

NGHIÊN CỨU XÁC ĐỊNH NẤM *Phomopsis durionis* VÀ *Lasiodiplodia theobromae* GÂY BỆNH CHÁY LÁ TRÊN SẦU RIÊNG

Đặng Thị Kim Uyên¹, Lê Thị Tường¹, Nguyễn Văn Hòa¹

TÓM TẮT

Kết quả thu thập mẫu bệnh với những triệu chứng gây bệnh cháy lá trên sầu riêng tại tỉnh Tiền Giang từ tháng 3 đến tháng 12 năm 2019 thì 30 mẫu phân lập ra nấm *Lasiodiplodia* sp.; *Phomopsis* sp.; *Colletotrichum* sp. và *Rhizoctonia* sp. Trong đó nấm *Lasiodiplodia* sp.; *Phomopsis* sp. chiếm tỷ lệ cao 75 - 95% trong tất cả mẫu phân lập. Dựa trên đặc điểm hình thái như màu sắc của khuẩn lạc, khuẩn ty, hình dạng bào tử cũng như dùng sinh học phân tử (ITS) gồm điện di sản phẩm PCR cho sản phẩm khuếch đại vùng trình tự vùng ITS-rDNA; giải trình tự vùng ITS-rDNA và so sánh tương đồng bằng công cụ BLAST trên GeneBank, cho thấy hai mẫu nấm có trình tự vùng ITS tương đồng cao (98 - 100%) với loài *Lasiodiplodia theobromae* và *Phomopsis durionis* là tác nhân gây bệnh cháy lá sầu riêng ở Tiền Giang. Bệnh do loài *Lasiodiplodia theobromae* gây cháy ở đuôi lá màu trắng bạc trên lá già, trên vết bệnh có nhiều hạch nấm màu nâu đen trên vết bệnh cũ. Triệu chứng bệnh do loài *Phomopsis durionis* gây ra vết bệnh có những đốm bằng đầu kim, mỗi vết bệnh có quang vàng xung quanh, vết bệnh có dạng oval, nặng có hình mắt cua có màu tro hay nâu dọc theo gân chính lan dần vào bên trong lá.

Từ khóa: Cây sầu riêng, bệnh cháy lá, *Lasiodiplodia theobromae*, *Phomopsis durionis*

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh cháy lá trên sầu riêng đã được báo cáo ở các quốc gia nhiệt đới và cận nhiệt đới như ở Malaysia, Trung Quốc và Thái Lan. Bệnh được xem là phổ biến nhất và gây ảnh hưởng đến ra hoa và đậu quả sầu riêng. Một số loài *Phomopsis* là nấm gây bệnh thực vật gây ra các triệu chứng đa dạng như đốm, thối rữa, chết thối, thối rễ, thối trái, cháy lá và héo trên nhiều loại ký chủ (Uecker, 1988; Uecker and Johnson, 1991; Uecker and Kuo, 1992; Santos and Phillips, 2009). *Phomopsis durionis* đã được báo cáo là tác nhân gây bệnh đốm lá sầu riêng được tìm thấy ở một số vùng trồng sầu riêng của Thái Lan (Lim and Sangchote, 2003). Triệu chứng bệnh đốm lá đặc trưng bởi các đốm hoại tử màu nâu đen, đường kính khoảng 1 mm, có quang vàng. Các vết bệnh đốm này phổ biến hơn trên lá sầu riêng trong giai đoạn trưởng thành. *Phomopsis durionis* cũng được phát hiện là tác nhân gây bệnh đốm lá mới trên cây phát tòi (*Pachira macrocarpa*) ở Trung Quốc, gây ra các triệu chứng nghiêm trọng và phổ biến khắp các khu vực trồng loại cây này (PingGen *et al.*, 2000). Nấm *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl còn có tên gọi khác là *Botryodiplodia theobromae*, phân bố rộng tại nhiều quốc gia trên thế giới thuộc khu vực khí hậu nhiệt đới và cận nhiệt đới, và được ghi nhận là

loại nấm kí sinh gần 500 loại cây trồng khác nhau (Punithalingam, 1976). Nội dung trình bày dưới đây là kết quả nghiên cứu hình thái và sinh học phân tử của nấm đã xác định được là tác nhân gây bệnh cháy lá trên sầu riêng tại tỉnh Tiền Giang.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

- Đối tượng nghiên cứu: nấm gây bệnh cháy lá sầu riêng.

- Nguyên vật liệu: Bộ kit ly trích DNA của Mỹ; agarose; dung dịch safeview; đệm TAE 1X; hóa chất PCR (Dung dịch 10X; Taq polymerase: 5U/μL; dNTPs: 10 mM; Các muối; nước cất HPCL; MgCl₂: 25 mM; DNA mẫu; H₂O cất). ITS1 F: TCCGTAGGTGAACCTGCGG (Kumar and Shukla, 2005) và ITS4 R:TCCTCCGCTTATTGATATGC (Kumar and Shukla, 2005).

- Thuốc BVTV, dịch trích thảo mộc cây móng tay, củ đậu, môi trường PDA,...

2.2. Phương pháp nghiên cứu

- Phương pháp phân lập, chẩn đoán, giám định tác nhân gây bệnh do nấm được thực hiện theo Agrios (2005); Shen và cộng tác viên (2010).

¹ Viện Cây ăn quả miền Nam

* Tác giả liên hệ, e-mail: hoayuen28052005@gmail.com

- Thực hiện quy trình Koch, thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên (CRD) với 5 nghiệm thức (*Rhizoctonia* sp.; *Colletotrichum* sp.; *Phomopsis* sp.; *Botrydiplodia* sp. và đối chứng) với 5 lần lặp lại, tại nhà lưới Bộ môn Bảo vệ thực vật.

- Chỉ tiêu theo dõi: Tỷ lệ bệnh (%), chỉ số bệnh (%).

- Nghiên cứu hình thái của nấm gây bệnh cháy lá trên sầu riêng:

Nghiên cứu các đặc điểm về hình thái của tác nhân gây bệnh thán thư mới theo phương pháp của Burgess và cộng tác viên (2009) về màu sắc, hình dạng, kích thước, đo 100 bào tử,... được quan sát bằng kính hiển vi quang học.

Xác định chuỗi gen 28S rRNA của nấm tại phòng Lab chuyên sâu Bộ môn Bảo vệ thực vật. Số liệu được xử lý bằng chương trình Microsoft Excel và phân tích thống kê phần mềm MSTATC.

2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện từ tháng 3 năm 2019 đến tháng 12 năm 2019 tại Bộ môn Bảo vệ thực vật, Viện Cây ăn quả miền Nam.

III. KẾT QUẢ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả phân lập, giám định tác nhân gây bệnh cháy lá hại trên sầu riêng

Kết quả phân lập vi sinh vật gây bệnh từ 60 mẫu lá sầu riêng nhiễm bệnh (Bảng 1) đã ghi nhận: Ở Cái Lậy, nấm *Phomopsis* sp. và *Lasiodiplodia* sp. chiếm 85,0 - 95,0%, thị xã Cái Lậy 75,0 - 80,0% và Cái Bè 65,0 - 85,0%. Riêng nấm *Colletotrichum* sp. có xuất hiện nhưng tỷ lệ dưới 55%. Kết quả này cho thấy, tác nhân gây bệnh cháy lá trên sầu riêng chủ yếu là nấm *Phomopsis* sp. và *Lasiodiplodia* sp.

Bảng 1. Vi sinh vật hiện diện sau khi cấy mẫu (Viện Cây ăn quả miền Nam, 2019)

Địa điểm	Số mẫu	Tỷ lệ vi sinh vật hiện diện (%)			
		<i>Phomopsis</i> sp.	<i>Lasiodiplodia</i> sp.	<i>Colletotrichum</i> sp.	Vi sinh vật khác
Cái Lậy	20	85,00	95,00	55,00	10,00
Thị xã Cái Lậy	20	75,00	80,00	45,00	20,00
Cái Bè	20	65,00	85,00	35,00	5,00
Trung bình		75,00	85,00	45,00	11,67

Kết quả kiểm chứng tác nhân gây bệnh cháy lá trên sầu riêng được trình bày trong bảng 2 cho thấy, các chủng nấm đều gây ra bệnh cháy lá trên sầu

riêng, trong đó tỷ lệ bệnh chiếm 78,26% ở nghiệm thức chủng *Botrydiplodia* sp. và tỷ lệ bệnh 67,39% ở nghiệm thức chủng *Phomopsis* sp.

Bảng 2. Kết quả thí nghiệm kiểm chứng tác nhân gây bệnh (Viện Cây ăn quả miền Nam, 2019)



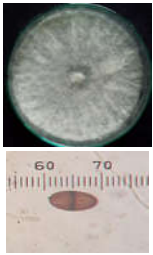
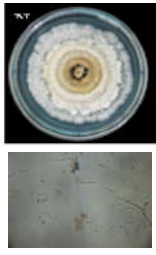
Nghiệm thức	TLB (%)	CSB (%)
<i>Rhizoctonia</i> sp.	47,83 ^b	19,22 ^d
<i>Colletotrichum</i> sp.	44,78 ^b	34,22 ^b
<i>Phomopsis</i> sp.	67,39 ^a	56,22 ^a
<i>Botrydiplodia</i> sp.	78,26 ^a	66,19 ^a
Đối chứng	0,00 ^c	0,00 ^c
Mức ý nghĩa	**	**
CV (%)	9,8	15,7

Ghi chú: Số liệu đã được chuyển sang $\arcsin(x)$ trước khi xử lý thống kê. Các giá trị trong cùng một cột theo sau bởi một chữ cái giống nhau thì không khác biệt ở mức ý nghĩa 5% qua phép thử Duncan; ** Khác biệt ở mức ý nghĩa 1%.

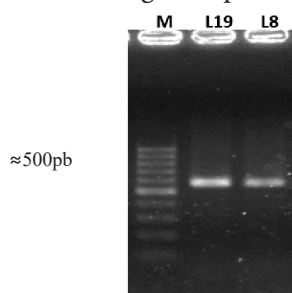
Chỉ số bệnh chiếm cao nhất là nghiệm thức chủng *Botrydiplodia* sp. (66,19%), kế đến là nghiệm thức chủng *Phomopsis* sp. chiếm 56,22%. Từ đó cho thấy nấm *Botrydiplodia* sp. và nấm *Phomopsis* sp. là nguyên nhân gây ra bệnh cháy lá trên sầu riềng.

3.2. Kết quả nghiên cứu đặc điểm hình thái *Lasiodiplodia* sp. và *Phomopsis* sp. gây bệnh cháy lá trên sầu riềng

Bảng 3. Một số đặc điểm gây bệnh và hình thái nấm *Lasiodiplodia* sp. và nấm *Phomopsis* sp. gây bệnh bệnh cháy lá trên sầu riềng (Viện Cây ăn quả miền Nam, 2019)

Quan sát	Đặc điểm của 2 nấm gây bệnh cháy lá trên sầu riềng	
	<i>Botrydiplodia</i> sp.	<i>Phomopsis</i> sp.
Triệu chứng	Trên lá có vết bệnh nhỏ nằm ngay giữa lá. Ban đầu màu sắc của lá có màu vàng nhạt, càng về sau chuyển sang vàng đậm và sau đó là màu xám đen, gây cháy ở đuôi lá màu trắng bạc trên lá già, vết bệnh có nhiều hạch nấm màu nâu đen trên vết bệnh cũ.	Trên lá vết bệnh có những đốm bằng đầu kim, mỗi vết bệnh có quầng vàng xung quanh, vết bệnh có dạng oval, khi bị nặng vết bệnh có hình mắt cua có màu tro hay nâu dọc theo gân chính lan dần vào bên trong lá. Toàn bộ lá có thể chuyển sang màu nâu.
		
Khuẩn lạc	Tân nấm <i>Lasiodiplodia</i> sp. trên môi trường PDA ban đầu có màu trắng sữa, sau 7 ngày nuôi cấy tân nấm có màu từ xám lông chuột đến đen, trên bề mặt phủ một lớp sợi mịn và dày như lông tơ, mặt sau tân nấm có màu đen, không có vòng đồng tâm.	Tân nấm <i>Phomopsis</i> sp. trên môi trường PDA ban đầu có màu trắng, sau 10 ngày nuôi cấy tân nấm có màu cà phê sữa, trên bề mặt sợi mịn, mọc sát môi trường có vòng đồng tâm.
Bào tử	Bào tử hình trứng hoặc ovan. Bào tử đính trường thành có một vách ngăn ở giữa, màu nâu vàng đến đen.	Bào tử ở dạng đơn bào, hình dấu ngã hoặc ovan.
Sợi nấm	Sợi nấm phân nhánh có vách ngăn đính trên cạnh bào tử.	Sợi nấm phân nhánh có vách ngăn
Hình tàn nấm và bào tử		

Kết quả điện di sản phẩm PCR 2 mẫu nấm *Lasiodiplodia* sp. đã phân lập đều cho sản phẩm khuếch đại trình tự vùng ITS – rDNA với chiều dài khoảng 520 bp .



Hình 1. Sản phẩm PCR được nhân lên từ DNA của các chủng nấm với mỗi ITS trên gel Agarose 1,5% Ladder 100 bp

Từ kết quả hình thái trên, tiến hành giải trình tự gen 28S rRNA của 2 mẫu nấm *Lasiodiplodia* sp. và *Phomopsis* sp. sử dụng hai Primer ITS1 và ITS4 cho thấy chiều dài toàn vùng 442 - 527 bp và tra cứu trên BLAST SEARCH có kết luận 99 - 100% là loài nấm *Lasiodiplodia theobromae* và *Phomopsis durionis*.

IV. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

4.1. Kết luận

Kết quả đánh giá đặc điểm hình thái và giải trình tự gen đã xác định được tác nhân gây bệnh cháy lá trên sầu riêng tại Tiền Giang là nấm *Lasiodiplodia theobromae* và nấm *Phomopsis durionis*. Triệu chứng bệnh do *Lasiodiplodia theobromae* có vết bệnh gây cháy ở đuôi lá màu trắng bạc trên lá già, có nhiều hạch nấm màu nâu đen trên vết bệnh cũ. Triệu chứng bệnh do loài *Phomopsis durionis* gây ra vết bệnh có những đốm bằng đầu kim, mỗi vết bệnh có quầng vàng xung quanh, vết bệnh có dạng oval, nặng có hình mắt cua có màu tro hay nâu đục theo gân chính lan dần vào bên trong lá.

4.2. Đề nghị

Cần phân biệt đúng triệu chứng bệnh cháy lá ở ngoài đồng để có biện pháp quản lý bệnh hiệu quả.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Burgess, L.W., Timothy, E., Lentasoriero, Phan Thuy Hien, 2009. Anthracnose disease of chili pepper. Technical bulletin.

Kumar, M., Shukla, P.K., 2005. Use of PCR Targeting of internal transcribed spacer regions and single-stranded conformation polymorphism analysis of sequence variation in different regions of rRNA genes in fungi for rapid diagnosis of mycotic keratitis. *Microbiology*, 43: 662-668.

Lim, T.K. and Sangchote, S., 2003. Diseases of Durian. In: PLOETZ, R.C. (ed.), *Diseases of Tropical Fruit Crops*. Wallingford: CABI Publishing. on asparagus. *Mycologia*, 83: 192-199.

Pinggen, X., Peikun, Q. and zide, J., 2000. Identification of the fungal diseases in *Pachira macrocarpa*. *Journal of South China Agricultural University*, 21 (4): 30-32.

Punithalingam E., 1976. *Botryodiplodia theobromae*. CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria No. 519. Commonwealth Mycological Institute, Ferry Lane, Kew, surrey, England, 2 pages.

Santos, J.M. and Phillips, A.J.L., 2009. Resolving the complex of *Diaporthe* (*Phomopsis*) species occurring on *Foeniculum vulgare* in Portugal. *Fungal Divers.*, 34: 111-125.

Uecker, F.A. and Johnson, D.A., 1991. Morphology and taxonomy of species of *Phomopsis*, 83(2): 192-199.

Uecker, F.A., 1988. A world list of *Phomopsis* names with notes on nomenclature, morphology and biology. *Mycologia Memoir*, 13: 1-231.

Uecker, F.A. and Kuo, K.C., 1992. A new *Phomopsis* with long paraphyses. *Mycotaxon*, 44: 425-433.

Agrios, G.N., 2005. *Plant Pathology*. 5th ed. Academic Press, San Diego, 922 pages.

Shen, Y.Y., Liang, L., n, Y.B., Yue, B.S., Yang, X.J., Murphy, R.W., & Zhang, Y.P., 2010. A mitogenomic perspective on the ancient, rapid radiation in the Galliformes with an emphasis on the Phasianidae. *BMC evolutionary biology*, 10: 132.

Identification of fungi *Phomopsis durionis* and *Lasiodiplodia theobromae* causing leaf blight on durian

Dang Thi Kim Uyen, Le Thi Tuong, Nguyen Van Hoa

Abstract

Results from collecting leaf blight diseased samples in Tien Giang province from March to December 2019 showed that 30 of the collected samples were recorded to be infected by fungi such as *Lasiodiplodia* sp.; *Phomopsis* sp.; *Colletotrichum* sp. and *Rhizoctonia* sp. In which the fungus *Lasiodiplodia* sp.; *Phomopsis* sp. accounted for 75 to 95% of the all isolates. Based on morphological characteristics such as color of colonies, bacteriophages and spore shapes as well as using molecular biology technique (ITS) including electrophoresis of PCR products for products that amplified the ITS - rDNA sequence region; ITS - rDNA region sequencing and homology comparison using BLAST tool on the GeneBank, showed that two fungal sequences had highly similarity (99 - 100%) to the ITS sequence of fungal species of *Lasiodiplodia theobromae* and *Phomopsis durionis*, so they are the causal agents of the leaf blight disease on durian in Tien Giang province. In case of *Lasiodiplodia theobromae*, there are symptoms of burning on the tips of the old leaves, which are white to silver color, and there are many brown to black fungal scerotia on the

old lesions. Symptoms due to *Phomopsis durionis* fungus, the lesions have needle-tip spots, each diseased lesion has a yellow halo around it, the diseased lesion is oval in shape, severe infection with ash or brown carb's eyes along the main vein gradually spreading to the edge of the leaf.

Keywords: Durian, leaf blight disease, *Lasiodiplodia theobromae*, *Phomopsis durionis*

Ngày nhận bài: 01/6/2022
Ngày phản biện: 09/6/2022

Người phản biện: TS. Nguyễn Văn Vãn
Ngày duyệt đăng: 30/6/2022

NGHIÊN CỨU KHẢ NĂNG SỬ DỤNG CHỦNG *Streptomyces* XK3.1 VÀ Tra TRONG PHÒNG TRỪ *Fusarium oxysporum* VÀ *Corynespora cassiicola*

Phạm Hồng Hiến¹, Đặng Thành Đạt², Nguyễn Huy Thuần³,
Trần Bảo Trâm⁴, Nguyễn Văn Giang^{2*}

TÓM TẮT

Thời gian qua, nhiều loại dịch bệnh hại vật nuôi và cây trồng bùng phát làm giảm năng suất, chất lượng cây trồng. Người sản xuất đã sử dụng các chế phẩm sinh học từ các vi sinh vật hữu ích thay thế dần thuốc bảo vệ thực vật nguồn gốc hoá học. Xạ khuẩn là thành phần chính của nhiều chế phẩm sinh học, đóng vai trò quan trọng trong kiểm soát bệnh hại cây trồng vì chúng có khả năng sinh các hoạt chất đối kháng tác nhân gây bệnh, chất kích thích sinh trưởng, các enzyme phá huỷ thành tế bào vi sinh vật gây bệnh. Trong nghiên cứu này, hai chủng xạ khuẩn Tra và XK3.1 thuộc chi *Streptomyces* đã thể hiện hiệu lực ức chế nấm *Fusarium oxysporum* (phần trăm ức chế đạt tương ứng 22,97% và 21,62%) và *Corynespora cassiicola* (phần trăm ức chế đạt tương ứng 31,25% và 25%). Hai chủng này sinh trưởng tốt tại nhiệt độ 30°C, pH = 7, trên các nguồn carbon là dextrin, lactose, sucrose, maltose và có thể chịu được nồng độ muối trong môi trường tới 1%.

Từ khóa: Xạ khuẩn, nấm *Fusarium oxysporum*, *Corynespora cassiicola*, chịu muối

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong những năm qua, bệnh hại cây trồng gây thiệt hại nặng nề cho sản xuất nông nghiệp nói chung, cho cây trồng nói riêng. Ví dụ, nấm *Fusarium oxysporum* gây bệnh Panama hại chuối, nấm *Corynespora cassiicola* gây bệnh vàng, rụng lá trên cây cao su. Để giảm thiểu tác động của các tác nhân gây hại cây trồng, người sản xuất đã sử dụng nhiều biện pháp như luân canh, cải tạo đất, nhưng thường là sử dụng thuốc bảo vệ thực vật nguồn gốc hoá học. Tuy nhiên, lạm dụng thuốc bảo vệ thực vật đã ảnh hưởng tới môi trường đất, nước, chất lượng nông sản. Hiện nay các chế phẩm từ các vi sinh vật hữu ích đang được người sản xuất sử dụng vì chế phẩm này không chỉ góp phần cải tạo

đất, cung cấp dinh dưỡng cho cây trồng, giúp cây trồng kháng lại một số stress phi sinh học, mà còn góp phần hạn chế sự phát triển của các tác nhân gây bệnh (Rajiv Pathak *et al.*, 2017; Verma *et al.*, 2018). Xạ khuẩn (*Actinomyces* sp.) là một trong số các loài vi sinh vật được khai thác và ứng dụng nhiều không chỉ trong sản xuất mà còn trong lĩnh vực bảo vệ sức khỏe. Xạ khuẩn có tác dụng ức chế hoặc kiểm soát một số nấm bệnh gây bệnh hại thực vật có nguồn gốc từ đất (Mustafa Oskay, 2009). Khoảng hơn 8.000 chất kháng sinh được biết đến trên thế giới, có tới 80% là do xạ khuẩn sinh ra (Dhanasekaran *et al.*, 2012). Bên cạnh đó, xạ khuẩn cũng đóng vai trò rất lớn trong việc phân giải các chất như: cellulose, lignin, phân giải phosphate khó

¹ Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam

² Khoa Công nghệ sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

³ Trung tâm Sinh học phân tử, Đại học Duy Tân

⁴ Trung tâm Sinh học Thực nghiệm - Viện Ứng dụng Công nghệ, Bộ KH&CN

* Tác giả liên hệ, e-mail: nvgiang@vnua.edu.vn