

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 cassicola* TRÊN CÂY CAO SU  
(*Hevea brasiliensis*) Ở VIỆT NAM

Chuyên ngành: **Bảo vệ thực vật**

Mã số : 9.62.01.12

**TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ NÔNG NGHIỆP**

**Thành phố Hồ Chí Minh, năm 2020**

**Công trình được hoàn thành tại:**  
**TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM TP. HCM**

Hướng dẫn khoa học: TS. Nguyễn Anh Nghĩa  
PGS.TS. Nguyễn Bảo Quốc

Phản biện 1:

Phản biện 2:

Phản biện 3:

Luận án được bảo vệ trước Hội đồng chấm luận án cấp Trường học  
tại Trường Đại học Nông Lâm TP. Hồ Chí Minh

Vào hồi.....giờ .....ngày .....tháng.....năm.....

Có thể tìm hiểu luận án tại:

-Thư viện Trường Đại học Nông Lâm TP. Hồ Chí Minh

-Thư viện Quốc gia Hà Nội

## MỞ ĐẦU

### 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* có đặc điểm sinh học rất phức tạp vì là loài ký sinh, hoại sinh và đồng thời là nấm nội sinh (Déon và ctv, 2014). Kết quả các nghiên cứu sử dụng chỉ thị phân tử RAPD, rDNA-RFLP, rDNA-ITS, ISSR 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 cassiicolin (gen *Cas*), có ít nhất 06 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 mất cảm (Tan và ctv, 1992; Jayasinghe và Silva, 1996). Mức độ mất 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 mất cảm ở nước khác. Điều này dẫn đến giả thuyết 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 hoặc là đang có sự tồn tại nhiều nòi nấm 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) nấm 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.

### **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.

### **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.

## **Mục tiêu nghiên cứu của đề tài**

Đánh giá sự đa dạng di truyền của 76 MPL *C. cassicola* 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. cassicola* 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 tuyến 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.

## **Thời gian nghiên cứu**

Từ tháng 11 năm 2016 đến tháng 11 năm 2019.

## **Đối tượng nghiên cứu**

Bảy mươi sáu (76) mẫu nấm *C. cassicola* được phân lập từ 16 DVT cao su trên nhiều vùng địa lý ở Việt Nam.

## **Phạm vi nghiên cứu**

Phân lập, định danh các mẫu nấm *C. cassicola* 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.

## **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. cassicola* 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.

### **Bố cục của luận án**

Luận án gồm 136 trang (không kể phụ lục), có 3 chương, phần kết quả nghiên cứu có 12 bảng số liệu và 24 hình. Tổng cộng có 122 (9 tiếng Việt và 113 tiếng Anh) tài liệu đã được tham khảo các nội dung liên quan đến luận án.

## **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*) được xem là loài cây công nghiệp quan trọng trên thế giới cũng như 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). Từ năm 2006, kim ngạch xuất khẩu cao su thiên nhiên đã vượt giá trị 1 tỉ USD, đến năm 2018 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 vào năm 1936 (Wei, 1950). Đến nay, bệnh đã xuất hiện ở hầu hết các nước trồng cao su. Từ năm 1975 bệnh rụng lá *Corynespora* đã trở thành loại bệnh hại chính trên cây cao su ở Malaysia (RRIM, 2000). Ở Sri Lanka, từ năm 1986 đến 1988, hơn 4.000 ha cao su nhiễm bệnh, chính phủ Sri Lanka phải chi hơn 530.000 đô la Mỹ để bồi thường cho khoảng 3.000 hộ nông dân bị ảnh hưởng (Liyanage và ctv, 1989). Ở Indonesia, trong những năm 1980, gần 1.200 ha cao su đã bị nhiễm bệnh nặng, thiệt hại kinh tế lên đến 200 tỉ Rupiah (hơn 20 triệu đô la Mỹ) (Liyanage và ctv, 1989). Từ năm 1996, bệnh đã xuất hiện ở tất cả các vùng trồng cao su ở nước này. Ở Ấn Độ, 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. 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). Từ năm 2000, bệnh 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. Tháng 4 năm 2009, dịch bệnh đã 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. Từ tháng 4 đến tháng 10 năm 2010, dịch bệnh xảy ra trên qui mô lớn tại vùng Đông Nam Bộ, hơn 23.500 ha cao su đã nhiễm bệnh (Phan Thanh Dung và Nguyen Anh Nghia, 2011). Kể từ năm 2011 đến nay, 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.

### **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 (Liyanage và ctv, 1986; 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 quầng vàng nhạt trên lá ổn định. Triệu chứng của bệnh biến thiên theo mức độ mầm cảm của DVT và điều kiện thời tiết (Chee, 1988; Radziah và Ismail, 1990).

## **1.3. Đặc điểm của nấm *C. 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 *C. cassiicola***

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*.

Tảo 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. 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 sự biến thiên về chiều dài, chiều rộng và số vách ngăn giả (pseudosepta) (Ellis và Holiday, 1971; Onesirosan và ctv, 1974; Darmono và ctv, 1996; Silva và ctv, 1998; Nguyen Anh Nghia và ctv, 2008).

### **1.3.2. Phân bố và ký chủ của nấm *C. 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).

### **1.4. Đặc điểm phát sinh và phát triển của nấm *C. 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. Sợi nấm và bào tử nấm tồn tại trong đất, không khí, trên vết bệnh và tàn dư thực. Điều kiện môi trường có liên quan chặt chẽ đến sự phát triển của bệnh (Rajalakshmy và Kothandaraman, 1996; Radziah và ctv, 1996; Sailajadevi, 2006). 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 (Tan và ctv, 1992; Jayasinghe và Silva, 1996; Breton và ctv, 1996).

## **1.5. Đặc điểm sinh lý, sự xâm nhiễm, lây lan và lưu tồn của nấm *C. cassiicola***

Có sự biến thiên về số lượng bào tử hình thành trên các môi trường nuôi cấy khác nhau. 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 xâm nhập chủ yếu ở mặt dưới lá qua biểu bì và khí khổng. Bào tử nảy mầm tốt nhất khi nhiệt độ môi trường xung quanh là 28°C – 30°C. Bào tử được lây lan nhờ gió và mưa. Bào tử có khả năng tồn tại trên vết bệnh cũng như trong đất với thời gian dài từ 3 tháng đến 2 năm (Pernezny và Simone, 1993).

## **1.6. Nghiên cứu về đa dạng di truyền của nấm *C. cassiicola* bằng chỉ thị phân tử**

### **1.6.1. Sự đa dạng di truyền của nấm *C. cassiicola***

Những nghiên cứu về đa dạng di truyền của nấm *C. cassiicola* bằng các chỉ thị phân tử RAPD, RFLP, rDNA-ITS, ISSR cho thấy loài nấm này rất đa dạng về mặt di truyền (Silva và ctv, 1995; 1998; 2003; Ismail và Jeyanayagi, 1999; Safiah và Noor, 2003; Nguyen Anh Nghia và ctv; 2008; Nguyen Don Hieu và ctv, 2014).

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

Một số chỉ thị phân tử đã được áp dụng thành công trong nghiên cứu đa dạng di truyền nấm *C. cassiicola* bao gồm RFLP, RAPD, ISSR, phân tích trình tự vùng rDNA-ITS.

## **1.7. Độc tố cassiicolin của nấm *C. 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. Độc tố này là tác nhân làm phân hủy tế bào và gây ra các dạng triệu chứng bệnh trên cây ký chủ (Breton và ctv, 2000). Cassiicolin có vai trò đặc biệt quan trọng trong giai đoạn đầu của quá trình xâm nhiễm của nấm (Déon và ctv (2012a).

### **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 (Lamotte và ctv, 2007). 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 (Barthe và ctv, 2007). Cassiicolin dễ tan trong nước và một số dung môi khác, khả năng chịu nhiệt cao, ổn định trong môi trường pH 4 – 8, 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 *C. cassiicola* và tính kháng của ký chủ**

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 sản sinh lượng độc tố cao nhất. Cassiicolin có thể được xem là tác nhân quy định tính gây bệnh của nấm *C. cassiicola* (Breton và ctv, 2000). Mức độ miễn cảm với lượng độc tố cassiicolin là tùy thuộc vào ký chủ, nghĩa là tùy thuộc vào tính kháng của mỗi DVT (Déon và ctv, 2012a).

### **1.8. Nghiên cứu về đa dạng di truyền gen mã hóa độc tố cassiicolin (gen *Cas*) của nấm *C. cassiicola***

Có 6 nhóm gen *Cas* đã được ghi nhận, nhóm gen *CasI* 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 (Déon và ctv, 2012b; Déon và ctv, 2014).

Nhóm gen *Cas2* và *Cas5* được tìm thấy trên cây cao su và một số cây ký chủ khác tại Trung Quốc (Liu và ctv, 2015). Nhóm gen *Cas4* và *Cas5* được phát hiện tại Malaysia và lần đầu tiên ghi nhận 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 *C. cassiicola***

Phổ ký chủ của nấm *C. cassiicola* rất rộng nhưng sự lây nhiễm chéo rất biến thiên khác biệt giữa các kết quả nghiên cứu. 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 (Onesirosan và ctv, 1974; Kingsland, 1985; Chee, 1988; Suwanto và ctv, 2000; Cutrim và Silva, 2003; Poltronieri và ctv, 2003; Olivera và ctv, 2007; Nguyen Don Hieu và ctv, 2014; Ferreira và Bentes, 2017).

### **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 (Dangl và Jones, 2001; Bùi Chí Bửu, 2002).

#### **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 (Health, 2000; Dangl và Jones, 2001; Bùi Chí Bửu, 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 (Phạm Văn Dư, 2002; 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 MPL nấm *C. cassiicola* phân lập từ cây cao su.
- Phân tích đa dạng di truyền của 76 MPL nấm *C. cassiicola* bằng kỹ thuật giải trình tự vùng rDNA-ITS và chỉ thị phân tử SRAP.
- Nhận diện sự tồn tại của các nhóm gen *Cas* trong 76 MPL nấm *C. cassiicola* bằng kỹ thuật PCR khuếch đại gen *Cas*.
- Khảo sát tính gây bệnh của 76 MPL nấm *C. cassiicola* trên DVT cao su RRIV 4 (mẫn cảm) 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 bằng phương pháp lây bệnh trên lá cắt rời và phương pháp lây bệnh nhân tạo trong điều kiện nhà lưới.

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

Từ tháng 11 năm 2016 đến tháng 11 năm 2019 tại Viện Nghiên cứu Cao su Việt Nam.

#### 2.3. VẬT LIỆU NGHIÊN CỨU

Nguồn nấm: 76 mẫu nấm được phân lập trên cây cao su tại nhiều vùng trồng cao su ở Việt Nam.

Môi trường nuôi cấy nấm (MEA, PSA, WA). Các loại hóa chất ly trích DNA; hóa chất sử dụng cho kỹ thuật PCR; cặp primer ITS1 và ITS4 (White và ctv, 1990) khuếch đại vùng rDNA-ITS, 30 cặp primer thực hiện PCR-SRAP (tổ hợp 5 cặp mỗi xuôi Me1, Me2, Me3, Me4, Me5 với 6 mỗi ngược Em1, Em2, Em3, Em4, Em5, Em6) (Li và Quiros, 2001); 7 cặp primer khuếch đại gen *Cas* (Déon và ctv (2012a; 2012b; 2014) gồm F1CasU1-2-6 + R1CasU1-2-6 (Cas1,

Cas2, Cas6), CasF17 + CasR24 (Cas2), CasF18 + CasR27 (Cas1), CasF16 + CasR25 (Cas6), F1CasU3-4-5 + R1CasU3-4-5 (Cas3, Cas4, Cas5), CasF20 + CasR28 (Cas3, Cas4), CasF19 + CasR26 (Cas5). Hóa chất điện di sản phẩm PCR.

Trang thiết bị dụng cụ cần thiết cho thí nghiệm nuôi cấy trong phòng thí nghiệm và các nghiên cứu chỉ thị phân tử. Trang thiết bị dụng cụ cần thiết cho thí nghiệm lây bệnh nhân tạo. Nhà lưới, hệ thống tưới phun sương (giữ ẩm).

## **2.4. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**

### **2.4.1. Thu thập mẫu bệnh**

Mẫu bệnh có vết bệnh đặc trưng được thu thập từ nhiều DVT cao su tại 12 tỉnh từ Đông Nam Bộ, Tây Nguyên, Miền Trung và Miền Núi Phía Bắc. Phân lập đơn bào tử và cấy chuyển nguồn nấm thuần chủng phục vụ cho nghiên cứu.

### **2.4.2. Khảo sát đặc điểm hình thái nấm *C. 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. Phương pháp và chỉ tiêu theo dõi:

- (1) Hình thái và sự phân bố 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;
- (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 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 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 *C. cassiicola***

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

MPL nấm được ly trích DNA bằng Wizard Genomic DNA Purification Kit theo quy trình khuyến cáo bởi nhà cung cấp bộ Kit.

#### **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 và ITS4 (White và ctv, 1990). Thể tích cho mỗi phản ứng PCR là 25  $\mu$ L. Phản ứng khuếch đại được thực hiện theo quy trình (White và ctv, 1990). Các sản phẩm PCR được giải trình tự bởi First BASE Laboratories, Singapore. So sánh trình tự sản phẩm PCR các mẫu nấm bằng phần mềm BioEdit. Xây dựng cây phân nhóm di truyền bằng phần mềm MEGA 6.

#### **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). Thể tích mỗi phản ứng PCR-SRAP khuếch đại vùng ORFs là 25  $\mu$ L. Phản ứng khuếch đại được thực hiện theo quy trình (Li và Quiros, 2001; Li và ctv, 2014). Sản phẩm khuếch đại được điện di trên gel agarose 1%, chụp ảnh bằng máy chuyên dụng. Kích thước của các đoạn DNA khuếch đại được so sánh với thang DNA chuẩn 100 bp.

Phương pháp phân tích kết quả: Các đoạn DNA đã khuếch đại được ghi là (1) nếu có băng DNA và (0) nếu không có 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 UPGMA với bootstrap 1.000 lần



lập 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 (Déon và ctv, 2012a; 2012b; 2014). Thể tích cho mỗi phản ứng PCR là 25  $\mu$ L. Phản ứng khuếch đại được thực hiện theo quy trình (Liu và ctv, 2015). Sản phẩm sau khuếch đại sẽ được điện di trên gel agarose 1%, chụp ảnh bằng máy chuyên dụng. 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 bởi First BASE Laboratories, Singapore. So sánh trình tự sản phẩm PCR các mẫu nấm bằng phần mềm BioEdit để tìm sự tương đồng giữa chúng.

#### **2.4.5. Khảo sát tính gây bệnh của 76 MPL nấm *C. 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 nấm 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/ô cơ sở (hộp plastic).

Lá được lây bệnh bằng cách dùng pipette nhỏ một 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).

Chỉ tiêu theo dõi: Chỉ số bệnh (%) 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 (%).

#### **2.4.6. Đánh giá tính gây bệnh của 6 MPL *C. cassiicola* đại diện cho các phân nhóm di truyền và vùng địa lý khác nhau trên 12 DVT cao su bằng phương pháp lây bệnh nhân tạo trên lá cắt rời**

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.

Thí nghiệm được bố trí theo kiểu khối đầy đủ ngẫu nhiên, hai yếu tố. Yếu tố A: 6 MPL nấm; Yếu tố B: 12 DVT cao su. Thí nghiệm gồm 72 nghiệm thức, 3 lần lặp lại, 3 lá cao su/ô cơ sở (hộp plastic).

Phương pháp đánh giá vết bệnh trên lá cao su, chỉ tiêu theo dõi tương tự thí nghiệm khảo sát tính gây bệnh của 76 MPL nấm (tiêu mục 2.4.5). Số liệu được chuyển đổi sang  $\sqrt{x+0,5}$  hoặc góc arsin  $\sqrt{x}$  và phân tích ANOVA bằng phần mềm SAS 8.1.

#### **2.4.7. Đánh giá tính gây bệnh của 6 MPL *C. cassiicola* đại diện cho các phân nhóm di truyền và vùng địa lý khác nhau trên 12 DVT cao su bằng phương pháp lây bệnh nhân tạo trong nhà lưới**

Thí nghiệm được bố trí theo kiểu khối đầy đủ ngẫu nhiên, hai yếu tố. Yếu tố A: 6 MPL nấm; Yếu tố B: 12 DVT cao su. Thí nghiệm gồm 72 nghiệm thức, 3 lần lặp lại, 6 cây/nghiệm thức (2 cây/ô cơ sở).

Cây cao su 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. Sau khi lây nhiễm 12 giờ (qua đêm), hệ thống tưới phun sương được sử dụng để điều chỉnh

nhiệt độ 26 – 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).

Chỉ tiêu theo dõi: Chỉ số bệnh (%) của mỗi MPL nấm trên các DVT cao su.

Đánh giá mức gây bệnh của các MPL nấm trên lá các DVT cao su được phân hạng theo CSB.

Số liệu được chuyển đổi sang  $\sqrt{x+0,5}$  hoặc góc arcsin  $\sqrt{x}$  và phân tích ANOVA bằng phần mềm SAS.

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.

## CHƯƠNG 3

### KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### **3.1. Đặc điểm hình thái nấm *C. cassiicola* phân lập từ cây cao su**

##### **3.1.1. Đặc điểm hình thái tản nấm *C. 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 (dày, mỏng).

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 có tản nấm màu xám trắng. Một số MPL tạo sắc tố hồng làm đổi màu một phần môi trường nuôi cấy.

Phần lớn số MPL nấm (71 MPL) có kết cấu tản nấm được xếp vào nhóm “dày”, sợi nấm mọc nhiều, mọc bông lên khỏi bề mặt môi trường. Còn lại 5 MPL thuộc nhóm có kết cấu tản nấm “mỏng”.

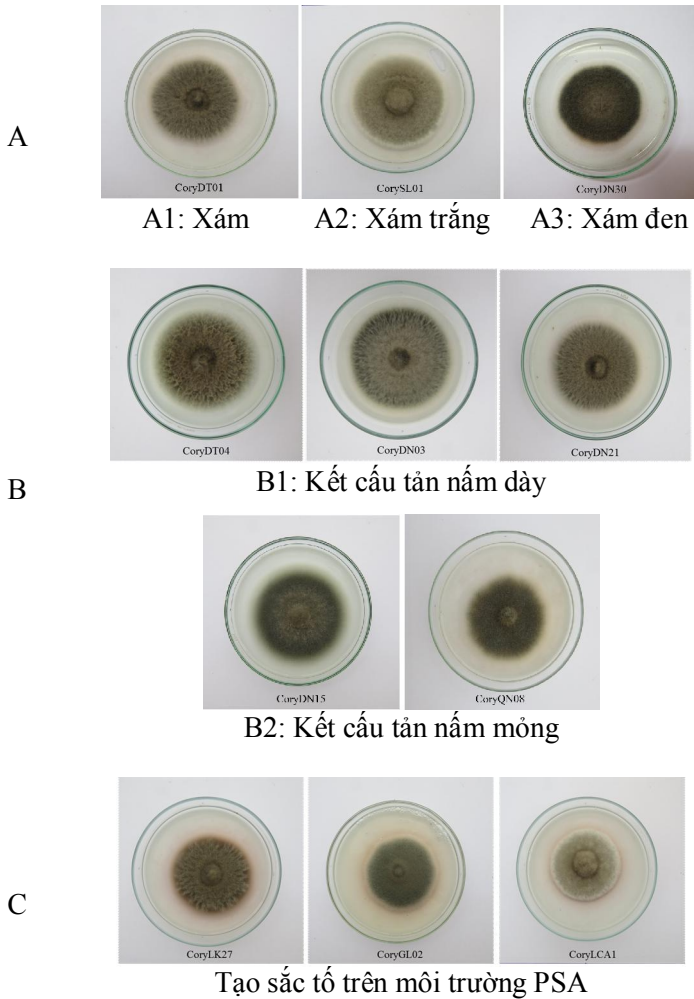
Tốc độ tăng trưởng tản nấm trung bình sau 7 ngày cấy nấm và kích thước tản nấm ở thời điểm sau 7 ngày cấy nấm có sự khác biệt ý nghĩa giữa những MPL. Phân tích trắc nghiệm đa đoạn Duncan tách các nguồn nấm ra thành nhiều nhóm. Các MPL có tốc độ tăng trưởng nhanh (10,5 – 11,5 mm/ngày), tương ứng với kích thước tản nấm sau 7 ngày nuôi cấy từ 73,7 mm đến 80,3 mm, tăng trưởng nhanh nhất là MPL CoryBT03. 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 tản nấm sau 7 NNC từ 60 mm đến 71 mm.

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

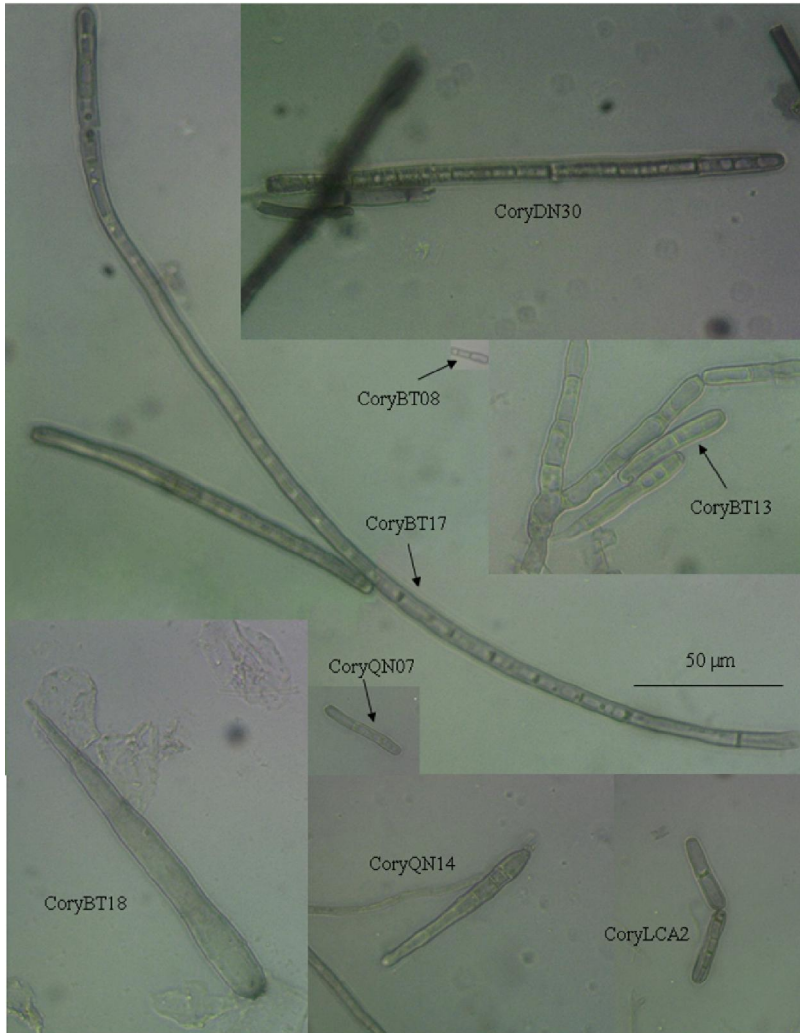
Sự đa dạng về hình thái bào tử được ghi nhận không chỉ giữa những MPL khác nhau mà ngay cả trên cùng một MPL nấm. Ghi nhận sự biến thiên về hình dạng bào tử (hình chùy, dài, thẳng, cong, bầu dục). Kích thước bào tử với chiều dài từ 14  $\mu\text{m}$  đến 385,4  $\mu\text{m}$ ,

chiều rộng từ 3,7  $\mu\text{m}$  đến 14,1  $\mu\text{m}$ , số vách ngăn giả (speudosepta) từ 0 đến 26 vách ngăn. 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.

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.



**Hình 3.1.** Sự biến thiên về hình thái tản nấm *C. cassiicola* 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 cấy.



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

### **3.2. Đa dạng di truyền nấm *C. cassicola* phân lập từ cây cao su**

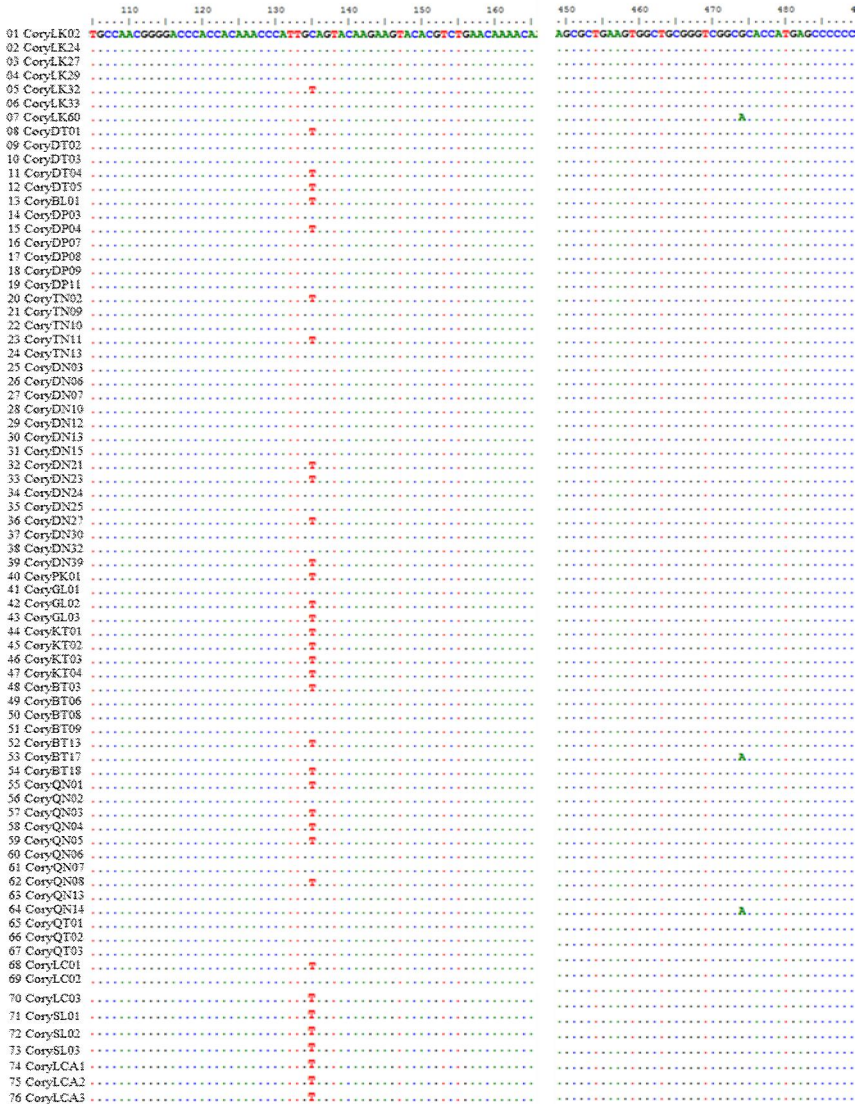
#### **3.2.1. Nhận diện và phân tích mối quan hệ di truyền của các MPL nấm *C. cassicola* dựa trên trình tự vùng rDNA-ITS**

Phản ứng PCR khuếch đại vùng rDNA-ITS của 76 MPL nấm dùng cặp primer 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.

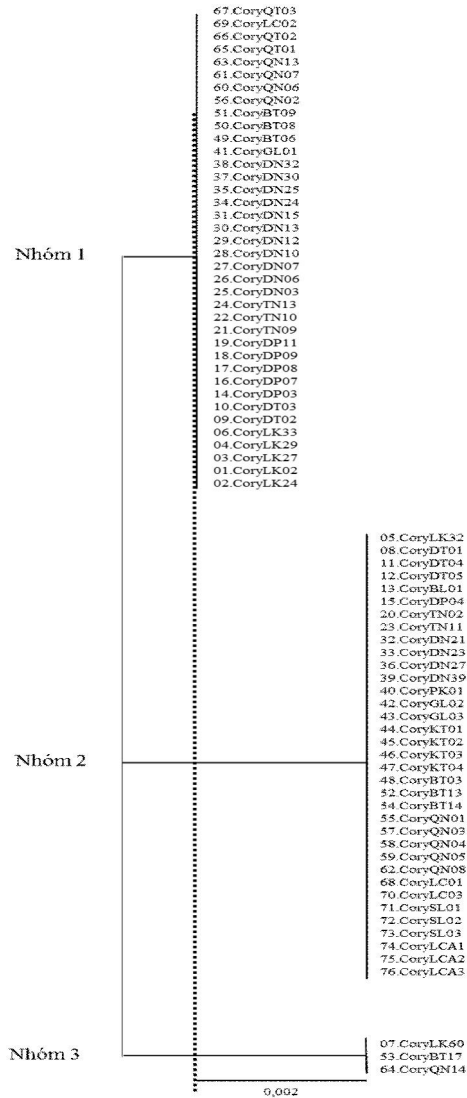
Từ kết quả phân tích trình tự vùng rDNA-ITS đã chia 76 MPL nấm thành ba nhóm rõ rệt dựa trên cơ sở SNPs ở vị trí nucleotide thứ 135 và 474. Nhóm thứ nhất gồm 38 MPL, nhóm thứ hai gồm 35 MPL và nhóm thứ ba gồm 3 MPL (CoryLK60, CoryBT17, CoryQN14).

Cây phân nhóm di truyền thu được từ phân tích Neighbor – joining chia 76 MPL nấm thành 3 nhóm chính trùng khớp hoàn toàn với sự khác biệt giữa các SNPs đã được phát hiện. Đột biến tại vị trí 474 là phát hiện mới, lần đầu tiên được tìm thấy trên các mẫu nấm *C. cassicola* ở Việt Nam.





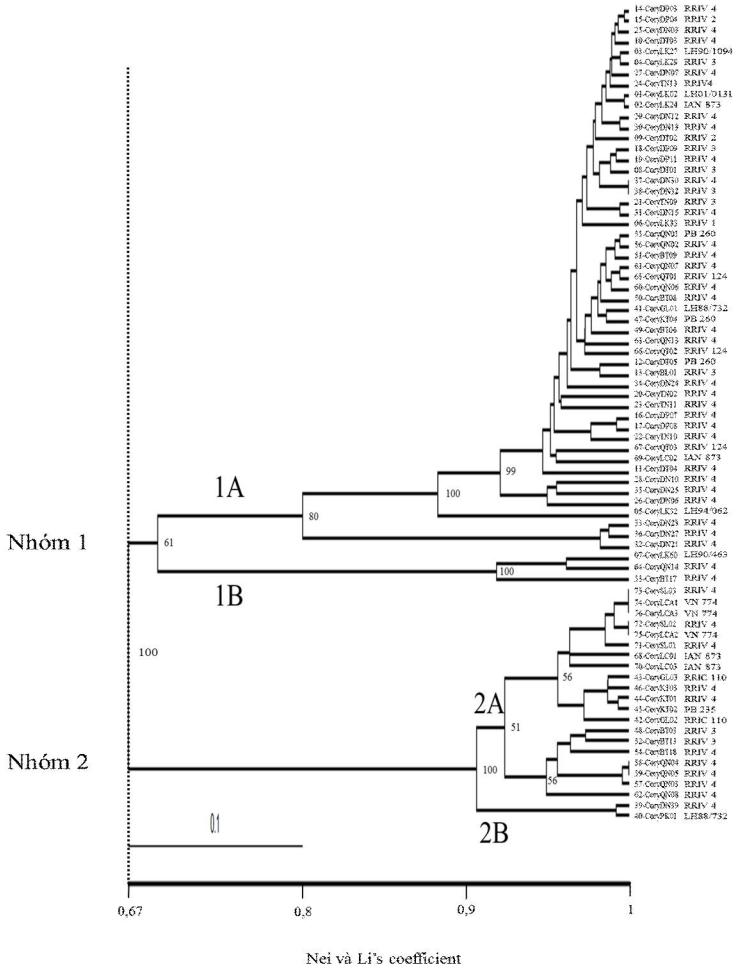
**Hình 3.3.** Sự khác biệt nucleotide ở vị trí 135 trong vùng ITS1 và vị trí 474 trong vùng ITS2 của 76 MPL nấm *C. cassiicola*.



**Hình 3.4.** Cây phân nhóm di truyền thu được từ phân tích Neighbor – joining dựa trên trình tự vùng rDNA-ITS của 76 MPL nấm *C. cassiicola*.

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

Tổng số 223 băng DNA được khuếch đại từ 30 cặp primer SRAP, với tỷ lệ đa hình là 93,3%, 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. Giá trị Bootstrap cho nhóm 1 và 2 lần lượt là 61% và 100%, cho thấy sự phân nhóm là đáng tin cậy. Nhóm 1 có 54 MPL được thu thập tại 10/12 tỉnh, được chia thành 2 nhóm phụ (1A và 1B), nhóm phụ 1A gồm 51 MPL, nhóm phụ 1B gồm 3 MPL (CoryLK60, CoryBT17 và CoryQN14). Nhóm 2 có 22 MPL được thu thập tại 8/12 tỉnh, 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 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). Đây là lần đầu tiên chỉ thị SRAP được sử dụng để phân tích sự đa dạng của *C. cassiicola* trên cây cao su.



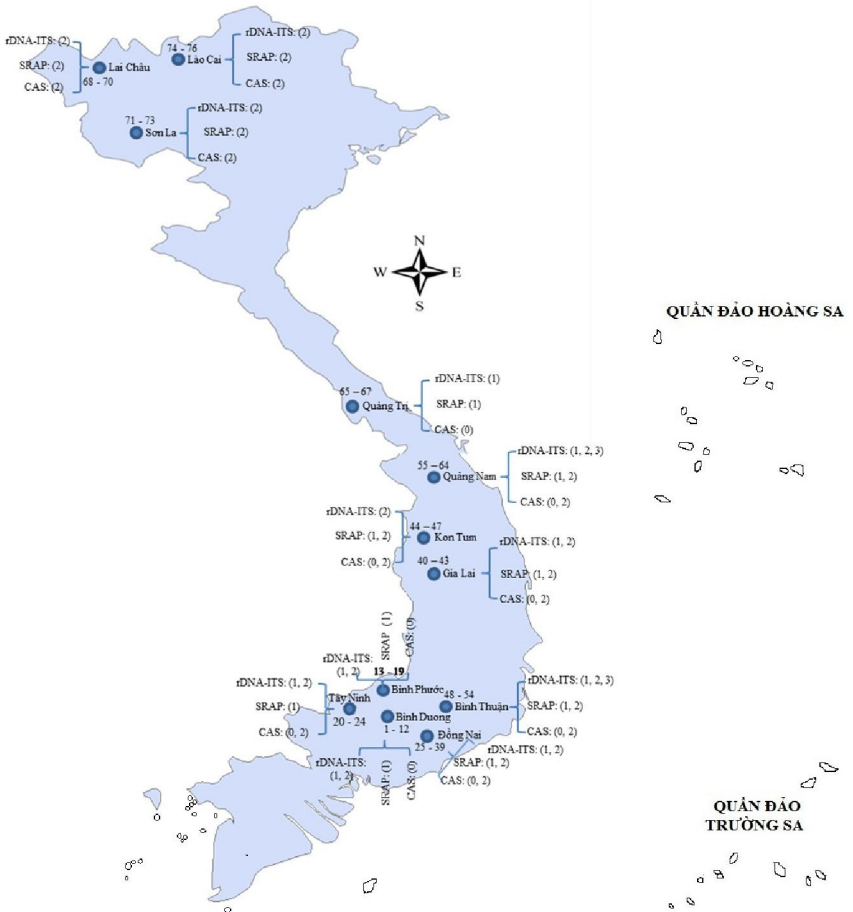
**Hình 3.5.** Cây phân nhóm di truyền thu được từ phân tích UPGMA, sử dụng hệ số tương đồng Nei và Li's dựa trên 223 băng từ 30 cặp primer SRAP, chỉ ra mối quan hệ di truyền của 76 MPL *C. cassicola*.

### 3.3. Xác định sự hiện diện gen *Cas* trên các MPL *C. 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*. Kết quả đã phát hiện 40/76 MPL nấm có sự hiện diện gen *Cas2* (chiếm tỷ lệ 52,6%) và 36 MPL còn lại không phát hiện gen *Cas* được ký hiệu là *Cas0*. Có sự khác biệt khá rõ về kiểu di truyền 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.



**Hình 3.6.** Trình tự nucleotide gen *Cas2* và kết quả so sánh bằng công cụ BLAST. (A) Trình tự gen *Cas2* của MPL CoryDN39; (B) Kết quả so sánh trình tự gen *Cas2* của 4 MPL trên GenBank.



**Hình 3.7.** Lược đồ phân nhóm di truyền nấm *C. cassicola* theo các 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 *C. cassiicola* trên lá DVT cao su RRIV 4 (mẫn cảm bệnh) và PB 260 (chống chịu bệnh)**

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%.

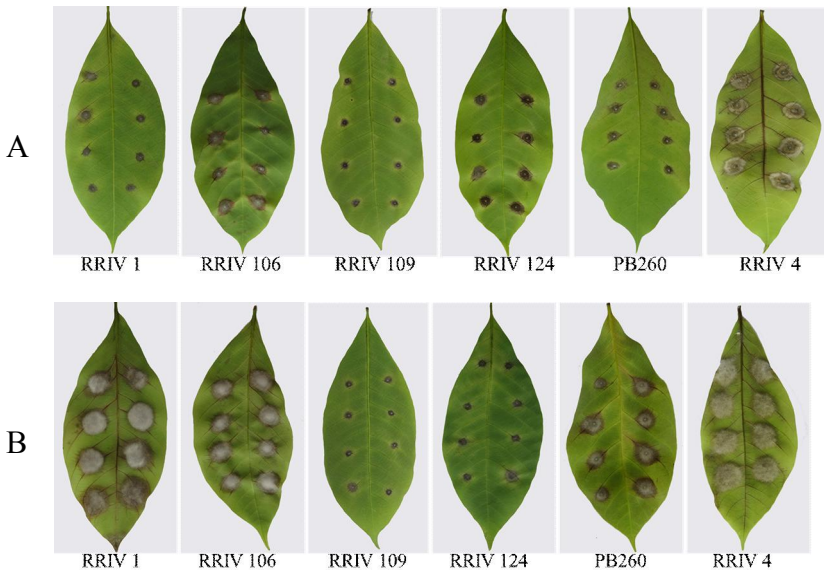
Trên DVT PB 260, mức độ gây bệnh của 76 MPL biến thiên từ mức nhẹ cho đến nặng với CSB 12,7% – 74,3%. Trong đó nhóm gây bệnh nặng gồm 35 MPL với CSB từ 50,7% đến 74,3%, nhóm gây bệnh trung bình gồm 30 MPL với CSB 26,7% – 49,7%, nhóm gây bệnh nhẹ gồm 11 MPL với CSB 12,5% – 24,7%.

Nhìn chung, mức độ gây bệnh của 76 MPL nắm trên DVT RRIV 4 nặng hơn rõ rệt so với DVT PB 260. Có sự khác biệt rất rõ về mức độ gây bệnh của những MPL nắm thuộc cùng một nhóm di truyền hay vùng địa lý đối với mỗi DVT cao su. Trong số 36 MPL không phát hiện gen *Cas* (*Cas0*), có nhiều MPL gây bệnh nặng trên cả 2 DVT RRIV 4 và PB 260. Có thể còn tồn tại những gen *Cas* khác chưa được biết đến và/hoặc cassiicolin không phải là tác nhân duy nhất tác động mang tính quyết định với mức độ gây bệnh của MPL nắm *C. cassiicola*.

### **3.5. Đánh giá tính gây bệnh của 6 MPL *C. cassiicola* đại diện cho các phân nhóm di truyền và vùng địa lý khác nhau trên 12 DVT cao su bằng phương pháp lây bệnh nhân tạo trên lá cắt rời**

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 nấm 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 nấm (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 3.1).



**Hình 3.8.** Mức độ xâm nhiễm, gây bệnh của MPL CoryDN39 (A) và CorySL02 (B) trên lá của một số DVT cao su. Ghi chú bên dưới mỗi lá là tên DVT cao su.

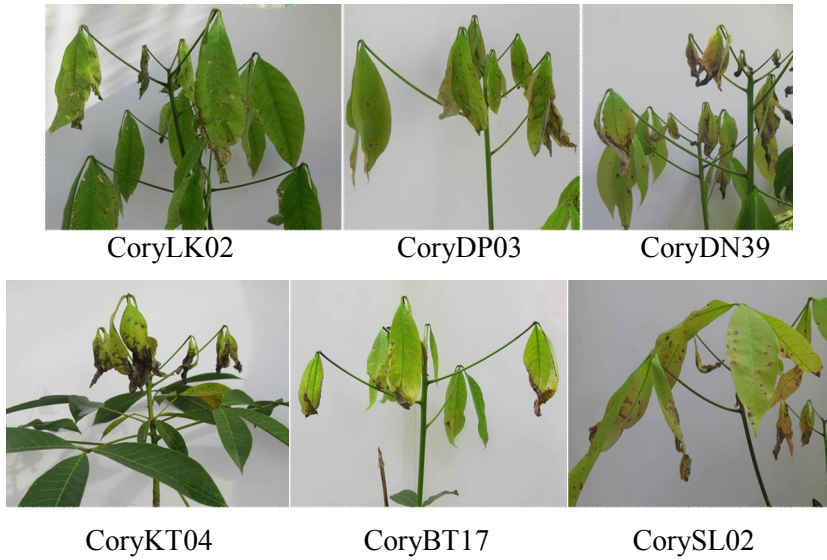


### **3.6. Đánh giá tính gây bệnh của 6 MPL *C. cassiicola* đại diện cho các phân nhóm di truyền và vùng địa lý khác nhau trên 12 DVT cao su bằng phương pháp lây bệnh nhân tạo trong nhà lưới**

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 06 MPL nấm với CSB biến thiên từ 6,4% đến 95,4%. DVT RRIV 4 nhiễm bệnh ở mức rất nặng với tất cả 06 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 3.2).

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. cassiicola* là 100%.



**Hình 3.9.** Mức độ gây bệnh của 6 MPL nấm trên DVT cao su RRIV 4 ở thời điểm 10 ngày sau lây bệnh

**Bảng 3.1.** Mức độ gây bệnh của 6 MPL nằm trên lá cắt rời của 12 DVT cao su ở thời điểm 7 NSC

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.

**Bảng 3.2.** Mức độ gây bệnh của 6 MPL nấm trên 12 DVT cao su trong nhà lưới 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.

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, kể 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.

Xét theo mức độ miễn cảm của DVT cao su thì RRIV 4 là miễn cảm nhất (nhiễm bệnh ở mức rất nặng với 06 MPL nấm trong cả hai điều kiện thí nghiệm), kể 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.

## 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 khác nhau; Nghiên cứu nhận diện gen *Cas* xác định có hai nhóm nấm, một nhóm mang gen *Cas2* và một nhóm không mang gen *Cas*.

- 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>.