

ĐỊNH DANH *Phytophthora palmivora* GÂY BỆNH TRÊN GIỐNG SẦU RIÊNG MONTHONG (*Durio zibethinus* L. ‘Monthong’) BẰNG ĐẶC ĐIỂM HÌNH THÁI VÀ SINH HỌC PHÂN TỬ

Võ Thị Ngọc Hà^{1,*}, Hồ Minh Cường^{1,2}, Đỗ Hồng Khanh¹

¹ Khoa Nông học, Trường Đại học Nông Lâm thành phố Hồ Chí Minh

² Công ty TNHH ViDan, thành phố Hồ Chí Minh

*Email: ha.vothingoc@hcmuaf.edu.vn

TÓM TẮT

Bệnh do *Phytophthora palmivora* gây ra trên sầu riêng ngày càng diễn biến phức tạp và khó kiểm soát, trong khi việc xác định chính xác tác nhân gây bệnh còn gặp nhiều khó khăn. Trong nghiên cứu này, các chủng *P. palmivora* được phân lập từ các mẫu thân, trái sầu riêng giống Monthong bị bệnh và đất canh tác sầu riêng có triệu chứng vàng lá thối rữa tại một số tỉnh phía Nam trong năm 2023. Các chủng phân lập *P. palmivora* được định danh dựa trên đặc điểm hình thái và kiểm chứng là tác nhân gây bệnh theo chu trình Koch. Sau đó, sử dụng sản phẩm PCR với các mồi đặc hiệu Yph1F/Yph2R của vùng gen Ypt1 và mồi GUPal6fw/GUPal8rv của vùng gen GUP để xác định đến loài tác nhân gây bệnh. Tổng cộng có 20 chủng *P. palmivora* được phân lập, bào tử của tất cả các chủng này đều có 1 cuống cắt hoặc nửa bán cầu rõ ràng với kích thước trung bình $4,37 \pm 1,75 \mu\text{m}$. Bào tử hậu hình tròn với kích thước trung bình $31,63 - 47,93 \mu\text{m}$. Túi bào tử hình quả lê ngược, hình oval, hình elip và hình trứng có kích thước trung bình $37,00 - 64,75 \times 27,25 - 45,75 \mu\text{m}$, tỷ lệ D/R dao động 1,13 - 1,87. Sản phẩm PCR vùng gen Ypt1 và GUP của các chủng phân lập *P. palmivora* có kích thước lần lượt là 450 - 470 bp và 150 bp. Trong đó, trình tự vùng gen Ypt1 của 7 chủng *P. palmivora* là DL1, LD1, DN3, DNg, GL3, TG2, Btr1 tương đồng với chủng *P. palmivora* (KU645765.1) từ 99 - 100% với độ bao phủ đạt trên 99%.

Từ khoá: Sầu riêng, *Phytophthora palmivora*, hình thái, gen Ypt1, gen GUP.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Tính đến hết năm 2023, diện tích trồng sầu riêng tại Việt Nam là hơn 150.000 ha, trong đó giống sầu riêng Ri6 và Monthong chiếm gần 60% tổng diện tích canh tác. *Phytophthora palmivora* là đối tượng gây hại quan trọng nhất trên các vùng trồng sầu riêng trên thế giới và ảnh hưởng trực tiếp đến năng suất, chất lượng trái gây thiệt hại nặng tại Thái Lan, Indonesia, Philippines, Malaysia và Việt Nam [1]. *P. palmivora* tấn công ở tất cả thời kỳ sinh trưởng và gây vàng lá, thối rễ, thối lá, thối trái và nứt thân xì mủ, làm giảm năng suất tới 20 - 25% [2], giảm chất lượng trái và có thể làm chết cây.

Hiện nay, biện pháp hoá học được sử dụng rộng rãi trong việc phòng trừ. Tuy nhiên, nhiều loại thuốc trừ nấm không có hiệu lực đối với

Phytophthora spp.. Do *Phytophthora* spp. thuộc nhóm omycetes, khác biệt đối với nhóm nấm thật trên nhiều đặc điểm quan trọng như vòng đời, cấu tạo màng tế bào và thành tế bào, con đường trao đổi chất và mức độ nhạy cảm với các hoạt thuốc trừ nấm. Nhiều loài *Phytophthora* spp. không nhạy cảm với thuốc diệt nấm DMI (Sterol Demethylation Inhibitor) nhưng nhạy cảm với thuốc diệt nấm Phenylamide (PA), QoI (Quinone Outside Respiration Inhibitors) và CAA (Carboxylic axit Amide Fungicides) [3]. Do đó, nếu không xác định chính xác loài *Phytophthora* spp. gây bệnh có thể hạn chế hiệu quả của loại thuốc sử dụng.

Việc định danh bằng đặc điểm hình thái đối với các *Phytophthora* spp. thường không cho kết

quả chính xác vì đặc điểm hình thái thường không đồng nhất và phụ thuộc vào loài, điều kiện nuôi cấy và bị ảnh hưởng bởi điều kiện môi trường [4]. Trình tự vùng lặp lại không mã hoá ITS (Internal Transcribed Spacer) trong RNA ribosome đã được sử dụng rộng rãi để phát hiện và xác định các loài *Phytophthora* [5]. Tuy nhiên, trình tự vùng ITS không đủ nhạy để phân tách các đơn vị phân loại có quan hệ gần gũi [6, 7]. Mỗi đặc hiệu cho vùng gen mã hóa protein liên quan đến hoạt động sống của tế bào Ras (Ypt1) đã được thiết kế để nhận biết và phân biệt các loài *Phytophthora* và không thay đổi trong cùng một loài [6], trong khi vùng gen GUP chỉ đặc trưng cho loài *P. palmivora* [8].

Trước diễn biến phức tạp của bệnh hại trên cây sầu riêng do diện tích canh tác tăng nhanh trong những năm gần đây, việc phát hiện chính xác tác nhân gây bệnh là một trong những yếu tố quan trọng quyết định hiệu quả của việc phòng trừ. Do vậy, nghiên cứu này đã tiến hành thu mẫu bệnh thối trái, nứt thân xì mủ trên giống sầu riêng Monthong và đất canh tác cây sầu riêng Monthong có triệu chứng vàng lá, thối rễ tại các vùng trồng sầu riêng ở khu vực phía Nam gồm các tỉnh: Tiền Giang (TG), Bến Tre (Btr), Đồng Nai (DN), Lâm Đồng (LD), Đắk Nông (DNg), Đắk Lắk (DL) và Gia Lai (GL), phân lập, định danh tác nhân gây bệnh dựa trên đặc điểm hình thái và sản phẩm khuếch đại vùng gen *Ypt1* và *GUP*, đồng thời phân tích cây phát sinh loài dựa trên trình tự vùng gen *Ypt1* của một số chủng *P. palmivora* đại diện cho từng vùng canh tác.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Mẫu bệnh trên cây sầu riêng Monthong (đất, mô thân và trái) được thu thập tại tỉnh Tiền Giang, Bến Tre, Đồng Nai, Lâm Đồng, Đắk Nông, Đắk Lắk và Gia Lai (Bảng 1). Môi trường *Phytophthora* Selective Medium (PSM gồm: 20 g cà rốt, 20 g khoai tây, 15 g agar, hoá chất pimarin, rifampicin, hymexazol lần lượt là 10 µg/mL, 50 µg/mL, 50 µg/mL và 1.000 mL nước cất); Potato Carrot Agar (PCA gồm: 20 g cà rốt, 20 g khoai tây, 20 g agar và 1.000 mL nước cất) và Water Agar (WA gồm: 20 g agar và 1.000 mL nước cất).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phân lập *P. palmivora* gây bệnh trên cây sầu riêng

Mẫu bệnh trên cây sầu riêng Monthong được thu thập theo TCVN 13268- 4:2021 [9].

Phân lập tác nhân gây bệnh từ mẫu đất được thực hiện theo phương pháp bẫy cánh hoa hồng của Drenth và Sendall (2001) [10]. Phân lập tác nhân từ mẫu thân và trái bị bệnh theo phương pháp của Burgess và Knight (2009) [11] sử dụng môi trường PSM. Các đĩa petri được đặt trong tủ định ôn 28°C trong thời gian 2 - 4 ngày, quan sát và cấy chuyển đỉnh hệ sợi sang môi trường PCA. Các chủng phân lập được làm thuần trên môi trường WA bằng phương pháp tách đỉnh sợi nấm đơn.

Tác nhân gây bệnh được xác định dựa trên đặc điểm hình thái của tản sợi trên môi trường PCA, hình thái túi bào tử, chlamydospore và xác định loài dựa theo khoá phân loại của Drenth và Sendall (2001) [10] và Gallegly và Hong (2008) [12].

2.2.2. Lây nhiễm nhân tạo

Nhằm kiểm tra khả năng gây bệnh và khẳng định tác nhân gây bệnh của các chủng *P. palmivora* đã phân lập được, tiến hành lây bệnh nhân tạo trên trái đối với các chủng phân lập từ trái, trên thân cây sầu riêng Monthong đối với các chủng phân lập từ mô thân và lây nhiễm vào đất trồng cây sầu riêng Monthong đối với các chủng phân lập từ đất theo chu trình Koch.

Các trái sầu riêng Monthong già (110 - 115 ngày sau đậu trái) vỏ xanh, không nhiễm bệnh và có thời gian cách ly thuốc hoá học tối thiểu 14 ngày được thu thập và dùng bông gòn thấm nước bọc cuống để giữ cho trái được tươi trong quá trình thực hiện thí nghiệm chủng Koch. Các trái được rửa sạch dưới vòi nước và sát khuẩn bề mặt bằng cồn 70%, sau đó đặt khoanh tán nấm *P. palmivora* (3 × 3 cm) lên bề mặt trái và nhỏ 20 µL nước cất vô trùng lên khoanh tán nấm. Mỗi trái đặt 2 khoanh tán sợi của cùng 1 chủng phân lập *P. palmivora* về hai phía của trái và đặt trái đựng đứng trong túi nilon có khoanh bông gòn thấm nước tạo độ ẩm.

Đối với thân cành sử dụng cây giống sầu riêng Monthong 1 năm tuổi, chọn vị trí cách chồi đang phân nhánh từ 5 - 10 cm và lau sạch bằng nước cất vô trùng, sau đó sát khuẩn bằng cồn 70%. Tiếp áp

khoanh tẩn nấm *P. palmivora* (3 × 3 cm) vào vị trí đã được sát khuẩn và nhỏ 20 µL nước cất vô trùng lên khoanh tẩn nấm và được cố định khoanh tẩn sợi bằng parafilm.

Đối với chủng bệnh vào đất ,chọn những cây giống sầu riêng Monthong 1 năm tuổi tiến hành bón phân, phun thuốc kích thích ra rễ cho cây. Các chủng phân lập *P. palmivora* được nhân nuôi trên vỏ trấu và hạt kê [11] rồi trộn với đất sạch tribat đã được hấp khử trùng (50 g cho 1 kg đất) và trồng cây giống sầu riêng, tạo độ ẩm liên tục cho cây.

Mẫu trái và thân cây đối chứng thực hiện tương tự, sử dụng thạch agar (WA) vô trùng thay thế cho nguồn bệnh, còn cây đối chứng chủng bệnh lên rễ chỉ dùng nước tưới gốc. Trái được bảo quản ở nhiệt độ phòng 28°C ± 2°C, cây sầu riêng được tưới nước và chăm sóc tại nhà lưới tại Khoa Nông học, Trường Đại học Nông Lâm thành phố Hồ Chí Minh với tổng diện tích 1.000 m² trong điều kiện nhiệt độ 28°C ± 2°C, ẩm độ 80 ± 3%, chiếu sáng 12 giờ/ngày. Sau 7 ngày tiến hành đánh giá sự hiện diện của triệu chứng bệnh trên trái và thân và 30 ngày trên rễ.

2.2.3. Chiết tách ADN, thực hiện phản ứng PCR và giải trình tự

ADN được tách chiết bằng bộ kit của Công ty TNHH ABT theo quy trình của nhà sản xuất. Phản ứng PCR khuếch đại vùng gen *Ypt1* sử dụng mỗi Yph1F (3'-CGACCATKGGTGTGGACTTT-5') và Yph2R (5'-ACGTTCTCMCAGGCGTATCT -5') ở điều kiện 95°C trong 2 phút và 35 chu kỳ (94°C trong 30 giây; 58°C trong 45 giây; 72°C trong 30 giây và 72°C trong 10 phút [4]. Phản ứng PCR khuếch đại vùng gen *GUP* bằng cặp mỗi GUPal6fw (3'-CTTCAGCTGTGGTGGTATGATT) và GUPal8rv (5' CATGCCGAAGCATACACAAG-3') ở điều kiện 95°C trong 5 phút và 35 chu kỳ (95°C trong 30 giây; 65°C trong 30 giây; 72°C trong 1 phút và 72°C trong 10 phút) [8].

Mỗi phản ứng PCR có dung tích 25 µL gồm 2 µL ADN khuôn mẫu (100 ng/µL), 2 µL (10 µM) cho mỗi mỗi xuôi và mỗi ngược, 12,5 µL MyTaq và 6,5 µL nước siêu sạch. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1% có bổ sung chất nhuộm redsafe với nồng độ 5 µL/100 mL và được chụp ảnh bằng hệ thống chụp gel UV. Sản phẩm PCR

vùng gen *Ypt1* của 7 chủng phân lập DL1, LD1, DN3, DNg, GL3, TG2, Btr1 được tinh sạch và gửi đi giải trình tự tại Công ty TNHH GenLab, thành phố Hà Nội.

2.2.4. Phân tích trình tự và xây dựng cây phát sinh loài

Trình tự ADN được chỉnh sửa bằng phần mềm Bio Edit với phần đầu và phần cuối trình tự không rõ ràng được loại bỏ. Dựa vào trình tự thu được, so sánh với các trình tự sẵn có trên cơ sở dữ liệu trong ngân hàng gen bằng phần mềm trực tuyến BLAST tại NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Cây phả hệ được xây dựng bằng phương pháp Neighbor - Joining trong phần mềm MEGA11. 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).

2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện từ tháng 11/2023 - 2/2024 tại Phòng Thí nghiệm Bệnh cây, Bộ môn Bảo vệ Thực vật, Khoa Nông học, Trường Đại học Nông Lâm thành phố Hồ Chí Minh.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân lập *P. palmivora* gây bệnh trên cây sầu riêng Monthong



Hình 1. Triệu chứng bệnh thu thập trên cây sầu riêng Monthong tại tỉnh Lâm Đồng

Chú thích: A. Triệu chứng vàng lá thối rễ; B: Triệu chứng bệnh trên thân; C: Triệu chứng bệnh trên trái.

Mẫu bệnh nứt thân xì mủ được thu thập từ phần thân có vỏ đổi màu và rỉ ra dịch màu hơi đỏ nâu và phần mạch dẫn của cây hoá nâu. Mẫu bệnh thối trái được thu thập từ những trái vết bệnh ướt

sùng nước ở giữa có màu nâu sáng và bên ngoài có màu đen. còi cọc không phát triển và kiểm tra rễ non bị thối sượng màu trắng và mẫu đất được lấy từ những cây có hiện tượng rụng lá, lá chuyển vàng héo, cây

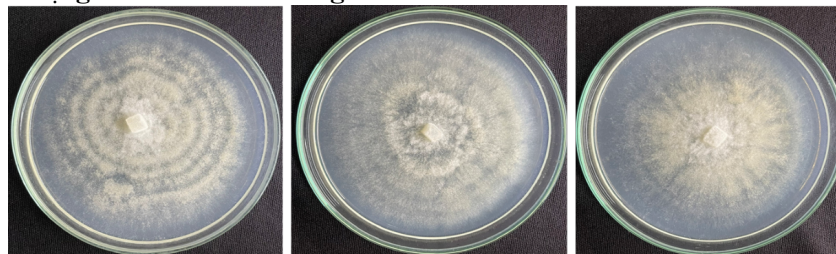
Bảng 1. Địa điểm thu thập mẫu bệnh trên cây sầu riêng Monthong

STT	Kí hiệu mẫu	Địa điểm thu mẫu	Toạ độ	Vị trí thu mẫu
1	TG1	Xã Ngũ Hiệp – huyện Cai Lậy – tỉnh Tiền Giang	10°17'24.9"N 106°06'57.7"E	Trái
2	TG2	Xã Hoà Khánh – huyện Cái Bè – tỉnh Tiền Giang	10°22'51.9"N 105°59'08.5"E	Đất
3	TG3	Xã Long Khánh – huyện Cai Lậy – tỉnh Tiền Giang	10°37'37.3"N 106°12'28.3"E	Mô thân
4	Btr1	Xã Hoà Nghĩa – huyện Chợ Lách – tỉnh Bến Tre	10°14'11.3"N 106°08'56.3"E	Đất
5	Btr2	Xã Tấn Phú – huyện Châu Thành – tỉnh Bến Tre	10°16'23.6"N 106°09'41.8"E	Mô thân
6	DN	Phường Bình Lộc – thành phố Long Khánh – tỉnh Đồng Nai	10°58'50.9"N 107°14'31.0"E	Trái
7	DN3	Xã Sông Ray – huyện Cẩm Mỹ - tỉnh Đồng Nai	10°74'17.9"N 107°34'94.0"E	Mô thân
8	DN4	Xã Xuân Định – huyện Xuân Lộc – tỉnh Đồng Nai	10°52'15.8"N 107°15'57.0"E	Mô thân
9	LD	Xã Hà Lâm – huyện Đạ Huoai – tỉnh Lâm Đồng	11°24'02.9"N 107°36'28.5"E	Trái
10	LD1	Xã Đạ Oai – huyện Đạ Huoai – tỉnh Lâm Đồng	11°25'28.7"N 107°29'47.1"E	Mô thân
11	LD4	Xã Lộc Thành – huyện Bảo Lâm – tỉnh Lâm Đồng	11°32'59.0"N 107°51'14.4"E	Đất
12	LD7	Xã Hoà Nam – huyện Di Linh – tỉnh Lâm Đồng	11°28'06.6"N 107°54'12.7"E	Mô thân
13	DL	Xã Ea Yông – huyện Krông Pắc – tỉnh Đắk Lắk	12°41'11.4"N 108°16'21.6"E	Trái
14	DL1	Xã Ea Nam – huyện Ea H'Leo – tỉnh Đắk Lắk	13°09'40.4"N 108°10'42.4"E	Trái
15	DL2	Xã Pong Drang – huyện Krông Búk – tỉnh Đắk Lắk	12°58'58.0"N 108°12'33.0"E	Mô thân
16	GL2	Xã Ia Ka - huyện Chư Pưh – tỉnh Gia Lai	13°27'59.4"N 108°06'13.9"E	Mô thân
17	GL3	Xã Bình Giáo – huyện Chư Prông – tỉnh Gia Lai	13°49'21.0"N 107°52'00.4"E	Trái
18	DNg	Xã Thuận Hạnh – huyện Đắk Song – tỉnh Đắk Nông	12°17'05.7"N 107°29'41.6"E	Trái
19	DNg1	Xã Đắk Nia – thành phố Gia Nghĩa - tỉnh Đắk Nông	11°57'50.2"N 107°43'14.1"E	Đất
20	DNg2	Xã Đức Mạnh – huyện Đắk Mil – tỉnh Đắk Nông	12°33'49.4"N 107°46'45.6"E	Trái

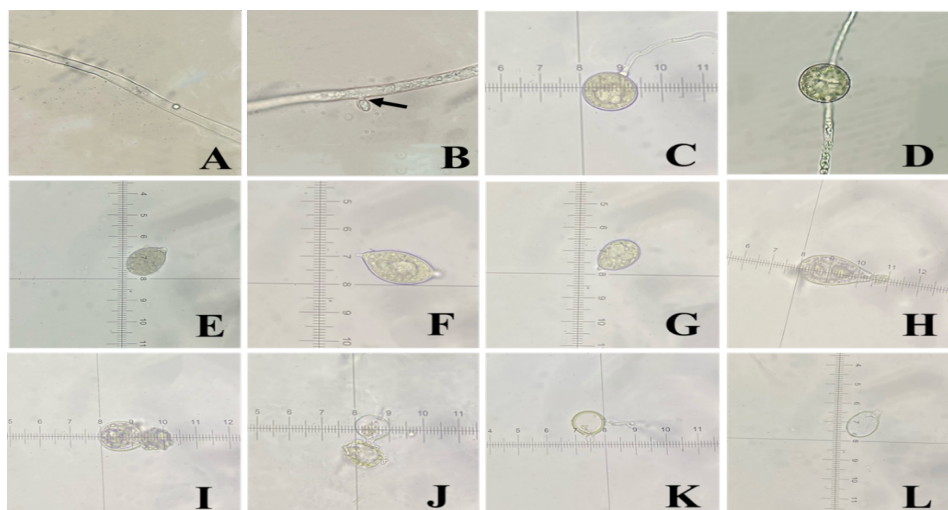
3.2. Xác định *P. palmivora* dựa vào đặc điểm hình thái

Hình thái tản nấm trên môi trường PCA là dạng hoa hồng và dạng hình sao có các vòng tròn

đồng tâm. Tản nấm có màu trắng đục đến hơi ngà, mọc sát mặt thạch hoặc hơi bung (Hình 2). Sợi nấm trong suốt, thon dài, thuôn đều, không có vách ngăn và phân nhánh vuông góc (Hình 3A, B).



Hình 2. Đặc điểm hình thái tản nấm của *P. palmivora* trên môi trường PCA sau 7 ngày sau cấy ở nhiệt độ $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$



Hình 3. Hình thái của *P. palmivora* quan sát dưới kính hiển vi với độ phóng đại 40X

Chú thích: A – B: Hình thái sợi nấm; C – D: Bào tử hậu (*Chlamydospore*); E – H: Túi bào tử (*Sporangium*); I – J: Túi bào tử đang phóng thích bào tử động; K – L: Túi bào tử rỗng sau khi phóng thích bào tử động.

Bào tử hậu hình thành ở cuối hoặc giữa sợi nấm, có hình tròn, thành mép nhăn và kích thước trung bình $31,63 - 47,93 \mu\text{m}$ (Hình 3C, D). Bào tử có 1 cuống ngắn rõ ràng, dính trên đỉnh sợi nấm và kích thước trung bình $4,37 \pm 1,75 \mu\text{m}$, dạng cuống cụt hoặc nửa bán cầu. Túi bào tử dạng hình quả lê ngược, hình oval, hình elip, hình trứng và túi bào tử có hình elip chiếm đa số; kích thước trung bình $37,00 - 64,75 \times 27,25 - 45,75 \mu\text{m}$, tỷ lệ chiều dài/chiều rộng (D/R) dao động $1,13 - 1,87$. Túi bào tử rụng nhiều trong nước, chiều dài cuống rụng trung bình $4,66 \pm 2,69 \mu\text{m}$. Bào tử động được phóng ra ngoài thông qua lỗ phóng, kích thước

trung bình đạt $5,11 \pm 1,66 \mu\text{m}$, không hình thành túi tương phòng và bào tử động có 2 lông roi ở 2 đầu.

Wibowo và cs (2019) [8] mô tả rằng, *P. palmivora* có kích thước bào tử hậu dao động $25,27 - 44,95 \mu\text{m}$, kích thước túi bào tử $34,68 - 68,55 \mu\text{m} \times 25,64 - 43,68 \mu\text{m}$, tỷ lệ D/R dao động $1,17 - 1,89$. Trong khi đó, Abad và cs (2023) [13] ghi nhận *P. palmivora* có hình thái sợi nấm hình cầu, cần hình cầu, thon dài và có hình dạng không đều. Bào tử có cuống ngắn hình cầu. Túi bào tử có hình cầu, hình trứng, hình elip hoặc hình dạng không đều với kích thước $(27 - 70 \times 21 - 46 \mu\text{m})$ có nguồn gốc

từ các bào tử đối xứng đơn. Bào tử hậu hình cầu hoặc cận cầu $16 - 50 \times 16 - 45 \mu\text{m}$, hình thành ở cuối hoặc giữa sợi nấm.

So sánh các đặc điểm hình thái của các chủng phân lập được trong nghiên cứu này với các mô tả trong các khóa phân loại của Drenth và Sendall (2001) [10], Gallegly và Hong (2008) [12], Wibowo và cs (2019) [8] và Abad và cs (2023) [13] cho phép xác định các chủng phân lập được từ các mẫu trái, thân cây sầu riêng Monthong bị bệnh và đất

canh tác cây sầu riêng Monthong có triệu chứng vàng lá thối rã là *P. palmivora*.

3.3. Lây nhiễm nhân tạo

Các chủng *P. palmivora* được phân lập từ trái sầu riêng thể hiện khả năng gây bệnh cao, các trái sầu riêng được chủng bệnh xuất hiện triệu chứng sau 3 ngày lây nhiễm. Các chủng phân lập từ thân gây ra triệu chứng bệnh trên thân cây sau 7 ngày lây nhiễm và các chủng phân lập từ đất biểu hiện triệu chứng sau 30 ngày lây nhiễm.

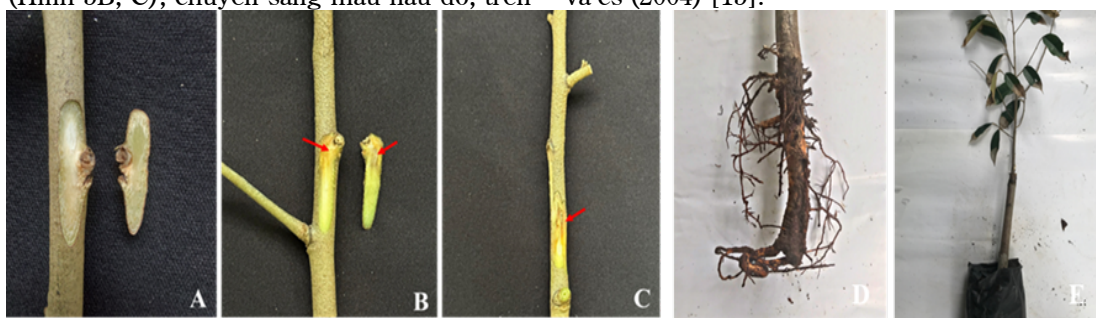


Hình 4. Lây nhiễm nhân tạo trên trái sầu riêng Monthong sau 7 ngày

Đối chứng (A); lây nhiễm chủng P. palmivora DL (B) và chủng P. palmivora DN (C)

Trên trái sau 3 ngày lây nhiễm xuất hiện những đốm chuyển dần từ nâu sang đen sẫm và sau đó lan rộng rất nhanh, quanh vết bệnh xuất hiện những quang vàng và xuất hiện sợi nấm màu trắng xung quanh (Hình 4B, C), trong khi trên trái đối chứng không có biểu hiện của bệnh (Hình 4A). Triệu chứng trên cành xuất hiện sau 7 ngày lây nhiễm, ban đầu vết ướt trên bề mặt vỏ có dịch màu nâu đỏ, khi bóc vỏ ra khỏi mô vỏ và gỗ mất màu kem (Hình 5B, C), chuyển sang màu nâu đỏ, trên

thân cây đối chứng gỗ vẫn giữ nguyên màu kem (Hình 5A). Đối với các nghiệm thức lây nhiễm nguồn bệnh vào đất, cây sầu riêng Monthong có triệu chứng sau 30 ngày lây nhiễm, lá hơi vàng và rụng nhiều, chóp lá bị cháy, rễ bị mềm, thối có màu nâu, vỏ rễ bị tuột ra (Hình 5D, E) giống với triệu chứng khi thu mẫu. Triệu chứng gây hại tương tự mô tả trên trái, thân cành và rễ do *P. palmivora* của Lim và Chan (1986) [14] và O'Gara và cs (2004) [15].



Hình 5. Lây nhiễm nhân tạo trên sầu riêng Monthong 1 năm tuổi

Đối chứng (A), lây nhiễm P. palmivora chủng DL2 (B), chủng TG3 (C), chủng LD4 (D, E)

Các vị trí biểu hiện triệu chứng trên trái, thân cành sầu riêng và phần rễ đối với nghiệm thức

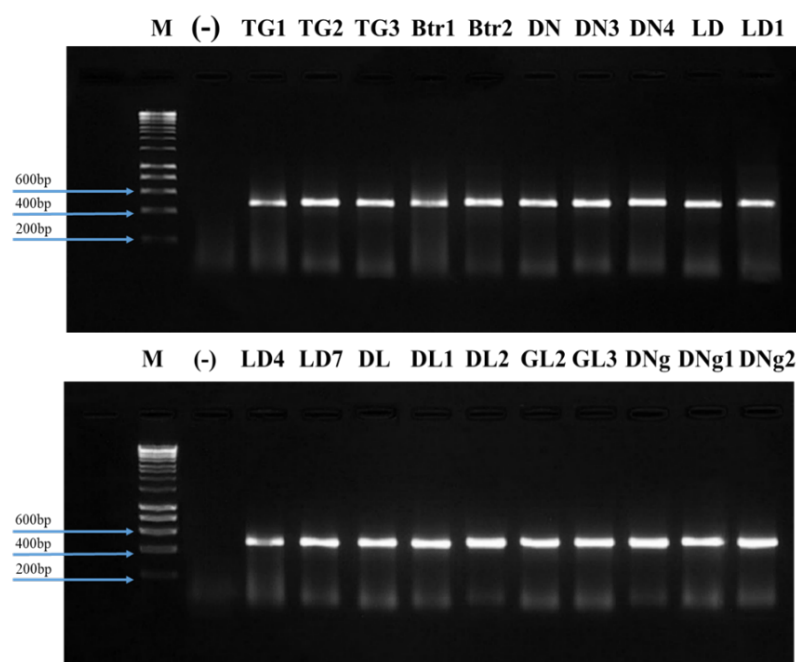
chủng bệnh trong đất do lây nhiễm nhân tạo đều được tái phân lập trên môi trường PCA và sau đó

quan sát dưới kính hiển vi điện tử thu được kết quả tương tự về đặc điểm hình thái tản nấm, bào tử, túi bào tử và bào tử hậu đúng với chủng sử dụng trước khi lây nhiễm.

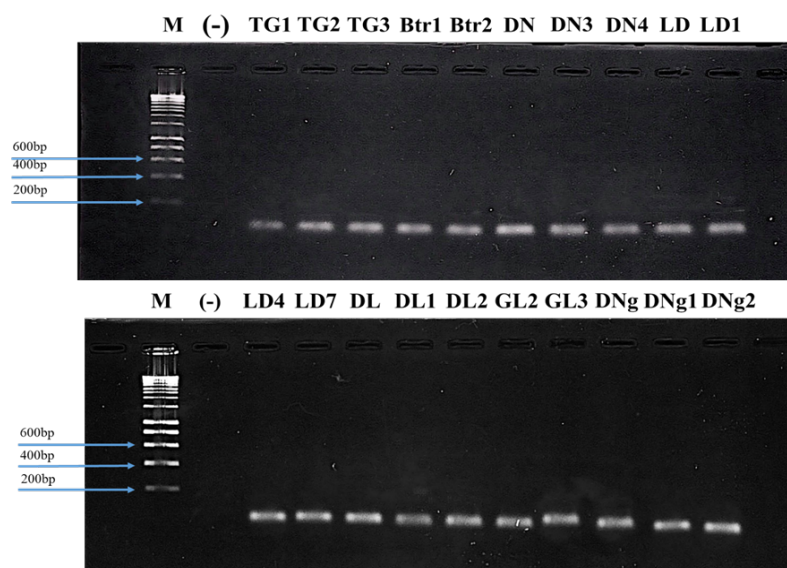
Kết quả chủng bệnh nhân tạo theo chu trình Koch khẳng định, 20 chủng *P. palmivora* phân lập

được trong nghiên cứu này là tác nhân gây bệnh thối trái, nứt thân xì mù và vàng lá, thối rễ trên cây sầu riêng Monthong.

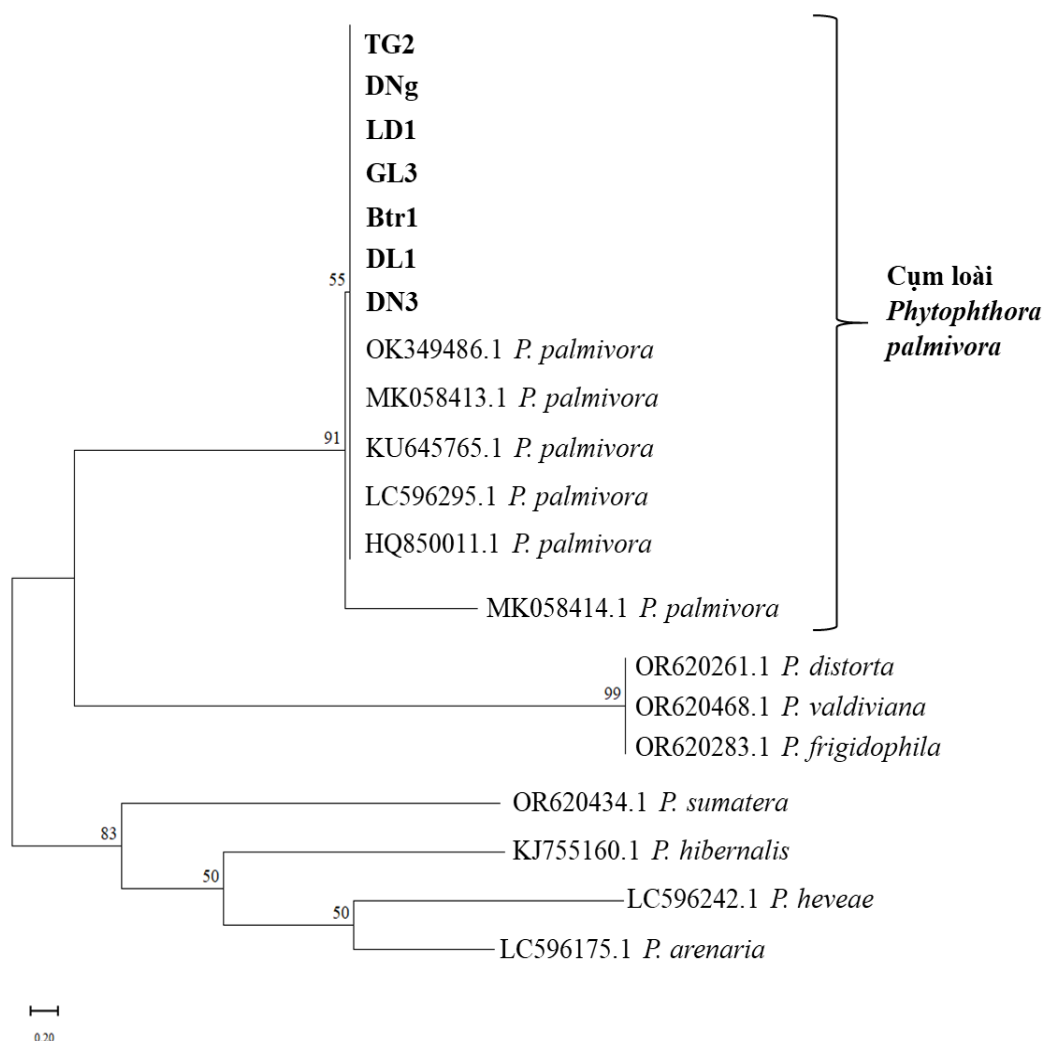
3.4. Xác định *P. palmivora* dựa trên phân tích trình tự vùng gen *Ypt1* và *GUP*



Hình 6. Kết quả điện di sản phẩm PCR vùng gen *Ypt1* của các chủng *Phytophthora*
Ghi chú: (-): Mẫu đối chứng âm (nước cất vô trùng); M: Thang DNA 1 kb (Thermo).



Hình 7. Hình điện di sản phẩm PCR của vùng gen *GUP* của các chủng *Phytophthora*
Ghi chú: (-): Mẫu đối chứng âm (nước cất vô trùng); M: Thang DNA 1 kb (Thermo).



Hình 8. Cây phả hệ được xây dựng trên vùng gen *Ypt1* của các chủng *P. palmivora* được phân lập từ mẫu bệnh cây sầu riêng. Giá trị bootstrap 1.000 lần thể hiện dưới dạng %

Sản phẩm PCR của mỗi *Yph1F/Yph2R* của 20 chủng phân lập có kích thước là 450 - 470 bp (Hình 6) phù hợp với kết quả nghiên cứu của Schena và cs (2006) [6] và khẳng định 20 chủng phân lập là *Phytophthora* spp.. Trong đó, sản phẩm PCR của 20 chủng phân lập trên vùng gen GUP khuếch đại bằng cặp mồi GUPal6fw/GUPal8rv có kích thước khoảng 150 bp (Hình 7). Phù hợp với kết quả nghiên cứu của Wibowo và cs (2019) [8] và có thể khẳng định đây là *P. palmivora*.

Sản phẩm khuếch đại vùng gen *Ypt1* của các chủng phân lập *P. palmivora* DL1, LD1, DN3, DNg, GL3, TG2, Btr1 được lựa chọn đại diện cho

từng vùng thu mẫu để giải trình tự. So sánh trình tự vùng gen *Ypt1* của các chủng *P. palmivora* này với các trình tự có sẵn trên cơ sở dữ liệu ngân hàng gen cho thấy, trình tự các chủng DL1, LD1, DN3, DNg, GL3, TG2, Btr1 có độ tương đồng từ 99 - 100% với *P. palmivora* (KU645765.1) và độ bao phủ đạt trên 99%. Cây phả hệ được xây dựng bằng phương pháp Neighbor - Joining trong phần mềm MEGA11 sử dụng trình tự vùng *Ypt1* của các chủng DL1, LD1, DN3, DNg, GL3, TG2, Btr1 và chủng *P. palmivora* (KU645765.1) gây thối thân và rễ trên cây liễu ở Trung Quốc [16], chủng *P. palmivora* (OK349486.1) gây bệnh cháy lá trên

cây phát tằm tại Trung Quốc [17]. Các loài *Phytophthora* khác gồm: *P. distorta* (OR620261.1), *P. valdiviana* (OR620468.1), *P. frigidophila* (OR620283.1), *P. sumatera* (OR620434.1), *P. hibernalis* (KJ755160.1), *P. heveae* (LC596242.1) và *P. arenaria* (LC596175.1) xem như nhóm ngoài, được sử dụng để dựng cây phát sinh loài (Hình 8).

3.5. Thảo luận

Phytophthora với 203 loài gây hại trên cây trồng nói chung đóng vai trò quan trọng trong sản xuất nông nghiệp. Việc xác định các loài *Phytophthora* khá phức tạp bởi các đặc điểm hình thái chồng chéo và tính biến đổi trong từng loài cụ thể, thậm chí, việc lựa chọn môi trường để phân lập và đánh giá cũng ảnh hưởng đến kết quả thu được [18]. Trong đó, các đặc điểm quan trọng để phân biệt *P. palmivora* được ghi nhận gồm: Hình thái tản nấm và sợi nấm, cuống bào tử, bào tử, túi bào tử và bào tử hậu [13], được mô tả và so sánh chi tiết trong nghiên cứu này.

Ngoài ra, việc xác định bằng kỹ thuật phân tử cho một số loài *Phytophthora* nhất định có thể là một thách thức. Vùng gen ITS và COI được sử dụng phổ biến để nhận biết các loài *Phytophthora*, song hai vùng gen không đủ nhạy để phân biệt các loài gần gũi [6], [7], [13]. Ngoài ra, các vùng gen khác cũng được sử dụng nhiều như *Ypt1*, *β -tub*, *EF1a*, *L10* và *HSP90*, trong số đó trình tự vùng gen *Ypt1* đã rất thành công trong việc xác định *Phytophthora* spp. [13]. Vùng gen *Ypt1* được thiết kế riêng biệt cho một số loài *Phytophthora* spp. ở mức khuếch đại khoảng 450 - 470 bp.

Vùng gen *Ypt1* đã được sử dụng để xác định loài *Phytophthora* gây bệnh trên kiwi tại Trung Quốc [19], hoặc phân biệt các loài *P. ramorum*, *P. kernoviae*, *P. citricola* và *P. quercina* gây bệnh trên lá [6] cho kích thước sản phẩm khuếch đại từ 450 - 470 bp. Hoặc khi thăm dò *P. ramorum* bằng cặp mồi Yph1F/Yph2R để xác định loài này bằng phổ Raman [20] cũng thu được giá trị khuếch đại có kích thước từ 450 - 470 bp. Mặc dù ghi nhận các sự khác biệt trong đặc điểm hình thái nhưng khi sử dụng mồi đặc hiệu GUPal6fw/GUPal8rv của vùng gen GUP [8] đã chứng minh tác nhân gây

bệnh thối đen trái trên cacao tại Indonesia là *P. palmivora*.

Trong nghiên cứu này, kết quả điện di sản phẩm PCR với mồi Yph1F/Yph2R cho sản phẩm là 1 băng duy nhất, kích thước nằm trong khoảng 450 - 470 bp, trình tự vùng gen *Ypt1* của các chủng đại diện có độ tương đồng cao với các chủng *P. palmivora* trên ngân hàng gen. Ngoài ra, sản phẩm PCR với mồi GUPal6fw/GUPal8rv của vùng gen GUP cũng cho 1 băng duy nhất, có kích thước khoảng 150 bp. Dựa vào các đặc điểm hình thái và kỹ thuật phân tử cho phép xác định tác nhân gây bệnh thối trái, nứt thân xì mù, vàng lá, thối rễ trên giống sầu riêng Monthong từ các mẫu bệnh thu thập được là *P. palmivora*.

4. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

4.1. Kết luận

Xác định được tác nhân gây bệnh thối trái, nứt thân xì mù, vàng lá, thối rễ trên giống sầu riêng Monthong từ các mẫu bệnh thu thập được là *P. palmivora*. Các chủng *P. palmivora* có bào tử hậu hình tròn với kích thước trung bình 31,63 - 47,93 μ m. Túi bào tử có 1 cuống cụt hoặc nửa bán cầu rõ ràng có kích thước trung bình $4,37 \pm 1,75 \mu$ m. Túi bào tử dạng hình quả lê ngược, hình oval, hình elip và hình trứng có kích thước trung bình 37,00 - 64,75 $\times$ 27,25 - 45,75 μ m, tỷ lệ D/R dao động 1,13 - 1,87. Sản phẩm PCR vùng gen *Ypt1* và *GUP* của các chủng *P. palmivora* có kích thước lần lượt là 450 - 470 bp và 150 bp.

4.2. Đề nghị

Khuyến cáo sử dụng cặp primer Yph1F/Yph2R và GUPal6fw/GUPal8rv trong việc phát hiện *P. palmivora* gây hại trên cây sầu riêng Monthong nói riêng và trên cây sầu riêng nói chung để tiết kiệm thời gian và chi phí trong việc xác định đúng tác nhân gây bệnh nhằm lựa chọn biện pháp quản lý phù hợp và hiệu quả.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Yan, Q., Sreedharan, A., Wei, S., Wang, J., Pelz-Stelinski, K., Folimonova, S. & Wang, N. (2013). Global gene expression changes in *Candidatus Liberibacter asiaticus* during the transmission in distinct hosts between plant and insect. *Molecular plant pathology*, 14(4), 391 - 404

2. Dang, V. T. T., Ngo, V. V. and Drenth, A. (2004). *Phytophthora* diseases in Vietnam. *Diversity and management of phytophthora in Southeast Asia*, 83 - 89.
3. Ishii, H., and Holloman, D. W. (2015). Fungicide resistance in plant pathogens. *Principles and a Guide to Practical Management*, 146 - 167.
4. Duncan, J., Cooke, D. (2002). Identifying, diagnosing and detecting *Phytophthora* by molecular methods. *Mycologist*, 16(2), 59 - 66.
5. Cooke, D. E. L, Drenth, A., Duncan, J. M., Wagels, G. and Brasier, C. M., (2000). A molecular phylogeny of *Phytophthora* and related oomycetes. *Fungal genetics and biology*, 30(1), 17 - 32.
6. Schena, L., Hughes, K. J., and Cooke, D. E. (2006). Detection and quantification of *Phytophthora ramorum*, *P. kernoviae*, *P. citricola* and *P. quercina* in symptomatic leaves by multiplex real-time PCR. *Molecular Plant Pathology* 7, 365 - 379.
7. Martin, F. N., and Tooley, P. W. (2003). Phylogenetic relationships of *Phytophthora ramorum*, *P. nemorosa*, and *P. pseudosyringae*, three species recovered from areas in California with sudden oak death. *Mycological Research*, 107(12), 1379 - 1391.
8. Wibowo, A., Subandiyah, S. and Kageyama, K. (2019). Morphometric variation of *Phytophthora palmivora* causing black pod rot disease on cocoa (*Theobroma cacao* L.) in Indonesia. *Plant Pathology Journal (Faisalabad)*, 18(1), 1 - 11.
9. Tiêu chuẩn Quốc gia TCVN 13268-4: 2021. Bảo vệ thực vật - Phương pháp điều tra sinh vật gây hại - Phần 4: Nhóm cây ăn quả
10. Drenth, A., Sendall, B. (2001). Practical guide to detection and identification of *Phytophthora*. *Tropical plant protection*, 1, 32 - 33.
11. Burgess, L. và Knight, T. (2009). Cẩm nang chuẩn đoán bệnh cây ở Việt Nam. *Chuyên khảo ACIAR* 129a, 210.
12. Gallegly, M. E. and Hong, C. (2008). *Phytophthora: identifying species by morphology and DNA fingerprints*. APS Press.
13. Abad Z. G., Burgess T. I., Redford A. J., Bienapfl J. C. (2023). IDphy: An International online resource for molecular and morphological identification of *Phytophthora* based on type specimens. *Plant Disease*, 107: 987 - 998. DOI:10.1094/PDIS-02-22-0448-FE.
14. Lim, T. K., & Chan, L. G. (1986). Fruit rot of durian caused by *Phytophthora palmivora*. *Pertanika*, 9(3), 269 - 276.
15. O’Gara, E., Guest, D. I., Vawdrey, L., Langdon, P., & Diczbalis, Y. (2004). *Phytophthora* diseases of durian and durian-decline syndrome in Northern Queensland, Australia. Diversity and Management of *Phytophthora* in Southeast Asian. *ACIAR Monograph*, 238p.
16. Lan, C. Z., & Ruan, H. C. (2016). First Report of *Phytophthora palmivora* causing stem and root rot of salix babylonica (Babylon Willow) in Fujian Province, China. *Plant Disease*, 100(12), 2536.
17. Li, Z. (2021). Occurrence of leaf blight caused by *Phytophthora palmivora* on Dracaena sanderiana in China. College of Plant Protection, Hainan University, Renming, China, Hainan, China.
- 18 Frank N. Martin, Z. Gloria Abad, Yilmaz Balci & Kelly Ivors (2012). Identification and detection of *Phytophthora*: Reviewing our progress, identifying our needs. *Plant Disease*. Vol. 96 No. 8. P.1080-1103. <https://doi.org/10.1094/PDIS-12-11-1036-FE>.
19. Bi, X., Hieno, A., Otsubo, K., Kageyama, K., Liu, G., & Li, M. (2019). A multiplex PCR assay for three pathogenic *Phytophthora* species related to kiwifruit diseases in China. *Journal of general plant pathology*, 85, 12 - 22.
20. Yüksel, S., Schwenkbier, L., Pollok, S., Weber, K., Cialla-May, D., & Popp, J. (2015). Label-free detection of *Phytophthora ramorum* using surface-enhanced Raman spectroscopy. *Analyst*, 140(21), 7254 - 7262.

IDENTIFICATION OF *Phytophthora palmivora* CAUSING DISEASE ON MONTHONG DURIAN (*Durio zibethinus* L. 'Monthong') BY MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR CHARACTERISTICS

Vo Thi Ngoc Ha¹, Ho Minh Cuong², Do Hong Khanh¹

¹ Faculty of Agronomy, Nong Lam University, Ho Chi Minh city

² Vidan Co., Ltd, Ho Chi Minh city

Summary

Plant disease caused by *Phytophthora palmivora* on durian trees is becoming increasingly complex and challenging to control, while accurately identifying the causative agent remains difficult. In this study, *P. palmivora* isolates were obtained from infected stems, fruits and soil from Monthong orchards in several Southern provinces in 2023. *P. palmivora* strains were identified based on morphological characteristics and confirmed by Koch's postulates. Then, the PCR products with specific primers Yph1F/Yph2R of the *Ypt1* gene region and primers GUPal6fw/GUPal8rv of the GUP gene region were used to identify the pathogen species. A total of 20 *P. palmivora* strains were isolated, all of which had spherical chlamydospores with an average size of 31.63 - 47.93 μm . The sporangium had a clear truncated or hemispherical papilla with an average size of $4.37 \pm 1.75 \mu\text{m}$. The sporangia were inverted pear-shaped, oval, elliptical, and ovoid, with an average size of $37.00 - 64.75 \times 27.25 - 45.75 \mu\text{m}$ and a length/width ratio ranging from 1.13 to 1.87. The PCR products of the *Ypt1* and GUP gene regions of the *P. palmivora* strains had sizes of 450 - 470 bp and 150 bp, respectively. The *Ypt1* gene sequences of 7 *P. palmivora* strains (DL1, LD1, DN3, DNg, GL3, TG2, Btr1) showed 99 - 100% similarity to the *P. palmivora* strain (KU645765.1) with a coverage of over 99%.

Keywords: Durian, *Phytophthora palmivora*, morphological characteristic, *Ypt1* gene, GUP gene.

Ngày nhận bài: 24/4/2024

Ngày gửi phản biện: 28/5/2024

Ngày thông qua phản biện: 3/7/2024

Ngày duyệt đăng: 11/11/2024