

PHÂN LẬP VÀ ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG GÂY BỆNH CHÁY LÁ CỦA NẤM *Phytophthora colocasiae* TRÊN KHOAI MÔN SỌ (*Colocasia esculenta* L. Schott) TẠI MỘT SỐ TỈNH MIỀN BẮC VIỆT NAM

Lê Thị Thủy, Nguyễn Thị Na, Lê Thị Tươi và Nguyễn Xuân Việt
Khoa Sinh học, Trường Đại học Sư phạm Hà Nội

Tóm tắt. Nghiên cứu thực hiện nhằm phân lập và xác định được các chủng nấm *Phytophthora colocasiae* gây bệnh cháy lá cho khoai môn sọ ở một số tỉnh miền Bắc Việt Nam. Từ mẫu lá bệnh thu thập tại 6 địa điểm thuộc tỉnh Bắc Giang, Bắc Ninh, Hà Nội và Hòa Bình, nghiên cứu đã phân lập được 6 chủng nấm khác nhau. Đánh giá và so sánh các đặc điểm của khuẩn lạc, trình tự ITS của các chủng nấm sau nuôi thuần đã xác định được 2 trong số 6 chủng phân lập là thuộc nấm *Phytophthora colocasiae*, đó là chủng BN1 từ mẫu lá bệnh khoai môn sọ thu tại Bắc Ninh và chủng SB từ mẫu lá bệnh thu tại Hà Nội. Cả hai chủng nấm đều sinh trưởng tốt trên môi trường CGA và PGA và có độc tính tương đương qua đánh giá thử nghiệm lây nhiễm *in vitro* trên 3 nguồn gen khoai môn sọ, nhưng có sai khác nhau về hình dạng của túi bào tử. Trong khi túi bào tử chủng BN1 có dạng hình trứng, túi bào tử của chủng SB có dạng hình cầu bán nhú.

Từ khóa: bệnh cháy lá, khoai môn sọ (*Colocasia esculenta* L. Schott), phân lập nấm, *Phytophthora colocasiae*.

1. Mở đầu

Khoai môn sọ (*Colocasia esculenta* L. Schott) là loại cây trồng lấy củ chính trong họ Ráy (Araceae) phân bố rộng khắp vùng nhiệt đới, được dùng làm nguồn thực phẩm cho hàng triệu người, đặc biệt là ở các nước đang phát triển như khu vực Đông Nam Á và Châu Phi. Sản lượng khoai môn sọ trên thế giới đạt trên 10 triệu tấn với diện tích trồng trên 1,6 triệu ha, xếp thứ 4 về diện tích trồng sau cà chua, sắn và khoai lang [1]. Ở Việt Nam, khoai môn sọ được trồng ở cả khu vực đồng bằng và miền núi, với diện tích trồng hàng năm ước tính khoảng 15.000 ha. Củ khoai môn sọ được dùng làm thực phẩm, nguyên liệu cho các ngành công nghiệp chế biến, sản xuất bánh kẹo, thức ăn chăn nuôi hay phục vụ mục đích xuất khẩu [2].

Bệnh cháy lá khoai môn sọ do nấm *Phytophthora colocasiae* gây ra là loại bệnh chính đe dọa tính bền vững của hoạt động sản xuất khoai môn sọ trên thế giới [3]. Bệnh được ghi nhận lần đầu tiên ở Ấn Độ vào năm 1913. Bệnh xuất hiện có thể làm giảm năng suất

Ngày nhận bài: 29/12/2022. Ngày sửa bài: 20/3/2023. Ngày nhận đăng: 27/3/2023.

Tác giả liên hệ: Lê Thị Thủy. Địa chỉ e-mail: thuy_lt@hnue.edu.vn

củ từ 25 - 50% tùy thuộc vào đặc điểm của giống và điều kiện khí hậu [4]. Trên thế giới, đã có một số nghiên cứu phân lập và đánh giá độc tính của nấm *P. colocasiae*, chẳng hạn như trong nghiên cứu của Padmaja (2017) và cộng sự, bốn chủng nấm *P. colocasiae* đã được phân lập dựa trên việc đánh giá hình dạng, kích thước, đặc điểm của khuẩn lạc và bào tử nấm khi tiến hành nuôi cấy mẫu lá bệnh và làm thuần các chủng nấm trên môi trường thạch cà rốt (CA) trong điều kiện nhiệt độ 18 °C [5]. Trong khi đó, Cotieno (2020) sử dụng môi trường thạch khoai tây để phân lập nấm từ mẫu lá bệnh trong điều kiện nhiệt độ 22 - 26 °C và độc tính của 4 chủng nấm phân lập được đánh giá dựa trên việc lây nhiễm nhân tạo trong điều kiện nhà lưới dựa trên quy tắc Koch [6]. Trong một nghiên cứu khác, 7 chủng nấm đã được phân lập từ mẫu mô lá khoai môn sọ ở miền trung Đài Loan, chúng được xác định là nấm *P. colocasiae* dựa trên đặc điểm hình thái, mức độ tương đồng trình tự ITS và khả năng gây bệnh [7].

Theo Shakywar và Pathak (2012), bệnh cháy lá phát triển mạnh ở những nơi có nhiệt độ dao động từ 22 - 23 °C và độ ẩm tương đối cao từ 85 - 100% với lượng mưa lớn và xảy ra thường xuyên [8]. Khí hậu nhiệt đới nóng ẩm của nước ta rất thuận lợi cho sự phát triển của nấm gây bệnh này. Thực tế sản xuất khoai môn sọ cũng đã ghi nhận bệnh cháy lá do nấm *P. colocasiae* đã là nguyên nhân chính gây thất thu lớn cho nhiều vùng trồng khoai môn sọ ở Việt Nam. Do đó, việc phân lập và xác định được đặc điểm sinh học cũng như độc tính của các chủng nấm gây hại cho cây khoai môn sọ ở nước ta là rất cần thiết. Bài báo này trình bày kết quả nghiên cứu phân lập và xác định chủng nấm *P. colocasiae* cũng như độc tính của các chủng đã gây bệnh cháy lá khoai môn sọ ở một số tỉnh miền Bắc. Các chủng nấm *P. colocasiae* đã phân lập sẽ được sử dụng như một nguồn lây nhiễm trong nghiên cứu tiếp theo về đánh giá tính kháng phục vụ xây dựng cơ sở dữ liệu nguồn gen, phát hiện nguồn gen kháng và kháng cao cho các chương trình chọn tạo giống khoai môn sọ kháng bệnh cháy lá.

2. Nội dung nghiên cứu

2.1. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1.1. Vật liệu nghiên cứu

- Mẫu lá bệnh: lá cây khoai môn sọ có biểu hiện các triệu chứng điển hình của bệnh cháy lá do nấm gây ra được thu tại các vùng trồng khoai môn sọ tại Lục Nam (Bắc Giang), Tiên Du và Yên Phong (Bắc Ninh), Đà Bắc (Hòa Bình) và Ba Vì (Hà Nội).

- Củ giống không biểu hiện bệnh của 3 nguồn gen: khoai sọ trắng (kí hiệu 19-1006, thu tại Yên Sơn, Lục Nam, Bắc Giang), nguồn gen có số đăng kí 11528 (khoai sọ, Hà Nội) và 11960 (khoai thó cứng), do Trung tâm Tài nguyên Thực vật, Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam cung cấp.

- Môi trường nuôi cấy: 6 loại môi trường nuôi cấy đặc: WA, CA, CGA, PGA, PSM và TGA đã được sử dụng để phân lập, nuôi thuần và đánh giá đặc điểm sinh học của chủng nấm. Thành phần các chất trong mỗi loại môi trường được trình bày trong Bảng 1 [5].

- Cặp mồi có trình tự 5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3' (ITS5F) và 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' (ITS4R) được dùng để nhân các vùng gen ITS [9].

Bảng 1. Thành phần các loại môi trường nuôi cấy

Môi trường	Thành phần chuẩn bị cho 1 lít môi trường				
	Cà rốt (g)	Khoai tây (g)	Glucose (g)	Agar (g)	Khoai môn sọ
WA (Thạch nước cất)	0	0	0	20	0
CA (Thạch cà rốt)	200	0	0	20	0
CGA (Thạch cà rốt khoai tây)	150	50	20	20	0
PGA (Thạch khoai tây)	0	200	20	20	0
PSM (Thạch khoai tây cà rốt)	80	20	0	8	0
TGA (Thạch khoai môn)	0	0	20	15	200

2.1.2. Phương pháp nghiên cứu

* Phương pháp thu thập mẫu lá bệnh

Lá bị bệnh (có các vết đốm màu vàng cam hoặc nâu sẫm) được thu tại vùng trồng khoai môn sọ thuộc bốn tỉnh gồm: Bắc Ninh, Bắc Giang, Hà Nội và Hòa Bình. Tại mỗi vùng, lá bệnh được thu từ 2 - 3 địa điểm khác nhau; mỗi địa điểm thu 3 - 4 mẫu. Lá bệnh sau đó được cho vào các túi zip vô trùng, ghi rõ địa điểm thu, kí hiệu mẫu và đưa về phòng thí nghiệm phục vụ cho phân lập nấm bệnh.

* Phương pháp phân lập nấm bệnh

Phân lập nấm *Phytophthora colocasiae* được tiến hành theo phương pháp mô tả bởi Pjajma (2017) có cải tiến [5]. Lá bệnh được rửa sạch dưới vòi nước chảy, sau đó thấm khô bằng giấy thấm khử trùng, lau lại bề mặt lá bằng cồn 70°. Các mẫu lá có diện tích khoảng 1,5-2,0 cm² (chứa cả phần mô bệnh và mô khỏe quanh vết bệnh) được khử trùng bề mặt bằng cách lắc trong bình tam giác chứa 50 mL javen 1% trong 3 phút, cuối cùng rửa lại bằng nước cất khử trùng 3 lần (mỗi lần lắc trong 2 phút) để loại bỏ javen thừa bám trên bề mặt. Sau khi thấm khô mảnh mô lá bệnh trên giấy thấm khử trùng, đặt mẫu lá (25 mẫu mô lá bệnh từ mỗi địa điểm thu thập) vào môi trường CA trong các đĩa Petri.

Sau 3 - 4 ngày nuôi cấy trên môi trường trong điều kiện nhiệt độ 23°C ± 2°C các sợi nấm khí sinh mọc lên từ mảnh mô lá tiến hành cấy chuyển sang môi trường WA nghiêng.

Sau 7 - 10 ngày, hệ sợi nấm mọc lan trên khắp môi trường WA, tiến hành chọn một đỉnh sinh trưởng của sợi nấm và cấy chuyển sang môi trường PGA để nhân nuôi hệ sợi tạo chủng nấm thuần phục vụ cho các bước nghiên cứu tiếp theo.

* Phương pháp xác định một số đặc điểm sinh học của nấm phân lập

Mô tả các đặc điểm của khuẩn lạc tiến hành theo hướng dẫn của Waterhouse (1963) [10]. Hình dạng của bào tử nấm được xác định qua quan sát hệ sợi nấm dưới kính hiển vi quang học Carl Zeiss (Axio Scope.A1) ở độ phóng đại 40X và sử dụng trục vi thị kính để đo kích thước của bào tử.

Xác định khối lượng khô của hệ sợi: Dùng que cấy lấy một mảnh thạch có đường kính 5 mm chứa hệ sợi nấm đã được nuôi trên môi trường CA sau 7 ngày và đưa vào bình

tam giác chứa 150 mL môi trường nước cà rốt (môi trường CA không có agar), sợi nấm được nuôi ở nhiệt độ 20 - 22 °C trong 8 ngày. Hệ sợi được thu và sấy khô ở nhiệt độ 50 - 60 °C trong 12 - 14 giờ đến khối lượng không đổi sau đó cân khối lượng bằng cân điện tử [5]. Mỗi chủng nấm nuôi trong 5 bình tam giác, thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

Xác định tốc độ sinh trưởng của hệ sợi nấm trên các môi trường nuôi cấy khác nhau: cắt khoảng 1 cm² môi trường WA có hệ sợi nấm mọc lan đặt vào giữa đĩa Petri có chứa 25 mL môi trường CA/CGA/PGA/PSM/TGA/WA [5]. Nuôi nấm trong tối ở nhiệt độ 20 - 25 °C (để hạn chế sự đọng nước trong đĩa Petri). Tốc độ sinh trưởng và đường kính khuẩn lạc được đo hằng ngày tại cùng một thời điểm, từ ngày thứ 2 đến ngày thứ 8 sau nuôi nấm, bằng thước có độ chính xác đến 0,1 mm. Mỗi chủng nấm được nuôi trên 3 đĩa môi trường mỗi loại và thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

- *Xác định chủng nấm P. colocasiae sử dụng chỉ thị phân tử*

Tách chiết DNA của hệ sợi nấm bằng phương pháp CTAB. Nhân đoạn DNA ribosom vùng ITS1, ITS2 và 5.8S rRNA bằng cặp mồi ITS5F và ITS4R, tiến hành theo Yang và cộng sự có cải tiến [9]. Phản ứng PCR trong hỗn hợp 20 µl dung dịch gồm: 2 µl PCR buffer 10x; 1,6 µl dNTP 2,5mM; 1,4 µl primer 17,5 ng/µl; 0,1 µl green Taq (5U/µl); 5 µl DNA (5ng/µl) được thực hiện trên máy Veriti 96 well Thermal cycler. Điều kiện phản ứng: 95 °C trong 5 phút; 45 chu kỳ (biến tính ở 94 °C trong 1 phút, nhiệt độ gắn mồi đặc hiệu trong 1 phút và kéo dài ở 72 °C trong 1 phút). Quá trình này được kết thúc bằng một chu kỳ để hoàn thành kéo dài ở 72 °C trong 5 phút.

Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng PCR purification kit (GeneAll Biotech, Seoul, Korea) và gửi giải trình tự. Trình tự ITS của nấm sau đó được so sánh với các trình tự được công bố trên ngân hàng gen bằng công cụ BLAST.

- *Đánh giá khả năng gây bệnh của các chủng nấm phân lập bằng phương pháp lá cắt rời có cải tiến [11].*

Củ của 3 nguồn gen khoai môn sọ được trồng vào chậu trong nhà lưới Vườn thực nghiệm Khoa Sinh học, sử dụng giá thể trồng TN.1 của Trung tâm nghiên cứu phân bón và dinh dưỡng cây trồng. Sau khoảng 60 ngày trồng, khi cây có 4 - 5 lá, không biểu hiện triệu chứng bệnh cháy lá được thu và cắt thành các mảnh có kích thước 4 cm². Các mảnh lá sau khi được khử trùng theo quy trình tương tự ở bước phân lập nấm bệnh, thấm khô trên giấy thấm khử trùng và đặt vào giữa đĩa Petri chứa môi trường WA. Tiếp theo, dùng dao cắt đã khử trùng cắt một khoanh môi trường PGA nuôi thuần nấm (1 mm²) và đặt vào cạnh mảnh lá trong đĩa Petri. Các đĩa mẫu cây được nuôi trong phòng nuôi cấy có ánh sáng và ở nhiệt độ 20 - 22 °C. Quan sát và xác định diện tích lá bị bệnh sau 5, 7 và 10 ngày nuôi cấy để đánh giá khả năng gây hại của các chủng nấm cũng như mức độ kháng bệnh của mỗi nguồn gen theo thang điểm của Little và Hills (1978) và Prasad (1982) [12, 13] và hướng dẫn của Trung tâm Tài nguyên thực vật (Bảng 2). Mẫu đối chứng của mỗi giống được bố trí tương tự với mẫu thí nghiệm, thay khoanh nấm bằng khoanh thạch môi trường không nuôi nấm có kích thước tương đương. Thí nghiệm được lặp lại ba lần với mỗi nguồn gen khoai môn sọ và chủng nấm lây nhiễm, mỗi lần nấm đĩa Petri.

Diện tích lá bị bệnh (phần mô lá bị biến màu, khô hoặc hoại tử) được xác định dựa trên phần mềm *Image*, các vết bệnh không có hình thù đặc trưng được chia thành nhiều hình nhỏ để xác định diện tích.

Bảng 2. Cấp gây hại đánh giá mức độ kháng bệnh cháy lá do nấm *P. colocasiae* ở khoai môn sọ

Cấp hại	Mô tả biểu hiện bệnh	Chỉ số nhiễm bệnh (PDI) %	Phản ứng với bệnh (mức độ kháng bệnh)
0	Không nhiễm bệnh	0	Miễn dịch (Immune)
1	Nhiễm ít, dưới 1% diện tích lá nhiễm bệnh	1%	Kháng cao (Highly resistant)
2	Nhiễm nhẹ, nhỏ hơn 5% diện tích lá nhiễm bệnh	1,01-5%	Kháng (Resistant)
3	Nhiễm trung bình, diện tích lá nhiễm bệnh từ 5,01-25%	5,01-25%	Kháng trung bình (Moderately resistant)
4	Nhiễm nặng, diện tích lá nhiễm bệnh từ 26-50%	25,01-50%	Mẫn cảm (Susceptible)
5	Nhiễm nghiêm trọng, diện tích lá nhiễm hơn 50%	> 50%	Mẫn cảm cao (Highly susceptible)

Chỉ số nhiễm bệnh (%) được tính theo công thức sau [13]:

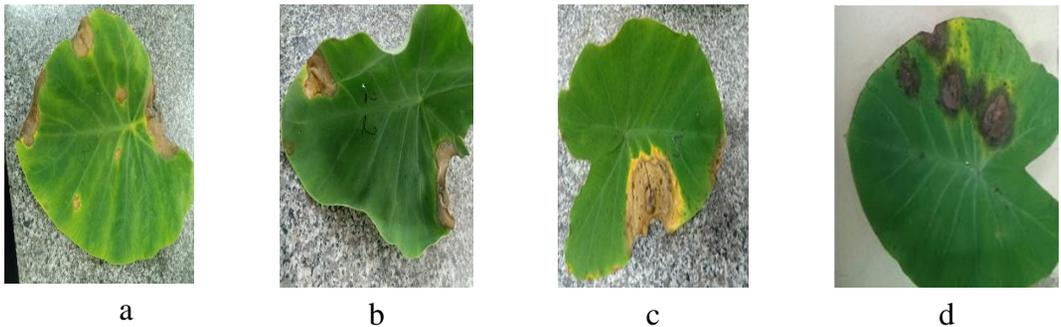
$$PDI \text{ (Percent Disease Index)} = \frac{\text{tổng diện tích mẫu lá nhiễm bệnh}}{\text{tổng diện tích mẫu lá} \times \text{số mẫu quan sát}} \times 100$$

Nghiên cứu được thực hiện từ tháng 4/2019 đến tháng 12/2021 tại các phòng nghiên cứu của Khoa Sinh học, Trường Đại học Sư phạm Hà Nội.

2.2. Kết quả nghiên cứu và thảo luận

2.2.1. Kết quả phân lập nấm gây bệnh

Nghiên cứu đã tiến hành thu thập mẫu lá khoai môn sọ biểu hiện triệu chứng điển hình của bệnh cháy lá tại 6 địa điểm thuộc 4 tỉnh: Bắc Ninh, Bắc Giang, Hà Nội và Hòa Bình (Hình 1). Mẫu lá bệnh sau đó được sử dụng làm vật liệu phân lập nấm *Phytophthora colocasiae*.



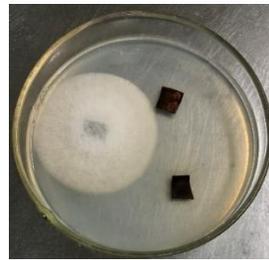
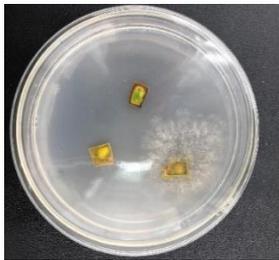
Hình 1. Mẫu lá bệnh biểu hiện triệu chứng bệnh cháy lá do nấm thu tại Bắc Ninh (a), Bắc Giang (b), Hà Nội (c) và Hòa Bình (d)

Sau 3 ngày kể từ khi được nuôi cấy trên môi trường CA, có thể quan sát thấy sự phát triển của hệ sợi nấm xung quanh mô lá bệnh. Ban đầu, sợi nấm thường xuất hiện trên bề mặt vết bệnh, sau lan mạnh trên môi trường và có thể quan sát thấy bằng mắt thường hoặc dưới kính lúp soi nổi (Hình 2). Hệ sợi nấm sẽ lan ra toàn bộ đĩa Petri (đường kính 90 mm) sau 7 - 9 ngày nuôi cấy.

Kết quả phân lập đã thu được 26 khuẩn lạc, dựa vào các đặc điểm về kích thước, màu sắc và hình dạng của khuẩn lạc, mật độ và độ bông xốp của hệ sợi sau 5 ngày nuôi trên môi trường, bước đầu chúng tôi lựa chọn và phân loại chúng thành 6 nhóm khác nhau, tương đương với 6 chủng nấm (Bảng 2), các chủng này sau đó được nuôi thuần, phân tích các đặc điểm sinh học để xác định chủng nấm *P. colocasiae*.

Bảng 3. Địa điểm thu mẫu và kí hiệu mẫu nấm bệnh đã phân lập

Stt	Địa điểm thu mẫu lá bệnh	Kí hiệu chủng nấm phân lập
1	Thụy Hòa (Yên Phong, Bắc Ninh)	BN1
2	Liên Bảo (Tiên Du, Bắc Ninh)	BN2
3	Yên Sơn (Lục Nam, Bắc Giang)	BG1
4	Vườn thực nghiệm Khoa Sinh học, Trường Đại học Sư phạm Hà Nội	HN1
5	Yên Bài (Ba Vì, Hà Nội)	SB
6	Toàn Sơn (Đà Bắc, Hòa Bình)	HB1



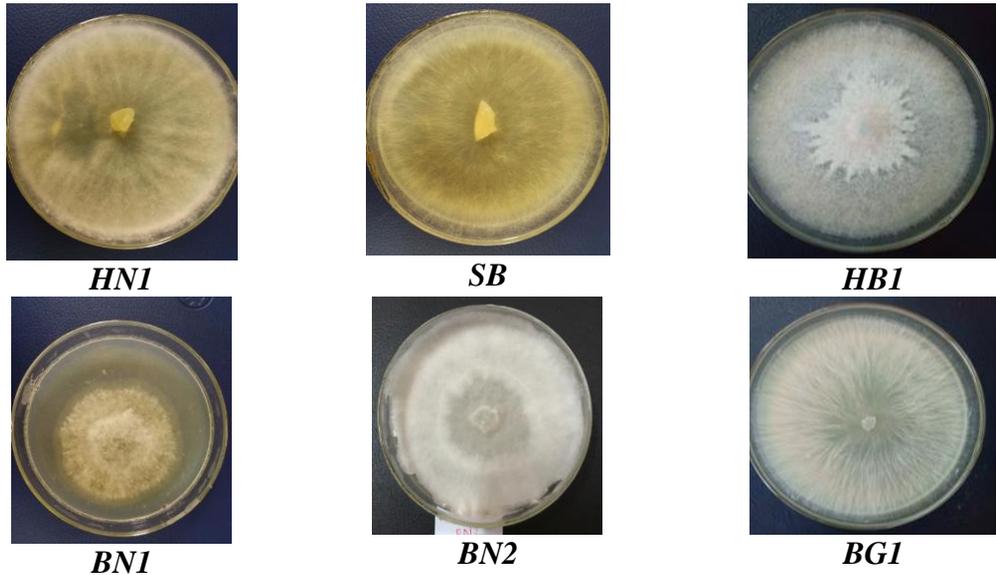
Hình 2. Hệ sợi nấm lan từ mô lá bệnh trên môi trường sau năm ngày nuôi cấy

2.2.2. Phân tích đặc điểm sinh học và định danh các chủng nấm phân lập

Nấm sau khi làm thuần được nuôi cấy trên môi trường PGA để đánh giá một số đặc điểm hình thái khuẩn lạc dựa theo mô tả của Waterhouse (1963) nhằm phân loại các chủng nấm đã phân lập được.

Kết quả nuôi cấy (Hình 3) cho thấy: Về màu sắc, khuẩn lạc của 6 chủng nấm đã phân lập có thể được chia thành 2 nhóm màu sắc khuẩn lạc: chủng HN1, SB và BN1 nuôi cấy trên môi trường PGA có màu trắng xám, môi trường thạch nuôi chuyển màu vàng nhạt. Ba chủng còn lại (BN2, HB1 và BG1) mọc khuẩn lạc có màu trắng sáng, môi trường nuôi cấy chuyển màu trắng đục; Về hình dạng và kết cấu của khuẩn lạc: quan sát ảnh chụp có thể nhận thấy 5 kiểu hình dạng và kết cấu khác nhau của các khuẩn lạc: dạng lông tơ (fluffy) với hệ sợi nấm bông xốp, mềm, quan sát thấy ở 2 chủng phân lập từ mẫu lá thu thập ở Hà Nội (chủng HN1 và SB); dạng hoa hồng (rosette) và hệ sợi mềm xốp của khuẩn lạc ở chủng BN1 phân lập từ mẫu lá bệnh của khoai ở Yên Phong (Bắc Ninh). Theo Waterhouse, đây là 2 dạng khuẩn lạc điển hình của nhóm nấm *P. colocasiae*. Ba chủng còn lại có hình dạng khuẩn lạc không điển hình, với dạng sợi nấm tỏa tia ở chủng BG1,

dạng mịn không rõ sợi nấm ở chủng BN2 và dạng khuẩn lạc lông tơ ở xung quanh, hệ sợi dày cứng ở trung tâm quan sát thấy ở chủng HB1.



Hình 3. Hình ảnh khuẩn lạc của các chủng nấm phân lập được sau tám ngày nuôi cấy trên môi trường PGA

Bảng 4. Một số đặc điểm sinh học của sáu chủng nấm sau tám ngày nuôi cấy

Stt	Kí hiệu chủng phân lập	Đặc điểm sinh học				
		Kết cấu của hệ sợi nấm (khuẩn lạc)	Màu sắc của hệ sợi	Đường kính khuẩn lạc (mm)	Tốc độ tăng trưởng/ngày (mm)	Khối lượng khô của hệ sợi (mg)
1	SB	Bông dạng lông tơ, xốp	Trắng xỉn	90,00 ± 1,64	12,86	277,08 ± 5,65
2	HN1	Mềm, xốp, dạng lông tơ	Trắng xỉn	73,08 ± 2,51	10,43	197,12 ± 5,74
3	HB1	Dày, cứng ở trung tâm, thưa và xốp ở xung quanh	Trắng sáng	71,09 ± 2,43	10,14	207,36 ± 6,01
4	BN1	Mềm, xốp, xếp lớp dạng hoa hồng	Trắng xỉn	90,00 ± 1,84	12,86	387,85 ± 7,26
5	BN2	Mềm, không rõ sợi nấm	Trắng sáng	84,03 ± 2,06	12,0	269,72 ± 5,43
6	BG1	Mịn, xốp, tỏa tia, rõ sợi nấm	Trắng sáng	80,08 ± 2,13	11,43	257,63 ± 6,17

Kết quả đánh giá về tốc độ sinh trưởng của khuẩn lạc trên môi trường PGA trình bày ở Bảng 4 cho thấy, khuẩn lạc của chủng SB và BN1 sinh trưởng nhanh nhất trên môi trường nuôi cấy, trung bình đạt 12,86 mm/ngày, sau 8 ngày nuôi cấy, sợi nấm sinh trưởng bao phủ toàn bộ bề mặt môi trường trong đĩa Petri. Hai chủng có tốc độ sinh trưởng của khuẩn lạc chậm nhất là HN1 và HB1, tốc độ sinh trưởng trung bình lần lượt là 10,43 và 10,14 mm/ngày. Chủng BN2 và BG1 có tốc độ sinh trưởng gần tương đương nhau, lần lượt là 12 và 11,43 mm/ngày.

Khối lượng khô của hệ sợi được xác định khi nuôi cấy các chủng nấm trên môi trường nước cà rốt ở nhiệt độ 20 - 22 °C trong 8 ngày. Kết quả thống kê cho thấy, khối lượng khô của chủng BN1 đạt giá trị cao nhất, 387,85 mg; tiếp đến là chủng SB với khối lượng khô của hệ sợi đạt 277,08 mg. Khối lượng khô thấp nhất là hệ sợi của chủng HN1 (197,12 mg) và của chủng HB1 (207,36 mg). Giá trị về khối lượng khô hệ sợi của các chủng nấm khi nuôi trên môi trường lỏng cũng phù hợp với tốc độ tăng trưởng của khuẩn lạc trên môi trường đặc PGA.

Kết quả xác định chủng nấm *P. colocasiae* dựa trên so sánh đặc điểm hình thái của khuẩn lạc được củng cố và xác nhận bằng giải trình tự và so sánh trình tự ITS vùng gen nhân của 6 chủng nấm và một số trình tự ITS được công bố trên ngân hàng NCBI (Bảng 5).

Bảng 5. Kết quả so sánh trình tự ITS bằng BLAST

Stt	Kí hiệu chủng	Độ dài đoạn DNA khuếch đại (nucleotide)	Loại nấm tương đồng trên GeneBank	Mức độ tương đồng
1	SB	604	<i>Phytophthora colocasiae</i> isolate CTCRI-PC 39	98%
2	HN1	614	<i>Trichoderma harzianum</i> isolate IIA2a	98%
3	HB1	542	<i>Nigrospora chinensis</i> isolate SWFU000068	99%
4	BN1	610	<i>Phytophthora colocasiae</i> strain P6102	99%
5	BN2	562	<i>Thielavia</i> sp. HYY2(1)	98%
6	BG1	579	<i>Xylaria</i> sp. T1070911	98%

Kết quả ở Bảng 5 cho thấy, chủng SB có trình tự tương đồng nucleotide đến 98% so với chủng *Phytophthora colocasiae* isolate CTCRI-PC 39 và BN1 tương đồng 99% với trình tự của chủng *Phytophthora colocasiae* strain P6102 trên GeneBank. Do đó cả 2 chủng SB và BN1 được xác nhận thuộc nấm *P. colocasiae*, trong khi bốn chủng nấm còn lại thuộc các loại nấm khác (Bảng 5). Kết quả này đã củng cố thêm cho kết quả phân tích đặc điểm hình thái của khuẩn lạc các chủng nấm như được trình bày ở trên.

Chủng HB1 có trình tự tương đồng 99% với nấm *Nigrospora chinensis*, loại nấm có phổ kí chủ rộng, được phát hiện là nguyên nhân gây nên triệu chứng cháy lá ở nhiều đối tượng cây trồng như cây chuối, cải bẹ, chè dầu với các biểu hiện khá giống với bệnh do nấm *P. colocasiae* gây ra [14]. Ba chủng nấm còn lại là HN1, BG1 và BN2 được xác định có độ tương đồng cao (98%) với các chủng nấm thuộc các loài *Trichoderma harzianum*, 98

Xylaria sp. và *Thielavia* sp., đây là các loại nấm nội sinh phổ biến tồn tại trong các bộ phận khác nhau của cây như lá, thân, rễ,... mà không gây ra triệu chứng gì cho cây trừ khi cây đang trong tình trạng bị bệnh [15]. Nhiều nghiên cứu cũng cho thấy, nấm *P. colocasiae* chỉ có thể sống trong mô bệnh trong thời gian khá ngắn nên việc phân lập nấm *P. colocasiae* được cho là tương đối khó, đòi hỏi những điều kiện nghiêm ngặt về chất lượng mẫu bệnh và về dinh dưỡng của môi trường nuôi cấy. Đây có thể là những nguyên nhân lí giải cho việc 4 trong 6 chủng nấm phân lập được từ mô lá biểu hiện triệu chứng của bệnh cháy lá nhưng không phải nấm *P. colocasiae*.

2.2.3. Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy khác nhau đến tốc độ sinh trưởng của nấm

Nhằm mục đích tìm ra môi trường nuôi cấy phù hợp nhất cho việc nhân nuôi hệ sợi nấm của 2 chủng *P. colocasiae* phân lập được (SB và BN1), chúng tôi đã nuôi cấy chúng trên 6 loại môi trường khác nhau. Kết quả đánh giá kích thước của khuẩn lạc sau 8 ngày nuôi cấy được trình bày trong Bảng 6.

Bảng 6. Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến sự sinh trưởng của hai chủng nấm *P. colocasiae* phân lập từ mô lá khoai môn sọ bị bệnh

Stt	Môi trường	Đường kính của khuẩn lạc (mm)	
		SB	BN1
1	CGA	90,00 ± 2,03	89,09 ± 2,25
2	CA	60,08 ± 2,17	69,16 ± 2,54
3	TGA	80,01 ± 1,98	77,28 ± 2,16
4	WA	42,53 ± 1, 65	53,02 ± 2,75
5	PGA	90,00 ± 1,64	90,00 ± 1,89
6	PSM	72,28 ± 3,25	72,34 ± 3,01

Số liệu chỉ ra trong Bảng 6 cho thấy, cả 2 chủng SB và BN1 đều sinh trưởng khá tốt trên cả 6 loại môi trường thử nghiệm. Sau 8 ngày nuôi cấy, đường kính khuẩn lạc dao động từ 42,53 đến 90 mm, trong đó khuẩn lạc có đường kính lớn nhất (90 mm) quan sát thấy ở chủng SB trên môi trường CGA, PGA và ở chủng BN1 trên môi trường PGA. Nấm mọc trên môi trường WA có tốc độ sinh trưởng của hệ sợi chậm nhất, với đường kính khuẩn lạc của chủng SB và BN1 đạt lần lượt là 42,53 mm và 53,02 mm.

Như vậy có thể thấy, môi trường CGA hay PGA thích hợp để nhân nuôi hệ sợi nấm trong phòng thí nghiệm, trong khi môi trường WA có thể sử dụng khi cần làm chậm tốc độ sinh trưởng của hệ sợi trong việc bảo quản, lưu giữ chủng nấm.

2.2.4. Xác định đặc điểm của bào tử nấm

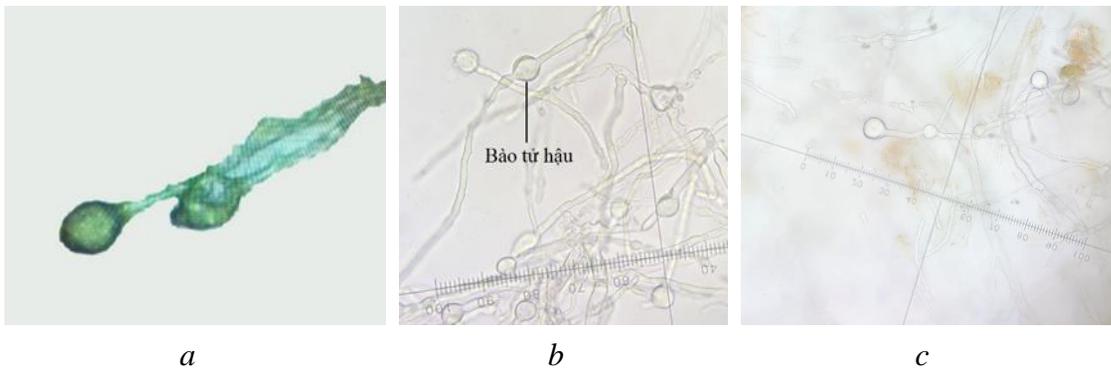
Nấm *P. colocasiae* có thể sinh sản vô tính hình thành các loại bào tử như bào tử hậu (bào tử vách dày), bào tử nang hay động bào tử (chứa trong túi bào tử) hoặc sinh sản hữu tính bằng bào tử trứng [1]. Trong nghiên cứu này, hình dạng và kích thước bào tử của nấm được quan sát dưới kính hiển vi Carl Zeiss (Axio Scope.A1) (40X), kết quả được trình bày trong Bảng 7.

Kết quả cho thấy, túi bào tử của chủng BN1 có dạng hình trứng, trong khi chủng SB có dạng hình cầu bán nhú (hình oval đầu hẹp) (Hình 4), đây cũng là 02 kiểu hình dạng của túi bào tử được quan sát thấy phổ biến ở nấm *P. colocasiae* bên cạnh một số hình

dạng khác như hình elip, hình quả lê [6, 17]. Mặt khác, khi quan sát một số mẫu nấm cũng tìm thấy bào tử hậu, loại bào tử được hình thành ở phần đầu hoặc giữa của sợi nấm với cấu trúc vách dày, kiểu bào tử này thường được tìm thấy chủ yếu khi nuôi cấy nấm trên môi trường nhân tạo. Ngoài ra, cả 2 chủng nấm BN1 và SB đều xuất hiện bào tử trứng với kích thước dao động từ 357,2 đến 475,2 μm^2 . Kích thước này tương tự với kết quả được công bố trong nghiên cứu của Padmaja và cộng sự.

Bảng 7. Hình dạng và kích thước bào tử của chủng nấm BN1 và SB

Chủng nấm	Chiều dài (D) túi bào tử (μm)	Chiều rộng (R) túi bào tử (μm)	Tỉ lệ D/R	Kích thước túi bào tử (μm^2)	Kích thước bào tử trứng (μm^2)	Hình dạng túi bào tử
BN1	22,8	14,1	1,6:1	321	475,2	Hình trứng
SB	25,4	15,8	1,6:1	401	357,2	Hình cầu bán nhú



Hình 4. Hình dạng bào tử của hai chủng nấm SB và BN1
 Túi bào tử hình cầu bán nhú (a) và bào tử hậu (b) của chủng SB;
 Túi bào tử hình trứng của chủng nấm BN1

2.2.5. Xác định khả năng gây bệnh của chủng nấm *P. colocasiae*

Kết quả ở Bảng 8 cho thấy, khả năng gây bệnh của 2 chủng SB và BN1 khá tương đồng ở cả 3 nguồn gen khoai môn sọ được lây nhiễm nấm. Các vết bệnh trên mảnh lá *in vitro* đã biểu hiện những triệu chứng điển hình của bệnh cháy lá do nấm *P. colocasiae* gây ra trong điều kiện đồng ruộng. So sánh kết quả thu được trình bày ở Bảng 8 với cấp gây hại và tính kháng/mẫn của nguồn gen (Bảng 2) nhận thấy, nguồn gen có số đăng kí 11960 (khoai thó cung) có khả năng kháng bệnh ở mức trung bình với diện tích lá nhiễm bệnh sau 10 ngày lây nhiễm với chủng SB và BN1 lần lượt là 20,5% và 17,5%. Trong khi đó, khoai sọ trắng (19-1006) mẫn cảm với nấm *P. colocasiae* với tỉ lệ % diện tích lá biểu hiện triệu chứng bệnh lên tới 49,23% và 45,16% sau 10 ngày lây nhiễm với chủng SB và BN1. Chủng SB và chủng BN1 vì thế đã được lưu giữ và nhân nuôi để phục vụ cho nghiên cứu đánh giá khả năng kháng bệnh cháy lá do nấm *P. colocasiae* của các nguồn gen trong tập đoàn khoai môn sọ.

Bảng 8. Tỷ lệ % diện tích lá biểu hiện triệu chứng bệnh sau lây nhiễm với chủng nấm phân lập SB và BN1

Lây nhiễm với chủng SB			
Mã/tên nguồn gen khoai môn sọ lây nhiễm	Tỷ lệ % diện tích lá bị phá hủy diệt lục sau lây nhiễm		
	5 ngày	7 ngày	10 ngày
11960/Khoai thó cung	3,0	9,0	20,5
19-1006/Khoai sọ trắng	12,48	30,79	49,23
11528/Khoai sọ An Khánh	5,12	14,70	28,11
Lây nhiễm với chủng BN1			
11960/Khoai thó cung	2,0	8,5	17,5
19-1006/Khoai sọ trắng	11,84	30,01	45,16
11528/Khoai sọ An Khánh	5,01	13,32	24,78

3. Kết luận

Đã phân lập được sáu chủng nấm từ mẫu lá có biểu hiện bệnh cháy lá trên cây khoai môn sọ trồng tại Bắc Ninh, Bắc Giang, Hòa Bình và Hà Nội bằng nuôi cấy mô bệnh. Trong đó, chỉ có hai chủng (SB phân lập từ mẫu thu tại Ba Vì, Hà Nội và chủng BN1 phân lập từ lá bệnh thu tại huyện Yên Phong, Bắc Ninh) có đặc điểm hình thái khuẩn lạc điển hình của nấm *P. colocasiae* và có mức tương đồng trình tự ITS trên 98% với nấm *Phytophthora colocasiae*, là tác nhân gây bệnh cháy lá trên cây khoai môn sọ trồng ở bốn tỉnh miền Bắc Việt Nam.

Chủng nấm SB và chủng BN1 có độc tính tương đương, sinh trưởng mạnh trên môi trường CGA và PGA, nhưng sinh trưởng kém với đường kính khuẩn lạc nhỏ khi được nuôi cấy trên môi trường WA. Túi bào tử chủng BN1 có dạng hình trứng nhưng của chủng SB có dạng hình cầu bán nhú.

Lời cảm ơn. Nghiên cứu được hỗ trợ tài chính từ Chương trình Quỹ gen cấp Quốc gia thông qua đề tài mang mã số NVQG-2019/ĐT.05.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAOSTAT. 16. <http://faostat.fao.org/>.
- [2] Vũ Ngọc Lan, Nguyễn Thị Phương Dung, Nguyễn Văn Phú, 2015. Lưu giữ *in vitro* nguồn gen khoai môn bản địa (*Colocasia esculenta* (L) Schott). *Tạp chí Khoa học và Phát triển*, 13(4), tr. 623-633.

- [3] Misra RS., Mishra AK., Sharma K., Muthulekshmi LJ. and Hegde V., 2011. Characterisation of *Phytophthora colocasiae* isolates associated with leaf blight of taro in India. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 44 (6), pp. 581-590.
- [4] Misra RS., Maheshwari SK., Sriram S., Sharma K. and Sahu AK., 2007. Integrated management of *Phytophthora* leaf blight disease of Taro. *Journal of Root Crops*, 33(2), pp. 144-146.
- [5] Padmaja G., Devi GU., Mahalakshmi BK. and Sridevi D., 2017. Characterization of Isolates of *Phytophthora colocasiae* collected from Andhra Pradesh and Telangana causing leaf blight Rana. *Plant Diseases Research*, 22 (1), pp. 30-33.
- [6] Cotieno CA., 2020. Taro leaf blight (*Phytophthora colocasiae*) disease pathogenicity on selected taro (*Colocasia esculenta*) Accessions in Maseno, Kenya. *Open Access Library Journal*, 7: e6393. <https://doi.org/10.4236/oalib.1106393>.
- [7] Lin M.J and Ko W.H., 2008. Occurrence of isolates of *Phytophthora colocasiae* in Taiwan with homothallic behavior and its significance. *Mycologia*, 100 (5), pp. 727-734.
- [8] Shakywar RC. and Pathak SP., 2012. Integrated disease management of leaf blight of taro Indian. *Phytopathology*, 65 (3), pp. 294-296.
- [9] Yang DC., Yang KJ., Eui Soo Yoon ES., 2001. Comparison of ITS (Internal Transcribed Spacer) and 5.8S rDNA Sequences among Varieties and Cultivars in *Panax ginseng*. *Journal of Photoscience*, 8(2), pp. 55-60.
- [10] Waterhouse, Grace M., 1963. Key to the species of *Phytophthora* de Bary. UK: Commonwealth Agricultural Bureaux. *Mycological Papers*. No. 92.
- [11] Brooks FE., 2008. Detached leaf bioassay for evaluating Taro resistance to *Phytophthora colocasiae*. *Plant Disease*, 92, pp. 126-131.
- [12] Little TM, Hills FJ., 1978. Agricultural experimentation: *design and analysis*. Somerset, NJ: John Wiley & Sons Inc.
- [13] Prasad SM., 1982. National survey for diseases of ropical tuber crops. *Regional centre of CTCRI*, Bhubaneswar, (India).
- [14] Wang M., Liu F., Crous PW., Cai L., 2017. Phylogenetic reassessment of *Nigrospora*: Ubiquitous endophytes, plant and human pathogens. *Persoonia*, 39, pp.118-142.
- [15] Lê Thị Hoàng Yến, Dương Văn Hợp, Tsurumi Y., Ando K., 2011. Đa dạng sinh học của nấm nội sinh phân lập từ lá cây lầy trong rừng Quốc gia Cát Tiên. *Hội nghị Khoa học toàn quốc về Sinh thái và Tài nguyên sinh vật lần thứ 4*, tr. 1057-1066.
- [16] Bandyopadhyay R., Sharma K., Onyeka TJ., Aregbesola A., Kumar PL., 2011. First report of taro (*Colocasia esculenta*) leaf blight caused by *Phytophthora colocasiae* in Nigeria. *Plant Disease*, 95(5), pp. 618.
- [17] Adomako J., Kwoseh C., Moses E., and Prempeh RNA., 2018. Variations in morphological and molecular characteristics of *Phytophthora colocasiae* population causing leaf blight of taro in Ghana. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 51 (19-20), pp. 1009-1021.

ABSTRACT

Isolation and pathogenicity evaluation of *Phytophthora colocasiae* causing leaf blight disease in taro (*Colocasia esculenta* L. Schott) in some Northern provinces, Vietnam

Le Thi Thuy, Nguyen Thi Na, Le Thị Tuoi and Nguyen Xuan Viet
Faculty of Biology, Hanoi National University of Education

The study aimed to isolate and purify the pathogenic fungal strains isolated from blight disease taro leaves in some provinces of Northern Vietnam, from which to select the pathogenic strains belonging to *Phytophthora colocasiae* species, and to determine their toxicity on taro plants. From leaf tissue showing leaf blight collected from taro fields in 6 places in Bac Giang, Bac Ninh, Hanoi, and Hoa Binh provinces, 6 strains of the fungus were isolated. Based on the morphological characteristics as well as ITS rDNA sequences, it was confirmed that two of the six strains were *Phytophthora colocasiae* and named BN1 and SB, respectively. The sporangium of strain BN1 was ovoid and strain SB was a semi-papillary spherical shape. Both fungal strains grew well on CGA and PGA media and had equivalent toxicity through *in vitro* infection testing on 3 taro gene sources.

Keywords: leaf blight disease, taro (*Colocasia esculenta* L. Schott), isolating, *Phytophthora colocasiae*.