

## PHÁT HIỆN VÀ GIÁM ĐỊNH TÁC NHÂN GÂY BỆNH THỐI CỦ HÀNH BẰNG KỸ THUẬT PCR VÀ PHÂN TÍCH GEN 16SrDNA

### Detection and Identification of Causative Agent Causing Bulb Rot Disease of Onion Based on PCR Technique and Analysis of 16SrDNA

Ngô Quang Huy<sup>1</sup>, Nguyễn Mạnh Hùng<sup>1</sup>, Lê Thị Hằng<sup>1</sup>, Phạm Hồng Hiền<sup>2</sup>, Trần Văn Chiến<sup>3</sup>

Ngày nhận bài: 19.9.2021

Ngày chấp nhận: 16.11.2021

#### Abstract

Onion (*Allium ascalonicum* L.) bulbs showing rot symptoms were collected from Luc Nam district, Bac Giang province; Kinh Mon district, Hai Duong province; and Vinh Loc district, Thanh Hoa province. The representative isolate designated as HD1.1, TH1.1 và BG1.1 was identified as *Pectobacterium carotovorum* using the phenotypic characterization and molecular identification based on the 16SrDNA sequence analysis. For fulfil Koch's postulate, surface-sterilized root system were dipped into *P. carotovorum* broth, onion bulbs were injected with the *P. carotovorum* broth and onion seedlings were sprayed with *P. carotovorum* broth ( $1 \times 10^6$  CFU/ml). Upon artificial inoculation, *P. carotovorum* induced decays of the internal fleshy scales and yellow similar to the symptoms in the field. The same bacterium was consistently reisolated from the artificially inoculated onion.

**Keywords:** Onion, Bulb rot disease, *Pectobacterium carotovorum*, PCR, 16SrDNA.

#### 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trên thế giới, hành được trồng ở 175 quốc gia và vùng lãnh thổ, 5 nước đứng đầu là Trung Quốc, Ấn Độ, Mỹ, Các tiểu vương quốc Ả Rập Thống nhất (UAE) và Thổ Nhĩ Kỳ có sản lượng chiếm 56,42% toàn thế giới. Theo thống kê của FAO năm 2019 diện tích trồng hành trên thế giới là hơn 5,2 triệu ha, năng suất trung bình đạt 19,17 tấn/ha, sản lượng đạt 99,7 triệu tấn (FAO, 2019). Tại Việt Nam, hành được trồng ở nhiều tỉnh, thành phố trong cả nước như Hải Dương, Hải Phòng, Bắc Ninh, Bắc Giang, Vĩnh Phúc, Thanh Hóa, Nghệ An, Quảng Ngãi, Ninh Thuận... Những năm gần đây, bệnh thối củ hành được ghi nhận ở hầu hết các vùng trồng hành trong cả nước từ giai đoạn cây con đến trước và sau khi thu hoạch; hàng năm bệnh gây tổn thất 5-25% sản lượng (Lê Minh Thi và cs., 1982). Một trong những nguyên nhân gây thối nhũn cây trồng là vi khuẩn. Các triệu chứng thối nhũn là hệ quả của quá trình phân hủy pectin trong thành tế bào thực vật của enzym pectinase (Gavriloic *et al.*, 2001). Rất nhiều loài vi khuẩn gây ra hiện tượng thối nhũn như *Pseudomonas* (Zhang *et al.*, 2016), *Bacillus* (Zhong *et al.*, 2015), *Burkholderia* (Lu *et al.*, 2007), *Pantoea* (Liao *et al.*, 2016),

*Pectobacterium* and *Dickeya* (Charkowski *et al.*, 2012) and *Enterobacter* (Masyahit *et al.*, 2009). Trong đó, *Pectobacterium* và *Dickeya* thuộc họ *Enterobacteriaceae* là hai chi phổ biến nhất và được biết đến với tên cũ là *Erwinia* sp. (Adeolu *et al.*, 2016). Do đặc điểm gần gũi về di truyền của các loài thuộc các chi *Erwinia*, *Pectobacterium*, *Dickeya* và *Pantoea* và việc thay đổi tên của các loài *Erwinia* spp. (ví dụ: *Erwinia carotovora* đổi thành *Pectobacterium carotovorum*, *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* thay đổi thành *Pectobacterium atroseptica*, *Erwinia chrysanthemi* đổi thành *Dickeya chrysanthemi*, *Erwinia cyripedii* thành *Pantoea cyripedii*...) nên việc nghiên cứu, xác định nguyên nhân gây bệnh thối nhũn do vi khuẩn gây ra gặp nhiều khó khăn (Bergey Manual, 2005).

Tại Việt Nam, các nghiên cứu về xác định loài gây bệnh thối nhũn trước những năm 2000 được thực hiện dựa trên phương pháp hình thái, có độ chính xác chưa cao. Những năm gần đây, việc áp dụng các phương pháp công nghệ sinh học và hóa sinh đã gia tăng độ chính xác về phân loại cấp loài của chủng gây bệnh. Tuy nhiên, các nghiên cứu chưa có sự cập nhật về khóa phân loại mới nhất về các chi *Erwinia*, *Pectobacteria*, *Dickeya* và *Pantoea* (Nguyễn Thị Vân, 2010; Trương Thị Chiên và cs., 2019; Nguyễn Xuân Cảnh và cs., 2017). Các nghiên cứu này cho thấy, nguyên nhân gây hiện tượng thối nhũn trên các đối tượng cây trồng khác nhau rất đa dạng. Trên cây khoai lang, thối nhũn do vi khuẩn

1. Viện Bảo vệ thực vật

2. Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam

3. Trung tâm Kiểm dịch thực vật sau nhập khẩu I, Cục Bảo vệ thực vật.

*Dickeya chrysanthemi* gây ra (Nguyễn Lê Thanh Mai và cs., 2020). Các loài *Pectobacterium* sp. gây bệnh thối nhũn trên các cây khoai môn, mít và sâm ngọc linh.

Để có cơ sở đưa ra các giải pháp phòng chống bệnh hiệu quả, bài báo trình bày phương pháp phát hiện và giám định tác nhân gây bệnh thối củ hành bằng kỹ thuật PCR và phân tích trình tự gen *16SrDNA*.

## 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1 Vật liệu nghiên cứu

Mẫu củ hành tía (*Allium ascalonicum* L.) có triệu chứng bệnh thối củ được thu thập tại các vùng trồng hành ở xã Huyện Sơn, huyện Lục Nam, tỉnh Bắc Giang; xã Hiệp Hòa, huyện Kinh Môn, tỉnh Hải Dương; xã Minh Tân, huyện Vĩnh Lộc, tỉnh Thanh Hóa.

Môi trường phân lập gồm: WA (Water Agar: Agar 20 g, Nước cất 1000 ml), PDA-peptone (Potato Dextrose Agar Peptone: Khoai tây 200 g, Dextrose 20 g, Pepton 5 g, Agar 20 g, Nước cất 1000 ml), Hugh và Leifson (Anaerobic growth: Pepton 2 g, NaCl 5 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,3 g, Bromthymol blue 3 ml, Agar 3 g, Nước cất 1000 ml), LB lỏng (Luria-Bertaini: Tryptone 10 g, Cao nấm men 5 g, NaCl 5 g, Nước cất 1000 ml) và YDC (Cao nấm men 10 g,  $\text{CaCO}_3$  20 g, Dextrose 20 g, nước cất 1000 ml). Các loại hóa chất phục vụ các phần ứng chiết suất DNA, cặp primer 27F/1492R.

### 2.2 Phương pháp nghiên cứu

**Thu thập và phân lập tác nhân gây bệnh thối củ hành:** Thu thập và phân lập bệnh thối nhũn hành theo phương pháp điều tra phát hiện bệnh cây của Viện Bảo vệ thực vật (1997). Mẫu củ hành bị thối được thu thập tại xã Huyện Sơn, huyện Lục Nam, tỉnh Bắc Giang; xã Hiệp Hòa, huyện Kinh Môn, tỉnh Hải Dương; xã Minh Tân, huyện Vĩnh Lộc, tỉnh Thanh Hóa. Tại phòng thí nghiệm, mẫu bệnh sẽ được phân lập, nuôi cấy, làm thuần phục vụ công tác giám định tác nhân gây bệnh. Mô bệnh được khử trùng bề mặt bằng dung dịch 1% NaOCl trong 30 giây và rửa sạch 3 lần bằng nước cất vô trùng. Sau đó mô bệnh được nghiền nhỏ trong nước cất vô trùng và cấy trên môi trường PDA-peptone, ủ ở 28°C để theo dõi sự hình thành khuẩn lạc. Để phân biệt nhanh chóng vi khuẩn gây bệnh trên hành theo phương pháp đã mô tả bởi Schaad *et al.* (2001) gồm nhuộm gram, kiểm tra khả năng vi khuẩn sống ở điều kiện yếm khí (Hugh và Leifson) và trên môi

trường YDC. Các nguồn vi khuẩn được làm thuần và lưu giữ trong môi trường LB lỏng có chứa glycerol và cất ở điều kiện nhiệt độ -80°C để phục vụ các bước nghiên cứu tiếp theo.

**Chiết suất DNA, PCR và phân tích gen:** DNA của vi khuẩn được chiết suất dựa trên phương pháp của Ali *et al.* (2009). Lấy 2 khuẩn lạc vi khuẩn đã được nuôi cấy qua đêm cho vào ống Eppendorf 1,5 ml chứa 1 ml nước cất đã được khử trùng, ủ trong bể ủ nhiệt ở 100°C trong 10 phút, ly tâm với tốc độ 1.000 vòng/phút trong 5 phút. Sử dụng cặp mồi phát hiện bệnh thối củ hành với mồi 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')/1492R (5'-CTACGGCTACCTGTTACGA-3') (Weisburg *et al.*, 1991). Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1%. Sản phẩm PCR được tinh sạch từ agarose gel sử dụng Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Mỹ) và được giải trình tự gen trực tiếp cả hai chiều bằng 27F và 1492R primer trên máy ABI3100. Trình tự các mẫu được so sánh với ngân hàng gen bằng phần mềm trực tuyến (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), cây phả hệ xây dựng theo phương pháp Maximum-likelihood với khoảng cách di truyền giữa các chuỗi được xác định dựa trên mô hình thay thế Kimura 2-parameter model, giá trị thống kê bootstrap (%) với 1.000 lần lặp lại trong phần mềm MEGA X (Kumar *et al.*, 2018).

**Lây nhiễm nhân tạo theo chu trình Koch:** kiểm tra khả năng gây bệnh của các chủng phân lập được lây bệnh theo phương pháp của Schroeder *et al.* (2010) với một số điều chỉnh. Thí nghiệm lây bệnh được tiến hành trên giống hành tía và hành tây.

+ Giống hành thí nghiệm: Hành tía, hành tây. Chủng vi khuẩn: *P. carotovorum*. Thí nghiệm lây bệnh được bố trí với 3 lần nhắc lại, 30 củ/lần nhắc lại với nhiệt độ phòng 28°C.

+ Ngâm bộ rễ của củ hành trong dung dịch vi khuẩn nồng độ  $1 \times 10^6$  CFU/ml, công thức đối chứng được ngâm trong nước cất vô trùng.

+ Tiêm dung dịch vi khuẩn có nồng độ  $1 \times 10^6$  CFU/ml vào mỗi củ hành tây đã được khử trùng bề mặt, công thức đối chứng được tiêm bằng nước cất.

+ Cây hành con được trồng chậu chứa cát (đã được hấp khử trùng) và được tưới bằng dung dịch vi khuẩn có nồng độ  $1 \times 10^6$  CFU/ml, giai đoạn cây con 6 ngày sau trồng, công thức đối chứng được tưới bằng nước cất vô trùng.

Theo dõi và ghi nhận sự xuất hiện và biểu hiện triệu chứng, tái phân lập vi khuẩn từ củ, cây hành biểu hiện triệu chứng và xác định loài vi khuẩn thu thập được bằng kỹ thuật PCR và phân

tích trình tự gen *16SrDNA* như mô tả ở phần trên.

### 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1 Triệu chứng bệnh

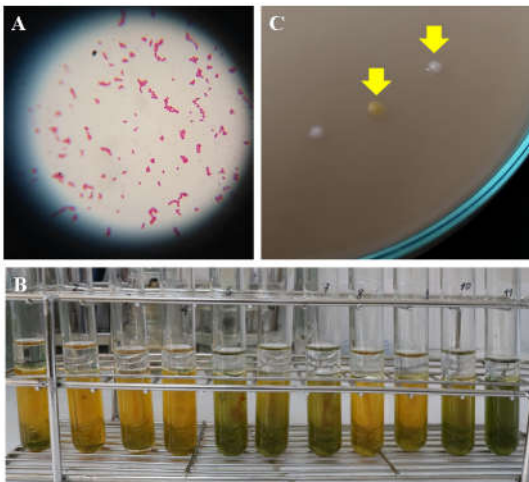
Thu thập mẫu cây hành có biểu hiện triệu chứng bị thối củ trong điều kiện đồng ruộng tại các huyện Kinh Môn (Hải Dương), Lục Nam (Bắc Giang) và Vĩnh Lộc (Thanh Hóa). Trên đồng ruộng, bệnh thường xuất hiện sớm từ giai đoạn cây con đến giai đoạn thu hoạch. Ban đầu, bộ rễ

bị nhiễm bệnh có màu vàng nâu, về sau rễ bị thối và nếu bị nhiễm bệnh nặng thì toàn bộ bộ rễ của cây hành bị thối (hình 1B) so với cây hành khỏe thì bộ rễ vẫn phát triển bình thường có màu trắng (hình 1A, C). Về sau, bệnh tấn công lên bộ phận củ làm cho củ hành bị thối có màu nâu, mọng nước và mềm (hình 1D, F) so với củ hành khỏe (hình 1E). Lá hành mới bị bệnh từ màu xanh chuyển sang màu vàng nhạt, về sau khi củ hành bị thối nặng lá chuyển sang màu vàng úa.



**Hình 1.** Triệu chứng bệnh thối nhũn trên hành.

(A) Cây khỏe; (B) Cây bị nhiễm bệnh ở các mức độ khác nhau ở giai đoạn cây con trên đồng ruộng; (C, E) Lá và củ hành khỏe; (D, F) Lá và củ hành bị nhiễm bệnh trên đồng ruộng trước khi thu hoạch.



**Hình 2.** Đặc điểm hình thái khuẩn lạc của vi khuẩn phân lập từ củ hành bị thối

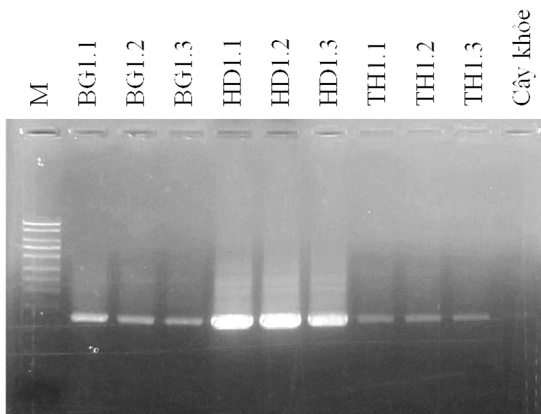
(A) Hình dạng vi khuẩn chụp dưới kính hiển vi quang học ở độ phóng đại 400 lần;  
 (B) Kiểm tra khả năng vi khuẩn sống trong điều kiện yếm khí;  
 (C) Màu sắc khuẩn lạc trên môi trường YDC.

Từ 27 mẫu củ hành bị nhiễm bệnh, đã phân lập được 48 chủng. Trong số 48 chủng có 38 chủng bắt màu nhuộm gram âm, hình que (hình 2A). Theo Schaad *et al.* (2001) nhóm vi khuẩn bắt màu gram âm thuộc một số chi *Pectobacterium*, *Pantoea*, *Xylophilus*, *Xanthomonas*, *Pseudomonas*, *Acidovorax* và *Ralstonia*. Sau 48 giờ nuôi vi khuẩn trong ống nghiệm điều kiện yếm khí (có phủ parafin), môi trường nuôi cấy đều đổi màu từ xanh sang vàng (hình 2B). Sự chuyển màu là do trong quá trình sinh trưởng, vi khuẩn đã sinh ra acid làm cho pH trong môi trường chuyển từ tính kiềm (pH = 7,1) sang tính acid. Chúng tỏ mẫu vi khuẩn có khả năng sinh trưởng, phát triển và sử dụng nguồn dinh dưỡng là glucose có trong môi trường. Theo Schaad *et al.* (2001), dựa vào đặc tính có thể sinh trưởng và phát triển trong môi trường yếm khí, qua đó xác định được 29 chủng vi khuẩn được xác định thuộc hai chi *Pectobacterium* và *Pantoea*. Trong khi đó ống nghiệm chứa vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* (vi khuẩn hiếu khí) có phủ parafin (đối chứng) không chuyển màu, vẫn

giữ màu xanh của môi trường. Để phân biệt nhanh chóng 2 chi *Pectobacterium* và *Pantoea*, cấy khuẩn lạc các chủng lên môi trường YDC, nếu khuẩn lạc có màu trắng trên môi trường YDC thì vi khuẩn đó thuộc chi *Pectobacterium*, nếu khuẩn lạc có màu vàng trên môi trường YDC thì vi khuẩn thuộc chi *Pantoea* (hình 2C). Như vậy, 25 chủng phân lập được từ mẫu củ hành bị thối thuộc chi *Pectobacterium* và 4 chủng thuộc chi *Pantoea*.

**Xác định loài vi khuẩn gây bệnh thối củ hành dựa trên trình tự đoạn gen 16SrDNA**

Cặp primer 27F/1492R khuếch đại trình tự của gen 16SrDNA từ các mẫu vi khuẩn phân lập được, trong khi không có sản phẩm PCR nào được khuếch đại từ mẫu đối ứng âm (sử dụng nước cất). Tất cả các sản phẩm PCR đều có kích thước khoảng 1.400 bp (hình 3).



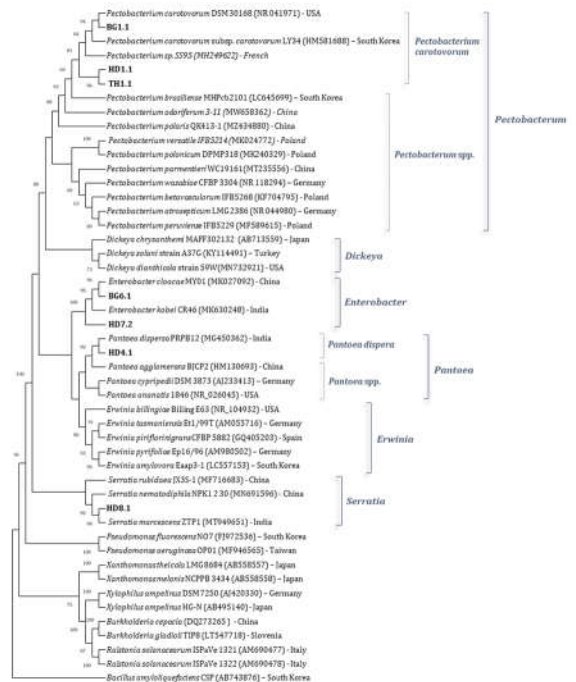
**Hình 3.** Hình ảnh điện di sản phẩm PCR khuếch đại đoạn gen 16SrDNA của các mẫu vi khuẩn phân lập được từ củ hành bị thối tại Bắc Giang (BG1.1, BG1.2, BG1.3), tại Hải Dương (HD1.1, HD1.2, HD1.3) và Thanh Hóa (TH1.1, TH1.2, TH1.3) bằng cặp primer 27F/1492R. M: High Ranger 1 kb DNA Ladder (Cat. 11900, Norgen Biotek Corp., Canada).

Tất cả các sản phẩm được giải trình tự và đều cho kết quả đồng nhất. Kết quả tìm kiếm bằng phần mềm trực tuyến BLAST cho thấy, chủng HD1.1, TH1.1 và BG1.1 có mức đồng nhất tính tự cao từ 99,8 - 100% với chủng *Pectobacterium carotovorum*.

Cây phả hệ được xây dựng dựa trên trình tự đoạn gen 16SrDNA của mẫu đại diện ký hiệu HD1.1, TH1.1 và BG1.1 có chiều dài 1.265 bp cùng với 4 trình tự các đoạn gen 16SrDNA của các chủng vi khuẩn tìm kiếm bằng phần mềm trực tuyến BLAST cho thấy mẫu đại diện ký hiệu HD4.1

có mức đồng nhất tính tự *Pantoea dispersa* PRPB12 (mã số: MG450362), mẫu đại diện BG6.1 và HD7.2 có mức đồng nhất tính tự *Enterobacter cloacae* MY01 (mã số: MK027092), mẫu đại diện HD8.1 có mức đồng nhất tính tự *Serratia marcescens* ZTP1 (mã số: MT949651) và các chi *Pectobacterium*, *Dickeya*, *Enterobacter*, *Pantoea*, *Erwinia*, *Serratia*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Xylophilus*, *Burkholderia*, *Ralstonia*, *Bacillus* từ ngân hàng gen.

Như vậy, loài vi khuẩn phân lập từ mẫu củ hành bị thối là loài *Pectobacterium carotovorum*



**Hình 4.** Cây phả hệ được xây dựng bằng phương pháp Maximum-likelihood của phần mềm MEGA X dựa trên trình tự 16SrDNA của chủng phân lập từ củ hành bị thối nhũn và các chủng vi khuẩn được lựa chọn từ ngân hàng gen. Giá trị bootstrap được hiển thị ở các điểm giao các nhánh.

**Lây nhiễm nhân tạo**

Đối với công thức lây nhiễm bộ rễ của củ hành bằng dung dịch vi khuẩn với nồng độ  $1 \times 10^6$  CFU/ml: sau 7 ngày lây nhiễm bằng các chủng HD1.1, TH1.1 và BG1.1, bộ rễ của củ hành đã bị thối, có màu nâu và bộ phận thối có xu hướng lan lên phần củ (hình 5B, C, D), trong khi đó bộ rễ của củ hành lây nhiễm bằng nước cất không biểu hiện triệu chứng, có màu trắng, củ có màu bình thường (hình 5A).

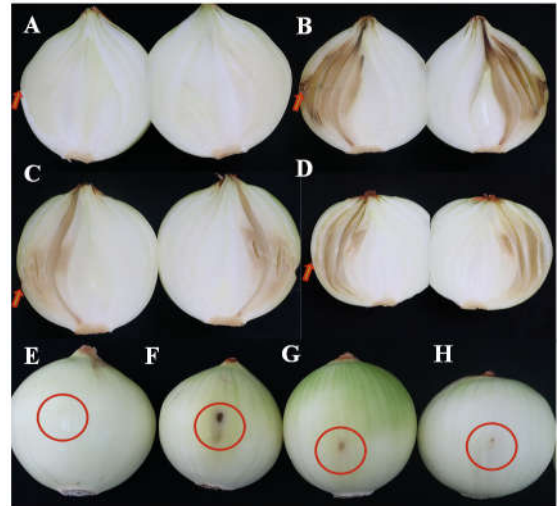


**Hình 5.** Kết quả lây nhiễm nhân tạo chủng HD1.1, TH1.1 và BG1.1 lên bộ rễ củ hành. **A:** lây nhiễm bằng nước cất; **B:** Lây nhiễm bằng chủng HD1.1; **C:** Lây nhiễm bằng chủng TH1.1. và **D:** lây nhiễm bằng chủng BG1.1.

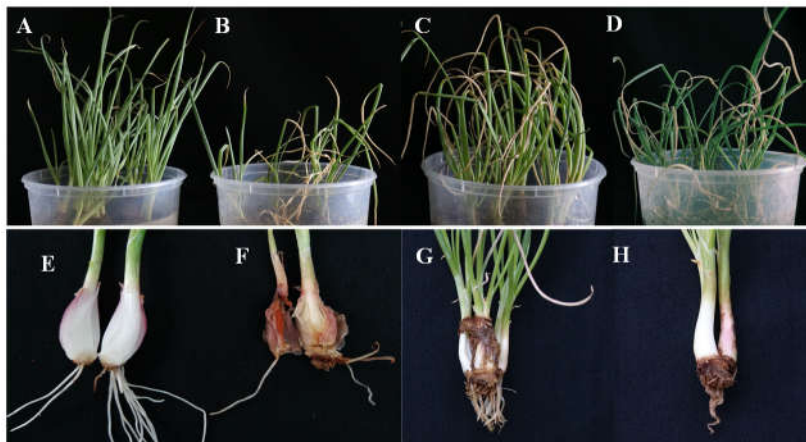
Đối với công thức tiêm dung dịch vi khuẩn với nồng độ  $1 \times 10^6$  CFU/ml vào trong củ: sau 7 ngày lây nhiễm, ở củ hành được tiêm bằng nước cất vô trùng, vết tiêm vẫn có màu trắng, không ghi nhận triệu chứng (hình 6A, E), trong khi đó, củ hành tây được lây nhiễm bằng dung dịch các chủng HD1.1, TH1.1 và BG1.1 vết tiêm đã có màu nâu, dạng ướt và có xu hướng lan rộng ra xung quanh (hình 6B, F; C, G; D, H).

Tiến hành lây bệnh cây hành con trong điều kiện chậu vại bằng dung dịch vi khuẩn *P. carotovorum* nồng độ  $10^6$  CFU/ml. Sau 30 ngày lây nhiễm, trong khi cây hành con được lây bằng nước cất vô trùng không biểu hiện triệu chứng (hình 7A, E), cây hành con được lây nhiễm bằng dung dịch vi khuẩn *P. carotovorum* có biểu hiện cây thấp, lá bị

vàng cháy (hình 7B, C, D), bộ rễ bị thối gần như hoàn toàn và phần củ đã bị thối nhũn (hình 7F, G, H). Tất cả các mẫu lây bệnh nhân tạo đã được tái phân lập vi khuẩn và khẳng định loài vi khuẩn phân lập được từ các vết bệnh sau khi lây nhiễm nhân tạo lên bộ rễ, củ đều là loài *P. carotovorum*. Như vậy, đã hoàn thành chu trình Koch và khẳng định loài vi khuẩn *P. carotovorum* là nguyên nhân gây bệnh thối nhũn trên cây hành.



**Hình 6.** Kết quả lây nhiễm nhân tạo chủng HD1.1, TH1.1 và BG1.1 tiêm vào củ hành tây. **(A, E):** lây nhiễm bằng nước cất; **(B, F):** lây nhiễm bằng chủng HD1.1; **(C, G):** lây nhiễm bằng chủng TH1.1; **(D, H):** lây nhiễm bằng chủng BG1.1.



**Hình 7.** Kết quả lây cây hành con bằng chủng HD1.1, TH1.1 và BG1.1. **(A, E):** lây nhiễm bằng nước cất; **(B, F):** lây nhiễm bằng chủng HD1.1; **(C, G):** lây nhiễm bằng chủng TH1.1; **(D, H):** lây nhiễm bằng chủng BG1.1.

#### 4. KẾT LUẬN

Đã xác định được nguyên nhân gây bệnh thối củ hành tại Bắc Giang, Hải Dương và Thanh Hóa là do loài vi khuẩn *Pectobacterium carotovorum* gây ra bằng phương pháp PCR sử dụng cặp primer 27F/1492R khuếch đại đoạn gen 16SrDNA.

#### Lời cảm ơn

Công trình này là một phần kết quả của đề tài tiềm năng cấp Bộ *Nghiên cứu xác định nguyên nhân gây bệnh thối nhũn hành, tỏi tại các tỉnh phía Bắc* do ThS. Ngô Quang Huy làm chủ trì.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Xuân Cảnh, Nguyễn Thị Khánh và Phạm Hồng Hiền, 2017. Nghiên cứu chủng xạ khuẩn có khả năng đối kháng với vi khuẩn *Erwinia carotovora* gây bệnh thối nhũn trên một số loại cây trồng. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam*, 7, pp.41-46.
2. Trương Thị Chiên, Nguyễn Thị Thanh Mai, Nguyễn Xuân Cảnh, Nguyễn Ngọc Lan, Nguyễn Thị Hiền và Trần Bảo Trâm, 2019. Phân lập và tuyển chọn chủng vi khuẩn có hoạt tính kháng *Erwinia carotovora* từ đất trồng sâm Ngọc Linh tại Quảng Nam. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam*, 61, pp.32-35.
3. Nguyễn Lê Thanh Mai, Trần Thị Thu Thủy và Lê Minh Tường, 2020. Bước đầu nghiên cứu vi khuẩn *Dickeya chrysanthemi* (*Erwinia chrysanthemi*) gây bệnh thối nhũn củ khoai lang tại huyện Bình Tân, tỉnh Vĩnh Long. *Tạp chí bảo vệ thực vật*, 2 (289), pp.10-15.
4. Lê Minh Thi và cs, 1982. Nghiên cứu bệnh hại hành tại Mê Linh, Vĩnh Phúc. Báo cáo khoa học.
5. Nguyễn Thị Vân, 2010. Nghiên cứu bệnh thối nhũn hành, tỏi và đề xuất biện pháp phòng trừ tại một số địa phương ở Hải Dương. Báo cáo nghiệm thu đề tài.
6. Viện Bảo vệ thực vật, 1999. Phương pháp nghiên cứu Bảo vệ thực vật. tập 1, NXB Nông nghiệp Hà Nội.
7. Adeolu, M., S. Alnajjar, S. Naushad and R. S. Gupta, 2016. Genome-based phylogeny and taxonomy of the 'Enterobacteriales': proposal for Enterobacterales ord. nov. divided into the families Enterobacteriaceae, Erwiniaceae fam. nov., Pectobacteriaceae fam. nov., Yersiniaceae fam. nov., Hafniaceae fam. nov., Morganellaceae fam. nov., and Budviciaceae fam. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66, pp.5575–5599.
8. Ali, A.D., M.J. Mehrez, M.A. Abdulsamad and M.D. Hussein, 2009. Heat treatment of bacteria: a simple method of DNA extraction for molecular techniques. *Kuwait Medical Journal*, 41, pp.117-122.
9. Bergey Manual, 2005. Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol. 2, *The proteobacteria*.
10. Charkowski, A., C. Blanco, G. Condemine, D. Expert, T. Franza, C. Hayes, I. Yedidia, 2012. The Role of Secretion Systems and Small Molecules in Soft-Rot Enterobacteriaceae Pathogenicity. *Annual Review of Phytopathology*, 50(1), pp.425–449.
11. FAO, 2019. World onion production. <http://faostat.fao.org>.
12. Gavrilovic, V., A. Obradovic and M. Arsenijevic, 2001). Bacterial Soft Rot of Carrot, Parsley and Celery. *Plant Pathogenic Bacteria*, pp. 269-271.
13. Kumar, S., et al., 2018. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.*, 35, pp.1547-1549.
14. Liao, L., R. Hei, Y. Tang, S. Liu and J. Zhou, 2016. First Report of Soft Rot Disease of Peach Caused by *Pantoea ananatis* in China. Vol. 100, No. 2.
15. Masyahit, M., K. Sijam, Y. Awang, M. Ghazali, 2009. First report on bacterial soft rot disease on dragon fruit (*Hylocereus* spp.) caused by *Enterobacter cloacae* in peninsular Malaysia. *Int J Agric Biol*, 11, pp.659–666.
16. Schaad, N.W., et al., 2001. Laboratory guide for identification of plant pathogenic Bacteria. *American Phytopathological Society*.
17. Schroeder, B.K., et al., 2010. Evaluation of onion culti-vars for resistance to *Enterobacter cloacae* in storage. *Plant Dis*, 94, pp.236-243.
18. Weisburg, W.G., S.M. Barns, D.A. Pelletier, and D.J. Lane, 1991. 16S ribosomal RNA amplification for phylogenetic study. *Journal of bacteriology*, 173(2), pp.697-703.
19. Zaid, A.M., J.M. Bonasera and S.V. Beer, 2012. OEM - a new medium for rapid isolation of onion-pathogenic and onion-associated bacteria. *J. Microbiol. Methods*, 91, pp.520-526.
20. Zhang, Y., X.L. Chen, A.W. Huang, S.L. Liu, W.J. Liu, N. Zhang and X.Z. Lu, 2016. Mortality attributable to carbapenem-resistant *Pseudomonas-aeruginosa* bacteremia: a meta-analysis of cohort studies. *Emerging Microbes & Infections*, 5:1, pp.1-6.
21. Zhong, L., N. Harijati, Y. Ding, Z.Z. Bao, W.D. Ke and Z.L. Hu, 2015. First Report of Black Rot of *Sagittaria sagittifolia* Caused by *Bacillus amyloliquefaciens* in China. *The American Phytopathological Society*, Vol. 99, No. 9, pp.1270.

**Phản biện: PGS.TS. Hà Viết Cường**