

ĐỊNH DANH CÁC CHỦNG *Phytophthora* VÀ *Phytophythium* PHÂN LẬP TRÊN MẪU BỆNH VÀ MẪU ĐẤT VÙNG RỄ BƯỞI NĂM ROI TẠI XÃ MỸ HÒA, THỊ XÃ BÌNH MINH, TỈNH VINH LONG

Phạm Thanh Nam^{1,2}, Lê Phước Thanh^{1,*}

¹ Đại học Cần Thơ

² Chi cục Trồng trọt và Bảo vệ thực vật tỉnh Cà Mau

* Email: lpthanh@ctu.edu.vn

TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện nhằm mục tiêu định danh các chủng *Phytophthora* và *Phytophythium* hiện diện trong mẫu bệnh (lá và trái) và đất vùng rễ bưởi Năm Roi tại xã Mỹ Hòa, thị xã Bình Minh, tỉnh Vĩnh Long. Dựa vào đặc điểm hình thái trên môi trường V8, 18/73 chủng *Phytophthora* và *Phytophythium* được chọn đại diện cho các thí nghiệm tiếp theo. Thí nghiệm đánh giá khả năng gây bệnh trên lá bưởi Năm Roi được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên một nhân tố gồm 4 lặp lại với 18 nghiệm thức, mỗi nghiệm thức là 1 chủng *Phytophthora* hoặc *Phytophythium*. Đặc điểm hình thái và kích thước của bọc bào tử, bào tử áo và sự tăng sinh của bọc bào tử của 18 chủng *Phytophthora* và *Phytophythium* đại diện được ghi nhận. ADN của 18 chủng *Phytophthora* và *Phytophythium* đại diện được PCR với cặp mồi ITS1/ITS4; sau đó các sản phẩm PCR với một băng sáng rõ được giải trình tự; sản phẩm giải trình tự sẽ được xử lý bằng phần mềm Finch TV (phiên bản 1.4.0), so sánh với các trình tự tham khảo (BLAST) trên NCBI để xác định loài và xây dựng cây phả hệ bằng phần mềm MEGA (phiên bản 11.0.14). Kết quả ghi nhận cho thấy, 18 chủng đại diện đều gây bệnh trên lá bưởi Năm Roi sau 5 ngày lây bệnh với các mức độ khác nhau, tùy thuộc vào độc tính của từng chủng. Dựa vào đặc điểm hình thái và kết quả PCR - Giải trình tự, 18 chủng đại diện được chia làm 5 nhóm: Nhóm 1 gồm 10 chủng phân lập: PP7, PP8, PP9, PP13, PP17, PP18, PP22, PP23, PP27 và PP28, thuộc loài *Phytophthora virginiana*; nhóm 2 gồm 5 chủng phân lập: PP1, PP2, PP3, PP4 và PP5, thuộc loài *Phytophthora parvispora*; nhóm 3 gồm 1 chủng phân lập: PP21, thuộc loài *Phytophthora prodigiosa*; nhóm 4 gồm: 1 chủng phân lập: PP11, thuộc loài *Phytophthora citrophthora*; nhóm 5 gồm 1 chủng PP12 là thuộc loài *Phytophythium helicoides*.

Từ khoá: *Phytophthora*, *Phytophythium*, bưởi Năm Roi.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Phytophthora spp. cùng với *Pythium* spp., *Fusarium* spp, tuyến trùng... đã được ghi nhận là các tác nhân làm cây cam quýt chậm phát triển, trái nhỏ [1]. Các loài *Phytophthora* đã được xác nhận là tác nhân gây ra bệnh thối gốc chảy nhựa thân và các loài quan trọng nhất là *P. nicotianae* và *P. citrophthora* [2, 3], hai loài này còn gây thối rễ, đặc biệt *P. citrophthora* còn gây thối ngọn trên cam quýt [2]. Bên cạnh đó, *P. palmivora* cũng được ghi nhận là tác nhân gây thối quả trên cây

cam, quýt [2]. Ở một số vườn còn ghi nhận được bệnh thối rễ xuất hiện cùng với mật số cao *Pythium* spp. mà không có mặt của *Phytophthora* spp. hay tuyến trùng [4, 5]. Đã có nhiều báo cáo cho thấy *Pythium* spp. cũng như *Phytophythium* spp. đang gây hại nghiêm trọng trên cây trồng của chi *Citrus* gây thối rễ, thối gốc, chảy nhựa thân cũng như gây thối [6 - 11].

Ở Việt Nam, nghiên cứu của Thanh và cs (2004) [12] đã ghi nhận được hai loài *Phytophthora* là *P. citrophthora* và *P. nicotianae*

gây hại trên cây cam, quýt. Tại đồng bằng sông Cửu Long (ĐBSCL), tác nhân chính gây bệnh thối rễ đã được xác định là do *Phytophthora* spp. và *Fusarium solani* [13]. Ngoài ra, *Pythium helicoides* cũng được phân lập được trên rễ cam quýt bị thối [13]. Năm 2017, nghiên cứu của Puglisi và cs (2017) [14] lần đầu tiên ghi nhận hai loài *P. mekongensis* và *P. prodigiosa* gây thối nâu trái và thối rễ bưởi, quýt Hồng và chanh Volka tại ĐBSCL. Nghiên cứu của Thái Thanh Duy và cs (2022) [15] đã ghi nhận được bốn loài *Phytophythium cucurbitacearum*, *Phytophythium helicoides*, *Pythium deliense* và *P. cinnamomi* var. *parvispora* (hiện nay là *P. parvispora*) hiện diện trong đất vùng rễ bưởi Năm Roi tại xã Mỹ Hòa, thị xã Bình Minh, tỉnh Vĩnh Long. Gần đây, các loài *P. parvispora* [16], *P. deliense* [17], *P. palmivora*, *P. nicotianae*, *P. citrophthora* và *P. mekongensis* [18] được ghi nhận gây thối rễ và chảy nhựa thân, thối trái trên bưởi, cam và chanh tại các tỉnh: Hà Giang, Tuyên Quang, Phú Thọ và Yên Bái.

Như vậy có thể giả thuyết, ngoài các tác nhân, *Phytophthora*, *Pythium*, gây hại trên cam quýt đã được xác định, có thể có các loài mới (*Phytophthora* và *Pythium*) chưa được xác định cũng góp phần gây hại trên cam quýt (thối rễ, thối và chảy nhựa gốc, thân và nhánh, thối trái). Để quản lý tốt các bệnh thối rễ, bệnh thối gốc chảy nhựa thân và nhánh và thối trái trên cây cam, quýt, việc hiểu rõ về các tác nhân gây bệnh là thật sự cần thiết. Do đó, việc nghiên cứu các thành phần loài *Phytophthora* và *Phytophythium* gây hại là rất cần thiết nhằm có các biện pháp quản lý bệnh hại do chúng gây ra được hiệu quả hơn.

Vì vậy, nghiên cứu này được thực hiện nhằm mục tiêu xác định tới loài các chủng *Phytophthora* và *Phytophythium* hiện diện trong vùng rễ và trong vết bệnh trên bưởi Năm Roi. Kết quả đạt được sẽ được sử dụng làm cơ sở cho các nghiên cứu tiếp theo trong quy trình quản lý bệnh hại trên bưởi Năm Roi do *Phytophthora* và *Phytophythium*.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Thu thập mẫu bệnh và đất trồng bưởi Năm Roi và phân lập tác nhân gây bệnh

2.1.1. Thu mẫu

Chọn các vườn bưởi Năm Roi (30 vườn) có

diện tích tối thiểu 2.000 m², có biểu hiện bệnh vàng lá, chảy nhựa ở gốc, thân và nhánh. Quá trình thu mẫu thực hiện theo QCVN 01-119:2012/BNNPTNT[19].

Mẫu đất được thu ở độ sâu 0 - 20 cm, theo hình chiếu vuông góc của tán cây bưởi với mặt đất, được cho vào cùng một túi nylon (4 mẫu/cây). Một vườn sẽ thu 6 mẫu riêng biệt tại 6 cây bưởi có biểu hiện bệnh. Sau đó, tiến hành xử lý trộn 6 mẫu riêng biệt (1 vườn bưởi) để có được 1 mẫu đất hỗn hợp từ 600 g - 1 kg đất. Đào và thu rễ thối ở 4 vị trí tán của mỗi cây. Các rễ non bị thối được cho vào các túi giấy. Trái bưởi thối được thu trên các vườn bưởi. Mẫu lá thối được thu trong các vườn bưởi. Các mẫu đất được trữ ở 4 - 10°C ở phòng thí nghiệm.

2.1.2. Phân lập

Các mẫu đất được sử dụng để cấy *Phytophthora* và *Pythium* bằng lá bưởi Năm Roi. Sau 1 - 2 ngày, các lá bưởi Năm Roi bị nhiễm bệnh sẽ được phân lập trên môi trường chọn lọc V8 + chất kháng nấm + chất kháng sinh [20].

Mẫu bệnh trên rễ, lá và trái bưởi sẽ được phân lập trực tiếp trên môi trường chọn lọc V8 + chất kháng nấm + chất kháng sinh theo nghiên cứu của Burgess và cs (2008) [21] và Abad và cs (2023) [22].

2.2. Đánh giá khả năng gây bệnh của các chủng *Phytophthora* và *Phytophythium*

Thí nghiệm chủng bệnh nhân tạo trên lá bưởi Năm Roi được tiến hành theo phương pháp của Yan *et al.* (2017) [23] đối với 18 chủng phân lập được tiến hành như sau: cấy khoanh khuẩn ty *Phytophthora* hoặc *Phytophythium* (7 ngày nuôi cấy trên môi trường V8, đường kính 7 mm) lên giữa lá bưởi Năm Roi non (20 ngày tuổi) đã thanh trùng bề mặt bằng cồn 70° và tạo vết thương (2 vết thương/lá) bằng bó 5 mũi kim may đã khử trùng. Lá chủng bệnh được đặt ở điều kiện phòng thí nghiệm (che tối hoàn toàn). Ghi nhận sự lây nhiễm sau 5 ngày lây bệnh bằng cách xem sự đổi màu của lá xung quanh khối khuẩn ty nấm. Cấp bệnh được đánh giá dựa theo Latifah *et al.* (2018) [35]: Cấp 1: Lá khô; Cấp 2: Bắt đầu lây nhiễm với vết bệnh < 5 mm; Cấp 3:

Vết bệnh phát triển với chiều dài 5 - 10 mm; Cấp 4: Vết bệnh phát triển toàn bộ lá, đổi màu, vết bệnh có chiều dài > 10 mm.

2.3. Khảo sát đặc điểm hình thái

Hình thái khuẩn lạc *Phytophthora* và *Phytophythium* được ghi nhận ở 7 ngày sau khi nuôi cấy trên môi trường V8 theo Drenth và Guest (2004) [2] và Abad và cs (2023) [22].

Hình dạng dạng và kích thước bọc bào tử, sự tăng sinh của bọc bào tử, sự hiện diện và cách mọc của bào tử áo được thực hiện theo phương pháp của Abad và cs (2023) [22].

2.4. PCR - giải trình tự

Các mẫu *Phytophthora* và *Phytophythium* đại diện (18 chủng) được nuôi cấy trên môi trường V8 trong 7 ngày ở điều kiện nhiệt độ phòng. Sau đó, hệ sợi nấm trên bề mặt môi trường được thu lấy bằng lame (thanh trùng). Hệ sợi nấm được nghiền mịn được ngâm trong nitor lỏng, sau đó được nghiền mịn. Cân 100 mg mẫu nấm đã nghiền mịn vào tube 1.5 mL. Quy trình ly trích ADN từ hệ sợi nấm được nghiền mịn bằng kit của Công ty TNHH Giải pháp Y sinh ABT (Việt Nam).

Các mẫu ADN ly trích được PCR với cặp môi ITS1 và ITS4 [24]. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1,5% (có bổ sung thêm 5 µL SafeView (Lithuania)/100 mL gel). Sản phẩm PCR có kích

thước mong đợi (800 - 900 bp) sẽ được gửi giải trình theo quy trình của Công ty TNHH DNA Sequencing (<https://www.dnasequencing.com.vn/>). Kết quả giải trình tự sẽ được xử lý với phần mềm FinchTV (phiên bản 1.4.0) để kiểm tra peak của các nucleotide hiện rõ và tín hiệu nhiễu. Sau đó đoạn trình tự sản phẩm PCR sẽ được so sánh với dữ liệu trình tự trên Ngân hàng NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) bằng công cụ BLAST nhằm xác định đến mức loài.

Các trình tự ở mỗi nhóm loài sẽ được sử dụng để xây dựng cây phả hệ nhằm xác định mức độ giống nhau và mối quan hệ của loài được phân lập với các loài đã được công bố trên NCBI. Phần mềm MEGA phiên bản 11.0.13 [25] được sử dụng để xây dựng cây phả hệ.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả phân lập

Tại các vườn bưởi Năm Roi có triệu chứng thối gốc chảy nhựa, phân lập được 73 chủng *Phytophthora* và *Phytophythium* từ 30 mẫu đất vườn, 10 mẫu lá nhiễm bệnh và 2 mẫu trái bưởi bị thối (Bảng 1). Dựa vào hình thái khuẩn lạc phát triển 7 ngày trên môi trường V8, 18 chủng đại diện được chọn để làm các thí nghiệm về đánh giá khả năng gây hại trên lá bưởi Năm Roi, đặc điểm hình thái và PCR - giải trình tự.

Bảng 1. Kết quả phân lập *Phytophthora* và *Phytophythium* từ mẫu đất vùng rễ, lá và trái bưởi Năm Roi

Cách phân lập	Số mẫu	Số chủng phân lập	Số chủng chọn lọc làm thí nghiệm	Ký hiệu chủng
Bẫy đất	30	5	5	PP1, PP2, PP3, PP4, PP5
Phân lập trực tiếp từ lá	10	48	10	PP7, PP8, PP13, PP9, PP17, PP18, PP21, PP22, PP23, PP27
Phân lập trực tiếp từ trái	2	20	3	PP11, PP12, PP28
Tổng cộng		73	18	

3.2. Khả năng gây bệnh của các chủng *Phytophthora* và *Phytophythium* trên lá bưởi Năm Roi

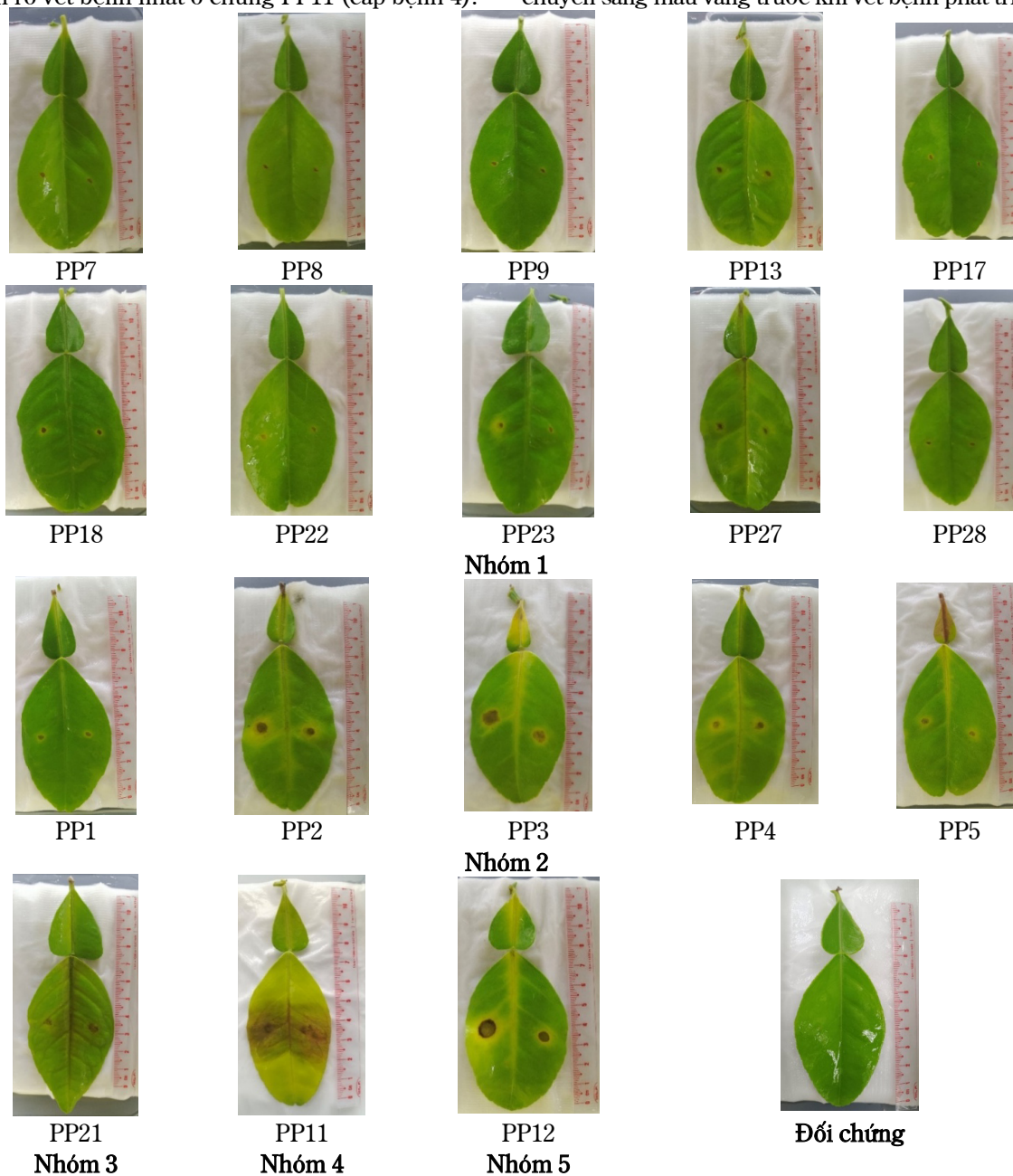
Sau 5 ngày lây bệnh nhân tạo, kết quả ghi nhận được cho thấy, tất cả 18 chủng phân lập đều gây bệnh cho lá bưởi Năm Roi ở các mức độ khác nhau (Hình 1).

Chủng phân lập gây bệnh trên lá mạnh và biểu hiện rõ vết bệnh nhất ở chủng PP11 (cấp bệnh 4).

Các chủng gây bệnh bệnh khá mạnh gồm PP12 (cấp bệnh 3); PP1, PP2, PP3, PP4 và PP5 (cấp bệnh 2-3).

Các chủng gây bệnh yếu trên lá gồm PP7, PP8, PP9, PP13, PP17, PP18, PP21, PP22, PP23, PP27 và PP28 (cấp bệnh 2).

Tất cả các chủng gây bệnh đều làm phỉn lá nhỏ rời khỏi phiến lá lớn, lá có biểu hiện già đi và lá chuyển sang màu vàng trước khi vết bệnh phát triển.



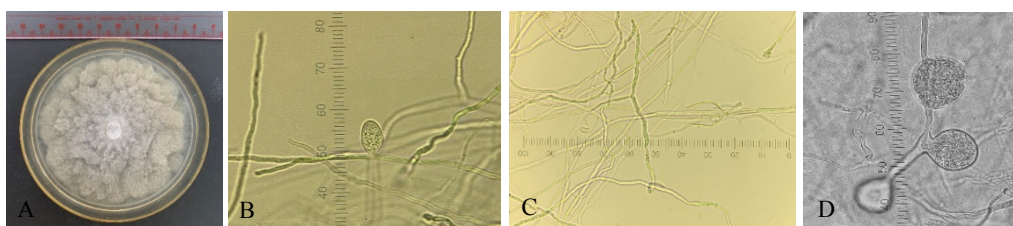
Hình 1. Vết bệnh trên lá bưởi Năm Roi của các chủng phân lập ở 5 Nhóm.

3.3. Các đặc điểm hình thái

Về mặt hình thái, 18 chủng phân lập có thể chia thành 5 nhóm như sau:

Các chủng nhóm 1 (PP7, PP8, PP9, PP13, PP17, PP18, PP22, PP23, PP27 và PP28) có các đặc điểm: Khuẩn lạc trên môi trường V8 có dạng hoa cúc với sợi nấm kí sinh như bông gòn ở giữa (tâm) (Hình 2A), khuẩn lạc phát triển đầy đĩa Petri sau 5 - 7 ngày. Bọc bào tử có dạng hình quả

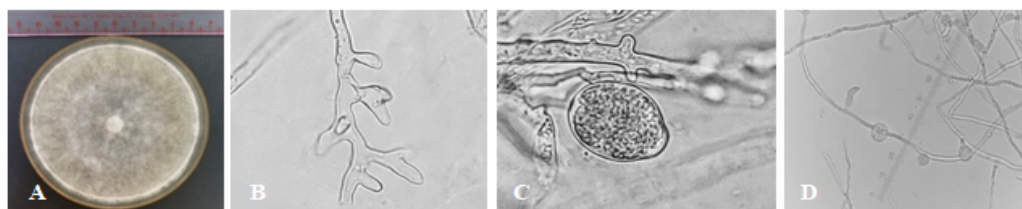
lê (Hình 2B), kích thước từ 12,4 - 40 x 7,5 - 32,5 μm (trung bình 25,17 x 13,75 μm). Có sự hiện diện của sự tăng sinh kéo dài của bọc bào tử (Hình 2C). Bào tử áo hình thành bên hong sợi nấm, mọc thành cụm (Hình 2D). Dựa vào các đặc điểm hình thái quan sát được, theo Yang & Hong (2014) [26], bước đầu có thể xác định các chủng phân lập nhóm 1 thuộc loài *Phytophthora virginiana*.



Hình 2. Khuẩn lạc trên môi trường V8 (A), bọc bào tử dạng quả lê (B), sự tăng sinh kéo dài bên trong của bọc bào tử (C) và bào tử áo hình thành bên sợi nấm (D) của loài nhóm 1

Các chủng Nhóm 2 (PP1, PP2, PP3, PP4 và PP5) có các đặc điểm: sợi nấm phát triển đầy đĩa Petri sau 4 - 5 ngày nuôi cấy (Hình 3A). Bọc bào tử có hình trứng (Hình 3C), kích thước từ 12,5 - 55 x 8,75 - 27,5 μm (trung bình 23,67 - 15,21 μm). Sợi nấm phồng thành cụm, có dạng san hô (Hình

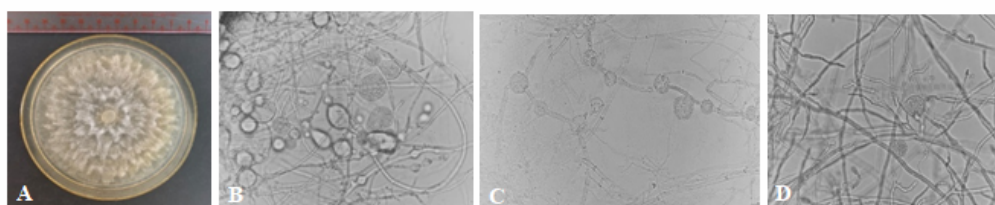
3B). Bào tử áo hình thành bên hong sợi nấm (Hình 3D). Dựa vào các đặc điểm hình thái quan sát được, theo Tran và cs (2023a) [16] và Scanu và cs (2014) [27], bước đầu có thể xác định các chủng phân lập nhóm 2 thuộc loài *Phytophthora parvispora*.



Hình 3. Khuẩn lạc trên môi trường V8 (A), sợi nấm sưng phồng thành cụm, dạng san hô (B), bọc bào tử hình trứng (C) và bào tử áo hình thành bên trong sợi nấm (D) của loài nhóm 2

Chủng nhóm 3 (PP21) có các đặc điểm: Khuẩn lạc trên môi trường V8 có dạng hoa hồng (Hình 4A), phát triển đầy đĩa petri sau 7 ngày nuôi cấy. Bọc bào tử dạng trứng và quả lê ngược (Hình 4B), kích thước 20-50 x 13,75-40 μm (trung bình 30,92 x 26,96 μm).

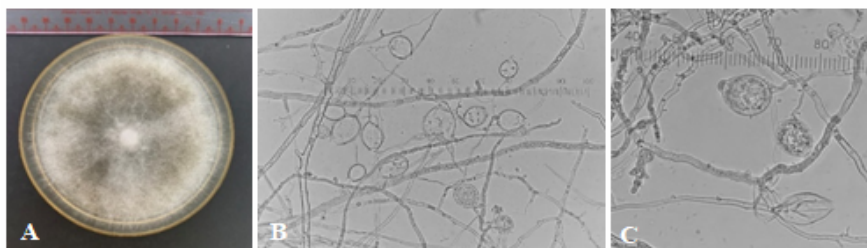
Sợi nấm sưng phồng thành cụm dạng dây xích (Hình 4C). Bào tử áo có hình cầu (Hình 4D). Dựa vào các đặc điểm hình thái quan sát được, theo Puglisi và cs (2017) [14], bước đầu có thể xác định chủng phân lập nhóm 3 thuộc loài *Phytophthora prodigiosa*.



Hình 4. Khuẩn lạc trên môi trường V8 (A), bọc bào tử dạng trứng và quả lê ngược (B), sự phồng lên của sợi nấm có hình dây xích (C) và bào tử áo hình thành bên trong sợi nấm có hình cầu (D) của loài nhóm 3

Chủng nhóm 4 (PP11) có các đặc điểm: Khuẩn lạc trên môi trường V8 phát triển đầy đĩa petri sau 7 ngày nuôi cấy (Hình 5A). Bọc bào tử có dạng hình trứng bán nhú (Hình 5B), kích thước 15,0 - 45,0 x 15,0 - 35,0 μm (32,08 x 31,17 μm). Bọc

bào tử tăng sinh bên trong. Bào tử áo hình cầu (Hình 5B). Dựa vào các đặc điểm hình thái quan sát được, theo Leonian (1925) [28], bước đầu có thể xác định chủng phân lập nhóm 4 thuộc loài *Phytophthora citrophthora*.



Hình 5. Khuẩn lạc trên môi trường V8 (A), bọc bào tử hình trứng bán nhú và bào tử áo (B), bọc bào tử bán nhú và tăng sinh bên trong (C) của loài nhóm 4.

Chủng nhóm 5 (PP12) có đặc điểm: Khuẩn lạc trên môi trường V8 phát triển đầy đĩa petri sau 2 ngày nuôi cấy (Hình 6A). Bọc bào tử có hình cầu (Hình 6B), kích thước 18,8 - 35 x 15,8 - 33,1 μm (trung bình 20 x 25,1 μm). Có sự tăng sinh bên

trong của bọc bào tử (Hình 6C). Dựa vào các đặc điểm hình thái quan sát được, theo de Jesus và cs (2016) [29], bước đầu có thể xác định chủng phân lập nhóm 5 thuộc loài *Phytophthora helicoides*.

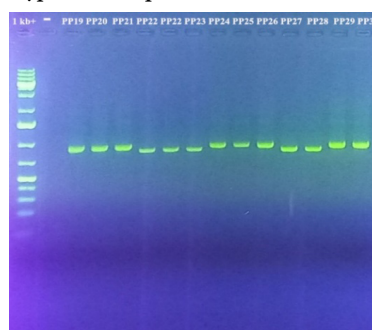


Hình 6. Khuẩn lạc trên môi trường V8 (A), bọc bào tử hình cầu (B) và sự tăng sinh kéo dài của bọc bào tử (C) của loài nhóm 5.

3.4. Kết quả PCR - giải trình tự

Sau khi ADN của 18 chủng nấm được thực hiện PCR với cặp mồi ITS1/ITS4 [24], kết quả điện di các mẫu đều xuất hiện các băng sáng màu nằm giữa khoảng 700 bp và 1 kb (Hình 7). Phù hợp với kết quả

nghiên cứu của Chowdappa và cs (2003) [30] và Khreibeh và cs (2015) [31] và *Pythium* và *Phytophthora* sẽ cho sản phẩm từ 800 - 910 bp với cặp mồi ITS1/ITS4.



Hình 7. Kết quả điện di trên sản phẩm PCR trên gel agarose 1,5%

Ghi chú: - : đối chứng âm.

Kết quả giải trình tự sản phẩm PCR của cặp mồi ITS1/ITS4 và so sánh trình tự trên NCBI cho thấy, 15 chủng phân lập được chia làm 5 nhóm như đặc điểm hình thái gồm:

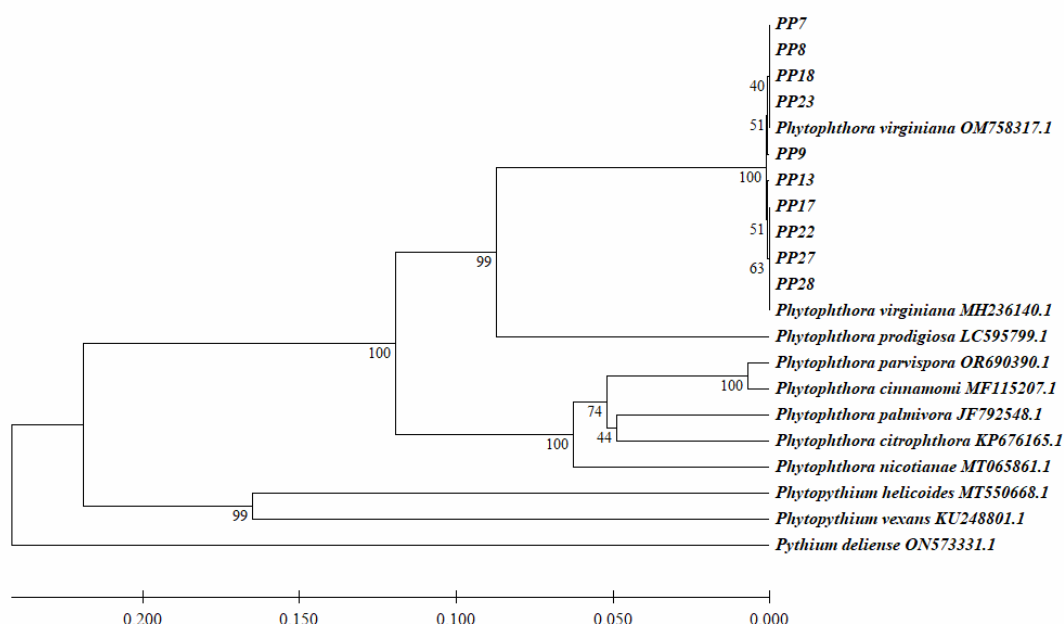
Nhóm 1 gồm 10 chủng: PP7, PP8, PP9, PP13, PP17, PP18, PP22, PP23, PP27 và PP28, được xác định là loài *Phytophthora virginiana* với độ tương đồng từ 99,32 - 100% với dữ liệu trên NCBI (chủng tham khảo *P. virginiana* OM758317.1 và MH236140.1). Kết quả xây dựng cây phả hệ cho thấy, 10 chủng phân lập phân nhánh cùng với hai chủng tham khảo *P. virginiana* OM758317.1 và MH236140.1 và tách biệt hoàn toàn với các chủng (loài) tham khảo khác (Hình 8).

Nhóm 2 gồm 5 chủng: PP1, PP2, PP3, PP4 và PP5, được xác định là loài *Phytophthora parvispora* với độ tương đồng 99,65 - 99,89% với dữ liệu trên NCBI (chủng tham khảo *P. parvispora* OR690390.1, MG865563.1 và KJ755091.1). Kết quả xây dựng cây phả hệ cho thấy 5 chủng phân lập phân nhánh cùng với 3 chủng tham khảo *P. parvispora* OR690390.1, MG865563.1 và KJ755091.1 và tách biệt hoàn toàn với các chủng (loài) tham khảo khác (Hình 9).

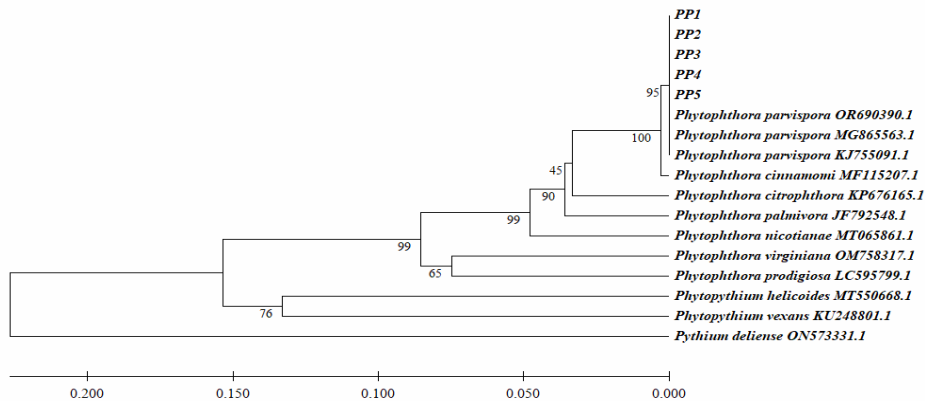
Nhóm 3 gồm 1 chủng, PP21, được xác định là loài *Phytophthora prodigiosa* với độ tương đồng 99,38% với dữ liệu trên NCBI (chủng tham khảo *P. prodigiosa* LC595799.1). Kết quả xây dựng cây phả hệ cho thấy, chủng phân lập phân nhánh cùng với chủng tham khảo *P. prodigiosa* LC595799.1, và tách biệt hoàn toàn với các chủng (loài) tham khảo khác (Hình 10).

Nhóm 4 gồm 1 chủng là PP11, được xác định là loài *Phytophthora citrophthora* với độ tương đồng 99,88% với dữ liệu trên NCBI (chủng tham khảo *P. citrophthora* GU111603.1). Kết quả xây dựng cây phả hệ cho thấy chủng phân lập phân nhánh cùng với chủng tham khảo *P. citrophthora* GU111603.1, và tách biệt hoàn toàn với các chủng (loài) tham khảo khác (Hình 11).

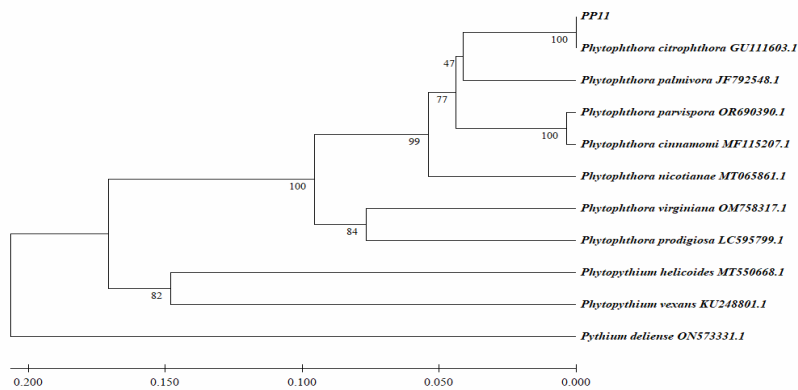
Nhóm 5 gồm 1 chủng là PP12, được xác định là loài *Phytophthora helicoides* với độ tương đồng 100% với dữ liệu trên NCBI (chủng tham khảo *P. helicoides* MT550668.1). Kết quả xây dựng cây phả hệ cho thấy, chủng phân lập phân nhánh cùng với chủng tham khảo *P. helicoides* MT550668.1 và tách biệt hoàn toàn với các chủng (loài) tham khảo khác (Hình 12).



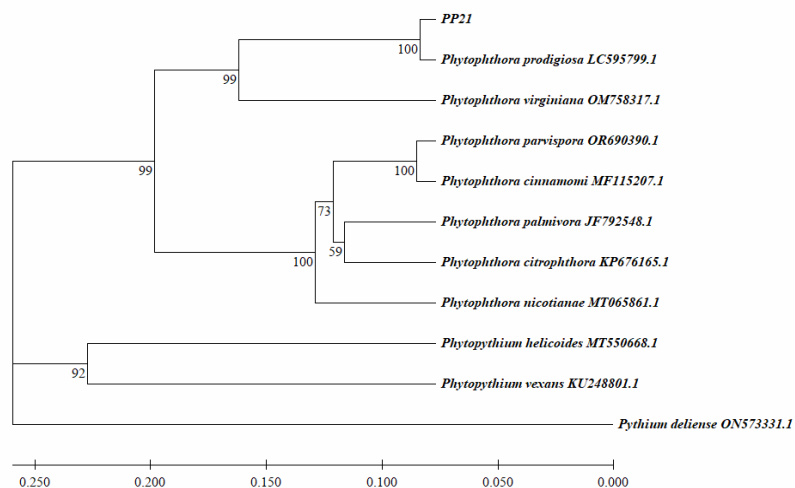
Hình 8. Cây phả hệ chỉ mối quan hệ của các chủng phân lập nhóm 1 (PP7, PP8, PP9, PP13, PP17, PP18, PP22, PP23, PP27 và PP28) với các chủng (loài) tham khảo trên NCBI



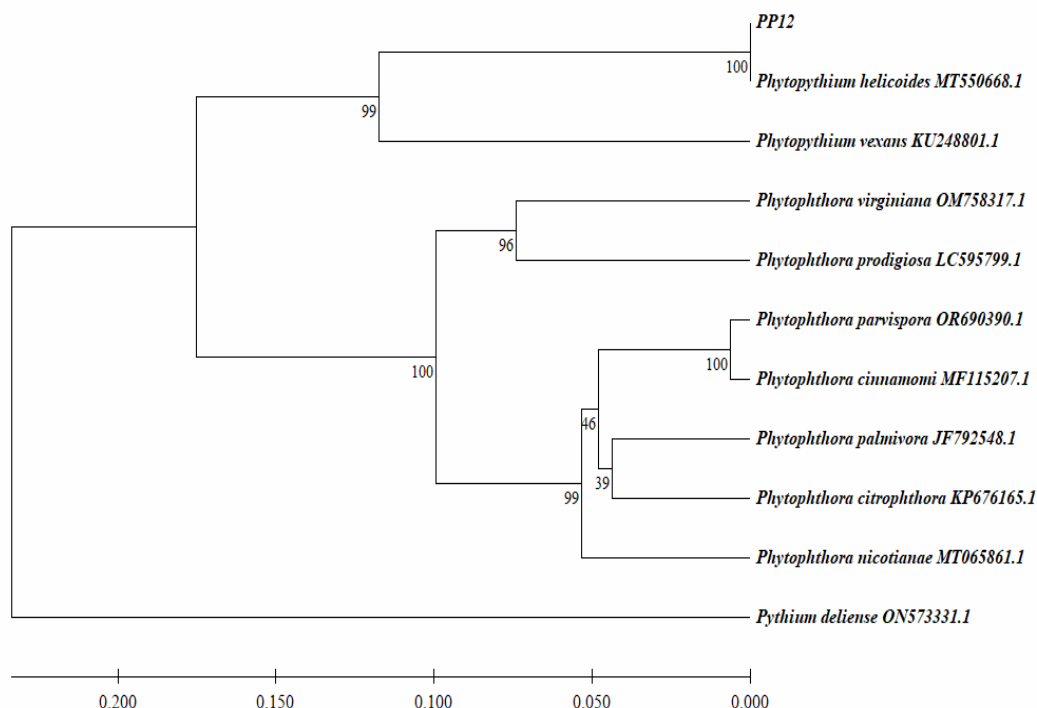
Hình 9. Cây phả hệ chỉ mối quan hệ của các chủng phân lập nhóm 2 (PP1, PP2, PP3, PP4 và PP5) với các chủng (loài) tham khảo trên NCBI



Hình 10. Cây phả hệ chỉ mối quan hệ của chủng phân lập nhóm 3 (PP11) với các chủng (loài) tham khảo trên NCBI



Hình 11. Cây phả hệ chỉ mối quan hệ của chủng phân lập nhóm 4 (PP21) với các chủng (loài) tham khảo trên NCBI



Hình 12. Cây phả hệ chỉ mối quan hệ của chủng phân lập nhóm 5 (PP12) với các chủng (loài) tham khảo trên NCBI

3.5. Thảo luận

Kết quả định danh về mặt hình thái 18 chủng đại diện (trong 73 chủng phân lập được) cho thấy, có 5 loài được xác định là *P. virginiana*, *P. parvispora*, *P. prodigiosa*, *P. citrophthora* và *Phytophthora helicoides*. Các kết quả đạt được trong nghiên cứu này tương tự với kết quả của Puglisi và cs (2017) [14] đối với loài *P. prodigiosa*, Thái Thanh Duy và cs (2022) [15] đối với hai loài *P. parvispora* và *Phytophthora helicoides* và Tran và cs (2023a) [16] đối với loài *P. parvispora*.

Loài *P. virginiana* đã được phân lập từ hồ chứa nước tưới cho cây trồng tại Virginia (Mỹ) [26]. Tuy nhiên, loài này chưa được ghi nhận có khả năng gây hại trên cây trồng tại vùng đó. Trong nghiên cứu này, lần đầu tiên *P. virginiana* được ghi nhận hiện diện trong các ruộng chứa nước cho các vườn bưởi Năm Roi. Đặc biệt, chủng bệnh trên lá bưởi Năm Roi theo quy trình Koch thì 10 chủng phân lập đều có khả năng gây nhiễm và tạo vết bệnh lá bưởi, mặc dù vết bệnh nhỏ. Trong 10 chủng phân lập thuộc loài *P. virginiana*, có 1

chủng được phân lập từ trái bưởi Năm Roi thối (chủng PP28). Điều đó chứng tỏ loài *P. virginiana* có thể có khả năng gây hại trên bưởi Năm Roi khi có điều kiện thích hợp xuất hiện.

Loài *P. parvispora* được xem là gây thối rễ và chảy nhựa trên cam, quýt tại miền Bắc Việt Nam [16]. Đây được xem là loài mới được ghi nhận xuất hiện đầu tiên các vùng trồng cam, quýt tại Việt Nam trong những năm gần đây [15, 16]. *Phytophthora parvispora* được phát hiện là tác nhân nghiêm trọng gây thối rễ và thối gốc trên cây dâu tây Địa Trung Hải (*Arbutus unedo* L.) ở Ý [27]. Trước đây, thông qua phân tích hình thái và trình tự ITS, các chủng thuộc loài *P. parvispora* đầu tiên được phân lập từ cây cam, quýt nhiễm bệnh tại Đài Loan vào năm 1985 [27, 32]. Ann và cs (2016) [33] đã khẳng định *P. parvispora* là tác nhân gây bệnh trên nhiều loại cây trồng họ cam, quýt tại Đài Loan, trước đây những bệnh này đã bị nhầm lẫn là do *P. cinnamomi* gây ra. Hơn nữa, *P. citrophthora* và *P. nicotianae* thường được coi là tác nhân gây bệnh chính trên cây cam, quýt ở Việt

Nam [12]. Do đó, có thể nói rằng *P. parvispora* có thể là một trong những tác nhân mới được biết, cùng với các loài *Phytophthora* đã biết, có một vai trò nào đó trong quá trình gây suy yếu cây bưởi Năm Roi và các giống/loài cam, quýt khác.

Mặc dù thí nghiệm chủng bệnh đã xác nhận các chủng phân lập *P. parvispora* có thể gây bệnh trên lá bưởi Năm Roi, nhưng phạm vi ký chủ của *P. parvispora* vẫn chưa được biết rõ. Hơn nữa, vì *P. parvispora* và *P. cinnamomi* là họ hàng gần nhất của nhau và có chung một tổ tiên, có thể cả hai loài đều tiến hóa trong cùng một khu vực. Do đó, có thể có lý do để lo ngại nếu *P. parvispora* có phổ ký chủ tương tự (hơn 300 loài) như *P. cinnamomi* [34]). Vì vậy, việc xác định phạm vi ký chủ của *P. parvispora* là vô cùng quan trọng.

Kết quả phân lập đã xác định được một chủng thuộc loài *P. prodigiosa* có khả năng gây bệnh nhẹ trên lá bưởi Năm Roi. Kết quả này phù hợp với kết quả nghiên cứu của Puglisi và cs (2017) [14]. Theo đó, *P. prodigiosa* chỉ được phân lập từ các trái bưởi rụng dưới đất, không ghi nhận *P. prodigiosa* gây hại trên các trái bưởi hay lá còn tươi trên cây. Trong nghiên cứu này, chủng PP21 (thuộc loài *P. prodigiosa*) được phân lập từ các lá bưởi nhiễm bệnh trong vườn, bổ sung thêm nhận định của Puglisi và cs (2017) [14] là *P. prodigiosa* hiện diện phổ biến trong đất, như là tác nhân cơ hội xâm nhiễm trái và lá bưởi bị rụng xuống đất. Cũng giống như *P. parvispora*, *P. prodigiosa* cần được xác định phổ ký chủ để có cách nhìn chính xác hơn.

Việc phân lập thành công loài *C. citrophthora* (trên mẫu trái bị thối) đã tái khẳng định kết quả nghiên cứu của Thanh và cs (2004) [12] rằng *C. citrophthora* là một trong hai loài (cùng với *P. nicotinae*) hiện diện rất phổ biến trên các vùng trồng cam, quýt tại Việt Nam. Trong nghiên cứu này, không có chủng nào liên quan đến loài *P. nicotinae* và *P. palmivora* được phân lập như các nghiên cứu trước đây đã công bố [13, 18].

Nghiên cứu cũng phân lập và xác định được một loài *Phytophthium helicoides* từ mẫu trái bưởi Năm Roi bị thối. Kết quả này tương đồng với kết quả nghiên cứu của Thái Thanh Duy và cs (2022) [15]. Tuy nhiên, Thái Thanh Duy và cs (2022) [15]

phân lập được *P. helicoides* từ các mẫu đất ở các cây bưởi bị thối rễ và xì mủ. Điều đó cho thấy, có thể nấm *P. helicoides* hiện diện phổ biến trong đất trồng bưởi và có khả năng gây hại các bộ phận cho cây ở các mức độ khác nhau. Kết quả chủng bệnh nhân tạo đã bổ sung cho nhận định đó thông qua khả năng gây hại trung bình của chủng nấm lên lá bưởi Năm Roi. Thêm vào đó, tại Trung Quốc, *P. helicoides* được Chen và cs (2016) [9] xác định là tác nhân gây thối thân quýt (*Citrus reticulata*) giống Shatangju.

Tóm lại, sự xuất hiện của các loài *Phytophthora* và *Phytophthium* mới trên đất vườn và các mẫu bệnh từ trái và lá bưởi Năm Roi cho thấy, ngoài các loài đã được xác định là hiện diện phổ biến và gây hại trên các vườn cam quýt như *P. palmivora*, *P. nicotinae* và *P. citrophthora*, các loài mới đang được xác định cũng có thể có liên quan đến việc gây thối rễ, chảy nhựa và thối trái trên bưởi Năm Roi và các giống/loài cam, quýt khác.

4. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

4.1. Kết luận

Đã phân lập được 73 chủng *Phytophthora* và *Phytophthium* từ đất vùng rễ và mẫu trái, lá bưởi bị nhiễm bệnh ban đầu. Kết quả phân loại về mặt hình thái và PCR - giải trình tự cho thấy 18 chủng đại diện được phân làm 5 nhóm với 5 loài được định danh là *P. virginiana* (nhóm 1 với 10 chủng phân lập), *P. parvispora* (nhóm 2 với 5 chủng phân lập), *P. prodigiosa* (nhóm 3 với 1 chủng phân lập), *P. citrophthora* (nhóm 4 với 1 chủng phân lập) và *Phytophthium helicoides* (nhóm 5 với 1 chủng phân lập).

4.2. Kiến nghị

Thử nghiệm các biện pháp phòng trị lên một số chủng *Phytophthora* và *Phytophthium* gây bệnh trên bưởi Năm Roi trong điều kiện phòng thí nghiệm và nhà lưới.

LỜI CẢM ƠN

Nhóm nghiên cứu chân thành cảm ơn Giáo sư Hiromitsu Moriyama và ông Seiji Uematsu (Trường Đại học Nông nghiệp và Công nghệ Tokyo, Nhật Bản) đã hỗ trợ hóa chất và tập huấn kỹ thuật phân lập *Phytophthora*, *Pythium* và *Phytophthium*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Wager, V. A. (1931). Diseases of plants in South Africa due to members of the Pythiaceae. Union So. Africa Department of Agriculture Bulletin, 105, 1 - 43.
2. Drenth, A. & Guest, D. I., ed. (2004). Diversity and management of *Phytophthora* in Southeast Asia. Monograph no. 114, 238p. ACIAR: Canberra.
3. Batuman, O., Ritenour, M., Vicent, A., Li, H., Jae-Wook, H., Catara, V., & Ma, H., Cano L.M. (2020). Diseases caused by fungi and oomycetes, The Genus *Citrus*, Elsevier, 349 - 369.
4. Tsao, P. H., Martin, J. P. & Davis, R. M. (1989). The citrus replant problem. *The citrus industry*, 5, 261 - 279.
5. Thompson, A. H., Phillips, A. J. L. & Nel, E. (1995). *Phytophthora* and *Pythium* associated with feeder root rot of citrus in the Transvaal Province of South Africa. *Journal of Phytopathology*, 143(1), 37 - 41.
6. Maseko, B. O. Z., & Coutinho, T. A. (2001). Pathogenicity of *Phytophthora* and *Pythium* species associated with citrus root rot in South Africa. *South African Journal of Botany*, 68, 327-332.
7. Kean, S., Soyong, K. and To-anun, C. (2010). Application of biological fungicides to control citrus root rot in Cambodia. *Journal of Agricultural Technology*, 6(2): 219 - 230.
8. Spies, C. F. J., Mazzola, M. & McLeod, A. (2011). Characterisation and detection of *Pythium* and *Phytophthora* species associated with grapevines in South Africa. *European Journal of Plant Pathology*, 131(1), 103 -119.
9. Chen, X. R., Liu, B. B., Xing, Y. P., Cheng, B. P., Liu, M. L., Tong, Y. H. and Xu, J. Y. (2016). Identification and characterization of *Phytophthora helicoides* causing stem rot of Shatangju mandarin seedlings in China. *European Journal of Plant Pathology*, 146(4), 715 - 727.
10. Benfradj, N., Migliorini, D., Luchi, N., Santini, A. and Boughalleb-M'Hamdi, N. (2017). Occurrence of *Pythium* and *Phytophthora* species isolated from citrus trees infected with gummosis disease in Tunisia. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 50(5 - 6), 286 - 302.
11. Noireung, P., Intaparn, P., Maumoon, R., Wongwan, T. & To-anun, C. (2020). First record of *Phytophthora vexans* causing root rot on Mandarin (*Citrus reticulata* L. cv. *Sainampung*) in Thailand. *Plant Pathology & Quarantine*, 10(1), 85 - 90.
12. Thanh, D. V. T., Vien, N. V. & Drenth, A. (2004). *Phytophthora* diseases in Vietnam. In Drenth, A. and Guest, D. I. (Eds.), *Diversity and management of Phytophthora in Southeast Asia*, 83 - 89.
13. Nguyễn Ngọc Anh Thư, Đỗ Ái Mỹ, Nguyễn Thành Hiếu, Nguyễn Văn Hòa (2012). *Khảo sát tác nhân gây bệnh vàng lá thối rễ trên cây có múi ở đồng bằng sông Cửu Long. Kỷ yếu Hội thảo quốc gia "Bệnh hại thực vật Việt Nam" lần thứ 11 tại Viện Cây ăn quả miền Nam*. Nxb Nông nghiệp, Hà Nội. Trang 240 - 245.
14. Puglisi, I., De Patrizio, A., Schena, L., Jung, T., Evoli, M., Pane, A... & Cacciola, S. O. (2017). Two previously unknown *Phytophthora* species associated with brown rot of pomelo (*Citrus grandis*) fruits in Vietnam. *PLoS One*, 12(2), e0172085.
15. Thái Thanh Duy, Phạm Thanh Nam, Lâm Phước Thành, Lê Phước Thịnh (2022). Định danh một số chủng nấm *Pythium*, *Phytophthora* và *Phytophthora* hiện diện trong đất vùng rễ bưởi 'Năm Roi' bằng hình thái và sinh học phân tử. *Tạp chí Bảo vệ thực vật*, 5, 21 - 27.
16. Tran, V. Q., Ha, V. C., Vvedensky, V. V., Le, T. T. L. & Han, V. C. (2023a). Pathogenicity and fungicide sensitivity of *Phytophthora parvispora*, a new pathogen causing gummosis and root rot disease on citrus trees. *Microbial Pathogenesis*, 175, 105986.
17. Tran, V. Q., Vvedensky, V. V., Viet - Cuong, H. & Cuong, H. V. (2023b). Pathogenicity

- of *Pythium deliense* isolated from the rhizosphere soil of orange in Vietnam. *The International Society for Southeast Asian Agricultural Sciences*, 1, 90 - 101.
18. Tran, V. Q., Ha, V. C., Vvedensky, V. V. & Han, V. C. (2023c). Current status and characterization of *Phytophthora* species associated with gummosis of citrus in Northern Vietnam. *Journal of Phytopathology*, 171(9), 478 - 488.
19. Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia QCVN 01 - 119:2012. Phương pháp điều tra phát hiện sinh vật gây hại trên cây ăn quả có múi.
20. Grimm, G. R. and, Alexander, A. F. (1973). Citrus leaf pieces as traps for *Phytophthora parasitica* from soil slurries. *Phytopathology*, 63, 540 - 541.
21. Burgess, L. W., Knight, T. E., Tesoriero, L., Phan, H. T. (2008). *Diagnostic manual for plant diseases in Vietnam*. ACIAR Monograph no. 129, 210 pp.
22. Abad, Z. G., Burgess, T. I., Bourret, T., Bensch, K., Cacciola, S. O., Scanu, B... & Redford, A. J. (2023). *Phytophthora*: taxonomic and phylogenetic revision of the genus. *Studies in Mycology*, 106(1), 259 - 348.
23. Yan, H., Zhong, Y., Jiang, B., Zhou, B., Wu, B. and Zhong, G. (2017). Guanggan (*Citrus reticulata*) shows strong resistance to *Phytophthora nicotianae*. *Scientia Horticulturae*, 225, 141 - 149.
24. White, T. J., Bruns, T., Lee, S. J. W. T. and Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*, 18(1), 315 - 322.
25. Tamura K., Stecher G. and Kumar S. (2021). MEGA 11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution*. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>.
26. Yang, X. & Hong, C. (2014). *Phytophthora virginiana* sp. nov., a high-temperature tolerant species from irrigation water in Virginia. *Mycotaxon*, 126(1), 167 - 176.
27. Scanu, B., Hunter, G. C., Linaldeddu, B. T., Franceschini, A., Maddau, L., Jung, T. & Denman, S. (2014). A taxonomic re-evaluation reveals that *Phytophthora cinnamomi* and *P. cinnamomi* var. *parvispora* are separate species. *Forest Pathology*, 44(1), 1 - 20.
28. Leonian, L. H. (1925). Physiological studies on the genus *Phytophthora*. *American Journal of Botany*, 444 - 498.
29. de Jesus, A. L., Gonçalves, D. R., Rocha, S. C. O., Marano, A. V., Jerônimo, G. H., De Souza, J. L... & Pires-Zottarelli, C. L. A. (2016). Morphological and phylogenetic analyses of three *Phytophthora* species (Peronosporales, Oomycota) from Brazil. *Cryptogamie, Mycologie*, 37(1), 117 - 128.
30. Chowdappa, P., Brayford, D., Smith, J., & Flood, J. (2003). Molecular discrimination of *Phytophthora* isolates on cocoa and their relationship with coconut, black pepper and bell pepper isolates based on rDNA repeat and AFLP fingerprints. *Current Science*, 1235 - 1238.
31. Khreibeh, M. I., Choumane, W., Ghazal, I., & Azmeh, F. (2015). Molecular characterization of *Pythium* spp. Isolated from tomato seedlings in the Syrian Coast. *Journal of Life Sciences*, 9, 449 - 455.
32. Ann, P. J. & Ko, W. H. (1985). Variants of *Phytophthora cinnamomi* extend the known limits of the species. *Mycologia*, 77(6), 946 - 950.
33. Ann, P. J., Tsai, J. N., Lin, C. P. & Tsai, H. L. (2016). *Phytophthora parvispora*, the correct name for a *Phytophthora* sp. causing diseases of *Citrus* spp. and *Begonia* in Taiwan. *Journal of Plant Medicine*, 58(3/4), 115 - 117.
34. Hardham, A.R. (2005). *Phytophthora cinnamomi*. *Molecular Plant Pathology*, 6(6), 589 - 604.
35. Ghaffar, A. (1969). Biological control of white rot of onion. I. Interactions of soil microorganisms with *Sclerotium cepivorum* Berk. *Mycopathologia Et Mycologia Applicata*, 38(1 - 2), 101 - 111.

IDENTIFICATION OF *Phytophthora* AND *Phytophthium* SPECIES ISOLATED ON DISEASED SAMPLES AND RHIZOSPHERE SOILS OF NAM ROI POMELO IN MY HOA COMMUNE, BINH MINH TOWN, VINH LONG PROVINCE

Pham Thanh Nam^{1,2}, Le Phuoc Thanh¹

¹ Can Tho University

² Department of Crop Production and Plant Protection of Ca Mau province

Abstract

The study was aimed to identify *Phytophthora* and *Phytophthium* species present in disease samples (leaves and fruits) and from the rhizosphere soil of Nam Roi pomelo in My Hoa commune, Binh Minh town, Vinh Long province. Based on morphological characteristics on V8 medium, 18 out of 73 *Phytophthora* and *Phytophthium* isolates were selected to represent subsequent experiments. The experiment evaluating pathogenicity on Nam Roi pomelo leaves was arranged in a completely randomized design with one factor, 4 replications, and 18 treatments, with each treatment being one *Phytophthora* or *Phytophthium* isolate. Morphological characteristics and sizes of sporangia, chlamydospores and sporangial proliferation of the 18 representative *Phytophthora* and *Phytophthium* isolates were recorded. DNA of the 18 representative *Phytophthora* and *Phytophthium* isolates was PCR-amplified using the ITS1/ITS4 primer pair; subsequently, PCR products with a clear, bright band were sequenced; the sequencing products were processed using Finch TV software (version 1.4.0), compared with reference sequences (BLAST) on NCBI for species identification and a phylogenetic tree was constructed using MEGA software (version 11.0.14). The results showed that all 18 representative isolates caused disease on Nam Roi pomelo leaves after 5 days of inoculation with varying degrees of severity, depending on the virulence of each isolate. Based on morphological characteristics and PCR-sequencing results, the 18 representative isolates were divided into 5 Groups: Group 1 included 10 isolates: PP7, PP8, PP9, PP13, PP17, PP18, PP22, PP23, PP27, and PP28, belonging to the species *Phytophthora virginiana*; group 2 included 5 isolates: PP1, PP2, PP3, PP4, PP5, belonging to the species *Phytophthora parvispora*; group 3 included 1 isolate, PP21, belonging to the species *Phytophthora prodigiosa*; group 4 included 1 isolate, PP11, belonging to the species *Phytophthora citrophthora*; group 5 included 1 isolate, PP12, belonging to the species *Phytophthium helicoides*.

Keywords: *Phytophthora*, *Phytophthium*, Nam Roi pomelo.

Ngày nhận bài: 15/4/2025

Ngày chuyển phản biện: 01/7/2025

Ngày thông qua phản biện: 15/7/2025

Ngày duyệt đăng: 4/8/2025