và sinh hóa	18
1.3.4. Đặc điểm di truyền của vi khuẩn <i>Xanthomonas axonopodis</i>	19
1.3.4.1. Vai trò vùng rDNA-ITS	19
1.3.4.2. Giới thiệu về các gene gây bệnh	21
1.3.5. Một số kết quả nghiên cứu trên thế giới và trong nước về vi khuẩn <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> và bệnh loét do vi khuẩn <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> trên cây có múi	22
1.4. Tổng quan về cây giao (<i>Euphorbia tirucalli</i> L.)	27
1.4.1. Phân loại thực vật	27
1.4.2. Đặc điểm thực vật	28
1.4.3. Nguồn gốc và phân bố	29
1.4.4. Thành phần hóa học của cây giao (<i>E. tirucalli</i>)	30
1.4.5. Khả năng ức chế vi khuẩn gây bệnh trên cây trồng của dịch chiết cây giao (<i>E. tirucalli</i>)	31
1.5. Tổng quan về hợp chất thứ cấp phenolic	32
1.5.1. Phenolic	32
1.5.2. Tính chất kháng khuẩn của các hợp chất phenolic	33
CHƯƠNG 2: VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	34
2.1. Thời gian và địa điểm nghiên cứu	34
2.2. Nội dung nghiên cứu	34
2.3. Vật liệu nghiên cứu	35

2.4. Phương pháp nghiên cứu	35
2.4.1. Phân lập và xác định loài vi khuẩn <i>Xanthomonas</i> sp. gây bệnh loét trên cây chanh theo hình thái, đặc điểm sinh hóa, trình tự vùng 16S rDNA, <i>hrpW</i> và <i>pthA</i>	35
2.4.1.1. Xác định loài vi khuẩn <i>Xanthomonas</i> sp. gây bệnh theo hình thái và đặc tính sinh hóa	35
2.4.1.2 Xác định loài vi khuẩn <i>Xanthomonas</i> sp. dựa vào trình tự vùng 16S rDNA, <i>hrpW</i> và <i>pthA</i>	38
2.4.2. Đánh giá hoạt tính ức chế vi khuẩn <i>Xanthomonas</i> sp. của cao chiết phân đoạn từ cây giao trong điều kiện <i>in vitro</i>	41
2.4.2.1. Xác định độ ẩm của mẫu bột cây giao	42
2.4.2.6. Xác định hợp chất trong cao phân đoạn có hoạt tính ức chế vi khuẩn <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i>	50
2.4.2.7. Xác định hàm lượng các hợp chất có trong cao chiết phân đoạn có hoạt tính ức chế vi khuẩn <i>X. axonopodis</i> cao nhất	53
2.4.3. Đánh giá hiệu quả đối với bệnh loét do vi khuẩn <i>X. axonopodis</i> gây ra của cao chiết phân đoạn từ cây giao trong nhà lưới và ngoài đồng	54
2.4.3.1. Xác định liều lượng ức chế vi khuẩn <i>Xanthomonas axonopodis</i> trong điều kiện nhà lưới của cao chiết phân đoạn từ cây giao ở các nồng độ khác nhau	54
2.4.3.2. Đánh giá hiệu quả phòng trừ bệnh loét trên cây chanh của cao chiết phân đoạn từ cây giao ngoài đồng	56
2.4.4. Phương pháp xử lý số liệu	57
CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	58
3.1. Xác định loài vi khuẩn <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> gây bệnh loét trên cây chanh theo hình thái, đặc điểm sinh hóa, trình tự vùng 16S rDNA, <i>hrpW</i> và <i>pthA</i>	58
3.1.1. Xác định loài vi khuẩn <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> gây bệnh theo hình thái và đặc điểm sinh hóa	58
3.1.2. Kết quả khảo sát khả năng gây bệnh của các MPL <i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i> theo quy tắc Koch's	63
3.1.3. Xác định loài <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> dựa vào trình tự vùng gene 16S rDNA, <i>hrpW</i> và <i>pthA</i>	67
3.1.3.1. Xác định loài <i>Xanthomonas</i> sp. dựa vào trình tự vùng gene 16S rDNA	68
3.1.3.2. Xác định loài vi khuẩn <i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i> dựa vào vùng gene <i>hrpW</i>	70

3.1.3.3. Xác định loài vi khuẩn <i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i> dựa vào vùng gene <i>pthA</i>	72
3.2. Đánh giá hoạt tính ức chế vi khuẩn <i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i> của cao chiết phân đoạn từ cây giao trong điều kiện phòng thí nghiệm	75
3.2.1. Kết quả tạo cao chiết toàn phần và các cao phân đoạn từ cây giao (<i>Euphorbia tirucalli</i> L.)	76
3.2.2. Đánh giá hoạt tính ức chế vi khuẩn <i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i> của các cao chiết phân đoạn	77
3.2.3. Kết quả định tính các nhóm hoạt chất có trong các cao chiết phân đoạn từ cây giao ...	81
3.2.4. Hàm lượng phenolic tổng và flavonoid tổng của cao chiết phân đoạn từ cây giao (<i>E. tirucalli</i>)	84
3.2.5. Kết quả phân lập hợp chất	86
3.2.5.1. Hợp chất scopoletin (hợp chất 1)	90
3.2.5.2. Hợp chất gallic acid (hợp chất 2)	91
3.2.5.3. Hợp chất piperic acid (hợp chất 3)	92
3.2.5.4. Hợp chất 3,3',4-tri-O-methylelagic acid (Hợp chất 4)	93
3.2.6. Hàm lượng các hợp chất có trong cao chiết phân đoạn có hoạt tính ức chế vi khuẩn <i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i> cao nhất	96
3.3. Đánh giá hiệu quả đối với bệnh loét do vi khuẩn <i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i> gây ra của cao chiết phân đoạn từ cây giao trong nhà lưới và ngoài đồng	97
3.3.1. Đánh giá hiệu quả đối với bệnh loét do vi khuẩn <i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i> của cao chiết EA từ cây giao ở các nồng độ khác nhau trong điều kiện nhà lưới	98
3.3.2. Hiệu quả phòng trừ bệnh loét do vi khuẩn <i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i> gây ra trên cây chanh của cao chiết ethyl acetate từ cây giao ở các nồng độ khác nhau ngoài đồng	101
3.3.2.1. Hiệu quả phòng trừ bệnh loét trên lá chanh của cao chiết ethyl acetate ở các nồng độ khác nhau	101
3.3.2.2. Hiệu lực phòng trừ bệnh loét trên quả chanh của cao chiết EA ở các nồng độ khác nhau	103
CHƯƠNG 4: KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ	107
4.1. Kết luận	107
4.2. Đề nghị	107
DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH NGHIÊN CỨU CÓ LIÊN QUAN ĐÃ CÔNG BỐ	109

TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	110
PHỤ LỤC.....	126

DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT

Chữ viết tắt	Diễn giải
AFLP:	Amplified Fragment Length Polymorphism (Đa hình độ dài đoạn cắt hạn chế)
BL:	Bến Lức
BLKC:	Cành chanh không hạt thu nhận từ Bến Lức
BLKL:	Lá chanh không hạt thu nhận từ Bến Lức
BLKQ:	Quả chanh không hạt thu nhận từ Bến Lức
BNNPTNT:	Bộ Nông nghiệp phát triển nông thôn
Bu	Cao chiết phân đoạn butanol từ cây giao
C:	Cành
CC:	Column Chromatography (Sắc ký cột)
CFU:	Colony Forming Units
Ctv:	Cộng tác viên
DMSO:	Dimethyl sulfoxid
DHKC:	Cành chanh không hạt thu nhận từ Đức Huệ
DHKL:	Lá chanh không hạt thu nhận từ Đức Huệ
DHKQ:	Quả chanh không hạt thu nhận từ Đức Huệ
ĐBSCL:	Đồng bằng sông Cửu Long
He	Cao chiết phân đoạn hexan từ cây giao
HPLC:	High Performance Liquid Chromatography (Sắc ký lỏng cao áp)
EA	Cao chiết phân đoạn ethyl acetate từ cây giao
EtOH	Cao chiết toàn phần từ cây giao
EPPO:	European and Mediterranean plant protection Organization (Tổ chức bảo vệ thực vật Châu Âu và

	Địa Trung Hải)
EU:	European Union (Liên Minh Châu Âu)
ISPM:	International Standards for phytosanitary measure (Tiêu chuẩn Quốc Tế về kiểm định thực vật)
ITS:	Internal Transcribed Spacer (Vùng đệm trong được sao mã)
L:	Lá
MIC:	Minimum Inhibitory Concentration (Nồng độ ức chế tối thiểu)
MPL:	Mẫu phân lập
NA:	Nutrient Agar
NB:	Nutrient broth
NCCLS:	National Committee for Clinical Laboratory Standards (Ủy Ban Quốc gia về Tiêu chuẩn thử nghiệm lâm sàng)
NMR:	Nuclear Magnetic Resonance (Cộng hưởng từ hạt nhân)
NT:	Nghiệm thức
PCR:	Polymerase Chain Reaction (phản ứng chuỗi polymerase)
PGA:	Potato Glucose Agar
Q:	Quả
QCVN:	Quy chuẩn Việt Nam
RAPD:	Random Amplified Polymorphic DNA (DNA đa hình được nhân bản ngẫu nhiên)
Rep-PCR:	Repetitive element polymerase chain reaction (PCR với yếu tố lặp lại)

RFLP:	Restriction Fragment Length Polymorphisms (Đa hình độ dài nhân bản chọn lọc)
rDNA:	Ribosomal deoxynucleotide acide
rRNA:	Axit ribonucleic ribosome
SD:	Standard Deviation (Độ lệch chuẩn)
SEM:	Scanning electron microscopic (Kính hiển vi điện tử quét)
TCVN:	Tiêu chuẩn Việt Nam
THHC:	Cành chanh giấy thu nhận Thanh Hóa
THHL:	Lá chanh giấy thu nhận Thanh Hóa
THHQ:	Quả chanh giấy thu nhận Thanh Hóa
THKC:	Cành chanh không hạt thu nhận Thanh Hóa
THKL:	Lá chanh không hạt thu nhận Thanh Hóa
THKQ:	Quả chanh không hạt thu nhận Thanh Hóa
UBND:	Ủy ban nhân dân
USDA:	United States Department of Agriculture (Bộ Nông nghiệp Hoa Kỳ)
<i>Xac:</i>	<i>Xanthomonas axonopodis pv. citri</i>
YDC:	Yeast extract Dextrose
YS:	Yeast extract salt

DANH SÁCH CÁC BẢNG

Bảng 2.1. Các đặc điểm sinh hóa và tiêu chí định danh vi khuẩn <i>X. axonopodis</i> .	36
Bảng 2.2. Chu trình nhiệt phản ứng PCR của ba cặp mồi.....	39
Bảng 2.3. Thông tin loài vi khuẩn <i>Xanthomonas</i> spp. trên Genbank được sử dụng để so sánh loài theo trình tự vùng 16S rDNA.....	40
Bảng 2.4. Thông tin loài vi khuẩn <i>Xanthomonas</i> spp. trên Genebank được sử dụng để so sánh loài theo trình tự vùng pthA và hrpW.....	41
Bảng 2.5. Bảng bố trí nghiệm thức đánh giá khả năng ức chế vi khuẩn <i>X. axonopodis</i> của các cao chiết phân đoạn trong phòng thí nghiệm.....	45
Bảng 2.6. Nghiệm thức các cao chiết phân đoạn ở các nồng độ khác nhau sử dụng trong thí nghiệm.....	47
Bảng 2.7. Chương trình gradient pha động.....	53
Bảng 2.8. Các nghiệm thức thí nghiệm trong nhà lưới.....	55
Bảng 2.9. Các nghiệm thức thí nghiệm ngoài đồng.....	56
Bảng 3.1. Kết quả đặc điểm sinh hóa của 75 MPL được phân lập ở Long An.....	61
Bảng 3.2. Đặc điểm sinh hóa của 75 MPL <i>X. axonopodis</i> từ cây chanh ở Long An với các <i>X. axonopodis</i> được phân lập trên thế giới.....	62
Bảng 3.3. Kết quả tỷ lệ vết bệnh trên lá, quả và cành chanh của 9 MPL <i>Xanthomonas</i> ở các ngày sau chủng.....	63
Bảng 3.4. Đường kính trung bình vết bệnh (mm) trên lá, quả và cành chanh của 9 MPL <i>Xanthomonas</i> ở các ngày sau chủng.....	64
Bảng 3.5. Kết quả hiệu suất chiết cao toàn phần và các cao phân đoạn từ cây giao thu thập ở Bình Thuận, Đắk Nông và Tp. HCM.....	76
Bảng 3.6. Độ ẩm của cao toàn phần và các cao phân đoạn từ cây giao thu thập ở Bình Thuận, Đắk Nông và Tp. HCM.....	77
Bảng 3.7. Đường kính vòng vô khuẩn của các cao chiết phân đoạn đối với vi khuẩn <i>Xanthomonas</i> (mm).....	78

Bảng 3.8. Kết quả nồng độ ức chế tối thiểu (MIC - mg/mL) vi khuẩn Xanthomonas của các cao chiết phân đoạn từ cây giao.....	80
Bảng 3.9. Kết quả định tính các nhóm hoạt chất trong các cao chiết phân đoạn từ cây giao.....	83
Bảng 3.10. Kết quả hàm lượng phenolic tổng và flavonoid tổng trong các cao chiết phân đoạn từ cây giao thu nhận ở Bình Thuận và Đắk Nông.....	85
Bảng 3.11. Dữ liệu phổ NMR của hợp chất 1, 2 và 3.....	90
Bảng 3.12. Dữ liệu phổ NMR của hợp chất 4.....	94
Bảng 3.13. Hàm lượng gallic acid, scopoletin và piperic acid trong cao toàn phần từ cây giao.....	97
Bảng 3.14. Hiệu quả phòng trừ bệnh loét trên cây chanh của cao EA ở các nồng độ khác nhau trong điều kiện nhà lưới.....	99
Bảng 3.15. Kích thước vết bệnh (mm) ở các thời điểm theo dõi.....	100
Bảng 3.16. Ảnh hưởng của các nồng độ EA xử lý đến chỉ số bệnh (%) và hiệu quả giảm bệnh trên lá chanh.....	103
Bảng 3.17. Ảnh hưởng của các nồng độ cao chiết EA đến chỉ số bệnh và hiệu quả giảm bệnh trên quả chanh.....	105

DANH SÁCH CÁC HÌNH

Hình 1.1. Cây chanh giấy (<i>C. aurantifolia</i> Swingle) và chanh không hạt (<i>C. latifolia</i> Tanaka).....	5
Hình 1.2. Biểu đồ diện tích chanh tỉnh Long An từ năm 2014 ÷ 2020.....	7
Hình 1.3. Bảng đồ phân bố của bệnh loét trên cây có múi do vi khuẩn <i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i>	8
Hình 1.4. Triệu chứng bệnh loét do vi khuẩn <i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i> trên cây chanh.....	10
Hình 1.5. Triệu chứng bệnh loét do vi khuẩn <i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i> và <i>X. axonopodis</i> pv. <i>aurantifolia</i> trên cây chanh.....	13
Hình 1.6. Hình dạng vi khuẩn <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> trên lá chanh.....	19
Hình 1.7. Trình tự vùng ITS được thiết kế bởi môi J-RXc2 của <i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i>	20
Hình 1.8. Cụm gene hrp của <i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i>	22
Hình 1.9. Hình thân, hoa, lá và quả cây giao (<i>E. tirucalli</i>).....	29
Hình 2.1. Các bố trí thí nghiệm đục lỗ thạch trên đĩa petri.....	44
Hình 2.2. Sơ đồ xác định hợp chất trong cao phân đoạn có hoạt tính ức chế vi khuẩn <i>Xanthomonas</i> sp.....	52
Hình 3.1. Triệu chứng bệnh loét trên lá, quả và cành chanh do vi khuẩn <i>Xanthomonas</i> sp. gây ra	59
Hình 3.2. Hình dạng khuẩn lạc vi khuẩn <i>Xanthomonas</i> sp. phân lập trên môi trường NA và YDC.....	60
Hình 3.3. Triệu chứng bệnh do <i>X. axonopodis</i> (BLKQ1) gây ra trên quả tại 9 NSC và 15 NSC và lá tại 15 NSC.....	66
Hình 3.4. Kết quả chụp SEM vết bệnh trên lá và quả chanh gây ra bởi vi khuẩn <i>Xanthomonas</i> sp. sau khi chủng Koch's.....	67
Hình 3.5. Kết quả điện di sản phẩm PCR của 9 MPL <i>Xanthomonas axonopodis</i> với cặp primer 27F - 1492R.....	68

Hình 3.6. Sơ đồ phân nhóm di truyền của 9 MPL <i>Xanthomonas axonopodis</i> xây dựng theo phương pháp Maximum Composite Likelihood dựa trên trình tự vùng 16S rDNA.....	70
Hình 3.7. Kết quả điện di sản phẩm PCR của 9 MPL <i>Xanthomonas axonopodis</i> với cặp primer XacF - XacR.....	71
Hình 3.8. Sơ đồ phân nhóm di truyền của 9 MPL <i>Xanthomonas axonopodis</i> , xây dựng theo phương pháp Maximum Composite Likelihood dựa trên trình tự gene hrpW	72
Hình 3.9. Sản phẩm PCR khuếch đại gene pthA của 8 MPL <i>Xanthomonas axonopodis</i> với các cặp mồi J-pth1/J-pth2.....	73
Hình 3.10. Sơ đồ phân nhóm di truyền của 8MPL <i>Xanthomonas axonopodis</i> , xây dựng theo phương pháp Maximum Composite Likelihood dựa trên trình tự gene pthA.....	73
Hình 3.11. Kết quả align trình tự vùng gene pthA của 8 MPL <i>Xanthomonas axonopodis</i> với trình tự vùng gene pthA của các dòng vi khuẩn <i>Xanthomonas</i> sp. đã được công bố trên GeneBank.....	75
Hình 3.12. Kết quả đường kính vòng vô khuẩn đối với vi khuẩn <i>Xanthomonas</i> của các cao chiết từ cây giao ở nồng độ 7,5 mg/mL, kháng sinh Streptomycin (0,01 mg/mL) bằng phương pháp khuếch tán giếng thạch.....	81
Hình 3.13. Kết quả phân lập các hợp chất từ mẫu cây giao (<i>E. tirucalli</i>) thu nhận ở Bình Thuận.....	88
Hình 3.14. Kết quả phân lập các hợp chất từ mẫu cây giao (<i>E. tirucalli</i>) thu nhận ở Đắk Nông.....	89
Hình 3.15. Cấu trúc hợp chất scopoletin.....	91
Hình 3.16. Cấu trúc hợp chất 2 (galllic acid).....	92
Hình 3.17. Cấu trúc hợp chất 3 (piperic acid).....	93
Hình 3.18. Cấu trúc hợp chất 4 (3,3',4'-tri-O-methylellagic acid).....	95
Hình 3.19. Ảnh hưởng của nồng độ cao chiết EA (ethyl acetate) đến tỷ lệ bệnh loét trên lá chanh.....	102

Hình 3.20. Ảnh hưởng của nồng độ cao chiết EA đến tỷ lệ bệnh loét trên quả
chanh..... 104

MỞ ĐẦU

Tính cấp thiết của luận án

Bệnh loét là một trong những bệnh hại nghiêm trọng trên cây có múi trong đó có cây chanh, làm ảnh hưởng đến chất lượng và giá trị thương phẩm của quả. Bệnh tấn công chủ yếu vào cành, lá và quả non làm cho lá bị bệnh dễ rụng; quả bị bệnh xuất hiện những vết nứt, rần, xù xì, quả khô, ít nước, bị biến dạng và rụng sớm. Theo thống kê của tỉnh Long An, trong mùa khô, bệnh loét gây hại trên lá và quả từ 10 ÷ 15%, vào mùa mưa ẩm độ cao, dịch bệnh bùng phát mạnh làm bệnh lây lan rất nhanh trên diện rộng và rất khó kiểm soát.

Để phòng trừ bệnh này, nông dân thường sử dụng hỗn hợp rất nhiều loại thuốc BVTV hóa học để trừ cùng lúc với nhiều đối tượng dịch hại khác nhau, do đó hiệu quả không cao, một số thuốc có độ độc cao, thời gian cách ly dài, phun nhiều lần/vụ, liều lượng sử dụng cao, một số thuốc nằm trong danh mục cấm, hạn chế sử dụng trên cây ăn quả xuất khẩu, từ đó dẫn đến sản phẩm không an toàn, không đạt tiêu chí xuất khẩu và làm tăng giá trị đầu tư. Hiện nay, sản xuất nông nghiệp ở nước ta đang phát triển theo hướng hữu cơ nên việc sử dụng các tác nhân sinh học, kích kháng và thảo mộc để tạo chế phẩm sinh học có hiệu quả cao, thân thiện với môi trường đang là hướng nghiên cứu được quan tâm hàng đầu trong biện pháp sinh học nhằm từng bước thay thế thuốc BVTV hóa học trong nền sản xuất nông nghiệp hữu cơ.

Cây giao (*Euphorbia tirucalli* L.) là một loại thảo mộc thuộc chi *Euphorbia*, được sử dụng trong y học cổ truyền của Việt Nam và các nước trên Thế giới. Qua các dẫn liệu nghiên cứu cho thấy, trong cây giao có chứa các nhóm hợp chất có hoạt tính sinh học như: alkaloids, phenolic, tannin, flavonoids và terpenoids. Dịch chiết từ cây giao có khả năng kháng nhiều loại vi khuẩn Gram (-), Gram (+). Trong y học, cây giao đã được biết đến với các tính năng chữa bệnh như: mụn cóc, ung thư, lậu, viêm khớp, hen suyễn, ho, đau tai, đau dây thần kinh, thấp khớp, đau răng, ... (Cataluna và ctv, 1999). Ngoài ra, dịch chiết cây giao còn có khả năng ức chế vi khuẩn *X. campestris* pv. *campestris*; *Erwinia carotovora* pv. *carotovora* và *Pseudomonas solanacearum* gây bệnh trên cây trồng (Liror và ctv, 1998). Tuy nhiên cho tới nay, ở Việt Nam chưa có nhiều nghiên cứu ứng dụng dịch chiết từ cây giao để phòng trừ vi khuẩn gây bệnh cây trồng nông nghiệp. Do đó, việc nghiên cứu ứng dụng dịch chiết từ cây giao để phòng

trừ bệnh loét trên cây chanh và các cây trồng khác là điều cần thiết. Trên cơ sở đó, luận án “Nghiên cứu khả năng ức chế vi khuẩn *Xanthomonas* sp. gây bệnh loét trên cây chanh của hoạt chất chiết xuất từ cây giao (*Euphorbia tirucalli* L.)”.

Mục tiêu của luận án

Xác định được cấu trúc hóa học, hàm lượng của các nhóm hoạt chất và đánh giá hiệu quả ức chế vi khuẩn *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* của các cao chiết phân đoạn chiết xuất từ cây giao, làm cơ sở để phát triển chế phẩm sinh học có nguồn gốc thảo mộc trong quản lý bệnh hại trên cây có múi và các cây trồng khác có cùng tác nhân do vi khuẩn gây ra.

Ý nghĩa khoa học của luận án

Từ dịch chiết cây giao đã xác định được cấu trúc và hàm lượng các hoạt chất trong cao chiết EA cung cấp dữ liệu sinh hóa cho nghiên cứu tạo chế phẩm thảo mộc.

Luận án xác định được loài *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* theo đặc điểm hình thái, sinh hóa và vùng gene chuyên biệt rDNA - ITS, *hrpW* và *pthA* góp cơ sở dữ liệu phân tử, cung cấp cho các nhà khoa học nghiên cứu chuyên sâu về loài vi khuẩn gây bệnh loét trên cây chanh tại Long An, Việt Nam.

Ý nghĩa thực tiễn của luận án

Kết quả xác định được hiệu quả ức chế vi khuẩn *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* của cao chiết EA từ cây giao đã chứng minh tính hiệu quả, tính khả thi của cao chiết EA trong phòng trừ bệnh loét trên cây chanh tại Long An.

Đối tượng nghiên cứu của luận án

Vi khuẩn *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* gây bệnh trên cây chanh giầy và chanh không hạt ở Long An.

Cao chiết chiết xuất từ cây giao (*Euphorbia tirucalli* L.) thu từ Bình Thuận (Phan Thiết); Đắk Nông (Cư Jut) và Tp. Hồ Chí Minh (Bình Chánh).

Những đóng góp mới của luận án

Đã xác định được loài vi khuẩn *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* gây bệnh loét trên cây chanh tại Long An. Trình tự vùng 16S rDNA, *hrpW* và *pthA* của 9 MPL *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* đã được đăng ký trên Genebank.

Đã xác định được thành phần hợp chất và định lượng nhóm hợp chất phenolic và flavonoid trong cao chiết từ cây giao.

Đã xác định được cấu trúc và hàm lượng hợp chất gallic acid, scopoletin, piperic acid và 3,3',4-tri-O-methylelagic acid trong cao chiết EA từ cây giao, trong đó hợp chất piperic acid là chất mới được cô lập trong cao chiết EA.

Đã xác định được hoạt tính ức chế của cao chiết EA từ cây giao đối với vi khuẩn *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* trong phòng thí nghiệm và hiệu quả của cao chiết EA trong phòng trừ bệnh loét trên cây chanh ở điều kiện nhà lưới và ngoài đồng.

CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. Tổng quan về cây chanh

1.1.1. Nguồn gốc

Chanh giấy (*Citrus aurantifolia* Swingle), chanh có nguồn gốc xuất phát từ vùng Indonesia và Malaysia. Những người Ả Rập đã mang cây chanh đến Bắc Phi và Tây Nam Á rồi đến Địa Trung Hải. Đến giữa thế kỉ XIII, chanh giấy được trồng tại Ý và Pháp.

Chanh không hạt (*Citrus latifolia* Tanaka) là giống chanh được lai từ chanh giấy (*C. aurantifolia* Swingle) với giống chanh yên (*C. medica*). Theo một số báo cáo, chanh không hạt có bộ gen tam bội dù chỉ có 18 bộ nhiễm sắc thể. Chanh không hạt đã được trồng ở khu vực Địa Trung Hải với tên gọi khác là “Sakhesli”. Sau đó được các thương nhân Bồ Đào Nha mang đến Brazil và từ đây mang đến Úc năm 1824. Cây chanh không hạt đến California từ Tahiti giữa các năm 1850 ÷ 1880 và được đưa đến Florida vào năm 1883 (Morton, 1987). Ở miền nam Việt Nam, chanh không hạt được trồng nhiều và phổ biến ở các tỉnh ĐBSCL đem lại hiệu quả kinh tế cao, không chỉ được tiêu thụ trong nước mà còn xuất khẩu (Hồ Cao Việt, 2016).

1.1.2. Vị trí phân loại

Cây chanh thuộc họ Cửu lý hương (Rutaceae), bộ Sapindales, chi Citrus. Cây chanh được trồng hiện nay có hai loại: chanh giấy (chanh ta) và chanh không hạt (chanh lai). Chanh giấy có tên khoa học là *C. aurantifolia* Swingle, tên tiếng Anh gọi là Lime. Chanh không hạt có tên khoa học là *C. latifolia* Tanaka. Vị trí phân loại của chanh giấy được xếp như sau:

Giới (Kingdom): Plantae

Bộ (Order): Sapindales

Họ (Family): Rutaceae

Chi (Genus): Citrus

Loài (Species): *Citrus aurantifolia*.

Vị trí phân loại của chanh không hạt được xếp như sau:

Giới (Kingdom): Plantae

Bộ (Order): Sapindales

Họ (Family): Rutaceae

Chi (Genus): Citrus

Loài (Species): *Citrus latifolia*

1.1.3. Đặc điểm thực vật

Chanh giấy được trồng ở nước ta từ rất lâu, là loài cây bụi, cao khoảng 5 m. Thân cây hiếm khi mọc thẳng mà tỏa nhiều nhánh từ nơi gần gốc, thân có nhiều gai nhọn. Lá hình trứng, dài khoảng $2,5 \div 9,0$ cm, nhìn giống lá cam. Hoa chanh có đường kính khoảng 2,5 cm, màu trắng ngả sang màu vàng, có gân màu tím nhạt. Cây đơm hoa kết trái quanh năm nhưng ra quả nhiều nhất từ tháng 5 đến tháng 9. Quả chín sau từ 5 đến 6 tháng khi hoa nở. Quả có vỏ mỏng, nhiều nước, mùi thơm, vị chua và nhiều hạt (Hình 1.1 A).



Hình 1.1. Cây chanh giấy (*C. aurantifolia* Swingle) và chanh không hạt (*C. latifolia* Tanaka)

(A: cây chanh giấy; B: cây chanh không hạt)

(Nguồn: Trung tâm nghiên cứu và phát triển cây giống học viện nông nghiệp Việt Nam)

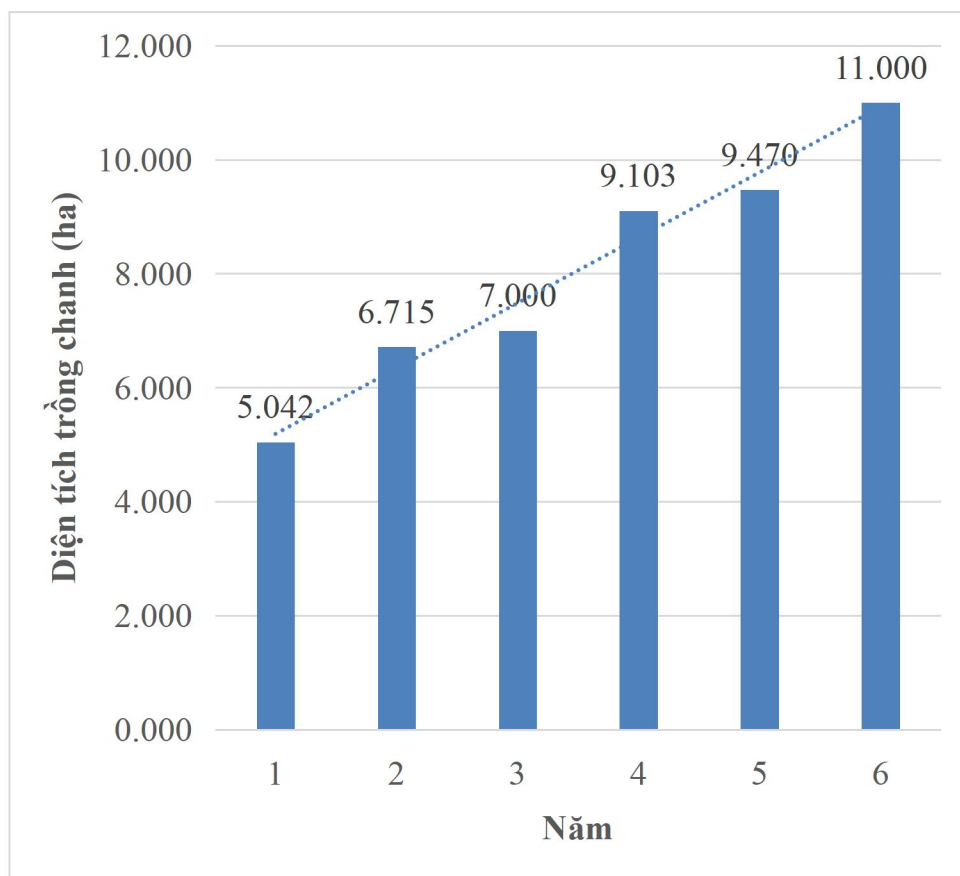
Chanh không hạt là một giống chanh lai giữa chanh giấy và chanh yên, được trồng rất phổ biến trên thế giới. Ở Việt Nam, chanh không hạt được nhập từ bang California (Mỹ). Cây mọc cao đến 6 m, thân không có gai, tán lá tròn, trái chùm, trái to 6 ÷ 7 quả/kg, không hạt, vỏ mỏng, màu xanh sáng, nhiều nước, vị ít chua có mùi thơm và không có vị đắng như chanh giấy nên được nhiều người ưa chuộng và giá trị xuất khẩu cao. Cây cho trái quanh năm, có thể cho năng suất quả 150 ÷ 200 kg/năm/cây (Hình 1.1 B).

1.1.4. Tình hình sản xuất chanh ở Long An

Ở phía Nam, cây chanh được trồng chủ yếu ở vùng ĐBSCL (chiếm gần 60% tổng diện tích chanh cả nước). Chanh có 2 vụ/năm, chanh trái vụ (mùa khô) giá chanh tăng từ 35 ÷ 45% so với chính vụ (mùa mưa). Sau khi trồng từ 18 ÷ 20 tháng, chanh bắt đầu thu hoạch, với năng suất vụ đầu đạt khoảng 15 ÷ 20 tấn/ha. Đến năm thứ hai, thứ ba năng suất tăng lên 25 ÷ 35 tấn/ha (có vườn đạt 40 tấn/ha), lãi trung bình từ 150 ÷ 300 triệu đồng/ha. Trung bình mỗi cây chanh mang 1.000 trái/năm, khoảng 70 ÷ 100 kg/cây/năm. Chanh không hạt trái to, 6 ÷ 7 quả/kg. Chu kỳ sinh trưởng của chanh không hạt có thể trên 10 năm.

Trong những năm gần đây, cây chanh là một trong những cây trồng chủ lực trong chương trình chuyển đổi cơ cấu cây trồng của tỉnh Long An. Tỉnh có diện tích chanh lớn nhất trong khu vực ĐBSCL (30% diện tích chanh toàn vùng). Diện tích chanh của tỉnh liên tục gia tăng trong những năm gần đây (Hình 1.2). Năm 2018, với diện tích chanh toàn tỉnh là 9.438 ha đạt 94,4% kế hoạch (10.000 ha), bằng 105,8% so cùng kỳ năm 2017. Trong đó có 7.374 ha chanh cho trái, tập trung ở các huyện: Bến Lức, Thủ Thừa, Thạnh Hóa, Đức Huệ và Đức Hòa.

Theo sở Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn Long An, tỉnh đề ra mục tiêu phát triển diện tích cây chanh lên 11.000 ha đến năm 2020. Phát triển vùng sản xuất nông nghiệp chuyên canh theo hướng phát triển kinh tế tập thể, sản xuất theo hướng VietGAP và GlobalGAP nhằm giúp nông dân có đầu ra ổn định, đưa sản phẩm chanh đến với thị trường trong và ngoài nước. Trong đó, Bến Lức là một trong năm huyện trồng chanh lớn của tỉnh, chủ yếu là chanh không hạt, hiện có 5.470 ha đất trồng chanh, tăng 752 ha so với cuối năm 2017, tổng sản lượng đạt 77.344 tấn. Từ cuối năm 2011, huyện Bến Lức đã xây dựng thương hiệu độc quyền chanh Bến Lức.



Hình 1.2. Biểu đồ diện tích chanh tỉnh Long An từ năm 2014 ÷ 2020.

(Nguồn: Tổng hợp từ các nguồn UBND Tỉnh Long An, 2014, 2016, 2020)

Để đạt kế hoạch đề ra, ngành nông nghiệp và phát triển nông thôn, Long An tăng cường hoạt động xúc tiến thương mại, xây dựng thương hiệu, quản lý chất lượng sản phẩm và nâng cao hiệu quả kinh tế tập thể; hình thành quy trình sản xuất nông nghiệp tốt, mô hình chuỗi giá trị, cung ứng sản phẩm chanh an toàn, góp phần xây dựng nền nông nghiệp phát triển toàn diện, bền vững. Sản phẩm chanh tươi Việt Nam đã có mặt trên thị trường của nhiều quốc gia vùng Châu Á, Trung Đông và đặc biệt là cộng đồng Châu Âu (EU) nâng kim ngạch xuất khẩu chanh cả nước trên 3 tỷ USD. Trong đó, Long An đóng góp khoảng 0,5 triệu USD (Hồ Cao Việt, 2016).

Tuy nhiên, trước những cơ hội lớn, ngành hàng chanh tỉnh Long An cũng như cả nước còn đang và sẽ đối mặt với rất nhiều thử thách về truy suất nguồn gốc, quản lý chất lượng sản phẩm theo các tiêu chuẩn của thị trường nhập khẩu, hàng rào kiểm dịch đối với một số loại dịch bệnh trên chanh,... Do đó, việc đảm bảo chất lượng an toàn vệ sinh thực phẩm, kiểm soát tốt các loại dịch bệnh và đáp ứng nguyên tắc xuất khẩu là điều kiện để nông sản Việt Nam vươn ra thế giới.

1.2. Tổng quan về bệnh loét do vi khuẩn trên cây chanh

1.2.1. Lịch sử và phân bố

Theo Fawcett và Jenkins (1933), những vết bệnh được phát hiện trên cây thuộc họ cam quýt lâu đời nhất (*C. medica* được thu thập từ Ấn Độ vào năm 1827 ÷ 1831 và *C. aurantifolia* từ Indonesia vào năm 1842 ÷ 1844) được giữ tại Herbaria của vườn thực vật hoàng gia (Royal Botanic Gardens) ở Kew, Anh. Do đó, bệnh loét có thể xuất hiện lần đầu tiên và có nguồn gốc ở các khu vực nhiệt đới châu Á, như Nam Trung Quốc, Indonesia và Ấn Độ, nguồn gốc của cây có múi.

Năm 1912, tại Florida, Hoa Kỳ, bệnh loét được chú ý lần đầu tiên, bệnh gây hại nghiêm trọng và lan rộng khắp Florida trên cây giống nhập khẩu từ Nhật Bản. Năm 1933, bệnh được loại bỏ thông qua việc kiểm tra nghiêm ngặt, loại bỏ các cây bị bệnh một cách triệt để. Năm 1986, bệnh lại xuất hiện và bùng phát thành dịch ở Manatee, Florida, phía nam vịnh (Stall và Civerolo, 1991). Sau đó, mầm bệnh xuất hiện phổ biến khắp châu Á và sau đó đến Nam Phi (Doidge, 1916), Châu Đại Dương, Nam Mỹ (Rossetti, 1977) và Úc, (Garnsey và ctv, 1979). Ở Iran bệnh loét do vi khuẩn được báo cáo đầu tiên trên chanh Mexico, vùng Kahnouj, tỉnh Kerman (Alizadeh và Rahimian, 1990). Ở Kouli-koro, Mali (Tây Phi), tỷ lệ bệnh loét trên chanh chiếm 50% (Traore và ctv, 2008). Bệnh loét do vi khuẩn đã có mặt ở hầu hết các quốc gia trồng cây có múi trên thế giới (Sharma và Sharma, 2009) (Hình 1.3).



Hình 1.3. Bản đồ phân bố của bệnh loét trên cây có múi do vi khuẩn

X. axonopodis pv. *citri*

(Nguồn: Cabi. org)

Ở Việt nam, bệnh loét trên cây có múi được báo cáo đầu tiên bởi Whittle (1992). Vi khuẩn gây bệnh là *X. campestris* pv. *citri*. Theo báo cáo của Bui và ctv (2009), vi khuẩn gây bệnh loét trên cây chanh Mexico thu nhận từ 14 tỉnh ở cả hai miền Bắc và Nam là *X. citri* pv. *citri* dạng loét A. Hiện nay, bệnh loét là một trong những bệnh hại phổ biến và gây hại nghiêm trọng ở hầu hết các vùng trồng cây có múi trong nước, làm ảnh hưởng lớn tới nguồn hàng xuất khẩu. Bệnh phát sinh và phát triển mạnh ở điều kiện ẩm độ cao và nhiệt độ $26 \div 35^{\circ}\text{C}$, lây lan rất nhanh gây hại trên tất cả các giống chanh (Nguyễn Văn Nga và Cao Văn Chí, 2013).

1.2.2. Triệu chứng bệnh và thiệt hại về kinh tế

Theo Sharma và Sharma (2009), bệnh loét trên cây có múi gây ra bởi nhiều chủng *Xanthomonas* khác nhau về đặc điểm sinh học và cây ký chủ nhưng các triệu chứng và dấu hiệu bệnh là như nhau. Ở lá non, ban đầu vết bệnh là những chấm tròn có đường kính trên dưới 1mm, màu trong vàng, sưng ướm, thường thấy ở mặt dưới của lá, sau đó vết bệnh mở rộng và phá vỡ biểu bì mặt dưới lá, màu trắng nhạt hoặc nâu nhạt. Xung quanh vết bệnh có quầng tròn dạng giọt dầu màu vàng hoặc xanh tối. Khi vết bệnh già rần lại nổi gờ giống như ghê, loét, sần sùi, mặt dưới xù xì, mặt trên nứt nẻ màu xám tro, mọc nhô lên mặt lá (Hình 1.4 A). Vết bệnh có thể nhìn thấy khoảng 7 đến 10 ngày sau khi nhiễm bệnh ở mặt dưới của lá và sau đó nhìn thấy rõ ở mặt trên. Lá bị nhiễm bệnh nặng, rụng sớm dẫn đến cành trơ trụi. Vết bệnh ở quả cũng tương tự như ở lá: vết bệnh xù xì màu nâu hơn, mép ngoài có gờ nổi lên, ở giữa vết bệnh mô chết rạn nứt trên vỏ quả. Bệnh nặng có thể làm cho quả biến dạng, ít nước, khô sớm, dễ rụng. Bệnh loét làm ảnh hưởng đến giá trị thẩm mỹ của quả, không đạt tiêu chuẩn chất lượng để xuất khẩu (Hình 1.4 C). Vết bệnh trên cành và thân cây con cũng giống như ở trên lá nhưng sùi lên tương đối rõ ràng. Đặc biệt có trường hợp, vết loét ở thân kéo dài tới 15 cm và ở cành tới $5 \div 7$ cm (Hình 1.4B).



Hình 1.4. Triệu chứng bệnh loét do vi khuẩn *X. axonopodis* pv. *citri* trên cây chanh

(A: bệnh loét trên lá; B: bệnh loét trên cành; C: bệnh loét trên quả)

(Nguồn: Nghiên cứu sinh chụp tại vườn chanh huyện Bến Lức, Long An)

Bệnh loét là một trong những bệnh hại nghiêm trọng trên cây có múi do vi khuẩn *X. axonopodis* pv. *citri* và là một bệnh dịch nguy hiểm có thể phá hủy toàn bộ cây trồng trong vườn. Hàng năm, trên toàn Thế giới, hàng triệu đô la được chi cho các chương trình phòng ngừa, kiểm soát và diệt trừ dịch bệnh. Bệnh gây ra tổn thất nặng nề khi sự lây nhiễm xảy ra ở giai đoạn đầu sự phát triển của cây. Bệnh phổ biến trong thời kỳ phát sinh chồi và phát triển quả sớm và trở nên nghiêm trọng hơn khi lượng mưa nhiều và nhiệt độ ẩm áp. Tỷ lệ lá bị bệnh thường tương đương với tỷ lệ quả bị bệnh (Grupta và Sharma, 2008). Theo Stall và Seymour (1983), ở Argentina trong giai đoạn 1979 ÷ 1980, 83 ÷ 97% quả của cây bưởi bị bệnh và tỷ lệ lá bị nhiễm bệnh là 88%. Bệnh loét hạn chế nghiêm trọng việc sản xuất chanh nói riêng và cây có múi nói chung ở châu Á và Nam Mỹ. Hậu quả nghiêm trọng nhất của bệnh loét là ảnh hưởng đến thương mại do những hạn chế đối với vận chuyển, xuất khẩu trái cây quốc tế, bị tăng cường kiểm soát kiểm dịch đối sản phẩm có nguồn gốc từ các khu vực bị nhiễm bệnh (Rybak và ctv, 2009).

Ở Việt Nam, trong thời gian gần đây, với sự diễn biến bất thường của thời tiết, khí hậu, cùng với sự gia tăng nhanh chóng diện tích trồng chanh, mức độ thâm canh cao, tỷ lệ vườn sử dụng máy tưới phun ngày càng tăng, bệnh loét vi khuẩn càng phổ biến và gây hại nghiêm trọng. Theo báo cáo dịch hại hàng năm, bệnh loét xuất hiện hầu hết ở

các tỉnh trồng chanh trên cả nước với các mức độ khác nhau theo mùa. Năm nào mưa nhiều kèm thời tiết nóng ẩm bệnh phát mạnh thành dịch. Bệnh thường xuất hiện trên những cành, lá, quả non. Cành nhiễm bệnh nặng sẽ khô và gãy, lá non bị nhiễm bệnh sẽ kém phát triển, rụng sớm. Sau khi hoa rụng 35 ngày, quả non có kích thước khoảng 9 mm dễ bị nhiễm bệnh; đường kính quả từ 26 ÷ 32 mm (sau hoa rụng 60 ÷ 80 ngày) tỷ lệ phát bệnh cao nhất, làm ảnh hưởng đến năng suất trái và không đạt yêu cầu xuất khẩu. Hiện nay, một số quốc gia chưa có báo cáo về bệnh loét do vi khuẩn ra sức thực hiện nhiều biện pháp phòng ngừa bệnh. Trong đó, biện pháp kiểm dịch nghiêm ngặt như hạn chế hoặc cấm nhập khẩu cây giống và trái cây từ các khu vực có dịch bệnh được đặt lên hàng đầu (Sharma và Sharma, 2009). Điều này ảnh hưởng không nhỏ đến thị trường xuất khẩu chanh của những nước có báo cáo về bệnh loét trong đó có Việt Nam.

1.2.3. Nguồn bệnh và điều kiện phát sinh bệnh

Chanh là loại cây lâu năm, chu kỳ sống có thể lên đến 10 năm nên cây dễ dàng vượt qua tác động của vi khuẩn gây bệnh trên thân, lá và quả. Vi khuẩn gây bệnh loét có thể tồn tại đến 6 tháng trong lá bị nhiễm bệnh (Rao và Higorani, 1963). Bệnh được truyền từ mùa này sang mùa khác chủ yếu từ những tán cây và cành cây bị nhiễm. Trong các tổn thương trên thân, cành, vi khuẩn có thể tồn tại cho đến một vài năm (Chakravarti và ctv, 1966). Trong các mô thực vật bị nhiễm bệnh được giữ khô và không có đất, vi khuẩn có thể tồn tại nhiều năm, có khả năng chịu hạn và chịu lạnh cao (Sharma và Sharma, 2009).

Theo Pria và ctv (2006), bệnh phát sinh và phát triển mạnh ở điều kiện ẩm độ cao và nhiệt độ 25 ÷ 35°C. Hầu hết, bệnh xảy ra trên lá và cành non trong sáu tuần đầu tiên sau khi cây bắt đầu tăng trưởng. Thời kỳ quan trọng nhất đối với bệnh ở vỏ quả là trong 90 ngày đầu tiên sau khi rụng cánh hoa. Vi khuẩn gây bệnh loét chủ yếu thông qua các lỗ khí khổng, các vết thương được tạo ra do gió mưa hoặc côn trùng. Thời gian ủ bệnh tùy thuộc vào loại cây nhưng trung bình từ 6 ÷ 14 ngày (Schaad và ctv, 2005). Vi khuẩn *Xanthomonas* có lớp màng nhầy nên chúng dễ dàng tạo huyền phù trong nước và phân tán thành những giọt nhỏ. Sự lây lan của bệnh loét chủ yếu bởi gió và mưa ở khoảng cách gần nên bệnh trở nên nghiêm trọng hơn ở những cây tiếp xúc với mưa, cùng hướng gió. Nước mưa từ tán lá có tổn thương chứa vi khuẩn từ 10^5 ÷ 10^8

cfu/mL, tốc độ gió trung bình trong các cơn mưa vượt quá 8 m/giây, bệnh có thể rất nghiêm trọng. Ngoài ra, sâu vẽ bùa cũng là môi giới truyền bệnh tạo nên vết thương để bệnh xâm nhiễm dễ dàng, nhất là trong vườn ươm cây giống (Das, 2003).

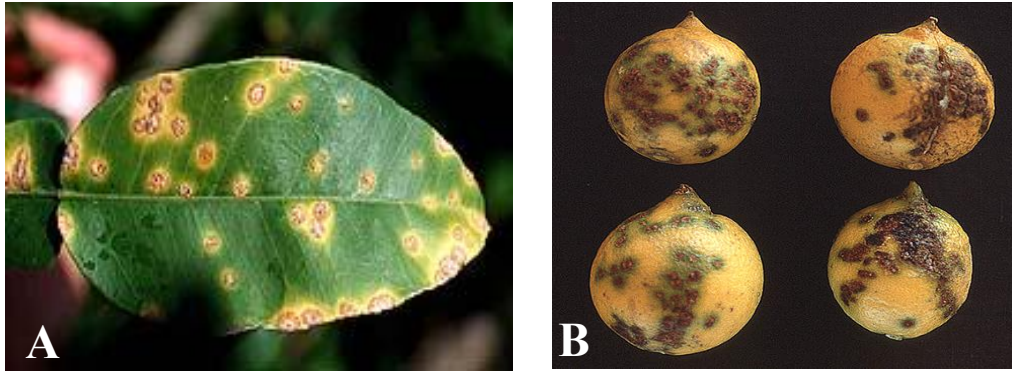
Tại Việt Nam, bệnh phát sinh từ lộc xuân (tháng 3), tăng mạnh đến lộc hạ (tháng 7 và 8) rồi đến lộc đông (tháng 10 và 11) thì bệnh giảm dần và ngừng phát triển. Bệnh loét cam, chanh phát triển trong điều kiện nhiệt độ cao, vi khuẩn xâm nhiễm thích hợp ở nhiệt độ $25 \div 30^{\circ}\text{C}$, độ ẩm cao. Tuổi cây càng non càng dễ bị nhiễm bệnh nặng, nhất là ở vườn ươm ghép cây giống thường bị bệnh nặng trong $1 \div 2$ năm đầu. Cành vượt phát triển nhiều lộc thường bị bệnh nặng hơn. Sau khi nảy lộc $30 \div 45$ ngày cây rất dễ bị bệnh. Khi lộc cành bước vào ổn định nhưng chưa hóa già (nảy lộc được $50 \div 60$ ngày) khả năng nhiễm bệnh cao nhất, sau khi nảy lộc $90 \div 110$ ngày, lộc già thì hầu như không bị nhiễm bệnh nữa. Sau khi hoa rụng 35 ngày, quả non kích thước khoảng 9 mm bắt đầu bị nhiễm bệnh. Giai đoạn phát bệnh cao nhất là khi quả có đường kính từ $26 \div 32$ mm (sau khi hoa rụng $60 \div 80$ ngày). Khi quả ngừng lớn, bắt đầu già, quả không bị nhiễm bệnh nữa (Nguyễn Văn Nga và Cao Văn Chí, 2013).

1.2.4. Các dạng bệnh loét do vi khuẩn trên cây chanh

Các dạng bệnh loét trên cây chanh gây ra bởi vi khuẩn *X. axonopodis* và các biến thể của chúng (Graham và ctv, 2014). Sự khác biệt của các dạng bệnh chủ yếu dựa trên sự phân bố địa lý và phạm vi ký chủ của mầm bệnh (Stall và Seymour, 1983). Dạng loét A, là dạng bệnh do vi khuẩn *X. axonopodis* pv. *citri* (Hasse) Vauterin (*Xac*) gây ra, là dạng bệnh phổ biến và gây hại nghiêm trọng nhất. Bệnh có mặt khắp Ấn Độ, Pakistan, các đảo Ấn Độ Dương, Đông Nam Á, Trung Quốc và Nhật Bản (Hình 1.5A).

Dạng loét B gây ra bởi vi khuẩn *X. axonopodis* pv. *aurantifolii* (Hasse) Gabriel Vauterin, gây hại nghiêm trọng trên chanh ở Argentina, Paraguay và Uruguay. Chanh Mexico, cam chua và bưởi cũng dễ lây nhiễm. Vết bệnh ở dạng loét B tương tự dạng loét A, nhưng vết bệnh nhỏ hơn. Vi khuẩn gây ra dạng loét B phát triển chậm hơn so với vi khuẩn dạng loét A khi nuôi cấy (Hình 1.5B).

Dạng loét C là dạng bệnh gây ra bởi vi khuẩn *X. axonopodis* pv. *aurantifolii*, được phân lập từ chanh Mexico ở Brazil. Các biểu hiện bệnh giống dạng loét A.



Hình 1.5. Triệu chứng bệnh loét do vi khuẩn *X. axonopodis* pv. *citri* và *X. axonopodis* pv. *aurantifolia* trên cây chanh

(A: dạng loét A do vi khuẩn *X. axonopodis* pv. *citri*; B: dạng loét B, C do vi khuẩn *X. axonopodis* pv. *aurantifolia*)

(Nguồn: Gottwald và ctv, 2002)

1.2.5. Biện pháp phòng trừ

1.2.5.1. Phòng bệnh bằng các biện pháp canh tác

Đối với những vùng chưa xuất hiện bệnh, kiểm soát tốt mầm bệnh từ trong vườn ươm là việc làm thiết yếu. Với vùng có dịch bệnh, cần áp dụng các biện pháp phòng và trị để làm giảm mức độ nghiêm trọng của bệnh trên cây giống như: các bộ phận của cây bị nhiễm bệnh cần được cắt bỏ và tiêu hủy; cắt tỉa các chồi hoặc các bộ phận của cây bị nhiễm bệnh trong cuối mùa hè và mùa thu có thể làm giảm nguy cơ nhiễm bệnh vào mùa xuân sau; giảm mật độ cây trồng.

Một số trường hợp bệnh nhiễm mới thông qua người và dụng cụ, thiết bị làm vườn. Do đó, cần phải xây dựng các trạm khử trùng cho nhân viên, phương tiện và máy móc được phun các hợp chất diệt khuẩn trong các trang trại trồng cây; tránh làm việc trong vườn cây bị nhiễm bệnh khi cây bị ướt do sương hoặc mưa. Việc giảm tốc độ gió làm giảm khả năng xâm nhập trực tiếp của vi khuẩn vào các lỗ khí khổng cũng như giảm sự xâm nhập gián tiếp thông qua các vết thương do gió gây ra trên tán lá và quả. Tốc độ gió có thể được giảm bằng cách triển khai các tấm chắn gió trên phạm vi của vườn cây hoặc giữa các hàng (Gottwald và ctv, 2002).

1.2.5.2. Phòng trừ bằng thuốc hóa học

Việc sử dụng thuốc BVTV hóa học để quản lý bệnh loét do vi khuẩn *X. axonopodis* trên cây chanh đã được nghiên cứu và sử dụng từ rất lâu. Hiện nay, thuốc BVTV hóa học vẫn đang là lựa chọn của người nông dân bởi tác dụng nhanh và tiêu diệt được nhiều đối tượng dịch hại cùng một lúc. Thuốc diệt nấm Thiram thể hiện hiệu quả ức chế vi khuẩn *X. citri* tốt nhất ở nồng độ 500 ppm (Beniwal và Chaubey, 1976). Theo Maher và ctv (2005), agrimycin-100, streptomycin sulfate, vitavax và dithane M-45, streptomycin sulfate, vitavax, benlate và cobox, streptomycin sulfate (1,0%) có hiệu quả ức chế vi khuẩn *X. axonopodis* pv. *citri* cao nhất trong điều kiện *in vitro*. Sahi và ctv (2007) cũng chỉ ra rằng các thuốc agrimycin-100, dithane M-45 và vitavax (1,0%) có khả năng ức chế vi khuẩn *X. campestris* pv. *citri* với đường kính vòng vô khuẩn tương ứng là 2,89; 2,0 và 1,80 cm.

1.2.5.3. Phòng trừ bằng giống kháng

Việc sử dụng thuốc BVTV hóa học dẫn đến một số tác động tiêu cực cho môi trường. Do đó, sử dụng giống kháng là một trong những biện pháp sinh học đã và đang được quan tâm. Các vi sinh vật đối kháng có thể cạnh tranh với mầm bệnh để lấy chất dinh dưỡng, ức chế sự nhân lên của mầm bệnh bằng cách tiết ra kháng sinh hoặc độc tố hoặc giảm mật độ mầm bệnh thông qua siêu ký sinh trùng. Qua các dẫn liệu nghiên cứu trước cho thấy, vi khuẩn *Pseudomonas*, *Bacillus* và nấm *Aspergillus*, *Trichoderma* có hiệu quả ức chế được sự phát triển của vi khuẩn *X. axonopodis* và kiểm soát bệnh loét trên chanh. *Pseudomonas* là một trong những nguồn giống kháng được ứng dụng trong kiểm soát bệnh hại trong nông nghiệp (Durairaj và ctv, 2017; Weller, 2007). Trong đó, *Pseudomonas* đã được chứng minh có khả năng sản xuất các hợp chất có hoạt tính sinh học ức chế vi khuẩn gây bệnh loét trên cây có múi (Oliveira và ctv, 2016; Michavila và ctv, 2017). *P. aeruginosa* LV đã được báo cáo có khả năng sản xuất kháng sinh organocopper làm giảm bệnh loét trên cây cam Valencia đến 90% (de Oliveira và ctv, 2016). Trong thử nghiệm nhà lưới, khi xử lý bằng dịch khuẩn *Pseudomonas*, tỷ lệ vết bệnh loét giảm $23,8 \div 64,0\%$ (Khodakaramian và Swings, 2003). Ngoài ra, một số *Bacillus* spp. được phân lập từ rễ và lá cây có múi có khả năng ức chế vi khuẩn *X. citri* gây bệnh loét trên cây có múi trong thử nghiệm *in vitro* và thử nghiệm ngoài đồng (Das và ctv, 2013; Huang và ctv, 2012; Daungfu và ctv, 2019;

Rabbee và ctv, 2019). Trong báo cáo của Sarkar và ctv (2007), dịch khuẩn *B. subtilis* ở nồng độ 50 µl/disc có khả năng ức chế được vi khuẩn *X. axonopodis* pv. *citri* với đường kính vòng vô khuẩn là $18,3 \pm 0,4$ mm. Trong báo cáo của Giri và ctv (2008), dịch lọc nấm *A. terreus* có hiệu quả ức chế vi khuẩn *X. axonopodis* pv. *citri* cao hơn dịch lọc nấm *T. harzianum* trong điều kiện phòng thí nghiệm. Trong thử nghiệm nhà lưới, hiệu quả giảm bệnh loét của dịch lọc nấm *A. terreus* đạt 17,69%.

1.2.5.4. Phòng trừ bằng dịch chiết thảo mộc

Bên cạnh việc sử dụng giống kháng trong quản lý bệnh hại thực vật, sử dụng dịch chiết thảo mộc cũng là một trong những biện pháp sinh học đã và đang được nghiên cứu và ứng dụng. Bởi tính tự nhiên, không ảnh hưởng đến môi trường, không gây hại cho các đối tượng có lợi trong môi sinh nên không làm phá vỡ tính cân bằng của hệ sinh thái. Sự tồn lưu của các chất trong tự nhiên ngắn, dễ phân hủy, không ảnh hưởng đến sức khỏe của người nông dân cũng như người tiêu dùng sản phẩm. Việc nghiên cứu sử dụng thảo mộc để phòng trừ bệnh loét trên cây chanh đã được nghiên cứu từ khá lâu.

Tinh dầu là một dạng chất lỏng chứa các hợp chất dễ bay hơi được chiết xuất từ các bộ phận của cây. Hoạt tính ức chế vi khuẩn gây bệnh trên cây trồng đã được biết đến nhiều (Pandey và ctv, 2017; Akhtar và ctv, 2014). Trong đó, tinh dầu từ cây *C. aurantium*, *C. aurantifolia* và *Fortunella* sp. có khả năng ức chế vi khuẩn *X. citri*. MIC của tinh dầu từ cây *C. aurantifolia* đạt 0,5 mg/mL (Mirzaei - Najafgholi và ctv, 2017). Ngoài ra, dịch chiết từ một số thảo mộc cũng có khả năng ức chế vi khuẩn gây bệnh loét trên cây có múi. Dịch chiết *A. indicia* (5 và 20%) có hiệu quả ức chế vi khuẩn *X. citri* với đường kính vòng vô khuẩn tương ứng là 1,27 và 2,60 cm (Ijato, 2016). Ở nồng độ 20% dịch chiết nước từ cây *Psidium guajava*, *Datura stramonium*, *Leucas indica* cũng có khả năng ức chế rõ rệt sự phát triển của vi khuẩn *X. axonopodis* pv. *citri*. Trong đó, chiết xuất nước từ cây *L. indica* có hiệu quả ức chế cao nhất và tỷ lệ làm giảm bệnh đạt 78,46% so với đối chứng (Bora và ctv, 2001). Trong thử nghiệm nhà lưới, dịch chiết lá cây Tam Thất (*Tamarindus indica*) có thể kiểm soát được bệnh loét trên cây chanh *C. aurantifolia* với tỷ lệ bệnh còn lại là 48%. Khi ứng dụng ngoài đồng, dịch chiết lá Tam Thất làm giảm đáng kể số lượng lá bị bệnh và tỷ lệ bệnh (Leksomboon và ctv, 2001). Dịch chiết tỏi (*Allium sativum*) ở nồng độ 75 g lá tươi +

25 ml nước cất có khả năng ức chế vi khuẩn *X. axonopodis* pv. *citri*, tỷ lệ ức chế đạt tương ứng là 24 và 43% (Iqram và ctv, 2003). Trong khảo sát của Sarkar và ctv (2018), chiết xuất ethanol từ tỏi (20 mg/mL) cũng có khả năng ức chế vi khuẩn *X. axonopodis* pv. *citri* với đường kính vòng vô khuẩn là $14,6 \pm 0,4$ mm. Theo Vudhivanich (2003), chiết xuất thô từ quả *Chebulic myrobalan* ở nồng độ 50.000 ppm có thể làm giảm kích thước vết bệnh loét do vi khuẩn *X. axonopodis* pv. *citri* gây ra. Kích thước vết loét trung bình ở 15; 20 và 30 ngày là 0,62; 0,97 và 1,40 mm so với mẫu đối chứng là 0,97; 1,84 và 3,00 mm. Dịch chiết ethanol từ các cây *Aegle marmelos*, *Aristolochia indica* và *Ocimum canum* ở các nồng độ 1000 ppm, 2000 ppm, 3000 ppm, 4000 ppm và 5000 ppm có khả năng ức tốt các vi khuẩn *X. citri* gây bệnh loét trên cây có múi (Prakash và ctv, 2012). Ngoài ra, dịch chiết lá Tulasi (cây húng quế) và dầu hạt Neem (40%) cũng được báo cáo có khả năng ức chế tốt vi khuẩn *X. axonopodis* pv. *unicpae* với đường kính vòng vô khuẩn tương ứng là 1,76 và 1,5 cm (Raju và ctv, 2013). Cũng theo Negi và Kuma (2015), dịch chiết lá Neem, tỏi (*Allium sativum*), Guava và Casto có khả năng ức chế vi khuẩn *X. axonopodis* pv. *citri* với đường kính vòng vô khuẩn là tương ứng là 1,73 cm; 1,67 cm; 1,57 cm; 1,43 cm và 1,13 cm. Ngoài ra, dịch chiết lá từ các thảo mộc *Allium cepa*, *Catharanthus roseus*, *Allium sativum*, *Zingiber officinale* (75g lá + 25 mL nước) cũng có hiệu quả ức chế vi khuẩn *X. axonopodis* pv. *citri* (Atiq và ctv, 2019).

Tóm lại, bệnh loét do vi khuẩn *Xanthomonas* sp. là một trong những bệnh gây hại nghiêm trọng cho cây chanh. Bệnh thường xuất hiện trên những cành, lá, quả non nên ảnh hưởng rất lớn đến năng suất, giá trị thương phẩm của quả dẫn đến giá trị xuất khẩu giảm. Khi lây lan mạnh, bệnh rất khó diệt trừ. Biện pháp duy nhất đã được một số nước trên thế giới áp dụng là nhổ bỏ và tiêu hủy toàn bộ cây bị nhiễm bệnh. Hiện nay, trong thực tế, người nông dân đang sử dụng thuốc BVTV hóa học để phòng trừ bệnh loét trên cây chanh. Thuốc BVTV hóa học được áp dụng chủ yếu để ngăn chặn các loài gây hại cho thực vật, động vật và bảo vệ các sản phẩm nông nghiệp. Tuy nhiên, phần lớn thuốc BVTV hóa học không chỉ nhắm đến sâu bệnh cần tiêu diệt mà còn ảnh hưởng đến thực vật và động vật không phải mục tiêu. Do đó, việc sử dụng thuốc BVTV hóa học lặp đi lặp lại dẫn đến mất cân bằng sinh học. Nhiều loại thuốc BVTV không dễ bị phân hủy, chúng tồn tại trong đất, thấm vào nước ngầm, nước mặt và làm ô nhiễm môi trường rộng. Tùy thuộc vào tính chất, chúng có thể xâm nhập vào cơ thể

sinh vật, tích lũy sinh học trong chuỗi thức ăn và do đó ảnh hưởng đến sức khỏe con người. Việc sử dụng thuốc trừ sâu hóa học và các hóa chất nông nghiệp khác đang bị giảm và bị cấm trên toàn cầu vì tác dụng độc hại của chúng đối với con người và nguồn sống, độc tính còn sót lại, các vấn đề môi trường, dịch hại và tác động mạnh đến côn trùng có lợi, làm xuất hiện các mầm bệnh đa kháng thuốc. Do đó, việc áp dụng các giải pháp sinh học vừa thân thiện với môi trường, vừa có hiệu quả kinh tế để khắc phục bệnh hại cây trồng là cần thiết. Bên cạnh biện pháp sử dụng giống đối kháng, dịch chiết từ thảo mộc là một giải pháp có hiệu quả để phòng trừ bệnh loét trên cây chanh. Dịch chiết thảo mộc là các hợp chất thiên nhiên được tổng hợp từ quá trình sinh trưởng phát triển của cây nên thời gian phân hủy ngắn, không làm ảnh hưởng đến môi trường và sức khỏe con người. Nhiều nghiên cứu đã chứng tỏ, dịch chiết thảo mộc có hiệu quả ức chế vi khuẩn *X. axonopodis* pv. *citri* gây bệnh loét trên cây chanh trong thử nghiệm *in vitro* và giảm tỷ lệ bệnh trong nhà lưới và ngoài đồng. Ngoài ra, Việt Nam là một trong những nước có nguồn dược liệu phong phú và quý (Đỗ Tất Lợi, 2019). Đây là một trong những điều kiện thuận lợi về nguồn nguyên liệu trong nghiên cứu và ứng dụng.

1.3. Tổng quan về vi khuẩn *Xanthomonas axonopodis* gây bệnh loét trên cây chanh

1.3.1. Vị trí phân loại

Tên khoa học là *X. axonopodis* Hasse, 1915 (tên khoa học cũ là *Xanthomonas citri*, ex Hasse, 1915). Vị trí phân loại của vi khuẩn *X. axonopodis* được xếp như sau:

Giới (Kingdom): Monera

Bộ (Order): Xanthomonadales

Họ (Family): Xanthomonadaceae

Chi (Genus): *Xanthomonas*

Loài (Species): *Xanthomonas citri*

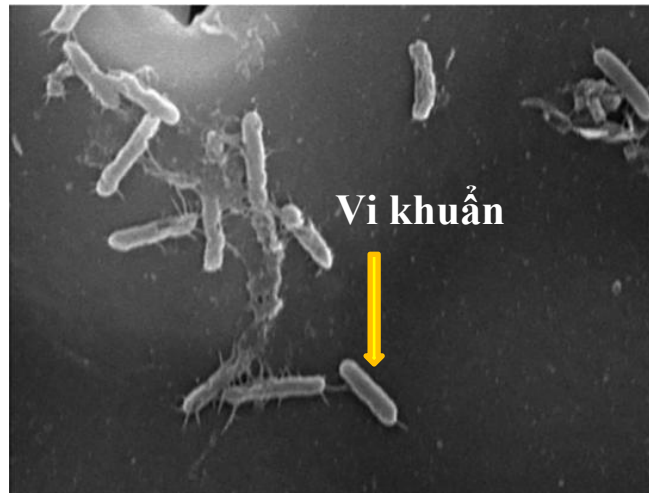
1.3.2. Phổ ký chủ

Không giống như *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Ralstonia* và *Erwinia*, vi khuẩn thuộc giống *Xanthomonas* luôn hiện diện trên thực vật dù không phải lúc nào cũng gây bệnh. Đa số chúng sống nội ký sinh thực vật, *Xanthomonas* có phổ ký chủ rất rộng, gồm ít nhất 68 họ thực vật và hơn 240 giống cây trồng. Bất kỳ chủng vi khuẩn nào thuộc *Xanthomonas* spp. cũng chỉ có số ký chủ giới hạn và phổ ký chủ thường được chỉ thị bằng trạng thái gây bệnh tùy theo điều kiện (pathovar) của vi khuẩn (Brunings và Gabriel, 2003).

Bệnh loét trên cây có múi gây ra bởi chi *Xanthomonas*, có hai nhóm di truyền. Một nhóm bắt nguồn từ châu Á là *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* và một nhóm bắt nguồn từ Nam Mỹ là *X. axonopodis* pv. *aurantifolii*. Nhóm châu Á gây ra bệnh loét dạng A trên tất cả các cây có múi. Nhóm này có mặt khắp nơi trên thế giới và gây thiệt hại nặng nề nhất. Ngược lại, tất cả các chủng Nam Mỹ lại giới hạn số ký chủ, *X. axonopodis* pv. *aurantifolii* gây bệnh loét dạng B và dạng C trên chanh Mexico, cam chua, bưởi chùm (Gottwald và ctv, 2001). Triệu chứng gây bệnh trên những ký chủ mẫn cảm là giống nhau. Ngoài ra, ở Oman, Ả Rập Saudi, Iran, Ấn Độ đã báo cáo có hai chủng gây bệnh phụ là *X. axonopodis* pv. *citri* A* (Vernière và ctv, 1998) và *X. axonopodis* pv. *citri* A^W được tìm thấy đầu tiên ở Florida năm 1999. Hai chủng gây bệnh này có phổ ký chủ giống với chủng *aurantifolii* nhưng về đặc điểm di truyền giống với *citri*. Vì vậy, chúng không được ưu tiên xếp vào nhóm nào trong hai nhóm trên (Sun và ctv, 2004).

1.3.3. Đặc điểm hình thái, sinh lý và sinh hóa

Vi khuẩn có hình gậy ngắn, kích thước khoảng $1,5 \div 2,0 \times 0,5 \div 0,75 \mu\text{m}$, hai đầu tròn có một lông roi ở đầu, có thể nối liền thành chuỗi, có vỏ nhờ nhuộm gram âm, hiếu khí (Hình 1.6). Độ dài genome khoảng 5 Mbp. Sinh trưởng dễ dàng trên môi trường agar-glucose-peptone, khuẩn lạc tròn, sáng, bóng, nhầy, nhô, rìa hơi gợn sóng, màu vàng sáp (Braithwaiten và ctv, 2002).



Hình 1.6. Hình dạng vi khuẩn *Xanthomonas citri* subsp. *citri* trên lá chanh

(Nguồn: Garita-Cambroneró và ctv, 2019)

Đặc trưng để phân biệt vi khuẩn *Xanthomonas* sp. với loại vi khuẩn màu vàng khác là nó có thể sinh trưởng thành khuẩn lạc màu vàng sáp trên miếng lát cắt củ khoai tây. Phạm vi nhiệt độ phát triển là $5 \div 35^{\circ}\text{C}$, thích hợp $20 \div 30^{\circ}\text{C}$. Ở nhiệt độ 52°C trong 10 phút vi khuẩn chết. Vi khuẩn phát triển và hoạt động trong phạm vi pH $6,1 \div 8,8$, thích hợp ở pH 6,6. Một số đặc điểm sinh hóa chung của *X. axonopodis* pv. *citri* như: oxyase âm tính, catalase dương tính, urease âm tính, casein và thủy phân aesculin dương tính; khử nitrat âm tính; sản xuất acid từ các loại đường arabinose, glucose, saccarose, mannose, galactose và trehalose. Theo Verniere và ctv (1991), các dạng bệnh loét A, B, C và D được phân nhóm bằng các đặc điểm sinh hóa như khả năng thủy giải gelatin, casein và dung nạp NaCl. Theo đó, dạng loét A, vi khuẩn *X. axonopodis* pv. *citri* có khả năng sử dụng maltose, tinh bột và glycogen, thủy giải gelatin, casein, phát triển được trong môi trường có 3% NaCl (Verniere và ctv, 1998). Các chủng dạng C khác với các chủng dạng B và D là có khả năng sử dụng D-alanine và L-serine (Verniere và ctv, 1991).

1.3.4. Đặc điểm di truyền của vi khuẩn *Xanthomonas axonopodis*

1.3.4.1. Vai trò vùng rDNA-ITS

Những gene mã hóa rRNA được tìm thấy trong vùng rDNA. Sản phẩm của những gene này (rRNA) kết hợp với những phân tử protein hình thành những ribosom có chức năng tổng hợp protein. Gene rDNA 16S mã hóa một phân tử RNA hình thành tiểu đơn vị ribosome nhỏ của vi khuẩn điển hình (thành phần protein của tế bào). Trình

tự của gene này thích hợp là một mô hình phổ biến để nghiên cứu sự tiến hóa và phân loại của vi khuẩn. Gene rDNA được tìm thấy ở hầu hết các dạng sống (ngoại trừ virus và prion). Các thành phần của trình tự rDNA từ những sinh vật có quan hệ với nhau được đánh dấu giống nhau. Điều này có nghĩa, trình tự của những sinh vật thân cận đã được sắp xếp chính xác, làm cho những khác biệt dễ dàng để đánh giá. Điều đó cũng có nghĩa là chỉ một vài nhóm primer PCR là cần thiết để khuếch đại gene rDNA từ bất cứ loài vi khuẩn nào. Trình tự vùng 16S rDNA đã được xác định cho nhiều loài. Sự thật, không có bất kỳ gene nào khác đặc trưng cho nhiều loài như vậy. Chiều dài và trình tự của những vùng ITS của rDNA được cho rằng là vùng tiến hóa nhanh nhất và vì vậy có thể rất biến đổi. Những universal primer được thiết kế từ những vùng bảo tồn nằm hai đầu vùng ITS và vùng ITS có kích thước nhỏ (600 ÷ 700 bp) dễ dàng được khuếch đại bởi vì số bản sao lớn (lên tới 30.000 bản trong mỗi tế bào) (Dubouzet và Shinoda, 1999) của vùng lặp lại trên rDNA. Điều này làm cho vùng ITS trở thành một đề tài được quan tâm cho việc nghiên cứu sự tiến hóa và phát sinh loài cũng như các nghiên cứu về địa lý sinh vật (Baldwin và ctv, 1995) (Hình 1.7).

J-RXc2

3' CTATCGAGGCTCCGTTGAACC 5'

F1	1992	ACACAACACG-GCATATGACCCCTGAGGCAACTTGGGGTTATATGGTCAAGCGAATAA	2047
<i>X.a.v.</i>	1992	ACACAACACG-GCATATGACCCCTGAGGCAACTTGGGGTTATATGGTCAAGCGAATAA	2047
X341	1992	ACACAACACG-ACATATGATCCTGAGGCAACTTGGGGTTATATGGTCAAGCGAATAA	2047
X84	1991	ACACAACACG-ACATATGATCCTGAGGCAACTTGGGGTTATATGGTCAAGCGAATAA	2046
MI	1991	ACACAACACG-GCAGATAGCTCCGAGGCAACTTGGGGTTATATGGTCAAGCGAATAA	2046
LW	1992	ACACAACACG-GCAGATAGCTCCGAGGCAACTTGGGGTTATATGGTCAAGCGAATAA	2047
MA	1993	ACACAACACG-GCAGATAGCTCCGAGGCAACTTGGGGTTATATGGTCAAGCGAATAA	2048
<i>X.c.c.</i>	1992	ACACAACACGTACATGTAGCTCCGAGGCAACTTGGGGTTATATGGTCAAGCGAATAA	2048
<i>X.gardneri</i>	1991	ACACAACACG-ACATGTAACTCCGAGGCAACTTGGGGTTATATGGTCAAGCGAATAA	2046

Hình 1.7. Trình tự vùng ITS được thiết kế bởi môi *J-RXc2* của *X. axonopodis* pv. *citri*

(Nguồn: Cubero và Graham, 2002)

1.3.4.2. Giới thiệu về các gene gây bệnh

➤ Gene *pthA*

pthA là thành viên của họ gene *avrBs3/pthA*. Đây là gene quy định tính gây độc của *X. axonopodis* pv. *citri* trên cây có múi (Brunings và Gabriel, 2003). Tuy nhiên, khi được chuyển vào các vi khuẩn *Xanthomonas* khác thì bị mất tính độc. Gene *pthA* mang nhiều trình tự lặp lại giống nhau có kích thước 102 bp ở vùng trung tâm (Yang và Gabriel, 1995). Gene *pthA* là yếu tố kích hoạt triệu chứng đặc trưng của bệnh loét trên cây có múi, bao gồm sự tăng sinh tế bào quá mức và tạo ra vết thương hoại tử (Duan và ctv, 1999).

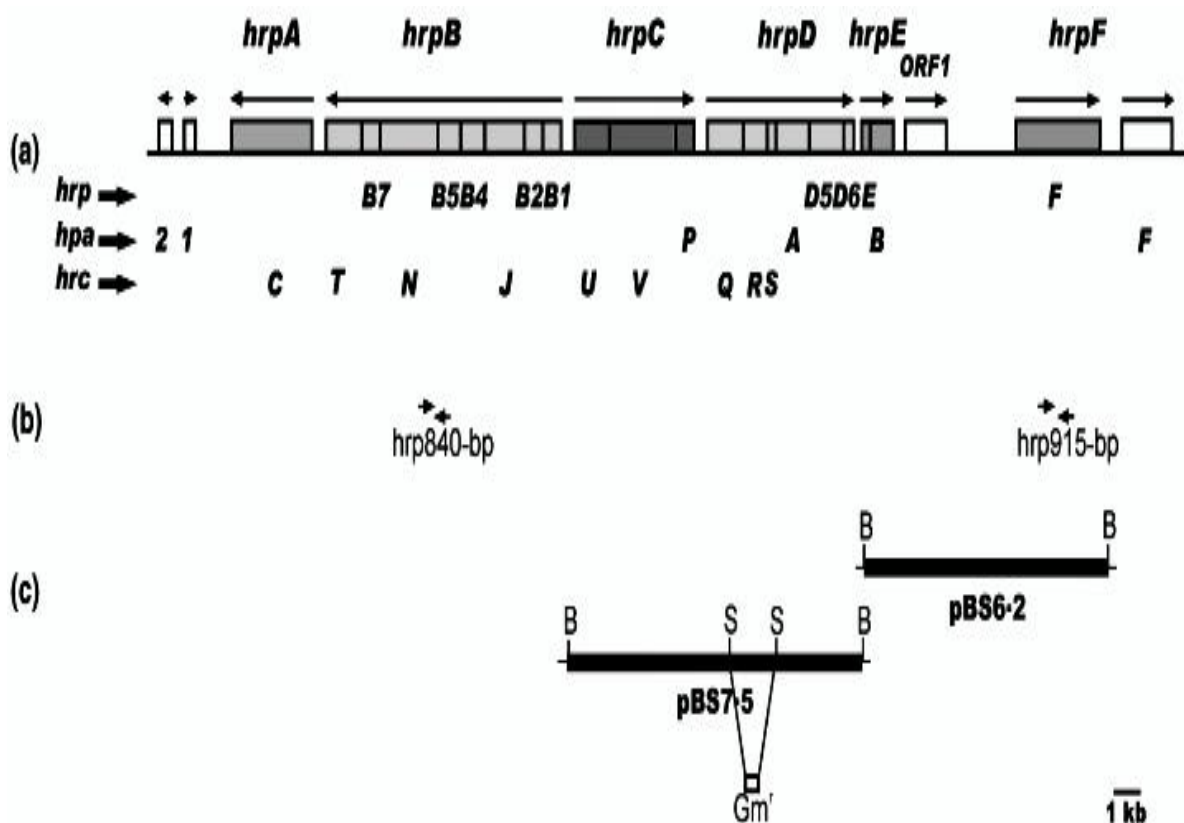
Trên những thực vật không phải ký chủ như thuốc lá, cây đậu và bông vải, gene *pthA* gây ra phản ứng siêu nhạy cảm thể hiện ở sự hoại tử tế bào của các mô bị nhiễm. Vết loét trên cây có múi không được tạo ra khi thử nghiệm kiểm tra sự biểu hiện của gene *avrb6*, trong khi gene *avrb6* có trình tự tương đồng với gene *pthA* khoảng 97%. Gene *avrb6* được tạo dòng từ vi khuẩn *X. campestris* pv. *malvacearum* gây ra bệnh giác ban (tàn lụi) trên cây bông vải (De Feyter và ctv, 1993).

pthA, *pthB*, *pthC* và *pthW* là những đồng đẳng của nhau, chúng được phân lập tương ứng từ *X. axonopodis* pv. *citri* chủng A, *X. axonopodis* pv. *aurantifolii* chủng B và C, *X. axonopodis* pv. *citri* chủng A^w. Tất cả các gene này đều quy định tính gây bệnh của vi khuẩn trên cây có múi. Trong đó, gene *pthA*, giới hạn phổ ký chủ. Hai gene *pthC* và *pthW* không giới hạn phổ ký chủ (Brunings và Gabriel, 2003).

➤ Gene *hrpW*

Sự tương tác giữa ký sinh với ký chủ phụ thuộc vào hệ thống protein. Đặc biệt đối với tương tác vi khuẩn gram âm gây bệnh thực vật với cây ký chủ. Cụm gene *hrp* (Hypersensitive Response and Pathogenicity) mã hóa cho những protein cấu thành hệ thống tiết loại III (T3S-Type III secretion). Hệ thống tiết loại III này có vai trò phân phối các protein effector gây độc vào bên trong tế bào ký chủ (Leach và White, 1996; Dunger và ctv, 2005). Sau đó, nếu ký chủ miễn cảm sẽ xuất hiện kiểu hình bệnh, đối với cây có tính kháng thì xảy ra phản ứng siêu nhạy cảm. Cụm gene *hrp* là một phần của khu vực đảo có tính gây bệnh (“pathogenic island”) nằm trên nhiễm sắc thể chính, trải dài hơn 23 kb và chứa vùng có hàm lượng G + C khác biệt so với những vùng còn lại trong hệ gene vi khuẩn (Brunings và Gabriel, 2003; Hacker và Kaper, 2000). Cụm

gene *hrp* còn mang các yếu tố di truyền có tính di động.



Hình 1.8. Cụm gene *hrp* của *X. axonopodis* pv. *citri*

(Nguồn: Dunger và ctv, 2005)

Trên vi khuẩn *X. axonopodis* pv. *citri* người ta xác định được các loại *hrp* gene: *hrpG*, *hrpA*, *hrpB*, *hrcV*, *hrpB1*, *hrpD6*, *hrpB2*, *hrcU*, *hrcW*, *hrpB4*, *hrcN*. Trong đó, các gene thuộc cụm gene *hrp* này nằm thành cụm trừ *hrpW* (Alegria và ctv, 2004). Dựa vào đặc tính đặc trưng này, người ta thiết kế primer chuyên biệt để nhận biết phát hiện nhanh, chính xác chủng gây bệnh bằng kỹ thuật PCR. Mô hình tổ chức cụm gene *hrp* dựa trên trình tự hệ gene của vi khuẩn *X. axonopodis* pv. *citri* 306 thể hiện trên Hình 1.8.

1.3.5. Một số kết quả nghiên cứu trên thế giới và trong nước về vi khuẩn *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* và bệnh loét do vi khuẩn *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* trên cây có múi

◆ Các nghiên cứu về đặc điểm sinh hóa

Bệnh loét do vi khuẩn trên cây có múi là một trong những bệnh hại nghiêm trọng, ảnh hưởng đến chất lượng và giá trị thương phẩm của quả và rất khó quản lý khi lây

lan mạnh. Bệnh đã có mặt ở hầu hết các quốc gia trồng cây có múi trên thế giới (Sharma và Sharma, 2009) và hiện đang là một trong những đối tượng kiểm dịch trong thương mại. Do đó, việc phân lập và xác định tác nhân gây bệnh đã được nghiên cứu và báo cáo ở nhiều nước trên thế giới. Tác nhân gây bệnh loét trên cây chanh đã được báo cáo là do vi khuẩn *X. axonopodis* pv. *citri* và *X. axonopodis* pv. *aurantifolia* tùy theo vùng địa lý và ký chủ (Gottwald và ctv, 2002). Theo các nghiên cứu trước cho thấy, trên môi trường Nutrient agar (NA), khuẩn lạc vi khuẩn có màu vàng kem hoặc vàng nhạt, lồi, nhầy (Sujata và Sai, 2010; Ismail và ctv, 2014; Kharde và ctv, 2018; Isokar và ctv, 2020; Mahmood và ctv, 2020). Trên môi trường Nutrien glucose agar (NGA), khuẩn lạc vi khuẩn có màu vàng, nhòn, lồi (Al-saleh và ctv, 2014; Manyam và Nargund, 2020). Trên môi trường Yeast extract Dextrose (YDC) agar, khuẩn lạc vi khuẩn có màu vàng, tròn, nhầy, lồi (Arshiyah và ctv, 2014; Mahmood và ctv, 2020). Trên môi trường Galactose yeast peptone (GYP) khuẩn lạc của vi khuẩn có màu vàng, khuẩn lạc nhỏ, nhầy bóng (Shehzadi và Nazi, 2019). Trên môi trường Yeast extract peptone glucose agar, khuẩn lạc có màu vàng nhạt đến vàng, kích thước trung bình, lồi, bóng, nhầy (Haider và ctv, 2020). Nhìn chung, qua các nghiên cứu trước cho thấy, môi trường Nutrient agar (NA) thường được sử dụng để phân lập tác nhân gây bệnh loét trên cây chanh. Tuy nhiên, trên môi trường NA, vi khuẩn thuộc chi *Pantoea* cũng có màu vàng tương tự chi *Xanthomonas* (Mbega và ctv, 2012). Do đó, việc phân lập và nhận diện đặc điểm khuẩn lạc chỉ là bước sàng lọc sơ bộ, cần thiết phải có bước tái phân lập sau khi đánh giá khả năng gây bệnh để so sánh với các đặc điểm khuẩn lạc ban đầu.

◆ Các nghiên cứu đánh giá khả năng gây bệnh của vi khuẩn *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*

Sau khi phân lập tác nhân gây bệnh, việc đánh giá khả năng gây bệnh của tác nhân là quy trình bắt buộc trong xác định tác nhân gây bệnh trên cây trồng. Thời gian biểu hiện bệnh phụ thuộc vào chủng khuẩn và cây ký chủ. Vi khuẩn *X. axonopodis* pv. *punicae* cho biểu hiện bệnh loét trên lá 100% tại thời điểm 21 ngày sau chủng (Chand và Kishun, 1991). Sau khi chủng bệnh trên lá, vết bệnh ban đầu do vi khuẩn *X. axonopodis* pv. *citri* có biểu hiện: là những đốm tròn, hơi nhô lên, nhỏ, có màu xanh nhạt. Về sau, vết chủng bệnh đổi sang màu nâu sậm, rắn, có quang vàng xuất hiện xung quanh (Haider và ctv, 2020). Theo Abhang và ctv (2015), Kharde và ctv (2018)

và Haider và ctv (2020), vi khuẩn *X. axonopodis* pv. *citri* (*Xac*) 1 có độc lực mạnh tạo vùng sũng ướt và phát triển đầy đủ các triệu chứng bệnh loét khi chủng bệnh trên lá chanh tại thời điểm 10 đến 15 ngày sau chủng. Khi chủng bệnh trên lá cây có mùi, vi khuẩn *X. axonopodis* pv. *citri* có biểu hiện bệnh loét ở thời điểm 6-11 ngày sau chủng. Tại thời điểm 6 ngày sau chủng, kích thước vết bệnh đạt 1,8 - 2,5 mm và tiếp tục gia tăng kích thước đến 20 ngày sau chủng (Arshiya và ctv, 2014; Mustafa và ctv, 2015). Tuy nhiên, trong báo cáo của Katkar và ctv (2016), trong 15 dòng vi khuẩn *X. axonopodis* pv. *citri* được chủng bệnh trên lá chanh, các dòng *Xac*-III, *Xac*-V, *Xac*-VII, *Xac*-XI, *Xac*-XIII và *Xac*-XIV có độc lực cao, biểu hiện các triệu chứng bệnh điển hình như: hình thành mô sẹo kết tinh màu trắng tại thời điểm 7 đến 9 ngày sau chủng. Các dòng *Xac*-I, *Xac*-II và *Xac*-IV có độc tính thấp hơn, khi biểu hiện bệnh tại thời điểm 13 đến 16 ngày sau chủng. Tuy nhiên, trong báo cáo của Mahmood và ctv (2020), biểu hiện bệnh loét sau khi chủng trên lá được quan sát khá lâu 3 tuần sau khi chủng bệnh. Trong khi đó, trong báo cáo của Manyam và Nargund (2020), 5 dòng vi khuẩn *X. axonopodis* pv. *citri* có thời gian biểu hiện bệnh khá sớm 5 đến 8 ngày sau chủng. Biểu hiện bệnh khá điển hình: giai đoạn đầu, các vết bệnh nổi lên mặt lá, có quầng vàng xuất hiện. Sau đó, vết bệnh gia tăng kích thước (5-10 mm), vết bệnh nứt nẻ, màu nâu sậm.

Nhìn chung, các nghiên cứu đánh giá khả năng gây bệnh sử dụng phương pháp gây vết thương trên lá. Sau đó, tiến hành phun dịch vi khuẩn có nồng độ $10^6 - 10^8$ cfu/mL đã chuẩn bị lên lá (đã gây vết thương) và ủ. Kết quả biểu hiện bệnh ở giai đoạn đầu: vết bệnh hình thành vùng sũng ướt, có quầng vàng nhỏ xung quanh. Sau đó, vết bệnh gia tăng kích thước, vết bệnh trở nên rắn, cứng, nứt nẻ và chuyển màu nâu sậm, xung quanh có quầng vàng lớn. Thời gian xuất hiện bệnh trong khoảng 5 đến 16 ngày sau chủng. Trong đó, những chủng có độc lực mạnh, có thời gian xuất hiện bệnh sớm từ 5 đến 9 ngày sau chủng. Ngoài ra, một số nghiên cứu còn sử dụng phương pháp cắt lá. Tuy nhiên, phương pháp gây vết thương cho hiệu quả đánh giá tốt hơn, được báo cáo trong hầu hết các nghiên cứu. Sau khi đánh giá khả năng gây bệnh, các vết bệnh được tái phân lập trên môi trường ban đầu. Kết quả tái phân lập sẽ được so sánh với kết quả phân lập ban đầu.

◆ **Các kết quả nghiên cứu về định danh vi khuẩn *Xanthomonas axonopodis* dựa vào đặc điểm sinh hóa**

Để định danh tác nhân gây bệnh, ngoài việc phân lập, nhận diện hình dạng khuẩn lạc, việc định dạng dựa vào các đặc điểm sinh hóa, là một trong các cơ sở khoa học để xác định loài. Vi khuẩn *X. axonopodis* khi quan sát dưới kính hiển vi có dạng hình que, mảnh, Gram (-), kích thước từ $1,5 \div 2,0 \times 0,5 \div 0,75 \mu\text{m}$, có long roi đơn cực, có khả năng di động (Das, 2003; Graham và ctv, 2004; Sing và Thind, 2014). Trên môi trường phân lập Nutrient agar (NA) hình thái khuẩn lạc của vi khuẩn có đặc điểm: màu vàng nhạt, khuẩn lạc nhỏ, nhày, nhô (Graham và ctv, 2004; Shehzadi và Nazi, 2019). Các đặc điểm sinh hóa của vi khuẩn *X. axonopodis*: âm tính trong oxidase, thử nghiệm indol, dương tính trong các phản ứng catalase, thủy phân gelatin, aesculin, thủy phân tinh bột, casein, sử dụng đường sucrose, sản xuất H₂S (Sujata và Sai, 2010; Islam và ctv, 2014; Arshiyah và ctv, 2014; Haider và ctv, 2020, Isokar và ctv, 2020), có khả năng chịu muối 1, 2 và 3% và không có khả năng sử dụng nitrate, citrate (Bharadwaj và ctv, 2014; Shehzadi và Nazi, 2019; Mahmood và ctv, 2020). Ngoài ra, vi khuẩn *X. axonopodis* có khả năng phát triển ở 36°C, không phát triển ở 40°C, thủy giải tween 20, 80, sử dụng L-arabinose, L-rahamnose, sucrose (Al-Saleh và ctv, 2014), sinh sắc tố huỳnh quang (Mubeen và ctv, 2015), sản xuất acid và gas, sử dụng Dextrose là nguồn cacbon (Kharde và ctv, 2018).

Nhìn chung, qua các nghiên cứu trước cho thấy, vi khuẩn *X. axonopodis* pv. *citri* có các đặc điểm sinh hóa: Gram (-), hình que, kích thước từ $1,5 \div 2,0 \times 0,5 \div 0,75 \mu\text{m}$, có long roi đơn cực, sinh trưởng hiếu khí bắt buộc, âm tính với các thử nghiệm oxidase, sinh sắc tố huỳnh quang, thủy giải arginine, urea, thử nghiệm indol, sản xuất nitrate, methyl red, voges-proskauer; dương tính với các thử nghiệm thủy giải casein, tinh bột, gelatin, tween 20, 80, sử dụng L-arabinose, L-rahamnose, sucrose và chịu được muối 1, 2 và 3%.

◆ **Các nghiên cứu định danh vi khuẩn *Xanthomonas axonopodis* gây bệnh loét dựa vào trình tự các vùng gene chuyên biệt**

Theo phân loại hình thái dựa vào hình dạng, màu sắc khuẩn lạc, các đặc điểm sinh hóa có thể xác định được các loài trong chi *Xanthomonas*. Tuy nhiên, theo phương pháp này phải mất nhiều thời gian, dễ nhầm lẫn. Kỹ thuật PCR, giải trình tự DNA và

các đặc điểm phân tử khác được sử dụng nhiều như một công cụ chuẩn dùng để phát hiện, định danh và phân loại các loài trong chi *Xanthomonas* cho kết quả nhanh và chính xác (Del Campo và ctv, 2009).

Cubero và Graham (2002) cho rằng, dựa vào vùng trình tự rDNA với cặp mồi 2/3 đủ để xác định hai nhóm loài *X. axonopodis*: nhóm 1 (*X. axonopodis* pv. *citri*) gây bệnh loét dạng A và nhóm 2 (*X. axonopodis* pv. *aurantifolii*) gây bệnh loét dạng B và C. Dựa vào vùng trình tự *pthA* có thể phát hiện nhanh và chính xác vi khuẩn *X. axonopodis* pv. *citri*. Việc kết hợp hai cặp mồi 2/3 và Jpth1/Jpth2 có thể khắc phục được những thiếu sót khi phát hiện chủng A^w. Cặp mồi J-RXg/J-RXc2 không phù hợp để phát hiện *X. axonopodis* pv. *citri* trên mẫu thực vật. Sáu mươi bốn dòng vi khuẩn từ cây chanh ở Saudi Arabian được phân lập và định danh bằng phương pháp giải trình tự vùng 16S rDNA với cặp mồi 27R và 1492R. Kết quả, so sánh với các trình tự vùng 16S rDNA trên Genbank thế giới, các dòng vi khuẩn phân lập được xác định là *X. citri* subsp. *citri* (Al-Saleh và ctv, 2014). Cũng với cặp mồi 27F/1492R nhận diện vùng trình tự 16S rDNA, các mẫu phân lập trên lá và trái cam có kết quả band PCR với kích thước 1500 bp, so sánh với trình tự trên Genebank thế giới tương đồng với *X. citri* subsp. *citri* (CP008989), mức tương đồng 99% (Li và ctv, 2015). Ngoài ra, để nhận diện nhanh và chính xác vi khuẩn *X. axonopodis* pv. *citri*, Park và ctv (2006) đã cho rằng có thể sử dụng cặp mồi chuyên biệt XacF/XacR để nhận diện vùng gene *hrpW*. Manyam và Nargund (2020) đã sử dụng cặp mồi Xc-lipF/Xc-lipR để định danh loài các mẫu phân lập gây bệnh loét từ cây có múi dựa vào vùng gene *estA*. Kết quả PCR thu được với kích thước 777 bp, và xác định được 5 mẫu phân lập là *X. axonopodis* pv. *citri*.

Nhìn chung, loài vi khuẩn *Xanthomonas* gây bệnh loét trên cây chanh có thể được xác định dựa trên vùng 16S rDNA với cặp mồi 27R và 1492R. Ngoài ra, các vùng gene *pthA*, *hrpW* và *estA* cũng được sử dụng để định danh loài vi khuẩn *Xanthomonas* gây bệnh loét trên cây chanh. Theo Cubero và Graham (2002), việc kết hợp giải trình tự vùng 16S rDNA và vùng trình tự gene *pthA* với cặp mồi Jpth1/Jpth2 xác định nhanh, chính xác loài *X. axonopodis* pv. *citri* và khắc phục được những thiếu sót khi định danh đến dưới loài.

Bui và ctv (2009) đã nghiên cứu sự phân bố của *X. citri* pv. *citri* ở Đông Nam Á,

Trong 577 dòng vi khuẩn *X. citri* pv. *citri* được phân lập từ các mẫu thu thập ở 14 tỉnh phía Bắc (Hà Nội, Hưng Yên, Nghệ An, Hà Tĩnh và Phú Thọ) và phía Nam (Cần Thơ, Long An, Đồng Nai, Tiền Giang, Vĩnh Long, Bến Tre, Đồng Tháp, Vũng Tàu và Lâm Đồng) của Việt Nam có 60 chủng từ chanh Mexico. Phân tích trung gian (IS-LM) - PCR bằng cách sử dụng mỗi nhắm vào ba trình tự chèn (1) được thực hiện trên tất cả các chủng Việt Nam và trên các chủng tham khảo *X. citri* pv. *citri*-A, -A * và *X. citri* pv. *aurantifolii*, IS-LM-PCR chỉ ra rằng tất cả các chủng phân lập ở Việt Nam đều là kiểu gen A. Phân tích độ đa dạng chiều dài đoạn khuếch đại (AFLP) được thực hiện trên 84 *X. citri* pv. *citri*, trong đó có 22 chủng từ chanh Mexico, AFLP được thực hiện bằng cách sử dụng *SacI* /*MspI* và bốn cặp mồi (*MspI* +1 [A, C, T, G] và 5'-*SacI* + C) cho bước khuếch đại chọn lọc). Kết quả cho thấy, tất cả chủng *X. citri* pv. *citri* ở Việt Nam có liên quan về mặt di truyền đối với chủng vi khuẩn A.

Tóm lại, bệnh loét do vi khuẩn *Xanthomonas* sp. trên cây chanh là bệnh khá phổ biến ở nhiều nước trên thế giới và trên khắp các vùng trồng chanh trong cả nước, gây hại nghiêm trọng, làm ảnh hưởng đến chất lượng thương phẩm của quả. Trên thế giới, nhiều nghiên cứu đã báo cáo vi khuẩn gây bệnh loét trên cây chanh được định danh là vi khuẩn *X. axonopodis* dựa trên đặc điểm hình thái, sinh hóa, biểu hiện bệnh, giải trình tự vùng 16S rDNA, vùng *pthA* và vùng *hrpW* bằng các cặp mồi chuyên biệt. Tuy nhiên, các nghiên cứu trong nước về tác nhân gây bệnh loét còn hạn chế. Hiện nay chỉ mới được ghi nhận nghiên cứu của Bui và ctv (2009), nhóm tác giả đã báo cáo vi khuẩn gây bệnh loét trên cây chanh Mexico ở 14 tỉnh phía Bắc và phía Nam là vi khuẩn *X. citri* pv. *citri*.

1.4. Tổng quan về cây giao (*Euphorbia tirucalli* L.)

1.4.1. Phân loại thực vật

Cây giao *Euphorbia tirucalli* L. (*E. tirucalli* L.) thuộc chi *Euphorbia*, một trong 8.000 loài trong họ *Euphorbiaceae*. Đây là cây bụi, nhỏ đặc hữu cho các vùng nhiệt đới có các nhánh giống như bút chì. Do đó, *E. tirucalli* còn được gọi là cây bút chì hay một số tên gọi khác như: cây san hô xanh, cây xương cá, cây giao.

Trong hệ thống phân loại nhị thức (dữ liệu thực vật học USDA tại www.plants.usda.gov) *E. tirucalli* L. thuộc:

Giới: Plantae.

Lớp: Magnoliopsida.

Họ: Euphorbiaceae.

Chi: *Euphorbia*.

Loài: *Euphorbia tirucalli*.

Danh pháp hai thành phần: *Euphorbia tirucalli* L.

1.4.2. Đặc điểm thực vật

Cây giao (*E. tirucalli*) dạng cây bụi có thể mọc cao 4 ÷ 12 m, đường kính thân 15 ÷ 20 cm. Cành có màu xanh, mọng nước, dày khoảng 7 mm, mọc so le, nhiều mắt. Chi nhánh thường kết thúc bằng những cành cây nhỏ hơn, màu xanh lá cây (Hình 1.9 A). Lá nhỏ, hình mác hẹp, hơi dày, chónh rụng, phiến lá dài 12 ÷ 16 mm, bề rộng khoảng 2 cm. Hoa kết thành cụm, phân bố đều mỗi nhánh nhỏ, màu vàng hoặc trắng, có từ 2 đến 6 hoa nhỏ (Hình 1.9 B). Quả dạng viên nang ba bên (chia thành ba phần), đường kính khoảng 12 mm, có thùy mỏng theo chiều dọc quả, cuống ngắn (8 mm), màu xanh nhạt. Quả xuất hiện từ tháng 11 đến tháng 12 hàng năm (Hình 1.9 D).

E. tirucalli có thể phát triển trong nhiều môi trường sống khác nhau. Cây có thể sống trong các điều kiện khắc nghiệt mà hầu hết các loại cây trồng khác không thể phát triển như: vùng khô hạn nhiệt đới với lượng mưa thấp, đất bị xói mòn kém, đất mặn và độ cao lên đến 2000 m nhưng không thể sống nhiệt độ thấp, môi trường sương giá (Van Damme, 1990; Van Damme, 2001).



Hình 1.9. Hình thân, hoa, lá và quả cây giao (*E. tirucalli*).

(A: Hình cây giao; B: Hình hoa cây giao; C: Hình lá trên các phân nhánh cây giao; D: Hình quả cây giao)

(Nguồn: Van Damme, 2001)

1.4.3. Nguồn gốc và phân bố

Cây giao (*E. tirucalli*) thuộc chi Euphorbia (Euphorbiaceae). *E. tirucalli* là một trong những loài phổ biến nhất trong chi. Theo Van Damme (1990) và Schmelzer và Gurib-Fakim (2008) cây có nguồn gốc từ vùng nhiệt đới Đông Phi nhưng đã thích nghi và phát triển được ở tất cả các vùng của Ấn Độ, đặc biệt là ở các vùng khô hạn hơn như ở Bengal và Nam Ấn Độ.

Cây *E. tirucalli* hiện đang được trồng phổ biến ở các nước Angola, Ethiopia, Eritrea, Malawi, Kenya, Rwanda, Mauritius, Sudan, Senegal, Uganda, Tanzania,

Zanzibar, Ở Brazil, Indonesia, Ấn Độ, Malaysia, Việt Nam, Philippines. Ở Việt Nam, cây *E. tirucalli* còn được gọi là cây giao, cây bút chì, cây san hô xanh. Cây giao mọc hoang dại hoặc trồng ở nhiều nơi trong cả nước để làm cảnh và cung cấp cây dược liệu trong đông y.

1.4.4. Thành phần hóa học của cây giao (*E. tirucalli*)

Theo các nghiên cứu trước cho thấy, trong các bộ phận của cây *E. tirucalli* (rễ, thân, lá và củ) có chứa rất nhiều nhóm hợp chất thứ cấp có hoạt tính sinh học như: terpenoids, triterpenes, polyphenols, serine proteases, steroids, flavonoids, isoflavonoids, acids and esters. Tuy nhiên, thành phần và tỷ lệ các hợp chất thứ cấp trong cây còn phụ thuộc vào vị trí địa lý, mùa vụ (Upadhyay và ctv, 2010). Theo Yoshida và ctv (1991), dịch chiết cây *E. tirucalli* ở Nhật Bản có chứa 22 hợp chất: quercitrin; 5-o-caffeoylquinic acid; 3,3',4-tri-o-methyl-4'-o-rutinosyl-ellagic acid; tellimagrandin II; genaiin; euphorbin A; tirucallin A; prostratin A; cornusiin B; oenothien C; tirucallin B; corilagin; punicafofin; euphorbin F (21); phenazine derivative; euphorbin E; 1,2,3,4,6-penta-o-galloyl- β -D-glycose. Trong khi đó, trong dịch chiết cây giao thu nhận ở Trung Quốc có chứa các hợp chất: 3,3',4-tri-O-methyl-4-O-rutinosyl ellagic acid, gallic acid, 1-O-galloyl- β -D-glucoside, 1,2,3-tri-O-galloyl- β -D-glucoside, corilagin, pedunculagin, casuariin, quercitrin, putranjivain B, putranjivain A, 3,3'-di-O-methyl gallic acid; 2,3-(S)-hexahydroxydiphenoyl-D-glucopyranoside, rutin và 5-desgalloylstarchyurin (Lin và ctv, 2001). Ở Brazil, dịch chiết cây *E. tirucalli* có chứa quercetin (1,47 $\mu\text{g/mL}$), rutin (0,49 $\mu\text{g/mL}$), gallic acid (30,52 $\mu\text{g/mL}$), caffeic acid (15,61 $\mu\text{g/mL}$), chlorogenic acid (12,37 $\mu\text{g/mL}$), kaempferol (3,45 $\mu\text{g/mL}$), 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) (3,12 $\mu\text{g/mL}$) (Machado và ctv, 2016), malic acid glycoside, ellagic acid (phenolics), mono-caffeoylquinic acid (phenylpropanoid), 2,3-(S)-Hexahydroxydiphenoyl-D-glucose (ellagitannin), acid triterpene (triterpene) (Caxito và ctv, 2017). Các hợp chất α -chaconine; linamarin, myricetin, isatin và gypsogenin đã được báo cáo có mặt trong dịch chiết cây *E. tirucalli* ở Nam Phi (Choene và Motadi, 2016). Ở Malaysia, dịch chiết cây *E. tirucalli* ở Malaysia có chứa các hợp chất: 4-hydroxy-2,5-dimethylfuran-3(2H)-one, 4H-Pyran-4-one, 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-pyran-4(4H)-one, 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde, (E)-2-methoxy-4-(prop-1-enyl) phenol, megastigmatrienone, 2-hydroxy-1-(4-isopropylphenyl)-2-methyl-1-propanone,

tetradecanoic acid, hexadecanoic acid, linoleic acid, octadecanoic acid, 9,12-octadecadienoic acid, ethyl linoleate, spinacene, Vitamin E, ergost-5-en-3-ol,(3 β)-, lanosta-8,24-dien-3-ol,(3 β), (23S)-ethylcholest-5-en-(3 β)-ol, liminalol. Trong đó, bốn hợp chất có tỷ lệ cao nhất là lanosta-8,24-dien-3-ol, (3 β)-(13,60%), (23S)-ethylcholest-5-en-(3 β)-ol (7,02%), linoleic acid (2,96%), và viminalol (2,57 %) (Yusoff và ctv, 2017).

Ở Việt Nam, Le và ctv (2019) cũng đã phân lập được 7 hợp chất từ cây giao thu nhận ở Hàm Thuận Bắc, Tỉnh Bình Thuận gồm: arjunolic acid, eriodictyol, quercitrin, afzelin, scopoletin, 3,3',4'-O-trimethylellagic acid và gallic acid.

Nhìn chung, cây giao có chứa rất nhiều hợp chất thuộc các nhóm terpenoids, triterpenes, polyphenols, serine proteases, steroids, flavonoids, isoflavonoids, acids and esters. Chính sự đa dạng về thành phần hóa học đã là cơ sở khoa học chứng minh cho các ứng dụng của cây giao như: thuốc bảo vệ thực vật, y dược,...Mặc khác, thành phần hóa học của cây giao ở các nơi trên thế giới được nghiên cứu và công bố nhiều. Trong khi đó, việc nghiên cứu về thành phần hóa học của cây giao trong nước còn khá ít. Cụ thể, cho đến nay chỉ có báo cáo của Le và ctv (2019) về việc phân lập được 7 hợp chất (arjunolic acid, eriodictyol, quercitrin, afzelin, scopoletin, 3,3',4'-O-trimethylellagic acid và gallic acid) từ cây giao thu nhận được ở Hòn Sơn, Hàm Thuận Bắc, Bình Thuận. Điều này cho thấy, việc nghiên cứu về thành phần hóa học của cây giao ở Việt Nam là cần thiết để có cơ sở khoa học phục vụ cho các nghiên cứu ứng dụng khác.

1.4.5. Khả năng ức chế vi khuẩn gây bệnh trên cây trồng của dịch chiết cây giao (*E. tirucalli*)

Bên cạnh sự đa dạng về các thành phần hóa học, ứng dụng trong y học để chữa một số bệnh như: mụn cóc, ung thư, lậu, viêm khớp, hen suyễn, ho, đau tai, đau dây thần kinh, thấp khớp, đau răng, (Gupta và ctv, 2013), cây giao còn được báo cáo có khả năng ức chế các vi khuẩn gây bệnh cho cây trồng. Năm 1998, Lirio và ctv đã báo cáo dịch chiết nước cây *E. tirucalli* có khả năng ức chế cả năm loại vi khuẩn gây bệnh trên cây trồng (*X. campestris* pv. *campestris*; *Erwinia carotovora* pv. *carotovora* và *Pseudomonas solanacearum*). Theo nhóm tác giả, dịch chiết từ cây *E. tirucalli* có thể được ứng dụng làm thuốc bảo vệ thực vật. Dịch chiết nước, ethanol và methanol từ

thân cây *E. tirucalli* có thể ức chế vi khuẩn *X. citri* với đường kính vòng ức chế tương ứng là 11, 13 và 17 mm. Điều này chứng tỏ, hiệu quả ức chế vi khuẩn của chiết xuất cây *E. tirucalli* bằng dung môi cao hơn nhiều so với nước (Jadhav và ctv, 2010).

Nhìn chung, theo các dẫn liệu cho thấy, thân cây *E. tirucalli* có chứa nhiều nhóm hợp chất thứ cấp có hoạt tính sinh học như: terpenoids, triterpenes, polyphenols, serine proteases, steroids, flavonoids, isoflavonoids, acids and esters. Tuy nhiên, các nghiên cứu về khả năng ức chế vi khuẩn gây bệnh trên cây trồng của dịch chiết cây giao trên thế giới còn khá ít, chủ yếu dừng lại ở đánh giá trong phòng thí nghiệm. Cụ thể, nhiều báo cáo cho thấy chiết xuất từ cây giao có tác dụng diệt ấu trùng (muỗi) (Rahuman và ctv, 2008; Yadav và ctv, 2002), chống nấm (Mohamed và ctv, 1996), chống virus (Betancur-Galvis và ctv, 2002), diệt khuẩn (Neuwinger, 2004). Trong thử nghiệm ngoài đồng, các nghiên cứu về ứng dụng cây giao trong lĩnh vực bảo vệ thực vật còn khá hạn chế, đến nay chỉ mới được ghi nhận một nghiên cứu của Mwine và Van Damme (2010). Trong nghiên cứu này, nhóm tác giả đã ghi nhận chiết xuất từ cây giao đã làm giảm đáng kể sự xâm nhập của rệp *Brevicoryne brassicae* trên cây cải bắp dưới ngưỡng yêu cầu của thị trường khi thử nghiệm trên đồng ruộng. Bên cạnh đó, Mwine (2011) cũng đã báo cáo chiết xuất từ cây giao cải thiện sức khỏe cho cây trồng và giảm thiểu sự hư hại lá nhưng chưa có báo cáo cụ thể chiết xuất này có thể chống lại những loài gây hại nào. Do đó, theo ghi nhận đến nay, nghiên cứu này là nghiên cứu đầu tiên báo cáo về hiệu quả của chiết xuất từ cây giao đối với vi khuẩn gây bệnh hại cây trồng.

1.5. Tổng quan về hợp chất thứ cấp phenolic

1.5.1. Phenolic

Các hợp chất phenolic là các hợp chất có một hoặc nhiều vòng thơm với một hoặc nhiều nhóm hydroxy. Chúng được phân bố rộng rãi trong giới thực vật và là các sản phẩm trao đổi chất phong phú của thực vật. Hơn 8.000 cấu trúc phenolic đã được tìm thấy, từ các phân tử đơn giản như các acid phenolic đến các chất polyme như tannin.

Các hợp chất phenolic thực vật có tác dụng chống lại bức xạ tia cực tím hoặc ngăn chặn các tác nhân gây bệnh, ký sinh trùng và động vật ăn thịt, cũng như làm tăng màu sắc của thực vật. Chúng có ở khắp các bộ phận của cây và vì vậy, chúng cũng là một phần không thể thiếu trong chế độ ăn uống của con người.

Các hợp chất phenolic là thành phần phổ biến của thức ăn thực vật (trái cây, rau,

ngũ cốc, ô liu, các loại đậu, sô-cô-la,...) và đồ uống (trà, cà phê, bia, rượu,...) và góp phần tạo nên các đặc tính cảm quan chung của thức ăn thực vật. Các hợp chất phenolic làm tăng vị đắng của trái cây và nước trái cây, bởi vì sự tương tác giữa các hợp chất phenolic, chủ yếu là các procyanidin và glycoprotein trong nước bọt. Các anthocyanin, một trong sáu phân nhóm của một nhóm polyphenol thực vật lớn được gọi là các flavonoid, tạo màu da cam, đỏ, xanh và màu tím của nhiều loại trái cây và rau quả như táo, quả, củ cải và hành tây. Các hợp chất phenolic được biết đến như là những hợp chất quan trọng nhất ảnh hưởng đến hương vị và sự khác biệt màu sắc giữa các loại rượu vang trắng, hồng và đỏ, các hợp chất này phản ứng với oxy và có ảnh hưởng đến việc bảo quản, lên men và cất giữ rượu vang. Các hợp chất phenolic thực vật bao gồm các stilben, các lignan, các acid phenolic, các flavonoid và các tannin (Dai và Mumper, 2010).

1.5.2. Tính chất kháng khuẩn của các hợp chất phenolic

Các hợp chất có nguồn gốc thực vật chủ yếu là các hợp chất thứ cấp trong quá trình trao đổi chất, hầu hết trong số đó là phenol hoặc các dẫn xuất của chúng. Trong đó, các nhóm hợp chất phenol, axit phenolic, quinon, saponin, flavonoid, tannin, coumarin, terpenoid và alkaloid đã được chứng minh có khả năng ức chế nhiều vi khuẩn Gram (-) và Gram (+) (Ciocan và Bara, 2007). Các nhóm -OH tự do trong các hợp chất phenolic được cho là gây ra hoạt động ức chế vi khuẩn thông qua một số cơ chế (Lai và Roy, 2004). Các nhóm -OH này có thể tương tác với màng tế bào của vi khuẩn để phá vỡ cấu trúc màng và gây rò rỉ các thành phần tế bào làm chết vi khuẩn (Xue và ctv, 2013). Nhóm -OH hoạt động thúc đẩy việc phân định vị trí của các electron sau đó hoạt động như chất trao đổi proton và giảm gradient qua màng tế bào chất của tế bào vi khuẩn. Điều này sẽ gây ra sự sụp đổ của động lực proton và làm cạn kiệt nhóm ATP và cuối cùng làm chết tế bào vi khuẩn (Ultee và ctv, 2002). Ngoài ra, nhóm -OH ức chế sự tạo ra các loại oxy phản ứng, cũng như việc loại bỏ các gốc tự do làm giảm tiềm năng oxy hóa khử của môi trường sinh trưởng của vi sinh vật và làm hạn chế sự phát triển của chúng (Cueva và ctv, 2010; Stojkovic và ctv, 2013).

CHƯƠNG 2: VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

2.1.1. Thời gian nghiên cứu

Luận án đã được tiến hành từ tháng 07 năm 2017 đến tháng 6 năm 2021.

2.1.2. Địa điểm nghiên cứu

Thu thập mẫu bệnh loét được tiến hành tại 3 huyện trồng chanh Bến Lức, Đức Huệ và Thạnh Hóa ở Long An.

Thu thập mẫu cây giao (*Euphorbia tirucalli* L.) tại Phan Thiết, Bình Thuận; Bình Chánh, Tp. Hồ Chí Minh; Cujut, Đắk Nông.

Phân lập và định danh vi khuẩn được tiến hành tại phòng thí nghiệm Bệnh cây, Bộ môn Bảo vệ Thực vật và khoa Khoa học Sinh học, Trường ĐH Nông Lâm, Tp. HCM.

Chiết xuất, điều chế cao chiết toàn phần, các cao chiết phân đoạn từ bột cây giao, đánh giá định tính, phân lập chất trong các cao chiết phân đoạn được thực hiện tại khoa Khoa học Sinh học, Trường ĐH Nông Lâm, Tp. HCM và Bộ môn Hóa hữu cơ, Trường ĐH Sư phạm Tp. HCM.

Phổ $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz) và $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz) được ghi trên máy BRUKER Avante 500 với chất chuẩn nội TMS tại Viện Hóa học, Viện Hàn lâm khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Xác định hàm lượng phenolic tổng, flavonoid tổng, acid gallic, scopoletin và acid piperic có trong cao chiết từ cây giao được tiến hành tại trung tâm Công nghệ Việt - Đức, Trường ĐH Công nghiệp Thực phẩm Tp. HCM.

Các thí nghiệm trong nhà lưới được thực hiện tại khu thực nghiệm, khoa Nông học, Trường ĐH Nông Lâm, Tp. HCM.

Thí nghiệm ngoài đồng được thực hiện tại vườn chanh xã Bình Hòa Nam, huyện Đức Huệ, tỉnh Long An.

2.2. Nội dung nghiên cứu

- Phân lập và xác định loài vi khuẩn *Xanthomonas* sp. gây bệnh loét trên cây chanh theo hình thái, đặc điểm sinh hóa, trình tự vùng 16S rDNA, *hrpW* và *pthA*.

- Đánh giá hoạt tính ức chế vi khuẩn *Xanthomonas* sp. của cao chiết phân đoạn từ cây giao trong điều kiện phòng thí nghiệm.

- Đánh giá hiệu quả đối với bệnh loét do vi khuẩn *X. axonopodis* gây ra của cao chiết phân đoạn từ cây giao trong điều kiện nhà lưới và ngoài đồng.

2.3. Vật liệu nghiên cứu

Môi trường phân lập tác nhân và thí nghiệm sinh học: NA (Nutrient agar), NB (Nutrient broth), MT gelatin, MT Tween 80, MT casein, MT Urea broth.

Các loại hóa chất phân tử tách chiết DNA và PCR: tinh sạch sản phẩm PCR bằng Gene JET Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific).

Các loại hóa chất thực hiện HPLC: Dung môi và hóa chất tách chiết mẫu: methanol, acid formic. Chất chuẩn: acid gallic độ tinh khiết 97%; scopoletin độ tinh khiết 99%; acid piperic độ tinh khiết 97% của hãng Sigma.

2.4. Phương pháp nghiên cứu

2.4.1. Phân lập và xác định loài vi khuẩn *Xanthomonas* sp. gây bệnh loét trên cây chanh theo hình thái, đặc điểm sinh hóa, trình tự vùng 16S rDNA, *hrpW* và *pthA*

2.4.1.1. Xác định loài vi khuẩn *Xanthomonas* sp. gây bệnh theo hình thái và đặc tính sinh hóa

a, Phương pháp thu thập mẫu bệnh và bảo quản mẫu bệnh

Mẫu chanh không hạt và chanh giầy có triệu chứng bệnh loét được thu thập từ các vườn ở 3 huyện Bến Lức, Đức Huệ, Thạnh Hóa, tỉnh Long An bằng cách tiến hành lấy mẫu theo quy chuẩn kỹ thuật quốc gia QCVN 01-141: 2013/BNNPTNT về phương pháp lấy mẫu kiểm dịch thực vật do Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn ban hành. Áp dụng theo phương pháp quản lý mẫu bệnh thực vật của Roger và Dean (2005): Sử dụng túi giấy để lấy và giữ mẫu bệnh, gói mẫu cẩn thận để tránh va đập và hơi nước ngưng tụ. Sử dụng bút chì để viết lịch sử mẫu. Mẫu bệnh sau khi được thu thập, nhanh chóng vận chuyển về phòng thí nghiệm và lưu trữ, bảo quản mẫu trong tủ mát (Alaska, BD-300C, Việt Nam) ở nhiệt độ 4°C.

Quy ước đặt tên mẫu bệnh: Các mẫu bệnh được mã hóa theo địa điểm thu mẫu, vị trí và bộ phận bị bệnh (Bảng 2.1, Phụ lục 2).

b, Phân lập tác nhân gây bệnh

Việc phân lập tác nhân gây bệnh từ các mẫu lá, cành và quả chanh có biểu hiện loét được thực hiện theo phương pháp của Roger và Dean (2005). Chọn các lá, quả và cành chanh có vết bệnh còn mới. Rửa mẫu bệnh dưới vòi nước ở phòng thí nghiệm để loại bỏ đất và bụi bẩn. Dùng kéo cắt mẫu lá thành từng miếng nhỏ tại phần tiếp giáp giữa mô khỏe và mô bệnh một cách cẩn thận. Khử trùng bề mặt trong dung dịch natri hypochloride 10% khoảng 1 ÷ 3 phút rồi rửa lại bằng nước cất vô trùng 3 ÷ 4 lần. Thấm khô mẫu bằng giấy thấm vô trùng. Dùng kẹp nuôi cấy mô đã vô trùng đặt miếng mẫu lên môi trường Nutrient agar (NA), đặt ngược đĩa petri ở điều kiện nhiệt độ phòng. Sau khi vi khuẩn phát triển cấy truyền khuẩn lạc riêng lẻ sang môi trường NA. Lưu nguồn vi khuẩn vào ống nghiệm NA và bảo quản ở 4°C để sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.

c, Xác định tên loài vi khuẩn *Xanthomonas* sp. dựa vào các đặc điểm hình thái và đặc tính sinh hóa

Bảng 2.1. Các đặc điểm sinh hóa và tiêu chí định danh vi khuẩn *X. axonopodis*

STT	Đặc điểm sinh hóa	Tiêu chí định danh
1	Gram	-
2	Catalase	+
3	Oxidase	-
4	Phát triển trong điều kiện kỵ khí	+
5	Thủy phân casein	+
6	Thủy phân tinh bột	+
7	Thủy phân Tween 80	+
8	Thủy phân gelatin	+
9	Thủy phân urea	-
10	Phát triển ở 35°C	+
11	Phát triển trên môi trường YDC ở 28°C, 33°C	+
12	Khả năng chịu muối 1, 2 và 3%	+
13	Khả năng sử dụng đường glucose, arabimose, mannose	+

Tổng số mẫu thu thập ở 3 huyện Bến Lức, Đức Huệ và Thạnh Hóa là 75 mẫu. Các mẫu nuôi cấy trên môi trường NA sau 48 ÷ 72 giờ có các đặc điểm của chi

Xanthomonas sp. như: khuẩn lạc có hình dạng tròn, nhẵn bóng, lồi, màu vàng nổi trên bề mặt thạch theo mô tả của Mubeen và ctv (2015) sẽ được giữ lại để tiến hành khảo sát các đặc điểm sinh hóa. Các đặc điểm sinh hóa khảo sát và tiêu chí định danh theo hướng dẫn của Schaad và ctv (2001), EPPO (2005), ISPM (2014) (Bảng 2.1).

d, Kiểm chứng vi khuẩn gây bệnh sau phân lập theo phương pháp chủng bệnh nhân tạo (quy tắc Koch's)

Các mẫu vi khuẩn sau phân lập được tiến hành đánh giá khả năng gây bệnh trong điều kiện phòng thí nghiệm.

Lá, cành và quả chanh không hạt (*C. latifolia*) và chanh giầy (*C. aurantifolia*) được rửa bằng nước cho sạch, khử trùng bề mặt lá, cành và quả bằng cồn 70%, rửa lại 3 lần bằng nước cất vô trùng. Dùng bông gòn thấm ướt với nước cất vô trùng rồi quần xung quanh đầu cuống lá, đầu cuống trái và hai đầu cành chanh giúp giữ ẩm cho mẫu. Các mẫu sau khi được chủng, đặt trong các hộp nhựa kích thước 12 x 17 x 5 cm đã được xử lý sạch bằng cồn 70%, bên dưới đáy hộp đặt một lớp giấy được thấm ướt nước cất. Các hộp được đặt trong tối 24 giờ ở nhiệt độ phòng. Sau đó, các hộp được đặt ở điều kiện ánh sáng tự nhiên ở nhiệt độ phòng, theo dõi sự hình thành vết bệnh.

Mỗi huyện chọn ngẫu nhiên 3 mẫu phân lập từ lá, cành, quả nuôi cấy trên môi trường Nutrient broth (NB) sau 18 giờ, nồng độ vi khuẩn đạt khoảng 10^6 cfu/mL.

Chủng bệnh trên lá: Dùng kim ghim côn trùng để gây vết thương trên lá, mỗi lá 4 vết thương. Dùng micropipet nhỏ 20 μ L dịch vi khuẩn đã chuẩn bị lên vết thương, lá đối chứng được nhỏ bằng nước cất vô trùng. Mỗi nghiệm thức tương ứng với 1 MPL và được chủng 3 lần lặp lại, mỗi lần lặp lại gồm 1 lá.

Chủng bệnh trên quả: Dùng kim ghim côn trùng để gây vết thương trên quả, mỗi quả 4 vết. Dùng micropipet nhỏ 20 μ L dịch vi khuẩn đã chuẩn bị lên vùng vết thương, quả đối chứng được nhỏ bằng nước cất vô trùng. Mỗi nghiệm thức tương ứng với 1 MPL và được chủng 3 lần lặp lại, mỗi lần lặp lại gồm 1 quả.

Chủng bệnh trên cành: Dùng kim ghim côn trùng để gây vết thương trên cành, mỗi cành 4 vết. Dùng micropipet nhỏ 20 μ L dịch vi khuẩn đã chuẩn bị lên vùng vết thương, cành đối chứng được nhỏ bằng nước cất vô trùng. Mỗi nghiệm thức tương ứng với 1 MPL và được chủng 3 lần lặp lại, mỗi lần lặp lại gồm 1 cành.

Các mẫu lá, cành và quả chanh sau khi chủng vi khuẩn được đặt vào trong hộp nhựa đã chuẩn bị. Các mẫu lá, quả và cành chanh được ngăn cách với một lớp giấy được thấm ướt nước cất vô trùng bằng một ống nhựa sạch.

Chỉ tiêu theo dõi:

- Thời gian ủ bệnh: tính từ khi chủng đến khi xuất hiện triệu chứng bệnh.

- Tỷ lệ vết bệnh (%): tỷ lệ vết bệnh được tính theo công thức:

$$\text{Tỷ lệ vết bệnh (\%)} = \frac{\text{Số vết bệnh xuất hiện triệu chứng}^*}{\text{Tổng số vết chủng}}$$

(*: Xuất hiện quầng vàng, vết sần sùi nổi gờ)

- Kích thước vết bệnh: đường kính vết lớn nhất.

- Chụp SEM so sánh với vết bệnh ban đầu.

e, Phương pháp chụp SEM

Các mẫu lá, quả sau khi được chủng bệnh được chụp SEM theo phương pháp của Sena-Vélez và ctv (2015) có thay đổi. Các mẫu lá, quả được cắt thành mảnh nhỏ, tại vết bệnh, rửa ba lần với đệm muối phosphate sau đó khử nước bằng ethanol ở các nồng độ khác nhau (20, 40, 60, 80 và 100%). Các mẫu lá, quả được cấp đông sâu -40°C trong 1 ÷ 2 giờ. Các mẫu sau khi được phủ bởi vàng/paladium được chụp SEM bằng thiết bị JSM-IT200 SEM (Nhật Bản).

2.4.1.2 Xác định loài vi khuẩn *Xanthomonas* sp. dựa vào trình tự vùng 16S rDNA, *hrpW* và *pthA*

a, Phương pháp chiết xuất DNA tổng số

Sử dụng que cấy dạng vòng lấy 1 khuẩn lạc đơn các MPL đã chọn cho vào 5 mL môi trường NB, ủ ở 28°C trong 48 giờ. Ly tâm dịch tăng sinh ở 12.000 rpm/5 phút để thu sinh khối để ly trích DNA.

Phương pháp ly trích DNA được thực hiện theo quy trình của bộ kit Gene JET Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific).

b, Phương pháp khuếch đại vùng gene 16S rDNA, *hrpW* và *pthA*

Ba cặp primer: 27F (5'-AGATTTGATCCTGGCTCAG-3') và 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') (Lane, 1991); *XacF* (5'-GTCGCAATACGATTGGAAC-3') và *XacR* (5'-GGAGGCATTGTCTGAAGGAA-3') (Park và ctv, 2006); *Jpth1* (5'-CTTCAACTCAAACGCCGGAC-3') và *Jpth2* (5'-CATCGCGCTGTTCGGGAG-3') (Cubero và Graham, 2002) được sử dụng để khuếch đại vùng 16S rDNA, *hrpW* và *pthA*. Thể tích phản ứng là 25 μ L có chứa mỗi primer 0,5 μ L, khuôn DNA 0,5 μ L, DreamTaq Green 12,5 μ L (Bioline), nước cất vô trùng 11 μ L. Chu trình nhiệt phản ứng PCR của ba cặp mồi được thể hiện trong Bảng 2.2.

Bảng 2.2. Chu trình nhiệt phản ứng PCR của ba cặp mồi

STT	Tên cặp mồi	Chu kỳ	Giai đoạn	Nhiệt độ	Thời gian
1	27F/1492R	1	Tiền biến tính	95	3 phút
		35	Biến tính	95	30 giây
			Bắt cặp	50	30 giây
			Kéo dài	72	1 phút 30 giây
		1	Hậu kéo dài	72	7 phút
2	<i>XacF/XacR</i>	1	Tiền biến tính	95	3 phút
		35	Biến tính	95	15 giây
			Bắt cặp	60	30 giây
			Kéo dài	72	45 giây
		1	Hậu kéo dài	72	7 phút
3	<i>Jpth1/Jpth2</i>	1	Tiền biến tính	95	3 phút
		35	Biến tính	95	15 giây
			Bắt cặp	58	15 giây
			Kéo dài	72	30 giây
		1	Hậu kéo dài	72	7 phút

Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng cách điện di trên gel agarose 1,5% ở 80V, 35

phút, trong dung dịch Gelred. Sản phẩm PCR sẽ được giải trình tự tại công ty 1st Base (Singapore).

Vùng 16S rDNA, *hrpW* và *pthA* được giải trình tự và so sánh với các trình tự vùng 16S rDNA, *hrpW* và *pthA* của các mẫu *Xanthomonas* trên thế giới đã biết tên loài từ cơ sở dữ liệu của Genebank (Bảng 2.3 và Bảng 2.4) làm cơ sở xác định tên loài của các dòng vi khuẩn *Xanthomonas* sp. thu thập được.

Bảng 2.3. Thông tin loài vi khuẩn *Xanthomonas* spp. trên Genebank được sử dụng để so sánh loài theo trình tự vùng 16S rDNA.

TT	Mã số Genebank	Tên loài/Quốc gia
1	MK382439.1	<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>citri</i> – New Zealand
2	NR104963	<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>aurantifolii</i> strain LMG 9179 – Mỹ
3	MK121207.1	<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>citri</i> – Trung Quốc
4	MN584920.1	<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>fuscans</i> strain 3002T1.1 – Mỹ
5	HQ875739.1	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> strain BP104 – Thái Lan
6	KY271340.1	<i>Xanthomonas axonopodis</i> – Brazil
7	JQ513818.1	<i>Xanthomonas campestris</i> – Brazil

(<http://ncbi.nlm.nih.gov>)

Bảng 2.4. Thông tin loài vi khuẩn *Xanthomonas* spp. trên Genebank được sử dụng để so sánh loài theo trình tự vùng *pthA* và *hrpW*.

TT	<i>hrpW</i>		<i>pthA</i>	
	Tên loài/thứ/Quốc gia	Mã số Genebank	Tên loài/thứ/Quốc gia	Mã số Genebank
1	<i>X. citri</i> subsp. <i>citri</i> – Mỹ	CP009007.1	<i>X. citri</i> – Trung Quốc	U28802.1
2	<i>X. citri</i> subsp. <i>citri</i> – Mỹ	CP009019.1	<i>X. citri</i> – Nhật Bản	AB021365.1
3	<i>X. citri</i> pv. <i>citri</i> – Mỹ	CP023285.1	<i>X. axonopodis</i> – Trung Quốc	CP004400.1
4	<i>X. citri</i> subsp. <i>citri</i> – Mỹ	CP009010.1	<i>X. citri</i> pv. <i>citri</i> – Argentina	MK425211.1
5	<i>X. citri</i> pv. <i>citri</i> – Mỹ	CP009031.1	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i> – Đài Loan	GU181333.1
6	<i>X. citri</i> pv. <i>citri</i> – Mỹ	CP003778.1	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i> – Đài Loan	GU181332.1
7	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i> – Brazil	AE008923.1	<i>X. citri</i> pv. <i>citri</i> – Mỹ	EF473087.1

(<http://ncbi.nlm.nih.gov>)

*** Phân nhóm xác định loài và sự khác biệt di truyền của các MPL *Xanthomonas* dựa vào vùng trình tự 16S rDNA, *hrpW* và *pthA***

Sơ đồ phân nhóm xác định loài của vi khuẩn *Xanthomonas* được xử lý tính toán từ trị số của ma trận khoảng cách di truyền theo phương pháp Maximum Composite Likelihood. Phần trăm giá trị boottrap từ 1000 lần lặp lại được chỉ trên các nhánh. Tỷ lệ tương đồng DNA (%) giữa các MPL và các mẫu trên thế giới dựa trên tỷ lệ các vị trí có nucleotide thay đổi (không bao gồm thêm hoặc mất nucleotide), được tính theo chương trình DNADIST trong phần mềm PHYLIP version 3.66.

2.4.2. Đánh giá hoạt tính ức chế vi khuẩn *Xanthomonas* sp. của cao chiết phân đoạn từ cây giao trong điều kiện *in vitro*

Từ những nghiên cứu phân lập vi khuẩn *Xanthomonas* sp. gây bệnh loét trên cây chanh, MPL có thời gian xuất hiện bệnh sớm nhất, đặc trưng nhất và kích thước vết bệnh lớn nhất trong thử nghiệm đánh giá khả năng gây bệnh bằng phương pháp chủng

Koch's được sử dụng làm nguồn nguyên liệu cho nghiên cứu đánh giá hoạt tính ức chế vi khuẩn của cao chiết phân đoạn từ cây giao trong phòng thí nghiệm.

2.4.2.1. Xác định độ ẩm của mẫu bột cây giao

Mẫu cây giao được thu thập từ 3 vùng (Bình Thuận, Tp. Hồ Chí Minh và Đắk Nông) khoảng 2 năm tuổi. Mẫu cành và thân cây giao sau khi thu hái được loại bỏ phần hư hỏng, cắt thành những đoạn nhỏ 2,0 ÷ 2,5 cm, ngâm rửa qua nước sạch 3 lần, phơi trong bóng râm rồi sấy ở 50 ÷ 60°C cho đến khô. Mẫu cây giao khô được xay thành bột mịn (< 1 mm) và tiến hành xác định độ ẩm theo TCVN 9706-2013.

Cho 5 g bột cây giao vào chén sấy dùng để xác định độ ẩm, có nắp và đã được xác định khối lượng chén sấy và nắp. Cho chén sấy chứa mẫu bột cây giao (đã mở nắp) vào tủ sấy ở nhiệt độ 105°C trong 1 giờ. Lấy ra và cho chén sấy vào bình hút ẩm đến nguội. Đậy nắp và cân. Làm lại nhiều lần cho đến khi chênh lệch trọng lượng giữa hai lần cân không vượt quá 0,5 mg. Thí nghiệm được lặp lại ba lần. Độ ẩm X (%) của bột cây giao được xác định theo công thức (TCVN 9706-2013):

$$X\% = \left(\frac{P - A}{P} \right) \times 100$$

Trong đó: P: Số gam của mẫu bột cây giao trước khi sấy (g)

A: Số gam của mẫu bột cây giao sau khi sấy (g)

X: Độ ẩm của mẫu bột cây giao (%)

2.4.2.2. Xác định cao chiết phân đoạn chiết xuất từ cây giao

a, Chiết xuất cao toàn phần

Mẫu bột cây giao ở mỗi vùng (Bình Thuận, Tp. Hồ Chí Minh và Đắk Nông) được cho vào bình ngâm có lót bông ở đáy. Rót dung môi ethanol 96% vào bình với tỷ lệ nguyên liệu : dung môi là 1 : 6 (w/v). Giữ yên ở nhiệt độ phòng trong một ngày cho dung môi xuyên thấm vào cấu trúc tế bào thực vật và hòa tan các hợp chất tự nhiên. Thu dịch chiết và tiếp tục rót dung môi mới vào bình. Quá trình ngâm được lặp lại 6 lần. Gộp dịch chiết lại, đem cô giảm áp để thu hồi dung môi và có được các cao toàn phần (cao tổng) tương ứng (Nguyễn Kim Phi Phụng, 2007).

b, Chiết xuất cao phân đoạn từ cao toàn phần

Các cao toàn phần ban đầu chứa hầu hết các hợp chất hữu cơ từ phân cực đến kém phân cực. Sử dụng kỹ thuật chiết lỏng - lỏng để phân chia cao toàn phần ban đầu thành những phân đoạn có tính phân cực khác nhau.

Việc chiết lỏng - lỏng được thực hiện trong bình lắng gạn, ở điều kiện nhiệt độ phòng, 1/2 thể tích nước được thêm vào 1 thể tích cao toàn phần, tiến hành lắc phân đoạn phân dịch này lần lượt với các dung môi có độ phân cực tăng dần: *n*-hexan, ethyl acetate và butanol. Tiến hành lắc cho đến khi không còn chất hòa tan vào dung môi thì mới chuyển sang dung môi phân cực hơn. Thu các phân đoạn, đem cô giảm áp để loại dung môi, thu các cao chiết phân đoạn tương ứng (Nguyễn Kim Phi Phụng, 2007). Hiệu suất thu hồi của các cao chiết phân đoạn từ cây giao thu nhận ở ba vùng (Bình Thuận, Đắk Nông và Tp. HCM) được tính theo công thức (Upadhyay và ctv, 2010):

$$H (\%) = \left(\frac{\text{Khối lượng cao chiết phân đoạn}}{\text{Khối lượng cao chiết toàn phần}} \right) \times 100$$

Các cao phân đoạn thu được từ cây giao ở cả ba vùng (Bình Thuận, Tp. Hồ Chí Minh và Đắk Nông) sẽ được đánh giá hoạt tính ức chế vi khuẩn *X. axonopodis* nhằm chọn ra phân đoạn có tiềm năng cao nhất để ứng dụng trong thử nghiệm nhà lưới và ngoài đồng.

2.4.2.3. Đánh giá hoạt tính ức chế vi khuẩn *Xanthomonas axonopodis* của cao chiết phân đoạn từ cây giao (*Euphorbia tirucalli* L.) trong phòng thí nghiệm

Để có cơ sở trong việc xác định loại cao chiết và nồng độ cao chiết phân đoạn từ cây giao thích hợp cho việc ứng dụng phòng trừ bệnh loét trên cây chanh trong nhà lưới và ngoài đồng, việc khảo sát khả năng ức chế vi khuẩn *X. axonopodis* trong điều kiện phòng thí nghiệm là rất cần thiết.

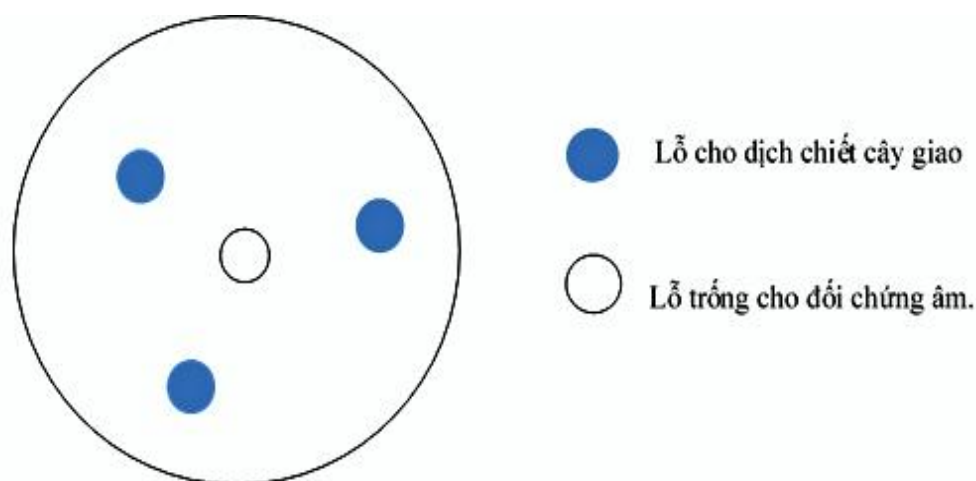
Thí nghiệm được tiến hành tại khoa Khoa học Sinh học và Bộ môn Bảo vệ thực vật trường Đại học Nông Lâm, Tp. HCM theo phương pháp khuếch tán giếng thạch của Toda và ctv (1989) và Upadhyay và ctv (2010) và xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) theo hướng dẫn của NCCLS (2003) và Ostrosky và ctv (2008).

❖ Phương pháp khuếch tán giếng thạch

Dòng vi khuẩn *X. axonopodis* có độc tính mạnh, biểu hiện bệnh rõ nhất và sớm nhất ở thí nghiệm chủng bệnh theo quy tắc Koch's được lựa chọn tăng sinh trong môi trường Nutrient broth (NB) ở 37°C, lắc với tốc độ 150 rpm trong 20 ÷ 24 giờ. Sau nuôi lắc tăng sinh, huyền phù vi khuẩn được ly tâm trong 15 phút ở 5000 rpm, 4°C để tách sinh khối ra khỏi môi trường, rửa sinh khối vi sinh vật bằng nước cất vô trùng, quá trình rửa được thực hiện 3 lần. Sinh khối được pha loãng bằng nước cất vô trùng đến độ đục tương đương 0,5 McFarland, dịch vi khuẩn có nồng độ tương đương 10⁶ cfu/mL.

Lấy 0,1 mL dung dịch vi khuẩn đã chuẩn bị cho vào đĩa Nutrient agar (NA, Merck) rồi trải đều bằng que cấy trang. Dùng dụng cụ thủy tinh vô trùng có đường kính lỗ 5 mm tạo 4 giếng trên thạch (Hình 2.1).

Các cao chiết phân đoạn được pha loãng bằng dung dịch DMSO 10% tạo thành dung dịch gốc 10 mg/mL. Từ đó, pha loãng các dịch cao chiết đến nồng độ cuối là 1,25; 2,5; 5,0 và 7,5 mg/mL bằng phương pháp pha loãng hai lần. Lấy 50 µL dịch các cao chiết đã chuẩn bị cho vào 3 giếng của đĩa thạch có chứa vi khuẩn chỉ thị, giữ đĩa trong 2 giờ ở 4°C để dung dịch trong giếng khuếch tán vào thạch, 50 µL dung dịch DMSO 10% được cho vào giếng ở giữa làm đối chứng âm (Hình 2.1). Dung dịch kháng sinh Streptomycin (0,01 mg/mL) được dùng làm đối chứng dương (Upadhyay và ctv, 2010). Các nghiệm thức thí nghiệm trình bày ở Bảng 2.5.



Hình 2.1. Cách bố trí thí nghiệm đục lỗ thạch trên đĩa petri

Khả năng ức chế vi khuẩn được đánh giá theo công thức:

$$\Delta d = d_1 - d_2$$

Trong đó: d_1 : Đường kính vòng vô khuẩn (mm)

d_2 : Đường kính giếng thạch (mm)

Ủ các đĩa ở 37°C, đo đường kính vòng vô khuẩn một lần ở thời điểm 48 giờ sau khi tiến hành thí nghiệm. Thí nghiệm đơn yếu tố được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên gồm 38 nghiệm thức, mỗi nồng độ lặp lại 3 lần tương ứng với 3 đĩa petri.

Bảng 2.5. Bảng bố trí nghiệm thức đánh giá khả năng ức chế vi khuẩn *X. axonopodis* của các cao chiết phân đoạn trong phòng thí nghiệm

Vùng thu nhận	Cao chiết phân đoạn	Nồng độ thí nghiệm (mg/mL)
	Cao He	1,25; 2,5; 5,0; 7,5
Bình Thuận	Cao EA	1,25; 2,5; 5,0; 7,5
	Cao Bu	1,25; 2,5; 5,0; 7,5
	Cao He	1,25; 2,5; 5,0; 7,5
Đắk Nông	Cao EA	1,25; 2,5; 5,0; 7,5
	Cao Bu	1,25; 2,5; 5,0; 7,5
	Cao He	1,25; 2,5; 5,0; 7,5
Tp. HCM	Cao EA	1,25; 2,5; 5,0; 7,5
	Cao Bu	1,25; 2,5; 5,0; 7,5
	Streptomycin	0,01
	DMSO	10%

Ghi chú: cao He: cao hexan; cao EA: cao ethyl acetate; cao Bu: cao butanol; DMSO: dimethyl sulfoxide.

❖ Phương pháp xác định nồng độ tối thiểu (MIC)

Để đánh giá nồng độ tối thiểu của các cao phân đoạn ức chế vi khuẩn *X. axonopodis*, các cao chiết phân đoạn được pha loãng trên đĩa 96 giếng và chỉ thị màu resazurin theo hướng dẫn của theo hướng dẫn của NCCLS (2003) và Ostrosky và ctv (2008).

Dịch vi khuẩn *X. axonopodis* được chuẩn bị tương tự ở thí nghiệm đánh giá ức chế bằng phương pháp khuếch tán giếng thạch. Dịch vi khuẩn được pha loãng đến nồng độ 10^6 cfu/mL để thực hiện thí nghiệm.

Hòa tan 0,1 g các cao chiết phân đoạn được pha loãng với 10 mL dung dịch DMSO 10% tạo thành dung dịch gốc 10 mg/mL. Từ đó, pha loãng thành một dãy nồng độ: 5,0; 2,5; 1,25; 0,625; 0,312; 0,156 và 0,078 mg/mL bằng phương pháp pha loãng hai lần. Mỗi giếng gồm 100 μ L dịch vi khuẩn, 50 μ L dung dịch các cao chiết ở các nồng độ khác nhau và môi trường Nutrient (NB) được thêm vào để có thể tích cuối cùng là 200 μ L. Sử dụng hai giếng là mẫu đối chứng: một chỉ có môi trường NB và dịch vi khuẩn không có dịch chiết thực vật làm đối chứng dương, một chỉ có môi trường NB không có dịch vi khuẩn làm đối chứng âm. Tất cả đem ủ ở 37°C trong 24 giờ. Sau 24 giờ, cho vào mỗi giếng 20 μ L thuốc thử resazurin 0,01%. Quan sát sự thay đổi màu, ghi nhận giá trị MIC. Các giếng có sự đổi màu của dung dịch resazurin từ màu xanh sang màu hồng cho thấy có sự tăng trưởng của vi khuẩn trong giếng. MIC là nồng độ nhỏ nhất của mẫu thử không làm đổi màu resazurin.

Thí nghiệm đơn yếu tố được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên gồm 65 nghiệm thức, mỗi nồng độ lặp lại 3 lần. Các nghiệm thức thí nghiệm trình bày ở Bảng 2.6.

Để có cơ sở khoa học khẳng định hiệu quả ức chế vi khuẩn *X. axonopodis* của các cao chiết phân đoạn từ cây giao, các cao chiết phân đoạn từ cây giao có hiệu quả ức chế vi khuẩn cao được định tính, định lượng các nhóm hợp chất và phân lập và xác định cấu trúc các hoạt chất hiện diện.

Bảng 2.6. Nghiệm thức các cao chiết phân đoạn ở các nồng độ khác nhau sử dụng trong thí nghiệm.

Vùng thu nhận	Cao chiết phân đoạn	Nồng độ thí nghiệm (mg/mL)
	Cao He	5,0; 2,5; 1,25; 0,625; 0,312; 0,156 và 0,078
Bình Thuận	Cao EA	5,0; 2,5; 1,25; 0,625; 0,312; 0,156 và 0,078
	Cao Bu	5,0; 2,5; 1,25; 0,625; 0,312; 0,156 và 0,078
	Cao He	5,0; 2,5; 1,25; 0,625; 0,312; 0,156 và 0,078
Đắk Nông	Cao EA	5,0; 2,5; 1,25; 0,625; 0,312; 0,156 và 0,078
	Cao Bu	5,0; 2,5; 1,25; 0,625; 0,312; 0,156 và 0,078
	Cao He	5,0; 2,5; 1,25; 0,625; 0,312; 0,156 và 0,078
Tp. HCM	Cao EA	5,0; 2,5; 1,25; 0,625; 0,312; 0,156 và 0,078
	Cao Bu	5,0; 2,5; 1,25; 0,625; 0,312; 0,156 và 0,078
	Đối chứng 1	Môi trường NB và dịch vi khuẩn (10^6 cfu/mL)
	Đối chứng 2	Môi trường NB

Ghi chú: cao He: cao hexan; cao EA: cao ethyl acetate; cao Bu: cao butanol

2.4.2.4. Định tính các nhóm hoạt chất chính trong các cao phân đoạn

Việc định tính các nhóm hoạt chất trong các cao phân đoạn từ cây giao được thực hiện theo hướng dẫn của Brain và Turner (1975); Evans (1966).

❖ *Định tính alkaloids*

Cân 2 g mẫu cao cho vào 20 mL dung dịch acid sulfuric 5% trong ethanol 50%. Thêm 2 giọt dung dịch ammoniac đậm đặc và thêm một ít dung môi chloroform vào rồi lắc nhẹ để trộn đều và hỗn hợp được đưa vào phễu chiết. Chờ một lúc để hỗn hợp

tách lớp rồi đem đi chiết thu được 2 lớp (lớp nước và lớp chứa hợp chất hữu cơ). Cho 1 mL thuốc thử Dragendorff vào lớp chứa hợp chất hữu cơ. Kết quả hình thành kết tủa màu nâu đỏ chứng tỏ có sự hiện diện của alkaloids.

❖ **Định tính tannin**

Cân 2 g mẫu cao hòa tan trong 10 ml dung dịch cồn 50% rồi chia làm 2 phần bằng nhau. Nhỏ 3 giọt dung dịch FeCl_3 vào phần thứ nhất, màu sắc của mẫu chuyển sang màu xanh lam hoặc màu xanh đen đậm chứng tỏ mẫu có tồn tại tannin. Phần thứ hai làm đối chứng.

❖ **Định tính saponin**

Cân 1 g mẫu cao rồi hòa tan trong 10 mL nước cất sau đó lắc mạnh trong 30 giây và để yên hỗn hợp trong vòng 30 phút. Nếu có sự hình thành của bọt khí không tan chứng tỏ có sự hiện diện của saponin trong mẫu cao.

❖ **Định tính flavonoid**

Cân 2 g mẫu cao hòa tan trong 10 mL nước cất rồi hút 3 ml hỗn hợp vào trong 2 ống nghiệm. Phương pháp này gồm thử nghiệm với dung dịch NaOH 10% và thử nghiệm với dung dịch FeCl_3 .

- Thử nghiệm NaOH 10%: Thêm 2 mL dung dịch NaOH 10% vào 3 ml hỗn hợp rồi lắc đều. Nếu thấy xuất hiện dung dịch màu vàng rồi chuyển sang không màu nếu cho acid hydrochloric vào chứng tỏ có sự hiện diện của flavonoids trong mẫu cao.

- Thử nghiệm FeCl_3 : Nhỏ 3 giọt dung dịch FeCl_3 vào 3 ml hỗn hợp rồi lắc đều. Sự chuyển màu của dung dịch sang màu xanh đen chứng tỏ có tồn tại flavonoids trong mẫu cao.

❖ **Định tính terpenoids**

Cân 1 g mẫu cao cho vào chén sứ, hòa tan với 0,5 ml ethyl acetate, thêm vào dung dịch 0,5 ml chloroform. Chuyển dung dịch vào 1 ống nghiệm nhỏ khô, thêm 1 ÷ 2 ml H_2SO_4 đậm đặc lên thành ống nghiệm để nghiêng cho acid chảy từ từ xuống đáy ống nghiệm. Nơi tiếp xúc giữa 2 lớp dung dịch có màu đỏ nâu hay đỏ đến tím, lớp dung dịch phía trên dần chuyển thành màu xanh lục hay tím. Kết luận trong các cao chiết có chứa terpenoids.

2.4.2.5. Định lượng phenolic tổng và flavonid tổng trong các cao chiết phân đoạn

❖ Định lượng phenolic tổng trong các cao chiết phân đoạn

Hàm lượng phenolic tổng của các cao phân đoạn được xác định bằng phương pháp Folin - Ciocalteu theo Waterm và Mole (1994). Thuốc thử Folin - Ciocalteu là một hỗn hợp của natri wolframát và natri molybđat khi có mặt của phenol sẽ xảy ra phản ứng oxi hóa khử, các nhóm -OH trong phenolic sẽ được chuyển thành nhóm quinol tạo thành phức hợp có màu. Để thực hiện việc định lượng phenolic tổng trong mẫu bằng phương pháp UV-Vis, trước hết cần xây dựng đường chuẩn phenolic. Đường chuẩn phenolic được xây dựng với chất chuẩn là acid gallic nồng độ lần lượt là 5, 10, 20, 30, 40 và 50 mg/L. Dung dịch acid gallic chuẩn được thêm 2,5 mL Folin - Ciocalteu (Folin phải được pha loãng 20 lần), lắc đều cho hỗn hợp phản ứng trong 4 phút, thêm vào hỗn hợp 2 mL dung dịch Na_2CO_3 10%, lắc đều, để yên trong 2 giờ ở 25°C. Độ hấp thụ quang của dung dịch sau phản ứng được đo ở bước sóng 758 nm. Phương trình đường chuẩn là $y = 0,0102x + 0,0075$, $R^2 = 0,9998$.

Để xác định hàm lượng phenolic tổng trong các cao phân đoạn, 1,5 mL mẫu được xử lý như quy trình xử lý chuẩn và đo độ hấp thụ quang ở cùng bước sóng.

Hàm lượng phenolic tổng tương ứng với mg gallic acid/mL trong mẫu được xác định từ phương trình đường chuẩn qua công thức:

$$C_1 \text{ (mg gallic acid/mL mẫu)} = (\text{Độ hấp thụ quang của mẫu} - 0,0075) / 0,0102$$

Hàm lượng phenolic tổng tương ứng với mg gallic acid/g cao chiết được xác định qua công thức:

$$C_2 \text{ (mg acid gallic/gam cao chiết)} = \frac{C_1 \times V}{m}$$

Trong đó: C_1 : Hàm lượng phenolic tổng được xác định theo đường chuẩn (mg/mL)

V : Thể tích mẫu cao chiết (mL)

m : Khối lượng cao chiết (mg)

❖ Định lượng flavonoid tổng trong các cao chiết phân đoạn

Hàm lượng flavonoid tổng của các cao phân đoạn được xác định thông qua phương pháp tạo màu với AlCl_3 trong môi trường kiềm - trắc quang (Zhishen và ctv, 1999). Khi dịch chiết có mặt của flavonoid sẽ tác dụng với AlCl_3 , Al^{3+} sẽ thay thế các H^+ ở các nhóm $-\text{OH}$ liền kề hoặc cách nhau 1 C tạo liên kết $\text{O}-\text{Al}-\text{O}$ tạo thành phức có màu. Để thực hiện việc định lượng flavonoid tổng trong mẫu bằng phương pháp UV-Vis, trước hết cần xây dựng đường chuẩn flavonoid. Đường chuẩn phenolic được xây dựng với chất chuẩn là quercetin nồng độ lần lượt là 5, 10, 50, 75 và 100 mg/L. Dung dịch quercetin chuẩn được thêm 4 mL nước cất 2 lần thu được hỗn hợp 1, sau đó thêm vào 0,3 mL dung dịch NaNO_2 5%. Sau 5 phút thêm tiếp 0,3 mL dung dịch AlCl_3 10%, sau 6 phút cho vào 2 mL dung dịch NaOH 1M và định mức đến thể tích 10 mL bằng nước cất. Độ hấp thu quang của dung dịch sau phản ứng được đo ở bước sóng 320 nm. Phương trình đường chuẩn là $y = 0,0043x + 0,0118$, $R^2 = 0,9999$.

Để xác định hàm lượng flavonoid tổng trong các cao phân đoạn, 0,5 mL mẫu được xử lý như quy trình xử lý chuẩn và đo độ hấp thu quang ở cùng bước sóng.

Hàm lượng flavonoid tổng tương ứng với mg quercetin/mL trong mẫu được xác định từ phương trình đường chuẩn qua công thức:

$$C_1 \text{ (mg quercetin/mL mẫu)} = (\text{Độ hấp thu quang của mẫu} - 0,0118) / 0,0043$$

Hàm lượng flavonoid tương ứng với mg quercetin/gam cao chiết được xác định qua công thức:

$$C_2 \text{ (mg quercetin/gam cao chiết)} = \frac{C_1 \times V}{m}$$

Trong đó: C_1 : Hàm lượng flavonoid tổng được xác định theo đường chuẩn (mg/mL)

V : Thể tích mẫu cao chiết (mL)

m : Khối lượng cao chiết (mg)

2.4.2.6. Xác định hợp chất trong cao phân đoạn có hoạt tính ức chế vi khuẩn *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*

Cao chiết phân đoạn từ cây giao có hoạt tính ức chế vi khuẩn *X. axonopodis* trong phòng thí nghiệm cao được tiến hành cô lập và xác định tên các hợp chất hiện diện

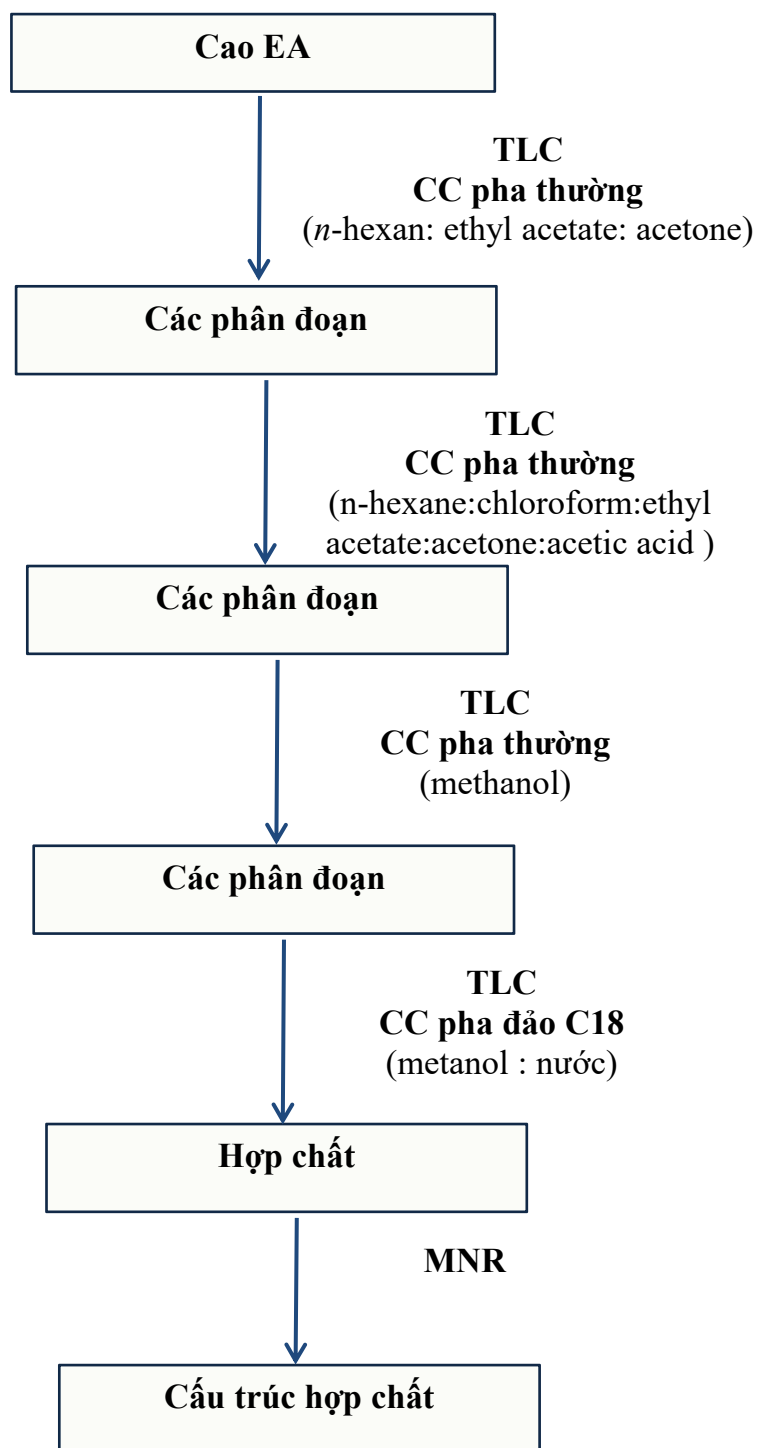
bằng các phương pháp sắc ký lớp mỏng (TLC), sắc ký cột (CC) và phương pháp cộng hưởng từ hạt nhân (NMR) theo hướng dẫn của Le và ctv (2019) có sự thay đổi (Hình 2.2).

Cao chiết có hoạt tính ức chế vi khuẩn *X. axonopodis* cao nhất trong phòng thí nghiệm được chạy sắc ký cột silica gel pha thường, giải ly với hệ dung môi thích hợp thu được các phân đoạn.

Tiến hành định tính sự có mặt các nhóm hợp chất trong các phân đoạn bằng phương pháp TLC sử dụng bản mỏng loại Silica gel 60F₂₅₄ (20×20), Merck. Một vệt nhỏ dung dịch chứa mẫu thử được chấm lên bản sắc ký. Bản sắc ký được phun dung dịch H₂SO₄ 10% và được sấy khô. Quan sát các vệt màu trên bản sắc ký dưới đèn UV₂₅₄.

Phân đoạn có hoạt tính ức chế vi khuẩn tiếp tục được phân tách bằng sắc ký cột gel pha thường, giải ly với hệ dung môi ban đầu thích hợp để thu được các phân đoạn tiếp theo. Các phân đoạn được định tính sự có mặt các nhóm hợp chất bằng phương pháp TLC tương tự như trên.

Phân đoạn có hoạt tính ức chế vi khuẩn tiếp tục được phân tách bằng sắc ký gel Sephadex LH-20 giải ly bằng dung môi thích hợp để thu được các phân đoạn tiếp theo và thực hiện định tính sự có mặt các nhóm hợp chất trong các phân đoạn bằng phương pháp TLC tương tự như trên.



Hình 2.2. Sơ đồ xác định hợp chất trong cao phân đoạn có hoạt tính ức chế vi khuẩn *X. axonopodis* pv. *citri*

Tương tự, phân đoạn có hoạt tính ức chế vi khuẩn tiếp tục được phân tách bằng sắc ký cột pha đảo C18 với hệ dung môi giải ly thích hợp thu được các hợp chất tinh sạch.

Phổ NMR của các hợp chất tinh sạch được đo trên máy quang phổ Bruker Avance

III (500 MHz cho ^1H và 125 MHz cho ^{13}C NMR). Sự thay đổi hóa học proton được tham chiếu đến tín hiệu dư dung môi của CD_3COCD_3 tại δH 2,05. Phổ ^{13}C NMR được quy chiếu đến đỉnh trung tâm của CD_3COCD_3 tại δC 29,4. HR – ESI – MS được ghi lại trên một Bruker microTOF Q-II.

2.4.2.7. Xác định hàm lượng các hợp chất có trong cao chiết phân đoạn có hoạt tính ức chế vi khuẩn *X. axonopodis* cao nhất

Các hoạt chất có trong cao chiết phân đoạn từ cây giao có hiệu quả ức chế vi khuẩn *X. axonopodis* cao nhất được xác định hàm lượng bằng kỹ thuật sắc ký lỏng hiệu năng cao (High Performance Liquid Chromatography - HPLC) theo phương pháp của Mira và ctv (2008) và Singh và ctv (2010). Hệ thống HPLC Agilent 1200, đầu dò DAD, bước sóng 275 nm ($\lambda = 280$ nm) đối với gallic acid; bước sóng 374 nm ($\lambda = 374$ nm) đối với scopoletin và piperic acid, nhiệt độ cột được đặt là 40°C . Các acid phenolic (Sigma-Aldrich, USA) được sử dụng để phát hiện và xác định đỉnh bao gồm gallic acid, scopoletin và piperic. Với tốc độ dòng rửa giải là 0,5 mL/phút, 20 μL chiết xuất được tiêm vào cột phân tích HPLC (XDB-C18 150-4,6 mm, 5 μm (Agilent)). Chương trình chạy được trình bày trong Bảng 2.7.

Bảng 2.7. Chương trình gradient pha động

Thời gian	% HCOOH (0,05%)	MeOH
0-6	80	20
8	65	35
26	65	35
28	30	70
34	30	70
35	80	20

2.4.3. Đánh giá hiệu quả đối với bệnh loét do vi khuẩn *X. axonopodis* gây ra của cao chiết phân đoạn từ cây giao trong nhà lưới và ngoài đồng

Từ kết quả đánh giá về khả năng ức chế vi khuẩn *X. axonopodis* gây bệnh loét trên cây chanh của cao chiết phân đoạn từ cây giao trong phòng thí nghiệm, cao chiết phân đoạn có hiệu ức chế cao nhất được lựa chọn để đánh giá hiệu quả giảm bệnh loét trên cây chanh trong nhà lưới và ngoài đồng.

2.4.3.1. Xác định liều lượng ức chế vi khuẩn *Xanthomonas axonopodis* trong điều kiện nhà lưới của cao chiết phân đoạn từ cây giao ở các nồng độ khác nhau

Thí nghiệm được thực hiện tại khu nhà lưới khoa Nông học trường ĐH Nông Lâm, Tp. Hồ Chí Minh.

Cây chanh không hạt có 30 ÷ 40 lá thật, không bị bệnh, sinh trưởng đồng đều được chăm sóc, cách ly sâu bệnh trong vườn ươm 2 tháng trước khi tiến hành thí nghiệm. Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên, đơn yếu tố gồm 7 nghiệm thức với 3 lần lặp lại. Mỗi nghiệm thức được thực hiện với các mức nồng độ khác nhau, 3 chậu/nồng độ, mỗi chậu trồng 1 cây chanh. Thuốc trừ bệnh Copper oxychloride, Streptomycin sulfate được sử dụng làm đối chứng.

Gây vết thương trên lá: Dùng kim đã khử trùng để tạo vết thương trên lá, châm nhẹ nhàng để tránh gây thủng lá.

Dịch vi khuẩn *X. axonopodis* được chuẩn bị bằng cách tăng sinh trong môi trường NB trên máy lắc (150 vòng/phút) 18 giờ. Sau đó, ly tâm trong 15 phút ở 5000 rpm, 4°C để tách sinh khối ra khỏi môi trường, rửa sinh khối vi khuẩn bằng nước cất vô trùng, sau đó hòa với nước cất tạo huyền phù vi khuẩn có mật độ 10^6 cfu/mL. Tiến hành chủng vi khuẩn *X. axonopodis* lên lá bằng cách phun 50 mL huyền phù vi khuẩn sao cho ướt đều hai mặt lá, sau đó dùng túi nilong đen phủ kín cây trong 24 giờ. Khi bệnh xuất hiện (7 ngày sau khi phun vi khuẩn), tiến hành phun cao chiết từ cây giao và thuốc trừ bệnh, phun 3 lần, mỗi lần cách nhau 7 ngày. Các nghiệm thức thí nghiệm được trình bày ở Bảng 2.8.

Bảng 2.8. Các nghiệm thức thí nghiệm trong nhà lưới

STT	Nghiệm thức	Nồng độ thí nghiệm
1	Cao chiết phân đoạn	0,25%
2	Cao chiết phân đoạn	0,5%
3	Cao chiết phân đoạn	0,75%
4	Cao chiết phân đoạn	1,0%
5	Copper oxychloride	0,25%
6	Streptomycin sulfate	0,1%
7	Đối chứng	Nước lã

Thời điểm theo dõi: Trước khi xử lý thuốc, 7 ngày sau phun lần 1, lần 2 và 7, 14, 21 ngày sau phun lần 3.

Các chỉ tiêu theo dõi:

- Thời gian ủ bệnh (ngày)

- Tỷ lệ lá bị nhiễm bệnh (%) = (Số lá bị bệnh/Tổng số lá điều tra) x 100

Trong đó: Số lá bị bệnh: đếm 20 lá ngẫu nhiên/cây tính từ trên ngọn xuống.
Tổng số lá điều tra: 20 lá/cây.

+ Chỉ số bệnh (%) = $(5n_5 + 4n_4 + 3n_3 + 2n_2 + n_1 / 5N) \times 100$

Trong đó: n1: số lá bị bệnh ở cấp 1 với $\leq 5\%$ diện tích lá bị bệnh
n2: số lá bị bệnh ở cấp 2 với $\leq 5 \div 10\%$ diện tích lá bị bệnh
n3: số lá bị bệnh ở cấp 3 với $> 10 \div 15\%$ diện tích lá bị bệnh
n4: số lá bị bệnh ở cấp 4 với $> 15 \div 20\%$ diện tích lá bị bệnh
n5: số lá bị bệnh ở cấp 5 với $> 20\%$ diện tích lá bị bệnh
N: tổng số lá điều tra (20 lá)

(QCVN 01-174:2014 BNNPTNT)

Kích thước vết bệnh (mm): được đánh giá bằng cách cố định 10 lá ngẫu nhiên/cây, mỗi lá chọn 5 vết bệnh để theo dõi qua việc đo đường kính vết bệnh (mỗi vết bệnh đo 2 đường chéo).

Đánh giá hiệu lực trừ bệnh theo CSB (%) ở các thời điểm theo dõi và được tính theo công thức Henderson-Tilton (1955):

$$H(\%) = \left(1 - \frac{Ta \times Cb}{Tb \times Ca}\right) \times 100$$

Trong đó: Ta: CSB bệnh ở công thức sau khi xử lý thuốc

Tb: CSB bệnh ở công thức trước khi xử lý thuốc

Ca: CSB bệnh ở ô đối chứng sau khi xử lý thuốc

Cb: CSB bệnh ở ô đối chứng trước khi xử lý thuốc.

(TCVN12561-2018: Bộ KH và CN)

2.4.3.2. Đánh giá hiệu quả phòng trừ bệnh loét trên cây chanh của cao chiết phân đoạn từ cây giao ngoài đồng

Phương pháp khảo nghiệm được thực hiện theo QCVN 01-174:2014 BNNPTNT. Thí nghiệm được tiến hành tại xã Bình Hòa Nam, huyện Đức Huệ, tỉnh Long An, năm 2019 trên cây chanh không hạt 2 ÷ 3 năm tuổi, bố trí theo phương pháp khối ngẫu nhiên đầy đủ, gồm 7 nghiệm thức 3 lần lặp lại, mỗi ô cơ sở gồm 5 cây chanh. Cao chiết từ cây giao và thuốc trừ bệnh được phun 1 lần. Các nghiệm thức được trình bày ở Bảng 2.9.

Bảng 2.9. Các nghiệm thức thí nghiệm ngoài đồng

STT	Nghiệm thức	Nồng độ thí nghiệm
1	Cao chiết phân đoạn	0,5%
2	Cao chiết phân đoạn	0,75%
3	Cao chiết phân đoạn	1,0%
4	Cao chiết phân đoạn	1,25%
5	Copper oxychloride	0,25%
6	Streptomycin sulfate	0,1%
7	Đối chứng	Nước lã

Phương pháp và chỉ tiêu theo dõi: cố định 40 chồi non theo 4 hướng đối với lần xử lý đầu tiên và 40 chùm trái theo 4 hướng đối với lần xử lý thứ hai trên mỗi cây. Mỗi ô điều tra ngẫu nhiên 3 cây, quan sát và ghi nhận mức độ và số lượng bị bệnh của

toàn bộ số lá và số trái trước khi phun cao chiết 1 ngày và sau phun 7, 14 ngày đối với lá và 7, 14 và 21 ngày đối với trái. Tính TLB (%) và CSB (%) giống thí nghiệm trong nhà lưới (2.4.3.1). Phân cấp diện tích lá và quả bị bệnh như sau:

Trong đó:

n1: số lá (quả) bị bệnh ở cấp 1 với $\leq 5\%$ diện tích lá (quả) bị bệnh

n2: số lá (quả) bị bệnh ở cấp 2 với $\leq 5 \div 10 \%$ diện tích lá (quả) bị bệnh

n3: số lá (quả) bị bệnh ở cấp 3 với $> 10 \div 15\%$ diện tích lá (quả) bị bệnh

n4: số lá (quả) bị bệnh ở cấp 4 với $> 15 \div 20 \%$ diện tích lá (quả) bị bệnh

n5: số lá (quả) bị bệnh ở cấp 5 với $> 20 \%$ diện tích lá (quả) bị bệnh

N: tổng số lá (quả) điều tra

Hiệu lực phòng trừ bệnh loét ngoài đồng được tính theo CSB (%) ở các lần theo dõi và tính theo công thức Henderson-Tilton (1955) (2.4.3.1) (TCVN12561-2018: Bộ KH và CN)

$$H(\%) = \left(1 - \frac{Ta \times Cb}{Tb \times Ca} \right) \times 100$$

Trong đó: Ta: CSB bệnh ở công thức sau khi xử lý thuốc.

Tb: CSB bệnh ở công thức trước khi xử lý thuốc.

Ca: CSB bệnh ở ô đối chứng sau khi xử lý thuốc.

Cb: CSB bệnh ở ô đối chứng trước khi xử lý thuốc.

2.4.4. Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu tỷ lệ vết bệnh được tổng hợp bằng phần mềm Microsoft Excel.

Tất cả số liệu đường kính vòng ức chế vi khuẩn *Xanthomonas* sp. trong phòng thí nghiệm của các cao chiết từ cây giao, hàm lượng phenolic tổng, hàm lượng flavonoid tổng, hiệu quả xử lý bệnh loét của cao chiết từ cây giao trong nhà lưới, kích thước trung bình vết bệnh trong nhà lưới, tỷ lệ bệnh loét, chỉ số bệnh loét và hiệu lực phòng trừ bệnh loét trong thử nghiệm ngoài đồng được phân tích ANOVA và trắc nghiệm phân hạng kiểu DUNCAN bằng phần mềm SPSS 20.0.

CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Xác định loài vi khuẩn *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* gây bệnh loét trên cây chanh theo hình thái, đặc điểm sinh hóa, trình tự vùng 16S rDNA, *hrpW* và *pthA*

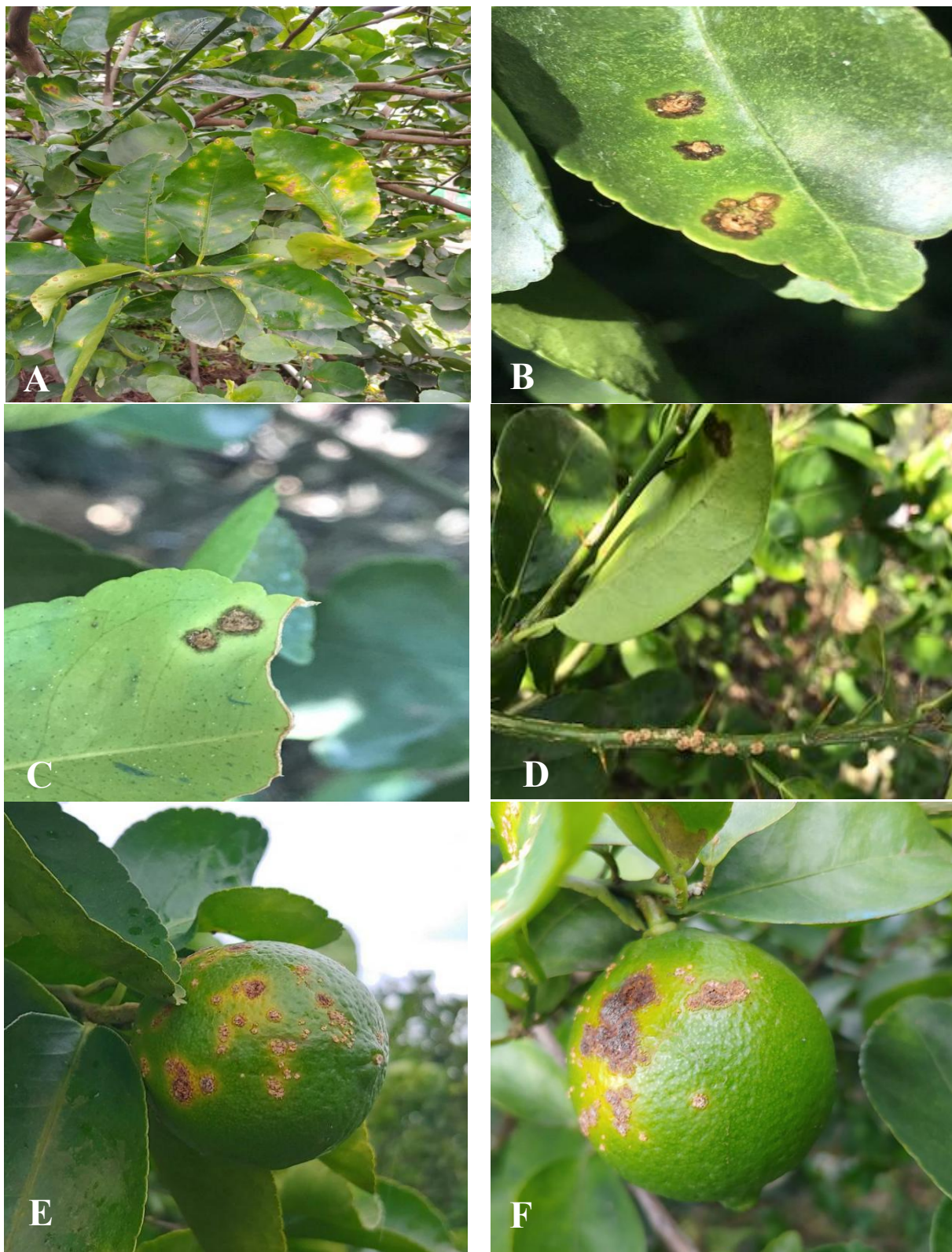
3.1.1. Xác định loài vi khuẩn *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* gây bệnh theo hình thái và đặc điểm sinh hóa

Bệnh loét là một trong những bệnh hại nghiêm trọng tại những vùng trồng chanh ở Long An, bệnh xuất hiện gây hại nghiêm trọng trên cành, lá và quả non. Sau khi hoa rụng 35 ngày, quả non có kích thước khoảng 9 mm dễ bị nhiễm bệnh; đường kính quả từ $26 \div 32$ mm (sau hoa rụng $60 \div 80$ ngày) tỷ lệ phát bệnh cao nhất, làm ảnh hưởng đến năng suất trái và không đạt yêu cầu xuất khẩu.

Triệu chứng bệnh điển hình: trên lá ban đầu gồm những chấm tròn có đường kính trên dưới 1 mm, sưng ướt dạng giọt dầu, thường thấy ở mặt dưới của lá. Khi vết bệnh già rần lại, nổi gờ giống như ghẻ, loét, màu nâu, xung quanh có quầng vàng rõ. Trên quả, vết bệnh là những đốm tròn xù xì, nâu đậm, mép ngoài có gờ nổi lên, ở giữa vết bệnh mô chết rạn nứt, xung quanh có quầng vàng rõ. Vết bệnh trên cành và thân cây non cũng giống ở lá nhưng sùi lên, màu nâu, vết loét ở thân có thể kéo dài tới 15 cm và ở cành tới $5 \div 7$ cm (Sharma và Sharma, 2009). Từ các mẫu lá, cành và quả chanh không hạt và chanh giấy có triệu chứng bệnh loét (Hình 3.1) đã được thu thập từ 3 huyện Bến Lức, Thạnh Hóa và Đức Huệ, tỉnh Long An đem về phòng thí nghiệm để phân lập tác nhân. Kết quả 75 mẫu phân lập (MPL) có các đặc điểm hình thái của vi khuẩn *Xanthomonas* sp. được chọn để tiếp tục xác định loài.

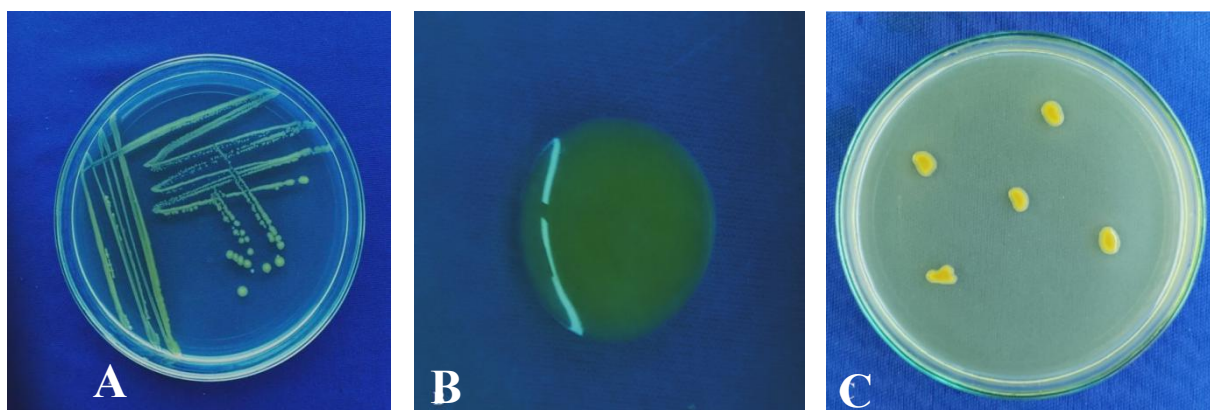
Việc định danh loài vi khuẩn nói chung bằng cách quan sát các đặc điểm hình thái và sinh hóa không thể thiếu trong quá trình định danh. Theo Schaad và ctv (2001), EPPO (2005) và ISPM (2014), để xác định tên loài của *Xanthomonas* sp. gây bệnh trên cây có múi bằng cách quan sát các đặc điểm, bao gồm: nhuộm Gram, đặc điểm hình thái màu sắc khuẩn lạc trên môi trường NA và các thử nghiệm sinh hóa như catalase, oxidase, thủy phân casein, tinh bột, tween 80, gelatin, urea, khả năng phát triển trong điều kiện kỵ khí ở 35°C, phát triển trên môi trường YDC ở 28°C và 33°C, khả năng chịu muối $1 \div 3\%$, khả năng sử dụng các loại đường glucose, arabinose, mannose. Kết quả định danh loài vi khuẩn dựa vào các đặc điểm hình thái và sinh hóa được thể hiện

trong Bảng 3.1.



Hình 3.1. Triệu chứng bệnh loét trên lá, quả và cành chanh do vi khuẩn *X. axonopodis* pv. *citri* gây ra.

(A, B, C: vết bệnh trên lá; D: vết bệnh trên cành; E, F: vết bệnh trên quả)



Hình 3.2. Hình dạng khuẩn lạc vi khuẩn *X. axonopodis* pv. *citri* phân lập trên môi trường NA và YDC

(A: Khuẩn lạc sau 48 giờ; B: Khuẩn lạc đơn sau 72 giờ; C: Khuẩn lạc trên YDC ở 33°C)

Kết quả ở Bảng 3.1 cho thấy, có một loài *Xanthomonas axonopodis* (*X. axonopodis* pv. *citri*) gây bệnh loét trên lá, quả và cành cây chanh ở Long An. Đặc điểm của 75 MPL *X. axonopodis* pv. *citri* gây bệnh loét trên cây chanh ở Long An được mô tả chi tiết về hình thái và sinh hóa trong nghiên cứu này: Khuẩn lạc tròn, nhỏ, màu vàng nhạt, nhô, bóng nhầy, bìa nguyên trên môi trường Nutrient agar (NA) sau 72 giờ nuôi cấy (Hình 3.2 A, B). Trên môi trường YDC ở 28°C, khuẩn lạc có màu vàng sẫm sau 24 giờ nuôi cấy. Khuẩn lạc tiếp tục phát triển và gia tăng kích thước, màu vàng đậm, bóng nhầy khi nâng nhiệt độ lên 33°C trên môi trường YDC (Hình 3.2 C). Theo Schaad và ctv (2001), vi khuẩn thuộc chi *Xanthomonas* và *Xylophilus* đều có chung đặc điểm có màu vàng trên môi trường YDC ở 28°C. Tuy nhiên, các vi khuẩn thuộc chi *Xanthomonas* có đặc điểm sau khi nuôi ủ ở 28°C trong 48 giờ và chuyển lên nhiệt độ 33°C trên môi trường YDC, các khuẩn lạc vẫn tiếp tục phát triển và gia tăng kích thước trong khi đó các vi khuẩn thuộc chi *Xylophilus* thì không có đặc điểm này. Tất cả các MPL đều có khả năng chịu được môi trường chứa 1, 2 và 3% muối, dương tính với thử nghiệm catalase, thủy phân tinh bột, casein, tween 80, gelatin, âm tính với thử nghiệm oxidase, urea. Các đặc điểm sinh hóa của 75 MPL trong nghiên cứu này tương tự với kết quả công bố của các nghiên cứu trước đây (Bảng 3.2).

Bảng 3.1. Kết quả đặc điểm sinh hóa của vi khuẩn *X. axonopodis* pv. *citri*

STT	Đặc điểm sinh hóa	Kết quả
1	Gram	-
2	Catalase	+
3	Oxidase	-
4	Phát triển trong điều kiện hiếu khí	+
5	Thủy phân casein	+
6	Thủy phân tinh bột	+
7	Thủy phân Tween 80	+
8	Thủy phân gelatin	+
9	Thủy phân urea	-
10	Phát triển ở 35°C	+
11	Phát triển trên môi trường YDC ở 28°C, 33°C	+
12	Khả năng chịu muối 1, 2, 3%	+
13	Khả năng sử dụng glucose, arabimose và mannose	+

Như vậy, dựa vào kết quả về hình thái và đặc điểm sinh hóa 75 MPL *Xanthomonas* ở Long An là vi khuẩn *X. axonopodis* pv. *citri*, dạng loét A. Kết quả nghiên cứu này cũng phù hợp với mô tả của Verniere và ctv (1991) về vi khuẩn *X. axonopodis* (dạng A); vi khuẩn *X. axonopodis* pv. *citri* có khả năng sử dụng maltose, tinh bột và glycogen, thủy giải gelatin, casein, phát triển được trong môi trường có 3% NaCl. Bên cạnh đó, theo ghi nhận của Gottwald và ctv (2001), bệnh loét trên cây có múi gây ra bởi chi *Xanthomonas*, có hai nhóm di truyền. Trong đó, nhóm ở khu vực Châu Á gây ra bệnh loét dạng A.

Bảng 3.2. Đặc điểm sinh hóa của vi khuẩn *X. axonopodis* phân lập từ cây chanh ở Long An với *X. axonopodis* trên thế giới

Đặc điểm sinh hóa	Sujata và ctv (2010)	Islam và ctv (2014)	Bharad waj và ctv (2014)	Al-Saleh và ctv (2014)	Shehzadi và Naz (2019)	Kết quả Nghiên cứu
Gram	-	NT	-	-	-	-
Catalase	+	NT	+	NT	+	+
Oxidase	NT	NT	NT	NT	-	-
Phát triển trong điều kiện hiếu khí	NT	NT	NT	NT	NT	+
Thủy phân casein	-	+	+	+	+	+
Thủy phân tinh bột	NT	+	+	+	NT	+
Thủy phân Tween 80	NT	NT	+	+	NT	+
Thủy phân gelatin	+	+	+	+	NT	+
Thủy phân urea	NT	NT	NT	NT	-	-
Phát triển ở 35°C	NT	NT	NT	+	NT	+
Phát triển trên môi trường YDC ở 28°C, 33°C	NT	NT	NT	NT	NT	+
Khả năng chịu muối 1, 2, 3%	NT	NT	+	+	NT	+
Khả năng sử dụng glucose	NT	NT	NT	NT	NT	+
Khả năng sử dụng arabinose	NT	NT	NT	+	NT	+
Khả năng sử dụng mannose	NT	NT	NT	NT	NT	+

Ghi chú: (-) âm tính (Không có); (+) dương tính (có); NT: không đánh giá

3.1.2. Kết quả khảo sát khả năng gây bệnh của các MPL *X. axonopodis* pv. *citri* theo quy tắc Koch's

Sự phát sinh dịch hại cây trồng thường là kết quả của một quá trình xảy ra khi một tác nhân gây bệnh xâm nhập thành công vào mô ký chủ. Chứng bệnh là quá trình lây nhiễm nhân tạo vi khuẩn vào mô cành, lá và quả với các điều kiện về môi trường hoàn toàn phù hợp cho vi khuẩn xâm nhập, gây bệnh.

Trong thí nghiệm này, 9 MPL vi khuẩn *X. axonopodis* pv. *citri* đã được xác định về hình thái, sinh hóa được chọn để chủng trở lại trên cây chanh và đánh giá khả năng gây bệnh của vi khuẩn sau phân lập. Kết quả được trình bày ở Bảng 3.3 và Bảng 3.4.

Bảng 3.3. Mức độ nhiễm bệnh trên lá, quả và cành chanh ở các ngày sau chủng vi khuẩn *X. axonopodis* pv. *citri*

MPL	Tỷ lệ vết bệnh ở các ngày sau chủng (%)						
	5 NSC	7 NSC	9 NSC	11 NSC	13 NSC	15 NSC	17 NSC
BLKL1	0	50	100	100	100	100	100
BLKC3	0	0	50	100	100	100	100
BLKQ1	25	50	100	100	100	100	100
DHHL2	0	0	25	50	100	100	100
DHHQ2	0	50	50	100	100	100	100
DHKQ4	25	50	50	100	100	100	100
THKL1	0	25	50	75	75	100	100
THKC4	0	0	50	100	100	100	100
THKQ1	25	50	100	100	100	100	100

NSC: Ngày sau chủng

Kết quả Bảng 3.3 cho thấy, ở thời điểm 15 NSC, tất cả 9 MPL có tỷ lệ biểu hiện bệnh là 100%. Trong đó, các MPL BLKL1, BLKQ1 và THKQ1 có tỷ lệ biểu hiện bệnh 100% tại thời điểm 9 NSC. Tất cả 3 MPL từ quả ở cả 3 huyện đều có biểu hiện bệnh sớm nhất tại thời điểm 5 NSC. Vết bệnh xuất hiện trên quả sớm hơn và rõ nét hơn so với trên lá và cành. Kết quả này cho thấy, các MPL *X. axonopodis* pv. *citri* trên

lá, quả và cành cây chanh ở Long An có thời gian xuất hiện bệnh sớm hơn so với kết quả nghiên cứu của Abhang và ctv (2015). Theo nhóm tác giả, dòng *X. axonopodis* pv. *citri* 01 có độc lực mạnh nhất trong số các dòng phân lập được, tạo vùng sưng uớt và phát triển các triệu chứng điển hình của bệnh ở thời điểm 10 ÷ 15 NSC.

Bảng 3.4. Đường kính trung bình vết bệnh (mm) trên lá, quả và cành chanh ở các ngày sau chủng vi khuẩn *X. axonopodis* pv. *citri*

MPL	Đường kính trung bình vết bệnh (mm ± SD)						
	5 NSC	7 NSC	9 NSC	11 NSC	13 NSC	15 NSC	17 NSC
BLKL1	-	2,68±0,27	3,20±0,39	4,10±0,14	4,88±0,17	7,94±0,26	8,39±0,31
BLKC3	-	-	0,97±0,27	1,24±0,18	1,26±0,26	1,46±0,35	1,50±0,27
BLKQ1	3,43±0,27	6,06±0,22	6,46±0,34	7,18±0,21	8,04±0,27	10,18±0,31	11,36±0,34
DHHL2	-	-	2,66±0,20	3,55±0,25	4,33±0,20	5,47±0,22	7,02±0,48
DHHQ2	-	3,50±0,20	4,22±0,40	6,23±0,21	7,97±0,32	8,76±0,28	10,89±0,18
DHKQ4	3,43±0,27	6,05±0,21	6,48±0,37	7,16±0,18	8,04±0,27	10,17±0,30	11,12±0,33
THKL1	-	2,55±0,22	3,02±0,21	4,33±0,21	4,51±0,30	6,79±0,27	7,05±0,30
THKC4	-	-	0,97±0,42	1,11±0,25	1,35±0,36	1,48±0,35	1,53±0,27
THKQ1	3,35±0,27	6,04±0,31	6,35±0,61	7,17±0,21	8,02±0,35	10,02±0,17	10,86±0,28

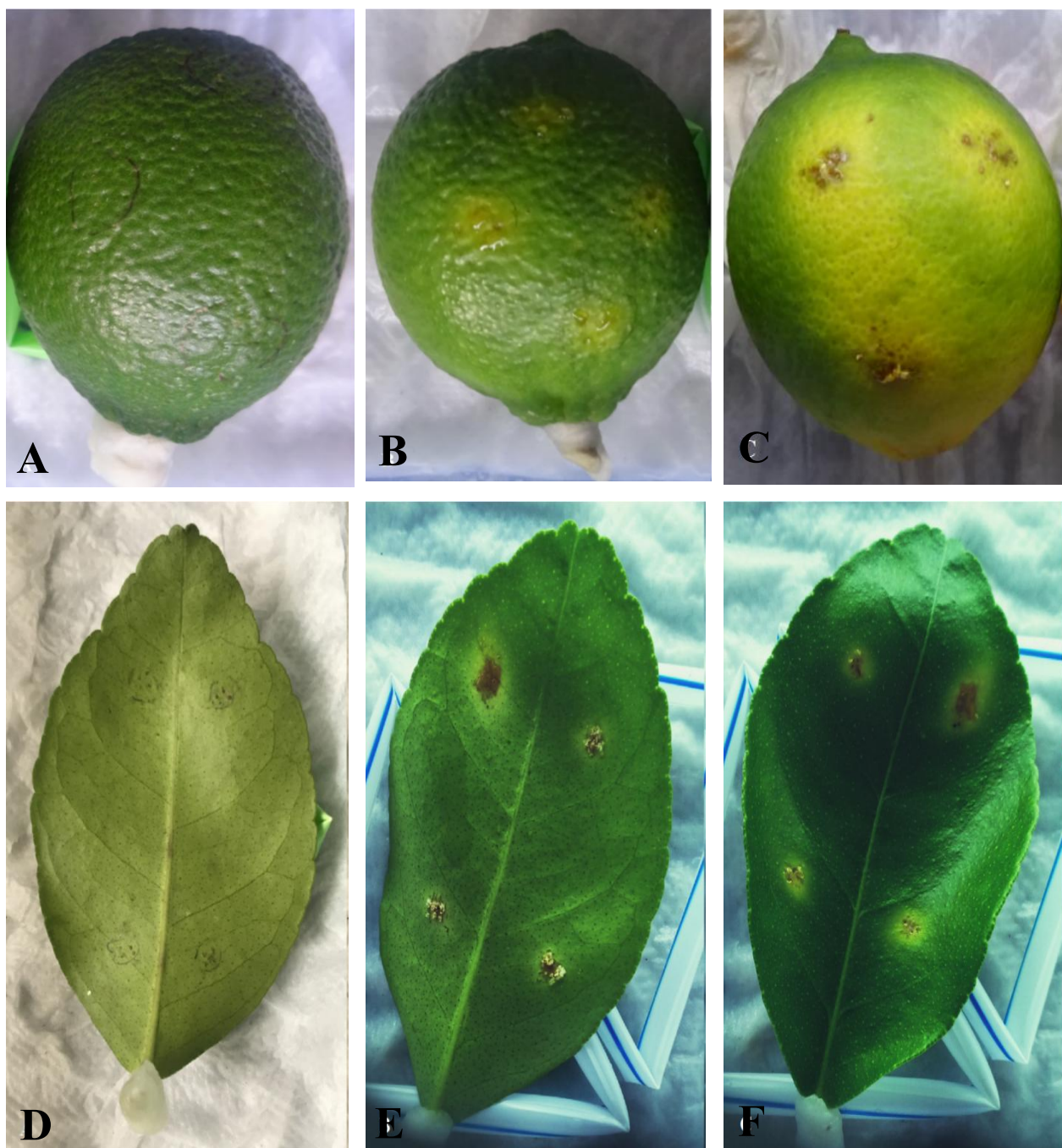
NSC: Ngày sau chủng

Kết quả ở Bảng 3.4 cho thấy, kích thước vết bệnh trung bình ở các MPL trên quả ở cả ba huyện lớn hơn so với trên lá và cành. Tại thời điểm 17 NSC, kích thước vết bệnh trung bình trên quả dao động trong khoảng từ 10,86 ± 0,28 mm đến 11,36 ± 0,34 mm; kích thước vết bệnh trung bình trên lá dao động trong khoảng từ 7,02 ± 0,48 mm đến 8,39 ± 0,31 mm và kích thước vết bệnh trung bình trên cành dao động từ 1,50 ± 0,27 mm đến 1,54 ± 0,27 mm. Trong đó, MPL BLKQ1 có kích thước vết bệnh lớn nhất đạt 11,36 ± 0,34 mm ở thời điểm 17 NSC. Kết quả nghiên cứu cho thấy, kích thước vết bệnh trên lá lớn hơn so với kết quả trong báo cáo của Arshiya và ctv (2014). Theo nhóm tác giả, kích thước vết bệnh tại thời điểm 6 NSC đạt 1,8 ÷ 2,5 mm. Trong

khi đó, kích thước vết bệnh trên lá tại thời điểm 7 NSC trong nghiên cứu đạt $2,55 \div 2,68$ mm.

Qua kết quả ở Bảng 3.3. và Bảng 3.4 cho thấy, các MPL *X. axonopodis* pv. *citri* có tỷ lệ xuất hiện vết bệnh, thời gian biểu hiện bệnh và kích thước vết bệnh khác nhau. Điều này chứng tỏ mức độ độc tính của các MPL là khác nhau. Trong đó, các MPL BLKQ1, THKQ1 và DHKQ4 có thời gian xuất hiện bệnh sớm hơn, tỷ lệ xuất hiện bệnh cao hơn, kích thước trung bình vết bệnh lớn hơn so với các MPL còn lại. Ngoài ra, qua kết quả nghiên cứu này cũng cho thấy, ở cành chanh có khả năng nhiễm bệnh nhẹ hơn, thời gian xuất hiện bệnh chậm hơn và vết bệnh nhỏ hơn so với lá và quả. Có thể do vỏ quả có độ xốp và độ ẩm cao, lá có vách tế bào mỏng, độ ẩm cao nên dễ dàng bị vi khuẩn tấn công phá hủy vách tế bào đồng thời có điều kiện sinh trưởng tốt nên bệnh thể hiện sớm hơn so với cành.

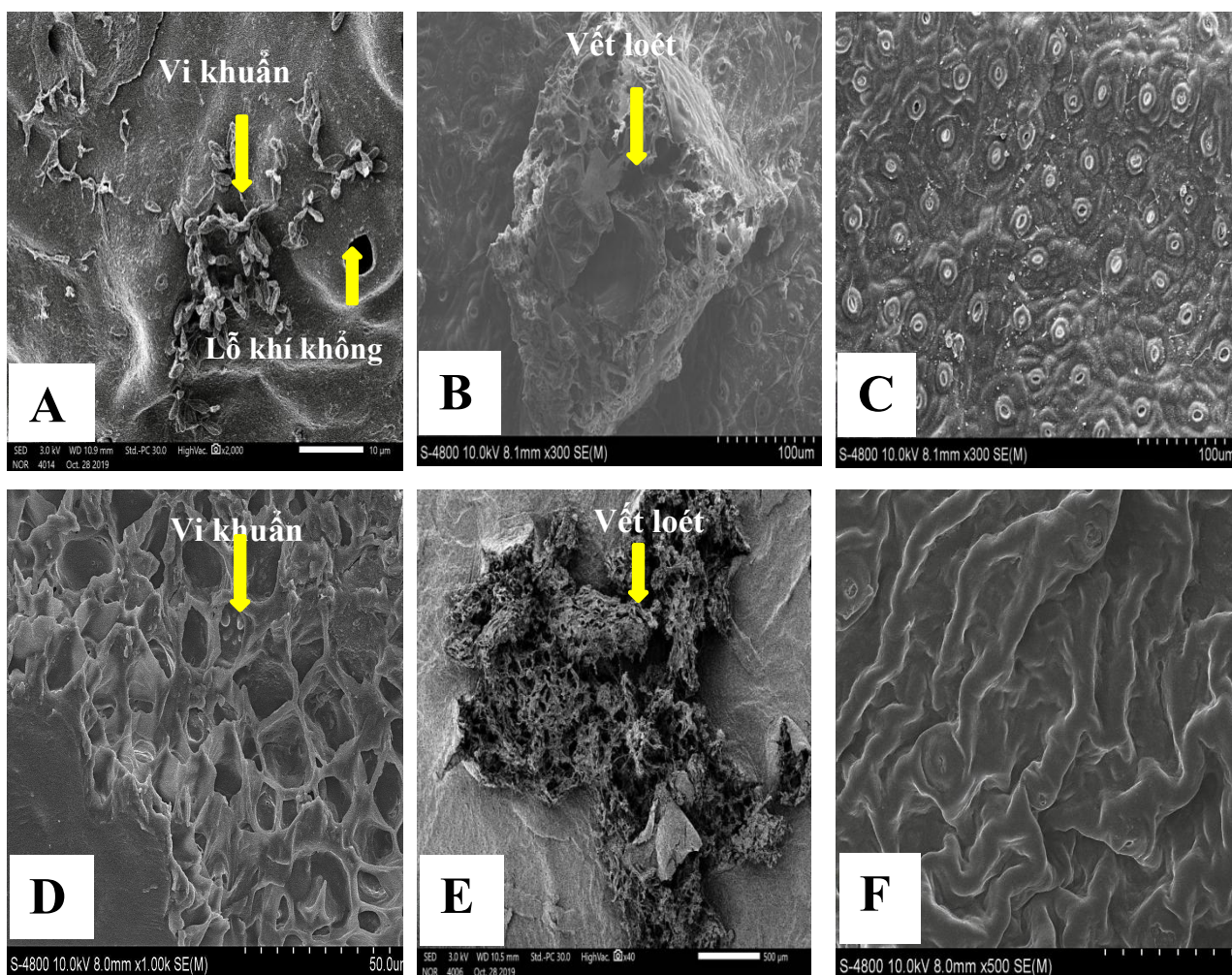
Sau khi chủng bệnh, biểu hiện vết bệnh trên quả, lá ở các thời điểm theo dõi được ghi nhận ở Hình 3.3. Qua Hình 3.3 cho thấy, trên quả, vết bệnh xuất hiện sớm nhất ở thời điểm 5 NSC. Ban đầu, vết bệnh có màu xanh giọt dầu, sưng ướm, quầng vàng rõ xung quanh (Hình 3.3 B, C). Trong khi quả đối chứng không có biểu hiện (Hình 3.3 A). Sau 15 ngày chủng bệnh, vết bệnh gia tăng kích thước và chuyển sang màu nâu, ở giữa mô bệnh nứt nẻ, nhô lên khỏi bề mặt vỏ quả, kích thước quầng vàng bên ngoài cũng gia tăng (Hình 3.3 D). Trên lá, vết bệnh xuất hiện muộn hơn ở 7 đến 9 NSC. Vết bệnh ban đầu cũng có màu xanh giọt dầu, sưng ướm, nhưng chưa xuất hiện quầng vàng rõ. Tại thời điểm 15 NSC, vết bệnh hình thành mô sẹo kết tinh màu trắng nổi trên bề mặt lá, bên dưới có màu nâu sậm, quầng vàng xuất hiện rõ xung quanh vết bệnh (Hình 3.3 E, F). Kết quả này tương tự mô tả của Katkar và ctv (2016). Vết bệnh già, màu nâu sậm hơn, ở giữa mô bệnh nứt nẻ. Trên cành, vết bệnh xuất hiện chậm nhất (11 NSC). Vết bệnh là những đốm nâu, nhỏ, xù xì nổi trên vỏ cành. Tại thời điểm 17 NSC, kích thước vết bệnh gia tăng, nổi trên bề mặt vỏ cành, rần, xốp và chuyển sang nâu đậm. Kết quả này tương tự mô tả của Gottwald và ctv (2002).



Hình 3.3. Triệu chứng bệnh loét do *X. axonopodis* pv. *citri* (BLKQ1) gây ra trên quả ở 9 NSC và 15 NSC và trên lá ở 15 NSC (A: Quả đối chứng; B: Quả 9 NSC; C: Quả 15 NSC; D: Lá đối chứng; E: Mặt trên của lá; F: Mặt dưới của lá)

Qua kết quả chụp SEM ở Hình 3.4 cho thấy, 7 NSC vết bệnh trên lá có sự xâm nhập của vi khuẩn qua vết thương và các lỗ khí khổng xung quanh. Hình dạng và kích thước vết bệnh chưa có sự thay đổi (Hình 3.4 B). Ở 15 NSC, kích thước vết bệnh tăng lên, nhô lên khỏi bề mặt lá, nứt nẻ, rỗng xốp bên trong tạo nơi trú ẩn cho vi khuẩn (Hình 3.4 A). Ở quả, 15 NSC, vết bệnh tương tự ở lá nhưng rỗng, xốp hơn. Các tế bào vi khuẩn đã xâm nhập sâu bên trong và được bảo vệ bởi các sợi polysaccharide do

chính vi khuẩn sản xuất ra (Hình 3.4 D, E).



Hình 3.4. Kết quả chụp SEM sự xâm nhập và gây bệnh trên lá và quả chanh gây ra bởi vi khuẩn *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*

(Trên lá: A-Vi khuẩn tập trung quanh lỗ khí khổng (7NSC); B: Tạo thành vết loét ở 15 NSC; C: Đối chứng; Trên quả: D- Vi khuẩn xâm nhập vào bên trong qua lỗ khí khổng; E: Tạo thành vết loét ở 15 NSC; F: Đối chứng).

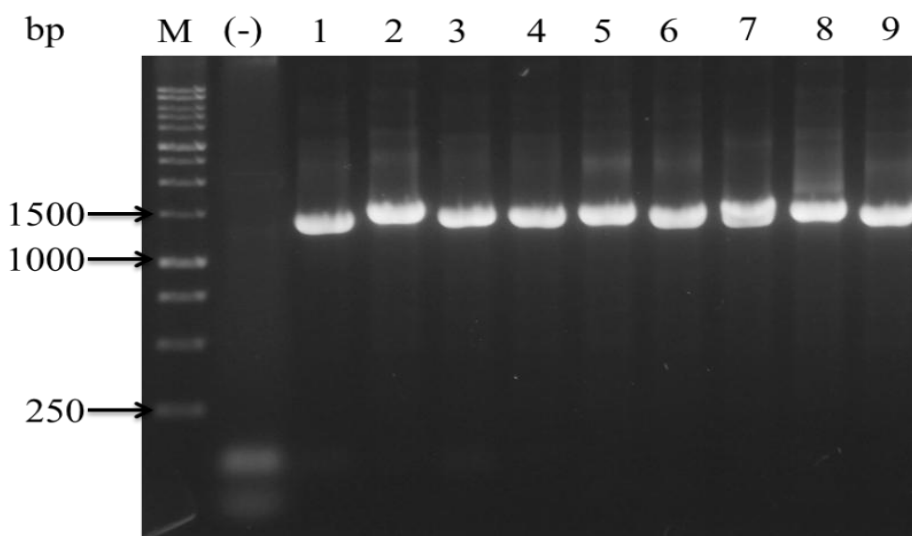
3.1.3. Xác định loài *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* dựa vào trình tự vùng gene 16S rDNA, *hrpW* và *pthA*

Xanthomonas là một chi thuộc họ Xanthomonadaceae. Nhiều loài *Xanthomonas* là mầm bệnh nghiêm trọng của thực vật, là nguyên nhân gây thiệt hại lớn cho nhiều loại cây trồng. Do đó, việc xác định chính xác các loài vi khuẩn trong chi *Xanthomonas* sẽ có giá trị lớn đối với các nhà nghiên cứu và người nông dân trong quản lý bệnh hại. Trong nghiên cứu này, việc kết hợp giữa quan sát các đặc điểm hình thái, sinh hóa và phân tích trình tự các vùng gene chuyên biệt của loài *X. axonopodis* pv. *citri* nhằm

kháng định đúng loài *X. axonopodis* pv. *citri* phân lập được từ cây chanh bị bệnh tại Long An. Chín MPL được chọn đại diện từ 3 vùng thu mẫu để nghiên cứu về trình tự các nucleotide bằng kỹ thuật sinh học phân tử, bao gồm: BLKQ1, BLKC3, BLKL1, DHHL2, DHHQ2, DHKQ4, THKQ1, THKL1, THKC4.

3.1.3.1. Xác định loài *Xanthomonas* sp. dựa vào trình tự vùng gene 16S rDNA

Chiều dài và trình tự của những vùng ITS của rDNA được cho rằng là vùng tiến hóa nhanh nhất vì vậy có thể rất biến đổi. Những universal primer được thiết kế từ những vùng bảo tồn nằm hai đầu vùng ITS và vùng ITS có kích thước nhỏ (600 ÷ 700 bp) dễ dàng được khuếch đại bởi vì số bản sao lớn (lên tới 30.000 bản trong mỗi tế bào) của vùng lặp lại trên rDNA (Dubouzet và Shinoda, 1999). Trình tự của gene này thích hợp là một mô hình phổ biến để nghiên cứu sự tiến hóa và phân loại của vi khuẩn.



Hình 3.5. Kết quả điện di sản phẩm PCR của 9 MPL *X. axonopodis* pv. *citri* với cặp primer 27F - 1492R. (M: thang mẫu chuẩn 250 bp; (-): đối chứng âm; Lane 1-9: BLKQ1, BLKC3, BLKL1, DHHL2, DHHQ2, DHKQ4, THKQ1, THKL1, THKC4)

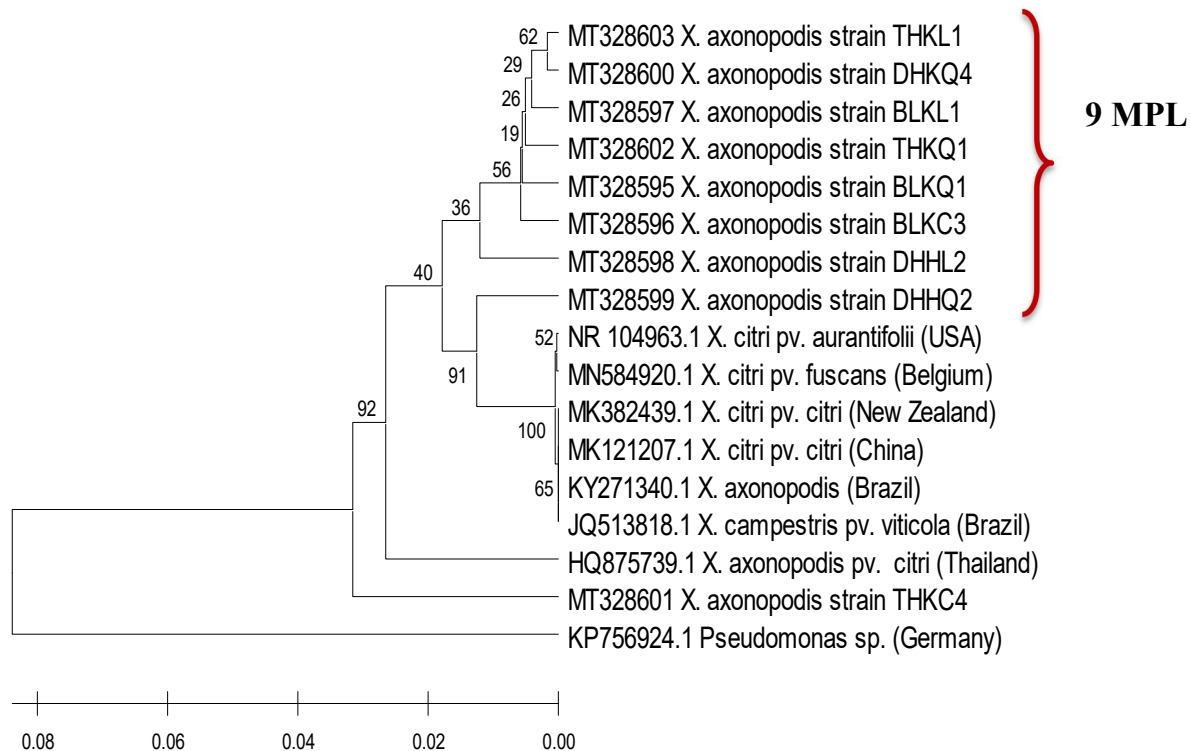
Sản phẩm PCR của 9 MPL *X. axonopodis* pv. *citri* trong nghiên cứu với primer 27F - 1492R sau khi điện di trên gel agarose 1,5% có kích thước khoảng 1500 bp khi so sánh với thang DNA phù hợp với báo cáo của Li và ctv (2015) (Hình 3.5). Trình tự vùng 16S rDNA của 9 MPL này đã được đăng ký trực tiếp trên ngân hàng dữ liệu Genebank và số đăng ký của các MPL từ MT328595.1 - MT328603.1 (Bảng 3.1, Phụ lục 3).

Để không xảy ra tình trạng có sự nhầm lẫn hoặc không có sự thống nhất ý kiến khi mô tả một loài dựa vào đặc điểm hình thái học thì sự tương đồng trình tự, sự phân nhóm loài của các MPL *X. axonopodis* pv. *citri* cần phải được so sánh và phân tích ở mức độ phân tử.

❖ **So sánh trình tự vùng 16S rDNA của 9 MPL *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* nghiên cứu với các mẫu trên thế giới**

Trong 9 MPL *X. axonopodis* pv. *citri* nghiên cứu, 8 MPL (BLKQ1, BLKC3, BLKL1, DHHL2, DHHQ2, DHKQ4, THKL1, THKQ1) có sự tương đồng rất cao từ 97 ÷ 99% với 1 mẫu có nguồn gốc từ Mỹ, 2 mẫu có nguồn gốc từ Trung Quốc, 1 mẫu có nguồn gốc từ New Zealand, 1 mẫu có nguồn gốc từ Thái Lan, 2 mẫu có nguồn gốc từ Brazil. Riêng MPL THKC4 có sự tương đồng khá 94 ÷ 95% với các mẫu trên thế giới (Mỹ, Trung Quốc, New Zealand, Thái Lan, Brazil) (Bảng 3.2, Phụ lục 3). Như vậy, tất cả 9 MPL *X. axonopodis* pv. *citri* nghiên cứu đều có sự tương đồng với các mẫu *X. axonopodis* pv. *citri* đã được xác nhận là minh chứng cho thấy 9 MPL này đều thuộc loài *X. axonopodis* pv. *citri*. Kết quả nghiên cứu này cũng cho thấy chỉ có một loài *X. axonopodis* pv. *citri* hiện diện phổ biến tại các vùng trồng chanh của tỉnh Long An.

Sơ đồ phân nhóm di truyền của 9 MPL nghiên cứu được xây dựng theo phương pháp Maximum Composite Likelihood dựa trên trình tự vùng 16S rDNA thể hiện qua Hình 3.6. Kết quả phân tích cho thấy có sự khác biệt di truyền ở vùng trình tự 16S rDNA giữa 9 MPL nghiên cứu. Mặc dù sự khác biệt là không đáng kể nhưng cũng đã phân 9 MPL *X. axonopodis* pv. *citri* nghiên cứu thành 6 nhóm nhỏ trên sơ đồ phân nhóm. Sự biến động nhỏ ở trình tự 16S rDNA có thể là do các đột biến điểm hoặc các đột biến nhỏ do chèn hay mất nucleotide xảy ra trên vùng 16S rDNA trong quá trình tiến hóa của các cá thể trong quần thể. Chín MPL *X. axonopodis* pv. *citri* tách rời với các mẫu của thế giới cho thấy có sự đồng nhất di truyền của những mẫu vi khuẩn phân lập.



Hình 3.6. Sơ đồ phân nhóm di truyền của 9 MPL *X. axonopodis* pv. *citri* xây dựng theo phương pháp Maximum Composite Likelihood dựa trên trình tự vùng 16S rDNA. Phần trăm giá trị bootstrap từ 1000 lần lặp lại được chỉ trên các nhánh. Mẫu KP756924 (*Pseudomonas* sp.) được sử dụng như một loài xa.

Như vậy, từ kết quả định danh theo phương pháp truyền thống dựa trên đặc điểm hình thái học, kết quả phân nhóm loài dựa trên trình tự vùng 16S rDNA, 9 MPL *Xanthomonas* nghiên cứu cùng nhóm với loài *X. axonopodis* pv. *citri*, chưa xác định được có sự hiện diện của các loài khác và khẳng định kết quả theo phương pháp truyền thống là chính xác. Đây cũng là cơ sở để kết luận loài *X. axonopodis* pv. *citri* là loài hiện diện phổ biến trên đồng ruộng ở Long An.

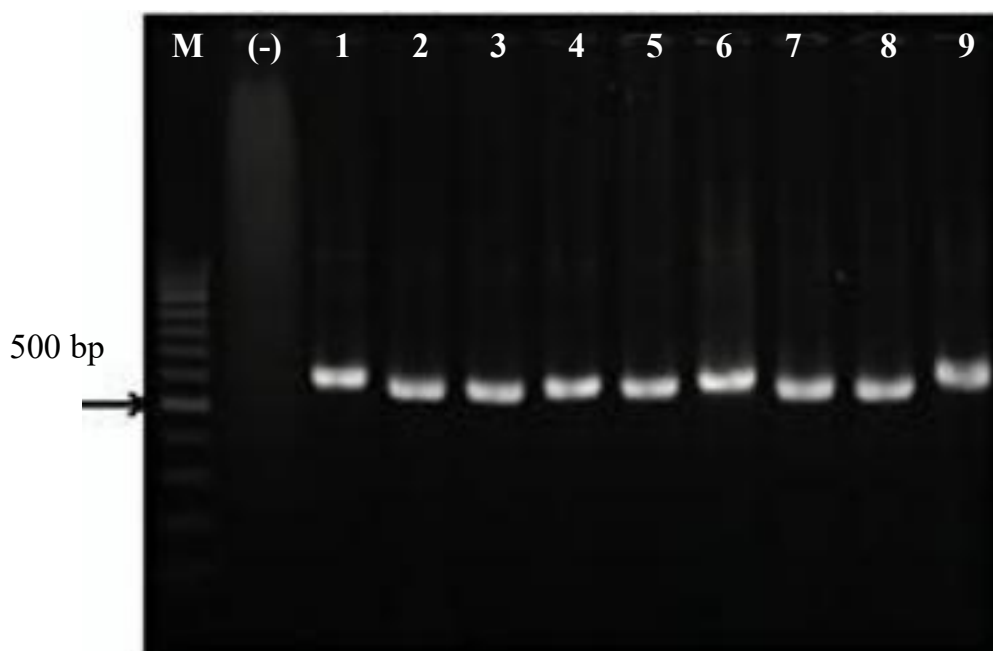
3.1.3.2. Xác định loài vi khuẩn *X. axonopodis* pv. *citri* dựa vào vùng gene *hrpW*

Sự tương tác giữa tác nhân gây bệnh với ký chủ phụ thuộc vào hệ thống protein. Cụm gene *hrp* (Hypersensitive Response and Pathogenicity) mã hóa cho những protein cấu thành hệ thống tiết loại III (T3S-Type III secretion), có vai trò phân phối các protein effector gây độc như *pthA* vào bên trong tế bào ký chủ (Leach và White, 1996; Dunger và ctv, 2005). Trên các loài *Xanthomonas* người ta xác định được các loại *hrp* gene: *hrpG*, *hrpA*, *hrpB*, *hrcV*, *hrpB1*, *hrpD6*, *hrpB2*, *hrcU*, *hrcW*, *hrpB4*, *hrcN* và các gene này nằm thành cụm. Trong khi đó, trên *X. axonopodis* pv. *citri* gene

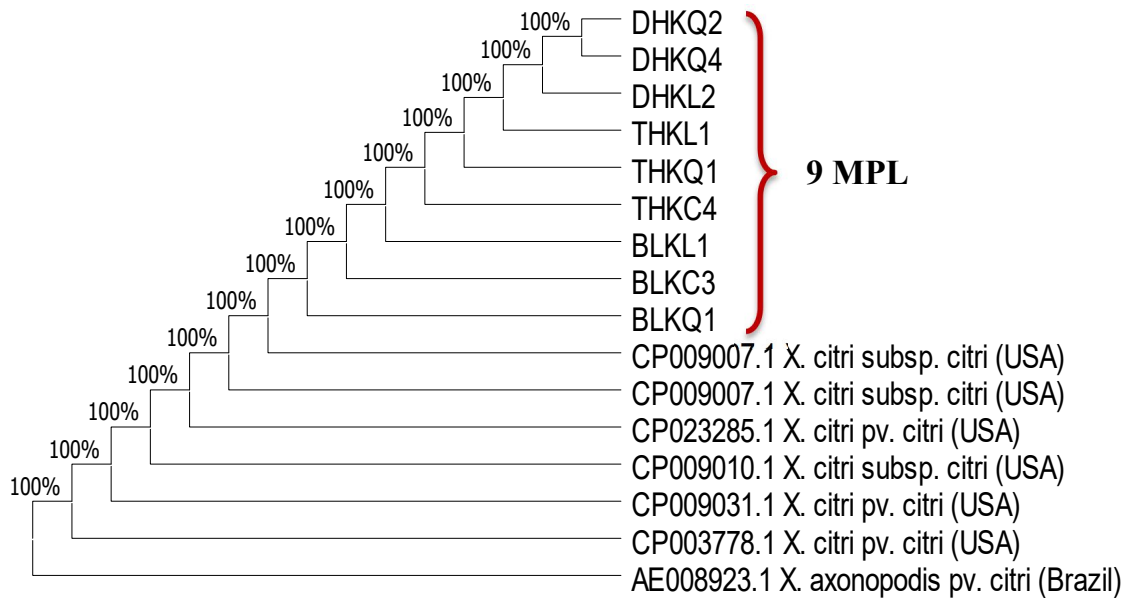
hrpW không nằm trong cụm *hrp* cùng với các gene còn lại (Alegria và ctv, 2004). Park và ctv (2006) cho rằng không thể phát hiện được mẫu vi khuẩn có gene *hrpW* bằng phương pháp phân loại truyền thống. Cần phải có các primer PCR chuyên biệt để phát hiện và xác định gene *hrpW* từ các mẫu thu về từ đồng ruộng. Kết quả xác định gene *hrpW* của 9 MPL *X. axonopodis* pv. *citri* nghiên cứu được trình bày ở Hình 3.7 và Hình 3.8.

Kết quả Hình 3.7 cho thấy, tất cả 9 MPL *X. axonopodis* nghiên cứu đều có đoạn gene *hrpW* với chiều dài khoảng 561 bp trong mỗi sản phẩm PCR khi phân tích trên gel agarose 1,5%. Kết quả nghiên cứu này tương đồng với kết quả của Park và ctv (2006) khi nghiên cứu về di truyền của vi khuẩn *X. axonopodis* pv. *citri* trên cây có múi.

Kết quả Hình 3.8 về so sánh trình tự vùng *hrpW* của 9 MPL *X. axonopodis* pv. *citri* với các mẫu *X. axonopodis* pv. *citri* trên thế giới cho thấy, sự tương đồng trình tự giữa 9 MPL nghiên cứu với 6 mẫu *X. citri* pv. *citri* từ Mỹ và 1 mẫu *X. axonopodis* pv. *citri* từ Brazil là giống nhau hoàn toàn 100% (Bảng 3.3; Phụ lục 3).



Hình 3.7. Kết quả điện di sản phẩm PCR của 9 MPL *X. axonopodis* pv. *citri* với cặp primer *XacF* - *XacR*. (M: thang chuẩn 100 bp; (-): đối chứng âm; Lane 1-9 (A): BLKQ1, BLKC3, BLKL1, DHHL2, DHHQ2, DHKQ4, THKQ1, THKL1, THKC4)

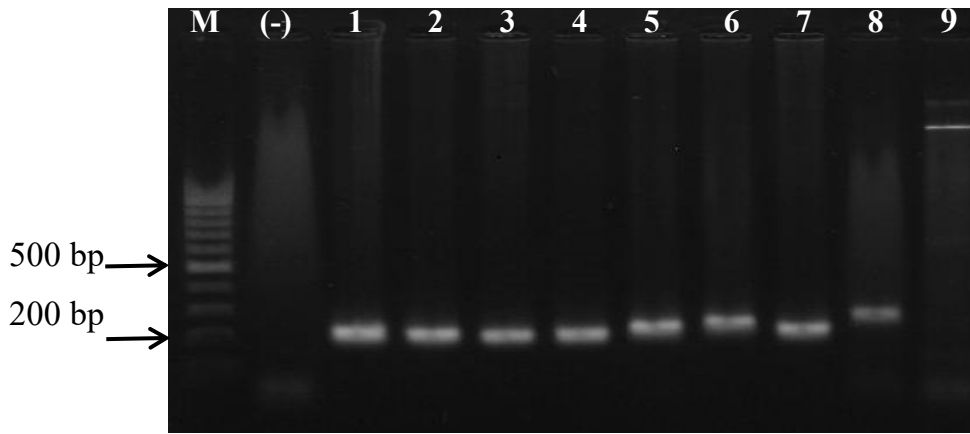


Hình 3.8. Sơ đồ phân nhóm di truyền của 9 MPL *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, xây dựng theo phương pháp Maximum Composite Likelihood dựa trên trình tự gene *hrpW*. Phần trăm giá trị bootstrap từ 1000 lần lặp lại được chỉ trên các nhánh.

Sự tương đồng trình tự rất cao với các mẫu đã xác định là *X. axonopodis* pv. *citri*. Chín MPL *X. axonopodis* pv. *citri* nghiên cứu xếp cùng nhóm loài với *X. citri* pv. *citri* có nguồn gốc từ Mỹ (6 mẫu), *X. axonopodis* pv. *citri* có nguồn gốc từ Brazil (1 mẫu). Kết quả phân tích trình tự nucleotic trên gene *hrpW* cho thấy vùng *hrpW* của 9 MPL *X. axonopodis* pv. *citri* không có sự khác biệt so với 6 mẫu có nguồn gốc từ Mỹ và 1 mẫu có nguồn gốc từ Brazil (Hình 3.1; Phụ Lục 3). Những kết quả định danh loài dựa trên trình tự vùng 16S rDNA và *hrpW* đã củng cố cho kết luận 9 MPL nghiên cứu đều thuộc loài *X. axonopodis* pv. *citri*.

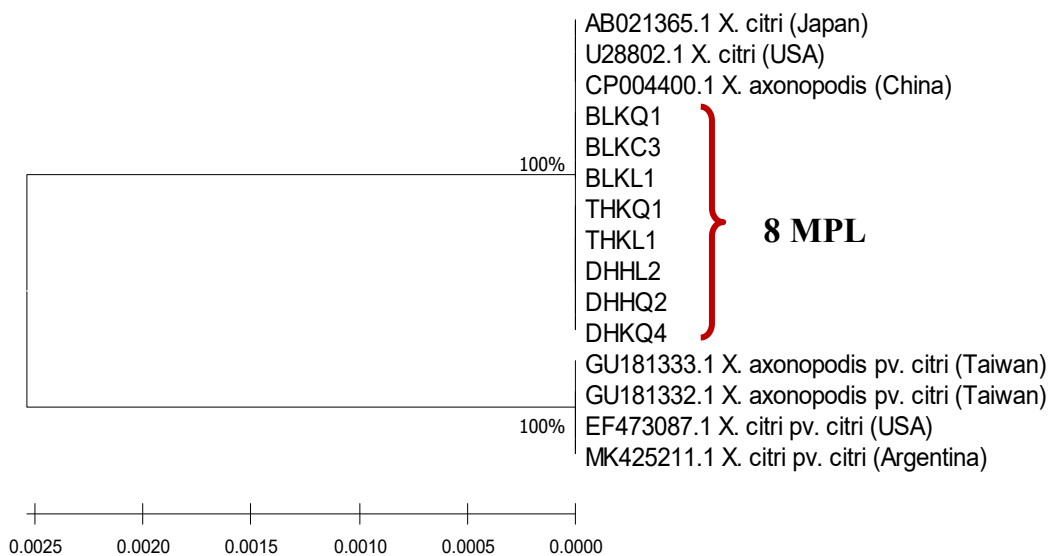
3.1.3.3. Xác định loài vi khuẩn *X. axonopodis* pv. *citri* dựa vào vùng gene *pthA*

pthA là thành viên của họ gene *avrBs3/pthA*. Đây là gene quy định tính gây độc của *X. axonopodis* pv. *citri* trên cây có múi (Brunings và Gabriel, 2003). Gene *pthA* là yếu tố kích hoạt triệu chứng đặc trưng của bệnh loét trên cây có múi, bao gồm sự tăng sinh tế bào quá mức và tạo ra vết thương hoại tử (Duan và ctv, 1999). Trong nghiên cứu này, để phát hiện và xác định gene *pthA* từ các mẫu thu về từ đồng ruộng sử dụng primer PCR chuyên biệt *pth1* - *pth2*.



Hình 3.9. Sản phẩm PCR khuếch đại gene *pthA* của 9 MPL *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* với các cặp mồi *J-ptl1/J-ptl2*. (M: thang chuẩn 100 bp; (-): đối chứng âm; Lane 1-9 (A): BLKQ1, BLKC3, BLKL1, DHHL2, DHHQ2, DHKQ4, THKQ1, THKL1, THKC4)

Kết quả PCR cho thấy, 8 trong 9 MPL nghiên cứu (BLKQ1, BLKC3, BLKL1, DHHL2, DHHQ2, DHKQ4, THKQ1, THKL1) tạo sản phẩm có kích thước khoảng 198 bp khi phân tích trên gel agarose 1,5% (Hình 3.9). Riêng MPLTHKC4 phân lập từ cành cây chanh không hạt ở Thạnh Hóa, Long An không cho sản phẩm band PCR. Kết quả này có thể do có một hoặc vài điểm khác nhau tại vị trí liên kết bắt cặp của primer.



Hình 3.10. Sơ đồ phân nhóm di truyền của 8 MPL *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, xây dựng theo phương pháp Maximum Composite Likelihood dựa trên trình tự gene *pthA*. Phần trăm giá trị bootstrap từ 1000 lần lặp lại được chỉ trên các nhánh.

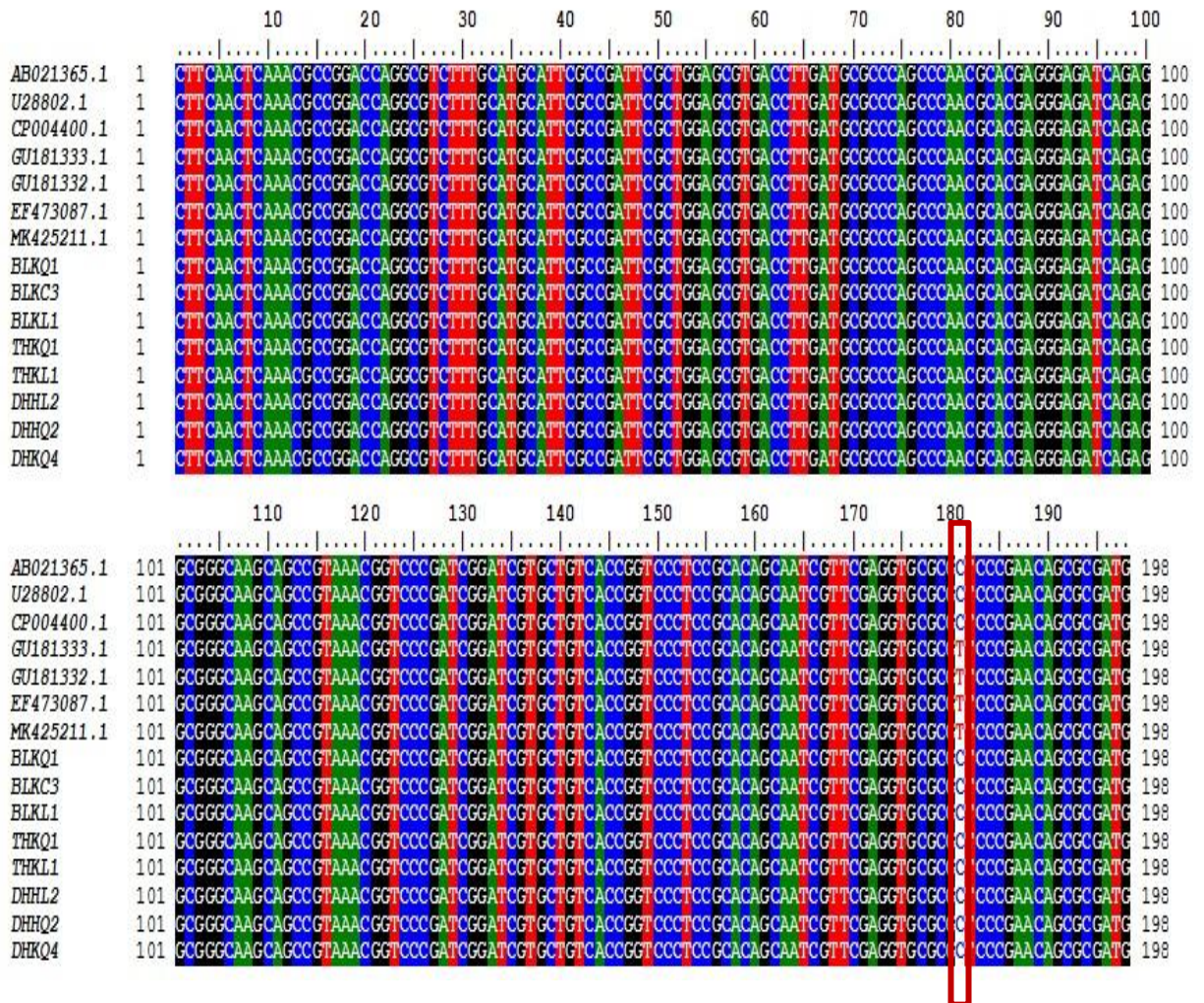
Kết quả Hình 3.10 về so sánh trình tự vùng *pthA* của 9 MPL *X. axonopodis* pv.

citri với các mẫu *X. axonopodis* pv. *citri* trên thế giới cho thấy, 8 trong 9 MPL *X. axonopodis* pv. *citri* nghiên cứu tương đồng với 1 mẫu *X. axonopodis* pv. *citri* có nguồn gốc từ Trung Quốc, 2 mẫu *X. axonopodis* pv. *citri* có nguồn gốc từ Đài Loan, 2 mẫu *X. citri* pv. *citri* có nguồn gốc từ Mỹ, 1 mẫu có nguồn gốc từ Argentina và 1 mẫu *X. citri* pv. *citri* có nguồn gốc từ Nhật Bản là 100% (Bảng 3.4; Phụ lục 3). Sự tương đồng trình tự rất cao với các mẫu đã xác định là *X. axonopodis* pv. *citri* đã củng cố cho kết luận 8 MPL nghiên cứu đều thuộc loài *X. axonopodis* pv. *citri*. Ngoài ra, kết quả sơ đồ phân nhóm loài dựa trên trình tự vùng *pthA* ở Hình 3.10 cho thấy, 8 MPL *X. axonopodis* pv. *citri* nghiên cứu nằm cùng một nhóm và có quan hệ di truyền rất gần gũi với *X. axonopodis* pv. *citri* ở Trung Quốc (CP004400.1), *X. citri* pv. *citri* ở Nhật Bản (AB021365.1) và *X. citri* pv. *citri* ở Mỹ (U28802.1). Tám MPL *X. axonopodis* pv. *citri* nghiên cứu nằm cùng một nhóm với nhau cho thấy sự đồng nhất di truyền của những mẫu vi khuẩn phân lập.

Kết quả phân tích trình tự nucleotic trên gene *pthA* cho thấy, 8 MPL ở Long An có 1 điểm sai khác C-T ở vị trí nucleotide thứ 181 so với loài *X. citri* pv. *citri* ở Argentina (MK425211.1), *X. axonopodis* pv. *citri* ở Đài Loan (GU181333.1; GU181332.1), *X. citri* pv. *citri* ở Mỹ (EF473087.1) nhưng giống hoàn toàn với *X. citri* pv. *citri* ở Mỹ (U28802.1), *X. citri* pv. *citri* ở Nhật Bản (AB021365.1) và *X. axonopodis* pv. *citri* ở Trung Quốc (CP004400.1) (Hình 3.11).

Tóm lại, từ 75 mẫu bệnh có biểu hiện loét trên lá, quả và cành chanh có hạt và không hạt thu thập từ 3 huyện Bến Lức, Thạnh Hóa, Đức Huệ tỉnh Long An đã phân lập được 75 MPL có đặc điểm hình thái, sinh hóa của loài vi khuẩn *X. axonopodis* pv. *citri*. Kết quả định danh vi khuẩn bằng phương pháp giải trình tự 16S rDNA với cặp mồi 27F - 1492R, cho thấy 9 MPL được lựa chọn đều thuộc loài *X. axonopodis* pv. *citri*. Từ các kết quả so sánh sự tương đồng trình tự, phân nhóm di truyền trên vùng ITS-rDNA của vi khuẩn *X. axonopodis* pv. *citri* cho thấy chỉ cần phân tích vùng ITS-rDNA với cặp mồi 27F - 1492R là đủ để xác định loài của vi khuẩn gây bệnh loét trên cây chanh. Tuy nhiên, nếu chỉ dựa vào kết quả giải trình tự vùng 16S rDNA chưa thể khẳng định 9 MPL từ Long An thuộc *X. axonopodis* pv. *citri* hay *X. axonopodis* pv. *aurantifolii*. Từ kết quả phân tích và so sánh thêm trình tự hai vùng gene gây bệnh loét đặc trưng *hrpW* và *pthA* cho thấy 9 MPL có độ tương đồng $99 \div 100\%$ với *X. axonopodis* pv. *citri*. Điều này cho thấy, việc kết hợp giải trình tự vùng 16S rDNA và

các vùng trình tự gene gây bệnh đặc trưng có thể khẳng định đến trạng thái gây bệnh của loài (pathovar).



Hình 3.11. Kết quả align trình tự vùng gene *pthA* của 8 MPL *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* với trình tự vùng gene *pthA* với các dòng vi khuẩn *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* đã được công bố trên GeneBank.

3.2. Đánh giá hoạt tính ức chế vi khuẩn *X. axonopodis* pv. *citri* của cao chiết phân đoạn từ cây giao trong điều kiện phòng thí nghiệm

Từ những nghiên cứu, phân lập vi khuẩn *Xanthomonas* pv. *citri* gây bệnh loét trên cây chanh, MPL **BLKQ1** được chọn cho nghiên cứu đánh giá hoạt tính ức chế vi khuẩn của các cao chiết phân đoạn từ cây giao trong điều kiện phòng thí nghiệm.

3.2.1. Kết quả tạo cao chiết toàn phần và các cao phân đoạn từ cây giao (*Euphorbia tirucalli* L.)

Bột khô (6,5 kg) của cây giao (*E. tirucalli*) thu thập ở 3 vùng Phan Thiết, Tp. Hồ Chí Minh và Đắc Nông có độ ẩm tương ứng $8,73\% \pm 0,74$; $8,86\% \pm 0,69$; $8,67\% \pm 0,87$ được sử dụng trong nghiên cứu. Kết quả hiệu suất chiết và độ ẩm cao toàn phần và các cao phân đoạn từ cây giao thu thập ở Bình Thuận, Đắc Nông, Tp. HCM được trình bày trong Bảng 3.5 và Bảng 3.6.

Qua Bảng 3.5 và Bảng 3.6 cho thấy, với độ ẩm các cao toàn phần và cao chiết phân đoạn nằm trong khoảng $27,28 \div 30,71\%$ (Bảng 3.6), hiệu suất chiết cao toàn phần (EtOH) của cây giao thu nhận ở ba vùng Bình Thuận, Đắc Nông và Tp. HCM khác biệt nhau đáng kể. Trong đó, cây giao thu nhận ở Phan Thiết, Bình Thuận có hiệu suất chiết cao toàn phần cao nhất đạt 9,48% và thấp nhất là cây giao thu nhận ở Tp. HCM (8,67%). Hiệu suất chiết cao toàn phần (EtOH) trong nghiên cứu này khác so với hiệu suất chiết cây giao thu nhận ở Ấn Độ trong báo cáo của Upahyay và ctv (2010).

Bảng 3.5. Kết quả hiệu suất chiết cao toàn phần và các cao phân đoạn từ cây giao thu thập ở Bình Thuận, Đắc Nông và Tp. HCM

STT	Loại cao chiết	Hiệu suất chiết (%)		
		Đắc Nông	Bình Thuận	Tp. HCM
1	EtOH	8,87 ^b	9,48 ^c	8,67 ^a
2	He	29,79 ^a	29,04 ^a	31,13 ^b
3	EA	18,34 ^b	18,64 ^b	15,92 ^a
4	Bu	13,14 ^b	11,90 ^a	15,22 ^c

Trong cùng một hàng, các giá trị có các ký tự theo sau khác nhau chỉ sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 0,05 theo trắc nghiệm DUNCAN; EtOH: cao toàn phần ethanol; He: cao n-hexan; EA: cao ethyl acetate; Bu: cao butanol

Bảng 3.6. Độ ẩm của cao toàn phần và các cao phân đoạn từ cây giao thu thập ở Bình Thuận, Đắk Nông và Tp. HCM

STT	Loại cao chiết	Độ ẩm (%)		
		Đắk Nông	Bình Thuận	Tp. HCM
1	EtOH	29,18±1,12	29,68±0,60	27,96±0,84
2	He	27,51±0,80	27,28±0,99	27,99±0,87
3	EA	29,00±1,48	29,05±0,60	29,23±0,89
4	Bu	30,71±0,86	30,47±0,69	30,27±1,09

EtOH: cao toàn phần ethanol; He: cao n-hexan; EA: cao ethyl acetate; Bu: cao butanol

Theo Upahyay và ctv (2010), hiệu suất chiết cây giao trong dung môi methanol bằng phương pháp soxhlet ở nhiệt độ $54,0 \div 55,5^{\circ}\text{C}$ trong 24 đến 36 giờ đạt 4,44%. Giữa các cao phân đoạn, hiệu suất chiết cao ethyl acetate từ cây giao ở Bình Thuận là cao nhất (18,64%), khác biệt không đáng kể so với cây giao thu ở Đắk Nông (18,34%). Tuy nhiên, cây giao thu nhận ở Tp. HCM có hiệu suất chiết cao *n*-hexan và cao butanol cao nhất tương ứng 31,13 và 15,22%. Kết quả nghiên cứu phù hợp với nhận định của các nghiên cứu trước, thành phần và hàm lượng các hợp chất thứ cấp trong thực vật phụ thuộc vào các yếu tố như tuổi cây, vị trí địa lý, khí hậu (Upadhyay và ctv, 2010); thành phần các hợp chất trong dịch chiết phụ thuộc vào độ phân cực và trọng lượng của dung môi chiết (Younes và ctv, 2018); dung môi không phân cực hòa tan tốt các hợp chất không phân cực, dung môi có tính phân cực trung bình sẽ hòa tan tốt các hợp chất phân cực trung bình, dung môi phân cực mạnh sẽ hòa tan tốt các hợp chất phân cực mạnh (Nguyễn Kim Phi Phụng, 2007).

3.2.2. Đánh giá hoạt tính ức chế vi khuẩn *X. axonopodis* pv. *citri* của các cao chiết phân đoạn

Việc đánh giá hoạt tính ức chế vi khuẩn *X. axonopodis* của các cao chiết phân đoạn từ cây giao từ 3 vùng thu nhận (Bình Thuận, Đắk Nông, Tp. HCM) trong điều kiện phòng thí nghiệm là rất cần thiết vì đây chính là cơ sở để xác định vùng thu nhận

cây giao, phân đoạn cao chiết và nồng độ thích hợp cho việc ứng dụng ngoài đồng. Kết quả đường kính vòng vô khuẩn và giá trị MIC của các cao chiết phân đoạn được thể hiện trong Bảng 3.7, Bảng 3.8 và Hình 3.13.

Bảng 3.7. Đường kính vòng vô khuẩn của các cao chiết phân đoạn đối với vi khuẩn *X. axonopodis* pv. *citri*

Vùng thu nhận	Cao chiết phân đoạn	Đường kính vòng vô khuẩn (mm)			
		Nồng độ (mg/mL)			
		1,25	2,5	5,0	7,5
Bình Thuận	He	-	-	6,10±0,65	8,67±0,76
	EA	10,57±0,80	12,30±0,79	14,33±0,76	17,67±0,57
	Bu	3,70±0,30	7,63±0,65	10,03±0,55	11,03±0,35
Đắk Nông	He	-	-	3,07±0,60	5,77±0,75
	EA	8,67±0,29	10,17±0,29	12,23±0,87	15,5±0,50
	Bu	3,27±0,25	5,00±0,50	7,67±0,76	10,03±0,55
Tp. HCM	He	-	-	2,67±0,29	5,00±0,50
	EA	6,67±0,29	8,40±0,36	9,97±0,45	11,60±0,36
	Bu	2,93±0,40	4,67±0,29	7,07±0,60	8,33±0,76
Streptomycin (0.01 mg/mL)		20,13±0,61	20,13±0,61	20,13±0,61	20,13±0,61
DMSO 10%		-	-	-	-

Ghi chú: (Trung bình ± SD, n = 3); “-”: Không ức chế; He: cao n-hexan; EA: cao ethyl acetate; Bu: cao butanol

Qua Bảng 3.7 cho thấy, ở nồng độ 5,0 mg/mL (0,5% w/v), tất cả các cao chiết phân đoạn từ cây giao thu nhận ở cả 3 vùng đều có khả năng ức chế vi khuẩn *X. axonopodis* pv. *citri*. Trong đó, hiệu quả ức chế vi khuẩn của các cao chiết phân đoạn từ cây giao ở Bình Thuận > Đắk Nông > Tp. HCM với đường kính vòng vô khuẩn

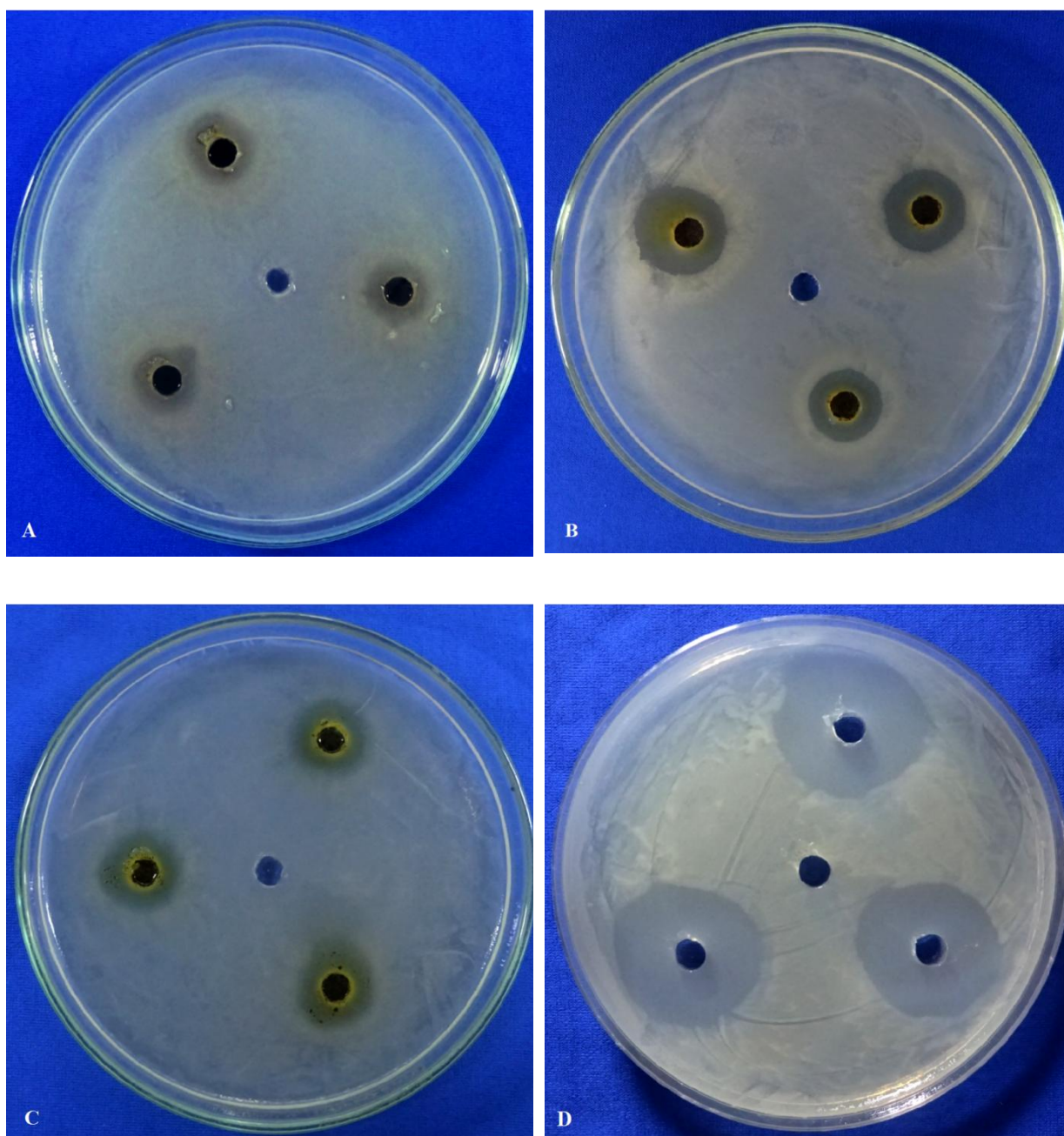
tương ứng từ $6,10 \pm 0,65$ mm đến $14,33 \pm 0,76$ mm; từ $3,07 \pm 0,60$ mm đến $12,33 \pm 0,87$ mm và từ $2,67 \pm 0,29$ mm đến $9,97 \pm 0,45$ mm. Ở nồng độ 7,5 mg/mL (0,75% w/v), cao chiết phân đoạn EA (ethyl acetate) từ cây giao thu nhận ở Bình Thuận có đường kính vòng vô khuẩn cao nhất ($17,67 \pm 0,57$ mm) và giá trị MIC đạt 0,156 mg/mL (0,0156%) (Bảng 3.8). Trong khi đường kính vòng vô khuẩn thấp nhất ($2,67 \pm 0,29$ mm) được quan sát thấy ở cao chiết chiết phân đoạn He (*n*-hexan) của cây giao thu nhận ở Tp. HCM. Ở nồng độ 1,25 mg/mL (0,125% w/v) và 2,5 mg/mL (0,25% w/v), cao chiết phân đoạn He từ cả ba vùng thu nhận đều không có khả năng ức chế vi khuẩn. Theo Sultan và ctv (2016) cho rằng, sự khác biệt về hiệu quả kháng khuẩn của các chiết xuất từ cây *E. tirucalli* khi sử dụng các dung môi khác nhau là do sự có mặt của các hợp chất có hoạt tính sinh học. Kết quả nghiên cứu cũng cho thấy, hiệu quả ức chế vi khuẩn *X. axonopodis* pv. *citri* của các chiết phân đoạn EA từ cây giao cao hơn so với dịch chiết ethanol từ tỏi, cây *Azadirachta indica*, Guava, Casto và Turmeric được báo cáo trong nghiên cứu của Negiand và Kuma (2015). Cụ thể, dịch chiết ethanol từ tỏi, cây *Azadirachta indica*, Guava, Casto và Turmeric với nồng độ 20% có khả năng ức chế vi khuẩn *X. axonopodis* pv. *citri* với đường kính vòng vô khuẩn tương ứng là 1,73; 1,67; 1,57; 1,43 và 1,13 cm.

Ngoài ra, trong nghiên cứu của Raju và ctv (2013), dịch chiết lá Tulasi (cây húng quế) (40%) có khả năng ức chế *X. axonopodis* pv. *punicae* với đường kính vòng vô khuẩn là 1,76 cm. Theo Ijato (2016), ở nồng độ 5% và 20%, dịch chiết *A. indicia* có hiệu quả ức chế vi khuẩn *X. citri* với đường kính vòng vô khuẩn là 1,27 cm và 2,60 cm. Trong khi đó, dịch chiết *V. amygdalina* có đường kính vòng vô khuẩn tương ứng là 0,82 cm và 2,20 cm. Kết quả nghiên cứu cho thấy, dịch chiết từ cây giao ở Việt Nam có khả năng ức chế vi khuẩn *X. axonopodis*. Nghiên cứu này là một bước quan trọng trong việc phát triển các loại thuốc trừ sâu có nguồn gốc thực vật thân thiện với môi trường để quản lý bệnh hại cây trồng do vi khuẩn và phát triển chế phẩm thương mại.

Bảng 3.8. Kết quả nồng độ ức chế tối thiểu (MIC - mg/mL) vi khuẩn *X. axonopodis* pv. *citri* của các cao chiết phân đoạn

Vùng thu nhận	Cao chiết phân đoạn	MIC (mg/mL)
Bình Thuận	He	-
	EA	0,156
	Bu	0,625
Đắk Nông	He	-
	EA	0,312
	Bu	0,625
Tp. HCM	He	-
	EA	0,625
	Bu	-

Ghi chú: “-”: không xác định; He: cao n-hexan; EA: cao ethyl acetate; Bu: cao butanol



Hình 3.12. Kết quả đường kính vòng vô khuẩn đối với vi khuẩn *Xanthomonas* của các cao chiết từ cây giao ở nồng độ 7,5 mg/mL (0,75% w/v), kháng sinh Streptomycin (0,01 mg/mL) bằng phương pháp khuếch tán giếng thạch.

(A - cao *n*-hexan; B- cao etyl acetate; C - cao butanol; D - Streptomycin)

3.2.3. Kết quả định tính các nhóm hoạt chất có trong các cao chiết phân đoạn từ cây giao

Để có cơ sở khoa học khẳng định kết quả đánh giá khả năng ức chế vi khuẩn *X. axonopodis* pv. *citri* trong điều kiện phòng thí nghiệm, việc đánh giá các nhóm hoạt chất, định lượng hàm lượng phenolic tổng và flavonoid tổng và xác định sự có mặt của

các hoạt chất có mặt trong cao chiết phân đoạn là cần thiết. Các cao chiết phân đoạn từ cây giao thu nhận từ Bình Thuận và Đắk Nông có hiệu quả ức chế vi khuẩn *X. axonopodis* pv. *citri* cao hơn ở Tp. HCM nên được chọn để đánh giá sự hiện diện của các nhóm hoạt chất. Kết quả định tính các nhóm hoạt chất flavonoid, alkaloid, tannin, terpenoid và saponin trong các cao chiết phân đoạn He (*n*-hexan), EA (ethyl acetate) và Bu (butanol) được trình bày ở Bảng 3.9.

Qua Bảng 3.9 cho thấy, kết quả định tính các nhóm hoạt chất trong các cao chiết phân đoạn của cây giao thu nhận từ Bình Thuận và Đắk Nông là như nhau. Trong đó, các cao chiết phân đoạn từ cây giao ở Bình Thuận và Đắk Nông đều có chứa nhóm flavonoid và không có sự hiện diện của nhóm saponin, nhóm chất có chứa nhiều thành phần có độc tính đã được báo cáo trong các nghiên cứu trước đây. Kết quả này khác với báo cáo của Vale và Orlanda (2011) và Orlanda và Vale (2015) về thành phần hóa học của dịch chiết cây giao ở Brazil có chứa saponin. Điều này cho thấy, cây giao ở Việt Nam là nguồn nguyên liệu tiềm năng với nhiều hoạt chất có khả năng ức chế vi khuẩn mới. Cao chiết phân đoạn EA (ethyl acetate) và phân đoạn Bu (butanol) có chứa alkaloid, flavonoid và tannin trong khi phân đoạn He (*n*-hexan) có chứa flavonoid và terpenoid. Giữa các cao chiết phân đoạn ở cả hai vùng thu nhận, phân đoạn EA sở hữu nhiều nhóm hoạt chất nhất. Theo Nguyễn Kim Phi Phụng (2007); Younes và ctv (2018), thành phần các hợp chất hóa học trong các dịch chiết phụ thuộc vào độ phân cực và trọng lượng phân tử của các dung môi chiết và tuân thủ nguyên tắc “các chất giống nhau sẽ hòa tan vào nhau”. Nhóm hoạt chất flavonoid phần lớn được giữ lại ở phân đoạn EA. Tuy nhiên, một số flavonoid có gắn với phân tử đường nên độ phân cực của hợp chất cũng tăng lên nên có mặt trong phân đoạn Bu. Thành phần hóa học trong cây giao ở Bình Thuận và Đắk Nông trong nghiên cứu này sở hữu các nhóm hoạt chất tương tự trong cây giao ở Ấn Độ trong báo cáo của Upahyay và ctv (2010) và Brazil trong báo cáo của Vale và Orlanda (2011) và Orlanda và Vale (2015). Tuy nhiên, theo báo cáo của nhóm nghiên cứu Aleixo và ctv (2018), cây giao thu nhận ở vườn Piatã, ở Brazil chỉ có mặt nhóm flavonoid, không có các nhóm tannin, alkaloid, saponin. Điều này cũng đã được ghi nhận trong báo cáo của Upahyay và ctv (2010) rằng thành phần và tỷ lệ của các hợp chất thứ cấp trong thực vật thay đổi phụ thuộc vào vị trí địa lý, mùa vụ khai thác và tuổi cây.

Bảng 3.9. Kết quả định tính các nhóm hoạt chất trong các cao chiết phân đoạn từ cây giao

Vùng thu nhận	Cao chiết phân đoạn	Alkaloid	Flavonoid	Tannin	Terpenoid	Saponin
Bình Thuận	He	-	+	-	+	-
	EA	++	++	+	+++	-
	Bu	+	+	+	-	-
Đắk Nông	He	-	+	-	+	-
	EA	++	++	+	+++	-
	Bu	+	+	+	-	-

Ghi chú: (-) âm tính (không có), (+) dương tính (có ít), (++) dương tính (có), (+++) dương tính (có nhiều). He: cao n-hexan; EA: cao ethyl acetate; Bu: cao butanol

Ngoài ra, theo Sultan và ctv (2016), sự khác nhau về hoạt tính kháng khuẩn của các cao chiết từ cây giao là do bởi hoạt tính sinh học của các nhóm hoạt chất có mặt. Trong đó, cao phân đoạn EA của cây giao sở hữu các nhóm hoạt chất alkaloid, flavonoid, tannin, terpenoid. Theo các nghiên cứu trước, alkaloid có khả năng ức chế vi khuẩn thông qua cơ chế ức chế quá trình sinh tổng hợp nucleic acid của vi khuẩn. Trong khi đó, tannin lại gây độc cho vi khuẩn thông qua cơ chế gia tăng quá trình hydroxyl hóa (Cushnie và ctv, 2014; Min và ctv, 2008). Bên cạnh đó, cơ chế tiêu diệt vi khuẩn của các polyphenol đã được ghi nhận thông qua việc kìm hãm c-di-AMP, có vai trò điều khiển nhiều chức năng khác nhau trong vi khuẩn (Upahyay và ctv, 2010). Các flavonoid ức chế vi khuẩn thông qua một số cơ chế: có khả năng ức chế enzyme transpeptidase làm cho mucopeptid (yếu tố đảm bảo vi khuẩn vững chắc) không tổng hợp được; gắn lên màng nguyên sinh chất của vi khuẩn, làm thay đổi tính thẩm thấu chọn lọc của màng, làm cho một số chất cần thiết cho đời sống của vi khuẩn (nucleotid, pyrimidin, purin) lọt qua màng nguyên sinh chất ra ngoài; ức chế tổng hợp nucleotid; tác động vào DNA khuôn, ức chế tổng hợp RNA của vi khuẩn. Nhóm -OH tự do trong

các hợp chất phenolic ức chế vi khuẩn thông qua một số cơ chế như: tương tác với màng tế bào của vi khuẩn để phá vỡ cấu trúc màng và gây rò rỉ các thành phần tế bào làm chết vi khuẩn (Xue và ctv, 2013); thúc đẩy việc phân định vị trí của các electron sau đó hoạt động như chất trao đổi proton và giảm gradient qua màng tế bào chất của tế bào vi khuẩn dẫn đến sự sụp đổ của động lực proton và làm cạn kiệt nhóm ATP và cuối cùng làm chết tế bào (Ultee và ctv, 2002).

3.2.4. Hàm lượng phenolic tổng và flavonoid tổng của cao chiết phân đoạn từ cây giao (*E. tirucalli*)

Phenolic và flavonoid là hai nhóm hợp chất tự nhiên thường gặp trong dược liệu có nguồn gốc thực vật. Hơn 8.000 cấu trúc phenolic đã được tìm thấy, từ các phân tử đơn giản như các acid phenolic đến các chất polyme như tannin. Ngoài ra, hai nhóm hợp chất này còn có nhiều hoạt tính sinh học trong đó có khả năng ức chế nhiều loại vi khuẩn Gram (-) và Gram (+) (Hwang và ctv, 2014). Hàm lượng phenolic tổng và flavonoid tổng của các cao chiết phân đoạn (*n*-Hexan, ethyl acetate và butanol) từ cây giao được trình bày ở Bảng 3.10.

Hàm lượng phenolic tổng được xác định dựa vào đường chuẩn của acid gallic (Hình 4.1; Phụ lục 4) $y = 0,0102x + 0,0075$, $R^2 = 0,9998$ và hàm lượng flavonoid tổng được xác định dựa vào đường chuẩn của quercetin (Hình 4.2; Phụ lục 4) $y = 0,0043x + 0,0118$, $R^2 = 0,9999$.

Qua Bảng 3.10 cho thấy, tất cả các cao chiết phân đoạn từ cây giao thu nhận ở hai vùng Bình Thuận và Đắk Nông đều có chứa phenolic và flavonoid nhưng hàm lượng ở mỗi vùng và mỗi phân đoạn khác nhau và khác biệt có ý nghĩa khi kiểm chứng bằng DUNCAN. Trong đó, cao chiết EA (ethyl acetate) từ cây giao thu nhận ở Bình Thuận có hàm lượng phenolic và flavonoid cao nhất tương ứng là 106,32 mgGAE/g và 450,83 µgQE/g, khác biệt đáng kể so với hàm lượng phenolic (98,63 mgGAE/g) và flavonoid (408,86 µgQE/g) trong phân đoạn EA ở Đắk Nông. Nồng độ phenolic và flavonoid thấp nhất được quan sát thấy ở cao phân đoạn He (*n*-hexan) ở Đắk Nông với giá trị tương ứng là 14,46 (mgGAE/g) và 90,34 µgQE/g, khác biệt không đáng kể với hàm lượng phenolic (16,65 mgGAE/g) và flavonoid (97,97 µgQE/g) trong phân đoạn He ở Bình Thuận. Kết quả này cho thấy, ngoài những thành phần như chlorophyll, chất béo, phân đoạn He còn chứa một ít các hợp chất phenolic kém phân cực

Bảng 3.10. Kết quả hàm lượng phenolic tổng và flavonoid tổng trong các cao chiết phân đoạn từ cây giao thu nhận ở Bình Thuận và Đắk Nông

Vùng thu nhận	Cao chiết phân đoạn	Phenolic tổng (mgGAE/g)	Flavonoid tổng (μ gQE/g)
Bình Thuận	He	16,65 ^a	97,97 ^a
	EA	106,32 ^e	450,83 ^e
	Bu	61,87 ^c	273,34 ^c
Đắk Nông	He	14,46 ^a	90,34 ^a
	EA	98,63 ^d	408,86 ^d
	Bu	50,94 ^b	258,75 ^b

Trong cùng một cột, các giá trị có các ký tự theo sau khác nhau chỉ sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức $p < 0,05$ theo trắc nghiệm DUNCAN; He: cao n-hexan; EA: cao ethyl acetate; Bu: cao butanol

Thành phần hóa học trong các cao chiết phụ thuộc vào độ phân cực và trọng lượng phân tử của dung môi lựa chọn cũng như sự có mặt của các hợp chất trong thực vật (Nguyễn Kim Phi Phụng, 2007). Kết quả nghiên cứu cho thấy, với cây giao thu nhận ở Bình Thuận và Đắk Nông, Việt Nam sử dụng dung môi có độ phân cực trung bình có hiệu quả hơn dung môi phân cực thấp để thu được hàm lượng phenolic và flavonoid cao hơn. Trong nghiên cứu của Araújo và ctv (2014), trong chiết xuất acetone và methanol từ cây giao ở Brazil có hàm lượng phenolic tương ứng là $30,54 \pm 0,64$ mgGAE/100g và $27,6 \pm 2,34$ mgGAE/100g. Trong khi đó, theo nhóm nghiên cứu Orlanda và Vale (2015), chiết xuất ethanol từ cây giao ở Brazil có hàm lượng phenolic và flavonoid tương ứng là $96,18 \pm 1,33$ mgGAE/g và $63,75 \pm 2,34$ mgQE/g. Các kết quả này cho thấy, hàm lượng phenolic tổng trong cây giao ở Brazil thấp hơn so với cây giao thu nhận ở Bình Thuận và Đắk Nông, Việt Nam trong nghiên cứu này nhưng hàm lượng flavonoid thì cao hơn nhiều.

3.2.5. Kết quả phân lập hợp chất

Cao chiết phân đoạn ethyl acetate (EA) từ cây giao ở Bình Thuận và Đắk Nông có hiệu quả ức chế vi khuẩn *X. axonopodis* pv. *citri*, hàm lượng phenolic và flavonoid cao hơn so với các phân đoạn còn lại. Do đó, cao chiết EA từ hai vùng này được tiến hành phân lập các hợp chất hiện diện bằng phương pháp sắc ký bản mỏng, sắc ký cột và xác định cấu trúc của các hợp chất bằng phương pháp NMR. Kết quả phân lập hợp chất được thể hiện trong Hình 3.14 và Hình 3.15, cụ thể:

❖ Kết quả phân lập cao phân đoạn EA từ cây giao ở Bình Thuận

Từ 114,98 g phân đoạn EA chạy sắc ký cột silica gel pha thường, giải ly với hệ dung môi *n*-hexan: ethyl acetate: acetone (5:1:1 → 1:1:1) thu được 18 phân đoạn EA1-18. Trong 18 phân đoạn thu được, phân đoạn EA3 có hoạt tính ức chế vi khuẩn *X. axonopodis* pv. *citri* cao hơn các phân đoạn còn lại. Do đó, phân đoạn EA3 được chọn để tiếp tục thực hiện sắc ký cột gel để phân tách thành các phân đoạn nhỏ hơn.

EA3 (4,08 g) được phân tách bằng sắc ký cột gel pha thường, giải ly với hệ dung môi ban đầu *n*-hexane: chloroform: ethyl acetate: acetone: acetic acid (350: 100: 40: 25: 10) để thu được 4 phân đoạn EA3.1-4. Trong 4 phân đoạn nhỏ thu được, phân đoạn EA3.2 có hoạt tính ức chế vi khuẩn *X. axonopodis* pv. *citri* cao hơn các phân đoạn còn lại do đó được lựa chọn để thực hiện bước tiếp theo.

EA3.2 (360 mg) tiếp tục được phân tách bằng sắc ký gel Sephadex LH-20 giải ly bằng methanol để thu được 3 phân đoạn EA3.2.1-3. Trong 3 phân đoạn nhỏ thu được, phân đoạn EA3.2.3 có hoạt tính ức chế vi khuẩn *X. axonopodis* pv. *citri* cao hơn các phân đoạn còn lại do đó được lựa chọn để phân lập hợp chất trong phân đoạn.

EA3.2.3 (166,3 mg) tiếp tục được phân tách bằng sắc ký cột pha đảo C18 với hệ dung môi giải ly metanol: nước (1: 2 → 1: 1) thu được hợp chất 1 (scopoletin, 20 mg), 2 (gallic acid, 9,3 mg) và 3 (piperic acid, 4,6 mg).

❖ Kết quả phân lập cao phân đoạn EA từ cây giao ở Đắk Nông

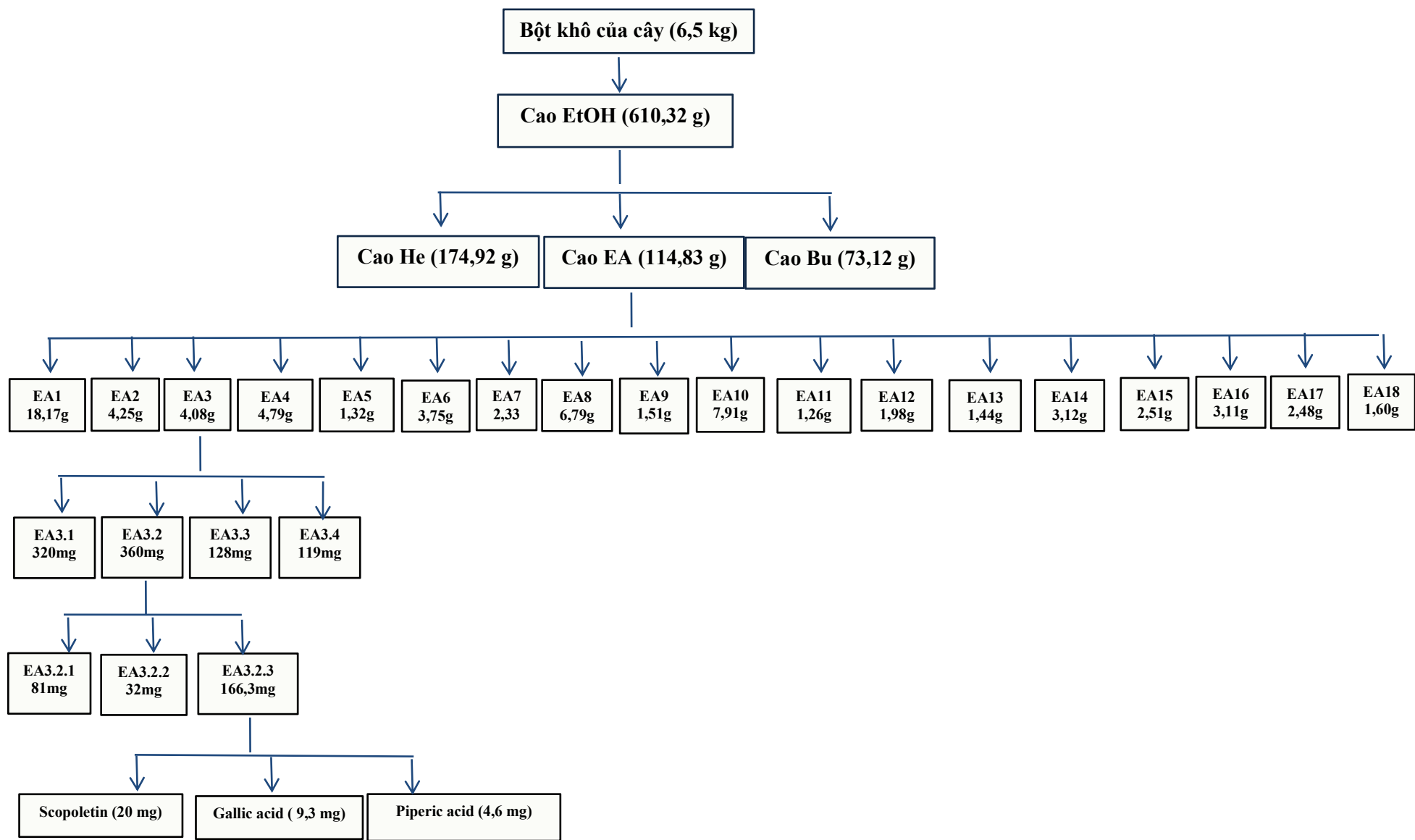
Từ 105,68 g phân đoạn EA chạy sắc ký cột silica gel pha thường, giải ly với hệ dung môi *n*-hexan: ethyl acetate: acetone (5:1:1 → 1:1:1) thu được 8 phân đoạn EA1-8. Trong 8 phân đoạn thu được, phân đoạn EA3 có hoạt tính ức chế vi khuẩn *X. axonopodis* pv. *citri* cao hơn các phân đoạn còn lại. Do đó, phân đoạn EA3 được chọn

để tiếp tục thực hiện sắc ký cột gel để phân tách thành các phân đoạn nhỏ hơn.

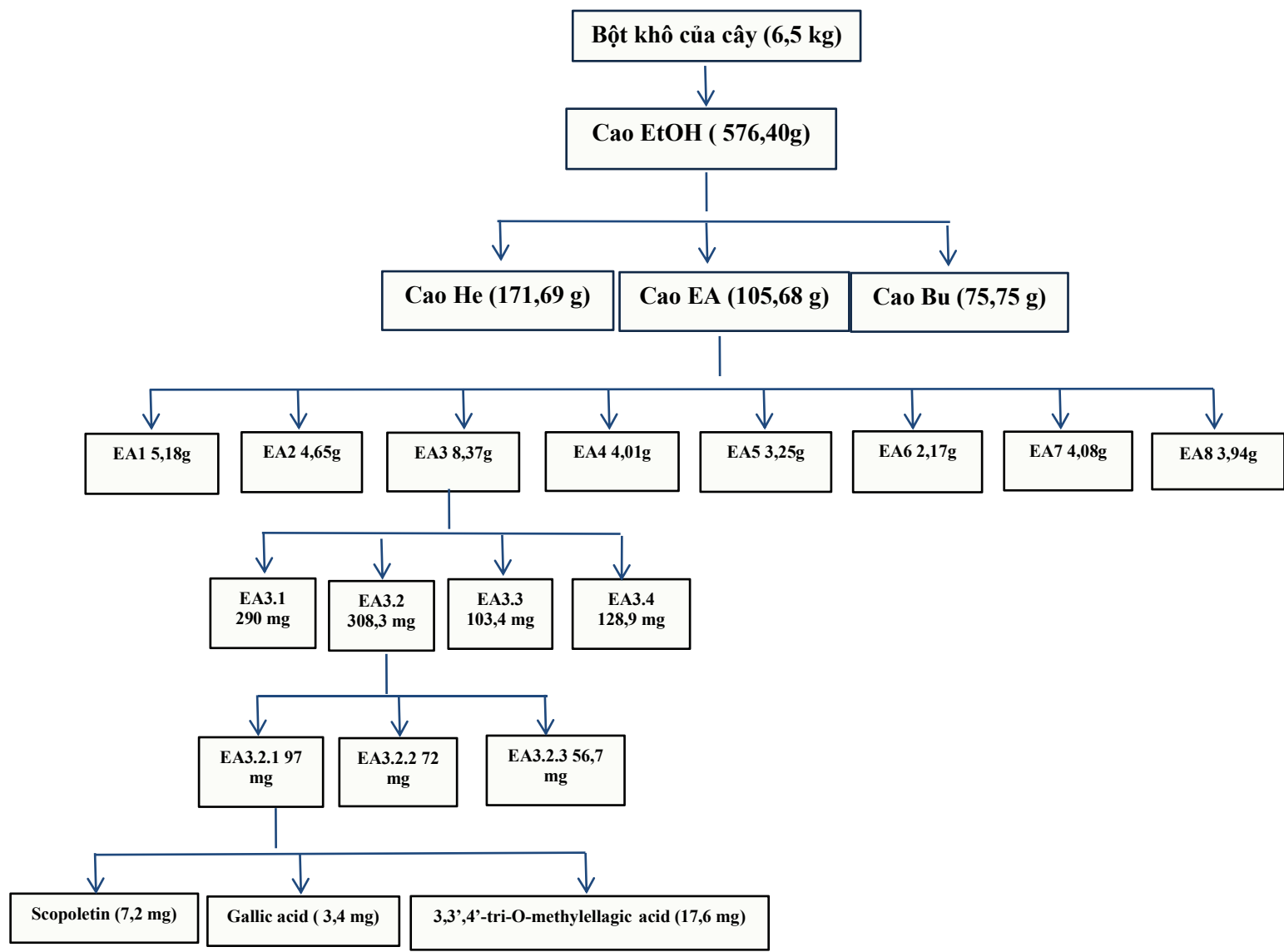
EA3 (4,01 g) được phân tách bằng sắc ký cột gel pha thường, giải ly với hệ dung môi ban đầu n-hexane: chloroform: ethyl acetate: acetone: acetic acid (350: 100: 40: 25: 10) để thu được 4 phân đoạn **EA3.1-4**. Trong 4 phân đoạn nhỏ thu được, phân đoạn EA3.2 có hoạt tính ức chế vi khuẩn *X. axonopodis* pv. *citri* cao hơn các phân đoạn còn lại do đó được lựa chọn để thực hiện bước tiếp theo.

EA3.2 (308 mg) tiếp tục được phân tách bằng sắc ký gel Sephadex LH-20 giải ly bằng methanol để thu được 3 phân đoạn **EA3.2.1-3**. Trong 3 phân đoạn nhỏ thu được, phân đoạn EA3.2.1 có hoạt tính ức chế vi khuẩn *X. axonopodis* pv. *citri* cao hơn các phân đoạn còn lại do đó được lựa chọn để phân lập hợp chất trong phân đoạn.

EA3.2.1 (97,0 mg) tiếp tục được phân tách bằng sắc ký cột pha đảo C18 với hệ dung môi giải ly metanol: nước (1: 2 → 1: 1) thu được 3 hợp chất. Trong đó, có hai hợp chất: scopoletin (7,0 mg) và gallic acid (3,4 mg) giống với hợp chất được phân lập ở cây giao thu nhận ở Bình Thuận và hợp chất còn lại, hợp chất 4 (3,3',4'-tri-O-methylellagic acid, 17,6 mg).



Hình 3.13. Kết quả phân lập các hợp chất từ mẫu cây giao (*E. tirucalli*) thu nhận ở Bình Thuận



Hình 3.14. Kết quả phân lập các hợp chất từ mẫu cây giao (*E. tirucalli*) thu nhận ở Đắk Nông

3.2.5.1. Hợp chất scopoletin (hợp chất 1)

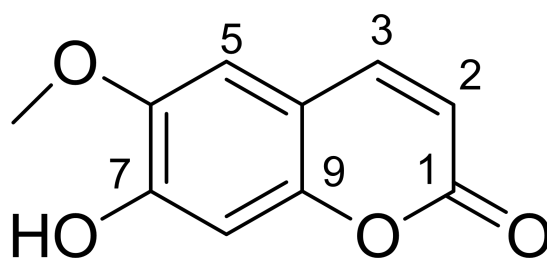
Hợp chất 1 được phân lập ở dạng bột vô định hình màu vàng nhạt. Dựa vào kết quả phổ NMR một chiều và hai chiều, dự đoán cấu trúc của chất 1 là scopoletin (Bảng 3.11 và Hình 3.15).

Bảng 3.11. Dữ liệu phổ NMR của hợp chất 1, 2 và 3

Vị trí	Hợp chất 1 (Scopoletin)		Hợp chất 2 (Gallic acid)		Hợp chất 3 (Piperic acid)	
	δ_H , J(Hz)	δ_C	δ_H , J(Hz)	δ_C	δ_H , J(Hz)	δ_C
1				122.2		131.4
2		160.4	7.14(1H, s)	110.4	7.11, d, 1.5	108.3
3	6.17, d, 9.5	112.4		146.4		148.1
4	7.84, d, 9.5	143.7		139.6		148.4
5	7.19, s	109.1		146.4	6.85, d, 9.0	105.4
6		144.9	7.14(1H, s)	110.4	7.00, dd, 9.0, 1.5	120.9
7		154.1		170.5	6.86, d, 15.5	137.5
8	6.80, s	102.8			6.97, dd, 15.5, 10.5	122.4
9		150.9			7.31, dd, 14.5, 10.5	141.8
10		111.2			6.86, d, 14.5	125.8
11						164.4
3-/5/6- OCH ₃	3.90	55.7				
O-CH ₂ -O					6.03	101.4

Phổ ^1H NMR cho thấy sự hiện diện của bảy cộng hưởng bao gồm: hai proton của nối đôi C=C của đồng phân cis là hai mũi đôi tại độ dịch chuyển δ_{H} 7,84 (1H), d, $J = 9,5$ Hz, H-4) và 6,17 (1H, d, $J=9,5$ Hz, H-3); hai proton của vòng thơm là hai mũi đơn tại δ_{H} 6,80 (H-8) và 7,19 (H-5), một mũi đơn là 3H của nhóm methoxy $-\text{OCH}_3$ ở δ_{H} 3,90 (3H, s) (Hình 4.3, Phụ lục 4)

Phổ ^{13}C - NMR của hợp chất 1 cho thấy 10 tín hiệu cacbon bao gồm: một nhóm cacbonyl este ở δ_{C} 160,4 (C-2), bốn phần tử methylen ở δ_{C} 143,7 (C-4), 112,4 (C-3), 109,1 (C-5) và 102,8 (C-8), một nhóm methoxy ở δ_{C} 55,7 và bốn cacbon bậc bốn thơm ở δ_{C} 111,2 (C-10), 144,9 (C-6), 150,9 (C-9) và 154,1 (C-7) (3 nguyên tử C sau có gắn với nguyên tử O) (Hình 4.4, Phụ lục 4). Dữ liệu NMR của hợp chất 1 tương tự như dữ liệu của scopoletin, do đó, hợp chất 1 được xác định là scopoletin.



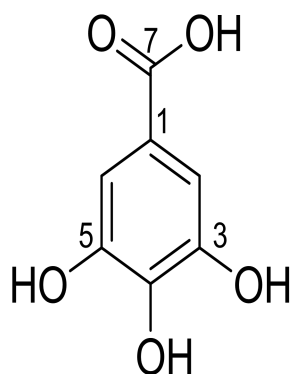
Hình 3.15. Cấu trúc hợp chất scopoletin

3.2.5.2. Hợp chất gallic acid (hợp chất 2)

Hợp chất 2 được phân lập dưới dạng chất vô định hình màu trắng. Dựa vào kết quả phổ NMR một chiều và hai chiều, dự đoán cấu trúc của chất 2 là gallic acid (Bảng 3.11 và Hình 3.16).

Phổ ^1H -NMR của hợp chất 2 cho thấy sự xuất hiện của một proton vòng thơm tại δ_{H} 7.14 (1H, s) và hai tín hiệu mũi tù đặc trưng cho nhóm OH tại δ_{H} 8.25 (brs) và 3.08 (brs) (Hình 4.5, Phụ lục 4).

Phổ ^{13}C -NMR của hợp chất 2 có thấy năm tín hiệu cộng hưởng. Trong đó có 4 tín hiệu của carbon vòng thơm tại δ_{C} 146.4, 139.6, 122.2, 110.4 và một tín hiệu carboxylic acid tại 170.5 ppm (Hình 4.6, Phụ lục 4).



Hình 3.16. Cấu trúc hợp chất 2 (gallic acid)

Dữ liệu phổ của hợp chất 2 gợi nhớ đến các hợp chất vòng đơn (mono aromatic compound) có cấu trúc đối xứng. Giả thuyết được củng cố bằng sự trùng chập hai tín hiệu carbon tại 146.4 và 110.4 trên phổ ^{13}C NMR. Mặc khác, kết hợp với độ dịch chuyển về vùng từ trường cao của proton 7.14 (1H, s) và sự tồn tại của một nhóm carboxylic acid giúp xác định cấu trúc hoá học của hợp chất 2.

So sánh dữ liệu phổ ^1H - và ^{13}C -NMR của hợp chất hợp chất 2 với số liệu phổ của gallic acid (Abraham Garcia và ctv, 2019) cho thấy có sự tương đồng, do đó cấu trúc của hợp chất 2 được đề nghị là gallic acid (Hình 3.16).

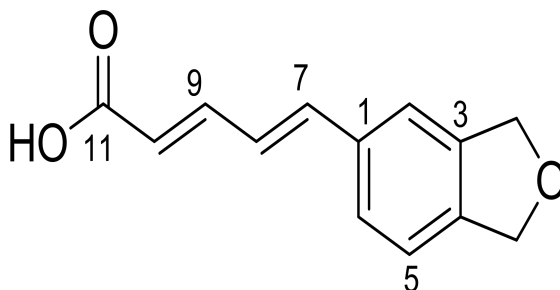
3.2.5.3. Hợp chất piperic acid (hợp chất 3)

Hợp chất 3 được phân lập dưới dạng chất vô định hình màu trắng. Dựa vào kết quả phổ NMR một chiều và hai chiều, dự đoán cấu trúc của chất 3 là piperic acid (Bảng 3.11 và Hình 3.17).

Phổ ^1H -NMR của hợp chất 3 cho thấy sự hiện diện của một mũi đơn là 3H của nhóm methoxy $-\text{OCH}_3$ ở δ_{H} 3,90 (3H, s) vòng 1,2,4-trisubstituted benzenoid ($\delta_{\text{H}} = 7,11$, d, $J = 1,5$; $\delta_{\text{H}} = 6,85$, d, $J = 9,0$; $\delta_{\text{H}} = 7,00$, dd, $J = 9,0, 1,5$), một nhóm metylen dioxy ($\delta_{\text{H}} = 6,03$, s), và bốn proton olefin từ $\delta_{\text{H}} = 6,86 - 7,31$ (Hình 4.7, Phụ lục 4).

Tín hiệu của phổ ^{13}C -NMR của hợp chất 3 được trình bày bao gồm một carbon cacbonyl, bảy nhóm methine sp^2 , một acetal metylen, và ba carbon thơm được thay thế. Phân tích sự kết hợp spin-spin của bốn proton olefin cho thấy sự hiện diện của hai liên kết đôi liên tiếp thông qua C-7 và C-10. Phân tích $J_{\text{H-7}/\text{H-8}}$ và $J_{\text{H-9}/\text{H-10}}$ (15,5 Hz) cho thấy cấu hình (E) của các liên kết đôi này (Hình 4.8, Phụ lục 4). Phổ HMBC thể hiện các đỉnh chéo của cả H-9 ($\delta_{\text{H}} = 7,31$) và H-10 ($\delta_{\text{H}} = 6,86$) với carbon cacbonyl C-11

($\delta_C = 164,4$) xác định liên kết của 11-COOH tại C-10. Tương tự, tương quan HMBC của H-7 ($\delta_H = 6,86$) và H-8 ($\delta_H = 6,97$) với C-1 ($\delta_C = 131,3$) chỉ ra liên kết của nhánh bên tại C-1. Cuối cùng, vị trí của nhóm metylen được xác định do mối tương quan HMBC với cả C-3 và C-4 (Hình 4.9, Phụ lục 4). Dữ liệu NMR của hợp chất 3 gần giống với dữ liệu của acid piperic, do đó, xác định hợp chất 3 là acid piperic (Takao và ctv, 2015).



Hình 3.17. Cấu trúc hợp chất 3 (piperic acid)

3.2.5.4. Hợp chất 3,3',4-tri-O-methylellagic acid (Hợp chất 4)

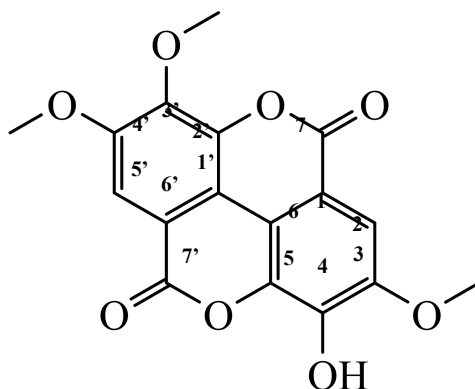
Hợp chất 4 được phân lập dưới dạng chất vô định hình màu trắng. Dựa vào kết quả phổ NMR một chiều và hai chiều, dự đoán cấu trúc của chất 4 là 3,3',4-Trimethylellagic acid (Bảng 3.12 và Hình 3.18).

Phổ $^1\text{H-NMR}$ của hợp chất 4 cho thấy sự xuất hiện của hai proton vòng thơm tại $\delta_H 7,54$ (1H, s), $\delta_H 7,48$ (1H, s) và ba tín hiệu cho nhóm CH_3 tại $\delta_H 4,07$ (3H, s), $\delta_H 4,06$ (3H, s) và $\delta_H 3,98$ (3H, s) (Hình 4.10, Phụ lục 4).

Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ của hợp chất 4 cho thấy 17 tín hiệu cacbon bao gồm: ba nhóm methyl ở $\delta_C 6,25$ (C-3), $60,91$ (C-3') và $56,66$ (C-4); hai nhóm cetone ở $\delta_C 158,47$ (C-7') và $158,29$ (C-7); một nhóm hydroxyl ở $\delta_C 153,68$ (C-4) và 15 cacbon bậc bốn thơm ở $\delta_C 111,70$ (C-1), $140,91$ (C-2), $140,71$ (C-3), $153,68$ (C-4), $107,38$ (C-5), $112,42$ (C-6), $158,29$ (C-7), $111,78$ (C-1'), $141,40$ (C-2'), $140,22$ (C-3'), $153,04$ (C-4'), $107,38$ (C-5'), $113,34$ (C-6'), $158,47$ (C-7') (Hình 4.11, Phụ lục 4). Dữ liệu NMR của hợp chất 4 tương tự như dữ liệu của 3,3',4'-tri-O-methylellagic acid đã được nghiên cứu và công bố bởi Khac và ctv, 1990. Do đó, hợp chất 4 được xác định là 3,3',4'-tri-O-methylellagic acid có cấu tạo Hình 3.18.

Bảng 3.12. Dữ liệu phổ NMR của hợp chất 4

Vị trí	Loại C	Hợp chất 4		3,3',4'-tri-O-methylellagic acid	
		$\delta_H(\text{ppm})$	$\delta_C(\text{ppm})$	$\delta_H(\text{ppm})$	$\delta_C(\text{ppm})$
1	>C<		111.70		111.62
2	>C<		140.91		141.23
3	>C<		140.71		140.26
4	>C<		153.68		152.23
5	-CH-	7.54 (1H, s)	107.38	7.73 (1H, s)	111.42
6	>C<		112.42		112.11
7	>C<		158.29		158.52
1'	>C<		111.78		111.65
2'	>C<		141.40		141.25
3'	>C<		140.22		140.23
4'	>C<		153.04		152.22
5'	-CH-	7.48 (1H, s)	107.38	7.61 (1H, s)	111.45
6'	>C<		113.34		112.12
7'	>C<		158.47		158.63
3-OMe	-CH ₃	4.07 (3H, s)	61.25	4.19 (3H, s)	61.53
3'-OMe	-CH ₃	4.06 (3H, s)	60.91	4.14 (3H, s)	61.26
4'-OMe	-CH ₃	3.98 (3H, s)	56.66	4.04 (3H, s)	56.51



Hình 3.18. Cấu trúc hợp chất 4 (3,3',4'-tri-O-methylellagic acid)

Qua kết quả phân lập các hợp chất cho thấy, hai hợp chất scopoletin và gallic acid đều có mặt trong cao phân đoạn EA (ethyl acetate) ở cây giao thu nhận ở hai vùng

Phan Thiết, Bình Thuận và Cujut, Đắk Nông. Hợp chất 3,3',4'-tri-O-methylelagic acid có mặt trong cao chiết phân đoạn EA từ cây giao thu nhận ở Cujut, Đắk Nông. Trong khi đó, hợp chất piperic acid có mặt trong cao chiết phân đoạn EA từ cây giao thu nhận ở Phan Thiết, Bình Thuận. Đây là hợp chất lần đầu tiên được cô lập trong nghiên cứu này từ cây giao ở Phan Thiết, Bình Thuận. Theo báo cáo của Le và ctv (2019), cao chiết EA (ethyl acetate) từ cây giao thu nhận ở Hàm Thuận Bắc, Bình Thuận cũng có chứa scopoletin và 3,3',4'-tri-O-methylelagic acid, nhưng không có sự hiện diện của gallic acid và piperic acid. Hợp chất gallic acid đã được ghi nhận có trong dịch chiết cây giao ở Brazil (Machado và ctv, 2016). Scopoletin đã được ghi nhận có mặt trong dịch chiết cây *Euphorbia dracunculoides* (Wang và ctv, 2014). 3,3',4'-tri-O-methylelagic acid cũng đã được báo cáo có mặt trong dịch chiết rễ cây *Euphorbia hylonoma* hand. -Mazz (Guo và ctv, 2007). Theo Upadhyay và ctv (2010), thành phần và tỷ lệ hợp chất thứ cấp trong thực vật phụ thuộc vào vị trí địa lý, mùa vụ khai thác và tuổi cây.

Theo các dẫn liệu nghiên cứu trước cho thấy, cả 4 hợp chất scopoletin, gallic acid, piperic acid và 3,3',4'-tri-O-methylelagic acid đều có hoạt tính ức chế nhiều vi khuẩn Gram (-), Gram (+). Scopoletin là một trong những Coumarin có hoạt tính ức chế nhiều vi khuẩn Gram (-) và Gram (+) như: *Salmonella Typhimurium* với giá trị MIC là 250 µg/mL (Prabowo và Agustina, 2020), vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 và *Pseudomonas* DMSC 37166 với giá trị MIC là 0,66 µg/mL (Napiroon và ctv, 2018), vi khuẩn Gram (+) (*Actinomyces naeslundii*, *Actinomyces israelii* và *Streptococcus mutans*) và Gram (-) (*Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis* và *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*) với giá trị MIC tương ứng từ 0,25 µg/mL đến 1,0 µg/mL và 0,5 µg/mL đến 1,0 µg/mL (More và ctv, 2012). Qua hình ảnh chụp SEM về cơ chế tác động của scopoletin lên tế bào vi khuẩn trong nghiên cứu của Napiroon và ctv (2018) cho thấy, scopoletin làm thay đổi cấu trúc thành tế bào của vi khuẩn. Cơ chế tác động của scopoletin lên tế bào vi khuẩn tương tự nhóm kháng sinh β-lactam: ngăn cản sự tạo vách tế bào, làm ly giải hoặc biến dạng vi khuẩn.

Gallic acid là một polyphenol có sẵn trong thực vật có nhiều hoạt tính sinh học như kháng khuẩn, kháng virus, chống oxy hóa, kháng viêm (Khanduja và ctv, 1999; Stoner và Gupta, 2001). Gallic acid có phổ kháng khuẩn rộng với nhiều vi khuẩn Gram (-) và Gram (+) như: ức chế vi khuẩn *X. citri* subsp. *citri* gây bệnh loét trên cây chanh

với giá trị MIC là 500 µg/mL (Silva và ctv, 2013), vi khuẩn *Staphylococcus aureus* và *Salmonella Typhimurium* với giá trị MIC tương ứng là 1250 µg/mL và 2500 µg/mL (Chanwitheessuk và ctv, 2007). Gallic acid còn có khả năng ức chế vi khuẩn gram (+): *Staphylococcus aureus* CMCC(B)26003 (MIC 0,63 µg/mL), *Bacillus cereus* CMCC(B)63301 (MIC 2,5 µg/mL), *Staphylococcus epidermidis* CMCC(B)26069 (MIC 0,63 µg/mL) và *Monilia albican* CMCC(F)98001 (MIC 5,0 µg/mL), các vi khuẩn gram (-) như: *E. coli* ATCC25922 (MIC 2,5 µg/mL), *S. typhimurium* CMCC(B)50115 (MIC 2,5 µg/mL), *Shigella flexneri* CMCC(B)51572 (MIC 2,5 µg/mL) và *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 (MIC 2,5 µg/mL) (Li và ctv, 2017), vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa* (MIC 500 mg/mL), *E. coli* (MIC 1500 mg/mL), *Staphylococcus aureus* (1750 mg/mL) và *Listeria monocytogenes* (2000 mg/mL). Cơ chế ức chế vi khuẩn chủ yếu của gallic acid là làm thay đổi đặc tính của màng tế bào như: tính thấm, điện tích, các đặc tính hóa lý, thay đổi tính kỵ nước, làm giảm điện tích âm ở bề mặt, xuất hiện hiện tượng vỡ cục bộ trên bề mặt màng tế bào hoặc hình thành lỗ trên màng tế bào gây hiện tượng rò rỉ các thành phần nội bào thiết yếu, làm chết vi khuẩn (Borges và ctv, 2013).

Zarai và ctv (2013) đã báo cáo piperic acid có khả năng ức chế vi khuẩn Gram (-): *E. coli*, *K. pneumoniae* và *S. enterica* với MIC tương ứng 312,5; 625 và 625 µg/mL; vi khuẩn Gram (+): *S. epidermidis*, *S. aureus*, *S. xyloso*, *B. subtilis*, *E. faecalis* với MIC tương ứng là 78,12; 312,5; 156,25; 156,25; 312,5 µg/mL. Theo Kuete và ctv (2007), 3,3',4'-tri-O-methylellagic acid có khả năng ức chế sự phát triển của 6 loài vi khuẩn Gram (-) và 13 loài vi khuẩn Gram (+) thử nghiệm. Như vậy, kết quả nghiên cứu là cơ sở khoa học khẳng định hoạt tính ức chế vi khuẩn *X. axonopodis* pv. *citri* của cao chiết EA.

3.2.6. Hàm lượng các hợp chất có trong cao chiết phân đoạn có hoạt tính ức chế vi khuẩn *X. axonopodis* pv. *citri* cao nhất

Giữa các cao phân đoạn từ cây giao thu ở 3 vùng Bình Thuận, Đăk Nông và Tp. HCM, cao phân đoạn ethyl acetate từ cây giao thu nhận ở Bình Thuận có hoạt tính ức chế vi khuẩn *X. axonopodis* pv. *citri* cao nhất và kết quả phân lập cho thấy có 3 hợp chất acid gallic, scopoletin và acid piperic. Hàm lượng 3 hợp chất acid gallic, scopoletin và acid piperic được xác định bằng kỹ thuật HPLC, kết quả được trình bày

trong Bảng 3.13. Hàm lượng acid gallic được xác định dựa vào đường chuẩn của acid gallic (Hình 3.3; Phụ lục 3) $y = 87,16392x - 60,14350$, $R^2 = 0,99967$; hàm lượng scopoletin được xác định dựa vào đường chuẩn của scopoletin (Hình 4.12; Phụ lục 4) $y = 38,34536x + 31,62261$, $R^2 = 0,99916$ và hàm lượng acid piperic được xác định dựa vào đường chuẩn của acid piperic (Hình 4.13; Phụ lục 4) $y = 84,05625x + 217,93638$, $R^2 = 0,99928$.

Bảng 3.13. Hàm lượng gallic acid, scopoletin và piperic acid trong cao toàn phần từ cây giao

STT	Tên hợp chất	Hàm lượng (mg/g)
1	Gallic acid	14,86
2	Scopoletin	21,81
3	Piperic acid	13,52

Qua Bảng 3.13 cho thấy, hàm lượng scopoletin trong cao toàn phần từ cây giao cao nhất là 21,81 mg/g cao chiết, tiếp đến là acid gallic và acid piperic với hàm lượng tương ứng là 14,86 mg/g cao chiết và 13,52 mg/g cao chiết. Theo nghiên cứu của Machado và ctv (2016), acid gallic trong cây giao ở Brazil chiếm 3,052% (30,52 $\mu\text{g/mL}$) cao hơn so với kết quả trong nghiên cứu này. Hai hợp chất scopoletin và acid gallic đã từng được Le và ctv (2019) phân lập trong chiết xuất từ cây giao ở Bình Thuận. Tuy nhiên, hàm lượng của hai hợp chất này chưa được xác định. Cho đến hiện tại, hàm lượng của hợp chất scopoletin và acid piperic trong chiết xuất từ cây giao chưa được báo cáo kể cả trong nước và trên thế giới.

3.3. Đánh giá hiệu quả đối với bệnh loét do vi khuẩn *X. axonopodis* pv. *citri* gây ra của cao chiết phân đoạn từ cây giao trong nhà lưới và ngoài đồng

Qua kết quả đánh giá khả năng ức chế vi khuẩn *X. axonopodis* pv. *citri* của các cao chiết phân đoạn từ cây giao thu nhận ở ba vùng Bình Thuận, Đắk Nông và Tp. HCM trong phòng thí nghiệm cho thấy, cao chiết phân đoạn ethyl acetate (EA) từ cây giao thu nhận ở Bình Thuận có hiệu quả cao nhất. Do đó, cao chiết phân đoạn EA từ cây giao thu nhận ở Bình Thuận được lựa chọn để thực hiện thử nghiệm đánh giá hiệu quả đối với bệnh loét do vi khuẩn *X. axonopodis* pv. *citri* trong nhà lưới và ngoài đồng

ở các nồng độ khác nhau.

3.3.1. Đánh giá hiệu quả đối với bệnh loét do vi khuẩn *X. axonopodis* pv. *citri* của cao chiết EA từ cây giao ở các nồng độ khác nhau trong điều kiện nhà lưới

Kết quả kích thước vết bệnh và đánh giá hiệu quả giảm bệnh loét trên cây chanh do vi khuẩn *X. axonopodis* pv. *citri* khi được xử lý với cao chiết EA ở các nồng độ khác nhau được trình bày ở Bảng 3.14 và Bảng 3.15.

Qua Bảng 3.14 cho thấy, khi xử lý bằng cao chiết EA (0,25%), kích thước trung bình vết bệnh giảm nhưng khác biệt không có ý nghĩa so với thời điểm trước phun ở các thời điểm theo dõi ngoại trừ 14 NSP lần 3 và 21 NSP lần 3. Kích thước trung bình vết bệnh tại thời điểm 14 NSP lần 3 và 21 NSP lần 3 tương ứng là 1,3 và 1,1 mm, trong khi mẫu đối chứng là 1,8 và 1,9 mm.

Bảng 3.14. Kích thước vết bệnh (mm) ở các thời điểm theo dõi

TN	Kích thước vết bệnh (mm)					
	TP	7 NSP lần 1	7 NSP lần 2	7 NSP lần 3	14 NSP lần 3	21 NSP lần 3
Cao EA (0,25%)	1,5 ^c	1,4 ^{bc}	1,4 ^{bc}	1,4 ^{bc}	1,3 ^{ab}	1,1 ^a
Cao EA (0,5%)	1,7 ^d	1,5 ^c	1,5 ^c	1,4 ^{bc}	1,20 ^{ab}	1,07 ^a
Cao EA (0,75%)	1,7 ^d	1,5 ^c	1,3 ^b	1,1 ^{ab}	0,97 ^a	0,95 ^a
Cao EA (1,0%)	1,7 ^c	1,3 ^b	1,1 ^{ab}	1,07 ^a	0,95 ^a	0,91 ^a
Copper oxychloride (0,25%)	1,8 ^d	1,3 ^c	1,2 ^{bc}	1,05 ^{ab}	0,99 ^{ab}	0,89 ^a
Streptomycin sulfate (0,1%)	1,7 ^d	1,4 ^c	1,2 ^b	1,08 ^b	0,95 ^a	0,88 ^a
Đối chứng (nước lã)	1,4 ^a	1,5 ^{ab}	1,7 ^{abc}	1,7 ^{abc}	1,8 ^{bc}	1,9 ^c

Trong cùng một hàng chỉ tiêu, các giá trị có ít nhất một chữ cái đi kèm giống nhau thì sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) theo trắc nghiệm DUNCAN. TP: trước phun, NSP: ngày sau phun; EA: cao ethyl acetate.

Khi xử lý với cao chiết EA (0,5%), kích thước trung bình vết bệnh giảm và khác biệt có ý nghĩa so với thời điểm trước phun ở tất cả các thời điểm theo dõi. Trong đó, 7 NSP lần 1, 7 NSP lần 2 và 7 NSP lần 3 có kích thước trung bình vết bệnh là 1,5; 1,5 và 1,4 mm, khác biệt không có ý nghĩa với nhau. Tại thời điểm 14 NSP lần 3 và 21 NSP lần 3, kích thước trung bình vết bệnh là 1,2 và 1,07 mm, giảm tương ứng là 0,5 và 0,63 mm (số liệu không biểu diễn) so với thời điểm trước phun.

Khi xử lý với cao chiết EA (1,0%), kích thước trung bình vết bệnh loét ở 7 NSP lần 1 và 7 NSP lần 2 tương ứng là 1,3 và 1,1 mm, giảm 0,3 và 0,5 mm so với thời điểm trước phun. Từ thời điểm 7 NSP lần 3 trở đi, kích thước vết bệnh giảm trong khoảng từ 0,63 ÷ 0,79 mm so với thời điểm trước khi phun. 21 NSP lần 3, kích thước trung bình vết bệnh nhỏ nhất 0,91 mm, trong khi mẫu đối chứng là 1,9 mm. Từ kết quả trên cho thấy, hiệu quả làm giảm kích thước vết bệnh của cao chiết EA trong nghiên cứu này cao hơn so với dịch chiết từ quả *Chebolic myrobalan* trong báo cáo của Vudhivanich (2003). Theo nhóm giả, dịch chiết từ quả *Chebolic myrobalan* nồng độ 50.000 ppm làm giảm kích thước vết bệnh loét do vi khuẩn *X. axonopodis* pv. *citri* gây ra. Kích thước trung bình vết bệnh tại các thời điểm 15; 20 và 30 ngày sau xử lý là 0,62; 0,97 và 1,40 mm so với mẫu đối chứng là 0,97; 1,84 và 3,00 mm.

Qua Bảng 3.15 cho thấy, hiệu quả giảm bệnh loét trên cây chanh do vi khuẩn *X. axonopodis* pv. *citri* của cao chiết EA ở các nồng độ khảo sát tại thời điểm 7 NSP lần 1, 7 NSP lần 2 và 7 NSP lần 3 khá thấp đạt trong khoảng từ 3,74 ÷ 28,65%. Từ 14 NSP lần 3 trở đi, hiệu quả giảm bệnh gia tăng theo chiều tăng nồng độ cao chiết EA. Cụ thể, tại thời điểm 14 NSP lần 3, khi xử lý với cao chiết EA (0,25%), hiệu quả giảm bệnh là 17,60%. Khi xử lý với cao chiết EA (0,75% và 1,0%), hiệu quả giảm bệnh tương ứng là 43,48 và 47,58%. Hiệu quả giảm bệnh của cao chiết EA ở nồng độ từ 0,5% trở lên khác biệt có ý nghĩa so với cao chiết EA ở nồng độ 0,25%.

Tại thời điểm 21 NSP lần 3, nồng độ cao chiết EA từ 0,75% trở lên có hiệu quả giảm bệnh trên cây chanh trên 50%. Trong đó, cao chiết EA ở nồng độ 0,75% có hiệu quả giảm bệnh 54,92%, ở nồng độ 1,0% hiệu quả 67,84%.

Bảng 3.15. Hiệu quả phòng trừ bệnh loét trên cây chanh của cao EA ở các nồng độ khác nhau trong điều kiện nhà lưới

Nghiệm thức	Hiệu lực phòng trừ (%)				
	7 NSP lần 1	7 NSP lần 2	7 NSP lần 3	14 NSP lần 3	21 NSP lần 3
Cao EA (0,25%)	3,74 ^a	6,17 ^a	12,05 ^a	17,60 ^a	26,65 ^a
Cao EA (0,50%)	9,71 ^{ab}	13,57 ^{ab}	21,08 ^{ab}	39,85 ^b	48,14 ^b
Cao EA (0,75%)	14,78 ^b	16,09 ^{bc}	23,14 ^b	43,48 ^{bc}	54,92 ^{bc}
Cao EA (1,00%)	15,39 ^b	18,08 ^{bc}	28,65 ^{bc}	47,58 ^{bc}	67,84 ^{cd}
Copper oxychloride (0,25%)	18,02 ^b	24,50 ^c	34,97 ^c	54,13 ^c	79,83 ^d
Streptomycin-sulfate (0,1%)	17,24 ^b	19,78 ^{bc}	30,04 ^{bc}	48,75 ^{bc}	74,5 ^d
Đối chứng	-	-	-	-	-

Trong cùng một cột, các giá trị ít nhất một chữ cái đi kèm giống nhau thì sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức $p < 0,05$ theo trắc nghiệm DUNCAN, NSP: ngày sau phun; EA: cao ethyl acetate.

Qua các kết quả ở Bảng 3.14 và Bảng 3.15 cho thấy, cao chiết EA từ cây giao ở nồng độ từ 0,75% trở lên làm giảm đáng kể kích thước trung bình vết bệnh (> 0,75 mm) và có hiệu quả làm giảm bệnh loét trên cây chanh do vi khuẩn *X. axonopodis* cao (> 50%). Một số nghiên cứu trước đây có đánh giá khả năng ức chế vi khuẩn *X. axonopodis* của dịch chiết từ cây giao, nhưng chỉ dừng lại ở quy mô phòng thí nghiệm. Cho đến thời điểm hiện tại, chưa có nghiên cứu đánh giá hiệu lực giảm bệnh loét của dịch chiết cây giao trong nhà lưới. Do đó, nghiên cứu này là báo cáo đầu tiên chứng minh hiệu lực giảm bệnh loét của dịch chiết cây giao trong nhà lưới. Bên cạnh đó, kết quả của nghiên cứu cũng nhằm mục đích khẳng định tiềm năng ứng dụng dịch chiết từ thảo mộc trong việc thay thế các loại thuốc BVTV có nguồn gốc từ hóa học và kháng sinh gây hại cho môi trường và sức khỏe con người; làm nền tảng cho thử nghiệm ứng dụng dịch chiết cây giao trong quản lý bệnh loét trên cây chanh ngoài đồng.

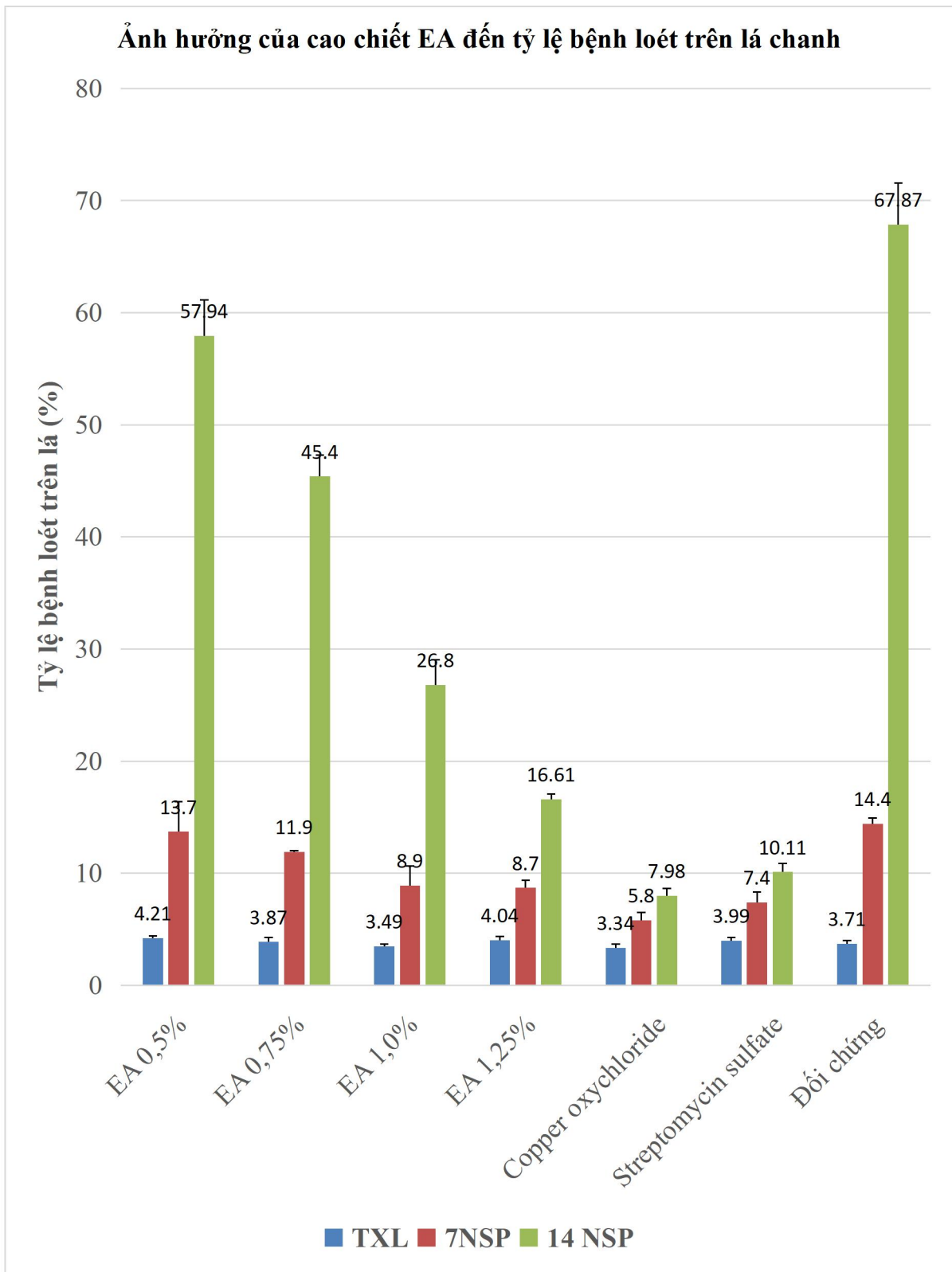
3.3.2. Hiệu quả phòng trừ bệnh loét do vi khuẩn *X. axonopodis* pv. *citri* gây ra trên cây chanh của cao chiết ethyl acetate từ cây giao ở các nồng độ khác nhau ngoài đồng

Từ những nghiên cứu, đánh giá về khả năng ức chế vi khuẩn *X. axonopodis* pv. *citri* gây bệnh loét trên cây chanh của cao chiết ethyl acetate (EA) từ cây giao trong phòng thí nghiệm, trong nhà lưới, một khảo nghiệm ngoài đồng ruộng tại xã Bình Hòa Nam, huyện Đức Huệ, tỉnh Long An đã được thực hiện để đánh giá hiệu quả phòng trừ bệnh loét trên cây chanh của cao chiết EA với các nồng độ từ 0,5% ÷ 1,25%. Bệnh loét trên cây chanh thường gây hại trên bộ phận non (lá non, cành non và quả non). Sâu vẽ bùa là nhân tố thường làm gia tăng tình trạng bệnh nặng hơn. Do đó, trước khi phun xử lý, tất cả các nghiệm thức được phun đồng đều thuốc sinh học Anisaf SH01 (1,0%).

3.3.2.1. Hiệu quả phòng trừ bệnh loét trên lá chanh của cao chiết ethyl acetate ở các nồng độ khác nhau

Kết quả Hình 3.19 cho thấy nồng độ cao chiết ethyl acetate (EA) từ cây giao tác động có ý nghĩa thống kê đến tỷ lệ bệnh loét trên lá chanh tại thời điểm 7 và 14 NSP. Tại thời điểm trước khi xử lý, tỷ lệ bệnh loét trên lá từ 3,34% đến 4,04%, điều này cho thấy các yếu tố thí nghiệm tương đối đồng đều. Ở thời điểm 7 NSP, tỷ lệ bệnh trên lá chanh chịu ảnh hưởng rõ rệt bởi nồng độ cao chiết EA khác nhau (0,5; 0,75; 1,0 và 1,25%). Tỷ lệ bệnh cao nhất 13,7% khi xử lý cao chiết EA 0,5% và thấp nhất 8,7% khi xử lý cao chiết EA 1,25%. Kết quả tương tự cũng được ghi nhận tại thời điểm 14 NSP.

Chỉ số bệnh trên lá chanh tại các thời điểm 7 và 14 NSP cũng chịu tác động rõ rệt bởi các nồng độ cao chiết EA và được thể hiện trong Bảng 3.16. Chỉ số bệnh trên lá càng giảm khi được phun cao chiết EA nồng độ tăng dần từ 0,5 đến 1,25%. Tại thời điểm 7 NSP, chỉ số bệnh cao nhất đạt 2,93 khi được phun cao chiết EA 0,5%, khác biệt có ý nghĩa với cao chiết EA nồng độ 1,0% và 1,25%, khác biệt không có ý nghĩa với cao chiết EA nồng độ 0,75%. Kết quả tương tự cũng được ghi nhận tại thời điểm 14 NSP, nhưng chỉ số bệnh khi được phun cao chiết EA 0,5% khác biệt rất có ý nghĩa so với các nồng độ cao chiết EA còn lại trong thí nghiệm.



Hình 3.19. Ảnh hưởng của nồng độ cao chiết EA (ethyl acetate) đến tỷ lệ bệnh loét trên lá chanh (TXL: trước xử lý; NSP: ngày sau phun).

Bảng 3.16. Ảnh hưởng của các nồng độ EA xử lý đến chỉ số bệnh và hiệu quả giảm bệnh trên lá chanh (%)

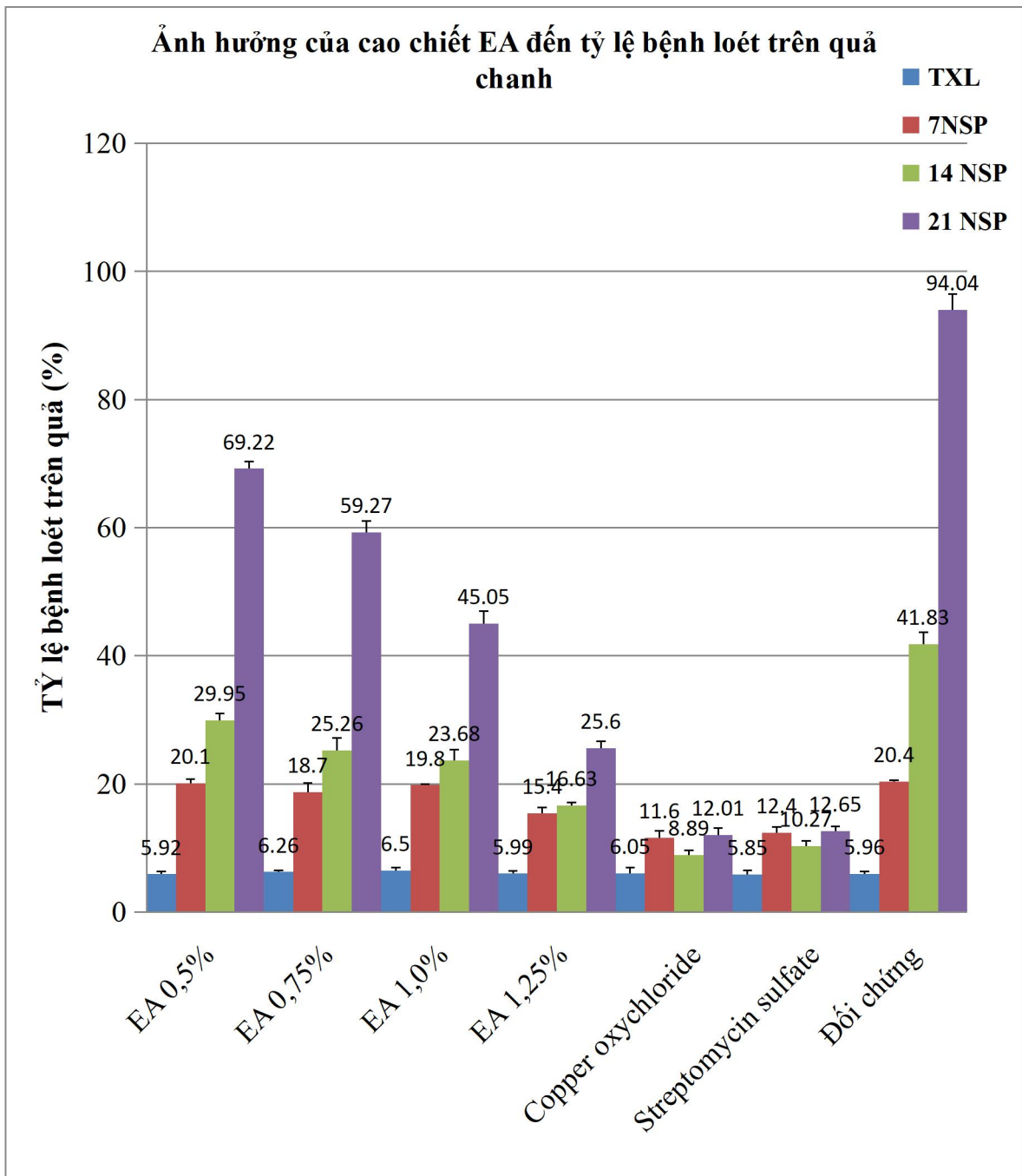
Nghiệm thức	TXL	7 NSP	14 NSP	HQGB (%)
Cao EA (0,5%)	1,00 ^b	2,93 ^{ef}	13,43 ^e	21,50 ^a
Cao EA (0,75%)	0,94 ^{ab}	2,54 ^{de}	10,79 ^d	28,01 ^b
Cao EA (1,0%)	0,90 ^{ab}	1,96 ^{bc}	6,14 ^c	46,40 ^c
Cao EA (1,25%)	0,98 ^b	1,87 ^{bc}	3,98 ^b	63,75 ^d
Copper oxychloride (0,25%)	0,80 ^a	1,30 ^a	1,74 ^a	77,17 ^e
Streptomycin sulfate (0,1%)	0,95 ^b	1,58 ^{ab}	2,10 ^a	77,45 ^e
Đôi chứng (nước lã)	0,91 ^{ab}	3,12 ^f	18,40 ^f	-

Trong cùng một cột chỉ tiêu, các giá trị có ít nhất một chữ cái đi kèm giống nhau thì không khác biệt có ý nghĩa ở mức 0,05 theo trắc nghiệm DUNCAN, TXL: trước xử lý; NSP: ngày sau phun; HQGB: hiệu quả giảm bệnh; EA: cao ethyl acetate.

Ngoài ra, kết quả Bảng 3.16 cũng cho thấy tại thời điểm 14 NSP, hiệu quả giảm bệnh loét trên lá có chiều hướng tăng dần theo chiều tăng nồng độ cao chiết EA, khác biệt có ý nghĩa ở cả bốn nghiệm thức. Trong đó, cao chiết EA (1,25%) có hiệu quả giảm bệnh loét trên lá cao nhất (63,75%), tiếp đến là cao chiết EA (1,0%) (46,40%). Cao chiết EA (0,5%) có hiệu quả giảm thấp nhất (21,50%). Như vậy, cao chiết EA nồng độ từ 0,5% đến 1,25% có hiệu quả giảm bệnh loét trên lá chanh.

3.3.2.2. Hiệu lực phòng trừ bệnh loét trên quả chanh của cao chiết EA ở các nồng độ khác nhau

Kết quả Hình 3.20 cho thấy nồng độ cao chiết EA từ cây giao tác động có ý nghĩa đến tỷ lệ bệnh loét trên quả chanh tại thời điểm 7, 14 NSP và 21 NSP.



Hình 3.20. Ảnh hưởng của nồng độ cao chiết EA đến tỷ lệ bệnh loét trên quả chanh (TXL: trước xử lý; EA: cao ethyl acetate; NSP: ngày sau phun)

Chỉ số bệnh loét trên quả chanh tại các thời điểm 7, 14 và 21 NSP cũng chịu tác động rõ rệt bởi các nồng độ cao chiết EA được thể hiện trong Bảng 3.17. Nhìn chung, chỉ số bệnh loét trên quả càng giảm khi được phun cao chiết EA nồng độ tăng dần từ 0,5 đến 1,25%. Tại thời điểm 7 NSP, chỉ số bệnh cao nhất (4,9) khi được phun cao chiết EA 0,5%, khác biệt không có ý nghĩa với cao chiết EA nồng độ 0,75 và 1,0% nhưng khác biệt có ý nghĩa với cao chiết EA nồng độ 1,25%. Kết quả tương tự cũng được ghi nhận tại thời điểm 14 và 21 NSP, nhưng có sự khác biệt rõ rệt có ý nghĩa giữa các nghiệm thức.

Ngoài ra, kết quả Bảng 3.17 cũng cho thấy tại thời điểm 21 NSP, hiệu quả giảm bệnh loét trên quả chanh từ 24,04% đến 61,29%, có chiều hướng tăng dần theo chiều tăng nồng độ cao chiết EA, khác biệt có ý nghĩa ở cả bốn nghiệm thức.

Bảng 3.17. Ảnh hưởng của các nồng độ cao chiết EA đến chỉ số bệnh và hiệu quả giảm bệnh trên quả chanh (%)

Ng nghiệm thức	TXL	7 NSP	14 NSP	21 NSP	HQGB (%)
Cao EA (0,5%)	1,58 ^a	4,9 ^c	10,47 ^e	27,18 ^e	24,04 ^a
Cao EA (0,75%)	1,59 ^a	4,7 ^c	9,41 ^d	20,30 ^d	36,92 ^b
Cao EA (1,0%)	2,02 ^b	4,9 ^c	8,03 ^c	13,50 ^c	50,87 ^c
Cao EA (1,25%)	1,57 ^a	3,4 ^b	4,49 ^b	5,94 ^b	61,29 ^d
Copper oxychloride (0,25%)	1,47 ^a	2,7 ^a	2,81 ^a	2,83 ^a	70,58 ^e
Streptomycin sulfate (0,1%)	1,53 ^a	2,8 ^a	2,84 ^a	2,84 ^a	70,78 ^e
Đối chứng (nước lã)	1,56 ^a	5,5 ^d	14,76 ^f	50,53 ^f	-

Trong cùng một cột, các giá trị có ít nhất một chữ cái đi kèm giống nhau thì không khác biệt có ý nghĩa ở mức 0,05 theo trắc nghiệm DUNCAN, Cao EA: cao ethyl acetate, TXL: trước xử lý, NSP: ngày sau phun; HQGB: hiệu quả giảm bệnh.

Trong đó, cao chiết EA từ 1,0% trở lên có hiệu quả giảm bệnh cao nhất đạt trên 50%. Cao chiết EA từ 1,25% có hiệu quả giảm bệnh cao nhất đạt 61,29%. Như vậy, cao chiết EA nồng độ từ 0,5% đến 1,25% có hiệu quả giảm bệnh loét trên quả chanh.

Tóm lại, qua các kết quả cho thấy, cao chiết EA từ cây giao có hiệu quả giảm bệnh loét trên lá, quả chanh. Trong đó, cao chiết EA (1,25%) cho hiệu quả giảm bệnh loét tốt cả trên lá và trái. Theo nhiều nghiên cứu trước đây cũng cho thấy, việc sử dụng thuốc bảo vệ thực vật có nguồn gốc hóa học hoặc kháng sinh ngoài việc giảm trừ được bệnh hại cây trồng còn làm ảnh hưởng đến môi trường sinh thái, suy thoái nguồn đất, tồn dư thuốc bảo vệ thực vật trên sản phẩm làm ảnh hưởng đến sức khỏe người tiêu dùng, xuất khẩu. Do đó, cao chiết EA từ cây giao có thể thay thế việc sử dụng thuốc hóa học Copper oxychloride và Streptomycin sulfate trong quản lý bệnh loét trên cây

chanh hiện nay góp phần an toàn cho môi trường sinh thái và đảm bảo sức khỏe cho người tiêu dùng và xuất khẩu.

CHƯƠNG 4: KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

4.1. Kết luận

Theo đặc điểm sinh hóa và giải trình tự các vùng gen 16S rDNA, *hrpW* và *pthA* đã xác định nguyên nhân gây bệnh loét trên cây chanh không hạt và chanh giầy tại Long An, Việt Nam là do vi khuẩn *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* gây ra. Trình tự 9 MPL vi khuẩn đã được đưa vào Genebank với mã số MT328595 - MT328603.

Trong 3 vùng nguyên liệu ở Đắc Nông, Tp. Hồ Chí Minh và Bình Thuận, hiệu suất cao toàn phần ethanol (EtOH) thu nhận từ nguồn cây giao ở Bình Thuận là cao nhất đạt 9,48%. Cao chiết phân đoạn ethyl acetate (EA) có sự hiện diện các nhóm hợp chất alkaloid, flavonoid, tannin, terpenoid và không có sự hiện diện của nhóm saponin. Hàm lượng phenolic tổng và flavonoid tổng thu được trong cao chiết EA là cao nhất, tương ứng 106,32 mgGAE/g và 450,83 µgQE/g. Cao chiết EA nồng độ 0,75% có khả năng ức chế vi khuẩn *X. axonopodis* pv. *citri* rất cao với đường kính vòng vô khuẩn lớn 17,67mm. Trong cao phân đoạn EA có sự hiện diện của các chất scopoletin, gallic acid và piperic acid với hàm lượng lần lượt 21,81 mg/g; 14,86 mg/g, 13,52 mg/g cao chiết và đều có hoạt tính ức chế vi khuẩn *X. axonopodis* pv. *citri* gây bệnh loét trên cây chanh. Trong đó, hợp chất piperic acid là một chất mới thu được trong cao chiết từ cây giao ở Bình Thuận.

Trong điều kiện nhà lưới, hiệu lực phòng trừ bệnh loét tại thời điểm 21 NSP lần 3 của cao chiết EA ở nồng độ 0,75 và 1,0% lần lượt 54,9 và 67,84%, kích thước vết bệnh giảm 0,7 mm so với đối chứng (nước lã).

Trong thử nghiệm ngoài đồng, tại thời điểm 14 NSP, hiệu lực giảm bệnh loét trên lá chanh của cao chiết EA nồng độ 1,25% đạt 63,75%. Tại thời điểm 21 NSP, hiệu lực giảm bệnh loét trên quả chanh của cao chiết EA nồng độ 1,0 và 1,25% tương ứng là 50,87 và 61,29%.

4.2. Đề nghị

Tiếp tục đánh giá hiệu quả phòng trừ bệnh loét do vi khuẩn *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* gây ra trên cây chanh của cao chiết ethyl acetate (EA) ở nồng độ 1,25% và có thể tăng nồng độ khảo sát để tăng hiệu quả phòng trừ bệnh ngoài đồng.

Tiếp tục nghiên cứu cơ chế tác động của các hợp chất hiện diện trong cao chiết

ethyl acetate đến vi khuẩn *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*.

DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH NGHIÊN CỨU CÓ LIÊN QUAN ĐÃ CÔNG BỐ

1. Nguyễn Thị Mỹ Lệ, Nguyễn Thị Ngọc Loan, Trần Thị Lệ Minh, Võ Thị Thu Oanh, Nguyễn Vũ Phong. 2020. Đặc điểm trình tự vùng gene *hrpW*, *pthA* của vi khuẩn *Xanthomonas axonopodis* gây bệnh loét trên cây chanh. Hội nghị Công nghệ sinh học toàn quốc 2020. 1-7.
2. Nguyen Thi My Le, Dang Xuan Cuong, Pham Van Thinh, Trương Ngọc Minh, Trần Đình Mạnh, Dương Thúc Huy, Trần Thị Lê Minh, Võ Thị Thu Oanh. 2021. Phytochemical screening and evaluation of antioxidant properties and antimicrobial activity against *Xanthomonas axonopodis* of *Euphorbia tirucalli* extracts in Binh Thuan province, Vietnam. *Molecules* 26(941): 1-11.
3. Le T.M. Nguyen, Phong V. Nguyen, Minh T.L. Tran, & Oanh T. T. Vo. 2021. Isolation and characterization of antibacterial compounds from *Euphorbia tirucalli* against *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* cause lime tree canker, *The Journal of Agriculture and Development* (Đã chấp nhận đăng).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Abhang P.B., Totawar M.V. and Kadam R., 2015. Biochemical characterization of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* for identification of citrus canker disease. *J. Basic.Sci.*10: 30-33
2. Abraham G., Francisco G.A., Veronica M.G. and Claudia D.P., 2019. Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy Data of isolated compounds from *Acacia farnesiana* (L) Willd fruits and two esterified derivatives. *Data in Brief.* 22: 255-268.
3. Akthar M.S., Degaga B., Azana T., 2014. Antimicrobial activity of essential oils extracted from medicinal plants against the pathogenic microorganisms: A review. *Issues Bio Sci Pharm Res.* 2: 001-007.
4. Alegria M.C., Docena C., Khater L., Ramos C.H.I., da Silva A.C.R. and Farah C.S., 2004. New protein–protein interactions identified for the regulatory and structural components and substrates of the type III secretion system of the phytopathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *J. Bacteriol.*186: 6186-6197.
5. Aleixo T.B., Calmon J.R., Falconi A.P., Souza A.R., Duarte R.S., Fagundes L.L., and Machado R.R.P., 2018. Phytochemical screening and investigation of antimicrobial activity from derivatives of Aveloz (*Euphorbia tirucalli* L.). *SOJ Microbiol. Infect. Dis.* 6(1): 1-7.
6. Alizadeh A. and Rahimian H., 1990. Citrus canker in Kerman province. *Iranian J. Plant Pathol.* 26: 118.
7. Al-Saleh M.A., Widyawan A., Saleh A.A. and Ibrahim Y.E., 2014. Distribution and pathotype identification of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* recovered from southwestern region of Saudi Arabia. *Afr. J. Microbiol. Res.* 8: 673-679.
8. Araújo K.M., Lima A., Silva J.N., Rodrigus L.L., Amorim A.G.N., Quelemes P.V., Santos R.C., Rocha J.A., Andrades E.O., Leite J.R.S.A., Mancini-Fiho J. and Trindade R.A., 2014. Identification of phenolic compounds and evaluation of antioxidant and antimicrobial properties of *Euphorbia tirucalli* L. *Antioxidants*, 3: 159-175.
9. Arshiya M., Suryawanshi A., More D. and Baig M.M.V. 2014. Reptitive PCR based detection of genetic diversity in *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* strains. *J. Appl. Biol. Biotechnol.* 2(1): 17-22.

10. Atiq M., Khan M.A., Sahi S.T., Ahmad R., Younas M., Shafiq M. and Ali Y., 2019. Appraisal of plant extracts and streptomycin sulfate against citrus canker disease, *Archi. Phytopathol. Plant Protect.* 2019: 1-10.
11. Baldwin B.G., Sanderson M.J., Porter J.M., Wojciechowski M.F., Campbell C.S. and Donoghue M.J., 1995. The ITS region of nuclear ribosomal DNA-A valuable source of evidence on Angiosperm phylogeny. *Ann. Mo. Bot. Gard.* 82: 247-277.
12. Beniwal S.P.S., and Chaubey S.N., 1976. Thiram, a fungicide effective against *Xanthomonas citri* (Hasse) Dowson. *Pedicides.* 10: 31-36.
13. Betancur-Galvis L.A., Morales G.E., Forero J.E. and Roldan J., 2002. Cytotoxic and antiviral activities of colombian medicinal plant extracts of the *Euphorbia* genus. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.* 97: 541-546.
14. Bharadwaj N., Upadhyay V., and Nagar M., 2014. Biochemical characterization of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. causal agent of citrus canker. *The Bioscan.* 9(1): 429-431.
15. Bora L.C., Das M., and Samuel J., 2001. Medicinal plant extracts for management of citrus canker and bacterial leaf spot of betelvine. *J. the Agricult. Scie. Soci. Nor. East India.* 14(2): 159-164.
16. Borges A., Ferreira C., Saavedra M.J., and Simoes M., 2013. Antibacterial activity and mode of action of ferulic and gallic acids against pathogenic bacteria. *Micro. Drug Resis.* 19 (4): 256-265.
17. Braithwaiten M., Leite R.P., Smith J.J. and Boa E., 2002. First report of citrus canker caused by *Xanthomonas campestris* pv. *citri* on *citrus sinensis* in Bolivia. *Plant Pathol.*, 51(3): 383-383.
18. Brain K.R., and Turner T.D., 1975. *The practical evaluation of phytopharmaceuticals*, 1st editor, Wright-scientechnica, Bristol, 198 pages.
19. Brunings A.M. and Gabriel D.W., 2003. *Xanthomonas citri*: breaking the surface. *Mol. Plant Pathol.* 4(3): 141-157.
20. Bui T. N. L., Vernière C., Pruvost O., So T. and Johnson G.I., 2008. First report of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* – A* causing citrus canker on lime in Cambodia. *Plant Dis.* 92: 1588.

21. Cahyo P.W., Ruslan W.K. and Muhamad I., 2013. Isolation and characterization Of 3-acetyl aleuritolic acid and scopoletin from stem bark of *aleurites moluccana* (L.) Wild, *Inter. J. Phar. Phar. Sci.* 5(3): 851-853
22. Caxito M.L., Do C., Victório C.P., Costa H.B. da Romão W., Kuster R.M. and Gattass C.R., 2017. Antiproliferative activity of extracts of *Euphorbia tirucalli* L. (Euphorbiaceae) from three regions of Brazil. *Trop. J. Pharm. Res.* 16(5): 1013-1020.
23. Chakravarti B.P., Porwal S. and Rangarajan M., 1966. Studies on citrus canker in Rajasthan. I. Disease incidence and survival of the pathogen. *Lab. J. Scie. and Tech.* 4: 262-265.
24. Chand R., and Kishun R., 1991. Studies on bacterial blight (*Xanthomonas campestris* pv. *punicae*) of pomegranate. *J. Ind. Phytopathol.* 44: 370-371.
25. Chanwitheesuk A., Teerawutgulrag A., Kiburn J. D., and Rakariyatham N., 2007. Antimicrobial gallic acid from *Caesalpinia mimosoides* Lamk., *Food Chemistry*, 100 (3): 1044-1048.
26. Choene M. and Motadi L., 2016. Validation of the antiproliferative effects of *Euphorbia tirucalli* extracts in breast cancer cell lines. *Mol. Biol. (Mosk)*, 50: 115-127
27. Ciocan I.D., and Băra I., 2007. Plant products as antimicrobiol agents. *Analele Științifice ale Universității, Alexandru Ioan Cuza”, Secțiunea Genetică și Biologie Moleculară*, Tom VIII: 151-156.
28. Cooke B.M., 2006. Disease assessment and yield loss. In *The epidemiology of plant diseases. Springer Netherlands*, 43-80.
29. Cubero J. and Graham J.H., 2002. Genetic relationship among worldwide strains of *Xanthomonas* causing canker in citrus species and design of new primers for their identification by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:1257-1264.
30. Cueva C., Moreno - Arribas M., Martin - Álvarez P.J., Bills G., Vicente M.F., Basilio A., *et al.*, 2010. Antimicrobial activity of phenolic acids against commensal, probiotic and pathogenic bacteria. *Res. Micro.* 161(5): 372-382.
31. Cushnie T.P., Cushnie B. and Lamb A.J., 2014. Alkaloids: an overview of their antibacterial, antibiotic enhancing and antivirulence activities. *Inter. J. Antimicro. Agents*, 44(5): 377-386.

32. Dai J. and Mumper R.T., (2010). Plant phenolics: Extraction, Analysis and their Antioxidant and Anticancer properties. *Molecules*, 15: 7313-7352.
33. Das A.K., 2003. Citrus canker – a review. *J. Appl. Hort.* 5: 52-60.
34. Das R.M.B., Mondal P., Khatua D.C., Mukherjee N., 2013. DNA polymorphisms and biocontrol of *Bacillus antagonistic* to citrus bacterial canker with indication of the interference of phyllosphere biofilms. *PloS ONE*. 7: e42124.
35. Daungfu O., Youpensuk S., Lumyoung S., 2019. Endophytic bacteria isolated from citrus plants for biological control of citrus canker in lime plants. *Trop Life Sci Res.* 30: 73-88.
36. De Feyter R., Yang Y. and Gabriel D.W., 1993. Gene-for-genes interactions between cotton *R* genes and *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* genes. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 6: 225-237.
37. De Oliveira A.G., Spago F.R., Simionato A.S., et al., 2016. Bioactive organocopper compound from *Pseudomonas aeruginosa* inhibits the growth of *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. *Front Microbiol*, 7: 113.
38. Del Campo R., Russi P., Mara P., Mara H., Peyrou M., De León I.P., and Gaggero C., 2009. *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* enters the VBNC state after copper treatment and retains its virulence. *FEMS Microbiol. Letters*, 298(2): 143-148.
39. Đỗ Tất Lợi, 2019. *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*. Nhà xuất bản Hồng Đức, 1-2.
40. Doidge E.M., 1916. Citrus canker in South Africa. *South African Fruit Grower*, 3: 265-268.
41. Dowson W.J., 1939. On the systematic position and generic names of the gram negative bacterial plant pathogens. *Zentr. Bakteriolog. Parasitenk. Abt.//.100*. 177-193.
42. Duan Y.P., Castañeda G.Z., Erdos G. and Gabriel D.W., 1999. Expression of a single, host-specific, bacterial pathogenicity gene in plant cells elicits division, enlargement, and cell death. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 12: 556-560.
43. Dubouzet J.G. and Shinoda K., 1999. ITS DNA sequence relationships between *Lilium concolor* Salisb., *L. dauricum* Ker-Gawl. and their putative hybrid. *L.*

- maculatum Thunb. *Theor. Appl. Genet.* 98: 213-218.
44. Dunger G., Arabolaza A.L., Gottig N., Orellano E.G. and Ottado J., 2005. Participation of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* hrp cluster in citrus canker and nonhost plant responses. *Plant Pathol.* 54: 781-788.
45. Durairaj K., Velmurugan P., Park J-H et al., 2017. Potential for plant biocontrol activity of isolated *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus Stratosphericus* strains against bacterial pathogens acting through both induced plant resistance and direct antagonism. *FEMS Microbiol Lett.* 364.
46. EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization), 2005. EPPO Standards Diagnostic PM7/44(1) *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. OEPP/EPPO Bulletin. 35: 271-273.
47. Evans W.C., 1966. *Trease Evans Pharmacognosy*, 14th editor, London: WB Saunders Ltd. 119-159.
48. Fawcett H.S., and Jenkins A.E., 1933. Records of citrus Canker from herbarium specimens of the genus *Citrus* in England and the United States. *Phytopath.* 23: 820-824.
49. Garita-Cambronero J., Sena-Velez M., Ferragud E., Sabuquillo P., Redondo C., and Cubero J., 2019. *Xanthomonas citri* subsp. *citri* and *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*: comparative analysis of two pathogens producing similar symptoms in different host plants. *PLOS ONE*, 14(7): 1-22.
50. Garnsey S.M., Ducharme E.P., Lightfied J.W., Seymour C.P., and Griffiths J.T., 1979. Citrus canker. *Citrus Industry*, 60: 5-6.
51. Giri G.K., Gade R.N., Gulhane A.R., and Das S., 2008. Efficacy of bioagents and botanicals and chemicals against citrus canker (*X. axonopodis* pv. *citri*). *J. Pl. Dis. Sci.* 3(2): 249-25.
52. Gottwald T.R., Hughes G., Graham J.H., Sun X., and Riley T., 2001. The citrus canker epidemic in Florida: The scientific basis of regulatory eradication policy for an invasive species, *Phytopath.* 91: 30-34.
53. Gottwald T.R., Graham J.H., and Schubert T.S., 2002. Citrus canker: The pathogen and its impact. *Plant Health Progress*, 3(1): 15.

54. Graham J.H., Gottwald T.R., Cubero J. and Achor D.S., 2004. *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*: Factors affecting successful eradication of citrus canker. *Mol Plant Pathol.* 5: 1-15.
55. Graham J.H., Gruber B. and Bock C., 2014. Research progress for integrated canker management. *Citrus Indus.* 95(4): 20-24.
56. Gupta V.K. and Sharma S.K., 2008. *Diseases of Fruit Crops*, 2nd editor, Kalyani Publishers, Ludhiana, 290 pages.
57. Guo Z-j., Zuo J-f., Bo X-q. and Sun Q-s., 2007. Study on chemical constituents of *Euphorbia hylonoma* hand. -Mazz. *China Journal of Chinese medicinal materials*, 30(4): 412-415.
58. Gupta N., Vishnoi G., Wal A. and Wal P., 2013. Medicinal value of *Euphorbia tirucalli*. *System Review Pharmacy*, 4(1): 40-46.
59. Hacker J. and Kaper J.B., 2000. Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annu. Rev. Microbiol.*, 54: 641-679.
60. Haider M.F., Ahmad Z., Shakeel Q., Shafiq S., Chand S. A., Saddiq W. M., Ahsan M.A. and Kharal M. A-Q, H., 2020. Biochemical characterization of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*; A major impediment to citrus orchards. *International Journal Biocences*, 16(3): 512-517.
61. Hồ Cao Việt, 2016. Triển vọng ngành chanh Việt Nam: Chuỗi giá trị chanh không hạt Long An. *Van Hien University Journal of Science*, 4(3): 75-84.
62. Hwang S.J., Yoon, W.B., Lee O.-H., Cha S.J. and Kim J.D., 2014. Radical-scavenging-linked antioxidant activities of extracts from black chokeberry and blueberry cultivated in Korea. *Food Chem.* 146: 71-77.
63. Ijato J.Y., 2016. An Evaluation of phytotoxic activities of some botanicals against *Xanthomonascitri* (Hasse), a canker bacterial pathogen of citrus, *New York Sci. J.* 9(8): 5-7.
64. Iqram F., Khan M.A. and Khan S.M., 2003. In vitro evaluation of plant extracts and antagonistic fungi against *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (Hasse) dye, *Pakistan J. Botany.* 35(5): 967-970.

65. Islam M.A., Mazumdar R.M., Islam S., Alam M.J. and Urmee S.A., 2014. Isolation, identification and in vitro antibiotic sensitivity pattern of citrus canker causing organism *Xanthomonas axonopodis*, *Advance, Life Sci.* 1(4): 215-222.
66. Ismail M., Haque M., Raiz A., Abro M. and Khan M., 2014. Pathogenic variability among different isolates of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, *Pakist J. Agr. and Enginer. Sci.* 30(2): 187-194.
67. Isokar S.S., Bramhankar S.B., Das A.K., Thakur K.D., Pillai T., Dinkwar G.T. and Kharat V.M., 2020. Mophological, biochemical and molecular characterization of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* isolates from different agroclimate zones of Maharashtra. *International Journal of Chemical Studies*, 8(2): 62-70.
68. Jadhav D.M., Gawai D.U. and Khillare E.M., 2010. Evaluation if antibacterial and antifungal activity of *Euphorbia tirucalli* L., *Bionano Frontier.*, 3: 332-334.
69. Khac D.D., Tran-van S., Campos A.M., Lallemand J.Y., and Fetizon M., 1990. Ellagic compounds from *Diplopanax stachyanthus*. *Phytochemistry*, 29: 251-256
70. Khanduja K.L., Gandhi R.K., Pathania V., Syal N., 1999. Prevention of N-nitrosodimethylamine induced lung tumorigenesis by ellagic acid and quercetin in mice, *Food Chem Toxicol.* 37(4): 313-18.
71. Khodakaramian G. and Swings J., 2003. AFLP fingerprinting of the strains of *Xanthomonas axonopodis* including citrus canker disease in southern Iran, *J. Phytopath.* 150(4): 227-231
72. Kharde R.R., Lavale S.A. and Ghorpade B.B., 2018. Molecular diversity among the isolate of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* causing bacteria canker in citrus. *In J. Curr. Microbiol. App. Sci.* 7(8): 2375-2384.
73. Katkar M., Raghuwanshi K.S., Chimote V.P., Borkar S.G., 2016. Pathological, biochemical and molecular diversity amongst the isolates of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* causing the citrus canker in acid lime from the different agro-climatic region of India, *Int. J Environ. Agr. Biotech.*, 1(2): 2456-2478.
74. Kuete V., Wabo G.F., Ngameni B., Mbaveng A.T., Metuno R., Etoa, F-X, Ngadjui B.T., Beng V.P., Meyer J.J.M., and Lall N. (2007). Antimicrobial activity of the mathanolic extract, fractions and compounds from the stem bark of *Irvingia*

gabonensis (Ixonanthaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 114(1): 54-60

75. Lai P., and Roy J., 2004. Antimicrobial and chemo preventive properties of herbs and spices, *Curr. Medic. chemis.*, 11(11): 1451-1460.

76. Lane D.J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. In: Nucleic acid techniques in bacterial systematics (Eds. E. Stackebrandt, M. Goodfellow). John Wiley and Sons, New York, pp. 115-175.

77. Le T.K.D., Bui X.H., Nguyen T.A.T., Pham N.K.T. and Duong T.H., 2019. Chemical constituents of *Euphorbia tirucalli* L. *Sci. Technol. Dev. J. Nat. Sci.* 2: 76-82

78. Leach J.E. and White F.F., 1996. Bacterial avirulence genes. *Annu. Rev. Phytopath.* 34: 153-179.

79. Leksomboon C., Thaveechai N. and Kositratana W., 2001. Potential of plant extracts for controlling citrus canker of Lime, *Kasetsart J. (Nat. Sci.)* 35: 392-396.

80. Li P., Ma Y., Zhou J., Luo H., Yan J., Mao Y. and Wang Z., 2015. The Efficacy and underlying mechanism of sulfone derivatives containing 1,3,4-oxadiazole on Citrus Canker, *Molecules*, 20: 14103-14117.

81. Li Z.J., Liu M., Dawuti G., Dou Q., Ma Y., Liu H.G. and Aibai S., 2017. Antifungal activity of gallic acid in vitro and in vivo, *Phytother. Res.* 19: 1-7.

82. Lin S.J., Yeh C.H., Yang L.M., Liu P.C. and Hsu F.L., 2001. Phenolic compounds from Formosan *Euphorbia tirucalli*. *Journal of the Chinese Chemical Society*, 48:105-108.

83. Lirio L.G., Hermano M.L. and Fontanilla M.Q., 1998. Note antibacterial activity of Medicinal Plants from the Philippines, *Phar. Biol.* 36(5): 357-359.

84. Machado M.M., Oliveira LFS De, Zuravski L., Souza R.O. De, Fischer P., Duarte J.A., Rocha M.O., Guez C.M., Bologon A.A. and Athayde M.L., 2016. Evaluation of genotoxic and cytotoxic effects of hydroalcoholic extract of *Euphorbia tirucalli* (Euphorbiaceae) in cell cultures of human leukocytes, *Ann. Brazil. Acade. Sci.* 88(1): 17-28.

85. Maher S.M., Sahi S.T., Ghazanfar M.U., Inam-ul-Haq M., Imran-ul-Haq, Iftikhar Y., Sarwar M.S. and Ahmad T., 2005. Evaluation of different toxicants against

- Xanthomonas campestris* pv. *citri* (Hasse) Dows, *Inter. J. Agr. Bio.* 7(1): 121-124.
86. Mahmood M.A., Aslam M. N., Atiq M., Rajput N. A., Usman M., Sharif A., Fatima K., Talib M. Z., Aslam N. and Tariq H., 2020. Biochemical and cultural characterization of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* isolated from infected citrus plants from Bahawalpur, Pakistan. *Journal of Biodiversity and Environment Science*, 16(3): 70-79.
87. Manyam P. and Nargund V.B., 2020. Diagnosis of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* isolates, the causal agent of citrus canker by pathogenicity and PCR based method. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 9(5): 173-176.
88. Mbega E.R., Mabagala R.B., Adriko J., Lund O.S. and Mortensen C.N., 2012. Xanthomonads and other yellow-pigmented Xanthomonas-like bacteria associated tomato seeds in Tanzania. *African Journal of Biotechnology*, 11(78): 14303-14312.
89. Michavila G., Adler C., De Gregorio P.R., et al., 2017. *Pseudomonas protegens* CS1 from the lemon phyllosphere as a candidate for citrus canker biocontrol agent. *Plant Biol*, 19: 608-617.
90. Mira N.V.M., Barros R.M.C., Schiocchet M.A., Noldin J.A. and Lanfer-Marquez U.M., 2008. Extraction, analysis and distribution of genotypes phenolic acids in pigmented and non-pigmented rice (*Oryza sativa* L.). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 28: 994-1002.
91. Min B., Pinchak W., Merkel R., Walker S., Tomita G. and Anderson R., 2008. Comparative antimicrobial activity of tannin extracts from perennial plants on mastitis pathogens, *Sci. Res. Ess.* 3(2): 066-073.
92. Mohamed S., Saka S., ElSharkawy S.H., Ali A.M. and Muid S., 1996. Antimycotic screening of 58 Malaysian plants against plant pathogens. *Pest. Sci.* 47: 259-264.
93. More G., Lall N., Hussein A. and Tshikalange T.E., 2012. Antimicrobial Constituents of *Artemisia afra* Jacq, ex Willd, against Periodontal Pathogens. *Comple. Alter. Med.* 1-7.
94. Morton J., 1987. Tahiti Lime, *In: Fruits of warm climates* (Julia F. Morton). Miami, FL.172-175.
95. Mubeen M., Arshad H.M.I., Iftikhar Y.R., Irfan U.M. and Bilqees I., 2015.

Biochemical characterization of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*: a gram negative bacterium causing citrus canker. *Inter. J. Sci. and Nature*. 6(2): 151-154.

96. Mustafa M., Imran M., Azeem M., Riaz A. and Afzal M., 2015. Commercial citrus cultivars resistance evaluation and management to canker disease. *Inter. J. Agr. Agr. Res.* 6(6): 1-9.

97. Mwine J., 2009. Pesticidal plants used in Masaka district, Central Uganda. *J. Sci. Sustainable develop.* 2: 1-7.

98. Mwine J. and Van Damme P., 2010. Evaluation of selected pesticidal plant extracts against major cabbage insect pests in the field. Tropentag 2010: "World Food System – A Contribution from Europe", *ETH Zurich, Switzerland*, 14-16 September 2010

99. Napiroon T., Vajrodaya S., Santimaleeworagun W., Balslev H. and Chayamarit K., 2017. Antibacterial Activity of Three Medicinal *Lasianthus* (Rubiaceae) Extracts on Human Resistant Pathogenic Bacteria. *Eur. Exp. Biol.* 7(6):1-7.

100. NCCLS, National Committee for Clinical Laboratory Standards, Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically; approved standard M7-A6, (National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa, 2003, 6th Edn.

101. Negi A. and Kumar P., 2015. Antibacterial effect of plant extracts and antibiotics on *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* *in vitro*. *Trends in Biosci. J.* 8(9): 2374-2376.

102. Neuwinger H.D., 2004. Plants used for poison fishing in tropical Africa. *Toxicon*. 44: 417-430

103. Nguyễn Kim Phi Phụng, 2007. *Phương pháp cô lập hợp chất hữu cơ*. Nhà xuất bản Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh, 16-20.

104. Nguyễn Văn Nga và Cao Văn Chí, 2013. *Sổ tay hướng dẫn phòng trừ sâu, bệnh hại trên cây có múi*. Bộ Nông Nghiệp và Phát Triển Nông Thôn Trung Tâm Khuyến Nông Quốc Gia, Nhà xuất bản Hà Nội, 37-38.

105. Orlanda J.F.F. and Vale V.V., 2015. Análise fitoquímica e atividade fotoprotetora de extrato etanólico de *Euphorbia tirucalli* Linneau (Euphorbiaceae), *Rev. Bras. Pl. Med.* 17: 730-736

106. Ostrosky-Zeichner L., *et al.*, 2008. Rationale for reading flfluconazole MICs at 24 hours rather than 48 hours when testing *Candida* spp. by the CLSIM27-A2 standard method. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52: 4175-4177.
107. Pandey A.K., Kumar P., Singh P. *et al.*, 2017. Essential oils: Sources of antimicrobials and food preservatives. *Front Microbial.* 7: 2161.
108. Park D.S., Hyun J.W., Park Yuong-Jin and Kim J., 2006. Sensitive and specific detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* by PCR using pathovar specific primers based on *hrpW* gene sequences. *Microbiol. Res.* 161(2): 145-149.
109. Prakash M. and Karmegam N., 2012. *In-vitro* antibacterial activity of certain plant extracts against plant disease causing bacteria isolated from citrus plant. *Inter. J. Curr. Micro. Appl. Sci.* 1(1): 1-11.
110. Pria M., Christiano R.C.S., Furtado E.L., Amorim L. and Bergamin Filho A., 2006. Effect of temperature and leaf wetness duration on infection of sweet oranges by Asiatic citrus canker. *Plant Pathol.* 55: 657-663
111. Rabbee M.F., Al M.S., BaeK K-H., 2019. Endophyte *Bacillus velezensis* isolated from *Citrus* subsp. *citri* that causes citrus bacterial canker. *Agronomy*, 9: 470.
112. Rahuman A.A., Gopalakrishnan G., Venkatesan P. and Geetha K., 2008. Larvicidal activity of some Euphorbiaceae plant extracts against *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera:Culicidae). *Parasitology Research*, 102: 867-873
113. Rao Y.P. and Hingorani M.K., 1963. Survival of *Xanthomonas citri* (Hasse) Dowson in leaves and soil. *Indian Phytopath.* 16: 362-364
114. Raju J., Benagai Jayalakshmi K., Angadi S.G., Basha H. and Giri M.S., 2013. *In vitro* evaluation of bioprospectus for bacterial blight of pomegranate. *Bioinfolet.* 10(2B): 710-713.
115. Rossetti V., 1977. Citrus canker in Latin America: A review, *Proc. Int. Soc. Citric.* 3: 918-924.
116. Rybak M., Minsavage G.V., Stall R.E. and Jones J.B., 2009. Identification of *Xanthomonas citri* ssp. *citri* host specificity genes in heterologous expression host, *Mol. plant pathol.* 10(2): 249-262.

117. Sahi S.T., Ghazanfar M.U. and Habib A., 2007. Incidence of citrus canker disease caused by *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (Hasse) down on kinnow (*Citrus reticulata*) and its chemotherapy. *Pak. J. Bot.* 39(4): 1319-1327.
118. Sarkar J., Saha J., Panja B.N. and Das A., 2007. Evaluation of citrus species and their relatives of tolerance to bacterial canker disease and prediction of canker incidence based on leaf morphological characters. *J. Mycopathol. Res.* 45:175-181.
119. Schaad, N.W.; Postnikova, E.; Lacy, G.; Sechler, A.; Agarkova, I.; Stromberg, P.E.; Stromberg, V.K.; Vidaver, A.K., 2006. Emended classification of xanthomonad pathogens on citrus, systematic and applied. *Microbiology*, 29: 690-695
120. Schaad N.W., Postnikova E., Lacy G.H., Sechler A., Agarkovac I., Stromberg P.E., Stromberg V.K. and Vidaver A.K., 2005. Reclassification of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (ex Hasse 1915) Dye 1978 forms A, B/C/D, and E as *X. smithii* subsp. *citri* (ex Hasse) sp.nov.nom.rev.comb. nov., *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* (ex Gabriel 1989) sp.nov.nom.rev.comb.nov., and *X. alfalfae* subsp. *citrumelo* (ex Riker and Jones) Gabriel *et al.*, 1989 sp.nov.nom.rev.comb.nov.; *X. campestris* pv. *malvacearum* (ex Smith 1901) Dye 1978 as *X. smithii* subsp. *smithii* nov.comb.nov.nom.nov.; *X. campestris* pv. *alfalfae* (ex Riker and Jones, 1935) Dye 1978 as *X. alfalfae* subsp. *alfalfae* (ex Riker *et al.*, 1935) sp.nov.nom.rev.; and “var. *fuscans*” of *X. campestris* pv. *phaseoli* (ex Smith, 1987) Dye 1978 as *X. fuscans* subsp. *fuscans* sp.. *Nov. Systematic and Appl. Micro.*, 28: 494-518.
121. Schmelzer G.H. and Gurib-Fakim A., 2008. Medicinal plants. *Plant Resour. Trop. Afri.* 412-415.
122. Sena - Véleza M., Redondo C., Gell I., Ferragud E., Johnson E., Graham J.H., and Cubero J., 2015. Biofilm formation and motility of *Xanthomonas* strains with different citrus host range, *Plant pathol.*, 64: 767-775.
123. Sharma S.K. and Sharma R.R., 2009. Citrus canker Approaching century: A review. *Tree and Forestry Sci. Biotech.* 3(2): 54-65.
124. Shehzadi I. and Nazi S., 2019. Morphological, biochemical and genetic characterization of citrus canker pathogen (*Xanthomonas axonopodis*) from citrus cultivars of punjab, Pakistan. *J. Animal & Plant Sci.* 29(1): 117-12.

125. Shivas R., Beasley D., Thomas J., Geering A. and Riley I., 2005. *Phương pháp quản lý mẫu bệnh thực vật*. Commonwealth, Australia. 85 trang.
126. Silva A.C., deFaria D.E., Borges N.B., de Souza I.A., Peters V.M. and Guerra M.d.O., 2007. Toxicological screening of *Euphorbia tirucalli* L.: Development altotoxicity studies in rats. *J. Ethnopharmacol.* 110: 154-159
127. Singh D., and Thind S.K., 2014. Prevalence, isolation and standardization of growth media for *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* causing citrus canker. *Plant Dis.* 29(2): 188-192.
128. Singh S., Srivastava R. and Choudhary S., 2010. Antifungal and HPLC analysis of the crude extracts of *Acorus calamus*, *Tinospora cordifolia* and *Celestrus paniculatus*. *J. Agr. Scie. and Tech.* 6: 149-158.
129. Stall R.E. and Seymour C.P., 1983. Canker, a threat to citrus in the Gulf coast states. *Plant Dis.* 67: 581.
130. Stall R.E., and Civerolo E.L., 1991. Research relating to the recent outbreak of citrus canker in Florida. *Ann. Rev. Phytopathol.* 29: 399-420.
131. Stojkovic D., Petrovic J., Sokovic M., Glamoclija J., Kukic-Markovic J. and Petrovic S., 2013. In situ antioxidant and antimicrobial activities of naturally occurring caffeic acid, p-coumaric acid and rutin, using food systems. *J. Sci. Food and Agri.* 93(13): 3205-3208.
132. Stoner G.D., and Gupta A., 2001. Etiology and chemoprevention of esophageal squamous cell carcinoma. *Carcinogenesis*, 22: 1737-1746.
133. Sujata B., and Sai D.V.R., 2010. Isolation and characterization of *Xanthomonas axonopodis* from *citrus aurantifolia* christm (Swingle). *The Bioscan.* 5(3): 373-376.
134. Sultan S., Kimaro C.C., and Amri E., 2016. Antifungal activity and phytochemical screening of different solvent extracts of *Euphorbia tirucalli* Linn. *J. Advances in Bio. And Biotech.* 7(1): 1-9.
135. Sun X., Stall R.E., Jones J.B., Cubero J., Gottwald T.R., Graham J.H., Dixon W.N., Schubert T.S., Chaloux P.H., Stromberg V.K., Lacy G.H. and Sutton B.D., 2004. Detection and characterization of a new strain of citrus canker bacteria from Key/Mexican lime and alemow in South Florida. *Plant Disease*, 88 (11): 1179-1188.

136. Takao K., Miyashiro T. and Sugita Y., 2015. Synthesis and biological evaluation of iiperic acid amides as free radical scavengers and α -Glucosidase inhibitors. *Chem. Pharm. Bull.* 63: 326-333.
137. Toda M., Okubo S., Ohnishi R., and Shimamura T., 1989. Antibacterial and bactericidal activities of Japanese green tea. *Japanese J. Bacter.* 44(4): 669-672.
138. Traore Y.N., Bui T.N.L., Verniere C. and Pruvost O., 2008. First report of *Xanthomonas citri* pv. *citri* causing citrus canker in Mali. *Plant Dis.* 92: 997.
139. Ultee A., Bennik M.H.J. and Moezelaaz R., 2002. The phenolic hydroxy group of carvacrol is essential for action against the foodborne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl. and Environ. Microbio.* 68(4): 1561-1568.
140. Upadhyay B., Singh K. and Kumar A., 2010. Ethnomedicinal, phytochemical and antimicrobial studies of *Euphorbia tirucalli* L. *J. Phyto.* 2(4): 65-77.
141. Vale V.V. and Orlanda J.F.F., 2011. Atividade antimicrobiana do extrato bruto etanólico das partes aéreas de *Euphorbia tirucalli* Linneau (Euphorbiaceae). *Scientia Plena*, 7(4): 1-6.
142. Van Damme P.L.J., 1990. Gebruik van *Euphorbia tirucalli* Als rubberleverancier en energiegewas. *Afrika Focus*, 6(1): 19-44.
143. Van Damme P.L.J., 2001. *Euphorbia tirucalli* for high biomass production, in: Schlissel A. and Pasternak D., (Eds.), Combating desertification with plants, Kluwer Academic Publishing, 169-187.
144. Verniere C., Devaux M., Pruvost O., Couteau A. and Luisett J., 1991. Studies on the biochemical and physiological variation among strains of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* the causal agent of citrus bacterial canker disease. *Fruits*, 46(2): 160-170.
145. Verniere C.J.S., Hartung O.P., Pruvost E.L., Cliverolo A.M., Alvarez P., Maestri and Luisetti J., 1998. Characterization of phenotypically distinct strains of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* from Southwest Asia. *Euro. J. Pl. Pathol.*, 104: 477-487.
146. Vudhivanich S., 2003. Efficacy of Thai herbal extract for growth inhibition of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, the bacterial canker of citrus, *Kasetsart J. (Nat.*

Sci.) 37: 445-452.

147. Wang L., Yu M-M., Chi Y-Q., Quyang W-B., Zang Z. and Zhao Y., 2014. Chemical constituents of *Euphorbia dracunculoides*. *China Journal of Chinese material medica*, 39(20): 3969-3973.

148. Waterman P.G. and Mole S., 1994. Analysis of phenolic plant metabolites. *Oxford, UK: Blackwell Science*, 248p

149. Xue J., Davidson P.M. and Zhong Q., 2013. Thymol nanoemulsified by whey protein-maltodextrin conjugates: the enhanced emulsifying capacity and antilisterial properties in milk by propylene glycol. *J. Agr. Food Chem.* 61: 12720-12726.

150. Yadav R., Srivastav K., Ramesh C. and Singh A., 2002. Larvicidal activity of latex and stem bark of *Euphorbia tirucalli* plant on the mosquito *Culex quinquefasciatus*. *J. communicable dis.* 34: 264-269.

151. Yang Y. and Gabriel D.W., 1995. *Xanthomonas* avirulence/pathogenicity gene family encodes functional plant nuclear targeting signals. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 8: 627-631.

152. Yoshida T., Yokoyama K., Namba O. and Okuda T., 1991. Tannins and related polyphenols of euphorbiaceous plants: VII, Tirucallins A, B and euphorbin F, monomeric and dimeric ellagitannins from *Euphorbia tirucalli* L, *Chem. Phar. Bull.* 39: 1137-1143.

153. Younes A.B., Salem M.B., Abed H.E. and Jarraya R., 2018. Phytochemical Screening and Antidiabetic, Antihyperlipidemic, and Antioxidant Properties of *Anthyllis henoniana* (Coss.) Flowers Extracts in an Alloxan-Induced Rats Model of Diabetes. *Evidence-Based Comple. Alter. Medici.* 3: 1-14.

154. Yusoff E., Ahmada A., Mohamada S. and Muhamma N.F., 2017. GC-MS analysis of some volatile constituents extracted from stem of *Euphorbia tirucalli* Linn. *Arch. Oro. Sci.* 12(1): 36-44.

155. Zarei Z., Emna B., Nadia B.S., Youssef G. and Adel S., 2013. Antioxidant and antimicrobial activities of various solvent extracts, piperine and piperic acid from *Piper nigrum*. *LWT-Food Sci. Technol.* 50: 634-641.

156. Zhishen J., Mengcheng, T. and Jianming, W., 1999. The determination of

flavonoid contents in mulberry and scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem.* 64: 555-559.

PHỤ LỤC

PHỤ LỤC 1. MỘT SỐ HÌNH ẢNH THÍ NGHIỆM TRONG LUẬN ÁN

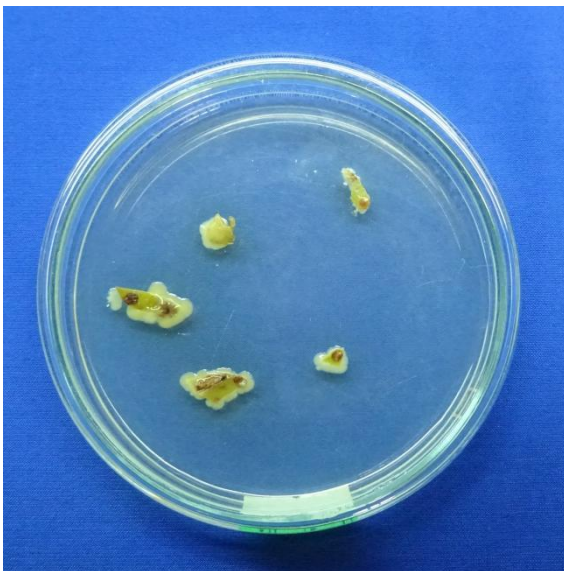
1.1. Vườn chanh thu mẫu ở ba huyện Bến Lức, Thạnh Hóa và Đức Huệ



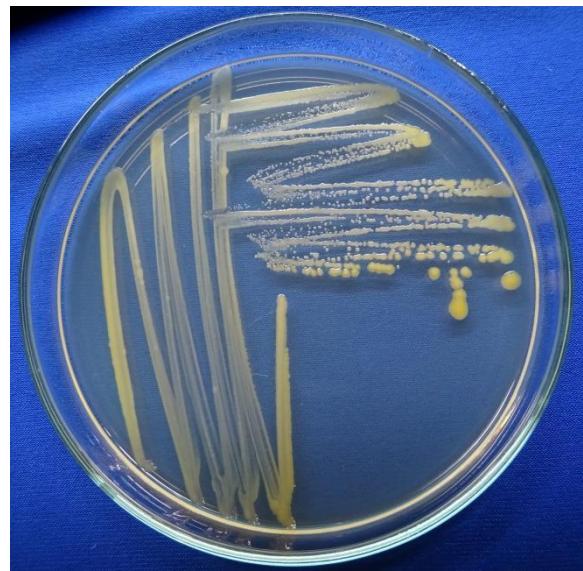
Hình 1.1. Các vườn chanh thu mẫu ở ba huyện Bến Lức, Thạnh Hóa và Đức Huệ

(A: Bến Lức; B: Thạnh Hóa; C: Đức Huệ)

1.2. Hình ảnh phân lập và làm thuần vi khuẩn *Xanthomonas* sp. từ các mẫu bệnh được thu nhận



Phân lập mẫu



Ria, làm thuần mẫu

1.3. Hình ảnh chủng bệnh nhân tạo trong phòng thí nghiệm theo quy tắc Koch's



Chủng bệnh trên lá

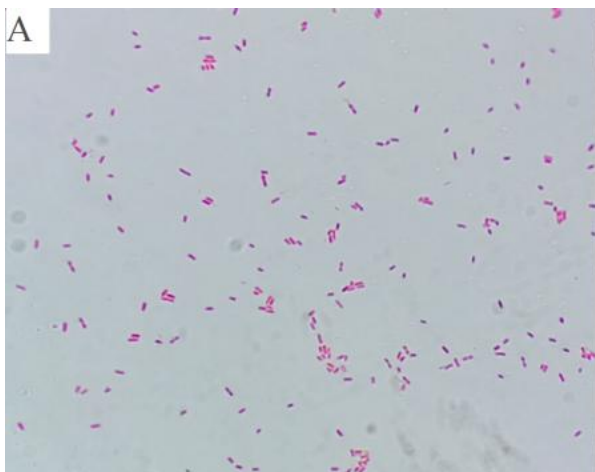


Chủng bệnh trên cành

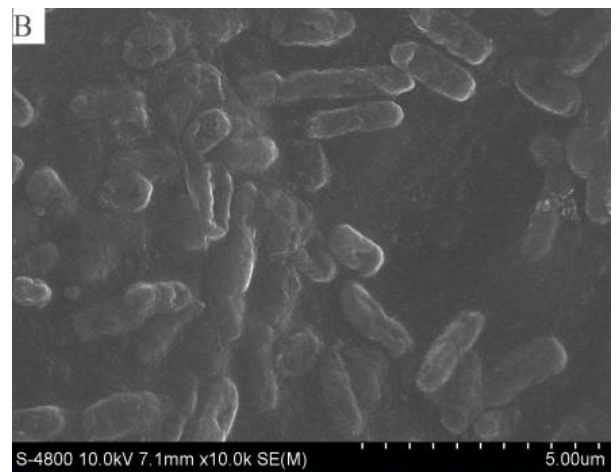


Chủng bệnh trên quả

1.4 Hình ảnh khảo sát đặc điểm sinh hóa của các MPL *Xanthomonas* từ cây chanh có biểu hiện bệnh loét ở Long An



Nhuộm Gram



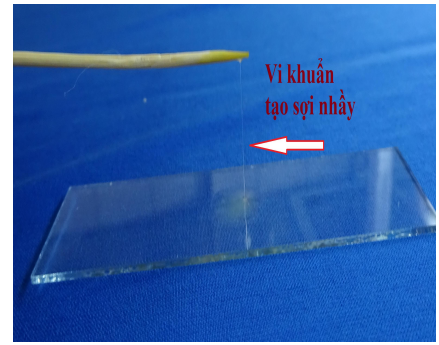
Chụp SEM



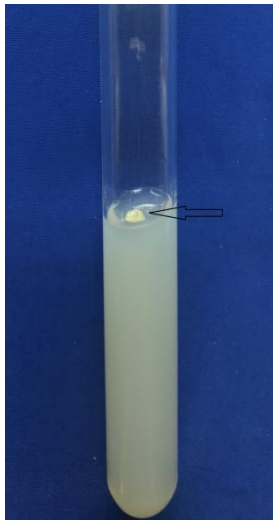
Thử nghiệm catalase



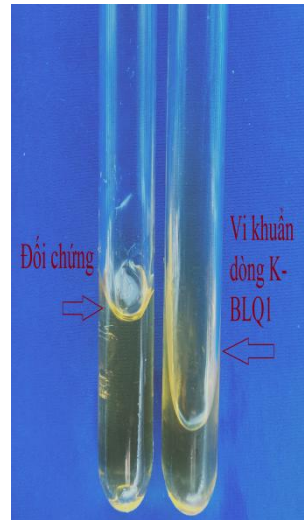
Thử nghiệm oxidase



Thử nghiệm KOH 3%



Khả năng phát triển trong điều kiện kỵ khí



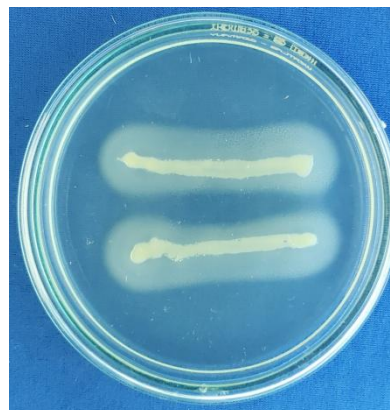
Thủy giải gelatinase



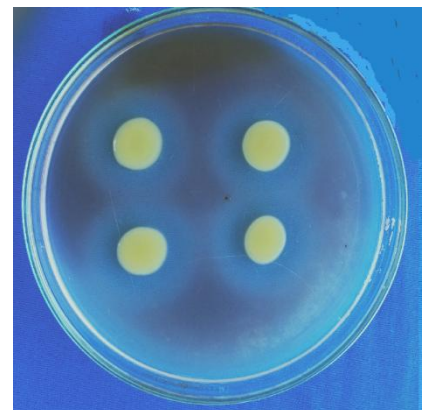
Thủy phân Urea



Thủy phân casein



Thủy phân Tween 80



Thủy phân tinh bột

1.5. Hình ảnh mẫu cây giao, bột cây giao, chiết cao phân đoạn từ cây giao



Mẫu Cây giao tươi



Mẫu sau khi sấy khô



Mẫu bột cây giao



Chiết cao phân đoạn



Cô quay thu cao chiết

1.6. Hình ảnh chứng bệnh trong nhà lưới



Bố trí TN trong nhà lưới



Tạo vết thương nhân tạo



Ủ 24 giờ



Triệu chứng bệnh sau 3 ngày chũng



Chọn vết bệnh và cố định bằng dây thun

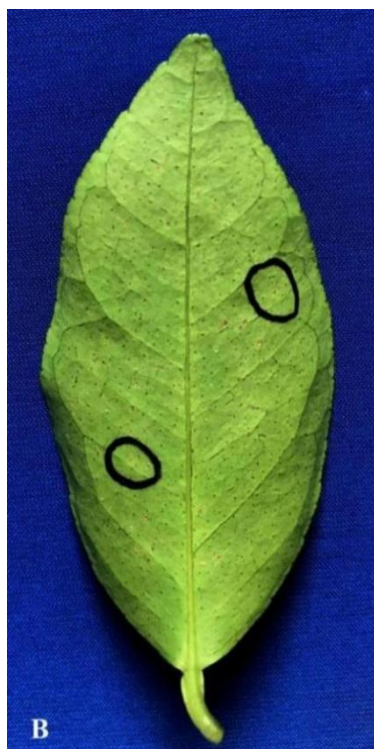


Đo kích thước vết bệnh

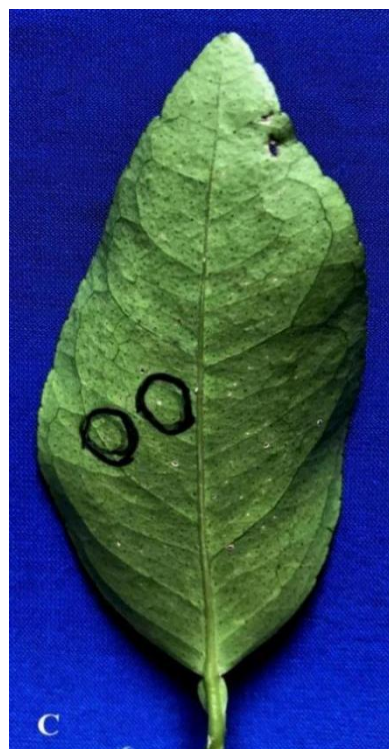
- ❖ Hiệu quả ức chế vi khuẩn *Xanthomonas* sp. trên lá chanh trong điều kiện nhà lưới của cao chiết ethyl acetate từ cây giao 21 NSP lần 3



Cao EA (0,25%)



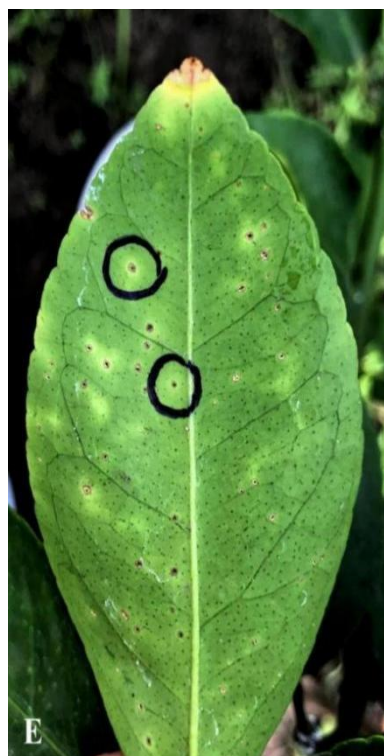
Cao EA (0,5%)



Cao EA (0,75%)



Cao EA (1,0%)



Đối chứng



Đc không chủng vi khuẩn

PHỤ LỤC 2. KẾT QUẢ PHÂN LẬP VI KHUẨN *Xanthomonas* sp.

Bảng 2.1. Các nguồn vi khuẩn *Xanthomonas* sp. đã phân lập định danh được từ các mẫu bệnh loét trên cây chanh ở tỉnh Long An, năm 2017 - 2018

STT	Ký hiệu mẫu	Ký chủ (tên thường gọi, tên khoa học)/bộ phận cây bị bệnh	Địa điểm thu mẫu
1	BLKL1	Chanh không hạt <i>Citrus latifolia</i> /Lá	Thạnh Hòa, Bến Lức
2	BLKL2	Chanh không hạt <i>Citrus latifolia</i> /Lá	Thạnh Hòa, Bến Lức
3	BLKL3	Chanh không hạt <i>Citrus latifolia</i> /Lá	Thạnh Hòa, Bến Lức
4	BLKL4	Chanh không hạt <i>Citrus latifolia</i> /Lá	Lương Bình, Bến Lức
5	BLKL5	Chanh không hạt <i>Citrus latifolia</i> /Lá	Lương Bình, Bến Lức
6	BLKL6	Chanh không hạt <i>Citrus latifolia</i> /Lá	Lương Bình, Bến Lức
7	BLKL7	Chanh không hạt <i>Citrus latifolia</i> /Lá	An Thạnh, Bến Lức
8	BLKL8	Chanh không hạt <i>Citrus latifolia</i> /Lá	An Thạnh, Bến Lức
9	BLKL9	Chanh không hạt <i>Citrus latifolia</i> /Lá	Thạnh Lợi, Bến Lức
10	BLKL10	Chanh không hạt <i>Citrus latifolia</i> /Lá	Thạnh Lợi, Bến Lức
11	BLKC1	Chanh không hạt <i>Citrus latifolia</i> /Cành	Thạnh Hòa, Bến Lức
12	BLKC2	Chanh không hạt <i>Citrus latifolia</i> /Cành	Lương Bình, Bến Lức
13	BLKC3	Chanh không hạt <i>Citrus latifolia</i> /Cành	Lương Bình, Bến Lức
14	BLKC4	Chanh không hạt <i>Citrus latifolia</i> /Cành	An Thạnh, Bến Lức
15	BLKC5	Chanh không hạt <i>Citrus latifolia</i> /Cành	Thạnh Lợi, Bến Lức
16	BLKQ1	Chanh không hạt <i>Citrus latifolia</i> /Quả	Thạnh Hòa, Bến Lức
17	BLKQ2	Chanh không hạt <i>Citrus latifolia</i> /Quả	Thạnh Hòa, Bến Lức
18	BLKQ3	Chanh không hạt <i>Citrus latifolia</i> /Quả	Thạnh Hòa, Bến Lức
19	BLKQ4	Chanh không hạt <i>Citrus latifolia</i> /Quả	Lương Bình, Bến Lức
20	BLKQ5	Chanh không hạt <i>Citrus latifolia</i> /Quả	Lương Bình, Bến Lức

21	BLKQ6	Chanh không hạt <i>Citrus latifolia</i> /Quả	Lương Bình, Bến Lức
22	BLKQ7	Chanh không hạt <i>Citrus latifolia</i> /Quả	An Thạnh, Bến Lức
23	BLKQ8	Chanh không hạt <i>Citrus latifolia</i> /Quả	An Thạnh, Bến Lức
24	BLKQ9	Chanh không hạt <i>Citrus latifolia</i> /Quả	Thanh Lợi, Bến Lức
25	BLKQ10	Chanh không hạt <i>Citrus latifolia</i> /Quả	Thanh Lợi, Bến Lức
26	THKL1	Chanh không hạt <i>Citrus latifolia</i> /Lá	Thuận Bình, Thạnh Hóa
27	THKL2	Chanh không hạt <i>Citrus latifolia</i> /Lá	Thuận Bình, Thạnh Hóa
28	THKL3	Chanh không hạt <i>Citrus latifolia</i> /Lá	Thuận Bình, Thạnh Hóa
29	THKL4	Chanh không hạt <i>Citrus latifolia</i> /Lá	Thuận Nghĩa Hòa, Thạnh Hóa
30	THKL5	Chanh không hạt <i>Citrus latifolia</i> /Lá	Thuận Nghĩa Hòa, Thạnh Hóa
31	THKL6	Chanh không hạt <i>Citrus latifolia</i> /Lá	Thuận Nghĩa Hòa, Thạnh Hóa
32	THKL7	Chanh không hạt <i>Citrus latifolia</i> /Lá	Tân Hiệp, Thạnh Hóa
33	THKL8	Chanh không hạt <i>Citrus latifolia</i> /Lá	Tân Hiệp, Thạnh Hóa
34	THKL9	Chanh không hạt <i>Citrus latifolia</i> /Lá	Thanh Phước, Thạnh Hóa
35	THKL10	Chanh không hạt <i>Citrus latifolia</i> /Lá	Thanh Phước, Thạnh Hóa
34	THKC1	Chanh không hạt <i>Citrus latifolia</i> /Cành	Thuận Bình, Thạnh Hóa
35	THKC2	Chanh không hạt <i>Citrus latifolia</i> /Cành	Thuận Bình, Thạnh Hóa
36	THKC3	Chanh không hạt <i>Citrus latifolia</i> /Cành	Thuận Nghĩa Hòa, Thạnh Hóa
38	THKC5	Chanh không hạt <i>Citrus latifolia</i> /Cành	Tân Hiệp, Thạnh Hóa
40	THKC7	Chanh không hạt <i>Citrus latifolia</i> /Cành	Thanh Phước, Thạnh Hóa
42	THKQ1	Chanh không hạt <i>Citrus latifolia</i> /Quả	Thuận Bình, Thạnh Hóa
43	THKQ2	Chanh không hạt <i>Citrus latifolia</i> /Quả	Thuận Bình, Thạnh Hóa
44	THKQ3	Chanh không hạt <i>Citrus latifolia</i> /Quả	Thuận Bình, Thạnh Hóa
45	THKQ4	Chanh không hạt <i>Citrus latifolia</i> /Quả	Thuận Nghĩa Hòa, Thạnh Hóa

46	THKQ5	Chanh không hạt <i>Citrus latifolia</i> /Quả	Thuận Nghĩa Hòa, Thanh Hóa
47	THKQ6	Chanh không hạt <i>Citrus latifolia</i> /Quả	Thuận Nghĩa Hòa, Thanh Hóa
48	THKQ7	Chanh không hạt <i>Citrus latifolia</i> /Quả	Tân Hiệp, Thanh Hóa
49	THKQ8	Chanh không hạt <i>Citrus latifolia</i> /Quả	Tân Hiệp, Thanh Hóa
50	THKQ9	Chanh không hạt <i>Citrus latifolia</i> /Quả	Thanh Phước, Thanh Hóa
	THKQ10	Chanh không hạt <i>Citrus latifolia</i> /Quả	Thanh Phước, Thanh Hóa
51	DHKL1	Chanh không hạt <i>Citrus latifolia</i> /Lá	Bình Hòa Nam, Đức Huệ
52	DHKL2	Chanh không hạt <i>Citrus latifolia</i> /Lá	Bình Hòa Nam, Đức Huệ
53	DHKL3	Chanh không hạt <i>Citrus latifolia</i> /Lá	Bình Hòa Bắc, Đức Huệ
54	DHKL4	Chanh không hạt <i>Citrus latifolia</i> /Lá	Bình Hòa Bắc, Đức Huệ
55	DHKL5	Chanh không hạt <i>Citrus latifolia</i> /Lá	Bình Hòa Hưng, Đức Huệ
56	DHKC1	Chanh không hạt <i>Citrus latifolia</i> /Cành	Bình Hòa Nam, Đức Huệ
57	DHKC2	Chanh không hạt <i>Citrus latifolia</i> /Cành	Bình Hòa Nam, Đức Huệ
58	DHKC3	Chanh không hạt <i>Citrus latifolia</i> /Cành	Bình Hòa Bắc, Đức Huệ
59	DHKC4	Chanh không hạt <i>Citrus latifolia</i> /Cành	Bình Hòa Bắc, Đức Huệ
60	DHKC5	Chanh không hạt <i>Citrus latifolia</i> /Cành	Bình Hòa Hưng, Đức Huệ
61	DHKQ1	Chanh không hạt <i>Citrus latifolia</i> /Quả	Bình Hòa Nam, Đức Huệ
62	DHKQ2	Chanh không hạt <i>Citrus latifolia</i> /Quả	Bình Hòa Nam, Đức Huệ
63	DHKQ3	Chanh không hạt <i>Citrus latifolia</i> /Quả	Bình Hòa Bắc, Đức Huệ
64	DHKQ4	Chanh không hạt <i>Citrus latifolia</i> /Quả	Bình Hòa Bắc, Đức Huệ
65	DHKQ5	Chanh không hạt <i>Citrus latifolia</i> /Quả	Bình Hòa Hưng, Đức Huệ
66	DHHL1	Chanh giấy <i>Citrus aurantifolia</i> /Lá	Bình Hòa Nam, Đức Huệ
67	DHHL2	Chanh giấy <i>Citrus aurantifolia</i> /Lá	Bình Hòa Bắc, Đức Huệ
68	DHHL3	Chanh giấy <i>Citrus aurantifolia</i> /Lá	Bình Hòa Hưng, Đức Huệ

69	DHHC1	Chanh giầy <i>Citrus aurantifolia</i> /Cành	Bình Hòa Nam, Đức Huệ
70	DHHC2	Chanh giầy <i>Citrus aurantifolia</i> /Cành	Bình Hòa Bắc, Đức Huệ
71	DHHC3	Chanh giầy <i>Citrus aurantifolia</i> /Cành	Bình Hòa Hưng, Đức Huệ
72	DHHQ1	Chanh giầy <i>Citrus aurantifolia</i> /Quả	Bình Hòa Nam, Đức Huệ
73	DHHQ2	Chanh giầy <i>Citrus aurantifolia</i> /Quả	Bình Hòa Bắc, Đức Huệ
74	DHHQ3	Chanh giầy <i>Citrus aurantifolia</i> /Quả	Bình Hòa Hưng, Đức Huệ
75	DHHQ4	Chanh giầy <i>Citrus aurantifolia</i> /Quả	Bình Thành, Đức Huệ

2.1. Kết quả đặc điểm sinh hóa của 75 MPL được phân lập ở Long An

Bảng 2.2. Kết quả đặc điểm sinh hóa của 75 MPL được phân lập ở Long An

STT	MPL	Gram	Catalase	Oxidase	Phát triển trong điều kiện hiếu khí	Thủy phân casein	Thủy phân tinh bột	Thủy phân Tween 80	Thủy phân gelatin	Thủy phân urea	Phát triển ở 35°C	Phát triển trên môi trường YDC ở 28°C, 33°C	Khả năng chịu muối 1, 2, 3%	Khả năng sử dụng glucose	Khả năng sử dụng arabinose	Khả năng sử dụng mannose
1	BLKL1	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
2	BLKL2	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
3	BLKL3	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
4	BLKL4	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
5	BLKL5	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
6	BLKL6	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
7	BLKL7	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
8	BLKL8	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
9	BLKL9	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
10	BLKL10	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+

11	BLKC1	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
12	BLKC2	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
13	BLKC3	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
14	BLKC4	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
15	BLKC5	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
16	BLKQ1	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
17	BLKQ2	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
18	BLKQ3	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
19	BLKQ4	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
20	BLKQ5	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
21	BLKQ6	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
22	BLKQ7	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
23	BLKQ8	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
24	BLKQ9	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
25	BLKQ10	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
26	THKL1	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
27	THKL2	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
28	THKL3	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+

29	THKL4	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
30	THKL5	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
31	THKL6	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
32	THKL7	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
33	THKL8	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
34	THKL9	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
35	THKL10	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
36	THKC1	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
37	THKC2	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
38	THKC3	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
39	THKC5	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
40	THKC7	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
41	THKQ1	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
42	THKQ2	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
43	THKQ3	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
44	THKQ4	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
45	THKQ5	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
46	THKQ6	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+

47	THKQ7	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
48	THKQ8	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
49	THKQ9	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
50	THKQ10	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
51	DHKL1	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
52	DHKL2	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
53	DHKL3	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
54	DHKL4	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
55	DHKL5	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
56	DHKC1	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
57	DHKC2	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
58	DHKC3	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
59	DHKC4	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
60	DHKC5	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
61	DHKQ1	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
62	DHKQ2	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
63	DHKQ3	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
64	DHKQ4	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+

65	DHKQ5	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
66	DHHL1	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
67	DHHL2	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
68	DHHL3	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
69	DHHC1	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
70	DHHC2	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
71	DHHC3	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
72	DHHQ1	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
73	DHHQ2	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
74	DHHQ3	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
75	DHHQ4	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+

2.3. Kết quả kích thước trung bình vết bệnh của các MPL sau chủng bệnh

Bảng 2.4. Kết quả kích thước trung bình vết bệnh của các MPL ở các NSC

MPL	5NSC			7NSC			9NSC			11NSC			13NSC			15NSC			17NSC		
	L1	L2	L3	L1	L2	L3	L1	L2	L3	L1	L2	L3	L1	L2	L3	L1	L2	L3	L1	L2	L3
BLKL1	0	0	0	2.44	2.46	2.68	2.88	3.02	3.12	3.96	4.04	4.12	4.78	4.68	5.04	8.08	7.56	7.98	8.08	8.56	8.18
BLKC3	0	0	0	0	0	0	0.78	1.12	0.7	1.08	1.18	1.20	1.60	1.08	1.04	1.60	1.32	1.06	1.34	1.20	1.68
BLKQ1	3.32	3.46	3.78	5.76	6.04	6.3	5.98	6.48	6.8	6.98	7.04	7.44	7.68	8.12	8.34	10.32	10.12	10.50	11.78	11.04	11.48
DHKQ4	3.32	3.46	3.78	5.76	6.04	6.26	5.98	6.48	6.88	6.98	7.04	7.36	7.68	8.12	8.34	10.32	10.12	10.46	11.78	11.04	11.34
DHHL2	0	0	0	0	0	0	2.60	2.42	2.70	3.34	3.6	3.36	4.50	4.06	4.30	5.30	5.58	5.28	7.60	7.20	6.50
DHHQ2	0	0	0	3.42	3.3	3.5	3.76	4.08	4.34	6.30	6.04	6.08	8.24	8.20	7.54	8.70	8.84	9.08	11.06	11.02	10.68
THKL1	0	0	0	2.26	2.48	2.68	2.78	3.18	3.20	4.10	4.24	4.38	4.10	4.52	4.60	6.78	6.80	7.12	7.30	7.28	6.68
THKC4	0	0	0	0	0	0	1.48	1.12	0.7	1.08	1.15	1.40	1.80	1.08	1.04	1.70	1.32	1.06	1.42	1.20	1.70
THKQ1	3.12	3.42	3.7	5.6	6.04	6.2	5.48	6.4	6.8	3.96	4.04	4.12	7.50	8.18	8.30	10.02	10.12	10.14	10.78	11.04	10.50

PHỤ LỤC 3: KẾT QUẢ XÁC ĐỊNH LOÀI *Xanthomonas* sp. DỰA VÀO TRÌNH TỰ VÙNG 16S rDNA, *hrpW*, *pthA*

3.1. Kết quả giải trình tự vùng gene 16S rDNA, *hrpW*, *pthA* của 9 MPL *Xanthomonas* sp.

>3773949_BLKQ1-16S_27F

CGGAGGGGCAGGCCTACCATGCAAGTCGAACGGCAGCACAGTAAGAGCTTGCTCTTATGGGTGGCGAGTGGC
GGACGGGTGAGGAATACATCGGAATCTACTCTTTCGTGGGGGATAACGTAGGGAAACTTACGCTAATACCGC
ATACGACCTACGGGTGAAAGCGGAGGACCTTCGGGCTTCGCGCGGTTGAATGAGCCGATGTCGGATTAGCTA
GTTGGCGGGGTAAAGGCCACCAAGGCGACGATCCGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAA
CTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCC
AGCCATGCCGCGTGGGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCCCTTTTGTGGGAAAGAAAAGCAGTCGGTT
AATACCCGATTGTTCTGACGGTACCCAAAGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC
GAAGGGTGCAAGCGTTACTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCGTAGGTGGTGGTTAAGTCTGTTGTGAA
AGCCCTGGGCTCAACCTGGGAATTGCAGTGGATACTGGGTCCTAGAGTGTGGTAGAGGGTAGCGGAATTCC
CGGTGTAGCAGTGAAATGCGTAGAGATCGGGAGGAACATCCGTGGCGAAGGCGGCTACCTGGACCAACT
GACTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGC
GAACTGGATGTTGGGTGCAATTTGGCACGCAGTATCGAAGCTAACGCGTTAAGTTCGCCGCTGGGGAGTAC
GGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTTAATTCGAT
GCAACGCGAAGAACCTTACCTGGTCTTGACATCCACGGAACCTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAAC
CGTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCC GCAACGAGCGC
AACCTTGTCTTAGTTGCCAGCACGTAATGGTGGGAACCTAAGGAAACCGCCGTTGACAACCGGAAGAAA
GGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGGCCCTTACAACCGGGGCTACC.

>3773950_BLK3-16S_27F

CGATGGGAGCCTACACATGCAAGTCGAACGGCAGCACAGTAAGAGCTTGCTCTTATGGGTGGCGAGTGGCGG
ACGGGTGAGGAATACATCGGAATCTACTCTTTCGTGGGGGATAACGTAGGGAAACTTACGCTAATACCGCAT
ACGACCTACGGGTGAAAGCGGAGGACCTTCGGGCTTCGCGCGGTTGAATGAGCCGATGTCGGATTAGCTAGT
TGGCGGGGTAAAGGCCACCAAGGCGACGATCCGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAACT
GAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAG
CCATGCCGCGTGGGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCCCTTTTGTGGGAAAGAAAAGCAGTCGGTTAA
TACCCGATTGTTCTGACGGTACCCAAAGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGA
AGGGTGCAAGCGTTACTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCGTAGGTGGTGGTTAAGTCTGTTGTGAAAG
CCCTGGGCTCAACCTGGGAATTGCAGTGGATACTGGGTCCTAGAGTGTGGTAGAGGGTAGCGGAATTCCCC
GTGTAGCAGTGAAATGCGTAGAGATCGGGAGGAACATCCGTGGCGAAGGCGGCTACCTGGACCAACTGA
CACTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGCGA
ACTGGATGTTGGGTGCAATTTGGCACGCAGTATCGAAGCTAACGCGTTAAGTTCGCCGCTGGGGAGTACGG
TCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTTAATTCGATGC
AACGCGAAGAACCTTACCTGGTCTTGACATCCACGGAACCTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACCG
TGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCC GCAACGAGCGCAA
CCCTTGTCTTAGTTGCCAGCACGTAATGGTGGGAACCTAAGGAGACCGCCGTTGACAACCGGAGGAAGGTG
GGATGACGTCAGTCATCAGGCCCTTACGACAGGGCTACCACGTACTACATGGTAGGACAAAGGCTGCAACCC
CCAGGGCAGCCATCCAGAACCCTTTCCAGTCGGATGGATTTGCACTCACCCCTGAATCGAATCCTAA.

>3773951_BCLK1-16S_27F

GGGGCAGCCTACCATGCAAGTCGAACGGCAGCACAGTAAGAGCTTGCTCTTATGGGTGGCGAGTGGCGGACG
GGTGAGGAATACATCGGAATCTACTCTTTCGTGGGGGATAACGTAGGGAACTTACGCTAATACCGCATACG
ACCTACGGGTGAAAGCGGAGGACCTTCGGGCTTCGCGCGGTTGAATGAGCCGATGTCGGATTAGCTAGTTGG
CGGGGTAAAGGCCACCAAGGCGACGATCCGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGA
ACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCAT
GCCGCGTGGGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCCCTTTTGTGGGAAAGAAAAGCAGTCGGTTAATACC
CGATTGTTCTGACGGTACCCAAAGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGG
TGCAAGCGTTACTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCGTAGGTGGTGGTTTAAAGTCTGTTGTGAAAGCCCTG
GGCTCAACCTGGGAATTGCAGTGGATACTGGGTCACTAGAGTGTGGTAGAGGGTAGCGGAATTCGCGGTGTA
GCAGTCAAATGCGTAGAGATCGGGAGGAACATCCGTGGCGAAGGCGGCTACCTGGACCAACACTGACACTG
AGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGCGAACTGG
ATGTTGGGTGCAATTTGGCACGCAGTATCGAAGCTAACGCGTTAAGTTCGCCGCCTGGGGAGTACGGTTCGCA
AGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGTATGTGGTTTAAATTCGATGCAACG
GAAGAACCTTACCTGGTCTTGACATCCACGGAACCTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACCGTGAGA
CAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCACAACGAGCGCAACCCCTG
TCCTTAGTTGCCAGCACGTAATGGTGGGAACTCTAAGGAGACCGCCGGTGACAACCGGAGGAAGGTGGGGAT
GACGTCAGTCATCAGGCCCTTACAACAGGGCTACCACGTAACATGGTAGGGACAAGGCTGCAACCGCGAG
GCAGCCATCCAGAACCTATTCATTCGGATGGATTGCACTCACTCCTGAATCGAATCCT

>3773964_DHKL2-16S_27F

GGCTACCATGCAAGTCGAACGGCAGCACAGTAAGAGCTTGCTCTTATGGGTGGCGAGTGGCGGACGGGTGAG
GAATACATCGGAATCTACTCTTTCGTGGGGGATAACGTAGGGAACTTACGCTAATACCGCATACGACCTAC
GGGTGAAAGCGGAGGACCTTCGGGCTTCGCGCGGTTGAATGAGCCGATGTCGGATTAGCTAGTTGGCGGGGT
AAAGGCCACCAAGGCGACGATCCGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGAAGACACGG
TCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCG
TGGGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCCCTTTTGTGGGAAAGAAAAGCAGTCGGTTAATACCCGATTG
TTCTGACGGTACCCAAAGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGTGAAG
CGTTACTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCGTAGGTGGTGGTTTAAAGTCTGTTGTGAAAGCCCTGGGCTCA
ACCTGGGAATTGCAGTGGATACTGGGTCACTAGAGTGTGGTAGAGGGTAGCGGAATTCGCGGTGTAGCAGTG
AAATGCGTAGAGATCGGGAGGAACATCCGTGGCGAAGGCGGCTACCTGGACCAACACTGACACTGAGGCAC
GAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGCGAACTGGATGTTGG
GTGCAATTTGGCACGCTAGTATCTAATTTTGGCGTTGTTCCGCCGCCTGGGGAGTACGGTTCGCAAGACTGAAAC
TCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGGGAGTAGGTGGTTTAAATTCGATGCAACCGGAAGACCTT
ACCGGGCTGGGCACCCCGGGAACCT

>3773965_DHKC2-16S_27F

GCTCGAGACTGGCATGAGACGCTTGATCCTTTCCATTATGGGTGGCGAGTGGCGGACGGGTGAGGAATACAT
CGGAATCTACTCTTTCGTGGGGGATAACGTAGGGAACTTACGCTAATACCGCATACGACCTACGGGTGAAA
GCGGAGGACCTTCGGGCTTCGCGCGGTTGAATGAGCCGATGTCGGATTAGCTAGTTGGCGGGGTAAAGGCC
ACCAAGGCGACGATCCGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTC
CTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGGGTGAA
GAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCCCTTTTGTGGGAAAGAAAAGCAGTCGGTTAATACCCGATTGTTCTGACG

GTACCCAAAGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGTGCAAGCGTTACTC
GGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCGTAGGTGGTGGTTTAAAGTCTGTTGTGAAAGCCCTGGGCTCAACCTGGG
AATTGCAGTGGATACTGGGTCACT

AGAGTGTGGTAGAGGGTAGCGGAATCCCGGTGTAGCAGTGAAATGCGTAGAGATCGGGAGGAACATCCGT
GGCGAAGGCGGCTACCTGGACCAACACTGACACTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATA
CCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGCGAACTGGATGTTGGGTGCAATTTGGCACGCAGTATCGAAGCTAA
CGCGTTAAGTTCGCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACA
AGCGGTGGAGTATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGTCTTGACATCCACGGAACCTTC
CAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACCGTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGA
TGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGCCTTAGTTGCCAGCACGTAATGGTGGGAACTCTAAGG
AGACCGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAGTCATCATGGCCCTTACAACAGGGTACCA
CGTACTACATGGTAGGGACAAAGGCTGCAACCCCGAAGGCAGCCATTCCCAAAACCC.

>3773966_DHKQ4-16S_27F

GGGGGGCTACCATGCAAGTCGAACGGCAGCACAGTAAGAGCTTGCTCTTATGGGTGGCGAGTGGCGGACGG
GTGAGGAATACATCGGAATCTACTCTTTCGTGGGGGATAACGTAGGGAACTTACGCTAATACCGCATAACGA
CCTACGGGTGAAAGCGGAGGACCTTCGGGCTTCGCGCGGTTGAATGAGCCGATGTCGGATTAGCTAGTTGGC
GGGGTAAAGGCCACCAAGGCGACGATCCGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGAAG
CACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATG
CCGCGTGGGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCCCTTTTGTGGGAAAGAAAAGCAGTCGGTTAATACCC
GATTGTTCTGACGGTACCCAAAGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGT
GCAAGCGTTACTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCGTAGGTGGTGGTTTAAAGTCTGTTGTGAAAGCCCTG
GGCTCAACCTGGGAATTGCAGTGGATACTGGGTCACTAGAGTGTGGTAGAGGGTAGCGGAATTCGCGGTGTA
GCAGTCAAATGCGTAGAGATCGGGAGGAACATCCGTGGCGAAGGCGGCTACCTGGACCAACACTGACACTG
AGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGCGAACTGG
ATGTTGGGTGCAATTTGGCACGCAGTATCGAAGCTAACGCGTTAAGTTCGCCGCCTGGGGAGTACGGTTCGCA
AGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGC
GAAGAACCTTACCTGGTCTTGACATCCACGGAACCTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACCGTGAGA
CAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTG
TCCTTAGTTGCCAGCACGTAATGGTGGGAACTCTAAGGAGACCCCGGTGACAACCGGAGGAAGGTGGGATGA
CGTCAGTCTCCTGGCCCTTACAACAGGGCTACCACGTAACATGGTAGGGACAAAGGCTGCAACCCGGAGG
GCAGCCATCCAGAACCTATTCAGTCGGATGGAGTTGCACTCGACCCTGAATCCGAA.

>3773952_THKC4-16S_27F

GCGTAGGCCTACCATGCAAGTCGAACGGCAGCACAGTAAGAGCTTGCTCTTACGGGTGGCGAGTGGCGGACG
GGTGAGGAATACATCGAGAATCTACTTTTTTCGTGGGGGATAACGTAGGGAACTTACGCTAATACCGCATAAC
GACCTACGGGTGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTTCGCGGATTGAGTGAGCCGATGTCGGATTAGCTAGTTG
GCGGGGTAAAGGCCACCAAGGCGACGATCCGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGA
GACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCC
ATACCGCGTGGGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCCCTTTTGTGGGAAAGAAATCCAGCCGGCTAATA
CCTGGTTGGGATGACGGTACCCAAAGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAG
GGTGAAGCGTTACTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCGTAGGTGGTGGTTTAAAGTCTGTTGTGAAAGCCC
TGGGCTCAACCTGGGAACTGCAGTG

GAAACTGGACGACTAGAGTGTGGTAGAGGGTAGCGGAATTCCTGGTGTAGCAGTGAAATGCGTAGAGATCA
GGAGGAACATCCATGGCGAAGGCAGCTACCTGGACCAACTGACACTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCA
CACAGGATTAGATACTCTGGTAGTCCACGCTCTACACGATGCAAACCTGGATGTTGGGTGCAATTTGGCACGC
AGTATCGAAGCTAACGCGTTAAGTTCGCCGCCTGGAGAGTACGGTCGCAAGACTGACACTCAGAGGAATTGA
CGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGAC
ATGTTCGAGAACTTTCCAGAGATGGATGGGTGCCTTCGGAACTCAAACACAGGTGCTGCATGGCTGTCCTCA
CCTCGTGTGGGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCACCTTGTCTTATGTTGCCACCACATAATG
GTGGGAACTCTAAGGAAACCGCCGGTAAACAACCGGAAGAAGGTGGGGAATGACTTCAAGTCTTCTGGGCC
CTTACCGC.

>3773953_THKQ1-16S_27F

AGGGGCGGCCTACACATGCAAGTCGAACGGCAGCACAGTAAGAGCTTGCTCTTATGGGTGGCGAGTGGCGG
ACGGGTGAGGAATACATCGGAATCTACTCTTTTCGTGGGGGATAACGTAGGGAACTTACGCTAATACCGCAT
ACGACCTACGGGTGAAAGCGGAGGACCTTCGGGCTTCGCGCGGTTGAATGAGCCGATGTCGGATTAGCTAGT
TGGCGGGGTAAAGGCCACCAAGGCGACGATCCGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAC
GAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAG
CCATGCCGCGTGGGTGAAGAAGGCCTTCGGGTGTAAAGCCCTTTTGTGGGAAAGAAAAGCAGTCGGTTAA
TACCCGATTGTTCTGACGGTACCCAAAGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGA
AGGGTGCAAGCGTACTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCGTAGGTGGTGGTTAAGTCTGTTGTGAAAG
CCCTGGGCTCAACCTGGGAATTGCAGTGGATACTGGGTCACTAGAGTGTGGTAGAGGGTAGCGGAATTCCCG
GTGTAGCAGTGAAATGCGTAGAGATCGGGAGGAACATCCGTGGCGAAGGCGGCTACCTGGACCAACTGA
CACTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGCGA
ACTGGATGTTGGGTGCAATTTGGCACGCAGTATCGAAGCTAACGCGTTAAGTTCGCCGCCTGGGGAGTACGG
TCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTTAATTCGATGC
AACGCGAAGAACCTTACCTGGTCTTGACATCCACGGAACCTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACCG
TGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAA
CCCTTGTCTTAGTTGCCAGCACGTAATGGTGGGAACTCTAAGGAGACCGCCGGTGACAACCGGAGGAAGGT
GGGGATGACGTCAGTCATCAGGCCCTTACGACAGGGCTACCACGTACTACATGGTAGGGACAAAGGCTGCAA
CCCAGGCAGCCATCCAGAACCTATTCAGTCGGATG

>3773963_THKL1-16S_27F

GGGGGCTACACATGCAAGTCGAACGGCAGCACAGTAAGAGCTTGCTCTTATGGGTGGCGAGTGGCGGACGG
GTGAGGAATACATCGGAATCTACTCTTTTCGTGGGGGATAACGTAGGGAACTTACGCTAATACCGCATAACGA
CCTACGGGTGAAAGCGGAGGACCTTCGGGCTTCGCGCGGTTGAATGAGCCGATGTCGGATTAGCTAGTTGGC
GGGGTAAAGGCCACCAAGGCGACGATCCGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAACCTGAGA
CACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATG
CCGCGTGGGTGAAGAAGGCCTTCGGGTGTAAAGCCCTTTTGTGGGAAAGAAAAGCAGTCGGTTAATACCC
GATTGTTCTGACGGTACCCAAAGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGT
GCAAGCGTACTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCGTAGGTGGTGGTTAAGTCTGTTGTGAAAGCCCTG
GGCTCAACCTGGGAATTGCAGTGGATACTGGGTCACTAGAGTGTGGTAGAGGGTAGCGGAATTCCCGGTGTA
GCAGTGAAATGCGTAGAGATCGGGAGGAACATCCGTGGCGAAGGCGGCTACCTGGACCAACTGACACTG
AGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGCGAACTGG
ATGTTGGGTGCAATTTGGCACGCAGTATCGAAGCTAACGCGTTAAGTTCGCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCA

AGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGTATGTGGTTTAATTCGATGCAACGC
GAAGAACCTTACCTGGTCTTGACATCCACGGAACCTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACCGTGAGA
CAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTG
TCCTTAGTTGCCAGCACGTAATGGTGGGAACTCTAAGGAGACCGCCGGTGACAACCGGAGGAAGGTGGGGAT
GACGTCAAGTCATCTGGCCCTTACAACAGGGCTACCACGTACTACATGGTAGGGACAGAGGCTGCAACCCCG
AGGGCAGCCATC.

3.2. Kết quả đăng ký trình tự vùng 16S rDNA trên genebank của 9 MPL *Xanthomonas* sp.

Bảng 3.1. Số đăng ký trình tự vùng 16S rDNA trên Genebank của 9 MPL *Xanthomonas axonopodis* nghiên cứu

STT	Mẫu phân lập	Số đăng ký (*)
1	BLKQ1	MT328595.1
2	BLKC3	MT328596.1
3	BLKL1	MT328597.1
4	DHHL2	MT328598.1
5	DHHQ2	MT328599.1
6	DHKQ4	MT328600.1
7	THKQ1	MT328601.1
8	THKL1	MT328602.1
9	THKC4	MT328603.1

3.3. Kết quả so sánh tỷ lệ tương đồng trình tự DNA trong vùng 16S rDNA của 9 MPL

Bảng 3.2. Tỷ lệ tương đồng (%) trình tự DNA trong vùng 16S rDNA của các *Xanthomonas axonopodis* với các mẫu công bố trên Genebank.

MPL	Tỷ lệ tương đồng (%)						
	KY27 1340	NR10 4963	MN43 1486	HQ87 5739	MK38 2439	MK12 1207	JQ51 3818
BLKQ1	99,24	98,99	99,16	99,16	99,16	99,32	99,16
BLKC3	97,53	97,39	97,62	97,62	97,55	97,61	97,55
BLKL1	99,24	98,99	99,16	99,16	99,16	99,32	99,16
THKC4	94,26	94,23	94,23	94,23	94,23	94,35	94,23
DHKQ4	97,75	97,68	97,91	97,91	97,83	97,83	97,83
DHHL2	97,91	97,81	98,02	98,02	98,02	98,02	98,02
DHHQ2	98,84	98,67	98,92	98,92	98,84	98,84	98,84
THKL1	99,10	99,03	99,27	99,27	99,19	99,19	99,19
THKQ1	98,33	98,11	98,35	98,35	98,34	98,41	98,27

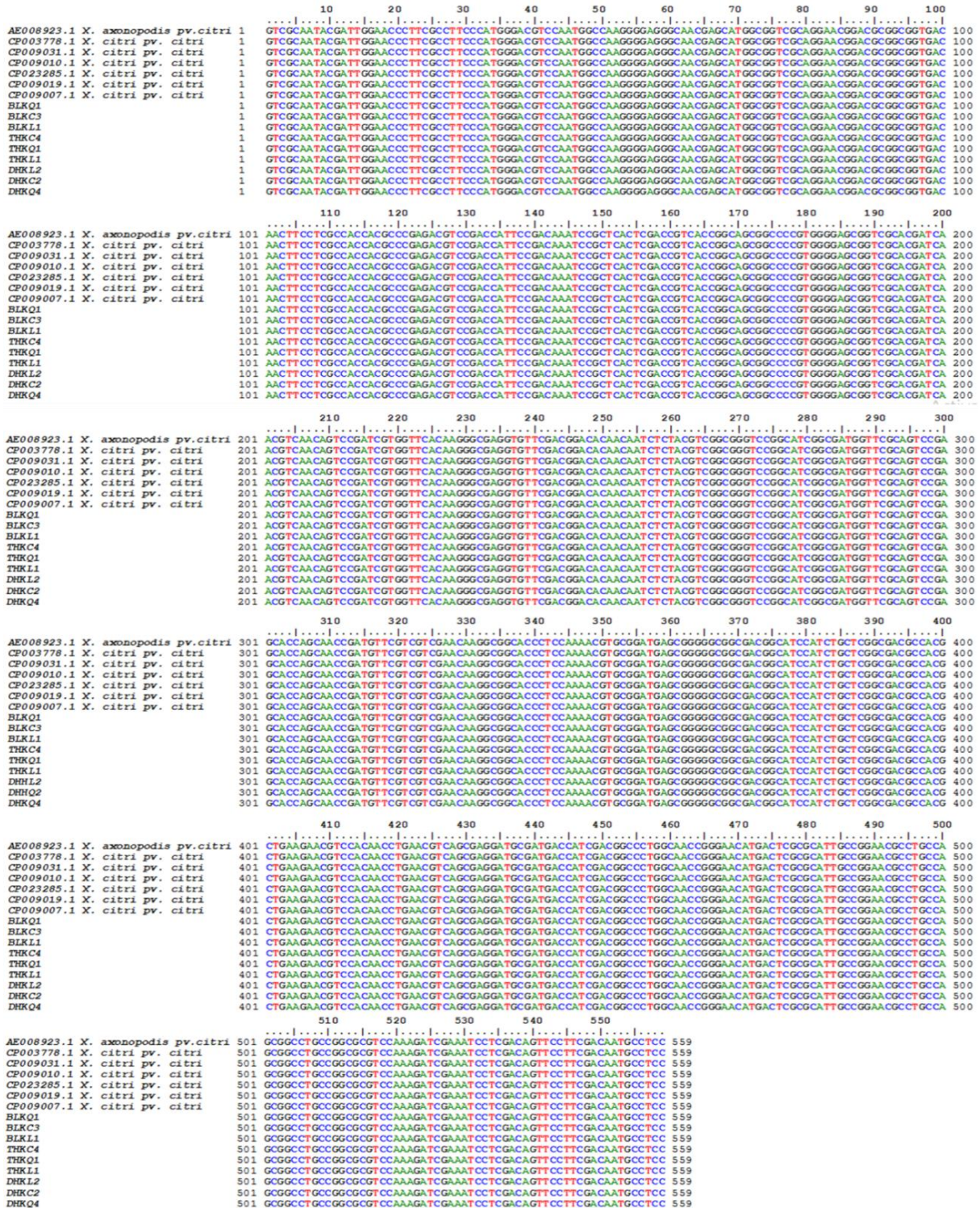
Bảng 3.3. Tỷ lệ tương đồng (%) trình tự vùng gene *hrpW* của các *Xanthomonas axonopodis* với các mẫu công bố trên Genbank.

MPL	Tỷ lệ tương đồng (%)						
	AE008 923.1	CP009 007.1	CP023 285.1	CP009 019.1	CP009 010.1	CP009 031.1	CP003 778.1
BLKQ1	100	100	100	100	100	100	100
BLKC3	100	100	100	100	100	100	100
BLKL1	100	100	100	100	100	100	100
THKC4	100	100	100	100	100	100	100
DHKQ4	100	100	100	100	100	100	100
DHHL2	100	100	100	100	100	100	100
DHHQ2	100	100	100	100	100	100	100
THKL1	100	100	100	100	100	100	100
THKQ1	100	100	100	100	100	100	100

Bảng 3.4. Tỷ lệ tương đồng (%) trình tự vùng gene *pthA* của các *Xanthomonas axonopodis* với các mẫu công bố trên Genbank.

MPL	Tỷ lệ tương đồng (%)						
	AB021 365.1	CP004 400.1	EF473 087.1	GU181 333.1	GU18 1332.1	MH276 958.1	MK4252 11.1
BLKQ1	100	100	99.49	99.49	99.49	99.49	99.49
BLKC3	100	100	99.49	99.49	99.49	99.49	99.49
BLKL1	100	100	99.49	99.49	99.49	99.49	99.49
THKQ1	100	100	99.49	99.49	99.49	99.49	99.49
DHKQ4	100	100	99.49	99.49	99.49	99.49	99.49
DHHL2	100	100	99.49	99.49	99.49	99.49	99.49
DHHQ2	100	100	99.49	99.49	99.49	99.49	99.49
THKL1	100	100	99.49	99.49	99.49	99.49	99.49

3.4. Kết quả align trình tự vùng gene *hrpW* của 9MPL với trình tự vùng gene *hrpW* của các dòng vi khuẩn *Xanthomonas* sp. đã được công bố trên GeneBank



Hình 3.1. Kết quả align trình tự vùng gene *hrpW* của 9MPL với trình tự vùng gene *hrpW* của các dòng vi khuẩn *Xanthomonas* sp. đã được công bố trên GeneBank

PHỤ LỤC 4: KẾT QUẢ ĐÁNH GIÁ HOẠT TÍNH ỨC CHẾ VI KHUẨN *Xanthomonas* sp. CỦA HOẠT CHẤT CHIẾT TỪ CÂY GIAO TRONG ĐIỀU KIỆN PHÒNG THÍ NGHIỆM

4.1. Kết quả tạo cao chiết toàn phần và các cao phân đoạn từ cây giao (*Euphorbia tirucalli* L.)

Bảng 4.1. Độ ẩm bột cây giao thu nhận từ Bình Thuận, ĐăK Nông, Tp. HCM

Lần lặp lại	Vùng thu nhận		
	Bình Thuận	ĐăK Nông	Tp. HCM
Lần 1	8,77	9,65	8,18
Lần 2	9,45	7,98	8,86
Lần 3	7,98	8,37	9,55

Bảng 4.2. Khối lượng và hiệu suất của cao chiết toàn phần và các cao chiết phân đoạn từ cây giao thu nhận ở Bình Thuận

Thông số	Mẫu cao chiết	LL1	LL2	LL3
Khối lượng	Cao toàn phần	610,32	620,12	620,00
	Cao n-hexan	174,92	183,2	179,3
	Cao ethyl acetate	114,83	116,21	113,89
	Cao butanol	73,12	74,23	72,89
Hiệu suất (%)	Cao toàn phần	9,38	9,54	9,53
	Cao n-hexan	28,66	29,54	28,92
	Cao ethyl acetate	18,81	18,73	18,37
	Cao butanol	11,98	11,97	11,75
Độ ẩm (%)	Cao toàn phần	29,9	30,13	29,00
	Cao n-hexan	26,19	28,12	27,52
	Cao ethyl acetate	28,87	30,00	28,28
	Cao butanol	30,59	31,09	29,72

Bảng 4.3. Khối lượng và hiệu suất của cao chiết toàn phần và các cao chiết phân đoạn từ cây giao thu nhận ở ĐẮK Nông

Thông số	Mẫu cao chiết	LL1	LL2	LL3
Khối lượng	Cao toàn phần	574,2	575,12	579,87
	Cao n-hexan	169,42	171,12	169,42
	Cao ethyl acetate	109,45	104,71	102,89
	Cao butanol	73,12	75,23	78,89
Hiệu suất (%)	Cao toàn phần	8,83	8,85	8,92
	Cao n-hexan	29,51	29,75	30,10
	Cao ethyl acetate	19,06	18,21	17,74
	Cao butanol	12,73	13,08	13,60
Độ ẩm (%)	Cao toàn phần	27,89	29,75	29,89
	Cao n-hexan	26,59	27,92	28,02
	Cao ethyl acetate	27,32	30,12	29,56
	Cao butanol	31,12	31,29	29,72

Bảng 4.4. Khối lượng và hiệu suất của cao chiết toàn phần và các cao chiết phân đoạn từ cây giao thu nhận ở Tp. HCM

Thông số	Mẫu cao chiết	LL1	LL2	LL3
Khối lượng	Cao toàn phần	564,2	565,12	560,87
	Cao n-hexan	171,42	175,12	179,53
	Cao ethyl acetate	83,45	90,71	94,89
	Cao butanol	83,12	85,23	88,89
Hiệu suất (%)	Cao toàn phần	8,68	8,69	8,63
	Cao n-hexan	30,38	30,99	32,01
	Cao ethyl acetate	14,79	16,05	16,92
	Cao butanol	14,73	15,08	15,85
Độ ẩm (%)	Cao toàn phần	28,67	27,09	28,12
	Cao n-hexan	27,05	28,78	28,13
	Cao ethyl acetate	28,37	30,15	29,16
	Cao butanol	30,12	31,43	29,26

❖ Xử lý ANOVA hiệu suất chiết cao toàn phần và các cao phân đoạn từ cây giao thu nhận ở Bình Thuận, Đắk Nông, Tp. HCM

➤ Cao toàn phần

Descriptives								
EtOH								
	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1	3	9.4833	0.08963	0.05175	9.2607	9.706	9.38	9.54
2	3	8.8667	0.04726	0.02728	8.7493	8.9841	8.83	8.92
3	3	8.6667	0.03215	0.01856	8.5868	8.7465	8.63	8.69
Total	9	9.0056	0.37246	0.12415	8.7193	9.2919	8.63	9.54

ANOVA						
EtOH						
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	
Between Groups	1.087	2	0.544	144.322	0	
Within Groups	0.023	6	0.004			
Total	1.11	8				

EtOH						
	NT	N	Subset for alpha = 0.05			
Duncan ^a	3	3	1	2	3	
			8.6667	8.86		
	2	3		67		
					9.48	
	1	3			33	
			Sig.	1	1	1

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

➤ **Cao Hexan**

Descriptives								
He								
	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1	3	29.04	0.45211	0.2610	27.9169	30.1631	28.66	29.54
		29.78						
2	3	67	0.2967	0.1713	29.0496	30.5237	29.51	30.1
		31.12		0.4754				
3	3	67	0.82355	8	29.0809	33.1725	30.38	32.01
Tot		29.98		0.3465				
al	9	44	1.03975	8	29.1852	30.7837	28.66	32.01

ANOVA

He

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	6.707	2	3.354	10.365	0.011
Within Groups	1.941	6	0.324		
Total	8.649	8			

He

	NT	N	Subset for alpha = 0.05	
Duncan ^a	1	3	1	2
	2	3	29.04	29.7867
	3	3	31.12	67
	Sig.		0.159	1

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

➤ Cao ethyl acetate

Descriptives									
EA									
	N	n	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
1	3	3	18.63	0.23438	0.13532	18.0544	19.2189	18.37	18.81
2	3	3	18.33	0.66905	0.38628	16.6746	19.9987	17.74	19.06
3	3	3	15.92	1.07093	0.6183	13.2597	18.5803	14.79	16.92
Total	9	11	17.63	1.4409	0.4803	16.5235	18.7387	14.79	19.06

ANOVA						
EA						
	Sum of Squares	df	Mean square	F	Sig.	
Between Groups	13.311	2	6.655	12.104	0.008	
Within Groups	3.299	6	0.55			
Total	16.609	8				

EA					
	NT	N	Subset for alpha = 0.05		
			1	2	
Duncan ^a	3	3	15.92		
	2	3		18.33	
				67	
	1	3		18.63	
				67	
	Sig.		1	0.638	

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

^a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

➤ **Cao butanol**

Descriptives								
Bu								
	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1	3	11.9	0.13	0.07506	11.5771	12.2229	11.75	11.98
		13.13						
2	3	67	0.43776	0.25274	12.0492	14.2241	12.73	13.6
3	3	15.22	0.57297	0.33081	13.7967	16.6433	14.73	15.85
Tot		13.41						
al	9	89	1.49857	0.49952	12.267	14.5708	11.75	15.85

ANOVA						
Bu						
		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups		16.892	2	8.446	47.199	0
Within Groups		1.074	6	0.179		
Total		17.966	8			

Bu							
			NT	N	Subset for alpha = 0.05		
					1	2	3
Duncan ^a			1	3	11.9		
						13.13	
			2	3		67	
							15.2
			3	3			2
			Sig				
					1	1	1

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

^a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

4.2. Kết quả thí nghiệm đánh giá khả năng ức chế vi khuẩn *Xanthomonas axonopodis* của các cao chiết phân đoạn từ cây giao (Bình Thuận, ĐăK Nông, Tp. HCM) trong điều kiện phòng thí nghiệm

❖ Cây giao ở Bình Thuận

Bảng 4.5. Đường kính vòng vô khuẩn của các cao chiết phân đoạn từ cây giao ở Bình Thuận

Nồng độ (mg/mL)	Cao chiết phân đoạn	Đường kính vòng vô khuẩn (mm)		
		Lần 1	Lần 2	Lần 3
1,25	<i>n</i> -Hexan	0	0	0
	Ethyl acetate	11,4	10,5	9,8
	Butanol	4,0	3,7	3,4
2,5	<i>n</i> -Hexan	0	0	0
	Ethyl acetate	13,2	12,0	11,7
	Butanol	7,5	8,4	7,0
5,0	<i>n</i> -Hexan	6,0	6,8	5,5
	Ethyl acetate	15,0	14,5	13,5
	Butanol	9,5	10,6	10,0
7,5	<i>n</i> -Hexan	8,5	9,5	8,0
	Ethyl acetate	18,3	17,2	17,5
	Butanol	11,4	11,0	10,7

❖ **Cây giao ở ĐẮK NÔNG**

Bảng 4.6. Đường kính vòng vô khuẩn của các cao chiết phân đoạn từ cây giao ở ĐẮK NÔNG

Nồng độ (mg/mL)	Cao chiết phân đoạn	Đường kính vòng vô khuẩn (mm)		
		Lần 1	Lần 2	Lần 3
1,25	<i>n</i> -Hexan	0	0	0
	Ethyl acetate	8,5	9,0	8,5
	Butanol	3,5	3,3	3,0
2,5	<i>n</i> -Hexan	0	0	0
	Ethyl acetate	10,0	10,0	10,5
	Butanol	4,5	5,5	5,0
5,0	<i>n</i> -Hexan	3,5	3,0	3,7
	Ethyl acetate	13,2	12,0	11,5
	Butanol	7,5	8,5	7,0
7,5	<i>n</i> -Hexan	5,0	5,8	6,5
	Ethyl acetate	15,0	15,5	16,0
	Butanol	9,5	10,6	10,0

❖ **Cây giao ở Tp. HCM**

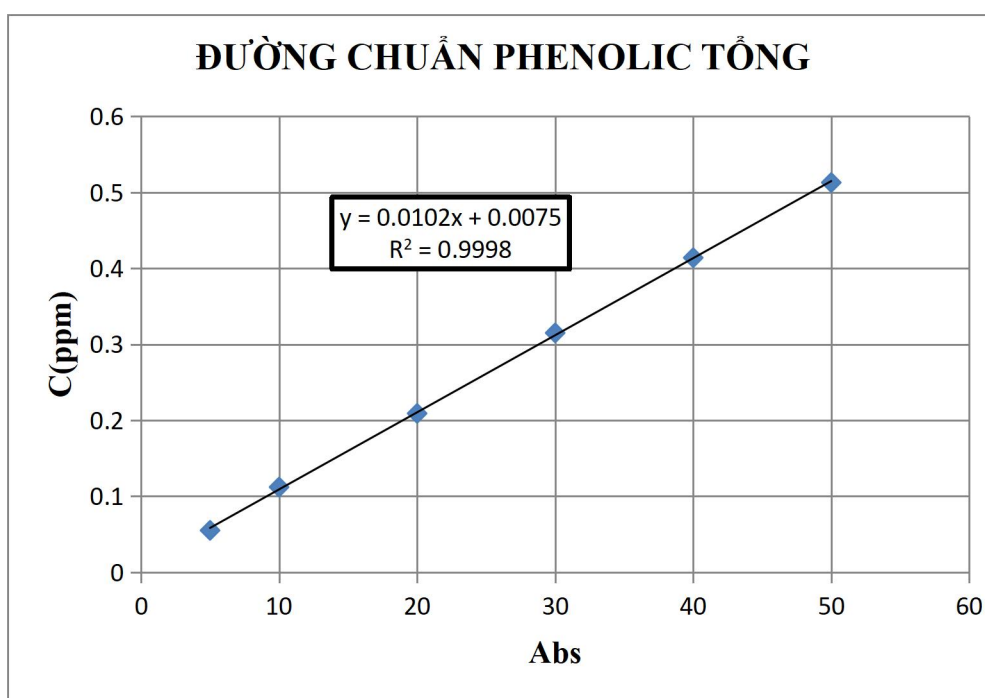
Bảng 4.7. Đường kính vòng vô khuẩn của các cao chiết phân đoạn từ cây giao ở Tp. HCM

Nồng độ (mg/mL)	Cao chiết phân đoạn	Đường kính vòng vô khuẩn (mm)		
		Lần 1	Lần 2	Lần 3
1,25	<i>n</i> -Hexan	0	0	0
	Ethyl acetate	6,5	7,0	6,5
	Butanol	2,5	3,3	3,0
2,5	<i>n</i> -Hexan	0	0	0
	Ethyl acetate	8,0	8,7	8,5
	Butanol	4,5	4,5	5,0
5,0	<i>n</i> -Hexan	2,5	3,0	2,5
	Ethyl acetate	10,4	10,0	9,5
	Butanol	6,5	7,7	7,0
7,5	<i>n</i> -Hexan	5,0	5,5	4,5
	Ethyl acetate	11,5	12,0	11,3
	Butanol	7,5	8,5	9,0

4.3. Kết quả định lượng phenolic tổng và flavonoid tổng của cao chiết phân đoạn từ cây giao (*E. tirucalli*) ở Bình Thuận, Đắk Nông, Tp. HCM

Bảng 4.8. Xác định đường chuẩn acid gallic

	Chuẩn (acid gallic)					
C ppm	50	40	30	20	10	5
m cân (mg)	250	200	150	100	50	25
m đm (ml)	5	5	5	5	5	5
Ac	0.513	0.414	0.315	0.209	0.112	0.055



Hình 4.1. Đường chuẩn acid gallic

Bảng 4.9. Hàm lượng phenolic tổng của các cao phân đoạn từ cây giao ở Bình Thuận

Cao chiết phân đoạn	m cân (mg)	V hút (mL)	F pha loãng	Mật độ quang (OD)				Nồng độ trong bình đo		
				A1	A2	A3	Atb	Lần 1	Lần 2	Lần 3
n-hexan	55.7	1.5	50	0.131	0.137	0.131		12.1705	12.745	12.1725
				64	5	66	0.1336	8824	09804	4902
Ethyl acetate	54.6	1.5	100	0.402		0.400	0.4022	38.7205	38.872	38.5137
				45	0.404	34	63333	8824	54902	2549
butanol	53.3	1.5	100	0.235		0.230	0.2317	22.3235	21.813	21.8254
				2	0.23	12	73333	2941	72549	902

Bảng 4.10. Hàm lượng phenolic tổng của các cao phân đoạn từ cây giao ĐẮK Nông

Cao chiết phân đoạn	m cân (mg)	V hút (mL)	F pha loãng	Mật độ quang (OD)				Nồng độ trong bình đo		
				A1	A2	A3	Atb	Lần 1	Lần 2	Lần 3
<i>n</i> -hexan	55.5	1.5	50	0.11	0.11	0.13	0.1166 66667	10.0490 1961	10.049 01961	12.0098 0392
Ethyl acetate	61.5	1.5	100	0.43	0.43	0.4	0.42	41.4215 6863	41.421 56863	38.4803 9216
Butanol	62.3	1.5	100	0.21	0.23	0.23	0.2233 33333	19.8529 4118	21.813 72549	21.8137 2549

❖ **Kết quả xử lý ANOVA hàm lượng phenolic tổng của các cao chiết phân đoạn từ cây giao thu nhận ở Bình Thuận và ĐẮK Nông**

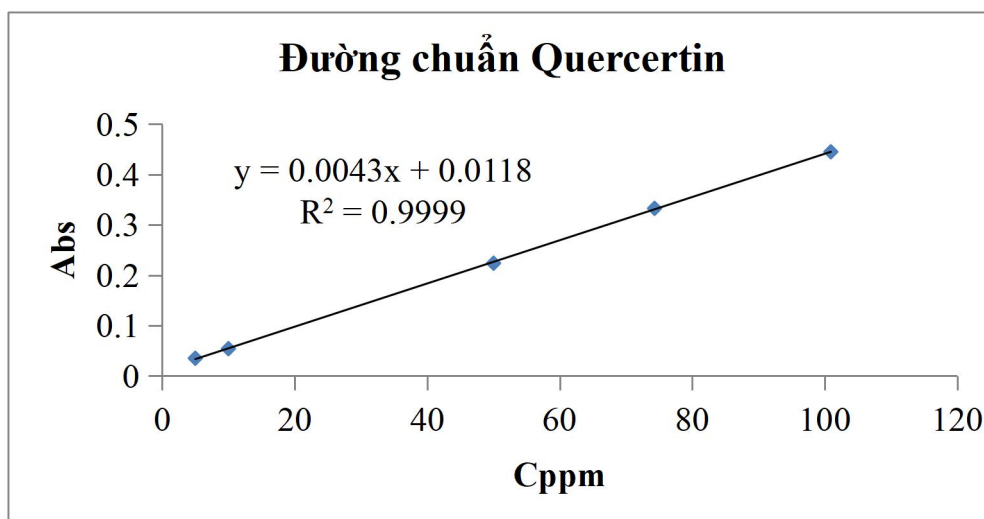
Descriptives									
Phenolic									
		Mea	Std.	Std.	95% Confidence Interval		Mini	Maxi	
	N	n	Deviation	Error	for Mean		mum	mum	
					Lower Bound	Upper Bound			
1	3	16.64 67	0.44456	0.2566 7	15.5423	17.751	16.39	17.16	
2	3	106.3 267	0.49217	0.2841 6	105.104	107.549	105.8	106.7	
3	3	61.87 67	0.81709	0.4717 5	59.8469	63.9064	61.39	62.82	
4	3	14.46 33	1.52998	0.8833 3	10.6627	18.264	13.58	16.23	
5	3	98.64 50.94	4.1396	2.39 1.5733	88.3567	108.923	93.86	101.0	
6	3	67	2.72509	3	44.1772	57.7162	47.8	52.52	
Total	8	58.15	36.80457	8.6749 2	39.8475	76.4525	13.58	106.7 9	

ANOVA					
Phenolic					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	22971.777	5	4594.355	984.126	0
Within Groups	56.022	12	4.668		
Total	23027.798	17			

Phenolic Duncan,a NT						
	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
	4	3	14.4633			
	1	3	16.6467			
	6	3		50.9467		
	3	3			61.8767	
	5	3				98.64
						106.32
	2	3				67
Sig.			0.24	1	1	1

Bảng 4.11. Xác định đường chuẩn quercetrin

Nồng độ thực (ppm)	$\lambda=320\text{nm}$			A tb
100.9120	0.446	0.444	0.445	0.445
74.3096	0.333	0.332	0.333	0.333
50.0145	0.224	0.224	0.223	0.224
10.0019	0.053	0.054	0.055	0.054
5.0017	0.034	0.035	0.036	0.035



Hình 4.2. Đường chuẩn quercetrin

Bảng 4.12. Hàm lượng flavonoid tổng của các cao phân đoạn từ cây giao Bình Thuận

Cao chiết phân đoạn	m cân (mg)	V _{hút} (mL)	F pha loãng	Mật độ quang (OD)				Nồng độ trong bình đo		
				A1	A2	A3	Atb	Lần 1	Lần 2	Lần 3
<i>n</i> -hexan	188.8	0.5	1	0.093	0.091	0.090	0.091	18.8837 2093	18.418 60465	18.1860 4651
Ethyl acetate	37.24 4	0.5	1	0.084	0.083	0.085	0.084	16.7906 9767	16.558 13953	17.0232 5581
Butanol	91.77	0.5	1	0.120	0.120	0.119	0.120	25.1627 907	25.162 7907	24.9302 3256

Bảng 4.13. Hàm lượng flavonoid tổng của các cao phân đoạn từ cây giao Đắk Nông

Cao chiết phân đoạn	m cân (mg)	V _{hút} (mL)	F pha loãng	Mật độ quang (OD)				Nồng độ trong bình đo		
				A1	A2	A3	Atb	Lần 1	Lần 2	Lần 3
<i>n</i> -hexan	185	0.5	1	0.081	0.085	0.085	0.084	16.0930 2326	17.023 25581	17.0232 5581
Ethyl acetate	35	0.5	1	0.072	0.074	0.074	0.073	14	14.465 11628	14.4651 1628
Butanol	95.15	0.5	1	0.117	0.117	0.119	0.118	24.4651 1628	24.465 11628	24.9302 3256

❖ **Kết quả xử lý ANOVA hàm lượng flavonoid tổng của các cao chiết phân đoạn từ cây giao thu nhận ở Bình Thuận và Đăk Nông**

Descriptives								
Flavonoid								
	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1	3	97.283	0.85909	0.496	95.1492	99.4174	96.32	97.97
2	3	451.03	6.54229	3.77719	434.778	467.282	444.59	457.67
3	3	273.06	1.28858	0.74396	269.8657	276.2677	271.66	274.19
4	3	90.343	2.90407	1.67667	83.1292	97.5574	86.99	92.02
5	3	408.86	7.67299	4.43	389.7992	427.9208	400	413.29
6	3	258.75	2.82324	1.63	251.7367	265.7633	257.12	262.01
Tot al	1 8	263.22 22	141.90024	33.4462 1	192.6569	333.7876	86.99	457.67

ANOVA
Flavonoid

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	342065.588	5	68413.118	3407.053	0
Within Groups	240.958	12	20.08		
Total	342306.546	17			

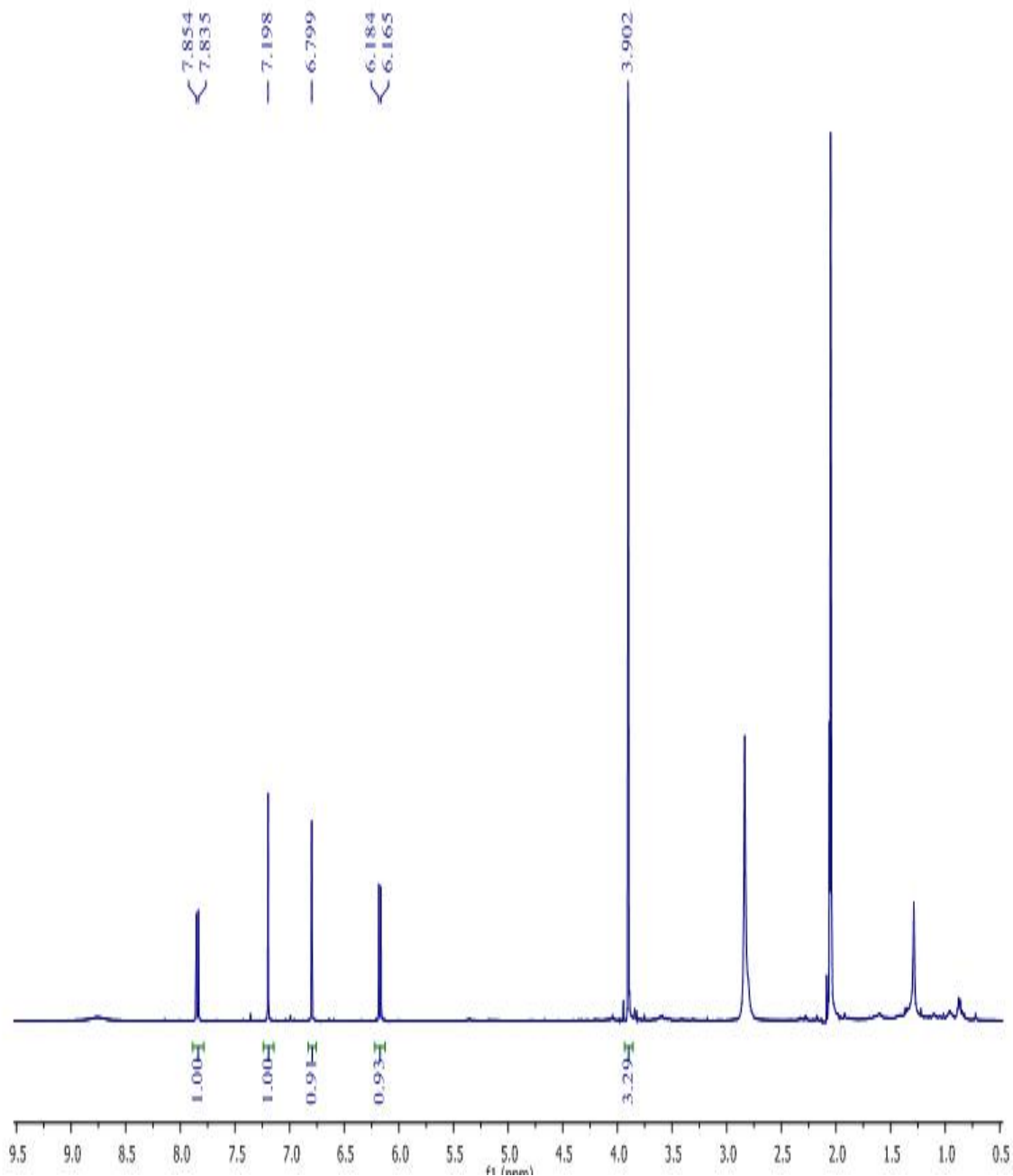
Flavonoid
Duncan,a

NT	N	Subset for alpha = 0.05						
		1	2	3	4	5		
	4	3	90.3433					
	1	3	97.2833					
	6	3	258.75					
	3	3		273.0667				
	5	3			408.86			
	2	3					451.03	
								3
Sig.			0.082	1	1	1	1	1

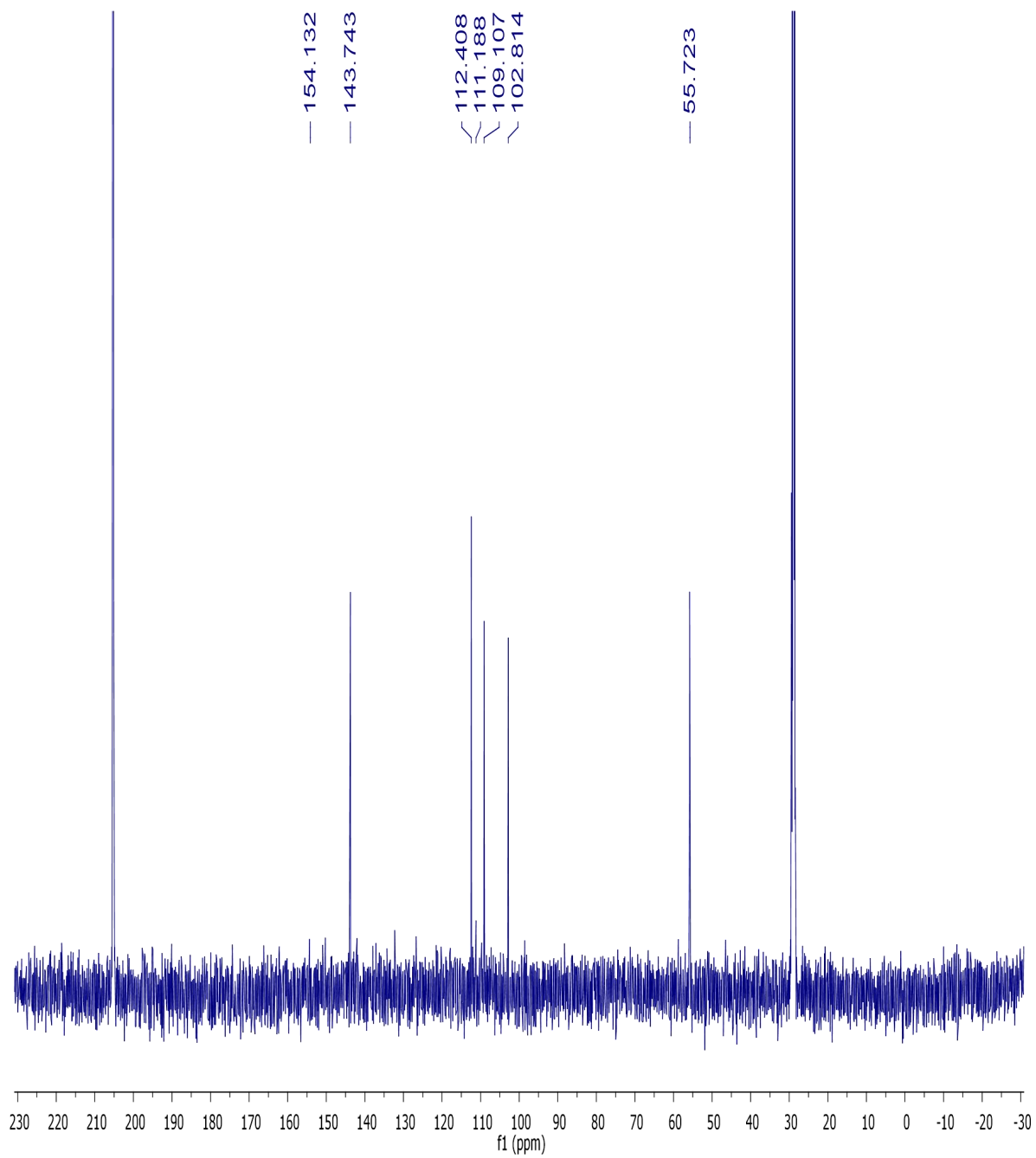
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

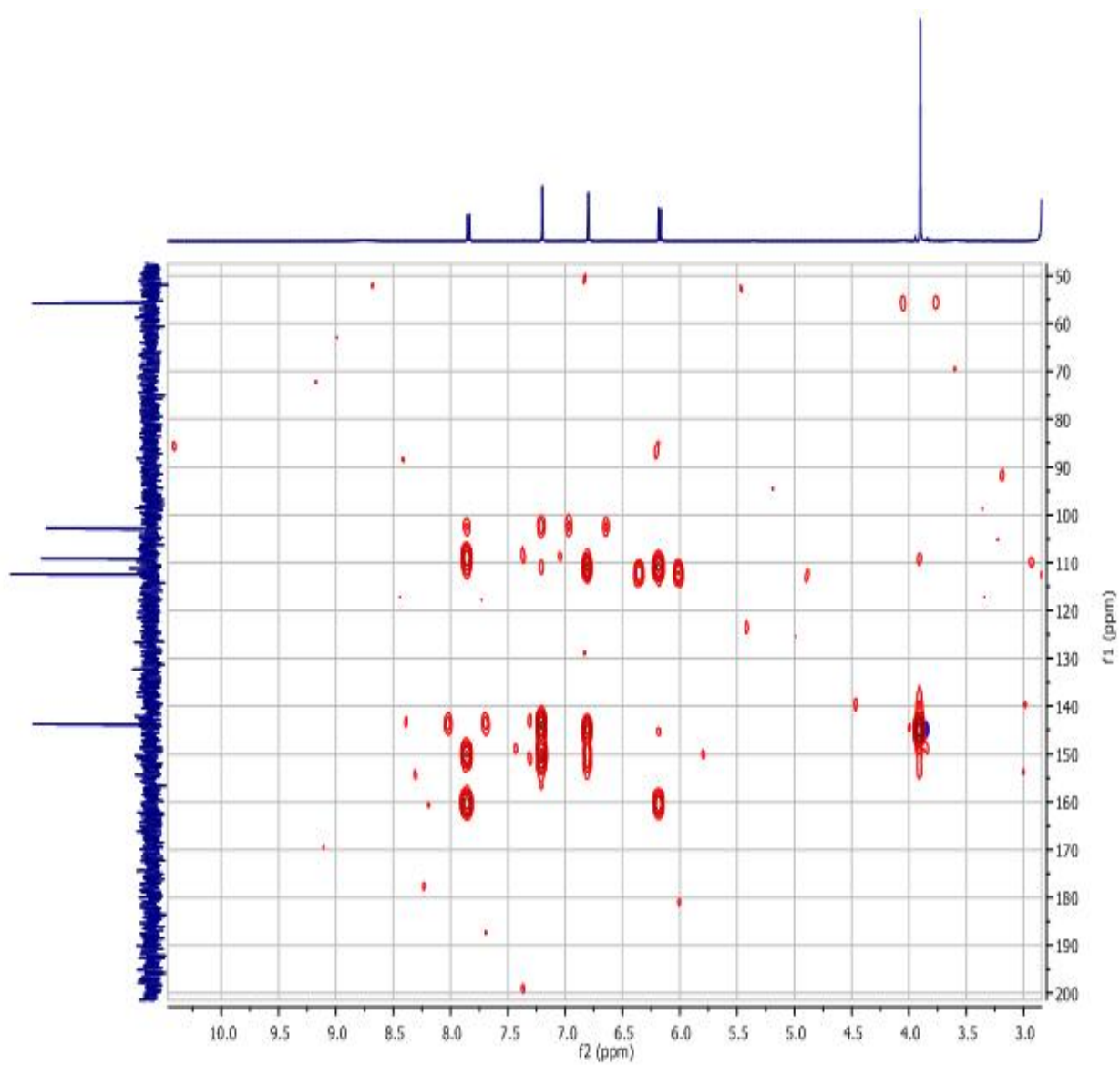
4.4. Kết quả phân lập hợp chất trong cao chiết ethyl acetate (EA) từ cây giao Bình Thuận và Đắk Nông



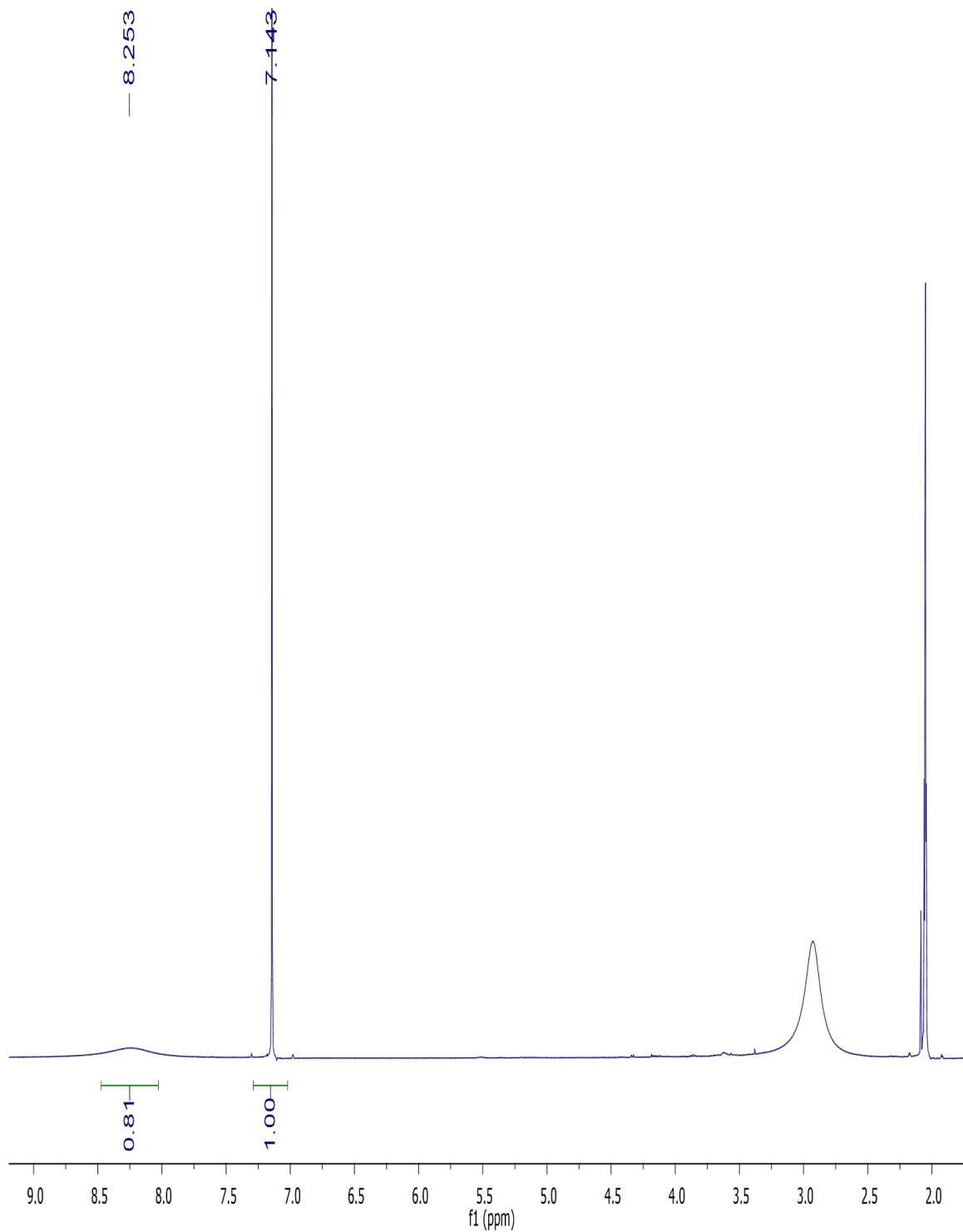
Hình 4.3. Phổ $^1\text{H-NMR}$ của hợp chất scopoletin trong $\text{acetone-}d_6$



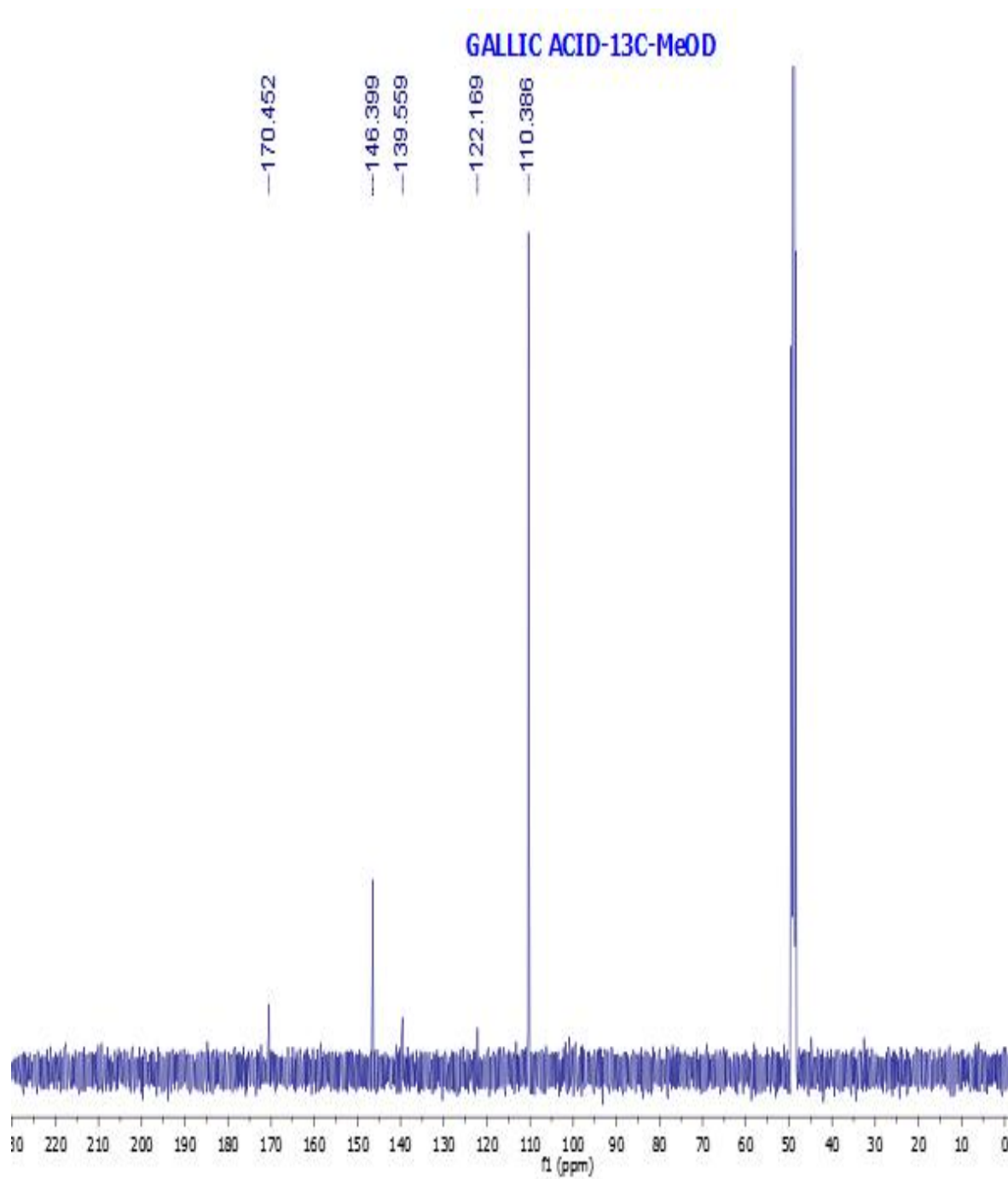
Hình 4.4. Phổ ^{13}C -NMR của hợp chất scopoletin trong acetone- d_6



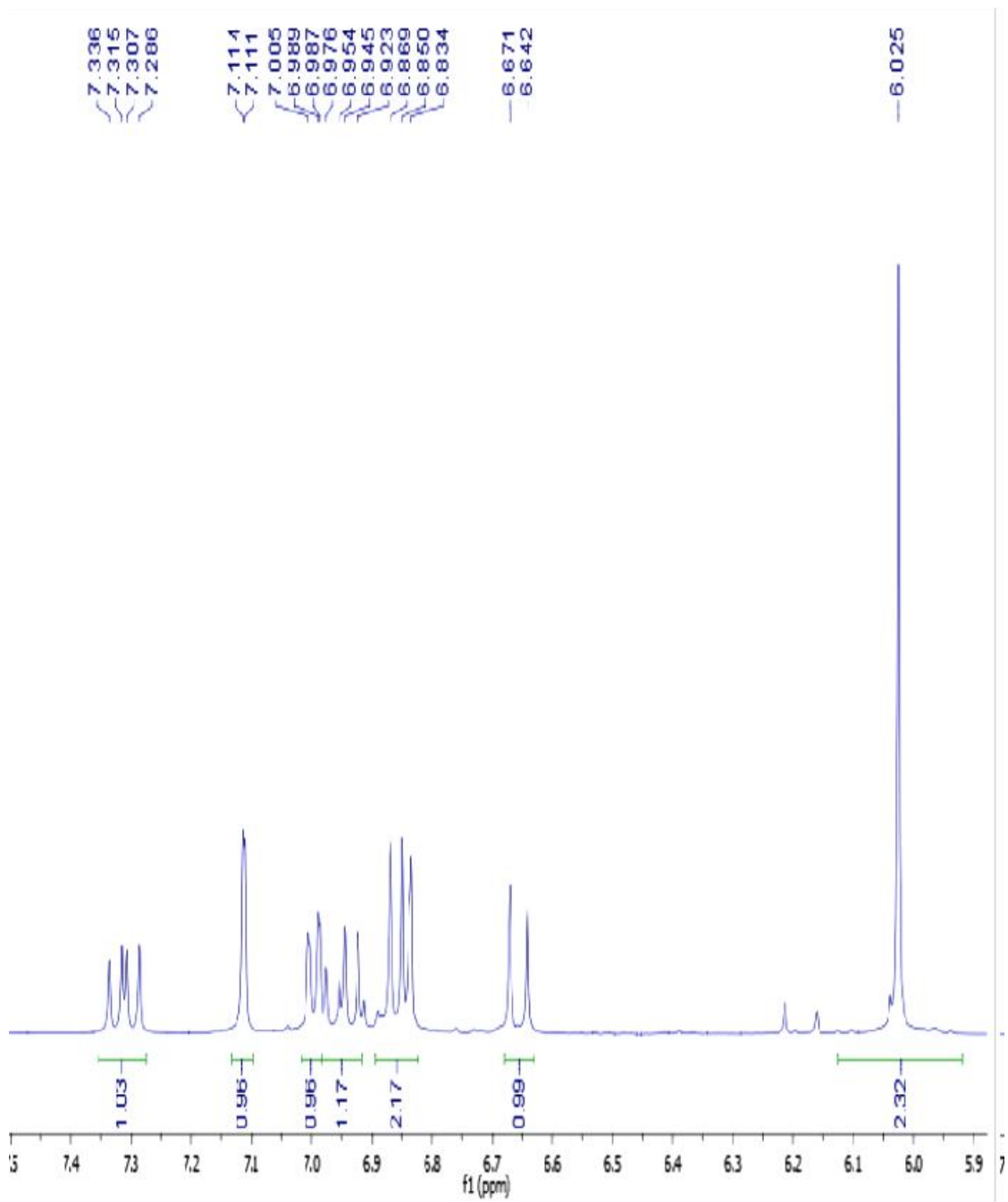
Hình 4.5. Phổ HMBC của hợp chất scopoletin trong acetone- d_6



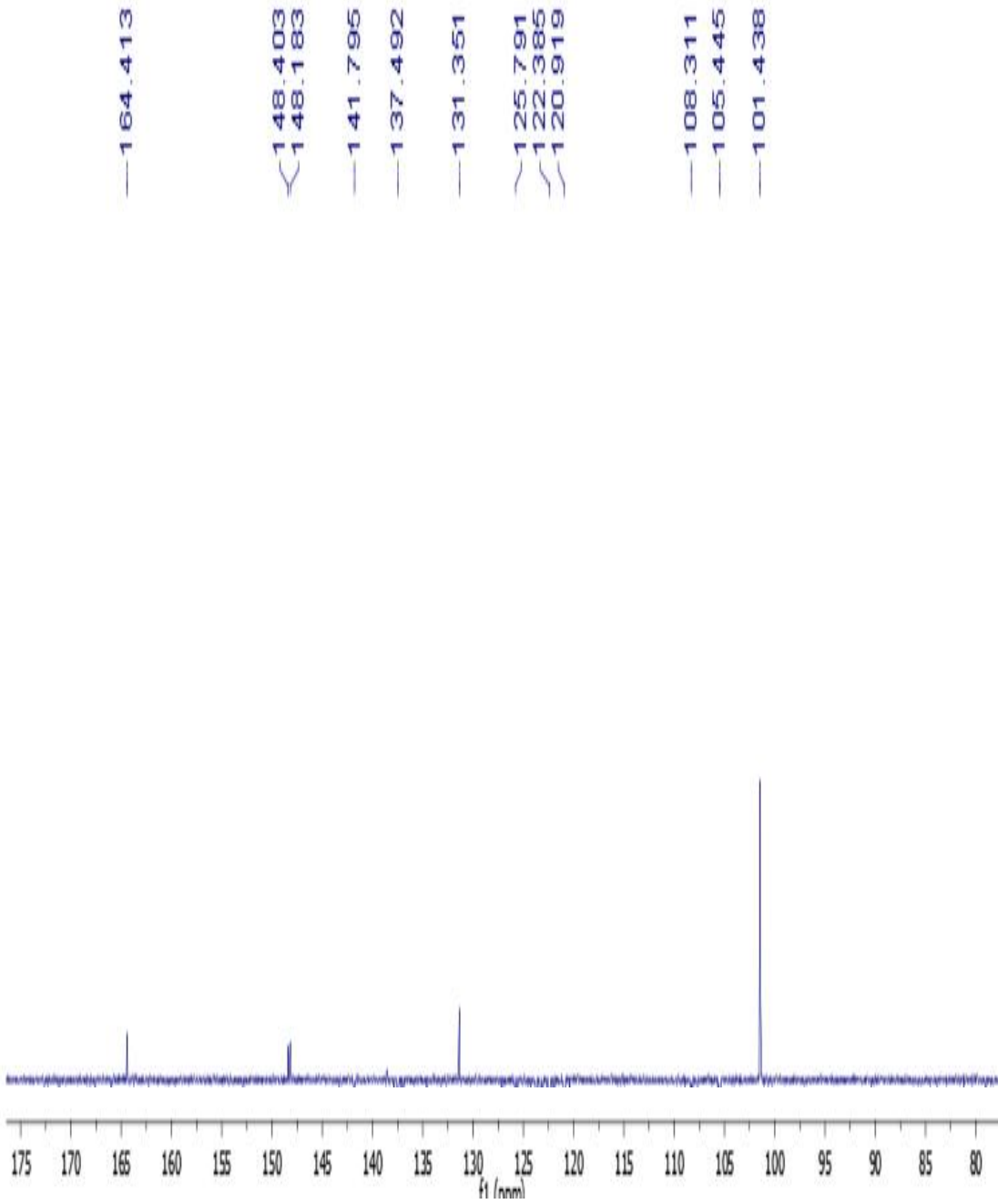
Hình 4.6. Phổ $^1\text{H-NMR}$ của hợp chất 2 (gallic acid) trong acetone- d_6



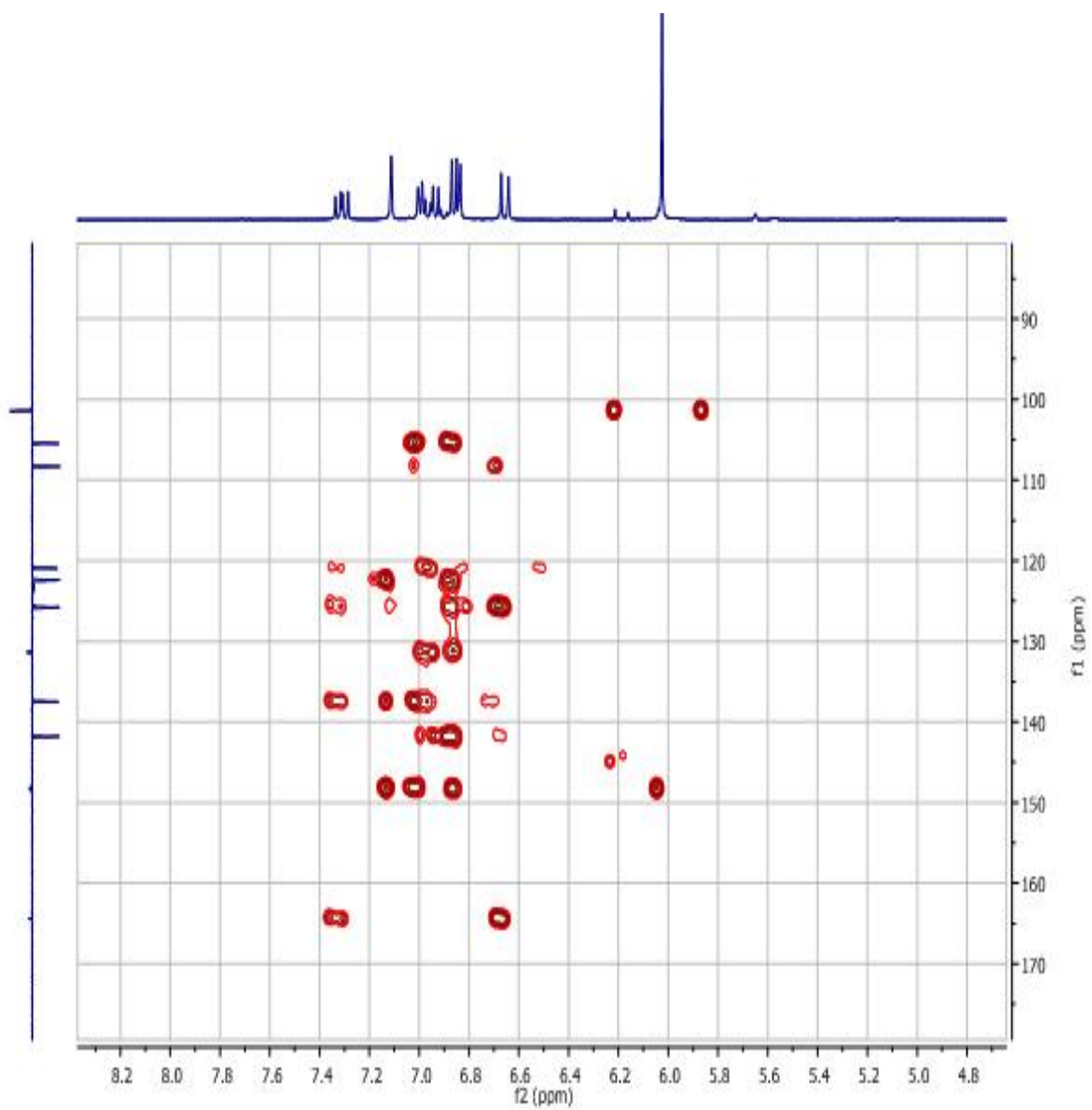
Hình 4.7. Phổ ^{13}C -NMR của hợp chất 2 (gallic acid) trong acetone- d_6



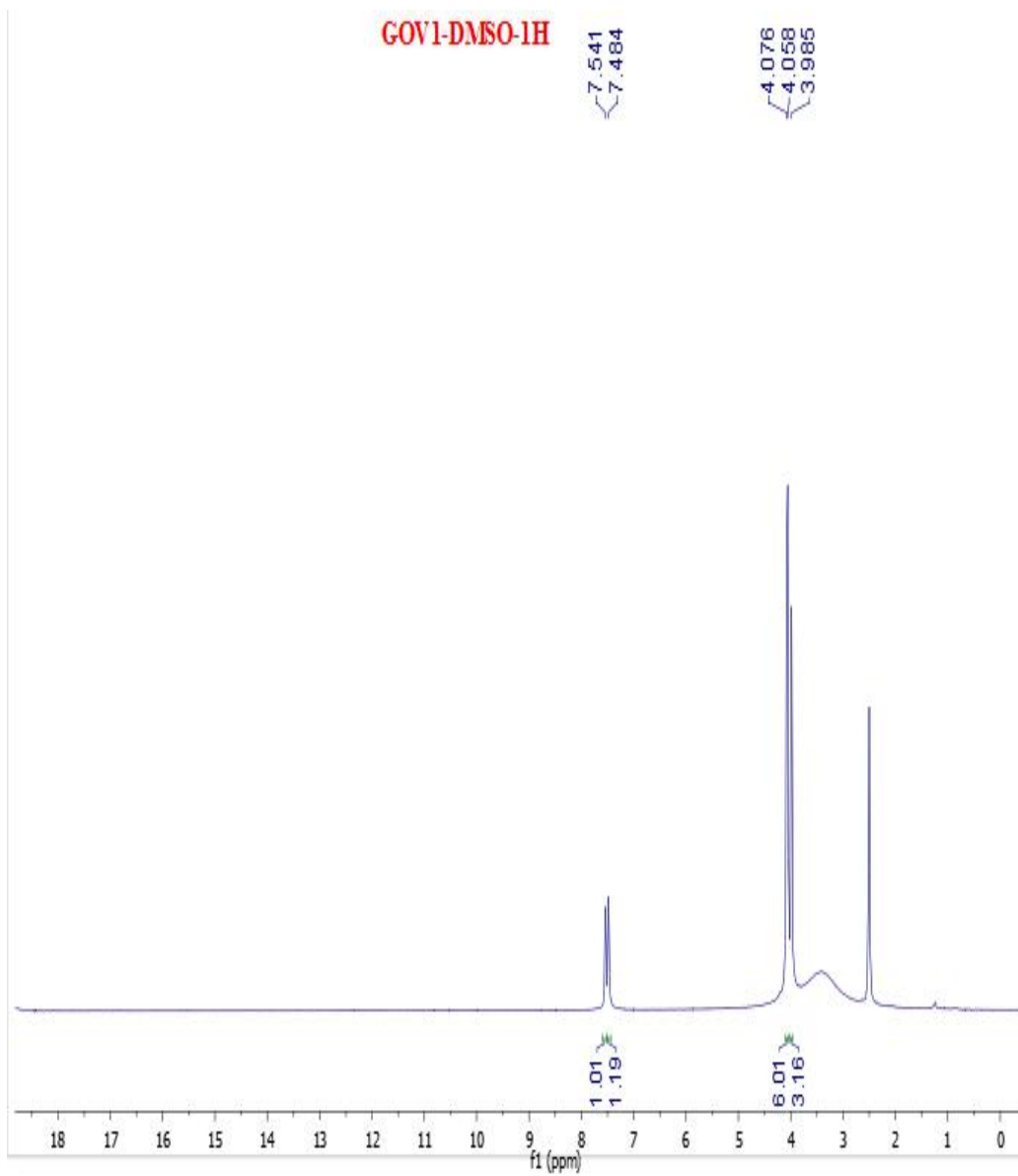
Hình 4.8. Phổ $^1\text{H-NMR}$ của hợp chất 3 (piperic acid) trong acetone- d_6



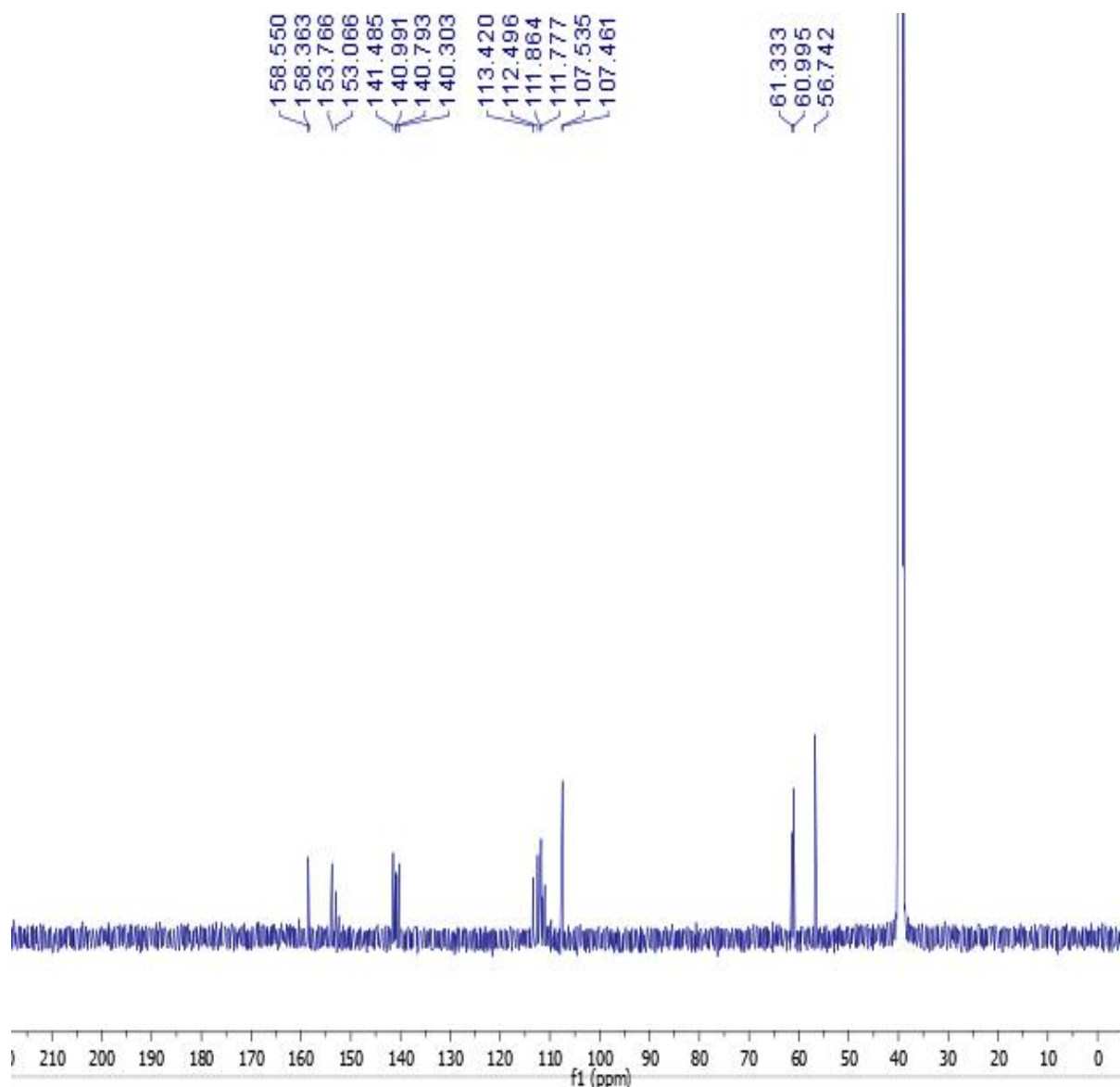
Hình 4.9. Phổ ^{13}C -NMR của hợp chất 3 (piperic acid) trong acetone- d_6



Hình 4.10. Phổ HMBC của hợp chất 3 (piperic acid) trong acetone- d_6



Hình 4.11. Phổ $^1\text{H-NMR}$ của hợp chất 4 (3,3',4'-tri-O-methylsuccinic acid) trong DMSO



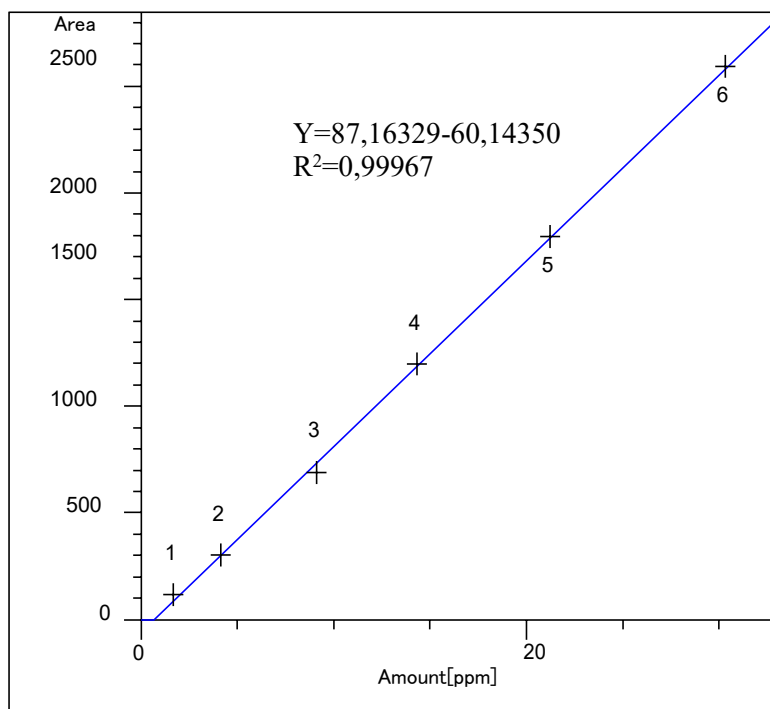
Hình 4.12. Phổ ^{13}C -NMR của hợp chất 4 (3,3',4'-tri-O-methylgallic acid) trong DMSO

4.5. Kết quả định lượng acid gallic, scopoletin, acid piperic trong cao chiết cây giao ở Bình Thuận

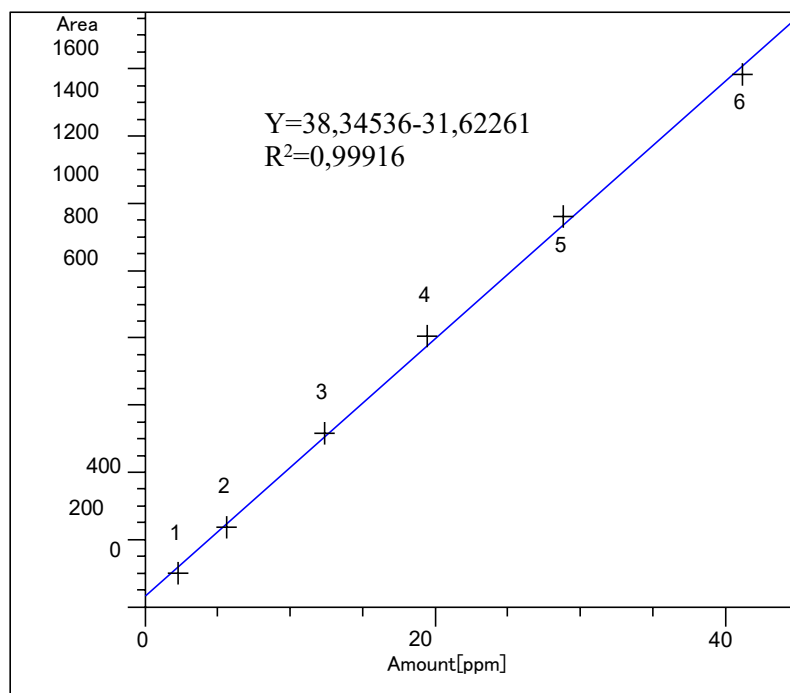
❖ Chuẩn gallic acid, scopoletin và piperic acid

Tên hợp chất	Ret time [min]	Sig	LV1	Amount [ppm]	Area	Amt/Area
Gallic acid	4.406	2	1	1.66100	113.77848	1.48985e-2
			2	4.14400	299.77206	1.38238e-2
			3	9.09700	687.88269	1.32246e-2
			4	14.31200	1195.90000	1.19751e-2
			5	21.23900	1794.10000	1.18382e-2
			6	30.34200	2590.84790	1.17112e-2
Scopoletin	16.837	1	1	2.25637	97.42265	2.31606e-2
			2	5.62902	237.18163	2.37330e-2
			3	12.35542	516.00989	2.39442e-2
			4	19.45117	804.96405	2.41640e-2
			5	28.84680	1159.52380	2.48781e-2
			6	41.21030	1583.00208	2.60330e02

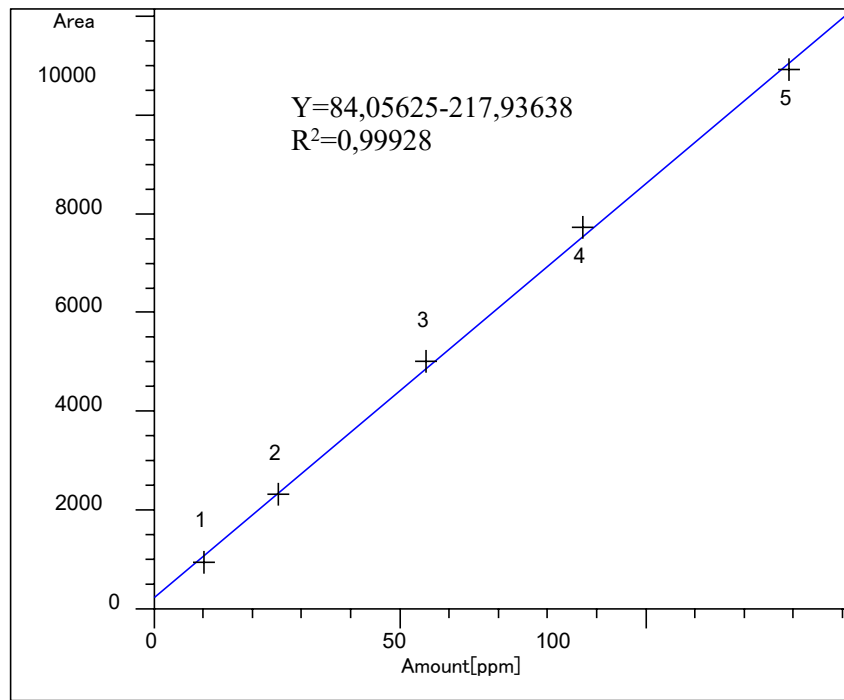
Piperic acid	35.626	1	1	10.10646	939.04803	1.07625e-2
			2	25.21289	2314.82446	1.08919e-2
			3	55.34101	5007.56201	1.10515e-2
			4	87.12352	7717.98975	1.12884e-2
			5	129.20740	1.09148e-4	1.18378e-2



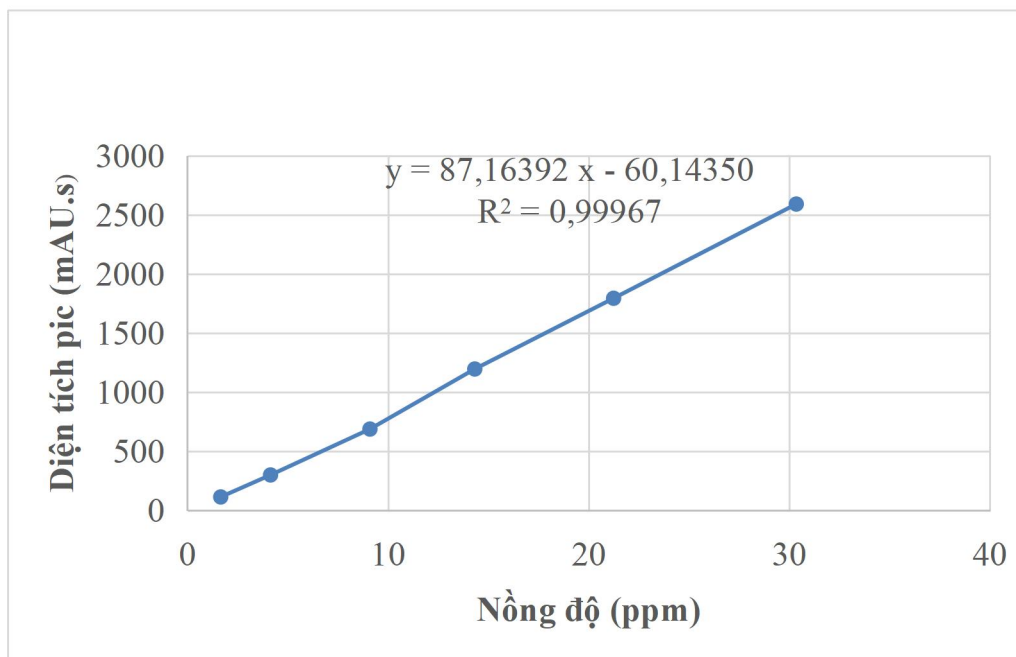
Hình 4.12. Đường chuẩn gallic acid



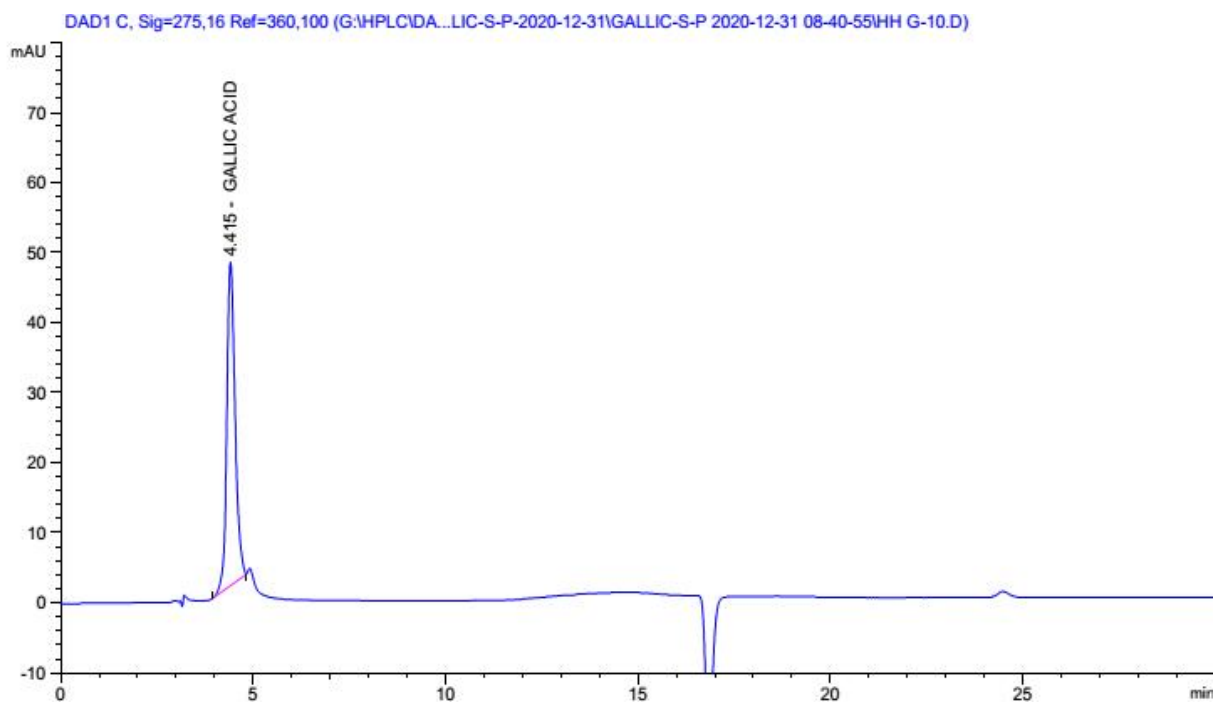
Hình 4.13. Đường chuẩn scopoletin



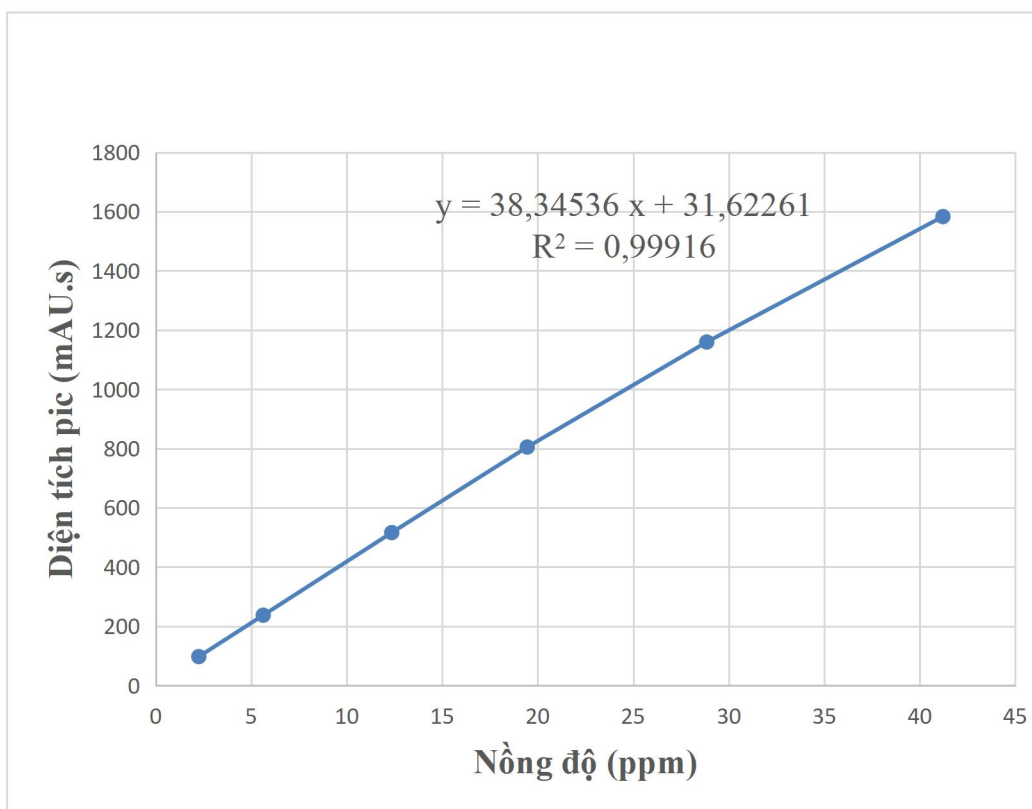
Hình 4.14. Đường chuẩn piperic acid



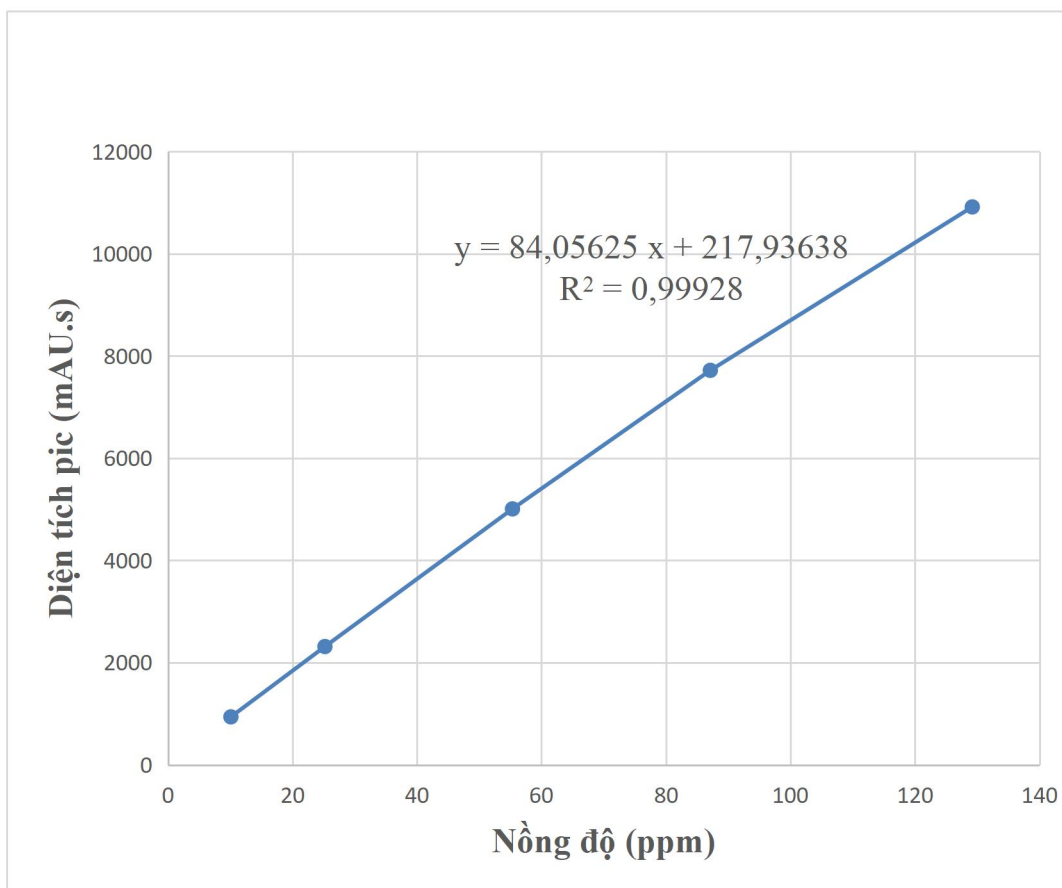
Hình 4.16. Đồ thị biểu diễn mối tương quan giữa nồng độ acid gallic và diện tích pic



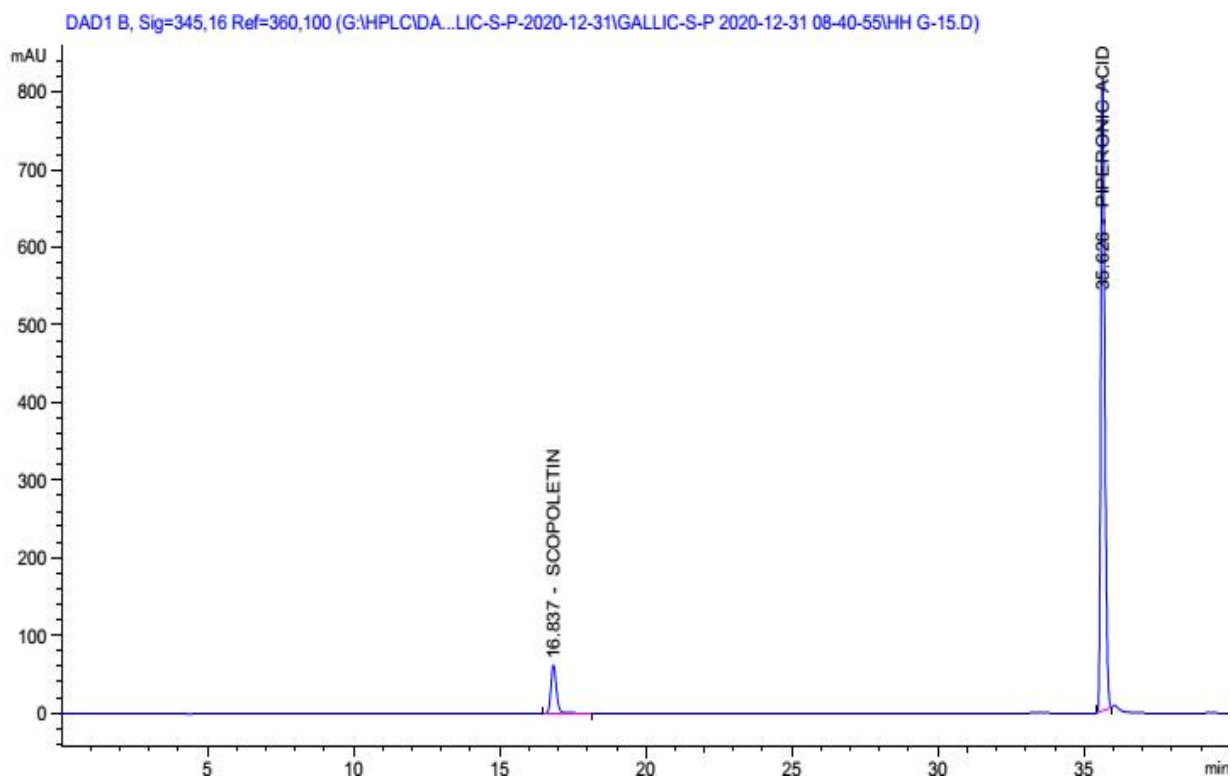
Hình 4.17. Sắc ký đồ của chất chuẩn acid gallic trong pha động HCOOH (0,05%) và MeOH



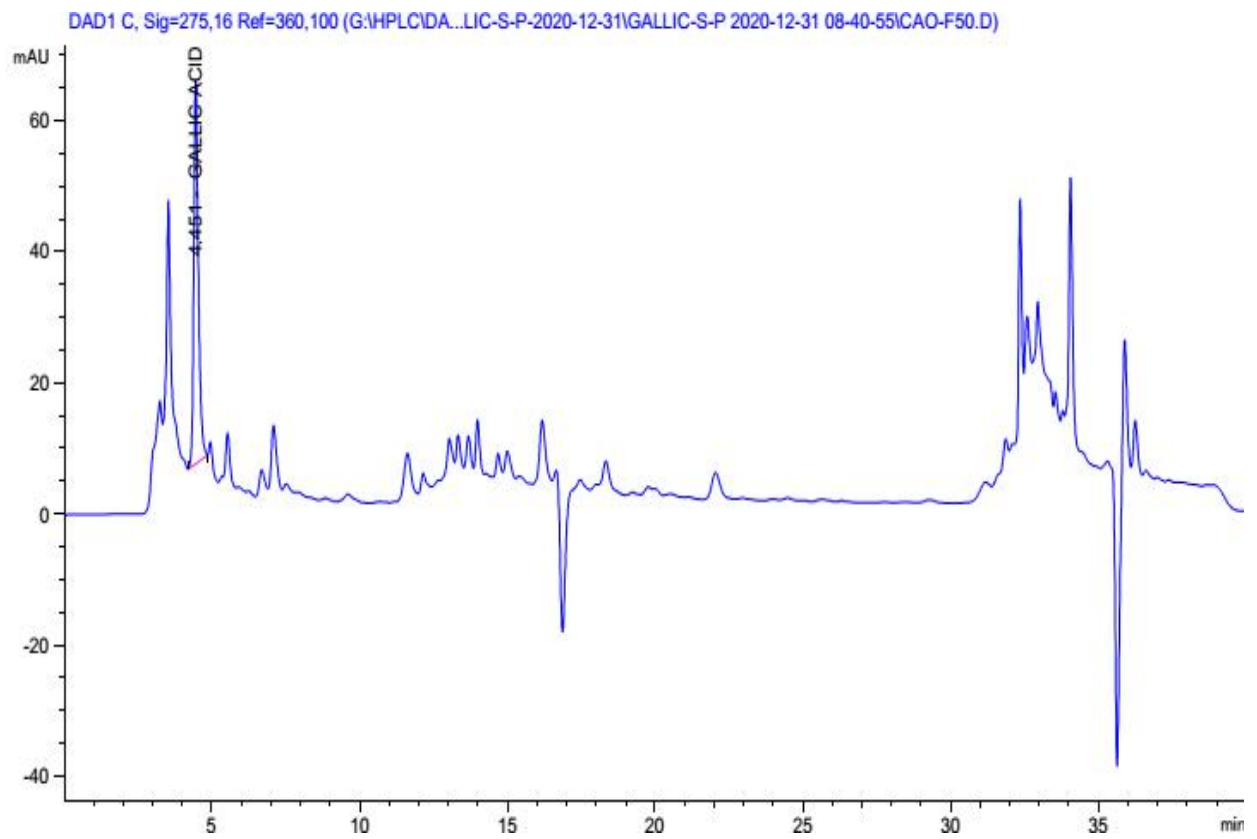
Hình 4.18. Đồ thị biểu diễn mối tương quan giữa nồng độ scopoletin và diện tích pic



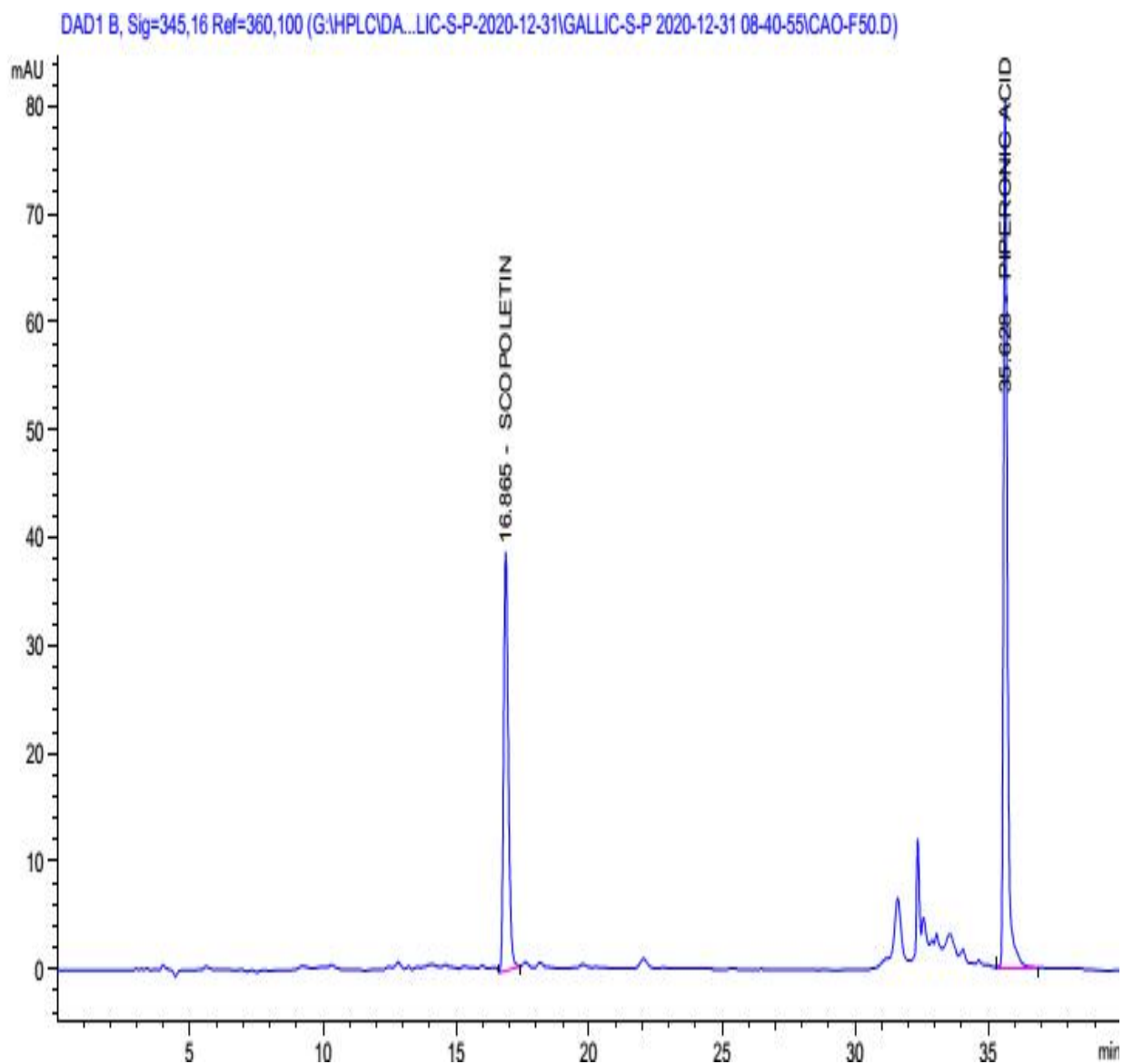
Hình 4.19. Đồ thị biểu diễn mối tương quan giữa nồng độ acid piperic và diện tích pic



Hình 4.20. Sắc ký đồ của chất chuẩn scopoletin và acid piperic trong pha động HCOOH (0,05%) và MeOH



Hình 4.21. Sắc ký đồ gallic acid trong cao cây giao ở Bình Thuận



Hình 4.22. Sắc ký đồ scopoletin và piperonic acid trong cao cây giao ở Bình Thuận

PHỤ LỤC 5: SỐ LIỆU THỐNG KÊ THÍ NGHIỆM HIỆU LỰC PHÒNG TRỪ BỆNH LOÉT TRÊN CÂY CHANH DO VI KHUẨN *X. axonopodis* CỦA CAO CHIẾT ETHYL ACETATE TỪ CÂY GIAO TRONG NHÀ LƯỚI

❖ **Kết quả xử lý ANOVA kích thước vết bệnh khi xử lý với cao chiết EA (0,25%) ở các thời điểm theo dõi**

Descriptives								
EA (0,25%)								
	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1.00	3	1.5333	.24664	.14240	.9206	2.1460	1.25	1.70
2.00	3	1.3133	.08963	.05175	1.0907	1.5360	1.21	1.37
3.00	3	1.4433	.03055	.01764	1.3674	1.5192	1.41	1.47
4.00	3	1.4167	.05686	.03283	1.2754	1.5579	1.37	1.48
5.00	3	1.2567	.04509	.02603	1.1447	1.3687	1.21	1.30
6.00	3	1.1067	.09504	.05487	.8706	1.3428	1.01	1.20
Total	18	1.3450	.17420	.04106	1.2584	1.4316	1.01	1.70

ANOVA						
EA (0,25%)						
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	
Between Groups	.348	5	.070	4.961	.011	
Within Groups	.168	12	.014			
Total	.516	17				

Duncan					
NT	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	
6.00	3	1.1067			
5.00	3	1.2567	1.2567		
2.00	3	1.3133	1.3133	1.3133	
4.00	3		1.4167	1.4167	
3.00	3		1.4433	1.4433	
1.00	3			1.5333	
Sig.		.064	.098	.056	

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

❖ **Kết quả xử lý ANOVA kích thước vết bệnh khi xử lý với cao chiết EA (0,5%) ở các thời điểm theo dõi**

Descriptives								
EA (0,5%)								
	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1.00	3	1.7367	.08083	.04667	1.5359	1.9375	1.69	1.83
2.00	3	1.4833	.16653	.09615	1.0696	1.8970	1.35	1.67
3.00	3	1.4767	.05508	.03180	1.3399	1.6135	1.44	1.54
4.00	3	1.4067	.02517	.01453	1.3442	1.4692	1.38	1.43
5.00	3	1.2400	.22517	.13000	.6807	1.7993	1.11	1.50
6.00	3	1.0733	.04041	.02333	.9729	1.1737	1.03	1.11
Total	18	1.4028	.23713	.05589	1.2849	1.5207	1.03	1.83

ANOVA						
EA (0,5%)						
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	
Between Groups	.775	5	.155	10.308	.001	
Within Groups	.181	12	.015			
Total	.956	17				

Duncan					
NT	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
6.00	3	1.0733			
5.00	3	1.2400	1.2400		
4.00	3		1.4067	1.4067	
3.00	3			1.4767	
2.00	3			1.4833	
1.00	3				1.7367
Sig.		.122	.122	.481	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

❖ **Kết quả xử lý ANOVA kích thước vết bệnh khi xử lý với cao chiết EA (0,75%) ở các thời điểm theo dõi**

Descriptives								
EA (0,75%)								
	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1.00	3	1.6100	.09000	.05196	1.3864	1.8336	1.52	1.70
2.00	3	1.4733	.10017	.05783	1.2245	1.7222	1.36	1.55
3.00	3	1.2600	.02000	.01155	1.2103	1.3097	1.24	1.28
4.00	3	1.0967	.12014	.06936	.7982	1.3951	.98	1.22
5.00	3	.9767	.11590	.06692	.6887	1.2646	.87	1.10
6.00	3	.9500	.19079	.11015	.4761	1.4239	.77	1.15
Total	18	1.2278	.27226	.06417	1.0924	1.3632	.77	1.70

ANOVA						
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	
Between Groups	1.095	5	.219	15.862	.000	
Within Groups	.166	12	.014			
Total	1.260	17				

Duncan

NT	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
6.00	3	.9500		
5.00	3	.9767		
4.00	3	1.0967	1.0967	
3.00	3		1.2600	
2.00	3			1.4733
1.00	3			1.6100
Sig.		.171	.114	.180

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

❖ **Kết quả xử lý ANOVA kích thước vết bệnh khi xử lý với cao chiết EA (1,0%) ở các thời điểm theo dõi**

Descriptives								
EA (1,0%)								
	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1.00	3	1.6067	.21221	.12252	1.0795	2.1338	1.46	1.85
2.00	3	1.3333	.14154	.08172	.9817	1.6849	1.17	1.42
3.00	3	1.1433	.06658	.03844	.9779	1.3087	1.07	1.20
4.00	3	1.0767	.07767	.04485	.8837	1.2696	.99	1.14
5.00	3	.9500	.10000	.05774	.7016	1.1984	.85	1.05
6.00	3	.9100	.14731	.08505	.5441	1.2759	.75	1.04
Total	18	1.1700	.27038	.06373	1.0355	1.3045	.75	1.85

ANOVA						
EA (1,0%)						
		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups		1.028	5	.206	11.508	.000
Within Groups		.214	12	.018		
Total		1.243	17			

Duncan				
NT	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
6.00	3	.9100		
5.00	3	.9500		
4.00	3	1.0767		
3.00	3	1.1433	1.1433	
2.00	3		1.3333	
1.00	3			1.6067
Sig.		.070	.107	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

❖ **Kết quả xử lý ANOVA kích thước vết bệnh khi xử lý với Copper (1,0%) ở các thời điểm theo dõi**

Descriptives								
Copper oxychloride (1,0%)								
	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1.00	3	1.8467	.20033	.11566	1.3490	2.3443	1.62	2.00
2.00	3	1.3333	.07234	.04177	1.1536	1.5130	1.25	1.38
3.00	3	1.2167	.09292	.05364	.9859	1.4475	1.14	1.32
4.00	3	1.0533	.07234	.04177	.8736	1.2330	.97	1.10
5.00	3	.9967	.13577	.07839	.6594	1.3339	.84	1.08
6.00	3	.8933	.13204	.07623	.5653	1.2213	.75	1.01
Total	18	1.2233	.33953	.08003	1.0545	1.3922	.75	2.00

ANOVA						
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	
Between Groups	1.770	5	.354	22.329	.000	
Within Groups	.190	12	.016			
Total	1.960	17				

Duncan					
NT	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
6.00	3	.8933			
5.00	3	.9967	.9967		
4.00	3	1.0533	1.0533		
3.00	3		1.2167	1.2167	
2.00	3			1.3333	
1.00	3				1.8467
Sig.		.164	.064	.279	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

❖ **Kết quả xử lý ANOVA kích thước vết bệnh khi xử lý với Streptomycin sulfate (1,0%) ở các thời điểm theo dõi**

Descriptives								
Streptomycin sulfate (1,0%)								
	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1.00	3	1.7367	.08505	.04910	1.5254	1.9479	1.64	1.80
2.00	3	1.3733	.01155	.00667	1.3446	1.4020	1.36	1.38
3.00	3	1.1933	.10066	.05812	.9433	1.4434	1.10	1.30
4.00	3	1.0800	.08888	.05132	.8592	1.3008	.98	1.15
5.00	3	.9500	.02646	.01528	.8843	1.0157	.92	.97
6.00	3	.8800	.05000	.02887	.7558	1.0042	.83	.93
Total	18	1.2022	.30189	.07116	1.0521	1.3523	.83	1.80

ANOVA						
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	
Between Groups	1.492	5	.298	62.606	.000	
Within Groups	.057	12	.005			
Total	1.549	17				

Duncan					
NT	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
6.00	3	.8800			
5.00	3	.9500			
4.00	3		1.0800		
3.00	3		1.1933		
2.00	3			1.3733	
1.00	3				1.7367
Sig.		.238	.067	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

❖ **Kết quả xử lý ANOVA kích thước vết bệnh mẫu đối chứng ở các thời điểm theo dõi**

Descriptives								
KTVBDC								
	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1.00	3	1.4400	.15620	.09018	1.0520	1.8280	1.34	1.62
2.00	3	1.5333	.14434	.08333	1.1748	1.8919	1.45	1.70
3.00	3	1.6533	.14572	.08413	1.2914	2.0153	1.55	1.82
4.00	3	1.6867	.14224	.08212	1.3333	2.0400	1.59	1.85
5.00	3	1.7267	.12503	.07219	1.4161	2.0373	1.64	1.87
6.00	3	1.8700	.14107	.08145	1.5196	2.2204	1.72	2.00
Total	18	1.6517	.18542	.04370	1.5595	1.7439	1.34	2.00

ANOVA					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.340	5	.068	3.338	.040
Within Groups	.244	12	.020		
Total	.584	17			

Duncan				
NT	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
1.00	3	1.4400		
2.00	3	1.5333	1.5333	
3.00	3	1.6533	1.6533	1.6533
4.00	3	1.6867	1.6867	1.6867
5.00	3		1.7267	1.7267
6.00	3			1.8700
Sig.		.073	.150	.110

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

❖ **Hiệu lực phòng trừ bệnh loét trong nhà lưới**

7 Ngày sau phun lần 1: ANOVA - LSD - DUCAN

Summary statistics for hiệu lực phòng trừ bệnh loét 7 NSP lần 1

Nghiệm thực	Count	Average	Standar deviation	Minimum	Maximum
1	3	3.7400	1.64848	2.69	5.64
2	3	9.7067	3.11731	6.97	13.1
3	3	14.7800	4.21014	10.97	19.3
4	3	15.3867	7.68740	10.74	24.26
5	3	18.0200	4.753006	13.63	23.07
6	3	17.2400	5.17663	11.99	22.34
Total	18	13.1456	6.52076	2.69	24.26

ANOVA Table for hiệu lực phòng trừ bệnh loét 7 NSP lần 1

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between Groups	445.527	5	89.105	3.856	0.026
Within Groups	277.318	12	23.11		
Total	722.846	17			

DUNCAN Table for hiệu lực phòng trừ bệnh loét 7 NSP lần 1

		Subset for alpha = 0.05		
		N	1	2
Duncan ^a	1	3	3.7400	
	2	3	9.7067	9.7067
	3	3		14.7800
	4	3		15.3867
	6	3		17.2400
	5	3		18.0200
Sig.			.148	.076

Summary statistics for hiệu lực phòng trừ bệnh loét 7 NSP lần 2

Nghiệm thực	Count	Average	Standar deviation	Minimum	Maximum
1	3	6.1667	2.38003	3.54	8.18
2	3	13.5733	5.23059	9.31	19.41
3	3	16.0933	7.41082	10.13	24.39
4	3	18.0867	6.91151	13.12	25.98
5	3	24.5067	3.65287	21.0	28.29
6	3	19.7833	3.96516	16.83	24.29
Total	18	16.3683	7.30827	3.54	28.29

ANOVA Table for hieu luc phong tru benh loet 7 NSP lan 2

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between Groups	578.427	5	115.685	4.212	0.019
Within Groups	329.557	12	27.463		
Total	907.984	17			

DUNCAN Table for hieu luc phong tru benh loet 7 NSP lan 2

VAR00001	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
Duncan ^a	1	3	6.1667	
	2	3	13.5733	13.5733
	3	3		16.0933
	4	3		18.0867
	6	3		19.7833
	5	3		24.5067
	Sig.		.104	.207
				.094

Summary statistics for hieu luc phong tru benh loet 7 NSP lan 3

Nghiem thuc	Count	Average	Standar deviation	Minimum	Maximum
1	3	12.0533	4.03493	8.41	16.39
2	3	21.0800	7.34294	13.62	28.3
3	3	23.1433	2.81072	20.55	26.13
4	3	28.6533	3.22267	25.31	31.74
5	3	34.9733	5.14677	30.94	40.77
6	3	30.0433	4.63601	22.46	35.28
Total	18	24.9911	8.72596	8.41	40.77

ANOVA Table for hieu luc phong tru benh loet 7 NSP lan 3

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between Groups	974.036	5	194.807	7.296	0.002
Within Groups	320.385	12	26.699		
Total	1294.422	17			

DUNCAN Table for hieu luc phong tru benh loet 7 NSP lan 3

VAR00001	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
Duncan ^a	1	3	12.0533	
	2	3		21.0800
	3	3		23.1433
	4	3		28.6533
	6	3		30.0433
	5	3		34.9733
	Sig.		1.000	.070
				.171

Summary statistics for hieu luc phong tru benh loet 14 NSP lan 3

Nghiem thuc	Count	Average	Standar deviation	Minimum	Maximum
1	3	17.6067	4.78174	13.03	22.57
2	3	39.8500	4.45647	34.76	43.05
3	3	43.4867	5.33299	38.97	49.37
4	3	47.5833	14.11482	33.11	61.31
5	3	54.1300	4.04916	50.62	58.56
6	3	48.7533	4.42667	43.77	52.23
Total	18	41.9017	13.48191	13.03	61.31

ANOVA Table for hieu luc phong tru benh loet 14 NSP lan 3

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between Groups	2477.182	5	495.436	9.702	0.001
Within Groups	612.77	12	51.064		
Total	3089.953	17			

DUNCAN Table for hieu luc phong tru benh loet 14 NSP lan 3

		Subset for alpha = 0.05		
VAR00001	N	1	2	3
Duncan ^a	1	3	17.6067	
	2	3		39.8500
	3	3		43.4867
	4	3		47.5833
	6	3		48.7533
	5	3		54.1300
	Sig.		1.000	.198
				.128

Summary statistics for hieu luc phong tru benh loet 21 NSP lan 3

Nghiem thuc	Count	Average	Standar deviation	Minimum	Maximum
1	3	26.6533	7.94544	19.39	35.14
2	3	48.1467	6.04512	41.87	53.93
3	3	54.9200	5.29144	51.85	61.03
4	3	67.8433	19.73440	51.12	89.61
5	3	79.8333	5.25523	74.55	85.06
6	3	74.5000	9.66580	67.94	85.6
Total	18	58.6494	20.39871	19.39	89.61

ANOVA Table for hieu luc phong tru benh loet 21 NSP lan 3

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between Groups	5797.479	5	1159.496	10.901	0.000
Within Groups	1276.344	12	106.362		
Total	7073.824	17			

DUNCAN Table for hieu luc phong tru benh loet 21 NSP lan 3

VAR00001	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
Duncan ^a	1	3	26.6533		
	2	3		48.1467	
	3	3		54.9200	54.9200
	4	3			67.8433
	6	3			74.5000
	5	3			79.8333
Sig.			1.000	.370	.147

❖ **Kích thước vết bệnh trên lá trong nhà lưới**

Summary statistics for kích thước vết bệnh 7 NSP lan 3

Nghiệm thức	Count	Average	Standar deviation	Minimum	Maximum
1	3	1.4167	0.05686	1.37	1.48
2	3	1.4067	0.02517	1.38	1.43
3	3	1.0967	0.12014	0.98	1.22
4	3	1.0767	0.07767	0.99	1.14
5	3	1.0533	0.07234	0.97	1.1
6	3	1.08	0.08888	0.98	1.15
7	3	1.6867	0.14224	1.59	1.85
Total	21	1.2595	0.24555	0.97	1.85

ANOVA Table for kích thước vết bệnh 7 NSP lan 3

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between Groups	1.09	6	0.182	22.049	0.000
Within Groups	0.115	14	0.008		
Total	1.206	20			

DUNCAN Table for kich thuoc vet benh 7 NSP lan 3

	NT	N	Subset for alpha = 0.05		
			1	2	3
Duncan ^a	5	3	1.0533		
	4	3	1.0767		
	6	3	1.08		
	3	3	1.0967		
	2	3		1.4067	
	1	3		1.4167	
	7	3			1.6867
Sig.			0.598	0.895	1

Summary statistics for kich thuoc vet benh 14 NSP lan 3

Nghiem thuc	Count	Average	Standar deviation	Minimum	Maximum
1	3	1.2567	0.04509	1.21	1.3
2	3	1.24	0.22517	1.11	1.5
3	3	0.9767	0.1159	0.87	1.1
4	3	0.95	0.1	0.85	1.05
5	3	0.9967	0.13577	0.84	1.08
6	3	0.95	0.02646	0.92	0.97
7	3	1.7267	0.12503	1.64	1.87
Total	21	1.1567	0.28963	0.84	1.87

ANOVA Table for kich thuoc vet benh 14 NSP lan 3

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between Groups	1.456	6	0.243	15.31	0.000
Within Groups	0.222	14	0.016		
Total	1.678	20			

DUNCAN Table for kich thuoc vet benh 14 NSP lan 3

	NT	N	Subset for alpha = 0.05		
			1	2	3
Duncan ^a	4	3	0.95		
	6	3	0.95		
	3	3	0.9767		
	5	3	0.9967		
	2	3		1.24	
	1	3		1.2567	
	7	3			1.7267
Sig.			0.682	0.874	1

Summary statistics for kich thuoc vet benh 21 NSP lan 3

Nghiem thuc	Count	Average	Standar deviation	Minimum	Maximum
1	3	1.1067	0.09504	1.01	1.21
2	3	1.0733	0.04041	1.03	1.11
3	3	0.95	0.19079	0.77	1.15
4	3	0.91	0.14731	0.75	1.04
5	3	0.8933	0.13204	0.75	1.01
6	3	0.88	0.05	0.83	0.93
7	3	1.87	0.14107	1.72	2
Total	21	1.0976	0.3498	0.75	2

ANOVA Table for kich thuoc vet benh 21 NSP lan 3

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between Groups	2.23	6	0.372	23.956	0.000
Within Groups	0.217	14	0.016		
Total	2.447	20			

DUNCAN Table for kich thuoc vet benh 21 NSP lan 3

	NT	N	Subset for alpha = 0.05	
			1	2
Duncan ^a	6	3	0.88	
	5	3	0.8933	
	4	3	0.91	
	3	3	0.95	
	2	3	1.0733	
	1	3	1.1067	
	7	3		1.87
Sig.			0.065	1

PHỤ LỤC 6: SỐ LIỆU THỐNG KÊ THÍ NGHIỆM HIỆU LỰC PHÒNG TRỪ BỆNH LOÉT TRÊN CÂY CHANH CỦA CAO CHIẾT EA TỪ CÂY GIAO NGOÀI ĐỒNG

❖ **Tỷ lệ bệnh loét trên lá ngoài đồng ruộng**

Trước xử lý: ANOVA - DUNCAN

Summary statistics for ty le benh loet tren la truoc xu ly

Nghiem thuc	Count	Average	Standar deviation	Minimum	Maximum
1	3	4.2067	0.25891	4.01	4.5
2	3	3.87	0.49275	3.41	4.39
3	3	3.4867	0.22679	3.23	3.66
4	3	4.04	0.41605	3.69	4.5
5	3	3.34	0.39686	3.04	3.79
6	3	3.9867	0.35642	3.59	4.28
7	3	3.7067	0.35303	3.33	4.03
Total	21	3.8052	0.42604	3.04	4.5

ANOVA Table for ty le benh loet tren la truoc xu ly

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between Groups	1.743	6	0.291	2.155	0.111
Within Groups	1.887	14	0.135		
Total	3.63	20			

DUNCAN Table for ty le benh loet tren la truoc xu ly

	NT	N	Subset for alpha = 0.05	
			1	2
Duncan ^a	5	3	3.34	
	3	3	3.4867	
	7	3	3.7067	3.7067
	2	3	3.87	3.87
	6	3	3.9867	3.9867
	4	3	4.04	4.04
	1	3		4.2067
			Sig.	0.054
				0.152

7 Ngày sau phun: ANOVA - DUNCAN

Summary statistics for ty le benh loet tren la 7 NSP

Nghiem thuc	Count	Average	Standar deviation	Minimum	Maximum
1	3	13.69	2.66586	11.43	16.63
2	3	11.8833	0.10116	11.82	12.0
3	3	8.8633	1.73877	7.53	10.83
4	3	8.66	0.652	7.96	9.25
5	3	5.7867	0.68676	5.13	6.5
6	3	7.39	0.91477	6.35	8.07
7	3	14.41	0.53113	13.9	14.96
Total	21	10.0976	3.29318	5.13	16.63

ANOVA Table for ty le benh loet tren la 7 NSP

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between Groups	192.589	6	32.098	18.484	0.00
Within Groups	24.312	14	1.737		
Total	216.901	20			

DUNCAN Table for ty le benh loet tren la 7 NSP

	NT	N	Subset for alpha = 0.05			
			1	2	3	4
Duncan ^a	5	3	5.7867			
	6	3	7.39	7.39		
	4	3		8.66		
	3	3		8.8633		
	2	3			11.8833	
	1	3			13.69	13.69
	7	3				14.41
Sig.			0.158	0.214	0.115	0.514

14 Ngày sau phun: ANOVA - DUNCAN

Summary statistics for ty le benh loet tren la 14 NSP

Nghiem thuc	Count	Average	Standar deviation	Minimum	Maximum
1	3	57.94	3.1792	55.11	61.38
2	3	45.4	1.89507	43.59	47.37
3	3	26.7967	2.26058	25.33	29.4
4	3	16.6133	0.47501	16.14	17.09
5	3	7.9767	0.66063	7.3	8.62
6	3	10.1067	0.77552	9.39	10.93
7	3	67.8667	3.68191	63.79	70.95
Total	21	33.2429	22.8169	7.3	70.95

ANOVA Table for ty le benh loet tren la 14 NSP

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between Groups	10344.9	6	1724.16	358.892	0.00
Within Groups	67.258	14	4.804		
Total	10412.2	20			

DUNCAN Table for ty le benh loet tren la 14 NSP

	NT	N	Subset for alpha = 0.05					
			1	2	3	4	5	6
Duncan ^a	5	3	7.9767					
	6	3	10.1067					
	4	3		16.6133				
	3	3			26.7967			
	2	3				45.4		
	1	3					57.94	
	7	3						67.8667
Sig.			0.254	1	1	1	1	1

❖ **Chỉ số bệnh loét trên lá ngoài đồng ruộng**

Trước xử lý: ANOVA - DUNCAN

Summary statistics for chi so benh loet tren la truooc xu ly

Nghiệm thực	Count	Average	Standar deviation	Minimum	Maximum
1	3	1.0033	0.05508	0.94	1.04
2	3	0.9367	0.12342	0.8	1.04
3	3	0.8967	0.01528	0.88	0.91
4	3	0.98	0.08185	0.89	1.05
5	3	0.8	0.4359	0.75	0.83
6	3	0.9533	0.11015	0.84	1.06
7	3	0.9133	0.10786	0.79	0.99
Total	21	0.9262	0.09531	0.75	1.06

ANOVA Table for chi so benh loet tren la truooc xu ly

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between Groups	0.08	6	0.013	1.834	0.164
Within Groups	0.102	14	0.007		
Total	0.182	20			

DUNCAN Table for chi so benh loet tren la truoc xu ly

NT	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	
Duncana	5	3	0.8	
	3	3	0.8967	0.8967
	7	3	0.9133	0.9133
	2	3	0.9367	0.9367
	6	3	0.9533	0.9533
	4	3		0.98
	1	3		1.0033
Sig.			0.065	0.19

7 Ngày sau phun: ANOVA - DUNCAN

Summary statistics for chi so benh loet tren la 7 NSP

Nghiem thuc	Count	Average	Standar deviation	Minimum	Maximum
1	3	2.9267	0.54784	2.44	3.52
2	3	2.5367	0.02082	2.52	2.56
3	3	1.96	0.34828	1.68	2.35
4	3	1.8667	0.14012	1.71	1.98
5	3	1.2967	0.10693	1.23	1.42
6	3	1.5833	0.14572	1.42	1.7
7	3	3.1167	0.08505	3.03	3.2
Total	21	2.1838	0.6891	1.23	3.52

ANOVA Table for chi so benh loet tren la 7 NSP

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between Groups	8.534	6	1.422	20.683	0.00
Within Groups	0.963	14	0.069		
Total	9.497	20			

DUNCAN Table for chi so benh loet tren la 7 NSP

NT	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
Duncan ^a	5	3	1.2967		
	6	3	1.5833	1.5833	
	4	3		1.8667	
	3	3		1.96	
	2	3			2.5367
	1	3			2.9267
	7	3			3.1167
Sig.			0.202	0.116	0.09

14 Ngày sau phun: ANOVA - DUNCAN

Summary statistics for chi so benh loet tren la 14 NSP

Nghiem thuc	Count	Average	Standar deviation	Minimum	Maximum
1	3	13.4267	1.14718	12.45	14.69
2	3	10.7867	0.75036	10.05	11.55
3	3	6.1433	0.44747	5.88	6.66
4	3	3.9833	0.12014	3.86	4.1
5	3	1.7433	0.07767	1.68	1.83
6	3	2.1033	0.15631	1.96	2.27
7	3	18.4	1.13053	17.25	19.51
Total	21	8.0838	6.01362	1.68	19.51

ANOVA Table for chi so benh loet tren la 14 NSP

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between Groups	716.467	6	119.411	245.68	0.00
Within Groups	6.805	14	0.486		
Total	723.272	20			

DUNCAN Table for chi so benh loet tren la 14 NSP

	NT	N	Subset for alpha = 0.05					
			1	2	3	4	5	6
Duncana	5	3	1.7433					
	6	3	2.1033					
	4	3		3.9833				
	3	3			6.1433			
	2	3				10.7867		
	1	3					13.4267	
	7	3						18.4
Sig.			0.537	1	1	1	1	1

❖ Hiệu quả giảm bệnh loét trên lá 14 NSP

Summary statistics for hieu qua giam benh loet tren la 14 NSP

Nghiem thuc	Count	Average	Standar deviation	Minimum	Maximum
1	3	21.5	0.95645	20.76	22.58
2	3	28.01	0.98899	27.17	29.1
3	3	46.4	0.92504	45.64	47.43
4	3	63.75	0.94821	62.76	64.65
5	3	77.1667	0.32868	76.89	77.53
6	3	77.45	0.22271	77.25	77.69
Total	18	52.3794	22.8471	20.76	77.69

ANOVA Table for hieu qua giam benh loet tren la 14 NSP

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between Groups	8866.18	5	1773.24	2795.92	0.00
Within Groups	7.611	12	0.634		
Total	8873.79	17			

DUNCAN Table for hieu qua giam benh loet tren la 14 NSP

	NT	N	Subset for alpha = 0.05				
			1	2	3	4	5
Duncan ^a	1	3	21.5				
	2	3		28.01			
	3	3			46.4		
	4	3				63.75	
	5	3					77.1667
	6	3					77.45
Sig.			1	1	1	1	0.671

❖ Tỷ lệ bệnh loét trên quả ngoài đồng ruộng

Trước xử lý: ANOVA - DUNCAN

Summary statistics for ty le benh loet tren qua truoc xu ly

Nghiem thuc	Count	Average	Standar deviation	Minimum	Maximum
1	3	5.9233	0.37448	5.51	6.24
2	3	6.2567	0.22234	6.0	6.39
3	3	6.5033	0.4477	6.03	6.92
4	3	5.99	0.44396	5.48	6.29
5	3	6.0533	0.85804	5.07	6.65
6	3	5.8467	0.63122	5.13	6.32
7	3	5.9633	0.33858	5.72	6.35
Total	21	6.0767	0.48001	5.07	6.92

ANOVA Table for ty le benh loet tren la truoc xu ly

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between Groups	0.935	6	0.156	0.594	0.73
Within Groups	3.673	14	0.262		
Total	4.608	20			

DUNCAN Table for ty le benh loet tren qua truoc xu ly

	NT	N	Subset for alpha = 0.05	
			1	
Duncan ^a		6	3	5.8467
		1	3	5.9233
		7	3	5.9633
		4	3	5.99
		5	3	6.0533
		2	3	6.2567
		3	3	6.5033
	Sig.			0.183

7 Ngày sau phun: ANOVA - DUNCAN

Summary statistics for ty le benh loet tren qua 7 NSP

Nghiem thuc	Count	Average	Standar deviation	Minimum	Maximum
1	3	20.0533	0.6354	19.32	20.44
2	3	1.7467	1.45727	17.1	19.87
3	3	19.7933	0.20429	19.56	19.94
4	3	15.4233	0.92002	14.5	16.34
5	3	11.5867	1.03645	10.84	12.77
6	3	12.3967	0.84287	11.44	13.03
7	3	20.4333	0.15373	20.33	20.61
Total	21	16.919	3.64105	10.84	20.61

ANOVA Table for ty le benh loet tren la 7 NSP

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between Groups	254.697	6	42.45	56.883	0.00
Within Groups	10.448	14	0.746		
Total	265.145	20			

DUNCAN Table for ty le benh loet tren la 7 NSP

	NT	N	Subset for alpha = 0.05			
			1	2	3	4
Duncan ^a		5	3	11.5867		
		6	3	12.3967		
				15.423		
		4	3		3	
		2	3			18.7467
		3	3			19.7933
		1	3			20.0533
		7	3			20.4333
	Sig.			0.27	1	0.1
						0.404

14 Ngày sau phun: ANOVA - DUNCAN

Summary statistics for ty le benh loet tren qua 14 NSP

Nghiem thuc	Count	Average	Standar deviation	Minimum	Maximum
1	3	29.95	1.02504	29.08	31.08
2	3	25.26	1.90654	24.09	27.46
3	3	23.6767	1.69777	21.82	25.15
4	3	16.63	0.50685	16.1	17.11
5	3	8.89	0.73695	8.43	9.74
6	3	10.27	0.8723	9.3	10.99
7	3	41.83	1.80842	40.31	43.83
Total	21	22.3581	11.0603	8.43	43.83

ANOVA Table for ty le benh loet tren qua 14 NSP

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between Groups	2421.82	6	403.637	227.872	0.00
Within Groups	24.799	14	1.771		
Total	2446.62	20			

DUNCAN Table for ty le benh loet tren qua 14 NSP

	NT	N	Subset for alpha = 0.05				
			1	2	3	4	5
Duncan ^a	5	3	8.89				
	6	3	10.27				
	4	3		16.63			
	3	3			23.6767		
	2	3				25.26	
	1	3					29.95
	7	3					
Sig.			0.225	1	0.167	1	1

21 Ngày sau phun: ANOVA - DUNCAN

Summary statistics for ty le benh loet tren qua 21 NSP

Nghiem thuc	Count	Average	Standar deviation	Minimum	Maximum
1	3	69.2233	1.10817	68.07	70.28
2	3	59.2667	1.74406	57.38	60.82
3	3	45.0467	1.895	43.15	46.94
4	3	25.6033	1.05006	24.71	26.76
5	3	12.01	1.09421	11.18	13.25
6	3	12.6467	0.68135	11.86	13.05
7	3	94.04	2.47024	91.59	96.53
Total	21	45.4052	29.2828	11.18	96.53

ANOVA Table for ty le benh loet tren qua 21 NSP

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between Groups	17116.2	6	2852.7	1193.81	0.00
Within Groups	33.454	14	2.39		
Total	17149.6	20			

DUNCAN Table for ty le benh loet tren qua 21 NSP

	NT	N	Subset for alpha = 0.05					
			1	2	3	4	5	6
Duncan ^a	5	3	12.01					
	6	3	12.6467					
	4	3		25.6033				
	3	3			45.0467			
	2	3				59.2667		
	1	3					69.2233	
	7	3						94.04
Sig.			0.622	1	1	1	1	1

❖ Chỉ số bệnh loét trên quả ngoài đồng ruộng

Chỉ số bệnh loét trên quả ngoài đồng ruộng trước xử lý: ANOVA - DUNCAN

Summary statistics for chi so benh loet tren qua truooc xu ly

Nghiem thuc	Count	Average	Standar deviation	Minimum	Maximum
1	3	1.5833	0.12423	1.44	1.66
2	3	1.59	0.03606	1.56	1.63
3	3	2.0167	0.02309	1.99	2.03
4	3	1.5667	0.07767	1.48	1.63
5	3	1.47	0.12166	1.33	1.55
6	3	1.5267	0.12097	1.39	1.62
7	3	1.5267	0.05033	1.51	1.61
Total	21	1.6157	0.1875	1.33	2.03

ANOVA Table for chi so benh loet tren qua truooc xu ly

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between Groups	0.593	6	0.099	12.509	0.00
Within Groups	0.111	14	0.008		
Total	0.703	20			

DUNCAN Table for chi so benh loet tren la truoc xu ly

	NT	N	Subset for alpha = 0.05		
			1	2	
Duncan ^a		5	3	1.47	
		6	3	1.5267	
		7	3	1.5567	
		4	3	1.5667	
		1	3	1.5833	
		2	3	1.59	
		3	3		2.0167
Sig.				0.159	1

7 Ngày sau phun: ANOVA - DUNCAN

Summary statistics for chi so benh loet tren qua 7 NSP

Nghiem thuc	Count	Average	Standar deviation	Minimum	Maximum
1	3	4.9367	0.12662	4.84	5.08
2	3	4.73	0.30806	4.4	5.01
3	3	4.9033	0.27392	4.66	5.2
4	3	3.38	0.20518	3.17	3.58
5	3	2.6767	0.23029	2.48	2.93
6	3	2.79	0.12124	2.66	2.9
7	3	5.5167	0.22502	5.34	5.77
Total	21	4.1333	1.11127	2.48	5.77

ANOVA Table for chi so benh loet tren qua 7 NSP

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between Groups	24.005	6	4.001	80.842	0.00
Within Groups	0.693	14	0.049		
Total	24.698	20			

DUNCAN Table for chi so benh loet tren qua 7 NSP

	NT	N	Subset for alpha = 0.05			
			1	2	3	4
Duncana		5	3	2.6767		
		6	3	2.79		
		4	3		3.38	
		2	3			4.73
		3	3			4.9033
		1	3			4.9367
		7	3			5.5167
Sig.				0.543	1	0.298

14 Ngày sau phun: ANOVA - DUNCAN

Summary statistics for chi so benh loet tren qua 14 NSP

Nghiem thuc	Count	Average	Standar deviation	Minimum	Maximum
1	3	10.4667	0.43501	10.03	10.9
2	3	9.4067	0.20984	9.17	9.57
3	3	8.03	0.14731	7.9	8.19
4	3	4.49	0.18735	4.28	4.64
5	3	2.81	0.13892	2.72	2.97
6	3	2.8433	0.09074	2.74	2.91
7	3	14.7633	0.19732	14.63	14.99
Total	21	7.5443	4.21494	2.72	14.99

ANOVA Table for chi so benh loet tren qua 14 NSP

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between Groups	354.601	6	59.1	1160.34	0.00
Within Groups	0.713	14	0.051		
Total	355.314	20			

DUNCAN Table for chi so benh loet tren qua 14 NSP

	NT	N	Subset for alpha = 0.05					
			1	2	3	4	5	6
Duncan ^a	5	3	2.81					
	6	3	2.8433					
	4	3		4.49				
	3	3			8.03			
	2	3				9.4067		
	1	3					10.4667	
	7	3						14.7633
Sig.			0.859	1	1	1	1	1

21 Ngày sau phun: ANOVA - DUNCAN

Summary statistics for chi so benh loet tren qua 21 NSP

Nghiem thuc	Count	Average	Standar deviation	Minimum	Maximum
1	3	27.1833	0.25775	26.95	27.46
2	3	20.3	0.1852	20.11	20.48
3	3	13.4967	0.40104	13.08	13.88
4	3	5.94	0.17578	5.74	6.07
5	3	2.83	0.17349	2.72	3.03
6	3	2.8233	0.09609	2.72	2.91
7	3	50.5267	0.73528	50.02	51.37
Total	21	17.5857	16.3088	2.72	51.37

ANOVA Table for chi so benh loet tren qua 21 NSP

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between Groups	5317.77	6	886.295	7111.219	0.00
Within Groups	1.745	14	0.125		
Total	5319.52	20			

DUCAN Table for chi so benh loet tren qua 21 NSP

	NT	N	Subset for alpha = 0.05						
			1	2	3	4	5	6	
Duncan ^a	6	3	2.8233						
	5	3	2.83						
	4	3		5.94					
	3	3			13.4967				
	2	3				20.3			
	1	3					27.1833		
	7	3						50.5267	
	Sig.		0.982	1	1	1	1	1	1

❖ Hiệu quả giảm bệnh loét trên quả 21 NSP

Summary statistics for hieu qua giam benh loet tren qua 21 NSP

Nghiem thuc	Count	Average	Standar deviation	Minimum	Maximum
1	3	24.0433	2.69611	21.68	26.98
2	3	36.9267	1.42606	35.37	38.17
3	3	50.87	2.00502	49.43	53.16
4	3	61.2867	2.35003	58.66	63.19
5	3	70.5833	0.43616	70.08	70.85
6	3	70.78	0.09644	70.67	70.85
Total	18	52.415	17.8523	21.68	70.85

ANOVA Table for hieu qua giam benh loet tren qua 21 NSP

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between Groups	5379.89	5	1075.977	338.981	0.00
Within Groups	38.09	12	3.174		
Total	5415.98	17			

DUNCAN Table for hieu qua giam benh loet tren qua 21 NSP

NT	N	Subset for alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	
Duncan ^a	1	3	24.0433				
	2	3		36.9267			
	3	3			50.87		
	4	3				61.2867	
	5	3					70.5833
	6	3					70.78
Sig.			1	1	1	1	0.895