

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO  
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM TP. HỒ CHÍ MINH

\*\*\*\*\*

NGUYỄN ĐÔN HIỆU

**ĐÁNH GIÁ ĐA DẠNG DI TRUYỀN VÀ TÍNH GÂY BỆNH  
CỦA NẤM *Corynespora cassiicola* TRÊN CÂY CAO SU  
(*Hevea brasiliensis*) Ở VIỆT NAM**

Chuyên ngành: **Bảo vệ thực vật**

Mã số : 9.62.01.12

**LUẬN ÁN TIẾN SĨ NÔNG NGHIỆP**

Hướng dẫn Khoa học:

TS. NGUYỄN ANH NGHĨA

PGS.TS. NGUYỄN BẢO QUỐC

Thành phố Hồ Chí Minh, năm 2020

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO  
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM TP. HỒ CHÍ MINH

\*\*\*\*\*

NGUYỄN ĐÔN HIỆU

**ĐÁNH GIÁ ĐA DẠNG DI TRUYỀN VÀ TÍNH GÂY BỆNH  
CỦA NẤM *Corynespora cassiicola* TRÊN CÂY CAO SU  
(*Hevea brasiliensis*) Ở VIỆT NAM**

Chuyên ngành: **Bảo vệ thực vật**

Mã số : 9.62.01.12

**LUẬN ÁN TIẾN SĨ NÔNG NGHIỆP**

Hướng dẫn Khoa học:

TS. NGUYỄN ANH NGHĨA

PGS.TS. NGUYỄN BẢO QUỐC

Thành phố Hồ Chí Minh, năm 2020

## LỜI CẢM ƠN

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn chân thành đến:

TS. Nguyễn Anh Nghĩa, PGS.TS. Nguyễn Bảo Quốc đã tận tình hướng dẫn và truyền đạt cho tôi nhiều kiến thức quý báu trong suốt quá trình thực hiện đề tài, giúp tôi hoàn thành luận án này;

TS. Võ Thị Thu Oanh, TS. Phạm Đức Toàn, TS. Phan Công Kiên đã luôn quan tâm, góp ý xây dựng trong suốt quá trình thực hiện đề tài;

Ban Giám hiệu, Thầy Cô Khoa Nông học và Phòng Sau Đại học - Trường Đại học Nông Lâm TP. Hồ Chí Minh đã tạo điều kiện thuận lợi cho tôi trong quá trình học tập;

Ban lãnh đạo Viện Nghiên cứu Cao su Việt Nam và Phòng Nghiên cứu Bảo vệ Thực vật đã tạo điều kiện thuận lợi cho tôi tham gia khóa học và thực hiện luận án nghiên cứu này;

ThS. Nguyễn Thị Kim Uyên, KS. Nguyễn Ngọc Mai, KS. Bùi Thanh Tuấn, ThS. Nguyễn Thị Thanh Trang (Phòng Nghiên cứu Bảo vệ Thực Vật), KS. Huỳnh Đức Định (Phòng Nghiên cứu Di truyền Giống) - Viện Nghiên cứu Cao su Việt Nam đã tích cực giúp đỡ trong việc thực hiện các thí nghiệm thuộc đề tài;

Các bạn đồng nghiệp và gia đình đã động viên khuyến khích, giúp đỡ tôi trong suốt thời gian học tập tại Trường.

Tác giả luận án

Nguyễn Đôn Hiệu

## **LỜI CAM ĐOAN**

Tôi cam đoan đây là công trình nghiên cứu của tôi được thực hiện dưới sự hướng dẫn của TS. Nguyễn Anh Nghĩa và PGS.TS. Nguyễn Bảo Quốc tại Viện Nghiên cứu Cao su Việt Nam và Trường Đại học Nông Lâm TP. Hồ Chí Minh. Số liệu, kết quả nêu trong luận án là trung thực đã được công bố trong các tạp chí, hội nghị khoa học bởi tác giả, nhóm tác giả và chưa được ai công bố.

Tác giả luận án

Nguyễn Đôn Hiệu



## TÓM TẮT

**NGUYỄN ĐÔN HIỆU – “Đánh giá đa dạng di truyền và tính gây bệnh của nấm *Corynespora cassiicola* trên cây cao su (*Hevea brasiliensis*) ở Việt Nam”**

Chuyên ngành: Bảo vệ Thực vật                      Mã số: 9.62.01.12.

Trường Đại học Nông Lâm TP. Hồ Chí Minh, 2016 – 2020

Nghiên cứu được thực hiện nhằm đánh giá sự đa dạng di truyền của 76 mẫu nấm *C. cassiicola* phân lập từ 16 dòng vô tính (DVT) cao su và tính gây bệnh của 6 mẫu nấm đại diện cho các phân nhóm di truyền và vùng địa lý khác nhau ở Việt Nam.

Đặc điểm hình thái tản nấm của 76 mẫu phân lập (MPL) *C. cassiicola* có sự biến thiên về màu sắc, cấu trúc sợi nấm và tốc độ sinh trưởng. Một số MPL tạo sắc tố hồng trên môi trường dinh dưỡng PSA. Hình thái bào tử có sự biến thiên rất lớn về hình dạng và kích thước không chỉ giữa các MPL mà còn trong cùng một MPL.

Trình tự vùng rDNA-ITS (ribosomal DNA internal transcribed spacer) của 76 MPL *C. cassiicola* có cùng kích thước 559 bp và giống nhau ngoại trừ 2 nucleotide khác biệt được phát hiện ở vị trí 135 và vị trí 474. Trình tự vùng rDNA-ITS đã phân chia 76 MPL thành 3 nhóm di truyền riêng biệt, nhóm 1 gồm 38 MPL có cytosine (C) ở nucleotide vị trí 135, nhóm 2 gồm 35 MPL có thymine (T) ở cùng vị trí và nhóm 3 gồm 3 MPL có adenine (A) ở vị trí 474.

Mối quan hệ di truyền của 76 MPL nấm *C. cassiicola* được phân tích dựa trên chỉ thị phân tử SRAP (Sequence-Related Amplified Polymorphism). Ba mươi (30) cặp primer SRAP đã được sử dụng để khuếch đại DNA vùng ORFs (Open Reading Frames), thu được 223 băng DNA với tỷ lệ đa hình là 93,3%. Cây phân nhóm di truyền được tạo từ phân tích UPGMA dựa trên hệ số Nei và Li's đã chia 76 MPL thành 2 nhóm chính. Nhóm 1 bao gồm 54 MPL, trong đó nhóm phụ 1A có 51 MPL và nhóm phụ 1B có 3 MPL. Nhóm 2 bao gồm 22 MPL, trong đó nhóm phụ 2A có 20 MPL và nhóm phụ 2B có 2 MPL. Giá trị Bootstrap cho nhóm 1 và 2 lần

lượt là 61% và 100%. Hệ số tương đồng giữa 2 nhóm chính là 67%. Sự phân nhóm theo vùng địa lý ở mức cao và kiểu di truyền của các MPL nấm *C. cassiicola* dường như phụ thuộc vào vùng địa lý hơn là nguồn gốc ký chủ (DVT cao su).

Sử dụng kỹ thuật PCR khuếch đại gen mã hóa độc tố cassiicolin (gen *Cas*) với 7 cặp primer chuyên biệt đã phát hiện được 40/76 MPL nấm có sự hiện diện của gen *Cas2* và 36 mẫu nấm còn lại không phát hiện được gen *Cas*, xếp vào nhóm *Cas0*. Dựa vào gen *Cas*, 76 MPL được phân chia thành 2 nhóm di truyền riêng biệt.

Bảy mươi sáu (76) MPL *C. cassiicola* nghiên cứu đã được khảo sát khả năng gây bệnh trên hai dòng vô tính cao su, RRIV 4 (DVT miễn cảm) và PB 260 (DVT chống chịu bệnh) bằng phương pháp lá cắt rời. Tất cả 76 MPL đều có thể lây nhiễm lá của 2 DVT cao su. Mức độ lây nhiễm của các MPL trên DVT RRIV 4 nghiêm trọng hơn rõ rệt so với trên DVT PB 260, tương ứng chỉ số bệnh (CSB) biến thiên từ 25,7% đến 100% so với 9,7% đến 76,7%.

Sáu (6) MPL đại diện cho các phân nhóm di truyền và vùng địa lý khác nhau gồm CoryLK02, CoryDP03, CoryDN39, CoryKT04, CoryBT17, CorySL02 được chọn để đánh giá mức độ gây bệnh trên 12 DVT cao su. Trong điều kiện phòng thí nghiệm, tất cả 6 MPL đều gây bệnh rất nặng trên DVT RRIV 4 (CSB trung bình 94,6%), gây bệnh nặng trên RRIV 1, RRIV 106, RRIV 206, RRIV 114, PB 260, PB 255, RRIV 209 (CSB trung bình 52,5% – 75,6%), gây bệnh trung bình trên RRIV 109, RRIV 124, PB 312, RRIV 230 (CSB trung bình 31,7% – 44,8%). Trong điều kiện nhà lưới, tất cả 6 MPL đều gây bệnh rất nặng trên DVT RRIV 4 (CSB trung bình 95,4%), trung bình trên RRIV 106, RRIV 1 (CSB trung bình 32,6% – 33,7%), gây bệnh nhẹ trên các DVT khác (CSB trung bình 6,4% – 19,2%).

## SUMMARY

**NGUYEN DON HIEU – “Genetic diversity and pathogenicity of the fungus *Corynespora cassiicola* on rubber tree (*Hevea brasiliensis*) in Vietnam”**

Major: Plant Protection

Code: 9.62.01.12

Nong Lam University Ho Chi Minh City, 2016 – 2020

The study was carried out to assess the genetic diversity among 76 *C. cassiicola* isolates collected from 16 rubber clones and pathogenicity of 6 isolates represent different distinct genetic groups and geographic regions in Vietnam.

The morphological characteristics of 76 *C. cassiicola* isolates vary in colour, hyphae texture and growth speed. Some isolates produced pink pigment. Conidial morphology was found greatly different in shape and size not only among isolates but also within each isolate.

DNA sequences confirmed the DNA fragments generated from 76 isolates were equal in length with 559 bp and the rDNA-ITS regions of all these isolates were identical with the exception two different nucleotide detected at base pair 135<sup>th</sup> and 474<sup>th</sup>. The rDNA-ITS sequences segregated the 76 studied isolates into three distinct genetic groups. Group 1, includes 38 isolates, contained cytosin (C); group 2, includes 35 isolates, contained thymine (T) at base pair 135; and group 3, includes 3 isolates, contained adenine (A) at base pair 474.

The genetic relationship of 76 isolates of *C. cassiicola* was analysed using the SRAP (Sequence-Related Amplified Polymorphism) markers. Thirty (30) SRAP primers were used to amplify DNA in ORFs (Open Reading Frames). The total DNA band obtained was 223 in which 93.3% were polymorphic. A dendrogram produced from UPGMA analysis based on Nei and Li's coefficient divided the 76 *C. cassiicola* isolates into two main clusters. Cluster one included 54 fungal isolates of which 51 and 3 were observed in subgroup 1A and 1B respectively. There were 22 *C. cassiicola* isolates belonging to cluster two with subgroups 2A and 2B consisted of 20 and 2 fungal isolates, respectively. Bootstrap values for groups one and two were 61% and 100%. Similarity coefficient between the two main groups at

67%. SRAP markers divided the studied isolates into two distinct groups which correlated with geographical environment rather than host source (rubber clone).

*Cas* genes were amplified using PCR technique with 7 specific primer pairs in order to detect cassiicolin encoding genes in 76 *C. cassiicola*. Cassiicolin protein isoform *Cas2* encoding gene was detected in 40 out of 76 isolates, meanwhile no *Cas* genes was detected in the remaining 36 isolates, which were subsequently classified to *Cas0* group. Based on *Cas* gen, the 76 *C. cassiicola* isolates have been divided into two distinct genetic groups.

A total of 76 *C. cassiicola* isolates were tested their pathogenicity on two rubber clones, RRIV 4 (susceptible clone) and PB 260 (tolerant clone), using detached leaf assay. All of the 76 isolates could infect leaves of 2 rubber clones. The infection levels of 76 isolates on rubber clone RRIV 4 were markedly more serious than that on rubber clone PB 260 with percent disease intensity (PDI) ranging from 25.7% to 100% in comparison to 9.7% to 76.7%, respectively.

Six of these studied isolates representing different genetic groups and geographic regions including CoryLK02, CoryDP03, CoryDN39, CoryKT04, CoryBT17, CorySL02 were selected to assess their pathogenicity on 12 rubber clones. In laboratory condition, all of six isolates caused very severe disease on RRIV 4 (average PDI = 94.6%), severe disease on RRIV 1, RRIV 106, RRIV 206, RRIV 114, PB 260, PB 255, RRIV 209 with average PDI values ranging from 52.5% to 75.6%, moderate disease on RRIV 109, RRIV 124, PB 312, RRIV 230 with average PDI ranging from 31.7% to 44.8%. In greenhouse condition, all of six isolates caused very severe disease on RRIV 4 (average PDI = 95.4%), moderate disease on RRIV 106, RRIV 1 with average PDI values ranging from 32.6% to 33.7%, and mild on others with average PDI values ranging from 6.4% to 19.2%.

## MỤC LỤC

Lời cảm ơn .....	i
Lời cam đoan .....	ii
Tóm tắt .....	iii
Mục lục .....	vii
Danh sách chữ viết tắt .....	xi
Danh sách các bảng .....	xiii
Danh sách các hình .....	xiv
<b>MỞ ĐẦU .....</b>	<b>1</b>
1. Tính cấp thiết của đề tài .....	1
2. Ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài .....	2
2.1. Ý nghĩa khoa học .....	2
2.2. Ý nghĩa thực tiễn .....	3
3. Mục tiêu nghiên cứu của đề tài .....	3
4. Thời gian, đối tượng và phạm vi nghiên cứu .....	3
4.1. Thời gian nghiên cứu .....	3
4.2. Đối tượng nghiên cứu .....	3
4.3. Phạm vi nghiên cứu .....	3
5. Những đóng góp mới của luận án .....	4
<b>Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU .....</b>	<b>5</b>
1.1. Sơ lược về tình hình sản xuất và vị trí cây cao su ở Việt Nam .....	5
1.2. Bệnh rụng lá <i>Corynespora</i> trên cây cao su .....	6
1.2.1. Lịch sử và tác hại của bệnh rụng lá <i>Corynespora</i> tại một số quốc gia trên thế giới.....	6
1.2.2. Lịch sử và tác hại của bệnh rụng lá <i>Corynespora</i> trên cây cao su ở Việt Nam .....	7
1.2.3. Triệu chứng bệnh rụng lá <i>Corynespora</i> trên cây cao su.....	8
1.3. Đặc điểm của nấm <i>Corynespora cassiicola</i> gây bệnh trên cây cao su và một số cây ký chủ khác.....	10

1.3.1. Vị trí phân loại và đặc điểm hình thái nấm <i>Corynespora cassiicola</i> .....	10
1.3.2. Phân bố và ký chủ của nấm <i>Corynespora cassiicola</i> .....	12
1.4. Đặc điểm phát sinh và phát triển của nấm <i>Corynespora cassiicola</i> trên cây cao su .....	14
1.5. Đặc điểm sinh lý, sự xâm nhiễm, lây lan và lưu tồn của nấm <i>Corynespora cassiicola</i> .....	15
1.6. Nghiên cứu về đa dạng di truyền của nấm <i>Corynespora cassiicola</i> bằng chỉ thị phân tử .....	16
1.6.1. Sự đa dạng di truyền ở mức độ phân tử của nấm <i>Corynespora cassiicola</i> .....	16
1.6.2. Các chỉ thị phân tử được sử dụng trong nghiên cứu đa dạng di truyền nấm <i>Corynespora cassiicola</i> .....	18
1.6.2.1. Chỉ thị phân tử RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)	19
1.6.2.2. Chỉ thị phân tử RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) .....	19
1.6.2.3. Chỉ thị phân tử ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) .....	20
1.6.2.4. Phân tích trình tự vùng rDNA-ITS .....	21
1.6.2.5. Chỉ thị phân tử SRAP (Sequence-Related Amplified Polymorphism)	24
1.7. Độc tố cassiicolin của nấm <i>Corynespora cassiicola</i> .....	25
1.7.1. Vai trò của độc tố cassiicolin .....	25
1.7.2. Cấu trúc và đặc tính của độc tố cassiicolin .....	26
1.7.3. Mối liên hệ giữa cassiicolin, tính gây bệnh của nấm <i>Corynespora cassiicola</i> và tính kháng của ký chủ .....	27
1.8. Nghiên cứu về đa dạng di truyền gen mã hóa độc tố cassiicolin (gen <i>Cas</i> ) của nấm <i>Corynespora cassiicola</i> .....	28
1.9. Nghiên cứu về tính gây bệnh của nấm <i>Corynespora cassiicola</i> .....	30
1.10. Khái lược về tương tác ký sinh – ký chủ trong bệnh cây .....	31
1.10.1. Thuyết “gen for gen” .....	31
1.10.2. Tính kháng của ký chủ .....	32
1.10.3. Phản ứng siêu nhạy cảm (HR: hypersensitivity response) .....	34

<b>Chương 2. NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU .....</b>	<b>36</b>
2.1. Nội dung nghiên cứu.....	36
2.2. Thời gian và địa điểm nghiên cứu .....	36
2.3. Vật liệu nghiên cứu .....	37
2.4. Phương pháp nghiên cứu .....	45
2.4.1. Thu thập mẫu bệnh và phân lập nấm .....	45
2.4.2. Khảo sát đặc điểm hình thái nấm <i>Corynespora cassiicola</i> .....	45
2.4.3. Phân tích đa dạng di truyền nấm <i>Corynespora cassiicola</i> .....	46
2.4.3.1. Ly trích DNA nấm <i>Corynespora cassiicola</i> .....	46
2.4.3.2. Khuếch đại vùng rDNA-ITS bằng kỹ thuật PCR .....	47
2.4.3.3. Khuếch đại vùng ORFs bằng phản ứng PCR-SRAP .....	48
2.4.4. Phản ứng PCR nhận diện gen <i>Cas</i> .....	50
2.4.5. Khảo sát tính gây bệnh của 76 MPL nấm <i>Corynespora cassiicola</i> trên DVT cao su RRIV 4 (mẫn cảm bệnh) và PB 260 (chống chịu bệnh).....	51
2.4.6. Đánh giá tính gây bệnh của 6 MPL nấm <i>Corynespora cassiicola</i> đại diện cho các phân nhóm di truyền và vùng địa lý khác nhau trên 12 DVT cao su .....	53
2.4.6.1. Điều kiện phòng thí nghiệm .....	53
2.4.6.2. Điều kiện nhà lưới .....	56
<b>Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN .....</b>	<b>59</b>
3.1. Đặc điểm hình thái của nấm <i>Corynespora cassiicola</i> phân lập từ cây cao su .....	59
3.1.1. Đặc điểm hình thái tản nấm <i>Corynespora cassiicola</i> .....	59
3.1.2. Đặc điểm hình thái bào tử nấm <i>Corynespora cassiicola</i> .....	64
3.2. Đa dạng di truyền của nấm <i>Corynespora cassiicola</i> phân lập từ cây cao su .....	69
3.2.1. Nhận diện và phân tích mối quan hệ di truyền của các MPL nấm <i>Corynespora cassiicola</i> dựa trên trình tự vùng rDNA-ITS .....	69

3.2.2. Phân tích mối quan hệ di truyền của các MPL nấm <i>Corynespora cassiicola</i> dựa trên chỉ thị phân tử SRAP .....	79
3.3. Xác định sự hiện diện của gen Cas trên các MPL nấm <i>Corynespora cassiicola</i> .....	89
3.4. Khảo sát tính gây bệnh của 76 MPL nấm <i>Corynespora cassiicola</i> trên DVT cao su RRIV 4 (mẫn cảm bệnh) và PB 260 (chống chịu bệnh).....	97
3.5. Đánh giá tính gây bệnh của 6 MPL nấm <i>Corynespora cassiicola</i> đại diện cho các phân nhóm di truyền và vùng địa lý khác nhau trên 12 DVT cao su .....	101
3.5.1. Điều kiện phòng thí nghiệm .....	101
3.5.2. Điều kiện nhà lưới .....	109
<b>CHƯƠNG 4. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ .....</b>	<b>118</b>
4.1. Kết luận .....	118
4.2. Đề nghị .....	119
<b>DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH NGHIÊN CỨU CÓ LIÊN QUAN ĐÃ CÔNG BỐ .....</b>	<b>120</b>
<b>TÀI LIỆU THAM KHẢO .....</b>	<b>122</b>
<b>PHỤ LỤC .....</b>	<b>137</b>



**DANH SÁCH CHỮ VIẾT TẮT**

AFLP:	Amplified Fragment Length Polymorphism
BLAST:	Basic Local Alignment Search Tool
bp:	base pair
ctv:	Cộng tác viên
CBTB:	Cấp bệnh trung bình
CSB:	Chỉ số bệnh
DNA:	deoxyribonucleic acid
dNTPs:	deoxynucleotides
DVT:	Dòng vô tính
ISSR:	Inter Simple Sequence Repeat
IGS	intergenic spacer
ITS:	Internal Transcribed Spacer
KTCB:	Kiến thiết cơ bản
LSU:	Large subunit
mM:	Milimolar
MEA	Malt Extract Agar
MGB	Mức gây bệnh
MPL	Mẫu phân lập
MW:	molecular weight
NCBI:	National Center for Biotechnology Information
ng:	nanogram
ORFs:	Open Reading Frames

PCR:	Polymerase Chain Reaction
PDA:	Potato Dextrose Agar
PSA	Potato Sucrose Agar
RAPD :	Random Amplified Polymorphic DNA
rDNA:	ribosomal deoxyribonucleotide acid
RFLPs :	Restriction Fragment Length Polymorphisms
RLEA	Rubber Leaf Extract Agar
RNA:	ribonucleic acid
RRIM:	Rubber Research Institute of Malaysia
RRIV:	Rubber Research Institute of Vietnam
SNPs:	Single Nucleotide Polymorphism
SSR:	Simple Sequence Repeat
SSU:	Small subunit
SRAP:	Sequence-Related Amplified Polymorphism
TAE:	Tris acetate EDTA
UBC:	University of British Columbia
UPGMA:	Unweighted Paired Group Method with Arithmetic mean
UV:	Ultra Violet
V:	Volts

## DANH SÁCH CÁC BẢNG

	TRANG
<b>Bảng 2.1.</b> Danh sách 76 MPL nấm <i>C. cassiicola</i> sử dụng trong nghiên cứu	39
<b>Bảng 2.2.</b> Danh sách 30 cặp primer, trình tự và nhiệt độ bắt cặp thực hiện phản ứng PCR-SRAP .....	42
<b>Bảng 2.3.</b> Danh sách 7 cặp primer khuếch đại gen <i>Cas</i> .....	44
<b>Bảng 2.4.</b> Thành phần hóa chất phản ứng PCR khuếch đại rDNA-ITS.....	47
<b>Bảng 2.5.</b> Chu trình phản ứng PCR khuếch đại rDNA-ITS .....	47
<b>Bảng 2.6.</b> Thành phần hóa chất phản ứng PCR-SRAP.....	48
<b>Bảng 2.7.</b> Chu trình nhiệt phản ứng PCR-SRAP .....	49
<b>Bảng 2.8.</b> Thành phần hóa chất phản ứng PCR khuếch đại gen <i>Cas</i> .....	50
<b>Bảng 2.9.</b> Chu trình nhiệt phản ứng PCR khuếch đại gen <i>Cas</i> .....	50
<b>Bảng 2.10.</b> Đánh giá mức gây bệnh của nấm <i>C. cassiicola</i> trên phiến lá cao su bằng phương pháp lây bệnh trên lá cắt rời .....	52
<b>Bảng 2.11.</b> Phân hạng mức gây bệnh của nấm <i>C. cassiicola</i> trên lá cao su cắt rời dựa trên CSB .....	53
<b>Bảng 2.12.</b> Danh sách 6 MPL nấm đại diện cho các phân nhóm di truyền và vùng địa lý .....	55
<b>Bảng 2.13.</b> Đánh giá mức gây bệnh của nấm <i>C. cassiicola</i> trên lá cao su bằng phương pháp lây bệnh trong nhà lưới .....	56
<b>Bảng 2.14.</b> Phân hạng mức gây bệnh của nấm <i>C. cassiicola</i> dựa trên CSB ở nhà lưới.....	57
<b>Bảng 3.1.</b> Màu sắc tản nấm <i>C. cassiicola</i> sau 7 ngày cấy nấm.....	61
<b>Bảng 3.2.</b> Kết cấu tản nấm <i>C. cassiicola</i> sau 7 ngày cấy nấm.....	62
<b>Bảng 3.3.</b> Chiều dài ( $\mu\text{m}$ ) bào tử nấm <i>C. cassiicola</i> .....	65
<b>Bảng 3.4.</b> Chiều rộng ( $\mu\text{m}$ ) bào tử nấm <i>C. cassiicola</i> .....	66
<b>Bảng 3.5.</b> Trung bình số vách ngăn giả của bào tử nấm <i>C. cassiicola</i> .....	67

<b>Bảng 3.6.</b> Phân nhóm di truyền các MPL nấm <i>C. cassicola</i> theo trình tự vùng rDNA-ITS .....	71
<b>Bảng 3.7.</b> Kết quả khuếch đại DNA của 76 MPL nấm <i>C. cassicola</i> với 30 cặp mồi SRAP .....	80
<b>Bảng 3.8.</b> Phân nhóm di truyền các MPL nấm <i>C. cassicola</i> theo chỉ thị phân tử SRAP .....	82
<b>Bảng 3.9.</b> Mức độ gây bệnh của nấm <i>C. cassicola</i> trên lá cao su DVT RRIV 4 ở thời điểm 7 ngày sau chủng .....	98
<b>Bảng 3.10.</b> Mức độ gây bệnh của nấm <i>C. cassicola</i> trên lá cao su DVT PB 260 ở thời điểm 7 ngày sau chủng .....	99
<b>Bảng 3.11.</b> Mức độ gây bệnh của 6 MPL nấm trên lá cắt rời của 12 DVT cao su ở thời điểm 7 ngày sau chủng .....	105
<b>Bảng 3.12.</b> Mức độ gây bệnh của 6 MPL nấm trên 12 DVT cao su trong nhà lưới ở thời điểm 10 ngày sau chủng.....	112

## DANH SÁCH CÁC HÌNH

	TRANG
<b>Hình 1.1.</b> Các dạng triệu chứng bệnh rụng lá <i>Corynespora</i> trên cây cao su	10
<b>Hình 1.2.</b> Nguyên lý kỹ thuật RAPD .....	20
<b>Hình 1.3.</b> Cấu trúc 1 đơn vị gen ribosomal DNA (rDNA) .....	23
<b>Hình 1.4.</b> Vùng các môi ITS (Internal Transcribed Spacer) .....	23
<b>Hình 2.1.</b> Minh họa phương pháp lây bệnh nhân tạo trên lá cắt rời.....	52
<b>Hình 2.2.</b> Minh họa một số bước trong phương pháp lây bệnh nhân tạo ở điều kiện nhà lưới .....	58
<b>Hình 3.1.</b> Sự biến thiên về hình thái tản nấm <i>C. cassiicola</i> nuôi cấy trên môi trường PSA .....	63
<b>Hình 3.2.</b> Sự biến thiên về hình dạng và kích thước của bào tử nấm <i>C. cassiicola</i> .....	68
<b>Hình 3.3.</b> Gel điện di sản phẩm PCR của 76 MPL nấm <i>C. cassiicola</i> dùng môi ITS1 và ITS4 .....	72
<b>Hình 3.4.</b> Sự khác biệt nucleotide ở vị trí 135 trong vùng ITS1 và vị trí 474 trong vùng ITS2 của 76 MPL nấm <i>C. cassiicola</i> .....	73
<b>Hình 3.5.</b> Cây phân nhóm di truyền thu được từ phân tích Neighbor – joining dựa trên trình tự vùng rDNA-ITS của 76 MPL nấm <i>C. cassiicola</i> ...	74
<b>Hình 3.6.</b> Lược đồ phân bố địa lý của các phân nhóm di truyền nấm <i>C. cassiicola</i> theo trình tự vùng rDNA-ITS .....	78
<b>Hình 3.7.</b> Gel điện di sản phẩm PCR khuếch đại DNA của 76 MPL nấm <i>C. cassiicola</i> với 3 cặp primer SRAP .....	83
<b>Hình 3.8.</b> Cây phân nhóm di truyền thu được từ phân tích UPGMA, sử dụng hệ số tương đồng Nei và Li's dựa trên 223 băng SRAP, chỉ ra mối quan hệ di truyền của 76 MPL nấm <i>C. cassiicola</i> .....	84
<b>Hình 3.9.</b> Lược đồ phân bố địa lý của các phân nhóm di truyền nấm <i>C. cassiicola</i> theo chỉ thị phân tử SRAP .....	87
<b>Hình 3.10.</b> Gel điện di sản phẩm PCR khuếch đại gen <i>Cas</i> của 76 MPL nấm <i>C. cassiicola</i> .....	91
<b>Hình 3.11.</b> Lược đồ phân bố địa lý của các phân nhóm di truyền nấm <i>C. cassiicola</i> theo gen <i>Cas</i> .....	94

<b>Hình 3.12.</b> Lược đồ sự phân bố địa lý của các phân nhóm di truyền nấm <i>C. cassiicola</i> theo các chỉ thị phân tử rDNA-ITS, SRAP và CAS .....	96
<b>Hình 3.13.</b> Mức độ xâm nhiễm và gây bệnh của MPL CoryLK02 trên lá cắt rời của 12 DVT cao su ở thời điểm 7 ngày sau chủng.....	106
<b>Hình 3.14.</b> Mức độ xâm nhiễm và gây bệnh của MPL CoryDP03 trên lá cắt rời của 12 DVT cao su ở thời điểm 7 ngày sau chủng.....	106
<b>Hình 3.15.</b> Mức độ xâm nhiễm và gây bệnh của MPL CoryDN39 trên lá cắt rời của 12 DVT cao su ở thời điểm 7 ngày sau chủng.....	107
<b>Hình 3.16.</b> Mức độ xâm nhiễm và gây bệnh của MPL CoryKT04 trên lá cắt rời của 12 DVT cao su ở thời điểm 7 ngày sau chủng.....	107
<b>Hình 3.17.</b> Mức độ xâm nhiễm và gây bệnh của MPL CoryBT17 trên lá cắt rời của 12 DVT cao su ở thời điểm 7 ngày sau chủng.....	108
<b>Hình 3.18.</b> Mức độ xâm nhiễm và gây bệnh của MPL CorySL02 trên lá cắt rời của 12 DVT cao su ở thời điểm 7 ngày sau chủng.....	108
<b>Hình 3.19.</b> Mức độ xâm nhiễm và gây bệnh của MPL CoryLK02 trên DVT RRIV 4, RRIV 1 và RRIV 106 trong nhà lưới ở thời điểm 10 ngày sau chủng.....	113
<b>Hình 3.20.</b> Mức độ xâm nhiễm và gây bệnh của MPL CoryDP03 trên DVT RRIV 4, RRIV 1 và RRIV 106 trong nhà lưới ở thời điểm 10 ngày sau chủng.....	113
<b>Hình 3.21.</b> Mức độ xâm nhiễm và gây bệnh của MPL CoryDN39 trên DVT RRIV 4, RRIV 1 và RRIV 106 trong nhà lưới ở thời điểm 10 ngày sau chủng.....	113
<b>Hình 3.22.</b> Mức độ xâm nhiễm và gây bệnh của MPL CoryKT04 trên DVT RRIV 4, RRIV 1 và RRIV 106 trong nhà lưới ở thời điểm 10 ngày sau chủng.....	114
<b>Hình 3.23.</b> Mức độ xâm nhiễm và gây bệnh của MPL CoryBT17 trên DVT RRIV 4, RRIV 1 và RRIV 106 trong nhà lưới ở thời điểm 10 ngày sau chủng.....	114
<b>Hình 3.24.</b> Mức độ xâm nhiễm và gây bệnh của MPL CorySL02 trên DVT RRIV 4, RRIV 1 và RRIV 106 trong nhà lưới ở thời điểm 10 ngày sau chủng.....	114

## MỞ ĐẦU

### 1. TÍNH CẤP THIẾT CỦA ĐỀ TÀI

Nấm *Corynespora cassiicola*, tác nhân gây bệnh rụng lá *Corynespora* trên cây cao su, là một trong những đối tượng dịch hại thực vật được quan tâm tại hầu hết các nước trồng cao su do mức độ và phạm vi gây bệnh của nấm gia tăng nhanh chóng. Nấm *C. cassiicola* phân bố trên nhiều vùng sinh thái và có phổ ký chủ rộng với hơn 400 loài thực vật thuộc nhóm cây ăn quả, cây công nghiệp, cây lâm nghiệp, cây ngũ cốc, cây rau màu và nhiều loại cây cảnh (Farr và Rossman, 2019). Tại Việt Nam, trên cây cao su, *C. cassiicola* được phát hiện vào tháng 8 năm 1999 trên vườn cây cao su của Viện Nghiên cứu Cao su Việt Nam, huyện Bàu Bàng, tỉnh Bình Dương (Phan Thanh Dung và Nguyen Thai Hoan, 2000). Từ năm 2009, các đợt dịch bệnh thường xuyên xảy ra gây hại trên hàng ngàn hecta vườn cây cao su mỗi năm buộc các Công ty trong ngành và người trồng cao su phải đầu tư chi phí lớn cho công tác phòng trị bệnh.

Nấm *C. cassiicola* có đặc điểm sinh học rất phức tạp vì có khả năng ký sinh, hoại sinh và nội sinh (Déon và ctv, 2014). Kết quả các nghiên cứu dựa vào chỉ thị phân tử RAPD, rDNA-RFLP, rDNA-ITS, ISSR đã cho thấy loài nấm này rất đa dạng về mặt di truyền (Darmono và ctv, 1996; Silva và ctv, 1998; Saha và ctv, 2000; Silva và ctv, 2003; Romruensukharom và ctv, 2005, Nguyen Anh Nghia và ctv, 2008; Qi và ctv, 2009; Nguyen Don Hieu, 2014; Oktavia và ctv, 2017). Trên phương diện đa dạng di truyền gen mã hóa độc tố cassicolin (gen *Cas*), có ít nhất 6 nhóm gen *Cas* được phát hiện và có sự khác biệt về mức độ gây bệnh của các mẫu nấm mang gen *Cas* khác nhau (Déon và ctv, 2014).

Nhiều dòng vô tính (DVT) cao su ban đầu được cho là kháng bệnh nhưng sau đó đã nhiễm bệnh từ mức nhẹ đến trung bình hoặc mãn cảm (Tan và ctv, 1992; Jayasinghe và Silva, 1996). Mức độ mãn cảm của các DVT cao su biến thiên tùy

theo vùng địa lý, một số DVT cao su được cho là kháng bệnh ở nước này nhưng mẫn cảm ở nước khác. Điều này dẫn đến giả thuyết *C. cassiicola* có khả năng hình thành nhiều nòi sinh lý mới để phá vỡ tính kháng bệnh của một số DVT cao su hoặc là đang có sự tồn tại nhiều nòi (race) khác nhau trên nhiều vùng sinh thái. Bên cạnh đó, kết quả các nghiên cứu về tính gây bệnh của nấm đều chứng tỏ có sự biến thiên lớn về mức độ gây bệnh của các mẫu phân lập (MPL) khác nhau, một số MPL có khả năng gây bệnh cho vài loài ký chủ này nhưng không gây bệnh cho các ký chủ khác (Pernezny và Simone, 1993; Suwanto và ctv, 2000; Cutrim và Silva, 2003; Poltronieri và ctv, 2003; Oliveira và ctv, 2007; Nguyen Don Hieu và ctv, 2014; Ferreira và Bentes, 2017).

Ở Việt Nam, các kết quả nghiên cứu về nấm *C. cassiicola* vẫn còn ít, số lượng MPL chưa nhiều, chủ yếu phân bố cục bộ ở một số tỉnh vùng Đông Nam Bộ. Vì vậy, việc nghiên cứu với bộ sưu tập MPL trải rộng trên nhiều vùng địa lý là rất cần thiết, nhằm góp phần hiểu biết về các đặc điểm dịch tễ của bệnh rụng lá *Corynespora*, từ đó phát triển các biện pháp quản lý bệnh hiệu quả (theo hướng tầm soát quần thể, can thiệp, cân bằng quần thể tác nhân và chọn tạo giống cao su chống chịu bệnh). Từ những cơ sở nêu trên, đề tài “**Đánh giá đa dạng di truyền và tính gây bệnh của nấm *Corynespora cassiicola* trên cây cao su (*Hevea brasiliensis*) ở Việt Nam**” đã được thực hiện.

## **2. Ý NGHĨA KHOA HỌC VÀ THỰC TIỄN CỦA ĐỀ TÀI**

### **2.1. Ý nghĩa khoa học**

Phát triển cách tiếp cận kỹ thuật sử dụng chỉ thị phân tử SRAP, phân tích trình tự vùng rDNA-ITS để phân nhóm di truyền các mẫu nấm *C. cassiicola* phân lập trên cây cao su tại nhiều vùng địa lý ở Việt Nam.

Xác định được sự phân bố của gen *Cas2* trong quần thể nấm *C. cassiicola* gây bệnh trên cây cao su ở Việt Nam.



## **2.2. Ý nghĩa thực tiễn**

Quần thể nấm *C. cassiicola* rất đa dạng về di truyền và tính gây bệnh. Kết quả nghiên cứu có ý nghĩa trong việc đề xuất chiến lược tuyển chọn giống cao su chống chịu bệnh rụng lá *Corynespora*.

Đánh giá được mức độ miễn cảm bệnh của một số DVT cao su nhằm phục vụ công tác khuyến cáo giống cho sản xuất.

## **3. MỤC TIÊU NGHIÊN CỨU CỦA ĐỀ TÀI**

Đánh giá sự đa dạng di truyền của 76 MPL *C. cassiicola* gây hại trên cây cao su ở Việt Nam bằng phương pháp truyền thống dựa trên các đặc điểm hình thái học và phương pháp hiện đại dựa trên các chỉ thị phân tử.

Xác định khả năng gây bệnh của một số MPL *C. cassiicola* đại diện cho các phân nhóm di truyền và vùng địa lý khác nhau, từ đó chọn lọc nguồn nấm sử dụng trong nghiên cứu tạo tuyển giống kháng bệnh.

Đánh giá mức độ miễn cảm bệnh của một số DVT cao su nhằm phục vụ công tác khuyến cáo giống cho sản xuất.

## **4. THỜI GIAN, ĐỐI TƯỢNG VÀ PHẠM VI NGHIÊN CỨU**

### **4.1. Thời gian nghiên cứu**

Đề tài được thực hiện từ tháng 11 năm 2016 đến tháng 11 năm 2019.

### **4.2. Đối tượng nghiên cứu**

Đối tượng nghiên cứu của đề tài là 76 mẫu nấm *C. cassiicola* được phân lập từ 16 DVT cao su trên nhiều vùng địa lý ở Việt Nam.

### **4.3. Phạm vi nghiên cứu**

Phân lập, định danh các mẫu nấm *C. cassiicola* dựa trên đặc điểm hình thái học và trình tự vùng rDNA-ITS (ribosomal DNA internal transcribed spacer), phân tích sự đa dạng di truyền của các mẫu nấm từ trình tự vùng rDNA-ITS, chỉ thị phân tử SRAP (Sequene-Related Amplified Polymorphism) và PCR khuếch đại gen *Cas*. Khảo sát mức độ gây bệnh của 76 MPL nấm trên 2 DVT cao su (RRIV 4 và PB 260), đánh giá mức độ gây bệnh của 6 MPL nấm đại diện cho các phân nhóm di

truyền và vùng địa lý khác nhau trên 12 DVT cao su ở điều kiện phòng thí nghiệm và nhà lưới.

## **5. NHỮNG ĐÓNG GÓP MỚI CỦA LUẬN ÁN**

Kết quả luận án đã góp phần làm rõ hơn về sự tồn tại của các phân nhóm di truyền nấm *C. cassiicola* trên cây cao su ở Việt Nam: (1) Phát hiện một phân nhóm di truyền mới dựa trên trình tự vùng rDNA-ITS; (2) lần đầu tiên chỉ thị phân tử SRAP được sử dụng trong nghiên cứu đa dạng di truyền nấm *C. cassiicola*; (3) Xác định sự hiện diện và phân bố gen *Cas2* của nấm tại nhiều vùng địa lý ở Việt Nam.

Chọn lọc được một số MPL nấm *C. cassiicola* làm nguồn vật liệu cho nghiên cứu tạo tuyển giống cao su chống chịu bệnh rụng lá *Corynespora*, phục vụ công tác khuyến cáo giống cao su cho sản xuất.

# Chương 1

## TỔNG QUAN TÀI LIỆU

### 1.1. SƠ LƯỢC VỀ TÌNH HÌNH SẢN XUẤT VÀ VỊ TRÍ CÂY CAO SU Ở VIỆT NAM

Cây cao su (*Hevea brasiliensis*) là một loài thuộc chi *Hevea*, họ Thầu Dầu (*Euphorbiaceae*) có nguyên quán tại vùng Amazone (Nam Mỹ). Trong chi *Hevea* còn có 9 loài khác bao gồm *H. benthamiana*, *H. camarganoa*, *H. camporum*, *H. guianensis*, *H. nitida*, *H. microphylla*, *H. pauciflora*, *H. rigidifolia* và *H. spruceana*. Mặc dù tất cả các loài cao su kể trên đều có mủ cao su (latex) nhưng chỉ có loài *Hevea brasiliensis* là có hiệu quả kinh tế và được trồng phổ biến nhất (Nguyễn Thị Huệ, 2006). Cây cao su được xem là loài cây công nghiệp quan trọng trên thế giới cũng như ở Việt Nam. Mủ cao su thiên nhiên là nguồn nguyên liệu quan trọng để sản xuất các sản phẩm phục vụ công nghiệp và đời sống, đặc biệt trong lĩnh vực giao thông vận tải và y tế. Bên cạnh đó, cây cao su còn được xem là một loài cây rừng trồng góp phần bảo vệ môi trường.

Cây cao su được di nhập vào Việt Nam từ năm 1897, các đồn điền cao su đầu tiên được thành lập ở Đông Nam Bộ từ năm 1907 và ở Tây Nguyên từ năm 1923. Hiện nay cây cao su có diện tích trồng lớn nhất trong số các cây công nghiệp lâu năm ở Việt Nam. Tính đến năm 2018, tổng diện tích cây cao su ở Việt Nam đạt khoảng 966.800 ha với tổng sản lượng đạt 1.138.000 tấn, tương ứng với năng suất bình quân đạt 1.650 kg/ha/năm (Hiệp hội Cao su Việt Nam, 2019). Nhờ vào các tiến bộ về giống, kỹ thuật canh tác và thu hoạch mủ mà năng suất cao su bình quân của cả nước đã có sự tiến bộ rõ rệt, từ 703 kg/ha (năm 1980) lên 1.222 kg/ha (năm 2000) và đạt đến 1.650 kg/ha (năm 2018), được xếp vào nhóm 3 nước sản xuất cao su có năng suất cao nhất thế giới. Từ năm 2006, kim ngạch xuất khẩu cao su thiên nhiên đã vượt giá trị 1 tỉ USD, đến năm 2019 đạt 2,3 tỉ USD, góp phần quan trọng vào nguồn thu ngoại tệ, phát triển kinh tế ở nước ta (Hiệp hội Cao su Việt Nam, 2020).

## **1.2. BỆNH RỤNG LÁ CORYNESPORA TRÊN CÂY CAO SU**

### **1.2.1. Lịch sử và tác hại của bệnh rụng lá Corynespora tại một số quốc gia trên thế giới**

Bệnh rụng lá Corynespora trên cây cao su được phát hiện lần đầu tiên tại vườn ươm ở Sierra Leon, các mẫu nấm đã được Mason và Deighton thu thập vào năm 1936 (Wei, 1950). Sau đó, bệnh tiếp tục được ghi nhận ở Ấn Độ (Ramakrishnan và Pillay, 1961), Sri Lanka và Cameroon (Liyanage và ctv, 1986; Jayasinghe và ctv, 1996), Malaysia (Newsam, 1961), Nigeria (Awoderu, 1969), Indonesia (Teoh, 1983), Brazil (Junqueira và ctv, 1985), Thái Lan (Pongthep, 1987) và Bangladesh (Rahman, 1988). Năm 1999, bệnh được phát hiện ở Việt Nam (Phan Thanh Dung và Nguyen Thai Hoan, 2000), sau đó bệnh được phát hiện ở đảo Hải Nam (Trung Quốc) vào năm 2006 (Jinji và ctv, 2007). Đến nay, bệnh đã xuất hiện ở hầu hết các nước trồng cao su.

Năm 1975, dịch bệnh rụng lá Corynespora xảy ra ở Malaysia trên DVT RRIM 725, gây rụng lá nghiêm trọng, sau đó lây nhiễm cho một số DVT khác như RRIC 103, FX 25, KRS 21, PPN 2058, PPN 2444 và PPN 2447. Bệnh rụng lá Corynespora đã trở thành loại bệnh hại chính trên cây cao su ở Malaysia và bệnh có xu hướng đi từ miền Nam lên miền Bắc Peninsular Malaysia (RRIM, 2000).

Ở Sri Lanka, bệnh rụng lá Corynespora đã bùng phát thành dịch bệnh và kéo dài từ năm 1986 đến 1988. Hơn 4.000 ha cao su, chủ yếu là DVT RRIC 103 và một vài DVT mẫn cảm khác, đã bị nhiễm bệnh nghiêm trọng. Chính phủ Sri Lanka đã phải chi ra hơn 530.000 đô la Mỹ để bồi thường cho khoảng 3.000 hộ nông dân tiểu điền bị ảnh hưởng để loại bỏ các DVT này và trồng lại bằng các DVT kháng bệnh (Liyanage và ctv, 1989).

Ở Indonesia, sau khi phát hiện bệnh vào năm 1980 tại Trạm thực nghiệm Sembawa (phía Nam Sumatra), bệnh rụng lá Corynespora đã dần lan sang các vùng trồng cao su khác (vùng Trung và Tây Java). Trong những năm 1980, gần 1.200 ha cao su đã bị nhiễm bệnh nặng, trong đó 400 ha đã bị loại bỏ với thiệt hại kinh tế lên

đến 200 tỉ Rupiah (hơn 20 triệu đô la Mỹ) (Liyanage và ctv, 1989). Đến năm 1996, bệnh rụng lá *Corynespora* đã xuất hiện ở tất cả các vùng trồng cao su ở nước này.

Ở Ấn Độ, dịch bệnh rụng lá *Corynespora* được ghi nhận lần đầu tiên tại Viện Nghiên cứu Cao su Ấn Độ (RRII) và Trạm Nghiên cứu Giống cao su ở Nam Karnataka vào năm 1996 (Rajalakshmy và Kothandaraman, 1996). Sau đó, vào năm 1999, bệnh rụng lá *Corynespora* trở nên nghiêm trọng với tỉ lệ bệnh lên đến 50% – 70% ở một số vùng trồng cao su, DVT RRII 105 được trồng phổ biến trên nhiều vùng tại nước này đã bị nhiễm bệnh nặng. Hơn 10.000 ha cao su bị ảnh hưởng và phải phun thuốc diệt nấm (Jacob, 2006).

Ở Thái Lan, bệnh rụng lá *Corynespora* lần đầu tiên được phát hiện vào năm 1985 (Pongthep, 1987). DVT RRIC 103, KRS 21 bị nhiễm bệnh và thiệt hại nặng nhất. Từ năm 2000, bệnh đã xuất hiện ở tất cả các vùng trồng cao su ở Thái Lan (Chanruang, 2000).

### **1.2.2. Lịch sử và tác hại của bệnh rụng lá *Corynespora* trên cây cao su ở Việt Nam**

Tháng 8 năm 1999, bệnh rụng lá *Corynespora* được phát hiện trên cây cao su ở Việt Nam tại Trạm Thực nghiệm Cao su Lai Khê thuộc Viện Nghiên cứu Cao su Việt Nam. Đến tháng 9 năm 1999, bệnh được phát hiện ở các khu vực trồng cao su khác vùng Đông Nam Bộ, chủ yếu trên DVT RRIC 103 và RRIC 104 tại các vườn chung tuyến. Bên cạnh đó, một số DVT khác như LH 88/372, RRIC 103 và RRIC 104 cũng được xác định là rất mẫn cảm với bệnh. Các DVT PB 235, RRIM 600, VM 515 và RRIC 110 bị nhiễm bệnh nhẹ. Tháng 1 năm 2000, bệnh bùng phát và lây lan nhanh chóng tại Công ty Cao su Lộc Ninh, hơn 200 ha cao su DVT RRIC 104 giai đoạn kiến thiết cơ bản (KTCB) bị rụng lá hoàn toàn, buộc Công ty phải thanh lý và thiêu hủy để hạn chế mầm bệnh lây lan (Phan Thanh Dung và Nguyen Thai Hoan, 2000).

Sau đó, bệnh xuất hiện rải rác ở mức nhẹ trên một vài DVT cao su. Đến tháng 4 năm 2009, một đợt dịch bệnh bùng phát tại Sa Thầy (Kon Tum) và Công ty Cao su Quảng Nam gây thiệt hại nghiêm trọng trên 1.700 ha cao su DVT RRIV 4. Tiếp

ngay sau đó, từ tháng 4 đến tháng 10 năm 2010, dịch bệnh xảy ra trên qui mô lớn tại vùng Đông Nam Bộ, hơn 6.500 ha cao su (chủ yếu là DVT RRIV 3 và RRIV 4) thuộc Tập đoàn Công nghiệp Cao su Việt Nam đã nhiễm bệnh. Cùng thời gian kể trên, dịch bệnh đồng thời gây hại nặng trên 17.000 ha cao su DVT RRIV 4 của hàng ngàn nông dân tiểu điền tại tỉnh Bình Dương, Bình Phước, Tây Ninh, Đồng Nai và Bình Thuận (Phan Thanh Dung và Nguyen Anh Nghia, 2011). Bệnh gây hại trên tất cả giai đoạn sinh trưởng của cây và xảy ra quanh năm, trong trường hợp bệnh nặng dẫn đến rụng lá hàng loạt làm giảm sản lượng nghiêm trọng và dẫn đến chết cây.

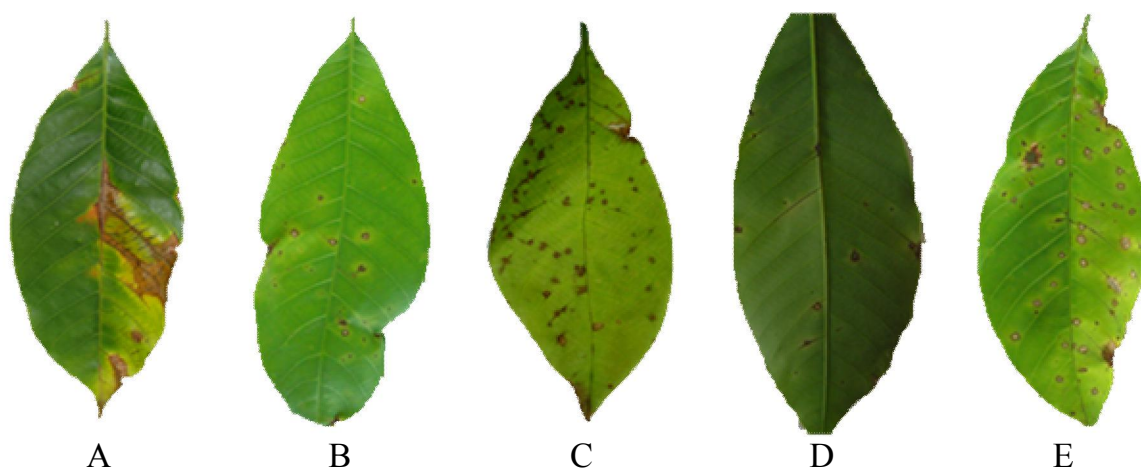
Kể từ năm 2011 đến nay, sau các đợt bùng phát dịch thì bệnh vẫn tái phát gây hại hàng năm trên hàng ngàn hecta vườn cây cao su DVT RRIV 3 và RRIV 4, công tác phun trị bệnh được triển khai nhiều lần nhằm khống chế bệnh, duy trì sinh trưởng và sản lượng vườn cây. Quy trình phòng trị bệnh rụng lá *Corynespora* đã được ban hành với nhiều loại thuốc trừ nấm có hiệu quả phòng trị bệnh cao. Tuy nhiên, việc chỉ chú trọng áp dụng biện pháp hóa học một cách đơn lẻ (phun thuốc trừ nấm khi vườn cây đã nhiễm bệnh), thực hiện nhiều lần trong thời gian dài sẽ dẫn đến nguy cơ phát sinh nòi nấm mới kháng thuốc, có tính gây bệnh cao và nguy hiểm hơn. Thuốc hóa học còn tác hại đến sức khỏe con người, gây ô nhiễm môi trường và mất cân bằng sinh thái. Hiện nay bệnh rụng lá *Corynespora* đã hiện diện trên khắp các vùng trồng cao su ở Việt Nam, cùng với sự biến đổi khí hậu, môi trường khác biệt giữa các vùng địa lý thì nguy cơ hình thành các nòi nấm mới là khó tránh khỏi. Vì vậy, cần có những nghiên cứu sâu về đặc điểm di truyền của loài nấm này ở mức độ phân tử cũng như tính gây bệnh của các mẫu nấm thuộc các phân nhóm di truyền và vùng địa lý khác nhau góp phần hiểu rõ hơn đặc điểm dịch tễ của loài nấm này. Trên cơ sở đó, thực hiện các nghiên cứu về quản lý tổng hợp bệnh, tuyển chọn giống cao su kháng bệnh cũng như là các khuyến cáo về giống cao su kháng bệnh rụng lá *Corynespora* tại Việt Nam.

### **1.2.3. Triệu chứng bệnh rụng lá *Corynespora* trên cây cao su**

Nấm tấn công chủ yếu trên lá cao su nhưng đôi khi cũng ghi nhận được triệu chứng trên chồi và cuống lá (Chee, 1988; Liyanage và ctv, 1986). Nấm bệnh tấn

công trên mọi giai đoạn tuổi lá và lá non dưới 20 ngày tuổi là mẫn cảm nhất đối với bệnh (Chee, 1988). Triệu chứng xuất hiện với vết xám đen hoặc đốm nâu sau đó phát triển thành những đốm tròn đồng tâm xung quanh có viền vàng, đường kính vết bệnh từ 1 mm đến 8 mm, lúc này tâm vết bệnh chuyển sang màu bạc hay nâu tối rồi hóa đen, phần mô lá nhiễm bệnh bị hủy hoại nên rất dễ bị rách thủng tạo thành lỗ dạng tròn trên phiến lá (Chee, 1988). Triệu chứng dễ nhận diện nhất là dạng “xương cá”, vết bệnh có màu đen dọc theo gân lá, hoặc vết bệnh dạng đốm màu đen có lỗ thủng và quang vàng nhạt trên lá ổn định. Triệu chứng của bệnh biến thiên theo mức độ mẫn cảm của DVT và điều kiện thời tiết (Chee, 1988; Radziah và Ismail, 1990).

Trên những DVT mẫn cảm với bệnh, hầu hết triệu chứng bệnh ở dạng đặc trưng “xương cá”. Tuy nhiên, triệu chứng bệnh ở một số DVT khác nhau có sự khác biệt rất lớn so với triệu chứng đặc trưng, DVT RRIC 110 có lá bệnh rất dễ nhầm lẫn với vết bệnh cũ của bệnh phấn trắng do nấm *Oidium hevea*, trên DVT RRIC 132 triệu chứng giống với bệnh đốm mắt chim do nấm *Drechslera heveae*. Bên cạnh những triệu chứng trên, còn có dạng triệu chứng “vết đen” dọc theo gân chính và gân phụ của lá (Jayasinghe và ctv, 2005). Những lá bị bệnh chuyển sang màu vàng, biến dạng và khô nhưng lá vẫn dính trên cành một thời gian rồi mới rụng xuống đất. Tuy nhiên, đối với vết bệnh gây hại trên gân chính của lá, dù chỉ có một vài vết bệnh cũng thường làm cho lá rụng ngay khi còn xanh. Triệu chứng gây hại trên chồi non dẫn đến hiện tượng khô đọt khô chồi, vết bệnh là một đường nứt ban đầu có hình thoi sau đó vết nứt lan rộng theo chiều dọc, bên trong đường nứt có màu nâu xám (Chee, 1988; Radziah và Ismail, 1990). Sự rụng lá có thể xảy ra mọi thời điểm trong năm, làm chậm sinh trưởng của cây cao su, nếu bệnh nặng có thể dẫn đến chết cây. Bệnh làm rụng lá hàng loạt, nhiều lần, mật độ tán lá thưa thớt kéo dài trong cả mùa cạo, giảm khả năng ra lá mới, những vườn cây suy kiệt do bệnh, sản lượng có thể giảm hơn 50% (Liyanage và ctv, 1986).



**Hình 1.1.** Các dạng triệu chứng bệnh rụng lá *Corynespora* trên cây cao su. A: Triệu chứng dạng “xương cá” điển hình; B: Triệu chứng dạng đốm tròn có viền vàng; C: Triệu chứng dạng đốm đen; D: Triệu chứng dạng sọc đen trên gân phụ; E: Nhiều dạng triệu chứng cùng tồn tại trên một lá.

### 1.3. ĐẶC ĐIỂM CỦA NẤM *Corynespora cassiicola* GÂY BỆNH TRÊN CÂY CAO SU VÀ MỘT SỐ CÂY KÝ CHỦ KHÁC

#### 1.3.1. Vị trí phân loại và đặc điểm hình thái nấm *Corynespora cassiicola*

Định danh phân loại nấm *Corynespora cassiicola* có nhiều tên gọi khác nhau, thay đổi theo thời gian. Năm 1950, Wei thu thập tất cả các tài liệu liên quan và đặt tên là *Corynespora cassiicola* (Berk and Curt) Wei, tên loài nấm này được các nhà bệnh học thực vật chấp nhận phổ biến nhất cho đến nay. Nấm được phân loại như sau:

Giới (Kingdom): Fungi

Ngành (Phylum): Ascomycota

Lớp (Class): Ascomycetes

Lớp phụ (Subclass): Dothideomycetidae

Bộ (Order): Pleosporales

Họ (Family): Corynesporascaceae

Chi (Genus): *Corynespora*

Nấm *C. cassiicola* có khả năng sống ký sinh trên thực vật cũng như có khả năng sống hoại sinh trên xác bã thực vật, tản nấm có màu xám đến nâu, sợi nấm



mỏng, mọc mạnh. Cành bào tử phân sinh (conidiophore) có dạng đơn bào hoặc đa bào, hình trụ thẳng hoặc phân nhánh, có sự biến thiên về kích thước với chiều dài từ 110  $\mu\text{m}$  đến 850  $\mu\text{m}$ , chiều rộng từ 4  $\mu\text{m}$  đến 11  $\mu\text{m}$ . Bào tử đính (conidia) ở dạng đơn hoặc dạng chuỗi, biến thiên về hình dạng, từ hình trụ, hình chùy, dạng thẳng hoặc cong, có từ 4 đến 20 vách ngăn giả (pseudosepta), chiều dài thay đổi từ 40  $\mu\text{m}$  đến 220  $\mu\text{m}$ , chiều rộng từ 9  $\mu\text{m}$  đến 22  $\mu\text{m}$  (Ellis và Holiday, 1971).

Sự đa dạng về đặc điểm hình thái của nấm *C. cassicola* đã được báo cáo trong một số kết quả nghiên cứu. Có sự biến thiên về hình thái giữa các MPL nấm thu được trên các cây chủ khác nhau tại một số Bang miền Nam của Hoa Kỳ, Nebraska, Canada, Nigeria và miền tây Mexico (Spencer và Walter, 1969; Onesirosan và ctv, 1974). Theo Onesirosan và ctv (1974), bào tử nấm có kích thước trung bình là 167  $\mu\text{m}$  x 8,3  $\mu\text{m}$  (chiều dài 60  $\mu\text{m}$  – 250  $\mu\text{m}$ , chiều rộng 5  $\mu\text{m}$  – 13  $\mu\text{m}$ ). Theo Chee (1988), kích thước trung bình của các bào tử nấm *C. cassicola* phân lập được trên cây cao su là 64,4  $\mu\text{m}$  x 5,5  $\mu\text{m}$  (chiều dài 23,4  $\mu\text{m}$  – 132,6  $\mu\text{m}$ , chiều rộng 2,6  $\mu\text{m}$  – 7,8  $\mu\text{m}$ ). Theo Nguyen Anh Nghia và ctv (2008), trên môi trường nuôi cấy PSA (Potato Sucrose Agar), kích thước bào tử biến thiên rất lớn với chiều dài thay đổi từ 17  $\mu\text{m}$  đến 942  $\mu\text{m}$  và chiều rộng thay đổi từ 3,9  $\mu\text{m}$  đến 16,8  $\mu\text{m}$ . Bào tử có nhiều vách ngăn giả, số lượng biến động từ 0 đến 70 vách ngăn giả.

Có sự biến thiên về màu sắc sợi nấm cũng như hình thái, tốc độ sinh trưởng, độ dày, độ mịn và màu sắc của tản nấm mặc dù được phân lập từ một bào tử duy nhất. Trên môi trường PDA (Potato Dextrose Agar) và PSA, tản nấm có màu xám đến nâu. Hình dạng và kích thước của bào tử có sự biến thiên rất lớn ở cả hai loại bào tử được lấy từ vết bệnh tự nhiên ngoài đồng ruộng hay nuôi cấy trên môi trường nhân tạo, thông thường trên lá cao su các bào tử nấm dài hơn và số lượng trung bình các vách ngăn cao hơn so với nuôi cấy trên môi trường nhân tạo. Bào tử có dạng bầu dục, dài, thẳng hoặc cong lười liềm. Bào tử nảy mầm tạo ra một hoặc nhiều ống mầm giữa các vách ngăn, các ống mầm thường mọc nhiều ở các tế bào tận cùng của bào tử. Đỉnh bào tử phân lập từ lá cao su thường có hình que, dài, thon hơn so với

bào tử trong môi trường nuôi cấy. Bào tử dạng đơn hoặc dạng chuỗi dính với nhau ở hai đầu gọi là hilum (Phan Thanh Dung, 1995).

Darmono và ctv (1996) quan sát hình thái tản nấm của một số MPL từ các vùng khác nhau đại diện cho các vùng trồng cao su ở Java, Sumatra và Kalimantan (Indonesia) trên một số DVT cao su. Sự khác biệt về màu sắc và kết cấu tản nấm ở cả mặt trên và mặt dưới của đĩa đã được ghi nhận. Tuy nhiên, sự khác biệt về hình thái tản nấm không tương quan với nguồn gốc ký chủ hoặc vùng địa lý của MPL nấm. Silva và ctv (1998) cũng báo cáo có sự thay đổi màu sắc, sự phát triển khuẩn lạc, sự khác biệt về hình dạng và kích thước bào tử của 27 MPL nấm *C. cassiicola* từ cây cao su ở Sri Lanka và một số cây ký chủ khác ở Úc. Sự đa dạng về đặc điểm hình thái của 21 MPL *C. cassiicola* từ cây cao su tại Malaysia cũng đã được báo cáo, trên môi trường nuôi cấy nhân tạo PSA, sợi nấm có màu xám sẫm ở giữa và xuất hiện màu sáng hơn ở rìa, sợi nấm mọc nhanh, mỏng, bám sát vào bề mặt môi trường. Màu sắc tản nấm biến thiên từ màu nâu nhạt đến màu xám đậm, kết cấu tản nấm mỏng hoặc dày, phân bố dạng vòng tròn đồng tâm hoặc xẻ thùy ở phía ngoài rìa (Nguyễn Anh Nghĩa và ctv, 2008).

### **1.3.2. Phân bố và ký chủ của nấm *Corynespora cassiicola***

Nấm *C. cassiicola* phân bố rộng khắp trên nhiều vùng sinh thái. Cho đến nay loài nấm này đã được ghi nhận tại hơn 80 quốc gia và vùng lãnh thổ ở nhiều vùng khí hậu khác nhau từ nhiệt đới đến ôn đới. Nấm có phổ ký chủ rộng, có khả năng gây bệnh cho hơn 400 loài thực vật bao gồm các loài cây ăn quả, rau quả, ngũ cốc, cây lâu năm, cây rừng và các loại cây cảnh (Farr và Rossman, 2019). Ngoài cây cao su (*Hevea brasiliensis*), loài nấm này còn tấn công trên nhiều loài cây trồng quan trọng phổ biến như đu đủ (*Carica papaya*), dưa leo (*Cucumis sativus*), đậu nành (*Glycine max*), cà chua (*Lycopersicon esculentum*) (Wei, 1950), dứa (*Ananas comosus*), cọ dầu (*Elaeis guineensis*), khoai mì (*Manihot esculenta*) (Ellis, 1957), bông vải (*Gossypium spp.*), chuối (*Musa sp.*) (Ellis và Holliday, 1971), đậu phộng (*Arachis hypogea*), cà phê (*Coffea arabica*), sầu riêng (*Durio zibethinus*), thuốc lá

(*Nicotiana tabacum*), hồ tiêu (*Piper nigrum*), khoai tây (*Solanum tuberosum*) và ca cao (*Theobroma cacao*) (Farr và Rossman, 2019).

Một số loài cây cảnh phổ biến là ký chủ của *C. cassiicola* như euphorbia (*Euphorbia* sp.), cây sung (*Ficus* sp.), hoa trạng nguyên (*Poinsettia* sp.) (Ellis, 1957); hoa tú cầu (*Hydrangea macrophylla*), azalea (1 loài hoa thuộc họ đỗ quyên) (*Rhododendron obtusum*) (Ellis và Holliday, 1971); cây ba đậu (*Codiaeum variegatum*); cây chùm ớt (*Bignonia* sp.), hoa cúc (*Chrysanthemum* sp.), dâm bụt (*Hibiscus* sp.), hoa lài (*Jasminum* sp.), hoa lạc tiên (*Passiflora* sp.) (Farr và Rossman, 2019).

Trên cây đu đủ, bệnh được gọi là bệnh đốm nâu *Corynespora* (Nishijima, 1999; Liberato và McTaggart, 2007), bệnh đốm lá *Corynespora* (Pernezny và Litz, 1999). Triệu chứng bệnh hiện diện trên thân, trái, chồi và lá. Những lá ở tầng dưới đặc biệt mẫn cảm với nấm bệnh, một lá có thể có đến hàng trăm vết bệnh. Nấm *C. cassiicola* còn là nguyên nhân gây thối quả chín sau thu hoạch, nấm thường xâm nhập tấn công qua vết thương trên quả. Triệu chứng bệnh trên cây con thường rõ ràng hơn, xuất hiện như là những vết hoại tử trên thân và lá, nếu bệnh nặng thì lá rụng và dẫn đến chết cây (Liberato và McTaggart, 2007).

Trên cây cà chua, bệnh được gọi là bệnh đốm vòng đồng tâm *Corynespora* (Jones và ctv, 1993; Cerkauskas và Kalb, 2005). Triệu chứng xuất hiện trên tất cả các bộ phận của cây như lá, thân, chồi và quả, bệnh nặng sẽ dẫn đến mất năng suất. Trong giai đoạn đầu khi bệnh mới phát triển thì triệu chứng đốm do nấm rất dễ nhầm lẫn với triệu chứng đốm do vi khuẩn *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* hoặc bệnh đốm vòng do nấm *Alternaria solani* (Cerkauskas và Kalb, 2005).

Trên cây dưa leo, *C. cassiicola* là tác nhân gây ra bệnh đốm lá *Corynespora* (Pernezny và Simone, 1993), bệnh đốm héo rũ *Corynespora* (Martyn và ctv, 1993). Triệu chứng bệnh, đặc biệt trong giai đoạn đầu rất khó phân biệt với bệnh đốm lá do vi khuẩn *Pseudomonas lachrymans* và bệnh khảm lá do nấm *Podosphaera xanthii* và *Pseudoperonospora cubensis* là những loại bệnh phổ biến trên dưa leo. Trong

khi, ở giai đoạn sau triệu chứng bệnh giống với bệnh đốm đen do nấm *Colletotrichum orbiculare* (Pernezny và Simone, 1993).

#### **1.4. ĐẶC ĐIỂM PHÁT SINH VÀ PHÁT TRIỂN CỦA NẤM *Corynespora cassiicola* TRÊN CÂY CAO SU**

Sự phát sinh và phát triển của bệnh rụng lá *Corynespora* trên cây cao su phụ thuộc nhiều vào yếu tố môi trường, khả năng gây bệnh của nấm và mức độ miễn cảm của các DVT cao su. Nấm gây bệnh trên tất cả các giai đoạn sinh trưởng của cây cao su từ vườn ươm, vườn nhân, vườn cây kiến thiết cơ bản và vườn cao su kinh doanh.

Sợi nấm và bào tử nấm tồn tại trong đất, không khí, trên vết bệnh và tàn dư thực vật trên vườn cao su là nguồn bệnh ban đầu giúp cho bệnh phát sinh, trong đó bào tử nấm đóng vai trò là nguồn bệnh chủ yếu. Bào tử nấm có khả năng tồn tại rất lâu và được phát tán nhờ gió và mưa. Theo Situmorang và ctv (2000), khả năng xâm nhiễm và gây bệnh cho lá cây cao su của nấm *C. cassiicola* phụ thuộc vào các giai đoạn sinh trưởng của lá. Lá non dưới 4 tuần tuổi là giai đoạn miễn cảm nhất đối với nấm bệnh, bệnh xuất hiện trên cây cao su trong suốt thời kỳ ra lá mới.

Điều kiện môi trường có liên quan chặt đến sự phát triển của bệnh. Các yếu tố môi trường tác động đến bệnh chủ yếu là lượng mưa, ẩm độ và nhiệt độ không khí. Điều kiện môi trường thích hợp cho sự phát triển của bệnh là ẩm độ cao, nhiệt độ 28°C – 30°C, không khí ẩm ướt và trời nhiều mây. Ẩm độ không khí cao hoặc bề mặt lá ẩm ướt ảnh hưởng đến quá trình hình thành và nảy mầm của bào tử, sự phát triển, khả năng xâm nhiễm và sự phát tán của mầm bệnh (Pawirosoemardjo và Purwantara, 1987; Rajalakshmy và Kothandaraman, 1996; Radziah và ctv, 1996; Sailajadevi, 2006). Ở Việt Nam, bệnh rụng lá *Corynespora* xảy ra trong điều kiện nhiệt độ 20°C – 28°C, ẩm độ 79% – 90%, lượng mưa 4,2 – 573 mm/tháng và có 2 – 28 ngày mưa/tháng (Nguyễn Thái Hoan và ctv, 2007). Theo Jayasinghe (2000), cây cao su trồng ở vùng cao trình trên 300 m thì ít bị bệnh rụng lá *Corynespora* hơn so với những vùng thấp hơn.

Mức độ miễn cảm bệnh của các DVT cao su rất khác biệt và đặc tính này thay đổi theo thời gian và vị trí địa lý. Báo cáo của Tan và ctv (1992) cho thấy các DVT PB 235, PB 260, PB 28/59, PB 280, PB 330, PM 10, RRIM 701, RRIM 908 và RRIM 926 nhiễm bệnh từ nhẹ đến trung bình, trong khi trước đó được xem là các DVT kháng bệnh. Theo Jayasinghe và Silva (1996), RRIC 110 ban đầu được đánh giá là DVT cao su kháng bệnh nhưng sau đó miễn cảm bệnh. Theo Sinulingga và ctv (1996); Breton và ctv (1996), có sự thay đổi về mức độ miễn cảm bệnh của một số DVT cao su tại các vùng địa lý khác nhau, PB 260 là DVT kháng bệnh tại châu Á nhưng bị nhiễm bệnh nặng tại châu Phi, GT 1 là DVT miễn cảm tại Malaysia và Indonesia nhưng kháng bệnh tại châu Phi.

Bệnh rụng lá *Corynespora* đang trở thành mối đe dọa thật sự đối với ngành cao su toàn cầu. Diễn biến của bệnh ngày càng phức tạp do nấm *C. cassiicola* có khả năng hình thành nhiều nòi sinh lý mới để phá vỡ tính kháng bệnh của một số DVT cao su. Có ít nhất 2 nòi (race) *C. cassiicola* gây hại trên cây cao su tại Malaysia, 2 nòi đang tồn tại ở Việt Nam và 5 phân nhóm di truyền tại Indonesia. Những nòi nấm hoặc những phân nhóm di truyền khác nhau cùng với tính gây bệnh biến thiên rất khác biệt, một nòi nấm (hay một phân nhóm di truyền) có thể gây bệnh mạnh trên DVT này nhưng gây bệnh nhẹ trên DVT khác và ngược lại (Nguyen Anh Nghia và ctv, 2008; Nguyen Don Hieu và ctv, 2014; Oktavia và ctv, 2017).

### **1.5. ĐẶC ĐIỂM SINH LÝ, SỰ XÂM NHIỄM, LÂY LAN VÀ LƯU TỒN CỦA NẤM *Corynespora cassiicola***

Có sự biến thiên về số lượng bào tử hình thành trên các môi trường nuôi cấy khác nhau. Theo Liyanage và Jayasinghe (1986), nấm *C. cassiicola* ít hình thành bào tử trên môi trường nhân tạo và số lượng bào tử thay đổi tùy MPL nấm. Theo Phan Thanh Dung (1995), bào tử nấm hình thành trên môi trường PSA nhiều hơn trên môi trường PDA và RLEA (Rubber Leaf Extract Agar). Nấm *C. cassiicola* sinh trưởng nhanh hơn trên môi trường MEA (Malt Extract Agar) và môi trường PDA so với các môi trường khác. Theo Chee (1988), có thể kích thích sự hình thành bào tử trên môi trường nhân tạo bằng cách để tối liên tục 3 ngày và sau đó chiếu sáng liên

tục 3 ngày bằng ánh sáng huỳnh quang hoặc chiếu sáng bằng tia cực tím trong khoảng thời gian ngắn. Nấm sinh trưởng và phát triển trong khoảng nhiệt độ 20°C – 30°C và tối thích ở 28°C, nhiệt độ trên 35°C sợi nấm ngừng sinh trưởng. Điều kiện môi trường thích hợp để bào tử hình thành nhiều nhất là 25°C – 27°C, ẩm độ trên 80% (Mushrif, 2006).

Nấm *C. cassiicola* xâm nhập chủ yếu ở mặt dưới lá qua biểu bì và khí khổng, bên cạnh đó nấm còn tiết ra men cellulase giúp phân hủy màng tế bào. Bào tử có khả năng nảy mầm và tấn công vào các mô lá già lẫn lá non, cũng như chồi non, cuống lá. Bào tử nảy mầm tốt nhất khi nhiệt độ môi trường xung quanh là 28°C – 30°C. Ở điều kiện ngoài đồng ruộng, bào tử được phóng thích vào ban ngày, bắt đầu từ 6 giờ sáng và thường đạt cao điểm vào lúc 10 – 11 giờ trưa, sau đó số lượng bào tử được phóng thích giảm xuống rất thấp và hầu như không xảy ra vào ban đêm. Bào tử được lây lan nhờ gió và mưa, kích thước và trọng lượng của bào tử tương đối lớn so với nhiều loại nấm khác.

Bào tử có khả năng tồn tại trên vết bệnh cũng như trong đất với thời gian dài. Trên lá cao su khô, nấm vẫn tồn tại và giữ nguyên khả năng gây bệnh trong khoảng thời gian 2 năm. Nấm tồn tại tiềm ẩn trong thời gian dài trên tất cả các bộ phận của cây cao su bị nhiễm bệnh, xác bã thực vật trên vườn cao su và đây chính là một trong những nguồn phát sinh dịch bệnh (Pernezny và Simone, 1993).

## **1.6. NGHIÊN CỨU VỀ ĐA DẠNG DI TRUYỀN CỦA NẤM *Corynespora cassiicola* BẰNG CHỈ THỊ PHÂN TỬ**

### **1.6.1. Sự đa dạng di truyền ở mức độ phân tử của nấm *Corynespora cassiicola***

Trước đây, nhiều DVT cao su được đánh giá là kháng bệnh nhưng hiện nay đã bị nhiễm bệnh chứng tỏ nấm *C. cassiicola* hoặc là đã có những biến dị về di truyền để thích nghi với điều kiện sống mới hoặc là đang tồn tại những nòi nấm *C. cassiicola* với khả năng gây bệnh khác nhau. Những nghiên cứu về đa dạng di truyền của nấm *C. cassiicola* trong thời gian qua đã phản ánh điều đó.

Darmono và ctv (1996) áp dụng kỹ thuật RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) để nghiên cứu đa dạng di truyền của nấm *C. cassiicola* gây

bệnh trên cây cao su ở Indonesia. Kết quả cho thấy, có biến dị giữa các MPL nấm *C. cassiicola* từ nhiều vùng trồng cao su. Tuy nhiên, không có mối tương quan giữa độc tính của các mẫu nấm với các đặc điểm hình thái hay phân tử. Đa số các MPL có độ tương đồng di truyền đến 95% dù khác biệt về nguồn gốc địa lý và DVT thu thập.

Tương tự, nghiên cứu ở Thái Lan cho thấy, dựa theo phản ứng gây độc, các mẫu nấm *C. cassiicola* phân lập từ nhiều nguồn khác nhau được phân vào 11 nhóm. Việc phân nhóm di truyền dựa trên dữ liệu khuếch đại của các decamer primers cũng được tiến hành. Tuy nhiên, vẫn chưa có mối tương quan nào giữa dữ liệu RAPD, kiểu gây độc và vùng địa lý được xác lập (Romruensukharom và ctv, 2005).

Tại Sri Lanka, kỹ thuật RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) trên vùng ITS (internal transcribed spacer) của rDNA và phân tích RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) trên DNA tổng số được ứng dụng để phân tích đa dạng di truyền của các MPL nấm *C. cassiicola* từ nhiều ký chủ khác nhau. Kết quả cho thấy, kích thước của các đoạn ITS khuếch đại được từ các MPL đều giống nhau và khi dùng enzyme cắt giới hạn để cắt đoạn ITS, kích thước của sản phẩm thu được hoàn toàn giống nhau ở tất cả các MPL. Tuy nhiên, dữ liệu thu được từ việc phân tích RAPD sử dụng 15 đoạn primer khác nhau cho thấy có sự đa hình có ý nghĩa giữa các nhóm MPL (Silva và ctv, 1995; 1998; 2003).

Tại Malaysia, sự tồn tại các nòi sinh lý của nấm *C. cassiicola* đã trở thành mối nghi ngờ từ lâu khi các DVT trước đây được xem là kháng bệnh nhưng sau đó trở nên mẫn cảm. Ismail và Jeyanayagi (1999) tiến hành các thí nghiệm trên các MPL có nguồn gốc từ nhiều DVT trồng ở nhiều nơi của Malaysia và khẳng định có 2 nòi nấm *C. cassiicola*. Nòi 1 không gây bệnh cho các DVT RRIM 2020 và PB 260 trong khi nòi 2 gây bệnh cho cả hai DVT trên. Atan và Hamid (2003) sử dụng kỹ thuật RAPD để phân nhóm di truyền và phân tích vùng ITS cho 9 mẫu nấm *C. cassiicola* phân lập từ một số DVT ở Malaysia tiếp tục xác định có 2 nòi *C. cassiicola* riêng biệt. Một nòi có thể gây bệnh trên DVT cao su RRIM 2020, một

nòi không gây bệnh trên DVT này nhưng lây bệnh trên RRIM 600 và RRIM 2009 cùng các DVT khác.

Sử dụng chỉ thị ISSR (Inter Simple Sequence Repeat), Nguyen Anh Nghia và ctv (2008) đã phân tích biến dị di truyền của 21 MPL nấm *C. cassiicola* được thu thập từ nhiều DVT tại các vùng trồng cao su truyền thống của Malaysia. Kết quả phân tích cho thấy chỉ thị ISSR đã phân chia 21 MPL thành 3 nhóm di truyền khác nhau. Tiếp tục sử dụng phương pháp lây bệnh trên lá cao su cắt rời dùng đại diện của mỗi nhóm di truyền làm nguồn nấm gây bệnh, tác giả đi đến kết luận có 2 nòi *C. cassiicola* tương tự như 2 nòi đã được xác định trước đây và một MPL thuộc nhóm di truyền thứ 3 có khả năng là một nòi mới. Kết quả cho thấy có sự phân nhóm di truyền các nguồn nấm theo vùng địa lý.

Tại Việt Nam, các kết quả nghiên cứu đa dạng di truyền của nấm *C. cassiicola* vẫn còn hạn chế với số lượng mẫu nấm chưa nhiều và chủ yếu phân bố cục bộ tập trung tại một số tỉnh vùng Đông Nam Bộ. Nguyen Anh Nghia và ctv (2010b) tiến hành phân tích đa dạng di truyền của 34 MPL nấm *C. cassiicola* sử dụng chỉ thị phân tử ISSR và giải trình tự vùng rDNA-ITS. Kết quả đã phát hiện được sự khác biệt nucleotide tại vị trí 135 trong vùng rDNA-ITS cùng với kết quả phân tích bằng chỉ thị ISSR đã phân chia 34 MPL nấm *C. cassiicola* thành 2 nhóm chính. Trong một nghiên cứu gần đây nhất, ba mươi tám (38) MPL nấm *C. cassiicola* từ 13 DVT cao su và một số cây ký chủ khác bao gồm đu đủ (*Carica papaya*), lá giang (*Aganonerion polymorphum*), kơ nia (*Irvingia malayana*), bí đao (*Benincasa cerifera*) và mè (*Sesamum indicum*) đã được phân tích đa dạng di truyền bằng kỹ thuật giải trình tự vùng rDNA-ITS và chỉ thị ISSR. Kết quả khẳng định có ít nhất 2 nhóm di truyền nấm *C. cassiicola* đang lây nhiễm trên cây cao su và một số cây ký chủ khác ở Việt Nam (Nguyen Don Hieu và ctv, 2014).

### **1.6.2. Các chỉ thị phân tử được sử dụng trong nghiên cứu đa dạng di truyền nấm *Corynespora cassiicola***

Các chỉ thị phân tử tạo ra số lượng chỉ thị nhiều hơn hẳn so với chỉ thị hình thái và chỉ thị isozyme, độ tin cậy cao hơn và thuận tiện hơn. Ngày càng có nhiều



kỹ thuật sinh học phân tử được ứng dụng trong các nghiên cứu, đánh giá đa dạng di truyền nấm gây bệnh thực vật. Một số chỉ thị phân tử đã được áp dụng trong nghiên cứu đa dạng di truyền nấm *C. cassiicola*.

#### **1.6.2.1. Chỉ thị phân tử RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)**

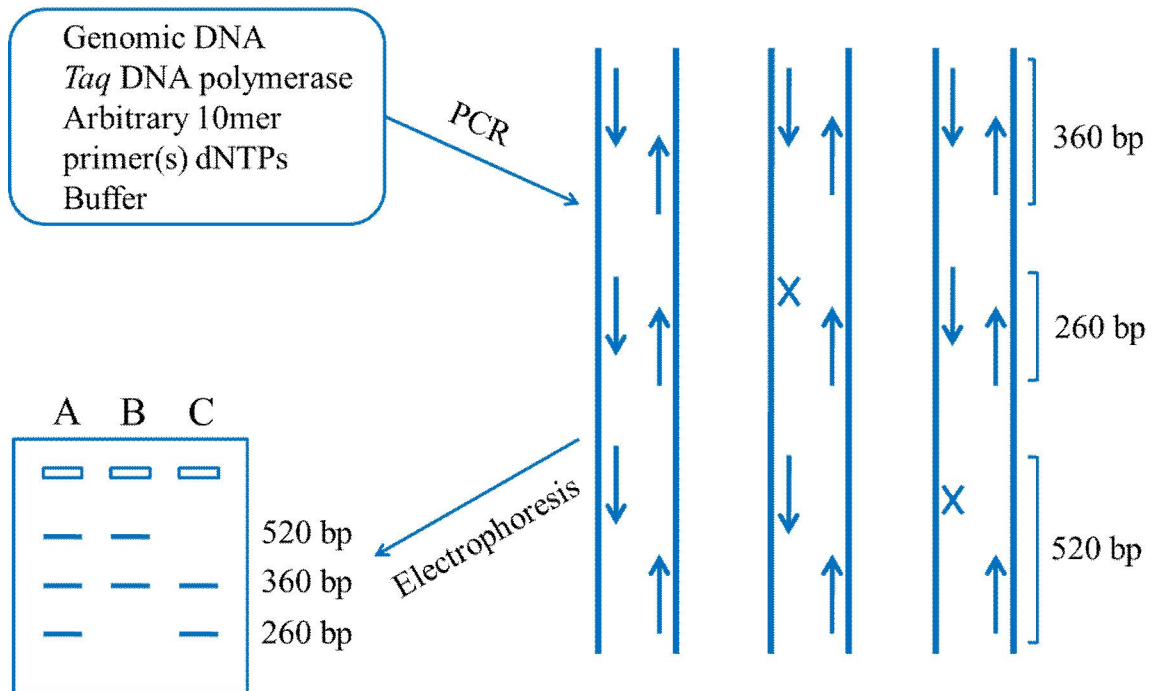
Chỉ thị phân tử RFLP được định nghĩa là tính đa hình chiều dài các phân đoạn cắt giới hạn, biểu hiện sự khác nhau về kích thước các phân đoạn được tạo ra khi cắt DNA bằng các enzyme cắt giới hạn khi có sự thay đổi trình tự trên DNA bộ nhân hoặc trong các bào quan khác.

Nguyên tắc của kỹ thuật này dựa trên độ đặc hiệu của các enzyme cắt hạn chế (RE) đối với vị trí nhận biết của chúng trên DNA bộ gen. DNA bộ gen sẽ được cắt bằng các enzyme cắt giới hạn, chạy điện di qua gel agarose, thấm qua màng lai và lai với một mẫu dò DNA (được đánh dấu phóng xạ) liên kết với một locus đặc biệt. Sự khác biệt vị trí cắt giữa hai cá thể sẽ tạo ra những phân đoạn cắt khác nhau.

Chỉ thị phân tử RFLP có ưu điểm là marker đồng trội cho phép phân biệt được cá thể đồng hợp và dị hợp. Do kích thước DNA khảo sát trong RFLP lớn vì vậy số lượng marker tạo ra nhiều đủ đáp ứng nhu cầu nghiên cứu. Tuy nhiên do qui trình thực hiện phức tạp, nguy hiểm đối với sức khỏe người nghiên cứu (sử dụng phóng xạ đánh dấu), DNA yêu cầu có chất lượng cao đã làm hạn chế việc sử dụng kỹ thuật này. Do đó, hiện nay người ta có xu hướng sử dụng những chỉ thị đơn giản hơn trên cơ sở phản ứng PCR (Bùi Chí Bửu và Nguyễn Thị Lang, 2008).

#### **1.6.2.2. Chỉ thị phân tử RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)**

Chỉ thị phân tử RAPD dựa trên kỹ thuật PCR, bằng cách sử dụng những primer ngắn (khoảng 10 nucleotide) có trình tự biết trước, bắt cặp và nhân bản ngẫu nhiên những đoạn DNA có trình tự bổ sung với trình tự của các primer. Theo nguyên tắc, khi 2 cá thể hoàn toàn giống nhau, sau khi thực hiện phản ứng RAPD ở điều kiện như nhau sẽ tạo ra số lượng các đoạn bằng nhau và chiều dài các đoạn tương ứng bằng nhau. Nguyên lý của kỹ thuật RAPD được minh họa trong Hình 1.2.



**Hình 1.2.** Nguyên lý kỹ thuật RAPD (Weising, 2005)

Sự đa hình DNA từ marker RAPD có thể đến từ một số thay đổi sau: (1) sự chèn vào một đoạn DNA quá lớn giữa 2 vị trí bắt cặp của primer làm vượt khỏi khả năng khuếch đại của PCR trong một khoảng thời gian nhất định dẫn đến việc mất băng; (2) sự chèn vào hay mất đi một đoạn DNA nhỏ giữa 2 vị trí bắt cặp của primer dẫn đến sự thay đổi chiều dài của đoạn được khuếch đại; (3) sự mất đi một trong hai vị trí bắt cặp của primer dẫn đến mất băng hoặc tăng chiều dài của đoạn khuếch đại bởi vị trí kế cận; (4) sự thay đổi 1 hoặc vài nucleotide tại vị trí bắt cặp của primer.

Tuy có một số hạn chế, nhưng kỹ thuật PCR-RAPD dễ thực hiện và dễ thành công do không cần biết trước trình tự bộ gen của đối tượng cần nghiên cứu, thao tác đơn giản, không yêu cầu DNA khuôn có chất lượng cao, thời gian thực hiện nhanh, khả năng nhân bản cao, chi phí thực hiện thấp nên RAPD thường được sử dụng kết hợp với những kỹ thuật khác (Bùi Chí Bửu và Nguyễn Thị Lang, 2008).

### 1.6.2.3. Chỉ thị phân tử ISSR (Inter Simple Sequence Repeat)

Nghiên cứu đầu tiên về kỹ thuật chỉ thị phân tử ISSR được xuất bản năm 1994 (Zietkiewicz và ctv, 1994; Gupta và ctv, 1994). Kỹ thuật PCR-ISSR, là sự cải

tiền của RAPD, sử dụng sự khác biệt của số lượng các vùng trình tự đơn lặp lại được phân phối trong suốt hầu hết bộ gen (Zietkiewicz và ctv, 1994). SSRs (Simple sequence repeats) (Tautz, 1989), cũng được biết đến như các microsatellite là sự lặp lại của 1 - 6 nucleotide nằm phổ biến trong khắp bộ gen bao gồm cả vùng mã hóa hay không mã hóa cho các protein ở sinh vật bậc cao.

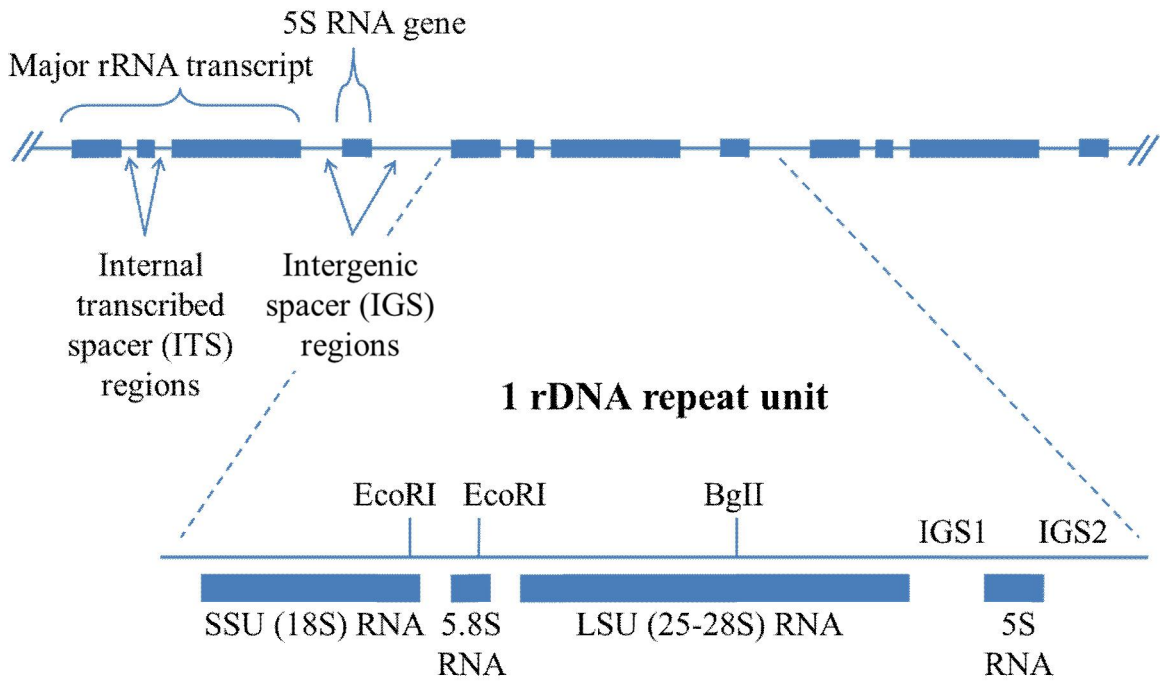
Trong nghiên cứu di truyền nấm, kỹ thuật PCR-ISSR được ứng dụng thành công trong xác định tính đa dạng di truyền của một số nấm bệnh. ISSR là một trong những chỉ thị phân tử dựa trên phản ứng khuếch đại một đoạn trình tự của chuỗi DNA của sinh vật. Sử dụng chỉ thị này cho phép khuếch đại đoạn trình tự nằm giữa những trình tự được gọi là microsatellites nằm khắp bộ gen. Chỉ thị này đã được ứng dụng trong phân tích đa dạng di truyền, biến dị di truyền để nhận dạng ở các cấp độ giống, loài và nòi địa lý ở trong phân loại cả nấm lẫn cây trồng nói chung. Trình tự primer sử dụng trong phản ứng PCR được thiết kế dựa trên những đoạn trình tự nucleotide lặp lại đơn giản gồm 2 nucleotide được lặp lại nhiều lần như (CA)<sub>n</sub>, (AT)<sub>n</sub>, (AG)<sub>n</sub> hoặc những đoạn trình tự gồm 3 nucleotide (AGC)<sub>n</sub>, (TAT)<sub>n</sub>. Mỗi primer gồm 16 - 18 bp là đoạn trình tự lặp lại có đầu 5' hoặc 3' kết thúc bằng 1 - 3 bp bất kì khác với bộ nucleotide được lặp lại. Vì thế chúng dễ thao tác, mang lại nhiều thông tin và có tính lặp lại cao. Vì các trình tự lặp lại được phân bố rất phong phú trong bộ gen nên các microsatellite gắn vào một vài vùng đặc trưng và tạo ra các kiểu khuếch đại đa dạng và thường đa hình giữa các cá thể khác nhau.

#### **1.6.2.4. Phân tích trình tự vùng rDNA-ITS**

Gen RNA ribosome (còn gọi là ribosome DNA hoặc rDNA) được mã hóa bởi DNA trong nhân tế bào và ty thể, các rRNA kết hợp với các phân tử protein chuyên biệt tạo thành các ribosome có chức năng trong tổng hợp protein. Các rDNA trong nhân tế bào được xếp thành một chuỗi các đơn vị lặp lại nối tiếp nhau, chứa nhiều vùng bảo tồn và biến động trên khắp toàn bộ chiều dài của chúng (White và ctv, 1990). Tùy theo hệ số lãg mà các rDNA được phân biệt với nhau và vùng rDNA của nhân tế bào thường bao gồm ba gen (18S, 5.8S và 28S) cách nhau bởi những vùng gọi là ITS (internal transcribed spacer) và được xếp thành một chuỗi

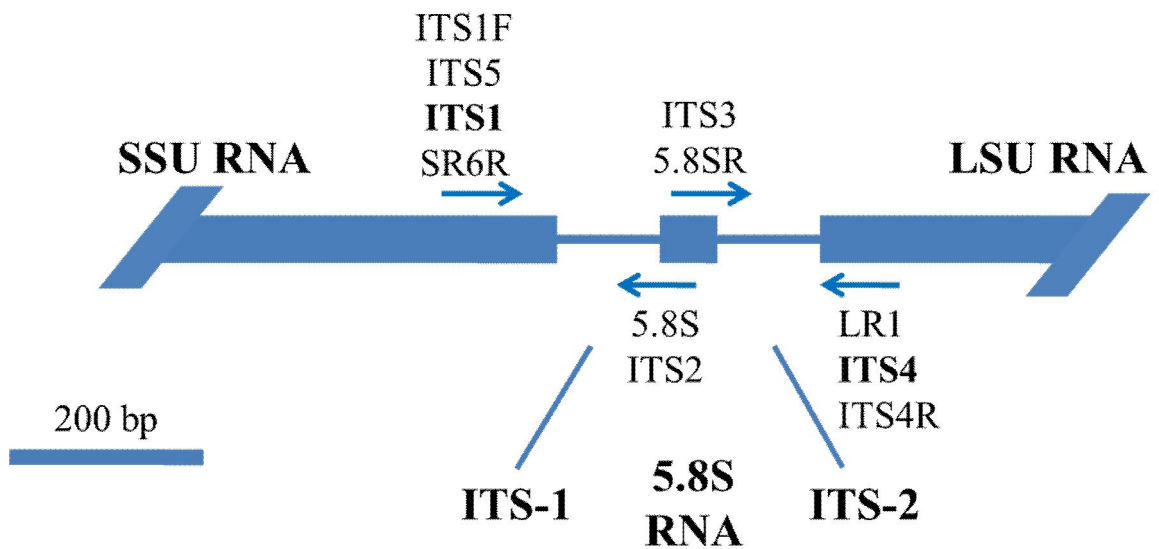
các đơn vị lặp lại nhiều lần (Hình 1.3). Mỗi một đơn vị lặp lại gồm có một vùng phiên mã và một vùng không phiên mã, vùng phiên mã của các gen 18S, 5.8S và 28S mã hóa cho các rRNA tương ứng. Vùng giữa gen 18S và 5.8S lần lượt được gọi là ITS1 và ITS2 (internal transcribed spacer 1, 2). Giữa các bản sao của gen rRNA có một vùng gọi là IGS (intergenic spacer). Các vùng spacer, đặc biệt là vùng IGS, thường biến đổi đáng kể ngay cả trong cùng loài (Bruns và ctv, 1991)

Trình tự nucleotide của các gen rRNA đã được áp dụng trong nghiên cứu về mối quan hệ phát sinh loài ở mức phân loại khác nhau của nhiều sinh vật. Các vùng spacer, rDNA chứa những vùng bảo tồn cao (18S, 5.8S, 28S) cũng như những vùng ít bảo tồn (ITS) và những vùng biến động (IGS). Các vùng ITS của các đơn vị lặp lại của rDNA trong nhân luôn biến động nhất và có thể khác nhau giữa các loài và các quần thể. Vì vậy, vùng rDNA-ITS được xem là hữu ích cho việc tìm hiểu về các mối quan hệ di truyền và phân loại các kiểu biến động trong nấm. Trình tự của vùng này cũng được sử dụng để phát hiện và định lượng sự biến động của nhiều loài hoặc nhóm di truyền của nấm (White và ctv, 1990; Bruns và ctv, 1991).



**Hình 1.3.** Cấu trúc 1 đơn vị gen ribosomal DNA (rDNA)

**ITS primers**



**Hình 1.4.** Vùng các mồi ITS (internal transcribed spacer) (Vilgalys và ctv, 2008)

Hiện nay, vùng rDNA-ITS có lẽ là vùng được giải trình tự rộng rãi nhất ở các loài nấm. Đây là công cụ hữu dụng nhất cho phân tích hệ thống phân tử ở mức độ giữa các loài và kể cả trong cấp độ cùng loài, chẳng hạn như để xác định sự phát sinh các nòi địa lý mới. Do mức độ biến dị của nó cao hơn các vùng di truyền khác của rDNA [Small Sub Unit 18S (SSU) và Large Sub Unit 25-28S (LSU)], sự biến dị của các đoạn lặp lại rDNA riêng biệt có thể được quan sát trong vùng ITS. Thêm vào đó, các môi chuẩn ITS1 và ITS4 được sử dụng ở hầu hết các phòng thí nghiệm, một vài primer phân nhóm chuyên biệt được mô tả cho phép khuếch đại chọn lọc các trình tự của nấm.

#### **1.6.2.5. Chỉ thị phân tử SRAP (Sequence-Related Amplified Polymorphism)**

Chỉ thị phân tử SRAP (Sequence-related amplified polymorphism) là kỹ thuật PCR được sử dụng nhằm khuếch đại đoạn “ORFs – Open Reading Frames”. ORFs là trình tự nucleotide trong phân tử DNA có tiềm năng mã hóa peptide hoặc protein, bao gồm bộ mã khởi động ATG, tiếp theo là các bộ ba (mỗi bộ ba mã hóa một acid amin), và cuối cùng là bộ mã kết thúc TAA, TAG hoặc TGA. Kỹ thuật PCR-SRAP marker sử dụng môi xuôi có độ dài 17 bp và môi ngược có 18 bp có chứa đoạn gen ORFs để khuếch đại số lượng của đoạn gen này. Cấu trúc trình tự của các primer gồm trình tự lõi có 13 – 14 bp, trong đó 10 – 11 ở đầu 5’ sau đó đến trình tự cố định CCGG (đối với môi xuôi) và AATT (đối với môi ngược), cuối cùng là 3 bp chọn lọc gắn ở đầu 3’ của đoạn môi. Sự thay đổi của một trong ba nucleotide cuối ở đầu 3’ sẽ tạo được dạng môi khác trên nền trình tự lõi. Các dạng môi xuôi sẽ định hướng khuếch đại vùng exon, còn môi ngược sẽ khuếch đại vùng intron (Li và Quiros, 2001).

Trong những năm gần đây, chỉ thị phân tử SRAP đã được sử dụng rộng rãi trong nghiên cứu đa dạng di truyền của nhiều loài thực vật và một số loài nấm gây bệnh cây trồng (Ma và ctv, 2010; Zhang và ctv, 2012; Yin và ctv, 2014; Liu và ctv, 2015; Yao và ctv, 2018; Hasan và ctv, 2018). Ưu điểm của kỹ thuật PCR-SRAP là sử dụng bộ môi phổ quát có thể sàng lọc các đột biến trên toàn bộ gen, độ tin cậy cao vì kết quả đa hình DNA thường tương quan với các đặc điểm hình thái và kiểu

hình (Li và ctv, 2014). Hiện nay, chưa có nghiên cứu nào về đa dạng di truyền nấm *C. cassiicola* bằng chỉ thị phân tử SRAP, trong khi sự đa dạng của nấm *C. cassiicola* đã được biết là có quan hệ với nhóm gen *Cas*, gen mã hóa độc tố cassiicolin, là một glycoprotein gồm 27 amino acid. Trong luận án nghiên cứu này, chỉ thị phân tử SRAP đã được sử dụng để phân tích đa dạng di truyền nấm *C. cassiicola* thu thập trên cây cao su tại nhiều vùng trồng khác nhau ở Việt Nam.

## **1.7. ĐỘC TỐ CASSIICOLIN CỦA NẤM *Corynespora cassiicola***

### **1.7.1. Vai trò của độc tố cassiicolin**

Cassiicolin là một độc tố thực vật được sản sinh bởi nấm *C. cassiicola*. Độc tố cassiicolin có vai trò chọn lọc ký chủ trong quá trình xâm nhiễm và gây bệnh của nấm vì độc tố này chỉ được ghi nhận tại vết bệnh trên cây ký chủ mẫn cảm và không tạo ra bất kỳ triệu chứng nào trên những loại cây trồng không phải là ký chủ. Đồng thời, cassiicolin là tác nhân làm phân hủy tế bào và gây ra các dạng triệu chứng bệnh trên cây ký chủ. Điều này đã được chứng minh bằng việc thêm độc tố cassiicolin vào dung dịch bào tử của MPL nấm không có tính độc (BGA3) để chủng bệnh trên lá cao su thì làm tăng mức độ và triệu chứng bệnh trên lá. Tương tự, khi lây bệnh nhân tạo trên lá cao su bằng dung dịch bào tử của nguồn nấm có tính độc mạnh (CCP) cùng với kháng thể kháng cassiicolin thì làm giảm mức độ bệnh so với cách chủng bệnh bằng bào tử bình thường. Kháng thể kháng cassiicolin và độc tố thô đã được chứng minh là không ảnh hưởng đến tỷ lệ nảy mầm của bào tử. Sự di chuyển của độc tố dọc theo gân lá làm gân lá mất màu và tạo ra triệu chứng đặc trưng “xương cá”. Cùng với quá trình xâm nhiễm của nấm, độc tố cassiicolin nhanh chóng lan truyền qua nội bào, gây độc và phá hủy tế bào, làm chết phần diện tích mô lá xung quanh vị trí xâm nhiễm của sợi nấm, tạo ra các dạng triệu chứng bệnh trên phiến lá. Nếu nhỏ một giọt độc tố này lên trên mô lá đã được gây vết thương thì nó cũng tạo ra những triệu chứng bệnh giống như phương pháp lây bệnh bằng bào tử (Breton và ctv, 2000).

Khi quan sát sự xâm nhiễm của nấm diễn ra trong nội bào lá cao su, không có sự đồng nhất về màu sắc vàng nâu của chất tích lũy trong vùng hoại tử của DVT

kháng bệnh và DVT mãn cảm bệnh. Sự xâm chiếm của nấm trong DVT kháng bị hạn chế bởi một vài vách ngăn của tế bào và sự phát triển của nấm dường như bị ngừng lại, xung quanh khu vực này xuất hiện nhân tế bào và sự hiện diện của tinh bột biểu lộ lá đã bị nhiễm độc. Ngược lại, trong các DVT mãn cảm mức độ xâm chiếm của nấm được tăng lên do các tế bào biểu bì bị phá hủy, đa số tế bào trong khu vực bị nấm xâm nhiễm đều bị thoái hóa. Vùng mô bị hoại tử cách xa vị trí sợi nấm chứng tỏ độc tố cassiicolin do nấm tiết ra đã hiện diện, khuếch tán và phân hủy tế bào (Breton và ctv, 2000).

Theo Déon và ctv (2012a), cassiicolin có vai trò đặc biệt quan trọng trong giai đoạn đầu của quá trình xâm nhiễm của nấm, ở thời điểm 1 hoặc 2 ngày sau chủng, độc tố của MPL CCP (độc lực cao) và CCAM1 (độc lực trung bình) đã biểu hiện. Độc tố cassiicolin làm giảm tỉ lệ đồng hoá CO<sub>2</sub> ở mô khô, từ đó làm thay đổi cơ chế quang hợp ở lá bị nhiễm bệnh (Nugawela và ctv; 1989). Theo Ribeiro và ctv (2019), cassiicolin là một tác nhân có vai trò tạo độc lực chính cho nguồn nấm có tính độc mạnh (CCP) trong quá trình ký sinh trên những DVT cao su mãn cảm, trong khi những tác nhân độc tố khác có vai trò trong quá trình hoại sinh hơn là ký sinh.

### 1.7.2. Cấu trúc và đặc tính của độc tố cassiicolin

Cấu trúc của cassiicolin là một glycoprotein, chuỗi peptide gồm 27 acid amin, với một N-acid pyroglutamic và 6 cysteine (Cysteine là 1  $\alpha$ -amino acid, công thức hóa học là HO<sub>2</sub>CCH(NH<sub>2</sub>)CH<sub>2</sub>SH). Khối lượng phân tử ước tính là 2.885 Da. Trình tự acid amin đầy đủ của cassiicolin như sau: PyroGlu- T\*- C V S C V N F G N G F C G D N C G N S W A C S G C, T\* là glycosylated threonine (Lamotte và ctv, 2007).

Barthe và ctv (2007), sử dụng kỹ thuật quang phổ NMR để phân tích mô phỏng cấu trúc không gian 3D của cassiicolin có dạng hình elip, khung bao bọc bởi 3 sợi antiparallel  $\beta$ -sheet sắp xếp theo hướng xoắn phải và được liên kết bởi 3 cầu nối disulfide.



Cassiicolin dễ tan trong nước và một số dung môi khác. Độc tố này khá bền với khả năng chịu nhiệt cao (nồng độ độc tố không thay đổi trong điều kiện hấp khử trùng ở nhiệt độ lên đến 120°C trong 30 phút), ổn định trong môi trường pH 4 – 8 và điểm đẳng điện 2,4 – 2,8 (Lamotte và ctv, 2007).

### **1.7.3. Mối liên hệ giữa độc tố cassiicolin, tính gây bệnh của nấm *Corynespora cassiicola* và tính kháng của ký chủ**

Nghiên cứu mối liên hệ giữa cassiicolin và tính gây bệnh của 11 MPL nấm *C. cassiicola* trên 22 DVT cao su bằng phương pháp chủng bệnh trên lá cắt rời, Breton và ctv (2000) kết luận: có mối tương quan thuận giữa lượng độc tố cassiicolin do mỗi MPL nấm tiết ra với khả năng gây bệnh của nấm. Những MPL nấm có tính gây bệnh mạnh như SRI5, CCP, BCA5 và BCA3 sản sinh lượng độc tố cao nhất. Cassiicolin có thể được xem là tác nhân quy định tính gây bệnh của nấm *C. cassiicola*. Tính kháng bệnh của các DVT cao su không phải là bất biến mà còn có mối liên hệ chặt chẽ với nồng độ độc tố được thử nghiệm, bằng chứng là khi sử dụng nồng độ độc tố cao thì có thể vượt qua tính kháng của GT1, là DVT cao su biểu hiện tính kháng bệnh ở nồng độ độc tố thấp.

Trong một nghiên cứu khác, dung dịch độc tố của 2 MPL nấm CCP và CCAM3 được chủng bệnh ở các mức nồng độ tăng dần từ 0,1, 1, 10, 25 và 50 µg/ml trên lá cao su PB 260 và RRIM 600. Kết quả cho thấy triệu chứng nhiễm độc trên lá của 2 DVT tăng dần tương ứng với các mức tăng nồng độ. Trên DVT PB 260 triệu chứng nhiễm độc biểu hiện rõ rệt ngay cả khi sử dụng nồng độ độc tố thấp nhất (0,1 µg/ml) với bề mặt mô lá bị hoại tử khô héo, trên DVT RRIM 600 biểu hiện triệu chứng nhiễm độc chỉ được ghi nhận từ mức nồng độ 1 µg/ml trở lên. Trong cùng một mức nồng độ nhưng biểu hiện nhiễm độc khác nhau giữa các DVT chứng tỏ độ nhạy với độc tố là tùy thuộc vào ký chủ, nghĩa là tùy thuộc vào tính kháng của mỗi DVT (Déon và ctv, 2012a).

Ribeiro và ctv (2019), sử dụng mẫu nấm *ccpΔcas1* (không chứa gen độc tố *Cas1*, thu được bằng cách gây đột biến loại bỏ gen *Cas1* của MPL nấm CCP) để chủng bệnh trên DVT PB 260, IRCA 631 trong điều kiện nhà lưới. Mẫu nấm đột

biến *ccpΔcas1* đã được chứng minh là có đặc điểm phát triển sợi nấm, sản sinh bào tử và tỷ lệ nảy mầm của bào tử không khác biệt so với MPL CCP. Mẫu nấm *ccpΔcas1* không gây bệnh trên 2 DVT cao su PB 260, IRCA 631 ở điều kiện nhà lưới. Tuy nhiên, khi được chủng bằng phương pháp lá cắt rời (ở điều kiện phòng thí nghiệm) thì mẫu nấm này vẫn có thể gây bệnh trên 7 DVT cao su IRCA 631, IRCA 18, PB 260, PB 217, RRIC 110, IRCA 41, RRIM 600 ở mức nhẹ và thời gian biểu hiện triệu chứng chậm hơn rõ rệt so với đối chứng (MPL CCP). Bên cạnh đó, độc tính dịch lọc độc tố của 2 mẫu nấm cũng được so sánh, độc tính dịch lọc *ccpΔcas1* thấp hơn so với CCP nhưng không bị ức chế hoàn toàn. Hai QTL (quantitative trait locus, vị trí tính trạng số lượng) trước đây được tìm thấy có liên quan đến mức độ miễn cảm hoặc chống chịu bệnh của các DVT cao su đối với dịch lọc độc tố của mẫu nấm CCP hoặc cassiicolin tinh khiết đã không còn được phát hiện với dịch lọc đột biến *ccpΔcas1*, trong khi QTL mới được tiết lộ. Nhóm tác giả đi đến kết luận: (1) cassiicolin là tác nhân có vai trò chính trong ký sinh và sản xuất độc tố trong mẫu nấm CCP trên các DVT cao su miễn cảm; (2) những độc tố khác cũng được sản sinh, gây độc trên những mô bị đã tổn thương và dường như có vai trò trong hoại sinh hơn là ký sinh.

### **1.8. NGHIÊN CỨU VỀ ĐA DẠNG DI TRUYỀN GEN MÃ HÓA ĐỘC TỐ CASSIICOLIN (GEN *CAS*) CỦA NẤM *Corynespora cassiicola***

Gen mã hóa độc tố cassiicolin lần đầu tiên được phát hiện và mô tả bởi Déon và ctv (2012a) trong một nghiên cứu về đặc điểm gen mã hóa độc tố cassiicolin của 3 MPL đại diện cho mức độ gây bệnh khác nhau. Gen *Cas* đã được phát hiện trên MPL có tính gây bệnh mạnh (CCP) và gây bệnh trung bình (CCAM3) nhưng không phát hiện trên mẫu nấm gây bệnh yếu (CCAM1). Trình tự gen *Cas* đã được giải mã và đăng ký trên ngân hàng dữ liệu Genbank (Déon và ctv, 2012a).

Bốn (4) mẫu nấm *C. cassiicola* nội sinh trên lá cây cao su không có triệu chứng bệnh tại Nam Mỹ, được xác định mang gen mã hóa cassiicolin thuộc nhóm *Cas3* và *Cas4*. Trong đó, ba (3) MPL có thể gây ra các triệu chứng bệnh trên lá cao su bằng phương pháp lây bệnh nhân tạo trên lá cắt rời với mức độ khác nhau. Một

(1) MPL có đặc tính và mức độ gây bệnh gần giống với MPL CCP (gây bệnh mạnh, thuộc nhóm *Cas1*), hai (2) MPL còn lại có biểu hiện triệu chứng chậm hơn trong quá trình lây nhiễm nên có thể chúng thuộc nhóm hoại sinh. Nghiên cứu biểu hiện gen gây độc không phát hiện được nhóm gen *Cas3* và *Cas4* trong khi nhóm gen *Cas1* được phát hiện tại MPL CCP, đã chứng minh *C. cassiicola* có mặt tại Nam Mỹ thuộc nhóm nấm nội sinh và có thể phát triển tiến hóa thành nhóm nấm hoại sinh hoặc thậm chí có khả năng gây bệnh (Déon và ctv, 2012b).

Sự đa dạng di truyền gen *Cas* của 70 MPL *C. cassiicola* có nguồn gốc từ nhiều cây ký chủ và vùng địa lý khác nhau đã được nghiên cứu, kết quả phát hiện 33 MPL có sự hiện diện ít nhất một dạng gen *Cas*, trong đó 30 MPL có một gen *Cas* và 3 MPL cùng tồn tại hai dạng gen *Cas* trong cùng mẫu nấm. Cây phân nhóm di truyền dựa vào vị trí loci và các dạng gen *Cas* đã phân chia 33 MPL thành sáu nhóm gen *Cas* riêng biệt. Nghiên cứu tính gây bệnh của các MPL đại diện cho các nhóm gen *Cas* khác nhau chỉ rõ nhóm gen *Cas1* có tính gây bệnh mạnh nhất và có vai trò trong giai đoạn mới xâm nhiễm. Một số MPL chưa phát hiện gen *Cas* (ký hiệu là *Cas0*) có khả năng gây bệnh ở mức trung bình, có lẽ còn tồn tại những nhóm gen *Cas* khác mà chưa được rõ (Déon và ctv, 2014).

Liu và ctv (2015) đã phân tích sự đa dạng của gen mã hóa cassiicolin trên 49 MPL *C. cassiicola* được thu thập từ nhiều ký chủ ở nhiều vùng địa lý khác nhau của Trung Quốc. Gen cassiicolin đã được phát hiện trong 40/49 mẫu nấm nghiên cứu, mã hóa thành 2 nhóm protein đồng dạng khác nhau (*Cas2* và *Cas5*). Những MPL mang gen *Cas5* được tìm thấy trên phần lớn ký chủ cao su, và chỉ được tìm thấy trên các MPL từ cây cao su. Những MPL đại diện cho nhóm *Cas2* được thu thập từ cây cao su và các ký chủ khác. Các dạng gen *Cas* khác không được tìm thấy ở một số MPL. Trong nghiên cứu này, gen mã hóa cassiicolin thuộc các nhóm *Cas1*, *Cas3*, *Cas4* và *Cas6* không được tìm thấy ở bất kỳ MPL nào.

Hai mươi sáu (26) MPL nấm *C. cassiicola* trên cây cao su tại Malaysia đã được phân tích gen mã hóa cassiicolin, kết quả phát hiện 13/26 mẫu nấm có sự hiện diện của gen *Cas*, trong đó có 12 MPL mang gen *Cas5* và có duy nhất CKT05D mang

gen *Cas4*. Tính gây bệnh của 4 MPL đại diện cho các nhóm đã được khảo sát bằng phương pháp chủng bệnh trên lá cắt rời của 6 DVT cao su. Kết quả thu được là mẫu nấm CKT05D mang gen *Cas4* có khả năng gây bệnh mạnh nhất, mức độ bệnh trên lá của 6 DVT đều ở mức nặng. Đây là lần đầu tiên phát hiện mẫu nấm *C. cassiicola* mang gen *Cas4* ký sinh và gây bệnh nặng trên cây cao su (Shuib và ctv, 2015).

### **1.9. NGHIÊN CỨU VỀ TÍNH GÂY BỆNH CỦA NẤM *Corynespora cassiicola***

Đến nay, các nòi nấm *C. cassiicola* từ các ký chủ khác nhau đã được phát hiện và không phải nòi nấm nào cũng có khả năng lây nhiễm chéo cho toàn bộ phổ ký chủ của các nòi khác (Pernezny và Simone, 1993). Có sự tương đồng về đặc điểm hình thái của nhiều mẫu nấm được phân lập từ nhiều cây ký chủ khác nhau nhưng sự lây nhiễm chéo giữa các MPL nấm trên các ký chủ là rất biến thiên, tùy thuộc mỗi MPL nấm.

Onesirosan và ctv (1974) nhận thấy những mẫu nấm phân lập từ cây dưa leo, đậu nành và cà chua là rất độc đối với cây cà chua và cà tím nhưng chỉ gây độc trung bình trên cây mè và cây bông vải.

Tại Malaysia, Chee (1988) nhận thấy phổ ký chủ của nấm *C. cassiicola* rất rộng nhưng sự lây nhiễm chéo vẫn còn đang hoài nghi. Theo Phan Thanh Dung (1995), nấm *C. cassiicola* gây bệnh trên cây cao su thì không xâm nhiễm trên cây ớt, đu đủ, cà chua và các mẫu nấm *C. cassiicola* gây bệnh trên cây cao su là nấm ký sinh chuyên biệt.

Kingsland (1985) phát hiện sự hiện diện của nấm *C. cassiicola* lần đầu tiên tại nước Cộng hòa Seychelles, nấm là nguyên nhân gây bệnh đốm lá trên cây cà chua và cây dưa leo. Tuy nhiên, những mẫu nấm kể trên khi được chủng lên cây đu đủ thì không xuất hiện triệu chứng bệnh.

Tại Indonesia, theo báo cáo của Suwanto và ctv (2000), những mẫu nấm phân lập từ cây đu đủ có thể gây bệnh trên một số DVT cao su nhưng những MPL từ cao su thì không gây bệnh trên đậu nành và khoai mì.

Cutrim và Silva (2003) đánh giá tính gây bệnh của hai mẫu nấm *C. cassiicola* được phân lập từ cây cà chua trên một số cây ký chủ khác. Kết quả cho thấy có sự

đáp ứng khác nhau của các cây ký chủ nhưng nhìn chung hầu hết đều miễn cảm với hai MPL trên ngoại trừ cây anh đào và cây đu đủ.

Poltronieri và ctv (2003) chủng bệnh trên lá cây sơ ri (*Malpighia glabra*) bằng các mẫu nấm *C. cassiicola* phân lập từ một số cây ký chủ khác nhau. Những MPL từ *Rhododendrum* sp., cà chua, bí ngô và sơ ri đều cho thấy triệu chứng bệnh trên lá sơ ri ngoại trừ những MPL từ cây tiêu và đu đủ.

Trong một nghiên cứu khác, 15 MPL từ các ký chủ khác nhau được chủng trên 12 loài cây, kết quả cho thấy mức độ gây bệnh của mỗi mẫu nấm trên các ký chủ là khác nhau và mức miễn cảm của các ký chủ là không đồng nhất đối với mỗi mẫu nấm (Olivera và ctv, 2007).

Tại Việt Nam, Nguyen Don Hieu và ctv (2014), nghiên cứu khả năng gây bệnh của 4 MPL đại diện cho 2 phân nhóm di truyền và nguồn gốc ký chủ khác nhau (2 MPL từ cây cao su, 1 MPL từ đu đủ và 1 MPL từ bí đao), kết quả ghi nhận được một trong hai MPL từ cây cao su có khả năng gây bệnh trên cây đu đủ và bí đao, trong khi MPL từ đu đủ có khả năng gây bệnh trên cây cao su nhưng không lây nhiễm được trên cây bí đao và MPL từ cây bí đao có thể gây bệnh trên cao su và cây đu đủ.

Tại Brazil, Ferreira và Bentes (2017) ghi nhận những MPL từ cây cà chua và cà tím có thể gây bệnh chéo với nhau nhưng không thể gây bệnh trên cây đu đủ. Trong khi, những MPL từ cây đu đủ thì có thể gây bệnh nặng trên cây cà chua và cà tím.

## **1.10. KHÁI LƯỢC VỀ TƯƠNG TÁC KÝ SINH – KÝ CHỦ TRONG BỆNH CÂY**

### **1.10.1. Thuyết “gen for gen”**

Khi quan sát từng giai đoạn trong tương tác di truyền giữa cây lanh và bệnh gỉ sắt, Flor (1971) lần đầu tiên đề xuất thuyết “gen for gen” (gen đối gen). Trong đó, tính kháng của ký chủ là do một gen đặc biệt tương ứng với ký sinh có gen *avr* (avirulence: không độc tính). Thuyết “gen đối gen” đặt ra cơ sở lý thuyết về mối quan hệ giữa ký sinh và ký chủ, ảnh hưởng trong nhiều ứng dụng kỹ thuật cloning

phân tử DNA của gen *avr* của mầm bệnh và sự tương ứng đối với gen kháng trong cây chủ (Bùi Chí Bửu, 2002). Nghiên cứu di truyền phân tử đã khẳng định lại giả thuyết “gen đối gen” với qui mô phân tử DNA. Sự kích thích phản ứng tự bảo vệ của thực vật bắt nguồn từ sự ghi nhận tín hiệu phân tử đặc biệt được biết đến với thuật ngữ “elicitor”. Những elicitor được mã hóa một cách trực tiếp hoặc gián tiếp bởi các gen *avr*. Những gen kháng sẽ mã hóa các “receptor” đối với từng elicitor riêng biệt. Tính chất ghi nhận một cách đặc biệt như vậy sẽ kích hoạt một cascade (phản ứng phosphoryl hóa để cung cấp năng lượng cho quá trình truyền tín hiệu di truyền) của gen cây chủ. Sự kích hoạt như vậy sẽ tạo ra hiện tượng đáp ứng siêu nhạy cảm và ức chế sự phát triển của mầm bệnh (Bùi Chí Bửu, 2002).

Hệ thống miễn dịch cơ bản thúc đẩy phản ứng tự vệ của cây chủ bắt nguồn từ sự ghi nhận tín hiệu phân tử đặc biệt gọi là “elicitor”. Những elicitor này được mã hóa một cách trực tiếp, hoặc gián tiếp bởi các gen *avr*. Hầu hết quan điểm đều cho rằng có mối quan hệ giữa gen kháng và gen không độc. Thuyết “gen đối gen” trong kháng bệnh của thực vật là rất quan trọng, được ứng dụng trong nghiên cứu tương tác của cây trồng với nhiều tác nhân gây bệnh để nâng cao hiệu quả kháng bệnh. Cây chủ có nhiều gen kháng và tác nhân gây bệnh có nhiều gen không độc. Mô tả một cách đơn giản, sự kháng bệnh được thực hiện nếu có mặt của các phân tử gen kháng nhận ra sự hiện diện của các gen không độc (Dangl và Jones, 2001).

### **1.10.2. Tính kháng của ký chủ**

Trong một tương tác giữa ký sinh và ký chủ có tính chất đồng tiến hóa cao, tính kháng bệnh có thể được chia thành hai dạng: (1) tính kháng về chất lượng (qualitative) đề cập đến khả năng ngăn cản mạnh mẽ sự phát sinh các nòi chuyên tính (strain) của mầm bệnh, ngăn cản sự phát sinh của mầm bệnh, trong khi tính kháng số lượng (quantitative) làm suy giảm sự kéo dài giai đoạn sinh sản của mầm bệnh; (2) tính kháng chuyên tính đối với nòi (race) được dùng để tả một phản ứng kháng bệnh đối với một kiểu gen của một mầm bệnh chuyên biệt nào đó và tính kháng không chuyên tính là phản ứng kháng trong tất cả các kiểu gen khác nhau (Bùi Chí Bửu, 2002).

Kháng không phân biệt ký chủ và kháng chuyên biệt ký chủ (non – host and host resistance): sự kháng của những loài cây với hầu hết các nòi sinh lý hay kiểu hình của mầm bệnh gọi là kháng không phân biệt ký chủ, đây là dạng phổ biến nhất được thể hiện của ký chủ (Health, 2000). Kháng chuyên biệt ký chủ thường là ký sinh chuyên tính, chỉ ký sinh giới hạn một số loại cây chủ và thường đặc trưng cho kiểu di truyền của mầm bệnh. Sự biến thiên của “host resistance” bị kiểm soát bởi những gen đơn riêng biệt, những sản phẩm của mối tương tác trực tiếp hoặc gián tiếp với “specific elicitor” những tín hiệu phân tử đặc biệt được sản sinh bởi mầm bệnh và mã hóa bởi những gen không độc. Kháng chuyên biệt ký chủ bao gồm những gen kháng đơn vượt trội mà những gen này mã hóa những protein nhận biết được những gen không độc chuyên tính từ mầm bệnh mà có những gen không độc. Do đó, phản ứng siêu nhạy cảm bị kích thích và kìm hãm mầm bệnh phát triển. Khi triệu chứng bệnh trên ký chủ xuất hiện, cần thiết có sự hiện diện hoặc là gen kháng của ký chủ hoặc là gen không độc của mầm bệnh. Tương tác giữa ký sinh và cây chủ nếu tương thích thì sự kháng xảy ra, còn nếu không tương thích thì sự mẫn cảm xảy ra. Kháng không phân biệt ký chủ là dạng kháng được hình thành trước từ những yếu tố có sẵn trong cây chủ, đây là cơ chế kháng thụ động được hình thành từ những hợp chất hóa sinh, những “rào cản” có thể kể đến là: thành tế bào, những lớp sáp, cutin, và các chuỗi protein kháng (Dangl và Jones, 2001).

Cây trồng thể hiện tính kháng đối với ký sinh gây bệnh là do chúng mang các đặc tính phân loại khác với nhóm ký chủ của ký sinh gây bệnh, hoặc là cây chứa các gen kháng mà ký sinh không có gen tương ứng để phá vỡ. Vài loài thực vật là ký chủ đối với nhóm nhỏ trong số các vi sinh vật gây bệnh, hoặc không là ký chủ khi mang tính kháng hoàn toàn ngay cả ở điều kiện thích hợp nhất cho bệnh phát triển. Hiện tượng từ kháng trở thành nhiễm của cây trồng đối với vi sinh vật gây bệnh là do số lượng khác nhau của gen kháng hiện diện ở mỗi giống cây và ảnh hưởng của gen kháng đối với ký sinh. Trường hợp giống rất nhiễm đối với vi sinh gây bệnh thể hiện sự kiện không có gen kháng một cách hiệu quả chống lại nòi gây bệnh đó. Giống cây trồng không có gen kháng đối với nòi gây bệnh thứ nhất và có thể có một

gen kháng hoặc nhiều gen kháng chống lại nòi thứ hai. Nếu như cùng một giống được lây nhiễm với nhiều nòi gây bệnh phân lập từ nhiều nguồn khác nhau, cây có thể nhiễm với vài nòi và kháng với vài nòi khác. Điều này cho thấy cây trồng có một hoặc vài gen kháng mà mỗi gen kháng có tính chuyên biệt cho từng nòi sinh lý gây bệnh (Phạm Văn Dư, 2002).

### **1.10.3. Phản ứng siêu nhạy cảm (HR: hypersensitivity response)**

Phản ứng siêu nhạy cảm được kích thích bởi sự xâm nhập của mầm bệnh, đây là hiện tượng có đặc điểm chung nhất trong vai trò tính kháng tích cực của cây chủ (Dangl và ctv, 1996). Phản ứng siêu nhạy cảm là vùng tự chết của tế bào, định vị ngay vị trí nhiễm bệnh của ký chủ đối với sự xâm nhập do nòi sinh lý gây bệnh. Đây là kết quả của hệ thống “gen đối gen” trong đó gen *avr* của ký sinh tương ứng với gen R của ký chủ. Hệ thống “gen đối gen” thể hiện qua phản ứng siêu nhạy cảm xảy ra đối với các bệnh do ký sinh bắt buộc theo cơ chế xâm nhập xuyên vách tế bào như virus, mycoplasma, hoặc ký sinh bắt buộc và không chuyên tính như vi khuẩn, nấm và tuyến trùng. Cơ chế này là kết quả của sự thừa nhận về mặt phân tử báo hiệu tính chuyên biệt, trong đó chất kích thích phản ứng được sản xuất do gen không độc *avr* của ký sinh và được thừa nhận do phân tử đặc biệt được mã hóa của gen kháng R của cây chủ. Sự thừa nhận này tạo ra hoạt động của một chuỗi bao gồm nhiều gen với chức năng khác nhau, phục vụ cùng một mục đích, dẫn đến hiện tượng siêu nhạy cảm xảy ra, đồng thời ngăn cản sự phát triển của ký sinh. Phản ứng cũng kích hoạt nhiều gen tương cận, làm cho việc tự bảo vệ là kết quả của nhiều kiểu tính kháng bao gồm tính kháng ngang và tính kháng lưu dẫn (Phạm Văn Dư, 2002).

HR biểu hiện tính kháng chủ động, do đó các sự kiện kích thích HR được cố gắng tìm kiếm cũng như tìm kiếm các giai đoạn cực trọng trong tiến trình làm cho tế bào chết. Phương pháp nghiên cứu thông qua các đột biến đã được áp dụng rất phổ biến để đạt được mục tiêu như vậy. Khía cạnh phân tử và mô học trong các thể đột biến liên quan đến phản ứng kháng bệnh của cây lanh đã được xem xét đến cho thấy, nó chỉ thể hiện tính kháng khi cây xuất hiện bệnh. Như vậy, chính các kiểu



hình có tế bào chết sẽ kích thích cho sự khởi động tính kháng không chuyên tính đối với mầm bệnh (Bùi Chí Bửu, 2002).

## **Chương 2**

# **NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**

### **2.1. NỘI DUNG NGHIÊN CỨU**

- Khảo sát một số đặc điểm hình thái của 76 mẫu nấm *C. cassiicola* phân lập từ cây cao su.
- Phân tích đa dạng di truyền của 76 MPL *C. cassiicola* bằng kỹ thuật giải trình tự vùng rDNA-ITS và PCR khuếch đại vùng Open Reading Frames (ORFs) bằng chỉ thị phân tử SRAP.
- Nhận diện sự tồn tại của các nhóm gen *Cas* trong 76 MPL *C. cassiicola* bằng kỹ thuật PCR khuếch đại gen *Cas*.
- Khảo sát tính gây bệnh của 76 MPL *C. cassiicola* trên DVT cao su RRIV 4 (mẫn cảm bệnh) và PB 260 (chống chịu bệnh) bằng phương pháp lây bệnh trên lá cắt rời.
- Đánh giá tính gây bệnh của 6 MPL đại diện cho các phân nhóm di truyền và vùng địa lý khác nhau trên 12 DVT cao su ở điều kiện phòng thí nghiệm và nhà lưới.

### **2.2. THỜI GIAN VÀ ĐỊA ĐIỂM NGHIÊN CỨU**

Đề tài được tiến hành từ tháng 11 năm 2016 đến tháng 11 năm 2019 tại Viện Nghiên cứu Cao su Việt Nam.

Thu thập mẫu bệnh rụng lá *Corynespora* tại tỉnh Bình Dương, Bình Phước, Tây Ninh, Đồng Nai, Gia Lai, Kon Tum, Bình Thuận, Quảng Nam, Quảng Trị, Lai Châu, Sơn La và Lào Cai.

Phân lập, nuôi cấy, khảo sát đặc điểm hình thái và tính gây bệnh của các MPL *C. cassiicola* được tiến hành tại phòng thí nghiệm Bệnh cây, Phòng Nghiên cứu Bảo vệ Thực vật, Viện Nghiên cứu Cao su Việt Nam.

Ly trích DNA và phản ứng PCR được thực hiện tại phòng thí nghiệm Công nghệ Sinh học, Phòng Nghiên cứu Di Truyền – Giống, Viện Nghiên cứu Cao su Việt Nam.

Thí nghiệm trong nhà lưới được thực hiện tại khu thực nghiệm, Phòng Nghiên cứu Bảo vệ Thực vật, Viện Nghiên cứu Cao su Việt Nam.

### 2.3. VẬT LIỆU NGHIÊN CỨU

Nguồn nấm: 76 MPL *C. cassicola* được phân lập trên cây cao su tại nhiều vùng trồng cao su ở Việt Nam. Danh sách mẫu nấm, thời gian và địa điểm thu thập được trình bày tại Bảng 2.1.

Môi trường nuôi cấy: WA (Water Agar), MEA (Malt Extract Agar) và PSA (Potato Sucrose Agar).

Mẫu DNA ly trích từ MPL nấm *C. cassicola*.

Lá cao su (giai đoạn 12 – 15 ngày tuổi) của các DVT: RRIV 1, RRIV 106, RRIV 109, RRIV 114, RRIV 124, RRIV 206, RRIV 209, RRIV 230, PB 255, PB 312, PB 260 và RRIV 4.

Cây cao su DVT: RRIV 1, RRIV 106, RRIV 109, RRIV 114, RRIV 124, RRIV 206, RRIV 209, RRIV 230, PB 255, PB 312, PB 260 và RRIV 4 được trồng trong nhà lưới.

Hóa chất ly trích DNA: dung dịch nitor lỏng, Wizard<sup>R</sup> Genomic DNA Purification Kit (Promega, Mỹ). Hóa chất sử dụng cho kỹ thuật PCR: GoTag Green Master Mix 2X (400  $\mu$ M dATP, 400  $\mu$ M dGTP, 400  $\mu$ M dCTP, 400  $\mu$ M dTTP và 3 mM MgCl<sub>2</sub>), nuclease - free water (Promega), các primer khuếch đại vùng rDNA-ITS, các primer thực hiện chỉ thị phân tử SRAP (Bảng 2.2) và các primer khuếch đại gen *Cas* (Bảng 2.3). Hóa chất để điện di sản phẩm PCR: agarose (Promega, Mỹ), TBE bufer 1X (Promega, Mỹ), ladder 100 bp (Promega, Mỹ).

Dụng cụ cần thiết: đèn cồn, que cấy tam giác, que cấy thẳng, kim mũi mác, lame, lammele, đĩa Petri (đường kính 9 cm), bình tam giác, becher các loại, bình cầu, nhiệt kế, ẩm kế, hộp nhựa plastic trong suốt (kích thước 30 x 20 x 15 cm), nước cất 2 lần, cốc thủy tinh, giấy thấm nước, lưới thép (kích thước 24 x 14 cm), ống hút

nhựa (có đường kính 1 cm), micropipette và đầu tube các loại, tube eppendorf 1,5 mL và 0,2 mL, bình phun và nhiều loại dụng cụ khác.

Máy móc và thiết bị: Nồi hấp khử trùng (SANYO MLS-3020), tủ sấy tiệt trùng (Gallenkamp Size two Oven BS), tủ định ôn (MIR-162), kính hiển vi quang học (BB.1153 – Pli), bồn ủ nhiệt Memmert WB/OB 7 - 45 WBU 45, máy vortex KMS1 Minishaker IKA®, máy ly tâm lạnh Hettich Zentrifugen MikRo 22R, tủ hút khí độc ESCO®, máy đo nồng độ DNA P330 Implen (Đức), máy PCR MJ Research PTC-100 (Mỹ), bồn điện di Thermo EC 330, nguồn điện di GE Healthcare EPS 301, máy chụp gel GelDoc - It - Imaging System UVP, tủ lạnh sâu Sanaky, tủ mát AquaFun.

**Bảng 2.1.** Danh sách 76 MPL nấm *C. cassicola* sử dụng trong nghiên cứu

<b>STT</b>	<b>Tên mẫu</b>	<b>Địa điểm phân lập (huyện, tỉnh)</b>	<b>Ký chủ (DVT)</b>	<b>Năm phân lập</b>	<b>Mã số đăng ký</b>
1	CoryLK02	Bàu Bàng, Bình Dương	LH01/0131	2009	KF387577
2	CoryLK24	Bàu Bàng, Bình Dương	IAN 873	2010	KF387580
3	CoryLK27	Bàu Bàng, Bình Dương	LH90/1094	2010	MK896359
4	CoryLK29	Bàu Bàng, Bình Dương	RRIV3	2010	KF387585
5	CoryLK32	Bàu Bàng, Bình Dương	LH94/062	2010	KF387588
6	CoryLK33	Bàu Bàng, Bình Dương	RRIV1	2010	KF387589
7	Cory LK60	Bàu Bàng, Bình Dương	LH90/463	2018	MK896360
8	CoryDT01	Dầu Tiếng, Bình Dương	RRIV3	2010	KF387595
9	CoryDT02	Dầu Tiếng, Bình Dương	RRIV2	2010	KF387596
10	CoryDT03	Dầu Tiếng, Bình Dương	RRIV4	2010	KF387597
11	CoryDT04	Dầu Tiếng, Bình Dương	RRIV4	2010	KF387598
12	CoryDT05	Dầu Tiếng, Bình Dương	PB260	2010	KF387599
13	CoryBL01	Bình Long, Bình Phước	RRIV3	2009	MK896361
14	CoryDP03	Đồng Phú, Bình Phước	RRIV4	2010	KF387605
15	CoryDP04	Đồng Phú, Bình Phước	RRIV2	2010	KF387606
16	CoryDP07	Đồng Phú, Bình Phước	RRIV4	2016	MK896362
17	CoryDP08	Đồng Phú, Bình Phước	RRIV4	2016	MK896363
18	CoryDP09	Đồng Phú, Bình Phước	RRIV3	2016	MK896364
19	CoryDP11	Đồng Phú, Bình Phước	RRIV4	2017	MK896365
20	CoryTN02	Dương Minh Châu, Tây Ninh	RRIV4	2010	KF387602
21	CoryTN09	Dương Minh Châu, Tây Ninh	RRIV3	2016	MK896366
22	CoryTN10	Gò Dầu, Tây Ninh	RRIV4	2016	MK896367
23	CoryTN11	Dương Minh Châu, Tây Ninh	RRIV4	2016	MK896368
24	CoryTN13	Dương Minh Châu, Tây Ninh	RRIV4	2017	MK896369
25	CoryDN03	Long Khánh, Đồng Nai	RRIV4	2010	KF387609

**Bảng 2.1(tt).** Danh sách 76 MPL nấm *C. cassiicola* sử dụng trong nghiên cứu

<b>STT</b>	<b>Tên mẫu</b>	<b>Địa điểm phân lập (huyện, tỉnh)</b>	<b>Ký chủ (DVT)</b>	<b>Năm phân lập</b>	<b>Mã số đăng ký</b>
26	CoryDN06	Cẩm Mỹ, Đồng Nai	RRIV4	2015	MK896370
27	CoryDN07	Cẩm Mỹ, Đồng Nai	RRIV4	2015	MK896371
28	CoryDN10	Long Thành, Đồng Nai	RRIV4	2015	MK896372
29	CoryDN12	Long Khánh, Đồng Nai	RRIV4	2015	MK896373
30	CoryDN13	Long Khánh, Đồng Nai	RRIV4	2015	MK896374
31	CoryDN15	Cẩm Mỹ, Đồng Nai	RRIV4	2015	MK896375
32	CoryDN21	Cẩm Mỹ, Đồng Nai	RRIV4	2016	MK896376
33	CoryDN23	Cẩm Mỹ, Đồng Nai	RRIV4	2016	MK896377
34	CoryDN24	Cẩm Mỹ, Đồng Nai	RRIV4	2016	MK896378
35	CoryDN25	Cẩm Mỹ, Đồng Nai	RRIV4	2016	MK896379
36	CoryDN27	Định Quán, Đồng Nai	RRIV4	2016	MK896380
37	CoryDN30	Long Khánh, Đồng Nai	RRIV4	2016	MK896381
38	CoryDN32	Long Thành, Đồng Nai	RRIV3	2016	MK896382
39	CoryDN39	Long Thành, Đồng Nai	RRIV4	2017	MK896383
40	CoryPK01	Chư Prông, Gia Lai	LH 88/732	2009	MK896384
41	CoryGL01	Krongpa, Gia Lai	RRIV106	2017	MK896385
42	CoryGL02	Pleiku, Gia Lai	RRIC110	2017	MK896386
43	CoryGL03	Pleiku, Gia Lai	RRIC110	2017	MK896387
44	CoryKT01	Sa Thầy, Kon Tum	RRIV4	2010	MK896388
45	CoryKT02	Sa Thầy, Kon Tum	PB235	2010	MK896389
46	CoryKT03	Sa thầy, Kon Tum	RRIV4	2010	MK896390
47	CoryKT04	Sa thầy, Kon Tum	PB260	2010	MK896391
48	CoryBT03	Đức Linh, Bình Thuận	RRIV3	2014	MK896392
49	CoryBT06	Tánh Linh, Bình Thuận	RRIV4	2014	MK896393
50	CoryBT08	Đức Linh, Bình Thuận	RRIV4	2015	MK896394

**Bảng 2.1(tt).** Danh sách 76 MPL nấm *C. cassiicola* sử dụng trong nghiên cứu

<b>STT</b>	<b>Tên mẫu</b>	<b>Địa điểm phân lập (huyện, tỉnh)</b>	<b>Ký chủ (DVT)</b>	<b>Năm phân lập</b>	<b>Mã số đăng ký</b>
51	CoryBT09	Tánh Linh, Bình Thuận	RRIV4	2015	MK896395
52	CoryBT13	Đức Linh, Bình Thuận	RRIV3	2017	MK896396
53	CoryBT17	Tánh Linh, Bình Thuận	RRIV4	2017	MK896397
54	CoryBT18	Tánh Linh, Bình Thuận	RRIV4	2017	MK896398
55	CoryQN01	Núi Thành, Quảng Nam	PB260	2009	MK896399
56	CoryQN02	Núi Thành, Quảng Nam	RRIV4	2009	MK896400
57	CoryQN03	Nông Sơn, Quảng Nam	RRIV4	2017	MK896401
58	CoryQN04	Nông Sơn, Quảng Nam	RRIV4	2017	MK896402
59	CoryQN05	Nông Sơn, Quảng Nam	RRIV4	2017	MK896403
60	CoryQN06	Núi Thành, Quảng Nam	RRIV4	2017	MK896404
61	CoryQN07	Núi Thành, Quảng Nam	RRIV4	2017	MK896405
62	CoryQN08	Núi Thành, Quảng Nam	RRIV4	2017	MK896406
63	CoryQN13	Núi Thành, Quảng Nam	RRIV4	2017	MK896407
64	CoryQN14	Núi Thành, Quảng Nam	RRIV4	2017	MK896408
65	CoryQT01	Gio Linh, Quảng Trị	RRIV 124	2017	MK896409
66	CoryQT02	Gio Linh, Quảng Trị	RRIV 124	2017	MK896410
67	CoryQT03	Gio Linh, Quảng Trị	RRIV 124	2017	MK896411
68	CoryLC01	Sìn Hồ, Lai Châu	IAN 873	2017	MK896412
69	CoryLC02	Sìn Hồ, Lai Châu	IAN 873	2017	MK896413
70	CoryLC03	Sìn Hồ, Lai Châu	IAN 873	2017	MK896414
71	CorySL01	Châu Thuận, Sơn La	RRIV 4	2018	MK896415
72	CorySL02	Châu Thuận, Sơn La	RRIV 4	2018	MK896416
73	CorySL03	Châu Thuận, Sơn La	RRIV 4	2018	MK896417
74	CoryLCA1	Bát Xát, Lào Cai	VNg 774	2018	MK896418
75	CoryLCA2	Bát Xát, Lào Cai	VNg 774	2018	MK896419
76	CoryLCA3	Bát Xát, Lào Cai	VNg 774	2018	MK896420

\*Tất cả 76 MPL nấm thuộc tác quyền của tác giả luận án.

**Bảng 2.2.** Danh sách 30 cặp primer thực hiện phản ứng PCR-SRAP

STT	Tên primer	Trình tự (5' – 3')	Nhiệt độ bắt cặp
1	Me1	TGAGTCCAAACCGGATA	35 <sup>0</sup> C
	Em1	GACTGCGTACGAATTAAT	
2	Me1	TGAGTCCAAACCGGATA	35 <sup>0</sup> C
	Em2	GACTGCGTACGAATTTGC	
3	Me1	TGAGTCCAAACCGGATA	35 <sup>0</sup> C
	Em3	GACTGCGTACGAATTGAC	
4	Me1	TGAGTCCAAACCGGATA	35 <sup>0</sup> C
	Em4	GACTGCGTACGAATTTGA	
5	Me1	TGAGTCCAAACCGGATA	35 <sup>0</sup> C
	Em5	GACTGCGTACGAATTAAC	
6	Me1	TGAGTCCAAACCGGATA	35 <sup>0</sup> C
	Em6	GACTGCGTACGAATTGCA	
7	Me2	TGAGTCCAAACCGGAGC	35 <sup>0</sup> C
	Em1	GACTGCGTACGAATTAAT	
8	Me2	TGAGTCCAAACCGGAGC	35 <sup>0</sup> C
	Em2	GACTGCGTACGAATTTGC	
9	Me2	TGAGTCCAAACCGGAGC	35 <sup>0</sup> C
	Em3	GACTGCGTACGAATTGAC	
10	Me2	TGAGTCCAAACCGGAGC	35 <sup>0</sup> C
	Em4	GACTGCGTACGAATTTGA	
11	Me2	TGAGTCCAAACCGGAGC	35 <sup>0</sup> C
	Em5	GACTGCGTACGAATTAAC	
12	Me2	TGAGTCCAAACCGGAGC	35 <sup>0</sup> C
	Em6	GACTGCGTACGAATTGCA	
13	Me3	TGAGTCCAAACCGGAAT	35 <sup>0</sup> C
	Em1	GACTGCGTACGAATTAAT	
14	Me3	TGAGTCCAAACCGGAAT	35 <sup>0</sup> C
	Em2	GACTGCGTACGAATTTGC	
15	Me3	TGAGTCCAAACCGGAAT	35 <sup>0</sup> C
	Em3	GACTGCGTACGAATTGAC	



**Bảng 2.2(tt).** Danh sách 30 cặp primer thực hiện phản ứng PCR-SRAP

STT	Tên primer	Trình tự (5' – 3')	Nhiệt độ bắt cặp
16	Me3	TGAGTCCAAACCGGAAT	35 <sup>0</sup> C
	Em4	GACTGCGTACGAATTTGA	
17	Me3	TGAGTCCAAACCGGAAT	35 <sup>0</sup> C
	Em5	GACTGCGTACGAATTAAC	
18	Me3	TGAGTCCAAACCGGAAT	35 <sup>0</sup> C
	Em6	GACTGCGTACGAATTGCA	
19	Me4	TGAGTCCAAACCGGACC	35 <sup>0</sup> C
	Em1	GACTGCGTACGAATTAAT	
20	Me4	TGAGTCCAAACCGGACC	35 <sup>0</sup> C
	Em2	GACTGCGTACGAATTTGC	
21	Me4	TGAGTCCAAACCGGACC	35 <sup>0</sup> C
	Em3	GACTGCGTACGAATTGAC	
22	Me4	TGAGTCCAAACCGGACC	35 <sup>0</sup> C
	Em4	GACTGCGTACGAATTTGA	
23	Me4	TGAGTCCAAACCGGACC	35 <sup>0</sup> C
	Em5	GACTGCGTACGAATTAAC	
24	Me4	TGAGTCCAAACCGGACC	35 <sup>0</sup> C
	Em6	GACTGCGTACGAATTGCA	
25	Me5	TGAGTCCAAACCGGAAG	35 <sup>0</sup> C
	Em1	GACTGCGTACGAATTAAT	
26	Me5	TGAGTCCAAACCGGAAG	35 <sup>0</sup> C
	Em2	GACTGCGTACGAATTTGC	
27	Me5	TGAGTCCAAACCGGAAG	35 <sup>0</sup> C
	Em3	GACTGCGTACGAATTGAC	
28	Me5	TGAGTCCAAACCGGAAG	35 <sup>0</sup> C
	Em4	GACTGCGTACGAATTTGA	
29	Me5	TGAGTCCAAACCGGAAG	35 <sup>0</sup> C
	Em5	GACTGCGTACGAATTAAC	
30	Me5	TGAGTCCAAACCGGAAG	35 <sup>0</sup> C
	Em6	GACTGCGTACGAATTGCA	

\* Trình tự các primer được thiết kế bởi tác giả Li và Quiros, 2001

**Bảng 2.3.** Danh sách 07 cặp primer khuếch đại gen *Cas*

Cặp mồi	Tên primer	Trình tự (5' – 3')	Gen <i>Cas</i> mục tiêu	Kích thước sản phẩm (bp)
1	F1 <i>Cas</i> U1-2-6 R1 <i>Cas</i> U1-2-6	CTCTGCTTTTGTAGCAGCCG GTGTGGTGTATATGTAGCGC	<i>Cas1</i> , <i>Cas2</i> và <i>Cas6</i>	457 - 461
2	<i>Cas</i> F17 <i>Cas</i> R24	GGATTTGCCTGAGATCCTA CAAACAATGCTAACCAAACAAAC	<i>Cas2</i>	759
3	<i>Cas</i> F18 <i>Cas</i> R27	CCCAAGATACATGTTTTGADTGT CCACACAAAGCAAGATACAGAATGAGC	<i>Cas1</i>	700
4	<i>Cas</i> F16 <i>Cas</i> R25	GCTTGATTTGCCTGTGAGATACT AAAACGATGCTAAACAAAAGGA	<i>Cas6</i>	764
5	F1 <i>Cas</i> U3-4-5 R1 <i>Cas</i> U3-4-5	TCCCTATCCTCATCTCGGC GTCCAGAATACTTGGTAGC	<i>Cas3</i> , <i>Cas4</i> và <i>Cas5</i>	418 - 419
6	<i>Cas</i> F20 <i>Cas</i> R28	GTCGGCTAACTTGGGAAAACTCT GCAGGAAGCAAACACAGAACAAAG	<i>Cas3</i> , <i>Cas4</i>	774
7	<i>Cas</i> F19 <i>Cas</i> R26	CGGGGAGGTATCAGGTGTGAGATA CAGAACAAGCCAAAAGAGAACTAC	<i>Cas5</i>	706

\* Trình tự các primer được thiết kế bởi tác giả Déon và ctv (2012a; 2012b; 2014). Riêng cặp primer F1*Cas*U1-2-6 + R1*Cas*U1-2-6; F1*Cas*U3-4-5 + R1*Cas*U3-4-5 được cung cấp thông tin bởi GS. Valerie Pujade-Renaud, Đại học Blaise Pascal (Pháp).

F (Forward primer); R (Reverse primer).

## 2.4. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.4.1. Thu thập mẫu bệnh và phân lập nấm

Mẫu bệnh có vết bệnh đặc trưng được thu thập từ nhiều DVT cao su tại tỉnh Bình Dương, Bình Phước, Tây Ninh, Đồng Nai (Đông Nam Bộ), Gia Lai, Kon Tum (Tây Nguyên), Bình Thuận, Quảng Nam, Quảng Trị (Miền Trung), Lai Châu, Sơn La, Lào Cai (Miền Núi Phía Bắc). Mẫu bệnh được gói bằng giấy sạch và cho vào trong túi nylon, ghi chép chi tiết tên ký chủ (DVT cao su), ngày thu thập mẫu, địa điểm và thông tin về bất kỳ biện pháp phòng trừ nấm nào (nếu có).

Phân lập nấm trên môi trường nhân tạo: các bộ phận nhiễm bệnh của ký chủ như lá, chồi, cuống lá được cắt thành những mảnh nhỏ tại vị trí tiếp giáp giữa mô bệnh và mô khỏe, rửa 3 lần bằng nước cất vô trùng, ngâm vào dung dịch khử trùng ethanol 70% trong 1 phút, rửa lại 3 lần bằng nước cất vô trùng. Đặt vào đĩa petri chứa 25 ml môi trường MEA nuôi cấy ở nhiệt độ 28°C trong 5 ngày.

Phân lập đơn bào tử: dung dịch chứa bào tử thu được từ tản nấm 10 ngày sau cấy, hút một lượng 0,25 ml dung dịch chứa bào tử (nồng độ 100 bào tử/ml) trải đều lên bề mặt lớp agar nồng độ 1,5% được trải trên tấm lame kính vô trùng, đặt lame vào đĩa petri, nuôi cấy ở nhiệt độ 27°C ± 2°C trong 10 – 12 giờ, đặt tấm lame lên kính hiển vi ở vật kính 10X. Phân lập đơn bào tử bằng cách dùng kim mũi mác cắt lớp agar chứa 1 bào tử khỏe và chuyển bào tử này vào đĩa petri chứa 25 ml môi trường PSA nuôi cấy ở điều kiện phòng thí nghiệm, cấy chuyển nguồn nấm thuần chủng phục vụ cho nghiên cứu.

Mẫu nấm được đặt tên như sau: tên nấm (Cory) + địa điểm thu mẫu (viết tắt bằng chữ cái đầu) + số thứ tự mẫu nấm thu được tại đại điểm thu mẫu. Ví dụ CoryDN39: MPL nấm *C. cassiicola* thứ 39 thu được tại Đồng Nai; CoryBT17: MPL nấm *C. cassiicola* thứ 17 thu được tại Bình Thuận.

### 2.4.2. Khảo sát đặc điểm hình thái nấm *Corynespora cassiicola*

Thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên, 76 nghiệm thức tương ứng với 76 MPL, các MPL được cấy trên môi trường PSA, mỗi MPL cấy 3 đĩa petri ứng với 3 lần lặp lại. Môi trường PSA sau khi hấp tiệt trùng được cho vào

đĩa petri (25 mL/đĩa) để nguội rồi tiến hành cấy mẫu nấm có đường kính 0,8 cm vào trung tâm đĩa, để ở nhiệt độ  $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  trong 7 ngày, thời gian chiếu sáng 12 giờ/ngày.

Phương pháp và chỉ tiêu theo dõi:

(1) Hình thái và kết cấu của tản nấm: quan sát và mô tả màu sắc và kết cấu tản nấm ở thời điểm sau 7 ngày cấy nấm;

(2) Đường kính tản nấm (cm): đo ở thời điểm sau 7 ngày cấy nấm. Đường kính trung bình được tính bằng công thức:  $D = \frac{d1 + d2}{2}$

Trong đó:

D: là đường kính trung bình của tản nấm.

d1, d2: là hai đường chéo vuông góc khi đo đường kính tản nấm;

(3) Kích thước bào tử nấm: đo chiều dài và chiều rộng bào tử ở thời điểm 7 ngày cấy nấm, mỗi MPL đo 50 bào tử. Các phép đo được tiến hành trên kính hiển vi quang học độ phóng đại 400 lần;

(4) Số vách ngăn giả ở mỗi bào tử (pseudosepta conidia): mỗi MPL đếm 50 bào tử.

Số liệu được lưu trữ, tổng hợp bằng phần mềm Excel và được xử lý bằng phần mềm SAS 8.1 (Statistical analysis system, USA, 1999) qua các thông số: trung bình, hệ số biến thiên (CV%), khoảng biến thiên, phân tích phương sai (ANOVA), các trắc nghiệm Duncan, LSD.

### **2.4.3. Phân tích đa dạng di truyền nấm *Corynespora cassiicola***

#### **2.4.3.1. Ly trích DNA nấm *Corynespora cassiicola***

MPL nấm được nghiền trong nitor lỏng bằng chày và cối sứ, sau đó ly trích DNA bằng Wizard Genomic DNA Purification Kit theo quy trình khuyến cáo bởi nhà cung cấp bộ kit có cải tiến một số bước cho phù hợp (Phụ lục 2). Sau khi ly trích hoàn tất, mẫu DNA được trữ ở tủ mát  $4^{\circ}\text{C}$ . Các DNA mẫu sau khi ly trích sẽ được điện di trên gel agarose 1% để định tính DNA và đo định lượng DNA bằng máy chuyên dụng (P330 Implen, Đức).

### 2.4.3.2. Khuếch đại vùng rDNA-ITS bằng kỹ thuật PCR

Phản ứng khuếch đại vùng rDNA-ITS sử dụng cặp primer ITS1 (forward primer) (5'\_TCCGTAGGTGAACCTGCGC\_3') và ITS4 (reverse primer) (5'\_GCATATCAATAAGCGGAGGA\_3') được mô tả bởi White và ctv (1990). Thể tích cho mỗi phản ứng PCR là 25  $\mu$ L, thành phần hóa chất được trình bày tại Bảng 2.4. Phản ứng khuếch đại được thực hiện trong máy PCR (MJ Research PTC-100, Mỹ), chu trình phản ứng được trình bày tại Bảng 2.5.

**Bảng 2.4.** Thành phần hóa chất phản ứng PCR khuếch đại rDNA-ITS

Thành phần hóa chất	Thể tích ( $\mu$ l) cho 1 phản ứng	Nồng độ dung dịch phản ứng
GoTag Green Master Mix 2X	12,5	1X
Primer ITS1	0,25	1 $\mu$ M
Primer ITS4	0,25	1 $\mu$ M
DNA template (20 ng/ $\mu$ l)	2,5	2 ng/ $\mu$ l
Nuclease-Free Water	9,5	

**Bảng 2.5.** Chu trình phản ứng PCR khuếch đại rDNA-ITS

Giai đoạn	Nhiệt độ ( $^{\circ}$ C)	Thời gian	Chu kỳ
Biến tính ban đầu	94	2 phút	1
Biến tính	94	20 giây	
Bắt cặp	53	30 giây	35
Kéo dài	72	30 giây	
Kéo dài cuối cùng	72	5 phút	1

\* White và ctv, 1990

Kiểm tra đoạn DNA được khuếch đại bằng phương pháp điện di trên gel agarose. Hút 2  $\mu$ L sản phẩm PCR, trộn đều với 1  $\mu$ L chất nhuộm DNA Gelred 6X, điện di trên gel agarose 1% pha bằng TBE buffer 1X ở 70V trong 45 phút ở nhiệt độ

28°C – 30°C. Gel được quan sát dưới đèn UV và chụp ảnh bằng máy chuyên dụng (GelDoc - It - Imaging System UVP). Kích thước của các đoạn DNA khuếch đại được so sánh với thang DNA chuẩn 100 bp.

Các sản phẩm PCR được giải trình tự bằng dịch vụ thương mại (thực hiện bởi First BASE Laboratories, Singapore). Kết quả giải trình tự của mỗi MPL được kiểm tra và hiệu chỉnh bằng phần mềm BioEdit phiên bản 7.2.5 (Hall, 2013) sao cho các trình tự thu được từ primer ITS4 sẽ được chuyển thành dạng mạch bổ sung và được xếp thẳng hàng với các trình tự thu được từ primer ITS1 để kiểm tra lại. So sánh trình tự sản phẩm PCR các mẫu nấm bằng công cụ Clustal W Multiple Alignment (Thompson và ctv, 1994) trong phần mềm BioEdit để tìm sự tương đồng giữa chúng. Xây dựng cây phân nhóm di truyền bằng phần mềm MEGA6.

#### **2.4.3.3. Khuếch đại vùng ORFs bằng phản ứng PCR-SRAP**

Phản ứng PCR khuếch đại vùng ORFs của các mẫu nấm được thực hiện với 30 cặp primer được mô tả bởi Li và Quiros (2001), trình tự các cặp primer được trình bày tại Bảng 2.2. Thể tích mỗi phản ứng PCR-SRAP khuếch đại vùng ORFs là 25  $\mu$ L, thành phần hóa chất được trình bày tại Bảng 2.6. Phản ứng khuếch đại được thực hiện trong máy PCR (MJ Research PTC-100, Mỹ), chu trình phản ứng được trình bày tại Bảng 2.7.

**Bảng 2.6.** Thành phần hóa chất phản ứng PCR-SRAP

<b>Thành phần hóa chất</b>	<b>Thể tích (<math>\mu</math>l)</b> <b>cho 1 phản ứng</b>	<b>Nồng độ dung dịch</b> <b>phản ứng</b>
GoTag Green Master Mix 2X	12,5	1X
Primer xuôi (Me)	0,25	1 $\mu$ M
Primer ngược (Em)	0,25	1 $\mu$ M
DNA template (20 ng/ $\mu$ l)	2,5	2 ng/ $\mu$ l
Nuclease-Free Water	9,5	

**Bảng 2.7.** Chu trình nhiệt phản ứng PCR-SRAP

<b>Giai đoạn</b>	<b>Nhiệt độ (°C)</b>	<b>Thời gian</b>	<b>Chu kỳ</b>
Biến tính ban đầu	94	5 phút	1
Biến tính	94	1 phút	
Bắt cặp	35	1 phút	5
Kéo dài	72	1 phút	
Biến tính	94	1 phút	
Bắt cặp	50	1 phút	35
Kéo dài	72	1 phút	
Kéo dài cuối cùng	72	5 phút	1

\* Li và ctv, 2014

Sản phẩm sau khuếch đại được phân tách theo kích thước bằng điện di trên gel agarose 1% pha bằng 1X TBE buffer, 70V trong 2 giờ ở nhiệt độ 28°C – 30°C. Các miếng gel được soi dưới tia UV và chụp ảnh bằng máy chuyên dụng (GelDoc - It - Imaging System UVP). Kích thước của các đoạn DNA khuếch đại được ước lượng dựa trên sự so sánh kích thước với thang DNA chuẩn 100 bp. Các phản ứng PCR-SRAP và phân tích kích thước các đoạn DNA trên gel agarose 1% được thực hiện với 2 lần lặp lại.

Phương pháp phân tích kết quả: Các đoạn DNA đã khuếch đại ổn định được ghi là (1) nếu có băng DNA và (0) nếu không có mặt của băng DNA so sánh trong cùng vị trí. Ma trận nhị phân được thiết lập để phân tích các chỉ số tương đồng di truyền. Các phân nhóm có được từ ma trận tương đồng sử dụng phương pháp nhóm cặp ý nghĩa số học (UPGMA, Unweighted Paired Group Method with Arithmetic mean) với bootstrap 1.000 lần lặp lại bằng phần mềm FreeTree 0.9.1.50 (Pavliček và ctv, 1999). Tạo cây phân nhóm di truyền bằng phần mềm TreeView phiên bản 1.6.6 (Page, 1996).

#### 2.4.4. Phản ứng PCR nhận diện gen *Cas*

Phản ứng PCR nhận diện gen *Cas* được thực hiện với 7 cặp primer đặc hiệu cho các nhóm gen *Cas* được mô tả bởi Déon và ctv (2012a; 2012b và 2014), trình tự các cặp primer được trình bày tại Bảng 2.3. Thể tích cho mỗi phản ứng PCR là 25  $\mu$ L, thành phần hóa chất được trình bày tại Bảng 2.8. Phản ứng khuếch đại được thực hiện trong máy PCR (MJ Research PTC-100, Mỹ), chu trình phản ứng được trình bày tại Bảng 2.9.

**Bảng 2.8.** Thành phần hóa chất phản ứng PCR khuếch đại gen *Cas*

Thành phần hóa chất	Thể tích ( $\mu$ l) cho 1 phản ứng	Nồng độ dung dịch phản ứng
GoTag Green Master Mix 2X	12,5	1X
Mồi xuôi (F)	0,25	1 $\mu$ M
Mồi ngược (R)	0,25	1 $\mu$ M
DNA template (20 ng/ $\mu$ l)	2,5	2 ng/ $\mu$ l
Nuclease-Free Water	9,5	

**Bảng 2.9.** Chu trình nhiệt phản ứng PCR khuếch đại gen *Cas*

Giai đoạn	Nhiệt độ ( $^{\circ}$ C)	Thời gian	Chu kỳ
Biến tính ban đầu	94	2 phút	1
Biến tính	94	30 giây	
Bắt cặp	56	30 giây	30
Kéo dài	72	1 phút	
Kéo dài cuối cùng	72	10 phút	1

\* Liu và ctv, 2015

Kiểm tra đoạn DNA được khuếch đại bằng phương pháp điện di trên gel. Hút 2  $\mu$ L sản phẩm PCR, trộn đều với 1  $\mu$ L chất nhuộm DNA Gelred 6X, điện di trên gel 1% pha bằng TBE buffer 1X ở 70V trong 45 phút ở nhiệt độ 28 $^{\circ}$ C – 30 $^{\circ}$ C. Gel được quan sát dưới đèn UV và chụp ảnh bằng máy chuyên dụng (GelDoc - It -



Imaging System UVP). Kích thước của các đoạn DNA khuếch đại được so sánh với thang DNA chuẩn 100 bp.

Các sản phẩm PCR được giải trình tự bằng dịch vụ thương mại (thực hiện bởi First BASE Laboratories, Singapore). Kết quả giải trình tự của mỗi MPL được kiểm tra và hiệu chỉnh bằng phần mềm BioEdit phiên bản 7.2.5 (Hall, 2013) sao cho các trình tự thu được từ reverse primer (mỗi xuôi) sẽ được chuyển thành dạng mạch bổ sung và được xếp thẳng hàng với các trình tự thu được từ forward primer (mỗi ngược) để kiểm tra lại. So sánh trình tự sản phẩm PCR các mẫu nấm bằng công cụ Clustal W Multiple Alignment (Thompson và ctv, 1994) trong phần mềm BioEdit để tìm sự tương đồng giữa chúng.

#### **2.4.5. Khảo sát tính gây bệnh của 76 MPL nấm *Corynespora cassiicola* trên DVT cao su RRIV 4 (mẫn cảm bệnh) và PB 260 (chống chịu bệnh)**

Gồm 2 thí nghiệm được thực hiện trên 2 DVT cao su RRIV 4 và PB 260 (mỗi DVT tương ứng là 1 thí nghiệm), 76 MPL tương ứng 76 nghiệm thức trong mỗi thí nghiệm. Các thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên với 3 lần lặp lại, 3 lá được đặt trong hộp nhựa/lần lặp lại. Lá cao su không có triệu chứng nhiễm bệnh, được rửa với thuốc chống mốc sodium benzoate 0,2% trong 30 giây, rửa lại 3 lần bằng nước cất vô trùng, dùng giấy vô trùng thấm ráo nước trên lá, sau đó đặt lá theo chiều úp vào hộp nhựa có chứa giấy thấm nước giữ ẩm được ngăn cách bằng lưới thép để lá không tiếp xúc trực tiếp với nước. Lây bệnh trên lá bằng cách nhỏ huyền phù bào tử nấm trên mặt dưới của lá (không tạo vết thương), lượng dung dịch chứa bào tử là 10  $\mu$ l/giọt với nồng độ bào tử là 2.000 bào tử/ml tại 8 điểm/lá. Tiếp theo, các hộp nhựa được đặt trong phòng ở nhiệt độ 25°C dưới ánh sáng huỳnh quang 12 giờ/ngày trong 6 ngày.

Sự phát triển của vết bệnh được đánh giá tại thời điểm 7 ngày sau lây bệnh bằng phương pháp đánh giá của Ismail và Jeyanayagi (1999) theo mô tả của Nguyen Anh Nghia và ctv (2008) và có cải tiến (Bảng 2.10; Hình 2.1).

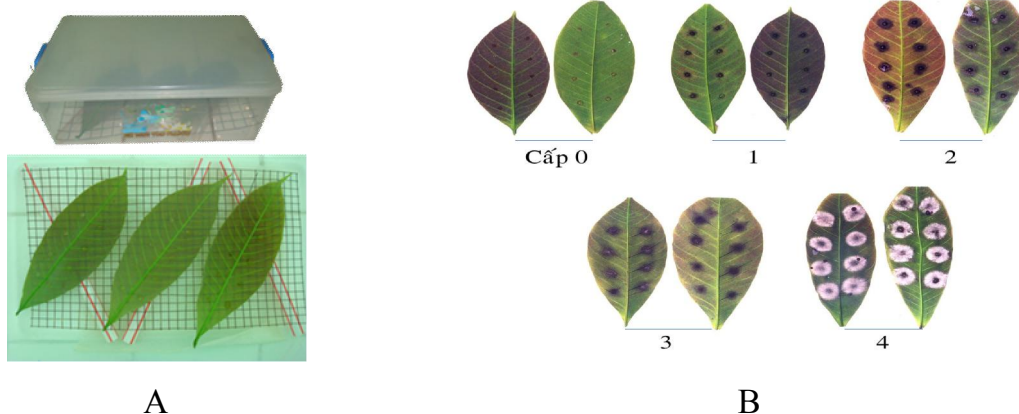
Tính chỉ số bệnh (CSB) của mỗi MPL nấm trên các DVT cao su. Phân hạng mức gây bệnh của các MPL nấm trên các DVT dựa theo CSB (%) được mô tả tại Bảng 2.11.

$$CSB (\%) = \sum(a \times b) \times 100 / (n \times t)$$

Trong đó: a: số vết chủng bị nhiễm bệnh ở mỗi cấp, b: trị số cấp bệnh của mỗi cấp tương ứng, n: tổng số điểm quan trắc, t: trị số cấp bệnh cao nhất trong bảng phân cấp.

**Bảng 2.10.** Đánh giá mức gây bệnh của nấm *C. cassiicola* trên phiến lá cao su bằng phương pháp lấy bệnh trên lá cắt rời

Cấp bệnh	Mô tả triệu chứng và kích thước vết bệnh
0	Không có triệu chứng bệnh trên lá.
1	Vết bệnh nhỏ, kích thước vết bệnh < 50% diện tích giọt huyền phù nấm.
2	Vết bệnh lớn hơn có xu hướng lan rộng gần đến gân lá, kích thước vết bệnh 50% – 100% diện tích giọt huyền phù nấm.
3	Vết bệnh lan đến gân lá, kích thước vết bệnh 100 – 200% diện tích giọt huyền phù nấm.
4	Vết bệnh lớn, xuất hiện sợi nấm, kích thước vết bệnh > 200% diện tích giọt huyền phù nấm.



**Hình 2.1.** Minh họa phương pháp lây bệnh nhân tạo trên lá cắt rời. A: Hộp đựng lá và chủng bệnh trên lá cao su; B: Phân cấp mức xâm nhiễm của nấm *C. cassiicola* trên mẫu lá cắt rời.

**Bảng 2.11.** Phân hạng mức gây bệnh của nấm *C. cassiicola* trên lá cao su cắt rời dựa trên CSB

Chỉ số bệnh (%)	Mức gây bệnh	Phản ứng của ký chủ
0	Không gây bệnh	Không nhiễm bệnh (kháng bệnh)
Từ trên 0 đến 25	Gây bệnh nhẹ	Nhiễm bệnh nhẹ (chống chịu bệnh)
Từ trên 25 đến 50	Gây bệnh trung bình	Nhiễm bệnh trung bình
Từ trên 50 đến 75	Gây bệnh nặng	Nhiễm bệnh nặng (mẫn cảm bệnh)
Từ trên 75 đến 100	Gây bệnh rất nặng	Nhiễm bệnh rất nặng (rất mẫn cảm)

#### 2.4.6. Đánh giá tính gây bệnh của 6 MPL *Corynespora cassiicola* đại diện cho các phân nhóm di truyền và vùng địa lý khác nhau trên 12 DVT cao su

##### 2.4.6.1. Điều kiện phòng thí nghiệm

Từ các kết quả nghiên cứu về đa dạng di truyền của 76 MPL nấm này bằng các chỉ thị phân tử giải trình tự vùng rDNA-ITS, SRAP (Sequence-Related Amplified Polymorphism) và PCR nhận diện gen mã hóa độc tố cassiicolin (gen *Cas*) cùng với kết quả thí nghiệm khảo sát tính gây bệnh của 76 MPL nấm *C. cassiicola* trên DVT cao su RRIV 4 và PB 260. Sáu (6) MPL nấm gồm: CoryLK02, CoryDP03, CoryDN39, CoryKT04, CoryBT17 và CorySL02 đã được chọn làm đại diện để chủng bệnh trên lá cắt rời của 12 DVT cao su. Cơ sở chọn MPL đại diện theo các tiêu chí: (1) các MPL này thuộc các phân nhóm di truyền và phân vùng địa lý khác nhau; (2) đồng thời thuộc nhóm gây bệnh mạnh (so với những MPL khác trong cùng nhóm di truyền) trên 2 DVT RRIV 4 và PB 260. Cụ thể như sau: (1) Chọn mẫu dựa trên phân nhóm theo trình tự vùng rDNA-ITS: CoryLK02, CoryDP03 (nhóm 1), CoryDN39, CoryKT04, CorySL02 (nhóm 2), CoryBT17 (nhóm 3); (2) Chọn mẫu dựa trên phân nhóm theo SRAP: CoryLK02, CoryDP03, CoryKT04 (nhóm 1A), CoryBT17 (nhóm 1B), CorySL02 (nhóm 2A), CoryDN39 (nhóm 2B); (3) Chọn mẫu dựa trên phân nhóm theo gen *Cas*: CoryLK02, CoryDP03, CoryKT04 (nhóm *Cas0*), CoryDN39, CoryBT17, CorySL02 (nhóm *Cas2*); (4) Chọn mẫu dựa trên phân nhóm

theo vùng địa lý: CoryLK02, CoryDP03, CoryDN39 (Đông Nam Bộ), CoryKT04 (Tây Nguyên), CoryBT17 (Miền Trung), CorySL02 (Miền Núi Phía Bắc). Danh sách 6 mẫu nấm đại diện được trình bày tại Bảng 2.12.

Thí nghiệm được bố trí theo kiểu khối đầy đủ ngẫu nhiên, hai yếu tố. Yếu tố A: 6 MPL nấm (CoryLK02, CoryDP03, CoryDN39, CoryKT04, CoryBT17, CorySL02); Yếu tố B: 12 DVT cao su (RRIV 1, RRIV 106, RRIV 109, RRIV 114, RRIV 124, RRIV 206, RRIV 209, RRIV 230, PB 255, PB 312, PB 260, RRIV 4). Thí nghiệm gồm 72 nghiệm thức, 3 lần lặp lại, 3 lá cao su/lần lặp lại (đặt trong hộp plastic).

Sự phát triển của vết bệnh được đánh giá tại thời điểm 7 ngày sau lây bệnh bằng phương pháp đánh giá của Ismail và Jeyanayagi (1999) theo mô tả của Nguyen Anh Nghia và ctv (2008) và có cải tiến. Tính chỉ số bệnh (CSB) của mỗi MPL nấm trên các DVT cao su. Phân hạng mức gây bệnh của các MPL nấm trên lá các DVT dựa theo CSB (%) được mô tả tại Bảng 2.11. Số liệu được chuyển đổi sang  $\sqrt{x+0,5}$  hoặc góc  $\arcsin \sqrt{x}$  và phân tích ANOVA bằng phần mềm SAS 8.1.

**Bảng 2.12.** Danh sách 6 MPL nắm đại diện cho các phân nhóm di truyền và vùng địa lý

MPL	Phân nhóm di truyền theo các chỉ thị phân tử								Phân nhóm theo vùng địa lý	
	rDNA-ITS			SRAP				Gen <i>Cas</i>		
	Nhóm 1	Nhóm 2	Nhóm 3	Nhóm 1A	Nhóm 1B	Nhóm 2A	Nhóm 2B	<i>Cas0</i>		<i>Cas2</i>
CoryLK02	+			+				+		Đông Nam Bộ
CoryDP03	+			+				+		Đông Nam Bộ
CoryDN39		+					+		+	Đông Nam Bộ
CoryKT04		+		+				+		Tây Nguyên
CoryBT17			+		+				+	Miền Trung
CorySL02		+				+			+	Miền Núi Phía Bắc

#### 2.4.6.2. Trong điều kiện nhà lưới

Thí nghiệm được bố trí theo kiểu khối đầy đủ ngẫu nhiên, hai yếu tố. Yếu tố A: 6 MPL nấm (CoryLK02, CoryDP03, CoryDN39, CoryKT04, CoryBT17, CorySL02); Yếu tố B: 12 DVT cao su (RRIV 1, RRIV 106, RRIV 109, RRIV 114, RRIV 124, RRIV 206, RRIV 209, RRIV 230, PB 255, PB 312, PB 260, RRIV 4). Thí nghiệm gồm 72 nghiệm thức, 3 lần lặp lại, 6 cây/nghiệm thức (2 cây/lần lặp lại). Cây cao su 4 – 5 tầng lá được cắt phục hồi để có tầng lá non mới giai đoạn 12 – 15 ngày tuổi, được lây bệnh nhân tạo bằng cách phun dung dịch chứa bào tử (nồng độ 4.000 bào tử/mL) vào thời điểm chiều tối. Phun ướt đẫm mặt trên và mặt dưới lá với lượng dung dịch khoảng 10 mL/chồi. Sau khi lây nhiễm 12 giờ (qua đêm), hệ thống tưới phun sương được sử dụng để điều chỉnh nhiệt độ 26°C – 30°C, ẩm độ không khí duy trì ở mức > 75% tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình ủ bệnh và phát triển bệnh.

Mức xâm nhiễm bệnh được đánh giá theo cấp bệnh trên mỗi mẫu lá, gồm 6 cấp từ 0 – 5 theo Quy trình Kỹ thuật cây Cao su của Tập Đoàn Công nghiệp Cao su Việt Nam, 2012 (Bảng 2.13).

**Bảng 2.13.** Đánh giá mức gây bệnh của nấm *C. cassiicola* trên phiến lá cao su bằng phương pháp lây bệnh trong nhà lưới

Cấp bệnh	Mô tả triệu chứng và kích thước vết bệnh
0	Không có bất kỳ triệu chứng bệnh nào trên lá.
1	Một vài vết bệnh hoặc đốm nhỏ nhìn kỹ mới thấy.
2	Các vết bệnh chiếm đến 1/8 diện tích mẫu lá.
3	Các vết bệnh chiếm trên 1/8 đến 1/4 diện tích mẫu lá.
4	Các vết bệnh chiếm trên 1/4 đến 1/2 diện tích mẫu lá.
5	Các vết bệnh chiếm trên 1/2 diện tích mẫu lá hoặc lá rụng.

Tính chỉ số bệnh (%) của mỗi MPL nấm trên các DVT cao su.

$$\text{CSB (\%)} = \frac{\sum(a \times b)}{n \times t} \times 100$$

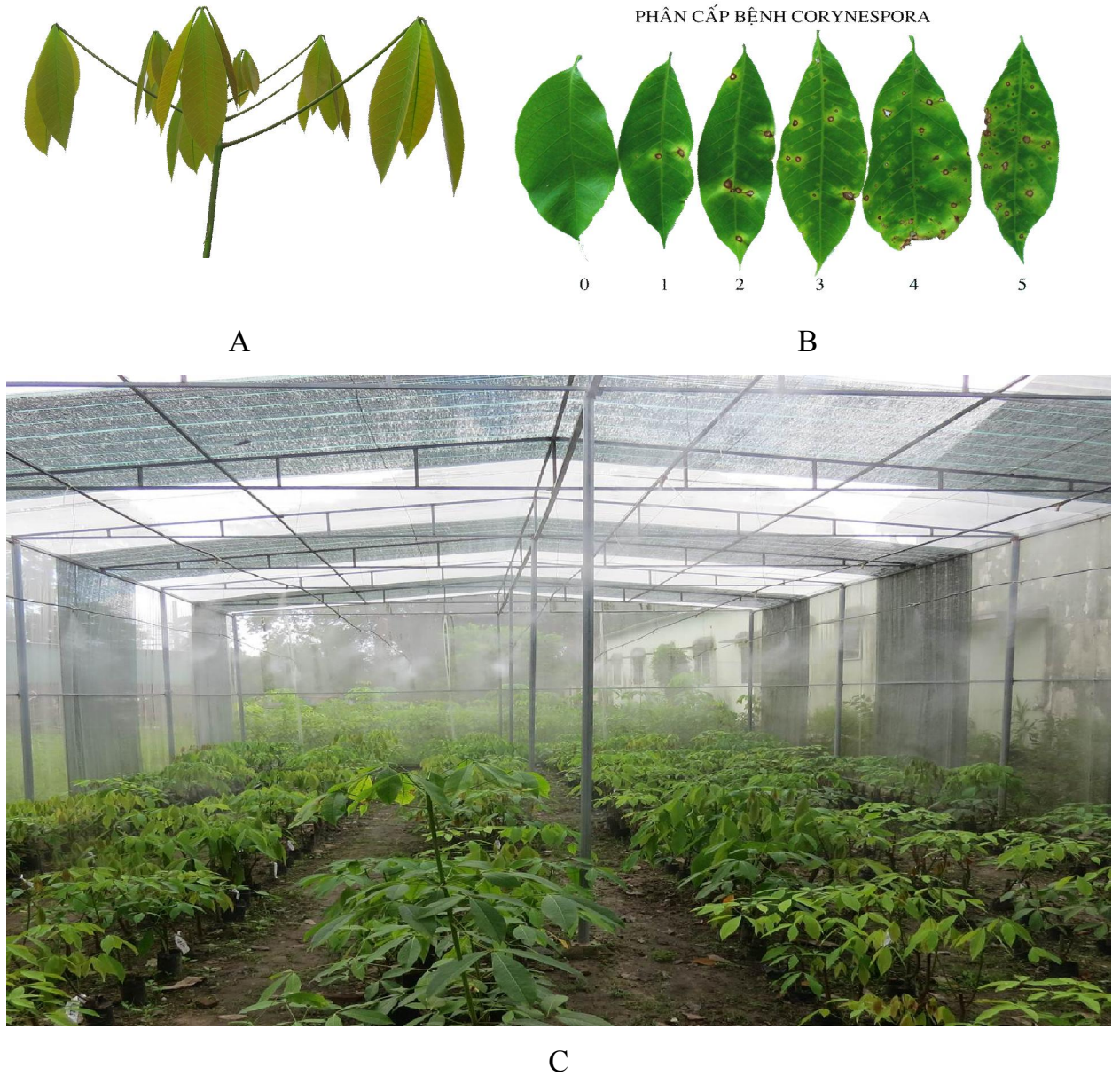
Trong đó: a: số lá bị nhiễm bệnh ở mỗi cấp, b: trị số cấp bệnh của mỗi cấp tương ứng, n: tổng số lá quan trắc, t: trị số cấp bệnh cao nhất trong bảng phân cấp.

Số liệu được chuyển đổi sang  $\sqrt{x+0,5}$  hoặc góc arcsin  $\sqrt{x}$  và phân tích ANOVA bằng phần mềm SAS. Đánh giá mức gây bệnh của các MPL nấm trên lá các DVT cao su được phân hạng theo CSB (Bảng 2.14).

**Bảng 2.14.** Phân hạng mức gây bệnh của nấm *C. cassicola* dựa trên CSB ở nhà lưới

Chỉ số bệnh (%)	Mức gây bệnh của ký sinh	Phản ứng của ký chủ
0	Không gây bệnh	Không bệnh (kháng bệnh)
Từ trên 0 đến 20	Gây bệnh nhẹ	Nhiễm nhẹ (chống chịu bệnh)
Từ trên 20 đến 40	Gây bệnh trung bình	Nhiễm trung bình
Từ trên 40 đến 60	Gây bệnh nặng	Nhiễm nặng (mẫn cảm bệnh)
Từ trên 60 đến 100	Gây bệnh rất nặng	Nhiễm rất nặng (rất mẫn cảm)

Kiểm tra nấm bệnh và triệu chứng nhiễm bệnh: Sau khi quan trắc mức độ nhiễm bệnh trên các DVT cao su, trong mỗi nghiệm thức lấy ngẫu nhiên 3 vết bệnh đặc trưng để tái phân lập và nuôi cấy trên môi trường MEA, kiểm tra và đối chiếu dựa vào hình dạng bào tử nấm.



**Hình 2.2.** Minh họa một số bước trong phương pháp lây bệnh nhân tạo ở điều kiện nhà lưới. A: Giai đoạn lá cây cao su được lây bệnh; B: Phân cấp bệnh Corynespora trên phiến lá; C: Nhà lưới với hệ thống tưới phun sương.



## CHƯƠNG 3

### KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. ĐẶC ĐIỂM HÌNH THÁI CỦA NẤM *Corynespora cassiicola* PHÂN LẬP TỪ CÂY CAO SU

##### 3.1.1. Đặc điểm hình thái tản nấm *Corynespora cassiicola*

Tất cả 76 MPL đều sinh trưởng tốt trên môi trường PSA, có sự khác biệt về màu sắc tản nấm (từ xám trắng, xám, xám đen), kết cấu tản nấm từ mỏng đến dày, sợi nấm của các MPL mọc chìm hoặc mọc nhô cao lên khỏi bề mặt môi trường (Phụ bảng 1, Phụ lục).

Màu sắc tản nấm biến thiên từ xám trắng đến xám đen. Màu sắc tản nấm của phần lớn số MPL là màu xám (51 MPL), kể đến là màu xám đen (17 MPL), và 8 MPL còn lại có tản nấm màu xám trắng (CoryDT02, CoryDP11, CoryDN32, CoryBT17, CoryBT18, CorySL01, CoryLCA1 và CoryLCA2) (Bảng 3.1; Hình 3.1A). Một số MPL tạo sắc tố hồng làm đổi màu một phần môi trường nuôi cấy, gồm có: CoryLK02, CoryLK27, CoryLK30, CoryLK33, CoryDT03, CoryBL01, CoryTN02, CoryDN06, CoryDN30, CoryGL01, CoryGL02, CoryGL03, CoryBT08, CoryBT17, CoryQN01, CoryLC01 và CoryLCA1 (Hình 3.1C).

Phần lớn số MPL nấm (71 MPL) có kết cấu tản nấm được xếp vào nhóm “dày”, sợi nấm mọc nhiều trên bề mặt môi trường. Còn lại 5 MPL thuộc nhóm có kết cấu tản nấm “mỏng”: CoryDN13, CoryGL01, CoryQN03, CoryQN08 và CoryLCA3 (Bảng 3.2; Hình 3.1B).

Tốc độ tăng trưởng tản nấm trung bình sau 7 ngày cấy nấm và kích thước tản nấm ở thời điểm 7 ngày sau cấy có sự khác biệt ý nghĩa giữa những MPL (Phụ bảng 1, Phụ lục). Phân tích trắc nghiệm đa đoạn Duncan tách các nguồn nấm ra thành nhiều nhóm. Các MPL CoryDN10, CoryBT06, CoryDN03, CoryDT04, CoryLK24, CoryDN15, CoryDP08 và CoryBT03 có tốc độ tăng trưởng nhanh (10,5 – 11,5

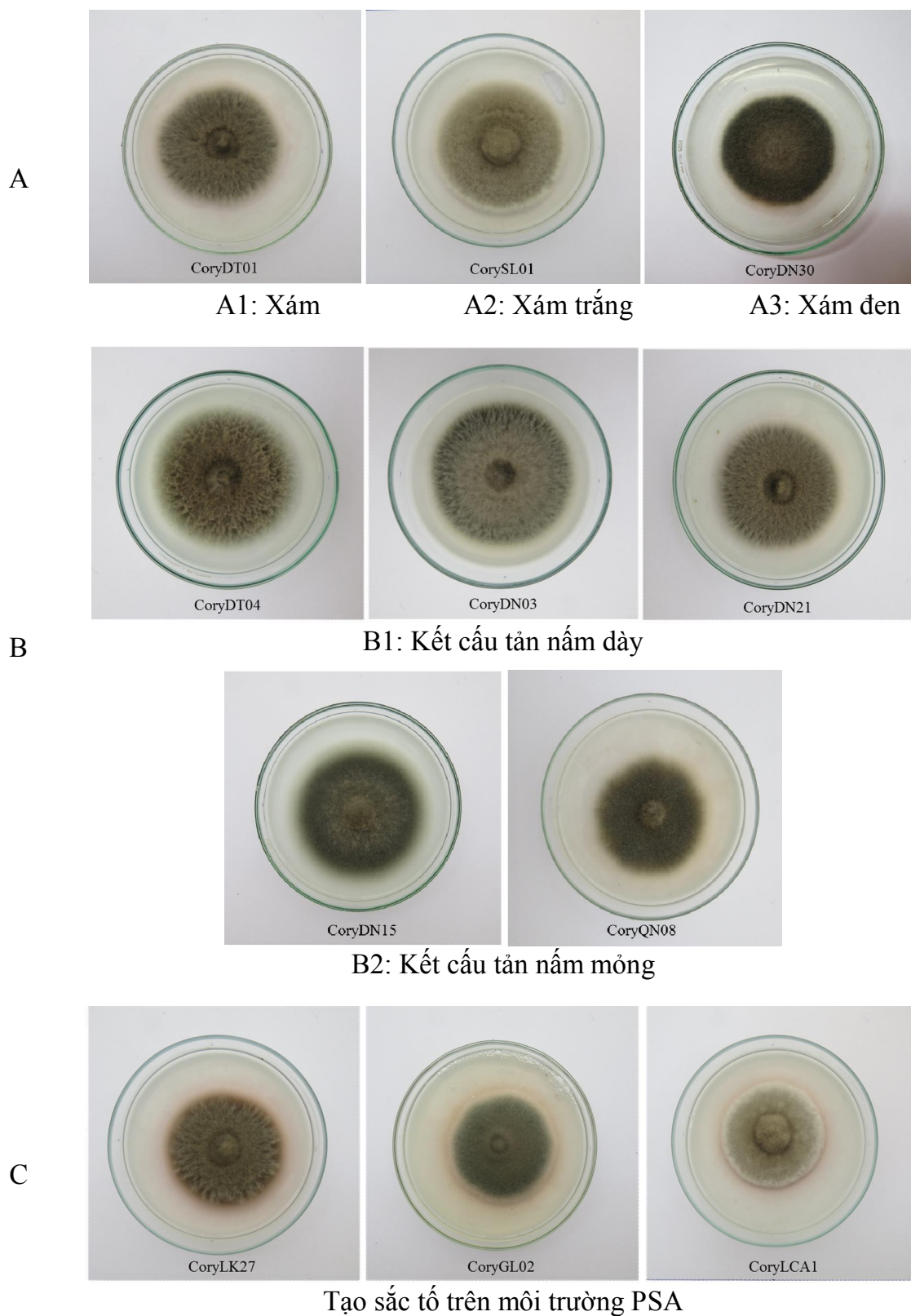
mm/ngày), tương ứng với kích thước tán nấm sau 7 ngày cấy nấm từ 73,7 mm đến 80,3 mm, tăng trưởng nhanh nhất là MPL CoryBT03. Các MPL CoryKT03, CoryKT02, CoryGL01, CoryLC01, CoryBT17, CoryDN06, CoryLK27, CoryKT04, CoryDP04, CoryLK32, CoryGL03, CoryLK02, CoryDT01, CoryQN03, CoryLK60, CoryQN08, CoryKT01, CoryLCA1, CoryDT03, CoryQN01, CoryDN24, CoryDN30, CoryPK01, CoryBT08, CoryTN02, CoryQN14, CoryTN09 và CoryLK33 có tốc độ tăng trưởng chậm (6,2 – 8,4 mm/ngày), tương ứng với kích thước tán nấm sau 7 ngày cấy từ 43,3 mm đến 59,0 mm, tăng trưởng chậm nhất là MPL CoryKT03. Các MPL còn lại có tốc độ tăng trưởng ở mức trung bình (8,5 – 10,1 mm/ngày), tương ứng với kích thước tán nấm sau 7 ngày cấy từ 60 mm đến 71 mm.

**Bảng 3.1.** Màu sắc tản nấm *C. cassicola* sau 7 ngày cấy nấm

<b>Màu sắc</b>	<b>Địa điểm thu thập mẫu (tỉnh)</b>	<b>Tên mẫu nấm</b>
Xám	Bình Dương	CoryLK02, CoryLK24, CoryLK27, CoryLK29, CoryLK33, CoryLK60, CoryDT01, CoryDT03, CoryDT05
	Bình Phước	CoryBL01, CoryDP03, CoryDP04, CoryDP08, CoryDP09
	Tây Ninh	CoryTN02, CoryTN09, CoryTN10, CoryTN11, CoryTN13
	Đồng Nai	CoryDN06, CoryDN07, CoryDN10, CoryDN12, CoryDN13, CoryDN23, CoryDN24, CoryDN25, CoryDN39
	Gia Lai	CoryPK01, CoryGL02, CoryGL03
	Kon Tum	CoryKT02, CoryKT04
	Bình Thuận	CoryBT03, CoryBT06, CoryBT08, CoryBT09, CoryBT13
	Quảng Nam	CoryQN01, CoryQN05, CoryQN06, CoryQN07, CoryQN08, CoryQN13
	Quảng Trị	CoryQT01, CoryQT02, CoryQT03
	Lai Châu	CoryLC02, CoryLC03
	Sơn La	CorySL02, CorySL03
	Xám đen	Bình Dương
Bình Phước		CoryDP07
Đồng Nai		CoryDN03, CoryDN15, CoryDN21, CoryDN27, CoryDN30
Gia Lai		CoryGL01
Kon Tum		CoryKT01, CoryKT03
Quảng Nam		CoryQN02, CoryQN03, CoryQN04, CoryQN14
Lai Châu		CoryLC01
Xám trắng	Lào Cai	CoryLCA3
	Bình Dương	CoryDT02
	Bình Phước	CoryDP11
	Đồng Nai	CoryDN32
	Bình Thuận	CoryBT17, CoryBT18
	Sơn La	CorySL01
Lào Cai	CoryLCA1, CoryLCA2	

**Bảng 3.2.** Kết cấu tàn nấm *C. cassicola* sau 7 ngày cấy nấm

Kết cấu	Địa điểm thu		
	thập mẫu (tỉnh)	Tên mẫu nấm	
Dày	Bình Dương	CoryLK02, CoryLK24, CoryLK27, CoryLK29, CoryLK32 CoryLK33, CoryLK60, CoryDT01, CoryDT02, CoryDT03, CoryDT04, CoryDT05	
	Bình Phước	CoryBL01, CoryDP03, CoryDP04, CoryDP07, CoryDP08, CoryDP09, CoryDP11,	
	Tây Ninh	CoryTN02, CoryTN09, CoryTN10, CoryTN11, CoryTN13	
	Đồng Nai	CoryDN03, CoryDN06, CoryDN07, CoryDN10, CoryDN12, CoryDN13, CoryDN21, CoryDN23, CoryDN24, CoryDN25, CoryDN27, CoryDN30, CoryDN32, CoryDN39	
	Gia Lai	CoryPK01, CoryGL02, CoryGL03	
	Kon Tum	CoryKT01, CoryKT02, CoryKT03, CoryKT04	
	Bình Thuận	CoryBT03, CoryBT06, CoryBT08, CoryBT09, CoryBT13, CoryBT17, CoryBT18	
	Quảng Nam	CoryQN01, CoryQN02, CoryQN04, CoryQN05, CoryQN06, CoryQN07, CoryQN13, CoryQN14	
	Quảng Trị	CoryQT01, CoryQT02, CoryQT03	
	Lai Châu	CoryLC01, CoryLC02, CoryLC03	
	Sơn La	CorySL01, CorySL02, CorySL03	
	Lào Cai	CoryLCA1, CoryLCA3	
	Mỏng	Đồng Nai	CoryDN15
		Gia Lai	CoryGL01
Quảng Nam		CoryQN03, CoryQN08	
Lào Cai		CoryLCA3	



**Hình 3.1.** Sự biến thiên về hình thái tản nấm *C. cassicola* nuôi cấy trên môi trường PSA. A: Sự biến thiên về màu sắc; B: Sự biến thiên về kết cấu; C: Tạo sắc tố trên môi trường cây.

### 3.1.2. Đặc điểm hình thái bào tử nấm *Corynespora cassiicola*

Sự đa dạng về hình thái bào tử được ghi nhận không chỉ giữa những MPL khác nhau mà ngay cả trên cùng một MPL nấm. Ghi nhận sự biến thiên về hình dạng bào tử (hình chùy, dài, thẳng, cong lưỡi liềm, bầu dục), kích thước bào tử với chiều dài từ 14  $\mu\text{m}$  đến 385,4  $\mu\text{m}$ , chiều rộng từ 3,7  $\mu\text{m}$  đến 14,1  $\mu\text{m}$ , số vách ngăn giả (pseudosepta) từ 0 đến 26 vách ngăn. Có nhiều dạng bào tử trên cùng mỗi MPL và tỷ lệ các dạng hình này rất khác nhau giữa các MPL. Các biến thể trong hình dạng bào tử và tỷ lệ của các hình dạng này khác nhau giữa các MPL. Các hình dạng có thể chiếm đa số ở MPL này nhưng là thiểu số trên MPL khác. Trong số 3.800 bào tử được quan sát, bào tử dài nhất là 385,4  $\mu\text{m}$  được ghi nhận trên MPL CoryBT17, bào tử ngắn nhất là 14  $\mu\text{m}$  được ghi nhận trên MPL CoryBT08, bào tử có bề rộng lớn nhất là 14,1  $\mu\text{m}$  được ghi nhận trên MPL CoryBT18, bào tử có bề rộng nhỏ nhất là 3,7  $\mu\text{m}$  được ghi nhận trên MPL CoryQN07, bào tử có số vách ngăn nhiều nhất cũng được ghi nhận trên MPL CoryBT08 (26 vách ngăn), nhiều bào tử không có vách ngăn được ghi nhận trên nhiều MPL nấm.

Giá trị trung bình chiều dài bào tử các MPL biến thiên từ 37  $\mu\text{m}$  đến 169,7  $\mu\text{m}$ . Trong đó, 20 MPL có chiều dài trung bình từ 37  $\mu\text{m}$  đến 70  $\mu\text{m}$ , 33 MPL trên 70  $\mu\text{m}$  đến 90  $\mu\text{m}$  và 23 MPL có chiều dài trung bình trên 90  $\mu\text{m}$  (Bảng 3.3).

Giá trị trung bình chiều rộng bào tử các MPL biến thiên từ 5,9  $\mu\text{m}$  đến 8,4  $\mu\text{m}$ . Trong đó, 21 MPL có chiều rộng trung bình từ 5,9  $\mu\text{m}$  đến 7  $\mu\text{m}$ , 46 MPL trên 7  $\mu\text{m}$  đến 8  $\mu\text{m}$ , và 9 MPL có chiều rộng trung bình trên 8  $\mu\text{m}$  (Bảng 3.4).

Giá trị trung bình số vách ngăn giả của bào tử các MPL biến thiên từ 1,2  $\mu\text{m}$  đến 12,1. Trong đó, 27 MPL có từ 1,2  $\mu\text{m}$  đến 3 vách ngăn, 33 MPL có từ trên 3 đến 5 vách ngăn và 16 MPL có trên 5 vách ngăn (Bảng 3.5).

Kết quả trình bày tại Phụ bảng 2 (Phụ lục) cho thấy có sự khác biệt ý nghĩa về kích thước trung bình của bào tử giữa những MPL nấm. Trong đó, CoryDN30 là mẫu nấm có giá trị trung bình chiều dài bào tử lớn nhất (169,7  $\mu\text{m}$ ) tương ứng với trung bình số vách ngăn giả nhiều nhất (12,1 vách ngăn), CoryBT13 là mẫu nấm có giá trị trung bình chiều dài bào tử ngắn nhất (37,8  $\mu\text{m}$ ) tương ứng với trung bình số

vách ngăn giả ít nhất (1,2 vách ngăn). Trong khi đó, CoryQN14 là mẫu nấm có giá trị trung bình chiều rộng lớn nhất (8,4  $\mu\text{m}$ ) và MPL CoryLCA2 có giá trị trung bình chiều rộng nhỏ nhất (5,9  $\mu\text{m}$ ). Một số MPL có giá trị trung bình số vách ngăn giả rất thấp (1,2 – 1,7 vách ngăn) như CoryBT13, CorySL01, CoryKT02 và CoryGL03. Kết quả phân tích trắc nghiệm đa đoạn Duncan có thể phân tách các nguồn nấm ra thành 22 nhóm theo chiều dài bào tử, 26 nhóm theo chiều rộng bào tử và 23 nhóm theo số lượng vách ngăn giả trên bào tử.

**Bảng 3.3.** Chiều dài ( $\mu\text{m}$ ) của bào tử nấm *C. cassiicola*

Kích thước ( $\mu\text{m}$ )	Số MPL	Tên mẫu nấm
Từ trên 37 đến 70	20	CoryLK32, CoryDT02, CoryDN03, CoryDN15, CoryDN23, CoryDN24, CoryDN27, CoryGL02, CoryGL03, CoryKT02, CoryKT03, CoryBT13, CoryQN04, CoryLC01, CorySL01, CorySL02, CorySL03, CoryLCA1, CoryLCA2, CoryLCA3
Từ trên 70 đến 90	33	CoryLK02, CoryLK24, CoryLK27, CoryLK29, CoryLK60, CoryDT01, CoryDT03, CoryBL01, CoryDP03, CoryDP04, CoryDP07, CoryDP09, CoryTN02, CoryTN11, CoryTN13, CoryDN06, CoryDN21, CoryDN25, CoryDN32, CoryDN39, CoryBT03, CoryBT06, CoryBT09, CoryBT17, CoryBT18, CoryQN05, CoryQN06, CoryQN07, CoryQN08, CoryQN14, CoryQT02, CoryQT03, CoryLC02
Từ trên 90 đến 170	23	CoryLK33, CoryDT04, CoryDT05, CoryDP08, CoryDP11, CoryTN09, CoryTN10, CoryDN07, CoryDN10, CoryDN12, CoryDN13, CoryDN30, CoryPK01, CoryGL01, CoryKT01, CoryKT04, CoryBT08, CoryQN01, CoryQN02, CoryQN03, CoryQN13, CoryQT01, CoryLC03

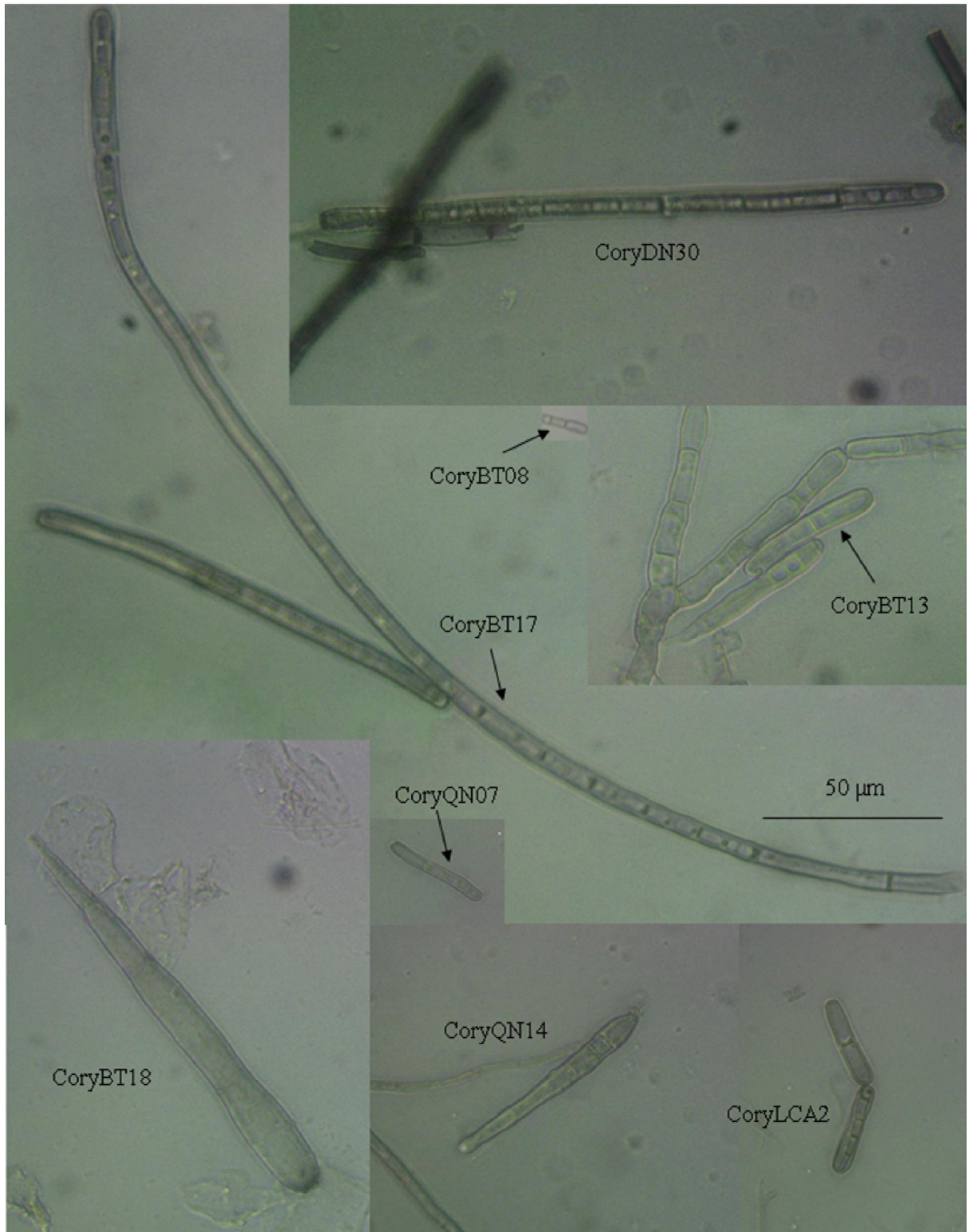
**Bảng 3.4.** Chiều rộng ( $\mu\text{m}$ ) của bào tử nấm *C. cassicola*

<b>Kích thước (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>Số MPL</b>	<b>Tên mẫu nấm</b>
Từ trên 5,8 đến 7	21	CoryLK27, CoryLK32, CoryTN10, CoryTN11, CoryDN24, CoryDN27, CoryDN30, CoryPK01, CoryGL01, CoryGL02, CoryGL03, CoryKT02, CoryKT03, CoryKT04, CoryBT06, CoryQN04, CoryQN05, CoryQN07, CoryLCA1, CoryLCA2, CoryLC01
Từ trên 7 đến 8	46	CoryLK02, CoryLK4, CoryLK29, CoryLK33, CoryLK60, CoryDT01, CoryDT02, CoryDT03, CoryDT05, CoryDT04, CoryBL01, CoryDP03, CoryDP04, CoryDP07, CoryDP08, CoryDP09, CoryDP11, CoryTN09, CoryTN13, CoryDN03, CoryDN06, CoryDN10, CoryDN15, CoryDN21, CoryDN23, CoryDN25, CoryDN32, CoryKT01, CoryBT03, CoryBT13, CoryBT17, CoryBT18, CoryQN01, CoryQN02, CoryQN03, CoryQN06, CoryQN08, CoryQT01, CoryQT02, CoryQT03, CoryLC02, CoryLC03, CorySL01, CorySL02, CorySL03, CoryLCA3
Từ trên 8 đến 8,4	9	CoryTN02, CoryDN07, CoryDN12, CoryDN13, CoryDN39, CoryBT08, CoryBT09, CoryQN13, CoryQN14



**Bảng 3.5.** Trung bình số vách ngăn giả của bào tử nấm *C. cassicola*

<b>Trung bình số vách ngăn giả</b>	<b>Số MPL</b>	<b>Tên mẫu nấm</b>
Từ 1,2 đến 3	27	CoryLK02, CoryLK24, CoryLK32, CoryLk33, CoryLK60, CoryTN02, CoryTN09, CoryTN11, CoryDN03, CoryDN06, CoryDN23, CoryDN24, CoryDN39, CoryGL03, CoryKT02, CoryKT04, CoryBT13, CoryBT17, CoryQN01, CoryQN02, CoryQN07, CoryQN13, CorySL01, CorySL02, CorySL03, CoryLCA1, CoryLCA3
Từ trên 3 đến 5	33	CoryLK27, CoryLK29, CoryDT01, CoryDT03, CoryDT02, CoryBL01, CoryDP03, CoryDP04, CoryDP07, CoryDP09, CoryTN13, CoryDN06, CoryDN12, CoryDN15, CoryDN21, CoryDN25, CoryDN27, CoryDN32, CoryPK01, CoryGL02, CoryKT03, CoryBT03, CoryBT06, CoryBT09, CoryBT18, CoryQN03, CoryQN04, CoryQN05, CoryQN08, CoryQN14, CoryQT03, CoryLC02, CoryLCA2
Từ trên 5 đến 12,1	16	CoryDT04, CoryDT05, CoryDP08, CoryTN10, CoryDP11, CoryDN07, CoryDN10, CoryDN13, CoryDN30, CoryGL01, CoryKT01, CoryBT08, CoryQT01, CoryQT02, CoryLC01, CoryLC03



**Hình 3.2.** Sự biến thiên về hình dạng và kích thước của bào tử nấm *C. cassiicola*.

Đặc điểm hình thái của 76 MPL trong luận án nghiên cứu phù hợp với mô tả trong tài liệu tra cứu CMI (Commonwealth Mycology Institute) về đặc điểm hình thái của nấm *C. cassiicola* (Ellis và Holliday, 1971). Sự khác biệt về hình thái tản nấm, hình thái bào tử của 76 MPL khá tương đồng và phù hợp với các nghiên cứu trước đây của Onesirosan và ctv (1974); Chee (1988); Phan Thanh Dung (1995); Darmono và ctv (1996); Silva và ctv (1998); Nguyen Anh Nghia và ctv (2008). Sự biến thiên về kích thước và hình dạng bào tử không chỉ được ghi nhận giữa các MPL khác nhau mà còn trong cùng một MPL nấm.

Nghiên cứu đặc điểm hình thái đóng vai trò quan trọng trong phân loại nấm, là phương pháp cổ điển, không thể thiếu trong nghiên cứu nấm bệnh vì có thể nhận dạng loài nấm một cách nhanh chóng, khá chính xác và dễ thực hiện. Sự biến thiên về đặc điểm hình thái của 76 MPL rất cao trên tất cả các chỉ tiêu quan trắc dẫn đến mối hoài nghi về sự đa dạng ở mức dưới loài của những mẫu nấm. Tuy nhiên, dựa trên các đặc điểm hình thái của 76 MPL thì không thể xác định có hay không sự khác biệt về cấu trúc di truyền của nấm ở mức dưới loài và cũng không ghi nhận được mối tương quan với nguồn gốc ký chủ (DVT cao su) hoặc vùng địa lý nơi mẫu nấm được thu thập. Hiện nay, có nhiều chỉ thị phân tử là công cụ hữu ích trong nhận diện và phân nhóm các đặc điểm di truyền của nấm ở mức độ dưới loài. Vì vậy, để có thể hiểu rõ hơn về loài nấm *C. cassiicola* thì việc tiếp tục áp dụng các kỹ thuật phân tử kết hợp với nghiên cứu tính gây bệnh của nấm là rất cần thiết.

### **3.2. ĐA DẠNG DI TRUYỀN CỦA NẤM *Corynespora cassiicola* PHÂN LẬP TỪ CÂY CAO SU**

#### **3.2.1. Nhận diện và phân tích mối quan hệ di truyền của các MPL nấm *Corynespora cassiicola* dựa trên trình tự vùng rDNA-ITS**

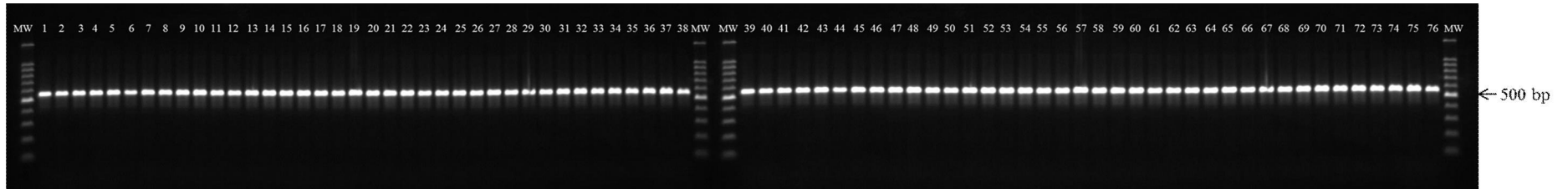
Phản ứng PCR khuếch đại vùng rDNA-ITS của 76 MPL nấm dùng cặp mồi ITS1 - ITS4 cho ra 1 sản phẩm PCR duy nhất gồm vùng ITS1 - 5,8S rDNA - ITS2 trong tất cả các MPL được nghiên cứu. Kết quả giải trình tự khẳng định các đoạn ITS1 - 5,8S rDNA - ITS2 của 76 MPL có cùng kích thước là 559 bp (Hình 3.3).

Xếp các trình tự vùng rDNA-ITS của 76 MPL giống hệt nhau ngoại trừ 2 nucleotide khác nhau được phát hiện tại vị trí 135 và 474 trong vùng ITS1 và ITS2. Trình tự DNA của 41 MPL được thu thập tại Bình Dương (8 MPL), Bình Phước (5 MPL), Tây Ninh (3 MPL), Đồng Nai (11 MPL), Gia Lai (1 MPL), Bình Thuận (4 MPL), Quảng Nam (5 MPL), Quảng Trị (3 MPL) và Lai Châu (1 MPL) có cytosine (C) ở vị trí 135. Trong khi đó, 35 MPL còn lại được thu thập tại Bình Dương (4 MPL), Bình Phước (2 MPL), Tây Ninh (2 MPL), Đồng Nai (4 MPL), Gia Lai (3 MPL), Kon Tum (4 MPL), Bình Thuận (3 MPL), Quảng Nam (5 MPL), Lai Châu (5 MPL), Sơn La (3 MPL), Lào Cai (3 MPL) có thymine (T) ở vị trí này. Trong số 41 MPL có cytosine (C) ở vị trí 135, ba (03) MPL thu thập tại Bình Dương (CoryLK60), Bình Thuận (CoryBT17) và Quảng Nam (CoryQN14) có adenine (A) ở vị trí 474 trong khi những MPL còn lại có guanine (G) ở vị trí này (Hình 3.4). Cây phân nhóm di truyền thu được từ phân tích Neighbor – joining dựa trên trình tự vùng rDNA-ITS với các nucleotide khác biệt được phát hiện ở vị trí nucleotide thứ 135 và 474 chia 76 MPL nắm thành 3 nhóm chính. Nhóm thứ nhất gồm 38 MPL, nhóm thứ hai gồm 35 MPL và nhóm thứ ba gồm 3 MPL (CoryLK60, CoryBT17, CoryQN14) (Bảng 3.6, Hình 3.5).

Mức độ tương đồng giữa 3 MPL đại diện cho các phân nhóm di truyền gồm CoryLK02 (nhóm 1), CorySL02 (nhóm 2), CoryBT17 (nhóm 3) là 99,82%. Kết quả tìm kiếm sự tương đồng bằng công cụ BLAST cho thấy 3 MPL có độ tương đồng 99,82% – 100% so với các mẫu nấm *C. cassicola* đã được đăng ký trên cơ sở dữ liệu GenBank (Phụ lục 5). Điều này xác nhận và khẳng định 76 MPL đúng là nấm *C. cassicola*.

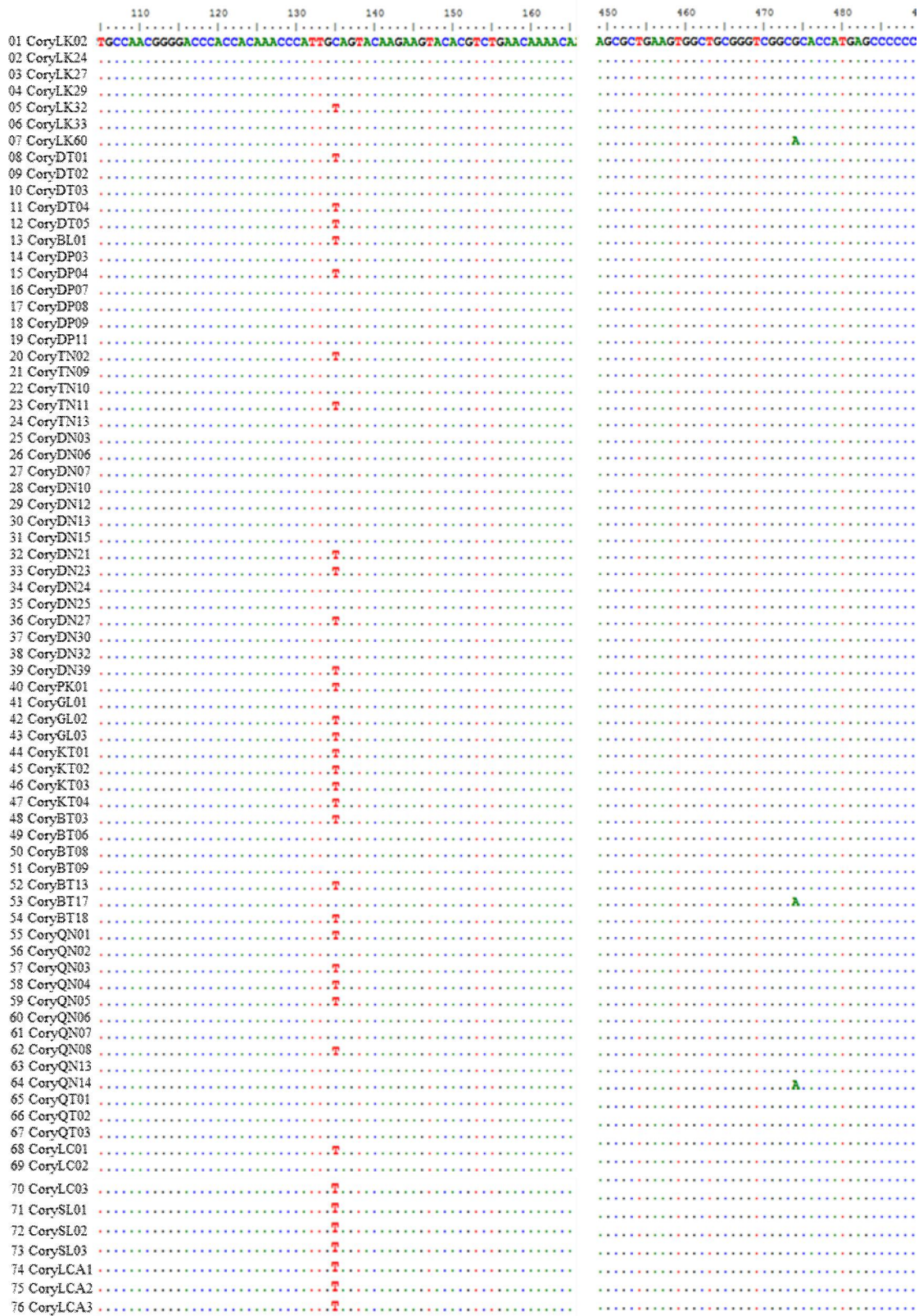
**Bảng 3.6.** Phân nhóm di truyền của các 76 MPL nấm theo trình tự vùng rDNA-ITS

<b>Nhóm di truyền</b>	<b>Địa điểm thu thập mẫu (tỉnh)</b>	<b>Tên mẫu nấm</b>
Phân nhóm 1 (Cytosine ở vị trí 135)	Bình Dương	CoryLK02, CoryLK24, CoryLK27, CoryLK29, CoryLK33, CoryDT02, CoryDT03
	Bình Phước	CoryDP03, CoryDP07, CoryDP08, CoryDP09, CoryDP11
	Tây Ninh	CoryTN09, CoryTN10, CoryTN13
	Đồng Nai	CoryDN03, CoryDN06, CoryDN07, CoryDN10, CoryDN12, CoryDN13, CoryDN15, CoryDN24, CoryDN25, CoryDN30, CoryDN32
	Gia Lai	CoryGL01
	Bình Thuận	CoryBT06, CoryBT08, CoryBT09
	Quảng Nam	CoryQN02, CoryQN06, CoryQN07, CoryQN13
	Quảng Trị	CoryQT01, CoryQT02, CoryQT03
	Lai Châu	CoryLC02
	Phân nhóm 2 (Thymine ở vị trí 135)	Bình Dương
Bình Phước		CoryBL01, CoryDP04
Tây Ninh		CoryTN02, CoryTN11
Đồng Nai		CoryDN21, CoryDN23, CoryDN27, CoryDN39
Gia Lai		CoryPK01, CoryGL02, CoryGL03
Kon Tum		CoryKT01, CoryKT02, CoryKT03, CoryKT04
Bình Thuận		CoryBT03, CoryBT13, CoryBT18
Quảng Nam		CoryQN01, CoryQN03, CoryQN04, CoryQN05, CoryQN08
Lai Châu		CoryLC01, CoryLC03
Sơn La		CorySL01, CorySL02, CorySL03
Lào Cai		CoryLCA1, CoryLCA2, CoryLCA3
Phân nhóm 3 (Adenine ở vị trí 474)	Bình Dương	CoryLK60
	Bình Thuận	CoryBT17
	Quảng Nam	CoryQN14

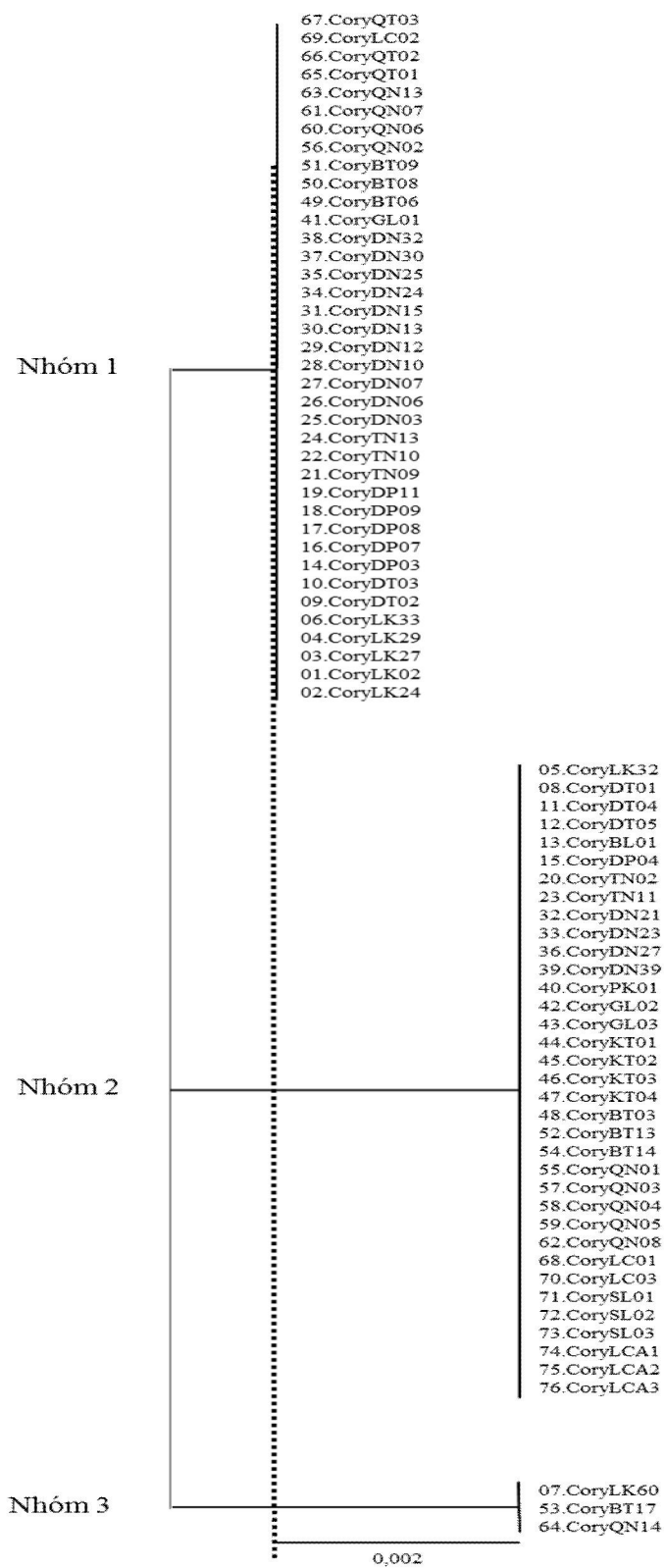


**Hình 3.3.** Gel điện di sản phẩm PCR của 76 MPL nấm *C. cassiicola* dùng mồi ITS 1 và ITS 4. Ký hiệu MW là thang DNA chuẩn 100bps (*Promega*). Nồng độ gel 1,0%, dung dịch điện di TBE buffer 1X, nguồn điện 70V, thời gian điện di 45 phút ở nhiệt độ 28°C – 30°C.





**Hình 3.4.** Sự khác biệt nucleotide ở vị trí 135 trong vùng ITS1 và vị trí 474 trong vùng ITS2 của 76 MPL nấm *C. cassiicola*.



**Hình 3.5.** Cây phân nhóm di truyền thu được từ phân tích Neighbor – joining dựa trên trình tự vùng rDNA-ITS của 76 MPL nấm *C. cassicola*.



Giải trình tự vùng rDNA-ITS là một phương pháp rất hữu dụng để định danh và nghiên cứu quan hệ di truyền của nấm (White và ctv, 1990). Vùng rDNA-ITS nằm giữa vùng SSU (Small Subunit DNA) và vùng LSU (Large Subunit DNA) với 2 vùng ITS1 và ITS2 (Internal Transcribed Spacer) và tiểu đơn vị 5,8S rDNA gene trong nhân. Trình tự vùng rDNA-ITS được ứng dụng rộng rãi để tìm ra mối quan hệ di truyền của các loài nấm, cũng như để phát hiện và định danh nấm (Kanbe, 2008; Abdel-Rahman, 2008). Trong những năm gần đây, kỹ thuật giải trình tự vùng rDNA-ITS đã được ứng dụng thành công trong nhiều nghiên cứu phân tích đa dạng di truyền nấm *C. cassiicola* phân lập trên cây cao su và các cây ký chủ khác (Dixon và ctv, 2009 ; Nguyen Anh Nghia và ctv, 2010a; 2010b; Qi và ctv, 2011; Déon và ctv, 2014; Nguyen Don Hieu và ctv 2014; Shuib và ctv, 2015, Oktavia và ctv; 2017). Tất cả các đột biến SNPs trên vùng rDNA-ITS đều có giá trị thông tin quan trọng trong phân tích biến dị di truyền và xác định phân nhóm di truyền ở cấp độ dưới loài như kiểu đơn “haplotype” hoặc phân loại các nòi nấm *C. cassiicola* (Dixon và ctv, 2009; Shimomoto và ctv, 2011; Oktavia và ctv; 2017). Tại Malaysia, dựa trên sự khác biệt các SNPs tại vị trí 100 và 135 trên vùng ITS1, cùng với kết quả đánh giá tính gây bệnh của các mẫu nấm trên lá các DVT cao su, đã xác định được 3 nòi nấm khác biệt có tương quan với các đột biến SNPs kể trên (Nguyen Anh Nghia, ctv 2008; 2010a).

Sự khác biệt nucleotide trên một vị trí là các dạng đột biến phổ biến nhất được tìm thấy trong DNA bộ gen (Barnes, 2002; Carter và ctv, 2004). Theo Nilsson và ctv (2008), sự biến động ITS trong cùng loài của một số loài nấm được công bố trên GenBank tương đối thấp, với hơn một nửa chúng cho thấy sự khác biệt nhỏ hơn 1%, nhưng có nhiều đột biến SNPs tồn tại trong vùng này. Theo Qi và ctv (2011), kích thước vùng rDNA-ITS của nấm *C. cassiicola* có độ dài là 559 bp, tương ứng với đoạn ITS1 là 180 bp, vùng 5,8S rDNA là 158 bp và vùng ITS2 là 221 bp. Kết quả thu được từ luận án cho thấy, các đoạn ITS1 - 5,8S rDNA - ITS2 của 76 MPL giống hết nhau ngoại trừ 2 đột biến tại vị trí 135 (trong vùng ITS1) và vị trí 474 (trong vùng ITS2). Đột biến tại vị trí 135 đã được biết đến qua kết quả nghiên cứu

trước đây trên nấm *C. cassiicola* phân lập từ cây cao su và một số cây ký chủ khác ở Việt Nam và một số quốc gia khác như Malaysia, Indonesia và Trung Quốc (Nguyen Anh Nghia và ctv, 2010a; 2010b; Qi và ctv, 2011; Nguyen Don Hieu và ctv, 2014; Shuib và ctv, 2015; Oktavia và ctv, 2017). Đáng lưu ý với đột biến tại vị trí 474 là phát hiện mới, lần đầu tiên được tìm thấy trên các mẫu nấm *C. cassiicola* ở Việt Nam. Trong khi đó, trình tự tiêu đơn vị 5,8S rDNA của 76 MPL nấm giống nhau hoàn toàn vì đây là vùng có tính bảo tồn rất cao không chỉ đối với nấm *C. cassiicola* mà còn trên tất cả các sinh vật. Ngược lại, các vùng ITS có tính biến động khá cao nên thường được sử dụng để phân tích xác định các phân nhóm di truyền ở mức dưới loài, kết quả trong luận án phù hợp với các nghiên cứu trước đây trên vùng rDNA-ITS nấm *C. cassiicola* (Dixon và ctv, 2009; Nguyen Anh Nghia và ctv, 2010a; 2010b; Qi và ctv, 2011; Shimomoto và ctv, 2011; Nguyen Don Hieu và ctv, 2014; Shuib và ctv, 2015).

Sự khác biệt giữa các nucleotide đã chia 76 MPL thành 3 nhóm, nhóm 1 gồm 38 MPL có cytosine (C) ở vị trí 135, nhóm 2 gồm 35 MPL có thymine (T) ở vị trí này và nhóm 3 gồm 3 MPL có cytosine (C) ở vị trí 135 và có adenin (A) ở vị trí 474. Xét theo vùng địa lý, có sự tồn tại cả 3 nhóm di truyền tại tỉnh Bình Dương, Bình Thuận và Quảng Nam. Trong phân nhóm di truyền 1 và phân nhóm di truyền 2 có sự hiện diện của các MPL được thu thập trên tất cả các vùng trồng cao su, phân bố trải rộng từ Miền Đông Nam Bộ, Tây Nguyên, Miền Trung và Miền Núi Phía Bắc (Hình 3.6).

Xét theo nguồn gốc ký chủ (DVT cao su), có sự tồn tại đồng thời 3 nhóm di truyền gây bệnh trên DVT RRIV 4 và 2 nhóm di truyền (1 và 2) gây bệnh trên các DVT RRIV 2, RRIV 3 và IAN 873. Các DVT RRIV 3, RRIV 4 và IAN 873 đã được biết đến là rất mẫn cảm với bệnh rụng lá *Corynespora* ở Việt Nam. Trong khi đó, kết quả nghiên cứu chỉ ghi nhận được phân nhóm di truyền 2 trên DVT phổ biến PB 260, là DVT cao su “chống chịu bệnh” ở Việt Nam. Phân nhóm di truyền 3 được thu thập trên DVT LH90/463 (tại Bình Dương) và DVT RRIV 4 (tại Bình Thuận, Quảng Nam). Các MPL nấm thu thập từ DVT khác như LH01/0131,

LH90/1094, RRIV 106, RRIV 124 đều thuộc phân nhóm di truyền 1. Trong khi, các MPL nấm thu thập từ DVT 94/062, LH 88/732, RRIC 110, VN774 thuộc phân nhóm di truyền 2. Kết quả nghiên cứu cho thấy khả năng tồn tại mối tương quan giữa phân nhóm di truyền dựa trên trình tự vùng rDNA-ITS của các MPL nấm với nguồn gốc ký chủ (DVT cao su). Tuy nhiên, do số lượng MPL nấm thu thập từ các DVT cao su không đồng đều, thiếu cân đối, nên chưa đủ cơ sở cho nhận định trên, cần thu thập thêm số lượng các MPL nấm có nguồn gốc từ DVT PB 260 và các DVT khác để kiểm chứng giả định này.



**Hình 3.6.** Lược đồ phân bố địa lý của các phân nhóm di truyền nấm *C. cassicola* theo trình tự vùng rDNA-ITS. Các số bên ngoài ngoặc đơn là số thứ tự mẫu nấm, các số bên trong ngoặc đơn là phân nhóm di truyền.

### 3.2.2. Phân tích mối quan hệ di truyền của các MPL nấm *Corynespora cassiicola* dựa trên chỉ thị phân tử SRAP

Tổng số 223 băng DNA được khuếch đại từ 30 cặp primer SRAP, trong đó có 208 băng đa hình với tỷ lệ 93,3%. Duy nhất cặp primer Me5 + Em6 cho sản phẩm DNA có 2 băng đồng hình, còn lại 29 cặp primer có tỷ lệ băng đa hình từ 66,7% – 100%, trong đó có 17 cặp primer cho tỷ lệ băng đa hình là 100%. Số đoạn DNA được khuếch đại trên mỗi cặp primer từ 2 – 12 băng và kích thước sản phẩm DNA từ 100 – 1.800 bp (Bảng 3.7). Một số cặp primer cho sản phẩm DNA với các băng chuyên biệt trên một số mẫu nấm (Hình 3.7). Cây phân nhóm di truyền thu được từ phân tích UPGMA dựa trên hệ số Nei và Li's với hệ số tương đồng 67% đã chia 76 MPL thành 2 nhóm chính (Bảng 3.8; Hình 3.8). Nhóm 1 có 54 MPL được thu thập tại Bình Dương (12 MPL), Bình Phước (7 MPL), Tây Ninh (5 MPL), Đồng Nai (14 MPL), Gia Lai (1 MPL), Kon Tum (1 MPL), Bình Thuận (4 MPL), Quảng Nam (6 MPL), Quảng Trị (3 MPL) và Lai Châu (1 MPL). Nhóm này được chia thành 2 nhóm phụ (1A và 1B), nhóm phụ 1A gồm 51 MPL, nhóm phụ 1B gồm 3 MPL được thu thập tại tỉnh Bình Dương (CoryLK60), Bình Thuận (CoryBT17) và Quảng Nam (CoryQN14). Nhóm 2 có 22 MPL được thu thập tại Đồng Nai (1 MPL), Gia Lai (3 MPL), Kon Tum (3 MPL), Bình Thuận (3 MPL), Quảng Nam (4 MPL), Lai Châu (2 MPL), Sơn La (3 MPL) và Lào Cai (3 MPL). Trong phân nhóm di truyền 2, có sự hiện diện của các MPL được thu thập từ 8/12 tỉnh và hầu hết các MPL tại vùng Tây Nguyên, Miền Trung và Miền Núi Phía Bắc, duy nhất mẫu phân lập CoryDN39 tại tỉnh Đồng Nai (vùng Đông Nam Bộ) hiện diện trong nhóm này. Nhóm phụ 2A có 20 MPL và tất cả đều ở vùng Tây Nguyên, Miền Trung và Miền Núi Phía Bắc, nhóm phụ 2B gồm có 1 MPL tại Đồng Nai (CoryDN39) và 1 MPL tại Gia Lai (CoryGL01) (Bảng 3.8). Giá trị Bootstrap cho nhóm 1 và 2 lần lượt là 61% và 100%, điều này cho thấy sự phân nhóm là đáng tin cậy, với hệ số tương đồng giữa 2 nhóm chính là 67%. Hệ số tương đồng của các MPL trong nhóm 1 là 72% và được phân chia thành 2 nhóm phụ 1A và 1B. Tương tự, các MPL thuộc nhóm 2 có hệ số tương đồng là 90% và cũng chia làm 2 nhóm phụ 2A và 2B.

**Bảng 3.7.** Kết quả khuếch đại DNA của 76 MPL nấm *C. cassicola* với 30 cặp primer SRAP

<b>STT</b>	<b>Tên primer</b>	<b>Số đoạn DNA khuếch đại</b>	<b>Đa hình các đoạn DNA</b>	<b>Tỷ lệ đa hình (%)</b>	<b>Kích thước sản phẩm (bp)</b>
1	Me1 + Em1	6	6	100	350 – 1.200
2	Me1 + Em2	9	9	100	150 – 1.300
3	Me1 + Em3	8	7	87,5	100 – 1.300
4	Me1 + Em4	12	12	100	100 – 2.000
5	Me1 + Em5	7	7	100	200 – 1.500
6	Me1 + Em6	8	8	100	200 – 1.500
7	Me2 + Em1	11	11	100	120 – 1.700
8	Me2 + Em2	8	6	75	100 – 1.800
9	Me2 + Em3	2	2	100	300 – 650
10	Me2 + Em4	8	8	100	80 – 1.800
11	Me2 + Em5	9	9	100	150 – 1.700
12	Me2 + Em6	8	7	87,5	150 – 1.700
13	Me3 + Em1	4	4	100	450 – 1.800
14	Me3 + Em2	9	9	100	100 – 1.600
15	Me3 + Em3	9	9	100	80 – 1.800

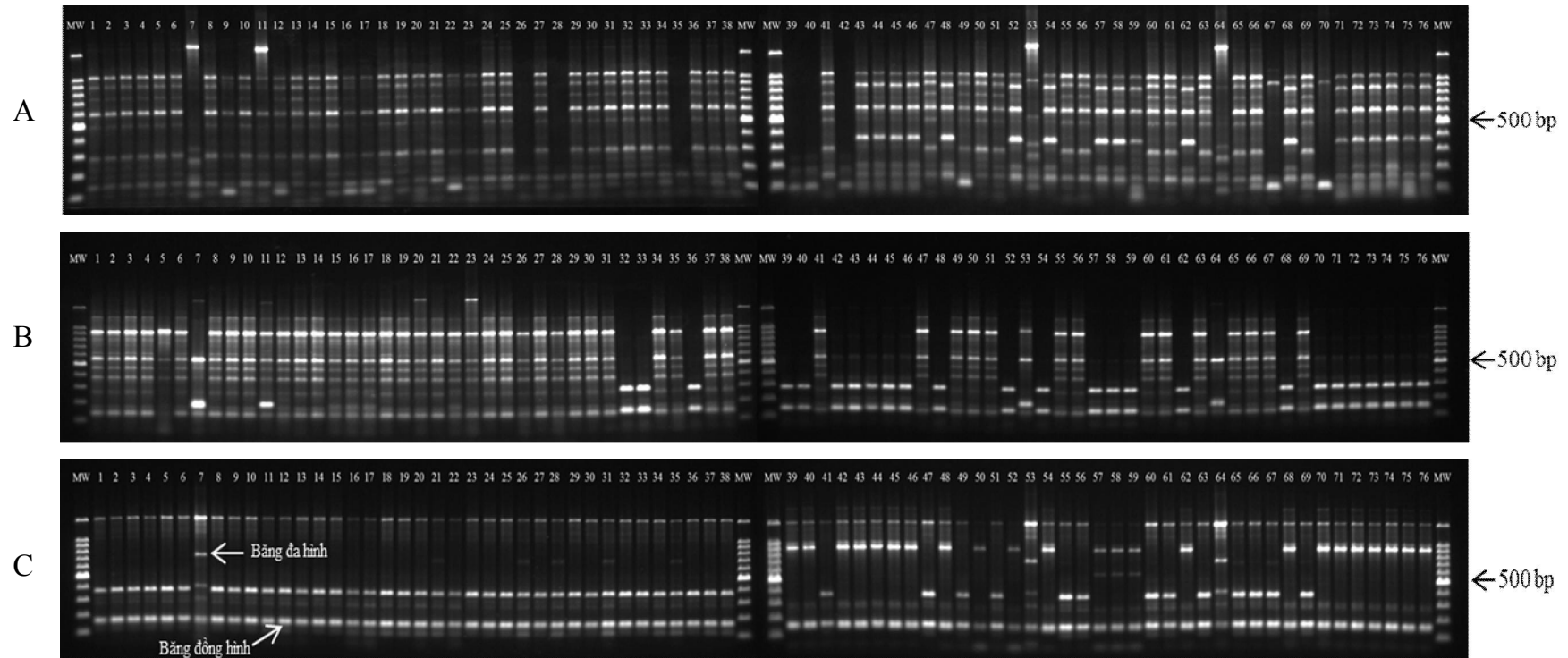
**Bảng 3.7 (tt).** Kết quả khuếch đại DNA của 76 MPL nấm *C. cassicola* với 30 cặp primer SRAP

STT	Tên primer	Số đoạn DNA khuếch đại	Đa hình các đoạn DNA	Tỷ lệ đa hình (%)	Kích thước sản phẩm (bp)
16	Me3 + Em4	9	8	88,9	150 – 1.800
17	Me3 + Em5	8	7	87,5	100 – 1.600
18	Me3 + Em6	3	2	66,7	110 – 1.600
19	Me4 + Em1	10	10	100	190 – 1.800
20	Me4 + Em2	3	2	66,7	200 – 1.400
21	Me4 + Em3	9	8	88,9	100 – 1.700
22	Me4 + Em4	8	7	87,5	100 – 1.800
23	Me4 + Em5	9	9	100	150 – 1.800
24	Me4 + Em6	12	12	100	70 – 1.800
25	Me5 + Em1	11	11	100	200 – 1.700
26	Me5 + Em2	3	3	100	400 – 1.400
27	Me5 + Em3	9	8	88,9	150 – 1.800
28	Me5 + Em4	6	5	83,3	150 – 1.500
29	Me5 + Em5	4	3	75	150 – 1.300
30	Me5 + Em6	2	0	0	290 – 350
Tổng số		223	208	93,3	

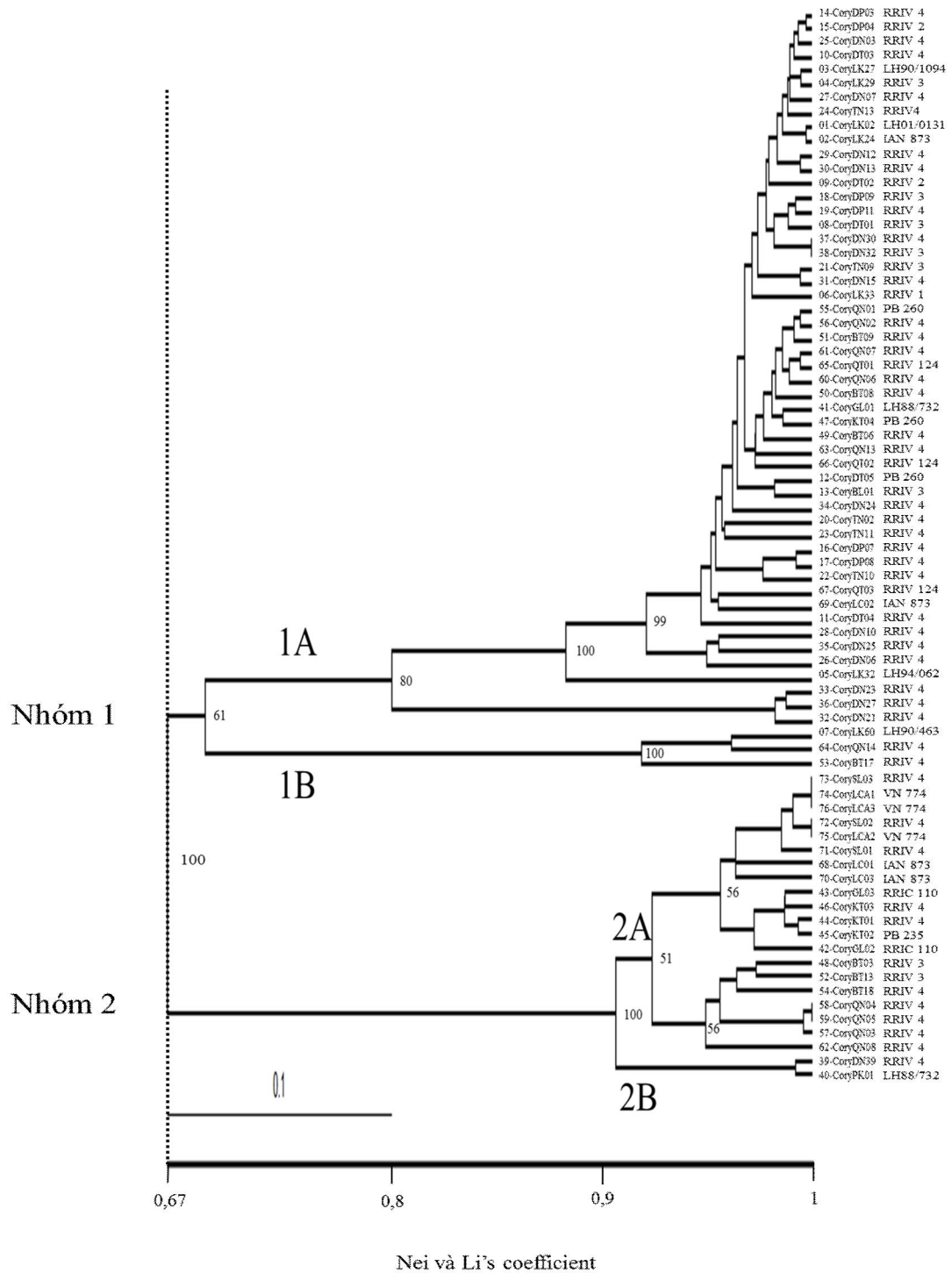
**Bảng 3.8.** Phân nhóm di truyền của 76 MPL nấm theo chỉ thị phân tử SRAP

<b>Nhóm di truyền</b>	<b>Địa điểm thu thập mẫu (tỉnh)</b>	<b>Tên mẫu nấm</b>
Phân nhóm 1	Bình Dương	CoryLK02, CoryLK24, CoryLK27, CoryLK29, CoryLK32, CoryLK33, CoryLK60, CoryDT01, CoryDT02, CoryDT03, CoryDT04, CoryDT05
	Bình Phước	CoryBL01, CoryDP03, CoryDP04, CoryDP07, CoryDP08, CoryDP09, CoryDP11,
	Tây Ninh	CoryTN02, CoryTN09, CoryTN10, CoryTN11, CoryTN13
	Đồng Nai	CoryDN03, CoryDN06, CoryDN07, CoryDN10, CoryDN12, CoryDN13, CoryDN15, CoryDN21, CoryDN23, CoryDN24, CoryDN25, CoryDN27, CoryDN30, CoryDN32
	Gia Lai	CoryGL01
	Kon Tum	CoryKT04
	Bình Thuận	CoryBT06, CoryBT08, CoryBT09, CoryBT17
	Quảng Nam	CoryQN01, CoryQN02, CoryQN06, CoryQN07, CoryQN13, CoryQN14
	Quảng Trị	CoryQT01, CoryQT02, CoryQT03
	Lai Châu	CoryLC02
Phân nhóm 2	Đồng Nai	CoryDN39
	Gia Lai	CoryPK01, CoryGL02, CoryGL03
	Kon Tum	CoryKT01, CoryKT02, CoryKT03
	Bình Thuận	CoryBT03, CoryBT13, CoryBT18
	Quảng Nam	CoryQN03, CoryQN04, CoryQN05, CoryQN08
	Lai Châu	CoryLC01, CoryLC03
	Sơn La	CorySL01, CorySL02, CorySL03
	Lào Cai	CoryLCA1, CoryLCA2, CoryLCA3





**Hình 3.7.** Gel điện di sản phẩm khuếch đại DNA của 76 MPL nấm *C. cassiicola* với 3 cặp primer SRAP. (A): Me2+ Em1; (B): Me2+ Em6; (C): Me5 + Em4 bằng kỹ thuật SRAP; Số thứ tự từ 1 đến 76 là số thứ tự MPL nấm; MW là thang chuẩn 100 bp (Promega). Nồng độ gel 1%, dung dịch điện di TBE 1X, nguồn điện 70V, thời gian điện di 120 phút ở nhiệt độ 28°C – 30°C.



**Hình 3.8.** Cây phân nhóm di truyền thu được từ phân tích UPGMA, sử dụng hệ số tương đồng Nei và Li's dựa trên 223 băng từ 30 cặp primer SRAP, chỉ ra mối quan hệ di truyền của 76 MPL *C. cassicola*. Số trên các nhánh biểu thị phần trăm giá trị bootstrap nhận được từ 1.000 lần lặp lại.

Bên cạnh phương pháp giải trình tự vùng rDNA-ITS, có nhiều loại đánh dấu phân tử đã được sử dụng rộng rãi để xác định biến thiên di truyền của các loài nấm, thực vật và động vật. Nhiều thành công trong việc sử dụng kỹ thuật PCR (Polymerase Chain Reaction) để phân loại nấm bệnh ở mức độ dưới loài đã được công bố (Gil-Lamaignere, 2003). Từ những năm 1998 – 2003, một số nghiên cứu sự khác biệt di truyền của nấm *C. cassiicola* bằng việc so sánh độ dài đoạn DNA vùng ITS và kỹ thuật RFLP nhưng không tìm thấy được sự đa hình nào giữa các MPL (Silva và ctv, 1998; Atan và Hamid, 2003). Bên cạnh đó, việc sử dụng chỉ thị phân tử RAPD (Randomly Amplified DNA Polymorphic) cũng đã hé lộ sự đa hình đáng kể giữa các nhóm MPL nấm *C. cassiicola*. Một số báo cáo cho thấy có mối tương quan giữa kết quả phân nhóm di truyền bằng chỉ thị phân tử RAPD với các nghiên cứu phân nhóm theo tính gây bệnh, vùng địa lý, ký chủ của các MPL (Silva và ctv, 1998; 2003; Saha và ctv, 2000; Atan và Hamid, 2003; Kurt, 2005) nhưng một số báo cáo khác lại không tìm thấy sự tương quan kể trên (Darmono và ctv, 1996; Romruensukharom, 2005). Hạn chế của kỹ thuật RAPD là tạo sản phẩm ít, kết quả không ổn định khi so sánh giữa các phòng thí nghiệm với nhau và kể cả trong cùng một phòng thí nghiệm (Jones và ctv, 1997).

Từ những năm 2008 – 2014, một số nghiên cứu sự khác biệt di truyền của nấm *C. cassiicola* bằng chỉ thị phân tử ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) đã cho thấy loài nấm này rất đa dạng về mặt di truyền. Sự phân nhóm di truyền dựa trên chỉ thị phân tử ISSR cho thấy, các MPL nấm trên cây cao su tại Malaysia có tương quan với vị trí địa lý và tính gây bệnh (Nguyen Anh Nghia và ctv, 2008). Trong khi đó, các MPL nấm trên cây cao su và một số cây ký chủ khác tại Việt Nam thì không có tương quan phù hợp giữa các phân nhóm di truyền với đặc điểm hình thái, tính gây bệnh, nguồn gốc địa lý hoặc nguồn gốc ký chủ (Nguyen Don Hieu và ctv, 2014).

Trong những năm gần đây, chỉ thị phân tử SRAP đã được sử dụng rộng rãi trong nghiên cứu đa dạng di truyền của nhiều loài thực vật và nấm gây bệnh thực vật. Kỹ thuật này được sử dụng nhằm khuếch đại đoạn “ORFs – Open Reading

Frames”, là trình tự nucleotide trong phân tử DNA có tiềm năng mã hóa peptide hoặc protein, bao gồm bộ mã khởi động ATG, tiếp theo là các bộ ba (mỗi bộ ba mã hóa một acid amin), và cuối cùng là bộ mã kết thúc TAA, TAG hoặc TGA. Chỉ thị SRAP sử dụng primer xuôi có độ dài 17 bp và primer ngược có 18 bp có chứa đoạn gen ORFs để khuếch đại số lượng của đoạn gen này. Ưu điểm của SRAP là sử dụng bộ primer phổ quát có thể sàng lọc các đột biến trên toàn bộ gen, độ tin cậy cao và kết quả đa hình DNA thường tương quan với các đặc điểm hình thái và kiểu hình (Li và ctv, 2014).

Đây là lần đầu tiên chỉ thị SRAP được sử dụng để phân tích sự đa dạng của *C. cassicola* trên cây cao su. Trong tổng số 223 băng DNA được khuếch đại từ 30 cặp mồi, có đến 93,3% các băng DNA được tổng hợp là đa hình, chứng tỏ giữa các MPL đang tồn tại mức độ biến động di truyền rất lớn. Cây phân nhóm di truyền có được bằng phân tích UPGMA dựa trên hệ số tương đồng Nei và Li với giá trị trung bình hệ số tương đồng là 67% đã chia 76 MPL thành 2 nhóm chính. Bên cạnh đó, giá trị tương đồng thấp giữa 2 nhóm nắm chính (67%) cho thấy có sự biến động di truyền lớn của các MPL.

Nếu xét theo vùng địa lý, có sự tồn tại đồng thời cả 2 nhóm di truyền tại tỉnh Đồng Nai, Gia Lai, Kon Tum, Quảng Nam và Lai Châu. Những MPL thu thập tại tỉnh Bình Dương, Bình Phước, Tây Ninh, Quảng Trị đều thuộc nhóm 1 và những MPL được thu thập tại tỉnh Sơn La, Lào Cai đều thuộc nhóm 2. Trong phân nhóm di truyền 1 có sự hiện diện của các MPL được thu thập tại 10/12 tỉnh, phân bố trải rộng trên các vùng trồng cao su từ Miền Đông Nam Bộ, Tây Nguyên, Miền Trung và Miền Núi Phía Bắc. Trong số 39 MPL thu thập tại vùng Đông Nam Bộ có đến 38/39 MPL thuộc phân nhóm di truyền 1, duy nhất MPL CoryDN39 thuộc phân nhóm di truyền 2. Trong số 37 MPL được thu thập tại các vùng Tây Nguyên, Miền Trung và Miền Núi Phía Bắc, có 16 MPL thuộc phân nhóm di truyền 1 và 21 MPL thuộc phân nhóm di truyền 2. Điều đáng lưu ý là trong số 22 MPL thuộc nhóm di truyền 2, thì có đến 21 MPL thuộc phân được thu thập tại các tỉnh thuộc vùng Tây Nguyên, Miền Trung và Miền Núi Phía Bắc (Hình 3.9).



**Hình 3.9.** Lược đồ phân bố địa lý của các phân nhóm di truyền nấm *C. cassicola* theo chỉ thị phân tử SRAP. Các số bên ngoài ngoặc đơn là số thứ tự mẫu nấm, các số bên trong ngoặc đơn là phân nhóm di truyền.

Như vậy, có sự phân nhóm di truyền theo vùng địa lý ở mức khá cao. Các MPL nấm CoryGL01, CoryKT04, CoryBT06, CoryBT08, CoryBT09, CoryBT17, CoryQN01, CoryQN02, CoryQN06, CoryQN07, CoryQN13, CoryQN14, CoryQT01, CoryQT02, CoryQT03, CoryLC02 thuộc phân nhóm di truyền 1, không loại trừ khả năng đây có thể là những mẫu nấm có nguồn gốc từ vùng Đông Nam Bộ được di nhập ra các vùng thuộc khu vực Tây Nguyên, Miền Trung và Miền Núi Phía Bắc qua con đường vận chuyển giống cao su. Trong khi đó, đối với MPL CoryDN39, thuộc phân nhóm di truyền 2 theo chỉ thị SRAP, có thể đây là một đột biến mới tại vùng Đông Nam Bộ. Trong một nghiên cứu trước đây, khi phân tích đa dạng di truyền 38 MPL nấm *C. cassiicola* từ 13 DVT cao su và một số cây ký chủ khác bằng kỹ thuật giải trình tự vùng rDNA-ITS và chỉ thị phân tử ISSR, Nguyen Don Hieu và ctv (2014) đi đến kết luận có ít nhất 2 nhóm di truyền nấm *C. cassiicola* đang lây nhiễm trên cây cao su và một số cây ký chủ khác ở Việt Nam. Trong nghiên cứu này, chỉ thị phân tử SRAP phân chia 76 MPL thành 2 nhóm chính nhưng có sự khác biệt về kết quả phân nhóm di truyền bằng chỉ thị SRAP và chỉ thị ISSR khi so sánh trên 11 MPL bao gồm: CoryLK02, CoryLK24, CoryLK27, CoryLK29, CoryLK33, CoryDT01, CoryDT03, CoryDT04, CoryDT05, CoryDP03, CoryDP04. Theo kết quả phân tích bằng kỹ thuật giải trình tự vùng rDNA-ITS và chỉ thị ISSR bởi Nguyen Don Hieu và ctv (2014), 11 MPL này thuộc 2 nhóm chính riêng biệt nhưng khi phân nhóm di truyền bằng chỉ thị SRAP, chúng thuộc cùng một nhóm.

Xét theo ký chủ (DVT cao su), có sự tồn tại đồng thời cả 2 nhóm di truyền trên các DVT RRIV 3, RRIV 4 và IAN 873, các DVT này đều bị xâm nhiễm gây bệnh bởi những MPL thuộc cả 2 nhóm di truyền, đây là 3 DVT đã được biết rõ rất miễn cảm với bệnh *Corynespora*. Trong khi đó, kết quả nghiên cứu chỉ ghi nhận sự hiện diện của nhóm di truyền 1 trên DVT PB 260, là DVT “chống chịu bệnh” tại Việt Nam. Các MPL nấm thu thập từ một số DVT khác như: LH01/0131, LH90/1094, LH94/062, LH90/463, RRIV106 đều thuộc nhóm 1. Trong khi, các MPL nấm thu thập từ DVT PB 235, LH88/732, RRIC 110, VNg 774 thuộc nhóm 2.

### 3.3. XÁC ĐỊNH SỰ HIỆN DIỆN CỦA GEN *CAS* TRÊN CÁC MPL NẤM *Corynespora cassiicola*

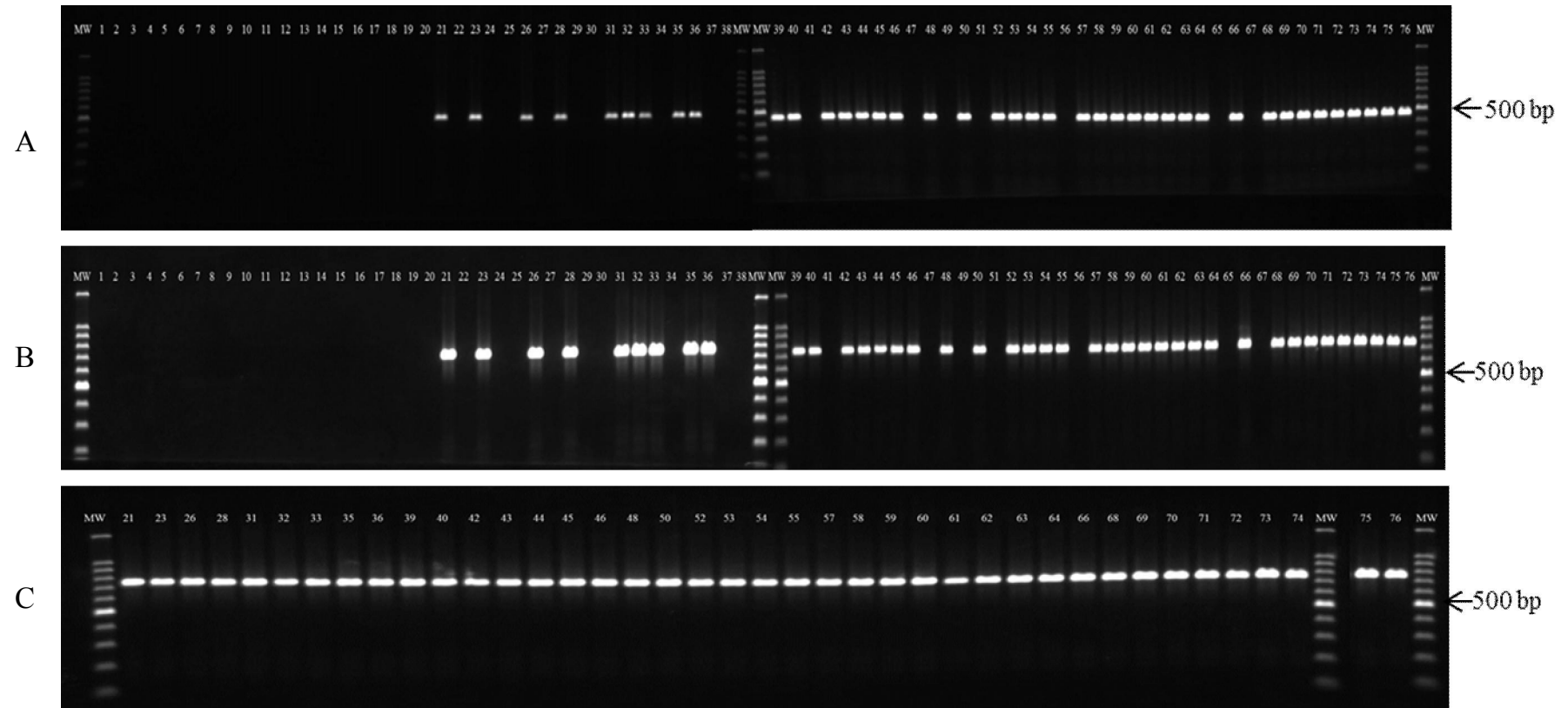
Các phản ứng PCR-*Cas* được thực hiện với từng cặp primer đặc hiệu theo thứ tự từ 1 đến 7 để nhận diện gen *Cas* (Bảng 2.3). Đầu tiên, thực hiện phản ứng PCR với cặp primer F1*Cas*U1-2-6 và R1*Cas*U1-2-6 để xác định sự hiện diện của gen *Cas1*, *Cas2* hoặc *Cas6*. Kết quả điện di sản phẩm phản ứng PCR thể hiện ở Hình 3.10A xuất hiện băng DNA với kích thước khoảng 450 – 500 bp tại 40 giếng trên 76 giếng, tương ứng với 40 MPL nấm có sự hiện diện của một trong ba gen *Cas1* hoặc *Cas2* hoặc *Cas6*. Tiếp theo, thực hiện phản ứng PCR với cặp primer *Cas*F17 và *Cas*R24 để xác định sự hiện diện của *Cas2*, kết quả điện di sản phẩm phản ứng PCR thể hiện ở Hình 3.10B xuất hiện băng DNA với kích thước 750 – 800 bp trên 40 giếng trùng khớp hoàn toàn với 40 MPL nấm đã thực hiện với cặp primer F1*Cas*U1-2-6 và R1*Cas*U1-2-6, chứng tỏ 40 MPL nấm này có gen *Cas2*. Những MPL nấm có gen *Cas2* bao gồm: CoryTN09, CoryTN11, CoryDN06, CoryDN10, CoryDN15, CoryDN21, CoryDN23, CoryDN25, CoryDN27, CoryDN39, CoryPK01, CoryGL02, CoryGL03, CoryKT01, CoryKT02, CoryKT03, CoryBT03, CoryBT08, CoryBT13, CoryBT17, CoryBT18, CoryQN01, CoryQN03, CoryQN04, CoryQN05, CoryQN06, CoryQN07, CoryQN08, CoryQN13, CoryQN14, CoryQT02, CoryLC01, CoryLC02, CoryLC03, CorySL01, CorySL02, CorySL03, CoryLCA1, CoryLCA2 và CoryLCA3 (Hình 3.10).

Sau đó, các phản ứng PCR-*Cas* tiếp tục được thực hiện lần lượt với các cặp primer *Cas*F18 + *Cas*R27 (nhận diện *Cas1*); *Cas*F16 + *Cas*R25 (nhận diện *Cas6*); F1*Cas*U3-4-5 + R1*Cas*U3-4-5 (nhận diện *Cas3*, *Cas4* và *Cas5*); *Cas*F20 + *Cas*R25 (nhận diện *Cas3*, *Cas4*); và cặp primer *Cas*F19 + *Cas*R26 (nhận diện *Cas5*) nhưng sản phẩm thu được không có băng DNA, chứng tỏ các MPL nấm không có các gen *Cas1*, *Cas6*, *Cas3*, *Cas4* hoặc *Cas5*.

Sản phẩm PCR với cặp primer *Cas*F17 - *Cas*R24 (*Cas2*) của 4 MPL đại diện gồm: CoryDN39, CoryPK01, CoryQN01 và CorySL02 được giải trình tự bởi First BASE (Singapore). Kết quả giải trình tự DNA cho thấy sản phẩm PCR của các

MPL có cùng kích thước là 759 bp trùng khớp với kích thước gen *Cas2* theo mô tả của Déon và ctv (2014). Trình tự gen *Cas2* của 4 MPL hoàn toàn giống nhau. Kết quả tìm kiếm sự tương đồng bằng công cụ BLAST cho thấy 4 MPL có độ tương đồng từ 99,4% – 99,9% so với các mẫu nấm *C. cassicola* mang gen *Cas2* đã được đăng ký trên cơ sở dữ liệu GenBank (Phụ lục 8). Điều này xác nhận và khẳng định sự hiện diện của gen *Cas2* trên 40 MPL trong số 76 MPL đã được nghiên cứu.





**Hình 3.10.** Gel điện di sản phẩm PCR khuếch đại gen *Cas* của các MPL nấm *C. cassiicola*. (A) Sản phẩm PCR của 76 MPL nấm với cặp primer F1*CasU1-2-6* và R1*CasU1-2-6* để nhận diện *Cas1*, *Cas2* và *Cas6*; (B) Sản phẩm PCR của 76 MPL nấm với cặp primer *CasF17* và *CasR24* để nhận diện *Cas2*; (C) Tổng hợp 40 MPL nấm có sự hiện diện của gen *Cas2*. Số thứ tự từ 1 đến 76 là số thứ tự MPL nấm; MW là thang chuẩn 100 bp (Promega). Nồng độ gel 1%, dung dịch điện di TBE 1X, nguồn điện 70V, thời gian điện di 45 phút ở nhiệt độ 28°C – 30°C.

Trong những năm gần đây, các nghiên cứu về đa dạng di truyền của nấm *C. cassiicola* thường có xu hướng quan tâm đến gen mã hóa độc tố cassiicolin (gen *Cas*) bởi vì nhóm gen này được cho là có vai trò quan trọng liên quan với sự đa dạng di truyền và tính gây bệnh của nấm. Gen mã hóa độc tố cassiicolin lần đầu tiên được phát hiện và mô tả bởi Déon và ctv (2012a). Có 6 nhóm gen *Cas* bao gồm *Cas1*, *Cas2*, *Cas3*, *Cas4*, *Cas5*, *Cas6* đã được phát hiện trên các MPL nấm *C. cassiicola* trên cây cao su và một số cây ký chủ khác, những MPL nấm chưa phát hiện có gen *Cas* được ký hiệu là *Cas0* (Déon và ctv, 2014).

Trình tự các nhóm gen *Cas* đã được giải mã và đăng ký trên ngân hàng dữ liệu Genbank (Déon và ctv, 2012a; 2012b; 2014). Sự khác biệt về cấu trúc giữa các nhóm gen *Cas* được xác định dựa trên sự thay đổi acid amin trên vùng N-terminal (chuỗi peptide tín hiệu và liên kết) và quan trọng hơn là vùng C-terminal (chuỗi peptide mã hóa protein cassiicolin). Gen *Cas2* khác với *Cas1*, *Cas2*, *Cas3*, *Cas4*, *Cas5* bởi sự thay thế 1 – 2 acid amin và khác đến 9 acid amin với gen *Cas6*. Cho dù vai trò và chức năng của một số acid amin được biết là có khả năng phản ứng với quá trình hoạt hóa của nấm nhưng biểu hiện của các dạng protein cassiicolin của các nhóm gen *Cas* khác nhau vẫn chưa được rõ (Bather và ctv, 2007; Déon và ctv, 2014). Kết quả phân tích trên toàn bộ hệ gen của MPL nấm CCP (*Cas1*) bằng mô hình dự đoán dựa trên kỹ thuật *in silico* cho thấy có khoảng 2.870 effector giả định, bao gồm CAZymes, lipases, peptidases, proteins bài tiết và enzymes trong hoạt động biến dưỡng thứ cấp của nấm (Lopez và ctv, 2018). Trong khi đó, cassiicolin chỉ là một protein effector phân tử nhỏ trong số các effector giả định kể trên, điều này cho thấy mức độ đa dạng và phức tạp của nấm *C. cassiicola*.

Nghiên cứu này đã phát hiện 40 MPL trong tổng số 76 MPL nấm *C. cassiicola* trên cây cao su ở Việt Nam có sự hiện diện của gen *Cas2* (chiếm tỷ lệ 52,6%) và 36 MPL còn lại không phát hiện gen *Cas* được ký hiệu là *Cas0*. Trong số 17 MPL tạo sắc tố hồng trên môi trường nuôi cấy PSA, có 8 MPL mang gen *Cas2* và 9 MPL không phát hiện gen *Cas* (*Cas0*). Lược đồ mô tả sự phân bố địa lý của phân nhóm gen *Cas* trên nấm *C. cassiicola* tại các vùng địa lý khác nhau được trình bày tại Hình 3.11.

Có sự khác biệt khá rõ về kiểu di truyền mang gen *Cas* của những MPL nấm *C. cassiicola* trên cây cao su tại Việt Nam so với các kết quả nghiên cứu trước đây tại các quốc gia khác. Theo kết quả nghiên cứu của Déon và ctv (2014), các gen *Cas1*, *Cas3*, *Cas4*, *Cas5* được phát hiện trên các MPL nấm *C. cassiicola* từ cây cao su và *Cas2*, *Cas6* trên các MPL nấm từ cây ký chủ khác, duy nhất MPL CC04 mang gen *Cas2* có nguồn gốc từ cây cao su tại Trung Quốc. Tiếp theo sau đó, Liu và ctv (2015) đã phát hiện gen *Cas2*, *Cas5* trên 40 MPL nấm *C. cassiicola* thu thập từ cây cao su và một số cây ký chủ khác tại Trung Quốc, trong đó có 6 MPL nấm mang gen *Cas2* có nguồn gốc từ cây cao su. Nhóm tác giả đi đến nhận định: những mẫu nấm *C. cassiicola* trên cây cao su tại Trung Quốc có nguồn gốc từ các cây ký chủ khác. Trong khi đó, Shuib và ctv (2015) phát hiện có 13 MPL nấm mang gen *Cas5* và 1 MPL mang gen *Cas4* trong số 26 MPL nấm *C. cassiicola* trên cây cao su tại Malaysia. Như vậy, kết quả nghiên cứu tại Việt Nam cùng với kết quả của những nghiên cứu trước đây tại các quốc gia khác đã chỉ ra rằng, sự đa dạng di truyền giữa các nhóm nấm mang gen *Cas* khác nhau được thể hiện rõ qua sự phân bố của các gen tại các vùng địa lý khác nhau. Gen *Cas1* được tìm thấy trên các MPL nấm được thu thập từ cây cao su tại Ghana, Cameroon và Philippines, gen *Cas3* và *Cas4* được tìm thấy trên các MPL nấm tại Brazil, gen *Cas5* được tìm thấy trên các MPL nấm tại Malaysia và Sri Lanka (Déon và ctv, 2014). Gen *Cas4* và *Cas5* được tìm thấy trên những MPL nấm tại Malaysia (Shuib và ctv, 2015), gen *Cas2* và *Cas5* được tìm thấy trên những MPL nấm tại Trung Quốc (Liu và ctv, 2015). Trong khi đó, gen *Cas2* được tìm thấy trên những MPL nấm từ cây cao su tại Việt Nam.



**Hình 3.11.** Lược đồ phân bố địa lý của các phân nhóm di truyền nấm *C. cassicola* theo gen *Cas.* Các số bên ngoài ngoặc đơn là số thứ tự mẫu nấm, các số bên trong ngoặc đơn là phân nhóm gen *Cas.*

Tương tự hầu hết các nghiên cứu trước đây về đa dạng di truyền của nấm *C. cassiicola*, kết quả nghiên cứu cho thấy không có mối tương quan rõ rệt giữa sự đa dạng hình thái của các MPL nấm với trình tự vùng rDNA-ITS hay chỉ thị phân tử SRAP cũng như là sự tồn tại của gen *Cas*. Lược đồ mô tả sự phân bố các nhóm di truyền theo trình tự vùng rDNA-ITS, SRAP và gen *Cas* của các MPL *C. cassiicola* được trình bày tại Hình 3.12.

Khi so sánh kết quả phân nhóm di truyền của các MPL dựa trên 3 chỉ thị phân tử cho thấy, trong phân nhóm di truyền 2 theo chỉ thị phân tử SRAP có 22 MPL nấm cũng thuộc phân nhóm 2 theo trình tự vùng rDNA-ITS và các MPL này đều mang gen *Cas2*. Tuy nhiên, trong số 54 MPL nấm thuộc phân nhóm di truyền 1 theo chỉ thị phân tử SRAP thì có 14 MPL nấm thuộc phân nhóm di truyền 2, 24 MPL thuộc phân nhóm di truyền 1 và 3 MPL thuộc phân nhóm di truyền 3 theo trình tự vùng rDNA-ITS, trong đó những MPL nấm mang gen *Cas2* và không có gen *Cas* (*Cas0*) hiện diện và phân bố một cách ngẫu nhiên trong nhóm này. Như vậy, khi so sánh kết quả phân nhóm di truyền của các MPL nấm bằng các chỉ thị phân tử khác nhau (trình tự vùng rDNA-ITS, SRAP và gen *Cas*) thì không có sự tương quan phù hợp giữa chúng.



**Hình 3.12.** Lược đồ phân bố địa lý của các phân nhóm di truyền nấm *C. cassicola* theo chỉ thị phân tử rDNA-ITS, SRAP và CAS. Các số bên ngoài ngoặc đơn là số thứ tự mẫu nấm, các số bên trong ngoặc đơn là phân nhóm di truyền.

### **3.4. KHẢO SÁT TÍNH GÂY BỆNH CỦA 76 MPL NẤM *Corynespora cassiicola* TRÊN DÒNG VÔ TÍNH CAO SU RRIV 4 (MẮN CẢM BỆNH) VÀ PB 260 (CHỐNG CHỊU BỆNH)**

Tất cả 76 MPL đều gây bệnh trên 2 DVT cao su RRIV 4 và PB 260. Mức độ gây bệnh biến động từ mức nhẹ với vết bệnh nhỏ không màu nằm dưới vị trí chủng cho đến mức rất nặng với vết bệnh lớn và hình thành sợi nấm trên vết chủng.

Trên DVT RRIV 4, mức độ gây bệnh của 76 MPL biến thiên từ mức trung bình cho đến rất nặng với CSB từ 25,7% đến 100%. Trong đó nhóm gây bệnh rất nặng gồm 45 MPL với CSB 76,4% – 100%, nhóm gây bệnh nặng gồm 18 MPL với CSB 52,1% – 75,3%, nhóm gây bệnh trung bình gồm 13 MPL với CSB 25,7% – 49,7% (Bảng 3.9; Phụ bảng 3, Phụ lục).

Trên DVT PB 260, mức độ gây bệnh của 76 MPL biến thiên từ mức nhẹ cho đến nặng với CSB 12,7% – 74,3%. Trong đó nhóm gây bệnh nặng gồm 35 MPL với CSB từ 50,7% đến 74,3%, nhóm gây bệnh trung bình gồm 30 MPL với CSB 26,7% – 49,7%, nhóm gây bệnh nhẹ gồm 11 MPL với CSB 12,5% – 24,7% (Bảng 3.10; Phụ bảng 3, Phụ lục).

Nhìn chung, mức độ gây bệnh của 76 MPL nấm trên DVT RRIV 4 nặng hơn rõ rệt so với DVT PB 260. Trên DVT RRIV 4, có đến 63 MPL CSB > 51%, trong đó 10 MPL gây bệnh ở mức tối đa (CSB 100%), 19 MPL CSB từ 90,6% đến 99,7%, 13 MPL CSB từ 80,2% đến 88,9%, 10 MPL CSB từ 70,1% đến 78,5% và 11 MPL CSB từ 52,1% đến 69,1%. Trên DVT PB 260, có 35 MPL CSB > 51%, trong đó 6 MPL có CSB cao nhất từ 70,1% đến 74,3%, 29 MPL CSB từ 51% đến 69,8%. Kết quả phân tích thống kê CSB theo trắc nghiệm đa đoạn Duncan được trình bày ở Phụ bảng 4 và Phụ lục 9.

**Bảng 3.9.** Mức độ gây bệnh của nấm *C. cassiicola* trên lá cao su DVT RRIV 4 ở thời điểm 7 ngày sau chủng

<b>Mức độ gây bệnh</b>	<b>Số MPL</b>	<b>Tên mẫu nấm</b>
Trung bình	13	CoryLK29, CoryDP08, CoryDP09, CoryDP10, CoryDN21, CoryDN30, CoryPK01, CoryBT09, CoryQN02, CoryQN03, CoryQN07, CoryQN13, CoryLC02
Nặng	17	CoryLK33, CoryDT04, CoryBL01, CoryTN13, CoryDN03, CoryDN07, CoryDN12, CoryDN24, CoryDN32, CoryGL02, CoryGL03, CoryBT06, CoryBT08, CoryBT18, CoryQN04, CoryQT01, CoryQT03
Rất nặng	46	CoryLK02, CoryLK24, CoryLK27, CoryLK32, CoryLK60, CoryDT01, CoryDT02, CoryDT03, CoryDT05, CoryDP03, CoryDP04, CoryDP07, CoryDP11, CoryTN02, CoryTN09, CoryTN10, CoryTN11, CoryDN06, CoryDN13, CoryDN15, CoryDN23, CoryDN25, CoryDN27, CoryDN39, CoryGL01, CoryKT01, CoryKT02, CoryKT03, CoryKT04, CoryBT03, CoryBT13, CoryBT17, CoryQN01, CoryQN05, CoryQN06, CoryQN08, CoryQN14, CoryQT02, CoryLC01, CoryLC03, CorySL01, CorySL02, CorySL03, CoryLCA1, CoryLCA2, CoryLCA3



**Bảng 3.10.** Mức độ gây bệnh của nấm *C. cassiicola* trên lá cao su DVT PB 260 ở thời điểm 7 ngày sau chủng

<b>Mức độ gây bệnh</b>	<b>Số MPL</b>	<b>Tên mẫu nấm</b>
Nhẹ	11	CoryLK24, CoryLK32, CoryDP04, CoryDP07, CoryDP08, CoryDP09, CoryBT06, CoryBT08, CoryQN03, CoryQN05, CorySL03
Trung bình	30	CoryLK29, CoryLK60, CoryDT02, CoryDT04, CoryDT05, CoryBL01, CoryDP11, CoryTN10, CoryTN11, CoryTN13, CoryDN06, CoryDN13, CoryDN24, CoryPK01, CoryGL01, CoryKT02, CoryBT03, CoryBT13, CoryBT18, CoryQN02, CoryQN04, CoryQN06, CoryQN07, CoryQN13, CoryQN14, CoryQT01, CoryLC01, CoryLC02, CoryLCA2, CoryLCA3
Nặng	35	CoryLK02, CoryLK27, CoryLK33, CoryDT01, CoryDT03, CoryDP03, CoryTN02, CoryTN09, CoryDN03, CoryDN07, CoryDN10, CoryDN12, CoryDN15, CoryDN21, CoryDN23, CoryDN25, CoryDN27, CoryDN30, CoryDN32, CoryDN39, CoryGL02, CoryGL03, CoryKT01, CoryKT03, CoryKT04, CoryBT09, CoryBT17, CoryQN01, CoryQN08, CoryQT02, CoryQT03, CoryLC03, CorySL01, CorySL02, CoryLCA1

Nấm *C. cassiicola* có phổ ký chủ rộng, gây bệnh trên nhiều cây ký chủ khác nhau. Quá trình tiến hóa của nấm *C. cassiicola* có liên quan trực tiếp với sự biến thiên thay đổi mức độ gây bệnh của các MPL nấm. Một số nghiên cứu cho thấy ảnh hưởng của nguồn gốc ký chủ hoặc vùng địa lý đến tính gây bệnh của các mẫu nấm (Saha và ctv, 2002; Cutrim và Silva, 2003; Atan và Hamid, 2003; Silva và ctv, 2003; Oktavia và ctv, 2017). Một số nghiên cứu khác cho thấy những MPL nấm có cùng nguồn gốc ký chủ hoặc cùng phân nhóm di truyền nhưng khả năng gây bệnh rất khác biệt, một MPL có thể gây bệnh mạnh cho ký chủ này nhưng gây bệnh nhẹ hoặc không gây bệnh trên ký chủ khác (Furukawa và ctv, 2008; Dixon và ctv, 2009; Shimomoto và ctv, 2011). Các nòi nấm hay phân nhóm di truyền nấm *C. cassiicola* thường biểu hiện tính gây bệnh ở mức độ cao thấp khác nhau trên một DVT cao su (Nguyen Anh Nghia và ctv, 2008; Oktavia và ctv, 2017). Trong nhiều trường hợp, một MPL có khả năng gây bệnh mạnh với một hoặc vài DVT cao su này mà không gây bệnh hoặc gây bệnh nhẹ với các DVT cao su khác.

Trong nghiên cứu này, 76 MPL *C. cassiicola* thuộc các phân nhóm di truyền và vùng địa lý khác nhau được khảo sát mức độ gây bệnh trên DVT RRIV 4 (mẫn cảm bệnh) và PB 260 (chống chịu bệnh). Tất cả 76 MPL đều gây bệnh trên 2 DVT cao su với mức độ biến thiên rất lớn. Một số MPL gây bệnh rất nặng trên RRIV 4 nhưng gây bệnh ở mức nhẹ trên PB 260 gồm có: CoryLK24, CoryLK32, CoryDP04, CoryDP07, CoryQN05 và CorySL03. Ngược lại, một số MPL gây bệnh nặng trên DVT PB 260 nhưng gây bệnh ở mức trung bình trên RRIV 4 như: CoryDN10, CoryDN21, CoryDN30 và CoryBT09. Điều này hé lộ có sự tương tác giữa tác nhân gây bệnh (MPL nấm) với cây ký chủ (DVT cao su).

Trong số 46 MPL gây bệnh rất nặng trên DVT RRIV 4, xét theo phân nhóm di truyền dựa trên trình tự vùng rDNA-ITS: có 17/38 MPL (nhóm 1), 21/35 MPL (nhóm 2) và 3/3 MPL (nhóm 3); dựa trên chỉ thị SRAP: có 29/54 MPL (nhóm 1) và 16/22 MPL (nhóm 2); xét theo phân nhóm gen *Cas*: có 26/40 MPL (nhóm *Cas2*) và 19/46 MPL (nhóm *Cas0*) gây bệnh rất nặng trên DVT này. Đồng thời xét theo vùng địa lý: có 22/39 MPL (vùng Đông Nam Bộ), 23/37 MPL (các vùng Tây Nguyên,

Miền Trung và Miền Núi Phía Bắc) gây bệnh rất nặng trên DVT RRIV 4. Trong số 35 MPL gây bệnh nặng trên DVT PB 260, xét theo phân nhóm di truyền dựa trên trình tự vùng rDNA-ITS: có 20/37 MPL (nhóm 1), 14/36 MPL (nhóm 2) và 1/3 MPL (nhóm 3); dựa trên chỉ thị SRAP: có 26/54 MPL (nhóm 1) và 9/22 MPL (nhóm 2); xét theo phân nhóm gen *Cas*: có 19/40 MPL (nhóm *Cas2*) và 16/46 MPL (nhóm *Cas0*) gây bệnh nặng trên DVT này. Đồng thời xét theo vùng địa lý: có 20/39 MPL (vùng Đông Nam Bộ), 15/37 MPL (vùng Tây Nguyên, Miền Trung và Miền Núi Phía Bắc) gây bệnh nặng trên DVT PB 260. Như vậy, có sự khác biệt rất rõ về mức độ gây bệnh của những MPL nấm thuộc cùng một nhóm di truyền hay vùng địa lý đối với mỗi DVT cao su, kết quả này khá phù hợp với nghiên cứu trước đây của Furukawa và ctv (2008); Dixon và ctv (2009); Shimomoto và ctv (2011). Trong số 36 MPL không phát hiện gen *Cas* (*Cas0*), có nhiều MPL gây bệnh nặng trên cả 2 DVT cao su. Điều này cho thấy, có thể còn tồn tại những nhóm gen *Cas* khác chưa được biết đến và/hoặc cassicolin không phải là tác nhân duy nhất tác động mang tính quyết định với mức độ gây bệnh của MPL nấm *C. cassiicola*.

Từ các kết quả phân tích đa dạng di truyền của 76 MPL nấm *C. cassiicola* dựa trên đặc điểm hình thái, trình tự vùng rDNA-ITS, chỉ thị phân tử SRAP, phân nhóm theo sự hiện diện của gen *Cas* và khảo sát mức độ gây bệnh của những MPL này trên 2 DVT cao su RRIV 4 và PB 260. Sáu (6) MPL nấm đã được chọn đại diện cho các phân nhóm di truyền và vùng địa lý để đánh giá tính gây bệnh trên 12 DVT cao su ở điều kiện *in vivo* trong phòng thí nghiệm và chủng bệnh trong nhà lưới.

### **3.5. ĐÁNH GIÁ TÍNH GÂY BỆNH CỦA 6 MPL NẤM *Corynespora cassiicola* ĐẠI DIỆN CHO CÁC PHÂN NHÓM DI TRUYỀN VÀ VÙNG ĐỊA LÝ KHÁC NHAU TRÊN 12 DVT CAO SU**

#### **3.5.1. Điều kiện phòng thí nghiệm**

Tất cả 6 MPL nấm *C. cassiicola* đều gây bệnh trên 12 DVT cao su thử nghiệm. Ở thời điểm 3 ngày sau lây bệnh, triệu chứng nấm xâm nhiễm gây bệnh trên lá đã được ghi nhận. Thời điểm 7 ngày sau chủng, triệu chứng rõ rệt với vết bệnh lớn và hình thành sợi nấm từ vết chủng trên lá của nhiều DVT cao su. Mức độ

gây bệnh của 6 MPL nắm được thể hiện qua CSB trên 12 DVT cao su được trình bày tại Bảng 3.11.

Mức độ gây bệnh trung bình của mỗi MPL trên 12 DVT cao su biến thiên từ mức trung bình đến nặng với CSB trung bình từ 48,2% đến 69,4%. MPL CorySL02 gây bệnh mạnh nhất với CSB trung bình 69,4%, kể đến là các MPL CoryDP03, CoryKT04, CoryBT17 và CoryLK02 với CSB trung bình từ 57,8% đến 62,1%, MPL CoryDN39 gây bệnh thấp nhất có CSB trung bình 48,2%. Bên cạnh đó, mức độ nhiễm bệnh trung bình của mỗi DVT cao su đối với 6 MPL nắm biến thiên từ mức trung bình đến rất nặng (CSB trung bình 31,7% – 94,6%). DVT RRIV 4 nhiễm bệnh ở mức rất nặng với tất cả 6 MPL nắm (CSB trung bình 94,6%), RRIV 1 và RRIV 106 nhiễm bệnh ở mức rất nặng với MPL CoryDP03 và CorySL02, nhiễm nặng với các MPL khác, các DVT PB 255, RRIV 209 nhiễm bệnh ở mức nặng (CSB trung bình 64,7% – 69,0%), các DVT PB 312, nhiễm bệnh ở mức trung bình (CSB trung bình 43,9% – 58,4%), DVT RRIV 109 và RRIV 124 nhiễm bệnh ở mức nhẹ đến trung bình với CSB trung bình từ 31,7% đến 38,7% (Bảng 3.11).

Kết quả phân tích biến lượng (GLM, General Linear Model Analysis) cho thấy, có tương tác giữa hai yếu tố MPL và DVT lên mức độ gây bệnh của nấm (Phụ lục 10). Điều này mang ý nghĩa là những MPL nắm có mức độ gây bệnh khác nhau đối với những DVT cao su (một MPL có thể gây bệnh mạnh trên DVT này nhưng gây bệnh nhẹ trên DVT khác), và mức độ miễn cảm của những DVT cao su là khác nhau đối với mỗi MPL (một DVT cao su có thể miễn cảm với MPL này nhưng kháng hoặc “chống chịu” với MPL khác). Theo Abebe (2000), khi kết quả phân tích có tương tác giữa 2 yếu tố, cần có thêm bước phân tích xét riêng tác động của từng yếu tố để thấy rõ hơn tác động của từng yếu tố đến chỉ tiêu quan trắc. Do đó, trong thí nghiệm này, mức độ gây bệnh của mỗi MPL nắm được phân tích riêng trên 12 DVT cao su, đồng thời mức độ nhiễm bệnh của mỗi DVT cao su được phân tích riêng trên 6 MPL nắm (Bảng 3.11; Kết quả phân tích thống kê CSB theo trắc nghiệm đa đoạn Duncan được trình bày ở Phụ bảng 5 và Phụ lục 10).

Mức độ gây bệnh xét theo từng MPL nấm trên 12 DVT cao su (Bảng 3.11, số liệu được xếp theo cột) như sau: (1) MPL CoryLK02 gây bệnh rất nặng trên DVT RRIV 4 (CSB 100%), nặng trên PB 260, RRIV 114, PB 255, RRIV 209, RRIV 106, RRIV 1 (CSB 63,5% – 72,6%), trung bình trên RRIV 124, RRIV 206, RRIV 230 (CSB 30,9% – 41,3%) và gây bệnh nhẹ trên RRIV 109 (CSB 25,3%); (2) MPL CoryDP03 gây bệnh rất nặng trên DVT RRIV 106, RRIV 4, RRIV 1 (CSB 83,7% – 92,0%), nặng trên RRIV 114, RRIV 206, PB 255, RRIV 209 (CSB 61,8% – 74,7%), trung bình trên RRIV 124, RRIV 230, RRIV 109, PB 312, PB 260 (CSB 35,1% – 50,3%); (3) MPL CoryDN39 gây bệnh rất nặng trên RRIV 4 (CSB 86,8%), nặng trên RRIV 1, RRIV 106, PB 255 (CSB 56,9% – 66,7%), trung bình trên PB 312, RRIV 230, RRIV 109, RRIV 124, PB 260, RRIV 114, RRIV 209, RRIV 206, (CSB 26,4% – 41,7%); (4) MPL CoryKT04 gây bệnh rất nặng trên RRIV 4 (CSB 99,7%, CBTB 4,0), nặng trên PB 312, RRIV 230, RRIV 106, RRIV 209, RRIV 114, RRIV 1 (CSB 57,6% – 72,9%), trung bình trên RRIV 124, RRIV 109, RRIV 206, PB 255, PB 260, (CSB 28,5% – 46,5); (5) MPL CoryBT17 gây bệnh rất nặng trên RRIV 4 (CSB 91,7%), nặng trên, PB 260, PB 255, RRIV 106, RRIV 1, RRIV 209, (CSB 55,6% – 74,0%), trung bình trên RRIV 109, RRIV 124, PB 312, RRIV 114, RRIV 230, RRIV 206 (CSB 27,1% – 48,6%); (6) MPL CorySL02 gây bệnh rất nặng trên RRIV 209, RRIV 1, RRIV 106, RRIV 4 (CSB 79,2% – 99,7%), nặng trên RRIV 114, RRIV 206, RRIV 124, PB 312, PB 260, PB 255 (CSB 58,3% – 75%), trung bình trên RRIV 109, RRIV 230 (CSB 34,0% – 50%).

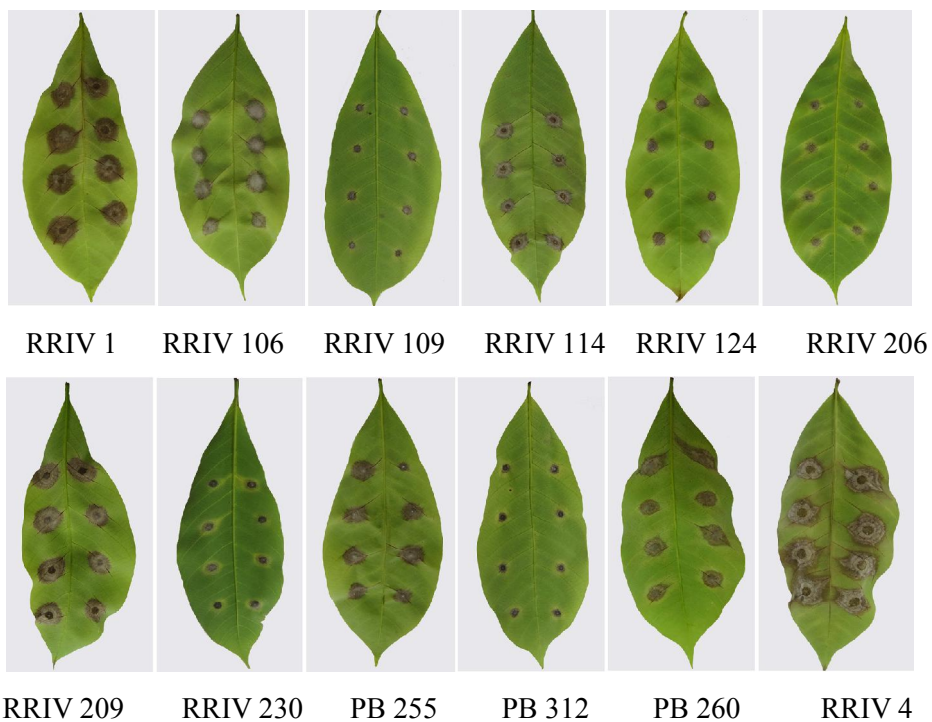
Mức độ miễn cảm bệnh xét theo từng DVT cao su với 6 MPL nấm (Bảng 3.11, số liệu được xếp theo hàng) như sau: (1) RRIV 1 nhiễm bệnh rất nặng khi được chủng bệnh bởi MPL CorySL02, CoryDP03 (CSB 85,8% – 92,0%), nhiễm nặng bởi CoryDN39, CoryBT17, CoryLK02, CoryKT04 (CSB 56,9% – 72,9%); (2) RRIV 106 nhiễm bệnh rất nặng với MPL CoryDP03, CorySL02 (CSB 83,7% – 94,4%), nhiễm nặng với CoryDN39, CoryKT04, CoryBT17, CoryLK02 (CSB 66,7% – 71,2%); (3) RRIV 109 nhiễm bệnh ở mức trung bình với MPL CoryBT17, CoryKT04, CoryDN39, CorySL02, CoryDP03 (CSB 27,1% – 41,3%), nhiễm nhẹ

với CoryLK02, (CSB 25,3%); (4) RRIV 114 nhiễm bệnh nặng với MPL CorySL02, CoryDP03, CoryLK02, CoryKT04 (CSB 58,3% – 69,1%), nhiễm trung bình với CoryDN39, CoryBT17 (CSB 45,5% – 47,2%); (5) RRIV 124 nhiễm bệnh nặng khi được chủng bệnh bởi MPL CorySL02 (CSB 61,5%), nhiễm trung bình bởi CoryKT04, CoryDN39, CoryDP03, CoryBT17, CoryLK02 (CSB 28,5% – 39,6%); (6) RRIV 206 nhiễm nặng với MPL CoryDN39, CoryBT17, CorySL02, CoryDP03 (CSB 50,7% – 66,3%), nhiễm trung bình với CoryLK02 CoryKT04, (CSB 39,9% – 44,4%); (7) RRIV 209 nhiễm nặng với MPL CoryKT04, CoryLK02, CoryBT17, CoryDP03, CorySL02 (CSB 68,4% – 79,2%), nhiễm trung bình với CoryDN39 (CSB 47,2%); (8) RRIV 230 nhiễm nặng bởi MPL CoryKT04 (CSB 62,8%), nhiễm trung bình bởi CoryDN39, CoryDP03, CoryLK02, CoryBT17, CorySL02 (CSB 28,1% – 50,0%); (9) PB 255 nhiễm nặng với MPL CoryBT17, CoryDN39, CoryLK02, CoryDP03, CorySL02 (CSB 58,3% – 75,0%), nhiễm trung bình với CoryKT04, (CSB 46,5%); (10) PB 312 nhiễm nặng với MPL CoryKT04, CorySL02 (CSB 57,6% – 63,9%), nhiễm trung bình với CoryDN39, CoryLK02, CoryDP03, CoryBT17, (CSB 26,4% – 41,7%); (11) PB 260 nhiễm nặng bởi MPL CoryBT17, CoryLK02, CorySL02 (CSB 55,6% – 71,2%), nhiễm trung bình bởi CoryDN39, CoryKT04, CoryDP03, (CSB 41,7% – 50,3%); (12) RRIV 4 nhiễm bệnh nặng với cả 6 MPL nấm, CSB từ 86,8% đến 100%.

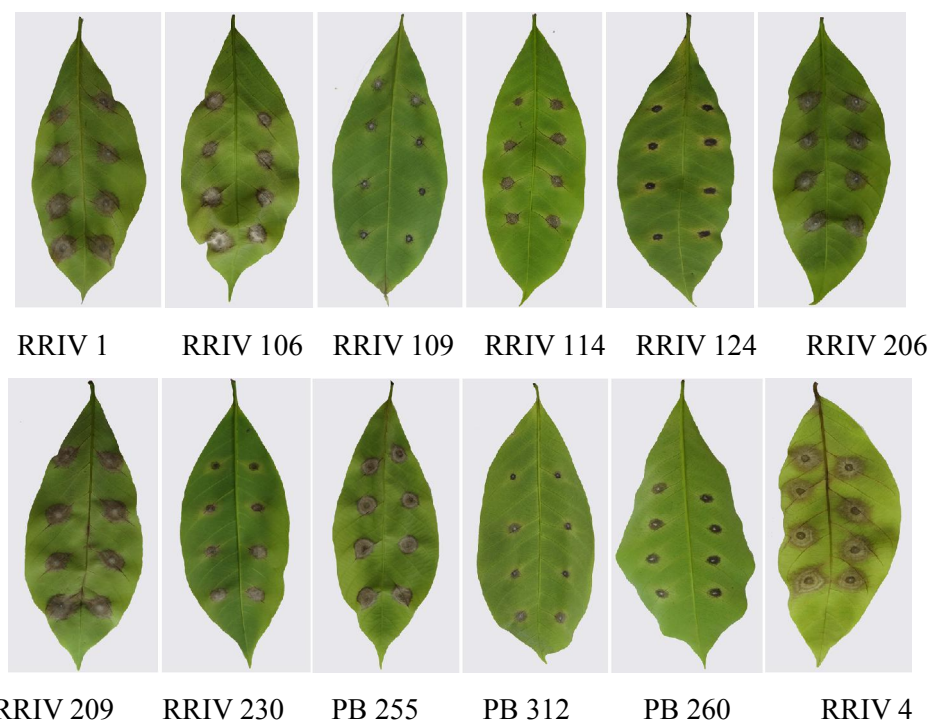
**Bảng 3.11.** Mức độ gây bệnh của 6 MPL nấm trên lá cắt rời của 12 DVT cao su ở thời điểm 7 ngày sau chủng

DVT	Mẫu phân lập nấm												TB (DVT)
	CoryLK02		CoryDP03		CoryDN39		CoryKT04		CoryBT17		CorySL02		
	CSB (%)	MGB	CSB (%)	MGB	CSB (%)	MGB	CSB (%)	MGB	CSB (%)	MGB	CSB (%)	MGB	
RRIV 1	72,6	Nặng	92,0	RN	56,9	Nặng	72,9	Nặng	70,8	Nặng	85,8	RN	<b>75,2</b>
RRIV 106	71,2	Nặng	83,7	RN	66,7	Nặng	68,1	Nặng	69,4	Nặng	94,4	RN	<b>75,6</b>
RRIV 109	25,3	Nhẹ	41,3	TB	30,9	TB	31,3	TB	27,1	TB	34,0	TB	<b>31,7</b>
RRIV 114	68,4	Nặng	61,8	Nặng	45,5	TB	69,1	Nặng	47,2	TB	58,3	Nặng	<b>58,4</b>
RRIV 124	39,6	TB	35,1	TB	31,3	TB	28,5	TB	36,1	TB	61,5	Nặng	<b>38,7</b>
RRIV 206	39,9	TB	66,3	Nặng	50,7	Nặng	44,4	TB	54,2	Nặng	59,7	Nặng	<b>52,5</b>
RRIV 209	70,5	Nặng	74,7	Nặng	47,2	TB	68,4	Nặng	74,0	Nặng	79,2	Nặng	<b>69,0</b>
RRIV 230	43,1	TB	36,1	TB	28,1	TB	62,8	Nặng	48,6	TB	50,0	TB	<b>44,8</b>
PB 255	69,1	Nặng	72,6	Nặng	66,7	Nặng	46,5	TB	58,3	Nặng	75,0	Nặng	<b>64,7</b>
PB 312	30,9	TB	41,7	TB	26,4	TB	57,6	Nặng	43,1	TB	63,9	Nặng	<b>43,9</b>
PB 260	63,5	Nặng	50,3	TB	41,7	TB	49,0	TB	55,6	Nặng	71,2	Nặng	<b>55,2</b>
RRIV 4	100,0	RN	89,6	RN	86,8	RN	99,7	RN	91,7	RN	99,7	RN	<b>94,6</b>
<b>TB (MPL)</b>	<b>57,8</b>		<b>62,1</b>		<b>48,2</b>		<b>58,2</b>		<b>56,3</b>		<b>69,4</b>		

\*MGB: Mức gây bệnh; TB: trung bình; RN: rất nặng.

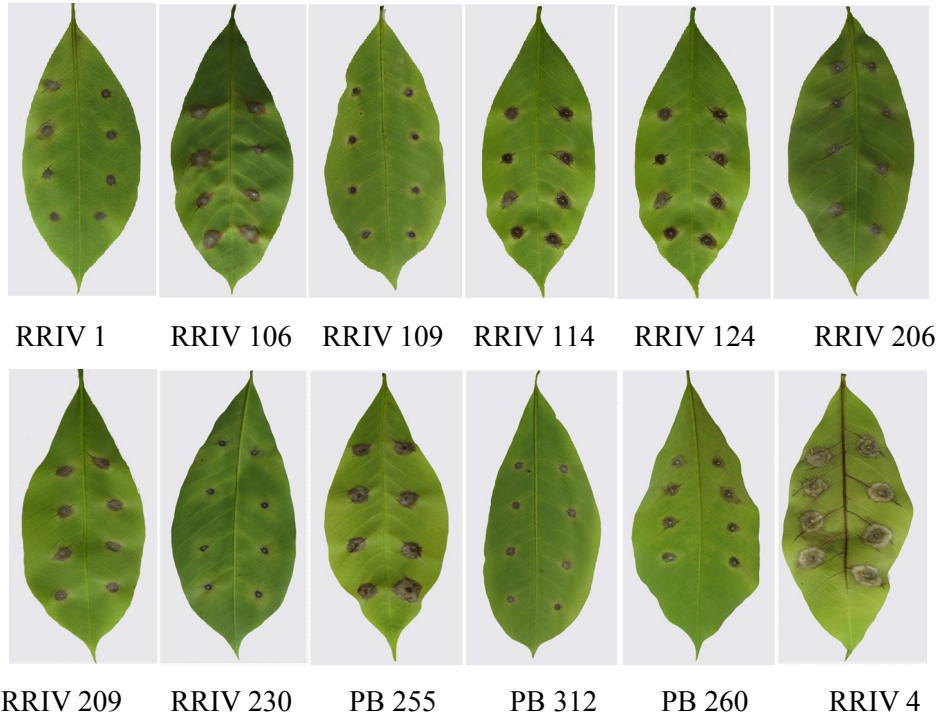


**Hình 3.13.** Mức độ xâm nhiễm và gây bệnh của MPL CoryLK02 trên lá cắt rời của 12 DVT cao su ở thời điểm 7 ngày sau chủng. Ghi chú bên dưới mỗi lá là tên DVT cao su.

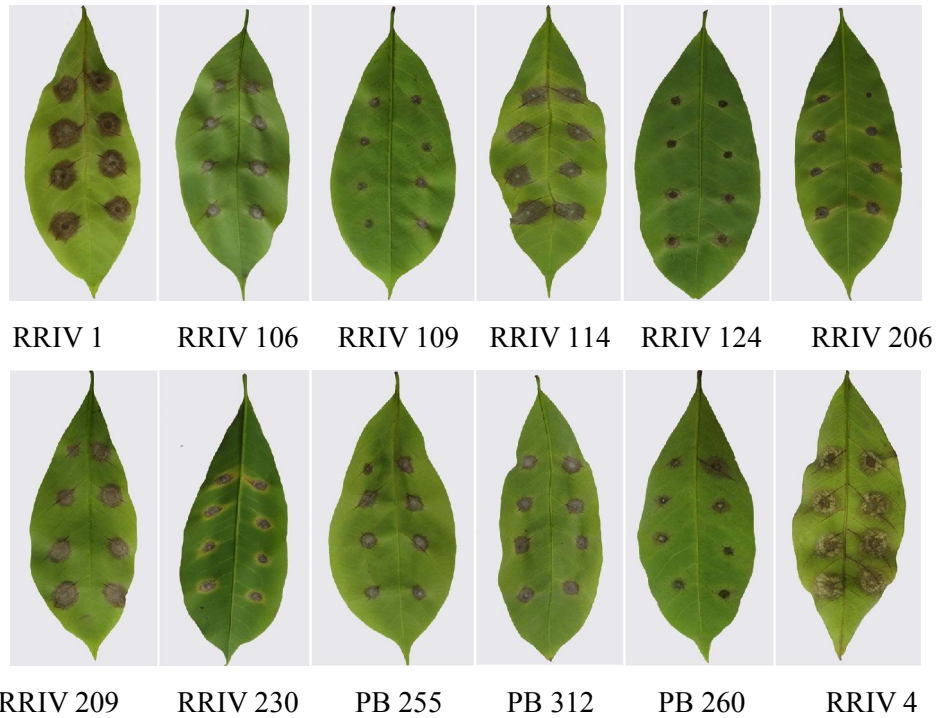


**Hình 3.14.** Mức độ xâm nhiễm và gây bệnh của MPL CoryDP03 trên lá cắt rời của 12 DVT cao su ở thời điểm 7 ngày sau chủng. Ghi chú bên dưới mỗi lá là tên DVT cao su.

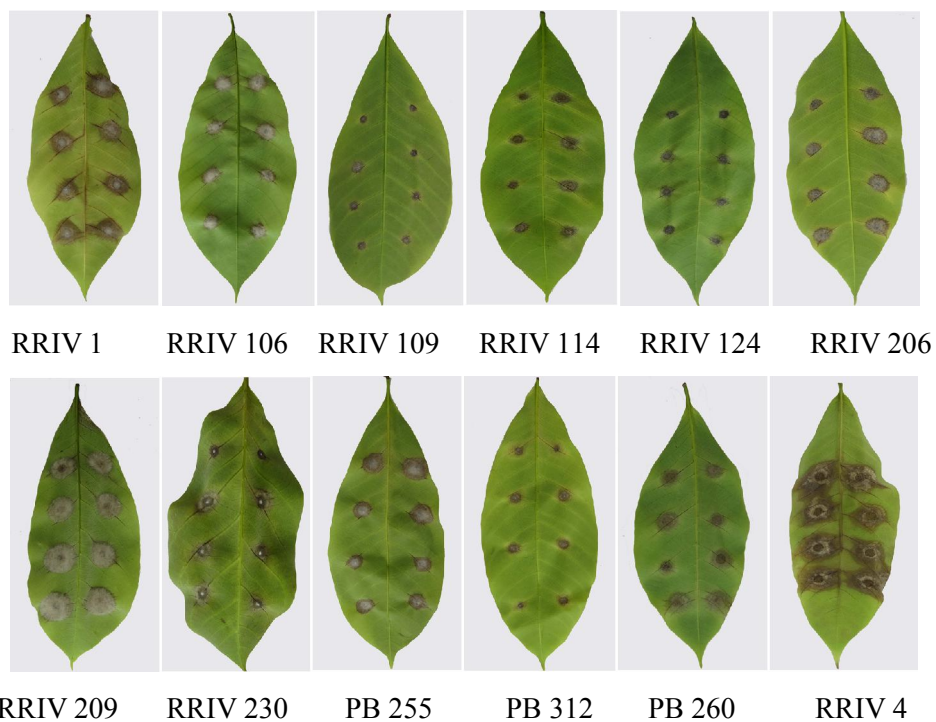




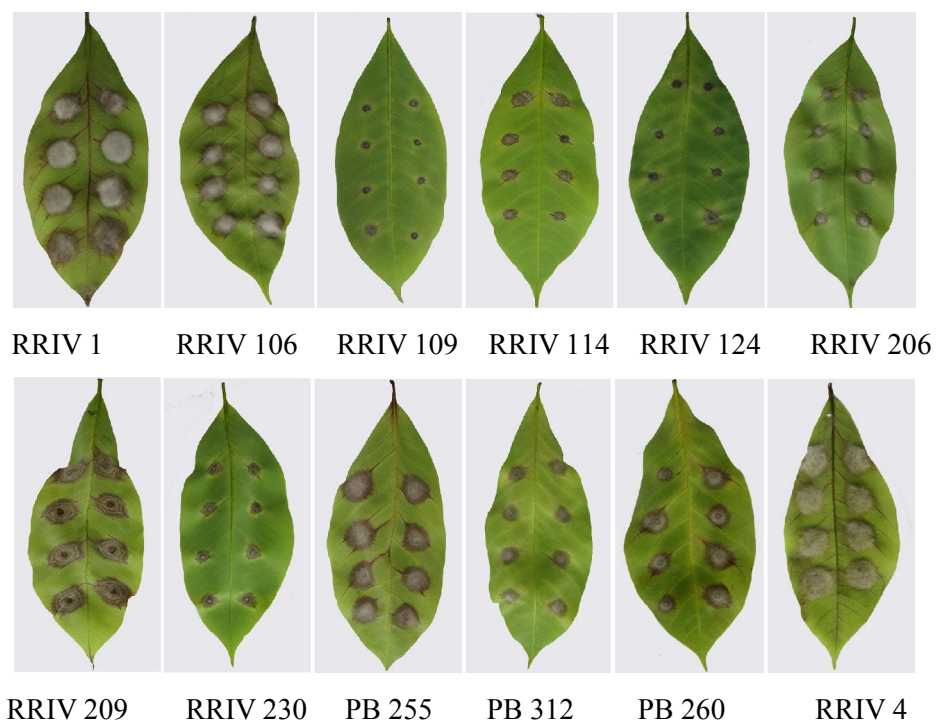
**Hình 3.15.** Mức độ xâm nhiễm và gây bệnh của MPL CoryDN39 trên lá cắt rời của 12 DVT cao su ở thời điểm 7 ngày sau chủng. Ghi chú bên dưới mỗi lá là tên DVT cao su.



**Hình 3.16.** Mức độ xâm nhiễm và gây bệnh của MPL CoryKT04 trên lá cắt rời của 12 DVT cao su ở thời điểm 7 ngày sau chủng. Ghi chú bên dưới mỗi lá là tên DVT cao su.



**Hình 3.17.** Mức độ xâm nhiễm và gây bệnh của MPL CoryBT17 trên lá cắt rời của 12 DVT cao su ở thời điểm 7 ngày sau chủng. Ghi chú bên dưới mỗi lá là tên DVT cao su.



**Hình 3.18.** Mức độ xâm nhiễm và gây bệnh của MPL CorySL02 trên lá cắt rời của 12 DVT cao su ở thời điểm 7 ngày sau chủng. Ghi chú bên dưới mỗi lá là tên DVT cao su.

### 3.5.2. Điều kiện nhà lưới

Sáu (6) MPL nấm *C. cassicola* đều gây bệnh trên 12 DVT cao su RRIV 1, RRIV 106, RRIV 109, RRIV 114, RRIV 124, RRIV 206, RRIV 209, RRIV 230, PB 255, PB 312, PB 260 và RRIV 4. Ở thời điểm 3 ngày sau lây bệnh triệu chứng nấm xâm nhiễm gây bệnh trên lá đã được ghi nhận. Thời điểm 10 ngày sau lây bệnh triệu chứng rõ rệt dạng đốm viền vàng hoặc thâm đen dọc gân lá trên các DVT bị nhiễm nặng, thậm chí gây rụng lá trên DVT RRIV 4.

Chỉ số bệnh trung bình của mỗi MPL trên 12 DVT cao su biến thiên từ 16,9% đến 32,8%. MPL CorySL02 gây bệnh mạnh nhất với CSB trung bình 32,8%, kế đến là các MPL CoryDP03, CoryKT04, CoryBT17 và CoryLK02 với CSB trung bình từ 18,7% đến 24,2%, MPL CoryDN39 gây bệnh thấp nhất (CSB trung bình 16,9%). Bên cạnh đó, mức độ nhiễm bệnh trung bình của mỗi DVT cao su đối với 6 MPL nấm với CSB biến thiên từ 6,4% đến 95,4%. DVT RRIV 4 nhiễm bệnh ở mức rất nặng với tất cả 6 MPL nấm (CSB trung bình lên đến 95,4%), kế đến là DVT RRIV 1, RRIV 106 nhiễm bệnh ở mức trung bình (CSB trung bình 32,6% – 33,7%), các DVT RRIV 209, PB 312, RRIV 124, RRIV 109, PB 260, RRIV 114 nhiễm bệnh ở mức nhẹ (CSB trung bình 6,4% – 19,2%) (Bảng 3.12).

Kết quả phân tích biến lượng (GLM, General Linear Model Analysis) cho thấy, có tương tác giữa hai yếu tố MPL và DVT lên CSB (Phụ lục 11). Trong thí nghiệm này, mức độ gây bệnh của mỗi MPL nấm được phân tích riêng trên 12 DVT cao su, đồng thời mức độ nhiễm bệnh của mỗi DVT cao su được phân tích riêng trên 6 MPL nấm. Kết quả phân tích thống kê CSB theo trắc nghiệm đa đoạn Duncan được trình bày ở Phụ bảng 6 và Phụ lục 11.

Mức độ gây bệnh xét theo từng MPL nấm trên 12 DVT cao su (Bảng 3.12, số liệu xếp theo cột) như sau: (1) MPL CoryLK02 gây bệnh rất nặng trên DVT RRIV 4 (CSB 94,0%), trung bình trên RRIV 1 (CSB 28,0%) và gây bệnh nhẹ trên các DVT khác (CSB 4,7% – 19,3%); (2) MPL CoryDP03 gây bệnh rất nặng trên DVT RRIV 4 (CSB 96,0%), trung bình trên RRIV 230, RRIV 114, RRIV 1, RRIV 106 (CSB 30,0% – 45,3%), gây bệnh nhẹ trên PB 260, RRIV 124, RRIV 206, RRIV

209, RRIV 109, PB 312, PB 255 (CSB 4,7% – 8,7%); (3) MPL CoryDN39 gây bệnh rất nặng trên RRIV 4 (CSB 94,7%), trung bình trên RRIV 1 (CSB 28,0%) và gây bệnh nhẹ trên các DVT khác (CSB 5,3% – 15,3%); (4) MPL CoryKT04 gây bệnh rất nặng trên RRIV 4 (CSB 96,0%), trung bình trên RRIV 106, RRIV 1 (CSB 45,3% – 46,0%) và gây bệnh nhẹ trên các DVT khác (CSB 6,0% – 16,7%); (5) MPL CoryBT17 gây bệnh rất nặng trên RRIV 4 (CSB 96,7%), trung bình trên RRIV 114 (CSB 30,0%) và gây bệnh nhẹ trên các DVT khác (CSB 6,0% – 19,3%). (6) MPL CorySL02 gây bệnh rất nặng trên RRIV 4 (CSB 95,3%), nặng trên RRIV 106 (CSB 54,0%), trung bình trên PB 260, RRIV 114, RRIV 206, PB 255, RRIV 230, RRIV 1 (CSB 20,7% – 43,3%) và gây bệnh nhẹ trên RRIV 209, RRIV 109, PB 312, RRIV 124 (CSB 11,3% – 17,3%).

Kết quả phân tích thống kê CSB theo trắc nghiệm đa đoạn Duncan cho thấy mức độ gây bệnh của MPL CoryLK02 trên 12 DVT cao su được phân tách thành 7 nhóm, CoryDN39 được xếp thành 5 nhóm, CoryKT04 được xếp thành 4 nhóm, CoryBT17 được xếp thành 6 nhóm và CorySL02 được xếp thành 7 nhóm. Có sự khác biệt rất có ý nghĩa về mức độ gây bệnh của mỗi MPL nấm trên các DVT cao su (Phụ bảng 6 và Phụ lục 11).

Mức độ mẫn cảm bệnh xét theo từng DVT cao su với 6 MPL nấm (Bảng 3.12, số liệu xếp theo hàng) như sau: (1) RRIV 1 nhiễm bệnh nặng khi được chủng bệnh bởi MPL CoryDP03, CoryKT04, CorySL02 (CSB 41,3% – 46,0%), nhiễm trung bình CoryLK02, CoryDN39 (CSB 28%) và nhiễm nhẹ bởi CoryBT17 (CSB 15,3%); (2) RRIV 106 nhiễm bệnh nặng với MPL CoryDP03, CoryKT04, CorySL02 (CSB 45,5% – 54,0%), nhiễm nhẹ với CoryDN39, CorySL02, CoryBT17 (CSB 12,7% – 19,3%); (3) RRIV 109 nhiễm bệnh ở mức nhẹ với 6 MPL nấm (CSB 5,3% – 14,7%); (4) RRIV 114 nhiễm ở mức trung bình với MPL CorySL02, CoryBT17, CoryDP03 (CSB 22,0% – 31,3%), nhiễm nhẹ với CoryDN39, CoryKT04, CoryLK02 (5,3% – 19,3%); (5) RRIV 124 nhiễm bệnh ở mức nhẹ với 6 MPL nấm (CSB 6,0% – 17,3%); (6) RRIV 206 nhiễm trung bình với MPL CorySL02 (CSB 31,3%), nhiễm nhẹ với 5 MPL còn lại (CSB 4,7% – 15,3%); (7)

RRIV 209 nhiễm bệnh ở mức nhẹ với 6 MPL nấm (CSB 4,7% – 11,3%); (8) RRIV 230 nhiễm trung bình bởi MPL CoryDP03, CorySL02 (CSB 30,0% – 31,3%), nhiễm nhẹ trên 4 MPL còn lại (CSB 4,7% – 13,3%); (9) PB 255 nhiễm bệnh trung bình với MPL CorySL02 (CSB 32,0%), nhiễm nhẹ trên 5 MPL còn lại (CSB 8,7% – 16,7%); (10) PB 312 nhiễm bệnh ở mức nhẹ với 6 MPL nấm (CSB 4,7% – 11,3%); (11) PB 260 nhiễm bệnh trung bình với MPL CorySL02 (CSB 20,7%), nhiễm nhẹ trên 5 MPL còn lại (CSB 4,7% – 11,3%); (12) RRIV 4 nhiễm bệnh nặng với 6 MPL nấm (CSB từ 94,0% đến 96,7%).

Như vậy, những MPL nấm có mức độ gây bệnh khác nhau đối với những DVT cao su (một MPL có thể gây bệnh nặng trên DVT này nhưng gây bệnh nhẹ trên DVT khác), và mức độ miễn cảm của những DVT cao su là khác nhau đối với mỗi MPL (một DVT cao su có thể miễn cảm với MPL này nhưng kháng hoặc “chống chịu” với MPL khác).

Kiểm tra nấm bệnh trên triệu chứng bệnh: Sau khi quan trắc mức độ nhiễm bệnh trên các DVT cao su, trong mỗi nghiệm thức lấy ngẫu nhiên 3 vết bệnh để tái phân lập trên môi trường MEA. Tổng số vết bệnh được kiểm tra là 216 vết bệnh, tỷ lệ tái phân lập được nấm *C. cassicola* là 100%.

**Bảng 3.12.** Mức độ gây bệnh của 6 MPL nằm trên 12 DVT cao su trong nhà lưới ở thời điểm 10 ngày sau lây bệnh

DVT	Mẫu phân lập nấm												TB (DVT)
	CoryLK02		CoryDP03		CoryDN39		CoryKT04		CoryBT17		CorySL02		
	CSB (%)	MGB	CSB (%)	MGB	CSB (%)	MGB	CSB (%)	MGB	CSB (%)	MGB	CSB (%)	MGB	
RRIV 1	28,0	TB	41,3	TB	28,0	TB	46,0	TB	15,3	Nhẹ	43,3	TB	<b>33,7</b>
RRIV 106	18,7	Nhẹ	45,3	TB	12,7	Nhẹ	45,3	TB	19,3	Nhẹ	54,0	Nặng	<b>32,6</b>
RRIV 109	10,7	Nhẹ	7,3	Nhẹ	5,3	Nhẹ	10,7	Nhẹ	9,3	Nhẹ	14,7	Nhẹ	<b>9,7</b>
RRIV 114	19,3	Nhẹ	31,3	TB	5,3	Nhẹ	7,3	Nhẹ	30,0	TB	22,0	TB	<b>19,2</b>
RRIV 124	8,0	Nhẹ	6,0	Nhẹ	11,3	Nhẹ	7,3	Nhẹ	6,0	Nhẹ	17,3	Nhẹ	<b>9,3</b>
RRIV 206	15,3	Nhẹ	6,0	Nhẹ	5,3	Nhẹ	7,3	Nhẹ	4,7	Nhẹ	31,3	Nhẹ	<b>11,7</b>
RRIV 209	5,3	Nhẹ	6,7	Nhẹ	5,3	Nhẹ	4,7	Nhẹ	5,3	Nhẹ	11,3	Nhẹ	<b>6,4</b>
RRIV 230	13,3	Nhẹ	30,0	TB	8,7	Nhẹ	6,0	Nhẹ	4,7	Nhẹ	36,7	Nhẹ	<b>16,6</b>
PB 255	10,0	Nhẹ	8,7	Nhẹ	15,3	Nhẹ	16,7	Nhẹ	13,3	Nhẹ	32,0	Nhẹ	<b>16,0</b>
PB 312	4,7	Nhẹ	7,3	Nhẹ	4,7	Nhẹ	8,0	Nhẹ	11,3	Nhẹ	15,3	Nhẹ	<b>8,6</b>
PB 260	7,3	Nhẹ	4,7	Nhẹ	6,0	Nhẹ	11,3	Nhẹ	8,7	Nhẹ	20,7	Nhẹ	<b>9,8</b>
RRIV 4	94,0	RN	96,0	RN	94,7	RN	96,0	RN	96,7	RN	95,3	RN	<b>95,4</b>
<b>TB (MPL)</b>	<b>19,6</b>		<b>24,2</b>		<b>16,9</b>		<b>22,2</b>		<b>18,7</b>		<b>32,8</b>		

\*MGB: Mức gây bệnh; TB: trung bình; RN: rất nặng.





RRIV 4

RRIV 1

RRIV 106

**Hình 3.19.** Mức độ gây bệnh của MPL CoryLK02 trên DVT RRIV 4, RRIV 1 và RRIV 106 trong nhà lưới ở thời điểm 10 ngày sau lây bệnh.



RRIV 4

RRIV 1

RRIV 106

**Hình 3.20.** Mức độ gây bệnh của MPL CoryDP03 trên DVT RRIV 4, RRIV 1 và RRIV 106 trong nhà lưới ở thời điểm 10 ngày sau lây bệnh.



RRIV 4

RRIV 1

RRIV 106

**Hình 3.21.** Mức độ gây bệnh của MPL CoryDN39 trên DVT RRIV 4, RRIV 1 và RRIV 106 trong nhà lưới ở thời điểm 10 ngày sau lây bệnh.



RRIV 4

RRIV 1

RRIV 106

**Hình 3.22.** Mức độ gây bệnh của MPL CoryKT04 trên DVT RRIV 4, RRIV 1 và RRIV 106 trong nhà lưới ở thời điểm 10 ngày sau lây bệnh.



RRIV 4

RRIV 1

RRIV 106

**Hình 3.23.** Mức độ gây bệnh của MPL CoryBT17 trên DVT RRIV 4, RRIV 1 và RRIV 106 trong nhà lưới ở thời điểm 10 ngày sau lây bệnh.



RRIV 4

RRIV 1

RRIV 106

**Hình 3.24.** Mức độ gây bệnh của MPL CorySL02 trên DVT RRIV 4, RRIV 1 và RRIV 106 trong nhà lưới ở thời điểm 10 ngày sau lây bệnh.



Nhìn chung, mức độ gây bệnh của 6 MPL nấm *C. cassiicola* trên 12 DVT cao su khi được chủng bệnh ở điều kiện nhà lưới thấp hơn so với kết quả chủng bệnh trên lá cắt rời ở điều kiện phòng thí nghiệm. Kết quả ở hai điều kiện thí nghiệm có cùng xu hướng về mức độ gây bệnh của mỗi MPL nấm trên các DVT cao su. MPL CorySL02 được đánh giá là có khả năng xâm nhiễm mạnh nhất, kế đến là CoryDP03, CoryKT04, CoryLK02, CoryBT17, cuối cùng là CoryDN39. Trong số 6 mẫu nấm nghiên cứu, MPL CorySL02 không những xâm nhiễm, gây bệnh rất nặng trên RRIV 4 mà còn gây bệnh nặng trên RRIV 1, RRIV 106 và gây bệnh ở mức trung bình trên nhiều DVT khác. Trong khi, MPL CoryDN39 chỉ có khả năng xâm nhiễm, gây bệnh rất nặng trên RRIV 4, gây bệnh trung bình trên RRIV 1 và gây bệnh nhẹ trên các DVT còn lại. Mặt khác, xét theo mức độ miễn cảm của DVT cao su thì RRIV 4 là miễn cảm nhất (nhiễm bệnh ở mức rất nặng với 6 MPL nấm trong cả hai điều kiện thí nghiệm), kế đến là RRIV 1, RRIV 106 nhiễm bệnh ở mức trung bình trong điều kiện nhà lưới với nhiều MPL nấm. Trong khi đó, các DVT khác bao gồm: PB 255, RRIV 114, RRIV 109, RRIV 124, RRIV 206, RRIV 209, RRIV 230, PB 312, PB 260 thể hiện là giống “chống chịu bệnh” với CSB ở mức thấp trên nhiều MPL nấm ở điều kiện nhà lưới.

Trong số 12 DVT được sử dụng để đánh giá mức độ miễn cảm với các MPL nấm *C. cassiicola* trong luận án này, DVT RRIV 4 và PB 260 đã được Tập đoàn Công nghiệp Cao su Việt Nam khuyến cáo không phát triển diện tích trồng mới từ năm 2008 (đối với RRIV 4) và từ năm 2015 (đối với PB 260). Mười (10) DVT cao su còn lại đều thuộc cơ cấu giống Bảng I, Bảng II giai đoạn 2016 – 2020, một số DVT có triển vọng tiếp tục trong cơ cấu giống giai đoạn 2021 – 2025. Từ kết quả thu được, xét riêng trên góc độ quản lý bệnh rụng lá *Corynespora*, một số đề xuất về việc khuyến cáo phát triển diện tích trồng mới các DVT cao su này như sau: (1) Đối với DVT RRIV 1, nên hạn chế mở rộng diện tích trồng mới bởi lẽ DVT này đã được trồng phổ biến trên quy mô đại trà trên khắp các vùng trồng từ năm 2011 đến nay. Mặc dù trong thực tế sản xuất, chưa ghi nhận đợt dịch bệnh rụng lá *Corynespora* xảy ra trên DVT này nhưng điều đáng lo ngại là RRIV 1 đã bị nhiễm

bệnh ở mức trung bình với 5/6 MPL nấm thuộc các phân nhóm di truyền và vùng địa lý khác nhau ở điều kiện nhà lưới; (2) Đối với DVT RRIV 106, không nên khuyến cáo trồng tại tỉnh Sơn La nói riêng và Miền Núi Phía Bắc nói chung vì có sự tồn tại các mẫu nấm cùng nhóm di truyền với MPL CorySL02. Đồng thời nên hạn chế diện tích trồng mới RRIV 106 tại tỉnh Bình Phước và KonTum nơi có sự hiện diện của các nhóm nấm gây bệnh mạnh trên DVT này; (3) Đối với DVT RRIV 114, nên hạn chế diện tích trồng mới DVT cao su này tại tỉnh Bình Thuận và Miền Núi Phía Bắc. (4) Đối với các DVT PB 255, RRIV 109, RRIV 124, RRIV 206, RRIV 209, RRIV 230 và PB 312 đã thể hiện là giống “chống chịu bệnh” nên tiếp tục đưa vào khuyến cáo trong cơ cấu giống trong giai đoạn tiếp theo, riêng DVT RRIV 230 nên hạn chế trồng mới tại tỉnh Bình Phước.

Tính gây bệnh, tính độc và phạm vi ký chủ là những đặc tính quan trọng trong nghiên cứu bệnh cây và mối quan hệ giữa tính gây bệnh, tính độc hoặc phổ ký chủ của các MPL với sự đa dạng di truyền và cấu trúc di truyền là rất phức tạp, khó lý giải vì liên quan đến nhiều gen khác nhau. Chính vì lẽ đó, nhiều nghiên cứu trước đây về nấm *C. cassiicola* chưa thể lý giải rõ ràng về mối tương quan giữa các phân nhóm di truyền với đặc điểm hình thái, tính gây bệnh, nguồn gốc địa lý hoặc nguồn gốc ký chủ của các mẫu nấm. Tính gây bệnh được sử dụng trong nghiên cứu xác định phân nhóm di truyền của nhiều loài nấm gây bệnh thực vật nhưng tiêu chí này không biểu hiện giá trị ổn định trong phân nhóm di truyền nấm. Trong nghiên cứu này, mức độ gây bệnh của các MPL nấm đại diện cho các phân nhóm di truyền và vùng địa lý khác nhau trên các DVT cao su có sự biến thiên rất lớn, kể cả những MPL thuộc cùng phân nhóm di truyền hoặc vùng địa lý. Tính gây bệnh của mỗi MPL nấm ít nhất là tùy thuộc vào khả năng xâm nhiễm, lượng độc tố, dạng độc tố do nấm tiết ra và có liên quan chặt với phản ứng kháng của mỗi DVT cao su. Thật vậy, kết quả chủng bệnh ở cả 2 điều kiện thí nghiệm đều cho thấy, một MPL có thể gây bệnh mạnh trên DVT này nhưng gây bệnh nhẹ trên DVT khác và một DVT cao su có thể miễn cảm với MPL này nhưng kháng hoặc “chống chịu” với MPL khác. Kết quả lây bệnh nhân tạo trong điều kiện nhà lưới cho thấy có sự tương tác “gen

đôi gen” giữa MPL nấm và DVT cao su, đồng thời khẳng định sự đa dạng di truyền của nấm *C. cassiicola* trên cây cao su ở Việt Nam. Tuy nhiên, trong khuôn khổ nghiên cứu, số liệu về tính gây bệnh đã cho thấy có sự khác nhau về mức độ gây bệnh của các MPL nấm mà không thể phản ánh đầy đủ, rõ nét sự biến động di truyền của các MPL thuộc các nhóm di truyền khác nhau. Do các thí nghiệm và chỉ tiêu quan trắc về tính gây bệnh của các MPL nấm được bố trí và theo dõi đơn thuần dựa trên phương pháp truyền thống nên chưa thể phân tích được sự tương tác ở mức độ phân tử. Vì vậy, các nghiên cứu về cơ sở truyền tín hiệu, hiện tượng điều hòa gen,... liên quan đến sự tương tác giữa ký sinh (MPL nấm) và ký chủ (DVT cao su) ở mức độ phân tử sẽ là những nội dung nên được thực hiện trong các nghiên cứu tiếp theo.

## **KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ**

### **1. Kết luận**

- Các mẫu nấm *C. cassiicola* gây bệnh trên cây cao su ở Việt Nam đa dạng cả về mặt hình thái lẫn di truyền phân tử.

+ Về đặc điểm hình thái học: có sự đa dạng về màu sắc, kết cấu và tốc độ phát triển của tản nấm. Có sự biến thiên rất lớn về hình dạng, kích thước của bào tử nấm không chỉ giữa các MPL mà còn trong cùng một MPL.

+ Về đặc điểm di truyền phân tử: có sự phân nhóm di truyền khác biệt giữa các chỉ thị phân tử khác nhau. Phân tích trình tự nucleotide vùng rDNA-ITS xác định có 3 nhóm di truyền riêng biệt, trong đó một nhóm di truyền mới được phát hiện; Phân tích bằng chỉ thị phân tử SRAP phân chia các mẫu nấm thành 2 nhóm di truyền chính và chỉ rõ các kiểu di truyền có xu hướng phân bố theo vùng địa lý khá cao; Nghiên cứu nhận diện gen *Cas* xác định có hai nhóm nấm, một nhóm mang gen *Cas2* và một nhóm không mang gen *Cas* (*Cas0*).

- Các mẫu nấm *C. cassiicola* được phân lập trên cây cao su ở Việt Nam có mức độ gây bệnh rất biến thiên, tùy thuộc đặc điểm chuyên biệt của mỗi MPL. Ở điều kiện phòng thí nghiệm, tất cả 76 MPL đều gây bệnh trên DVT cao su RRIV 4 và PB 260 với mức độ biến thiên rất lớn; Sáu (6) MPL đại diện phân nhóm di truyền và vùng địa lý đều gây bệnh rất nặng trên DVT RRIV 4, gây bệnh nặng trên RRIV 1, RRIV 106, RRIV 206, RRIV 114, PB 260, PB 255, RRIV 209, gây bệnh trung bình trên RRIV 109, RRIV 124, PB 312, RRIV 230; Trong điều kiện nhà lưới, sáu (6) MPL nấm đại diện đều gây bệnh rất nặng trên DVT RRIV 4, trung bình trên RRIV 106, RRIV 1, gây bệnh nhẹ trên các DVT khác.

## 2. ĐỀ NGHỊ

Trên cơ sở các MPL *C. cassiicola* đã thu được, tiếp tục nghiên cứu mô tả hệ gen các mẫu nấm và phân tích transcriptomics thông qua kỹ thuật *in silico* mining đối với những protein “effectors” của loài nấm này. Nghiên cứu sự tương tác giữa nấm *C. cassiicola* với DVT cao su trên cơ sở đồng tiến hóa (ký sinh – ký chủ) ở mức độ phân tử.

Sử dụng các MPL nấm trong nghiên cứu này làm nguồn vật liệu để đánh giá mức độ miễn cảm của các DVT cao su mới phục vụ công tác tuyển chọn giống cao su chống chịu bệnh.

## DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH NGHIÊN CỨU CÓ LIÊN QUAN ĐÃ CÔNG BỐ

1. **Nguyễn Đôn Hiệu, Nguyễn Anh Nghĩa và Nguyễn Bảo Quốc., 2019.** (Tổng quan) Sự đa dạng di truyền của nấm *Corynespora cassiicola*, tác nhân gây bệnh rụng lá *Corynespora* trên cây cao su (*Hevea brasiliensis*). *Tạp chí Khoa học và Công nghệ của Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn*, số 3 + 4, trang 83 – 90.
2. **Nguyễn Đôn Hiệu, Nguyễn Anh Nghĩa và Nguyễn Bảo Quốc., 2019.** (Tổng quan) Tính gây bệnh của nấm *Corynespora cassiicola* và độc tố Cassiicolin. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ của Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn*, số 18, trang 9 – 16.
3. **Nguyễn Đôn Hiệu, Nguyễn Anh Nghĩa và Nguyễn Bảo Quốc., 2019.** Đặc điểm hình thái của nấm *Corynespora cassiicola* gây bệnh rụng lá *Corynespora* trên cây cao su ở Việt Nam. *Hội thảo Bệnh hại thực vật Quốc Gia lần thứ 18*, trang 140 – 149.
4. **Nguyễn Đôn Hiệu, Nguyễn Anh Nghĩa và Nguyễn Bảo Quốc., 2019.** Nhận diện gen mã hóa độc tố cassiicolin trong các mẫu nấm *Corynespora cassiicola* phân lập trên cây cao su ở Việt Nam. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ của Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn*, số 22, trang 40 – 47.
5. **Nguyễn Đôn Hiệu, Nguyễn Anh Nghĩa và Nguyễn Bảo Quốc., 2020.** Đánh giá tính gây bệnh của nấm *Corynespora cassiicola* phân lập từ cây cao su ở Việt Nam bằng phương pháp lây bệnh trên lá cắt rời. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ của Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn*, số 1, trang 32 – 39.
6. **Nguyễn Đôn Hiệu, Nguyễn Anh Nghĩa và Nguyễn Bảo Quốc., 2020.** Đánh giá tính gây bệnh của nấm *Corynespora cassiicola* phân lập từ cây cao su ở Việt Nam bằng phương pháp lây bệnh nhân tạo trong nhà lưới. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ của Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn*, số 3 + 4, trang 164 – 169.

7. **Nguyen Don Hieu, Nguyen Anh Nghia, Nguyen Thi Kim Uyen, Nguyen Ngoc Bao Chau, Nguyen Bao Quoc., 2020.** Genetic Diversity Analysis of *Corynespora cassiicola* Isolates on Rubber Tree (*Hevea brasiliensis*) in Vietnam Using Ribosomal DNA Internal Transcribed Spacer (rDNA-ITS) Sequences and Sequence-Related Amplified Polymorphism (SRAP). *Journal of Rubber Research*. <https://doi.org/10.1007/s42464-020-00047-7>.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Abebe, A., 2000. Introduction to Design and Analysis of Experiments with the SAS System, Auburn University; pp. 62 - 187.
2. Abdel-Rahman S.M., 2008. Strain differentiation of Dermatophytes. *Mycopathologia*; 166: 319 - 333.
3. Atan, S. and N. Hamid., 2003. Differentiating races of *Corynespora cassiicola* using RAPD and internal transcribed spacer markers. *J. Rubber Res*; 6: 58-64.
4. Awoderu V.A., 1969. New leaf spot of para rubber (*Hevea brasiliensis*) in Nigeria. *Plant Disease Reporter*; 53: 406 - 408.
5. Barnes M.R., 2002. SNP and mutation data on the Web-hidden treasures for uncovering. *Comparative and Functional Genomics* 3: 67 - 74.
6. Barthe P., Pujade-Renaud V., Breton F., Gargani D., Thai R., Roumestand C. and de Lamotte F., 2007. Structural analysis of cassiicolin, a host-selective protein toxin from *Corynespora cassiicola*. *Journal molecular biology*, 367: 89 – 101.
7. Breton F., D'Auzac J., Garcia D., Sanier C. and Eschbach J.B., 1996. Recent research on *Corynespora cassiicola/Hevea brasiliensis* interaction. In: *Proceeding workshop on Corynespora leaf fall disease of Hevea Rubber*, Medan, Indonesia. Indonesian Rubber Research Institute; pp. 49–78.
8. Breton F., Sanier C. and d'Auzac. J., 2000. Role of Cassiicolin, a Host-selective toxin, in pathogenicity of *Corynespora cassiicola*, causal agent of a leaf fall disease of *Hevea*. *Journal of Rubber Research* 3: 115 - 128.
9. Bruns T.D, White T.J. and Taylor J.W., 1991. Fungal molecular systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* 22: 525 - 564.
10. Bùi Chí Bửu., 2002. *Tương tác giữa ký sinh và ký chủ trong bệnh cây trên cơ sở sinh học phân tử. Cơ sở di truyền tính kháng sâu bệnh hại cây trồng*. Nhà xuất bản Nông nghiệp, trang 11 – 43.



11. Bùi Chí Bửu và Nguyễn Thị Lang., 2008. *Di truyền phân tử*. Nhà xuất bản Nông nghiệp, TP. Hồ Chí Minh.
12. Carter D.A., Nai T.D., Marra R.E. and Vera R.E., 2004. The development of genetic markers from fungal genome initiatives. *Applied Mycology and Biotechnology* 4: 1 - 27.
13. Cerkauskas R. and Kalb T., 2005. Tomato diseases. Target spot, *Corynespora cassiicola*, found in the tropics and subtropics. *AVRDC - The World Vegetable Center, Fact Sheet*: 605 - 630.
14. Chanruang N., 2000. Status of *Corynespora* leaf fall in Thailand. In: *Paper presented at IRRDB Workshop on Corynespora Leaf Fall of Rubber*. Selangor, Malaysia, 2000.
15. Chee K.H., 1988. Studies on sporulation, pathogenicity and epidemiology of *Corynespora*. *Journal of Natural Rubber Research* 1: 21 - 29.
16. Cutrim F.A. and Silva G.S., 2003. Pathogenicity of *Corynespora cassiicola* to different plant species. *Fitopatologia Brasileira* 28: 193 - 194.
17. Dangl J.L., Dietrich R.A. and Richberg M.H., 1996. Death don't have mercy: cell death programs in plant – microbe interactions. *Plant Cell*, 8: 1793 – 1807.
18. Dangl J.L. and Jones J.D.G., 2001. Plant pathogenicity and integrated defense responded to infection. *Nature*, 411: 826 – 833.
19. Darmono T.W., Darussamin A. and Pawirosoemardjo S., 1996. Variation among isolates of *Corynespora cassiicola* associated with *Hevea brasiliensis* in Indonesia. In: *Proceeding Workshop on Corynespora Leaf Fall Disease of Hevea Rubber, Medan, Indonesia*. Indonesian Rubber Research Institute: 79 - 91.

20. Déon M., Bourre Y., Gimenez S., Berger A., Bieysse D., de Lamotte F., Poncet. J., Roussel V., Bonnot F., Oliver G., Franchel J., Seguin M., Leroy T., Roeckel-Drevet P. and Pujade-Renaud V., 2012a. Characterization of a cassiicolin-encoding gene from *Corynespora cassiicola*, pathogen of rubber tree (*Hevea brasiliensis*). *Plant Science 185-186*: 227 - 237.
21. Déon M., Scomparin A., Tixier A., Mattos C., Leroy T., Seguin M., Roeckel-Drevet P. and Pujade-Renaud V., 2012b. First characterization of endophytic *Corynespora cassiicola* isolates with variant cassiicolin genes recovered from rubber trees in Brazil. *Fungal Diversity 54*: 87 - 99.
22. Déon M., Fumanal B., Gimenez S., Bieysse D., Olivera R.R., Shuib S.S., Breton F., Elumalai S., Vida J.B., Seguin M., Leroy T., Roeckel-Drevet. and Pujade-Renaud V., 2014. Diversity of the cassiicolin gene in *Corynespora cassiicola* and relation with the pathogenicity in *Hevea brasiliensis*. *Fungal Biology 118* (1): 32-47.
23. Dixon L. J., Schlub R.L., Pernezny K. and Datnoff L. E., 2009. Host specialization and phylogenetic diversity of *Corynespora cassiicola*. *Phytopathology*; 99: 1015 - 1027.
24. Ellis M.B. and Holiday P., 1971. *Corynespora cassiicola*. *CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria 303*. Commonwealth Mycological Institute, Ferry Lane, Kew, Surrey, England, 2 pages.
25. Ellis M.B., 1957. Some species of *Corynespora*. *Mycological Paper 65*. Commonwealth Mycological Institute. Kew, Surrey, England.
26. Farr D.F., and Rossman A.Y., 2019. Fungal Databases, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA. <http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/>.
27. Ferreira, A.F.T.A.F. and Bentes, J.L.S. 2017. Pathogenicity of *Corynespora cassiicola* on different hosts in Amazonas State, Brazil. *Summa Phytopathologica*; 43 (1): 63 - 65.

28. Flor, H.H., 1971. Current status of the gene-for-gene concept. *Annual Review of Phytopathology*; 9:275–96.
29. Furukawa, T., K. Ushiyama and K. Kishi., 2008. *Corynespora* leaf spot of scarlet sage caused by *Corynespora cassiicola*. *J. Genet. Plant Pathol.* 4: 117 - 119.
30. Gil-Lamaignere C., Roilides E., Hacker J. and Muller F.M.C., 2003. Molecular typing for fungi - a critical review of the possibilities and limitation of currently and future methods. *Clinical Microbiology and Infection* 9: 172 - 185.
31. Gupta M., Chyi Y.S., Romero-Severson J. and Owen J.L., 1994. Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats. *Theoretical and Applied Genetics* 89: 998 - 1006.
32. Hall T.A., 2013. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*; 41.
33. Hasan, H.A., Almomany, A.M., Hasan, S. and Al-Abdallat, A.M., 2018. Assessment of Genetic Diversity among *Pleurotus* spp. Isolates from Jordan. *Journal of Fungi (Basel)* 4, 52.
34. Heath M.C., 2000. Nonhost resistance and nonspecific plant defenses current opinion. *In plant Biology*, 3: 315 – 319.
35. Hiệp hội Cao su Việt Nam., 2019. *Tình hình ngành cao su Việt Nam năm 2018*. Nhà xuất bản Nông nghiệp, Số 10, trang 6 – 9.
36. Hiệp hội Cao su Việt Nam, 2020. *Xuất khẩu cao su thiên nhiên Việt Nam năm 2019*. Nhà xuất bản Nông nghiệp, Số 01, trang 7 – 10.
37. Ismail H. and Jeyanayagi I., 1999. Occurrence and identification of physiological races of *Corynespora cassiicola* of *Hevea*. In: *Proceeding of IRRDB Symposium*, HaiKou, Hainan, China. Hainan Publishing House; pp. 263 - 272.

38. Jacob C.K., 2006. *Corynespora leaf disease of Hevea brasiliensis. Strategies for manegement*. Rubber Research Institute of India.
39. Jayashinghe C.K. and Silva W.P.K., 1996. Curren status of *Corynespora* leaf fall in Sri Lanka. In: *Proceeding workshop on Corynespora leaf fall disease of Heavea rubber*. Indonesia, pp. 15 - 19.
40. Jayasinghe C.K., 2000. *Corynespora* leaf fall of rubber in Sri Lanka: Diversity of the pathogen and pathogenesis. *IRRDB Workshop on Corynespora Leaf fall disease*. Kuala Lumpur and Medan.
41. Jayasinghe C.K., Silva W.P.K. and Fenando T.H.P.S., 2005. Twenty years of experience with *Corynespora* leaf fall in Sri Lanka. *Paper presented at IRRDB Transfer of Technology Workshop*. Kuala Lumpur, Malaysia.
42. Jayasuriya K.E and Thennakoon B.I., 2007. First report of *Corynespora cassiicola* on *Codiaeum variegatum* (croton) in Sri Lanka. *Biological Science*; 36 (2): 138-141.
43. Jinji P., Xin Z., Yangxian Q., Yixian X., Huiqiang Z. and He Z., 2007. First record of *Corynespora* leaf fall disease of *Hevea* rubber tree in China. *Australian Plant Disease Notes*.
44. Jones J.P., Stall R.E. and Zitter T.A., 1993. Diseases of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.), Common Names of Plant Diseases. *The American Phytopathologycal Society*.  
<http://www.apsnet.org/online/common/name/tomato.asp>.
45. Jones C.J., Edwards K.J., Castaglione S., Winfield M.O., Sala F., Van de Wiel C., Bredemeijer G., Vosman B., Matthes M., Daly A., Brettschneider R., Bettini P., Buiatti M., Maestri E., Malcevschi A., Marmioli N., Aert R., Volckaert G., Rueda J., Linacero R., Vazquez A. and Karp A., 1997. Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories. *Molecular Breeding*; 3: 381-390.

46. Junqueira N.T.V., Gasparotto L., Moraes V.H.F., Silva H.M. and Lim T.M., 1985. New disease caused by virus, fungi and also bacterium on rubber from Brazil and their impact on international quarantine. In *Proceeding of regional conference on plant quaranti support for agriculture development*, Kuala Lumpur, Malaysia, pp. 253 - 260.
47. Kanbe T., 2008. Molecular approaches in the diagnosis of demantophytosis. *Mycopathologia*; 166: 307 - 317.
48. Kingsland G.C., 1985. Pathogenicity and epidemiology of *Corynespora cassiicola* in the Republic of Seychelles. *Acta Horticulturae* 153: 229 - 230.
49. Kurt S., 2005. Genetic variation in *Corynespora cassiicola*, the target leaf spot pathogen. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 8(4): 618 - 621.
50. Lamotte F.D, Duviau M.P., Sanier C., Thai R., Poncet J., Bieysse D., Breton F. and Pujade- Renaud V., 2007. Purification and characterization of cassiicolin, the toxin produced by *Corynespora cassiicola*, causal agent of the leaf fall disease of rubber tree. *Journal of Chromatography* 849: 357 - 362.
51. Li G. and C.F. Quiros., 2001. Sequence-Related Amplified Polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in *Brassica*. *Theoret Applied Genet.*, 103: 455 – 461.
52. Li X.Y., Li J., Zhao Z.J., Yang F., Fu Q.W., Liu H.S., Wang D.D., Yang Y.C. and Wang R.Y., 2014. Sequence–Related Amplified Polimorphism (SRAP) for studying genetic diversity and population structure of plants and others living organisms: A Protocol. *The Journal of Animal & Plant Sciences*; 24(5): 1478 – 1486.
53. Liu X., Li B., Cai J, Li C. and Huang G., 2015. Diversity of the cassiicolin gene in *corynespora cassiicola* of rubber tree in china. In *Proceeding of Internation rubber conference*. Ho Chi Minh city, Viet Nam; pp. 176 - 181.

54. Liberato J.R. and Mc Taggart A.R., 2007. *Corynespora* brown spot of papaya (*Corynespora cassiicola*). Pest and Diseases Image Library. URL:<http://www.padil.gov.au/viewPestDiagnosticImages.aspx?id=381>.
55. Liyanage A.S., Jayasinghe C.K., Liyanage N.I.S. and Jayanratne A.H.R., 1986. *Corynespora* leaf spot disease of rubber (*Heavea brasilliensis*): a new record. *Journal of the Rubber Research Institute of Sri Lanka* 65: 47 - 50.
56. Liyanage A.S., Jayasinghe C.K. and Liyanage N.I.S., 1989. Loss due to *Corynespora* leaf fall disease and its eradication. In: Proceeding RRIM Rubber Grower' Conference; pp. 401 – 410.
57. Liu, J., Wang, Z.R., Li, C., Bian, Y.B. and Xiao, Y., 2015. Evaluating genetic diversity and constructing core collections of Chinese *Lentinula edodes* cultivars using ISSR and SRAP markers. *Journal of Basic Microbiology* 55, 749-760.
58. Lopez D., Ribeiro S., Label P., Fumanal B., Venisse J.S., Kohler A., de Oliveira R.R., Labutti K., Lipzen A., Lail K., Bauer D., Ohm R.A., Barry K.W., Spatafora J., Grigoriev I.V., Martin F.M. and Pujade-Renaud V., 2018. Genome-Wide Analysis of *Corynespora cassiicola* Leaf Fall Disease Putative Effectors. *Front. Microbiol.* 9:276. doi: 10.3389/fmicb.2018.0027.
59. Ma, D.L., Yang, G.T., Mu, L.Q. and Song, Y.T., 2010. Application of SRAP in the genetic diversity of *Tricholoma matsutake* in northeastern China. *African Journal of Biotechnology* 9, 6244-6250.
60. Martyn R.D., Miller M.E. and Bruton B.D., 1993. Diseases of Cucurbits (*Citrullus* spp., *Cucumis* spp., *Cucurbita* spp. and others). Common name of plant diseases. The American Phytopathological Society, July 28<sup>th</sup> 2008. <URL:<http://www.apsnet.org/online/common/names/cucurbit.asp>>.
61. Newsam S., 1961. Pathology division report. *Rubber research institute of Malaysia*; pp. 63 - 70.

62. Nishijima W.T., 1999. Diseases of Papaya (*Carica papaya* L.). Common names of plant diseases. The American Phytopathological Society, July 28<sup>th</sup> 2008. <URL:<http://www.apsnet.org/online/common/names/papaya.asp>>.
63. Nguyen Anh Nghia., Kadir J., Sunderasan E., Abdullah MP., Malik A. and Napis S., 2008. Morphological and Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) Markers Analyses of *Corynespora cassiicola* Isolates from Rubber Plantations in Malaysia. *Mycopathologia* 166: 189 - 201.
64. Nguyen Anh Nghia., Kadir J., Sunderasan E., Abdullah MP., Malik A. and Napis S., 2010. Intraspecific Variability of *Corynespora cassiicola* Inferred from Single Nucleotide Polymorphisms in ITS Region of Ribosomal DNA. *Journal of rubber research*, 13(4), 257-264.
65. Nguyen Anh Nghia, Duong Ngoc Kieu Thi and Phan Thanh Dung., 2010. Ribosomal DNA-ITS (rDNA-ITS) sequencing and Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) markers analyses of *Corynespora cassiicola* isolates from rubber plantations in Viet Nam. *IRRDB International Rubber Conference* 2010. Hainan, China.
66. Nguyen Don Hieu, Nguyen Anh Nghia, Vu Thi Quynh Chi and Phan Thanh Dung., 2014. Genetic diversity and pathogenicity of *Corynespora cassiicola* isolates from rubber tree and other hosts in Vietnam. *Journal of rubber research*, 73 (3): 187 – 203.
67. Nguyễn Thái Hoan, Phan Thành Dũng và Trần Minh., 2007. Nghiên cứu phân vùng các bệnh hại chính trên cây cao su tại Việt Nam. *Báo cáo tổng kết đề tài*. Viện Nghiên cứu Cao su Việt Nam, trang 24 - 60.
68. Nguyễn Thị Huệ., 2006. Cây cao su. Nhà xuất bản tổng hợp, TP. Hồ Chí Minh; Trang 5 – 31.
69. Nilsson R.H., Kristiansson E., Ryberg M., Hallenberg N. and Larsson K.H., 2008. Intraspecific ITS variability in the kingdom fungi as expressed in the international sequence database. *Evolutionary Bioinformatics* (4): 193 - 201.

70. Nishijima W.T., 1999. Diseases of Papaya (*Carica papaya* L.). Common names of plant diseases. The American Phytopathological Society, July 28<sup>th</sup> 2008. <URL:<http://www.apsnet.org/online/common/names/papaya.asp>>.
71. Nugalewa A., Liyanage N.I.S, Liyanage A.S. and Aluthewage R.K., 1989. Influence of infection by *Corynespora cassiicola* on carbon dioxide assimilation rate in *Hevea* leaves. *Journal of Natural Rubber Research* 4 (4): 233 – 238.
72. Oliveira R.R., Vida J.B., Tessman D.J., Aguiar B.M., Caixeta M.P. and Bardoza A.A.L., 2007. Pathogenicity of *Corynespora cassiicola* isolates on different host plant. *Summa Phytopathologica* 33: 297 - 299.
73. Oktavia F., Kuswanhadi, Widodo, Dinarti D. and Sudarsono., 2017. Pathogenicity and rDNA-ITS sequence analysis of the *Corynespora cassiicola* isolates from rubber plantations in Indonesia. *Emirates Journal of Food and Agriculture*; 29 (11): 872-883.
74. Onesirosan P.T., Arny D.C. and Durbin R.D., 1974. Host specificity of Nigerian and North American isolates of *Corynespora cassiicola*. *Phytopathology* 64: 1365 - 1367.
75. Page R.D.M., 1996. TREEVIEW: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences*;12: 357 - 358.
76. Pavlíček A., Hrdá Š. and Flegr J., 1999. FreeTree - freeware program for construction of phylogenetic trees on the basis of distance data and for bootstrap/jackknife analysis of the trees robustness. Application in the RAPD analysis of genus *Frenkelia*. *Folia Biologica* 45: 97 - 99.
77. Pawirosoemardjo S. and Purwantara D.A., 1987. Sporulation and spore germination of *Corynespora cassiicola*. In *proceeding of IRRDB symposium on pathology of Hevea brasiliensis*. Chiang Mai, Thailand. *The International Rubber Research and Development Board*; pp. 24 – 33.



78. Pernezny K and Litz R.E., 1999. Some common diseases of papaya in Florida. University of Florida. Plant Pathology Fact Sheet PP 35. 1999. <http://edis.ifas.ufl.edu/pdffiles/VH/VH05000.pdf>.
79. Pernezny K. and Simone G.W., 1993. Target spot of several vegetable crops. University of Florida. Plant Pathology Fact Sheet, July 12<sup>th</sup> 2009. <http://edis.ifas.ufl.edu/pdffiles/VH/VH05200.pdf>.
80. Phan Thanh Dung., 1995. Studies on *C. cassiicola* (Berk. & Curt) Wei on rubber. *MSc. thesis, University Pertanian Malaysia*.
81. Phan Thanh Dung and Nguyen Thai Hoan., 2000. Current status of *Corynespora* leaf fall in Vietnam. *Presented at workshop on Corynespora leaf fall disease of Hevea brasiliensis*, Kuala Lumpur - Malaysia and Medan – Indonesia.
82. Phan Thanh Dung and Nguyen Anh Nghia., 2011. *Corynespora* leaf fall disease on rubber in Vietnam, current status and recent studies. *Presented at IRRDB International Rubber Conference*. Chiang Mai, Thailand.
83. Phạm Hải Dương, Lê Mậu Túy, Tống Viết Thịnh, Nguyễn Đôn Hiệu, Nguyễn Năng, Trần Minh, Võ Thị Thu Hà và Phan Đình Thảo., 2015. *Cơ cấu bộ giống cao su giai đoạn 2015 – 2020*. Tập đoàn Công nghiệp Cao su Việt Nam, trang 18 – 48.
84. Phạm Văn Dư., 2002. Cơ sở di truyền học tính kháng trong nghiên cứu quản lý bệnh hại cây trồng. *Cơ sở di truyền tính kháng sâu bệnh hại cây trồng*. Nhà xuất bản Nông nghiệp, trang 89 – 106.
85. Pongthep K., 1987. *Corynespora* disease of *Hevea* in Thailand. In *proceeding of IRRDB symposium on pathology of Hevea brasiliensis*, 2 - 3 November 1987. Chiang Mai, Thailand. *The International Rubber Research and Development Board*, pp. 1 - 5.
86. Poltronieri L.S., Duarte M.L.R., Alfenas A.C., Tridade D.R. and Albuquerque F.C., 2003. Three new pathogens infecting Antilles cherry in the State of para. *Fitopatologia Brasileira* 28: 424 - 426.

87. Qi Y., Xie Y., Zhang X., Pu J., Zhang H., Huang S. and Zhang H., 2009. Molecular and pathogenic variation identified among isolates of *Corynespora cassiicola*. *Molecular Biotechnology* 41: 145 - 151.
88. Qi, Y. X., X. Zhang, J. J. Pu, X. M. Liu, Y. Lu, H. Zhang, H. Q. Zhang, Y. C. Lv and Y. X. Xie., 2011. Morphological and molecular analysis of genetic variability within isolates of *Corynespora cassiicola* from different hosts. *Eur. J. Plant Pathol.* 130: 83-95.
89. Rajalakshmy V.K. and Kothandaraman R., 1996. Current status of *Corynespora* leaf fall in India: the occurrence and management. In: *Proceeding workshop on Corynespora leaf fall disease of Hevea Rubber*. Medan, Indonesia. Indonesian Rubber Research Institute; pp. 37–46.
90. Radziad N.Z., Sulong S.H. and Hidir S., 1996. The epidemiology of *Corynespora* leaf fall of Rubber in Malaysia - Conidia dispersal pattern. In: *Proceedings of the Workshop on Corynespora Leaf fall Disease of Hevea Rubber*. Medan, Indonesia; pp. 37 - 43.
91. Radziah N.Z. and Ismail H., 1990. Major leaf diseases of rubber and their management. *RRIM Planters' Bulletin* ;204:67 - 79.
92. Rajalakshmy V.K. and Kothandaraman R., 1996. Current status of *Corynespora* leaf fall in India: the occurrence and management. In: *Proceeding workshop on Corynespora leaf fall disease of Hevea Rubber*. Medan, Indonesia. Indonesian Rubber Research Institute; pp. 37–46.
93. Rahman M.A., 1988. Diseases of *Hevea brasiliensis* in Bangladesh. *Bano Biggyan Patrika*;17:73–79.
94. Ramakrishman T.S. and Pillay R., 1961. Leaf spot of rubber caused by *Corynespora cassiicola* (Berk. & Curt.) Wei. *Rubber Board Bulletin* 5: 32 - 35.

95. Ribeiro, S., Minh Tran, D., Deon, M., Clement-Demange, A., Garcia, D., Soumahoro, M., Masson, A., and Pujade-renaud, V., 2019. Gene deletion of *Corynespora cassiicola* *cassiicolin* Cas1 suppresses virulence in the rubber tree. *Fungal Genetics and Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2019.05.004>.
96. RRIM (Rubber Research Institute of Malaysia)., 2000. Malaysia Country Report. *Paper presented at IRRDB Workshop on Corynespora Leaf Fall of Rubber*. Selangor, Malaysia.
97. Romruensukharom P., Tragoonrung S., Vanavichit A. and Toojinda T., 2005. Genetic variability of *Corynespora cassiicola* population in Thailand. *Journal of Rubber Research* 8(1): 38 - 49.
98. Saha T., Kumar A., Sreena A.S., Joseph A., Jacob C.K., Kothandaraman R. and Nazeer M.A., 2000. Genetic variability of *Corynespora cassiicola* infecting *Hevea brasiliensis* isolated from the traditional rubber growing areas in India. *India Journal of Natural Rubber Research* 13 (1,2): 1 - 10.
99. Saha, T., A. Kumar, B. Roy, M. Ravindran, A. Joseph, C. K. Jacob, M. A. Nazeer, K. Sreedharan, K. Vinod. and B. Chulaki., 2002. Molecular characterisation of fungal pathogens causing leaf diseases in rubber (*Hevea brasiliensis*). In: *Proceeding of the 15th Plantation Crops Symposium Placrosym XV*. India; pp. 195-203.
100. Sailajadevi T., 2006. Disease - weather relationship. In *Corynespora leaf disease of Hevea brasiliensis - Strategies for management* (Jacob C.K.). Rubber Research Institute of India; pp. 44 - 51.
101. Silva W.P.K., Deverall B.J. and Lyon B.R., 1998. Molecular, physiological and pathological characterization of *Corynespora* leaf spot fungi from rubber plantations in Sri Lanka. *Plant pathology* 47 (3): 267 - 277.
102. Silva W.P.K., Karunanayake EH., Ravi L.C. W. and Priyanka U.M.S., 2003. Genetic variation in *Corynespora cassiicola*: a possible relation between host origin and virulence. *Mycol Res.* 107 (Pt 5): 567 - 571.

103. Silva W.P.K., Multani D.S, Deverall B.J. and Lyon B.R., 1995. RFLP and RAPD analyses in the identification and differentiation of the leaf spot fungus *C. cassiicola*. *Australian Journal of Botani* 43: 609 - 618.
104. Sinulingga W., Suwarto. and Soepena H., 1996. Current status of *Corynespora* leaf fall in Indonesia. In *Proceeding workshop on Corynespora leaf fall disease of Hevea Rubber*, Medan, Indonesia, 16 - 17 December 1996. Indonesia Rubber Research Institute; pp. 29 - 36.
105. Situmorang A., Suryaningtyas H., Pawirosoemardjo S. and Sinaga M.S., 2000. Virulence of isolates of *Corynespora cassiicola* originated from various rubber clones and provinces in Indonesia on differential rubber clones. In *Proceeding of Indonesia Rubber Conference and IRRDB Symposium*, Borgor, Indonesia. Indonesia Rubber Research institute; pp. 225 - 234.
106. Shimomoto, Y., T. Sato, H. Hojo, Y. Morita, S. Takeuchi, H. Mizumoto, A. Kiba. and Y. Hikichi. 2011. Pathogenic and genetic variation among isolates of *Corynespora cassiicola* in Japan. *Plant Pathol.* 60: 253-260.
107. Shuib S. S. S, Déon M, Mahyuddin M. M, Izhar A, Fumanal B, Sunderasan E and Renaud V. P., 2015. *Cassiicolin Genes among Corynespora cassiicola Isolates from Rubber Plantations in Malaysia*. *Journal of rubber research*, 18 (2): 109 – 126.
108. Suwarto, Pawirosoemardjo S., Darussamin A. and Sinaga M.S., 2000. Assay of isolates of *Corynespora cassiicola* originated from papaw and differential rubber clones. In *Proceedings of Indonesian Rubber Conference and IRRDB Symposium*, Bogor, Indonesia. Indonesia Rubber Research Institute, pp. 205 - 224.
109. Spencer J.A. and Walter H.J., 1969. Variation in certain isolates of *Corynespora cassiicola*. *Phytopathology*;59:58.
110. Tan A.M., Lo T.P., Vadivel G., Bachik M.S. and Yoon K.P., 1992. Survey of major leaf disease of rubber in Peninsular Malaysia. *RRIM Planter's Bulletin* 221: 51 - 62.

111. Tautz D., 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research*;17: 6463 - 6471.
112. Teoh C.H., 1983. *Corynespora* leaf fall of *Hevea* in West Java. *Malaysian Plant Protection Society, Newsletter*;7(2):12–13.
113. Thompson D.J., Higgins D.G. and Gibson T.J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighing, position-specific gap penalties and weigh matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22: 4673 – 4680.
114. Tập đoàn Công nghiệp Cao su Việt Nam., 2014. *Thực hiện công tác giống trong Tập đoàn: hiện trạng và đề xuất*. Hội nghị Kỹ thuật Nông nghiệp lần V, trang 49 – 60.
115. Vilgalys R., 2008. Conserved primer sequences for PCR amplification and sequencing from nuclear ribosomal RNA, Vilgalys lab, Duke University. <http://152.3.12.176/fungi/mycolab/primers.htm>.
116. Wei C.T., 1950. Notes on *Corynespora*. CMI Kew, Surrey, London, UK. Mycological paper, No. 34. .
117. White T.J., Bruns T., Lee S. and Taylor J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In *PCR protocols, a guide to methods and applications* (Eds. Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J., and White T.J.). Academic Press, New York; pp. 315 - 322.
118. Yao, F.J., Lu, L.X., Wang, P., Fang, M., Zhang, Y.M., Chen, Y., Zhang, W.T., Kong, X.H., Lu, J. and Honda, Y., 2018. Development of a Molecular Marker for Fruiting Body Pattern in *Auricularia auricula-judae*. *Mycobiology* 46, 72-78.
119. Yin, Y., Liu, Y., Li, H., Zhao, S., Wang, S., Liu, Y., Wu, D. and Xu, F., 2014. Genetic diversity of *Pleurotus pulmonarius* revealed by RAPD, ISSR, and SRAP fingerprinting. *Current Microbiology* 68, 397-403.

120. Weising K., Nybom H., Wolff K. and Kahl G., 2005. DNA fingerprinting in plants: principles, methods, and applications. *CRC Press Publisher*, USA.
121. Zhang, Q.S., Xu, B.L., Liu, L.D., Yuan, Q.Q., Dong, H.X., Cheng, X.H. and Lin, D.L., 2012. Analysis of genetic diversity among Chinese *Pleurotus scitrinopileatus* Singer cultivars using two molecular marker systems (ISSRs and SRAPs) and morphological traits. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 28, 2237-2248.
122. Zietkiewicz E., Rafalski A. and Labuda D., 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*; 20:176 - 183.

## PHỤ LỤC

### **Phụ lục 1. ĐẶC ĐIỂM CÁC DVT CAO SU ĐƯỢC SỬ DỤNG LÀM VẬT LIỆU THÍ NGHIỆM TRONG LUẬN ÁN**

Đối tượng trong nội dung nghiên cứu tính gây bệnh của nấm *C. cassiicola* được thực hiện trên 12 DVT cao su. Trong đó, DVT RRIV 4 được sử dụng làm đối chứng mắc cảm bệnh và DVT PB 260 được sử dụng làm đối chứng chống chịu bệnh (Tập đoàn Công nghiệp Cao su Việt Nam, 2014); Các DVT RRIV 1, RRIV 106, RRIV 114, RRIV 209, PB 255 thuộc cơ cấu giống Bảng I khu vực Đông Nam Bộ giai đoạn 2016 – 2020; các DVT RRIV 109, RRIV 124, RRIV 206, RRIV 230, PB312 có triển vọng trong cơ cấu giống 2021 – 2025 của Tập đoàn Công nghiệp Cao su Việt Nam (Phạm Hải Dương và ctv, 2015).

#### **\* Dòng vô tính RRIV 4**

DVT cao su RRIV 4 (phổ hệ RRIC 110 x PB 235, tên gốc: LH 82/182) có xuất xứ tại Việt Nam, do Viện nghiên cứu Cao su Việt Nam lai tạo năm 1982. Khảo nghiệm từ năm 1983, khu vực hóa từ năm 1994 và năm 1997 bắt đầu thử nghiệm diện rộng. Từ năm 2002, RRIV 4 được đưa vào Bảng I cơ cấu giống khuyến cáo của Tập đoàn Công nghiệp Cao su Việt Nam trồng ở vùng Đông Nam Bộ. Đây là DVT cao su sinh trưởng rất khỏe trong giai đoạn KTCB, dễ trồng, dễ chăm sóc, đặc biệt có năng suất rất cao. Vì vậy, trong giai đoạn 2002 đến 2009, các Công ty cao su trong ngành và người trồng cao su đã tự phát mở rộng diện tích trồng một cách nhanh chóng, vượt xa quy hoạch diện tích và vùng sinh thái khuyến cáo. Đến năm 2010, nhận thấy sự rủi ro khi phát triển diện tích trồng quá lớn, cùng với một số hạn chế về đặc tính nông học của DVT RRIV 4 như thân mềm, dễ gãy đổ do gió mạnh, sinh khối gỗ thấp, đặc biệt là mắc cảm với bệnh rụng lá *Corynespora*, Tập đoàn Công nghiệp Cao su Việt Nam đã có quyết định khuyến cáo không phát triển mới diện tích trồng DVT cao su này (Tập đoàn Công nghiệp Cao su Việt Nam, 2014).

#### **\* Dòng vô tính PB 260**

DVT cao su PB 260 (phổ hệ PB 5/51 x PB 49) có xuất xứ tại Malaysia, do công ty Golden Hope lai tạo năm 1956, được nhập nội vào Việt Nam năm 1978.

Khảo nghiệm từ năm 1983, được Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn công nhận sản xuất diện rộng năm 1997. Từ năm 2006, PB 260 được đưa vào Bảng I cơ cấu giống khuyến cáo của Tập đoàn Công nghiệp Cao su Việt Nam. Đây là DVT cao su sinh trưởng rất khỏe, dễ trồng, dễ chăm sóc, đặc biệt có khả năng chống chịu bệnh rụng lá *Corynespora*. Vì vậy, trong giai đoạn 2007 đến 2012, các Công ty cao su trong ngành và người trồng cao su đã tự phát mở rộng diện tích trồng một cách nhanh chóng, vượt xa quy hoạch diện tích và vùng sinh thái khuyến cáo. Đến năm 2014, nhận thấy sự rủi ro khi phát triển diện tích trồng quá lớn, cùng với một số hạn chế về đặc tính nông học như dễ khô mặt cạo, đông mủ sớm trên miệng cạo (giai đoạn đầu mùa mưa), đáp ứng kích thích kém, phản ứng u lồi với cạo, đặc biệt là mắc cảm với bệnh *Botryodiplodia*, Tập đoàn Công nghiệp Cao su Việt Nam đã có quyết định khuyến cáo không phát triển mới diện tích trồng DVT cao su này (Tập đoàn Công nghiệp Cao su Việt Nam, 2014).



Hình mức độ nhiễm bệnh *Corynespora* trên tán lá của DVT PB 260 (bên trái, không nhiễm bệnh) và DVT RRIV 4 (bên phải, nhiễm bệnh nặng).



**\* Dòng vô tính RRIV 1**

- Nguồn gốc: Viện Nghiên cứu Cao su Việt Nam, lai tạo năm 1982. Phổ hệ RRIC 110 x RRIC 117. Tên gốc: LH 82/122.
- Sinh trưởng và năng suất: Sinh trưởng khỏe, đồng đều, tỷ lệ cây mở miệng cao. Năng suất cao, sớm, đạt bình quân 2,5 tấn/ha/năm ở vùng thuận lợi.
- Chống chịu bệnh hại: Nhiễm trung bình bệnh phấn trắng và nấm hồng ở vùng thuận lợi, nhiễm rất nhẹ *Corynespora* và *Botryodiplodia*. Dễ nhiễm bệnh héo đen đầu lá, gây hại đáng kể trên vườn nhân, vườn trồng mới ở các năm đầu KTCB.

**\* Dòng vô tính RRIV 106**

- Xuất xứ: Viện Nghiên cứu Cao su Việt Nam, lai tạo năm 1983. Phổ hệ: RRIC 110 x PB 252. Tên gốc: LH 83/85.
- Sinh trưởng và năng suất: sinh trưởng khỏe trong thời gian KTCB ở vùng thuộc Đông Nam Bộ và miền Trung. Năng suất đạt rất cao từ các năm đầu. Ở Đông Nam Bộ cho năng suất trên mặt cạo BO1 đạt 2,5 – 3 tấn/ha/năm.
- Chống chịu bệnh hại: Nhiễm nhẹ các bệnh phổ biến: phấn trắng, héo đen, nấm hồng và bệnh *Corynespora*.

**\* Dòng vô tính RRIV 114**

- Xuất xứ: Viện Nghiên cứu Cao su Việt Nam, lai tạo năm 1988. Phổ hệ: RRIC 121 x PB 235. Tên gốc LH 88/72.
- Sinh trưởng và năng suất: sinh trưởng rất khỏe trong thời gian KTCB ở vùng thuận lợi, tăng vanh trong khi cạo tốt. Có năng suất cao sớm trên khảo nghiệm giống ở vùng Đông Nam Bộ, năng suất trên mặt cạo BO1 từ 2,5 – 3 tấn/ha/năm.
- Chống chịu bệnh hại: Nhiễm trung bình bệnh phấn trắng, nhiễm nhẹ héo đen đầu lá và nấm hồng, nhiễm nhẹ bệnh *Corynespora*.

**\* Dòng vô tính RRIV 209**

- Xuất xứ: Viện Nghiên cứu Cao su Việt Nam, lai tạo năm 1994. Phổ hệ: LH 82/173 x RRIC 121. Tên gốc: LH 94/481.
- Sinh trưởng và năng suất: sinh trưởng khỏe giai đoạn KTCB trên nhiều vùng trồng cao su ở Đông Nam Bộ, Tây Nguyên, Bắc Trung Bộ và Tây Bắc, tăng vanh

trong khi cạo khá. Năng suất rất cao, sớm. Ở vùng Đông Nam bộ trong điều kiện đất xám đạt 3 tấn/ha/năm từ năm thứ 3. Trong điều kiện tới hạn (cao trình cao, đất kém, khô hại và rét hại) năng suất vẫn thuộc nhóm dẫn đầu.

- Chống chịu bệnh hại: Nhiễm nhẹ bệnh phấn trắng, héo đen, nhiễm bệnh *Corynespora* và đốm mắt chim trung bình trên vườn nhân và vườn ương. Rất dễ nhiễm nấm hồng.

**\* Dòng vô tính PB 255**

- Xuất xứ: Trạm Prang Besar, Công ty Golden Hope, Malaysia. Lai tạo năm 1955. Nhập nội vào Việt Nam năm 1978. Phổ hệ: PB 5/51 x PB 32/36.
- Sinh trưởng và năng suất: sinh trưởng khá ở vùng thuận lợi, biến thiên lớn theo điều kiện môi trường. Tăng trưởng khá trong giai đoạn thu hoạch mù. Năng suất rất cao ở vùng thuận lợi, đạt 2 tấn/ha/năm bình quân 10 năm đầu không kích thích; đạt 2,5 – 3 tấn/ha/năm với chế độ cạo có kích thích từ năm cạo thứ tư.
- Chống chịu bệnh hại: Dễ nhiễm bệnh nấm hồng; nhiễm rụng lá mùa mưa trên trung bình; nhiễm nhẹ phấn trắng và rất nhẹ *Corynespora*. Dễ khô miệng cạo.

**\* Dòng vô tính RRIV 109**

- Xuất xứ: Viện Nghiên cứu Cao su Việt Nam, lai tạo năm 1983. Phổ hệ: PB 235 x RRIC 123. Tên gốc: LH 83/290.
- Sinh trưởng và năng suất: sinh trưởng khỏe giai đoạn KTCB trên nhiều vùng trồng cao su ở Đông Nam Bộ, tăng trưởng tốt trong giai đoạn thu hoạch mù. Năng suất đạt trên 2 tấn/ha từ năm cạo thứ 2 tại vùng Đông Nam Bộ.
- Chống chịu bệnh hại: Nhiễm nhẹ bệnh phấn trắng, *Corynespora* và nấm hồng. Nhiễm bệnh rụng lá mùa mưa ở mức trung bình, dễ khô mặt cạo.

**\* Dòng vô tính RRIV 124**

- Xuất xứ: Viện Nghiên cứu Cao su Việt Nam, lai tạo năm 1990. Phổ hệ: RRIC 121 x RRIC 115. Tên gốc: LH 90/952.
- Sinh trưởng và năng suất: sinh trưởng khỏe giai đoạn KTCB trên nhiều vùng trồng cao su. Tăng vạnh tốt trong giai đoạn khai thác, có chiều cao thân chính

cho trữ lượng gỗ tốt. Năng suất đạt trên 2 tấn/ha từ năm cạo thứ 2 tại vùng Đông Nam Bộ.

- Chống chịu bệnh hại: Nhiễm nhẹ bệnh phấn trắng, *Corynespora* và nấm hồng. Chịu rét, chịu hạn khá.

**\* Dòng vô tính RRIV 206**

- Xuất xứ: Viện Nghiên cứu Cao su Việt Nam, lai tạo năm 1994. Phổ hệ: PB 235 x RRIV 5. Tên gốc: LH 94/286.
- Sinh trưởng khỏe giai đoạn KTCB trên nhiều vùng trồng cao su ở Đông Nam Bộ, tăng trưởng tốt trong giai đoạn thu hoạch mũ. Năng suất trung bình 6 năm cạo đầu đạt trên 2,2 tấn/ha tại vùng Đông Nam Bộ.
- Chống chịu bệnh hại: Nhiễm nhẹ bệnh phấn trắng, *Corynespora* và nấm hồng.

**\* Dòng vô tính RRIV 209**

- Xuất xứ: Viện Nghiên cứu Cao su Việt Nam, lai tạo năm 1994. Phổ hệ: LH 82/173 x RRIC 121. Tên gốc: LH 94/481.
- Sinh trưởng khỏe giai đoạn KTCB trên nhiều vùng trồng cao su, tăng trưởng tốt trong giai đoạn thu hoạch mũ. Năng suất cao sớm, vùng Đông Nam Bộ đạt 3 tấn/ha từ năm cạo thứ 3.
- Chống chịu bệnh hại: Nhiễm nhẹ bệnh phấn trắng, *Corynespora*, rất dễ nhiễm bệnh nấm hồng. Chịu rét khá, chịu hạn và cao trình khá.

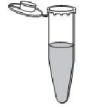
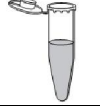




**\* Dòng vô tính RRIV 230**

- Xuất xứ: Viện Nghiên cứu Cao su Việt Nam, lai tạo năm 1991. Phổ hệ: RRIC 121 x GU 164. Tên gốc: LH 91/579.
- Sinh trưởng khỏe giai đoạn KTCB trên nhiều vùng Đông Nam Bộ và cả vùng có điều kiện khắc nghiệt của vùng Phú Quỳ (Nghệ An), tăng trưởng tốt trong giai đoạn thu hoạch mũ. Năng suất khá cao, đạt 2,6 tấn/ha từ năm cạo thứ 6.
- Chống chịu bệnh hại: Nhiễm nhẹ bệnh phấn trắng, *Corynespora*, nấm hồng. Chịu rét khá.

**\* Dòng vô tính PB 312**

- Xuất xứ: Trạm Prang Besar, Công ty Golden Hope, Malaysia. Lai tạo năm 1956. Nhập nội vào Việt Nam năm 1984. Phổ hệ: RRIM 600 x PB 235.
- Sinh trưởng và năng suất: sinh trưởng trung bình ở vùng thuận lợi, sinh trưởng khá ở vùng Tây Nguyên. Tăng trưởng khá trong giai đoạn thu hoạch mũ. Năng suất khá cao ở Tây Nguyên.
- Chống chịu bệnh hại: Nhiễm nhẹ bệnh phấn trắng; chịu rét khá.

**Phụ lục 2. QUI TRÌNH LY TRÍCH DNA NẤM *C. cassicola* THEO PHƯƠNG PHÁP DÙNG Wizard<sup>R</sup> Genomic DNA Purification Kit (có cải tiến)**

1. Cho 40 mg sợi nấm được nghiền bằng nitor lỏng vào eppendorf 2 ml, đặt vào khay đá đã được chuẩn bị trước, mở nắp tube.	Không để bột nấm dính trên thành và miệng tube	
2. Cho vào tube 600 µl Nuclei Lysis Solution; Vortex; Ủ ở 65°C trong 15 phút, trong thời gian ủ nhiệt nên đảo tube 2 – 3 lần.		
3. Thêm vào 5 µl RNase Solution; Trộn mẫu bằng cách đảo ngược tube 4 – 5 lần; Vortex trong 5 giây; Ủ ở 37°C trong 15 phút, đảo tube 1 – 2 lần; sau đó để ở nhiệt độ phòng trong 5 phút.		Đảo tube 1- 2 lần
4. Thêm 200 µl Protein Precipitation Solution; Vortex mạnh ở tốc độ cao trong 20 giây; Ủ trong khay đá 5 phút.		Ủ khay đá
5. Ly tâm 14.000 vòng/phút trong 5 phút để loại bỏ các chất kết tủa.		
6. Dùng pipet chuyển 400 µl dịch lỏng bên trên vào một tube mới đã chứa sẵn 600 µl isopropanol (đã được làm lạnh trong tủ lạnh - 20 °C và đặt trong khay đá); trộn nhẹ bằng cách đảo ngược tube 1 – 2 lần.	Ủ tủ lạnh - 20 °C trong 30 – 45 phút.	
7. Ly tâm 14.000 vòng/phút trong 2 phút.		
8. Loại bỏ dịch lỏng phía trên (nghiên tube để loại bỏ dịch lỏng), lưu ý phần kết tủa ở đáy tube chính là DNA. Thêm vào 600 µl ethanol 70%, nhẹ tay đảo ngược tube 4 – 5 lần để rửa DNA.		Phần kết tủa là DNA
9. Ly tâm 14.000 vòng/phút trong 1 phút, để làm khô DNA; Nhẹ tay đổ bỏ ethanol 70%.		
10. Úp ngược ống trên giấy thấm sạch, làm khô DNA (ethanol bay hơi hết) trong buồng hút khoảng 15 phút.		
11. Thêm 100 µl DNA rehydration solution (hoặc TE buffer) để hòa tan DNA.		
12. Ủ 65°C trong 1 giờ (định kỳ vỗ nhẹ đáy tube) để hòa tan DNA; lưu trữ ở 4 - 8°C. * Nếu hòa tan bằng TE buffer thì ủ 37°C trong 45 phút.	Thu dung dịch DNA	

**Phụ bảng 1.** Đặc điểm hình thái và sinh trưởng của tản nấm *C. cassicola* sau 7 ngày cấy nấm

STT	MPL	Màu sắc	Kết cấu	TĐTTTB	KT (mm)
				(mm/ngày)	TB ± SD
1	CoryLK02	Xám	Dày	7,7 <sup>t-y</sup> ± 0,1	54,0 <sup>u-z</sup> ± 1,0
2	CoryLK24	Xám	Dày	10,9 <sup>a-d</sup> ± 0,1	76,0 <sup>a-d</sup> ± 1,0
3	CoryLK27	Xám	Dày	7,3 <sup>v-z</sup> ± 0,2	51,3 <sup>w-a'</sup> ± 1,5
4	CoryLK29	Xám	Dày	9,2 <sup>i-p</sup> ± 0,2	64,7 <sup>i-q</sup> ± 1,5
5	CoryLK32	Xám đen	Dày	7,7 <sup>u-y</sup> ± 0,2	53,7 <sup>v-z</sup> ± 1,5
6	CoryLK33	Xám	Dày	8,4 <sup>m-v</sup> ± 0,1	59,0 <sup>m-w</sup> ± 1,0
7	CoryLK60	Xám	Dày	7,8 <sup>t-y</sup> ± 0,1	54,3 <sup>u-z</sup> ± 0,6
8	CoryDT01	Xám	Dày	7,7 <sup>t-y</sup> ± 0,1	54,0 <sup>u-z</sup> ± 1,0
9	CoryDT02	Xám trắng	Dày	9,4 <sup>h-n</sup> ± 0,1	66,0 <sup>h-n</sup> ± 1,0
10	CoryDT03	Xám	Dày	7,9 <sup>s-y</sup> ± 0,3	55,3 <sup>t-z</sup> ± 2,1
11	CoryDT04	Xám đen	Dày	10,7 <sup>a-e</sup> ± 0,4	75,0 <sup>a-e</sup> ± 2,6
12	CoryDT05	Xám	Dày	8,9 <sup>j-s</sup> ± 0,1	62,0 <sup>i-u</sup> ± 1,0
13	CoryBL01	Xám	Dày	9,1 <sup>i-q</sup> ± 0,2	63,7 <sup>i-s</sup> ± 1,5
14	CoryDP03	Xám	Dày	9,3 <sup>i-p</sup> ± 0,4	65,0 <sup>i-q</sup> ± 2,6
15	CoryDP04	Xám	Dày	7,6 <sup>u-y</sup> ± 0,1	53,3 <sup>v-z</sup> ± 0,6
16	CoryDP07	Xám đen	Dày	9,0 <sup>i-s</sup> ± 0,4	63,0 <sup>i-t</sup> ± 2,6
17	CoryDP08	Xám	Dày	11,1 <sup>ab</sup> ± 0,3	77,7 <sup>ab</sup> ± 2,1
18	CoryDP09	Xám	Dày	9,4 <sup>h-n</sup> ± 0,1	66,0 <sup>h-n</sup> ± 1,0
19	CoryDP11	Xám trắng	Dày	9,8 <sup>d-k</sup> ± 0,8	68,7 <sup>d-k</sup> ± 5,7
20	CoryTN02	Xám	Dày	8,3 <sup>n-w</sup> ± 0,4	58,3 <sup>o-w</sup> ± 2,5
21	CoryTN09	Xám	Dày	8,4 <sup>m-v</sup> ± 0,1	59,0 <sup>m-w</sup> ± 1,0
22	CoryTN10	Xám	Dày	9,1 <sup>i-q</sup> ± 0,4	64,0 <sup>i-r</sup> ± 2,6
23	CoryTN11	Xám	Dày	9,5 <sup>f-m</sup> ± 0,6	66,7 <sup>f-n</sup> ± 4,2
24	CoryTN13	Xám	Dày	9,4 <sup>h-n</sup> ± 0,4	66,0 <sup>h-n</sup> ± 3,0
25	CoryDN03	Xám đen	Dày	10,6 <sup>a-f</sup> ± 0,7	74,3 <sup>a-f</sup> ± 5,1
26	CoryDN06	Xám	Dày	7,2 <sup>w-a'</sup> ± 0,5	50,7 <sup>x-b'</sup> ± 3,2
27	CoryDN07	Xám	Dày	9,6 <sup>e-l</sup> ± 0,2	67,3 <sup>i-t</sup> ± 1,5

**Phụ bảng 1 (tt).** Đặc điểm hình thái và sinh trưởng của tản nấm *C. cassicola* sau 7 ngày cấy nấm

STT	MPL	Màu sắc	Kết cấu	TĐTTTB (mm/ngày)		KT (mm)	
				TB ± SD		TB ± SD	
28	CoryDN10	Xám	Dày	10,5 <sup>a-h</sup>	± 0,1	73,7 <sup>a-h</sup>	± 0,6
29	CoryDN12	Xám	Dày	8,7 <sup>k-u</sup>	± 0,1	61,0 <sup>k-v</sup>	± 1,0
30	CoryDN13	Xám	Dày	8,6 <sup>l-u</sup>	± 0,4	60,0 <sup>l-v</sup>	± 2,6
31	CoryDN15	Xám đen	Mỏng	10,9 <sup>abc</sup>	± 0,2	76,3 <sup>abc</sup>	± 1,2
32	CoryDN21	Xám đen	Dày	9,2 <sup>i-p</sup>	± 0,3	64,7 <sup>i-q</sup>	± 2,1
33	CoryDN23	Xám	Dày	9,5 <sup>f-m</sup>	± 0,6	66,3 <sup>g-n</sup>	± 4,0
34	CoryDN24	Xám	Dày	8,0 <sup>q-w</sup>	± 0,4	56,3 <sup>r-y</sup>	± 2,9
35	CoryDN25	Xám	Dày	9,2 <sup>i-p</sup>	± 0,1	64,7 <sup>i-q</sup>	± 0,6
36	CoryDN27	Xám đen	Dày	8,8 <sup>k-u</sup>	± 0,2	61,3 <sup>k-v</sup>	± 1,5
37	CoryDN30	Xám đen	Dày	8,1 <sup>p-w</sup>	± 0,5	57,0 <sup>q-w</sup>	± 3,5
38	CoryDN32	Xám trắng	Dày	9,4 <sup>h-n</sup>	± 0,6	66,0 <sup>h-n</sup>	± 4,0
39	CoryDN39	Xám	Dày	9,5 <sup>g-n</sup>	± 0,1	66,3 <sup>g-n</sup>	± 0,6
40	CoryPK01	Xám	Dày	8,2 <sup>o-w</sup>	± 0,5	57,3 <sup>p-w</sup>	± 3,2
41	CoryGL01	Xám đen	Mỏng	6,9 <sup>y-a'</sup>	± 0,8	48,3 <sup>z-b'</sup>	± 5,7
42	CoryGL02	Xám	Dày	6,9 <sup>y-a'</sup>	± 0,3	48,3 <sup>z-b'</sup>	± 2,1
43	CoryGL03	Xám	Dày	7,7 <sup>u-y</sup>	± 0,4	54,0 <sup>u-z</sup>	± 2,6
44	CoryKT01	Xám đen	Dày	7,9 <sup>s-y</sup>	± 0,2	55,3 <sup>t-z</sup>	± 1,5
45	CoryKT02	Xám	Dày	6,4 <sup>z-a'</sup>	± 0,1	45,0 <sup>a-b'</sup>	± 1,0
46	CoryKT03	Xám đen	Dày	6,2 <sup>a'</sup>	± 0,3	43,3 <sup>b'</sup>	± 2,3
47	CoryKT04	Xám	Dày	7,4 <sup>v-z</sup>	± 0,1	51,7 <sup>w-a'</sup>	± 0,6
48	CoryBT03	Xám	Dày	11,5 <sup>a</sup>	± 0,1	80,3 <sup>a</sup>	± 0,6
49	CoryBT06	Xám	Dày	10,6 <sup>a-g</sup>	± 0,1	74,0 <sup>a-g</sup>	± 1,0
50	CoryBT08	Xám	Dày	8,2 <sup>o-w</sup>	± 0,4	57,3 <sup>p-w</sup>	± 2,5
51	CoryBT09	Xám	Dày	9,0 <sup>i-r</sup>	± 0,5	63,3 <sup>i-t</sup>	± 3,5
52	CoryBT13	Xám	Dày	8,6 <sup>k-u</sup>	± 0,1	60,3 <sup>l-v</sup>	± 0,6
53	CoryBT17	Xám trắng	Dày	7,2 <sup>w-a'</sup>	± 0,7	50,7 <sup>x-b'</sup>	± 4,7
54	CoryBT18	Xám trắng	Dày	9,0 <sup>i-r</sup>	± 0,4	63,3 <sup>i-t</sup>	± 2,9

**Phụ bảng 1 (tt).** Đặc điểm hình thái và sinh trưởng của tản nấm *C. cassicola* sau 7 ngày cấy nấm

STT	MPL	Màu sắc	Kết cấu	TĐTTTB	KT (mm)
				(mm/ngày)	TB ± SD
55	CoryQN01	Xám	Dày	8,0 <sup>r-y</sup> ± 0,2	55,7 <sup>s-z</sup> ± 1,5
56	CoryQN02	Xám đen	Dày	8,9 <sup>i-s</sup> ± 0,7	62,0 <sup>j-u</sup> ± 4,6
57	CoryQN03	Xám đen	Mỏng	7,7 <sup>t-y</sup> ± 0,2	54,0 <sup>u-z</sup> ± 1,7
58	CoryQN04	Xám đen	Dày	9,7 <sup>e-l</sup> ± 0,4	67,7 <sup>e-l</sup> ± 2,5
59	CoryQN05	Xám	Dày	8,7 <sup>k-u</sup> ± 0,2	61,0 <sup>k-v</sup> ± 1,7
60	CoryQN06	Xám	Dày	9,1 <sup>i-q</sup> ± 0,2	64,0 <sup>i-r</sup> ± 1,7
61	CoryQN07	Xám	Dày	9,3 <sup>i-o</sup> ± 0,3	65,3 <sup>i-p</sup> ± 2,1
62	CoryQN08	Xám	Mỏng	7,8 <sup>t-y</sup> ± 0,7	54,7 <sup>u-z</sup> ± 4,7
63	CoryQN13	Xám	Dày	8,6 <sup>l-u</sup> ± 0,8	60,3 <sup>l-v</sup> ± 5,5
64	CoryQN14	Xám đen	Dày	8,4 <sup>m-v</sup> ± 0,9	58,7 <sup>n-x</sup> ± 6,4
65	CoryQT01	Xám	Dày	9,6 <sup>e-l</sup> ± 0,1	67,3 <sup>e-l</sup> ± 0,6
66	CoryQT02	Xám	Dày	9,7 <sup>e-l</sup> ± 0,6	68,0 <sup>e-l</sup> ± 4,0
67	CoryQT03	Xám	Dày	8,7 <sup>k-u</sup> ± 1,9	61,0 <sup>k-v</sup> ± 13,0
68	CoryLC01	Xám đen	Dày	7,0 <sup>x-a'</sup> ± 0,4	49,0 <sup>y-b'</sup> ± 3,0
69	CoryLC02	Xám	Dày	9,6 <sup>f-m</sup> ± 0,4	67,0 <sup>f-m</sup> ± 2,6
70	CoryLC03	Xám	Dày	9,4 <sup>i-n</sup> ± 0,4	65,7 <sup>i-o</sup> ± 3,1
71	CorySL01	Xám, trắng	Dày	10,1 <sup>b-i</sup> ± 0,4	71,0 <sup>b-i</sup> ± 3,0
72	CorySL02	Xám	Dày	10,0 <sup>c-j</sup> ± 0,3	70,0 <sup>c-j</sup> ± 2,0
73	CorySL03	Xám	Dày	9,7 <sup>e-l</sup> ± 0,3	68,0 <sup>e-l</sup> ± 2,0
74	CoryLCA1	Xám trắng	Dày	7,9 <sup>s-y</sup> ± 0,2	55,3 <sup>t-z</sup> ± 1,5
75	CoryLCA2	Xám trắng	Dày	10,0 <sup>c-j</sup> ± 0,3	70,0 <sup>c-j</sup> ± 2,0
76	CoryLCA3	Xám đen	Mỏng	9,0 <sup>i-s</sup> ± 0,6	63,3 <sup>i-t</sup> ± 4,0
F tính				19,73 (**)	19,67 (**)
CV (%)				5,00	5,01

\* TĐPTTB: tốc độ tăng trưởng trung bình (mm/ngày); KT: kích thước (mm). Các giá trị trung bình trong cùng một cột số liệu, có cùng mẫu tự thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức  $\alpha = 0,01$  trong trắc nghiệm Duncan.



**Phụ bảng 2.** Kích thước ( $\mu\text{m}$ ) và số vách ngăn giả của bào tử nấm *C. cassiicola*

STT	MPL	Chiều dài ( $\mu\text{m}$ )	Chiều rộng ( $\mu\text{m}$ )	Số vách ngăn
		TB $\pm$ SD	TB $\pm$ SD	TB $\pm$ SD
1	CoryLK02	89,0 <sup>d-n</sup> $\pm$ 31,4	7,5 <sup>c-r</sup> $\pm$ 1,3	2,8 <sup>s-x</sup> $\pm$ 1,5
2	CoryLK24	89,4 <sup>d-m</sup> $\pm$ 31,8	7,8 <sup>a-m</sup> $\pm$ 1,2	2,7 <sup>s-x</sup> $\pm$ 1,3
3	CoryLK27	82,7 <sup>e-o</sup> $\pm$ 24,4	7,0 <sup>m-y</sup> $\pm$ 1,1	3,3 <sup>n-v</sup> $\pm$ 1,6
4	CoryLK29	80,6 <sup>g-r</sup> $\pm$ 28,9	7,6 <sup>b-p</sup> $\pm$ 1,3	3,1 <sup>p-w</sup> $\pm$ 1,9
5	CoryLK32	61,5 <sup>p-x</sup> $\pm$ 25,8	6,9 <sup>n-y</sup> $\pm$ 1,1	2,1 <sup>w-y</sup> $\pm$ 1,4
6	CoryLK33	104,6 <sup>d-g</sup> $\pm$ 37,7	7,1 <sup>l-y</sup> $\pm$ 1,4	2,4 <sup>u-y</sup> $\pm$ 1,7
7	CoryLK60	82,0 <sup>f-q</sup> $\pm$ 27,6	8,1 <sup>a-f</sup> $\pm$ 1,6	2,8 <sup>s-x</sup> $\pm$ 1,3
8	CoryDT01	79,9 <sup>g-r</sup> $\pm$ 46,6	7,1 <sup>k-w</sup> $\pm$ 1,5	3,7 <sup>k-u</sup> $\pm$ 2,4
9	CoryDT02	64,5 <sup>n-w</sup> $\pm$ 25,9	7,1 <sup>l-y</sup> $\pm$ 1,2	3,2 <sup>p-w</sup> $\pm$ 1,7
10	CoryDT03	82,9 <sup>e-o</sup> $\pm$ 42,9	7,1 <sup>l-y</sup> $\pm$ 1,3	4,5 <sup>e-r</sup> $\pm$ 2,5
11	CoryDT04	95,7 <sup>d-j</sup> $\pm$ 35,1	7,7 <sup>a-n</sup> $\pm$ 1,2	5,1 <sup>d-l</sup> $\pm$ 1,9
12	CoryDT05	103,6 <sup>d-g</sup> $\pm$ 41,8	7,1 <sup>k-w</sup> $\pm$ 1,6	6,7 <sup>c</sup> $\pm$ 3,6
13	CoryBL01	81,9 <sup>f-q</sup> $\pm$ 43,3	7,3 <sup>h-v</sup> $\pm$ 1,4	4,5 <sup>e-r</sup> $\pm$ 2,5
14	CoryDP03	71,9 <sup>j-v</sup> $\pm$ 32,5	7,1 <sup>k-x</sup> $\pm$ 1,2	4,1 <sup>h-t</sup> $\pm$ 2,3
15	CoryDP04	76,0 <sup>h-r</sup> $\pm$ 43,2	7,3 <sup>h-v</sup> $\pm$ 1,0	3,8 <sup>j-u</sup> $\pm$ 2,6
16	CoryDP07	76,5 <sup>h-r</sup> $\pm$ 29,6	7,4 <sup>d-t</sup> $\pm$ 1,1	4,6 <sup>e-q</sup> $\pm$ 2,1
17	CoryDP08	94,5 <sup>d-k</sup> $\pm$ 41,8	7,7 <sup>a-n</sup> $\pm$ 1,1	5,7 <sup>c-g</sup> $\pm$ 2,4
18	CoryDP09	85,4 <sup>e-o</sup> $\pm$ 29,9	7,7 <sup>a-n</sup> $\pm$ 1,2	4,9 <sup>d-n</sup> $\pm$ 2,5
19	CoryDP11	94,5 <sup>d-k</sup> $\pm$ 40,4	7,9 <sup>a-l</sup> $\pm$ 1,1	5,5 <sup>c-i</sup> $\pm$ 3,2
20	CoryTN02	77,9 <sup>h-r</sup> $\pm$ 30,9	8,1 <sup>a-f</sup> $\pm$ 1,2	2,6 <sup>t-y</sup> $\pm$ 1,6
21	CoryTN09	92,2 <sup>d-k</sup> $\pm$ 30,8	7,6 <sup>c-q</sup> $\pm$ 1,2	2,8 <sup>s-x</sup> $\pm$ 1,4
22	CoryTN10	111,4 <sup>cd</sup> $\pm$ 43,4	6,9 <sup>m-y</sup> $\pm$ 1,2	5,7 <sup>c-f</sup> $\pm$ 3,3
23	CoryTN11	76,9 <sup>h-r</sup> $\pm$ 33,6	7,0 <sup>m-y</sup> $\pm$ 1,0	3,0 <sup>q-w</sup> $\pm$ 1,7
24	CoryTN13	82,2 <sup>f-q</sup> $\pm$ 33,0	8,0 <sup>a-h</sup> $\pm$ 1,2	4,2 <sup>f-s</sup> $\pm$ 2,7
25	CoryDN03	54,8 <sup>s-y</sup> $\pm$ 28,0	7,5 <sup>c-s</sup> $\pm$ 1,3	2,7 <sup>s-x</sup> $\pm$ 2,3
26	CoryDN06	79,9 <sup>g-r</sup> $\pm$ 30,3	7,5 <sup>c-s</sup> $\pm$ 1,1	4,3 <sup>f-s</sup> $\pm$ 2,0
27	CoryDN07	105,7 <sup>def</sup> $\pm$ 33,9	8,1 <sup>a-f</sup> $\pm$ 1,0	5,9 <sup>cde</sup> $\pm$ 2,7

**Phụ bảng 2 (tt).** Kích thước ( $\mu\text{m}$ ) và số vách ngăn giả của bào tử nấm *C. cassicola*

STT	MPL	Chiều dài ( $\mu\text{m}$ )	Chiều rộng ( $\mu\text{m}$ )	Số vách ngăn
		TB $\pm$ SD	TB $\pm$ SD	TB $\pm$ SD
28	CoryDN10	97,5 <sup>d-1</sup> $\pm$ 42,7	8,0 <sup>a-1</sup> $\pm$ 1,2	5,9 <sup>cde</sup> $\pm$ 3,3
29	CoryDN12	91,0 <sup>d-1</sup> $\pm$ 36,8	8,2 <sup>a-e</sup> $\pm$ 1,1	4,9 <sup>d-n</sup> $\pm$ 2,5
30	CoryDN13	93,2 <sup>d-k</sup> $\pm$ 38,2	8,1 <sup>a-g</sup> $\pm$ 1,5	5,2 <sup>c-k</sup> $\pm$ 2,7
31	CoryDN15	66,5 <sup>l-w</sup> $\pm$ 41,9	7,6 <sup>c-r</sup> $\pm$ 1,3	3,6 <sup>l-v</sup> $\pm$ 3,2
32	CoryDN21	88,2 <sup>d-n</sup> $\pm$ 34,1	7,9 <sup>a-l</sup> $\pm$ 1,3	4,7 <sup>d-p</sup> $\pm$ 2,1
33	CoryDN23	65,9 <sup>m-w</sup> $\pm$ 29,2	7,3 <sup>g-u</sup> $\pm$ 1,2	3,0 <sup>q-w</sup> $\pm$ 1,8
34	CoryDN24	53,6 <sup>t-y</sup> $\pm$ 20,5	6,8 <sup>r-y</sup> $\pm$ 1,0	3,0 <sup>q-w</sup> $\pm$ 1,9
35	CoryDN25	77,1 <sup>h-r</sup> $\pm$ 29,8	7,5 <sup>c-r</sup> $\pm$ 1,1	4,2 <sup>g-t</sup> $\pm$ 2,1
36	CoryDN27	61,5 <sup>p-x</sup> $\pm$ 45,7	6,8 <sup>q-y</sup> $\pm$ 1,2	3,1 <sup>p-w</sup> $\pm$ 2,7
37	CoryDN30	169,7 <sup>a</sup> $\pm$ 62,4	6,6 <sup>u-z</sup> $\pm$ 0,8	12,1 <sup>a</sup> $\pm$ 4,9
38	CoryDN32	78,2 <sup>h-s</sup> $\pm$ 30,6	8,0 <sup>a-j</sup> $\pm$ 1,0	3,1 <sup>p-w</sup> $\pm$ 1,5
39	CoryDN39	85,9 <sup>e-o</sup> $\pm$ 47,7	8,3 <sup>abc</sup> $\pm$ 1,5	2,6 <sup>t-y</sup> $\pm$ 1,7
40	CoryPK01	93,5 <sup>d-k</sup> $\pm$ 55,4	6,3 <sup>y-z</sup> $\pm$ 1,1	4,0 <sup>i-u</sup> $\pm$ 3,3
41	CoryGL01	92,5 <sup>d-k</sup> $\pm$ 35,2	7,0 <sup>m-y</sup> $\pm$ 1,3	5,4 <sup>c-i</sup> $\pm$ 2,0
42	CoryGL02	56,3 <sup>r-y</sup> $\pm$ 28,0	6,3 <sup>x-z</sup> $\pm$ 1,1	3,1 <sup>p-w</sup> $\pm$ 1,8
43	CoryGL03	69,9 <sup>k-v</sup> $\pm$ 29,6	6,5 <sup>v-z</sup> $\pm$ 1,0	1,7 <sup>w-y</sup> $\pm$ 1,1
44	CoryKT01	128,0 <sup>bc</sup> $\pm$ 53,7	7,6 <sup>b-q</sup> $\pm$ 1,5	5,6 <sup>c-h</sup> $\pm$ 3,5
45	CoryKT02	45,7 <sup>w-y</sup> $\pm$ 19,8	6,7 <sup>t-y</sup> $\pm$ 1,2	1,7 <sup>w-y</sup> $\pm$ 2,1
46	CoryKT03	62,9 <sup>o-w</sup> $\pm$ 36,7	6,7 <sup>s-y</sup> $\pm$ 1,4	4,7 <sup>d-p</sup> $\pm$ 3,3
47	CoryKT04	93,6 <sup>d-k</sup> $\pm$ 37,5	6,9 <sup>m-y</sup> $\pm$ 1,1	2,4 <sup>u-y</sup> $\pm$ 1,4
48	CoryBT03	78,5 <sup>h-s</sup> $\pm$ 49,7	7,5 <sup>c-r</sup> $\pm$ 1,6	4,2 <sup>g-t</sup> $\pm$ 3,2
49	CoryBT06	75,9 <sup>h-r</sup> $\pm$ 27,3	6,8 <sup>o-y</sup> $\pm$ 0,9	3,5 <sup>m-v</sup> $\pm$ 2,1
50	CoryBT08	135,4 <sup>b</sup> $\pm$ 76,1	8,4 <sup>ab</sup> $\pm$ 1,5	10,4 <sup>b</sup> $\pm$ 6,9
51	CoryBT09	88,7 <sup>d-n</sup> $\pm$ 35,2	8,2 <sup>a-d</sup> $\pm$ 1,8	3,1 <sup>p-w</sup> $\pm$ 1,6
52	CoryBT13	37,7 <sup>y</sup> $\pm$ 12,5	7,2 <sup>h-v</sup> $\pm$ 0,9	1,2 <sup>y</sup> $\pm$ 1,0
53	CoryBT17	84,5 <sup>e-o</sup> $\pm$ 56,3	7,6 <sup>c-q</sup> $\pm$ 1,3	2,9 <sup>r-w</sup> $\pm$ 2,5
54	CoryBT18	88,7 <sup>d-n</sup> $\pm$ 76,6	7,7 <sup>a-n</sup> $\pm$ 1,9	3,7 <sup>j-u</sup> $\pm$ 3,3

**Phụ bảng 2 (tt).** Kích thước ( $\mu\text{m}$ ) và số vách ngăn giả của bào tử nấm *C. cassicola*

STT	MPL	Chiều dài ( $\mu\text{m}$ )	Chiều rộng ( $\mu\text{m}$ )	Số vách ngăn
		TB $\pm$ SD	TB $\pm$ SD	TB $\pm$ SD
55	CoryQN01	99,9 <sup>d-h</sup> $\pm$ 27,7	7,1 <sup>k-w</sup> $\pm$ 1,1	2,9 <sup>s-w</sup> $\pm$ 1,4
56	CoryQN02	90,4 <sup>d-m</sup> $\pm$ 34,9	7,6 <sup>b-p</sup> $\pm$ 1,4	2,6 <sup>t-y</sup> $\pm$ 1,3
57	CoryQN03	98,1 <sup>d-i</sup> $\pm$ 41,6	7,2 <sup>j-w</sup> $\pm$ 1,3	5,0 <sup>d-m</sup> $\pm$ 2,8
58	CoryQN04	61,6 <sup>p-x</sup> $\pm$ 39,9	6,6 <sup>u-z</sup> $\pm$ 1,3	3,7 <sup>k-u</sup> $\pm$ 3,6
59	CoryQN05	80,3 <sup>g-r</sup> $\pm$ 33,6	7,0 <sup>m-y</sup> $\pm$ 1,2	3,4 <sup>n-v</sup> $\pm$ 1,8
60	CoryQN06	83,8 <sup>e-o</sup> $\pm$ 41,0	7,2 <sup>h-v</sup> $\pm$ 1,5	2,6 <sup>t-y</sup> $\pm$ 1,9
61	CoryQN07	74,5 <sup>i-u</sup> $\pm$ 28,7	6,6 <sup>u-z</sup> $\pm$ 1,1	2,8 <sup>s-x</sup> $\pm$ 1,8
62	CoryQN08	74,8 <sup>i-u</sup> $\pm$ 49,4	7,2 <sup>h-v</sup> $\pm$ 1,4	4,0 <sup>i-u</sup> $\pm$ 3,2
63	CoryQN13	107,0 <sup>de</sup> $\pm$ 41,9	8,2 <sup>a-d</sup> $\pm$ 1,3	2,8 <sup>s-x</sup> $\pm$ 1,7
64	CoryQN14	80,4 <sup>g-r</sup> $\pm$ 39,4	8,4 <sup>a</sup> $\pm$ 1,3	3,3 <sup>o-w</sup> $\pm$ 2,2
65	CoryQT01	106,0 <sup>def</sup> $\pm$ 42,4	7,3 <sup>f-u</sup> $\pm$ 1,4	6,2 <sup>c-d</sup> $\pm$ 2,9
66	CoryQT02	86,6 <sup>e-o</sup> $\pm$ 33,1	7,7 <sup>a-o</sup> $\pm$ 1,1	5,3 <sup>c-j</sup> $\pm$ 2,3
67	CoryQT03	83,0 <sup>e-o</sup> $\pm$ 29,8	8,0 <sup>a-h</sup> $\pm$ 1,2	4,8 <sup>d-o</sup> $\pm$ 2,1
68	CoryLC01	69,6 <sup>k-v</sup> $\pm$ 42,9	6,8 <sup>p-y</sup> $\pm$ 1,3	5,2 <sup>c-k</sup> $\pm$ 4,1
69	CoryLC02	80,6 <sup>g-r</sup> $\pm$ 42,1	7,4 <sup>e-u</sup> $\pm$ 1,2	3,4 <sup>m-v</sup> $\pm$ 2,1
70	CoryLC03	93,0 <sup>d-k</sup> $\pm$ 39,3	7,1 <sup>k-x</sup> $\pm$ 1,2	5,7 <sup>c-f</sup> $\pm$ 2,5
71	CorySL01	55,2 <sup>s-y</sup> $\pm$ 25,3	7,9 <sup>a-k</sup> $\pm$ 1,6	1,3 <sup>x-y</sup> $\pm$ 1,5
72	CorySL02	51,1 <sup>u-y</sup> $\pm$ 27,3	7,4 <sup>f-u</sup> $\pm$ 1,3	2,5 <sup>u-y</sup> $\pm$ 1,7
73	CorySL03	57,8 <sup>q-y</sup> $\pm$ 36,2	7,8 <sup>a-m</sup> $\pm$ 1,1	2,6 <sup>t-y</sup> $\pm$ 1,7
74	CoryLCA1	48,1 <sup>v-y</sup> $\pm$ 21,1	6,4 <sup>w-z</sup> $\pm$ 1,2	2,7 <sup>s-x</sup> $\pm$ 1,9
75	CoryLCA2	62,1 <sup>o-x</sup> $\pm$ 39,0	5,9 <sup>z</sup> $\pm$ 1,0	3,4 <sup>m-v</sup> $\pm$ 2,6
76	CoryLCA3	39,1 <sup>x-y</sup> $\pm$ 18,1	7,2 <sup>i-v</sup> $\pm$ 1,2	2,1 <sup>w-y</sup> $\pm$ 1,3
F tính		14,98 (**)	9,65 (**)	24,49 (**)
CV (%)		46,84	17,14	63,61

\* TB: giá trị trung bình; SD: độ lệch chuẩn. Các giá trị trung bình trong cùng một cột số liệu, có cùng mẫu tự thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức  $\alpha = 0,01$  trong trắc nghiệm Duncan.

### Phụ lục 3. Kết quả phân tích biến lượng về tốc độ tăng trưởng trung bình (mm/ngày) và kích thước tản nấm (mm) (số liệu Phụ bảng 1)

Kết quả phân tích biến lượng về tốc độ tăng trưởng trung bình (mm/ngày)

The ANOVA Procedure

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	75	288.2801316	3.8437351	19.73	<.0001
Error	152	29.6066667	0.1947807		
Corrected Total	227	317.8867982			

	R-Square	Coeff Var	Root MSE	TDPT Mean
	0.906864	5.000022	0.441340	8.826754

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
NT	75	288.2801316	3.8437351	19.73	<.0001

Alpha	0.01
Error Degrees of Freedom	152
Error Mean Square	0.194781

Kết quả phân tích biến lượng về kích thước tản nấm (mm)

The ANOVA Procedure

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	75	14145.34649	188.60462	19.67	<.0001
Error	152	1457.33333	9.58772		
Corrected Total	227	15602.67982			

	R-Square	Coeff Var	Root MSE	KT Mean
	0.906597	5.012996	3.096404	61.76754

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
NT	75	14145.34649	188.60462	19.67	<.0001

Alpha	0.01
Error Degrees of Freedom	152
Error Mean Square	9.587719

### Phụ lục 4. Kết quả phân tích biến lượng về kích thước (chiều dài, chiều rộng) và số vách ngăn giả (pseudosepta) của bào tử (số liệu Phụ bảng 2)

Kết quả phân tích biến lượng về kích thước chiều dài bào tử

The ANOVA Procedure

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	75	1651640.688	22021.876	14.98	<.0001
Error	3724	5474609.301	1470.088		
Corrected Total	3799	7126249.989			

	R-Square	Coeff Var	Root MSE	CD Mean
	0.231769	46.84227	38.34173	81.85284

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
NT	75	1651640.688	22021.876	14.98	<.0001

Alpha	0.01
-------	------

Error Degrees of Freedom 3724  
Error Mean Square 1470.088

### Kết quả phân tích biến lượng về kích thước chiều rộng bào tử

#### The ANOVA Procedure

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	75	1152.827621	15.371035	9.65	<.0001
Error	3724	5932.093600	1.592936		
Corrected Total	3799	7084.921221			

R-Square 0.162716  
Coeff Var 17.13826  
Root MSE 1.262116  
CR Mean 7.364316

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
NT	75	1152.827621	15.371035	9.65	<.0001

Alpha 0.01  
Error Degrees of Freedom 3724  
Error Mean Square 1.592936

### Kết quả phân tích biến lượng về số vách ngăn giả (pseudosepta) của bào tử

#### The ANOVA Procedure

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	75	11423.45974	152.31280	24.49	<.0001
Error	3724	23157.38000	6.21842		
Corrected Total	3799	34580.83974			

R-Square 0.330341  
Coeff Var 63.60989  
Root MSE 2.493675  
VN Mean 3.920263

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
NT	75	11423.45974	152.31280	24.49	<.0001

Alpha 0.01  
Error Degrees of Freedom 3724  
Error Mean Square 6.218416

**Phụ lục 5.** Kết quả so sánh trình tự vùng rDNA-ITS của các MPL bằng công cụ BLAST.

**A**

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<a href="#">01 CoryLK02</a>	1033	1033	100%	0.0	100.00%	Query_173801
<a href="#">74 CorySL02</a>	1027	1027	100%	0.0	99.82%	Query_173803
<a href="#">55 CoryBT17</a>	1027	1027	100%	0.0	99.82%	Query_173802

**B**

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<a href="#">Corynespora cassicola isolate FXSB-1 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer</a>	1033	1033	100%	0.0	100.00%	MK139711.1
<a href="#">Corynespora cassicola strain SAL1 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer</a>	1033	1033	100%	0.0	100.00%	KY806119.1
<a href="#">Corynespora cassicola isolate AS49 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S</a>	1033	1033	100%	0.0	100.00%	FJ852574.1
<a href="#">Corynespora cassicola isolate CKT1 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete</a>	1033	1033	100%	0.0	100.00%	EU364535.1
<a href="#">Corynespora cassicola strain UM591 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer</a>	1029	1174	99%	0.0	100.00%	KU990882.1
<a href="#">Corynespora cassicola isolate CS9 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer</a>	1027	1027	100%	0.0	99.82%	MK119211.1
<a href="#">Corynespora cassicola strain Cory9 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer</a>	1027	1027	100%	0.0	99.82%	MK530180.1
<a href="#">Corynespora cassicola isolate CC15 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer</a>	1027	1027	100%	0.0	99.82%	MG976665.1

**C**

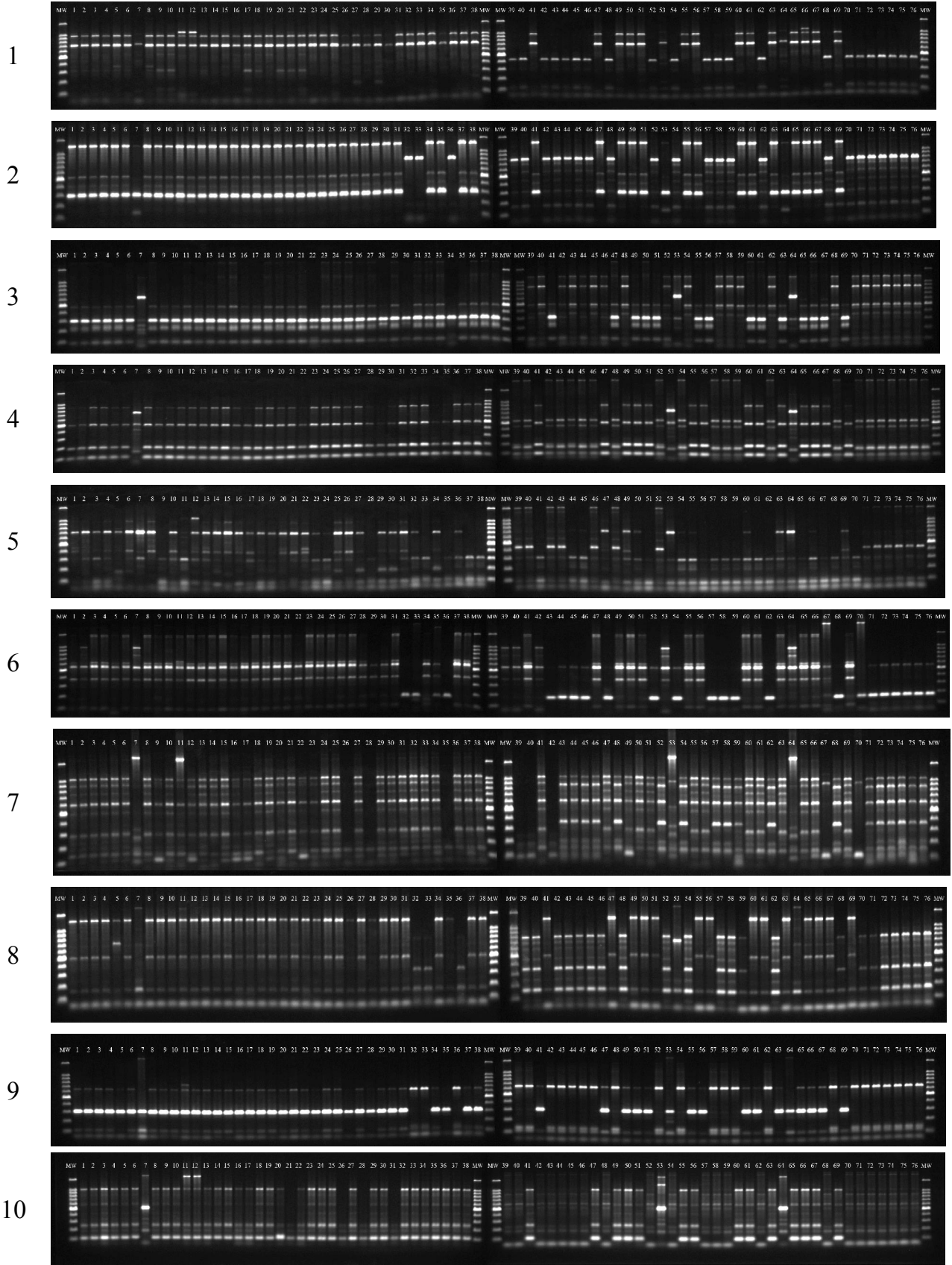
Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<a href="#">Corynespora cassicola isolate AS65 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S</a>	1033	1033	100%	0.0	100.00%	FJ852578.1
<a href="#">Corynespora cassicola strain CATAS002 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete</a>	1033	1033	100%	0.0	100.00%	EF198116.1
<a href="#">Corynespora cassicola isolate FXSB-1 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer</a>	1027	1027	100%	0.0	99.82%	MK139711.1
<a href="#">Corynespora cassicola strain SAL1 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer</a>	1027	1027	100%	0.0	99.82%	KY806119.1
<a href="#">Corynespora cassicola isolate GU120 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S</a>	1027	1027	100%	0.0	99.82%	FJ852631.1
<a href="#">Corynespora cassicola isolate AS49 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S</a>	1027	1027	100%	0.0	99.82%	FJ852574.1
<a href="#">Corynespora cassicola isolate CKT1 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete</a>	1027	1027	100%	0.0	99.82%	EU364535.1
<a href="#">Corynespora cassicola isolate Lemidcor2 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer</a>	1026	1026	99%	0.0	100.00%	MH299413.1

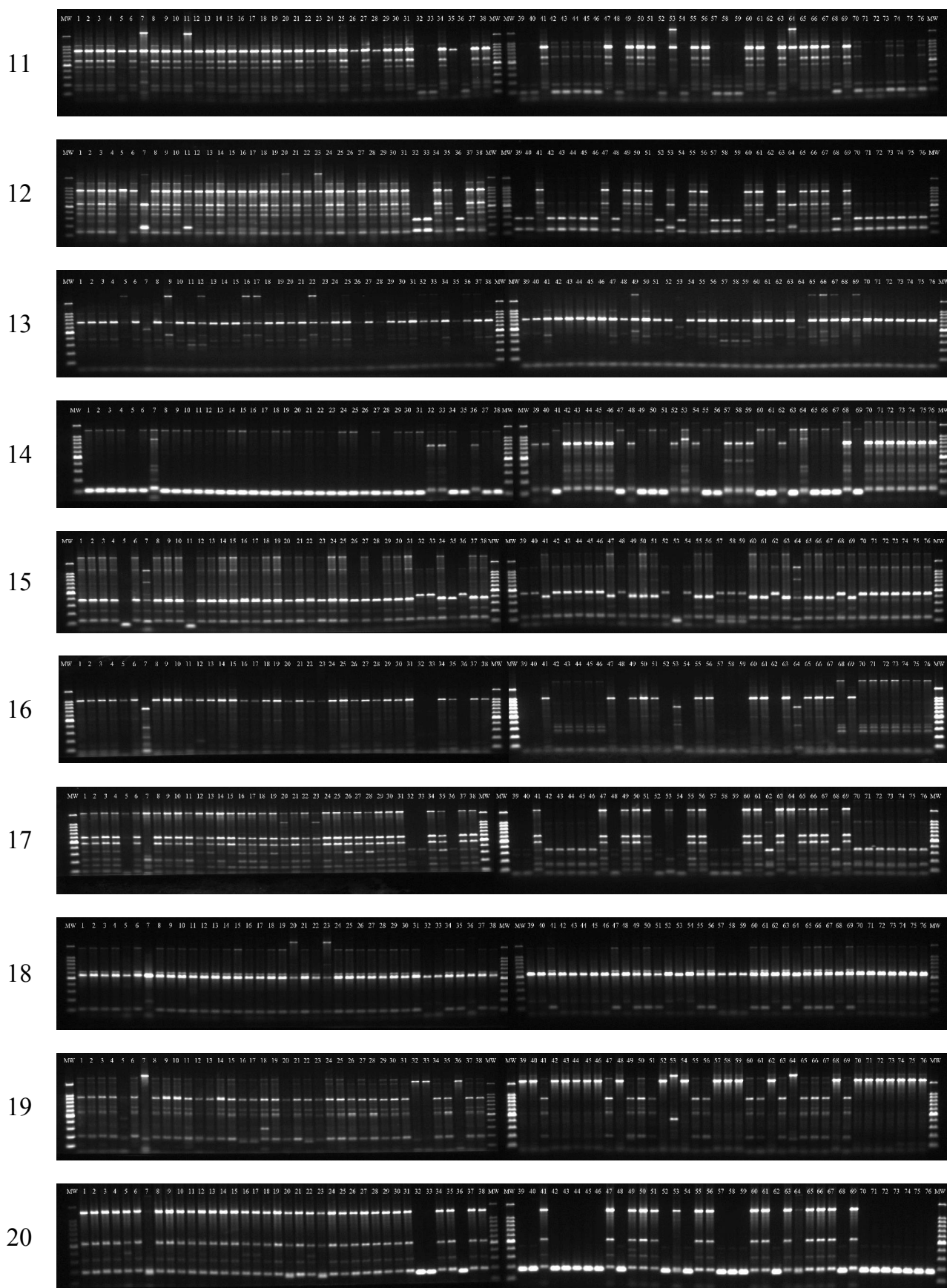
**D**

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<a href="#">Corynespora cassicola isolate CS9 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer</a>	1033	1033	100%	0.0	100.00%	MK119211.1
<a href="#">Corynespora cassicola strain Cory9 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer</a>	1033	1033	100%	0.0	100.00%	MK530180.1
<a href="#">Corynespora cassicola isolate CC15 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer</a>	1033	1033	100%	0.0	100.00%	MG976665.1
<a href="#">Corynespora cassicola isolate CC14 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer</a>	1033	1033	100%	0.0	100.00%	MG976664.1
<a href="#">Corynespora cassicola isolate CC13 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer</a>	1033	1033	100%	0.0	100.00%	MG976663.1
<a href="#">Corynespora cassicola isolate CC12 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer</a>	1033	1033	100%	0.0	100.00%	MG976662.1
<a href="#">Corynespora cassicola isolate CC11 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer</a>	1033	1033	100%	0.0	100.00%	MG976661.1
<a href="#">Corynespora cassicola isolate CC10 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer</a>	1033	1033	100%	0.0	100.00%	MG976660.1

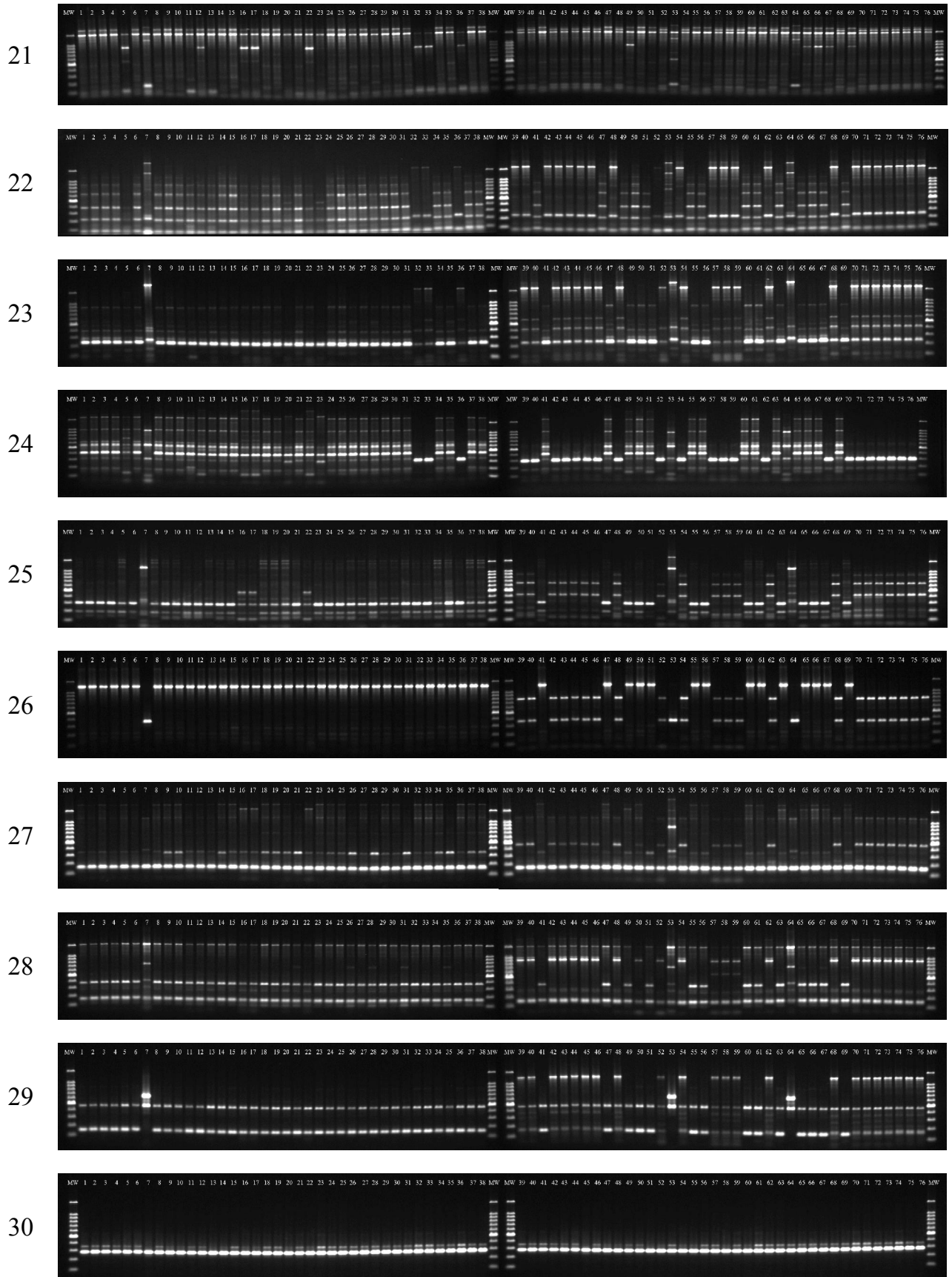
(A): So sánh trình tự của 3 MPL đại diện CoryLK02, CoryBT17 và CorySL02; (B – D): So sánh độ tương đồng của từng MPL với các trình tự sẵn có trên GenBank: CoryLK02 (B), CoryBT17 (C) CorySL02 (D).

**Phụ lục 6.** Hình gel điện di sản phẩm khuếch đại của 30 cặp primer SRAP



**Phụ lục 6 (tt).** Hình gel điện di sản phẩm khuếch đại của 30 cặp primer SRAP



**Phụ lục 6 (tt).** Hình gel điện di sản phẩm khuếch đại của 30 cặp primer SRAP





**Phụ lục 8.** Trình tự nucleotide gen *Cas2* và kết quả so sánh bằng công cụ BLAST

A

```

.....10.....20.....30.....40.....50.....60.....70.....80.....90
TGGCATAATTCAGATCGACTCTGAGACCTGCTCTATATATTTGCTACACAAAGAAATACCTCCCTATCTCTGCTTTCAGCAGC
.....110.....120.....130.....140.....150.....160.....170.....180.....190
CAGTTCGGGAGGGTCCGCTGTGCTGGGGACGAGCTATTCCTCCTAGACAGTCTTCCCTAGCTCTGATTAACAAGACCGATCAGAAAAA
.....210.....220.....230.....240.....250.....260.....270.....280.....290
TTTGTAACATAAATGCTAAAGCTATCAATGCTCAATCGGCACAGGCTTCTGTGGCCAACTCTGTAATTCCTGGGCTGAAATAT
.....310.....320.....330.....340.....350.....360.....370.....380.....390
GTTTCTTGTATTAAGCTAATTTGCATACAGTGTTCGGGTTGTTAGCTTAGGTAGCGTCTAGATAAATTTGGGCTACAGATAGTGTAGC
.....410.....420.....430.....440.....450.....460.....470.....480.....490
TTGAGCTGGCTGCCGTACAAAGCTAAAGCAATGGCAACATAGCTACCTATACGCAAGTATCTTACTTCTAGGTCTTTAGACCAATTTGCA
.....510.....520.....530.....540.....550.....560.....570.....580.....590
GTATAATCTAGCGCTACTATATACACCACTCCTTACATACACAAATTTATATTTCTTACCGGATCTAAAAATTTGCTACAAAACGTGAG
.....610.....620.....630.....640.....650.....660.....670.....680.....690
AAAAAGCGGTTTGGGCTAAGTCTCTTTAAGTAGTCTGTATCTCTGCTTCTCTATCCCAAGCATATTTACGCAAAATTTAAAAGGCCA
.....710.....720.....730.....740.....750
TGAAAATCCGTTTGTGGTGAATTTTGGTTTGGTTGTTGGTGAATTTTGGTTGGG
    
```

B

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected:0

Alignments Download Graphics Distance tree of results

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input type="checkbox"/> CorySL02	1402	1402	100%	0.0	100.00%	Query_207457
<input type="checkbox"/> CoryQN01	1402	1402	100%	0.0	100.00%	Query_207456
<input type="checkbox"/> CoryKT01	1402	1402	100%	0.0	100.00%	Query_207455
<input type="checkbox"/> CoryDN39	1402	1402	100%	0.0	100.00%	Query_207454

C

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected:12

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Corynespora cassiicola</i> clone HCcYBN01 cassiicolin precursor protein (Cas2) gene, complete cds	1306	1306	98%	0.0	99.58%	<a href="#">KY856837.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Corynespora cassiicola</i> clone PaCcSD02 cassiicolin precursor protein (Cas2) gene, complete cds	1304	1304	98%	0.0	99.44%	<a href="#">KY856841.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Corynespora cassiicola</i> clone HCcYNHZM01-2 cassiicolin precursor protein (Cas2) gene, complete cds	1303	1303	97%	0.0	99.58%	<a href="#">KY856838.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Corynespora cassiicola</i> clone HCcYNHZM01-4 cassiicolin precursor protein (Cas2) gene, complete cds	1299	1299	97%	0.0	99.44%	<a href="#">KY856840.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Corynespora cassiicola</i> clone HCcGDMM1406 cassiicolin precursor protein (Cas2) gene, complete cds	1299	1299	96%	0.0	99.86%	<a href="#">KY856835.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Corynespora cassiicola</i> clone PaCcSD03 cassiicolin precursor protein (Cas2) gene, complete cds	1297	1297	96%	0.0	99.72%	<a href="#">KY856842.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Corynespora cassiicola</i> clone CpCcHN02 cassiicolin precursor protein (Cas2) gene, complete cds	1295	1295	96%	0.0	99.86%	<a href="#">KY856832.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Corynespora cassiicola</i> isolate ACC43 cassiicolin precursor (Cas2) gene, complete cds	1293	1293	97%	0.0	99.44%	<a href="#">KP748302.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Corynespora cassiicola</i> clone HCcHNDZ1622 cassiicolin precursor protein (Cas2) gene, complete cds	1293	1293	96%	0.0	99.86%	<a href="#">KY856843.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Corynespora cassiicola</i> clone PaCcHR04 cassiicolin precursor protein (Cas2) gene, complete cds	1293	1293	96%	0.0	99.86%	<a href="#">KY856836.1</a>

(A) Trình tự gen *Cas2* của MPL CoryDN39; (B) Kết quả so sánh độ tương đồng của 4 MPL CoryDN39, CoryKT01; CoryQN01 và CorySL02; (C) Kết quả so sánh trình tự gen *Cas2* của 4 MPL trên GenBank.

**Phụ bảng 3.** Mức độ gây bệnh của 76 MPL nấm *C. cassiicola* trên lá cao su DVT RRIV 4 và PB 260 ở thời điểm 7 NSC

STT	MPL	RRIV 4		PB 260	
		CSB (%)	Mức nhiễm bệnh	CSB (%)	Mức nhiễm bệnh
1	CoryLK02	100,0	Rất nặng	69,8	Nặng
2	CoryLK24	85,8	Rất nặng	19,4	Nhẹ
3	CoryLK27	94,1	Rất nặng	56,6	Nặng
4	CoryLK29	44,8	Trung bình	47,9	Trung bình
5	CoryLK32	99,0	Rất nặng	13,2	Nhẹ
6	CoryLK33	71,2	Nặng	50,7	Nặng
7	CoryLK60	92,0	Rất nặng	46,9	Trung bình
8	CoryDT01	96,5	Rất nặng	72,2	Nặng
9	CoryDT02	78,5	Rất nặng	44,4	Trung bình
10	CoryDT03	94,1	Rất nặng	57,6	Nặng
11	CoryDT04	62,5	Nặng	49,3	Trung bình
12	CoryDT05	85,8	Rất nặng	39,2	Trung bình
13	CoryBL01	69,1	Nặng	49,7	Trung bình
14	CoryDP03	96,5	Rất nặng	70,8	Nặng
15	CoryDP04	90,6	Rất nặng	24,7	Nhẹ
16	CoryDP07	91,7	Rất nặng	32,6	Nhẹ
17	CoryDP08	37,2	Trung bình	18,1	Nhẹ
18	CoryDP09	48,3	Trung bình	24,7	Nhẹ
19	CoryDP11	85,8	Rất nặng	42,0	Trung bình
20	CoryTN02	98,6	Rất nặng	59,4	Nặng
21	CoryTN09	83,3	Rất nặng	51,4	Nặng
22	CoryTN10	78,5	Rất nặng	33,0	Trung bình
23	CoryTN11	90,6	Rất nặng	44,4	Trung bình
24	CoryTN13	70,1	Nặng	45,8	Trung bình
25	CoryDN03	80,2	Nặng	51,0	Nặng

**Phụ bảng 3 (tt).** Mức độ gây bệnh của 76 MPL nấm *C. cassicola* trên lá cao su DVT RRIV 4 và PB 260 ở thời điểm 7 NSC

STT	MPL	RRIV 4		PB 260	
		CSB (%)	Mức nhiễm bệnh	CSB (%)	Mức nhiễm bệnh
26	CoryDN06	99,3	Rất nặng	50,0	Trung bình
27	CoryDN07	72,6	Nặng	62,8	Nặng
28	CoryDN10	30,2	Trung bình	67,7	Nặng
29	CoryDN12	59,0	Nặng	67,7	Nặng
30	CoryDN13	75,3	Rất Nặng	34,4	Trung bình
31	CoryDN15	100,0	Rất nặng	68,4	Nặng
32	CoryDN21	49,7	Trung bình	59,0	Nặng
33	CoryDN23	82,3	Rất nặng	66,0	Nặng
34	CoryDN24	52,4	Nặng	42,7	Trung bình
35	CoryDN25	84,4	Rất nặng	54,9	Nặng
36	CoryDN27	100,0	Rất nặng	70,1	Nặng
37	CoryDN30	25,7	Trung bình	59,4	Nặng
38	CoryDN32	67,7	Nặng	58,0	Nặng
39	CoryDN39	88,9	Rất nặng	59,0	Nặng
40	CoryPK01	42,0	Trung bình	29,2	Trung bình
41	CoryGL01	97,6	Rất nặng	49,0	Trung bình
42	CoryGL02	52,1	Nặng	70,5	Nặng
43	CoryGL03	71,5	Nặng	72,2	Nặng
44	CoryKT01	100,0	Rất nặng	59,0	Nặng
45	CoryKT02	100,0	Rất nặng	34,7	Trung bình
46	CoryKT03	99,7	Rất nặng	50,7	Nặng
47	CoryKT04	100,0	Rất nặng	69,8	Nặng
48	CoryBT03	100,0	Rất nặng	36,5	Trung bình
49	CoryBT06	68,1	Nặng	22,6	Nhẹ
50	CoryBT08	68,1	Nặng	12,5	Nhẹ

**Phụ bảng 3 (tt).** Mức độ gây bệnh của 76 MPL nấm *C. cassicola* trên lá cao su DVT RRIV 4 và PB 260 ở thời điểm 7 NSC

STT	MPL	RRIV 4		PB 260	
		CSB (%)	Mức nhiễm bệnh	CSB (%)	Mức nhiễm bệnh
51	CoryBT09	33,7	Trung bình	69,1	Nặng
52	CoryBT13	92,0	Rất nặng	32,6	Trung bình
53	CoryBT17	98,6	Rất nặng	58,0	Nặng
54	CoryBT18	68,1	Nặng	31,9	Trung bình
55	CoryQN01	84,4	Rất nặng	53,1	Nặng
56	CoryQN02	44,8	Trung bình	43,4	Trung bình
57	CoryQN03	36,5	Trung bình	23,6	Nhẹ
58	CoryQN04	62,5	Nặng	48,3	Trung bình
59	CoryQN05	76,4	Rất nặng	22,2	Nhẹ
60	CoryQN06	84,4	Rất nặng	28,1	Trung bình
61	CoryQN07	41,7	Trung bình	37,5	Trung bình
62	CoryQN08	97,2	Rất nặng	51,0	Nặng
63	CoryQN13	37,8	Trung bình	45,5	Trung bình
64	CoryQN14	82,6	Rất nặng	41,7	Trung bình
65	CoryQT01	70,1	Nặng	45,8	Trung bình
66	CoryQT02	80,2	Rất nặng	64,6	Nặng
67	CoryQT03	69,1	Nặng	55,2	Nặng
68	CoryLC01	88,9	Rất nặng	41,0	Trung bình
69	CoryLC02	43,1	Trung bình	42,0	Trung bình
70	CoryLC03	82,3	Rất nặng	52,1	Nặng
71	CorySL01	92,0	Rất nặng	61,1	Nặng
72	CorySL02	100,0	Rất nặng	74,3	Nặng
73	CorySL03	92,0	Rất nặng	24,3	Nhẹ
74	CoryLCAI01	100,0	Rất nặng	65,3	Nặng
75	CoryLCAI02	100,0	Rất nặng	26,7	Trung bình
76	CoryLCAI03	99,7	Rất nặng	28,1	Trung bình

**Phụ bảng 4.** Mức độ gây bệnh của 76 MPL nấm *C. cassiicola* trên lá cao su DVT RRIV 4 và PB 260 ở thời điểm 7 NSC

STT	MPL	CSB (%)		STT	MPL	CSB (%)	
		RRIV 4	PB 260			RRIV 4	PB 260
1	CoryLK02	100,0 <sup>a</sup>	69,8 <sup>abc</sup>	39	CoryDN39	88,9 <sup>b-h</sup>	59,0 <sup>a-j</sup>
2	CoryLK24	85,4 <sup>c-1</sup>	19,4 <sup>o-q</sup>	40	CoryPK01	42,0 <sup>m-p</sup>	29,2 <sup>i-q</sup>
3	CoryLK27	92,0 <sup>a-f</sup>	56,6 <sup>a-k</sup>	41	CoryGL01	97,6 <sup>a-d</sup>	49,0 <sup>a-o</sup>
4	CoryLK29	44,8 <sup>l-p</sup>	47,9 <sup>a-o</sup>	42	CoryGL02	52,1 <sup>j-p</sup>	70,5 <sup>abc</sup>
5	CoryLK32	99,0 <sup>ab</sup>	13,2 <sup>q</sup>	43	CoryGL03	71,5 <sup>h-l</sup>	72,2 <sup>ab</sup>
6	CoryLK33	71,2 <sup>h-l</sup>	50,7 <sup>a-n</sup>	44	CoryKT01	100,0 <sup>a</sup>	59,0 <sup>a-j</sup>
7	CoryLK60	91,7 <sup>a-h</sup>	46,9 <sup>a-p</sup>	45	CoryKT02	100,0 <sup>a</sup>	34,7 <sup>i-q</sup>
8	CoryDT01	94,8 <sup>a-e</sup>	72,2 <sup>ab</sup>	46	CoryKT03	99,7 <sup>ab</sup>	50,7 <sup>a-n</sup>
9	CoryDT02	77,8 <sup>e-j</sup>	44,4 <sup>a-p</sup>	47	CoryKT04	100,0 <sup>a</sup>	69,8 <sup>a-d</sup>
10	CoryDT03	94,1 <sup>a-i</sup>	57,6 <sup>a-k</sup>	48	CoryBT03	100,0 <sup>a</sup>	36,5 <sup>e-q</sup>
11	CoryDT04	62,5 <sup>l-n</sup>	49,3 <sup>a-o</sup>	49	CoryBT06	68,1 <sup>h-m</sup>	22,6 <sup>n-q</sup>
12	CoryDT05	85,8 <sup>c-1</sup>	39,2 <sup>c-q</sup>	50	CoryBT08	68,1 <sup>h-m</sup>	12,5 <sup>q</sup>
13	CoryBL01	69,1 <sup>h-m</sup>	49,7 <sup>a-o</sup>	51	CoryBT09	33,7 <sup>n-p</sup>	69,1 <sup>a-d</sup>
14	CoryDP03	96,5 <sup>a-e</sup>	70,8 <sup>abc</sup>	52	CoryBT13	92,0 <sup>a-g</sup>	32,6 <sup>g-q</sup>
15	CoryDP04	90,6 <sup>a-h</sup>	24,7 <sup>m-q</sup>	53	CoryBT17	98,6 <sup>abc</sup>	58,0 <sup>a-k</sup>
16	CoryDP07	91,7 <sup>a-h</sup>	32,6 <sup>g-q</sup>	54	CoryBT18	69,1 <sup>h-m</sup>	31,9 <sup>a-q</sup>
17	CoryDP08	37,2 <sup>n-p</sup>	18,1 <sup>p-q</sup>	55	CoryQN01	84,4 <sup>c-1</sup>	53,1 <sup>a-n</sup>
18	CoryDP09	48,3 <sup>k-p</sup>	24,7 <sup>l-q</sup>	56	CoryQN02	44,8 <sup>l-p</sup>	43,4 <sup>a-p</sup>
19	CoryDP11	85,8 <sup>c-1</sup>	42,0 <sup>b-q</sup>	57	CoryQN03	36,5 <sup>n-p</sup>	23,6 <sup>n-q</sup>
20	CoryTN02	98,6 <sup>abc</sup>	59,4 <sup>a-j</sup>	58	CoryQN04	61,1 <sup>l-n</sup>	48,3 <sup>a-o</sup>
21	CoryTN09	83,3 <sup>e-1</sup>	51,4 <sup>a-n</sup>	59	CoryQN05	76,4 <sup>e-k</sup>	22,2 <sup>n-q</sup>
22	CoryTN10	78,5 <sup>e-j</sup>	33,0 <sup>g-q</sup>	60	CoryQN06	84,0 <sup>d-1</sup>	28,1 <sup>j-q</sup>
23	CoryTN11	90,6 <sup>a-h</sup>	44,4 <sup>a-p</sup>	61	CoryQN07	41,7 <sup>m-p</sup>	37,5 <sup>d-q</sup>
24	CoryTN13	70,1 <sup>h-m</sup>	45,8 <sup>a-p</sup>	62	CoryQN08	97,2 <sup>a-d</sup>	51,0 <sup>a-n</sup>
25	CoryDN03	76,0 <sup>e-1</sup>	51,0 <sup>a-n</sup>	63	CoryQN13	37,8 <sup>n-p</sup>	45,5 <sup>a-p</sup>
26	CoryDN06	99,3 <sup>ab</sup>	50,0 <sup>a-n</sup>	64	CoryQN14	82,6 <sup>e-1</sup>	41,7 <sup>b-p</sup>
27	CoryDN07	72,6 <sup>g-1</sup>	62,8 <sup>a-h</sup>	65	CoryQT01	70,1 <sup>h-m</sup>	45,8 <sup>a-p</sup>
28	CoryDN10	30,2 <sup>o-p</sup>	67,7 <sup>a-e</sup>	66	CoryQT02	80,2 <sup>e-1</sup>	64,6 <sup>a-g</sup>
29	CoryDN12	59,0 <sup>l-o</sup>	67,7 <sup>a-e</sup>	67	CoryQT03	68,4 <sup>h-m</sup>	55,2 <sup>a-l</sup>
30	CoryDN13	75,3 <sup>l-j</sup>	34,4 <sup>l-q</sup>	68	CoryLC01	88,9 <sup>b-h</sup>	41,0 <sup>b-p</sup>
31	CoryDN15	100,0 <sup>a</sup>	68,4 <sup>a-d</sup>	69	CoryLC02	43,1 <sup>l-p</sup>	42,0 <sup>b-p</sup>
32	CoryDN21	49,7 <sup>k-p</sup>	59,0 <sup>a-j</sup>	70	CoryLC03	82,3 <sup>e-1</sup>	52,1 <sup>a-n</sup>
33	CoryDN23	81,9 <sup>e-1</sup>	66,0 <sup>a-e</sup>	71	CorySL01	92,0 <sup>a-h</sup>	61,1 <sup>a-1</sup>
34	CoryDN24	52,4 <sup>l-p</sup>	42,7 <sup>a-p</sup>	72	CorySL02	100,0 <sup>a</sup>	74,3 <sup>a</sup>
35	CoryDN25	84,4 <sup>d-1</sup>	54,9 <sup>a-m</sup>	73	CorySL03	93,8 <sup>a-g</sup>	24,3 <sup>n-q</sup>
36	CoryDN27	100,0 <sup>a</sup>	70,1 <sup>abc</sup>	74	CoryLCA1	100,0 <sup>a</sup>	65,3 <sup>a-1</sup>
37	CoryDN30	25,7 <sup>p</sup>	59,4 <sup>a-j</sup>	75	CoryLCA2	100,0 <sup>a</sup>	26,7 <sup>k-q</sup>
38	CoryDN32	67,7 <sup>h-m</sup>	58,0 <sup>a-j</sup>	76	CoryLCA3	99,7 <sup>ab</sup>	28,1 <sup>j-q</sup>
F tính						18,38 (**)	5,86 (**)
CV (%)						10,61	16,38

\* Trong cùng một cột số liệu, các giá trị trung bình có cùng ký tự không khác biệt có ý nghĩa thống kê theo trắc nghiệm đa đoạn Duncan ở mức  $P < 0,01$ .



**Phụ lục 9. Kết quả phân tích biến lượng về chỉ số bệnh (%) của 76 MPL nấm *C. cassiicola* trên lá cao su DVT RRIV 4 và PB 260 ở điều kiện phòng thí nghiệm (số liệu Phụ bảng 4)**

Kết quả phân tích biến lượng về chỉ số bệnh (%) của 76 MPL nấm *C. cassiicola* trên lá cao su DVT RRIV 4

The ANOVA Procedure					
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	75	66592.57579	887.90101	18.38	<.0001
Error	152	7344.14667	48.31675		
Corrected Total	227	73936.72246			
	R-Square	Coeff Var	Root MSE	CSB Mean	
	0.900670	10.61623	6.951025	65.47544	
Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
MPL	75	66592.57579	887.90101	18.38	<.0001
	Alpha		0.01		
	Error Degrees of Freedom		152		
	Error Mean Square		48.31675		

Kết quả phân tích biến lượng về chỉ số bệnh (%) của 76 MPL nấm *C. cassiicola* trên lá cao su DVT PB 260

The ANOVA Procedure					
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	75	22184.13702	295.78849	5.86	<.0001
Error	152	7675.03333	50.49364		
Corrected Total	227	29859.17035			
	R-Square	Coeff Var	Root MSE	CSB Mean	
	0.742959	16.38129	7.105888	43.37807	
Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
MPL	75	22184.13702	295.78849	5.86	<.0001
	Alpha		0.01		
	Error Degrees of Freedom		152		
	Error Mean Square		50.49364		

**Phụ bảng 5.** So sánh chỉ số bệnh (%) của các nghiệm thức sau 7 ngày chủng nấm (Thí nghiệm chủng bệnh trên lá cắt rời)

STT	DVT	Mẫu phân lập nấm							TB (DVT)
		CoryLK02	CoryDP03	CoryDN39	CoryKT04	CoryBT17	CorySL02		
1	RRIV 1	72,6 <sup>b</sup> AB	92,0 <sup>a</sup> A	56,9 <sup>bc</sup> B	72,9 <sup>b</sup> AB	70,8 <sup>bc</sup> AB	85,8 <sup>ab</sup> AB	75,2 <sup>b</sup>	
2	RRIV 106	71,2 <sup>b</sup> AB	83,7 <sup>ab</sup> AB	66,7 <sup>b</sup> B	68,1 <sup>bc</sup> B	69,4 <sup>bc</sup> AB	94,4 <sup>a</sup> A	75,6 <sup>b</sup>	
3	RRIV 109	25,3 <sup>d</sup> A	41,3 <sup>cd</sup> A	30,9 <sup>e-f</sup> A	31,3 <sup>bc</sup> A	27,1 <sup>f</sup> A	34,0 <sup>d</sup> A	31,7 <sup>i</sup>	
4	RRIV 114	68,4 <sup>b</sup> A	61,8 <sup>bcd</sup> A	45,5 <sup>c-f</sup> A	69,1 <sup>bc</sup> A	47,2 <sup>de</sup> A	58,3 <sup>bcd</sup> A	58,4 <sup>de</sup>	
5	RRIV 124	39,6 <sup>cd</sup> B	35,1 <sup>d</sup> B	31,3 <sup>d-e</sup> B	28,5 <sup>bc</sup> B	36,1 <sup>ef</sup> B	61,5 <sup>bcd</sup> A	38,7 <sup>hi</sup>	
6	RRIV 206	39,9 <sup>cd</sup> A	66,3 <sup>bcd</sup> A	50,7 <sup>bcd</sup> A	44,4 <sup>bc</sup> A	54,2 <sup>c-e</sup> A	59,7 <sup>bcd</sup> A	52,5 <sup>efg</sup>	
7	RRIV 209	70,5 <sup>b</sup> A	74,7 <sup>abc</sup> A	47,2 <sup>b-e</sup> A	68,4 <sup>bc</sup> A	74,0 <sup>b</sup> A	79,2 <sup>ab</sup> A	69,0 <sup>bc</sup>	
8	RRIV 230	43,1 <sup>c</sup> AB	36,1 <sup>d</sup> B	28,1 <sup>e-f</sup> B	62,8 <sup>bc</sup> A	48,6 <sup>de</sup> AB	50,0 <sup>cd</sup> AB	44,8 <sup>fgh</sup>	
9	PB 255	69,1 <sup>b</sup> A	72,6 <sup>abc</sup> A	66,7 <sup>b</sup> A	46,5 <sup>bc</sup> A	58,3 <sup>bcd</sup> A	75,0 <sup>bc</sup> A	64,7 <sup>cd</sup>	
10	PB 312	30,9 <sup>cd</sup> C	41,7 <sup>cd</sup> BC	26,4 <sup>f</sup> C	57,6 <sup>bc</sup> AB	43,1 <sup>def</sup> BC	63,9 <sup>bcd</sup> A	43,9 <sup>gh</sup>	
11	PB 260	63,5 <sup>b</sup> AB	50,3 <sup>cd</sup> AB	41,7 <sup>c-f</sup> B	49,0 <sup>bc</sup> AB	55,6 <sup>b-e</sup> AB	71,2 <sup>bcd</sup> A	55,2 <sup>def</sup>	
12	RRIV 4	100,0 <sup>a</sup> A	89,6 <sup>ab</sup> A	86,8 <sup>a</sup> A	99,7 <sup>a</sup> A	91,7 <sup>a</sup> A	99,7 <sup>a</sup> A	94,6 <sup>a</sup>	
<b>TB</b>									
<b>(MPL)</b>		<b>57,8<sub>B</sub></b>	<b>62,1<sub>B</sub></b>	<b>48,2<sub>C</sub></b>	<b>58,2<sub>B</sub></b>	<b>56,3<sub>B</sub></b>	<b>69,4<sub>A</sub></b>		
<b>CV (%) = 14,2; F(A) = 15,9<sup>**</sup>; F(B) = 56,2<sup>**</sup>; F(A*B) = 2,1<sup>*</sup></b>									

- So sánh mức độ gây bệnh của mỗi MPL trên các DVT cao su, số liệu có cùng mẫu tự (in thường) trong cùng một cột có cùng mẫu tự thì không khác biệt có ý nghĩa thống kê theo trắc nghiệm đa đoạn Duncan ở mức  $P < 0,01$ .
  - So sánh mức độ nhiễm bệnh của mỗi DVT với các MPL, số liệu có cùng mẫu tự (in hoa) trong cùng một hàng có cùng mẫu tự thì không khác biệt có ý nghĩa thống kê theo trắc nghiệm đa đoạn Duncan ở mức  $P < 0,01$ .
  - Số liệu ở hàng cuối cùng là CSB trung bình theo MPL, so sánh mức độ gây bệnh giữa những MPL trên 12 DVT cao su;
  - Số liệu ở cột cuối cùng là CSB trung bình theo DVT, so sánh mức độ miễn cảm của những DVT cao su với 6 MPL nấm.
- \*: có ý nghĩa ở mức  $0,01 < P \leq 0,05$ ; \*\*: rất có ý nghĩa ở mức  $P \leq 0,05$ .

**Phụ lục 10. Kết quả phân tích biến lượng về chỉ số bệnh (%) của 6 MPL nấm *C. cassiicola* trên lá 12 DVT cao su ở điều kiện phòng thí nghiệm (số liệu Phụ bảng 5)**

## The GLM Procedure

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	73	43324.88574	593.49159	11.12	<.0001
Error	142	7579.80296	53.37889		
Corrected Total	215	50904.68870			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	CSB Mean
0.851098	14.21750	7.306086	51.38796

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
K	2	0.38370	0.19185	0.00	0.9964
M	5	4259.86537	851.97307	15.96	<.0001
D	11	33027.60537	3002.50958	56.25	<.0001
M*D	55	6037.03130	109.76421	2.06	0.0004

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
K	2	0.38370	0.19185	0.00	0.9964
M	5	4259.86537	851.97307	15.96	<.0001
D	11	33027.60537	3002.50958	56.25	<.0001
M*D	55	6037.03130	109.76421	2.06	0.0004

Alpha	0.01
Error Degrees of Freedom	142
Error Mean Square	53.37889
Critical Value of t	2.61090
Least Significant Difference	4.4961

Means with the same letter are not significantly different.

t Grouping	Mean	N	M (MPL)
A	59.144	36	6
B	53.517	36	2
B	51.133	36	4
B	50.839	36	1
B	49.300	36	5
C	44.394	36	3

## The GLM Procedure

## t Tests (LSD) for CSB

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

Alpha	0.01
Error Degrees of Freedom	142
Error Mean Square	53.37889
Critical Value of t	2.61090
Least Significant Difference	6.3585

Means with the same letter are not significantly different.

t Grouping		Mean	N	D (DVT)	
	A	80.728	18	12	
	B	62.767	18	2	
	B	61.794	18	1	
C	B	57.356	18	7	
C	D	53.633	18	9	
E	D	50.117	18	4	
E	D	F	48.078	18	11
E	G	F	46.383	18	6
H	G	F	41.983	18	8
H	G		41.394	18	10
H	I		38.333	18	5
	I		34.089	18	3

The GLM Procedure

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	73	43324.88574	593.49159	11.12	<.0001
Error	142	7579.80296	53.37889		
Corrected Total	215	50904.68870			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	CSB Mean
0.851098	14.21750	7.306086	51.38796

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
K	2	0.38370	0.19185	0.00	0.9964
MD	71	43324.50204	610.20425	11.43	<.0001

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
K	2	0.38370	0.19185	0.00	0.9964
MD	71	43324.50204	610.20425	11.43	<.0001

Alpha 0.01  
 Error Degrees of Freedom 142  
 Error Mean Square 53.37889

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping					Mean	N	MD			
			A		89.400	3	M1D12			
	B		A		87.633	3	M4D12			
	B		A		87.633	3	M6D12			
	B		A	C	81.967	3	M6D2			
	B	D	A	C	76.833	3	M2D1			
E	B	D	A	C	76.167	3	M5D12			
E	B	D	A	C	F	72.233	3	M3D12		
E	B	D	G	C	F	71.300	3	M2D12		
E	B	D	G	H	C	F	70.233	3	M2D2	
E	I	D	G	H	C	F	68.600	3	M6D7	
E	I	D	J	G	H	C	F	67.933	3	M6D1
E	I	D	J	G	H	K	F	61.267	3	M4D1

	E		I	L	D	J	G	H	K	F		60.000	3	M6D9			
	E		I	L	D	J	G	H	K	F		59.767	3	M2D7			
	E	M	I	L	D	J	G	H	K	F		59.300	3	M5D7			
	E	M	I	L	N	J	G	H	K	F		58.433	3	M2D9			
	E	M	I	L	N	J	G	H	K	F		58.400	3	M1D1			
	O	M	I	L	N	J	G	H	K	F		57.567	3	M6D11			
	O	M	I	L	N	J	G	H	K	F		57.533	3	M1D2			
	O	M	I	L	N	J	G	H	K	F		57.333	3	M5D1			
	O	M	I	L	N	J	G	H	K	F		57.100	3	M1D7			
	O	M	I	L	N	J	G	H	K	F		56.500	3	M4D4			
	O	M	I	L	N	J	G	H	K	F		56.467	3	M5D2			
P	O	M	I	L	N	J	G	H	K	F		56.233	3	M1D9			
P	O	M	I	L	N	J	G	H	K	F		55.967	3	M4D7			
P	O	M	I	L	N	J	G	H	K	F		55.800	3	M1D4			
P	O	M	I	L	N	J	G	H	K	R	F	Q	55.700	3	M4D2		
P	O	M	I	L	N	J	G	H	K	R	F	Q	54.700	3	M3D2		
P	O	M	I	L	N	J	G	H	K	R	F	Q	54.700	3	M3D9		
P	O	M	I	L	N	J	G	H	K	R	F	Q	54.533	3	M2D6		
P	O	M	I	L	N	J	G	H	K	R	S	Q	53.033	3	M6D10		
P	O	M	I	L	N	J	G	H	T	K	R	S	Q	52.833	3	M1D11	
P	O	M	I	L	N	J	G	H	T	K	R	S	Q	52.767	3	M4D8	
P	O	M	I	L	N	J	G	H	T	K	R	S	Q	52.500	3	M2D4	
P	O	M	I	L	N	J		H	T	K	R	S	Q	51.600	3	M6D5	
P	O	M	I	L	N	J	U		T	K	R	S	Q	50.600	3	M6D6	
P	O	M	I	L	N	J	U	V	T	K	R	S	Q	50.100	3	M6D4	
P	O	M	I	L	N	J	U	V	T	K	R	S	Q	49.833	3	M5D9	
P	O	M	I	L	N	J	U	W	V	T	K	R	S	Q	49.500	3	M4D10
P	O	M		L	N	J	U	W	V	T	K	R	S	Q	49.000	3	M3D1
P	O	M		L	N		U	W	V	T	K	R	S	Q	48.200	3	M5D11
P	O	M		L	N		U	W	V	T	K	R	S	Q	47.400	3	M5D6
P	O	M		L	N		U	W	V	T	K	R	S	Q	45.400	3	M3D6
P	O	M		L	N		U	W	V	T	K	R	S	Q	45.200	3	M2D11
P	O	M		L	N		U	W	V	T	K	R	S	Q	45.000	3	M6D8
P	O	M		L	N		U	W	V	T	K	R	S	Q	44.467	3	M4D11
P	O	M		L	N		U	W	V	T	K	R	S	Q	44.200	3	M5D8
P	O	M		L	N		U	W	V	T	K	R	S	Q	43.400	3	M3D7
P	O	M		L	N		U	W	V	T	K	R	S	Q	43.400	3	M5D4
P	O	M		L	N		U	W	V	T	K	R	S	Q	42.600	3	M4D9
P	O	M		L	N		U	W	V	T	K	R	S	Q	42.400	3	M3D4
P	O	M		L	N		U	W	V	T		R	S	Q	41.600	3	M4D6
P	O	M		L	N		U	W	V	T		R	S	Q	41.000	3	M1D8
P	O	M		L	N		U	W	V	T		R	S	Q	41.000	3	M5D10
P	O	M		L	N		U	W	V	T		R	S	Q	40.200	3	M3D11
P	O	M			N		U	W	V	T		R	S	Q	40.167	3	M2D10
P	O	M			N		U	W	V	T		R	S	Q	40.000	3	M2D3
P	O				N		U	W	V	T		R	S	Q	39.000	3	M1D5
P	O						U	W	V	T		R	S	Q	38.767	3	M1D6
P							U	W	V	T		R	S	Q	36.933	3	M5D5
P							U	W	V	T		R	S	Q	36.900	3	M2D8
P							U	W	V	T		R	S	Q	36.333	3	M2D5
							U	W	V	T		R	S	Q	35.700	3	M6D3
							U	W	V	T			S		34.000	3	M3D5
							U	W	V	T			S		33.767	3	M1D10
							U	W	V	T			S		33.767	3	M3D3
							U	W	V	T					33.467	3	M4D3
							U	W	V						32.133	3	M4D5
							U	W	V						32.033	3	M3D8
							U	W	V						31.367	3	M5D3
								W	V						30.900	3	M3D10
								W							30.233	3	M1D3



R-Square	Coeff Var	Root MSE	CSB Mean
0.821829	15.11588	8.089513	53.51667

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
K	2	22.261667	11.130833	0.17	0.8447
D	11	6618.403333	601.673030	9.19	<.0001

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
K	2	22.261667	11.130833	0.17	0.8447
D	11	6618.403333	601.673030	9.19	<.0001

Alpha	0.01
Error Degrees of Freedom	22
Error Mean Square	65.44023

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	D (DVT)
A	76.833	3	1
B A	71.300	3	12
B A	70.233	3	2
B A C	59.767	3	7
B A C	58.433	3	9
B D C	54.533	3	6
B D C	52.500	3	4
D C	45.200	3	11
D C	40.167	3	10
D C	40.000	3	3
D	36.900	3	8
D	36.333	3	5

----- M=3 (CoryDN39) -----

The GLM Procedure

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	13	4804.609444	369.585342	17.83	<.0001
Error	22	456.089444	20.731338		
Corrected Total	35	5260.698889			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	CSB Mean
0.913302	10.25617	4.553168	44.39444

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
K	2	40.350556	20.175278	0.97	0.3936
D	11	4764.258889	433.114444	20.89	<.0001

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
K	2	40.350556	20.175278	0.97	0.3936
D	11	4764.258889	433.114444	20.89	<.0001

Alpha 0.01  
 Error Degrees of Freedom 22  
 Error Mean Square 20.73134

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping			Mean	N	D (DVT)
		A	72.233	3	12
		B	54.700	3	2
		B	54.700	3	9
C		B	49.000	3	1
C		B D	45.400	3	6
C	E	B D	43.400	3	7
C	E	F D	42.400	3	4
C	E	F D	40.200	3	11
	E	F D	34.000	3	5
	E	F	33.767	3	3
	E	F	32.033	3	8
		F	30.900	3	10

----- M=4 (CoryKT04) -----

The GLM Procedure

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	13	7595.46500	584.26654	5.22	0.0003
Error	22	2460.27500	111.83068		
Corrected Total	35	10055.74000			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	CSB Mean
0.755336	20.68123	10.57500	51.13333

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
K	2	411.831667	205.915833	1.84	0.1822
D	11	7183.633333	653.057576	5.84	0.0002

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
K	2	411.831667	205.915833	1.84	0.1822
D	11	7183.633333	653.057576	5.84	0.0002

Alpha 0.01  
 Error Degrees of Freedom 22  
 Error Mean Square 111.8307



Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	D (DVT)
A	87.633	3	12
B	61.267	3	1
C B	56.500	3	4
C B	55.967	3	7
C B	55.700	3	2
C B	52.767	3	8
C B	49.500	3	10
C B	44.467	3	11
C B	42.600	3	9
C B	41.600	3	6
C B	33.467	3	3
C	32.133	3	5

----- M=5 (CoryBT17) -----

The GLM Procedure

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	13	4649.771667	357.674744	17.96	<.0001
Error	22	438.168333	19.916742		
Corrected Total	35	5087.940000			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	CSB Mean
0.913881	9.052369	4.462818	49.30000

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
K	2	8.571667	4.285833	0.22	0.8081
D	11	4641.200000	421.927273	21.18	<.0001

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
K	2	8.571667	4.285833	0.22	0.8081
D	11	4641.200000	421.927273	21.18	<.0001

Alpha	0.01
Error Degrees of Freedom	22
Error Mean Square	19.91674

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	D (DVT)
A	76.167	3	12
B	59.300	3	7
C B	57.333	3	1
C B	56.467	3	2
C B D	49.833	3	9
C E B D	48.200	3	11
C E D	47.400	3	6
E D	44.200	3	8
E D	43.400	3	4
E F D	41.000	3	10
E F	36.933	3	5
F	31.367	3	3

----- M=6 (CorySL02) -----

## The GLM Procedure

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	13	7745.139444	595.779957	7.96	<.0001
Error	22	1647.489444	74.885884		
Corrected Total	35	9392.628889			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	CSB Mean
0.824598	14.63140	8.653663	59.14444

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
K	2	241.763889	120.881944	1.61	0.2217
D	11	7503.375556	682.125051	9.11	<.0001

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
K	2	241.763889	120.881944	1.61	0.2217
D	11	7503.375556	682.125051	9.11	<.0001

Alpha	0.01
Error Degrees of Freedom	22
Error Mean Square	74.88588

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	D
A	87.633	3	12
A	81.967	3	2
B A	68.600	3	7
B A	67.933	3	1
B C	60.000	3	9
B C D	57.567	3	11
B C D	53.033	3	10
B C D	51.600	3	5
B C D	50.600	3	6
B C D	50.100	3	4
C D	45.000	3	8
D	35.700	3	3

**Xét theo từng DVT cao su**

----- D=1 (RRIV 1) -----

## The GLM Procedure

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	7	1683.137222	240.448175	3.51	0.0359
Error	10	684.852222	68.485222		
Corrected Total	17	2367.989444			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	CSB Mean
0.710787	13.39211	8.275580	61.79444

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
K	2	305.374444	152.687222	2.23	0.1582
M	5	1377.762778	275.552556	4.02	0.0292

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
K	2	305.374444	152.687222	2.23	0.1582
M	5	1377.762778	275.552556	4.02	0.0292

Alpha	0.01
Error Degrees of Freedom	10
Error Mean Square	68.48522

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	M (MPL)
A	76.833	3	2
B	67.933	3	6
B	61.267	3	4
B	58.400	3	1
B	57.333	3	5
B	49.000	3	3

----- D=2 (RRIV 106) -----

## The GLM Procedure

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	7	2024.043333	289.149048	3.34	0.0416
Error	10	865.236667	86.523667		
Corrected Total	17	2889.280000			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	CSB Mean
0.700536	14.81967	9.301810	62.76667

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
K	2	204.610000	102.305000	1.18	0.3460
M	5	1819.433333	363.886667	4.21	0.0256

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
K	2	204.610000	102.305000	1.18	0.3460
M	5	1819.433333	363.886667	4.21	0.0256

Alpha	0.01
Error Degrees of Freedom	10
Error Mean Square	86.52367

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping		Mean	N	M
	A	81.967	3	6
B	A	70.233	3	2
B	A	57.533	3	1
B	A	56.467	3	5
B		55.700	3	4
B		54.700	3	3

----- D=3 (RRIV 109) -----

The GLM Procedure

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	7	220.2722222	31.4674603	1.37	0.3143
Error	10	229.6055556	22.9605556		
Corrected Total	17	449.8777778			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	CSB Mean
0.489627	14.05654	4.791717	34.08889

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
K	2	39.3611111	19.6805556	0.86	0.4533
M	5	180.9111111	36.1822222	1.58	0.2525

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
K	2	39.3611111	19.6805556	0.86	0.4533
M	5	180.9111111	36.1822222	1.58	0.2525

Alpha	0.01
Error Degrees of Freedom	10
Error Mean Square	22.96056

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping		Mean	N	M
	A	40.000	3	2
	A	35.700	3	6
	A	33.767	3	3
	A	33.467	3	4
	A	31.367	3	5
	A	30.233	3	1

----- D=4 (RRIV 114) -----

The GLM Procedure

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	7	577.748333	82.535476	0.98	0.4928
Error	10	839.376667	83.937667		
Corrected Total	17	1417.125000			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	CSB Mean
0.407690	18.28085	9.161750	50.11667

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
K	2	27.5833333	13.7916667	0.16	0.8507
M	5	550.1650000	110.0330000	1.31	0.3337

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
K	2	27.5833333	13.7916667	0.16	0.8507
M	5	550.1650000	110.0330000	1.31	0.3337

Alpha 0.01  
 Error Degrees of Freedom 10  
 Error Mean Square 83.93767

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	M
A	56.500	3	4
A	55.800	3	1
A	52.500	3	2
A	50.100	3	6
A	43.400	3	5
A	42.400	3	3

----- D=5 (RRIV 124) -----  
 The GLM Procedure

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	7	724.4700000	103.4957143	12.76	0.0003
Error	10	81.0900000	8.1090000		
Corrected Total	17	805.5600000			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	CSB Mean
0.899337	7.428602	2.847631	38.33333

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
K	2	5.5900000	2.7950000	0.34	0.7165
M	5	718.8800000	143.7760000	17.73	0.0001

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
K	2	5.5900000	2.7950000	0.34	0.7165
M	5	718.8800000	143.7760000	17.73	0.0001

Alpha 0.01  
 Error Degrees of Freedom 10  
 Error Mean Square 8.109

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	M
A	51.600	3	6
B	39.000	3	1
B	36.933	3	5
B	36.333	3	2
B	34.000	3	3
B	32.133	3	4

----- D=6 (RRIV 206) -----  
 The GLM Procedure

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	7	718.9550000	102.707857	1.85	0.1814
Error	10	554.1700000	55.4170000		
Corrected Total	17	1273.1250000			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	CSB Mean
0.564717	16.04943	7.444260	46.38333

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
K	2	217.6633333	108.8316667	1.96	0.1908
M	5	501.2916667	100.2583333	1.81	0.1987

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
K	2	217.663333	108.8316667	1.96	0.1908
M	5	501.2916667	100.2583333	1.81	0.1987

Alpha 0.01  
 Error Degrees of Freedom 10  
 Error Mean Square 55.417

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	M
A	54.533	3	2
A	50.600	3	6
A	47.400	3	5
A	45.400	3	3
A	41.600	3	4
A	38.767	3	1

----- D=7 (RRIV 209) -----  
 The GLM Procedure

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	7	1145.018889	163.574127	1.48	0.2758
Error	10	1102.865556	110.286556		
Corrected Total	17	2247.884444			

R-Square 0.509376    Coeff Var 18.30989    Root MSE 10.50174    CSB Mean 57.35556

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
K	2	146.6677778	73.3338889	0.66	0.5356
M	5	998.3511111	199.6702222	1.81	0.1984

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
K	2	146.6677778	73.3338889	0.66	0.5356
M	5	998.3511111	199.6702222	1.81	0.1984

Alpha 0.01  
 Error Degrees of Freedom 10  
 Error Mean Square 110.2866

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	M
A	68.600	3	6
A	59.767	3	2
A	59.300	3	5
A	57.100	3	1
A	55.967	3	4
A	43.400	3	3

----- D=8 (RRIV 230) -----

The GLM Procedure

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	7	828.755000	118.393571	4.95	0.0119
Error	10	239.270000	23.927000		
Corrected Total	17	1068.025000			

R-Square 0.775970    Coeff Var 11.65111    Root MSE 4.891523    CSB Mean 41.98333

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
K	2	60.4433333	30.2216667	1.26	0.3243
M	5	768.3116667	153.6623333	6.42	0.0064

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
K	2	60.4433333	30.2216667	1.26	0.3243
M	5	768.3116667	153.6623333	6.42	0.0064

Alpha 0.01  
 Error Degrees of Freedom 10  
 Error Mean Square 23.927

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	M
A	52.767	3	4
B A	45.000	3	6
B A	44.200	3	5
B A	41.000	3	1
B	36.900	3	2
B	32.033	3	3

----- D=9 (PB 255) -----  
 The GLM Procedure

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	7	735.863333	105.123333	1.90	0.1720
Error	10	552.796667	55.279667		
Corrected Total	17	1288.660000			

R-Square 0.571030    Coeff Var 13.86270    Root MSE 7.435030    CSB Mean 53.63333

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
K	2	112.9233333	56.4616667	1.02	0.3948
M	5	622.9400000	124.5880000	2.25	0.1284

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
K	2	112.9233333	56.4616667	1.02	0.3948
M	5	622.9400000	124.5880000	2.25	0.1284

Alpha 0.01  
 Error Degrees of Freedom 10  
 Error Mean Square 55.27967

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	M
A	60.000	3	6
A	58.433	3	2
A	56.233	3	1
A	54.700	3	3
A	49.833	3	5
A	42.600	3	4

## ----- D=10 (PB 312) -----

## The GLM Procedure

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	7	1155.123889	165.017698	11.73	0.0004
Error	10	140.685556	14.068556		
Corrected Total	17	1295.809444			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	CSB Mean
0.891430	9.061137	3.750807	41.39444

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
K	2	41.694444	20.847222	1.48	0.2731
M	5	1113.429444	222.685889	15.83	0.0002

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
K	2	41.694444	20.847222	1.48	0.2731
M	5	1113.429444	222.685889	15.83	0.0002

Alpha	0.01
Error Degrees of Freedom	10
Error Mean Square	14.06856

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	M
A	53.033	3	6
B A	49.500	3	4
B C	41.000	3	5
B C	40.167	3	2
C	33.767	3	1
C	30.900	3	3

## ----- D=11 (PB 260) -----

## The GLM Procedure

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	7	677.222222	96.7460317	4.05	0.0230
Error	10	238.6488889	23.8648889		
Corrected Total	17	915.8711111			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	CSB Mean
0.739430	10.16097	4.885170	48.07778

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
K	2	89.0711111	44.5355556	1.87	0.2048
M	5	588.1511111	117.6302222	4.93	0.0156

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
K	2	89.0711111	44.5355556	1.87	0.2048
M	5	588.1511111	117.6302222	4.93	0.0156

Alpha	0.01
Error Degrees of Freedom	10
Error Mean Square	23.86489



Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping		Mean	N	M
	A	57.567	3	6
B	A	52.833	3	1
B	A	48.200	3	5
B	A	45.200	3	2
B	A	44.467	3	4
B		40.200	3	3

----- D=12 (RRIV 4) -----

The GLM Procedure

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	7	1408.677222	201.239603	4.48	0.0166
Error	10	449.198889	44.919889		
Corrected Total	17	1857.876111			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	CSB Mean
0.758219	8.302260	6.702230	80.72778

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
K	2	351.407778	175.703889	3.91	0.0556
M	5	1057.269444	211.453889	4.71	0.0180

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
K	2	351.407778	175.703889	3.91	0.0556
M	5	1057.269444	211.453889	4.71	0.0180

Alpha	0.01
Error Degrees of Freedom	10
Error Mean Square	44.91989

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping		Mean	N	M
	A	89.400	3	1
	A	87.633	3	6
	A	87.633	3	4
	A	76.167	3	5
	A	72.233	3	3
	A	71.300	3	2

**Phụ bảng 6.** So sánh chỉ số bệnh (%) của các nghiệm thức sau 10 ngày chủng nấm (Thí nghiệm chủng bệnh trong nhà lưới)

STT	DVT	Mẫu phân lập nấm										TB (DVT)		
		CoryLK02		CoryDP03		CoryDN39		CoryKT04		CoryBT17			CorySL02	
1	RRIV 1	28,0 <sup>b</sup>	B	41,3 <sup>b</sup>	A	28,0 <sup>b</sup>	B	46,0 <sup>b</sup>	A	15,3 <sup>cd</sup>	C	43,3 <sup>bc</sup>	A	33,7 <sup>b</sup>
2	RRIV 106	18,7 <sup>c</sup>	C	45,3 <sup>b</sup>	B	12,7 <sup>cd</sup>	D	45,3 <sup>b</sup>	B	19,3 <sup>c</sup>	C	54,0 <sup>b</sup>	A	32,6 <sup>b</sup>
3	RRIV 109	10,7 <sup>def</sup>	AB	7,3 <sup>d</sup>	BC	5,3 <sup>e</sup>	C	10,7 <sup>cd</sup>	AB	9,3 <sup>def</sup>	B	14,7 <sup>fg</sup>	A	9,7 <sup>e</sup>
4	RRIV 114	19,3 <sup>bc</sup>	AB	31,3 <sup>c</sup>	BC	5,3 <sup>e</sup>	B	7,3 <sup>de</sup>	B	30,0 <sup>b</sup>	A	22,0 <sup>ef</sup>	A	19,2 <sup>c</sup>
5	RRIV 124	8,0 <sup>efg</sup>	B	6,0 <sup>d</sup>	B	11,3 <sup>cd</sup>	AB	7,3 <sup>de</sup>	B	6,0 <sup>ef</sup>	B	17,3 <sup>fg</sup>	A	9,3 <sup>e</sup>
6	RRIV 206	15,3 <sup>cd</sup>	B	6,0 <sup>d</sup>	C	5,3 <sup>e</sup>	C	7,3 <sup>de</sup>	C	4,7 <sup>f</sup>	C	31,3 <sup>de</sup>	A	11,7 <sup>e</sup>
7	RRIV 209	5,3 <sup>fg</sup>	B	6,7 <sup>d</sup>	B	5,3 <sup>e</sup>	B	4,7 <sup>e</sup>	B	5,3 <sup>f</sup>	B	11,3 <sup>g</sup>	A	6,4 <sup>f</sup>
8	RRIV 230	13,3 <sup>cd</sup>	B	30,0 <sup>c</sup>	A	8,7 <sup>de</sup>	BC	6,0 <sup>de</sup>	C	4,7 <sup>f</sup>	C	36,7 <sup>cd</sup>	A	16,6 <sup>d</sup>
9	PB 255	10,0 <sup>d-g</sup>	BC	8,7 <sup>d</sup>	C	15,3 <sup>c</sup>	BC	16,7 <sup>c</sup>	B	13,3 <sup>cd</sup>	BC	32,0 <sup>de</sup>	A	16,0 <sup>dc</sup>
10	PB 312	4,7 <sup>g</sup>	B	7,3 <sup>d</sup>	BC	4,7 <sup>e</sup>	C	8,0 <sup>de</sup>	B	11,3 <sup>de</sup>	AB	15,3 <sup>fg</sup>	A	8,6 <sup>ef</sup>
11	PB 260	7,3 <sup>efg</sup>	B	4,7 <sup>d</sup>	B	6,0 <sup>e</sup>	B	11,3 <sup>cd</sup>	B	8,7 <sup>def</sup>	B	20,7 <sup>f</sup>	A	9,8 <sup>e</sup>
12	RRIV 4	94,0 <sup>a</sup>	A	96,0 <sup>a</sup>	A	94,7 <sup>a</sup>	A	96,0 <sup>a</sup>	A	96,7 <sup>a</sup>	A	95,3 <sup>a</sup>	A	95,4 <sup>a</sup>
<b>TB (MPL)</b>		19,6 <sub>CD</sub>		24,2 <sub>B</sub>		16,9 <sub>E</sub>		22,2 <sub>BC</sub>		18,7 <sub>D</sub>		32,8 <sub>A</sub>		

**CV (%) = 9,5; F(A) = 104,2<sup>\*\*</sup>; F(B) = 853,9<sup>\*\*</sup>; F(A\*B) = 13,8<sup>\*\*</sup>**

- So sánh mức độ gây bệnh của mỗi MPL trên các DVT cao su, số liệu có cùng mẫu tự (in thường) trong cùng một cột có cùng mẫu tự thì không khác biệt có ý nghĩa thống kê theo trắc nghiệm đa đoạn Duncan ở mức  $P < 0,01$ .
  - So sánh mức độ nhiễm bệnh của mỗi DVT với các MPL, số liệu có cùng mẫu tự (in hoa) trong cùng một hàng có cùng mẫu tự thì không khác biệt có ý nghĩa thống kê theo trắc nghiệm đa đoạn Duncan ở mức  $P < 0,01$ .
  - Số liệu ở hàng cuối cùng là CSB trung bình theo MPL, so sánh mức độ gây bệnh giữa những MPL trên 12 DVT cao su;
  - Số liệu ở cột cuối cùng là CSB trung bình theo DVT, so sánh mức độ mẫn cảm của những DVT cao su với 6 MPL nấm.
- \*: có ý nghĩa ở mức  $0,01 < P \leq 0,05$ ; \*\*: rất có ý nghĩa ở mức  $P \leq 0,05$ .

**Phụ lục 11. Kết quả phân tích biến lượng về chỉ số bệnh (%) của 6 MPL nấm *C. cassiicola* trên lá 12 DVT cao su ở nhà lưới (số liệu Phụ bảng 6)**

## The GLM Procedure

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	73	68966.46750	944.74613	146.34	<.0001
Error	142	916.75083	6.45599		
Corrected Total	215	69883.21833			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	CSB Mean
0.986882	9.515356	2.540864	26.70278

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
K	2	56.22250	28.11125	4.35	0.0146
M	5	3363.20000	672.64000	104.19	<.0001
D	11	60637.51167	5512.50106	853.86	<.0001
M*D	55	4909.53333	89.26424	13.83	<.0001

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
K	2	56.22250	28.11125	4.35	0.0146
M	5	3363.20000	672.64000	104.19	<.0001
D	11	60637.51167	5512.50106	853.86	<.0001
M*D	55	4909.53333	89.26424	13.83	<.0001

Alpha	0.01
Error Degrees of Freedom	142
Error Mean Square	6.455992
Critical Value of t	2.61090
Least Significant Difference	1.5636

Means with the same letter are not significantly different.

t Grouping	Mean	N	M (MPL)
A	34.7139	36	6
B	27.6667	36	2
C B	26.3722	36	4
C D	24.9167	36	1
D	24.1389	36	5
E	22.4083	36	3

Alpha	0.01
Error Degrees of Freedom	142
Error Mean Square	6.455992
Critical Value of t	2.61090
Least Significant Difference	2.2113

Means with the same letter are not significantly different.

t Grouping	Mean	N	D (DVT)
A	78.1333	18	12
B	35.1333	18	1
B	34.0611	18	2
C	24.9667	18	4
D C	23.0333	18	9
D	22.5389	18	8
E	18.6889	18	6
E	17.8778	18	3
E	17.5889	18	11
E	17.3944	18	5
F E	16.5500	18	10
F	14.4667	18	7

The GLM Procedure

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	73	68966.46750	944.74613	146.34	<.0001
Error	142	916.75083	6.45599		
Corrected Total	215	69883.21833			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	CSB Mean
0.986882	9.515356	2.540864	26.70278

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
K	2	56.22250	28.11125	4.35	0.0146
MD	71	68910.24500	970.56683	150.34	<.0001

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
K	2	56.22250	28.11125	4.35	0.0146
MD	71	68910.24500	970.56683	150.34	<.0001

Alpha 0.01  
 Error Degrees of Freedom 142  
 Error Mean Square 6.455992

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping				Mean	N	MD					
			A	79.633	3	M5D12					
			A	79.133	3	M4D12					
			A	78.733	3	M2D12					
			A	78.000	3	M6D12					
			A	76.867	3	M3D12					
			A	76.433	3	M1D12					
			B	47.267	3	M6D2					
C			B	42.733	3	M4D1					
C			B	42.367	3	M2D2					
C			B	42.333	3	M4D2					
C				41.167	3	M6D1					
C				40.033	3	M2D1					
C		D		37.233	3	M6D8					
		D		34.333	3	M6D9					
E		D		34.000	3	M6D6					
E		D		33.867	3	M2D4					
E		D		33.133	3	M2D8					
E		D		33.033	3	M5D4					
E		D	F	31.933	3	M3D1					
E		D	F	31.867	3	M1D1					
E		G	F	27.933	3	M6D4					
H		G	F	26.867	3	M6D11					
H		G	F	26.000	3	M1D4					
H		G	F	26.000	3	M5D2					
H		G	I	25.600	3	M1D2					
H	J	G	I	24.600	3	M6D5					
K	H	J	G	I	24.067	3	M4D9				
K	H	J	G	I	L	23.067	3	M6D10			
K	H	J	G	I	L	23.067	3	M5D1			
K	H	J	G	I	L	23.033	3	M3D9			
K	H	J	G	I	L	22.967	3	M1D6			
K	H	J	G	M	I	L	22.533	3	M6D3		
K	H	J	N	M	I	L	21.433	3	M5D9		
K	H	J	N	M	I	L	21.267	3	M1D8		
K	H	J	O	N	M	I	L	20.800	3	M3D2	
K	P	J	O	N	M	I	L	19.600	3	M5D10	
K	P	J	O	N	M	I	L	19.567	3	M6D7	
K	P	J	O	N	M	I	L	19.467	3	M3D5	
K	P	J	O	N	M	I	L	19.400	3	M4D11	
K	P	J	O	N	M	Q	L	19.033	3	M4D3	
K	P	J	O	N	M	Q	L	19.033	3	M1D3	
K	P	R	J	O	N	M	Q	L	18.367	3	M1D9

K	P	R		O	N	M	Q	L	17.700	3	M5D3
	P	R		O	N	M	Q	L	17.067	3	M5D11
	P	R		O	N	M	Q	L	17.000	3	M3D8
	P	R		O	N	M	Q	L	16.967	3	M2D9
	P	R		O	N	M	Q		16.400	3	M4D10
	P	R		O	N	M	Q		16.400	3	M1D5
	P	R		O	N		Q		15.667	3	M2D3
	P	R		O	N		Q		15.667	3	M2D10
	P	R		O	N		Q		15.667	3	M4D4
	P	R		O	N		Q		15.667	3	M4D5
	P	R		O	N		Q		15.600	3	M1D11
	P	R		O	N		Q		15.433	3	M4D6
	P	R		O	N		Q		14.933	3	M2D7
	P	R		O			Q		14.200	3	M2D5
	P	R		O			Q		14.200	3	M4D8
	P	R		O			Q		14.200	3	M3D11
	P	R					Q		14.033	3	M5D5
	P	R					Q		14.033	3	M2D6
	P	R					Q		13.300	3	M5D7
	P	R					Q		13.300	3	M1D7
	P	R					Q		13.300	3	M3D4
	P	R					Q		13.300	3	M3D7
	P	R					Q		13.300	3	M3D6
	P	R					Q		13.300	3	M3D3
	R						Q		12.400	3	M5D8
	R						Q		12.400	3	M3D10
	R						Q		12.400	3	M5D6
	R						Q		12.400	3	M4D7
	R						Q		12.400	3	M2D11
	R								12.167	3	M1D10

**Xét theo từng MPL năm**

M=1 (CoryLK02)

The GLM Procedure

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	13	9807.365000	754.412692	114.10	<.0001
Error	22	145.465000	6.612045		
Corrected Total	35	9952.830000			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	CSB Mean
0.985385	10.31996	2.571390	24.91667

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
K	2	41.181667	20.590833	3.11	0.0644
D	11	9766.183333	887.834848	134.28	<.0001

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
K	2	41.181667	20.590833	3.11	0.0644
D	11	9766.183333	887.834848	134.28	<.0001

Alpha	0.01
Error Degrees of Freedom	22
Error Mean Square	6.612045

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	D (DVT)			
A	76.433	3	12			
B	31.867	3	1			
C	26.000	3	4			
C	25.600	3	2			
C	D	22.967	3	6		
C	D	E	21.267	3	8	
F	D	E	19.033	3	3	
F	G	D	E	18.367	3	9
F	G	E	16.400	3	5	
F	G	E	15.600	3	11	
F	G		13.300	3	7	
G			12.167	3	10	

----- M=2 (CoryDP03) -----

The GLM Procedure  
Class Level Information

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	13	12680.97500	975.45962	173.23	<.0001
Error	22	123.88500	5.63114		
Corrected Total	35	12804.86000			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	CSB Mean
0.990325	8.577114	2.373002	27.66667

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
K	2	50.76167	25.38083	4.51	0.0229
D	11	12630.21333	1148.20121	203.90	<.0001

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
K	2	50.76167	25.38083	4.51	0.0229
D	11	12630.21333	1148.20121	203.90	<.0001

Alpha	0.01
Error Degrees of Freedom	22
Error Mean Square	5.631136

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	D (DVT)
A	78.733	3	12
B	42.367	3	2
B	40.033	3	1
C	33.867	3	4
C	33.133	3	8
D	16.967	3	9
D	15.667	3	10
D	15.667	3	3
D	14.933	3	7
D	14.200	3	5
D	14.033	3	6
D	12.400	3	11

----- M=3 (CoryDN39) -----

The GLM Procedure

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	13	10799.82750	830.75596	194.10	<.0001
Error	22	94.16000	4.28000		
Corrected Total	35	10893.98750			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	CSB Mean
0.991357	9.232351	2.068816	22.40833

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
K	2	9.70667	4.85333	1.13	0.3399
D	11	10790.12083	980.92008	229.19	<.0001

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
K	2	9.70667	4.85333	1.13	0.3399
D	11	10790.12083	980.92008	229.19	<.0001

Alpha	0.01
Error Degrees of Freedom	22
Error Mean Square	4.28

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	D (DVT)
A	76.867	3	12
B	31.933	3	1
C	23.033	3	9
D C	20.800	3	2
D C	19.467	3	5
D E	17.000	3	8
E	14.200	3	11
E	13.300	3	7
E	13.300	3	6
E	13.300	3	3
E	13.300	3	4
E	12.400	3	10

----- M=4 (CoryKT04) -----

The GLM Procedure

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	13	12619.86111	970.75855	149.92	<.0001
Error	22	142.45111	6.47505		

Corrected Total 35 12762.31222

R-Square	Coeff Var	Root MSE	CSB Mean
0.988838	9.648834	2.544612	26.37222

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
K	2	2.84222	1.42111	0.22	0.8047
D	11	12617.01889	1147.00172	177.14	<.0001

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
K	2	2.84222	1.42111	0.22	0.8047
D	11	12617.01889	1147.00172	177.14	<.0001

Alpha	0.01
Error Degrees of Freedom	22
Error Mean Square	6.475051

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	D (DVT)
A	79.133	3	12
B	42.733	3	1
B	42.333	3	2
C	24.067	3	9
D C	19.400	3	11
D C	19.033	3	3
D E	16.400	3	10
D E	15.667	3	4
D E	15.667	3	5
D E	15.433	3	6
D E	14.200	3	8
E	12.400	3	7

----- M=5 (CoryBT17) -----

The GLM Procedure

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	13	11345.32944	872.71765	142.90	<.0001
Error	22	134.35611	6.10710		
Corrected Total	35	11479.68556			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	CSB Mean
0.988296	10.23765	2.471254	24.13889

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
K	2	11.44389	5.72194	0.94	0.4069
D	11	11333.88556	1030.35323	168.71	<.0001

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
K	2	11.44389	5.72194	0.94	0.4069
D	11	11333.88556	1030.35323	168.71	<.0001

Alpha	0.01
Error Degrees of Freedom	22
Error Mean Square	6.107096

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	D (DVT)
A	79.633	3	12
B	33.033	3	4
C	26.000	3	2
D C	23.067	3	1
D C	21.433	3	9
D E	19.600	3	10
D E F	17.700	3	3
D E F	17.067	3	11
E F	14.033	3	5
F	13.300	3	7
F	12.400	3	6
F	12.400	3	8

----- M=6 (CorySL02) -----

The GLM Procedure  
Class Level Information

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	13	8455.391944	650.414765	83.70	<.0001
Error	22	170.951111	7.770505		
Corrected Total	35	8626.343056			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	CSB Mean
0.980183	8.030107	2.787563	34.71389

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
K	2	45.768889	22.884444	2.95	0.0736
D	11	8409.623056	764.511187	98.39	<.0001

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
K	2	45.768889	22.884444	2.95	0.0736
D	11	8409.623056	764.511187	98.39	<.0001

Alpha	0.01
Error Degrees of Freedom	22
Error Mean Square	7.770505



Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	D
A	78.000	3	12
B	47.267	3	2
C B	41.167	3	1
C D	37.233	3	8
E D	34.333	3	9
E D	34.000	3	6
E F	27.933	3	4
F	26.867	3	11
G F	24.600	3	5
G F	23.067	3	10
G F	22.533	3	3
G	19.567	3	7

### Xét theo từng DVT cao su

----- D=1 (RRIV 1) -----

The GLM Procedure

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	7	854.3633333	122.0519048	20.16	<.0001
Error	10	60.5366667	6.0536667		
Corrected Total	17	914.9000000			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	CSB Mean
0.933832	7.003093	2.460420	35.13333

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
K	2	0.3033333	0.1516667	0.03	0.9753
M	5	854.0600000	170.8120000	28.22	<.0001

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
K	2	0.3033333	0.1516667	0.03	0.9753
M	5	854.0600000	170.8120000	28.22	<.0001

Alpha	0.01
Error Degrees of Freedom	10
Error Mean Square	6.053667

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	M (MPL)
A	42.733	3	4
A	41.167	3	6
A	40.033	3	2
B	31.933	3	3
B	31.867	3	1
C	23.067	3	5

----- D=2 (RRIV 106) -----

The GLM Procedure

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	7	1880.380556	268.625794	85.60	<.0001
Error	10	31.382222	3.138222		
Corrected Total	17	1911.762778			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	CSB Mean
0.983585	5.200954	1.771503	34.06111

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
K	2	7.697778	3.848889	1.23	0.3339
M	5	1872.682778	374.536556	119.35	<.0001

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
K	2	7.697778	3.848889	1.23	0.3339
M	5	1872.682778	374.536556	119.35	<.0001

Alpha 0.01  
 Error Degrees of Freedom 10  
 Error Mean Square 3.138222

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	M
A	47.267	3	6
B	42.367	3	2
B	42.333	3	4
C	26.000	3	5
C	25.600	3	1
D	20.800	3	3

----- D=3 (RRIV 109) -----

The GLM Procedure

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	7	152.5122222	21.7874603	9.51	0.0010
Error	10	22.8988889	2.2898889		
Corrected Total	17	175.4111111			

R-Square 0.869456  
 Coeff Var 8.464351  
 Root MSE 1.513238  
 CSB Mean 17.87778

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
K	2	1.8477778	0.9238889	0.40	0.6784
M	5	150.6644444	30.1328889	13.16	0.0004

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
K	2	1.8477778	0.9238889	0.40	0.6784
M	5	150.6644444	30.1328889	13.16	0.0004

Alpha 0.01  
 Error Degrees of Freedom 10  
 Error Mean Square 2.289889

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	M (MPL)
A	22.533	3	6
B A	19.033	3	1
B A	19.033	3	4
B	17.700	3	5
B C	15.667	3	2
C	13.300	3	3

----- D=4 (RRIV 114) -----

The GLM Procedure

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	7	1175.503333	167.929048	13.11	0.0003
Error	10	128.056667	12.805667		
Corrected Total	17	1303.560000			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	CSB Mean
0.901764	14.33311	3.578501	24.96667

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
K	2	45.250000	22.625000	1.77	0.2203
M	5	1130.253333	226.050667	17.65	0.0001

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
K	2	45.250000	22.625000	1.77	0.2203
M	5	1130.253333	226.050667	17.65	0.0001

Alpha	0.01
Error Degrees of Freedom	10
Error Mean Square	12.80567

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	M
A	33.867	3	2
A	33.033	3	5
A	27.933	3	6
A	26.000	3	1
B	15.667	3	4
B	13.300	3	3

----- D=5 (RRIV 124) -----

The GLM Procedure

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	7	249.5772222	35.6538889	8.03	0.0020
Error	10	44.3922222	4.4392222		
Corrected Total	17	293.9694444			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	CSB Mean
0.848990	12.11275	2.106946	17.39444

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
K	2	4.5077778	2.2538889	0.51	0.6166
M	5	245.0694444	49.0138889	11.04	0.0008

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
K	2	4.5077778	2.2538889	0.51	0.6166
M	5	245.0694444	49.0138889	11.04	0.0008

Alpha	0.01
Error Degrees of Freedom	10
Error Mean Square	4.439222

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	M
A	24.600	3	6
B A	19.467	3	3
B	16.400	3	1
B	15.667	3	4
B	14.200	3	2
B	14.033	3	5

----- D=6 (DVT 206) -----

The GLM Procedure

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	7	1083.475556	154.782222	23.82	<.0001
Error	10	64.982222	6.498222		
Corrected Total	17	1148.457778			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	CSB Mean
0.943418	13.63998	2.549161	18.68889

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
K	2	22.697778	11.348889	1.75	0.2236
M	5	1060.777778	212.155556	32.65	<.0001

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
K	2	22.697778	11.348889	1.75	0.2236
M	5	1060.777778	212.155556	32.65	<.0001

Alpha	0.01
Error Degrees of Freedom	10
Error Mean Square	6.498222

Number of Means	2	3	4	5	6
Critical Range	6.596	6.874	7.049	7.169	7.257

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	M
A	34.000	3	6
B	22.967	3	1
C	15.433	3	4
C	14.033	3	2
C	13.300	3	3
C	12.400	3	5

----- D=7 (RRIV 209) -----

The GLM Procedure

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	7	115.6700000	16.5242857	6.07	0.0057
Error	10	27.2300000	2.7230000		
Corrected Total	17	142.9000000			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	CSB Mean
0.809447	11.40658	1.650152	14.46667

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
K	2	11.9233333	5.9616667	2.19	0.1627
M	5	103.7466667	20.7493333	7.62	0.0034

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
K	2	11.9233333	5.9616667	2.19	0.1627
M	5	103.7466667	20.7493333	7.62	0.0034

Alpha	0.01
Error Degrees of Freedom	10
Error Mean Square	2.723

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	M
A	19.567	3	6
B	14.933	3	2
B	13.300	3	1
B	13.300	3	3
B	13.300	3	5
B	12.400	3	4

----- D=8 (RRIV 230) -----

The GLM Procedure

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	7	1637.310556	233.901508	39.05	<.0001
Error	10	59.892222	5.989222		
Corrected Total	17	1697.202778			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	CSB Mean
0.964711	10.85807	2.447289	22.53889

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
K	2	38.907778	19.453889	3.25	0.0819
M	5	1598.402778	319.680556	53.38	<.0001

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
K	2	38.907778	19.453889	3.25	0.0819
M	5	1598.402778	319.680556	53.38	<.0001

Alpha	0.01
Error Degrees of Freedom	10
Error Mean Square	5.989222

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	M
A	37.233	3	6
A	33.133	3	2
B	21.267	3	1
C B	17.000	3	3
C	14.200	3	4
C	12.400	3	5

----- D=9 (PB 255) -----

The GLM Procedure

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	7	599.0233333	85.5747619	16.41	<.0001
Error	10	52.1366667	5.2136667		
Corrected Total	17	651.1600000			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	CSB Mean
0.919933	9.913222	2.283345	23.03333

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
K	2	29.3233333	14.6616667	2.81	0.1074
M	5	569.7000000	113.9400000	21.85	<.0001

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
K	2	29.3233333	14.6616667	2.81	0.1074
M	5	569.7000000	113.9400000	21.85	<.0001

Alpha	0.01
Error Degrees of Freedom	10
Error Mean Square	5.213667

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	M
A	34.333	3	6
B	24.067	3	4
C B	23.033	3	3
C B	21.433	3	5
C B	18.367	3	1
C	16.967	3	2

----- D=10 (PB 312) -----

The GLM Procedure

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	7	272.7983333	38.9711905	10.40	0.0007
Error	10	37.4666667	3.7466667		
Corrected Total	17	310.2650000			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	CSB Mean
0.879243	11.69565	1.935631	16.55000

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
K	2	5.7733333	2.8866667	0.77	0.4884
M	5	267.0250000	53.4050000	14.25	0.0003

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
K	2	5.7733333	2.8866667	0.77	0.4884
M	5	267.0250000	53.4050000	14.25	0.0003

Alpha	0.01
Error Degrees of Freedom	10
Error Mean Square	3.746667

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	M
A	23.067	3	6
B A	19.600	3	5
B C	16.400	3	4
B C	15.667	3	2
C	12.400	3	3
C	12.167	3	1

----- D=11 (PB 260) -----

The GLM Procedure

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	7	422.5722222	60.3674603	8.34	0.0017
Error	10	72.3855556	7.2385556		
Corrected Total	17	494.9577778			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	CSB Mean
0.853754	15.29634	2.690456	17.58889

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
K	2	26.5877778	13.2938889	1.84	0.2093
M	5	395.9844444	79.1968889	10.94	0.0008

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
K	2	26.5877778	13.2938889	1.84	0.2093
M	5	395.9844444	79.1968889	10.94	0.0008

Alpha	0.01
Error Degrees of Freedom	10
Error Mean Square	7.238556

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	M
A	26.867	3	6
B	19.400	3	4
B	17.067	3	5
B	15.600	3	1
B	14.200	3	3
B	12.400	3	2

----- D=12 (RRIV 4) -----

## The GLM Procedure

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	7	87.1100000	12.4442857	1.09	0.4351
Error	10	114.0500000	11.4050000		
Corrected Total	17	201.1600000			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	CSB Mean
0.433038	4.322264	3.377129	78.13333

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
K	2	62.74333333	31.37166667	2.75	0.1117
M	5	24.36666667	4.87333333	0.43	0.8198

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
K	2	62.74333333	31.37166667	2.75	0.1117
M	5	24.36666667	4.87333333	0.43	0.8198

Alpha	0.01
Error Degrees of Freedom	10
Error Mean Square	11.405

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	M
A	79.633	3	5
A	79.133	3	4
A	78.733	3	2
A	78.000	3	6
A	76.867	3	3
A	76.433	3	1