

**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 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**

**TP. HỒ CHÍ MINH NĂM 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 XUẤT TỪ  
CÂY GIAO (*Euphorbia tirucalli* L.)**

**Chuyên ngành: Công nghệ sinh học**

**Mã số: 9420201**

**Cán bộ hướng dẫn: TS. Võ Thị Thu Oanh**

**PGS.TS. Trần Thị Lệ Minh**

**TP. Hồ Chí Minh năm 2022**

## MỞ ĐẦU

### Tính cấp thiết của đề tài

Bệnh loét trên cây chanh là một trong những bệnh hại nghiêm trọng, gây ảnh hưởng đến chất lượng và giá trị thương phẩm của quả. Bệnh bệnh tấn công chủ yếu vào các 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 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 cao chiết phân đoạn 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 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.

### **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-methylellagic 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.

### **Bố cục của luận án**

Luận án chính thức gồm 121 trang (không bao gồm phụ lục), có 4 chương, 25 bảng số liệu và 41 hình. Luận án đã tham khảo tổng cộng 151 tài liệu trong đó 4 tài liệu tiếng Việt và 147 tài liệu tiếng Anh

## **CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN TÀI LIỆU**

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

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<sup>w</sup> 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).

### **1.2. 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**

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<sup>w</sup>. 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 môi 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.

### 1.3. 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 mù) 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- $\beta$ -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- $\beta$ -D-glucoside, 1,2,3-tri-*O*-galloyl- $\beta$ -D-glucoside, corilagin, pedunculagin, casuarinin, 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  $\mu$ g/mL), rutin (0,49  $\mu$ g/mL), gallic acid (30,52  $\mu$ g/mL), caffeic acid (15,61  $\mu$ g/mL), chlorogenic acid (12,37  $\mu$ g/mL), kaempferol (3,45  $\mu$ g/mL), 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) (3,12  $\mu$ 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  $\alpha$ -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(2*H*)-one, 4*H*-Pyran-4-one, 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-pyran-4(4*H*)-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 $\beta$ )-, lanosta-8,24-dien-3-ol,(3 $\beta$ ), (23*S*)-ethylcholest-5-en-(3 $\beta$ )-ol, liminalol. Trong đó, bốn hợp chất có tỷ lệ cao nhất là lanosta-8,24-dien-3-ol, (3 $\beta$ )-(13,60%), (23*S*)-ethylcholest-5-en-(3 $\beta$ )-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.

#### **1.4. 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).

## **CHƯƠNG 2: VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**

### **2.1. Nội dung nghiên cứu**

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

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

### **2.2. Thời gian và địa điểm nghiên cứu**

Luận án đã được tiến hành từ tháng 07 năm 2017 đến tháng 6 năm 2021. 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. Tiến hành thí nghiệm tại phòng thí nghiệm Bệnh cây, Bộ môn Bảo vệ Thực vật và khoa Khoa học Sinh học, Trường ĐH Nông Lâm, Tp. HCM; Bộ môn Hóa hữu cơ, Trường ĐH Sư phạm Tp. HCM; Viện Hóa học, Viện Hàn lâm khoa học và Công nghệ Việt Nam; trung tâm Công nghệ Việt - Đức, Trường ĐH Công nghiệp Thực phẩm Tp. HCM; khu thực nghiệm, khoa Nông học, Trường ĐH Nông Lâm, Tp. HCM; vườn chanh xã Bình Hòa Nam, huyện Đức Huệ, tỉnh Long An.

### **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**

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, Việt Nam bằng cách tiến hành lấy mẫu theo quy chuẩn kỹ thuật quốc gia QCVN 01-141: 2013/BNNT. 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). Các đặc điểm sinh hóa khảo sát và tiêu chí định danh theo hướng dẫn của Schaad và ctv (2001), EPPO (2005), ISPM (2014).

###### **2.4.1.2. Kiểm chứng vi khuẩn gây bệnh sau phân lập theo phương pháp chủng bệnh nhân tạo (quy tắc Koch's)**

Lá, cành và quả chanh không hạt (*C. latifolia*) và chanh giầy (*C. aurantifolia*) được chủng bệnh theo phương pháp chủng bệnh nhân tạo (quy tắc Koch's).

**Chỉ tiêu theo dõi:** Thời gian xuất hiện bệnh, Tỷ lệ vết bệnh (%), Kích thước vết bệnh và chụp SEM.

###### **2.4.1.3. Xác định loài vi khuẩn *Xanthomonas* sp. dựa vào trình tự vùng 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); *J-pth1* (5'-CTTCAACTCAAACGCCGGAC-3') và *J-pth2* (5'-CATCGCGCTGTTCGGGAG-3') (Cubero và Graham, 2002) được sử dụng để khuếch đại vùng 16S rDNA, *hrpW* và *pthA*. 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.

**\* 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 bootstrap 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***

**2.2.2.1. 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) sau khi được làm khô, xay mịn, xác định độ ẩm theo TCVN 9706-2013.

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

Mẫu bột cây giao ở mỗi vùng (Bình Thuận, Tp. Hồ Chí Minh và Đắk Nông) chiết cao toàn phần ethanol bằng phương pháp ngâm dầm. 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 thu được các cao chiết phân đoạn

trương ứng. 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).

#### **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**

Hoạt tính ức chế của các cao chiết phân đoạn từ cây giao được đánh giá trên 4 mức 1,25 mg/mL (0,125%), 2,5 mg/mL (0,25%), 5,0 mg/mL (0,5%), 7,5 mg/mL (0,75%).

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

Đánh giá định tính các nhóm chất: alkaloid, flavonoid, tannin, saponin, terpenoid.

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

Hàm lượng phenolic và flavonoid lần lượt được xác định bằng phương pháp Folin - Ciocalteu theo Waterm và Mole (1994) và phương pháp tạo màu với  $AlCl_3$  trong môi trường kiềm - trắc quang (Zhishen và ctv, 1999).

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

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).

#### **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**

Hàm lượng các hợp chất trong cao chiết từ cây giao được xác định 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).

#### **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**

#### **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**

Hiệu quả giảm bệnh loét trên cây chanh trong nhà lưới được đánh giá trên 4 mức: 0,25; 0,5; 0,75 và 1,0%.

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

Hiệu quả giảm bệnh loét trên cây chanh trong nhà lưới được đánh giá trên 4 mức: 0,5; 0,75, 1,0 và 1,25%.

### **2.5. 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 DUCAN bằng phần mềm SPSS 20.0.

## **CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

### **3.1. 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***

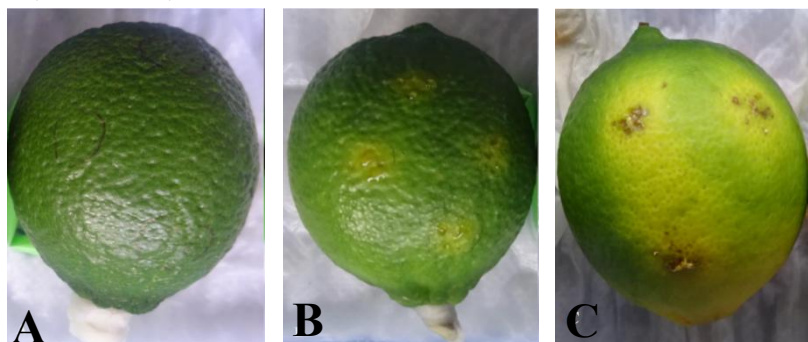
#### **3.1.1. Xác định loài vi khuẩn *Xanthomonas* sp. gây bệnh theo hình thái và đặc điểm sinh hóa**

Kết quả định danh cho thấy, có một loài *Xanthomonas* gây bệnh loét trên lá, quả và cành cây chanh ở Long An. Đặc điểm của 75 MPL *Xanthomonas* 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 sáp 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 YCD 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.

### 3.1.2. Kết quả khảo sát khả năng gây bệnh của các MPL theo quy tắc Koch's

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.



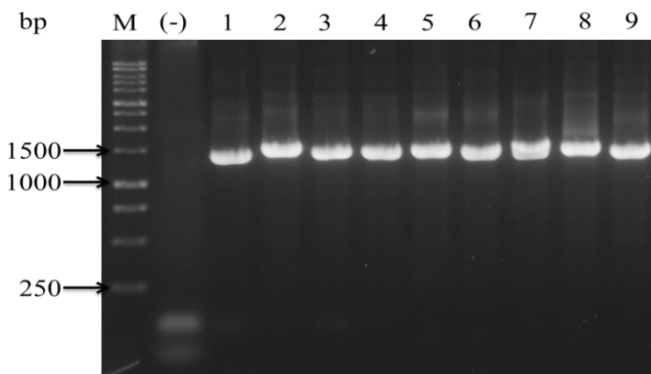


**Hình 3.3.** Triệu chứng bệnh do *X. axonopodis* (BLKQ1) gây ra trên quả tại 9 NSC và 15 NSC và lá tại 15 NSC (A: Quả đối chứng; B: Quả 9 NSC; C: Quả 15 NSC; D: Lá đối chứng; E: Mặt trên của lá; F: Mặt dưới của lá)

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

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

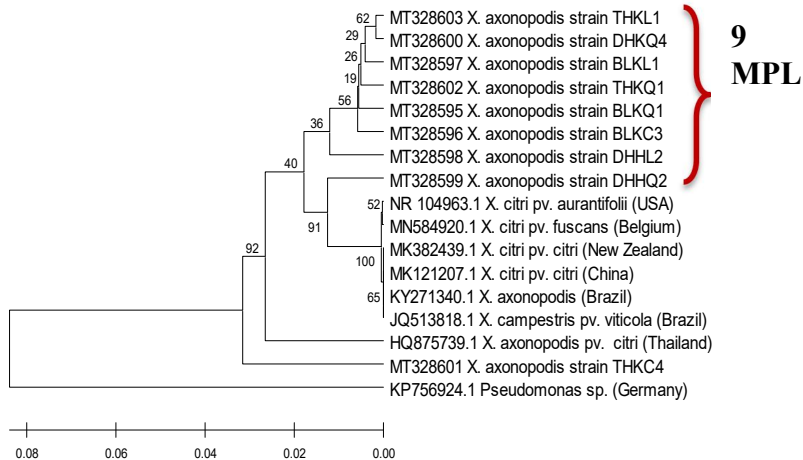
DNA của 9 MPL *Xanthomonas* trong nghiên cứu sau khi được tinh sạch đã được sử dụng để khuếch đại vùng 16S rDNA bằng kỹ thuật PCR với cặp primer 27F - 1492R. Sản phẩm PCR với primer 27F - 1492R sau khi điện di trên gel agarose 1,5% có kích thước khoảng 1500 bp khi so sánh với thang DNA phù hợp với báo 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 Genbank và số đăng ký của các MPL từ MT328595.1 - MT328603.1.



**Hình 3.5.** Kết quả điện di sản phẩm PCR của 9 MPL *Xanthomonas axonopodis* với cặp primer 27F - 1492R. (M: thang mẫu chuẩn 250 bp; (-): đối chứng âm; Lane 1-9: BLKQ1, BLK3, BLKL1, DHHL2, DHHQ2, DHKQ4, THKQ1, THKL1, THKC4)

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 thể giới cho thấy có sự đồng nhất di truyền của những mẫu vi khuẩn phân lập.



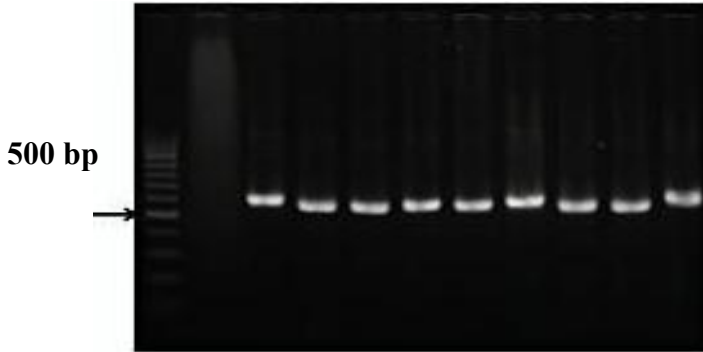


**Hình 3.6.** Sơ đồ phân nhóm di truyền của 9 MPL *Xanthomonas axonopodis* xây dựng theo phương pháp Maximum Composite Likelihood dựa trên trình tự vùng 16S rDNA. Phần trăm giá trị bootstrap từ 1000 lần lặp lại được chỉ trên các nhánh. Mẫu KP756924 (*Pseudomonas* sp.) được sử dụng như một loài xa.

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

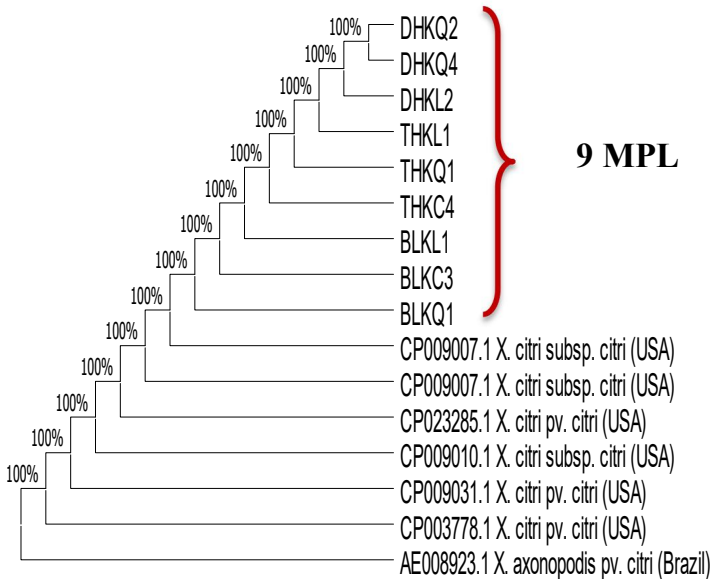
Kết quả Hình 3.7 cho thấy, tất cả 9 MPL *X. axonopodis* nghiên cứu đều có đoạn gene *hrpW* với chiều dài khoảng 561 bp trong mỗi sản phẩm PCR khi phân tích trên gel agarose 1,5%. Kết quả nghiên cứu này tương đồng với kết quả của Park và ctv (2006) khi nghiên cứu về di truyền của vi khuẩn *X. axonopodis*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

Kết quả Hình 3.8 về so sánh trình tự vùng *hrpW* của 9 MPL *X. axonopodis* với các mẫu *Xanthomonas* 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 2.3; Phụ lục 2).



**Hình 3.7.** Kết quả điện di sản phẩm PCR của 9 MPL *Xanthomonas axonopodis* 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)

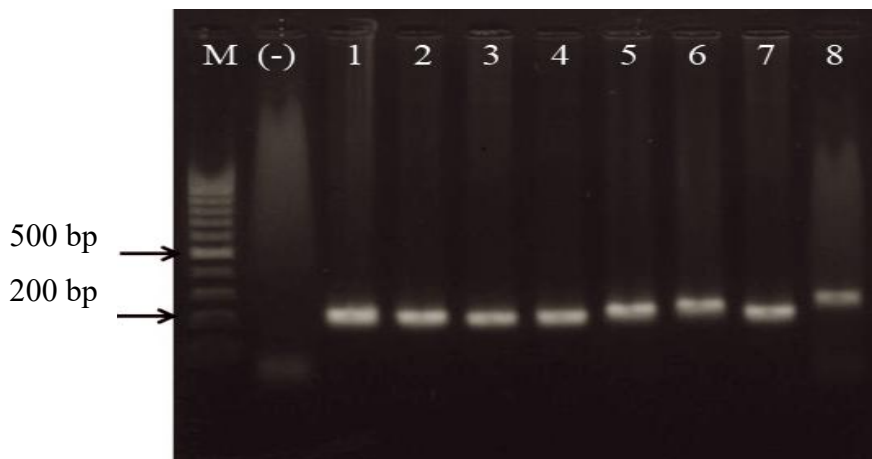
Sự tương đồng trình tự rất cao với các mẫu đã xác định là *X. axonopodis* pv. *citri*. Chín MPL *X. axonopodis* pv. *citri* nghiên cứu xếp cùng nhóm loài với *X. citri* pv. *citri* có nguồn gốc từ Mỹ (6 mẫu), *X. axonopodis* pv. *citri* có nguồn gốc từ Brazil (1 mẫu). Kết quả phân tích trình tự nucleotic 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*.



**Hình 3.8.** Sơ đồ phân nhóm di truyền của 9 MPL *Xanthomonas axonopodis*, 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

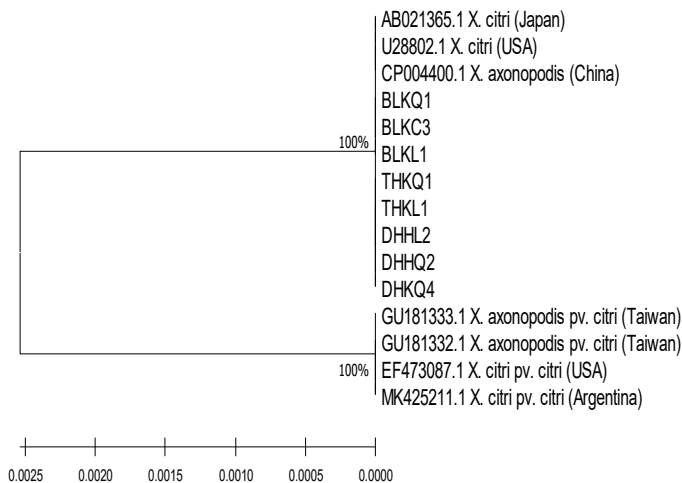
### 3.1.3.3. Xác định loài vi khuẩn *X. axonopodis* dựa vào vùng gene *pthA*

Kết quả PCR cho thấy, 8 trong 9 MPL nghiên cứu (BLKQ1, BLKC3, BLKL1, DHL2, DHLQ2, DHLQ4, THQ1, THKL1) tạo sản phẩm có kích thước khoảng 198 bp khi phân tích trên gel agarose 1,5% (Hình 3.9). Riêng MPLTHK4 phân lập từ cành cây chanh không hạt ở Thanh 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 3.9.** Sản phẩm PCR khuếch đại gene *pthA* của 8 MPL *Xanthomonas axonopodis* với các cặp mồi *J-pth1/J-pth2*. (M: thang chuẩn 100 bp; (-): đối chứng âm; Lane 1-8 (A): BLKQ1, BLKC3, BLKL1, DHHL2, DHHQ2, DHKQ4, THKQ1, THKL1)

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. 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%.



**Hình 3.10.** Sơ đồ phân nhóm di truyền của 8 MPL *Xanthomonas axonopodis*, 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

### 3.2. Đánh giá hoạt tính ức chế vi khuẩn *Xanthomonas* sp. của hoạt chất chiết 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.)

Mẫu 6,5 kg bột khô của cây giao (*E. tirucalli*) thu thập ở 3 vùng Phan Thiết, Tp. Hồ Chí Minh và ĐăK Nông có độ ẩm tương ứng  $8,73\% \pm 0,74$ ;  $8,86\% \pm 0,69$ ;  $8,67\% \pm 0,87$  được chiết với ethanol 96% bằng phương pháp ngâm dầm, tỷ lệ dung môi và nguyên liệu là 6:1 (v/w). Kết quả cho thấy, 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%). 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 Đăk Nông (18,34%).

### **3.2.2. Đánh giá hoạt tính ức chế vi khuẩn *Xanthomonas axonopodis* strain BLKQ1 của các cao chiết phân đoạn**

Ở nồng độ 5,0 mg/mL, 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*. Trong đó, hiệu quả ức chế vi khuẩn của các cao chiết phân đoạn từ cây giao ở Bình Thuận > Đăk Nông > Tp. HCM. Ở nồng độ 7,5 mg/mL, 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.

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

Kết quả định tính các nhóm hoạt chất trong các cao chiết phân đoạn của cây giao thu nhận từ Bình Thuận và Đăk Nông là như nhau. Trong đó, các cao chiết phân đoạn từ cây giao ở Bình Thuận và Đăk 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. Cao chiết phân đoạn EA (ethyl acetate) và phân đoạn Bu (butanol) có chứa alkaloid 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.

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

Cây giao thu nhận ở hai vùng Bình Thuận và Đăk Nông đều có chứa phenolic và flavonoid. 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  $\mu$ gQE/g.

### **3.2.5. Kết quả phân lập hợp chất**

Từ cao phân đoạn ethyl acetate (cây giao Bình Thuận) phân lập được 3 hợp chất: gallic acid, scopoletin và piperic acid.

Từ cao phân đoạn ethyl acetate (cây giao ĐăK Nông) phân lập được 3 hợp chất: gallic acid, scopoletin và 3,3',4'-tri-O-methylellagic acid.

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

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.

### **3.3. 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**

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

Tại thời điểm 21 NSP lần 3, nồng độ cao chiết EA từ cây giao từ 0,75% trở lên có hiệu quả giảm bệnh loét trên cây chanh lớn hơn 50%. Trong đó, cao chiết EA từ cây giao ở nồng độ 0,75% có hiệu quả giảm bệnh loét trên cây chanh do vi khuẩn *X. axonopodis* là 54,92%, ở nồng độ 1,0% đạt hiệu quả 67,84%.

Xử lý bằng cao chiết EA (1,0%), 21 NSP lần 3, kích thước trung bình vết bệnh nhỏ nhất 0,91 mm, trong khi mẫu đối chứng là 1,9 mm.

#### **3.4.2. Hiệu quả phòng trừ bệnh loét do vi khuẩn *Xanthomonas* gây ra trên cây chanh của cao chiết ethyl acetate từ cây giao ở các nồng độ khác nhau ngoài đồng**

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

Tại thời điểm 7 NSP, 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%. 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%).

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

Tại thời điểm 7 NSP, tỷ lệ quả chanh bị bệnh chịu ảnh hưởng rõ rệt bởi nồng độ cao chiết EA (0,5; 0,75; 1,0 và 1,25%). Tỷ lệ quả bệnh cao nhất (20,1%) khi được phun cao chiết EA 0,5% và thấp nhất (15,4%) khi được phun cao chiết EA 1,25%. 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%.



## **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 giấy 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%. Trong 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 thử nghiệm 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* 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*

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

1). Nguyễn Thị Mỹ Lê, 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, Truong Ngoc Minh, Tran Dinh Manh, Duong Thuc Huy, Tran Thi Le Minh, Vo Thi 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)