

XÁC ĐỊNH CHỦNG NẤM GÂY BỆNH THÁN THƯ HÀNH LÁ NẶNG TẠI MỘT SỐ TỈNH ĐỒNG BẰNG SÔNG CỬU LONG

NGUYỄN QUỐC THÁI*

Tóm tắt

Nghiên cứu được thực hiện nhằm xác định chủng nấm gây bệnh thán thư hành lá nặng nhất và định danh đến loài của chủng nấm này. Hai mươi chủng nấm gây bệnh thán thư thu thập ở Đồng Tháp và Vĩnh Long được nuôi cấy trên môi trường PDA, thu lấy bào tử và phun lên cây hành lá trong điều kiện nhà lưới. Kết quả ghi nhận về tỷ lệ bệnh và chỉ số bệnh cho thấy chủng nấm PHVL2 là chủng gây hại nặng nhất. Với các đặc điểm về đĩa đài, hình dạng và kích thước bào tử, đĩa áp đã xác định chủng PHVL2 thuộc chi *Colletotrichum*. Kết quả giải trình tự gene vùng ITS1-ITS4, và so sánh với dữ liệu trên ngân hàng gene đã xác định chủng nấm PHVL2 có mối quan hệ rất gần với loài *Colletotrichum gloeosporioides* với tỷ lệ tương đồng của mẫu khảo sát đạt trên 99,6%.

Từ khóa: bệnh thán thư, *Colletotrichum*, định danh, hành lá.

Abstract

The study was carried out to identify the fungus causing the most severe anthracnose disease and to determine the species of this fungal strain. Twenty anthracnose strains collected in Dong Thap and Vinh Long province were cultured on PDA, spores collected and sprayed on Welsh onions under net house conditions. The results of disease rate and disease index showed that strain PHVL2 was the most harmful strain. With the characteristics of conidiomata, shape and size of conidia and appressoria have identified strain PHVL2 belonging to genus *Colletotrichum*. The results of gene sequencing of the ITS1-ITS4 region and comparison with the data on the gene bank have determined that the PHVL2 strain is very closely related to *Colletotrichum gloeosporioides* species when the per. ident of samples are over 99.6%.

Key words: *Allium fistulosum* L., anthracnose disease, *Colletotrichum*, determine the species

Giảng viên Khoa Nông nghiệp - Thủy sản, Trường Đại học Cửu Long

*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Nguyễn Quốc Thái (Email: nguyenquocthai@mku.edu.vn)

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Hành lá (*Allium fistulosum* L.) được trồng nhiều nơi tại Việt Nam, chủ yếu dùng làm gia vị, hoặc dùng làm thuốc nam để chữa nhiều loại bệnh như ho, nhiễm khuẩn..., là loại cây trồng mang lại lợi nhuận khá cao cho người trồng. Tuy nhiên, việc trồng hành lá cũng đòi hỏi không ít về khâu chăm sóc, chủ yếu là phòng trừ các loại sâu bệnh, đặc biệt là bệnh thán thư do nấm *Colletotrichum* sp. gây ra (Nguyễn Kim Vân, 2011). Bệnh thán thư là một trong mười bệnh hại phổ biến trên cây hành. Khi cây bị bệnh, đầu lá biến màu nâu trắng, có đĩa cảnh nên còn được gọi là bệnh cháy đầu lá (Burgess *et al.*, 2009). Tại đồng bằng sông Cửu Long, triệu chứng gây hại dễ nhận biết của bệnh trên cây hành lá là vết thối lõm hình bầu dục kéo dài trên lá cùng với sự hiện diện của các đĩa cảnh (đĩa đài). Bệnh có thể do nhiều loài khác nhau của chi *Colletotrichum* gây ra. Theo Salamanca *et al.* (2012), sáu loài *Colletotrichum* spp. khác nhau đã được ghi nhận là tác nhân gây bệnh thán thư hành trên khắp thế giới, bao gồm *C. gloeosporioides*, *C. coccodes*, *C. circinans*... Trong khi ở Việt Nam, loài nấm *C. circinans* đã được phát hiện ở Thái Nguyên và Hà Nội, gây hại trên lá các cây hành tỏi (Đặng Vũ Thị Thanh, 2008). Do đó, việc thu thập phân lập và tuyển chọn được chủng nấm gây hại nặng để phục vụ cho các nghiên cứu liên quan là rất cần thiết.

2. Phương pháp thí nghiệm

2.3.1. Thu mẫu, phân lập nấm gây bệnh và đánh giá khả năng gây hại của các chủng nấm gây bệnh thán thư hành lá tại một số tỉnh vùng ĐBSCL: nấm gây bệnh được phân lập từ các mẫu bệnh thu thập từ các

ruộng chuyên canh hành lá tại tỉnh Đồng Tháp và Vĩnh Long trên môi trường WA và nuôi cấy trên môi trường PDA. Thí nghiệm được bố trí theo thể thức hoàn toàn ngẫu nhiên một nhân tố là 20 chủng nấm *Colletotrichum* sp. cùng đối chứng không lây nhiễm nấm bệnh, với 5 lần lặp lại (1 chậu hành/3 tép/lặp lại). Phun mỗi chậu hành lá 10ml huyền phù bào tử nấm *Colletotrichum* spp. mật số 10^6 bào tử/ml lên toàn cây đến khi bề mặt phủ một lớp sương huyền phù bào tử nấm thì ngưng. Cây được để trong mát 2 ngày và chăm sóc bình thường ở nhà lưới. Ghi nhận tỷ lệ bệnh và chỉ số bệnh vào các thời điểm 5, 7, 9, 11 và 13 ngày sau lây bệnh (NSLB) dựa vào số lá bệnh và tổng số lá trên bụi, cấp bệnh trên lá theo thang đánh giá 6 cấp của Nanda *et al.* (2016). Các số liệu được phân tích phương sai và trắc nghiệm phân hạng với kiểm định Duncan 5% bằng phần mềm SPSS 16.0

2.3.2. Định danh loài nấm *Colletotrichum* gây bệnh nặng trên hành lá: chủng nấm gây hại nặng được cấy vào tâm của đĩa petri chứa môi trường PDA và cấy trên lame với môi trường PCA để tạo đĩa áp. Quan sát bào tử nấm gây bệnh và đĩa áp dưới kính hiển vi quang học để ghi nhận hình dạng, màu sắc, kích thước. Đối sánh với miêu tả của Barnet và Hunter (1998) để xác định chi nấm gây bệnh. Dùng 2 mẫu nấm cấy từ cùng 1 chủng nấm gây hại nặng nhất gửi công ty TNHH MTV Sinh hóa Phù Sa để tiến hành ly trích DNA, thực hiện PCR, tiến hành giải trình tự ITS của mẫu nghiên cứu và so sánh với trình tự trên ngân hàng gene bằng công cụ BLAST. Trình tự ITS của mẫu nghiên cứu cùng với trình tự ITS lấy từ Genbank của các loài có mức độ tương đồng cao nhất trong kết quả tìm kiếm BLAST, được sắp xếp lại bằng chương trình Clustal v1.8 trong Bioedit.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Kết quả so sánh về khả năng gây hại của các chủng nấm gây bệnh thán thư hành lá thu tại một số tỉnh vùng ĐBSCL

Khả năng gây hại của 20 chủng nấm trên hành lá được ghi nhận ở 5 thời điểm 5, 7, 9, 11 và 13 NSLB. Kết quả về tỷ lệ bệnh trên lá và chỉ số bệnh được ghi nhận tại Bảng 1 và 2.

❖ Tỷ lệ bệnh (%): ở thời điểm 5NSLB, tất cả các nghiệm thức đều có sự xuất hiện của vết bệnh thán thư, chủng nấm BT7VL có tỷ lệ bệnh cao nhất, khác biệt so với đối chứng nhưng không cao hơn ở PHVL2 và một số chủng nấm khác. Đến thời điểm 7NSLB, chủng nấm PHVL2 vượt lên cao nhất, đạt 28,18%, chỉ không khác biệt so với ở chủng ĐT4 và ĐT9 (lần lượt đạt 18,52% và 20,99%). Thời điểm 9 và 13NSLB, chủng nấm PHVL2 gây nên tỷ lệ lá bị bệnh thán thư cao nhất và vượt trội so với

19 chủng nấm còn lại, đạt lần lượt 21,4% và 20,47%. Một số lá có nhiều vết bệnh liên kết lại với nhau làm lá bị khô nên đến thời điểm 13NSLB, mặc dù chủng PHVL2 không phải là chủng nấm có tỷ lệ bệnh cao nhất nhưng cũng không khác biệt so với ở chủng nấm PHVL1 (cao nhất và đạt 23,42%).

❖ Chỉ số bệnh (%): ở 5 NSLB, chủng BT7VL cũng gây hại nhanh nhất, đạt chỉ số bệnh cao nhất, tương tự như ghi nhận trên chỉ tiêu tỷ lệ bệnh, nhưng cũng không khác biệt so với ở chủng PHVL2. Đến 7NSLB, chỉ số bệnh (%) ở PHVL2 vượt lên mức cao nhất, tương đương với chủng ĐT2, ĐT4, ĐT5, ĐT7 và ĐT9. Ở 9NSLB, PHVL2 có chỉ số bệnh đạt 8,66%; cao nhất trong các chủng nấm thử nghiệm. Ở 2 thời điểm ghi nhận tiếp theo là 11 và 13NSLB, chủng nấm PHVL2 vẫn luôn duy trì ở mức cao so với các chủng nấm khác.

Bảng 1. Tỷ lệ bệnh (%) khi lây nhiễm 20 chủng nấm *Colletotrichum* sp. trên hành lá tại thời điểm 5, 7, 9, 11 và 13 NSLB.

Chủng nấm	5NSLB	7NSLB	9NSLB	11NSLB	13NSLB
Đối chứng	6,13 e-g	2,21 d	9,42 b-d	6,37 cd	6,71 c-e
ĐT10	13,52 a-e	16,77 b	9,84 b-d	6,59 b-d	4,88 e
ĐT9	14,71 a-c	20,99 ab	9,67 b-d	7,69 b-d	5,40 de
ĐT8	8,72 a-f	16,72 b	8,34 b-d	7,32 b-d	9,06 c-e
ĐT7	10,82 a-f	16,90 b	8,73 b-d	5,46 cd	7,92 c-e
ĐT6	8,45 a-f	14,60 b	10,18 b-d	5,17 cd	5,87 de
ĐT5	14,26 a-d	16,67 b	8,12 b-e	8,26 b-d	5,09 e
ĐT4	12,22 a-e	18,52 ab	7,79 b-e	7,42 b-d	6,69 c-e
ĐT3	7,51 b-g	13,86 b	8,58 b-d	7,32 b-d	8,53 c-e
ĐT2	12,98 a-e	17,05 b	8,11 b-e	6,19 cd	6,95 c-e
ĐT1	12,39 a-e	14,52 b	6,57 c-e	6,37 cd	5,13 e
LHVL1	7,80 c-g	7,08 c	3,81 e	6,35 cd	6,82 c-e

LHVL2	5,93 e-g	6,56 cd	5,56 c-e	9,16 b-d	8,16 c-e
PHVL1	5,49 fg	14,81 b	14,14 b	13,04 b	23,42 a
PHVL2	17,28 ab	28,14 a	21,40 a	20,47 a	19,21 ab
BT6VL	4,51 fg	6,67 c	11,45 bc	8,63 b-d	15,74 a-c
BT7VL	18,47 a	4,81 cd	13,07 b	10,06 bc	19,43 a
BT9VL	4,02 g	6,56 cd	6,02 de	4,60 d	6,83 c-e
BT12VL	5,70 fg	3,35 cd	10,17 b-d	7,45 b-d	9,82 b-e
BT13VL	6,65 d-g	7,63 c	9,61 b-d	8,80 b-d	9,46 c-e
BT14VL	8,22 a-g	7,30 c	9,70 b-d	8,46 b-d	13,86 a-d
Mức ý nghĩa	**	**	**	**	**
CV (%)	8,5	5,9	6,9	7,1	8,8

Ghi chú: số liệu được chuyển sang $\sqrt{x + 0,5}$ trước khi xử lý thống kê, các số có cùng ký tự theo sau thì không khác biệt qua phân tích thống kê ở Duncan 5%, **: khác biệt mức ý nghĩa 1%

Như vậy, chủng nấm PHVL2 có khả năng gây bệnh thán thư nặng nhất trên cây hành lá khi có tỷ lệ bệnh và chỉ số bệnh cao hơn so với 19 chủng nấm còn lại (hình 1). Nghiên cứu

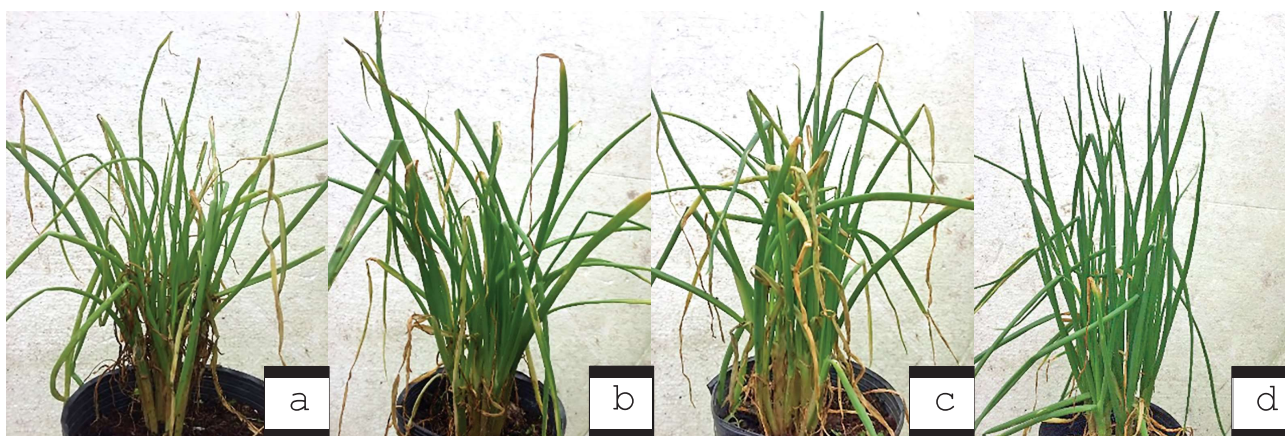
trước đó của Nguyễn Quốc Thái (2017) cũng cho thấy các chủng nấm *Colletotrichum* gây bệnh thán thư thu thập ở các địa điểm khác nhau cho khả năng gây bệnh khác nhau.

Bảng 2. Chỉ số bệnh (%) khi lây nhiễm 20 chủng nấm *Colletotrichum* sp. trên hành lá tại thời điểm 5, 7, 9, 11 và 13 NSLB.

Chủng nấm	5NSLB	7NSLB	9NSLB	11NSLB	13NSLB
Đối chứng	1,33 e-g	1,08 e	2,77 b-d	1,10 b	1,02 cd
ĐT10	2,51 a-g	5,83 ab	2,54 cd	1,18 b	0,88 d
ĐT9	3,81 a-c	9,04 a	2,14 c-e	2,23 b	0,72 d
ĐT8	1,79 b-g	4,97 bc	1,61 c-e	1,76 b	1,70 b-d
ĐT7	2,32 b-g	5,73 ab	2,11 c-e	1,15 b	1,27 b-d
ĐT6	1,92 b-g	5,09 bc	2,10 c-e	1,06 b	0,99 cd
ĐT5	3,27 a-d	6,15 ab	2,11 c-e	1,85 b	0,76 d
ĐT4	2,90 a-f	6,97 ab	1,65 c-e	1,68 b	1,10 cd
ĐT3	1,28 d-g	4,55 bc	2,42 c-e	1,79 b	1,60 b-d
ĐT2	3,11 a-e	6,10 ab	1,79 c-e	1,03 b	1,39 b-d
ĐT1	3,03 a-f	3,66 b-d	1,24 c-e	1,15 b	1,30 b-d
LHVL1	1,78 c-g	2,89 c-e	0,42 e	1,55 b	1,41 b-d

LHVL2	1,75 b-g	2,03 de	1,30 c-e	2,62 b	2,29 a-d
PHVL1	1,47 d-g	5,06 bc	5,79 ab	7,46 a	2,78 ab
PHVL2	4,39 ab	9,61 a	8,66 a	5,95 a	3,26 ab
BT6VL	0,83 g	1,54 de	2,87 cd	1,56 b	1,75 b-d
BT7VL	5,02 a	1,47 de	3,52 bc	2,13 b	3,83 a
BT9VL	1,22 g	1,37 e	1,20 de	0,94 b	0,93 d
BT12VL	1,13 g	1,52 de	2,58 c-e	1,33 b	1,09 b-d
BT13VL	1,19 fg	1,48 de	2,83 b-d	1,96 b	1,05 cd
BT14VL	1,54 d-g	1,42 de	3,66 b-d	1,88 b	2,94 a-c
Mức ý nghĩa	**	**	**	**	**
CV (%)	18,2	12,0	18,0	19,6	23,1

Ghi chú: số liệu được chuyển sang $\sqrt{x + 0,5}$ trước khi xử lý thống kê, các số có cùng ký tự theo sau thì không khác biệt qua phân tích thống kê ở Duncan 5%, **: khác biệt mức ý nghĩa 1%



Hình 1. Triệu chứng bệnh thán thư của 3 chủng nấm *Colletotrichum* sp. gây hại nặng so với cây đối chứng trên cây hành lá; (a) chủng BT7VL, (b) chủng PHVL1, (c) chủng PHVL2 và (d) cây đối chứng

3.2. Kết quả định danh loài nấm *Colletotrichum* có khả năng gây bệnh nặng trên hành lá

Định danh loài nấm trong nghiên cứu này được thực hiện kết hợp 2 phương pháp: khảo sát hình thái để xác định chi, và sinh học phân tử để định danh loài.

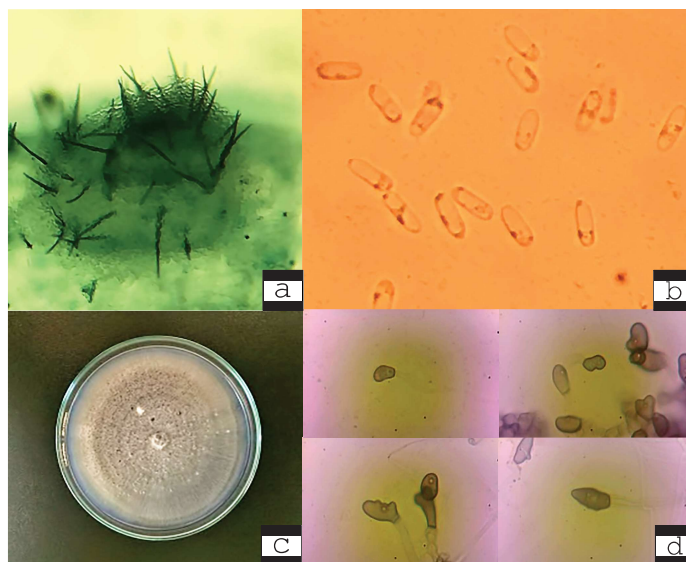
❖ **Kết quả khảo sát hình thái nấm *Colletotrichum* sp:** trên vết bệnh, đĩa nuôi của

nấm có nhiều gai nhọn, phóng thích nhiều bào tử, dạng hình trụ, không vách ngăn. Nấm gây hại sau khi phân lập được nuôi cấy trên môi trường PDA đến 15 ngày sau cấy thì tiến hành quan sát hình dạng và đo kích thước bào tử. Theo đó, chủng nấm tại PHVL2 có bào tử dạng hình trụ, không màu, bên trong có các giọt bào tử. Bào tử có kích thước trung bình $12,7 \times 2,7 \mu\text{m}$ (Hình 2). Đĩa áp có 4 dạng: chùy,

trứng, trứng ngược và xẻ thùy. Kích thước của từng loại đĩa áp như sau: chùy: $9,5 \div 18,9 \mu\text{m}$ x $5,4 \div 8,1 \mu\text{m}$; trứng: $10,8 \div 16,2 \mu\text{m}$ x $4,5 \div 6,8 \mu\text{m}$; trứng ngược: $9,5 \div 18,9 \mu\text{m}$ x $5,4 \div 8,1$

μm ; xẻ thùy: $10,8 \div 18,9 \mu\text{m}$ x $5,4 \div 13,5 \mu\text{m}$

Các đặc điểm hình thái trên chứng tỏ nấm gây bệnh thuộc chi nấm *Colletotrichum* khi phù hợp với mô tả của Barnet và Hunter (1998).



Hình 2. Đĩa áp và đơn bào tử của chủng nấm *Colletotrichum PHVL2*, a: đĩa dài, b: bào tử, c: khuẩn ty nấm phát triển trên môi trường PDA, d: đĩa áp tạo nên trên môi trường PCA.

❖ Kết quả định danh bằng phương pháp sinh học phân tử

Kết quả phản ứng PCR: sản phẩm PCR được khuếch đại thành công và cho 1 band sắc nét. Kích thước ước lượng vào khoảng 500-600 bp so với thang chuẩn DNA.

Kết quả giải trình tự gene ITS: kết quả giải trình tự và so sánh trên Ngân hàng gene <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/> cho thấy cả 2 mẫu của chủng nấm PHVL2 đều có mối quan hệ gần nhất với loài *Colletotrichum gloeosporioides*. Mẫu PHVL2-1 có mức độ tương đồng với *Colletotrichum gloeosporioides* KF053201.1, là 99,61%, độ phủ là 100% (hình 3); mẫu PHVL2-2 có mức độ tương đồng với *Colletotrichum gloeosporioides* GU066671.1 là 100%, độ phủ là 99% (hình 4). Kết hợp kết quả quan sát hình thái và định danh bằng phương pháp sinh học phân

tử đã xác định được chủng nấm PHVL2 là loài *Colletotrichum gloeosporioides*. Như vậy, loài nấm gây bệnh thán thư hành lá tại miền Nam Việt Nam khác với loài gây hại tại Thái Nguyên và Hà Nội là loài *C. circinans* (Đặng Vũ Thị Thanh, 2008), hoặc tại Brazil là *Colletotrichum spaethianum* (Santana *et al.*, 2015), *Colletotrichum theobromicola* và *C. truncatum* (Matos *et al.* 2017).

4. Kết luận

Chủng nấm PHVL2 thu thập tại xã Phước Hậu, huyện Long Hồ, Vĩnh Long là chủng nấm gây hại nặng nhất trên cây hành lá trong tổng số 20 chủng nấm gây bệnh thán thư thu thập ở Đồng Tháp và Vĩnh Long khi có tỷ lệ bệnh và chỉ số bệnh cao nhất. Kết hợp phương pháp quan sát hình thái và sinh học phân tử đã xác định chủng nấm PHVL2 là loài *Colletotrichum gloeosporioides*.

LỜI CẢM ƠN

Đây là kết quả từ đề tài “Đánh giá hiệu quả bước đầu của chế phẩm thử nghiệm kích thích tính kháng bệnh thán thư trên cây hành lá tại Vĩnh Long” được Trường Đại học Cửu Long hỗ trợ kinh phí nghiên cứu giai đoạn 2020-2021.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] Barnett H.L. and B.B Hunter (1998). Illustrated genera of imperfect fungi, (4th ed). published by Amer Phytopathological Society;

[2] Burgess L.W., Knight T.E., Tesoriero L. và Phan H.T. 2009. Cẩm nang chẩn đoán bệnh cây ở Việt Nam. Chuyên khảo ACIAR số 129a, 210 pp. ACIAR: Canberra;

[3] Đặng Vũ Thị Thanh, *Các loài nấm gây bệnh hại cây trồng Việt Nam*, Nhà xuất bản nông nghiệp, 251 trang, năm 2008;

[4] Matos K. S., K. F. A. Santana, A. M. Catarino, and R. E. Hanada (2017). Plant disease, First Report of Anthracnose on Welsh onion (*Allium fistulosum* L.) in Brazil caused by *Colletotrichum theobromicola* and *C. truncatum*;

[5] Nanda S., S. K. Chand, P. Mandal, P. Tripathy and R. K. Joshi (2016). Identification of Novel Source of Resistance and Differential Response of *Allium* Genotypes to Purple Blotch

Pathogen, *Alternaria porri* (Ellis) Ciferri. The Plant Pathology Journal. 32(6): 519-527;

[6] Nguyễn Kim Vân, *Phòng chống bệnh hại cây hành*, năm 2011, <http://nongnghiep.vn/phong-chong-benh-hai-cay-hanh-post85126.html>, ngày truy cập: 10/2017;

[7] Nguyễn Quốc Thái, “Đánh giá hiệu quả của một số hóa chất kích kháng đối với bệnh thán thư do nấm *Colletotrichum* sp. gây ra trên cây hành lá (*Allium fistulosum*) tại Vĩnh Long”, *Báo cáo nghiên cứu khoa học cấp cơ sở*, Trường Đại học Cửu Long, năm 2017;

[8] Salamanca, L. M. R., Enzenbacher, T. B., Derie, M. L., du Toit, L. J., Feng, C., Correll, J. C., Hausbeck, M. K. (2012). First Report of *Colletotrichum coccodes* Causing Leaf and Neck Anthracnose on Onions (*Allium cepa*) in Michigan and the United States. *The American Phytopathological Society* 96: 769p;

[9] Santana K. F. A., C. B. Garcia, K. S. Matos, R. E. Hanada, G. F. Silva and N. R. Sousa (2015). Plant disease, First Report of Anthracnose Caused by *Colletotrichum spaethianum* on *Allium fistulosum* in Brazil.

Ngày nhận bài: 11/09/2021

Ngày gửi phản biện: 13/09/2021

Ngày duyệt đăng: 16/10/2021