

Effect of herbal extract on the growth of *Fusarium* sp. isolated from the swollen swim bladder of striped catfish

Dang Thuy Mai Thy, Nguyen Thi Thu Hang,
Nguyen Trong Tuan, Tran Thi Tuyet Hoa

Abstract

This study was conducted to determine the effect of herbal extract on the growth of *Fusarium* sp. isolated from the swollen swim bladder of striped catfish. The extract of 6 herbs including *Bouea oppositifolia*, *Dirinaria applanala*, *Eclipta prostrata*, *Psidium guajava*, *Punica granatum* and *Teraminalia catppa* were evaluated against four *Fusarium* sp. strains. The result revealed that extracts of *Bouea oppositifolia*, *Dirinaria applanala* and *Punica granatum* showed greater antifungal activity than those of the remaining herbs when the fungi were exposed to each herb. *Dirinaria applanala*, *Bouea oppositifolia* and *Punica granatum* completely inhibited the growth of mycelium and the germination of spores of four fungal strains at concentration of 6.25; 12.5 and 25 mg/mL, respectively. *Eclipta prostrata* and *Psidium guajava* were found to have antifungal activity at the concentration of 100 mg/mL. The inhibition rate of mycelium growth was from 47.3% to 65.5%. The fungal were grown on *Teraminalia catppa* at the concentration of 100; 50; 25 and 12.5 mg/mL.

Keywords: Herbal extract, MIC, MFC, *Fusarium* sp.

Ngày nhận bài: 10/11/2021

Ngày phản biện: 20/11/2021

Người phản biện: TS. Trương Đình Hoài

Ngày duyệt đăng: 30/11/2021

XÁC ĐỊNH NẤM *Phytophthora* spp. GÂY BỆNH THỐI RỄ, CHẢY GÔM TRÊN CÂY ĂN QUẢ CÓ MÚI TẠI CAO BẰNG

Nguyễn Nam Dương¹, Hà Minh Thanh¹, Nguyễn Thị Bích Ngọc¹,
Ngô Thị Thanh Hương¹, Vũ Duy Minh¹, Hà Việt Cường², Phạm Bích Hiền^{3*}

TÓM TẮT

Những năm gần đây cây ăn quả có múi là cây trồng thịnh hành và có giá trị kinh tế nhất của tỉnh Cao Bằng, tuy nhiên bệnh thối rễ, chảy gôm đã gây hại nghiêm trọng, làm giảm năng suất ở tất cả các vùng của tỉnh. Mục đích của nghiên cứu này là xác định loài và đặc điểm sinh học của tác nhân gây bệnh được phân lập từ các mẫu đất, rễ, mô cây cam, quýt, bưởi. Dựa vào đặc điểm hình thái của nấm, lây nhiễm nhân tạo, phân tích trình tự vùng ITS đã xác định được 3 loài nấm *Phytophthora palmivora*, *Phytophthora nicotianae* và *Phytophthora citrophthora* là nguyên nhân gây bệnh thối rễ, chảy gôm trên cây ăn quả có múi tại Cao Bằng. Môi trường V8, CRA và PDA ở pH 6 - 7 thích hợp cho sinh trưởng, phát triển của cả 3 loài *P. palmivora*, *P. nicotianae* và *P. citrophthora*. Nhiệt độ thích hợp nhất cho sinh trưởng, phát triển của *P. palmivora* là ở 25°C, *P. nicotianae* là 30°C và *P. citrophthora* là 20°C. Phạm vi pH thích hợp nhất cho sinh trưởng, phát triển của cả 3 loài là pH 5,0 - 6,0. Kết quả nghiên cứu này là cơ sở khoa học để tiếp tục nghiên cứu các biện pháp quản lý hiệu quả bệnh thối rễ, chảy gôm trên cây ăn quả có múi tại Cao Bằng.

Từ khóa: Cây ăn quả có múi, *Phytophthora palmivora*, *Phytophthora nicotianae*, *Phytophthora citrophthora*, bệnh thối rễ, chảy gôm

¹ Viện Bảo vệ thực vật;

² Học Viện Nông nghiệp Việt Nam;

³ Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam;

* Tác giả liên hệ: E-mail: phambichhien@vaas.vn

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh thối rễ, chảy gôm là bệnh hại nghiêm trọng trên cây ăn quả có múi, cây bị bệnh còi cọc, lá chuyển màu vàng, trên thân cành và đặc biệt phần gốc cây có xuất hiện các vết chảy gôm, gỗ bị biến màu nâu đen, rễ bị thối đen và dễ tuột vỏ, hoa quả ít, làm giảm năng suất, chất lượng, khi bị bệnh nặng cây không cho quả và có thể bị chết (Whittle, 1992; Đặng Vũ Thị Thanh và *ctv.*, 2010).

Tỉnh Cao Bằng có điều kiện đất đai, khí hậu rất thích hợp cho phát triển cây ăn quả có múi, tuy nhiên việc mở rộng diện tích, đẩy mạnh thâm canh, tăng năng suất cây ăn quả có múi đặc biệt là các giống đặc sản có giá trị kinh tế là điều kiện thích hợp cho nhiều loài sâu bệnh phát sinh gây hại khiến diện tích, sản lượng cây ăn quả có múi bị suy giảm mạnh. Nhiều vườn cam, quýt tại vùng Hòa An, Trà Lĩnh tỉnh Cao Bằng bị thoái hóa nặng nề do nấm bệnh. Mặc dù bệnh thối rễ, chảy gôm trên một số cây ăn quả có múi ở Cao Bằng đã được xác định sơ bộ là do nấm *Phytophthora* spp. gây ra (Nguyễn Thị Bích Ngọc và *ctv.*, 2016) nhưng việc thực hiện các nghiên cứu chuyên sâu, xác định được vị trí phân loại, định danh tác nhân gây bệnh là rất cần thiết để có cơ sở khoa học đưa ra các biện pháp quản lý bệnh an toàn và hiệu quả, đảm bảo sản xuất bền vững cây ăn quả có múi tại Cao Bằng cũng như các vùng trồng cây ăn quả có múi ở Việt Nam.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Một số vườn cây ăn quả có múi tại Cao Bằng (cam Trung Vương, quýt Trà Lĩnh và bưởi Phục Hòa). Môi trường PSM, PDA; các hóa chất sử dụng trong phương pháp PCR, các cặp mồi ITS4 và ITS5. Máy PCR, máy điện di, các dụng cụ và vật liệu thí nghiệm, cần thiết khác.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

- Phương pháp điều tra, thu thập mẫu:

Mẫu bệnh thối rễ, chảy gôm được thu thập tại vùng trồng cây ăn quả có múi của tỉnh Cao Bằng theo phương pháp của Đặng Vũ Thị Thanh và Hà Minh Trung (1997), và theo Quy chuẩn kỹ thuật Quốc gia (QCVN 01-119:2012/BNNPTNT). Thu thập 3 loại mẫu khác nhau (đất, mô cây và mô rễ) tại 5 huyện (gồm: Hòa An, Trà Lĩnh, Thạch An, Nguyên Bình và Phục Hòa); tại mỗi huyện, thu thập

25 mẫu mỗi loại trên các giống quýt Trà Lĩnh, cam Trung Vương và bưởi Phục Hòa có biểu hiện triệu chứng thối rễ, chảy gôm. Tổng số mẫu thu thập: $3 \times 5 \times 25 = 375$ mẫu.

- Phương pháp phân lập, xác định tác nhân gây bệnh:

Nấm *Phytophthora* được phân lập từ số mẫu thu thập (đất, mô cây, và mô rễ) theo phương pháp sử dụng môi bẫy cánh hoa hồng của Erwin và Riberrio (1996); Drenth và Sendall (2001). Nấm sau khi phân lập được làm thuần, nuôi cấy và sử dụng phương pháp áp thạch thân gốc, tưới dịch nấm lây bệnh nhân tạo trở lại trên cây con. Quan sát, mô tả triệu chứng bệnh theo thời gian, khi xuất hiện vết bệnh, tái phân lập để xác định nấm bệnh; so sánh triệu chứng của cây, hình thái nấm từ vết bệnh ngoài tự nhiên và mẫu nấm qua lây bệnh nhân tạo; xác định một số đặc điểm sinh học nấm *Phytophthora* theo Phương pháp nghiên cứu bệnh cây của Viện Bảo vệ thực vật.

- Phương pháp xác định loài nấm *Phytophthora*

Nấm sau khi phân lập được làm thuần, nuôi cấy và sử dụng để đánh giá đặc điểm hình thái, xác định loài *Phytophthora* dựa vào phương pháp truyền thống theo khóa phân loại của Drenth và Sendall (2001); Erwin và Riberrio (1996). Đồng thời, định danh bằng sinh học phân tử qua phản ứng PCR sử dụng mồi ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') và ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'). Phản ứng PCR được thực hiện trong 50 μ L chứa 15 ng DNA, 100 ng mỗi loại primer; 150 μ M mỗi loại dNTP; 4 mM $MgCl_2$; 1 unit Dream Taq Polymerase trong môi trường $1 \times$ PCR buffer (Fermentas, Germany). Điều kiện nhiệt độ 95°C trong 3 phút và 34 chu kỳ với 95°C trong 1 phút, 52°C trong 30 giây và 72°C trong 1 phút. Mười microlit (10 μ L) sản phẩm PCR được điện di bằng 1% agarose gel (w/v) có chứa 0,5 μ g/ml ethidium bromide và chụp ảnh bằng hệ thống Geldoc-It™ Imaging System (USA). Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Đức) và được giải trình tự trực tiếp cả hai chiều bằng cả 2 primer đã được sử dụng trong phản ứng PCR.

- Phân tích trình tự vùng ITS (Internal Transcribed Spacer):

Dựa trên các trình tự thu được, tìm kiếm trên cơ sở dữ liệu Genbank bằng phần mềm trực tuyến BLAST tại NCBI (the National Center for Biotechnology Information) (<http://www.ncbi.nlm>

nih.gov/BLAST/). Căn trình tự đa chuỗi bằng phần mềm Clustal X ver. 2.0 (Larkin *et al.*, 2007). Cây phả hệ được xây dựng bằng phương pháp Neighbor-Joining trong phần mềm MEGA X (Kumar *et al.*, 2018) sử dụng mô hình thay thế Kimura 2 tham số để ước lượng khoảng cách di truyền. Giá trị ở các nốt là giá trị thống kê bootstrap dưới dạng % (1.000 lần lặp) và chỉ trình bày các giá trị > 50%.

2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện từ năm 2014 đến năm 2020 tại một số vùng trồng cây ăn quả có múi ở Cao Bằng.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân lập nấm *Phytophthora* gây bệnh thối rễ, chảy gôm trên cây ăn quả có múi tại Cao Bằng

Bảng 1. Kết quả phân lập nấm *Phytophthora* tại vùng cây ăn quả có múi tại Cao Bằng

Đối tượng cây	Địa điểm thu mẫu	Mẫu đất		Mô cây		Mô rễ		Tổng số mẫu phân lập được năm
		Số mẫu phân lập được năm	Tỉ lệ (%)	Số mẫu phân lập được năm	Tỉ lệ (%)	Số mẫu phân lập được năm	Tỉ lệ (%)	
Quýt	Trà Lĩnh	18	72	10	40	7	28	35
Cam, quýt	Hòa An	15	60	8	32	6	24	29
Quýt	Thạch An	12	48	7	28	5	20	24
Quýt	Nguyễn Bình	13	52	8	32	4	16	25
Bưởi	Phục Hòa	16	64	9	36	4	16	29
	Tổng	74	59,2	42	33,6	26	20,8	142

Ghi chú: Số mẫu thu thập tại 1 điểm là 25 mẫu × 3 loại mẫu (đất, mô cây, mô rễ).

3.2. Xác định nấm *Phytophthora* gây hại trên cây ăn quả có múi tại Cao Bằng

Dựa trên đặc điểm hình thái và màu sắc tản nấm, 142 nguồn nấm phân lập được chia thành 3 nhóm khác nhau; chọn đại diện 10 mẫu phân lập từ 3 loại cây ăn quả có múi khác nhau (ký hiệu như sau: mẫu Phyt-01, Phyt-02, Phyt-03, M1, M2 phân lập từ giống quýt Trà Lĩnh; mẫu Phyt-04, M3, M4 từ giống cam Trưng Vương; M5, M6 từ giống bưởi Phục Hòa) để xác định loài *Phytophthora*.

3.2.1. Xác định loài *Phytophthora* dựa vào đặc điểm hình thái nấm

Trên môi trường PDA, tản nấm Phyt-01 và Phyt-02 có màu trắng, sợi nấm trong suốt, không vách ngăn, ít phân nhánh và hơi phình lên ở vị trí phân nhánh, cành bào tử ít phân nhánh, có các bọc bào tử đính trên cành bào tử; bọc bào tử thường có

Từ 375 mẫu đất, mô cây, mô rễ thu thập tại các vườn bị bệnh thối rễ, chảy gôm tại các huyện Trà Lĩnh, Hòa An, Phục Hòa, Nguyễn Bình và Thạch An đã phân lập được 142 mẫu nấm *Phytophthora*. Tỷ lệ mẫu nấm *Phytophthora* phân lập được từ đất là cao nhất (chiếm 59,2%); từ mô cây bị bệnh là 33,6% và từ rễ cây bị bệnh là 20,8%. Có tới 72% mẫu đất, 40% mẫu mô cây và 28% mẫu mô rễ phân lập tại huyện Trà Lĩnh xác định được nấm *Phytophthora* (Bảng 1). Kết quả này cho thấy, Trà Lĩnh là vùng bị bệnh thối rễ, chảy gôm nặng nhất tỉnh Cao Bằng và sự tích lũy của nguồn bệnh trên các vườn cây ăn quả có múi tỷ lệ thuận với số cây bị nhiễm bệnh trên vườn. Nhận định này cũng phù hợp với kết quả khảo sát bệnh thối rễ, chảy gôm trên cây quýt Trà Lĩnh (Nguyễn Thị Bích Ngọc và *ctv.*, 2016).

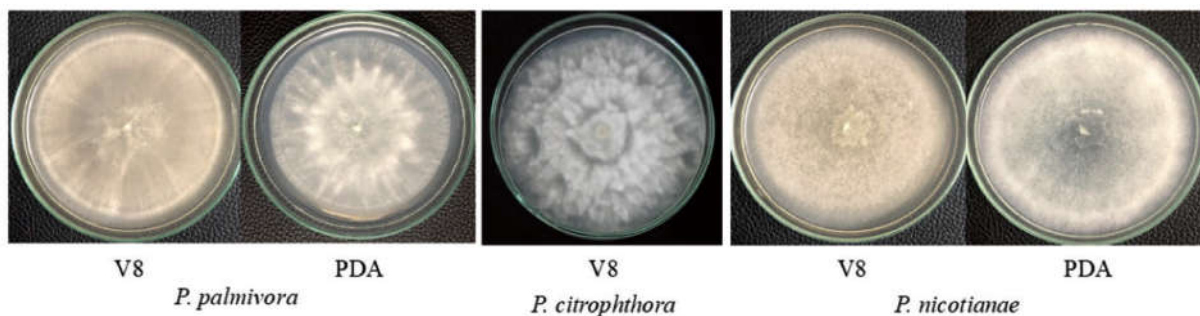
núm, hình elip, hình trứng, nhưng phổ biến dạng quả lê; kích thước bọc bào tử 42,6 - 77,2 μm × 24,6 - 40,3 μm, bọc bào tử có cuống ngắn, kích thước từ 3,6 đến 4,8 μm. Theo khóa phân loại của Erwin và Ribeiro (1996), hai mẫu Phyt-01 và Phyt-02 có hình thái tương tự loài *Phytophthora palmivora* (Hình 3, Hình 4A, D).

Trên môi trường V8, tản nấm của các mẫu M1, M2, M3, M4, M5 và M6 có màu trắng và hồng, sợi nấm bông vào giai đoạn thành thực, không vách ngăn, phân nhánh; bọc bào tử hình elip, hình trứng, hình quả chanh và dạng méo, không đối xứng, được sinh ra từ đoạn cuối hoặc giữa cành bào tử, có 1 - 2 núm; kích thước bọc bào tử từ 24,6 - 40,3 μm × 8,6 - 16,3 μm. Các đặc điểm hình thái sợi nấm và bọc bào tử của các mẫu M1, M2, M3, M4, M5 và M6 tương tự như mô tả của Erwin và

Donald (1983); Erwin và Ribeiro (1996) về nấm *Phytophthora citrophthora* (Hình 3, Hình 4B, E).

Trên môi trường PDA, tản nấm của các mẫu Phyt-03 và Phyt-04 có màu trắng, dạng bông; sợi nấm trong suốt, không vách ngăn, hơi phình lên; bào tử dạng hình cầu, hình trứng, có nóm. Kích

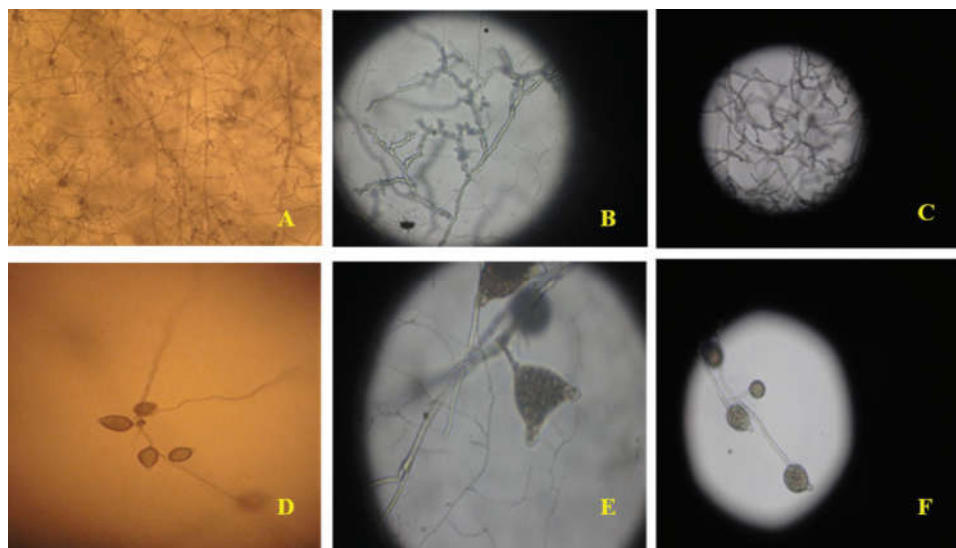
thước bào tử từ 15,2 - 46,8 $\mu\text{m} \times 14,5 - 38,3 \mu\text{m}$. Không ghi nhận được sự xuất hiện của hậu bào tử trong các mẫu quan sát. Theo khóa phân loại của Erwin và Ribeiro (1996), đặc điểm mẫu Phyt-03 và Phyt-04 tương tự loài *Phytophthora nicotianae* (Hình 3, Hình 4C, F).



Hình 3. Hình thái tản nấm *P. palmivora*, *P. citrophthora*, và *P. nicotianae* trên môi trường nuôi cấy nhân tạo (sau 7 ngày, 28°C)

Quan sát trên kính hiển vi cho thấy, hệ sợi nấm không vách ngăn, có dạng cành cây nổi lên từng cụm, hình thành nhiều u nhỏ. Bào tử có hình cầu, hình elip, hình trứng có khi dạng hình thang lệch. Bào bào

tử có từ một đến 2 nóm rõ ràng, đính trên đỉnh sợi nấm. Bào bào tử động trưởng thành phóng bào tử động (zoospore) thông qua lỗ hở, bào tử động có 2 lông roi ở 2 đầu, kích thước nhỏ 7 - 10 μm .



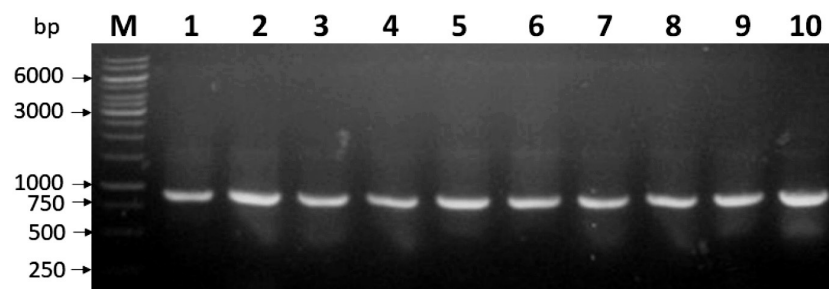
Hình 4. Ba loài nấm *Phytophthora* trên cây ăn quả có múi tại Cao Bằng

Ghi chú: A: Sợi nấm *P. palmivora*; B: Sợi nấm *P. citrophthora*; C: Sợi nấm *P. nicotianae*; D: Bào tử nấm *P. palmivora*; E: Bào tử nấm *P. citrophthora*; F: Bào tử nấm *P. nicotianae*.

3.2.2. Xác định loài *Phytophthora* dựa trên phân tích trình tự vùng ITS

Để xác định chính xác tác nhân gây bệnh thối rễ, chảy gôm, 10 mẫu nấm (Phyt-01, Phyt-02, Phyt-03, Phyt-04, M1, M2, M3, M4, M5 và M6) đã

được khuếch đại bằng cặp mồi ITS4 và ITS5. Sản phẩm PCR, kích thước $\sim 0,8 \text{ kb}$, được tinh chiết từ agarose gel và được giải trình tự trực tiếp cả hai chiều bằng mồi ITS4 và ITS5 (Hình 5).

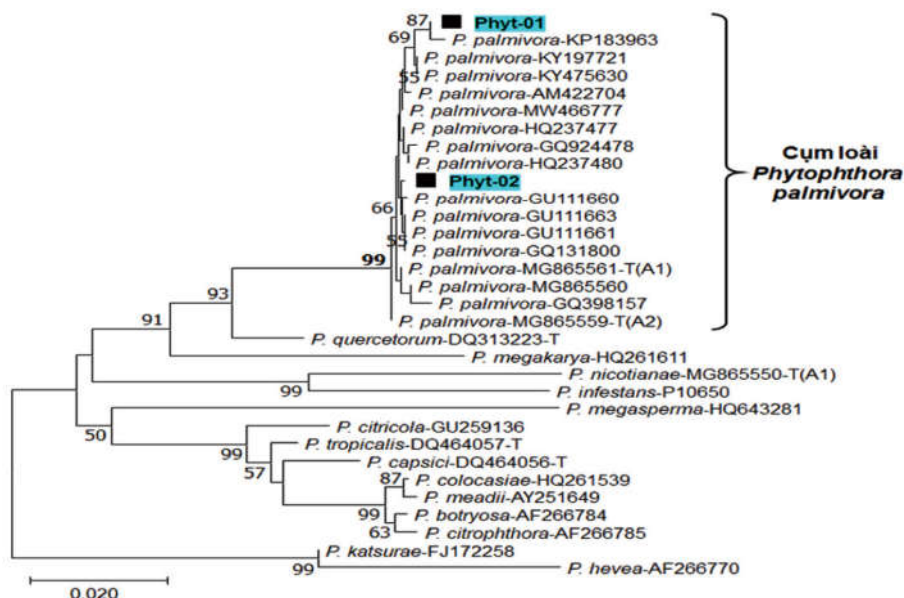


Hình 5. PCR nhân vùng ITS của các mẫu *Phytophthora* bằng cặp mồi ITS4 và ITS5

Ghi chú: Các giếng từ 1 - 10: mẫu Phyt-01, Phyt-02, Phyt-03, Phyt-04, M1, M2, M3, M4, M5 và M6, tương ứng. M là thang DNA 1 kb (Thermo).

Sản phẩm PCR của 2 mẫu Phyt-01 và Phyt-02 có kích thước là 795 bp, có mức tương đồng 100% với nhau và có độ tương đồng 99,9% với trình tự vùng ITS của loài *P. palmivora* có mã số GenBank MT052675, MK500842, MH401199, MF370566 và MG434772 (Bảng 2). Cây phát sinh được xây dựng bằng phương pháp Neighbor-Joining trong phần mềm MEGA X sử dụng trình tự vùng ITS của mẫu Phyt-01 và Phyt-02 và 30 trình tự vùng ITS của 15

loài khác nhau thuộc chi *Phytophthora*. Kết quả cho thấy, mẫu Phyt-01 và Phyt-02 cùng với các mẫu có mã số GenBank KP183963, KY197721, KY475630, AM422704, MW466777, HQ237477, GQ924478, HQ237480, GU111660, GU111663, GU111661, GQ131800, MG865561, MG865560, GQ398157 và MG865559 tạo thành cụm loài *P. palmivora* với giá trị bootstrap của cụm là 99% so với các cụm loài khác (Hình 6).



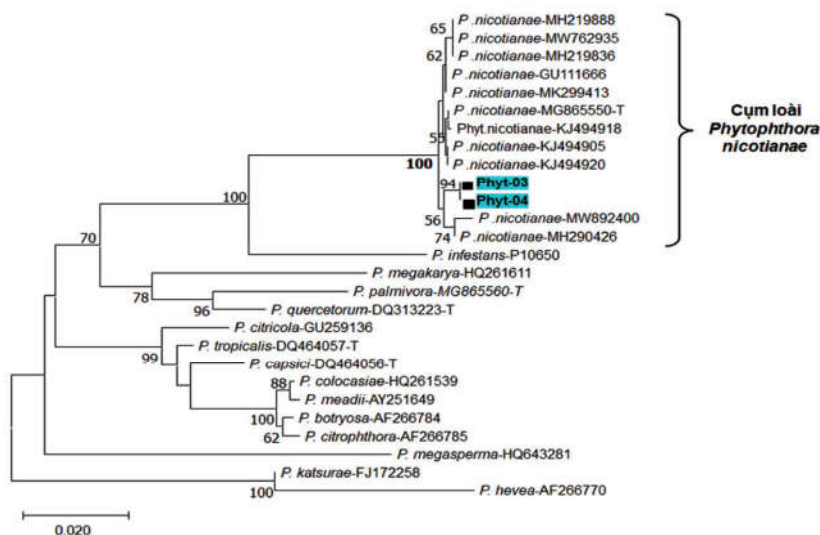
Hình 6. Cây phát sinh dựa trên trình tự vùng ITS của các mẫu Phyt-01 và Phyt-02 với đại diện một số loài thuộc chi *Phytophthora* từ GenBank

Sản phẩm PCR của 2 mẫu Phyt-03 và Phyt-04 đều có kích thước bằng 824 bp, có mức tương đồng 100% với nhau; và có độ tương đồng 99,9% với trình tự vùng ITS của loài *P. nicotianae* có mã số GenBank KR827692, KJ865230, JF792541, JF792540 và GU111681 (Bảng 2). Cây phả hệ được

xây dựng từ trình tự vùng ITS của mẫu Phyt-03 và Phyt-04 với 25 trình tự vùng ITS của 15 loài nấm khác nhau thuộc chi *Phytophthora*. Kết quả phân tích phả hệ cho thấy 2 mẫu Phyt-03 và Phyt-04 cùng với các mẫu có mã số GenBank MH219888, MW762935, MH219836, GU111666, MK299413,

MG865550, KJ494918, KJ494905, KJ494920, MW892400 và MH290426 tạo thành cụm loài *P. nicotianae* tách biệt so với các cụm loài khác

thuộc chi *Phytophthora* với giá trị thống kê bootstrap của cụm bằng 100% (Hình 7).



Hình 7. Cây phát sinh dựa trên trình tự vùng ITS của 2 mẫu Phyt-03 và Phyt-04 với đại diện của một số loài khác nhau thuộc chi *Phytophthora* từ GenBank

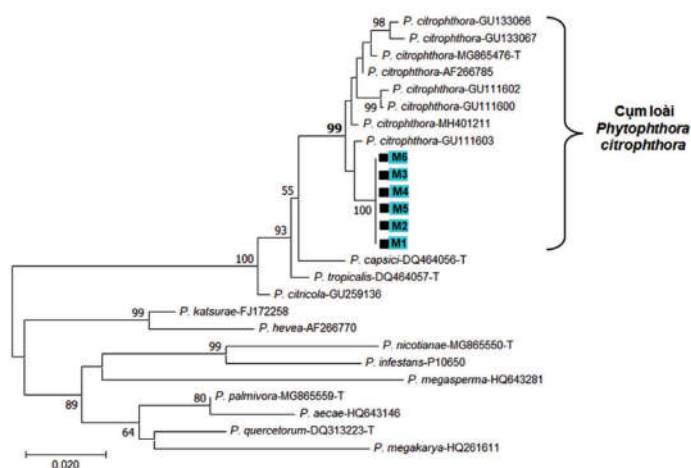
Sản phẩm PCR của 6 mẫu M1, M2, M3, M4, M5 và M6 đều có kích thước bằng 811 bp và có mức đồng nhất 100% với nhau, và có mức tương đồng 99,6-100% với trình tự vùng ITS của loài *P. citrophthora* có mã số GenBank GU111603, GU111602, GU111601, GU111600 và GU133066 (Bảng 2). Cây phả hệ được xây dựng dựa trên vùng

ITS của 6 mẫu M1, M2, M3, M4, M5 và M6 với 20 trình tự vùng ITS của 13 loài khác nhau thuộc chi *Phytophthora*. Các mẫu M1, M2, M3, M4, M5 và M6 nằm cùng cụm loài *P. citrophthora* với các mẫu có mã số GU133066, GU133067, MG865476, AF266785, GU111602, GU111600, MH401211, và GU111603 (Hình 8).

Bảng 2. Kết quả so sánh trình tự vùng ITS của 10 mẫu nấm *Phytophthora* với GenBank

STT	Mẫu so sánh	Phần trăm đoạn so sánh (%)	Mức đồng nhất trình tự (%)	Loài tương đồng trên GenBank	Mã số GenBank
1	Phyt-01 và Phyt-02	100	99,9	<i>P. palmivora</i>	MT052675
2		100	99,9	<i>P. palmivora</i>	MK500842
3		100	99,9	<i>P. palmivora</i>	MH401199
4		100	99,9	<i>P. palmivora</i>	MF370566
5		100	99,9	<i>P. palmivora</i>	MG434772
6	Phyt-03 và Phyt-04	99	99,9	<i>P. nicotianae</i>	KR827692
7		99	99,9	<i>P. nicotianae</i>	KJ865230
8		99	99,9	<i>P. nicotianae</i>	JF792541
9		99	99,9	<i>P. nicotianae</i>	JF792540
10		99	99,9	<i>P. nicotianae</i>	GU111681
11	M1, M2, M3, M4, M5 và M6	100	100,0	<i>P. citrophthora</i>	GU111603
12		100	100,0	<i>P. citrophthora</i>	GU111602
13		100	100,0	<i>P. citrophthora</i>	GU111601
14		100	100,0	<i>P. citrophthora</i>	GU111600
15		100	99,6	<i>P. citrophthora</i>	GU133066

Ghi chú: Chỉ trình bày 5 trình tự gần nhất cho mỗi loài so sánh.



Hình 8. Cây phát sinh dựa trên trình tự vùng ITS của 6 mẫu M1, M2 M3, M4, M5 và M6 với đại diện một số loài thuộc *Phytophthora* trên GeneBank

Như vậy, căn cứ vào kết quả phân tích đặc điểm hình thái, trình tự vùng ITS khẳng định các mẫu nấm phân lập từ các mẫu đất, mô cây và mô rễ của cây ăn quả có múi bị bệnh thối rễ, chảy gôm ở Cao Bằng là 3 loài *P. citrophthora*, *P. palmivora* và *P. nicotianae*.

3.2.3. Kết quả lây bệnh nhân tạo

Lây nhiễm nhân tạo được tiến hành trên quả cam Trưng Vương với cả 10 mẫu nấm thuộc 3 loài nấm đã được xác định. Cả 3 loài nấm đều

lây bệnh cho quả cam, triệu chứng xuất hiện sau 5 - 7 ngày lây nhiễm với tỷ lệ bệnh do nấm *P. palmivora*, *P. citrophthora* tạo ra là 70 - 90% và do nấm *P. nicotianae* tạo ra là 60% (Bảng 3). Vùng quả bị nhiễm bệnh có màu nâu, sau đó thâm đen, vỏ quả xung quanh vị trí nhiễm bệnh hơi cứng, vết bệnh bị thối sau 10 - 15 ngày lây nhiễm. Toàn bộ số quả bị bệnh do lây nhiễm nhân tạo đều được tái phân lập và đã thu được loài nấm đúng với loài nấm sử dụng trước khi lây nhiễm.

Bảng 3. Kết quả lây bệnh nhân tạo trên quả cam Trưng Vương với các mẫu nấm

TT	Mẫu nấm - Cây ký chủ	Địa điểm thu thập	Số quả lây bệnh	Số quả nhiễm bệnh	Thời gian ủ bệnh	Triệu chứng	Tỉ lệ tái phân lập (%)
1	<i>P. palmivora</i> - quýt Trà Lĩnh (Phyt-01)	Trà Lĩnh	10	8	5 - 7	Vết bệnh màu nâu nhạt, sau thâm đen, vỏ hơi cứng	80
2	<i>P. palmivora</i> - quýt Trà Lĩnh (Phyt-02)	Trà Lĩnh	10	7	5 - 6	Vết bệnh màu nâu, đen	70
3	<i>P. nicotianae</i> - quýt Trà Lĩnh (Phyt-03)	Trà Lĩnh	10	6	7 - 8	Vết bệnh màu nâu nhạt	60
4	<i>P. nicotianae</i> - cam Trưng Vương (Phyt-04)	Hòa An	10	6	7 - 8	Vết bệnh màu nâu đen	60
5	<i>P. citrophthora</i> - quýt Trà Lĩnh (M)	Trà Lĩnh	10	8	5 - 7	Vết bệnh màu nâu, sau bị thối	80
6	<i>P. citrophthora</i> - quýt Trà Lĩnh (M2)	Trà Lĩnh	10	7	6 - 7	Vết bệnh màu nâu	70
7	<i>P. citrophthora</i> - cam Trưng Vương (M3)	Hòa An	10	9	5 - 7	Vết bệnh màu nâu đen	90
8	<i>P. citrophthora</i> - cam Trưng Vương (M4)	Hòa An	10	8	5 - 6	Vết bệnh thâm nâu	80
9	<i>P. citrophthora</i> - bưởi Phục Hòa (M5)	Phục Hòa	10	7	5 - 6	Vết bệnh màu nâu nhạt	70
10	<i>P. citrophthora</i> - bưởi Phục Hòa (M6)	Phục Hòa	10	8	5 - 6	Vết bệnh màu nâu đen	80
11	Đối chứng		10	0	-	Vỏ quả bình thường	0

Kết quả lây nhiễm nhân tạo trên cây cam non cũng xác định cả 3 loài nấm *P. palmivora*, *P. nicotianae* và *P. citrophthora* đều có khả năng lây bệnh với tỷ lệ cây bị bệnh đạt 80 - 100% sau 27 - 30 ngày lây nhiễm (Bảng 4).

Bảng 4. Kết quả lây bệnh nhân tạo trên cây cam Trưng Vương với các mẫu nấm

TT	Mẫu nấm & cây ký chủ	Địa điểm thu thập	Số cây lây bệnh	Số cây nhiễm bệnh	Thời gian ủ bệnh	Triệu chứng	Tỷ lệ tái phân lập (%)
1	<i>P. palmivora</i> - quýt Trà Lĩnh (Phyt-01)	Trà Lĩnh	5	4	27 - 29	Vết bệnh màu nâu	80
2	<i>P. palmivora</i> - quýt Trà Lĩnh (Phyt-02)	Trà Lĩnh	5	5	28 - 30	Vết bệnh màu nâu,	100
3	<i>P. nicotianae</i> - quýt Trà Lĩnh (Phyt-03)	Trà Lĩnh	5	5	27 - 29	Vết bệnh màu nâu	100
4	<i>P. nicotianae</i> - cam Trưng Vương (Phyt-04)	Hòa An	5	4	27 - 29	Vết bệnh màu nâu	80
5	<i>P. citrophthora</i> - quýt Trà Lĩnh (M)	Trà Lĩnh	5	5	28 - 30	Vết bệnh màu nâu	100
6	<i>P. citrophthora</i> - quýt Trà Lĩnh (M2)	Trà Lĩnh	5	4	27 - 30	Vết bệnh màu nâu	80
7	<i>P. citrophthora</i> - cam Trưng Vương (M3)	Hòa An	5	5	28 - 30	Vết bệnh màu nâu, bị thối	100
8	<i>P. citrophthora</i> - cam Trưng Vương (M4)	Hòa An	5	5	27 - 29	Vết bệnh màu nâu, bị thối	100
9	<i>P. citrophthora</i> - bưởi Phúc Hòa (M5)	Phúc Hòa	5	5	28 - 30	Vết bệnh màu nâu	100
10	<i>P. citrophthora</i> - bưởi Phúc Hòa (M6)	Phúc Hòa	5	5	28 - 30	Vết bệnh màu nâu	100
11	Đối chứng		5	0	-	Thân cây bình thường	0

Tại các điểm lây nhiễm, mô cây biến màu nâu, có hình dạng không rõ ràng, đoạn thân phía trên hay phần gốc sát mặt đất nơi nấm xâm nhập bị thối,

có hiện tượng chảy gôm. Bên trong lớp vỏ bị bệnh, phần gỗ có những mạch màu đen, một số cây rễ bắt đầu bị thối, thâm đen (Hình 9).



Hình 9. Lây bệnh nhân tạo bằng phương pháp áp thạch các mẫu nấm lên cây cam Trưng Vương

Kết quả phân lập, định danh nấm, lây bệnh nhân tạo trên quả, thân và tái phân lập nấm cho thấy 3 loài nấm *P. palmivora*, *P. nicotianae* và *P. citrophthora* là tác nhân gây bệnh thối rữa, chảy gôm trên cây ăn quả có múi tại Cao Bằng. Kết quả nghiên cứu trước đây của Dang Vu Thi Thanh và cộng tác viên (2004); Đặng Vũ Thị Thanh và cộng tác viên (2010) đã xác định hai loài nấm *P. nicotianae* và *P. citrophthora* là tác nhân gây bệnh thối rữa, chảy gôm cây ăn quả có múi ở Việt Nam. Như vậy, *P. palmivora* trong nghiên cứu này được xác định là tác nhân gây bệnh thối rữa, chảy gôm trên cây ăn quả có múi tại Cao Bằng.

3.3. Xác định đặc điểm sinh học của các loài nấm gây bệnh thối rữa, chảy gôm trên cây ăn quả có múi tại Cao Bằng

3.3.1. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến sinh trưởng và khả năng hình thành bọc bào tử của 3 loài nấm *Phytophthora*

Ba mẫu *P. palmivora* Phyt-01, *P. nicotianae* Phyt-03 và *P. citrophthora* M2 đại diện cho 3 loài nấm *P. palmivora*, *P. nicotianae* và *P. citrophthora* đã được lựa chọn, nuôi cấy riêng biệt trong môi trường PDA, pH 6,5 ở các điều kiện nhiệt độ từ 5 - 40°C để xác định khả năng sinh trưởng và phát triển, đồng thời nuôi cấy trong các điều kiện nhiệt độ từ 10 - 35°C để xác định khả năng hình thành bọc bào tử. Loài *P. palmivora* sinh trưởng, phát triển trong khoảng nhiệt độ 20 - 30°C, và nhiệt độ thích hợp nhất cho sản sinh bọc bào tử là 25°C. Loài *P. nicotianae* sinh trưởng, phát triển trong khoảng nhiệt độ 15 - 35°C, và nhiệt độ thích hợp nhất cho sản sinh bọc bào tử là 30°C. Loài *P. citrophthora* sinh trưởng, phát triển trong khoảng nhiệt độ 15 - 25°C, nhiệt độ thích hợp nhất cho sản sinh bọc bào tử là 20°C. Kết quả nghiên cứu đã chỉ ra sự khác biệt về điều kiện nhiệt độ thích hợp cho sự sinh trưởng, phát triển của các loài nấm gây bệnh thối rữa, chảy gôm làm cơ sở xác định thời điểm gây hại nặng của từng loài nấm trên đồng ruộng.

3.3.2. Ảnh hưởng của pH đến sinh trưởng của nấm *Phytophthora*

Chọn đại diện 3 loài nấm *P. palmivora* Phyt-01; *P. nicotianae* Phyt-03 và *P. citrophthora* M2, nuôi cấy riêng biệt trên môi trường PDA ở điều kiện

nhiệt độ 25°C trong các điều kiện pH biến động từ 4,5 - 8, kết quả xác định khả năng sinh trưởng và phát triển của 3 loài nấm *Phytophthora* cho thấy: Cả 3 loài *Phytophthora* đều có thể sinh trưởng, phát triển trong khoảng pH 4,5 - 8,0 tuy nhiên pH 6,0 - 7,0 là thích hợp nhất cho sự sinh trưởng và phát triển của cả 3 loài.

3.3.3. Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến sinh trưởng của nấm *Phytophthora*

Nuôi cấy riêng biệt 3 loài nấm *P. palmivora* Phyt-01; *P. nicotianae* Phyt-03 và *P. citrophthora* M2 ở điều kiện nhiệt độ 25°C trên 6 loại môi trường khác nhau có pH 6,5. Kết quả cho thấy, cả 3 loài *P. palmivora*, *P. nicotianae* và *P. citrophthora* đều có thể phát triển trên 6 loại môi trường nuôi cấy, phát triển kém nhất trên môi trường PSA, phát triển tốt nhất trên môi trường V8A. Có 3 loại môi trường PDA, CRA và V8A là thích hợp cho cả 3 loài nấm phát triển.

IV. KẾT LUẬN

- Từ 375 mẫu đất và các mẫu cam, quýt, bưởi bị bệnh thối rữa chảy gôm thu thập tại Cao Bằng đã phân lập được 142 mẫu nấm *Phytophthora* spp., trong đó chọn đại diện 10 mẫu nấm gây bệnh trên 3 loại cây ký chủ là cam, quýt và bưởi. Dựa trên đặc điểm hình thái, kết quả giải trình tự vùng ITS và kết quả lây nhiễm nhân tạo đã xác định được 3 loài nấm *P. palmivora*, *P. nicotianae* và *P. citrophthora* là tác nhân gây bệnh thối rữa, chảy gôm trên cây ăn quả có múi tại Cao Bằng.

- Nấm *P. palmivora* sinh trưởng, phát triển và hình thành bọc bào tử thích hợp nhất ở nhiệt độ 25°C, nấm *P. nicotianae* là 30°C nấm *P. citrophthora* phát triển tốt nhất ở nhiệt độ 20°C. Môi trường V8A, CRA và PDA, khoảng pH từ 6 - 7 thích hợp cho sự phát triển của cả 3 loài.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Nguyễn Thị Bích Ngọc, Nguyễn Nam Dương, Phạm Thị Dung, Lê Mai Nhất, Đỗ Duy Hưng, Ngô Thị Thanh Hương, 2016. Quản lý bệnh thối gốc, thối rễ trên quýt Trà Linh tại Cao Bằng. *Tạp chí Bảo vệ thực vật*, số 4 (297): 3-8.

Đặng Vũ Thị Thanh và Hà Minh Trung, 1997. Phương pháp điều tra bệnh hại cây trồng nông nghiệp.

- Trong: *Phương pháp nghiên cứu bảo vệ thực vật, Tập I: Phương pháp điều tra cơ bản Dịch hại nông nghiệp và thiên địch của chúng*. NXB Nông nghiệp Hà Nội: 62-78.
- Đặng Vũ Thị Thanh, Mai Văn Quân, Vũ Duy Hiện, Lê Thị Thanh Thủy, Trịnh Xuân Hoạt, Đặng Đức Quyết, Nguyễn Thị Mai Chi, Ngô Gia Bôn**, 2010. Báo cáo điều tra cơ bản bệnh hại cây trồng từ năm 2006 - 2010, Viện Bảo vệ thực vật.
- Dang Vu Thi Thanh, Ngo Vinh Vien and André Drenth**, 2004. Phytophthora diseases in Vietnam. In (eds. Drenth A. and Guest D.I.) *Diversity and Management of Phytophthora in Southeast Asia*. ACIAR monograph, 114: 83-89.
- Drenth A., Sendall B.**, 2001. Practical guide to detection and identification of Phytophthora, Version 1.0, *CRC for Tropical Plant Protection, Brisbane Australia*: 1- 42.
- Erwin, D.C and Donald C.**, 1983. *Phytophthora: its biology, taxonomy, ecology, and pathology*. American Phytopathological Society Press, St. Paul, Minnesota: 392 pages. ISBN 0-89054-050-0.
- Erwin, D.C and Ribeiro O.K.**, 1996. *Phytophthora Diseases Worldwide*. The American Phytopathological Society, Minnesota, USA: 562 pages.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K.**, 2018. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular biology and evolution*, 35 (6): 1547 pages.
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., & Higgins, D.G.**, 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23 (21): 2947-2948.
- Whittle A.M.**, 1992. Diseases and pests of citrus in Vietnam. *FAO Plant Protection Bulletin*, 40 (3):75-81.

Identification of *Phytophthora* spp. causing root rot, gum disease of citrus in Cao Bang province

Nguyen Nam Duong, Ha Minh Thanh, Nguyen Thi Bich Ngoc, Ngo Thi Thanh Huong, Vu Duy Minh, Ha Viet Cuong, Pham Bich Hien

Abstract

In recent years, *Citrus* spp. has been the most popular and economically valuable crop in Cao Bang province, however, root rot and gum disease have caused serious damage and reduced yield in all regions of the province. The purpose of this study was to identify and characterize the causal pathogen isolated from the soil, root and plant tissue samples of orange, mandarin and pomelo. Based on the morphological characteristics, artificial infection and the sequence analysis in the ITS region, 3 fungal species including *Phytophthora palmivora*, *P. nicotianae* and *P. citrophthora* were identified as the pathogens responsible for the root rot, gum disease on citrus in Cao Bang. The media V8, CRA and PDA at pH 6.0 - 7.0 were suitable for growth and development of all 3 species *P. palmivora*, *P. nicotianae* and *P. citrophthora*. The optimal temperature for the growth and development of *P. palmivora* was 25°C, for *P. nicotianae* was 30°C, and for *P. citrophthora* was 20°C. The optimum pH for growth ranged from 5.0 - 6.0 with maximum growth at 5.5. The findings of the present study are the important scientific basis for further study on effective and sustainable management of the root rot, gum disease on citrus in Cao Bang province.

Keywords: Citrus, *Phytophthora citrophthora*, *Phytophthora palmivora*, root rot, gum disease

Ngày nhận bài: 02/11/2021
Ngày phản biện: 09/11/2021

Người phản biện: PGS.TS. Ngô Bích Hào
Ngày duyệt đăng: 30/11/2021

KHẢ NĂNG SỬ DỤNG TỔ HỢP VI SINH VẬT ĐỐI KHÁNG CB-1 PHÒNG TRỪ BỆNH THỐI RỄ CHẢY GÔM DO NẤM *Phytophthora* TRÊN CÂY ĂN QUẢ CÓ MÚI TẠI CAO BẰNG

Nguyễn Nam Dương¹, Hà Minh Thanh¹, Nguyễn Thị Bích Ngọc¹,
Ngô Thị Thanh Hương¹, Vũ Duy Minh¹, Hà Việt Cường², Phạm Bích Hiền^{3*}

TÓM TẮT

Tổ hợp vi sinh vật đối kháng CB-1 được sử dụng để đánh giá khả năng kiểm soát nấm *Phytophthora*, hạn chế bệnh thối rễ, chảy gôm gây hại trên cây ăn quả có múi ở Cao Bằng. Sau 6 tháng xử lý với CB-1, hiệu lực kiểm soát nấm *Phytophthora* (đạt 73,1% trên cây cam, 57,9% trên cây quýt) tương đương hiệu lực của một số chế phẩm sinh học đang được khuyến cáo sử dụng phòng trừ bệnh cây (Phyto-M, Actinovate 1SP, SH-BV1 và Trico ĐHCT). Sau 9 tháng xử lý vườn quýt bị nhiễm bệnh ở mức nhẹ, hiệu quả phòng trừ nấm bệnh của CB-1 đạt 71,8%. CB-1 ủ với phân hữu cơ rôi bón trực tiếp hay hòa nước tưới cho cây 3 lần vào các thời gian sau khi thu hoạch, trước và sau mùa mưa có hiệu quả phòng trừ bệnh đạt 79,3%. Sử dụng CB-1 kết hợp với cắt tỉa, vệ sinh vườn và bón phân hợp lý cho hiệu quả hạn chế nấm cao nhất.

Từ khóa: Cây ăn quả có múi, nấm *Phytophthora*, bệnh thối rễ chảy gôm, tổ hợp vi sinh vật đối kháng

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh thối rễ, chảy gôm do nấm *Phytophthora* là một trong các bệnh gây hại nghiêm trọng nhất trên các loại cây ăn quả. Nấm gây hại trên các bộ phận và trong suốt thời gian sinh trưởng của cây đặc biệt là trong điều kiện nóng ẩm, khi bị bệnh cây sinh trưởng kém, bệnh nặng dẫn đến cây rụng lá, héo rũ và chết (Đặng Vũ Thị Thanh và *ctv.*, 2004; Graham and Feichtenberger, 2015).

Bệnh thối rễ, chảy gôm có thể làm giảm năng suất cây ăn quả có múi từ 15 - 20% đồng thời làm giảm chất lượng quả. Trong nhiều năm, việc phòng chống bệnh do nấm *Phytophthora* chủ yếu là sử dụng gốc ghép chống chịu bệnh cùng với các loại thuốc hóa học vì mang lại hiệu quả nhanh chóng trong trường hợp bệnh phát triển mạnh (Phạm Thị Ngọc Dung và *ctv.*, 2015; Nguyễn Thị Bích Ngọc và *ctv.*, 2016). Do tác nhân gây bệnh tồn tại dưới dạng bào tử trong đất và tàn dư trong quá trình canh tác nên sử dụng thuốc hóa học không đem lại hiệu quả lâu dài mà còn dẫn đến các tác động xấu đối với môi trường. Phòng trừ bệnh tổng hợp là biện pháp quản lý hiệu quả nhất đối với bệnh do nấm *Phytophthora* gây ra trên cây trồng do có sự kết hợp chặt chẽ giữa các yếu tố cơ bản để quản lý bệnh đó là: kỹ thuật canh tác, tạo giống kháng, phòng trừ sinh học, phòng trừ hóa học trong đó xu

thế phòng trừ sinh học được quan tâm nghiên cứu (David and André Drenth, 2004; Hà Minh Thanh và *ctv.*, 2013).

Kế thừa các kết quả của Viện Bảo vệ thực vật trong nghiên cứu phân lập, tuyển chọn, định danh và xây dựng quy trình tạo tổ hợp vi sinh vật CB-1 đối kháng với nấm *Phytophthora*, nhóm nghiên cứu thực hiện đánh giá khả năng sử dụng tổ hợp vi sinh vật đối kháng CB-1 trong phòng chống bệnh thối rễ, chảy gôm trên cây ăn quả có múi tại Cao Bằng nhằm đưa ra các biện pháp quản lý bệnh an toàn và hiệu quả các loại cây ăn quả có múi đặc sản của địa phương cũng như phục vụ sản xuất bền vững cho các vùng trồng cây ăn quả có múi ở Việt Nam.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu, đối tượng nghiên cứu

Một số vườn cam quýt tại tỉnh Cao Bằng (vườn quýt 10 tuổi tại huyện Trà Lĩnh; vườn cam 7 - 8 tuổi tại huyện Trưng Vương, và vườn cam 10 tuổi tại huyện Hòa An).

Ba loài nấm *Phytophthora palmivora* Phyt-01; *Phytophthora nicotianae* Phyt-03 và *Phytophthora citrophthora* M2 gây bệnh thối rễ chảy gôm trên cây ăn quả có múi tại Cao Bằng do Viện Bảo vệ thực vật phân lập và định danh.

¹ Viện Bảo vệ thực vật;

² Học Viện Nông nghiệp Việt Nam;

³ Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam;

* Tác giả liên hệ: E-mail: bichhienvaas@gmail.com