

# CÁC LOÀI NẤM (*Colletotrichum* spp.) GÂY BỆNH THÁN THƯ CÓ ĐỘC TÍNH CAO TRÊN XOÀI CÁT CHU Ở ĐỒNG BẰNG SÔNG CỬU LONG

Châu Trùng Dương<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Như Ý<sup>2</sup>, Nguyễn Thị Thu Nga<sup>2</sup>,  
Đoàn Thị Kiều Tiên<sup>2</sup>, Nguyễn Thị Ngọc Trúc<sup>3</sup>, Lưu Thái Danh<sup>2\*</sup>

## TÓM TẮT

Thán thư là bệnh gây thiệt hại nghiêm trọng đến năng suất và chất lượng của trái xoài. Bệnh gây hại từ lúc trái còn non đến lúc thu hoạch, ngoài ra bệnh còn xuất hiện và gây hại trên lá, thân, hoa và trái. Tác nhân gây bệnh thường là do nhiều loài nấm khác nhau thuộc cùng chi *Colletotrichum* với đặc điểm hình thái tương đối giống nhau, do đó khó xác định chính xác loài gây bệnh khi chỉ dựa vào triệu chứng gây bệnh và đặc điểm hình thái của nấm. Để giúp cho việc phòng trị bệnh thán thư trên trái xoài Cát Chu đạt hiệu quả, việc xác định chính xác loài nấm gây bệnh là rất quan trọng. Nghiên cứu được tiến hành bằng cách phân lập các nguồn nấm gây bệnh trên trái xoài Cát Chu thu thập từ một số tỉnh ở đồng bằng sông Cửu Long, sau đó dựa vào đặc điểm hình thái và giải trình tự vùng ITS để định danh loài nấm gây bệnh. Đã thu được 9 dòng nấm gây hại, trong đó hai dòng nấm có độc tính cao được ký hiệu là TG3 và HG2. Căn cứ vào đặc điểm hình thái và so sánh trình tự vùng ITS với dữ liệu trên ngân hàng gen bằng phần mềm BLAST đã xác định dòng TG3 tương đồng với loài *Colletotrichum gloeosporioides* và dòng HG2 tương đồng với loài *Colletotrichum scovillei*.

**Từ khóa:** Bệnh thán thư, xoài Cát Chu, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum scovillei*.

## 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây xoài được xem là một trong những cây ăn quả quan trọng trong nghề trồng cây ăn quả trên thế giới [1]. Xoài là một loại trái cây có giá trị cao trên thị trường quốc tế do có mùi vị thơm ngon, màu sắc hấp dẫn và năng lượng cao [2]. Bệnh thán thư là một trong những bệnh chính trên xoài ở khắp thế giới giai đoạn trước và sau thu hoạch [3]. Ở Việt Nam, xoài được trồng khắp các vùng trong cả nước với diện tích khá lớn. Theo số liệu thống kê của Cục Trồng trọt năm 2019 diện tích trồng xoài của cả nước đạt 99.641,5 ha. Trong đó, diện tích trồng mới là 9.938,6 ha, diện tích xoài đang cho trái khoảng 78.676,1 ha. Diện tích trồng xoài Cát Chu có xu hướng giảm so với năm 2017 và đạt khoảng 29.812,9 ha, chủ yếu tập trung ở các tỉnh đồng bằng sông Cửu Long. Trong đó, diện tích cây đang cho trái chiếm khoảng 73,8% và 13,2% đối với diện tích trồng mới. Năng suất xoài Cát Chu đạt từ 28 đến 32 tấn/năm; ước tính tổng sản lượng xoài Cát Chu năm 2019 đạt

khoảng 652,9 nghìn tấn. Với các vùng trồng xoài trọng điểm nằm trong vùng địa lý có điều kiện tự nhiên thích hợp cho nấm *Colletotrichum* phát triển như thời tiết nóng ẩm, mưa nhiều tạo ẩm độ cao giúp nấm bệnh dễ phát triển kèm theo cách quản lý phòng trừ bệnh còn hạn chế. Trên xoài triệu chứng thán thư có trên lá, thân lá, cánh hoa và trái. Vết bệnh trên lá ban đầu nhỏ, góc cạnh, đốm nâu đến đen và hình thành vết bệnh lớn. Triệu chứng trên hoa ban đầu là điểm đen nhỏ sau đó lớn dần và liên kết với nhau làm rụng hoa trước khi đậu quả, làm giảm năng suất đáng kể [4].

Bệnh thán thư trên xoài được ghi nhận gây ra bởi nhiều loài *Colletotrichum* spp. [5]. Trên thế giới, ở đông bắc Brazil phát hiện có năm loài *C. asianum*, *C. fructicola*, *C. tropicale*, *C. karstii* và *C. dianesei* [6], tại Quảng Tây, Trung Quốc, *C. asianum*, *C. fructicola*, *C. siamense* và *C. scovillei* đã được chứng minh là gây ra bệnh thán thư trên xoài [5, 7]...

Tại Việt Nam, bệnh thán thư trên xoài được ghi nhận do *Colletotrichum acutatum*, *C. gloeosporioides* và một loài nấm chưa xác định được tên là *Colletotrichum* sp. [8] gây nên. Theo nghiên cứu Trần Đức Thắng và cs [9] đã ghi nhận thêm loài *C. asianum* thuộc phức hợp loài *C. gloeosporioides* và

<sup>1</sup> Khoa Nông nghiệp - Sinh học ứng dụng, Trường Cao đẳng Kinh tế - Kỹ thuật Cần Thơ

<sup>2</sup> Khoa Nông nghiệp, Trường Đại học Cần Thơ

<sup>3</sup> Bộ môn Nông học, Viện Cây ăn quả miền Nam

\* Email: ltdanh@ctu.edu.vn

một loài đã phát hiện trước là *C. acutatum* là tác nhân gây bệnh thán thư trên xoài. Các chủng này gây hại trên các bộ phận lá, hoa và quả của các giống xoài trồng phổ biến tại các tỉnh phía Nam.

Việc định danh chính xác các loài nấm gây bệnh thán thư trên xoài sẽ giúp cho việc phòng trừ bệnh hiệu quả hơn. Tuy nhiên, chỉ dựa vào đặc điểm hình thái có thể dễ nhầm lẫn trong quá trình định danh loài. Do đó, các đặc điểm hình thái nên được kết hợp với kỹ thuật sinh học phân tử (giải trình tự ADN vùng ITS) nhằm xác định chính xác loài nấm gây bệnh. Ngoài ra, đến nay chưa có một nghiên cứu nào về phân lập và định danh các loài nấm gây bệnh thán thư trên giống xoài Cát Chu. Vì vậy, nghiên cứu được thực hiện nhằm phân lập và định danh các loại nấm gây bệnh thán thư trên trái xoài Cát Chu có độc tính cao ở cấp độ loài dựa vào đặc điểm hình thái và sinh học phân tử.

## **2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**

### **2.1. Vật liệu thí nghiệm**

Xoài Cát Chu bị nhiễm bệnh được thu từ các nhà vườn tại 3 địa điểm: xã An Thới Trung, huyện Cái Bè, tỉnh Tiền Giang (1); xã Hòa An, huyện Chợ Mới, tỉnh An Giang (2); huyện Châu Thành, tỉnh Hậu Giang (3).

Môi trường phân lập Water Agar (WA) (Agar 20 gr, nước cất vừa đủ 1.000 ml) và môi trường làm thuần Potato Dextrose Agar (PDA) (khoai tây 200 g, đường Dextrose 20 g, agar 20 g, chỉnh pH 6,8 và thêm nước cất vừa đủ 1.000 ml).

Hóa chất ly trích ADN, PCR và điện di: CTAB buffer, Chloroform:Isoamyl alcohol (24:1),  $\beta$ -mercaptoethanol, SDS 10%, Proteinase K, RNAase, Isopropanol, Ethanol 70%, TE buffer, Agarose 1%, Loading dye, TAE buffer 1X, Gelred, nước dùng cho PCR, EZ PCR Mix, Phusa 1X PCR buffer, Primer ITS1 (5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG3') và ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3') được dùng để khuếch đại vùng gen ITS với kích thước khoảng 590 bp [10].

### **2.2. Phân lập nấm *Colletotrichum* sp.**

Các trái xoài Cát Chu bị nhiễm bệnh thán thư được thu ở các vườn nông dân thuộc 3 tỉnh Tiền Giang, An Giang và Hậu Giang. Đầu tiên, quan sát triệu chứng hình dạng vết bệnh, soi mẫu tươi để xem khuẩn ty, bào tử nấm. Quá trình phân lập các dòng nấm được thực hiện theo phương pháp của Agrios

(2005) [11] và Burgess và cs (2008) [12]. Rửa sạch quả bị bệnh bằng nước cất và lau khô bằng giấy đã khử trùng để loại bỏ các tạp chất còn sót lại. Chọn mô nằm tiếp giáp giữa mô bệnh và mô khỏe, khử trùng bề mặt mô bằng ethanol 70% khoảng 30-60 giây. Cắt mô thành miếng nhỏ (2×2 mm) sau đó cấy lên môi trường WA (Water Agar). Đặt đĩa cấy ở nhiệt độ 25-28°C trong 2 - 5 ngày. Kiểm tra đĩa cấy hàng ngày, khi nấm phát triển sẽ cấy truyền sang môi trường PDA (Potato Dextrose Agar). Cấy truyền một bào tử nảy mầm để tạo mẫu nấm thuần chủng dùng trong nghiên cứu. Mẫu nấm *Colletotrichum* sp. sau khi thuần sẽ được lây nhiễm trở lại trên quả xoài để đánh giá tính độc của các dòng nấm. Dòng nấm có độc tính cao được định danh dựa vào đặc điểm hình thái và kỹ thuật sinh học phân tử.

### **2.3. Đánh giá khả năng gây hại của các dòng *Colletotrichum* spp. trên trái xoài Cát Chu**

Các dòng nấm *Colletotrichum* spp. được nuôi cấy trên môi trường PDA ở nhiệt độ phòng cho đến khi tạo bào tử. Các bào tử nấm được thu và pha loãng trong nước cất thanh trùng với mật số  $10^6$  bào tử/mL. Các trái xoài Cát Chu chín sinh lý, có kích thước đồng đều, không có vết thương, vỏ trái sạch và không có dấu hiệu bệnh được chọn để tiến hành lây nhiễm nhân tạo. Trước khi lây nhiễm nhân tạo, các trái được rửa sạch dưới vòi nước chảy mạnh, sau đó được nhúng vào trong dung dịch cồn trong 1 phút vớt ra để khô tự nhiên, cuối cùng trái được vô trùng bằng đèn cực tím trong 15 phút để loại bỏ mầm bệnh tiềm ẩn bên ngoài vỏ trái. Các trái được tạo vết thương ở 2 vị trí trên phần má trái bằng cách chụm một bó kim cúc (đường kính lỗ kim 0,5 mm), mỗi vị trí tạo 1 vết thương sâu 2 mm. Khoanh giấy thấm đã tẩm huyền phù bào tử nấm với mật số  $10^6$  bào tử/mL được đặt lên vết thương đã tạo sẵn. Ở công thức đối chứng, huyền phù bào tử nấm được thay bằng nước cất vô trùng.

Thí nghiệm được bố trí theo thể thức hoàn toàn ngẫu nhiên 1 nhân tố (dòng nấm) với mỗi dòng nấm là một nghiệm thức (9 dòng nấm), có 4 lần lặp lại, mỗi lần lặp lại là 5 trái xoài ở giai đoạn chín sinh lý. Các trái được cho vào bọc ni lông có lót bông gòn thấm nước được thanh trùng và ủ trong điều kiện 12 giờ sáng xen kẽ 12 giờ tối ở nhiệt độ 25°C. Quan sát và đo đường kính của vết bệnh từ thời điểm bắt đầu xuất hiện, sau đó cách 2 - 3 ngày/lần.

#### 2.4. Định danh nấm *Colletotrichum* spp.

Các đặc điểm hình thái quan trọng trong phân loại nấm *Colletotrichum* gồm hình dạng, màu sắc và kích thước bào tử được đánh giá trên nấm nuôi cấy trong giai đoạn từ nấm 5 ngày tuổi trên môi trường PDA ở điều kiện 25 - 28°C, chiếu sáng xen kẽ 12 giờ sáng và 12 giờ tối. Để xác định hình dạng đĩa áp tiến hành nuôi cấy trên lam [13] có hiệu chỉnh. Chuẩn bị môi trường PDA, lam kính đã thanh trùng, đặt một mảnh PDA (1 cm<sup>2</sup>) cấy nấm vào 2 góc của mảnh PDA và đặt lam lên khối môi trường đã được cấy nấm, sau đó đặt tất cả vào trong đĩa petri có lót sẵn giấy thấm được tẩm 2,5 mL nước cất thanh trùng. Mẫu được đặt trong điều kiện phòng thí nghiệm đến khi đĩa áp hình thành ở mặt dưới của lam. Chuyển lam sang một lam khác để quan sát đĩa áp dưới kính hiển vi có độ phóng đại X400.

Định danh bằng kỹ thuật phân tử: ADN tổng của nguồn nấm được ly trích trong bộ đệm CTAB và thực hiện phản ứng PCR khuếch đại dựa trên trình tự vùng ITS. Mẫu được nghiền trong CTAB dịch đệm theo phương pháp của Doyle và Doyle (1987) [14] có điều chỉnh. Nấm được nuôi cấy trong môi trường PDA lỏng từ 3-5 ngày, 10 mg tản nấm nghiền trong 1 mL CTAB buffer bằng dụng cụ chày, cối sứ, thêm 10 µL β-mercaptoethanol, 50 µL SDS 10%, 5 µL Proteinase K để phá hủy các liên kết của protein sau đó ly tâm loại bỏ protein. Lọc bỏ cặn bằng Chloroform: Isoamyl alcohol (24: 1). Ủ mẫu trong Isopropanol ở -20°C trong 30 phút. Cặn ADN được rửa 2 lần bằng Ethanol 70%. Làm khô mẫu và trữ trong 30 µl TE buffer.

Phản ứng PCR: Thể tích phản ứng 50 µl gồm 5 µl EZ PCR mix, 40 µl Phusa 1x PCR buffer, 0,5 µl ITS1, 0,5 µl ITS4, 1 µl ADN mẫu và 3 µl nước cất PCR. Phản ứng PCR được thực hiện theo Weir và cs (2012) [15] có điều chỉnh trên máy GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems, Malaysia) với chu trình nhiệt: khởi đầu biến tính ở 95°C trong 5 phút, tiếp theo là 35 chu trình 3 bước gồm: 95°C trong 30 giây (biến tính); 58°C trong 30 giây (bắt cặp); 72°C trong 30 giây (kéo dài). Cuối cùng là 10°C trong 20 phút. Sản phẩm PCR nhuộm với gelred được điện di trên gel agarose 1% trong TAE dịch đệm, chạy trên thiết bị điện di ATTA Compact PAGE-Twin (ATTA, Nhật), hiệu điện thế 85 V trong 35 phút.

Giải trình tự và phân tích trình tự: Các sản phẩm PCR được giải trình tự và so sánh với các trình tự

được công bố trong cơ sở dữ liệu bằng cách sử dụng công cụ tìm kiếm BLAST trên ngân hàng NCBI để xác định loài nấm (BLAST: Basic Local Alignment Search Tool (nih.gov)), sau đó sử dụng chương trình CLUSTAL-W để nhận diện sự sai khác giữa các nucleotide của vùng đoạn gen ITS giữa các chi và loài. Sơ đồ nhánh so sánh mối quan hệ di truyền giữa các loài được thiết lập bằng phương pháp Neighbor-Joining trong phần mềm MEGA 6 [16].

#### 2.5. Phương pháp xử lý số liệu

Tất cả số liệu được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel, phân tích thống kê bằng phần mềm SPSS 22 và kiểm định sự khác biệt qua phép thử DUNCAN.

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

#### 3.1. Phân lập và đánh giá khả năng gây hại của các dòng nấm trên xoài Cát Chu

Quá trình phân lập thu được 9 dòng nấm *Colletotrichum* spp. từ các vết bệnh trên trái xoài Cát Chu thu ở các vườn nông dân thuộc 3 tỉnh Tiền Giang, An Giang và Hậu Giang. Các dòng nấm được đặt tên lần lượt là TG1-TG4, AG1-AG2, HG1-HG3. Triệu chứng cơ bản của bệnh thán thư trên trái xoài với vết bệnh màu nâu đen, hình tròn và hơi lõm. Vết bệnh thường xuất hiện khi vỏ trái chuyển màu từ xanh sang vàng. Sau khi xuất hiện từ 7-8 ngày nhiều vết bệnh liên kết lại tạo thành mảng lớn (Hình 1 A, B). Sau 10 ngày trên vết bệnh xuất hiện ổ bào tử với nhiều cụm ổ bào tử màu vàng cam (Hình 1 C).



**Hình 1. Triệu chứng bệnh thán thư do nấm *Colletotrichum* gây ra trên trái: dòng TG3 (A, B); dòng HG2 (C)**

Sau khi phân lập, các dòng nấm được đánh giá khả năng gây hại trên trái xoài Cát Chu. Kết quả ở bảng 1 cho thấy, có sự khác biệt ý nghĩa qua phân tích thống kê về chiều dài vết bệnh trên trái xoài Cát Chu giữa các nghiệm thức qua tất cả các thời điểm quan sát. Trong đó giai đoạn 2 - 4 ngày sau khi chủng (NSKC) chiều dài vết bệnh tăng chậm, sau đó chiều

dài vết bệnh tăng nhanh. Cụ thể, thời điểm 2 NSKC chiều dài vết bệnh khá thấp, dòng TG4 (chỉ đạt 4,63 mm) tương đương với dòng TG3 (3,98 mm) và cao hơn so với 7 dòng còn lại. Đến thời điểm 4 NSKC chiều dài vết bệnh tăng lên, trong đó dòng nấm TG1 (14,73 mm) có xu hướng vượt trội so với các dòng nấm còn lại. Đặc biệt, sự phát triển vượt bậc của các

dòng nấm được ghi nhận ở 6 NSKC, dòng TG3 và HG2 có chiều dài vết bệnh lần lượt là 30,05 và 30,45 mm, cao hơn các dòng còn lại. Mức độ gây độc của các dòng nấm trên trái xoài Cát Chu tăng cao nhất ở thời điểm 8 NSKC, hai dòng nấm TG3 và HG2 có chiều dài vết bệnh đạt cao lần lượt là 38,48 và 39,58 mm.

**Bảng 1. Chiều dài vết bệnh thân thư trên trái xoài Cát Chu qua các ngày sau khi lây bệnh**

| Dòng nấm            | Chiều dài vết bệnh (mm) |                      |                     |                      |
|---------------------|-------------------------|----------------------|---------------------|----------------------|
|                     | 2 NSKC                  | 4 NSKC               | 6 NSKC              | 8 NSKC               |
| TG1                 | 3,65 <sup>bc</sup>      | 14,73 <sup>a</sup>   | 26,65 <sup>ab</sup> | 34,98 <sup>abc</sup> |
| TG2                 | 2,94 <sup>d</sup>       | 8,20 <sup>c</sup>    | 27,65 <sup>ab</sup> | 33,35 <sup>bc</sup>  |
| TG3                 | 3,98 <sup>ab</sup>      | 9,65 <sup>bc</sup>   | 30,05 <sup>a</sup>  | 38,48 <sup>a</sup>   |
| TG4                 | 4,63 <sup>a</sup>       | 11,55 <sup>abc</sup> | 19,80 <sup>b</sup>  | 36,23 <sup>ab</sup>  |
| HG1                 | 3,95 <sup>b</sup>       | 12,18 <sup>ab</sup>  | 23,38 <sup>ab</sup> | 31,60 <sup>cd</sup>  |
| HG2                 | 3,58 <sup>bc</sup>      | 11,58 <sup>abc</sup> | 30,45 <sup>a</sup>  | 39,58 <sup>a</sup>   |
| HG3                 | 3,46 <sup>bcd</sup>     | 13,15 <sup>ab</sup>  | 26,85 <sup>ab</sup> | 28,53 <sup>de</sup>  |
| AG1                 | 3,21 <sup>cd</sup>      | 10,68 <sup>abc</sup> | 23,20 <sup>ab</sup> | 26,40 <sup>e</sup>   |
| AG3                 | 3,28 <sup>cd</sup>      | 9,73 <sup>bc</sup>   | 23,10 <sup>ab</sup> | 31,93 <sup>cd</sup>  |
| F <sub>(tính)</sub> | **                      | **                   | **                  | **                   |
| CV(%)               | 3,45                    | 8,02                 | 8,01                | 2,65                 |

Ghi chú: Trong cùng một nhóm giá trị trung bình, những giá trị có cùng ký tự sự theo sau khác biệt không có ý nghĩa thống kê; \*\*: có ý nghĩa ở mức  $P \leq 0,01$ .

Trong 9 dòng nấm được khảo sát về mức độ gây độc lên trái xoài Cát Chu, hai dòng nấm TG3 và HG2 có đường kính vết bệnh đạt cao sau 8 ngày lây bệnh nhân tạo và có khác biệt so với các dòng nấm còn lại (Hình 2). Hai dòng nấm này được chọn để định danh dựa vào các đặc điểm hình thái và sinh học phân tử.



**Hình 2. Trái xoài Cát Chu sau 8 ngày lây bệnh nhân tạo: TG3 (A); HG2 (B); đối chứng (C)**

### 3.2. Định danh tác nhân bằng đặc điểm hình thái

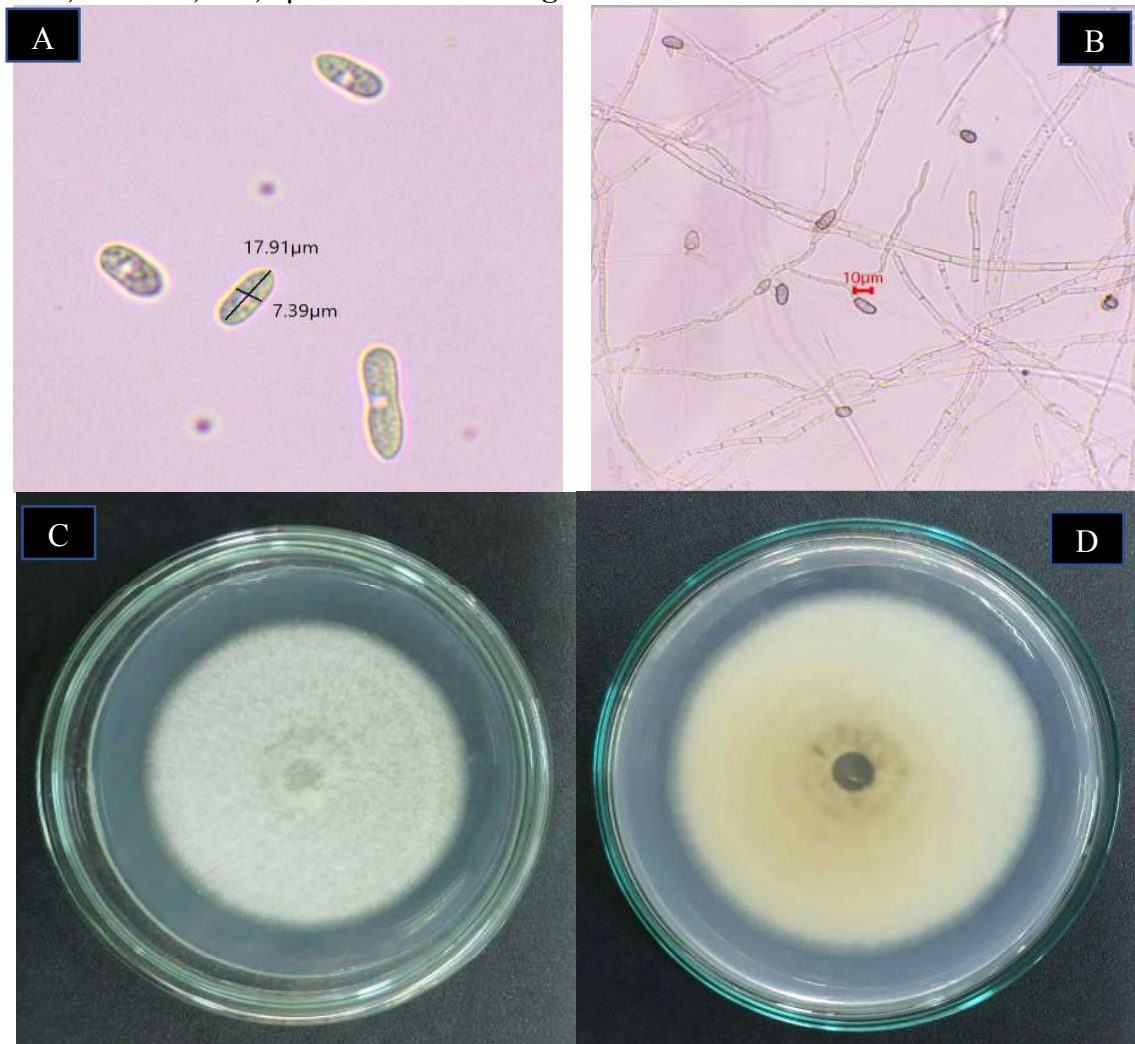
Việc phân loại nấm *Colletotrichum* ở cấp độ loài dựa trên đặc điểm hình thái bao gồm kích thước và hình dạng của bào tử, đĩa áp, sự hiện diện của đĩa đài, gai, hạch nấm và cấu trúc sinh sản cũng như đặc tính sinh trưởng bao gồm tốc độ tăng trưởng và màu sắc

tán nấm [17]. Kết quả quan sát hình thái mặt trên đĩa thạch của dòng TG3 cho thấy tán nấm có màu trắng đến trắng xám, mép tròn đều, mọc nổi và phân bố đều trên đĩa thạch có nhiều vòng tròn đồng tâm, sợi nấm mảnh màu trắng đến xám hay nâu mọc bung. Mặt dưới đĩa thạch có màu trắng hay vàng nhạt có nhiều vòng tròn đồng tâm. Trên mặt tán nấm xuất hiện giọt dầu màu cam chứa bào tử nấm. Đường kính tán nấm sau 7 ngày nuôi cấy là 70 mm (Hình 3). Bào tử hình trụ một đầu cùn một đầu hẹp hay cả hai đầu đều hẹp bên trong có chứa chất nhân màu vàng kích thước trung bình từ  $5 - 17,5 \times 3 - 6,5 \mu\text{m}$ , tương đồng với kết quả nghiên cứu tại Việt Nam về loài *C. gloesporioides* [8]  $7,5 - 20 \times 3,25 - 5 \mu\text{m}$ , bào tử có hình trụ và có dạng thắt eo, có tạo hạch nấm và đĩa áp. Hay nghiên cứu khác về loài *C. gloesporioides* ở Thái Lan [18] là  $4,45 - 15,68 \times 3,5 - 8,19 \mu\text{m}$  và ở Trung Quốc  $10,51 \pm 0,78 \times 5,94 \pm 0,24 \mu\text{m}$  [19]. Đĩa áp có màu nâu nhạt đến nâu hình dạng trứng ngược mép thẳng không phân thùy hoặc xẻ thùy, hình chùy hơi tròn kích thước trung bình từ  $10,75 \pm 0,53 \times 7,5 \pm 0,53 \mu\text{m}$ . Kích thước tương đương với nghiên cứu tại Việt Nam  $6,25 - 17,5 \times 3,75 - 11,25 \mu\text{m}$  [8], tại Trung Quốc [19] là  $8,81 \pm 0,41 \times 5,26 \pm 0,19 \mu\text{m}$ .

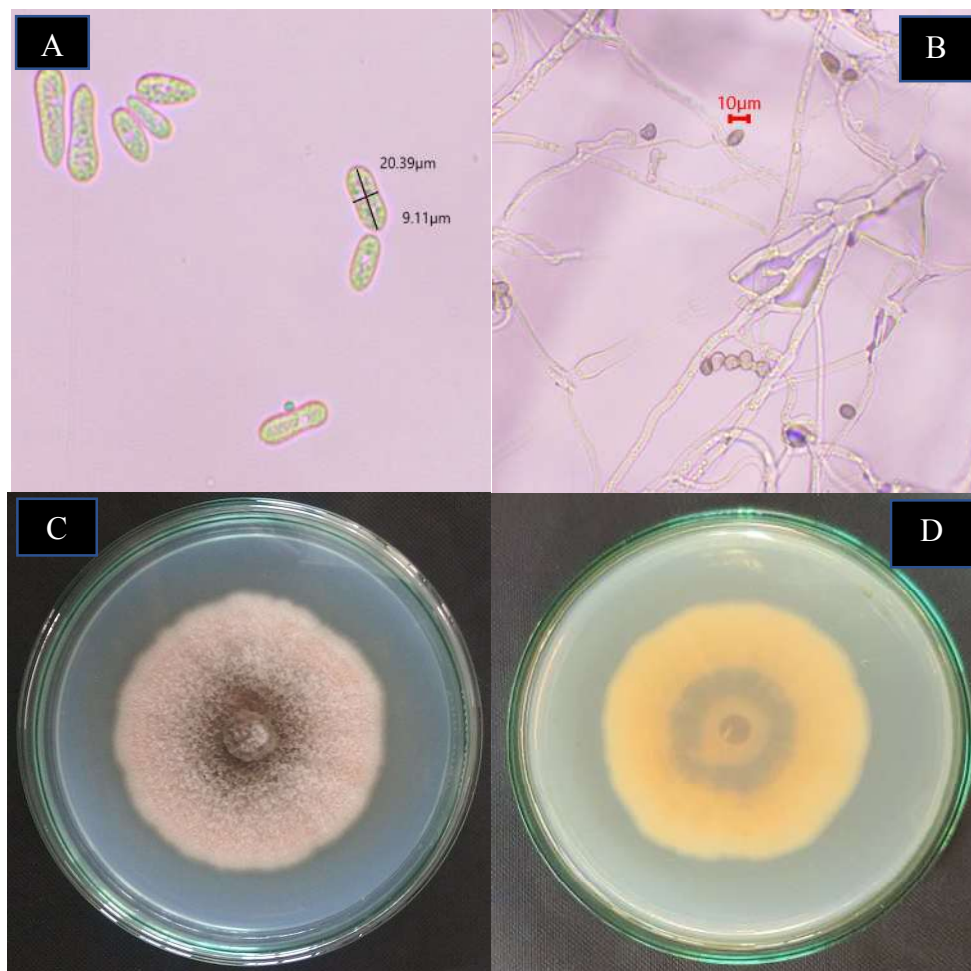
Kết quả quan sát hình thái ghi nhận ở dòng HG2. Mặt trên tản nấm có màu hồng nhạt đến cam, mép hơi gợn sóng, mọc nổi và phân bố đều trên đĩa thạch có nhiều vòng tròn đồng tâm, sợi nấm từ màu hồng đến xám. Mặt dưới đĩa thạch có màu vàng nhạt, có nhiều vòng tròn đồng tâm. Đường kính tản nấm sau 10 ngày nuôi cấy là 60 mm (Hình 4). Bào tử hình trụ một đầu cùn một đầu nhọn hay cả hai đầu đều cùn, kích thước trung bình từ  $5 - 20 \times 3 - 5 \mu\text{m}$ . Đĩa áp có màu nâu nhạt đến nâu hình dạng trứng đến hình chùy, kích thước trung bình từ  $9,37 \pm 0,86 \times 6,37 \pm 0,6 \mu\text{m}$ . Theo Qin và cs (2019) [7] sợi nấm có màu trắng đến xám, mặt dưới tản nấm có màu vàng nhạt đến xanh olive, bào tử của *C. scovillei* có dạng trong suốt, đơn bào, thẳng, hình trụ với cả hai đầu hơi tròn hoặc một đầu tròn và đầu kia hơi nhọn, kích thước  $7,6 - 15,8 \times 3,0 - 4,7 \mu\text{m}$ . Đĩa áp dạng đơn lẻ, hình cầu méo, hình trứng đến chùy, màu nâu nhạt đến đen sẫm, kích thước  $5,9 - 10 \times 4,5 - 7,8 \mu\text{m}$ . Kích thước tương

đương với nghiên cứu của Li và cs (2019) [19] về loài *C. scovillei* là  $7,88 \pm 0,30 \times 5,45 \pm 0,14$  về chiều dài của đĩa áp. Kích thước trung bình của bào tử từ  $11,5 - 25,5 \times 4,0 - 8,2 \mu\text{m}$ . *C. scovillei* có kích thước bào tử ngắn nhất trong phức hợp loài *C. acutatum* [19]. Các đặc điểm hình thái của dòng HG2 được ghi nhận trong nghiên cứu này giống như loài nấm *C. scovillei* được mô tả trong nghiên cứu của Qin và cs (2019) [7], Li và cs (2019) [19].

Qua các đặc điểm về hình thái, bước đầu xác định hai dòng nấm TG3 và HG2 có hình dạng tương đồng lẫn lộn với loài *Colletotrichum gloeosporioides* và *Colletotrichum scovillei*. Tuy nhiên, chỉ dựa vào đặc điểm hình thái không đủ để xác định chính xác ở cấp độ loài, do *Colletotrichum* có nhiều phức hợp loài và chịu tác động của điều kiện môi trường nên cần sử dụng thêm kỹ thuật sinh học phân tử để định danh chính xác loài gây bệnh.



Hình 3. Đặc điểm hình thái dòng nấm TG3: bào tử (A), đĩa áp (B), tản nấm mặt trên (C), mặt dưới (D) sau 7 ngày nuôi cấy trên môi trường PDA

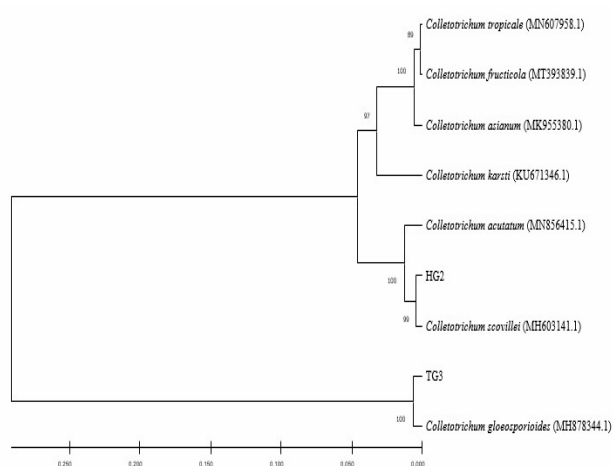


Hình 4. Đặc điểm hình thái dòng nấm HG2: bào tử (A), đĩa áp (B), tản nấm mặt trên (C), mặt dưới (D) sau 10 ngày nuôi cấy trên môi trường PDA

### 3.3. Kết quả định danh bằng giải trình tự ADN

Định danh các loài *Colletotrichum* sp. khi dựa vào hình thái dễ nhầm lẫn do kiểu hình giống nhau, yếu tố môi trường cũng ảnh hưởng lên kiểu hình [20]. Do đó, việc kết hợp đặc điểm hình thái với kỹ thuật sinh học phân tử cho kết quả chính xác hơn khi phân loại. Kết quả giải trình tự gen được so sánh trên NCBI cho thấy trình tự của dòng TG3 tương đồng 100% với trình tự của *Colletotrichum gloeosporioides* với mã số MH878344.1 với kích thước khoảng 575 bp. Tương tự, kết quả giải trình tự của dòng HG2 có kích thước 536 bp với tỷ lệ tương đồng 99% với trình tự ADN của *Colletotrichum scovillei* với mã số MH603141.1 (Hình 5). Từ kết quả phân tích trình tự và kiểm tra trên ngân hàng gen cùng với những đặc điểm hình thái đã ghi nhận thì hai dòng nấm được phân lập trên xoài Cát Chu tương đồng với loài *Colletotrichum gloeosporioides* đối với dòng TG3 và loài *Colletotrichum scovillei* đối với dòng HG2. Trong đó, loài *Colletotrichum gloeosporioides* là loài

gây bệnh phổ biến trên xoài [8, 9, 19, 20] và nhiều loài thực vật trên thế giới. Đối với loài *Colletotrichum scovillei* gần đây có một số nghiên cứu ghi nhận gây bệnh thán thư trên xoài ở miền Nam Trung Quốc...[7, 20].



Hình 5. Cây quan hệ giữa dòng nấm TG3, HG2 với các loài *Colletotrichum* spp.

#### 4. KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu đã phân lập được 2 dòng nấm gây bệnh thán thư và có độc tính cao trên trái xoài Cát Chu là TG3 và HG2. Dựa vào đặc điểm hình thái và trình tự ADN của vùng ITS cho thấy hai dòng nấm TG3 và HG2 trên lần lượt tương đồng với loài *Colletotrichum gloeosporioides* và *Colletotrichum scovillei*. *C. gloeosporioides* là loài nấm phổ biến gây bệnh thán thư trên xoài được ghi nhận ở nhiều nơi trên thế giới và ở Việt Nam, trong khi đó loài *Colletotrichum scovillei* chỉ được ghi nhận trong một số nghiên cứu ở phía Nam Trung Quốc. Do đó, để khẳng định HG2 là loài nấm *C. scovillei* gây bệnh thán thư trên xoài Cát Chu ở đồng bằng sông Cửu Long cần thêm các nghiên cứu về đặc điểm hình thái và giải trình tự ADN của một số vùng đặc trưng trong bộ gen của loài nấm này.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Paull, R. E., & Duarte, O. (2011). *Tropical fruits* (Vol. 1). CABI.
2. Diedhiou, P.M., Mbaye, N. Dramé, A. and Samb, P.I. (2007). Alteration of postharvest diseases of mango *Mangifera indica* through production practices and climatic factors. *African Journal of Biotechnology* 6(9): 1087-1094.
3. Chowdhury, M. N. A., & Rahim, M. A. (2009). Integrated crop management to control anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) of mango. *Journal of Agriculture & Rural Development*, 115-120.
4. Auz, L. F. (2000). Mango anthracnose: Economic impact and current options for integrated management. *Plant disease*, 84(6), 600-611.
5. Mo, J., Zhao, G., Li, Q., Solangi, G. S., Tang, L., Guo, T., & Hsiang, T. (2018). Identification and characterization of *Colletotrichum* species associated with mango anthracnose in Guangxi, China. *Plant disease*, 102(7), 1283-1289.
6. Lima, N. B., de A. batista, M. V., De Moraes, M. A., Barbosa, M. A. G., Michereff, S. J., Hyde, K. D., & Câmara, M. P. S. (2013). Five *Colletotrichum* species are responsible for mango anthracnose in northeastern Brazil. *Fungal Diversity*, 61(1), 75-88.
7. Qin, L. P., Yu, G. M., Zhang, Y., Su, Q., Nong, Q., Huang, S. L., & Xie, L. (2019). First report of anthracnose of *Mangifera indica* caused by *Colletotrichum scovillei* in China. *Plant disease*, 103(5), 1043.
8. Lê Hoàng Lê Thủy và Phạm Văn Kim (2008). Phân loài nấm *Colletotrichum* gây bệnh thán thư trên xoài và sầu riêng tại Đồng bằng sông Cửu Long và thử hiệu lực của sáu loại thuốc đối với các loài nấm này. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 31-40.
9. Trần Đức Thắng, Đào Uyên Trân Đa, Nguyễn Ngọc Linh và Lê Đình Đôn (2019). Nghiên cứu nấm *Colletotrichum* spp. gây bệnh thán thư trên cây xoài.
10. White, T. J., T. Bruns, S. Lee and J. Taylor (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*, 18(1): 315-322.
11. Agrios, G. N. (2005). *Plant Pathology*. Elsevier.
12. Burgess, L. W., Phan, H. T., Knight, T. E., & Tesoriero, L. (2008). *Diagnostic manual for plant diseases in Vietnam* (No. LC-0362). Australian Centre for International Agricultural Research, Aciar.
13. Waller J. M., Ritchie and M. Holderness (1998). *Plant Clinic Handbook*, pp. 94.
14. Doyle, J.J. and J.L. Doyle (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19:11-15.
15. Weir, B., P. Johnston and U. Damm, 2012. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. *Studies in Mycology*, 73:115-180.
16. Tamura, K., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski and S. Kumar, 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30: 2725-2729.
17. Hyde, K. D., Cai, L., McKenzie, E. H. C., Yang, Y. L., Zhang, J. Z., & Prihastuti, H. (2009). *Colletotrichum*: a catalogue of confusion. *Fungal Diversity*, 39(1), 1-17.
18. Umroong, P. (2019). Ultrastructure studies of fungus *Colletotrichum gloeosporioides* cause of Anthracnose disease of mango by microscope technique. *Microscopy and Microanalysis Research- The Journal of The Microscopy Society of Thailand*, 32(2), 1-5.

19. Li, Q., Bu, J., Shu, J., Yu, Z., Tang, L., Huang, S., & Hsiang, T. (2019). *Colletotrichum* species associated with mango in southern China. *Scientific reports*, 9(1), 1-10.
20. Cai, L., Hyde, K. D., Taylor, P. W. J., Weir, B., Waller, J., Abang, M. M., ... & Prihastuti, H. (2009). A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. *Fungal Diversity*, 39(1), 183-204.
21. Kamle, M., Kumar, P., Gupta, V. K., Tiwari, A. K., Misra, A. K., & Pandey, B. K. (2013). Identification and phylogenetic correlation among *Colletotrichum gloeosporioides* pathogen of anthracnose for mango. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2(3), 285-287.

**FUNGI (*Colletotrichum* spp.) CAUSING HIGHLY PATHOGENIC ANTHRACNOSE DISEASE ON CAT CHU MANGO IN MEKONG DELTA**

**Chau Trung Duong, Nguyen Thi Nhu Y, Nguyen Thi Thu Nga,**

**Doan Thi Kieu Tien, Nguyen Thi Ngoc Truc, Luu Thai Danh**

**Summary**

Anthrachnose is a disease that severely damages the yield and quality of mangoes. The disease attacks fruits from early development to harvest, and also appears on leaves, stems and flowers. The causative agent is different fungal species belonging the same genus *Colletotrichum* with similarly morphological characteristics, therefore it is difficult to identify the exact species causing the disease based on the symptoms of disease and the morphological characteristics of fungi. To help for the effective prevention and control of anthracnose on Cat Chu mango fruits, it is very important to accurately identify the disease-causing fungus. The study was conducted to isolate the pathogenic fungi on Cat Chu fruits collected from some provinces in Mekong Delta, then identify the disease causing agent based on both morphological characteristics and DNA sequencing of ITS region. Nine harmful fungal strains were isolated, of which two highly toxic strains were designated as TG3 and HG2. Based on the morphological characteristics and comparing the ITS region sequences with the data on the Gene Bank by BLAST software, TG3 isolate is similar to *Colletotrichum gloeosporioides* and HG2 isolate is similar to *Colletotrichum scovillei*.

**Key words:** *Mango, anthracnose, Colletotrichum gloeosporioides, Colletotrichum scovillei.*

**Người phản biện:** PGS.TS. Trịnh Xuân Hoạt

**Ngày nhận bài:** 15/7/2022

**Ngày thông qua phản biện:** 18/8/2022

**Ngày duyệt đăng:** 6/9/2022