

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO  
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM TP. HCM

PHAN THỊ THU HIỀN

**NGHIÊN CỨU NẤM *Alternaria* spp. GÂY BỆNH ĐÓM NÂU  
TRÊN CHANH DÂY (*Passiflora edulis*)**

Chuyên ngành: Bảo vệ thực vật

Mã số: 9.62.01.12

LUẬN ÁN TIẾN SĨ NÔNG NGHIỆP

**TP. HCM – Năm 2021**

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO  
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM TP.HCM

PHAN THỊ THU HIỀN

**NGHIÊN CỨU NẤM *Alternaria* spp. GÂY BỆNH ĐÓM NÂU  
TRÊN CHANH DÂY (*Passiflora edulis*)**

Chuyên ngành: Bảo vệ thực vật

Mã số: 9.62.01.12

LUẬN ÁN TIẾN SĨ NÔNG NGHIỆP

Người hướng dẫn khoa học: PGS. TS. Lê Đình Đôn

**TP. HCM – Năm 2021**

## LỜI CẢM ƠN

Trong quá trình thực hiện đề tài “Nghiên cứu nấm *Alternaria* spp. gây bệnh đốm nâu trên chanh dây (*Passiflora edulis*)”, Tôi đã nhận được rất nhiều sự giúp đỡ, tạo điều kiện của nhiều cá nhân, tổ chức để hoàn thành luận án này. Tôi xin bày tỏ lòng cảm ơn chân thành về sự giúp đỡ đó:

- PGS. TS. Lê Đình Đôn, Viện trưởng Viện Nghiên cứu Công nghệ sinh học và môi trường Trường Đại học Nông Lâm thành phố Hồ Chí Minh (ĐHNL. TP. HCM), là người Thầy đã trực tiếp và tận tình hướng dẫn xây dựng nội dung, phương pháp, lý luận khoa học và đúc kết kết quả của luận án. Thầy đã luôn luôn động viên khích lệ, dành nhiều thời gian trao đổi và định hướng cho tôi trong quá trình thực hiện luận án.

- Ban giám hiệu trường ĐHNL. TP. HCM đã tạo điều kiện thuận lợi cho tôi trong quá trình triển khai thực hiện đề tài cũng như bảo vệ luận án.

- Lãnh đạo Cục Bảo vệ thực vật đã hỗ trợ kinh phí và tạo điều kiện tốt nhất cho tôi hoàn thành luận án.

- TS. Bùi Ngọc Hùng và tập thể cán bộ Phòng Đào tạo sau đại học trường ĐHNL. TP. HCM đã nhiệt tình giúp đỡ và tạo điều kiện thuận lợi nhất để tôi hoàn tất luận án.

- Ban chủ nhiệm Khoa Nông học, bộ môn Bảo vệ thực vật trường ĐHNL. TP. HCM đã tạo mọi điều kiện thuận lợi cho tôi nghiên cứu và thực hiện đề tài.

- Lãnh đạo Viện Nghiên cứu Công nghệ sinh học và môi trường Trường Đại học Nông ĐHNL. TP. HCM, đặc biệt là ThS. Phùng Võ Cẩm Hồng - Phó Viện trưởng đã tạo điều kiện và giúp đỡ tôi hoàn thành thí nghiệm liên quan đến luận án.

- Lãnh đạo Trung tâm Kiểm định và Khảo nghiệm thuốc Bảo vệ thực vật phía Nam, đặc biệt là ThS. Lê Phạm Đoàn Trang đã tạo điều kiện và giúp đỡ tôi hoàn thành thí nghiệm liên quan đến luận án.

- Các em sinh viên Khoa Nông học và Bộ môn Công nghệ sinh học trường ĐHNL. TP. HCM đã cộng tác triển khai và thu thập kết quả thí nghiệm.

- Tôi xin chân thành cảm ơn bạn bè, đồng nghiệp của Tôi đang công tác tại Trung tâm Kiểm dịch thực vật sau nhập khẩu II, Chi Cục Kiểm dịch thực vật vùng II và gia đình đã động viên, khích lệ, tạo điều kiện và giúp đỡ Tôi trong suốt quá trình thực hiện và hoàn thành luận án này.

- Cảm ơn anh Huỳnh Tiến Cảnh (là chồng của tôi) đã luôn động viên, khích lệ và giúp đỡ tôi rất nhiều cả về vật chất lẫn tinh thần để tôi hoàn thành luận án này.

- Cảm ơn TS. Nguyễn Vũ Phong, ThS. Đặng Nguyên Lưu Vi Vy, ThS. Đinh Thị Ánh Tuyết, ThS. Nguyễn Thị Huyền đã hỗ trợ tôi trong suốt thời gian thực hiện luận án.

Tác giả luận án

Phan Thị Thu Hiền

## **LỜI CAM ĐOAN**

Tôi cam đoan đây là công trình nghiên cứu của tôi.

Các số liệu, kết quả nêu trong luận án là trung thực và chưa từng được ai công bố trong bất kỳ công trình nào khác.

Tác giả luận án

Phan Thị Thu Hiền

## TÓM TẮT

*Alternaria* là một chi nấm đa ký chủ, gây hại khá nghiêm trọng cho nhiều loại cây trồng có giá trị kinh tế. Ở Việt Nam, các nghiên cứu về phân loại, mô tả đặc điểm sinh học, tính độc và di truyền của *Alternaria* chưa được nghiên cứu một cách hệ thống. Chanh dây (*Passiflora edulis*) là một loại cây trồng được du nhập vào Việt Nam từ năm 1998 và hiện nay đã hình thành những vùng chanh dây rộng lớn tập trung ở các tỉnh Lâm Đồng, Đắk Nông, Đắk Lắk, Gia Lai, Kon Tum, Sơn La, Nghệ An, Cao Bằng. Sự gia tăng diện tích trồng chanh dây đã làm gia tăng sâu bệnh hại trên chanh dây. Năm 2011 đã ghi nhận có một loại bệnh đốm nâu trên lá, quả chanh dây do *Alternaria* spp. gây ra. Bệnh có tần suất xuất hiện nhiều nhưng chưa được mô tả và nghiên cứu một cách bài bản. Do đó, nghiên cứu về bệnh đốm nâu do *Alternaria* gây hại trên chanh dây hết sức cần thiết và rất có ý nghĩa; Để từ đó đề xuất các biện pháp phòng trừ hiệu quả an toàn sinh học nhằm đảm bảo năng suất và chất lượng chanh dây hàng hóa phục vụ tiêu thụ nội địa và xuất khẩu.

Chín mươi bảy mẫu phân lập nấm có các đặc điểm hình thái của *Alternaria* đã được phân lập từ lá và quả chanh dây trồng ở Đắk Nông, Lâm Đồng và cây giống nhập khẩu từ Đài Loan. Trong số này, 61 mẫu phân lập được nhận dạng là loài *Alternaria passiflorae*, 35 mẫu là *Alternaria tenuissima* và 1 mẫu được thu thập từ vùng trồng chanh dây ở Đài Loan cũng được định danh là *A. tenuissima*. Phân tích trình tự vùng gen rDNA-ITS, actin và glyceraldehyde – 3 – phosphate dehydrogenase của 15 mẫu phân lập loài *A. passiflorae* và 8 mẫu thuộc loài *A. tenuissima* với hệ số bootstrap 1.000 lần lặp lại, đã chứng minh có sự tồn tại quần thể *A. passiflorae*, *A. tenuissima* và khác biệt được tìm thấy rất đáng tin cậy khi dựa vào vùng rDNA-ITS, actin và glyceraldehyde – 3 – phosphate dehydrogenase. Trong đó, *A. passiflorae* phân lập từ Lâm Đồng và Đắk Nông gần gũi về mặt di truyền, trong khi các mẫu phân lập *A. tenuissima* có tỷ lệ tương đồng cao từ 98,7 – 99,4%.

Nhiệt độ thích hợp cho sự phát triển của hai loài *A. tenuissima* và *A. passiflorae* là 25 – 30°C; Bào tử nấm có khả năng sống sót ở ngưỡng nhiệt độ 45 –

48°C (*A. tenuissima*) và ở 45 – 50°C (*A. passiflorae*), *A. tenuissima* có khả năng kháng nhiệt kém hơn *A. passiflorae*. Môi trường PCA là môi trường thích hợp cho sự sinh trưởng của *A. tenuissima* và *A. passiflorae*. Ánh sáng và pH ít ảnh hưởng đến sự sinh trưởng của *A. tenuissima* và *A. passiflorae*.

Các mẫu phân lập *A. tenuissima*, *A. passiflorae* đều gây bệnh trên lá và trên quả giống Đài Nông 1 khi chủng bệnh nhân tạo với nồng độ  $10^7$  bào tử/ml, vết thương giúp *A. tenuissima*, *A. passiflorae* xâm nhiễm dễ dàng hơn và gây ra vết bệnh có kích thước lớn hơn so với khi chủng bệnh không gây vết thương.

Khảo sát cỏ dại trong vườn chanh dây, thu thập mẫu bệnh và chủng bệnh nhân tạo đã ghi nhận cây cỏ song nha lông (*Bidens pilosa*) có khả năng là nguồn lưu tồn và phát tán nguồn bệnh sơ cấp trong các vườn chanh dây hiện nay.

Tính gây bệnh của *A. passiflorae* và *A. tenuissima* được xác định bằng cách chủng bệnh nhân tạo trên lá của 10 loại cây và trên cây con của 12 loại cây trồng trong điều kiện nhà lưới. Kết quả cho thấy *A. tenuissima* có khả năng gây bệnh trên lá điều (*Anacardium occidentale*), lá bưởi (*Citrus grandis*), lá cao su (*Hevea brasiliensis*), cây bầu (*Lagenaria siceraria*), cây bí đỏ (*Cucurbita maxima*), cây cải ngọt (*Brassica integrifolia*), cây cải bẹ xanh (*Brassica juncea*) và cây cà chua (*Solanum lycopersicum*); không gây bệnh trên lá ca cao (*Theobroma cacao*), lá cà phê (*Coffea canephora*), lá mít (*Artocarpus heterophyllus*), lá nhãn (*Dimocarpus longan*), lá sầu riêng (*Durio zibethinus*), lá vú sữa (*Chrysophyllum cainito*), lá xoài (*Mangifera indica*), cây khổ qua (*Momordica charantia*), cây khoai lang (*Ipomoea batatas*), cây khoai tây (*Solanum tuberosum*), cây ớt (*Capsicum annuum* L.), cây lúa (*Oryza sativa*), cây ngô nếp (*Zea mays* var. *amylacea*), cây ngô thức ăn gia súc (*Zea mays* var. *indentata*). Loài *A. passiflorae* có khả năng gây bệnh trên lá cao su (*Hevea brasiliensis*), lá nhãn (*Dimocarpus longan*), lá sầu riêng (*Durio zibethinus*), cây bầu (*Lagenaria siceraria*), cây bí đỏ (*Cucurbita maxima*), cây khổ qua (*Momordica charantia*), cây cải bẹ xanh (*Brassica juncea*), cây khoai lang (*Ipomoea batatas*), cây ớt (*Capsicum annuum* L.), cây cà chua (*Solanum lycopersicum*); không gây bệnh trên cây cải ngọt (*Brassica integrifolia*), cây khoai tây (*Solanum tuberosum*), cây lúa

(*Oryza sativa*), cây ngô nếp (*Zea mays* var. *amylacea*), cây ngô thức ăn gia súc (*Zea mays* var. *indentata*), lá bưởi (*Citrus grandis* L.), lá điều (*Anacardium occidentale* L.), lá ca cao (*Theobroma cacao*), lá cà phê (*Coffea canephora*), lá mít (*Artocarpus heterophyllus*), lá vú sữa (*Chrysophyllum cainito*) và lá xoài (*Mangifera indica*).

Tìm hiểu về độc tố alternariol (AOH) thông qua việc xác định sự hiện diện của độc tố AOH và xác định bằng phương pháp sắc ký lỏng ghép khối phổ (LC-MS/MS) cho thấy cả hai loài *A. tenuissima* và *A. passiflorae* đều có khả năng sinh ra độc tố AOH. Tuy nhiên, chưa tìm được bằng chứng cho thấy AOH tham gia vào quá trình hình thành vết bệnh trên lá, mặc dù dung dịch nuôi nấm *Alternaria* gây nên hiện tượng rụng lá chanh dây đã được ghi nhận trong nghiên cứu này.

Kết quả nghiên cứu làm cơ sở cho nghiên cứu phòng trừ bệnh đốm nâu và đặc biệt định hướng cho việc tầm soát nguồn bệnh trên cây giống chanh dây nhập khẩu.

## SUMMARY

### STUDIES ON *ALTERNARIA* SPECIES CAUSING BROWN SPOT DISEASE OF PASSIONFRUIT (*Passiflora edulis*)

*Alternaria* is a genus with wide hosts range, causing serious harm to many crops. In Vietnam, *Alternaria* has not been systematically studied on classification and description of biological characteristics, toxicity and population genetics. Passion fruit (*Passiflora edulis*) is a crop introduced in Vietnam since 1998 and now has formed large areas of passion fruit concentrated in the provinces of Lam Dong, Dak Nong, Dak Lak, Gia Lai, Kon Tum, Son La, Nghe An, Cao Bang.

The development in cultivated area has increased pests and diseases on passion fruit. In 2011, there was appearance brown spot disease on leaves, of passion fruit, caused by *Alternaria* spp. The disease has had a high frequency but has not been described and studied methodically. Therefore, the research on brown spot disease caused by *Alternaria* on passion fruit is very necessary and meaningful; From there, proposing effective control measures, biosafety to ensure productivity and quality of passion fruit goods for domestic consumption and export.

Ninety-seven *Alternaria* isolates were obtained from leaves and passion fruit grown in Dak Nong, Lam Dong and seedlings imported from Taiwan. Among them, 61 isolates were identified as *Alternaria passiflorae*, 35 isolates were *Alternaria tenuissima* and 1 isolate collected from passion fruit growing areas in Taiwan was also identified as *A. tenuissima*. Sequence analysis of the rDNA-ITS, actin and glyceraldehyde - 3 - phosphate dehydrogenase regions of 15 isolates of *A. passiflorae*, and 8 isolates of *A. tenuissima* with a bootstrap coefficient of 1,000 replicates, were demonstrated the presence of populations of *A. passiflorae*, and *A. tenuissima* in the passion fields and the difference of them was found very reliably. Of which, *A. passiflorae* isolates from Lam Dong and Dak Nong were genetically close, while *A. tenuissima* isolates were a high similarity rate of 98.7 - 99.4%.



The favorite temperature for *A. tenuissima* and *A. passiflorae* isolates on artificial nutrients is recorded as 25 – 30°C; meanwhile spores is recorded to survive at a temperature of 45 - 48°C (*A. tenuissima*) and at 45 - 50°C (*A. passiflorae*), suggesting that *A. tenuissima* species has less heat resistance than *A. passiflorae* species. The *A. tenuissima* and *A. passiflorae* species were less affected by light and pH during the course of study.

Isolates of *A. tenuissima* and *A. passiflorae* caused the disease symptoms on leaves and on fruits of Dai Nong 1 seedling when inoculating with the concentration  $10^7$  spores/ml. The isolates of *A. tenuissima* and also isolates of *A. passiflorae* infected easily and created a larger lesion when inoculation by wound technique as compared to the non-wound one.

By field surveys, diseased sample collection and artificial inoculation, results indicated that the beggarticks (*Bidens pilosa*) was a source of persistence and spread of disease in orchards.

The pathogenicity of *A. passiflorae* and *A. tenuissima* was determined by the spores inoculation on cut leaves of 10 differential crop plants and on seedlings of 12 plants grown under a greenhouse condition. The results showed that isolates of *A. tenuissima* caused the disease symptoms on cashew leaves (*Anacardium occidentale*), pomelo leaf (*Citrus grandis*), rubber leaf (*Hevea brasiliensis*), gourd plant (*Lagenaria siceraria*), pumpkin plant (*Cucurbita maxima*), choy sum (*Brassica integrifolia*), leaf mustard (*Brassica juncea*) and tomato plants (*Solanum lycopersicum*); Non-pathogenic on cocoa leaves (*Theobroma cocoa*), coffee leaves (*Coffea canephora*), jackfruit leaves (*Artocarpus heterophyllus*), longan leaves (*Dimocarpus longan*), durian leaves (*Durio zibethinus*), star apple leaves (*Chrysophyllum cainito*), mango leaves (*Mangifera indica*) and the non - disease symptoms in bitter melon plant (*Momordica charantia*), sweet potato plant (*Ipomoea batatas*), potato plant (*Solanum tuberosum*), chili plant (*Capsicum annuum* L.), rice plant (*Oryza sativa*), glutinous maize plant (*Zea mays* var. *amylacea*), forage maize plant (*Zea mays* var. *indentata*). The isolates of *A. passiflorae* produced the typical

symptoms on rubber leaf (*Hevea brasiliensis*), longan leaf (*Dimocarpus longan*), durian leaf (*Durio zibethinus*), gourd plant (*Lagenaria siceraria*), pumpkin plant (*Cucurbita maxima*), bitter melon plant (*Momordica charantia*), leaf mustard (*Brassica juncea*), sweet potato plants (*Ipomoea batatas*), chili plants (*Capsicum annuum* L.), tomato plants (*Solanum lycopersicum*); but did not on choy sum (*Brassica integrifolia*), potato plant (*Solanum tuberosum*), rice plant (*Oryza sativa*), glutinous maize (*Zea mays* var. *amylacea*), forage maize (*Zea mays* var. *indentata*), pomelo leaf (*Citrus grandis* L.), cashew leaf (*Anacardium occidentale* L.), cocoa leaf (*Theobroma cocoa*), coffee leaf (*Coffea canephora*), jackfruit leaf (*Artocarpus heterophyllus*), star apple leaf (*Chrysophyllum cainito*) and mango leaf (*Mangifera indica*).

The study of alternariol toxin (AOH) through the determination of the presence of AOH toxin by Liquid chromatography tandem-mass spectrometry (LC-MS/MS) was showed that a few isolates of both *A. tenuissima* and *A. passiflorae* produced AOH toxin. However, there was no evidence that AOH involved in information of leaf lesions formation, although isolate culture solution causing passion defoliation was noted in this study.

The research results could be used as the basis for research on brown spot disease prevention and oriented the screening of pathogens on imported passion fruit seedlings, especially.

# MỤC LỤC

	<b>Trang</b>
Trang phụ bìa	
Lời cảm ơn .....	i
Lời cam đoan.....	ii
Tóm tắt .....	iii
Summary .....	vi
Mục lục.....	ix
Danh mục các ký hiệu, các chữ viết tắt.....	xv
Danh mục các bảng .....	xvii
Danh mục các hình vẽ, đồ thị.....	xxi
<b>MỞ ĐẦU .....</b>	<b>1</b>
<b>CHƯƠNG 1 TỔNG QUAN.....</b>	<b>4</b>
1.1. Giới thiệu sơ lược về cây chanh dây.....	4
1.1.1. Nguồn gốc .....	4
1.1.2. Vị trí phân loại .....	4
1.1.3. Đặc điểm thực vật học.....	5
1.1.4. Điều kiện sinh thái .....	5
1.1.5. Tình hình sản xuất của cây chanh dây trên thế giới và ở Việt Nam .....	6
1.1.5.1. Trên thế giới .....	6
1.1.5.2. Ở Việt Nam .....	8
1.1.6. Giá trị dinh dưỡng và lợi ích của chanh dây .....	9
1.2. Tình hình bệnh hại trên cây chanh dây .....	10
1.2.1. Bệnh do tuyến trùng .....	12
1.2.2. Bệnh do vi khuẩn .....	12
1.2.3. Bệnh do nấm .....	12
1.2.4. Bệnh do virus .....	13
1.3. Tổng quan về nấm <i>Alternaria</i> .....	14

1.3.1. Triệu chứng gây hại và sự phân bố của nấm <i>Alternaria</i> gây bệnh đốm nâu trên cây chanh dây.....	14
1.3.2. Đặc điểm hình thái học và đặc điểm phát sinh phát triển của <i>Alternaria</i> .....	14
1.3.2.1. Vị trí phân loại và đặc điểm hình thái học.....	14
1.3.2.2. Chu kỳ bệnh và đặc điểm phát sinh phát triển của <i>Alternaria</i> .....	16
1.3.3. Các độc tố sinh ra từ <i>Alternaria</i> .....	17
1.3.3.1. Đặc tính lý học, hóa học của các độc tố sinh ra từ <i>Alternaria</i> .....	17
1.3.3.2. Tác động của độc tố sinh ra từ <i>Alternaria</i> .....	18
1.4. Một số kết quả nghiên cứu về di truyền và định danh <i>Alternaria</i> .....	20
1.5. Độc tố của nấm <i>Alternaria</i> và mối liên quan đến mức độ bệnh do <i>Alternaria</i> gây ra trên cây trồng.....	25
1.6. Các kết quả nghiên cứu về độc tố của nấm <i>Alternaria</i> .....	27
<b>CHƯƠNG 2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....</b>	<b>29</b>
2.1. Nội dung nghiên cứu.....	29
2.2. Thời gian và địa điểm nghiên cứu.....	29
2.2.1. Thời gian nghiên cứu.....	29
2.2.2. Địa điểm nghiên cứu.....	29
2.3. Dụng cụ, thiết bị phục vụ nghiên cứu.....	30
2.4. Đối tượng, khách thể và giới hạn nghiên cứu.....	30
2.5. Phương pháp nghiên cứu.....	31
2.5.1. Phương pháp thu thập mẫu bệnh và bảo quản mẫu.....	31
2.5.2. Phương pháp phân lập tác nhân gây bệnh.....	31
2.5.3. Phương pháp thu đơn bào tử.....	31
2.5.4. Phương pháp xác định tên loài của các MPL <i>Alternaria</i> spp. dựa vào các đặc điểm hình thái.....	31
2.5.4.1. Phương pháp đo kích thước bào tử.....	31
2.5.4.2. Phương pháp nuôi ủ nấm trên lam.....	33
2.5.4.3. Mô tả và định danh các loài của <i>Alternaria</i> dựa vào các đặc điểm hình thái.....	33

2.5.5. Xác định tên loài của các MPL <i>Alternaria</i> spp. dựa vào trình tự vùng rDNA-ITS, actin và glyceraldehyde – 3 – phosphate dehydrogenase .....	34
2.5.5.1. Phương pháp ly trích DNA tổng số.....	34
2.5.5.2. Phương pháp khuếch đại vùng rDNA-ITS, actin và glyceraldehyde – 3 – phosphate dehydrogenase.....	34
2.6. Khảo sát một số đặc tính sinh học của các MPL <i>Alternaria</i> spp.....	35
2.6.1. Khả năng sinh trưởng của <i>Alternaria</i> spp. trên một số môi trường dinh dưỡng khác nhau .....	35
2.6.2. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến khả năng sinh trưởng của <i>Alternaria</i> spp.....	36
2.6.2.1. Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ đến khả năng sinh trưởng của <i>Alternaria</i> .....	36
2.6.2.2. Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ đến khả năng sống sót của bào tử nấm <i>Alternaria</i> .....	36
2.6.3. Ảnh hưởng của thời gian chiếu sáng đến khả năng sinh trưởng của <i>Alternaria</i> spp.....	37
2.6.4. Ảnh hưởng của pH đến khả năng sinh trưởng của <i>Alternaria</i> spp.....	37
2.7. Xác định khả năng gây bệnh của các MPL <i>Alternaria</i> spp. trên lá, quả chanh dây và xác định cây trồng nhiễm <i>Alternaria</i> trong vườn chanh dây bị bệnh đốm nâu.....	37
2.7.1. Xác định khả năng gây bệnh của các MPL <i>Alternaria</i> spp. trên lá và quả chanh dây.....	37
2.7.2. Xác định cỏ dại, cây trồng nhiễm <i>Alternaria</i> trong vườn chanh dây bị bệnh đốm nâu .....	40
2.8. Đánh giá khả năng gây bệnh của các MPL <i>Alternaria</i> spp. trên một số loại cây ký chủ .....	42
2.8.1. Chủng bệnh trong nhà lưới.....	43
2.8.2. Chủng bệnh trong phòng thí nghiệm.....	44

2.9. Xác định sự hiện diện của độc tố alternariol và khảo sát ảnh hưởng của các hợp chất thứ cấp sinh ra từ <i>Alternaria</i> spp. đến khả năng gây bệnh trên lá, ngọn chanh dây.....	45
2.9.1. Thiết bị, dụng cụ, hóa chất ly trích và thực hiện HPLC, LC-MS/MS .....	45
2.9.2. Phương pháp xác định sự hiện diện của độc tố alternariol .....	46
2.9.2.1. Khảo sát thành phần dung môi pha động.....	46
2.9.2.2. Khảo sát môi trường thích hợp có khả năng sinh ra nhiều độc tố .....	47
2.9.2.3. Phương pháp tách chiết mẫu .....	47
2.9.2.4. Thẩm định phương pháp phân tích .....	48
2.9.2.5. Giới hạn phát hiện (LOD) .....	48
2.9.3. Khảo sát ảnh hưởng của các hợp chất thứ cấp sinh ra từ <i>Alternaria</i> spp. và độc tố alternariol đến khả năng gây bệnh trên lá, ngọn chanh dây .....	49
2.9.3.1. Ảnh hưởng của các hợp chất thứ cấp trên ngọn chanh dây Đài Nông 1 .....	49
2.9.3.2. Ảnh hưởng của độc tố alternariol trên lá chanh dây Đài Nông 1 .....	50
2.10. Phương pháp xử lý số liệu.....	52
<b>CHƯƠNG 3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN .....</b>	<b>53</b>
3.1. Xác định tên loài, đặc tính sinh học và hình thái học của các MPL <i>Alternaria</i> spp. ....	53
3.1.1. Phân lập và định danh loài của <i>Alternaria</i> dựa vào đặc điểm hình thái.....	53
3.1.2. Phân tích trình tự vùng rDNA-ITS, actin và glyceraldehyde - 3 - phosphate dehydrogenase.....	67
3.1.2.1. Khuếch đại PCR vùng rDNA-ITS, actin và glyceraldehydes – 3 – phosphate dehydrogenase.....	67
3.1.2.2. So sánh trình tự tương đồng .....	68
3.2. Đặc tính sinh học của các MPL <i>Alternaria</i> .....	86
3.2.1. Đặc điểm của MPL <i>Alternaria</i> spp. trên môi trường dinh dưỡng khác nhau .....	86
3.2.2. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến sinh trưởng và phát triển của <i>Alternaria</i> spp. ....	87
3.2.2.1. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến khả năng sinh trưởng của <i>Alternaria</i> spp. ....	87

3.2.2.2. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến sự sống sót của bào tử <i>Alternaria</i> spp. ....	89
3.2.3. Ảnh hưởng của chiếu sáng đến sinh trưởng của <i>Alternaria</i> spp. ....	91
3.2.4. Ảnh hưởng của pH đến sinh trưởng của <i>Alternaria</i> spp. ....	92
3.3. Tính gây bệnh của MPL <i>Alternaria</i> spp. trên lá và quả chanh dây và xác định cỏ dại, cây trồng nhiễm <i>Alternaria</i> trong vườn chanh dây bị bệnh đốm nâu.....	94
3.3.1. Khả năng gây bệnh của MPL <i>Alternaria</i> spp. trên lá và quả chanh dây .....	94
3.3.1.1. Kết quả chủng bệnh trên lá chanh dây .....	94
3.3.1.2. Khả năng gây bệnh trên trên quả chanh dây .....	102
3.4. Xác định cỏ dại, cây trồng nhiễm <i>Alternaria</i> trong vườn chanh dây bị bệnh đốm nâu .....	106
3.4.1. Xác định tên loài của MPL <i>Alternaria</i> spp. từ cỏ dại .....	108
3.4.2. Khả năng gây bệnh của MPL <i>Alternaria</i> spp. từ cỏ dại đến chanh dây Đài Nông 1 bằng phương pháp chủng bệnh nhân tạo .....	113
3.5. Khả năng gây bệnh của MPL <i>Alternaria</i> spp. trên một số cây trồng phổ biến .....	116
3.5.1. Khả năng gây bệnh của <i>Alternaria passiflorae</i> .....	116
3.5.1.1. Kết quả chủng bệnh trong phòng thí nghiệm .....	116
3.5.1.2. Kết quả chủng bệnh trong điều kiện nhà lưới .....	120
3.5.2. Khả năng gây bệnh của <i>Alternaria tenuissima</i> .....	124
3.5.2.1. Kết quả chủng bệnh trong phòng thí nghiệm .....	124
3.5.2.2. Kết quả chủng bệnh trong điều kiện nhà lưới .....	128
3.6. Xác định sự hiện diện của độc tố alternariol và ảnh hưởng của hợp chất thứ cấp sinh ra từ <i>Alternaria</i> spp. ....	131
3.6.1. Điều kiện xác định sự hiện diện của độc tố alternariol .....	131
3.6.2. Khảo sát ảnh hưởng của các hợp chất thứ cấp và độc tố alternariol sinh ra từ <i>Alternaria</i> spp. ....	135
3.6.2.1. Ảnh hưởng của các hợp chất thứ cấp trên ngọn chanh dây Đài Nông 1 ....	135
3.6.2.2. Ảnh hưởng của độc tố alternariol trên lá chanh dây Đài Nông 1 với điều kiện chủng bệnh trong phòng thí nghiệm.....	138
<b>KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ .....</b>	<b>145</b>

<b>TÀI LIỆU THAM KHẢO .....</b>	<b>147</b>
<b>DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH NGHIÊN CỨU .....</b>	<b>156</b>
<b>CÓ LIÊN QUAN ĐÃ CÔNG BỐ.....</b>	<b>156</b>
<b>PHỤ LỤC</b>	



## DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ VIẾT TẮT

- AAS: Dung dịch môi trường đã nuôi cấy nấm
- AFLP: Amplified Fragment Length Polymorphism
- ALT: Altenuene
- AME: Alternariol Monomethyl Ether
- AOH: Alternariol
- ATX: Alvertoxins
- CDNK: Chanh dây nhập khẩu
- CMA: Cornmeal Agar
- DN: Đắc Nông
- DNA: Deoxynucleotide acide
- ĐPT: Độ phát triển
- ETS: External Transcribed Spacer
- HPLC: High Performance Liquid Chromatography
- HSTs: Host Specific Toxins
- IGS: Intergenic Spacer
- ITS: Internal Transcribed Spacer
- KNS: Khả năng sinh độc tố
- L: Lá
- La: Môi trường lá chanh dây
- LC-MS/MS: Liquid chromatography tandem-mass spectrometry
- LD: Lâm Đồng
- LLL: Lặp lại
- LOD: Giới hạn định tính
- LOQ: Giới hạn định lượng
- M.W.: Molecular Weight
- MeOH: Methanol

MPL: Mẫu phân lập  
MT: Dung dịch môi trường chưa nhân nấm  
NSC: Ngày sau chủng  
PCA: Potato Carot Agar  
PCR: Polymerase Chain Reaction  
PD: Môi trường khoai tây và đường Dextrose  
PG: Môi trường khoai tây và đường Glucose  
PGA: Potato Glucose Agar  
RAPD: Random Amplified Polymorphic DNA  
rDNA: Ribosomal deoxynucleotide acide  
RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism  
SD: Standard Deviation  
SS: Dung dịch bào tử *Alternaria*  
T: Quả  
TeA: Tenuazonic acid  
TLB: Tỷ lệ bệnh  
WA: Water Agar

## DANH MỤC CÁC BẢNG

<b>Bảng 1.1.</b> Giá trị dinh dưỡng của quả chanh dây màu tím trong 100 g thịt quả .....	9
<b>Bảng 1.2.</b> Các độc tố quan trọng do các loài <i>Alternaria</i> sinh ra.....	19
<b>Bảng 2.1.</b> Danh sách các loại cỏ dại, cây trồng xen thu thập trong vườn chanh dây.....	41
<b>Bảng 2.2.</b> Danh sách các loại cây trồng được sử dụng trong thí nghiệm xác định cây ký chủ của <i>Alternaria</i> spp. ....	42
<b>Bảng 2.3.</b> Nguồn nấm <i>Alternaria</i> spp. được sử dụng trong nghiên cứu xác định sự hiện diện của độc tố alternariol .....	46
<b>Bảng 2.4.</b> Các MPL <i>Alternaria</i> spp. được sử dụng trong thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của các hợp chất thứ cấp sinh ra từ <i>Alternaria</i> spp. trên ngọn chanh dây Đài Nông 1 .....	50
<b>Bảng 2.5.</b> Các MPL <i>Alternaria</i> spp. được sử dụng trong thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của độc tố alternariol trên lá chanh dây Đài Nông 1 .....	50
<b>Bảng 3.1.</b> Số lượng mẫu <i>Alternaria</i> phân lập được từ các vùng trồng khác nhau ...	54
<b>Bảng 3.2.</b> Kích thước trung bình bào tử, cánh bào tử của các MPL <i>Alternaria passiflorae</i> và <i>Alternaria tenuissima</i> .....	59
<b>Bảng 3.3.</b> Đặc điểm hình thái của <i>Alternaria</i> spp. gây bệnh đốm nâu trên chanh dây và 2 loài <i>Alternaria</i> theo mô tả trong khóa định danh của Simmons năm 2007 .....	60
<b>Bảng 3.4.</b> Số lượng vị trí đa hình của các mẫu phân lập tương ứng trên từng vùng gen.....	68
<b>Bảng 3.5.</b> Số vị trí đa hình trên từng vùng gen của 23 mẫu phân lập <i>Alternaria</i> sp. ....	69
<b>Bảng 3.6.</b> Vị trí đa hình tương ứng trên vùng rDNA-ITS .....	72
<b>Bảng 3.7.</b> Vị trí đa hình tương ứng trên vùng ACT.....	74
<b>Bảng 3.8.</b> Vị trí đa hình tương ứng trên vùng GPDH.....	75

<b>Bảng 3.9.</b> Độ tương đồng kiểu gen giữa các mẫu phân lập (%) trên vùng rDNA-ITS .....	77
<b>Bảng 3.10.</b> Độ tương đồng kiểu gen (%) giữa các mẫu phân lập trên vùng ACT....	79
<b>Bảng 3.11.</b> Độ tương đồng kiểu gen giữa các mẫu phân lập (%) trên vùng GPDH .....	80
<b>Bảng 3.12.</b> Độ tương đồng kiểu gen giữa các mẫu phân lập (%) trên ba vùng rDNA-ITS, ACT, GPDH .....	83
<b>Bảng 3.13.</b> Mã số trên ngân hàng gen (GenBank accession number) của 23 MPL <i>Alternaria</i> trên vùng rDNA - ITS, ACT và GPDH đã được xác định trong nghiên cứu .....	85
<b>Bảng 3.14.</b> Đường kính trung bình tản nấm (cm) của <i>A. passiflorae</i> và <i>A. tenuissima</i> trên môi trường V – 8 juice, Modified - CMA, PCA sau 10 ngày nuôi cấy .....	86
<b>Bảng 3.15.</b> Đường kính trung bình tản nấm (cm) của <i>A. passiflorae</i> và <i>A. tenuissima</i> ở các mức nhiệt độ sau 10 ngày nuôi cấy trên môi trường PCA.....	88
<b>Bảng 3.16.</b> Khả năng sống sót của bào tử nấm <i>A. passiflorae</i> và <i>A. tenuissima</i> trên môi trường PCA sau 5 ngày nuôi ủ ở các mức nhiệt độ .....	90
<b>Bảng 3.17.</b> Đường kính trung bình tản nấm (cm) của <i>A. passiflorae</i> và <i>A. tenuissima</i> ở các điều kiện chiếu sáng sau 10 ngày nuôi cấy trên môi trường PCA.....	91
<b>Bảng 3.18.</b> Đường kính trung bình tản nấm (cm) của <i>A. passiflorae</i> và <i>A. tenuissima</i> ở các mức pH sau 10 ngày nuôi cấy trên môi trường PCA...	93
<b>Bảng 3.19.</b> Các đặc tính sinh học của <i>A. tenuissima</i> và <i>A. passiflorae</i> .....	94
<b>Bảng 3.20.</b> Đường kính trung bình vết bệnh (mm) trên lá chanh dây Đài Nông 1 sau khi chủng các MPL <i>A. passiflorae</i> .....	95
<b>Bảng 3.21.</b> Đường kính trung bình vết bệnh (mm) trên lá chanh dây Đài Nông 1 sau khi chủng các MPL <i>A. tenuissima</i> .....	97

<b>Bảng 3.22.</b> Đường kính trung bình vết bệnh (mm) trên lá chanh dây gốc ghép sau khi chủng các MPL <i>A. tenuissima</i> .....	98
<b>Bảng 3.23.</b> Đường kính trung bình vết bệnh (mm) trên quả chanh dây Đài Nông 1 sau khi chủng các MPL <i>A. passiflorae</i> .....	102
<b>Bảng 3.24.</b> Đường kính trung bình vết bệnh (mm) trên quả chanh dây Đài Nông 1 sau khi chủng các MPL <i>A. tenuissima</i> .....	104
<b>Bảng 3.25.</b> Danh sách <i>Alternaria</i> spp. phân lập được từ cây cỏ dại trong vườn chanh dây tại Lâm Đồng và Đắk Nông .....	107
<b>Bảng 3.26.</b> Kích thước bào tử, cành bào tử của các MPL <i>Alternaria passiflorae</i> được phân lập từ các cây cỏ trong vườn chanh dây tại Đắk Nông và Lâm Đồng .....	109
<b>Bảng 3.27.</b> Đặc điểm hình thái của <i>Alternaria passiflorae</i> gây bệnh đốm lá trên cây cỏ dại mô tả dựa theo khóa định danh của Simmons năm 2007 .....	110
<b>Bảng 3.28.</b> Đường kính trung bình vết bệnh (mm) trên lá chanh dây Đài Nông 1 sau khi chủng các MPL <i>Alternaria</i> spp. phân lập trên cỏ. ....	113
<b>Bảng 3.29.</b> Thời gian ủ bệnh sau khi chủng <i>Alternaria passiflorae</i> trên lá cây công nghiệp và cây ăn quả.....	117
<b>Bảng 3.30.</b> Đường kính trung bình vết bệnh (mm) do <i>Alternaria passiflorae</i> gây ra trên lá cây công nghiệp và cây ăn quả sau các ngày chủng bệnh trong điều kiện phòng thí nghiệm.....	119
<b>Bảng 3.31.</b> Thời gian ủ bệnh sau khi chủng <i>Alternaria passiflorae</i> trên các loại cây trồng khác nhau.....	121
<b>Bảng 3.32.</b> Tỷ lệ lá bệnh (%) do <i>Alternaria passiflorae</i> gây ra trên các loại cây trồng sau chủng bệnh trong điều kiện nhà lưới .....	123
<b>Bảng 3.33.</b> Cấp bệnh cao nhất do nấm <i>Alternaria passiflorae</i> gây ra trên các loại cây trồng sau chủng bệnh trong điều kiện nhà lưới.....	124
<b>Bảng 3.34.</b> Thời gian ủ bệnh sau khi chủng <i>Alternaria tenuissima</i> trên lá cây công nghiệp và cây ăn quả.....	125

<b>Bảng 3.35.</b> Đường kính trung bình vết bệnh (mm) do <i>Alternaria tenuissima</i> gây ra trên lá cây công nghiệp và cây ăn quả sau các ngày chủng bệnh trong điều kiện phòng thí nghiệm.....	127
<b>Bảng 3.36.</b> Thời gian ủ bệnh sau khi chủng <i>Alternaria tenuissima</i> trên các loại cây trồng khác nhau .....	129
<b>Bảng 3.37.</b> Tỷ lệ lá bệnh (%) do <i>Alternaria tenuissima</i> gây ra trên các loại cây trồng sau chủng bệnh trong điều kiện nhà lưới .....	130
<b>Bảng 3.38.</b> Cấp bệnh cao nhất do nấm <i>Alternaria tenuissima</i> gây ra trên các loại cây trồng sau chủng bệnh trong điều kiện nhà lưới.....	131
<b>Bảng 3.39.</b> Kết quả khảo sát môi trường nhân sinh khối nấm <i>Alternaria</i> .....	132
<b>Bảng 3.40.</b> Kết quả phân tích hàm lượng AOH trung bình trên mẫu <i>Alternaria</i> ...	135
<b>Bảng 3.41.</b> Số lá rụng sau khi cắm ngọn chanh dây Đài Nông 1 vào dung dịch môi trường modified Fries No.3 đã nuôi cấy nấm <i>Alternaria</i> spp. ....	138
<b>Bảng 3.42.</b> Ảnh hưởng của hợp chất trong dung dịch nuôi nấm <i>Alternaria</i> trên lá chanh dây Đài Nông 1 sau 7 ngày chủng .....	140

## DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ, ĐỒ THỊ

<b>Hình 1.1.</b> Hoa và quả chanh dây.....	4
<b>Hình 1.2.</b> Đặc điểm hình thái <i>Alternaria tenuissima</i> .....	16
<b>Hình 1.3.</b> Đặc điểm hình thái <i>Alternaria passiflorae</i> .....	16
<b>Hình 1.4.</b> Chu kỳ gây bệnh của <i>Alternaria passiflorae</i> trên cây chanh dây.....	17
<b>Hình 2.1.</b> Các bước chủng bệnh trên lá chanh dây.....	39
<b>Hình 2.2.</b> Các bước chủng bệnh trên quả chanh dây.....	40
<b>Hình 2.3.</b> Vị trí chủng trên lá chanh dây Đài Nông 1.....	52
<b>Hình 3.1.</b> Triệu chứng bệnh đốm nâu trên lá chanh dây do <i>Alternaria</i> spp. gây ra.	55
<b>Hình 3.2.</b> Triệu chứng bệnh đốm nâu trên quả chanh dây do <i>Alternaria</i> spp. gây ra. ....	56
<b>Hình 3.3.</b> Triệu chứng bệnh đốm nâu do <i>Alternaria tenuissima</i> gây ra trên lá cây chanh dây giống nhập khẩu. ....	56
<b>Hình 3.4.</b> Hình thái <i>Alternaria tenuissima</i> (mẫu CDNK7.13) dưới kính hiển vi điện tử quét SU3500, thế gia tốc 1 kV, hình ảnh được thu ở đầu dò SE.	62
<b>Hình 3.5.</b> Hình thái <i>Alternaria tenuissima</i> (mẫu CDNK7.13) dưới kính hiển vi điện tử quét SU3500, thế gia tốc 1 kV, hình ảnh được thu ở đầu dò SE.	63
<b>Hình 3.6.</b> Hình thái <i>Alternaria tenuissima</i> (mẫu DN11T-1.16) dưới kính hiển vi điện tử quét SU3500, thế gia tốc 1 kV, hình ảnh được thu ở đầu dò SE.	64
<b>Hình 3.7.</b> Hình thái <i>Alternaria passiflorae</i> (mẫu LD16L-01.14) dưới kính hiển vi điện tử quét SU3500, thế gia tốc 1 kV, hình ảnh được thu ở đầu dò SE.	65
<b>Hình 3.8.</b> Hình thái <i>Alternaria passiflorae</i> (mẫu LD16L-01.14) dưới kính hiển vi điện tử quét SU3500, thế gia tốc 1 kV, hình ảnh được thu ở đầu dò SE.	66
<b>Hình 3.9.</b> Cây tương quan di truyền giữa 23 mẫu phân lập <i>Alternaria</i> được xây dựng dựa trên vùng rDNA-ITS sử dụng phần mềm MEGA X với hệ số bootstrap 1.000 lần lặp lại.....	76
<b>Hình 3.10.</b> Cây tương quan di truyền giữa 23 mẫu phân lập <i>Alternaria</i> được xây dựng dựa trên vùng ACT sử dụng phần mềm MEGA X với hệ số bootstrap 1.000 lần lặp lại.....	78

- Hình 3.11.** Cây tương quan di truyền giữa 23 mẫu phân lập *Alternaria* được xây dựng dựa trên vùng GPDH sử dụng phần mềm MEGA X với hệ số bootstrap 1.000 lần lặp lại..... 81
- Hình 3.12.** Cây tương quan di truyền giữa 23 mẫu phân lập *Alternaria* được xây dựng dựa trên vùng gen kết hợp rDNA-ITS-ACT-GPDH sử dụng phần mềm MEGA X với hệ số bootstrap 1.000 lần lặp lại. .... 82
- Hình 3.13.** Hình thái tản nấm của *Alternaria tenuissima* trên 3 môi trường sau 10 ngày nuôi cấy..... 87
- Hình 3.14.** Hình thái tản nấm *Alternaria passiflorae* ở các mức nhiệt độ trên môi trường PCA sau 10 ngày nuôi ủ ở các mức nhiệt độ khác nhau..... 88
- Hình 3.15.** Hình thái tản nấm *Alternaria tenuissima* (mẫu CDNK1.13) ở các mức nhiệt độ trên môi trường PCA sau 10 ngày nuôi ủ ở các mức nhiệt độ khác nhau. .... 89
- Hình 3.16.** Hình thái tản nấm *A. passiflorae* và *A. tenuissima* ở các điều kiện chiếu sáng trên môi trường PCA sau 10 ngày nuôi ủ. .... 92
- Hình 3.17.** Triệu chứng bệnh trên lá chanh dây Đài Nông 1 do *A. passiflorae* gây ra sau khi chủng bệnh với nồng độ  $10^7$  bào tử/ml sau 7 ngày. .... 100
- Hình 3.18.** Triệu chứng bệnh đốm nâu trên lá chanh dây Đài Nông 1 do *A. tenuissima* gây ra sau khi chủng bệnh với nồng độ  $10^7$  bào tử/ml sau 7 ngày..... 100
- Hình 3.19.** Triệu chứng bệnh đốm nâu trên lá chanh dây gốc ghép do *A. tenuissima* gây ra sau khi chủng bệnh có gây vết thương với nồng độ  $10^7$  bào tử/ml sau 7 ngày. .... 101
- Hình 3.20.** Triệu chứng bệnh trên quả chanh dây Đài Nông 1 do *A. passiflorae* gây ra sau 14 ngày chủng bệnh..... 105
- Hình 3.21.** Triệu chứng bệnh trên quả chanh dây Đài Nông 1 do *A. tenuissima* gây ra sau 14 ngày chủng bệnh..... 105
- Hình 3.22.** Triệu chứng đốm lá do nấm *Alternaria* sp. gây bệnh trên các loại cỏ dại khác nhau trong vườn chanh dây tại Đắk Nông. .... 107



<b>Hình 3.23.</b> Triệu chứng đốm lá lá do nấm <i>Alternaria</i> sp. gây bệnh trên các loại cỏ dại khác nhau trong vườn chanh dây tại Lâm Đồng.....	108
<b>Hình 3.24.</b> Triệu chứng bệnh đốm nâu trên lá chanh dây Đài Nông 1 ở 7 ngày sau khi chủng <i>Alternaria passiflorae</i> (mẫu DN3C-1.18).....	114
<b>Hình 3.25.</b> Triệu chứng bệnh đốm lá cỏ song nha lông sau khi chủng <i>Alternaria</i> <i>passiflorae</i> (mẫu DN3C-1.18).....	114
<b>Hình 3.26.</b> Đặc điểm hình thái <i>Alternaria passiflorae</i> (mẫu DN3C-1.18) dưới kính hiển vi điện tử quét SU3500, thế gia tốc 1 kV, hình ảnh được thu ở đầu dò SE.....	115
<b>Hình 3.27.</b> Triệu chứng bệnh do <i>Alternaria passiflorae</i> (LD4T-3.10) gây ra trên lá các loại cây sau 7 ngày chủng bệnh có gây vết thương.....	118
<b>Hình 3.28.</b> Triệu chứng bệnh do <i>Alternaria passiflorae</i> gây ra trên các loại cây trồng sau 20 ngày chủng bệnh.....	121
<b>Hình 3.29.</b> Triệu chứng bệnh đốm lá do <i>Alternaria passiflorae</i> (Mẫu DN9L- 1.10) gây ra trên cây bầu và cây khổ qua.....	122
<b>Hình 3.30.</b> Triệu chứng bệnh đốm lá do <i>Alternaria passiflorae</i> (Mẫu DN9L- 1.10) gây ra trên cây cà chua và cây ớt.....	122
<b>Hình 3.31.</b> Triệu chứng bệnh do <i>Alternaria tenuissima</i> gây ra trên các loại lá cây bưởi, cây cao su và cây điều sau 10 ngày chủng bệnh.....	126
<b>Hình 3.32.</b> Triệu chứng bệnh đốm lá do <i>Alternaria tenuissima</i> gây ra sau khi chủng bệnh.....	131
<b>Hình 3.33.</b> Sắc ký đồ của chất chuẩn AOH trong pha động MeOH 100%.....	132
<b>Hình 3.34.</b> Sắc ký đồ AOH trên nền mẫu môi trường PD (mẫu LD16L-1.14).....	133
<b>Hình 3.35.</b> Sắc ký đồ AOH trên nền mẫu môi trường PD (mẫu DN8T-4.11).....	133
<b>Hình 3.36.</b> Sắc ký đồ trong thẩm định tính đặc hiệu.....	134
<b>Hình 3.37.</b> Sắc ký đồ mẫu chuẩn tại nồng độ 0,1 µg/ml.....	135

## MỞ ĐẦU

### Tính cấp thiết của luận án

Chanh dây (*Passiflora edulis*) là loại cây được trồng từ thế kỷ XIX ở Châu Âu (CABI, 2007). Chanh dây được trồng nhiều ở Việt Nam chủ yếu tập trung ở Đắk Nông và Lâm Đồng; sau đó là các tỉnh Đắk Lắk, Gia Lai, Kon Tum, Sơn La, Nghệ An, Cao Bằng. Theo Cục Bảo vệ thực vật (2019), cây chanh dây được trồng với nguồn giống Đài Nông 1 được nhập khẩu từ Đài Loan, với số lượng cây giống nhập khẩu tăng dần qua các năm: 1.892.900 cây (năm 2014), 1.977.400 cây (năm 2015), 3.102.016 cây (năm 2016), 5.761.600 cây (năm 2017), 7.703.006 cây (năm 2018) và 5.361.250 cây (năm 2019), diện tích trồng ngày càng được mở rộng.

Theo Trung tâm kiểm dịch thực vật sau nhập khẩu II (2011), có nhiều tác nhân gây bệnh trên cây chanh dây; trong đó, bệnh do nấm *Alternaria* spp. có tần suất xuất hiện nhiều nhất, làm ảnh hưởng đến năng suất và chất lượng quả chanh dây.

Tại một số tỉnh trồng chanh dây, sinh vật gây hại làm tàn lụi cây, không cho thu hoạch chiếm khoảng 10% diện tích, chanh dây bị đùn ngọn, lá ngả màu vàng, hoa và quả non rụng hàng loạt, quả sắp thu hoạch thì bị sần sùi, móp méo gây thiệt hại lớn về năng suất và chất lượng sản phẩm. Theo Nguyễn Văn Tuất và cộng sự (2019), trong năm 2015 - 2016 đã phát hiện được 11 bệnh gây hại trên chanh dây do 11 loài vi sinh vật gây ra (5 loài nấm, 2 loài vi khuẩn, 3 loài virus và 1 loài tuyến trùng), mặc dù số bệnh hại ghi nhận trên chanh dây không nhiều nhưng có tới 10/11 loại bệnh có mức độ xuất hiện từ trung bình (++) đến nhiều (+++); trong đó, bệnh đốm nâu do *Alternaria passiflorae* là bệnh xuất hiện nhiều và gây hại nguy hiểm.

*Alternaria passiflorae* và *Alternaria alternata* là hai loài nấm gây bệnh trên chanh dây vào giai đoạn trước thu hoạch ở Mauritius (Đông Phi). Bệnh đốm nâu trên lá, thân và quả do *Alternaria* spp. gây ra là bệnh quan trọng nhất và phổ biến nhất (CABI, 2007; Rheinlander, 2010). Ngành trồng chanh dây ở Kenya cũng bị giảm 80 – 100% năng suất do các tác nhân *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae*, *Fusarium* spp., *Phytophthora* spp., *Alternaria passiflorae*, *Fusarium solani*, *Colletotrichum passiflorae* và phức hợp virus *passion fruit woodiness virus* (Amata và cộng sự, 2009).

*Alternaria* là một chi nấm có phổ ký chủ rất rộng, nấm có thể xâm nhập và gây bệnh cho cây trồng ở giai đoạn trước và sau thu hoạch. Nhiều loài của *Alternaria* đã được mô tả, hầu hết gây bệnh trên cây trồng và một số khác gây hại trên cả thực phẩm (Ostry, 2008). Ngoài ra, còn có các loài sinh ra độc tố như: acid tenuazonic, alternariol monomethylether, alternariol, altenuene, tenuazonic acid và altertoxin I, II, III trong các loại quả hoặc sản phẩm thực phẩm bị nhiễm *Alternaria* và làm ảnh hưởng đến sức khỏe người tiêu dùng.

*Alternaria* là một chi nấm lớn và rất khó định danh đến loài, theo Simmons (2007), chỉ riêng *Alternaria* gây hại trên cây thuộc chi *Passiflora* đã có đến chín loài khác nhau. Hiện nay diện tích trồng chanh dây phát triển đến 10,5 nghìn ha, nhưng chưa được nghiên cứu về sinh vật gây hại và các biện pháp phòng trừ một cách bài bản. Có thể xem chanh dây là cây trồng mới với nguồn giống nhập nội, do đó nghiên cứu bệnh hại chanh dây đáp ứng thực tiễn sản xuất hiện nay và tương lai là hết sức cần thiết. Kết quả điều tra thành phần bệnh hại trên chanh dây của Trung tâm Kiểm dịch thực vật sau nhập khẩu II (năm 2011) cho thấy *Alternaria* spp. là tác nhân gây bệnh đốm nâu, đây là một loại bệnh rất cần nghiên cứu xây dựng cơ sở dữ liệu về tác nhân, ký chủ phụ và nguồn gốc nguồn gây bệnh nhằm cung cấp số liệu khoa học làm cơ sở cho việc nghiên cứu biện pháp phòng trừ và giúp sản xuất bền vững chanh dây ở Việt Nam.

### **Mục tiêu nghiên cứu của luận án**

Xác định tác nhân gây bệnh đốm nâu trên lá, quả chanh dây tại Việt Nam và một số đặc điểm sinh học, khả năng gây bệnh làm cơ sở cho đề xuất biện pháp phòng trừ.

### **Những đóng góp mới của luận án**

Kết quả của luận án đã xác định được có hai loài thuộc *Alternaria* gây bệnh đốm nâu trên chanh dây, *A. passiflorae* và *A. tenuissima*, triệu chứng và đặc điểm gây bệnh có sự khác biệt. Trong đó, *A. tenuissima* là loài được phân lập trên nguồn cây giống chanh dây nhập nội.

Trình tự vùng rDNA-ITS, ACT, GPDH của 23 mẫu phân lập *Alternaria* được đưa vào genbank như là nguồn dữ liệu cho nghiên cứu so sánh và dịch tễ phân tử.

Xác định được phổ ký chủ của nấm *A. passiflorae* và *A. tenuissima* giúp trong việc quản lý và phòng trừ bệnh đốm nâu; cũng như trong công tác quy hoạch vùng trồng và cơ cấu cây trồng phù hợp với chanh dây nhằm hạn chế thiệt hại do nấm *Alternaria* spp. gây ra.

### **Ý nghĩa khoa học của luận án**

Xác định được hai loài của *Alternaria* gây bệnh trên lá và quả chanh dây tại Việt Nam là *A. passiflorae* và *A. tenuissima* với những triệu chứng và đặc điểm gây bệnh khác biệt. Trong đó, *A. tenuissima* được phát hiện trên nguồn nhập khẩu là gốc ghép của cây chanh dây giống.

Đã công bố 23 trình tự DNA của các vùng rDNA-ITS (ribosomal DNA internal transcribed spacer), ACT (actin) và GPDH (glyceraldehyde – 3 – phosphate dehydrogenase) trên genbank là nguồn cơ sở dữ liệu phân tử của *Alternaria* phân lập tại Việt Nam, phục vụ cho nghiên cứu so sánh và dịch tễ phân tử của bệnh đốm nâu trên chanh dây.

Đặc điểm gây bệnh của hai loài thuộc *Alternaria* trên các loại cây trồng là cơ sở khoa học cho nghiên cứu tính gây bệnh và chọn lọc ký chủ của nấm ký sinh.

### **Ý nghĩa thực tiễn của luận án**

Định danh đến loài của *Alternaria* gây bệnh đốm nâu trên chanh dây, đóng góp vào cơ sở dữ liệu về tác nhân gây bệnh cây trồng ở Việt Nam có ý nghĩa rất quan trọng trong công tác kiểm dịch thực vật và xác định nguồn bệnh ban đầu cho các vùng trồng chanh dây.

Xác định được ký chủ của hai loài *A. passiflora* và *A. tenuissima* có ý nghĩa rất quan trọng trong quy hoạch cơ cấu cây trồng, vùng trồng và phòng trừ bệnh do *Alternaria* gây ra.

### **Đối tượng nghiên cứu của luận án**

Chi *Alternaria* gây bệnh đốm nâu trên chanh dây.

### **Phạm vi nghiên cứu của luận án**

Phân lập, định danh các mẫu nấm *Alternaria* dựa vào các đặc điểm hình thái và trình tự các vùng rDNA-ITS, ACT và GPDH. Khảo sát một số đặc điểm sinh học của các mẫu phân lập đại diện cho từng loài của *Alternaria*, đánh giá khả năng gây bệnh

của các loài thuộc *Alternaria* trên cây chanh dây giống Đài Nông 1 và trên một số loại cây ký chủ phổ biến.

## CHƯƠNG 1

### TỔNG QUAN

#### 1.1. Giới thiệu sơ lược về cây chanh dây

##### 1.1.1. Nguồn gốc

Chanh dây còn được gọi là cây chanh leo, lạc tiên, chùm bao, mác mác. Chi *Passiflora* hiện có khoảng 500 loài và 12 giống, trong đó có khoảng 50 – 60 loài cho quả ăn được nhưng chỉ một vài loài ngon và một số ít có ý nghĩa khi thu quả. Chanh dây là loại cây leo, thân gỗ, lâu năm, có nguồn gốc từ Nam Brazil, được trồng tại Úc và Châu Âu từ thế kỷ XIX (CABI, 2007).



**Hình 1.1.** Hoa và quả chanh dây. (A): hoa chanh dây; (B): quả chanh dây ở giai đoạn quả còn xanh, (C): quả chanh dây vàng; (D): quả chanh dây tím (nguồn: Phan Thị Thu Hiền, 2012; <http://www.google.com.vn/search?q=passiflora+edulis+f.+flavicarpa&tbm>).

##### 1.1.2. Vị trí phân loại

Cây chanh dây thuộc giới (Kingdom): Plantae, ngành (Phylum): Spermatophyta, ngành phụ (Subphylum): Angiospermae, lớp (Class): Dicotyledonae, bộ (Order): Violales, họ (Family): Passifloraceae, giống (Genus): *Passiflora*, loài (Species): *Passiflora edulis*; Tên khoa học khác: loại cho quả màu tím: *Passiflora edulis* f. *edulis*, loại cho quả màu vàng: *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*; Tên tiếng Anh: Passion fruit hoặc Purple granadilla (CABI, 2012).

### 1.1.3. Đặc điểm thực vật học

Chanh dây là loại dây leo, sống lâu năm, lớn nhanh với thân bò leo; lá màu xanh và có màu hơi đỏ hoặc hơi hồng, lá xẻ ba thùy, rìa lá mịn, hình tim. Hoa đơn tính, mọc từ nách lá. Các hoa của chanh dây có 5 cánh màu trắng ánh tím tía, tạo ra một vành hoa màu trắng xen tía. Mỗi hoa mang 5 nhị đực với 5 chỉ dính với nhau thành ống ở đáy và tách rời ở phần mang bao phấn. Hoa của giống chanh dây cho quả màu tím nở vào buổi sáng sớm, thường là lúc bình minh và đóng vào buổi trưa; hoa của giống chanh dây cho quả màu vàng nở vào buổi trưa và đóng vào khoảng 9 – 10 giờ đêm. Không có khả năng thụ phấn chéo giữa hai giống tím và vàng (Akamine và cộng sự, 1974).

Quả chanh dây hình cầu hoặc bầu dục, kích thước 4,5 – 7 cm, màu tím đến tím sẫm hay vàng chanh, tự rụng khi chín, vỏ quả trơn và láng bóng. Quả chanh dây màu tím thường nhỏ hơn và năng suất thấp hơn loại quả màu vàng. Tuy nhiên, hương vị của quả màu tím ngọt hơn, thơm hơn và quyến rũ hơn quả màu vàng. Quả mang nhiều hạt, hạt đen, xung quanh hạt là cơm hạt, mềm, màu vàng và mùi thơm rất quyến rũ (Akamine và cộng sự, 1974).

### 1.1.4. Điều kiện sinh thái

Chanh dây đòi hỏi khí hậu ẩm và ẩm, lượng mưa trung bình từ 1.600 mm trở lên, phân bố đều, đặc biệt trong thời kỳ ra hoa ít bị mưa bão. Nhiệt độ thích hợp từ 16 – 30°C, không có sương muối. Giống quả tím thích hợp vùng Á nhiệt đới, cao độ 1.000 – 1.200 m so mặt biển. Ngược lại giống quả vàng thích hợp vùng nhiệt đới, độ cao < 600 m (Đào Quang Hưng, 2010).

Chanh dây thích nghi tốt với nhiều loại đất trồng nhưng đất nhiều mùn, đất sét, đất cát, thoát nước tốt, có pH = 6,5 – 7 là thích hợp nhất. Đất trồng cần giàu hữu cơ và có hàm lượng muối thấp (Đào Quang Hưng, 2010).

Cây chanh dây rất dễ trồng, ưa đất khô ráo, cần ít nước, sống được trên đất sỏi đá hoặc đất cát. Cây đạt độ trưởng thành ở 12 tháng tuổi, có thể dài đến khoảng 15 m, bắt đầu cho quả sau 4 tháng tuổi, thời gian thu hoạch kéo dài (khoảng 6 tháng). Khả năng cho năng suất cao, nhiệm kỳ kinh tế có thể tới 3 năm. Hai loại chanh dây được xem là có giá trị cho ngành sản xuất gồm loại cho quả màu tím khi chín (*Passiflora edulis*) và loại cho quả màu vàng khi chín (*P. edulis* f. *flavicarpa*). Chanh dây quả màu tím phát triển tốt tại các vùng có độ cao cao, có khí hậu mát mẻ, chanh dây quả màu vàng thì thích hợp với những vùng có cao độ thấp hơn và có khí hậu nóng hơn (Akamine và cộng sự, 1974; Cục Trồng trọt, 2020).

### **1.1.5. Tình hình sản xuất của cây chanh dây trên thế giới và ở Việt Nam**

#### **1.1.5.1. Trên thế giới**

Chanh dây hoang dại được tìm thấy và trồng ở nhiều nơi khác nhau trên thế giới gồm có vùng cao nguyên Java, Sumatra, Malaya, Western Samoa, đảo Norfolk, quần đảo Cook, Solomon, Guam, Philippines, Bờ biển Ngà, Zimbabwe và Đài Loan. Năm 1954, chanh dây vàng từ Brazil sang Venezuela, trở thành một ngành công nghiệp và nổi tiếng tại quốc gia này. Năm 1913, chanh dây tím được nhập từ Blue Mountains của Jamaica. Cả chanh dây tím và vàng được trồng nhiều ở Puerto Rico, Ceylon, Madras, Kerala và Ấn Độ (Nguyễn Thị Hoàng Yến, 2009).

Năm 1880, chanh dây đã xuất hiện ở Hawaii và năm 1930, chanh dây có mặt khắp các hòn đảo ở Hawaii bởi khí hậu ở đây gần như hoàn hảo cho sự phát triển của chanh dây. Bắt đầu năm 1950, chanh dây vàng được quan tâm và trồng ở Colombia (chủ yếu ở thung lũng Cauca) và Venezuela, năm 1975 ở Suriman sau đó lan rộng sang Ecuador (Lê Cảnh Tuấn, 2009).

Chanh dây có nguồn gốc từ Nam Mỹ, từ Brazil đến Paraguay và miền Bắc Argentina; không được báo cáo là có nguồn gốc ở miền Bắc Nam Mỹ, mặc dù trong số các tài liệu chanh dây được liệt kê là có nguồn gốc ở Venezuela và Colombia. Chanh dây được trồng rộng rãi ở Châu Phi (vùng nhiệt đới), Đông Nam Á, Châu Mỹ (vùng nhiệt đới) và Caribê. Trên thế giới, ngành sản xuất chanh dây tương đối nhỏ; diện tích thương mại ở các nước sản xuất lớn ước tính chỉ khoảng 4.500 ha. Khoảng 3.000 ha là ở Nam Mỹ, chủ yếu ở Brazil, Peru và Ecuador. Sri Lanka là nhà sản xuất quan trọng nhất ở Châu Á với 800 ha. Úc có khoảng 550 ha, bao gồm Papua New Guinea (80 ha)

và Fiji (70 ha). Sản phẩm thương mại phần lớn là sản xuất nước trái cây, khoảng một nửa trong số đó tham gia thương mại thế giới (CABI, 2020).



### 1.1.5.2. Ở Việt Nam

Cây chanh dây được du nhập vào nước ta từ thời Pháp thuộc. Tuy nhiên, suốt thời gian dài chỉ được trồng rải rác, chủ yếu để làm giàn che mát, sử dụng nước giải khác với tính chất hộ gia đình, chưa có vùng địa phương phát triển hàng hóa.

Từ cuối những năm 1990, Trung tâm Nghiên cứu Cây ăn quả Phú Hộ - thuộc Viện Nghiên cứu Rau quả (nay là Trung tâm Nghiên cứu và phát triển Rau hoa quả - Viện KHKT NLN miền núi phía Bắc) đã tiến hành nhập nội, đánh giá tập đoàn bốn giống chanh dây có nguồn gốc từ Uganda, Srilanca, Úc, Đài Loan. Năm 1998, Tổng công ty Rau quả Việt Nam, nay là Tổng công ty Rau quả, Nông sản – Công ty Cổ phần (Vegetexco Vietnam JSC.) đã đưa hai giống chanh dây vỏ vàng có nguồn gốc từ Srilanca và Uganda vào trồng trên diện rộng tại một số công ty: Công ty Chế biến TPXK Quảng Ngãi – tỉnh Quảng Ngãi (với diện tích 11,5 ha trong các năm 2002 – 2004) và Công ty Chế biến TPXK Đồng Giao – Ninh Bình (diện tích gần 20 ha năm 2000 – 2001), khai thác nguyên liệu cho chế biến nước giải khát và nước quả cô đặc phục vụ xuất khẩu.

Cũng từ những năm 1998, giống chanh dây vỏ tím Đài Nông 1 được các công ty Đài Loan đưa vào trồng tại Đức Trọng – Lâm Đồng. Diện tích này tăng nhanh tới khoảng 240 ha vào năm 2002 – 2004. Tuy nhiên, do vấn đề tiêu thụ, các nhà máy chế biến nước quả của Đài Loan không thu mua sản phẩm cho nông dân, các công ty chế biến nước quả trong nước tranh mua, tranh bán, ép giá nên diện tích chanh dây giảm xuống còn khoảng 100 ha (Cục Trồng trọt, 2020).

Chanh dây được xếp vào nhóm cây ăn quả mới, phục vụ nội tiêu và xuất khẩu. Sau đó vùng trồng chanh dây được phát triển, mở rộng từ từ và từ năm 2009 đến năm 2013 chanh dây được trồng tập trung ở hai tỉnh Đắk Nông, Lâm Đồng. Đến nay vùng trồng chanh dây tiếp tục được trồng và mở rộng thêm ở các tỉnh Lâm Đồng, Đắk Nông, Kon Tum, Gia Lai, Đắk Lắk, Sơn La, Nghệ An. Mặc dù mới du nhập vào Việt Nam nhưng đã có sức hấp dẫn rất lớn nhờ hương vị thơm ngon đặc biệt và theo Đông y thì các hợp chất trong chanh dây có tính hàn, giúp bổ dưỡng cho tim mạch, lưu thông khí huyết, hạ thân nhiệt.

Tổng diện tích chanh dây của cả nước năm 2019 đạt khoảng 10,5 nghìn ha; tổng sản lượng (quả tươi) ước đạt 20,32 tấn/ha. Chanh dây là cây trồng có tốc độ phát triển

nhanh, do thị trường xuất khẩu khá tốt, đã hình thành một số vùng sản xuất tập trung sản xuất hàng hóa tại các tỉnh Lâm Đồng, Đắk Nông, Đắk Lắk, Gia Lai, Kon Tum, Sơn La, Nghệ An, Cao Bằng. Trong đó, năm tỉnh sản xuất chanh dây lớn nhất, với diện tích trên 1.000 ha/tỉnh lần lượt gồm Gia Lai, Sơn La, Đắk Nông, Lâm Đồng và Đắk Lắk (Cục Trồng trọt, 2020). Nguồn cây giống chanh dây hiện nay được trồng ở Việt Nam chủ yếu là giống quả tím Đài nông 1 (LPH 04) được nhập khẩu từ Đài Loan, chiếm hơn 95% diện tích. Giống được công nhận chính thức cho sản xuất tại vùng Tây Nguyên và các tỉnh miền núi phía Bắc, Bắc Trung Bộ theo Quyết định số 4538/QĐ-BNN-TT ngày 05/11/2015 của Bộ trưởng Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn (Cục Trồng trọt, 2020).

#### 1.1.6. Giá trị dinh dưỡng và lợi ích của chanh dây

Lá và rễ của một số loài chanh dây được sử dụng như là một loại trà có đặc tính chữa bệnh. Tuy nhiên, quả là bộ phận có ý nghĩa kinh tế nhất. Phần cơm quả của cây được sử dụng làm nước giải khát, nước ép trái cây, làm bánh với một hương vị đặc biệt. Nước quả chanh dây có hương thơm, vị ngọt và có hàm lượng axit khoảng 2%, dịch quả chứa nhiều vitamin và nhiều nguyên tố vi lượng có ích cho tim mạch. Quả có vỏ dày nên thuận tiện cho việc vận chuyển và bảo quản lâu.

Sản phẩm thương mại phần lớn là quả tươi, nước trái cây và cơm thịt chanh dây đông lạnh dùng để tiêu thụ trong nước hoặc xuất khẩu. Hiện nay chanh dây ở Việt Nam đã xuất sang nhiều nước trên thế giới, chủ yếu là các nước: Pháp, Thụy Sĩ, Hà Lan, Đức, Anh, Hàn Quốc, Úc, Trung Quốc, New Zealand, Đài Loan (Cục Bảo vệ thực vật, 2019).

**Bảng 1.1.** Giá trị dinh dưỡng của quả chanh dây màu tím trong 100 g thịt quả

<b>Thành phần</b>	<b>Hàm lượng</b>	<b>Thành phần</b>	<b>Hàm lượng</b>
Năng lượng	97 Kcal	Phốt pho	68 mg
Carbohydrates	23,38 g	Kali	348 mg
Đường	11,20 g	Kẽm	0,10 mg
Chất xơ thực phẩm	10,40 g	Vitamin A	64 µg
Chất béo	0,70 g	Vitamin B2 (Riboflavin)	0,13 mg
Chất đạm	2,20 g	Vitamin B3 (Niacin)	1,50 mg
Canxi	12 mg	Vitamin B9 (Folate)	14 µg
Sắt	1,60 mg	Vitamin C	30 mg

Magiê

29 mg

(Nguồn: [https://vi.wikipedia.org/wiki/Passiflora\\_edulis](https://vi.wikipedia.org/wiki/Passiflora_edulis))

## 1.2. Tình hình bệnh hại trên cây chanh dây

Theo CABI (2007) đã ghi nhận bệnh quan trọng nhất trên cây chanh dây là bệnh đốm nâu do nấm *Alternaria passiflorae* gây hại trên lá, cành và quả. Một loại bệnh quan trọng khác là đốm do vi khuẩn *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae*, bệnh thối đọt non do nấm *Phytophthora nicotianae*, bệnh ghẻ trên quả do *Cladosporium cladosporioides* làm giảm năng suất và chất lượng quả. Bệnh do nấm *Septoria passiflorae* gây hại trên lá, thân và quả chanh dây. Bệnh héo do *Fusarium oxysporum* f.sp. *passiflorae* gây héo chồi, sau đó gây héo cả cây. Trong giai đoạn vườn ươm thì chanh dây bị bệnh héo cành do nấm *Thanatephorus cucumeris* và *Pythium* spp. gây ra.

Một số bệnh do virus đã được báo cáo, đáng chú ý là virus gây hóa gỗ *Passionfruit woodiness virus* (PWV) và virus gây bệnh tiềm ẩn do *Passiflora latent virus* (PLV). Các bệnh này bị lây lan bởi rầy mềm (*Aphis gossypii*, *Myzus persicae*) và dao cắt tĩa. Các bệnh do virus khác là *Passionfruit ringspot* từ Cộng hòa Bờ Biển Ngà (Côte d'Ivoire), tương tự như PWV (CABI, 2020).

Trung tâm Kiểm dịch thực vật sau nhập khẩu II (2011) đã ghi nhận thành phần nấm bệnh trên cây chanh dây được trồng ở Lâm Đồng và Đắk Nông có 10 loại bệnh do 14 giống loài nấm, 4 giống tuyến trùng và 1 loại nghi ngờ do virus gây hại; chủ yếu là bệnh đốm lá, đốm trái, ghẻ trái và khảm. Thành phần nấm bệnh trên cây chanh dây trồng tại Lâm Đồng nhiều hơn trên chanh dây trồng tại Đắk Nông, có 11 giống loài nấm gây hại trên chanh dây ở Lâm Đồng và 9 giống loài nấm gây hại trên chanh dây ở Đắk Nông. Chưa tìm thấy tuyến trùng gây hại trên chanh dây tại Lâm Đồng và chưa tìm thấy bệnh do vi khuẩn gây hại trên chanh dây tại hai vùng này. Thành phần nấm bệnh gồm các loài nấm: *Alternaria* spp., *Septoria* sp., *Colletotrichum* sp., *Curvularia* sp., *Phytophthora nicotianae*, *Phytophthora* sp., *Botryodiplodia theobromae*, *Nigrospora* sp., *Cladosporium oxysporum*, *Cladosporium* sp., *Pythium* sp., *Fusarium oxysporum*, *Fusarium* sp. và *Rhizoctonia solani*. Trong đó, *Alternaria* spp. là loài có tần suất xuất hiện nhiều nhất. Các loài tuyến trùng *Aphelenchus* sp., *Aphelenchoides*

sp., *Meiloidogyne* sp. và *Helicotylenchus* sp. cũng đã được ghi nhận gây hại trên chanh dây trồng ở Đắk Nông.

### 1.2.1. Bệnh do tuyến trùng

Theo Morton (1987), chanh dây quả tím ở Nam Phi bị tấn công gây hại bởi một vài loài tuyến trùng, nguy hiểm nhất là *Meloidogyne javanica*, *Scutellonema truncatum*, *Helicotylenchus* sp. và *Pratylenchus* sp. Chanh dây quả vàng có khả năng kháng với tuyến trùng. Theo Manicom (2003), tuyến trùng là tác nhân gây bệnh quan trọng gồm *Rotylenchus reniformis*, *Meloidogyne arenaria*, *M. incognita* và *M. javanica*, làm giảm tuổi thọ của cây.

CABI (2020) cũng đã ghi nhận tuyến trùng, đặc biệt *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* và *M. arenaria* là những loài gây hại nghiêm trọng nhất trên chanh dây (*Passiflora edulis*).

### 1.2.2. Bệnh do vi khuẩn

Vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* gây bệnh u sưng; *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora* gây bệnh thối mềm; *Ralstonia solanacearum* gây bệnh héo rũ và *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Pseudomonas syringae* pv. *passiflorae*, *Pseudomonas viridiflava* gây đốm lá. *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae* gây bệnh đốm trên lá và quả chanh dây, là loại bệnh quan trọng nhất, được ghi nhận ở Úc, Colombia và Brazil (Manicom và cộng sự, 2003).

### 1.2.3. Bệnh do nấm

Theo Akamine và cộng sự (1974), ghi nhận nấm *Alternaria passiflorae*, *A. tenuis* và *A. tomato* gây hại nghiêm trọng nhất trên cây chanh dây ở Hawaii. Đứng thứ hai là bệnh thối rễ do nấm *Pythium splendens*, *Pythium aphanidermatum* và bệnh ít nghiêm trọng hơn là do nấm *Rhizoctonia solani*.

Theo CABI (2007), bệnh hại quan trọng nhất là bệnh đốm nâu trên lá, thân và quả do nấm *Alternaria passiflorae* gây ra trên chanh dây ở các vùng trồng trên thế giới như: Úc, New Zealand, một số nước Châu Phi (Kenya, Uganda), Châu Mỹ (Colombia) và Malaysia. Ở Việt Nam cũng có một nghiên cứu gần đây nhất đã xác định được loài *Alternaria sesami* là tác nhân gây bệnh đốm nâu trên chanh dây tại Nghệ An (Võ Thị Dung, 2019).

Khi thời tiết ẩm áp, bệnh đốm nâu do *Alternaria passiflorae* là một tác nhân gây hại nghiêm trọng trên chanh dây quả tím ở New Zealand và Đông Phi. Tại Hawaii, năm 1969 bệnh này đã được ghi nhận trên chanh dây quả vàng do nấm *A. tenuis*, trong

khi *A. macrospora* cũng đã được ghi nhận gây hại nặng cho ngành sản xuất chanh dây tại Ấn Độ. Bệnh chết rạp cây con do nấm *Rhizoctonia solani* và *Pythium* spp. ở Queensland cũng đã được báo cáo (Morton, 1987).

Ngoài ra, một số loại bệnh khác như bệnh thối quả do nấm *Diplodia*, *Phomopsis*; bệnh ghẻ trên lá và quả do nấm *Cladosporium oxysporum* cũng có ảnh hưởng rất lớn cho ngành sản xuất chanh dây ở các quốc gia khác (Willingham, 2009).

Theo Amata (2009) bệnh quan trọng nhất là do *Fusarium* spp. và *Phytophthora nicotianae* var *parasitica* với tỷ lệ bệnh biến động từ 0 – 100% tại các vùng trồng chanh dây ở Kenya. Trong đó, tỷ lệ bệnh héo do *F. oxysporum* chiếm 0 – 33%, bệnh do *Alternaria passiflorae* và *Septoria passiflorae* từ 2 – 100%. Bệnh thán thư do nấm *Colletotrichum passiflorae* và *Glomerella cingulata* chiếm tỷ lệ bệnh từ 5 – 60%.

Theo Nguyễn Văn Tuất và cộng sự (2019) đã điều tra nghiên cứu về thành phần dịch hại và thiên địch trên cây chanh dây ở Việt Nam giai đoạn 2015 – 2016 cho thấy có 11 bệnh gây hại trên chanh dây do 11 loài vi sinh vật gây ra. Bệnh bệnh đốm nâu do *Alternaria passiflorae* là bệnh bắt gặp nhiều và gây hại nguy hiểm trên chanh dây được trồng tại các tỉnh thuộc các vùng sinh thái Trung du miền núi Bắc Bộ ( Sơn La), Đồng bằng sông Hồng (Vĩnh Phúc, Hải Phòng), Duyên hải Bắc Trung Bộ (Nghệ An) và Tây Nguyên (Lâm Đồng).

#### **1.2.4. Bệnh do virus**

Bệnh virus "woodiness" do virus PWV (*Passionfruit Woodiness Virus*) gây hại làm cho vỏ quả dày và cơm quả ít, là bệnh nghiêm trọng nhất trên chanh dây quả tím ở Úc và Đông Phi; nhưng bệnh này ít bị ảnh hưởng lên chanh dây quả vàng. Ngoài ra, bệnh do virus PWV cũng là nguyên nhân gây ra bệnh bạc lá chanh dây ở miền Trung Queensland. Virus PWV có phổ ký chủ rất rộng, không chỉ ở chi *Passiflora*, mà các họ Amaranthaceae, Chenopodiaceae, Cucurbitaceae và Solanaceae cũng là phổ ký chủ của virus PWV. Năm 1973, hai loại virus gây ra triệu chứng khảm là PPMV – K và PFMVMY, đây là virus rất phổ biến trong các vùng trồng chanh dây quả vàng ở huyện Bantung của Selangor, Malaysia. Triệu chứng điển hình của bệnh "Woodiness" là sự bóp méo, cứng và dày lên của vỏ quả (Manicom, 2003).

Bệnh xoắn lá Euphorbia do *Euphorbia leaf curl virus*, bệnh xoắn lá do *Papaya leaf curl virus* gây ra trên chanh dây được trồng tại Sơn La, Vĩnh Phúc, Hải Phòng,

Nghệ An và Lâm Đồng. Đây cũng là bệnh gây thiệt hại đáng kể cho cây chanh dây nếu không được phòng trừ kịp thời. Bên cạnh đó, các bệnh do virus gây ra cũng được nhóm tác giả ghi nhận lan truyền qua cây giống và các côn trùng môi giới như bọ phấn, rệp, rầy và là loại bệnh nguy hiểm nếu không được phát hiện sớm (Nguyễn Văn Tuất và cộng sự, 2019).

### **1.3. Tổng quan về nấm *Alternaria***

#### **1.3.1. Triệu chứng gây hại và sự phân bố của nấm *Alternaria* gây bệnh đốm nâu trên cây chanh dây**

Bệnh đốm nâu do nấm *Alternaria* spp. xuất hiện khắp nơi trên thế giới, bệnh đã được ghi nhận tại Úc, Canada, Indonesia, Kenya, Mauritius, New Zealand, New Guinea, Nam Phi, Tanzania, Hoa Kỳ và Zambia. Ba giống chanh dây *Passiflora quadrangularis*, *Passiflora edulis* f. *edulis* và *P. flavicarpa* f. *edulis* rất mẫn cảm với *Alternaria*, tỷ lệ nhiễm bệnh có thể lên đến 98% trong những vùng có lượng mưa lớn (Manicom và cộng sự, 2003).

Trên cây chanh dây, triệu chứng do *Alternaria passiflorae* và *Alternaria alternata* rất khác biệt. *Alternaria passiflorae* gây ra những đốm có màu nâu đỏ trên lá, đường kính vết bệnh 5 mm, phát triển rộng ra dưới điều kiện độ ẩm cao, bào tử và cành bào tử của nấm được tìm thấy ở trung tâm của vết bệnh. Bệnh có thể làm cho lá bị rụng, vết bệnh nhỏ, thuôn dài, màu tối, có vòng đồng tâm; bệnh xuất hiện trên cuống lá, cành, làm cho lá khô dẫn đến chết cành. Ngoài ra, bệnh còn gây hại trên quả, vết bệnh là những đốm tròn, màu nâu đỏ, đường kính lớn hơn 1 cm, xuất hiện ở giai đoạn quả đang phát triển và gây thiệt hại đến giá trị quả thương phẩm. Ngược lại, triệu chứng do nấm *A. alternata* gây ra là các đốm nhỏ, đường kính vết bệnh 1 – 5 mm, với những quầng vàng trên lá. Trên quả là những đốm có màu xanh đậm, mép tròn đều. *Alternaria alternata* là loài mang tính độc cao và là nguyên nhân gây ra hiện tượng rụng lá chanh dây (Manicom và cộng sự, 2003).

#### **1.3.2. Đặc điểm hình thái học và đặc điểm phát sinh phát triển của *Alternaria***

##### **1.3.2.1. Vị trí phân loại và đặc điểm hình thái học**

Nấm *Alternaria* thuộc sinh vật nhân chuẩn (Domain) Eukaryota, giới (Kingdom) Fungi, ngành (Phylum) Ascomycota, ngành phụ (Subphylum) Pezizomycotina, lớp (Class) Dothideomycetes, lớp phụ (Subclass)

Pleosporomycetidae, bộ (Order) Pleosporales, họ (Family) Pleosporaceae, chi (Genus) *Alternaria* (nguồn: CABI, 2012).

Đặc điểm chung: *Alternaria* tấn công chủ yếu trên lá, cuống, hoa và quả quanh năm trên các loại cây trồng, đặc biệt là nhóm cây rau màu và cây kiểng, nhưng cũng có một vài cây khác như cây có múi, cây táo. Bệnh do nấm *Alternaria* thường có triệu chứng như đốm và cháy, chết rạp cây con, thối cuống, thối củ và thối quả (Agrios, 1997). Có nhiều loài *Alternaria* hoại sinh và gây chết từng phần cây trồng. Bào tử của *Alternaria* rất phổ biến trong bụi bặm, trong nhà, trong không khí và là tác nhân chính gây dị ứng, một số bệnh về da và vài rối loạn nghiêm trọng ở cơ thể người (Nguyễn Văn Bá và cộng sự, 2005).

Đặc điểm hệ sợi nấm: màu nâu sáng, mảnh, phân nhánh mảnh, sợi nấm có vách ngăn trước hết là gian bào, sau đó có thể trở thành nội bào. Mỗi tế bào thường có nhiều nhân (Nguyễn Văn Bá và cộng sự, 2005).

Đặc điểm sinh sản: chi *Alternaria* chủ yếu sinh sản bằng cách tạo bào tử đính; giai đoạn hoàn chỉnh của *Alternaria* là *Pleospora infectoria*. Kiểu đặc trưng sinh sản bào tử của *Alternaria* gồm có cuống bào tử đơn và trên đỉnh cuống bào tử đính những nhánh bào tử dạng chuỗi với những bào tử nhỏ thứ cấp trên những cành bào tử ngăn riêng lẻ.

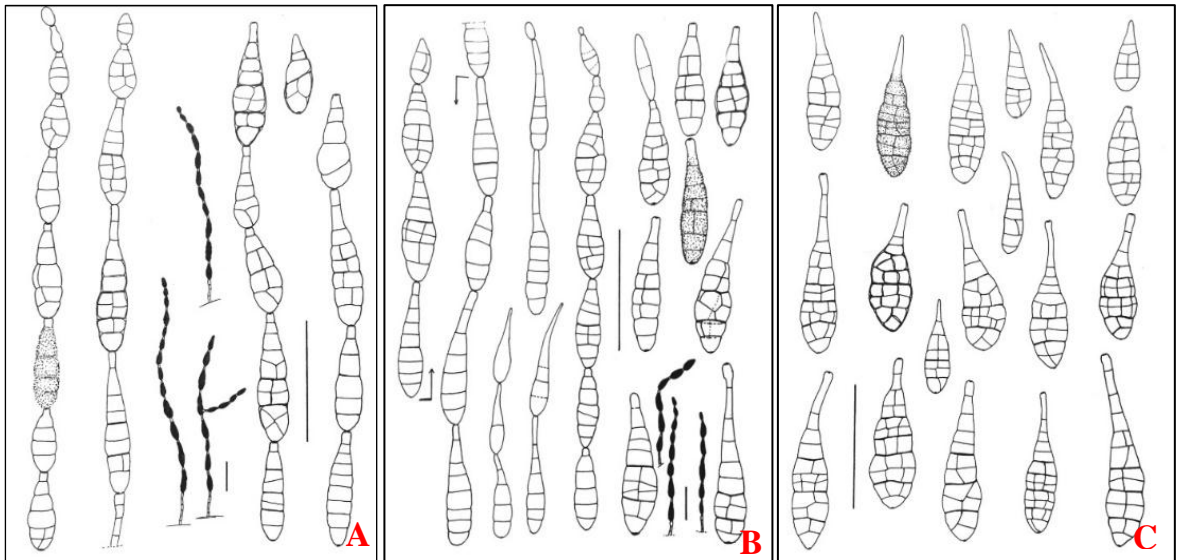
Bào tử đính phát triển trên cuống bào tử đính ngắn, sậm màu và thường vô định hình; Một bào tử phát triển như là chồi ngọn của tế bào đính trên cuống bào tử đính; Những bào tử non được phân cách bằng vách ngăn ngang với sự phát triển của vành hình khuyên vào bên trong; trung tâm mỗi vách ngăn có một lỗ thông nội chất giữa các tế bào của bào tử, sau đó một số tế bào phân cách bởi vách ngăn dọc. Nhóm bào tử với vách ngăn ngang và dọc như thế được gọi là dạng quả dâu (muriform) hoặc bào tử lưới (dictyospore), thường thì phân chóp bào tử nảy chồi và cuối cùng tạo thành chuỗi bào tử.

Sự phân nhánh của những chuỗi sơ cấp được bắt đầu khi một vài cành bào tử thứ cấp phát triển thành một chuỗi tại nơi hình thành bào tử hoặc khi cành bào tử thứ cấp xuất hiện từ tế bào thân của những bào tử đính (Nguyễn Văn Bá và cộng sự, 2005; Simmons, 2007). Đôi khi chồi có thể phát triển từ tế bào thấp hơn hay gắn vào bào tử tạo nên nhánh của chuỗi bào tử. Sự mở rộng thêm của chuỗi bào tử sẽ ngưng khi có sự bịt kín lỗ nền bào tử; bào tử chín (bào tử thành thực) là một bào tử nhiều nhân có vách

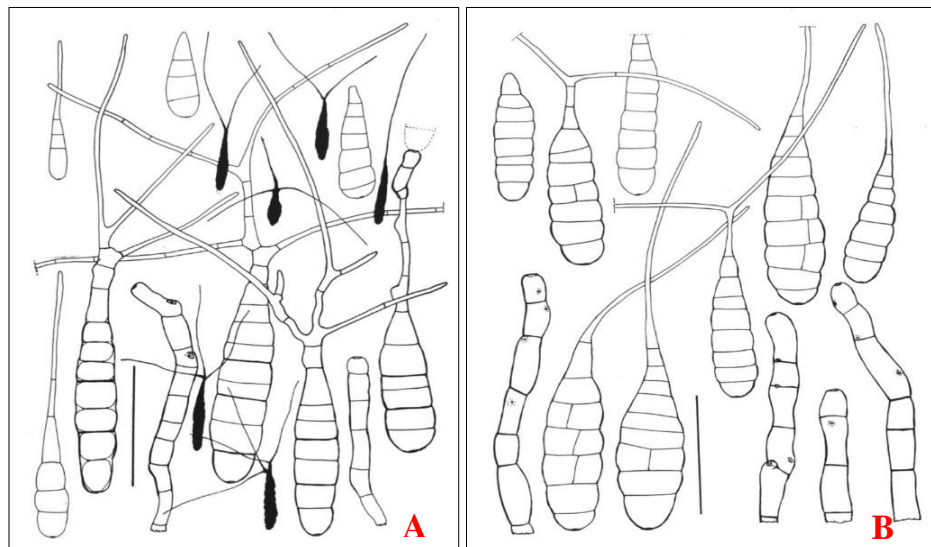


ngang và dọc; được bao quanh bởi 2 lớp vách, tầng ngoài có sắc tố của tế bào, tầng trong trong suốt.

Cành bào tử chín chứa vài nhân (0 – 3) trong khi bào tử chứa 1 – 2 nhân; Các bào tử được phát tán nhờ gió, gặp điều kiện nhiệt độ và độ ẩm thích hợp bào tử nảy mầm tạo từ 5 đến 10 ống mầm và hình thành sợi nấm (Nguyễn Văn Bá và cộng sự, 2005).



**Hình 1.2.** Đặc điểm hình thái *Alternaria tenuissima*. (A, B): Các dạng bào tử và cành bào tử; (C): Các dạng bào tử (Nguồn: Simmons, 2007).

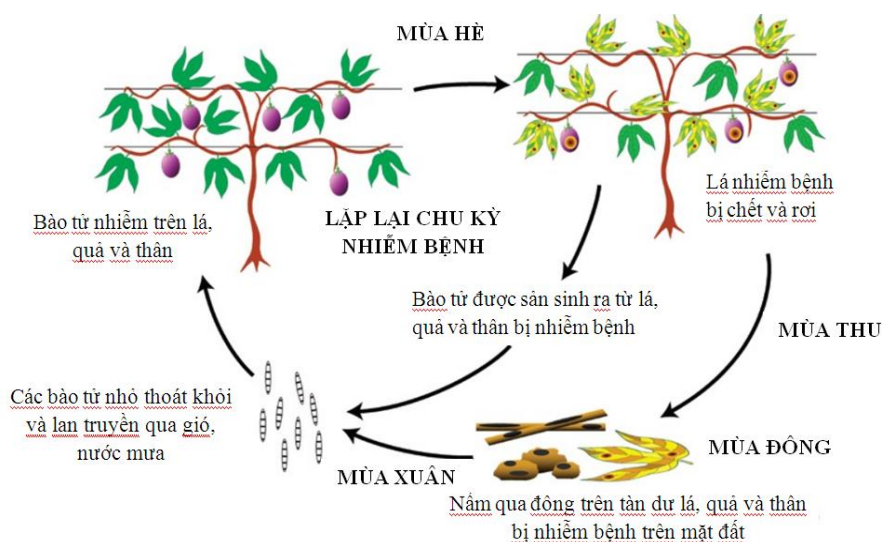


**Hình 1.3.** Đặc điểm hình thái *Alternaria passiflorae*. (A, B): Các dạng bào tử và cành bào tử (Nguồn: Simmons, 2007).

### 1.3.2.2. Chu kỳ bệnh và đặc điểm phát sinh phát triển của *Alternaria*

Nấm *Alternaria* spp. có khả năng gây bệnh trên nhiều loại cây trồng khác nhau. Bào tử *Alternaria* có thể tồn tại giữa các mùa vụ canh tác trên các tàn dư thực vật và đất bị nhiễm bệnh, trong các bộ phận bị nhiễm bệnh của cây trồng. Ở vùng khí hậu ôn

đời, bào tử *Alternaria* trải qua giai đoạn qua đông và sợi nấm có thể chịu được điều kiện môi trường bất lợi như tiếp xúc trực tiếp với ánh sáng mặt trời, khô, lạnh. Vào mùa xuân, bào tử đóng vai trò như là nguồn bệnh chủ yếu cho sự khởi đầu của quá trình gây bệnh. Nguồn bệnh ban đầu có thể lan truyền dễ dàng bằng cách bào tử di chuyển qua không khí, gió, mưa và nước tưới.



**Hình 1.4.** Chu kỳ gây bệnh của *Alternaria passiflorae* trên cây chanh dây (Rheinlander, 2010).

Bào tử phân sinh nảy mầm trong giọt nước sau 1 – 2 giờ ở 16 – 34°C, nhiệt độ thích hợp nhất cho nấm phát triển là 26 – 28°C. Nấm xâm nhập vào cây qua lỗ khí khổng hoặc vết thương hoặc trực tiếp qua biểu bì. Từ 13°C, nấm có thể xâm nhập và gây bệnh, nhiệt độ càng cao thì sự xâm nhập càng dễ dàng. Trong điều kiện nhiệt độ thích hợp, ẩm ướt thì thời kỳ tiềm dục của bệnh là 3 – 4 ngày và sau đó 3 – 4 ngày nấm có thể sinh bào tử mới. Thông thường thời kỳ tiềm dục kéo dài 8 – 10 ngày. Trời càng nhiều mưa và sương thì bào tử phân sinh hình thành càng nhiều (Vũ Triệu Mân, 2007).

### 1.3.3. Các độc tố sinh ra từ *Alternaria*

#### 1.3.3.1. Đặc tính lý học, hóa học của các độc tố sinh ra từ *Alternaria*

Có hơn 30 chất độc đã được trích xuất từ các loài *Alternaria*, gồm chất chuyển hóa thứ cấp, độc tố nấm và phần lớn các độc tố thực vật chuyên tính (host specific phytotoxins) hoặc không chuyên tính với cây ký chủ (non – host specific phytotoxins). Một số độc tố quan trọng nhất của *Alternaria* là alternariol (AOH), alternariol

monomethyl ether (AME), altenuene (ALT), altertoxins I, II, III (ATX-I, -II, -III) và acid tenuazonic (TeA) thuộc 3 dạng cấu trúc:

- Dẫn xuất dibenzopyrone (AOH, AME, ALT),
- Dẫn xuất perylene (ATX-I, -II, -III),
- Dẫn xuất tetramic acid (TeA).

Acid tenuazonic là loại acid không màu, nhớt và là một acid monobasic với pKa 3,5. Acid tenuazonic hòa tan trong methanol và chloroform. Acid tenuazonic tạo phức với ion canxi, magiê, đồng, sắt và niken. Acid tenuazonic thường được lưu giữ ở dạng muối đồng. Alternariol và alternariol monomethyl ether kết tinh từ ethanol có dạng không màu, điểm nóng chảy và phân hủy tương ứng với 267<sup>0</sup>C và 350<sup>0</sup>C. Trong điều kiện nhiệt độ 180 – 200<sup>0</sup>C và 250<sup>0</sup>C, chân không cao alternariol và alternariol monomethyl ether không bị phân hủy. Alternariol và alternariol monomethyl ether dễ dàng hòa tan trong các dung môi hữu cơ, đồng thời xảy ra phản ứng màu tím của ethanol với sắt clorua. Altenuene kết tinh không màu như lăng kính và nóng chảy ở 190 – 191<sup>0</sup>C. Altertoxin I là một chất rắn tan vô định hình, tan chảy ở 180<sup>0</sup>C và phát huỳnh quang màu vàng dưới ánh sáng tia cực tím.

#### **1.3.3.2. Tác động của độc tố sinh ra từ *Alternaria***

Độc tố do *Alternaria* sinh ra trong tự nhiên bao gồm acid tenuazonic (TeA), alternariol monomethyl ether (AME), alternariol (AOH), altenuene (ALT), altertoxin I (ATX I).

Acid tenuazonic là loại độc tố đã được nghiên cứu nhiều nhất, nguyên tắc gây hại là ức chế sự tổng hợp protein. Alternariol và alternariol monomethyl ether gây quái thai ở chuột. Hầu hết các loại độc tố do nấm *Alternaria* tiết ra đều gây độc cho các tế bào hoạt động, độc với động vật có vú (Lizaso và cộng sự, 2006).

Một nghiên cứu khác của Slavov và cộng sự (2004) về khả năng sản sinh ra các độc tố chuyên biệt từ *Alternaria alternata* gây bệnh đốm nâu trên cây thuốc lá. Tác giả cho rằng có ít nhất 12 loại độc tố chuyên biệt (HSTs – Host Specific Toxins) hay còn gọi là độc tố AT được sinh ra từ nấm *Alternaria alternata*, độc tố AT đóng vai trò quan trọng trong việc gây bệnh trên cây thuốc lá.

Các độc tố được sinh ra từ *Alternaria* có trong thiên nhiên thuộc dạng chất chuyển hóa thứ cấp. Nấm *Alternaria* spp. nhiễm trên nhiều loại thực phẩm và phát

triển trên các vật liệu khác như đất, giấy dán tường, vải sợi, gỗ mục, bột gỗ và phân ủ cũng có thể là môi trường ưa thích cho loại nấm này. Trong đó, loài *A. alternata* đã được ghi nhận là loài sinh ra các độc tố quan trọng như AOH, AME, ALT, iso-ALT, TeA và ATX-I, -II, -III (Ostry, 2008).

**Bảng 1.2.** Các độc tố quan trọng do các loài *Alternaria* sinh ra

Loài <i>Alternaria</i>	Loại độc tố <i>Alternaria</i>	Nguồn tham khảo
<i>A. alternata</i> (Fr.) Keissler	AOH, AME, iso-ALT, TeA, ATX-I, -II, -III	Ostry, 2008
<i>A. brassicae</i> (Berk.) Sacc.	AOH, AME	Bottalico và Logrieco, 1998
<i>A. capsici-anui</i> Săvul. & Sandu	AOH, AME, TeA	Bottalico và Logrieco, 1998
<i>A. cassiae</i> Jurair & A. Khan	ATX-I, -II	Hradil và cộng sự, 1989
<i>A. citri</i> Ell. & Pierce	AOH, AME, TeA	Freeman, 1965; Kinoshita và cộng sự, 1972
<i>A. cucumerina</i> (Ell. & Ev.) Elliott	AOH, AME	Raistrick và cộng sự, 1953; Freeman, 1965
<i>A. dauci</i> (Kuhn) Groves & Skolko	AOH, AME	Freeman, 1965; Raistrick và cộng sự, 1953
<i>A. japonica</i> Yoshii	TeA	Kinoshita và cộng sự, 1972
<i>A. kikuchiana</i> Tanaka	AOH, AME, TeA	Tirokata và cộng sự, 1969; Kinoshita và cộng sự, 1972; Kameda và cộng sự, 1973
<i>A. longipes</i> (Ell. & Ev.)	AME, TeA	Mikami và cộng sự, 1971; Bottalico và Logrieco, 1998
<i>A. mali</i> Roberts	ATX-I, -II, -III, TeA	Kinoshita và cộng sự, 1972
<i>A. oryzae</i> Hara	TeA	Kinoshita và cộng sự, 1972
<i>A. porri</i> (Ell.) Cif.	AME, TeA	Bottalico và Logrieco, 1998
<i>A. radicina</i> Meier, Drechsler & Eddy	ATX-I, -II, -III, TeA	Bottalico và Logrieco, 1998; Solfrizzo và cộng sự, 2005
<i>A. solani</i> Sorauer	AOH, AME, TeA	Stoessl, 1969; Pollock và cộng sự, 1982; Bottalico và Logrieco, 1998
<i>A. tenuissima</i> (Kunze) Wiltshire	AOH, AME, ATX-I, -III, TeA	Davies và cộng sự, 1977; Young và cộng sự, 1980; Bottalico và Logrieco, 1998
<i>A. tomato</i> (Cooke) Jones	AOH, AME, ATX-I, -II, -III, TeA	Bottalico và Logrieco, 1998

(Nguồn: Ostry, 2008)

*Alternaria* được phân lập và nuôi cấy trên môi trường nhân tạo trong phòng thí nghiệm; kết quả nghiên cứu cho thấy khi cho chuột và gà ăn nguồn nấm *Alternaria* có gây độc cho phôi thai chuột, phôi thai gà. Độc tố sinh ra từ *A. alternata* có khả năng là một yếu tố trong nguyên nhân gây bệnh ung thư thực quản con người ở tỉnh Linxian - Trung Quốc. Đặc tính gây đột biến gen và ung thư của AME, AOH và sự liên quan đến nguyên nhân ung thư thực quản con người đã được nghiên cứu. (1) AME và AOH

có thể gây đột biến gen tế bào và biến đổi tế bào, (2) AME và AOH có thể kết hợp với DNA tách ra từ biểu mô thực quản thai nhi, hoạt hóa chất phát sinh khối u c-H-ras và c-mys, thúc đẩy biểu mô thực quản phôi thai trong thí nghiệm, (3) tế bào vảy biểu mô thực quản thai nhi bị ung thư có thể do AOH (trích dẫn bởi Ostry, 2008).

#### **1.4. Một số kết quả nghiên cứu về di truyền và định danh *Alternaria***

Trong những năm gần đây, nhờ ứng dụng của sinh học phân tử đã có nhiều nghiên cứu về sự đa dạng di truyền cũng như thành công trong việc xác định tên loài của nhiều loại nấm gây bệnh cho cây trồng. Chi *Alternaria* là một nấm đa dạng về loài và gây hại phổ biến trên cây trồng, một số loài có thể sống hoại sinh trong đất, trên mô thực vật đã chết. Đa số các loài *Alternaria* là tác nhân gây bệnh trên nhiều loại cây trồng quan trọng và làm ảnh hưởng cho nền kinh tế trên toàn thế giới. Chi *Alternaria* là nấm sinh bào tử và hầu hết các loài *Alternaria* không được biết đến giai đoạn sinh sản hoàn chỉnh. Phân loại *Alternaria* chủ yếu dựa vào đặc điểm hình thái, sự phát triển bào tử và cành bào tử, ở một mức độ thấp hơn dựa vào cây ký chủ và hình thái tản nấm (trích dẫn bởi Gherbawy, 2005).

Phân tích di truyền của quần thể tác nhân gây bệnh thực vật là nền tảng cho sự hiểu biết về dịch tễ học, quá trình tiến hóa của ký chủ và tác nhân gây bệnh và quản lý tính kháng (Milgroom và Fary, 1997). Bằng cách này, mối quan hệ phân tử giữa các loài *Alternaria* dựa trên DNA ribosome nhân và các độc tố thực vật chuyên tính hoặc với các loại nấm khác có liên quan đã được phân tích (Kusaba và Tsuge; 1994, 1995).

Nghiên cứu sự đa dạng di truyền của 9 loài trong 27 mẫu phân lập *Alternaria* spp. từ các loại cây trồng phổ biến ở Ai Cập bằng 4 primer RAPD khác nhau cho thấy sự tương đồng về gen giữa các nhóm loài *Alternaria alternata* biến động từ 14,8 – 100%, có sự đa dạng về di truyền rất lớn giữa các mẫu phân lập *Alternaria* và thậm chí trong cùng một nhóm loài (Gherbawy, 2005).

Các loài thuộc chi *Alternaria* là tác nhân gây bệnh phổ biến trên lúa mì và các loại ngũ cốc khác, gây ra bệnh cháy lá, đốm đen lúa mì và là nguồn ô nhiễm thực phẩm do độc tố. Phân tích 101 mẫu phân lập từ hạt lúa mì và các cây ký chủ khác ở Nga bằng kỹ thuật AFLP. Trong tổng số 101 mẫu phân lập của *A. tenuissima* cho thấy mức độ tương đồng quần thể là rất cao. Dựa trên chỉ số Wright cố định (FST) không

tìm thấy sự khác biệt giữa các mẫu phân lập có nguồn gốc từ lúa mì, lúa mạch (Philipp và cộng sự, 2007).

Sử dụng phương pháp tiếp cận phá hệ nghiên cứu sự đa dạng di truyền và quá trình tiến hóa của *A. solani* trên cây cà chua và khoai tây ở Brazil. Kết quả đã chứng minh rằng quần thể *A. solani* gây bệnh cháy lá sớm trên cây khoai tây có sự khác biệt về mặt di truyền so với các quần thể gây bệnh cháy lá sớm trên cây cà chua. Quần thể *A. solani* là dòng vô tính, có sự lai chéo của các gen và sự đột biến chính là quá trình tiến hóa về kiểu hình của cấu trúc di truyền của *A. solani* (Valdir, 2009).

Sự đa dạng về di truyền của vi sinh vật có thể xác định bằng cách áp dụng các kỹ thuật khác nhau như: RFLP, AFLP, RAPD (William và cộng sự, 1990). Nasim và cộng sự (2012) đã chứng minh có sự khác nhau về mặt di truyền giữa các mẫu phân lập *A. alternata* bằng kỹ thuật phân tích RAPD. Morris và cộng sự (2000), phân biệt 69 mẫu phân lập *A. alternata* từ quả cà chua bị bệnh ở California và cũng xác định có sự khác biệt di truyền khi phân tích RAPD. Tương tự, Welsh và McClelland (1990) cũng báo cáo việc sử dụng phân tích RAPD để tìm đa hình DNA các mẫu phân lập *Alternaria* khác nhau thu thập từ ngân hàng nấm ở Pakistan. Iram và Ahmad (2005) đã nghiên cứu sự đa dạng di truyền của *A. alternata* gây bệnh trên cây lúa mì và lúa ở Pakistan bằng kỹ thuật RAPD đã chứng minh được giữa hình thái, tính gây bệnh và biến đổi di truyền của *A. alternata* có sự tương quan thuận với nhau. Francisco và cộng sự (2009) xác nhận đa dạng di truyền của *Alternaria alternata* ở Brazil bằng phương pháp AFLP và RAPD trên hai mươi bốn chủng gây bệnh của *A. alternata* f. sp. *citri* từ cây cam quýt và bốn mẫu phân lập từ xoài (một *Alternaria tenuissima* và ba *Alternaria arborescens*). Cả hai phân tích RAPD và AFLP đều có hiệu quả để phát hiện ra các biến đổi di truyền trong quần thể của *Alternaria* spp.

Peever và cộng sự (2000) nghiên cứu sự khác biệt di truyền và ký chủ chuyên biệt của quần thể *Alternaria* spp. gây bệnh đốm nâu trên bưởi và cây lai Bưởi x Quýt ở Florida. Quần thể *Alternaria* spp. trên hai giống lai, Minneola và Orlando ở năm địa điểm trên khắp Florida có mức độ khác nhau giữa các khu vực. Mẫu phân lập từ bưởi và giống lai Nova có khác biệt về mặt di truyền so với các phân lập từ các giống lai khác như Robinson, Sun-burst, Minneola, Orlando và Murcott.

Pryor và Gilbertson (2000) nghiên cứu mối quan hệ ở mức độ phân tử giữa loài *Alternaria* và các loài nấm có liên quan dựa trên phân tích trình tự vùng ITS và các chuỗi rDNA ty thể SSU. Phân tích bằng phương pháp Neighbour joining, kết quả cho thấy *Stemphylium* spp. có nguồn gốc phát sinh khác biệt hơn so với *Alternaria* và *Ulocladium* spp. Dựa trên chuỗi trình tự xác định ITS và 18S rDNA, *A. longissima* có liên quan chặt chẽ nhất với *Leptosphaeria*.

Chou và Wu (2002) phân tích vùng ITS1 và ITS2 của 11 loại nấm khác nhau gồm 8 loài nấm *Alternaria*, *Nimbya gomphrenae*, *Stemphylium vesicarium* và *Ulocladium botrytis*. Phân tích mối quan hệ phát sinh loài với 36 loài thuộc chi *Pleosporaceae* trong GenBank. Sử dụng phương pháp khoảng cách và parsimony đã xác định vị trí của các *Alternaria* với cấu trúc cổ bào tử như là một nhóm đơn ngành rời rạc so với các nhóm khác trong chi *Alternaria*. Một giả thuyết đề xuất các loài *Alternaria* với cấu trúc có cổ bào tử liên quan đến một lộ trình tiến hóa đặc biệt khác hẳn so với các loài khác dựa trên những bằng chứng phân tử, những đặc điểm của sự thích nghi về mặt hình thái.

Năm 2007, phân tích hình thái và trình tự ITS của 14 mẫu phân lập *Alternaria* của 8 loài khác nhau chỉ ra rằng các mẫu phân lập này đại diện cho một loài mới là *A. hungarica*. Các bào tử của *A. hungarica* thường là bào tử đơn giống hệt với *A. mouchaccae* và *A. molesta*. Phân tích phát sinh loài dựa vào chuỗi trình tự ITS chỉ ra rằng loài mới này có thể phân biệt với tất cả các loài *Alternaria* và *Embellisia* khác. Kiểm tra về bệnh học cho thấy *A. hungarica* có thể được coi là một tác nhân gây bệnh trên cây lúa mì (Simmons, 2007).

Linde và cộng sự (2010) đã nghiên cứu về đa dạng di truyền trong quần thể *Alternaria brassicicola* gây hại trên cây cải *Cakile maritima* ở Úc. Sự thiết lập quần thể của nấm gây bệnh có mức độ đa dạng di truyền thấp cùng với sự biến đổi di truyền. Sử dụng các marker microsatellite trong sự tương tác giữa cây cải *Cakile maritima* và nấm *Alternaria brassicicola* để tìm hiểu về di truyền, kết quả cho thấy *A. brassicicola* sinh sản hữu tính.

Nasim và cộng sự (2012) đã sử dụng kỹ thuật RAPD để xác định chủng loài của 10 mẫu phân lập *Alternaria alternata*. Phân tích về sự giống nhau giữa các cặp băng DNA cho thấy các chủng nấm đã gom lại trong hai nhóm riêng biệt.

Bashir và cộng sự (2014) đã phát hiện sự bùng phát của bệnh đốm lá trên cà chua do *Alternaria metachromatica* ở Lahore thuộc Pakistan. Bước đầu đã xác định tác nhân gây hại bằng cách dựa trên những đặc điểm về hình thái học và được khẳng định lại một lần nữa nhờ vào chuỗi trình tự rDNA.

Maria và cộng sự (2010) nghiên cứu xác định tên loài *Alternaria* gây thối cải bông xanh dựa vào phương pháp hình thái học kết hợp với giải trình tự DNA vùng ITS, kết quả đã xác định có 2 loài *Alternaria* gây bệnh thối cải bông xanh ở Mexico là *A. tenuissima* và *A. alternata* với độ tương đồng lần lượt là 99% và 100%.

Keissler (1912) đồng nghĩa hoá cả *A. tenuis* và *Torula alternata* với *Alternaria alternata*, do sự mơ hồ trong mô tả của Nees về *A. tenuis*. Hai chi bổ sung là *Stemphylium* và *Ulocladium* sau đó được mô tả thuộc lớp hyphomycetes, làm phức tạp thêm mức độ phân loại của nhóm nấm này. Nhiều chỉ tiêu được thiết lập để mô tả và duyệt xét lại đối với chi *Alternaria* dẫn đến số lượng loài mới ngày càng gia tăng. Kết quả từ một nghiên cứu vòng đời phân loại *Alternaria* dựa trên đặc điểm hình thái đã được nêu ra một cách vắng tắt trong đó 275 loài *Alternaria* đã được công nhận. Một loài đã được di chuyển vào chi *Prathoda* và ba chi mới là *Alternariaster*, *Chalastospora* và *Teretispora* được tách từ *Alternaria* (Simmons, 2007).

Nghiên cứu ở mức độ phân tử cho thấy trong cùng một phức hợp *Alternaria* và nhánh loài *Alternaria* và những chi này không phải lúc nào cũng tương quan với các nhóm loài dựa trên đặc tính hình thái. Loài *A. alternata*, *A. brassicicola*, *A. infectoria*, *A. porri* và *A. radicina* được nghiên cứu kỹ và hai loài mới là *A. sonchi*, *A. alternantherae* và ba chi mới là *Crivellia*, *Undifilum* và *Sinomyces* cũng đã được mô tả. Nghiên cứu mới nhất ở mức độ phân tử đối với loài *Alternaria* đã đề xuất hai loài mới là *A. panax*, *A. gypsophilae* và tám loài được phân loại vào phân vùng trong cùng nhóm với *Alternaria*. Di truyền phát sinh loài hữu tính của *Alternaria* có loài *A. infectoria*, đã không được phân vùng, trái ngược với tám dòng phát sinh loài vô tính trong *Alternaria*. Phức hợp *Alternaria* hiện nay bao gồm các chi *Alternaria*, *Chalastospora*, *Crivellia*, *Embellisia*, *Nimbya*, *Stemphylium*, *Ulocladium*, *Undifilum* và *Sinomyces* gần đây cũng đã được mô tả cùng với tám phân vùng của *Alternaria* và nhóm loài *A. infectoria* (Simmons, 2007; Lawrence, 2012; Woudenberg, 2013).



Nghiên cứu sự đa dạng của *Alternaria alternata* ở Hoa Kỳ được thực hiện bởi Woudenberg và cộng sự (2015), bằng kỹ thuật giải trình tự gen ITS, GAPDH và endoPG. Kết quả cho thấy các loài của nhóm *Alternaria* đại diện cho 98% của 153 mẫu phân lập, trong đó 137 mẫu phân lập được xác định là *A. alternata*, còn lại là phức hợp loài *A. arborescens* và duy nhất một mẫu phân lập là *A. burnsii*. 2% còn lại (3 mẫu phân lập) đại diện cho nhóm *Infectoriae* (một mẫu) và nhóm *Pseudoulocladium* (2 mẫu).

Dựa trên 100% trình tự nucleotide vùng ITS của chi *Alternaria* trên GenBank và đặc điểm hình thái, những mẫu phân lập được xác định là *A. alternata*. Các primer chẩn đoán được phát triển trên vùng ITS và gen glucanase, endopolygalacturonase, hsp70 và histone. Kết quả từ nghiên cứu cho thấy *A. alternata* là một tác nhân chính gây bệnh cháy lá cây tử đinh hương (Mmbaga, 2011).

Zur và cộng sự (2002) đã phát triển các primer PCR trên vùng ITS có thể phát hiện *A. alternata* hoặc *A. solani*, nhưng thất bại trong việc phân biệt giữa hai loài này. Johnson và cộng sự (2000) đã phát triển một thí nghiệm PCR để khuếch đại gen độc tố AMT của *Alternaria* gây bệnh đốm trên táo và đã sử dụng kết quả này để phân biệt kiểu gây bệnh và không gây bệnh của *A. alternata*.

Năm 2017, Landschoot và cộng sự đã thực hiện nghiên cứu xác định *A. arborescens*, *A. grandis* và *A. protenta* là thành viên mới của quần thể *Alternaria* trên khoai tây ở Châu Âu. Dựa trên trình tự ITS và glyceraldehyd-3-phosphate dehydrogenase, *Alternaria* có bào tử nhỏ và bào tử lớn có thể được phân biệt rõ ràng với nhau. Phân tích trình tự gen Calmodulin và tiểu đơn vị lớn thứ hai RNA polymerase cho thấy bên cạnh *A. solani* còn có *A. grandis* và *A. protenta* hiện diện trong quần thể *Alternaria* bào tử lớn. Phân tích trình tự Alt a 1 và yếu tố kéo dài elongation factor- $\alpha$  cho thấy cả *A. alternata* và các loài thuộc phức hợp *A. arborescens* đều hiện diện trong quần thể *Alternaria* bào tử nhỏ. Hơn nữa, theo trình tự histone h3, các thành viên thuộc phức hợp loài *A. arborescens* có thể được chia thành hai nhóm chính. Nghiên cứu đưa ra kết luận đầu tiên xác định *A. arborescens*, *A. grandis* và *A. protenta* là những loài quan trọng góp phần trong bệnh đốm lá *Alternaria* khoai tây ở Châu Âu.

### 1.5. Độc tố của nấm *Alternaria* và mối liên quan đến mức độ bệnh do *Alternaria* gây ra trên cây trồng

Một số độc tố thực vật được phân lập từ các dịch lọc nuôi cấy được tạo ra bởi các loài nấm *Alternaria*. Tất cả đều có trọng lượng phân tử tương đối thấp, các hợp chất không thuộc dạng enzyme khác nhau, có cấu trúc từ các chuỗi peptide nhỏ đến phenol đơn giản. Vai trò của các hợp chất (nếu có) trong quá trình phát sinh bệnh vẫn chưa được chứng thực, nhưng xuất hiện nhiều lý lẽ thuyết phục rằng một vài trong số các hợp chất được tạo ra bởi các loài *Alternaria* tham gia vào sự phát triển triệu chứng bệnh vào những thời điểm nhất định trong suốt giai đoạn nhiễm, ủ bệnh của nấm trên cây ký chủ. Sự trao đổi giữa ký sinh và ký chủ là một khái niệm đã được thừa nhận kể từ khi thành lập học thuyết bệnh vi trùng (Templeton, 1972).

Các lập luận về sự tham gia của độc tố thực vật vào quá trình phát sinh bệnh tập trung chủ yếu vào hai điểm chính: (1) ký chủ chuyên biệt, tức là độc tố thực vật chỉ ảnh hưởng đến những ký chủ mà nấm sẽ nhiễm và mất khả năng tạo ra độc tố trong nuôi cấy đi kèm với mất khả năng gây bệnh; Hoặc (2) các ảnh hưởng bệnh lý của độc tố rất rõ ràng tương tự tất cả hay một phần so với triệu chứng của bệnh ký sinh, có thể có sự liên quan của độc tố. Hai điểm này là cơ sở để phân loại các chất chuyển hóa thứ cấp của nấm ký sinh thực vật có khả năng gây bệnh như là các yếu tố quyết định chính yếu hoặc thứ yếu của tính gây bệnh. Cả hai yếu tố chính yếu và thứ yếu của tính gây bệnh được tìm thấy trong số các độc tố được tạo ra bởi các loài *Alternaria* trong môi trường nuôi cấy nhân tạo (Templeton, 1972).

Tìm hiểu về bệnh đốm đen trên lê Nhật Bản do *Alternaria kikuchiana* gây ra, triệu chứng bệnh xuất hiện trên lá và quả là những đốm nhỏ màu đen, trở nên hoại tử và quầng vàng bao xung quanh vết bệnh. *Alternaria kikuchiana* là loài nấm có khả năng tạo ra các chất chuyển hóa thứ cấp trong môi trường nuôi cấy gây ra các triệu chứng đốm đen khi nhỏ một giọt dung dịch chất chuyển hóa lên vị trí gây vết thương trên lá. Phytoalternarin A, B, và C đã được trích xuất từ các hỗn hợp dịch lọc và màng sợi nấm bằng cách sử dụng phương pháp thử nghiệm sinh học trên lá lê giống Nijisseiki, có gây vết thương. Phytoalternarin A, B, và C là các protein hoặc peptide có trọng lượng phân tử thấp. Trong một thí nghiệm hoạt tính sinh học, phytoalternarin A được chứng minh là có cùng độ đặc hiệu ký chủ như là nấm trên ba giống lê mẫn cảm

và mười bốn giống kháng. Ảnh hưởng của phytoalternarin giống hết các triệu chứng nhiễm nấm trên các mô ở các độ tuổi khác nhau (tuổi mô và kích thước đốm bệnh có tương quan nghịch) và ở đó nhiệt độ tối ưu cho sự phát triển bệnh xảy ra trùng với nhiệt độ tối ưu cho biểu hiện triệu chứng khi sử dụng độc tố tinh (trích dẫn bởi Templeton, 1972).

Sử dụng các điều kiện nuôi cấy và phương pháp thử nghiệm sinh học khác nhau trong một số chỉ tiêu để trích xuất altenin bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng, một chất chuyển hóa khác từ *A. kikuchiana*, gây bệnh đốm đen trên giống lê Nijisseiki (trích dẫn bởi Templeton, 1972).

Acid alternaric đã được phân lập từ các dịch cây của *Alternaria solani*. *A. solani* là nguyên nhân gây bệnh đốm vòng trên cà chua và khoai tây. Cô lập acid alternaric từ các dịch lọc của *A. solani* bằng cách sử dụng một phân tích thí nghiệm dựa trên hoạt tính ức chế của nó trong quá trình nảy mầm của *Botrytis allii*. Acid alternaric ức chế sự nảy mầm, gây héo hoặc úa vàng và hoại tử ở một số thực vật bậc cao và ức chế sự nảy mầm của bào tử *Salmonella*, *Myrothecium verucaria* và *Stachybotrys atra* ở nồng độ từ 0,1 đến 1,0 µg/ml, trong khi đó ở nồng độ cao đến 200 µg/ml chỉ làm chậm tốc độ tăng trưởng của nấm *Botrytis allii*, *Fusarium caeruleum* và *Penicillium digitatum*. Ở những thực vật bậc cao hơn, acid alternaric gây ra héo và tiếp theo là gây chết cây con khi cho vào trong các dung dịch dinh dưỡng ở nồng độ 5 – 10 µg/ml đối với cây củ cải non, cải bắp, mù tạc và cà rốt; trong khi cà chua, đậu và củ cải đường không bị ảnh hưởng sau 7 đến 10 ngày. Rất giống với các tổn thương liên quan đến một số giai đoạn sinh bệnh bởi *A. solani*. Acid alternaric cũng gây ra những tổn thương tương tự đối với thực vật ngoài phạm vi ký chủ của *A. solani*, như *Atropa belladonna* L., *Solanum dulcamara* L., *Urtica dioica* L. và *Chamaenerion angustifolium* (L.) Scop (trích dẫn bởi Templeton, 1972).

Tentoxin đã được phân lập từ dịch lọc và sợi nấm của *Alternaria tenuis*, là tác nhân gây bệnh vàng úa cây con trên cây bông, cam quýt và nhiều loại cây con khác. Các đốm lá của thuốc lá và bông bị nhiễm *A. tenuis* thường chỉ hiển thị các vùng úa vàng nhẹ ở rìa lá. Trên lá táo non đã được gây nhiễm với *A. tenuis*, các vết đốm vàng nhỏ được hình thành và sẽ biến mất trong vòng 3 đến 4 tháng. Trong trường hợp lá táo

thành thực không có triệu chứng rõ ràng sau khi lây nhiễm *A. tenuis* (trích dẫn bởi Templeton, 1972).

Zinniol có nguồn gốc từ nấm *Alternaria zinnia*, bệnh thông thường phát sinh từ một điểm trên lá và gây tàn phá ở cây con họ cúc, hướng dương và cúc vạn thọ. Những đốm nâu nhỏ đặc trưng xuất hiện trên lá mầm, lá, thân và hoa. Khi lá cúc bị nhiễm nhiều đốm thì chúng trở nên khô và có màu nâu. Zinniol cũng ức chế sự nảy mầm của cúc lá nhám, cà chua, rau diếp, dưa hấu và hạt cà rốt. Nồng độ 1000 ppm gây teo rụng cành cây con ở dưa hấu, bí, củ cải đường, cà chua, yến mạch, bắp, đậu (trích dẫn bởi Templeton, 1972).

### **1.6. Các kết quả nghiên cứu về độc tố của nấm *Alternaria***

*Alternaria* là một chi phổ biến, gây hại một số loài cây trồng ở giai đoạn trước và sau thu hoạch; gây thiệt hại đáng kể cho cây ăn quả và rau màu. Dưới điều kiện thích hợp *Alternaria* có thể sản sinh ra một loạt các độc tố cũng như các chất chuyển hóa khác ít độc hại. *A. alternata* được ghi nhận là loài quan trọng nhất trong việc sản sinh ra các độc tố và thường xảy ra ở các hạt có dầu như: hạt ngũ cốc, hạt hướng dương, hạt ô liu, các loại rau quả (Lizaso và cộng sự, 2006).

Độc tố do nấm *Alternaria* sinh ra trong tự nhiên là acid tenuazonic, alternariol monomethyl ether, alternariol, altenuene, altertoxin iso-altenuene I. AAL là chất độc được sản sinh bởi *A. alternata* f. sp. *lycopersici*, một ít được sinh ra từ *A. alternata* và có cấu tạo liên quan đến fumonisins trong thức ăn ủ chua. Hầu hết các loại độc tố do nấm *Alternaria* tiết ra đều gây độc cho các tế bào hoạt động, độc với động vật có vú. *Alternaria alternata* còn là nguyên nhân gây nên triệu chứng bệnh suyễn cho người, triệu chứng này xảy ra khi mật số bào tử nấm trong môi trường không khí cao (Lizaso và cộng sự, 2006).

Các độc tố được sản sinh bởi các loài *Alternaria* gây bệnh trên nhiều loại cây trồng. *Alternaria* là tác nhân gây bệnh chủ yếu trên cây lúa mì, lúa miến, lúa mạch, trên các hạt có dầu như: hạt hướng dương, hạt ngũ cốc, cải dầu, cà chua, táo, cam, quýt, oliu và các loại rau quả khác. *Alternaria alternata* là loài gây hại nhiều nhất trên các loại cây rau quả và là loài sản sinh ra độc tố quan trọng nhất (EFSA, 2011). *Alternaria* sản sinh hơn 70 độc tố nhờ sự chuyển hóa thứ cấp, một tỷ lệ nhỏ các độc tố thực vật (phytotoxin) đã được xác định đặc tính hóa học và báo cáo tác động của độc

tổ nấm (mycotoxin) đến con người và động vật. Dựa trên tác dụng của *Alternaria* đối với cây trồng, độc tố *Alternaria* được chia làm 2 loại: độc tố không chuyên tính ký chủ (Non host specific toxins) và độc tố chuyên tính ký chủ (Host specific toxins). Một số độc tố không chọn lọc ký chủ như alternariol, alternariol monomethyl ether, acid tenuazonic và altertoxin đã được thử nghiệm riêng lẻ và được mô tả có khả năng gây ra các tác động có hại cho động vật, bao gồm cả tác động gây độc cho thai nhi và gây quái thai (Trích dẫn bởi EFSA, 2011). Một số kiểu bệnh của loài *A. alternata* cũng đã được xác định dựa trên sự hiện diện của các độc tố chuyên tính ký chủ (Thomma, 2003; Somma và cộng sự, 2011).

Một nghiên cứu khác của Slavov và cộng sự (2004) về khả năng sản sinh ra các độc tố chuyên tính từ nấm *A. alternata*. Tác giả cho rằng có ít nhất 12 loại độc tố thực vật chuyên tính (HSTs – Host Specific Toxins) được sinh ra từ các loài nấm *Alternaria* khác nhau, hầu hết 12 loại độc tố này được sinh ra từ các dòng lai của nấm *A. alternata*. Trong số 12 loại độc tố thì loại độc tố AT được sinh ra từ cây thuốc lá bị bệnh do nấm *A. alternata* và nó đóng vai trò cho việc gây bệnh trên cây thuốc lá.

Nhiều mẫu phân lập *A. alternata* được biết đến có khả năng sinh ra một loạt các enzym phân hủy vách tế bào. Các hợp chất chuyển hóa thứ cấp này đóng vai trò xâm nhiễm và gây bệnh. Các hợp chất chuyển hóa thứ cấp cho phép các loại nấm làm suy giảm các polyme thành tế bào, chẳng hạn như cellulose, hemicelluloses và pectin (Walton, 2000). Nghiên cứu trước đây cho thấy sự tham gia của endoglucanases và exoglucanases trong khả năng gây bệnh và mối tương quan giữa sự sản sinh ra các enzyme và phát triển triệu chứng bệnh có liên quan giữa *A. alternata* và cây ký chủ (Eshel và cộng sự, 2000; 2002a; 2002b).

## CHƯƠNG 2

### VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

#### 2.1. Nội dung nghiên cứu

1). Xác định tên loài và khảo sát một số đặc tính sinh học, đặc điểm hình thái của các mẫu phân lập *Alternaria* spp. gây bệnh đốm nâu trên cây chanh dây.

2). Xác định khả năng gây bệnh của các loài *Alternaria* spp. trên lá và quả chanh dây và xác định cỏ dại, cây trồng nhiễm *Alternaria* trong vườn chanh dây bị bệnh đốm nâu.

3). Đánh giá khả năng gây bệnh của các mẫu phân lập *Alternaria* spp. trên một số loại cây ký chủ.

4). Xác định sự hiện diện của độc tố alternariol sinh ra từ *Alternaria* spp. và khảo sát ảnh hưởng của các hợp chất thứ cấp sinh ra từ *Alternaria* spp. đến khả năng gây bệnh trên lá, ngọn chanh dây.

#### 2.2. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

##### 2.2.1. Thời gian nghiên cứu

Đề tài đã được tiến hành từ tháng 12 năm 2013 đến tháng 5 năm 2020.

##### 2.2.2. Địa điểm nghiên cứu

Thu thập mẫu bệnh được tiến hành tại hai vùng trồng chanh dây là Đắc Nông, Lâm Đồng và chanh dây giống nhập khẩu từ Đài Loan tại cảng hàng không Tân Sơn Nhất.

Phân lập và định danh nấm được tiến hành tại phòng thí nghiệm bệnh cây thuộc Trung tâm Kiểm dịch thực vật sau nhập khẩu II và Bộ môn Công nghệ sinh học thuộc trường Đại học Nông lâm TP.HCM.

Xác định sự hiện diện của độc tố nấm *Alternaria* được tiến hành tại phòng thí nghiệm hóa – Viện Công nghệ sinh học và môi trường thuộc trường Đại học Nông lâm TP.HCM và Trung tâm Kiểm định và Khảo nghiệm thuốc bảo vệ thực vật phía Nam – Cục Bảo vệ thực vật.

Thí nghiệm chủng bệnh được thực hiện tại nhà lưới Bộ môn Công nghệ sinh học thuộc trường Đại học Nông lâm TP.HCM và Trung tâm Kiểm dịch thực vật sau nhập khẩu II.

### **2.3. Dụng cụ, thiết bị phục vụ nghiên cứu**

Các trang thiết bị gồm: nồi hấp khử trùng (ALP, CL-32L), cân điện tử (Precisa, 205 A SCS), bếp điện, tủ sấy (Mettler, D6072), tủ định ôn (Sanyo, MIR-253), tủ lạnh (Alaska, BD300C), tủ âm sâu (Sanyo, MDF-U32V), buồng cấy (ESI Flufrance, Eurocyt 95), lò vi sóng (Electrolux, EMM2015S), kính hiển vi (Olympus, CX31), kính lúp soi nổi (Olympus, SZX7), máy ảnh kỹ thuật số (Canon), máy định vị, máy khuấy từ (Sigma, IKA RH-KT/C), bể ổn nhiệt (Mettler, WNB-14), máy PCR (Eppendorf, Mastercycler Gradient No.5331), máy làm khô DNA (Eppendorf, Concentrator 5301), máy sắc ký lỏng, máy ly tâm (Eppendorf, Centrifuge 5415R), máy điện di (UVP Consort, E844) và hệ thống chụp hình và phân tích hình ảnh sau điện di (UVP, Transilluminator).

Một số dụng cụ thí nghiệm trong phòng gồm: bình tam giác, ống đong, cốc đong, đĩa petri, đèn cồn, que cấy, dao mổ, thước đo kích thước bào tử nấm, lam, lamên, các loại đầu típ (10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl), ống eppendorf (100 µl, 1500 µl), micropipette và bình chứa nitơ lỏng. Các dụng cụ khác như: túi nilon, túi giấy, chậu trồng cây, dao, kéo, bình phun nước, bình phun bào tử nấm khi chủng bệnh và hộp nhựa.

### **2.4. Đối tượng, khách thể và giới hạn nghiên cứu**

Đối tượng nghiên cứu: Các MPL *Alternaria* spp. được phân lập từ cây chanh dây Đài Nông 1, chanh dây gốc ghép bị bệnh đốm nâu tại Đắc Nông, Lâm Đồng và cây giống nhập khẩu qua cảng hàng không Tân Sơn Nhất.

Khách thể nghiên cứu: Cây chanh dây cho quả màu tím giống Đài Nông 1 (*Passiflora edulis* f. *edulis*) và chanh dây cho quả màu vàng (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*).

Giới hạn địa điểm nghiên cứu: Nghiên cứu chỉ tiến hành thu thập mẫu bệnh trên chanh dây tại tỉnh Đắc Nông, Lâm Đồng và trên cây giống nhập khẩu từ Đài Loan qua cảng hàng không Tân Sơn Nhất.

Giới hạn nội dung nghiên cứu: Nghiên cứu chỉ tiến hành với độc tố AOH và khảo sát ảnh hưởng của các dung dịch môi trường nuôi nấm, dung dịch chất chuẩn AOH trên lá và ngọn chanh dây.

## **2.5. Phương pháp nghiên cứu**

### **2.5.1. Phương pháp thu thập mẫu bệnh và bảo quản mẫu**

Mẫu cỏ dại, mẫu cây trồng xen, mẫu chanh dây có triệu chứng đốm nâu được thu thập từ các vườn trồng chanh dây ở tỉnh Đắk Nông, Lâm Đồng theo phương pháp của McMaugh (2008) và thu thập cây chanh dây được nhập khẩu từ Đài Loan tại cảng hàng không Tân Sơn Nhất bằng cách tiến hành lấy mẫu theo Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia QCVN 01-141: 2013/BNNPTNT về phương pháp lấy mẫu kiểm dịch thực vật do Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn ban hành. Quản lý và bảo quản mẫu áp dụng theo phương pháp của Roger và cộng sự (2005). Mẫu bệnh sau khi được thu thập, nhanh chóng vận chuyển về phòng thí nghiệm để lưu trữ và bảo quản mẫu trong tủ mát (Alaska, BD300C) ở nhiệt độ 4<sup>0</sup>C.

### **2.5.2. Phương pháp phân lập tác nhân gây bệnh**

Áp dụng theo phương pháp của Shivas và cộng sự (2005) cho việc phân lập nấm bệnh từ mô cây bị bệnh (Chi tiết phương pháp phân lập tác nhân gây bệnh từ mẫu lá và mẫu quả xem phụ lục 5).

### **2.5.3. Phương pháp thu đơn bào tử**

Thu bào tử đơn đã được chuẩn bị cho mỗi phân lập bằng cách pha loãng dung dịch bào tử của các mẫu phân lập *Alternaria* spp.; khoảng 50 bào tử được cấy trang trên WA. Sau khi các bào tử nảy mầm được quan sát dưới kính lúp soi nổi, chọn những bào tử dạng đơn và cấy vào đĩa petri có chứa PCA (Chi tiết phương pháp chuẩn bị môi trường nuôi cấy xem phụ lục 6). Các mẫu phân lập khác nhau được duy trì trên PCA ở 25°C để thực hiện các thí nghiệm khác nhau (McKenzie, 2008; Siciliano, 2017).

### **2.5.4. Phương pháp xác định tên loài của các MPL *Alternaria* spp. dựa vào các đặc điểm hình thái**

#### **2.5.4.1. Phương pháp đo kích thước bào tử**

Phương pháp đo kích thước bào tử dưới kính hiển vi được tiến hành trước tiên là việc canh chỉnh thước đo chuẩn trên kính hiển vi và xác định hệ số đo. Chuẩn bị mẫu đo và tiến hành đo kích thước bào tử nấm theo chiều dài và chiều rộng tại vị trí



lớn nhất; đo ngẫu nhiên 30 bào tử, 10 cành bào tử có kích thước lớn nhỏ khác nhau, từ đó tính được kích thước bào tử và cành bào tử trung bình.

#### 2.5.4.2. Phương pháp nuôi ủ nấm trên lam

Phương pháp thực hiện được tiến hành theo phương pháp của McKenzie (2008): Đặt một phiến lam lên trên tờ giấy thấm đã được làm ẩm bằng dung dịch glycerine 20%. Hấp vô trùng 121°C trong 20 phút. Cho 15 ml môi trường PCA vào trong đĩa petri có đường kính 9 cm. Khi môi trường PCA đông cứng cắt thành nhiều mảnh có kích thước 1 cm<sup>2</sup>. Đặt một mảnh môi trường này lên trên phiến lam vô trùng. Dùng que cấy lấy một ít nấm đặt cạnh rìa của mảnh agar. Đặt một miếng lam lên trên mảnh agar. Sau 2 – 7 ngày lấy miếng lamen ra và đặt mặt dưới của lamen lên trên một lam sạch có chứa một giọt dung dịch lactophenol. Loại bỏ mảnh agar, cho thêm một giọt dung dịch lactophenol lên trên lam, đẩy lamen và đưa lam lên kính hiển vi để quan sát cấu trúc cành bào tử.

#### 2.5.4.3. Mô tả và định danh các loài của *Alternaria* dựa vào các đặc điểm hình thái

Sử dụng phương pháp mô tả đặc điểm hình thái và định danh dựa vào khóa phân loại, định danh của Simmons (2007). Các chỉ tiêu theo dõi như: 1/ màu sắc tản nấm, hình thái tản nấm (có vòng đồng tâm hay không có, có bao nhiêu vòng đồng tâm, tản nấm phát triển như thế nào), sự phân bố của tản nấm, đường kính tản nấm và hình thành bào tử sau bao nhiêu ngày nuôi cấy trên môi trường PCA hoặc V – 8 juice; 2/ mô tả hình thái cành, cấu trúc cành bào tử, bào tử dạng chuỗi được đính trên cành bào tử, chuỗi bào tử cấp một, bào tử thứ cấp, số lượng bào tử dạng chuỗi đính trên một cành; 3/ mô tả hình dạng bào tử đính non, già; kích thước bào tử non, bào tử già (bào tử thành thực); màu sắc bào tử; màu sắc và đặc điểm vách bào tử; số vách ngăn ngang, số vách ngăn dọc và đặc điểm trang trí những hạt đính xung quanh bào tử (nếu có); 4/ mô tả số lượng tế bào đầu (cổ bào tử) dạng thon nhọn kéo dài thành hình vòi hoặc hình sợi dây ngắn hay dài trên một bào tử.

Các MPL *Alternaria* được chọn và gửi mẫu chụp hình bằng kính hiển vi điện tử quét SU3500 tại Công ty TNHH Sao Đỏ (Hà Nội). Chụp hình các đặc điểm bào tử, cành bào tử, sợi nấm của các mẫu nhằm hỗ trợ cho việc định danh.

Phương pháp làm tiêu bản nấm và chụp hình SEM: Cắt băng dính cacbon thành nhiều đoạn, sau đó dán băng dính lên để mẫu, tiếp theo là cắt miếng thạch môi trường kích thước 3 x 4 cm có chứa sợi nấm và bào tử nấm *Alternaria* spp. được nuôi cấy trên môi trường PCA sau 7 ngày đối với loài *A. passiflorae* và 10 ngày đối với loài *A. tenuissima*.

Đặt đế mẫu vào kính hiển vi điện tử quét SU 3500 tiến hành quan sát mẫu, chọn những đặc điểm điển hình của *Alternaria* spp. và chụp hình với thế gia tốc 1 kV, hình ảnh được thu ở đầu dò SE.

### **2.5.5. Xác định tên loài của các MPL *Alternaria* spp. dựa vào trình tự vùng rDNA-ITS, actin và glyceraldehyde – 3 – phosphate dehydrogenase**

#### **2.5.5.1. Phương pháp ly trích DNA tổng số**

Các mẫu nấm được tăng sinh trong môi trường PGA lỏng ở 27 – 28°C, lắc 120 – 150 vòng/phút. Khối sợi nấm được thu sau 7 ngày, rửa với nước cất, để khô, cân 50 mg/mẫu và tồn trữ ở – 80°C cho đến khi sử dụng.

DNA tổng số được ly trích theo quy trình của Lee và Taylor (1990) có cải tiến cho phù hợp với điều kiện thực tế của phòng thí nghiệm. Nghiền 50mg sợi nấm *Alternaria* với nitor lỏng cho thật mịn, chuyển bột nấm vào eppendorf 1,5 ml. Sau đó thêm dịch đệm trích (50 mM Tris-HCl, pH 7.2, 50 mM EDTA, 3% SDS và 1%  $\beta$ - mercaptoethanol) và ủ ở 65°C trong 60 phút. Thêm vào 600  $\mu$ l hỗn hợp phenol: chloroform: isoamyl alcohol (25: 24: 1 v/v/v), trộn đều bằng vortex. Sau khi ly tâm 14.000 vòng/phút trong 15 phút ở 4°C, chuyển dịch nổi vào một ống eppendorf mới. Thêm 400  $\mu$ l hỗn hợp chloroform: isoamyl alcohol (24: 1 v/v), lắc nhẹ. Ly tâm 13.500 vòng/phút trong 20 phút ở 4°C, hút lấy dịch nổi (khoảng 300  $\mu$ l) vào một eppendorf mới. Dịch nổi được kết tủa với 0,6 thể tích isopropanol và 0,03 thể tích sodium acetate 3M. Ly tâm 14000 vòng/phút trong 5 phút ở 4°C. Loại bỏ dịch nổi, DNA kết tủa được rửa với ethanol 70%, để khô trong tủ sấy, hòa tan trong dịch đệm TE 1X (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) và tồn trữ ở – 20°C cho đến khi sử dụng. Kiểm tra sự hiện diện của DNA bằng cách điện di trên gel agarose 0,8% ở 100 V, 20 phút, trong dung dịch điện di TAE 0,5X.

#### **2.5.5.2. Phương pháp khuếch đại vùng rDNA-ITS, actin và glyceraldehyde – 3 – phosphate dehydrogenase**

Ba cặp primer: ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'), ITS5 (5'-GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G-3'); ACT512F (5'-ATG TGC AAG GCC GGT TTC GC-3'), ACT783R (5'-TAC GAG TCC TTC TGG CCC AT-3') và GDF1 (5'- GCC GTC AAC GAC CCC TTC ATT GA-3'), GDR1 (5'- GGG TGG AGT CGT ACT TGA GCA TGT-3') được sử dụng để khuếch đại vùng rDNA-ITS, actin và glyceraldehyde – 3 – phosphate dehydrogenase. Thể tích phản ứng là 50  $\mu$ l có chứa dung dịch đệm PCR 1X,

MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, dNTPs 400 μM, mỗi primer 200 pM, DNA khuôn 100 ng và Taq DNA polymerase 1U.

Phản ứng PCR được thực hiện theo chu kỳ nhiệt: 95°C trong 3 phút, tiếp theo là 95°C 1 phút, 60°C 30 giây, 72°C 1 phút, lặp lại 30 chu kỳ và 72°C 10 phút đối với primer ITS4 và ITS5.

Đối với primer ACT512F và ACT783R: thực hiện phản ứng PCR theo chu kỳ nhiệt 95°C trong 2 phút, tiếp theo là 95°C 30 giây, 60°C 30 giây, 72°C 45 giây, lặp lại 35 chu kỳ và 72°C 10 phút.

Thực hiện phản ứng PCR cho cặp primer GDF1 và GDR1 theo chu kỳ nhiệt: 95°C trong 3 phút, tiếp theo là 95°C 45 giây, 58°C 45 giây, 72°C 1 phút, lặp lại 35 chu kỳ và 72°C 10 phút.

Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng cách điện di trên gel agarose 1,5% ở 80 V, 47 phút, trong dung dịch điện di TAE 0,5X. Sản phẩm PCR sẽ được gửi giải trình tự tại công ty MacroGen ở Hàn Quốc. Các trình tự gen sau khi được giải mã sẽ được so sánh trình tự giữa các MPL với các trình tự của *Alternaria* spp. trên ngân hàng gen, đồng thời kết hợp với việc quan sát các đặc điểm hình thái để xác định tên loài của các MPL *Alternaria* spp.

## **2.6. Khảo sát một số đặc tính sinh học của các MPL *Alternaria* spp.**

### **2.6.1. Khả năng sinh trưởng của *Alternaria* spp. trên một số môi trường dinh dưỡng khác nhau**

Sáu mươi một (61) mẫu nấm của loài *Alternaria passiflorae* và 36 mẫu *Alternaria tenuissima* được nuôi cấy trên 3 loại môi trường: Modified – CMA, PCA và V – 8 juice (Chi tiết phương pháp chuẩn bị môi trường nuôi cấy xem phụ lục 6). Nghiệm thức thí nghiệm được lặp lại 3 lần với loài *Alternaria passiflorae* và 5 lần với loài *Alternaria tenuissima*, mỗi lần lặp lại là một đĩa petri.

Phương pháp tiến hành: các môi trường dinh dưỡng sau khi vô trùng được rót vào đĩa petri (có đường kính 9 cm), 20 ml môi trường/đĩa. Môi trường phải được rót vào đĩa petri 1 – 2 ngày trước khi làm thí nghiệm để cho bề mặt môi trường khô ráo và loại bỏ những đĩa môi trường bị nhiễm. Cấy một khoanh nấm có đường kính 3 mm có cùng độ tuổi (lấy từ mép tản nấm 4 ngày tuổi) vào trung tâm của đĩa petri ở vị trí úp

ngược cho nấm tiếp xúc với môi trường và dán kín xung quanh đĩa petri bằng parafilm, đặt các đĩa petri ở nhiệt độ phòng.

Chỉ tiêu theo dõi: Đo đường kính tản nấm ở 2, 4, 6, 8, 10 ngày sau cấy. Đường kính trung bình tính theo công thức:  $d = (d_1 + d_2) / 2$ . Trong đó,  $d_1$  và  $d_2$  là hai đường chéo phần tản nấm phân bố.

## **2.6.2. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến khả năng sinh trưởng của *Alternaria* spp.**

### **2.6.2.1. Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ đến khả năng sinh trưởng của *Alternaria***

Mẫu nấm sử dụng tương tự các mẫu đã trình bày trong mục 2.6.1. Mỗi loài *Alternaria* thử nghiệm với các mức nhiệt độ 15°C, 20°C, 25°C, 30°C, 35°C và 38°C trên môi trường PCA; Nghiệm thức thí nghiệm được lặp lại 3 lần với loài *Alternaria passiflorae* và 5 lần với loài *Alternaria tenuissima*, mỗi lần lặp lại là một đĩa petri.

Phương pháp tiến hành: thực hiện tương tự thí nghiệm được trình bày trong mục 2.6.1. Đặt thí nghiệm trong tủ định ôn ở các mức nhiệt độ tương ứng, trong điều kiện tối hoàn toàn.

Chỉ tiêu theo dõi: Đo đường kính tản nấm ở 2, 4, 6, 8, 10 ngày sau cấy. Đường kính trung bình tính theo công thức:  $d = (d_1 + d_2) / 2$ . Trong đó,  $d_1$  và  $d_2$  là hai đường chéo phần tản nấm phân bố.

### **2.6.2.2. Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ đến khả năng sống sót của bào tử nấm *Alternaria***

Chọn 10 mẫu đại diện cho *A. passiflorae* và 10 mẫu đại diện cho *A. tenuissima*. Phương pháp chuẩn bị dịch bào tử nấm: Cho 10 ml nước cất vô trùng vào đĩa nấm *A. passiflorae* hoặc *A. tenuissima* 10 ngày tuổi, sau đó sử dụng phiến lam kính vô trùng tác động nhẹ nhàng trên bề mặt của tản nấm 3 lần. Pha loãng dịch bào tử, đếm bào tử bằng buồng đếm hồng cầu và điều chỉnh đến nồng độ  $10^5$  bào tử/ml với nước cất vô trùng.

Phương pháp tiến hành: Dùng micropipette hút 10 ml dịch bào tử nồng độ  $10^5$  bào tử/ml cho vào ống nghiệm có kích thước 18 x 18 mm và nhúng các ống nghiệm vào bồn gia nhiệt trong 10 phút lần lượt với từng mức nhiệt độ khác nhau: 35°C, 36°C, 37°C, 38°C, 39°C, 40°C, 41°C, 42°C, 43°C, 44°C, 45°C, 46°C, 47°C, 48°C, 49°C và 50°C, nghiệm thức đối chứng nhúng ống nghiệm trong bồn không gia nhiệt. Sử dụng micropipette hút 1 ml

dịch bào tử nấm và ủ vào từng đĩa petri (9 cm) có môi trường PCA (20 ml/đĩa) và dán kính đĩa petri bằng parafilm, đặt các đĩa petri ở nhiệt độ phòng ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ).

Thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên, lặp lại 5 lần, mỗi lần lặp lại là một đĩa petri. Chỉ tiêu theo dõi: Quan sát khả năng phát triển của khuẩn ty sau khi ủ và xác định khả năng sống sót của bào tử ở 1, 2, 3, 4, 5 ngày sau cấy.

### **2.6.3. Ảnh hưởng của thời gian chiếu sáng đến khả năng sinh trưởng của *Alternaria* spp.**

Chọn 10 mẫu đại diện cho *A. passiflorae* và 10 mẫu đại diện cho *A. tenuissima* được thử nghiệm với 3 nghiệm thức tương ứng với chế độ ánh sáng: 24 giờ tối, 24 giờ sáng và 12 giờ sáng: 12 giờ tối trên môi trường PCA. Thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên, lặp lại 5 lần, mỗi lần lặp lại là một đĩa petri.

Phương pháp tiến hành: thực hiện tương tự thí nghiệm được trình bày trong mục 2.9.1. Đặt đĩa trong tủ định ôn (Sanyo, MIR-253), ở các điều kiện 24 giờ tối, 24 giờ sáng và 12 giờ sáng: 12 giờ tối.

Chỉ tiêu theo dõi: Đo đường kính tản nấm ở 2, 4, 6, 8, 10 ngày sau ủ. Đường kính trung bình tính theo công thức:  $d = (d_1 + d_2)/2$ . Trong đó,  $d_1$  và  $d_2$  là hai đường chéo phân tản nấm phân bố.

### **2.6.4. Ảnh hưởng của pH đến khả năng sinh trưởng của *Alternaria* spp.**

Mẫu nấm sử dụng tương tự các mẫu đã trình bày trong mục 2.9.3. Mỗi loài *Alternaria* thử nghiệm ở các mức pH: 4; 4,5; 5; 5,5; 6; 6,5; 7; 7,5; 8; 8,5; 9 trên môi trường PCA. Thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên, lặp lại 5 lần, mỗi lần lặp lại là một đĩa petri.

Phương pháp tiến hành: thực hiện tương tự thí nghiệm được trình bày trong mục 2.6.1. Đặt các đĩa petri ở nhiệt độ phòng.

Chỉ tiêu theo dõi: Đo đường kính tản nấm ở 2, 4, 6, 8, 10 ngày sau cấy. Đường kính trung bình tính theo công thức:  $d = (d_1 + d_2)/2$ . Trong đó,  $d_1$  và  $d_2$  là hai đường chéo phân tản nấm phân bố.

## **2.7. Xác định khả năng gây bệnh của các MPL *Alternaria* spp. trên lá, quả chanh dây và xác định cây trồng nhiễm *Alternaria* trong vườn chanh dây bị bệnh đốm nâu**

### **2.7.1. Xác định khả năng gây bệnh của các MPL *Alternaria* spp. trên lá và quả chanh dây**

Chuẩn bị nguồn lá và quả chanh dây: chanh dây giống Đài nông 1 được trồng trước khi làm thí nghiệm 6 tháng tại nhà lưới của bộ môn Công nghệ sinh học để thu lá và thu quả cung cấp cho thí nghiệm chủng bệnh in vitro.

Vật liệu chủng bệnh: Nguồn lá và quả chanh dây khỏe được thu hái từ nhà lưới. Các lá và quả chanh dây được rửa bằng nước cho sạch, sau đó xử lý bề mặt bằng cồn 70%, rửa lại 3 lần bằng nước cất vô trùng. Đối với lá chanh dây, sử dụng bông gòn thấm ướt bằng nước cất vô trùng và quấn xung quanh đầu cuống lá, giúp cho lá giữ tươi lâu. Các hộp nhựa có kích thước 30 x 25 x 13 cm và 40 x 30 x 15 cm cũng được xử lý bằng cồn 70%, bên dưới đáy hộp có đặt lớp giấy thấm vô trùng có thấm vừa đủ ướt bằng nước cất vô trùng.

Phương pháp chuẩn bị dịch bào tử nấm: bào tử nấm được thu từ tản nấm 10 ngày tuổi đối với loài *Alternaria passiflorae* và 14 ngày tuổi cho loài *A. tenuissima* trên môi trường PCA bằng cách cho 10 ml nước cất vô trùng vào mỗi đĩa petri có chứa nấm, sau đó sử dụng phiến lam kính vô trùng tác động nhẹ nhàng trên bề mặt của tản nấm. Tiếp tục pha loãng và đếm bào tử bằng buồng đếm hồng cầu và điều chỉnh đến nồng độ  $10^7$  bào tử/ml bằng nước cất vô trùng.

Chủng bệnh trên lá chanh dây: 61 mẫu phân lập *A. passiflorae* và 36 mẫu phân lập *A. tenuissima* được chủng trên lá chanh dây Đài Nông 1, mỗi mẫu chủng với 3 lá. Sử dụng kim ghim côn trùng số 0 để gây vết thương trên mỗi lá ở 6 vị trí khác nhau, mỗi một phần xẻ thùy của lá tạo 2 vết thương ở 2 điểm khác nhau. Sử dụng micropipet nhỏ 20  $\mu$ l dung dịch bào tử có nồng độ  $10^7$  bào tử/ml lên chỗ gây vết thương và đối chứng được nhỏ với nước cất vô trùng. Riêng loài *A. tenuissima* được chủng trên lá chanh dây gốc ghép (giống cho quả màu vàng), mỗi mẫu chủng với 5 lá và mỗi lá chỉ gây 1 vết thương tại một vị trí.

Chủng bệnh trên quả chanh dây: 29 mẫu phân lập *A. passiflorae* và 29 mẫu phân lập *A. tenuissima* được chủng với 3 quả chanh dây Đài Nông 1. Sử dụng kim ghim côn trùng số 0 để tạo 3 vết thương ở 3 vị trí khác nhau trên mặt rộng nhất của quả; sau đó đặt một mảnh nấm 14 ngày tuổi, có kích thước 2 mm<sup>2</sup> lên ngay vị trí gây vết thương, tiếp tục đặt một miếng giấy thấm vô trùng thấm ướt bằng nước cất vô trùng có kích thước 1 cm<sup>2</sup> lên trên mảnh nấm và dùng băng keo trong dán chặt tại vị trí chủng bệnh. Đối chứng đặt một mảnh agar vô trùng lên trên vị trí gây vết thương.

Quả hoặc lá chanh dây sau khi chùng được đặt trong hộp giữ ẩm trên một ống nhựa sạch, sao cho lá hoặc quả không tiếp xúc với lớp giấy thấm và đặt hộp ở nhiệt độ phòng, trong tối 24 giờ. Sau đó đặt hộp ở điều kiện ánh sáng tự nhiên, 12 giờ sáng và 12 giờ tối, nhiệt độ phòng ( $25^{\circ}\text{C} \pm 2$ ).

Thí nghiệm không gây vết thương trên lá và quả chanh dây thực hiện tương tự với thí nghiệm có gây vết thương.

Chỉ tiêu theo dõi: thời gian xuất hiện bệnh được tính từ khi chùng đến khi xuất hiện triệu chứng bệnh đầu tiên và kích thước vết bệnh. Đo kích thước vết bệnh ở 3, 5, 7 ngày sau khi chùng bệnh đối với mẫu lá và ở 5, 7, 14 ngày sau khi chùng bệnh đối với mẫu quả.



**Hình 2.1.** Các bước chùng bệnh trên lá chanh dây. (A): Rửa và khử trùng bề mặt lá; (B): Gây vết thương, (C): Nhỏ dịch bào tử nấm lên mặt sau lá, (D): cách đặt lá chanh dây vào hộp giữ ẩm.





**Hình 2.2.** Các bước chủng bệnh trên quả chanh dây. (A): Rửa và khử trùng bề mặt quả; (B): Cách đặt quả chanh dây vào hộp giữ ẩm, (C): Đặt mảnh nấm vào vị trí chủng bệnh, (D): Dán giấy thấm có thấm ướt bằng nước cất vô trùng lên mảnh nấm.

### 2.7.2. Xác định ổ đại, cây trồng nhiễm *Alternaria* trong vườn chanh dây bị bệnh đốm nâu

Mẫu cây cỏ, cây trồng xen trong vườn chanh dây tại huyện Đắk Glong, Đắk Mil, thị xã Gia Nghĩa, tỉnh Đắk Nông và huyện Lâm Hà, Đức Trọng, Đơn Dương, tỉnh Lâm Đồng có biểu hiện triệu chứng đốm nâu được thu thập từ 10 vườn ở Đắk Nông và 9 vườn ở Lâm Đồng, cho vào vào túi đựng mẫu, ghi nhãn, mang về phòng thí nghiệm bảo quản ở tủ mát, nhiệt độ 4<sup>0</sup>C phục vụ cho thí nghiệm phân lập để xác định sự hiện diện, tần suất xuất hiện của nấm *Alternaria* và định danh đến loài.

Phương pháp định danh loài *Alternaria*: dựa vào khóa định danh của Simmons (2007).

Phương pháp xác định tên loài cỏ dại đã thu thập: dựa vào khóa phân loại của Koo và cộng sự (2005).

Phương pháp chủng bệnh nhân tạo trên lá chanh dây Đài Nông 1: Thực hiện tương tự thí nghiệm 2.7.1.

Chỉ tiêu theo dõi: Xác định sự hiện diện của *Alternaria* spp. gây bệnh trên cỏ dại, trên cây trồng và định danh các loài *Alternaria* phân lập được từ cỏ dại và cây trồng xen xung quanh vườn chanh dây.

Xác định khả năng gây bệnh của các MPL *Alternaria* phân lập được từ cỏ dại hoặc từ những cây trồng xen trong vườn chanh dây bằng phương pháp chủng bệnh nhân tạo trên lá chanh dây Đài Nông 1 trong điều kiện phòng thí nghiệm.

**Bảng 2.1.** Danh sách các loại cỏ dại, cây trồng xen thu thập trong vườn chanh dây

STT	Tên cỏ dại/Cây trồng	Tên khoa học	Địa điểm thu mẫu
1	Cỏ đuôi chồn	<i>Setaria pallide - fusca</i> (Schum) Stapf. & Hubb	Đắk Nông
2	Cỏ màn trâu	<i>Eleusine indica</i> (L.) Gaertn.	Đắk Nông
3	Cỏ song nhĩ răng tơ	<i>Borreria setidens</i> (Miq.) Bold	Lâm Đồng
4	Cỏ túc hình rìa	<i>Digitaria ciliaris</i> (Retz.) Koel	Lâm Đồng
5	Cỏ túc tùng tơ	<i>Digitaria setigera</i> R.	Lâm Đồng
6	Cỏ cứt lợn	<i>Agertatum conyzoides</i> L.	Đắk Nông Lâm Đồng
7	Cỏ đuôi voi	<i>Pennisetum polystachyon</i> (L.) Schult	Đắk Nông
8	Cỏ hôi	<i>Eupatorrium odoratum</i> L.	Đắk Nông
9	Cỏ kim thất	<i>Crassocephalum Crepidiodes</i> (Benth.) S. Moore	Đắk Nông Lâm Đồng
10	Cỏ ráng tây sơn	<i>Dicranopteris linearis</i> (Burm. f.) Und	Lâm Đồng
11	Cỏ ruột gà lớn	<i>Borreria latifolia</i> (Aubl.) Shum.	Đắk Nông Lâm Đồng
12	Cỏ vi cúc	<i>Galinsoga parviflora</i> Cav.	Lâm Đồng
13	Cỏ nghệ	<i>Polygonum tomentosum</i> Willd	Lâm Đồng
14	Cỏ song nha lông	<i>Bidens pilosa</i> L.	Lâm Đồng Đắk Nông
15	Cỏ tục đoạn rau	<i>Sonchus oleraceus</i> L.	Lâm Đồng
16	Cỏ cúc dã quỳ	<i>Tithonia diversifolia</i> (Hemsl.) A. Gray	Lâm Đồng
17	Cỏ rau dền cơm	<i>Amaranthus viridis</i> L.	Lâm Đồng
18	Bí đỏ	<i>Cucurbita</i> sp.	Lâm Đồng
19	Bơ	<i>Persea americana</i> Mill.	Lâm Đồng

STT	Tên cỏ dại/Cây trồng	Tên khoa học	Địa điểm thu mẫu
20	Cà phê vối	<i>Coffea canephora</i> Pierre ex. A. Froehner	Lâm Đồng Đắk Nông
21	Cà phê chè	<i>Coffea arabica</i> L.	Đắk Nông
22	Cà chua	<i>Solanum lycopersium</i> L.	Lâm Đồng
23	Cà tím	<i>Solanum melongena</i> L.	Lâm Đồng
24	Cây trứng cá	<i>Muntingia calabura</i> L.	Đắk Nông
25	Cây lạc	<i>Arachis hypogea</i>	Lâm Đồng
26	Đinh lăng	<i>Polyscias fruticosa</i> (L.) Harms	Lâm Đồng Đắk Nông
27	Hoa lay ơn	<i>Gladiolus</i> sp.	Lâm Đồng
28	Khoai lang	<i>Ipomoea batatas</i> L.	Lâm Đồng
29	Mít	<i>Artocarpus heterophyllus</i> Lam.	Đắk Nông
30	Ớt	<i>Capsicum</i> sp.	Lâm Đồng

## 2.8. Đánh giá khả năng gây bệnh của các MPL *Alternaria* spp. trên một số loại cây ký chủ

Chọn một số loại cây trồng phổ biến, chủ yếu tập trung vào 4 nhóm cây ăn quả, cây công nghiệp, cây lương thực và cây rau.

**Bảng 2.2.** Danh sách các loại cây trồng được sử dụng trong thí nghiệm xác định cây ký chủ của *Alternaria* spp.

Nhóm cây	Họ thực vật	Tên thường gọi	Tên khoa học	Giống
Cây ăn quả	Họ dâu tằm Moraceae	Cây mít	<i>Artocarpus heterophyllus</i>	Mít Thái
	Họ đào lộn hột Anacardiaceae	Cây xoài	<i>Mangifera indica</i> L.	Cát Hòa Lộc
	Họ cam quýt Rutaceae	Cây bưởi	<i>Citrus grandis</i> L.	Da xanh
	Họ bồ hòn Sapindaceae	Cây nhãn	<i>Dimocarpus longan</i>	Xuồng com vàng
	Họ bông Malvaceae	Cây sấu riêng	<i>Durio zibethinus</i>	Ri6
	Họ hồng xiêm Sapotaceae	Cây vú sữa	<i>Chrysophyllum cainito</i> L.	Lò Rèn
	Cây công nghiệp	Họ đào lộn hột Anacardiaceae	Cây điều	<i>Anacardium occidentale</i> L.
Họ đại kích Euphorbiaceae		Cây cao su	<i>Hevea brasiliensis</i>	RRIV
Họ cà phê Rubiaceae		Cây cà phê vối	<i>Coffea canephora</i>	Robusta TF1
Họ bông Malvaceae		Cây ca cao	<i>Theobroma cacao</i>	TD6

Nhóm cây	Họ thực vật	Tên thường gọi	Tên khoa học	Giống
lương thực	Họ hòa thảo Poaceae	Cây lúa	<i>Oryza sativa</i>	27P22-F1
	Họ hòa thảo Poaceae	Cây ngô nếp	<i>Zea mays var.amylacea</i>	Wax 50
	Họ hòa thảo Poaceae	Cây ngô thức ăn gia súc	<i>Zea mays var. indentata</i>	NK6101
	Họ bìm bìm Convolvulaceae	Cây khoai lang	<i>Ipomoea batatas L.</i>	HL491
	Họ cà Solanaceae	Cây khoai tây	<i>Solanum tuberosum L.</i>	Carolus
	Họ cà Solanaceae	Cây cà chua	<i>Solanum lycopersicum L.</i>	Ceres F1
	Họ cà Solanaceae	Cây ớt	<i>Capsicum sp.</i>	F1-508
Cây rau	Họ bầu bí Cucurbitaceae	Cây khổ qua	<i>Momordica charantia L.</i>	F1- Lucky 01
		Cây bầu	<i>Lagenaria siceraria</i>	F1- BO 008
		Cây bí đỏ	<i>Cucurbita maxima</i>	F1- Golden city 334
	Họ thập tự Brassicaceae	Cải ngọt	<i>Brassica integrifolia</i>	F1-43
		Cải bẹ xanh	<i>Brassica juncea</i>	F1-46

Nhóm cây ăn quả và cây công nghiệp: Nguồn cây giống được mua từ những cơ sở bán cây giống tin cậy, đảm bảo không nhiễm sâu bệnh.

Nhóm cây lương thực và cây rau: Hạt giống được rửa bằng cồn 70% trong 30 giây, sau đó rửa lại bằng nước cất vô trùng 3 lần. Ủ hạt giống vào đĩa petri có lót lớp giấy thấm vô trùng đã được phun nước tạo ẩm cho đến khi hạt nảy mầm được 2 mm tiến hành trồng vào chậu nhựa, kích thước rộng 15 cm, cao 20 cm đã chứa giá thể vô trùng. Riêng củ giống khoai tây, khoai lang được trồng trong chậu, kích thước rộng 40 cm, cao 20 cm. Phun nước hàng ngày để tạo độ ẩm cho cây phát triển. Khi cây được 5 lá thật thì sử dụng để chủng bệnh.

Giá thể trồng cây: Giá thể trồng gồm có tro trấu, sơ dừa được hấp khử trùng ở 121<sup>0</sup>C trong 30 phút và trộn theo tỷ lệ 1:1 trước khi sử dụng.

### 2.8.1. Chủng bệnh trong nhà lưới

Thí nghiệm chủng bệnh trong nhà lưới được tiến hành với nhóm cây: lương thực và cây rau.

Phương pháp bố trí thí nghiệm: Thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên, mỗi nghiệm thức tương ứng với một loài *Alternaria*, 10 lần lặp lại, mỗi lần lặp lại gồm 1 chậu cây, mỗi loài *Alternaria* sử dụng 3 MPL và được chủng bệnh với nồng độ 1 x 10<sup>7</sup> bào tử/ml.

Phương pháp chuẩn bị dịch bào tử nấm: thực hiện tương tự mục 2.6.2.2.

Phương pháp chủng bệnh: Phun dung dịch bào tử nấm trực tiếp lên cây với lượng dung dịch vừa đủ ướt đẫm, cây đối chứng phun nước cất vô trùng. Mỗi nghiệm thức, bố trí xen 5 chậu chanh dây Đài Nông 1 khi tiến hành phun dung dịch bào tử nấm để làm đối chứng nhiễm bệnh; nhằm để so sánh, đánh giá, ghi nhận số liệu khi có sự xuất hiện của triệu chứng bệnh. Giữ cây trong tối 24 giờ bằng cách sử dụng bịch nilon đen bao các chậu cây.

Chỉ tiêu theo dõi: thời gian xuất hiện bệnh được tính từ khi chủng đến khi xuất hiện triệu chứng bệnh đầu tiên. Theo dõi tỷ lệ lá bệnh, chỉ số bệnh mỗi ngày sau khi xuất hiện triệu chứng bệnh.

Tỷ lệ bệnh ở mỗi nghiệm thức được tính theo công thức:

$$\text{TLB (\%)} = (\text{số lá bị bệnh} / \text{tổng số lá điều tra}) * 100$$

Chỉ số bệnh được tính theo quy ước trong bảng phân cấp mức độ bệnh của Vakalounakis (1990) như sau: Cấp 0: không bị bệnh; cấp 1: 0 – 1% số lá bị bệnh, xuất hiện một vài vết bệnh hoại tử có quầng vàng bao quanh; cấp 2: 1 – 8% số lá bị bệnh, xuất hiện nhiều vết bệnh hoại tử hoặc vài đốm hoại tử có quầng vàng bao quanh; cấp 3: 8 – 20% số lá bị bệnh, các đốm hoại tử đều có quầng vàng bao quanh; cấp 4: 20 – 50% số lá bị bệnh, các vết bệnh hoại tử liên kết với nhau thành khối vết bệnh nhỏ có quầng vàng bao quanh và cấp 5: 50 – 100% số lá bị bệnh, các vết bệnh hoại tử liên kết với nhau thành khối vết bệnh lớn có quầng vàng bao quanh, mô lá bị đứt gãy.

### **2.8.2. Chủng bệnh trong phòng thí nghiệm**

Thí nghiệm chủng bệnh trong phòng thí nghiệm được tiến hành với nhóm: cây ăn quả và cây công nghiệp.

Chuẩn bị nguồn lá để chủng bệnh: Lá cây ăn quả và cây công nghiệp được thu từ nguồn cây giống đã được trồng trong nhà lưới. Chọn lá bánh tẻ, rửa lá bằng nước cho sạch, sau đó rửa lá bằng cồn 70%, rửa lại bằng nước cất vô trùng, sau đó dùng bông gòn thấm ướt bằng nước cất vô trùng và quấn xung quanh đầu cuống lá, giúp cho lá tươi lâu. Các hộp nhựa có kích thước 30 x 25 x 13 cm được xử lý bằng cồn 70%, bên dưới đáy hộp có đặt lớp giấy thấm vô trùng được thấm vừa đủ ướt bằng nước cất vô trùng.

Phương pháp bố trí thí nghiệm: Thí nghiệm được thực hiện với hai kiểu chủng bệnh: có gây vết thương và không gây vết thương. Mỗi một loài *Alternaria* với 10 lần

lặp lại, mỗi lần lặp lại gồm 1 lá, mỗi loài *Alternaria* sử dụng 3 MPL và được chủng bệnh với nồng độ  $1 \times 10^7$  bào tử/ml.

Phương pháp chủng bệnh: thực hiện tương tự mục 2.7.1. Mỗi nghiệm thức bố trí xen 5 lá chanh dây khi tiến hành nhỏ dung dịch bào tử nấm để làm đối chứng nhiễm bệnh; nhằm để so sánh, đánh giá, ghi nhận số liệu khi có sự xuất hiện của triệu chứng bệnh. Nghiệm thức đối chứng được nhỏ bằng nước cất vô trùng.

Chỉ tiêu theo dõi: thời gian xuất hiện bệnh được tính từ khi chủng đến khi xuất hiện triệu chứng bệnh đầu tiên. Theo dõi tỷ lệ lá bệnh, đo kích thước vết bệnh mỗi ngày từ khi xuất hiện triệu chứng bệnh.

## **2.9. Xác định sự hiện diện của độc tố alternariol và khảo sát ảnh hưởng của các hợp chất thứ cấp sinh ra từ *Alternaria* spp. đến khả năng gây bệnh trên lá, ngọn chanh dây**

Từ kết quả thí nghiệm ở mục 2.7.1 về xác định khả năng gây bệnh của các loài *Alternaria* lên lá và quả chanh dây, những MPL *Alternaria* có và không có khả năng gây bệnh được chọn ra để tiến hành ly trích độc tố sinh ra từ những MPL này bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (High Performance Liquid Chromatography – HPLC, hãng Thermo) và phương pháp sắc ký lỏng ghép khối phổ (LC-MS/MS, Hãng Shimadzu LCMS – 8040). Đối tượng mẫu phân tích trong nghiên cứu này là các mẫu phân lập đại diện cho 2 loài *A. passiflorae* và *A. tenuissima*.

### **2.9.1. Thiết bị, dụng cụ, hóa chất ly trích và thực hiện HPLC, LC-MS/MS**

Thiết bị: Hệ thống sắc ký lỏng của Thermo bao gồm bộ phận bơm dung môi, bộ loại khí, bộ phận điều nhiệt và detector MS. Cột sắc ký C<sub>18</sub> HYPERSIL GOLD 5  $\mu$ m 250 x 4.6mm Column của hãng Thermo, thiết bị phân tích sắc ký lỏng khối phổ 2 lần (LC-MS/MS) Shimadzu LCMS – 8040, được trang bị nguồn ion hóa phun điện tử (ESI), bơm 4 kênh LC – 20ADXR, bộ lấy mẫu tự động SIL – 20ACXR của hệ thống Shimadzu và cột Phenomenex C18 (100 mm x 3 mm x 3,5 $\mu$ m), máy lắc vortex, máy đồng nhất mẫu, máy li tâm, cân phân tích (có độ chính xác 0,1 mg và 0,01 mg), cân kỹ thuật (có độ chính xác 0,01 g) và máy cắt quay chân không.

Dụng cụ: Pipet 1, 2, 5, 10, 20 ml; bình định mức 5, 10, 50, 100 ml, ống li tâm 50 ml, cột nhồi, bình cô quay 100 ml, lọ loại 1,8 ml, micropipette, màng lọc PTFE 0,45  $\mu$ m, phễu, giấy lọc và đầu côn các loại.

Dung môi và hóa chất tách chiết mẫu: Kít tách chiết độc tố từ mẫu: Step 1 – QuEChERS Extract Tubes và step 2 – Solubility/elution của hãng Agilent. Chất chuẩn: Alternariol, độ tinh khiết 95% của hãng TRC (Canada).

Một số hóa chất, dung môi khác bao gồm: ethyl acetate, acid formic, acid acetic, acid trifluoroacetic, anhydrous magnesium sulfate, methanol, axetonitril, amonium axetat, PSA cỡ hạt 40  $\mu\text{m}$  và sodium chloride.

**Bảng 2.3.** Nguồn nấm *Alternaria* spp. được sử dụng trong nghiên cứu xác định sự hiện diện của độc tố alternariol

STT	Mẫu phân lập	Địa điểm thu thập mẫu	Bộ phận bị hại	Tên loài
1	CDNK1.13	Sân bay Tân Sơn Nhất	Lá	<i>A. tenuissima</i>
2	CDNK7.13	Sân bay Tân Sơn Nhất	Lá	<i>A. tenuissima</i>
3	CDNK18.14(2)	Sân bay Tân Sơn Nhất	Lá	<i>A. tenuissima</i>
4	DN9L-1.10	Đắk Nông	Lá	<i>A. passiflorae</i>
5	DN8T-4.11	Đắk Nông	Quả	<i>A. passiflorae</i>
6	DN11T-1.16	Đắk Nông	Quả	<i>A. tenuissima</i>
7	DN3T-2.17	Đắk Nông	Quả	<i>A. passiflorae</i>
8	DN1C-1.18 <sup>(a)</sup>	Đắk Nông	Lá	<i>A. passiflorae</i>
9	DN3C-1.18 <sup>(b)</sup>	Đắk Nông	Lá	<i>A. passiflorae</i>
10	LD4T-3.10	Lâm Đồng	Quả	<i>A. passiflorae</i>
11	LD16L-1.14	Lâm Đồng	Lá	<i>A. passiflorae</i>
12	LD1T-1.16	Lâm Đồng	Quả	<i>A. tenuissima</i>
13	LD2T-1.16	Lâm Đồng	Quả	<i>A. tenuissima</i>
14	Mẫu trắng <sup>(c)</sup>	–	–	<i>Sclerotium rolfsii</i>

*Ghi chú:* CD: chanh dây, DN: Đắk Nông, LD: Lâm Đồng, L: Lá, T: Quả, NK: nhập khẩu, (a): Mẫu phân lập từ cây cỏ cắt lợn (*Agertatum conyzoides* L.) được thu thập trong vườn chanh dây và không gây bệnh trên lá chanh dây khi chủng bệnh nhân tạo trong phòng thí nghiệm, (b): Mẫu phân lập từ cây cỏ song nha lông (*Bidens pilosa* L.) được thu thập từ vườn chanh dây và gây bệnh trên lá chanh dây khi chủng bệnh nhân tạo trong phòng thí nghiệm, (c) mẫu trắng là mẫu không có khả năng sinh ra độc tố AOH, mẫu trắng được sử dụng trong nghiên cứu là mẫu nấm *Sclerotium rolfsii*.

## 2.9.2. Phương pháp xác định sự hiện diện của độc tố alternariol

### 2.9.2.1. Khảo sát thành phần dung môi pha động

Thành phần dung môi pha động được khảo sát dựa trên các điều kiện sắc ký HPLC như sau: Cột pha tĩnh C<sub>18</sub> HYPERSIL GOLD 5  $\mu\text{m}$  250 x 4.6 mm; Tốc độ dòng 0,8 ml/phút; Bước sóng 254 nm; Thể tích bơm mẫu 20  $\mu\text{l}$ .

Thí nghiệm khảo sát các thành phần dung môi pha động khác nhau dựa trên cùng một mẫu và chất chuẩn AOH 0,02 ppm với MeOH 100%, MeOH 10% và đệm phosphate 0,1 M.

Chuẩn bị pha động: methanol 100%, methanol 10% (90% nước khử ion 10% methanol), đệm phosphate pH 5,8 pha dung dịch với tỉ lệ 75% methanol và 25% phosphate 0,1 M (hút 7,9 ml Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> và 92,1 ml NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) dung dịch trên được điều chỉnh pH = 5,8 bằng acid phosphoric.

### **2.9.2.2. Khảo sát môi trường thích hợp có khả năng sinh ra nhiều độc tố**

Chọn 2 mẫu nấm đại diện cho hai loài *A. passiflorae* và *A. tenuissima* cho tăng sinh trong các môi trường PD, SA, LA, RA (Chi tiết phương pháp chuẩn bị môi trường nuôi cấy xem phụ lục 6). Mục đích là chọn được môi trường thích hợp nhất và sinh ra nhiều độc tố nhất.

Mẫu nấm được nuôi trên môi trường PCA 7 ngày, đục thành các mảnh có đường kính 3 mm. Cấy 5 mảnh thạch vào mỗi bình môi trường có dung tích 500 ml. Nấm được nuôi trong 3 tuần.

### **2.9.2.3. Phương pháp tách chiết mẫu**

Ly trích độc tố alternariol từ các MPL *Alternaria* spp. được thực hiện theo phương pháp QuEChERS (Anastassiades và cộng sự, 2003; Myresiotis và cộng sự, 2015).

Lấy 2 ml dung dịch trích từ môi trường nuôi nấm cho vào ống ly tâm có thể tích 50 ml, sau đó thêm vào 10 ml acetonitrile có chứa 1% acid acetic và 7,5 ml nước cất để lạnh; đóng nắp ống lại. Trộn đều mẫu bằng cách lắc bằng máy Vortex trong 4 phút. Thêm vào 4 g magnesium sulfate và 1 g sodium chloride vào các ống trên và lắc bằng máy Vortex trong 3 phút; sau đó ly tâm với tốc độ 7.500 vòng/phút trong 6 phút. Hút 6 ml lớp dung dịch phía trên cho vào ống ly tâm mới có chứa sẵn 0,2 g PSA và 0,6 g magnesium sulfate (dạng bột). Tiếp tục lắc mạnh trong 2 phút và ly tâm với tốc độ 4.000 vòng/phút trong 5 phút; hút 3 ml dịch nổi và làm khô ở 40°C bằng máy cô quay chân không, hòa tan bằng 0,4 ml metanol; lọc qua màng lọc PTFE 0,45 µm và chuyển vào các lọ mẫu tự động cho các phân tích cụ thể tiếp theo của hệ thống HPLC và LC-MS/MS.



#### 2.9.2.4. Thẩm định phương pháp phân tích

Tiến hành chạy sắc ký với điều kiện cho mẫu trắng (dịch chiết từ nấm *Sclerotium rolfsii*), mẫu chuẩn alternariol, mẫu thử là mẫu được chọn từ thí nghiệm khảo sát môi trường thích hợp có khả năng sinh ra nhiều độc tố. Các thiết bị sắc ký khí có gắn detector MS, thường so sánh phổ của chất phân tích với phổ chuẩn có sẵn trong thư viện đi kèm hoặc phổ của chất chuẩn tương ứng.

Giới hạn định lượng: LOQ là nồng độ tối thiểu của một chất có trong mẫu thử. LOQ: là nồng độ ứng với  $S/N=10$  trên nền mẫu. Phân tích mẫu thêm chuẩn ở nồng độ 0,1  $\mu\text{g/ml}$ . Dùng công cụ tính nhiễu đường nền của thiết bị để đo tỉ lệ  $S/N$ . Giá trị LOQ được tính theo công thức:  $LOQ = (10/T) \times C$ . Trong đó: T là tỷ lệ  $S/N$  thu được; C là nồng độ ban đầu của chuẩn trong mẫu,  $\mu\text{g/ml}$  (Trần Cao Sơn, 2010).

Đối với LC-MS-MS thường sử dụng mảnh  $m/z$  có cường độ lớn nhất và ổn định để định lượng, mảnh có cường độ thấp dùng để định tính.

#### 2.9.2.5. Giới hạn phát hiện (LOD)

Thực hiện tương tự LOQ nhưng LOD được chấp nhận tại nồng độ mà tại đó tín hiệu lớn gấp 3 lần nhiễu đường nền, thông thường thường lấy  $S/N = 3$ . Giới hạn phát hiện của phương pháp được tính theo công thức:  $LOQ = (10/3) \times LOD$ .

Đường chuẩn của các hoạt chất alternariol được xây dựng với 5 dung dịch chuẩn nồng độ 0,1; 0,2; 0,5; 1; 2 ( $\mu\text{g/ml}$ ). Để tránh ảnh hưởng của nền mẫu nên dung dịch pha chuẩn được dùng là mẫu trắng *Sclerotium rolfsii* (chọn mẫu trắng là chọn mẫu không có khả năng sinh ra độc tố AOH). Sau đó dung dịch được lọc qua màng 0,45  $\mu\text{m}$  tiến hành phân tích sắc ký với điều kiện đã chọn. Thu thập số liệu diện tích đỉnh (pic) thiết lập phương trình hồi quy  $y = ax + b$ . Trong đó: x là nồng độ AOH ( $\mu\text{g/ml}$ ); y là diện tích đỉnh (mAU); b là hằng số.

Độ tuyến tính của phương trình đường chuẩn được đánh giá thông qua hệ số tương quan  $R^2$ . Hệ số tương quan càng gần về 1 thì độ tuyến tính càng cao.  $R^2$  được chấp nhận trong khoảng  $R^2 \geq 0,99$  (Trần Cao Sơn, 2010).

Xác định độ chính xác theo tiêu chuẩn quốc tế (ISO 5725 1- 6:1994) và tiêu chuẩn quốc gia (TCVN 6910 1-6:2005). Độ chính xác (accuracy) = độ chụm (precision) + độ đúng (trueness). Trong đó, độ chụm được xác định thông qua lần lặp lại, độ đúng được xác định thông qua hiệu suất thu hồi.

Hiệu suất thu hồi của phương pháp:  $H (\%) = [(X / X_0) \times 100]$ . Với  $X_0$ : Nồng độ ban đầu của chuẩn trong mẫu,  $X_0 (\mu\text{g/ml}) = [(C \times V)/v] \times (P/100)$ . Trong đó, C: là nồng độ chuẩn dùng để thêm vào mẫu ( $\mu\text{g/ml}$ ), V: thể tích dung dịch chuẩn cần thêm vào mẫu (ml), v: thể tích mẫu thử (ml), P: độ tinh khiết của chất chuẩn (%), X: lượng hoạt chất thuốc trừ AOH tìm thấy trong mẫu ( $\mu\text{g/ml}$ ).

Kết quả thử nghiệm được chấp nhận nếu hiệu suất thu hồi nằm trong khoảng 70 – 110% so với AOH trong mẫu đã biết và  $RSD \leq 11\%$  (AOAC). Độ lặp lại của phương pháp được xác định theo các đại lượng SD và RSD:

$$RSD(\%) = \frac{S_D}{H} \times 100 \quad S_D = \sqrt{\frac{\sum (H_i - H_{tb})^2}{n-1}}$$

Trong đó, RSD: Hệ số biến thiên, SD: Độ lệch chuẩn,  $H_i$ : Hiệu suất thu hồi của các lần xác định,  $H_{tb}$ : Hiệu suất thu hồi trung bình, n: Số lần xác định.

### **2.9.3. Khảo sát ảnh hưởng của các hợp chất thứ cấp sinh ra từ *Alternaria spp.* và độc tố alternariol đến khả năng gây bệnh trên lá, ngọn chanh dây**

#### **2.9.3.1. Ảnh hưởng của các hợp chất thứ cấp trên ngọn chanh dây Đài Nông 1**

Chuẩn bị ngọn chanh dây: Ngọn chanh dây được cắt từ cây chanh dây Đài Nông 1 được trồng trong nhà lưới. Chọn những ngọn chanh dây khỏe, không có biểu hiện của sâu bệnh gây hại, có 3 lá thật và được rửa sạch bằng cồn 70°, sau đó rửa lại bằng nước cất vô trùng 3 lần.

Chuẩn bị dung dịch môi trường có chứa hợp chất thứ cấp: Lấy 10 mảnh thạch nhỏ có đường kính 3 mm chứa sợi nấm 7 ngày tuổi được nuôi cấy trên môi trường PCA cho vào bình thủy tinh chứa 100ml dung dịch môi trường Modified Fries No.3, PG và PC đã vô trùng (Chi tiết phương pháp chuẩn bị môi trường nuôi cấy xem phụ lục 6). Sau 7, 14 và 21 ngày nuôi ủ, lọc bỏ phần tán nấm trong dung dịch, dùng micropipette hút 1,5ml dung dịch môi trường có chứa hợp chất thứ cấp cho vào ống eppendorf và li tâm ở 6.600 vòng/phút trong vòng 10 phút, loại bỏ phần cặn, thu phần dung dịch phía trên và dùng đầu lọc 2 $\mu\text{m}$  để lọc dung dịch; thực hiện liên tục cho đến khi thu đủ 10 ml dung dịch môi trường có chứa hợp chất thứ cấp. Sau đó cho 10ml dung dịch có chứa hợp chất thứ cấp đã lọc này vào ống nhựa vô trùng có dung tích 15 ml để tiến hành cắm ngọn cây chanh dây.

Phương pháp bố trí thí nghiệm: Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên, mỗi nghiệm thức tương ứng một loài *Alternaria*, sử dụng 8 MPL cho loài *A. passiflorae* và 2 MPL cho loài *A. tenuissima* với 3 loại dung dịch môi trường có chứa hợp chất thứ cấp bao gồm dung dịch PC, PG và Modified Fries No.3 ở 3 mức thời gian nuôi cấy là 7, 14 và 21 ngày. Mỗi mức thời gian nuôi cấy và môi trường có chứa hợp chất thứ cấp được chủng với 3 lần lặp lại, mỗi lần lặp lại gồm 1 ngọn chanh dây Đài Nông 1. Cắm mỗi ngọn vào từng ống chứa 10ml dung dịch môi trường có chứa hợp chất thứ cấp. Sử dụng ống chứa môi trường không nuôi nấm và ống chứa nước cất vô trùng để làm đối chứng.

Chỉ tiêu theo dõi: Số lá bệnh rụng ở 3, 5, 7 ngày sau khi cắm ngọn chanh dây vào các dung dịch môi trường có chứa hợp chất thứ cấp.

**Bảng 2.4.** Các MPL *Alternaria* spp. được sử dụng trong thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của các hợp chất thứ cấp sinh ra từ *Alternaria* spp. trên ngọn chanh dây Đài Nông 1

Tên loài	Mẫu phân lập	Địa điểm thu thập mẫu	Bộ phận bị hại
<i>A. passiflorae</i>	DN9L-1.10	Đắk Nông	Lá
	DN1T-4.11	Đắk Nông	Quả
	DN8L-2.11	Đắk Nông	Lá
	DN8T-4.11	Đắk Nông	Quả
	DN11T-3.11	Đắk Nông	Quả
	LD4T-3.10	Lâm Đồng	Quả
	LD12T-5.10	Lâm Đồng	Quả
	LD16L-1.14	Lâm Đồng	Lá
<i>A. tenuissima</i>	CDNK1.13	Sân bay Tân Sơn Nhất	Lá
	CDNK7.13	Sân bay Tân Sơn Nhất	Lá
Đối chứng	Môi trường không nuôi cấy nấm		
	Nước cất vô trùng		

### 2.9.3.2. Ảnh hưởng của độc tố alternariol trên lá chanh dây Đài Nông 1

**Bảng 2.5.** Các MPL *Alternaria* spp. được sử dụng trong thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của độc tố alternariol trên lá chanh dây Đài Nông 1

Tên loài	Mẫu phân lập	Địa điểm thu thập mẫu	Bộ phận bị hại
<i>A. passiflorae</i>	DN9L-1.10	Đắk Nông	Lá
	LD4T-3.10	Lâm Đồng	Quả
	DN8T-4.11	Đắk Nông	Quả
	LD16L-1.14	Lâm Đồng	Lá
	DN3C-1.18	Đắk Nông	Lá
<i>A. tenuissima</i>	CDNK1.13	Sân bay Tân Sơn Nhất	Lá
	CDNK7.13	Sân bay Tân Sơn Nhất	Lá
	CDNK18.14(2)	Sân bay Tân Sơn Nhất	Lá
	DN11T-1.16	Đắk Nông	Quả
Đối chứng	Nước cất vô trùng		

Chuẩn bị nguồn lá chủng bệnh: lá chanh dây Đài Nông 1 (lá bánh tẻ) từ các cây được trồng trong nhà lưới, lá không có biểu hiện triệu chứng của sâu bệnh hại. Lá được rửa bằng nước sạch, sau đó xử lý bằng cồn 70%, rửa lại 3 lần bằng nước cất vô trùng. Sử dụng bông gòn thấm ướt bằng nước cất vô trùng và quấn xung quanh đầu cuống lá, giúp cho lá giữ tươi lâu. Các hộp nhựa có kích thước 30 x 25 x 13 cm và 40 x 30 x 15 cm cũng được xử lý bằng cồn 70%, bên dưới đáy hộp có đặt lớp giấy thấm vô trùng có thấm vừa đủ ướt bằng nước cất vô trùng.

Chuẩn bị dung dịch bào tử (SS): Tiến hành cấy các MPL *Alternaria* spp. trên môi trường PDA trong đĩa petri có đường kính 9 cm ở 25°C, đặt đĩa trong tối. Sau 2 – 3 tuần thu bào tử nấm bằng cách cho 10 ml nước cất vô trùng vào mỗi đĩa petri có chứa nấm, sau đó sử dụng phiến lam kính vô trùng tác động nhẹ nhàng trên bề mặt của tản nấm, lọc dung dịch nấm qua bốn lớp vải để loại bỏ sợi nấm và các mảnh vụn khác. Rửa dung dịch bào tử 3 lần bằng cách ly tâm ở 800 vòng/phút trong 5 phút. Pha loãng dịch bào tử, đếm bào tử bằng buồng đếm hồng cầu và điều chỉnh đến nồng độ  $10^7$  bào tử/ml với nước cất vô trùng.

Chuẩn bị dung dịch môi trường đã nuôi cấy nấm *Alternaria* spp. (AAS): cắt 10 mảnh nấm *Alternaria* spp. vào bình có chứa môi trường PD, nuôi ủ nấm ở 21 ngày, tiến hành lọc bỏ bào tử *Alternaria* spp. bằng đầu lọc 0,45  $\mu$ m, thu phần dung dịch môi trường nuôi cấy.

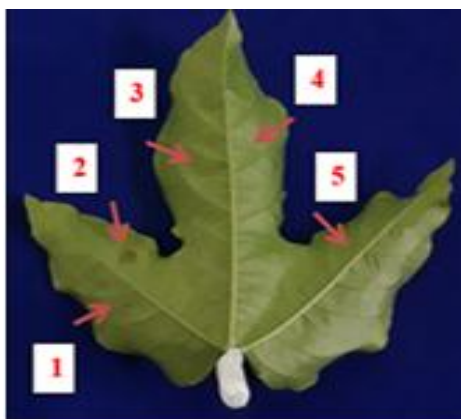
Chuẩn bị dung dịch độc tố alternariol (AOH): dung dịch độc tố alternariol được dùng là chất chuẩn AOH, nồng độ 5ppm, có độ tinh khiết 95% của hãng sản xuất TRC.

Phương pháp bố trí thí nghiệm: thí nghiệm được chủng với 5 dung dịch bao gồm: SS, AAS, AOH, H<sub>2</sub> O (nước cất vô trùng), MT (dung dịch môi trường không cấy nấm) trên lá chanh dây Đài Nông 1, với 5 MPL *Alternaria* đại diện cho loài *A. passiflorae* và 4 MPL *Alternaria* đại diện cho loài *A. tenuissima*; mỗi nghiệm thức được chủng với 5 lần lặp lại, mỗi lần lặp lại gồm một lá chanh dây. Sử dụng kim ghim côn trùng số 0 để gây vết thương trên mỗi lá ở 5 vị trí khác nhau.

Sử dụng micropipette hút 20  $\mu$ l dung dịch SS, AAS, AOH, H<sub>2</sub> O, MT; tiến hành nhỏ lần lượt các dung dịch này lên 5 vị trí gây vết thương. Đặt các lá chanh dây vừa

chúng vào trong hộp giữ ẩm trên một ống nhựa sạch, sao cho lá không tiếp xúc trực tiếp với lớp giấy thấm và đặt các hộp ở nhiệt độ 25°C, trong tối.

Chi tiêu theo dõi: Mỗi ngày theo dõi biểu hiện triệu chứng bệnh của từng nghiệm thức và ghi nhận kết quả ở 7 ngày sau chủng.



**Hình 2.3.** Vị trí chủng trên lá chanh dây Đài Nông 1. Số 1; 2; 3; 4; 5 lần lượt là các vị trí nhỏ các dung dịch tương ứng với nghiệm thức SS; AOH; AAS; MT; H<sub>2</sub>O.

### 2.10. Phương pháp xử lý số liệu

Tính giá trị trung bình, SD và vẽ đồ thị bằng phần mềm Excel.

Số liệu về trình tự DNA được sắp giống cột, sử dụng phần mềm BioEdit version 7.0.5.3. Số liệu về trình tự vùng rDNA-ITS, actin và glyceraldehyde – 3 – phosphate dehydrogenase của các MPL *Alternaria* spp. đại diện cho các loài khai thác từ cơ sở dữ liệu của GenBank từ trang web <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> được sử dụng để so sánh. Tỷ lệ tương đồng DNA (%) giữa các MPL dựa trên tỷ lệ các vị trí có nucleotide không thay đổi, được tính bằng phần mềm MEGA X version 10.1.7. Sơ đồ dạng cây chỉ mối quan hệ di truyền giữa các MPL được xây dựng từ trị số của ma trận khoảng cách di truyền theo phương pháp UPGMA và phân tích bootstrap với 1.000 lần lặp lại được thực hiện bằng phần mềm MEGA X version 10.1.7.

Xác định vị trí tương ứng trên đoạn nối ITS-ACT-GPDH: được xác định dựa trên vị trí tương ứng của một nucleotide xuất hiện trên vùng rDNA-ITS, ACT hay GPDH, hiện diện lại trên vùng gen nối ITS-ACT-GPDH.

Tính phần trăm đột biến trên tổng Nu (%): được xác định bằng tỷ lệ phần trăm của số lượng nucleotide đột biến hiện diện trên từng vùng gen so với tổng số nucleotide của vùng gen nối ITS-ACT-GPDH.

## CHƯƠNG 3

### KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Từ các mẫu chanh dây mang triệu chứng bệnh đốm nâu thu thập từ vùng trồng chanh dây tập trung Lâm Đồng, Đắk Nông và cây giống nhập khẩu qua cảng hàng không quốc tế Tân Sơn Nhất từ năm 2010 đến năm 2016, 97 mẫu phân lập (MPL) có các đặc điểm hình thái *Alternaria* đã được sử dụng cho nghiên cứu và được lưu trữ tại Trung tâm Kiểm dịch thực vật sau nhập khẩu II từ năm 2010 đến 2016.

#### **3.1. Xác định tên loài, đặc tính sinh học và hình thái học của các MPL *Alternaria* spp.**

##### **3.1.1. Phân lập và định danh loài của *Alternaria* dựa vào đặc điểm hình thái**

Kết quả quan sát triệu chứng đã ghi nhận có 2 dạng triệu chứng bệnh trên chanh dây trồng tại Đắk Nông và Lâm Đồng.

Triệu chứng 1 là các đốm tròn màu nâu đỏ, viền vết bệnh có màu nâu sậm, có vòng đồng tâm, kích thước vết bệnh từ 1 – 5 mm. Trên quả là những đốm tròn hoặc bất định, màu nâu đỏ vết bệnh lõm nhẹ, kích thước vết bệnh nhỏ từ 1 – 5 mm (D – F của hình 3.1 và hình 3.2). Triệu chứng 2 cho kích thước vết bệnh lớn hơn; trên lá là những đốm tròn màu nâu đỏ, viền vết bệnh có màu nâu sậm hoặc vàng, có vòng đồng tâm rõ nét, kích thước vết bệnh từ 1 – 10 mm. Trên quả, triệu chứng bệnh là những đốm tròn màu nâu đỏ, vết bệnh lõm nhẹ đến lõm sâu, kích thước vết bệnh từ 1 – 20 mm, nhiều đốm liên kết lại với nhau làm cho vết bệnh có kích thước rất lớn, quan sát phần trung tâm vết bệnh ở giai đoạn già có nhiều sợi nấm màu đen phát triển, thỉnh thoảng có những mẫu quả bệnh bị nhăn nheo, teo tóp lại (A – C, hình 3.1 và hình 3.2). Những đặc điểm vết bệnh trên lá và quả chanh dây đã thu thập được trong nghiên cứu này rất giống với những mô tả của Manicom (2003).

Bệnh với triệu chứng 2 xuất hiện rất ít trên các vùng trồng chanh dây ở Đắk Nông và Lâm Đồng, chỉ phát hiện được 4/66 MPL trên chanh dây trồng ở Lâm Đồng và 1/66 MPL ở Đắk Nông (Phụ lục 7 - bảng 7.2).

Riêng trên lá các cây chanh dây giống được nhập khẩu từ Đài Loan thì vết bệnh có màu nâu, viền màu nâu sậm hoặc vàng nhạt, kích thước vết bệnh từ 1 – 5 mm, bệnh chỉ xuất hiện trên lá chanh dây ở phần gốc ghép (vì cây chanh dây giống nhập khẩu là cây ghép dạng ghép nêm đọt) (hình 3.3).

Trong 97 MPL *Alternaria* đã phân lập được trên lá và quả, chưa phát hiện mẫu bệnh trên thân và cành chanh dây (bảng 3.1). Trong khi đó, theo ghi nhận của Akamine và cộng sự (1974), CABI (2007) bệnh đốm nâu do nấm *Alternaria* gây hại cả trên thân, lá và quả chanh dây, bệnh nặng làm chết cả cây.

**Bảng 3.1.** Số lượng mẫu *Alternaria* phân lập được từ các vùng trồng khác nhau

Địa điểm thu thập mẫu	Giống	Số mẫu <i>Alternaria</i> phân lập được theo bộ phận bị hại		Mã MPL
		Lá	Quả	
Đắk Nông	Đài Nông 1	14	16	DN
Lâm Đồng	Đài Nông 1	24	12	LD
Sân bay Tân Sơn Nhất	Đài Nông 1	30	-	CDNK
Đài Loan	Đài Nông 1	1	-	DL
	Tổng	69	28	

*Ghi chú: (-) không có MPL*

Việc định danh các loài nấm nói chung bằng cách quan sát các đặc điểm hình thái thì không thể thiếu trong quá trình định danh. Đây là một phương pháp rất quan trọng cho việc xác định tên loài của các đối tượng cần quan sát. Đối với chi *Alternaria* thì xác định tên loài hết sức khó khăn, bởi vì đây là một chi nấm rất lớn, gồm có nhiều loài và hầu như sự khác biệt giữa các loài cũng khó nhận biết. Theo Simmons (2007), để xác định được tên loài của *Alternaria* bằng cách quan sát các đặc điểm hình thái thì phải mô tả và ghi nhận đầy đủ các chỉ tiêu, bao gồm: đặc điểm phát triển của tản nấm trên môi trường PCA hoặc V - 8 juice, mô tả đặc điểm cành bào tử, bào tử non, bào tử trưởng thành, số lượng cổ bào tử trên một bào tử, số vách ngăn ngang, số vách ngăn dọc...

Kết quả từ bảng 3.2, 3.3 và phụ lục 7 cho thấy, có ít nhất hai loài *Alternaria* gây bệnh đốm nâu trên lá và quả chanh dây hiện diện ở Việt Nam.





**Hình 3.1.** Triệu chứng bệnh đốm nâu trên lá chanh dây do *Alternaria* spp. gây ra. (A-C): Triệu chứng bệnh do *A. passiflorae*; (D-F): Triệu chứng bệnh do *A. tenuissima*.





**Hình 3.2.** Triệu chứng bệnh đốm nâu trên quả chanh dây do *Alternaria* spp. gây ra. (A-C): Triệu chứng bệnh do *A. passiflorae*; (D-F): Triệu chứng bệnh do *A. tenuissima*.



**Hình 3.3.** Triệu chứng bệnh đốm nâu do *Alternaria tenuissima* gây ra trên lá cây chanh dây giống nhập khẩu.

Đặc điểm của 2 loài *Alternaria* gây bệnh đốm nâu trên chanh dây ở Đắk Nông và Lâm Đồng được mô tả chi tiết về hình thái trong nghiên cứu này:

**Loài *Alternaria tenuissima* (Nees & T. Nees: Fr.) Wiltshire, Trans. Brit.**

Tảo nấm trên môi trường PCA sau 10 ngày nuôi cấy có đường kính 85,00 mm, có 2 – 4 vòng đồng tâm, tảo nấm phát triển lông lẻo và vươn cao như sợi bông gòn trên bề mặt môi trường. Bào tử hình thành rất chậm trên môi trường dinh dưỡng nhân tạo, bào tử xuất hiện sau 2 – 4 tuần. Chuỗi bào tử đôi khi phân nhiều nhánh hoặc dạng chuỗi đơn, chiều dài trung bình, chuỗi bào tử không có tới 12 bào tử trên sợi nấm phân nhánh. Bào tử thứ 2, thứ 3 của chuỗi bào tử non phổ biến có hình chùy (dạng cây dùi) hoặc ít nhất là có một nửa phía trên thon nhọn; chỉ có vách ngăn ngang hiện diện trong bào tử dạng này. Khi bào tử thứ cấp được phát triển trong chuỗi, việc sản sinh ra các dạng bào tử có mỏ dài thon có thể tiếp tục, với tất cả các thể bào tử biểu hiện đặc điểm này.

Sự hình thành bào tử dạng chuỗi, có 2 – 12 bào tử trên một cành bào tử. Hình thái bào tử của *A. tenuissima* rất đa dạng. 1 – 2 bào tử ban đầu và đôi khi thậm chí 4 – 5 bào tử thấp nhất của một chuỗi thường chỉ có vách ngăn ngang; chỉ 1 hoặc 2 bào tử trưởng thành trong chuỗi có vách ngăn ngang có thể là hình trứng với 1 cành bào tử thứ cấp ngắn ở đỉnh hoặc hình chùy ngược và thon nhọn thành một đỉnh cành bào tử.

Cành bào tử không phân nhánh, thẳng, có một điểm sinh bào tử ở vị trí trên cùng của cành bào tử, kích thước khoảng 35,10 – 106,94 x 3,88 – 4,12  $\mu\text{m}$ .

Bào tử trưởng thành có hình chùy ngược, kích thước khoảng 18,01 – 35,32 x 7,24 – 10,25  $\mu\text{m}$ , có 0 – 9 vách ngăn ngang, 0 – 2 vách ngăn dọc, bào tử non hình trứng. Chiều dài lớn nhất của bào tử với một cổ bào tử (beak) rất ngắn gần 45(-49)  $\mu\text{m}$ . Bào tử trên môi trường nuôi cấy có màu nâu vàng và có những chấm nhỏ hình dấu chấm câu từ mờ đến rõ nét trên bề mặt bào tử.

**Loài *Alternaria passiflorae* J.H. Simmonds, Proc.**

Tảo nấm phát triển tương đối sát mặt môi trường PCA, màu đen hơi rêu, mép tròn đều và có màu xám trắng, có 3 vòng đồng tâm rõ nét, đường kính tảo nấm đạt 78,30 mm sau 10 ngày nuôi cấy, mặt sau tảo nấm có màu đen.

Cành bào tử trên môi trường V – 8 juice tương đối lớn, thô và có nhiều sắc tố. Hầu hết cành bào tử xuất hiện trực tiếp trên bề mặt môi trường. Đa số cành bào tử có dạng đơn lẻ và dài khoảng 88,86 – 150,48 x 6,12 – 6,59  $\mu\text{m}$  và tạo thành những đoạn cong gập, thỉnh thoảng có những nhánh thứ cấp ngắn và có 4 – 5 điểm sinh bào tử. Cành bào tử thứ cấp thỉnh thoảng xuất hiện từ cổ bào tử hoặc từ tế bào bên của bào tử, tạo thành chuỗi có 1 – 2 bào tử.

Bào tử non có hình trứng, chúng bắt đầu phát triển và sinh ra cổ bào tử có kích thước hẹp ở giai đoạn bào tử non. Bào tử trưởng thành có hình ellip hẹp hoặc thường có hình trứng dài hoặc dạng hình chùy ngược. Mỗi bào tử sinh ra ít nhất một cổ bào tử thon, nhỏ. Trên môi trường PCA, bào tử có 2 hoặc 3 cổ bào tử, phổ biến nhất là dạng bào tử có một cổ bào tử.

Bào tử trưởng thành có kích thước thân bào tử khoảng 51,54 – 66,73 x 15,24 – 17,19  $\mu\text{m}$ . Chiều dài cổ bào tử của dạng bào tử 1 cổ bào tử khoảng 79,37 – 120,74  $\mu\text{m}$ , đáy của cổ bào tử rộng khoảng 2,5 – 5,5  $\mu\text{m}$ , đầu cổ bào tử rộng khoảng 2,0 – 2,5  $\mu\text{m}$ . Dạng bào tử nhiều cổ bào tử thường có chiều dài ngắn hơn dạng 1 cổ bào tử. Bào tử có 2 – 12 vách ngăn ngang và thường không có vách ngăn dọc, hoặc có 1(-2) vách ngăn dọc trong một vài vị trí phân chia vách ngăn ngang rộng nhất. Sự hình thành tế bào rõ ràng là do mọc ra vách ngăn phình to (distoseptate) và duy trì hình thức này cho đến khi tế bào trưởng thành, đôi khi không có vách ngăn ngang thật (eusepta) mọc ra hoặc chỉ có 2 – 4 vách ngăn ngang thật không phình ra đối với loại bào tử kích cỡ lớn nhất. Vách bào tử có màu vàng nhạt, thường không có đặc điểm trang trí hoặc toàn bộ là những chấm nhỏ bằng phẳng hoặc hiếm khi là những mụn cóc.

Phân loại *Alternaria* dựa trên các đặc điểm của bào tử đính là rất phức tạp bởi sự tồn tại của các giống nấm khác như *Stemphylium* và *Ulocladium*, tạo ra bào tử đính phaeodictyosporic giống với loài *Alternaria*. Dựa trên các đặc điểm được mô tả loài *Stemphylium* và *Alternaria* được phân biệt dựa vào bào tử đính; các loài *Ulocladium* và *Alternaria* được phân biệt bởi hình dạng phần cuối của bào tử đính chưa trưởng thành, nhờ sự khác biệt này kết hợp với việc định danh nấm thông qua phân tích DNA của ribosome (Pryor và Gilbertson, 2000; Thomma, 2003; Woudenberg, 2013).

Trong chi *Alternaria*, nhiều loài được phân loại dựa vào các đặc điểm của bào tử đính. Tuy nhiên, những khác biệt trong phân loại *Alternaria* do có nhiều biến đổi về đặc điểm hình thái vì bị ảnh hưởng bởi các yếu tố bên trong như biến đổi di truyền mà còn bởi các điều kiện môi trường. Điều này được minh chứng, loài *A. alternata* có khả năng sản sinh hơn 100 ký chủ và thường có các biến thể hình thái. Hiện nay dựa vào đặc điểm hình thái và trình tự gen của các loài *Alternaria* đã chia *Alternaria* thành 27 nhóm loài gọi là Section (Lawrence và cộng sự; 2013, 2016), trong đó Section Porri là Section lớn nhất với tổng số 63 loài đã được ghi nhận (Woudenberg; 2013, 2014). Tuy nhiên, cho đến nay vẫn chưa có sự phân loại chung cho nấm *Alternaria*. Theo Đặng Vũ Thị Thanh (2008), đã ghi nhận có 16 loài *Alternaria* gây bệnh trên một số cây trồng ở Việt Nam; trong đó loài *A. passiflorae* được phát hiện ở Hà Tây (nay là Hà Nội), gây hại trên cây dưa và *A. tenuissima* phát hiện ở Hà Tây, Thái Nguyên, Bắc Cạn gây hại trên lá khoai lang.

Thực tế trong nghiên cứu cho thấy, triệu chứng 2 trên chanh dây là do loài *A. passiflorae* gây ra và chiếm đa số so với loài *A. tenuissima* gây ra triệu chứng 1. Trong 36 MPL được xác định là loài *A. tenuissima* thì chỉ có 4 MPL từ Lâm Đồng và 1 MPL từ Đắk Nông, chiếm tỷ lệ 13,89%, một tỷ lệ rất nhỏ. Trong khi đó có đến 30 MPL *A. tenuissima* trên lá chanh dây được nhập khẩu từ Đài Loan.

Tại Việt Nam, có rất ít nghiên cứu về bệnh đốm nâu trên chanh dây. Gần đây có một nghiên cứu về tác nhân gây bệnh đốm nâu trên chanh dây tại Nghệ An của Võ Thị Dung và cộng sự (2019) đã xác định được là do nấm *A. sesami* gây ra. Nhóm tác giả đã sử dụng kỹ thuật phân tích các đặc điểm hình thái và trình tự DNA mã hóa vùng ITS (Internal Transcribed Spacer) trong nghiên cứu định danh.

**Bảng 3.2.** Kích thước trung bình bào tử, cành bào tử của các MPL *Alternaria passiflorae* và *Alternaria tenuissima*

STT	Chi tiêu quan sát	Tên loài	
		<i>A.passiflorae</i>	<i>A.tenuissima</i>
	Kích thước thân bào tử		
1	-Dài ( $\mu\text{m}$ )	51,54 – 66,73	18,01 - 35,32
	-Rộng ( $\mu\text{m}$ )	15,24 – 17,19	7,24 - 10,25
2	Chiều dài cổ bào tử ( $\mu\text{m}$ )	79,37 - 120,74	18,01 - 35,32
3	Tổng chiều dài toàn bào tử ( $\mu\text{m}$ )	130,90 - 187,47	
4	Số lượng vách ngăn ngang	2 - 12	0 - 9
	Kích thước cành bào tử		
5	-Dài ( $\mu\text{m}$ )	88,86 - 150,48	35,10 - 106,94
	-Rộng ( $\mu\text{m}$ )	6,12 - 6,59	3,88 - 4,12

Ghi chú: Xem số liệu chi tiết về kích thước bào tử, cành bào tử của các MPL *Alternaria passiflorae* và *Alternaria tenuissima* ở phụ lục 7.

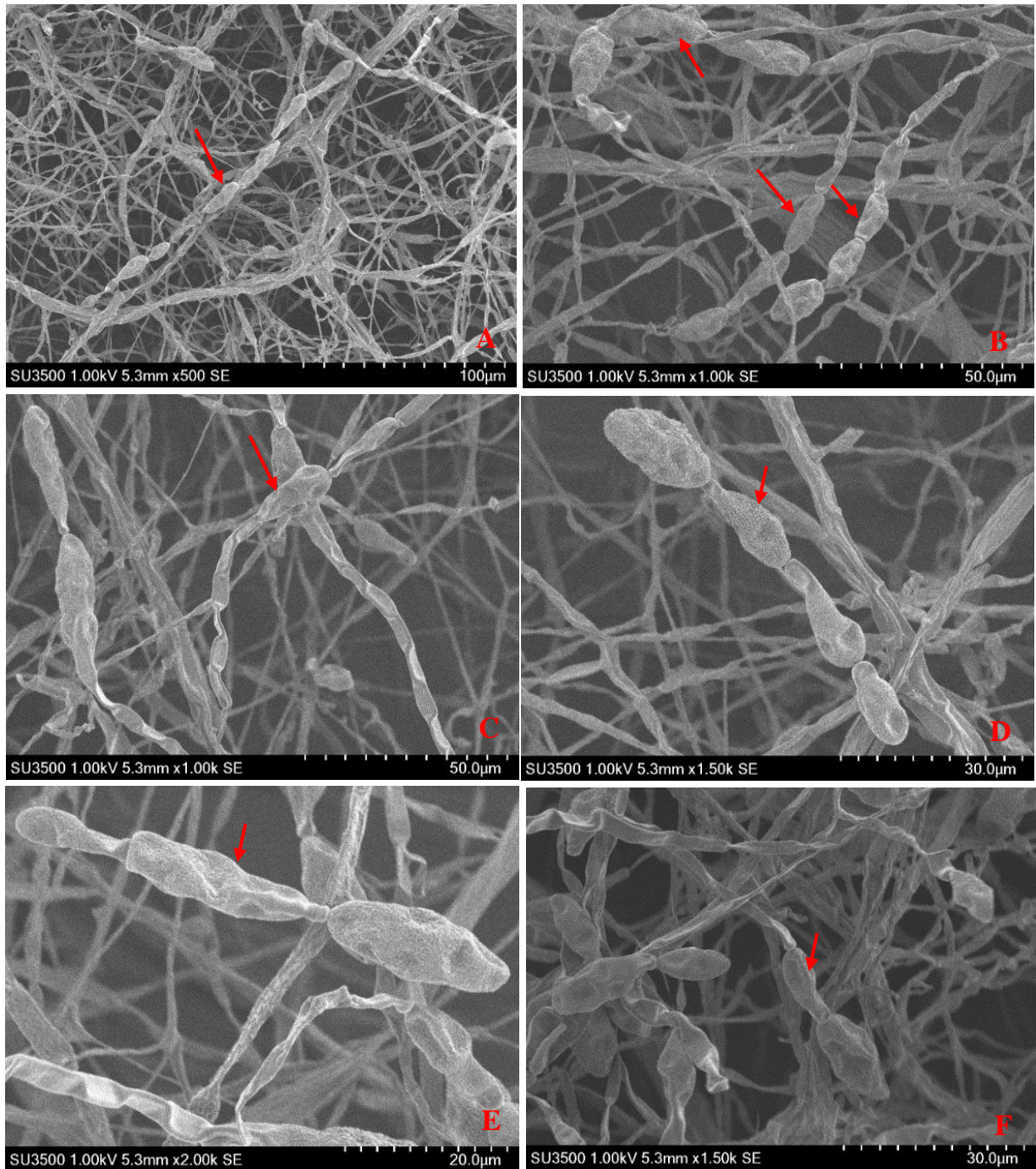
**Bảng 3.3.** Đặc điểm hình thái của *Alternaria* spp. gây bệnh đốm nâu trên chanh dây và 2 loài *Alternaria* theo mô tả trong khóa định danh của Simmons năm 2007

Đặc điểm	Chỉ tiêu	<i>A. passiflorae</i> (Simmons, 2007)	<i>A. passiflorae</i> (Chanh dây DN, LD)	<i>A. tenuissima</i> (Simmons, 2007)	<i>A. tenuissima</i> (Chanh dây DN, LD, DL, CDNK)
Tảo nấm trên môi trường V-8 juice (4 – 5 NSC)	Đường kính (cm)	4 – 5	3,02 – 3,86	5	4,16 – 5,08
Hình thành cành bào tử phân sinh và bào tử phân sinh trên mt nhân tạo		Nhiều	Nhiều	Trung bình đến nhiều	Ít đến trung bình
Cành bào tử phân sinh	Cách mọc	Mọc trực tiếp trên bề mặt mt, dạng đơn lẻ, thỉnh thoảng có những nhánh thứ cấp	Mọc trực tiếp trên bề mặt mt, dạng đơn lẻ, thỉnh thoảng có những nhánh thứ cấp	Mọc trực tiếp trên bề mặt mt, dạng đơn lẻ, có 1 điểm sinh bào tử	Mọc trực tiếp trên bề mặt mt, dạng đơn lẻ, có 1 điểm sinh bào tử
	Chiều dài x chiều rộng ( $\mu\text{m}$ )	(90 – 130) x (6 – 8)	(88,86 – 150,48) x (6,12 – 6,59)	-	(35,10 – 106,94) x (3,88 – 4,12)
Cách sinh bào tử phân sinh trên cành bào tử phân sinh		Đơn lẻ hoặc tạo thành chuỗi có 1 – 2 bào tử	Đơn lẻ hoặc tạo thành chuỗi có 1 – 2 bào tử	Hình thành bào tử dạng chuỗi, có 2 – 12 bào tử/cành	Hình thành bào tử dạng chuỗi, có 2 – 12 bào tử/cành
Thân bào tử phân sinh	Hình dạng	Ellip hẹp hoặc hình trứng dài hoặc chùy ngược	Ellip hẹp hoặc hình trứng dài hoặc chùy ngược	Hình trứng, chùy ngược	Hình trứng, chùy ngược
	Màu sắc	Vàng nhạt	Vàng nhạt	Nâu vàng	Nâu vàng
	Bề mặt	Nhẵn hoặc có những chấm nhỏ	Nhẵn hoặc có những chấm nhỏ	Có những chấm nhỏ hình dấu chấm câu	Có những chấm nhỏ hình dấu chấm câu

	Chiều dài x chiều rộng ( $\mu\text{m}$ )	70 – 115 x 16 - 22	51,54 – 66,73 x 15,24 – 17,19	(32 – 45) x (11 – 13) (32 – 45) x (14 – 18) (40 – 60) x (16 – 18)	(18,01 – 35,32 x 7,24 – 10,25)
	Số vách ngăn dọc	0 hoặc có 1(-2) vách ngăn trong 1 vài vị trí phân chia vách ngăn ngang rộng nhất	0 hoặc có 1(-2) vách ngăn trong 1 vài vị trí phân chia vách ngăn ngang rộng nhất	-	0 - 2
	Số vách ngăn ngang	Có vách ngăn phình to; Không có vách ngăn ngang thật hoặc có 2 – 4 vách ngăn ngang thật đối với loại bào tử có kích cỡ lớn nhất	Có vách ngăn phình to; Không có vách ngăn ngang thật hoặc có 2 – 4 vách ngăn ngang thật đối với loại bào tử có kích cỡ lớn nhất	-	0 - 9
Cổ bào tử phân sinh	Chiều dài ( $\mu\text{m}$ )	100 - 175	79,37 – 120,74	-	-
	Chiều rộng của đáy ( $\mu\text{m}$ )	4,5 – 6,5	2,5 – 5,5	-	-
	Kích thước đỉnh đầu ( $\mu\text{m}$ )	2,0	2,0 – 2,5	-	-
	Hình dạng	Thon, hẹp	Thon, hẹp	-	-

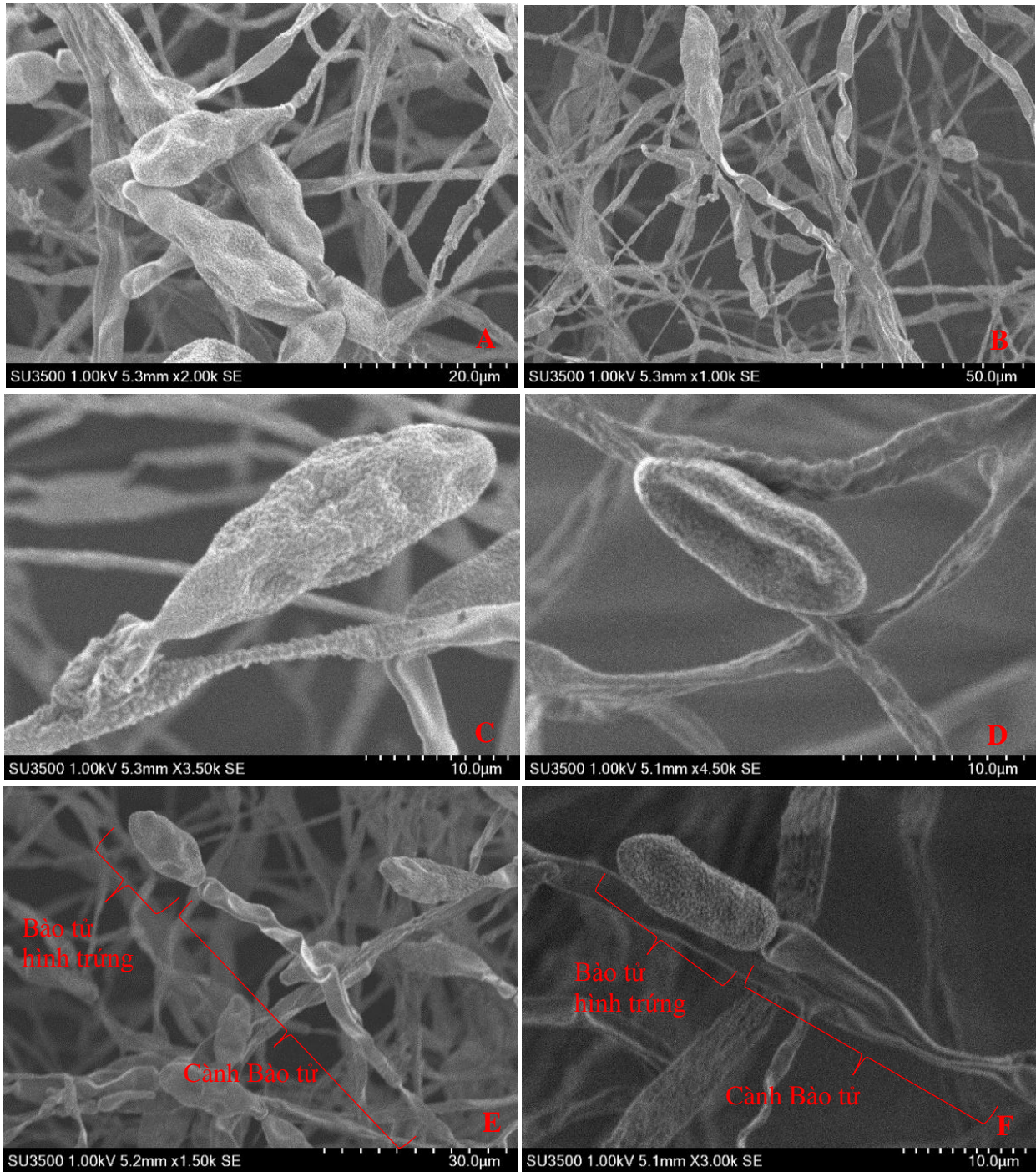
Ghi chú: (-) không được mô tả, (DN): Đắk Nông, (LD): Lâm Đồng, (DL): Đà Lạt, (CDNK): Chanh dây giống nhập khẩu.





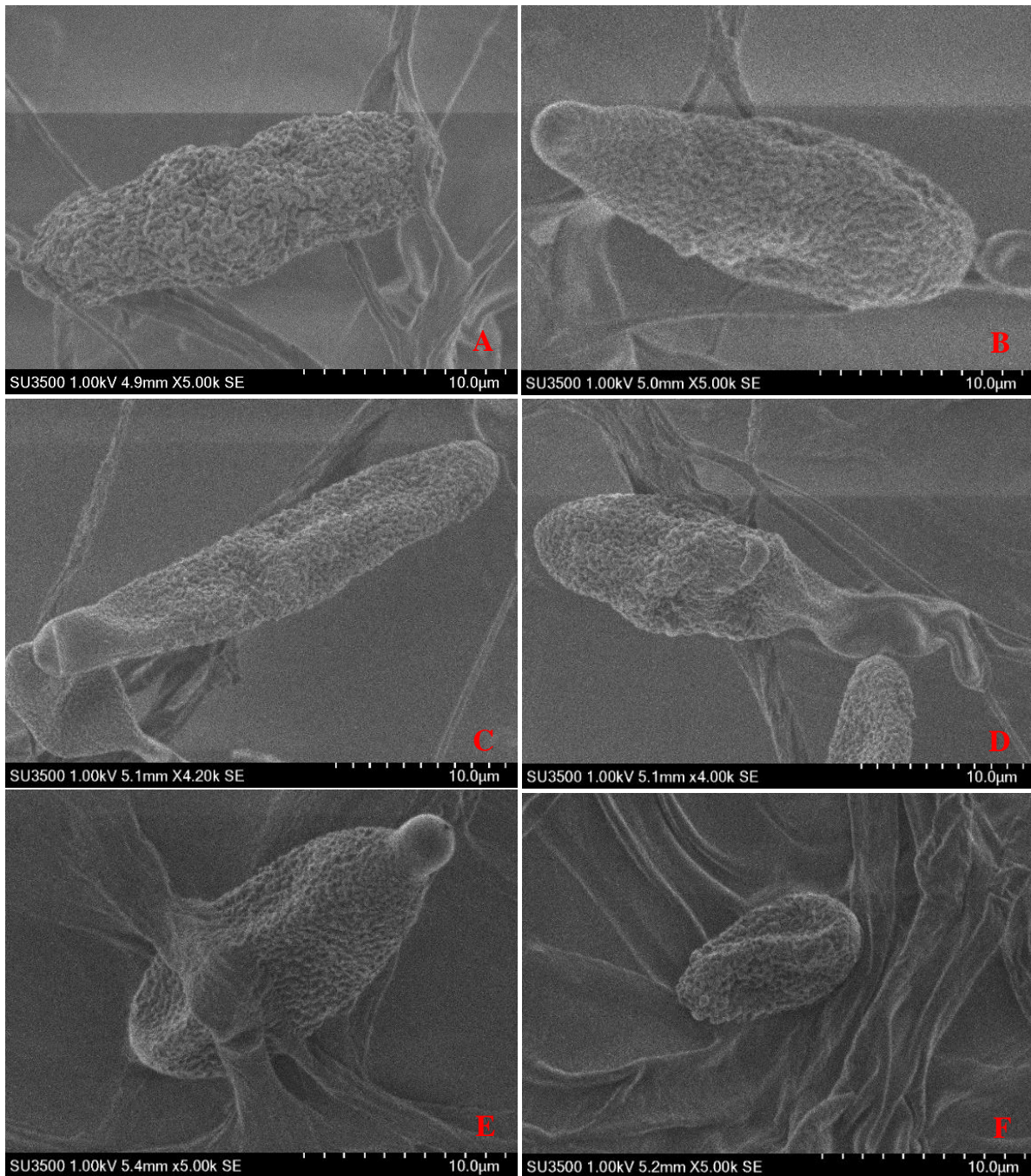
**Hình 3.4.** Hình thái *Alternaria tenuissima* (mẫu CDNK7.13) dưới kính hiển vi điện tử quét SU3500, thế gia tốc 1 kV, hình ảnh được thu ở đầu dò SE. (A): Bào tử đính dạng chuỗi được chụp ở độ phóng đại 500 lần; (B, C): Bào tử đính dạng chuỗi được chụp ở độ phóng đại 1.000 lần; (D, F): Bào tử đính dạng chuỗi được chụp ở độ phóng đại 1.500 lần; (E): Bào tử đính dạng chuỗi được chụp ở độ phóng đại 2.000 lần (Mũi tên chỉ bào tử đính dạng chuỗi).





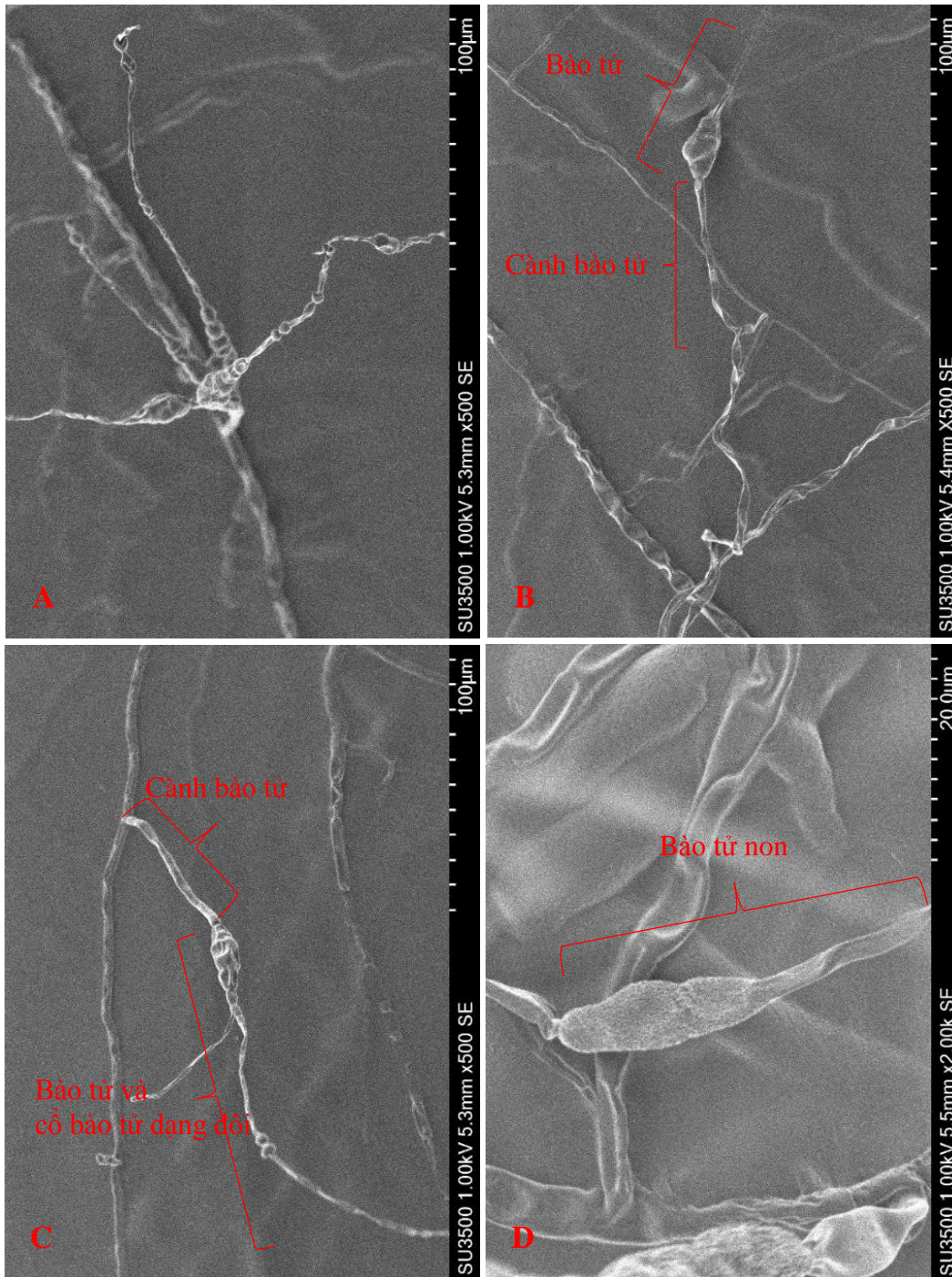
**Hình 3.5.** Hình thái *Alternaria tenuissima* (mẫu CDNK7.13) dưới kính hiển vi điện tử quét SU3500, thế gia tốc 1 kV, hình ảnh được thu ở đầu dò SE. (A): Bào tử hình chùy được chụp ở độ phóng đại 2.000 lần; (B): Bào tử hình chùy dài được chụp ở độ phóng đại 1.000 lần; (C): Bào tử hình chùy với các mụn nhỏ trên vách bào tử được chụp ở độ phóng đại 3.500 lần; (D): Bào tử hình trứng được chụp ở độ phóng đại 4.500 lần; (E): Bào tử hình trứng dính trên cành bào tử được chụp ở độ phóng đại 1.500 lần; (F): Bào tử hình trứng dài dính trên cành bào tử được chụp ở độ phóng đại 3.000 lần.



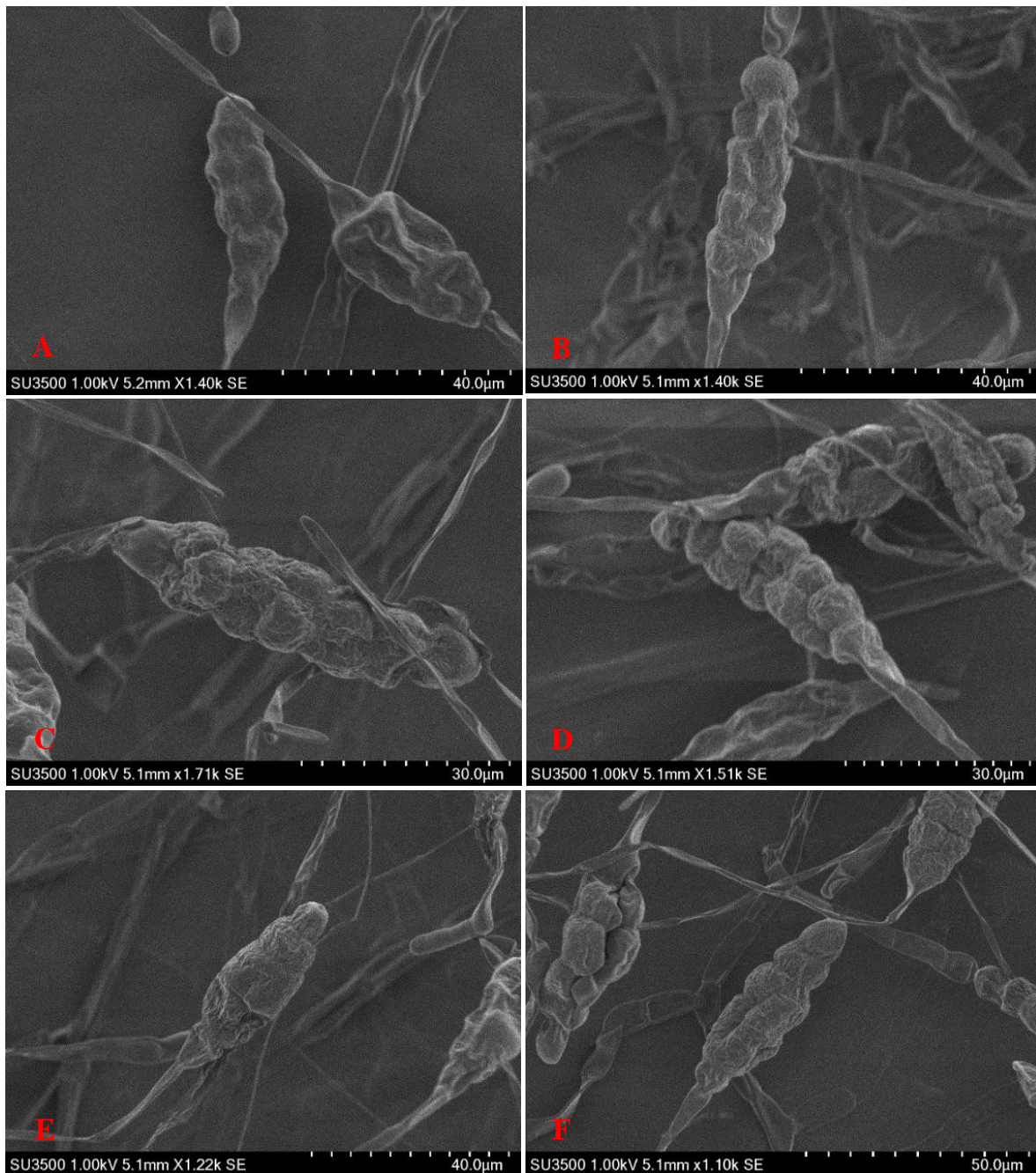


**Hình 3.6.** Hình thái *Alternaria tenuissima* (mẫu DN11T-1.16) dưới kính hiển vi điện tử quét SU3500, thế gia tốc 1 kV, hình ảnh được thu ở đầu dò SE. (A): Bào tử hình trứng dài được chụp ở độ phóng đại 5.000 lần; (B, E): Bào tử hình chùy được chụp ở độ phóng đại 5.000 lần; (D): Bào tử hình chùy được chụp ở độ phóng đại 4.000 lần; (F): Bào tử hình trứng được chụp ở độ phóng đại 5.000 lần; (A-F): thể hiện đặc điểm các mụn nhỏ trên vách bào tử.





**Hình 3.7.** Hình thái *Alternaria passiflorae* (mẫu LD16L-01.14) dưới kính hiển vi điện tử quét SU3500, thế gia tốc 1 kV, hình ảnh được thu ở đầu dò SE. (A, B): Bào tử trưởng thành đính trên cành bào tử được chụp ở độ phóng đại 500 lần; (C): Bào tử trưởng thành với cổ bào tử dạng đôi đính trên cành bào tử được chụp ở độ phóng đại 500 lần; (D): Bào tử non đính trên cành bào tử được chụp ở độ phóng đại 2.000 lần.



**Hình 3.8.** Hình thái *Alternaria passiflorae* (mẫu LD16L-01.14) dưới kính hiển vi điện tử quét SU3500, thế gia tốc 1 kV, hình ảnh được thu ở đầu dò SE. (A, B): Các dạng bào tử trưởng thành được chụp ở độ phóng đại 1.400 lần; (C): Thân bào tử trưởng thành được chụp ở độ phóng đại 1.710 lần; (D): Thân bào tử trưởng thành được chụp ở độ phóng đại 1.510 lần; (E): Bào tử trưởng thành được chụp ở độ phóng đại 1.220 lần; (F): Bào tử trưởng thành được chụp ở độ phóng đại 1.100 lần.



### 3.1.2. Phân tích trình tự vùng rDNA-ITS, actin và glyceraldehyde - 3 - phosphate dehydrogenase

*Alternaria* là một chi nấm có mặt khắp nơi bao gồm các loài hoại sinh và ký sinh. *Alternaria* có mối quan hệ với một loạt các chất nền như hạt giống, thực vật, nông sản, động vật, đất và khí quyển. Nhiều loài *Alternaria* là mầm bệnh nghiêm trọng của thực vật, là nguyên nhân gây thiệt hại lớn cho nhiều loại cây trồng; Một số loài phát sinh chất chuyển hóa thứ cấp trong thức ăn gia súc và thực phẩm chế biến gây độc cho động vật. Do những ảnh hưởng tiêu cực đáng kể đến sức khỏe con người và môi trường xung quanh của *Alternaria* nên xác định chính xác và nhanh chóng tên loài *Alternaria* sẽ có giá trị lớn đối với các nhà nghiên cứu, nhà nấm học và công chúng.

Đối với nhóm loài *Alternaria tenuissima* được chọn 7 mẫu điển hình, bao gồm các MPL như CDNK1.13, CDNK7.13, LD18L-14(2), LD1T-1.15, LD1T-1.16, DN2T-1.16, DN11T-1.16 và DL01L-9.14 (mẫu thu thập từ vùng trồng chanh dây ở Đà Loan). Các mẫu đại diện cho loài *Alternaria passiflorae* gồm DN9L-1.10, DN1T-4.11, DN8L-2.11, DN8T-4.11, LD4T-3.10, LD11L-1.10(2), LD12T-5.10, LD17L-1.10, LD1L-2.11(2) và mẫu LD16L-01.14; các mẫu *Alternaria* spp. phân lập từ cây cỏ trong vườn chanh dây có triệu chứng bệnh đốm lá bao gồm: LD1C-1.18, LD4C-1.18, DN1C-1.18, DN2C1.18 và DN3C-1.18.

Sau khi tản nấm của 23 mẫu phân lập *Alternaria* được tăng sinh trong môi trường PC (môi trường lỏng gồm có cà rốt và khoai tây), tiến hành thu sinh khối nấm, ép khô nấm bằng giấy thấm vô trùng và ly trích DNA tổng số. DNA tổng số được ly trích theo quy trình của Lee và Taylor (1990) có cải tiến sao cho phù hợp với điều kiện của thực tế của phòng thí nghiệm. Sản phẩm DNA được khuếch đại PCR với ba cặp primer ITS4 – ITS5, ACT512F – ACT783R và GDF1 – GDR1 tương ứng với ba vùng rDNA-ITS, actin và glyceraldehydes – 3 – phosphate dehydrogenase.

#### 3.1.2.1. Khuếch đại PCR vùng rDNA-ITS, actin và glyceraldehydes – 3 – phosphate dehydrogenase

DNA của các MPL *Alternaria* spp. sau khi tinh sạch đã được sử dụng để khuếch đại vùng rDNA-ITS, vùng ACT và vùng glyceraldehydes – 3 – phosphate dehydrogenase

bằng phương pháp PCR với ba cặp primer ITS4 – ITS5, ACT512F – ACT783R và GDF1 – GDR1. Sản phẩm PCR với primer ITS4/ITS5 sau khi điện di trên gel agarose 1,5% có kích thước khoảng 600 bp (Phụ lục 8 - hình 8.3) khi so sánh với thang DNA phù hợp với báo cáo của Pryor và Gilbertson (2000). Trong khi đó sản phẩm khuếch đại với primer ACT512F/ACT783R có kích thước khoảng 240 bp (Phụ lục 8 - hình 8.4) tương đồng với kết quả của Dagno và cộng sự (2011) và với primer GDF1/GDR1 có kích thước khoảng 200 bp (Phụ lục 8 - hình 8.5) phù hợp với Liu và cộng sự (2007).

### 3.1.2.2. So sánh trình tự tương đồng

**Bảng 3.4.** Số lượng vị trí đa hình của các mẫu phân lập tương ứng trên từng vùng gen

Mẫu phân lập	Vùng gen	ACT	GPDH	ITS	Tổng	Phần trăm đột biến trên tổng 1.008 Nu
	Chiều dài so					
	dòng (bp)	243	177	622	1.042	
	Chiều dài trung bình (bp)	243	174	591	1.008	
CDNK1.13		0	0	0	0	0,00
CDNK7.13		0	3	8	11	1,09
DL01L-9.14		3	7	7	17	1,69
DN11T-1.16		0	4	6	10	0,99
DN1C-1.18		17	23	31	71	7,04
DN1T-4.11		17	22	34	73	7,24
DN2C-1.18		17	23	31	71	7,04
DN3C-1.18		17	22	29	68	6,75
DN8L-2.11		17	22	46	85	8,43
DN8T-4.11		17	22	31	70	6,94
DN9L-1.10		17	22	33	72	7,14
LD11L-1.10(2)		17	22	32	71	7,04
LD12T - 5.10		17	22	45	84	8,33
LD16L-1.14		17	22	32	71	7,04
LD17L-1.10		17	22	33	72	7,14
LD18L-14(2)		17	44	6	67	6,65
LD1C-1.18		17	23	31	71	7,04
LD1L-2.11(2)		17	22	30	69	6,85
LD1T-1.15		3	7	7	17	1,69
LD1T-1.16		0	4	6	10	0,99
LD2T-1.16		3	7	6	16	1,59
LD4C-1.18		17	22	33	72	7,14
LD4T-3.10		17	22	30	69	6,85

**Bảng 3.5.** Số vị trí đa hình trên từng vùng gen của 23 mẫu phân lập *Alternaria* sp.

Vùng gen	Chiều dài so hàng	Chiều dài trung bình (bp)	Vị trí đa hình/ số vị trí đa hình
ACT	243	243	17
GPDH	177	174	47
ITS	622	591	81
Tổng	1.042	1.008	145

**Phân tích đa hình**

Trình tự kết hợp 3 vùng gen sau khi so hàng có chiều dài là 1.042 Nu (chiều dài trung bình là 1.008 Nu) từ 23 mẫu phân lập *Alternaria* spp. Có tổng cộng 145 vị trí đa hình, tương đương với 14,4% so với tổng chiều dài đoạn không gián đoạn. Sự khác biệt giữa các nucleotide cố định và không cố định của 3 nhánh của cây tương quan di truyền cũng được quan sát và thể hiện đối với từng vị trí (bảng 3.5).

Đối với vùng rDNA-ITS cho thấy có tổng cộng 81 vị trí đa hình (55,9%) phân bố ở tất cả các loài xuyên suốt 3 nhánh của cây tương quan di truyền. Trong đó MPL CDNK1.13 có thể phân biệt với MPL CDNK7.13 tại 4 vị trí đa hình 583(-), 587(C), 589(C) và 610(C), nhưng khác biệt với MPL DN11T-1.16 chỉ với 3 vị trí đa hình 587(C), 589-590(CC) và khác biệt giảm dần với nhóm 4 MPL (LD1T-1.16, DL01L-9.14, LD1T-1.15 và LD2T-1.16) tại 2 vị trí đa hình 587(C) và 589(C). Nhóm 2 MPL (DN2C-1.18, LD1C-1.18) có thể được phân biệt với DN1C-1.18 tại 1 vị trí đa hình duy nhất là 174(-). Trong nhóm 7 MPL (DN1T-4.11, DN3C-1.18, DN8L-2.11, DN8T-4.11, DN9L-1.10, LD1L-2.11(2), LD4T-3.10) thì DN1T-4.11 có thể phân biệt với các mẫu DN3C-1.18, DN8L-2.11, DN8T-4.11, DN9L-1.10, LD1L-2.11(2) và LD4T-3.10 tương ứng tại 10 vị trí 141(T), 209(-), 545(C), 553(T), 559 (T), 563(-), 576(-), 587(C), 589(C) và 597(G); 21 vị trí 30(G), 209(-), 545(C), 557(T), 576(-), 579(T), 583(-), 587(C), 589(C), 590(-), 599-600(C), 602(T), 604(T), 608(G), 609-610-611-612(CT--), 617(A), 621(C); 9 vị trí 209(-), 216(-), 553(T), 559(T), 563(-), 576(-), 587(C), 589(C), 597(G); 9 vị trí 141(T), 553(T), 557(T), 559 (T), 563(-), 576(-), 587(C), 589(C), 597(G); 8 vị trí 209(C), 545(C), 553(T), 559(T), 563(-), 587(C), 589(C), 597(G); và 9 vị trí 209(C), 545(C), 553(T), 559 (T), 563(-), 576(-), 587(C), 589(C), 597(G). Với nhóm 4 MPL (LD4C-1.18, LD16L-1.14, LD11L-1.10(2),

LD17L-1.10) thì LD4C-1.18 có thể được phân biệt với LD16L-1.14, LD11L-1.10(2), LD17L-1.10 lần lượt tại 7 vị trí 182(A), 184(C), 216(-), 589(C), 591(G), 597(G), 610(C); 8 vị trí 182(A), 184(C), 216(-), 589-590-591(C-G), 597(G), 610(C); và 11 vị trí đa hình 182(A), 184(C), 216(-), 579(T), 587(C), 589-590-591-592(C-G-), 594-595(--). LD4T-3.10 có thể phân biệt với LD12T-5.10 bởi 26 vị trí đa hình. MPL LD11L-1.10(2) khác biệt lớn nhất so với LD18L-14(2) do có số vị trí đa hình nhiều nhất tại 38 vị trí (Bảng 3.6 và Phụ lục 10 - bảng 10.1).

Đối với vùng ACT thì tổng số vị trí đa hình khác biệt xuyên suốt trên 3 nhánh cây của cây tương quan di truyền là 17 (11,7%). Trong đó nhóm 4 MPL gồm: CDNK1.13, CDNK7.13, DN11T-1.16, LD1T-1.16 có thể được phân biệt với nhóm 15 MPL (DN1C1.18, DN2C-1.18, LD1C-1.18, DN1T-4.11, DN3C-1.18, DN8L-2.11, DN8T-4.11, DN9L-1.10, LD1L-2.11(2), LD4T-3.10, LD12T-5.10, LD4C-1.18, LD16L-1.14, LD11L-1.10(2), LD17L-1.10) bởi 17 vị trí đa hình trên vùng gen ACT. Những khác biệt này nằm tại các vị trí sau: 66(C); 71(T); 73-74(TA); 81-82(AG); 87(T); 92(A); 97-98(GA); 122(C); 149(T); 168(A); 179(T); 195(A); 208(T); 223(T). Nhóm 4 MPL gồm CDNK1.13, CDNK7.13, DN11T-1.16, LD1T-1.16 có thể được phân biệt với nhóm 3 MPL gồm DL01L-9.14, LD1T-1.15 và LD2T-1.16 bởi 3 vị trí đa hình trên vùng gen ACT tại các vị trí: 87(T); 168(A) và 208(T). Tuy nhiên nhóm 4 MPL trên chỉ khác biệt với MPL LD18L-14(2) tại 1 vị trí đa hình là 87(T) (Bảng 3.7 và phụ lục 10 - bảng 10.2).

Phân tích sự khác biệt giữa các MPL dựa trên vùng GPDH của 3 nhánh cây thì tổng số vị trí đa hình là 47 (32,4%) (Bảng 3.8 và Phụ lục 10 - bảng 10.3). Dựa vào vị trí đa hình có thể phân chia các MPL này thành 8 nhóm. Trong đó nhóm tập trung nhiều MPL nhất (bao gồm mẫu DN1T-4.11, DN3C-1.18, DN8L-2.11, DN8T-4.11, DN9L-1.10, LD1L-2.11(2), LD4T-3.10, LD12T-5.10, LD16L-1.14, LD11L-1.10(2), LD17L-1.10) thể hiện sự khác biệt thấp nhất so với nhóm 3 MPL DN1C-1.18, DN2C-1.18, LD1C-1.18 với một đa hình duy nhất tại vị trí 91(A). Nhóm 3 MPL (DL01L-9.14, LD1T-1.15 và LD2T-1.16) có thể được phân biệt với nhóm 2 MPL (DN11T-1.16, LD1T-1.16) tại 3 vị trí đa hình 56(T), 80(A) và 94(T). MPL CDNK1.13 phân biệt với CDNK7.13 với 3 vị trí đa hình tại 55(A), 64(A) và 134(A). MPL LD4C-1.18 thì có thể phân biệt với nhóm 11 MPL

bởi 2 vị trí đa hình tại 64(T) và 109(G). MPL còn lại LD18L-14(2) thể hiện tính đa dạng so với các mẫu còn lại với số đa hình tổng cộng là 23 vị trí.



**Bảng 3.6.** Vị trí đa hình tương ứng trên vùng rDNA-ITS

<b>Mẫu phân lập so sánh</b>	<b>Số vị trí đa hình</b>	<b>Vị trí đa hình</b>
-----------------------------	--------------------------	-----------------------

CDNK1.13	CDNK7.13	4	583(-), 587(C), 589(C), 610(C)
CDNK1.13	DN11T-1.16	3	587(C), 589-590(CC)
CDNK1.13	LD1T-1.16, DL01L-9.14, LD1T-1.15, LD2T-1.16	2	587(C) và 589(C)
DN2C-1.18, LD1C-1.18	DN1C-1.18	1	174(-)
DN1T-4.11	DN3C-1.18	10	141(T), 209(-), 545(C), 553(T), 559(T), 563(-), 576(-), 587(C), 589(C) và 597(G)
DN1T-4.11	DN8L-2.11	21	30(G), 209(-), 545(C), 557(T), 576(-), 579(T), 583(-), 587(C), 589(C), 590(-), 599-600(C), 602(T), 604(T), 608(G), 609-610-611-612(CT--), 617(A), 621(C)
DN1T-4.11	DN8T-4.11	9	209(-), 216(-), 553(T), 559(T), 563(-), 576(-), 587(C), 589(C), 597(G)
DN1T-4.11	DN9L-1.10	9	141(T), 553(T), 557(T), 559(T), 563(-), 576(-), 587(C), 589(C), 597(G)
DN1T-4.11	LD1L-2.11(2)	8	209(C), 545(C), 553(T), 559(T), 563(-), 587(C), 589(C), 597(G)
DN1T-4.11	LD4T-3.10	9	209(C), 545(C), 553(T), 559(T), 563(-), 576(-), 587(C), 589(C), 597(G)
LD4C-1.18	LD16L-1.14	7	182(A), 184(C), 216(-), 589(C), 591(G), 597(G), 610(C)
LD4C-1.18	LD11L-1.10(2)	8	182(A), 184(C), 216(-), 589-590-591(C-G), 597(G), 610(C)
LD4C-1.18	LD17L-1.10		182(A), 184(C), 216(-), 579(T), 587(C), 589-590-591-592(C-G-), 594-595(--)
LD4T-3.10	LD12T-5.10	26	2 mẫu phân lập thể hiện sự khác biệt di truyền lớn với 26 vị trí đa hình (chỉ sau cặp phân lập (LD11L-1.10(2) và LD18L-14(2)) với 38 vị trí.
LD11L-1.10(2)	LD18L-14(2)	38	Cặp mẫu thể hiện đa dạng di truyền lớn nhất với 38 vị trí đa hình.

**Bảng 3.7.** Vị trí đa hình tương ứng trên vùng ACT

Mẫu phân lập so sánh	Số vị trí đa hình	Vị trí đa hình
CDNK1.13, CDNK7.13, DN11T-1.16, LD1T-1.16 – (4 MPL)	DN1C1.18, DN2C-1.18, LD1C-1.18, DN1T-4.11, DN3C-1.18, DN8L-2.11, DN8T-4.11, DN9L-1.10, LD1L-2.11(2), LD4T-3.10, LD12T-5.10, LD4C-1.18, LD16L-1.14, LD11L-1.10(2), LD17L-1.10) – (15 MPL)	17 66(C); 71(T); 73-74(TA); 81-82(AG); 87(T); 92(A); 97-98(GA); 122(C); 149(T); 168(A); 179(T); 195(A); 208(T); 223(T)
CDNK1.13, CDNK7.13, DN11T-1.16, LD1T-1.16	DL01L-9.14, LD1T-1.15 và LD2T-1.16	3 87(T); 168(A) và 208(T)
CDNK1.13, CDNK7.13, DN11T-1.16, LD1T-1.16	LD18L-14(2)	1 87(T)

**Phân tích tương quan di truyền**

Sử dụng phần mềm phân tích chuỗi trình tự BioEdit version 7.0.5.3. Các vùng dữ liệu và từng nucleotide liên kết không rõ ràng được loại bỏ khỏi phân tích. Đối với mỗi bộ trình tự DNA trên từng vùng gen, cây phát sinh chủng loài được xây dựng bằng phương pháp UPGMA sử dụng phần mềm MEGA X version 10.1.7 với hệ số bootstrap 1.000 lần lặp lại.

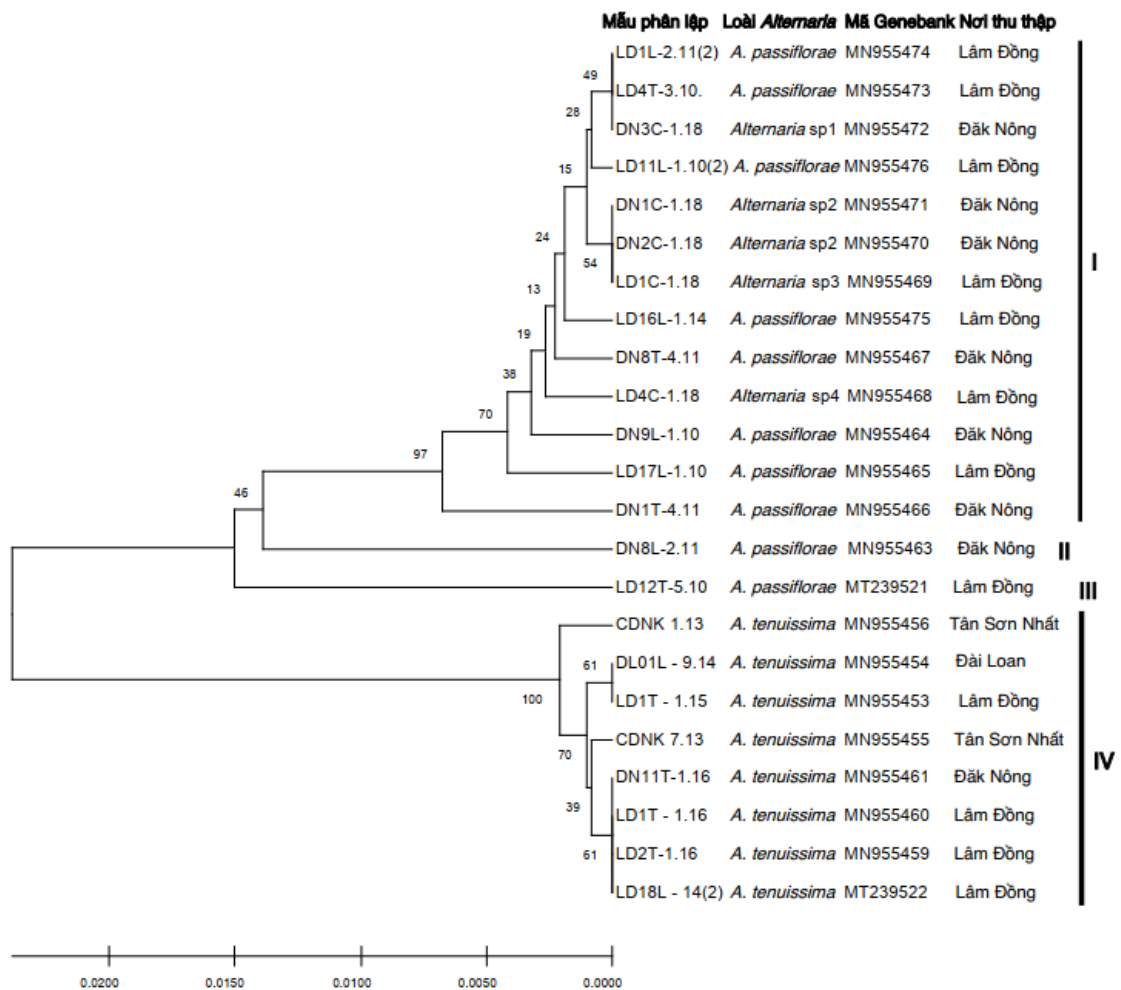
Phân tích cây tương quan di truyền trên vùng rDNA-ITS cho thấy các MPL được phân thành 4 nhóm chính (hình 3.9). Nhóm I có 8 MPL là *A. passiflorae* (gồm các mẫu LD1L-2.11(2), LD4T-3.10, LD11L-1.10(2), LD16L-1.14, DN8T-4.11, DN9L-1.10, LD17L-1.10, DN1T-4.11) và 5 MPL (DN3C-1.18, DN1C-1.18, DN2C-1.18, LD1C-1.18 và LD4C-1.18 phân lập từ các cây cỏ trong vườn chanh dây) là phức hợp của *A. passiflorae* phát sinh từ 2 vùng địa lý ở Đắk Nông và Lâm Đồng, bảng so sánh tương đồng cũng cho thấy tỷ lệ tương đồng cao (97,8 – 98,3%) trong nhóm này (được thể hiện màu cam trên bảng). Các MPL có tỷ lệ tương đồng 100% được thể hiện rõ trên cây tương quan di truyền vì các MPL đều cùng chung một nhóm. Với cây tương quan di truyền được xây dựng dựa trên vùng rDNA-ITS, cho thấy mối quan hệ di truyền rất gần gũi nhau giữa các MPL từ giống chanh dây nhập khẩu so với các MPL từ Lâm Đồng và Đắk

Nông (hình 3.9). Nhóm II và nhóm III chỉ với một MPL duy nhất tương ứng với MPL từ Lâm Đồng (LD12T-5.10) và Đắk Nông (DN8L-2.11). Phân tích tương quan di truyền cho thấy các MPL *A. passiflorae* trong nhóm I, II, III biến đổi lớn.

**Bảng 3.8.** Vị trí đa hình tương ứng trên vùng GPDH

Mẫu phân lập so sánh	Số vị trí đa hình	Vị trí đa hình
DN1T-4.11, DN3C-1.18, DN8L-2.11, DN8T-4.11, DN9L-1.10, LD1L-2.11(2), LD4T-3.10, LD12T-5.10, LD16L-1.14, LD11L-1.10(2), LD17L-1.10 – (11 MPL)	1	91(A)
DN1C-1.18, DN2C-1.18, LD1C-1.18 – (3 MPL)	3	56(T), 80(A) và 94(T)
DL01L-9.14, LD1T-1.15 và LD2T-1.16	3	55(A), 64(A) và 134(A)
CDNK1.13	3	64(T) và 109(G)
LD4C-1.18	2	Nhóm 11 DPL (DN1T-4.11, DN3C-1.18, DN8L-2.11, DN8T-4.11, DN9L-1.10, LD1L-2.11(2), LD4T-3.10, LD12T-5.10, LD16L-1.14, LD11L-1.10(2), LD17L-1.10)
LD18L-14(2)	23	Thể hiện đa dạng di truyền lớn nhất tại 23 vị trí đa hình so với nhóm.
		DN1T-4.11, DN3C-1.18, DN8L-2.11, DN8T-4.11, DN9L-1.10, LD1L-2.11(2), LD4T-3.10, LD12T-5.10, LD4C-1.18, LD16L-1.14, LD11L-1.10(2), LD17L-1.10 – (12 MPL)

Nhóm IV loài *A. tenuissima* đạt hệ số bootstrap cao nhất 100% cho thấy MPL từ cây chanh dây nhập khẩu (CDNK1.13, CDNK7.13) và nhóm các MPL từ Lâm Đồng, Đắk Nông và Đài Loan bao gồm DL01L-9.14, LD1T-1.15, DN11T-1.16, LD1T-1.16, LD2T-1.16 và LD18L-14(2) đạt được mức tương đồng tối đa, đồng thời nhìn vào bảng so sánh độ tương đồng dựa trên vùng gen rDNA-ITS (bảng 3.9) cũng có thể thấy mức độ tương đồng giữa các MPL này rất cao (99,3 – 99,6%), được thể hiện phần màu đỏ trên bảng), chứng tỏ *A. tenuissima* là loài được phân lập trên nguồn cây giống chanh dây nhập nội và có tồn tại nguồn bệnh.

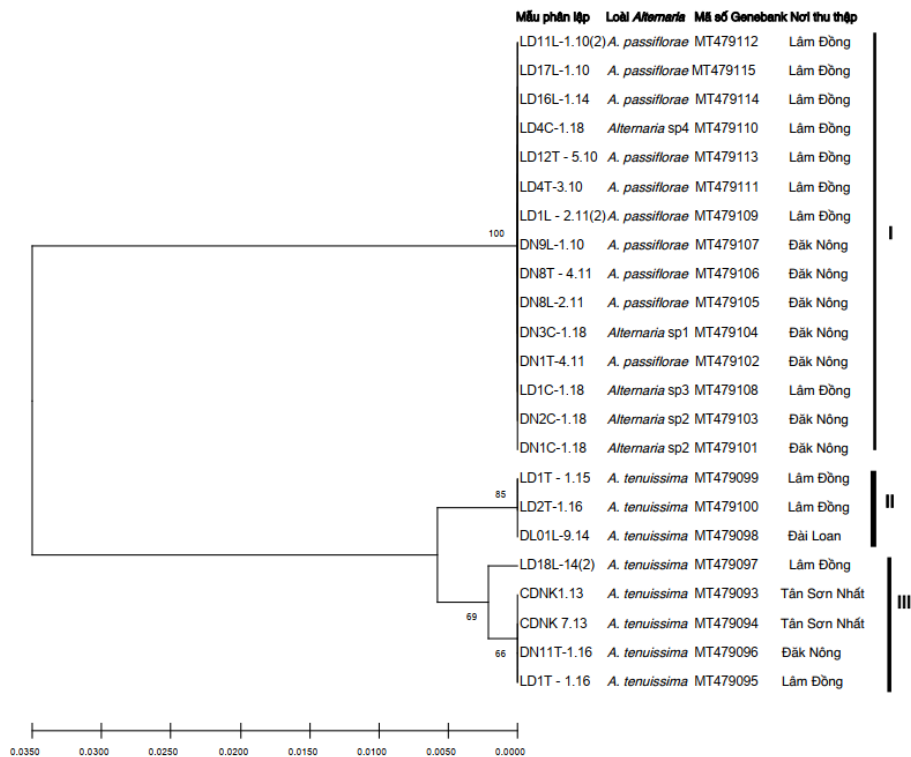


**Hình 3.9.** Cây tương quan di truyền giữa 23 mẫu phân lập *Alternaria* được xây dựng dựa trên vùng rDNA-ITS sử dụng phần mềm MEGA X với hệ số bootstrap 1.000 lần lặp lại.

**Bảng 3.9.** Độ tương đồng kiểu gen giữa các mẫu phân lập (%) trên vùng rDNA-ITS

Mẫu phân lập	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	
CDNK1.13																								
CDNK7.13	99,3																							
DN11T-1.16	99,4	99,4																						
LD1T-1.16	99,6	99,6	99,8																					
DL01L-9.14	99,4	99,4	99,6	99,8																				
LD1T-1.15	99,4	99,4	99,6	99,8	100,0																			
LD2T-1.16	99,6	99,6	99,8	100,0	99,8	99,8																		
DN1C-1.18	93,5	93,5	93,7	93,8	94,0	94,0	93,8																	
DN2C-1.18	93,5	93,5	93,7	93,8	94,0	94,0	93,8	100,0																
LD1C-1.18	93,5	93,5	93,7	93,8	94,0	94,0	93,8	100,0	100,0															
DN1T-4.11	92,4	91,9	92,1	92,2	92,4	92,4	92,2	97,8	97,8	97,8														
DN3C-1.18	93,7	93,7	93,9	94,0	94,2	94,2	94,0	99,6	99,6	99,6	98,1													
DN8L-2.11	90,0	90,5	90,3	90,3	90,5	90,5	90,3	95,9	95,9	95,9	96,0	96,2												
DN8T-4.11	93,2	93,2	93,4	93,5	93,7	93,7	93,5	99,1	99,1	99,1	98,3	99,5	95,7											
DN9L-1.10	93,0	93,0	93,2	93,4	93,5	93,5	93,4	99,0	99,0	99,0	98,3	99,3	96,0	99,1										
LD1L-2.11(2)	93,5	93,5	93,7	93,9	94,0	94,0	93,9	99,5	99,5	99,5	98,3	99,8	96,0	99,3	99,1									
LD4T-3.10	93,7	93,7	93,9	94,0	94,2	94,2	94,0	99,6	99,6	99,6	98,1	100,0	96,2	99,5	99,3	99,8								
LD12T-5.10	89,6	89,3	89,4	89,6	89,7	89,7	89,6	95,1	95,1	95,1	94,9	95,4	95,1	94,9	94,9	95,2	95,4							
LD4C-1.18	92,9	92,9	93,2	93,2	93,4	93,4	93,2	99,3	99,3	99,3	97,8	99,0	96,0	98,8	98,3	98,8	99,0	95,1						
LD16L-1.14	93,4	93,5	93,5	93,5	93,7	93,7	93,5	99,1	99,1	99,1	98,0	99,5	96,2	99,0	98,8	99,3	99,5	95,1	98,8					
LD11L-1.10(2)	93,5	93,9	93,7	93,8	94,0	94,0	93,8	99,5	99,5	99,5	98,0	99,8	96,3	99,3	99,1	99,6	99,8	95,2	98,8	99,6				
LD17L-1.10	92,9	92,6	92,7	92,9	93,1	93,1	92,9	98,5	98,5	98,5	97,7	98,8	95,7	98,3	98,1	98,6	98,8	95,7	98,1	98,5	98,6			
LD18L-14(2)	99,6	99,6	99,8	100,0	99,8	99,8	100,0	93,8	93,8	93,8	92,2	94,0	90,3	93,5	93,4	93,9	94,0	89,6	93,2	93,5	93,8	92,9		

Với cây tương quan di truyền được xây dựng dựa trên vùng ACT thì có 3 nhóm chính. Nhóm I, gồm các các MPL là *A. passiflorae* và phức hợp *A. passiflorae* có hệ số bootstap (100%), cũng như tỉ lệ tương đồng 100% (bảng 3.10, hình 3.10) có 10 MPL từ các bộ phận như lá, quả chanh dây (LD11L-1.10(2), LD17L-1.10, LD16L-1.14, LD12T-5.10, LD4T-3.10, LD1L-2.10(2), DN9L-1.10, DN8T-4.11, DN8L-2.11, DN1T-4.11) và năm MPL từ cây cỏ trong vườn chanh dây (LD4C-1.18, DN3C-1.18, LD1C-1.18, DN2C-1.18, DN1C-1.18) tại các tỉnh Lâm Đồng, Đắk Nông không có sự khác biệt về mặt di truyền. Nhóm II với 3 MPL từ Lâm Đồng và Đà Loan (LD1T-1.15, LD2T-1.16, DL01L-9.14) có hệ số bootstrap đạt 87%. Nhóm III MPL LD18L-14(2) có hệ số tương đồng bootstrap đạt 69% so với 4 MPL từ cây chanh dây nhập khẩu (CDNK1.13, CDNK7.13), Đắk Nông (DN11T-1.16) và Lâm Đồng (LD1T-1.16). Nếu dựa trên vùng ACT để phân tích mối tương quan di truyền giữa các MPL thì thật sự khó khăn, bởi cây tương quan di truyền cho thấy hầu như không thể hiện sự khác biệt giữa các MPL.



**Hình 3.10.** Cây tương quan di truyền giữa 23 mẫu phân lập *Alternaria* được xây dựng dựa trên vùng ACT sử dụng phần mềm MEGA X với hệ số bootstrap 1.000 lần lặp lại.

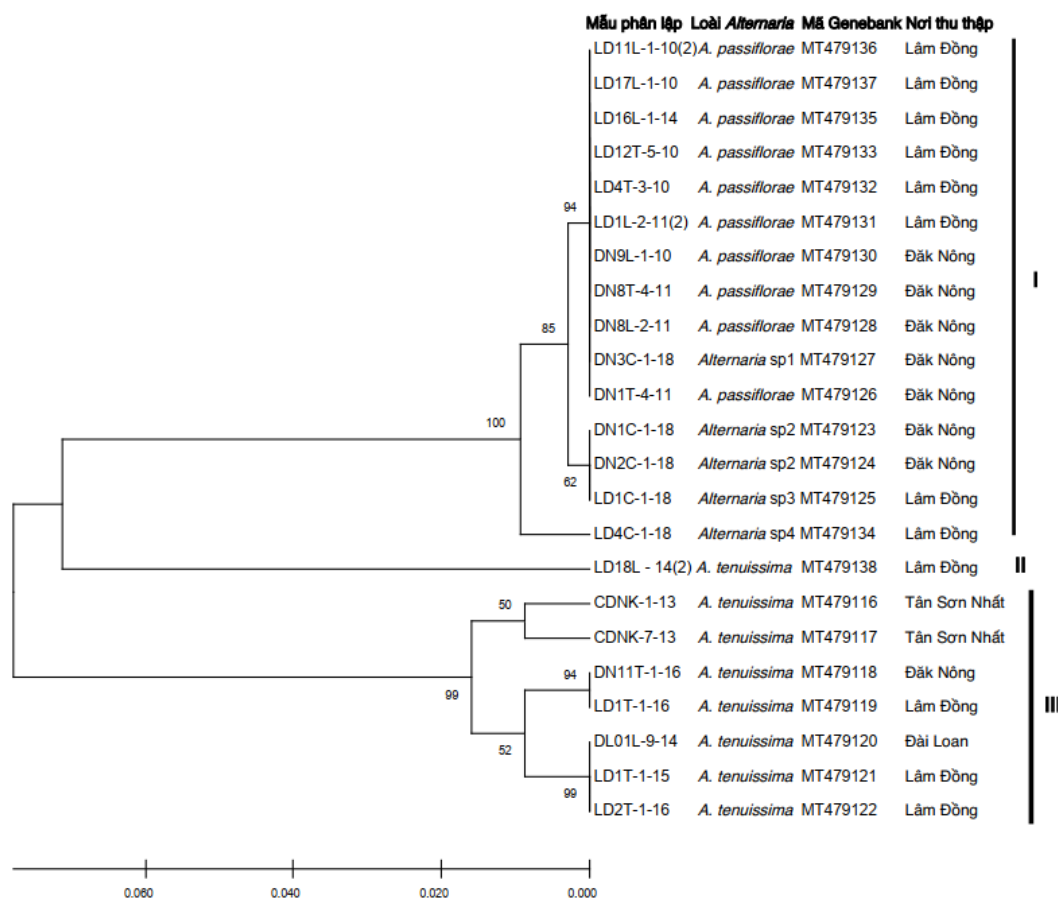
**Bảng 3.10.** Độ tương đồng kiểu gen (%) giữa các mẫu phân lập trên vùng ACT

<b>Mẫu phân lập</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>14</b>	<b>15</b>	<b>16</b>	<b>17</b>	<b>18</b>	<b>19</b>	<b>20</b>	<b>21</b>	<b>22</b>	<b>23</b>	
CDNK1.13																								
CDNK7.13	100,0																							
DN11T-1.16	100,0	100,0																						
LD1T-1.16	100,0	100,0	100,0																					
DL01L-9.14	98,7	98,7	98,7	98,7																				
LD1T-1.15	98,7	98,7	98,7	98,7	100,0																			
LD2T-1.16	98,7	98,7	98,7	98,7	100,0	100,0																		
DN1C-1.18	93,0	93,0	93,0	93,0	93,8	93,8	93,8																	
DN2C-1.18	93,0	93,0	93,0	93,0	93,8	93,8	93,8	100,0																
LD1C-1.18	93,0	93,0	93,0	93,0	93,8	93,8	93,8	100,0	100,0															
DN1T-4.11	93,0	93,0	93,0	93,0	93,8	93,8	93,8	100,0	100,0	100,0														
DN3C-1.18	93,0	93,0	93,0	93,0	93,8	93,8	93,8	100,0	100,0	100,0	100,0													
DN8L-2.11	93,0	93,0	93,0	93,0	93,8	93,8	93,8	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0												
DN8T-4.11	93,0	93,0	93,0	93,0	93,8	93,8	93,8	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0											
DN9L-1.10	93,0	93,0	93,0	93,0	93,8	93,8	93,8	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0										
LD1L-2.11(2)	93,0	93,0	93,0	93,0	93,8	93,8	93,8	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0									
LD4T-3.10	93,0	93,0	93,0	93,0	93,8	93,8	93,8	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0								
LD12T-5.10	93,0	93,0	93,0	93,0	93,8	93,8	93,8	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0							
LD4C-1.18	93,0	93,0	93,0	93,0	93,8	93,8	93,8	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0						
LD16L-1.14	93,0	93,0	93,0	93,0	93,8	93,8	93,8	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0					
LD11L-1.10(2)	93,0	93,0	93,0	93,0	93,8	93,8	93,8	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0				
LD17L-1.10	93,0	93,0	93,0	93,0	93,8	93,8	93,8	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
LD18L-14(2)	99,5	99,5	99,5	99,5	99,1	99,1	99,1	93,4	93,4	93,4	93,4	93,4	93,4	93,4	93,4	93,4	93,4	93,4	93,4	93,4	93,4	93,40	93,40	



**Bảng 3.11.** Độ tương đồng kiểu gen giữa các mẫu phân lập (%) trên vùng GPDH

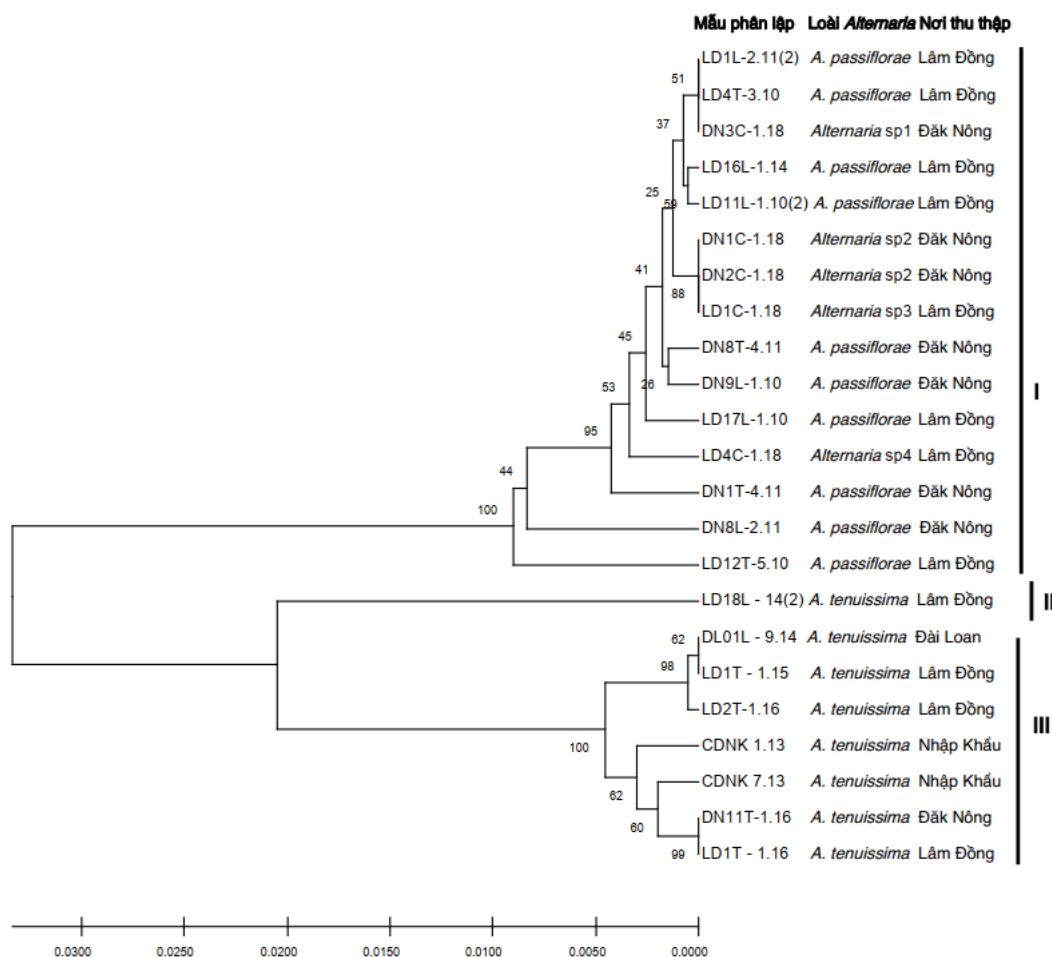
Mẫu phân lập	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	
CDNK1.13																								
CDNK7.13	98,2																							
DN11T-1.16	97,7	98,2																						
LD1T-1.16	97,7	98,2	100,0																					
DL01L-9.14	96,0	96,5	98,2	98,2																				
LD1T-1.15	96,0	96,5	98,2	98,2	100,0																			
LD2T-1.16	96,0	96,5	98,2	98,2	100,0	100,0																		
DN1C-1.18	86,9	85,7	87,5	87,5	88,0	88,0	88,0																	
DN2C-1.18	86,9	85,7	87,5	87,5	88,0	88,0	88,0	100,0																
LD1C-1.18	86,9	85,7	87,5	87,5	88,0	88,0	88,0	100,0	100,0															
DN1T-4.11	87,5	86,3	88,0	88,0	88,6	88,6	88,6	99,4	99,4	99,4														
DN3C-1.18	87,5	86,3	88,0	88,0	88,6	88,6	88,6	99,4	99,4	99,4	100,0													
DN8L-2.11	87,5	86,3	88,0	88,0	88,6	88,6	88,6	99,4	99,4	99,4	100,0	100,0												
DN8T-4.11	87,5	86,3	88,0	88,0	88,6	88,6	88,6	99,4	99,4	99,4	100,0	100,0	100,0											
DN9L-1.10	87,5	86,3	88,0	88,0	88,6	88,6	88,6	99,4	99,4	99,4	100,0	100,0	100,0	100,0										
LD1L-2.11(2)	87,5	86,3	88,0	88,0	88,6	88,6	88,6	99,4	99,4	99,4	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0									
LD4T-3.10	87,5	86,3	88,0	88,0	88,6	88,6	88,6	99,4	99,4	99,4	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0								
LD12T-5.10	87,5	86,3	88,0	88,0	88,6	88,6	88,6	99,4	99,4	99,4	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0							
LD4C-1.18	87,5	88,0	89,7	89,7	90,3	90,3	90,3	97,7	97,7	97,7	98,2	98,2	98,2	98,2	98,2	98,2	98,2	98,2						
LD16L-1.14	87,5	86,3	88,0	88,0	88,6	88,6	88,6	99,4	99,4	99,4	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0					98,2
LD11L-1.10(2)	87,5	86,3	88,0	88,0	88,6	88,6	88,6	99,4	99,4	99,4	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	98,2			100,0	
LD17L-1.10	87,5	86,3	88,0	88,0	88,6	88,6	88,6	99,4	99,4	99,4	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	98,2	100,0		100,0	
LD18L-14(2)	86,9	86,9	87,5	87,5	88,0	88,0	88,0	98,8	98,8	98,8	99,4	99,4	99,4	99,4	99,4	99,4	99,4	99,4	99,4	97,7	99,4	99,4	99,4	99,4



**Hình 3.11.** Cây tương quan di truyền giữa 23 mẫu phân lập *Alternaria* được xây dựng dựa trên vùng GPDH sử dụng phần mềm MEGA X với hệ số bootstrap 1.000 lần lặp lại.

Cây tương quan di truyền được xây dựng dựa trên vùng GPDH. Hình 3.11 cho thấy các MPL được chia thành 3 nhóm chính. Nhóm I gồm có *A. passiflorae* 15 MPL, phân bố ở cả 2 tỉnh: 8 mẫu từ Lâm Đồng (LD11L-1.10(2), LD17L-1.10, LD16L-1.14, LD12T-5.10, LD4T-3.10, LD1L-2.11(2), LD1C-1.18, LD4C-1.18) và 7 mẫu từ Đắk Nông (DN9L-1.10, DN8T-4.11, DN8L-2.11, DN3C-1.18, DN1T-4.11, DN1C-1.18 và DN2C-1.18). Bảng 3.11 cũng cho thấy các MPL có tỷ lệ tương đồng tối đa 100% là những mẫu phân lập cùng chung một nhóm hoặc phân nhóm trên cây tương quan di truyền (thể hiện màu xanh trên bảng 3.11). Có sự tương đồng di truyền lớn giữa các MPL được từ Đắk Nông và Lâm Đồng, bởi chúng được sắp xếp chung trong cùng một nhóm, hoặc phân nhóm cho thấy tính đa dạng di truyền về mặt địa lý vùng miền hầu

như không đáng kể. Nhóm II chỉ duy nhất 1 mẫu *Alternaria* phân lập được từ Lâm Đồng (LD18L-18(2)) tồn tại. Nhóm III với 2 MPL từ cây chanh dây nhập khẩu (CDNK1.13, CDNK7.13) có hệ số bootstrap 99% so với 5 MPL từ Lâm Đồng, Đắk Nông và Đài Loan (DN11T-1.16, LD1T-1.16, DL01L-9.14, LD1T-1.15 và LD2T-1.16). So sánh tương đồng trình tự nucleotide (bảng 3.11) cũng cho kết quả tương tự với tỷ lệ phần trăm cao (96 – 98,2%). Hệ số bootstrap cao (99%) chứng tỏ có không có sự khác biệt lớn về mặt di truyền giữa các mẫu *Alternaria* phân lập từ chanh dây nhập khẩu và mẫu *Alternaria* ở hai vùng địa lý Lâm Đồng và Đắk Nông.



**Hình 3.12.** Cây tương quan di truyền giữa 23 mẫu phân lập *Alternaria* được xây dựng dựa trên vùng gen kết hợp rDNA-ITS-ACT-GPDH sử dụng phần mềm MEGA X với hệ số bootstrap 1.000 lần lặp lại.

**Bảng 3.12.** Độ tương đồng kiểu gen giữa các mẫu phân lập (%) trên ba vùng rDNA-ITS, ACT, GPDH

Mẫu phân lập	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	
CDNK1.13																								
CDNK7.13	99,3																							
DN11T-1.16	99,3	99,4																						
LD1T-1.16	99,4	99,5	99,9																					
DL01L-9.14	98,7	98,8	99,2	99,3																				
LD1T-1.15	98,7	98,8	99,2	99,3	100,0																			
LD2T-1.16	98,8	98,9	99,3	99,4	99,9	99,9																		
DN1C-1.18	92,2	92,1	92,4	92,5	92,9	92,9	92,8																	
DN2C-1.18	92,2	92,1	92,4	92,5	92,9	92,9	92,8	100,0																
LD1C-1.18	92,2	92,1	92,4	92,5	92,9	92,9	92,8	100,0	100,0															
DN1T-4.11	91,7	91,2	91,6	91,7	92,1	92,1	92,0	98,6	98,6	98,6														
DN3C-1.18	92,4	92,3	92,6	92,7	93,1	93,1	93,0	99,7	99,7	99,7	98,9													
DN8L-2.11	90,2	90,3	90,5	90,5	90,9	90,9	90,8	97,4	97,4	97,4	97,6	97,7												
DN8T-4.11	92,2	92,0	92,4	92,4	92,8	92,8	92,7	99,4	99,4	99,4	99,0	99,7	97,4											
DN9L-1.10	92,1	91,9	92,3	92,3	92,7	92,7	92,6	99,3	99,3	99,3	99,0	99,6	97,6	99,5										
LD1L-2.11(2)	92,3	92,2	92,5	92,6	93,0	93,0	92,9	99,6	99,6	99,6	99,0	99,9	97,6	99,6	99,5									
LD4T-3.10	92,4	92,3	92,6	92,7	93,1	93,1	93,0	99,7	99,7	99,7	98,9	100,0	97,7	99,7	99,6	99,9								
LD12T-5.10	90,0	89,6	90,0	90,1	90,5	90,5	90,4	97,0	97,0	97,0	97,0	97,2	97,1	97,0	97,0	97,1	97,2							
LD4C-1.18	92,0	92,1	92,5	92,5	92,9	92,9	92,8	99,2	99,2	99,2	98,4	99,1	97,3	99,0	98,7	99,0	99,1	96,8						
LD16L-1.14	92,3	92,2	92,4	92,4	92,8	92,8	92,7	99,4	99,4	99,4	98,8	99,7	97,7	99,4	99,3	99,6	99,7	97,1	99,0					
LD11L-1.10(2)	92,3	92,3	92,5	92,6	93,0	93,0	92,9	99,6	99,6	99,6	98,8	99,9	97,8	99,6	99,5	99,8	99,9	97,1	99,0	99,8				
LD17L-1.10	92,0	91,6	92,0	92,1	92,5	92,5	92,4	99,0	99,0	99,0	98,6	99,3	97,4	99,0	98,9	99,2	99,3	97,4	98,6	99,1	99,2			
LD18L-14(2)	95,5	95,3	95,7	95,8	95,7	95,7	95,8	92,4	92,4	92,4	91,6	92,6	90,4	92,4	92,3	92,5	92,6	90,0	91,9	92,4	92,5	92,0		

Cây tương quan di truyền được xây dựng dựa trên sự tổng hợp ba vùng gen theo thứ tự ITS-ACT-GPDH với hệ số bootstrap 1.000 phân thành ba nhóm chính. Nhóm I, là *A. passiflorae* và phức hợp *A. passiflorae* đạt hệ số bootstrap cao tối đa (100) tương tự như khi phân tích trên vùng gen GPDH, các MPL này phân bố đều ở cả 2 tỉnh: 8 mẫu từ Lâm Đồng LD12T-5.10, (LD1L-2.11(2), LD4T-3.10, LD16L-1.14, LD11L-1.10(2), LD1C-1.18), LD17L-1.10 và LD4C-1.18) và 7 mẫu từ Đắk Nông (DN3C-1.18, DN1C-1.18, DN2C-1.18, DN8T-4.11, DN9L-1.10, DN1T-4.11 và DN8L-2.11) lại một lần nữa cho thấy nhóm MPL từ các tỉnh Lâm Đồng và Đắk Nông thể hiện sự gần gũi về mặt di truyền. Nhóm II với chỉ một mẫu *A. tenuissima* tách biệt duy nhất (LD18L-14(2)) được phân lập từ mẫu lá của cây chanh dây trồng tại Lâm Đồng. Từ bảng so sánh tương đồng di truyền (bảng 3.12) cũng có thể thấy rằng tỷ lệ tương đồng so với các mẫu phân lập còn lại khá thấp (chỉ từ 90 – 95,8%, hiển thị phần màu vàng). Nhóm III, loài *A. tenuissima* có 3 MPL DL01L-9.14, LD1T-1.15 và LD2T-1.16 có hệ số bootstrap tối đa (100) so với 4 MPL còn lại trong nhóm này (2 MPL từ cây chanh dây nhập khẩu: CDNK1.13, CDNK7.13; 1 MPL DN11T-1.16 từ Đắk Nông và 1 mẫu từ Lâm Đồng LD1T-1.16). Tương đồng kiểu gen (bảng 3.12) cũng minh chứng cho sự phân nhóm này vì cho tỷ lệ tương đồng cao (98,7 – 99,4%, được thể hiện màu đỏ trên bảng) chứng tỏ các mẫu nấm phân lập từ giống chanh dây nhập khẩu so với 3 vùng địa lý Đắk Nông, Lâm Đồng và Đà Loan không có sự khác biệt di truyền, chứng minh *A. tenuissima* là loài du nhập vào Việt Nam. Với cây tương quan di truyền được xây dựng dựa trên vùng gen kết hợp rDNA-ITS-ACT-GPDH cũng cho kết quả tương tự về mối di truyền gần gũi nhau giữa các MPL *Alternaria* từ giống chanh dây nhập khẩu so với các MPL từ Lâm Đồng, Đắk Nông và Đà Loan (hình 3.12).

Dựa trên dữ liệu phân tử vùng rDNA-ITS, ACT và GPDH có kết luận: 1) Các MPL từ cây chanh dây nhập khẩu có mối tương quan di truyền gần gũi với các mẫu phân lập từ Lâm Đồng và Đắk Nông, chứng tỏ có chung nguồn gốc phát sinh, 2) Các MPL từ vùng Lâm Đồng có mức đa dạng di truyền cao và các MPL từ vùng Đắk Nông có mức đa dạng di truyền thấp hơn, 3) ACT là vùng gen có tần số đột biến

thấp hơn vùng ITS trong nấm *Alternaria*. Dựa vào kết quả nghiên cứu này, vùng gen ACT có thể được sử dụng để nghiên cứu tính ổn định di truyền quần thể và nguồn gốc phát sinh bệnh cho nấm *Alternaria* spp.

Trình tự vùng rDNA-ITS, ACT, GPDH của 23 mẫu phân lập *Alternaria* được đưa vào genbank như là nguồn dữ liệu cho nghiên cứu so sánh (bảng 3.13).

**Bảng 3.13.** Mã số trên ngân hàng gen (GenBank accession number) của 23 MPL *Alternaria* trên vùng rDNA - ITS, ACT và GPDH đã được xác định trong nghiên cứu

Loài <i>Alternaria</i>	Mẫu phân lập	Accession number <sup>a</sup>		
		ITS	ACT	GPDH
<i>A. tenuissima</i>	LD1T-1.15	MN955453	MT479099	MT479121
<i>A. tenuissima</i>	DL01L-9.14	MN955454	MT479098	MT479120
<i>A. tenuissima</i>	CDNK-7.13	MN955455	MT479094	MT479117
<i>A. tenuissima</i>	CDNK-1.13	MN955456	MT479093	MT479116
<i>A. tenuissima</i>	LD18L-14(2)	MT239522	MT479097	MT479136
<i>A. tenuissima</i>	LD2T-1.16	MN955459	MT479100	MT479122
<i>A. tenuissima</i>	LD1T-1.16	MN955460	MT479095	MT479119
<i>A. tenuissima</i>	DN11T-1.16	MN955461	MT479096	MT479118
<i>A. passiflorae</i>	DN8L-2.11	MN955463	MT479105	MT479128
<i>A. passiflorae</i>	DN9L-1.10	MN955464	MT479107	MT479130
<i>A. passiflorae</i>	LD17L-1.10	MN955465	MT479115	MT479136
<i>A. passiflorae</i>	DN1T4.11	MN955466	MT479102	MT479126
<i>A. passiflorae</i>	DN8T-4.11	MN955467	MT479106	MT479129
<i>A. passiflorae</i>	LD4C-1.18	MN955468	MT479110	MT479134
<i>A. passiflorae</i>	LD1C-1.18	MN955469	MT479110	MT479125
<i>A. passiflorae</i>	DN2C-1.18	MN955470	MT479103	MT479124
<i>A. passiflorae</i>	DN1C-1.18	MN955471	MT479101	MT479123
<i>A. passiflorae</i>	DN3C-1.18	MN955472	MT479104	MT479127
<i>A. passiflorae</i>	LD4T-3.10	MN955473	MT479111	MT479132
<i>A. passiflorae</i>	LD1L-2.11sp(2)	MN955474	MT479109	MT479131
<i>A. passiflorae</i>	LD16L-01.14	MN955475	MT479114	MT479135
<i>A. passiflorae</i>	LD11L-1.10sp(2)	MN955476	MT479112	MT479136
<i>A. passiflorae</i>	LD12T-5.10	MT239521	MT479112	MT479133

### 3.2. Đặc tính sinh học của các MPL *Alternaria*

#### 3.2.1. Đặc điểm của MPL *Alternaria* spp. trên môi trường dinh dưỡng khác nhau

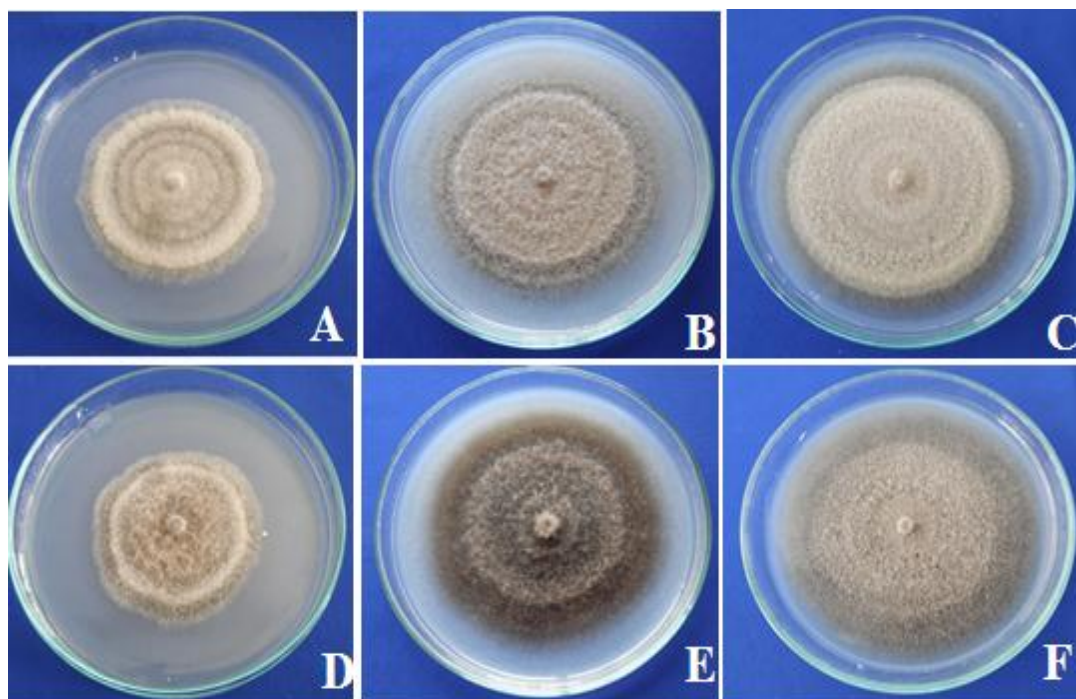
Nấm được xếp vào nhóm những sinh vật, có cấu tạo đơn bào hoặc đa bào. Các loại nấm gây bệnh trên thực vật đều có thể tồn tại và phát triển ở nhiều môi trường khác nhau. Chúng có thể tồn tại và phát triển trong đất, trong nước, trong mô ký chủ và trên tàn dư thực vật. Trong điều kiện nuôi cấy, nấm có thể phát triển trên nhiều loại môi trường dinh dưỡng khác nhau và có khả năng sử dụng các nguồn carbohydrate như glucose và sucrose để tổng hợp thành các protein cho sự sinh trưởng và phát triển.

Kết quả từ bảng 3.14 cho thấy *A. tenuissima* phát triển nhanh hơn *A. passiflorae* trên môi trường PCA là môi trường thích hợp nhất so với môi trường CMA và V8. Quan sát ở 8 ngày sau cấy, đường kính trung bình tản nấm (ĐKTBTN) của *A. tenuissima* đạt 8,08 cm trên môi trường PCA; 7,51 cm trên CMA và 6,43 cm trên môi trường V8. *A. passiflorae* thì có ĐKTBTN lần lượt là 6,55 cm; 5,26 cm; 4,36 cm. Sử dụng PCA như môi trường phân biệt nhanh 2 loài nấm trong điều kiện phòng thí nghiệm.

**Bảng 3.14.** Đường kính trung bình tản nấm (cm) của *A. passiflorae* và *A. tenuissima* trên môi trường V – 8 juice, Modified - CMA, PCA sau 10 ngày nuôi cấy

Môi trường	Đường kính trung bình tản nấm (cm)				
	2 NSC	4 NSC	6 NSC	8 NSC	10 NSC
<i>Alternaria tenuissima</i> (n = 36)					
PCA	2,39	4,46	6,27	8,08	-
CMA	2,35	4,12	5,88	7,51	-
V8	2,37	4,16	5,08	6,43	7,51
<i>Alternaria passiflorae</i> (n = 61)					
PCA	1,94	3,64	4,99	6,55	7,83
CMA	1,83	3,17	4,17	5,26	6,57
V8	1,64	3,02	3,86	4,36	6,04

Ghi chú: (n) là số MPL *Alternaria* được sử dụng trong thí nghiệm; (-) là không quan trắc vì sợi nấm đã phát triển chạm thành đĩa petri; NSC: ngày sau cấy.



**Hình 3.13.** Hình thái tản nấm của *Alternaria tenuissima* trên 3 môi trường sau 10 ngày nuôi cấy. (A, D): V-8 juice; (B, E): CMA; (C, F): PCA; (A, B, C): mẫu CDNK19.14; (D, E, F): mẫu CDNK21.13.

### 3.2.2. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến sinh trưởng và phát triển của *Alternaria* spp.

#### 3.2.2.1. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến khả năng sinh trưởng của *Alternaria* spp.

Thông thường, các loài nấm gây bệnh trên thực vật đều có dãy nhiệt độ tối thích từ 25 – 30 °C, mức nhiệt độ khảo sát trong nghiên cứu này được bố trí rộng hơn dưới 25°C và trên 30°C trên môi trường PCA. Kết quả ở bảng 3.15 cho thấy các MPL *Alternaria* đều phát triển ở 15°C, 20°C, 25°C, 30°C, 35°C. Tuy nhiên, ứng với mỗi mức nhiệt độ tốc độ sinh trưởng khác nhau và nhiệt độ thích hợp nhất cho *A. passiflorae* và *A. tenuissima* là 25 – 30°C.

Kết quả từ bảng 3.15 cho thấy *A. tenuissima* sinh trưởng và phát triển ở nhiệt độ từ 15°C đến 35°C, tản nấm đạt kích thước lớn nhất ở 25 – 30°C lần lượt là 8,67 cm và 7,68 cm sau 8 ngày trên môi trường PCA. Tương tự loài *A. passiflorae* cũng có tản nấm lớn nhất ở mức nhiệt độ 25 – 30°C lần lượt là 6,34 cm và 7,07 cm sau 10 ngày nuôi ủ trên môi trường PCA. *A. passiflorae* và *A. tenuissima* đều không phát triển ở 38°C sau 10 ngày nuôi ủ, điều này có thể kết luận rằng ở 38°C hoặc trên là ngưỡng nhiệt độ làm ngừng sự sinh trưởng, phát triển của *A. passiflorae* và *A.*

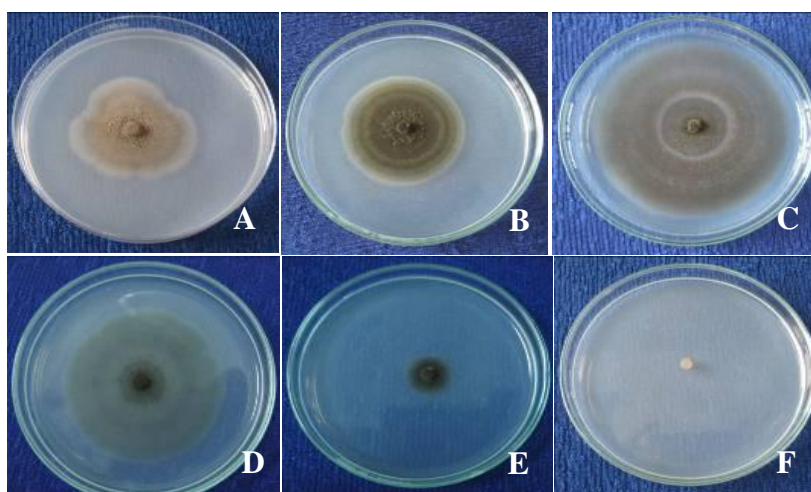


*tenuissima*. Mặc dù dưới kính lúp soi nổi một số MPL vẫn có sự phát triển của sợi nấm nhưng sợi nấm mỏng manh và khó ghi nhận được bằng mắt thường, cụ thể gồm các MPL thuộc *A. passiflorae*: DN5L-5.11(2), DN8T-4.11, DN5L-5.11(1), LD4T-3.10, LD11L-1.10(2), LD14L-1.10(1), LD14L-1.10(2), LD17L-1.10, LD1L-1.11(1), LD1L-1.11(1), LD1L-1.11(2) và LD11L-1.10(1).

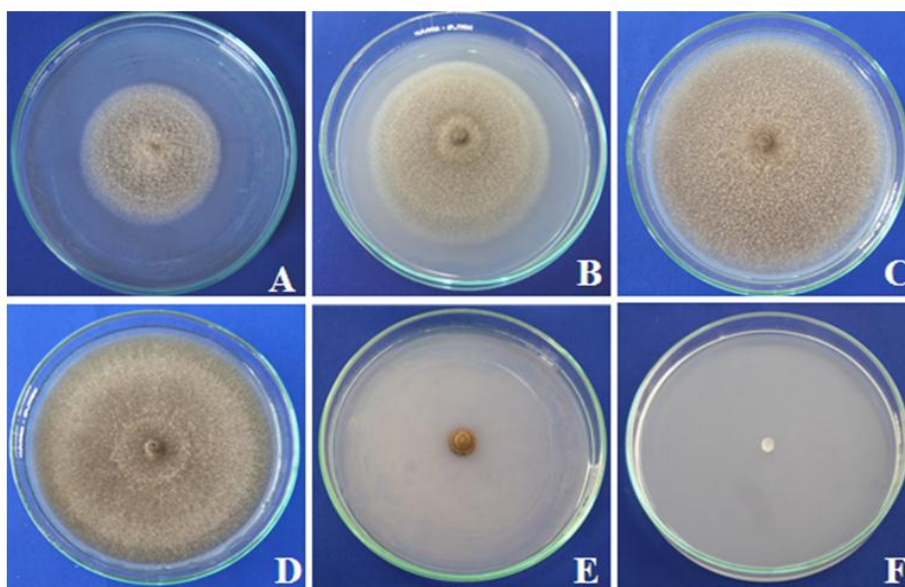
**Bảng 3.15.** Đường kính trung bình tản nấm (cm) của *A. passiflorae* và *A. tenuissima* ở các mức nhiệt độ sau 10 ngày nuôi cấy trên môi trường PCA

Nhiệt độ	Đường kính trung bình tản nấm (cm)				
	2 NSC	4 NSC	6 NSC	8 NSC	10 NSC
<i>Alternaria tenuissima</i> (n = 36)					
15°C	1,02	1,99	3,11	4,13	5,16
20°C	1,64	3,29	5,16	6,62	8,14
25°C	2,27	4,50	6,85	8,67	-
30°C	2,31	4,43	6,41	7,68	-
35°C	0,69	0,70	0,95	1,16	1,37
<i>Alternaria passiflorae</i> (n = 61)					
15°C	1,02	1,61	2,23	3,11	3,68
20°C	1,23	2,02	2,87	3,70	4,65
25°C	1,42	2,61	3,65	4,80	6,34
30°C	1,47	2,79	4,40	5,97	7,07
35°C	0,64	0,96	1,24	1,50	1,95

Ghi chú: (n) là số MPL *Alternaria* được sử dụng trong thí nghiệm; (-) là không quan trắc vì sợi nấm đã phát triển chạm thành đĩa petri; NSC: ngày sau cấy.



**Hình 3.14.** Hình thái tản nấm *Alternaria passiflorae* ở các mức nhiệt độ trên môi trường PCA sau 10 ngày nuôi ủ ở các mức nhiệt độ khác nhau. (A): 15°C, (B): 20°C, (C): 25°C, (D): 30°C, (E): 35°C, (F): 38°C.



**Hình 3.15.** Hình thái tản nấm *Alternaria tenuissima* (mẫu CDNK1.13) ở các mức nhiệt độ trên môi trường PCA sau 10 ngày nuôi ủ ở các mức nhiệt độ khác nhau. (A): 15°C, (B): 20°C, (C): 25°C, (D): 30°C, (E): 35°C, (F): 38°C.

### 3.2.2.2. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến sự sống sót của bào tử *Alternaria* spp.

Từ kết quả được trình bày trong mục 3.2.2.1 đã ghi nhận loài *A. passiflorae* vẫn có khả năng tồn tại dạng sợi nấm ở nhiệt độ 38°C. Do đó, khả năng sống sót của *Alternaria* ở các mức nhiệt độ cao hơn đã được đánh giá 35°C, 36°C, 37°C, 38°C, 39°C, 40°C, 41°C, 42°C, 43°C, 44°C, 45°C, 46°C, 47°C, 48°C, 49°C và 50°C trên môi trường PCA.

Mỗi loài nấm đều có một giới hạn nhiệt độ thích hợp để bào tử của nấm sống sót và phát triển hoàn tất vòng đời.

Kết quả từ bảng 3.16 cho thấy, sau 5 ngày bào tử các MPL *Alternaria* của cả hai loài đều có khả năng sống sót và phát triển được trên PCA sau khi đun dung dịch bào tử ở các mức nhiệt độ từ 35 – 45°C trong 10 phút. Ở 46°C bào tử các MPL *Alternaria* vẫn nảy mầm phát triển, tuy nhiên MPL LD1L-2.11 (loài *A. passiflorae*) không có khả năng phát triển. Ở 47°C, đa số các MPL loài *A. tenuissima* và *A. passiflorae* vẫn còn có khả năng sống sót và phát triển, ngoại trừ *A. tenuissima* mẫu CDNK4.13, CDNK7.13 và *A. passiflorae* mẫu LD1L-2.11.

**Bảng 3.16.** Khả năng sống sót của bào tử nấm *A. passiflorae* và *A. tenuissima* trên môi trường PCA sau 5 ngày nuôi ủ ở các mức nhiệt độ

Vùng phân lập	Mẫu phân lập	Mức nhiệt độ (°C)					
		< 45	46	47	48	49	50
		<i>A. tenuissima</i>					
Chanh dây nhập khẩu	CDNK1.11	+	+	+	-	-	-
	CDNK1.13	+	+	+	-	-	-
	CDNK4.13	+	+	-	-	-	-
	CDNK7.13	+	+	-	-	-	-
Đắk Nông	DN11T-1.16	+	+	+	+	-	-
	DL01L-9.14	+	+	+	-	-	-
	LD18L.14(2)	+	+	+	-	-	-
Lâm Đồng	LD1T-1.15	+	+	+	+	-	-
	LD1T-1.16	+	+	+	+	-	-
	LD2T-1.16	+	+	+	+	-	-
		<i>A. passiflorae</i>					
Đắk Nông	DN9L-1.10	+	+	+	+	-	-
	DN1T-4.11	+	+	+	+	+	+
	DN8L-2.11	+	+	+	+	+	+
	DN8T-4.11	+	+	+	+	-	-
	LD4T-3.10	+	+	+	-	-	-
Lâm Đồng	LD11L-1.10	+	+	+	-	-	-
	LD12T-5.10	+	+	+	+	-	-
	LD17L-1.10	+	+	+	+	-	-
	LD1L-2.11	+	-	-	-	-	-
	LD16L-1.14	+	+	+	-	-	-

Ghi chú: (+): Sợi nấm phát triển sau 5 ngày nuôi ủ, (-): Sợi nấm không phát triển sau 5 ngày nuôi ủ, LD: Lâm Đồng, DN: Đắk Nông; L: Lá, T: Quả; CDNK: Chanh dây nhập khẩu.

Khả năng sống sót của các MPL của cả hai loài *A. tenuissima* và *A. passiflorae* cũng giảm dần khi tăng các mức nhiệt độ ủ lên, ở 48°C có khả năng sống sót, bao gồm *A. tenuissima* mẫu LD1T-1.15, LD1T-1.16, LD2T-1.16, DN11T-1.16, chiếm tỷ lệ 40%. Trong khi đó, *A. passiflorae* thì tỷ lệ sống sót 60%. Khi tăng nhiệt độ lên 49°C và 50°C, mẫu DN1T-4.11 và DN8L-2.11 thuộc loài *A. passiflorae* có khả năng sống sót sau 5 ngày quan sát. Minh chứng rằng bào tử của *A. passiflorae* có khả năng chịu nhiệt và tồn tại ở điều kiện nhiệt độ cao 50°C. Kết quả cho thấy *A. passiflorae* khả năng phát tán nguồn bào tử trong điều kiện nóng ẩm ở các vùng trồng chanh dây hiện nay ở nước ta. Khoảng nhiệt độ cao cần được nghiên cứu thêm nhằm

làm cơ sở áp dụng trong công nghệ xử lý sau thu hoạch cho quả tươi chanh dây phục vụ xuất khẩu hoặc nội tiêu.

### 3.2.3. Ảnh hưởng của chiếu sáng đến sinh trưởng của *Alternaria* spp.

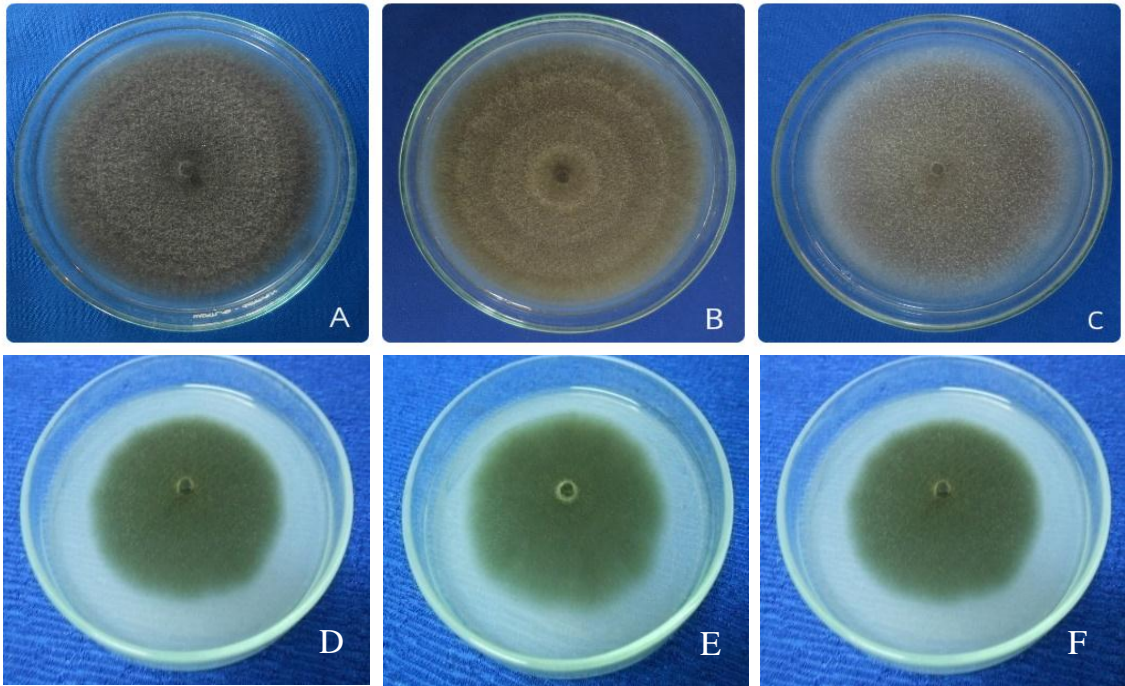
Thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của điều kiện chiếu sáng đến khả năng sinh trưởng và phát triển của *A. passiflorae* và *A. tenuissima* ở 3 mức ánh sáng: 24 giờ tối, 24 giờ sáng và 12 giờ sáng – 12 giờ tối đã được tiến hành.

**Bảng 3.17.** Đường kính trung bình tản nấm (cm) của *A. passiflorae* và *A. tenuissima* ở các điều kiện chiếu sáng sau 10 ngày nuôi cấy trên môi trường PCA

Ánh sáng	Đường kính trung bình tản nấm (cm)				
	2 NSC	4 NSC	6 NSC	8 NSC	10 NSC
<i>Alternaria tenuissima</i> (n = 10)					
12S12T	2,28	4,21	6,42	8,25	-
24S	2,13	4,02	6,13	7,90	-
24T	2,23	4,28	6,36	8,09	-
<i>Alternaria passiflorae</i> (n = 10)					
12S12T	1,24	2,48	3,78	4,95	6,33
24S	1,53	2,82	4,06	5,38	6,56
24T	1,19	2,45	3,56	4,67	6,23

Ghi chú: (n) là số MPL *Alternaria* được sử dụng trong thí nghiệm; (-) là không quan trắc vì sợi nấm đã phát triển chạm thành đĩa petri; NSC: ngày sau cấy; 24T: 24 giờ tối, 24S: 24 giờ sáng, 12S12T: 12 giờ sáng - 12 giờ tối.

Ở 8 ngày sau cấy, tản nấm *A. tenuissima* lớn hơn *A. passiflorae* ở cả 3 điều kiện chiếu sáng 12S12T, 24S, 24T. Trong điều kiện 24 giờ sáng ảnh hưởng đến khả năng phát triển của *A. tenuissima*, đường kính đạt 7,9 cm thấp nhất so với điều kiện chiếu sáng 12S12T và 24T. Đối với *A. passiflorae* 24S là điều kiện chiếu sáng thích hợp cho sự phát triển của loài này, đường kính tản nấm đạt 6,56 cm sau 10 ngày nuôi cấy (bảng 3.17). Như vậy, có thể dùng ánh sáng như 1 điều kiện nhằm phân biệt sơ bộ 2 loài *Alternaria* phân lập trên chanh dây.



**Hình 3.16.** Hình thái tản nấm *A. passiflorae* và *A. tenuissima* ở các điều kiện chiếu sáng trên môi trường PCA sau 10 ngày nuôi ủ. (A, D): 12 giờ sáng - 12 giờ tối; (B, E): 24 giờ tối; (C, F): 24 giờ sáng; (A, B, C): loài *A. tenuissima* (mẫu CDNK1.13); (D, E, F): loài *A. passiflorae* (mẫu LD4T-3.10).

#### 3.2.4. Ảnh hưởng của pH đến sinh trưởng của *Alternaria* spp.

Kết quả nghiên cứu cho thấy khoảng pH thích hợp cho sự sinh trưởng và phát triển của *A. passiflorae* và *A. tenuissima* là khác nhau. *A. passiflorae* thích hợp ở pH từ 5 – 6, đường kính tản nấm đạt từ 6,67 – 7,13 cm; trong khi đó thì *A. tenuissima* thích hợp ở pH từ 5,5 – 9, đường kính tản nấm đạt trên 9 cm. Các mức pH còn lại thì cả hai loài đều có thể sinh trưởng và phát triển được với khả năng phát triển kém hơn, đường kính tản nấm nhỏ hơn (bảng 3.18). Như vậy loài *A. tenuissima* có thể tồn tại trong ngưỡng pH rộng hơn *A. passiflorae* và có thể sử dụng môi trường pH = 9 như là kỹ thuật phân biệt nhanh 2 loài này trên mẫu chanh dây.

**Bảng 3.18.** Đường kính trung bình tản nấm (cm) của *A. passiflorae* và *A. tenuissima* ở các mức pH sau 10 ngày nuôi cấy trên môi trường PCA

pH	Đường kính trung bình tản nấm (cm)				
	2 NSC	4 NSC	6 NSC	8 NSC	10 NSC
<i>Alternaria tenuissima</i> (n = 10)					
4,0	2,00	4,05	5,98	7,82	8,49
4,5	2,06	4,27	5,98	7,83	8,56
5,0	2,27	4,23	5,94	7,96	8,65
5,5	2,37	4,43	6,07	8,04	-
6,0	2,43	4,41	6,19	8,13	-
6,5	2,30	4,47	6,43	8,49	-
7,0	2,23	4,31	6,37	8,42	-
7,5	2,35	4,42	6,85	8,44	-
8,0	2,30	4,46	7,06	8,61	-
8,5	2,30	4,51	7,00	8,59	-
9,0	2,13	4,20	6,54	8,44	-
<i>Alternaria passiflorae</i> (n = 10)					
4,0	1,50	2,67	3,72	4,96	5,95
4,5	1,60	2,95	3,82	4,99	6,17
5,0	1,49	3,01	4,12	5,56	6,74
5,5	1,24	2,40	3,75	5,23	7,13
6,0	1,08	3,07	4,04	5,44	6,67
6,5	1,23	2,51	3,41	4,61	5,68
7,0	1,04	2,24	3,17	4,36	5,44
7,5	1,05	2,00	2,87	3,91	4,51
8,0	1,14	2,61	3,22	3,85	4,37
8,5	1,07	1,92	2,83	3,75	5,12
9,0	0,78	1,43	2,26	3,13	4,42

Ghi chú: (n) là số MPL *Alternaria* được sử dụng trong thí nghiệm; (-) là không quan trắc vì sợi nấm đã phát triển chạm thành đĩa petri; NSC: ngày sau cấy.

*A. tenuissima* và *A. passiflorae* đều sinh trưởng tốt trên môi trường PCA; Nhiệt độ thích hợp là 25 – 30°C; Bào tử nấm có khả năng sống sót ở ngưỡng nhiệt độ 45 – 48°C (loài *A. tenuissima*) và ở 45 – 50°C (loài *A. passiflorae*) sau khi đun nóng với thời gian 10 phút, loài *A. tenuissima* có khả năng kháng nhiệt kém hơn loài *A. passiflorae*. Ánh sáng và pH ít bị ảnh hưởng đến khả năng sinh trưởng của *A.*

*tenuissima* và *A. passiflorae* (bảng 3.18). Tóm lại, dựa vào kết quả khảo sát các đặc tính sinh học có thể phân biệt *A. tenuissima* và *A. passiflorae* dựa vào các đặc điểm khác biệt được trình bày trong bảng 3.19.

**Bảng 3.19.** Các đặc tính sinh học của *A. tenuissima* và *A. passiflorae*

STT	Đặc tính sinh học	Loài <i>Alternaria</i>	
		<i>A. passiflorae</i>	<i>A. tenuissima</i>
1	Môi trường thích hợp	PCA	PCA
2	pH thích hợp	5 – 6	5,5 – 9
3	Ánh sáng thích hợp	12S12T, 24S, 24T	12S12T, 24S, 24T
4	Nhiệt độ thích hợp (°C)	25 – 30	25 – 30
5	Ngưỡng nhiệt độ mà bào tử <i>Alternaria</i> vẫn có khả năng sống sót (°C)	45 – 50	45 – 48
6	Ngưỡng nhiệt độ mà bào tử <i>Alternaria</i> không có khả năng sống sót / không nảy mầm (°C)	-	49

Ghi chú: (-) chưa xác định được trong điều kiện của nghiên cứu này; 24T: 24 giờ tối, 24S: 24 giờ sáng, 12S12T: 12 giờ sáng - 12 giờ tối.

### 3.3. Tính gây bệnh của MPL *Alternaria* spp. trên lá và quả chanh dây và xác định ổ đại, cây trồng nhiễm *Alternaria* trong vườn chanh dây bị bệnh đốm nâu

Tính gây bệnh cũng như mức độ gây hại của các MPL *Alternaria* spp. trên cây ký chủ là chanh dây giống Đài Nông 1 được thực hiện theo quy tắc chủng bệnh nhân tạo (quy tắc Koch) trong điều kiện phòng thí nghiệm đã được thực hiện.

#### 3.3.1. Khả năng gây bệnh của MPL *Alternaria* spp. trên lá và quả chanh dây

##### 3.3.1.1. Kết quả chủng bệnh trên lá chanh dây

Dựa vào kết quả được trình bày trong bảng 3.20 cho thấy, *A. passiflorae* đều có khả năng gây bệnh. Khi có vết thương, 98,59% số mẫu *A. passiflorae* tạo vết bệnh trên lá chanh dây Đài Nông 1 sau 7 ngày chủng (ngoại trừ mẫu DN11L-01.14). MPL *A. passiflorae* tạo vết bệnh có kích thước khác nhau, mẫu LD1L-1.11(2) gây vết bệnh



lớn nhất là 8,59 mm và mẫu DN8T-4.11 có đường kính vết bệnh nhỏ nhất là 1,24 mm. Khi chủng bệnh không gây vết thương thì 69,01 % MPL *A. passiflorae* có khả năng gây bệnh và tạo vết bệnh có đường kính dao động từ 0,19 – 5,78 mm và 30,99 % không có khả năng gây bệnh (các mẫu DN5L-5.11(2), DN13L-5.11, LD12T-5.10, LD4T-2.11, LD11L-1.10(1), DN10T-01.14, DN06L-01.14, DN05T-01.14, LD12L-01.14, LD09T-01.14, LD12T-01.14, LD13T-01.14, LD14L-01.14, DN07L-01.14, DN07L-02.14, DN11T-02.14, DN11L-01.14).

**Bảng 3.20.** Đường kính trung bình vết bệnh (mm) trên lá chanh dây Đài Nông 1 sau khi chủng các MPL *A. passiflorae*

Địa điểm thu thập mẫu	Mẫu phân lập	Đường kính trung bình vết bệnh (mm)					
		Có gây vết thương			Không gây vết thương		
		3 NSC	5 NSC	7 NSC	3 NSC	5 NSC	7 NSC
	DN15T-1.10(2)	5,51	5,81	7,61	4,58	4,58	5,78
	DN09L-01.14	1,22	4,52	5,70	1,75	3,77	5,06
	DN9T-2.11	4,83	5,72	5,72	2,41	3,64	4,39
	DN01L-01.14	0,97	1,76	4,69	0,00	1,50	3,86
	DN8L-2.11	1,03	2,64	4,13	0,36	1,80	3,42
	DN15T-1.10(1)	4,30	5,28	5,89	0,97	2,61	3,33
	DN16L-1.11	5,50	6,71	7,72	0,25	2,25	3,08
	DN02T-01.14	0,72	3,18	3,96	0,00	1,73	2,97
	DN10T-5.11	2,89	3,81	4,06	0,78	2,22	2,75
	DN06T-01.14	0,17	4,92	6,52	0,00	1,51	2,34
	DN04T-02.14	2,44	5,37	6,25	0,51	1,33	1,91
Đắk Nông	DN5L-5.11(1)	2,16	3,17	4,39	1,28	1,31	1,64
	DN9T-4.11	4,56	5,25	5,50	0,00	1,17	1,56
	DN9T-1.10	2,25	3,44	4,53	0,11	0,94	1,31
	DN9L-1.11	0,30	5,81	5,93	0,00	0,00	1,05
	DN1T-4.11	4,69	5,36	6,14	0,00	0,25	0,97
	DN17L-1.11	1,11	2,61	3,72	0,11	0,56	0,92
	DN15L-2.11	3,19	4,64	5,40	0,00	0,42	0,82
	DN11T-3.11	0,78	1,47	2,46	0,06	0,06	0,60
	DN8T-4.11	0,00	0,39	1,24	0,00	0,17	0,58
	DN9L-1.10	2,09	3,56	4,11	0,11	0,33	0,33
	DN07L-01.14	0,00	5,02	6,14	0,00	0,00	0,00
	DN11T-02.14	2,33	5,23	5,81	0,00	0,00	0,00
	DN10T-01.14	0,28	4,61	5,73	0,00	0,00	0,00



DN07L-02.14	0,00	4,47	5,61	0,00	0,00	0,00
DN06L-01.14	1,97	4,36	5,51	0,00	0,00	0,00
DN05T-01.14	1,89	4,22	5,24	0,00	0,00	0,00
DN13L-5.11	3,34	4,14	5,13	0,00	0,00	0,00
DN5L-5.11(2)	0,44	0,94	2,27	0,00	0,00	0,00
LD16L-1.10	3,17	5,58	6,30	2,89	5,08	5,77
LD3L-4.11	0,00	4,78	5,86	0,00	2,83	3,78
LD13L-4.10	6,32	7,00	8,12	0,00	2,92	3,56
LD08T-01.14	2,14	5,35	5,68	0,00	2,43	3,26
LD16L-1.14	1,98	3,13	4,38	0,97	1,70	3,21
LD1L-2.11(2)	1,08	4,89	5,28	0,00	1,77	3,05
LD11L-1.10(2)	5,11	5,92	6,66	0,00	1,92	3,03
LD10L-01.14	2,22	5,06	6,39	0,78	0,96	2,74
LD07L-01.14	0,83	2,14	3,46	0,49	1,08	2,73
LD14L-1.10(1)	5,50	6,32	7,11	0,42	0,79	2,50
LD5L-1.11	5,00	5,78	6,46	0,06	1,11	2,39
LD4T-3.10	3,80	5,14	6,17	0,39	1,58	2,39
LD02L-01.14	0,28	2,44	3,77	0,00	1,43	2,13
LD06T-01.14	0,44	4,94	5,60	0,00	0,87	2,04
LD6L-1.11	4,39	5,08	6,28	0,11	1,86	2,00
Lâm Đồng LD16L-02.14	0,83	3,50	3,90	0,41	0,54	1,68
LD17L-1.10	0,72	1,50	3,53	0,00	0,97	1,54
LD02T-01.14	0,75	4,20	6,52	0,17	0,59	1,10
LD1L-1.11(1)	4,39	5,47	5,70	0,00	0,00	0,80
LD1L-2.11(1)	1,36	3,97	5,06	0,17	0,47	0,67
LD4L-1.11	1,45	3,56	4,75	0,00	0,00	0,47
LD1L-1.11(2)	5,11	6,33	8,59	0,36	0,40	0,40
LD12L-3.10	2,47	5,03	6,17	0,00	0,20	0,39
LD14L-1.10(2)	1,72	3,94	4,73	0,00	0,00	0,19
LD13T-01.14	0,00	4,11	5,50	0,00	0,00	0,00
LD12L-01.14	0,39	3,42	5,31	0,00	0,00	0,00
LD12T-5.10	2,63	3,33	4,57	0,00	0,00	0,00
LD14L-01.14	0,47	3,58	4,56	0,00	0,00	0,00
LD4T-2.11	0,00	1,25	4,53	0,00	0,00	0,00
LD12T-01.14	0,11	2,60	4,36	0,00	0,00	0,00
LD09T-01.14	0,33	2,99	4,04	0,00	0,00	0,00
LD11L-1.10(1)	0,25	2,17	2,52	0,00	0,00	0,00
Đối chứng	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Ghi chú: LD: Lâm Đồng, DN: Đắk Nông, T: Quả, L: Lá

*A. tenuissima* cũng đã được xác định gây hại trên chanh dây trồng ở Đắk Nông, Lâm Đồng và hiện diện trên cả nguồn cây giống nhập khẩu từ Đài Loan. MPL *A. tenuissima* không có khả năng gây bệnh trên lá chanh dây Đài Nông 1 ở điều kiện

có gây vết thương, bao gồm các mẫu CDNK2.13, CDNK3.13, CDNK2.14, CDNK17.14, CDNK18.14(1), CDNK1.11. Mẫu gây vết bệnh lớn nhất trong 30 MPL là LD2T-1.16 (ở Lâm Đồng), với đường kính vết bệnh là 23,33 mm và mẫu có vết bệnh nhỏ nhất là LD18L.14(2), với đường kính vết bệnh 2,67 mm sau 7 ngày chủng bệnh.

Với kiểu chủng bệnh không gây vết thương có 10 mẫu (27,78 %) không có khả năng gây bệnh trên lá, bao gồm các mẫu CDNK2.13, CDNK3.13, CDNK5.13, CDNK12.13, CDNK2.14, CDNK17.14, CDNK1.11, LD1T-1.15, LD18L.14(2) và CDNK18.14(1). Mẫu gây vết bệnh lớn nhất là mẫu LD2T-1.16 (15,33 mm) và mẫu có đường kính vết bệnh nhỏ nhất là mẫu CDNK2.11 (1,17 mm) (bảng 3.21).

**Bảng 3.21.** Đường kính trung bình vết bệnh (mm) trên lá chanh dây Đài Nông 1 sau khi chủng các MPL *A. tenuissima*

Địa điểm thu thập mẫu	Mẫu phân lập	Đường kính trung bình vết bệnh (mm)					
		Có gây vết thương			Không gây vết thương		
		3NSC	5NSC	7NSC	3NSC	5NSC	7NSC
Sân bay Tân Sơn Nhất	CDNK18.13	5,00	9,33	14,83	4,17	7,00	10,00
	CDNK21.13	0,00	3,67	7,50	0,00	4,17	6,83
	CDNK1.13	2,67	6,83	13,00	1,67	3,50	5,83
	CDNK13.13	2,33	4,50	8,17	0,00	4,00	5,83
	CDNK8.14	0,00	5,33	7,33	0,00	0,00	5,83
	CDNK1.14	0,00	3,67	5,33	0,00	3,67	5,33
	CDNK3.14(2)	0,00	3,50	8,50	0,00	3,17	5,17
	CDNK10.13	0,00	2,67	5,20	0,00	2,67	5,17
	CDNK16.13	0,00	3,17	7,00	0,00	2,17	5,00
	CDNK10.14	0,00	2,67	5,33	0,00	2,17	5,00
	CDNK19.14(2)	0,00	3,00	6,17	0,00	3,17	4,83
	CDNK7.13	1,83	4,50	8,50	0,00	2,67	4,67
	CDNK19.14(1)	0,00	3,83	6,83	0,00	2,83	4,50
	CDNK4.13	0,00	2,67	7,50	0,00	1,00	4,13
	CDNK20.14	3,17	8,33	17,50	0,00	2,17	4,00
	CDNK19.13	0,00	4,17	6,67	0,00	1,33	3,50
	CDNK20.13	0,00	3,17	5,50	0,00	1,67	3,50
	CDNK18.14(2)	0,00	2,17	4,67	0,00	0,67	3,50
	CDNK9.14	0,00	3,50	6,67	0,00	1,00	2,33
	CDNK11.13	0,00	4,67	6,83	0,00	0,00	2,17
CDNK3.14(1)	1,67	3,50	6,50	0,00	0,00	1,67	

	CDNK2.11	0,00	0,00	3,00	0,00	0,00	1,17
	CDNK12.13	0,00	2,50	5,00	0,00	0,00	0,00
	CDNK5.13	0,00	1,00	3,17	0,00	0,00	0,00
	CDNK1.11	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	CDNK17.14	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	CDNK18.14(1)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	CDNK2.13	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	CDNK2.14	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	CDNK3.13	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Đắk Nông	DN11T-1.16	3,50	8,00	12,83	0,00	1,83	4,00
Lâm Đồng	LD2T-1.16	2,50	7,50	23,33	2,67	7,17	15,33
	LD1T-1.16	3,17	7,83	15,50	2,00	3,83	11,67
	LD18L.14(2)	0,00	1,50	2,67	0,00	0,00	0,00
	LD1T-1.15	0,00	2,00	2,33	0,00	0,00	0,00
Đài Loan	DL01L-9.14	0,00	5,50	8,00	1,50	4,00	4,83
	Đôi chứng	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

*Ghi chú: CDNK: Chanh dây giống nhập khẩu và được thu thập mẫu tại Cảng hàng không Tân Sơn Nhất, LD: Lâm Đồng, DN: Đắk Nông, DL: Mẫu chanh dây được thu thập từ Đài Loan, T: Quả, L: Lá.*

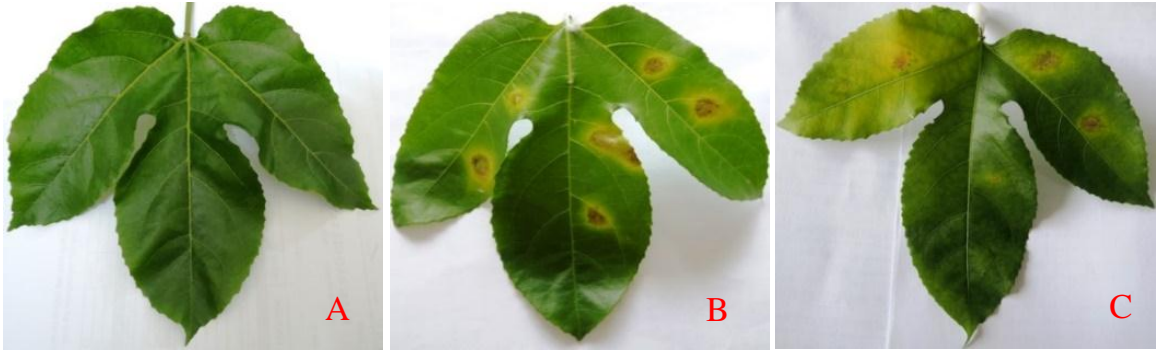
Trong quá trình thu mẫu, *A. tenuissima* phân lập từ cây chanh dây giống nhập khẩu trên phần lá của cây gốc ghép. Thí nghiệm chủng bệnh nhân tạo cho thấy, có 33 MPL đều tạo vết bệnh cho lá chanh dây gốc ghép khi có vết thương, kích thước vết bệnh từ 1,7 – 22,6 mm (91,67 %) và có 3 mẫu không gây bệnh (8,33 %) sau 7 ngày chủng. Có đến 80,56 % số mẫu *A. tenuissima* gây bệnh khi chủng không gây thương, kích thước vết bệnh từ 0,9 – 15,10 mm và 19,44 % mẫu không gây bệnh sau 7 ngày chủng (bảng 3.22). Theo Sicisiano (2017), *Alternaria* có mức độ gây bệnh khác nhau trên cây ký chủ và không có mối tương quan giữa mức độ gây bệnh và cây ký chủ hoặc loài *Alternaria*. Hai loài *Alternaria* trên chanh dây gây bệnh nặng khi có vết thương cơ học trên lá và cũng có khả năng xâm nhiễm gây bệnh trực tiếp khi tiếp xúc với ký chủ chanh dây giống Đài Nông 1.

**Bảng 3.22.** Đường kính trung bình vết bệnh (mm) trên lá chanh dây gốc ghép sau khi chủng các MPL *A. tenuissima*

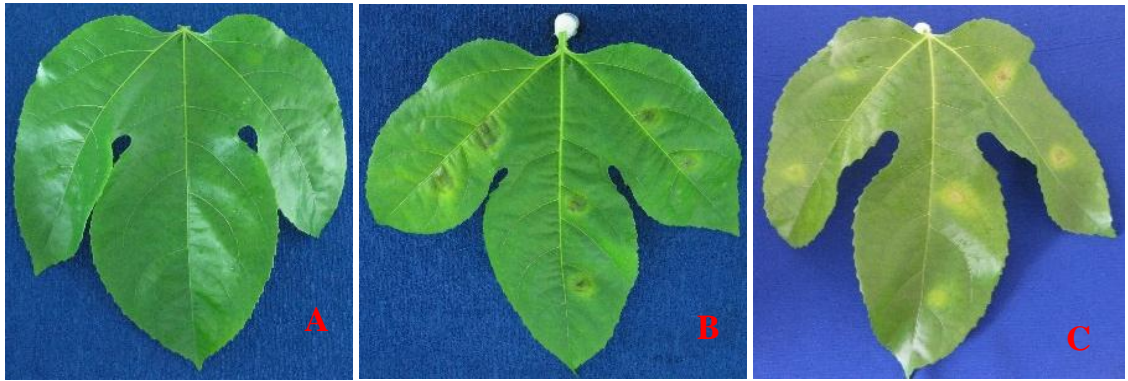
Địa điểm thu thập mẫu	Mẫu phân lập	Đường kính trung bình vết bệnh (mm)					
		Có gây vết thương			Không gây vết thương		
		3NSC	5NSC	7NSC	3NSC	5NSC	7NSC
Sân bay Tân	CDNK20.14	4,40	13,40	22,60	3,80	8,30	15,10

Sơn Nhất	CDNK16.13	3,20	6,60	15,10	2,60	5,60	14,00	
	CDNK19.14(1)	4,30	10,80	18,80	3,50	7,40	12,60	
	CDNK11.13	3,00	13,00	16,60	1,40	5,60	9,20	
	CDNK18.13	1,20	3,70	8,20	1,20	3,40	7,40	
	CDNK3.14(2)	4,00	12,10	16,80	2,20	4,40	6,70	
	CDNK1.13	1,80	5,90	12,50	1,00	3,00	6,40	
	CDNK7.13	0,40	3,80	8,50	1,10	2,20	6,40	
	CDNK8.14	1,20	4,00	7,00	0,40	2,20	5,50	
	CDNK21.13	0,50	2,70	6,00	0,20	2,00	5,30	
	CDNK9.14	1,40	2,40	5,80	0,60	1,70	5,20	
	CDNK19.13	1,10	3,00	6,60	0,40	1,90	4,30	
	CDNK10.13	0,70	2,80	5,30	0,20	1,90	4,30	
	CDNK13.13	1,10	3,10	5,20	0,00	1,70	4,20	
	CDNK10.14	0,40	2,40	5,80	0,30	1,80	3,70	
	CDNK3.14(1)	1,60	3,00	6,90	0,00	1,70	3,50	
	CDNK18.14(2)	0,80	2,40	5,10	0,40	1,60	3,00	
	CDNK4.13	2,30	5,50	9,10	0,00	0,00	2,50	
	CDNK1.14	1,70	4,20	6,70	0,00	0,80	2,40	
	CDNK20.13	2,20	4,80	6,80	0,00	1,00	2,20	
	CDNK5.13	0,60	1,80	3,60	0,00	0,40	2,20	
	CDNK12.13	0,20	1,70	2,80	0,00	0,20	1,90	
	CDNK3.13	0,00	0,30	2,30	0,00	0,00	0,90	
	CDNK2.11	0,00	0,40	2,80	0,00	0,00	0,00	
	CDNK19.14(2)	0,00	0,40	2,50	0,00	0,00	0,00	
	CDNK2.13	0,00	0,40	2,10	0,00	0,00	0,00	
	CDNK2.14	0,00	0,00	1,70	0,00	0,00	0,00	
	CDNK17.14	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
	CDNK1.11	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
	CDNK18.14(1)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
	Đắk Nông	DN11T-1.16	3,30	8,00	15,30	3,00	6,20	12,60
	Lâm Đồng	LD2T-1.16	2,50	6,50	22,30	1,10	2,90	18,80
		LD1T-1.16	6,00	12,50	25,10	3,20	6,20	17,20
LD1T-1.15		1,60	3,80	5,70	0,00	1,10	2,10	
LD18L.14(2)		0,00	1,30	2,60	0,00	0,40	1,60	
Đài Loan	DL01L-9.14	1,60	3,80	8,20	0,00	1,00	3,70	
	Đối chứng	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	

*Ghi chú: CDNK: Chanh dây giống nhập khẩu và được thu thập mẫu tại Cảng hàng không Tân Sơn Nhất, LD: Lâm Đồng, DN: Đắk Nông, DL: Mẫu chanh dây.*



**Hình 3.17.** Triệu chứng bệnh trên lá chanh dây Đài Nông 1 do *A. passiflorae* gây ra sau khi chủng bệnh với nồng độ  $10^7$  bào tử/ml sau 7 ngày. (A): đối chứng; (B): chủng bệnh có gây vết thương; (C): chủng bệnh không gây vết thương.



**Hình 3.18.** Triệu chứng bệnh đốm nâu trên lá chanh dây Đài Nông 1 do *A. tenuissima* gây ra sau khi chủng bệnh với nồng độ  $10^7$  bào tử/ml sau 7 ngày. (A): đối chứng; (B): chủng bệnh có gây vết thương; (C): chủng bệnh không gây vết thương.



**Hình 3.19.** Triệu chứng bệnh đốm nâu trên lá chanh dây gốc ghép do *A. tenuissima* gây ra sau khi chủng bệnh có gây vết thương với nồng độ  $10^7$  bào tử/ml sau 7 ngày. (A): đối chứng; (B): chủng bệnh có gây vết thương; (C): chủng bệnh không gây vết thương.

### 3.3.1.2. Khả năng gây bệnh trên trên quả chanh dây

Trong thực tế cho thấy *A. passiflorae* và *A. tenuissima* vừa gây hại trên lá và vừa gây hại trên quả. Do đó, thí nghiệm chủng bệnh trên quả chanh dây Đài Nông 1 có gây vết thương trong điều kiện phòng thí nghiệm đã được tiến hành. Kết quả được trình bày trong bảng 3.23 và bảng 3.24.

**Bảng 3.23.** Đường kính trung bình vết bệnh (mm) trên quả chanh dây Đài Nông 1 sau khi chủng các MPL *A. passiflorae*

Địa điểm thu thập mẫu	Mẫu phân lập	Đường kính trung bình vết bệnh (mm)		
		5 NSC	7 NSC	14 NSC
Đắk Nông	DN1T-4.11	2,22	3,50	5,94
	DN15T-1.10(1)	2,67	4,06	4,78
	DN16L-1.11	2,36	3,61	4,61
	DN01L-1.14	1,50	2,78	3,50
	DN5L-5.11(1)	0,00	1,13	3,07
	DN11T-2.14	0,00	2,50	3,00
	DN15L-2.11	0,00	1,11	2,11
	DN11T-3.11	0,00	0,00	0,00
	DN15T-1.10(2)	0,00	0,00	0,00
	DN17L-1.11	0,00	0,00	0,00
	DN8L-2.11	0,00	0,00	0,00
	DN8T-4.11	0,00	0,00	0,00
Lâm Đồng	LD5L-1.11	5,00	7,28	8,39
	LD6L-1.11	5,50	7,22	8,22
	LD4L-1.11	5,89	6,67	7,78
	LD13L-4.10	4,00	5,44	6,78
	LD12L-3.10	4,78	5,61	6,56
	LD1L-1.11(1)	2,28	3,39	4,39
	LD05L-1.14	1,00	2,50	3,39
	LD1L-2.11(2)	1,89	1,94	2,94
	LD2T-1.14	0,00	1,50	2,78
	LD4T-3.10	1,94	2,44	2,72
	LD09L-1.14	0,00	1,00	2,39
	LD07L-1.14	0,00	1,00	2,00
	LD11L-1.10(1)	0,00	0,00	0,00
	LD16L-1.14	0,00	0,00	0,00
	LD17L-1.10	0,00	0,00	0,00
	LD1L-2.11(1)	0,00	0,00	0,00
	LD8T-01.14	0,00	0,00	0,00
Đối chứng	0,00	0,00	0,00	

Ghi chú: LD: Lâm Đồng, DN: Đắk Nông, T: Quả, L: Lá

Trong 29 MPL *A. passiflorae* có 65,52 % mẫu phân lập gây bệnh và 34,48 % MPL không gây bệnh trên quả chanh dây (gồm mẫu DN8T-4.11, DN11T-3.11, DN17L-1.11, DN15T-1.10(2), DN8L-2.11, LD17L-1.10, LD1L-2.11(1), LD11L-1.10(1), LD16L-1.14 và LD8T-01.14). MPL *A. passiflorae* gây bệnh với kích thước vết bệnh khác nhau, từ 2,00 – 8,39 mm sau 14 ngày theo dõi (bảng 3.23); Điều khác biệt là MPL *A. tenuissima* tạo vết bệnh trên quả nhưng kích thước vết bệnh nhỏ hơn các MPL *A. passiflorae*, dao động từ 2,11 – 7,56 mm và có 7 MPL *A. tenuissima* không có khả năng gây bệnh trên quả, bao gồm: CDNK5.13, CDNK10.13, CDNK18.13, CDNK1.14, CDNK8.14, CDNK9.14 và CDNK1.11 sau 14 ngày chủng bệnh (bảng 3.24).

Kết quả từ bảng 3.23 và 3.24 cho thấy có những MPL từ lá hay từ quả đều có thể tạo vết bệnh trên quả chanh dây khi chủng bệnh nhân tạo, tuy nhiên nhiều MPL gây bệnh trên lá nhưng mất khả năng gây bệnh trên quả chưa xác định được nguyên nhân trong nghiên cứu này. Điều này cho thấy, khả năng gây bệnh trên lá hay trên quả chanh dây của *A. passiflorae* và *A. tenuissima* là do sự thiết lập tính ký sinh trên mô vật chủ khi bị ảnh hưởng bởi cấu trúc mô thực vật dày hay mỏng, xâm nhiễm và truyền bệnh qua mô có vết thương hay không có vết thương. *A. passiflorae* và *A. tenuissima* xâm nhiễm vào cây ký chủ có thể trực tiếp, xuyên qua vết thương hoặc xuyên qua lỗ khí khổng. Các mô bị yếu, già hoặc bị tổn thương thì dễ bị xâm nhiễm hơn là các mô khỏe (Laemmlen, 2001).

Trong cùng một loài *Alternaria* và trong cùng một MPL, *Alternaria* có thể gây bệnh trên lá nhưng không gây bệnh trên quả và ngược lại; hoặc vừa gây bệnh trên lá và vừa gây bệnh trên quả; hoặc không gây bệnh cho lá và quả, tính gây bệnh “chuyên biệt theo cấu trúc mô ký chủ” có thể xuất hiện trong quần thể *Alternaria* phân lập trên chanh dây tại Việt Nam. Thomma (2003) đã ghi nhận, *Alternaria* gây bệnh cho cây trồng là nấm có khả năng sinh ra melanin, đặc biệt là nấm tạo bào tử và độc tố chuyên biệt cây ký chủ. Trong quá trình hình thành bào tử đính, melanin vừa có chức năng gián tiếp và trực tiếp trong vai trò tạo độc lực và tham gia vào tác nhân gây bệnh của các loài nấm trên cây ký chủ đều khác nhau; Điều này nói lên rằng,

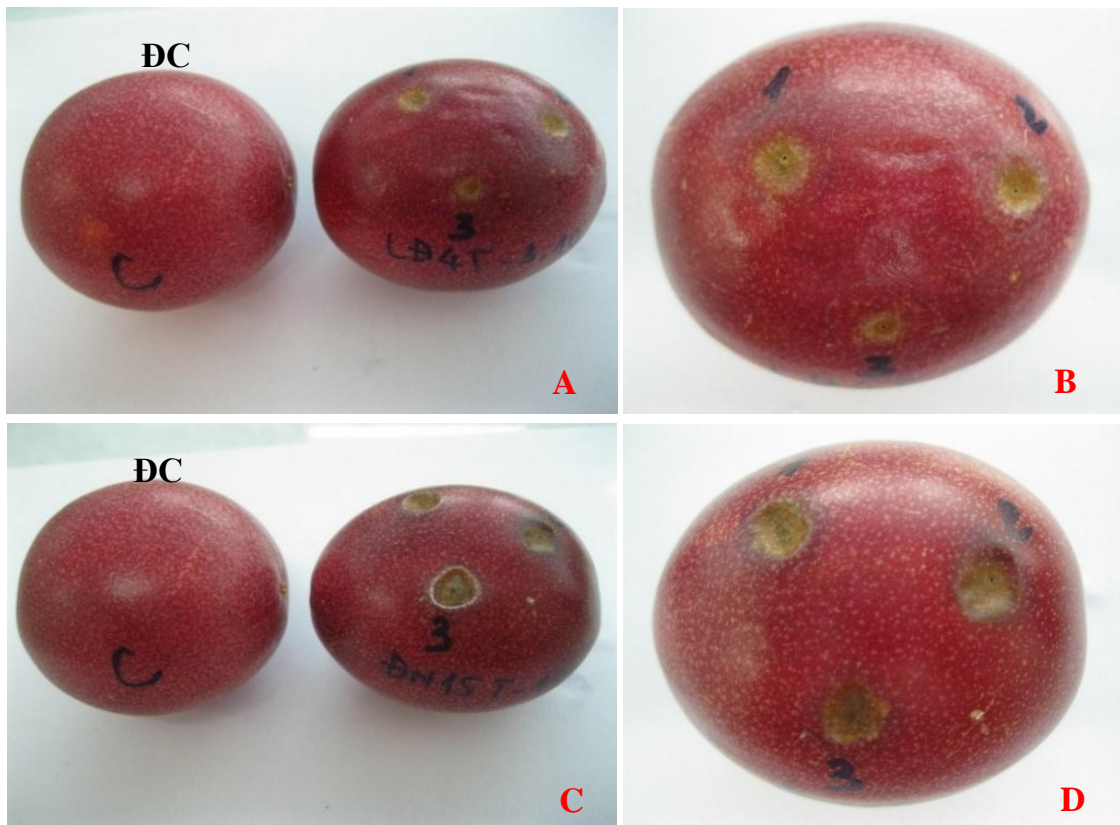


*Alternaria* là tác nhân gây bệnh có chuyển đổi qua lại giữa giai đoạn ký sinh và giai đoạn hoại sinh.

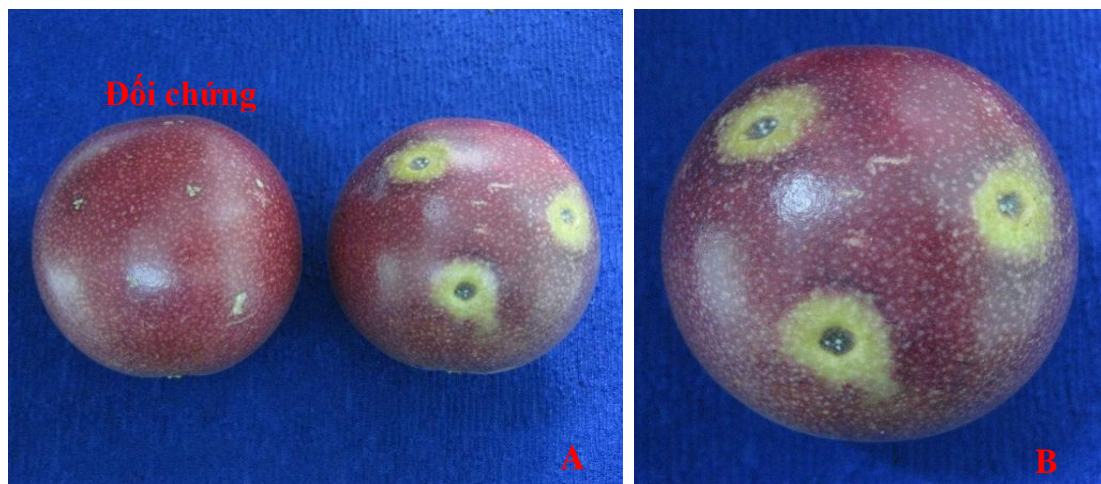
**Bảng 3.24.** Đường kính trung bình vết bệnh (mm) trên quả chanh dây Đài Nông 1 sau khi chủng các MPL *A. tenuissima*

Địa điểm thu thập mẫu	Mẫu phân lập	Đường kính trung bình vết bệnh (mm)		
		5 NSC	7 NSC	14 NSC
Sân bay Tân Sơn Nhất	CDNK18.14(2)	1,78	5,56	7,56
	CDNK13.13	2,22	4,61	6,89
	CDNK20.14	2,39	4,28	6,83
	CDNK19.14(1)	2,72	4,50	6,78
	CDNK1.13	1,67	3,22	6,72
	CDNK4.13	1,44	3,00	5,94
	CDNK20.13	2,33	3,83	5,50
	CDNK3.14(1)	1,44	3,00	5,50
	CDNK16.13	1,00	3,72	5,11
	CDNK3.14(2)	0,56	2,44	5,06
	CDNK21.13	1,44	2,28	4,72
	CDNK11.13	2,11	3,56	4,67
	CDNK7.13	0,00	3,00	3,72
	CDNK19.13	1,39	2,06	3,06
	CDNK12.13	0,00	1,78	2,83
	CDNK18.14(1)	0,67	1,83	2,11
	CDNK1.11	0,00	0,00	0,00
	CDNK1.14	0,00	0,00	0,00
	CDNK10.13	0,00	0,00	0,00
	CDNK18.13	0,00	0,00	0,00
CDNK5.13	0,00	0,00	0,00	
CDNK8.14	0,00	0,00	0,00	
CDNK9.14	0,00	0,00	0,00	
Đắk Nông	DN11T-1.16	2,00	3,06	4,67
Lâm Đồng	LD18L-14(2)	3,11	4,22	6,61
	LD1T-1.15	2,28	3,89	6,28
	LD2T-1.16	1,50	3,78	5,89
	LD1T-1.16	1,06	2,17	5,11
Đài Loan	DL01L-9.14	1,72	5,22	6,72
	Đối chứng	0,00	0,00	0,00

Ghi chú: CDNK: Chanh dây giống nhập khẩu và được thu thập mẫu tại Cảng hàng không Tân Sơn Nhất, LD: Lâm Đồng, DN: Đắk Nông, DL: Mẫu chanh dây được thu thập từ Đài Loan, T: Quả, L: Lá.



**Hình 3.20.** Triệu chứng bệnh trên quả chanh dây Đài Nông 1 do *A. passiflorae* gây ra sau 14 ngày chủng bệnh. (A, B): mẫu LD4T-3.10; (C, D): mẫu DN15T-1.10(1).



**Hình 3.21.** Triệu chứng bệnh trên quả chanh dây Đài Nông 1 do *A. tenuissima* gây ra sau 14 ngày chủng bệnh. (A, B): mẫu CDNK7.13.

### 3.4. Xác định cỏ dại, cây trồng nhiễm *Alternaria* trong vườn chanh dây bị bệnh đốm nâu

Để tìm hiểu về các cây trồng nhiễm hay khả năng lưu tồn của *Alternaria* trên đồng ruộng, điều tra và thu thập các mẫu có biểu hiện triệu chứng bệnh đốm trên các cây trồng xen, cây cỏ dại trong vườn chanh dây bị nhiễm bệnh đốm nâu tại Đắc Nông và Lâm Đồng được tiến hành với 51 mẫu trên 30 loại cây trồng xen và cây cỏ dại trong những năm 2013 - 2018. Đã xác định có 8 loại nấm bệnh hiện diện trong vườn chanh dây ở Lâm Đồng, bao gồm: *Alternaria* spp., *Curvularia* sp., *Puccinia* sp., *Septoria* sp., *Nigrospora* sp., *Pseudocercospora* sp., *Colletotrichum* sp. và *Phoma* sp. (Phụ lục 16 - bảng 16.2) từ các loại cây: Cỏ song nhĩ răng tơ, cỏ cứt lợn, cỏ song nha lông, cỏ kim thất, cỏ vi cúc, cỏ ruột gà lớn, cỏ ráng tây sơn, cỏ rau dền cơm, cỏ túc tưng tơ, cỏ túc hình rìa, bí đỏ, bơ, cà tím, cà phê vối, hoa lay ơn, ớt. Trong đó, *Alternaria* spp. hiện diện, tồn tại trên cỏ cứt lợn và cỏ song nha lông (bảng 3. 25).

Thành phần nấm bệnh trên các cây cỏ dại, cây trồng xen trong vườn chanh dây tại Đắc Nông thì có 8 loại, bao gồm: *Alternaria* spp., *Helminthosporium* sp., *Penicillium* sp., *Curvularia* sp., *Puccinia* sp., *Nigrospora* sp., *Pseudocercospora* sp. và *Colletotrichum* sp. đã phân lập được từ cỏ đuôi chồn, cỏ mần trâu, cỏ cứt lợn, cỏ đuôi voi, cỏ hôi, cỏ ruột gà lớn, cỏ song nha lông, cỏ kim thất, bơ, cà phê chè, cây trướng cá và cây mít (phụ lục 16 - bảng 16.4). Trong đó, *Alternaria* spp. hiện diện và tồn tại trên cỏ mần trâu, cỏ cứt lợn và cỏ song nha lông (bảng 3. 25).

Kết quả nghiên cứu cho thấy, cỏ cứt lợn, cỏ song nha lông và cỏ mần trâu có thể là ký chủ cho *Alternaria* spp. Nghiên cứu của Tu (1985) đã ghi nhận *A. alternata* được phân lập từ các loài cỏ dại trong hoặc xung quanh cánh đồng đậu nhưng triệu chứng gây bệnh không rõ ràng. Tác giả cho rằng *A. alternata* dường như tồn tại trên cỏ như một epiphyte (sống trên bề mặt của cây). Nấm *Alternaria* cũng có thể sinh trưởng trên các loài cỏ dại và cây trồng lâu năm, trên tàn dư thực vật (trích dẫn theo Mamgain và cộng sự, 2013).

**Bảng 3.25.** Danh sách *Alternaria* spp. phân lập được từ cây cỏ dại trong vườn chanh dây tại Lâm Đồng và Đắk Nông

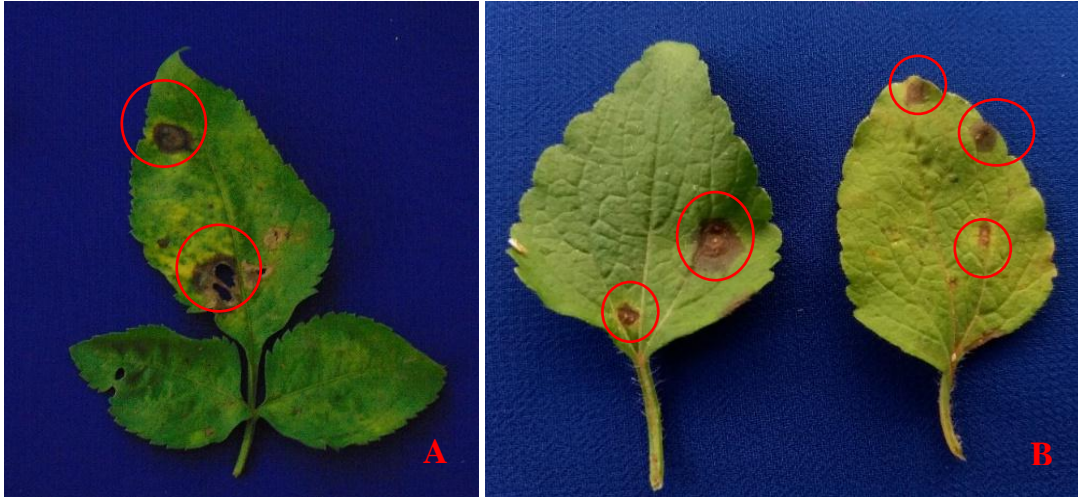
Loại cây cỏ dại	Tên khoa học	Địa điểm thu thập mẫu	Bộ phận bị hại	Tác nhân gây bệnh
Cỏ cắt lợn	<i>Agermatum conyzoides</i> L.	Lâm Đồng	Lá	<i>Alternaria</i> sp.
		Đắk Nông	Lá	<i>Alternaria</i> sp.
Cỏ song nha lông	<i>Bidens pilosa</i> L.	Lâm Đồng	Lá	<i>Alternaria</i> sp.
		Đắk Nông	Lá	<i>Alternaria</i> sp.
Cỏ màn trâu	<i>Eleusine india</i> (L.) Gaertn.	Đắk Nông	Lá	<i>Alternaria</i> sp.

Trong nghiên cứu đã ghi nhận được sự hiện diện của 5 MPL *Alternaria* spp. trên 3 loại cỏ: cỏ cắt lợn, cỏ song nha lông và cỏ màn trâu ở Đắk Nông và Lâm Đồng; tiếp tục thực hiện lây nhiễm nhân tạo trên lá chanh dây Đài Nông 1 để xác định khả năng gây bệnh của các MPL này.



**Hình 3.22.** Triệu chứng đốm lá do nấm *Alternaria* sp. gây bệnh trên các loại cỏ dại khác nhau trong vườn chanh dây tại Đắk Nông. (A, D): Triệu chứng đốm lá trên cỏ màn trâu; (B, C): Triệu chứng đốm lá trên cỏ cắt lợn; (E, F): Triệu chứng đốm lá trên cỏ song nha lông.





**Hình 3. 23.** Triệu chứng đốm lá do nấm *Alternaria* sp. gây bệnh trên các loại củ đại khác nhau trong vườn chanh dây tại Lâm Đồng. (A): Triệu chứng đốm lá trên củ song nha lông; (B): Triệu chứng đốm lá trên củ cắt lợn.

#### 3.4.1. Xác định tên loài của MPL *Alternaria* spp. từ củ đại

Năm MPL *Alternaria* spp. phân lập từ cây củ cắt lợn, củ song nha lông, củ mần trâu đã được quan sát và mô tả hình thái học của các MPL như: hình thái tản nấm trên môi trường PCA, hình dạng bào tử, cành bào tử, cổ bào tử, khả năng sinh bào tử chia các MPL *Alternaria* spp. từ củ đại thành bốn nhóm khác nhau, gồm: nhóm 1 có mẫu DN3C-1.18 (*Alternaria* sp<sub>1</sub>); nhóm thứ hai gồm có mẫu DN1C-1.18 và DN2C-1.18 (*Alternaria* sp<sub>2</sub>); nhóm thứ ba gồm có mẫu LD1C-1.18 (*Alternaria* sp<sub>3</sub>); nhóm thứ tư gồm có mẫu LD4C-1.18 (*Alternaria* sp<sub>4</sub>) (bảng 3.26).

Nghiên cứu mối quan hệ ở mức độ phân tử của các MPL *Alternaria* spp. từ chanh dây và từ củ đại cho thấy các MPL *Alternaria* spp. có liên quan dựa trên phân tích trình tự vùng rDNA-ITS, ACT và GPDH. Kết quả từ bảng 3.9, 3.10, 3.11, 3.12; hình 3.9, 3.10, 3.11, 3.12 cho thấy, hầu hết các MPL *Alternaria* spp. từ củ đại được nhóm chung cùng một nhánh với các MPL *Alternaria* spp. từ chanh dây. Hầu hết các *Alternaria* spp. có tương quan với nhau.

Dựa vào các đặc điểm hình thái học theo khóa định danh của Simmons (2007) kết hợp với phân tích dữ liệu trình tự 3 vùng rDNA-ITS, ACT và GPDH của 5 MPL *Alternaria* spp. từ cây củ đại trong vườn chanh dây ở Đắk Nông và Lâm Đồng bước đầu ghi nhận là loài *A. passiflorae* với các đặc điểm hình thái được mô tả trong bảng 3.26 và bảng 3.27.

**Bảng 3.26.** Kích thước bào tử, cành bào tử của các MPL *Alternaria passiflorae* được phân lập từ các cây cỏ trong vườn chanh dây tại Đắk Nông và Lâm Đồng

STT	Mẫu phân lập	Thân bào tử		Chiều dài cổ bào tử ( $\mu\text{m}$ )	Tổng chiều dài toàn bào tử ( $\mu\text{m}$ )	Số lượng vách ngăn ngang	Kích thước cành bào tử	
		Dài ( $\mu\text{m}$ )	Rộng ( $\mu\text{m}$ )				Dài ( $\mu\text{m}$ )	Rộng ( $\mu\text{m}$ )
1	DN1C-1.18	42,50 - 61,00	16,33 - 20,33	24,33 - 110,00	66,83 - 171,00	4 - 8	135,00 - 220,00	5,28 - 6,17
2	DN2C-1.18	47,83 - 66,50	18,33 - 22,17	35,67 - 120,00	83,50 - 186,50	3 - 10	66,67 - 186,67	5,22 - 5,93
3	DN3C-1.18	52,33 - 83,83	19,33 - 23,83	85,83 - 183,00	138,17 - 266,83	4 - 9	100,83 - 197,00	5,17 - 5,20
4	LD1C-1.18	69,67 - 107,33	17,67 - 26,67	74,83 - 107,50	144,50 - 214,83	5 - 10	60,75 - 117,75	4,98 - 5,33
5	LD4C-1.18	37,33 - 67,50	10,67 - 17,50	60,00 - 90,00	97,33 - 157,50	3 - 9	39,00 - 84,75	4,78 - 5,20
<b>Trung bình</b>		<b>49,93 - 77,23</b>	<b>16,47 - 22,10</b>	<b>56,13 - 122,10</b>	<b>106,07 - 199,33</b>	<b>3 - 10</b>	<b>80,45 - 161,23</b>	<b>5,09 - 5,57</b>

*Ghi chú: Mẫu DN1C-1.18: phân lập từ lá cỏ cắt lộn; mẫu DN2C-1.18: phân lập từ lá cỏ mần trâu; mẫu DN3C-1.18: phân lập từ lá cỏ song nha lông; mẫu LD1C-1.18: phân lập từ lá cỏ cắt lộn; mẫu LD4C-1.18: phân lập từ lá cỏ song nha lông; DN: Đắk Nông; LD: Lâm Đồng.*

**Bảng 3.27.** Đặc điểm hình thái của *Alternaria passiflorae* gây bệnh đốm lá trên cây cỏ dại mô tả dựa theo khóa định danh của Simmons năm 2007

Đặc điểm	Chỉ tiêu	<i>Alternaria passiflorae</i> (Cỏ dại ĐN, LD)				
		DN3C-1.18 (Nhóm 1)	DN1C-1.18 (Nhóm 2)	DN2C-1.18 (Nhóm 3)	LD1C-1.18 (Nhóm 3)	LD4C-1.18 (Nhóm 4)
Ký chủ phân lập	Tên thường gọi	Cỏ song nha lông	Cỏ cắt lợn	Cỏ màn trâu	Cỏ cắt lợn	Cỏ song nha lông
Tản nấm trên môi trường PCA (7 NSC)	Đường kính (cm)	5,3	4,8	4,8	6,55	5,62
Hình thành cành bào tử phân sinh và bào tử phân sinh trên mt nhân tạo		Nhiều	Nhiều	Nhiều	Nhiều	Nhiều
Cành bào tử phân sinh	Cách mọc	Mọc trực tiếp trên bề mặt môi trường, dạng đơn lẻ, cong gập	Mọc trực tiếp trên bề mặt môi trường, dạng đơn lẻ	Mọc trực tiếp trên bề mặt môi trường, dạng đơn lẻ	Mọc trực tiếp trên bề mặt môi trường, dạng đơn lẻ	Mọc trực tiếp trên bề mặt môi trường, dạng đơn lẻ, cong gập
	Chiều dài x chiều rộng ( $\mu\text{m}$ )	(100,83 – 197) x (5,17 – 5,2)	(135 – 220) x (5,28 – 6,17)	(66,67 – 186,67) x (5,22 – 5,93)	(60,75 – 117,75) x (4,98 – 5,33)	(39 – 84,75) x (4,78 – 5,2)
Cách sinh bào tử phân sinh trên cành bào tử phân sinh		Đơn lẻ	Đơn lẻ hoặc tạo thành cành bào tử thứ cấp có 1 – 2 điểm	Đơn lẻ hoặc tạo thành cành bào tử thứ cấp có 1 – 2 điểm	Đơn lẻ hoặc tạo thành cành bào tử thứ cấp có 2 – 3 điểm	Đơn lẻ hoặc tạo thành cành bào tử thứ cấp ngắn sinh ra từ

		sinh bào tử	sinh bào tử	sinh bào tử hoặc tạo thành chuỗi có 1 – 2 bào tử	cổ bào tử hoặc tế bào bên của thân bào tử có 3 – 4 điểm sinh bào tử	
Thân bào tử phân sinh	Hình dạng	Ellip hẹp hoặc hình trứng dài hoặc chùy ngược	Ellip rộng hoặc hình chùy ngược	Ellip rộng hoặc hình chùy ngược	Ellip hẹp hoặc hình trứng dài hình chùy ngược	
	Màu sắc	Vàng nhạt	Vàng nhạt	Vàng nhạt	Vàng nhạt	
	Bề mặt	Nhẵn hoặc có những chấm nhỏ	Nhẵn hoặc có những chấm nhỏ	Nhẵn hoặc có những chấm nhỏ	Nhẵn hoặc có những chấm nhỏ	
	Chiều dài x chiều rộng ( $\mu\text{m}$ )	(52,33 – 83,83) x (19,33 – 23,83)	(42,5 – 61) x (16,33 – 20,33)	(47,83 – 66,5) x (18,33 – 22,17)	(69,67 – 107,33) x (17,67 – 26,67)	(37,33 – 67,5) x (10,67 – 17,5)
	Số vách ngăn dọc	0 hoặc có 1(-3) vách ngăn trong 1 vài vị trí phân chia vách ngăn ngang rộng nhất	0 hoặc có 1(-2) vách ngăn trong 1 vài vị trí phân chia vách ngăn ngang rộng nhất	0 hoặc có 1(-2) vách ngăn trong 1 vài vị trí phân chia vách ngăn ngang rộng nhất	2 – 5	1 – 3
	Số vách ngăn ngang	Có vách ngăn phình to; Không có vách ngăn ngang thật hoặc có 4 – 9 vách	Có vách ngăn phình to; Không có vách ngăn ngang thật hoặc có 4	Có vách ngăn phình to; Không có vách ngăn ngang thật hoặc có 3	5 – 10	Có vách ngăn phình to; Có 3 – 9



		ngăn ngang thật	– 8 vách ngăn ngang thật	– 10 vách ngăn ngang thật		
Cỗ bảo tử phân sinh	Chiều dài ( $\mu\text{m}$ )	85,83 – 183	24,33 - 110	35,67 - 120	74,83 – 107,5	60 – 90
	Chiều rộng của đáy ( $\mu\text{m}$ )	2,92 – 3,33	2,75 – 3	2,83 – 3,25	2,60 – 3.80	2,75 – 3,75
	Kích thước đỉnh đầu ( $\mu\text{m}$ )	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0 – 2,5
	Hình dạng	Thon, hẹp	Thon, hẹp	Thon, hẹp	Thon, hẹp	Thon, hẹp

### 3.4.2. Khả năng gây bệnh của MPL *Alternaria* spp. từ cỏ dại đến chanh dây Đài Nông 1 bằng phương pháp chủng bệnh nhân tạo

Theo Thomma (2003), *Alternaria* là chi nấm có nhiều loài tồn tại ở dạng hoại sinh vì không thể xâm nhiễm trực tiếp vào các mô cây sống, chỉ phát triển trên xác mô cây đã chết hoặc mô cây bị già yếu. Vì thế, rất khó kết luận nấm *Alternaria* phân lập từ các mô bệnh là tác nhân chính gây bệnh hay chỉ là tác nhân thứ cấp xâm nhiễm cơ hội.

Trong 5 MPL từ các cây cỏ thì duy nhất MPL DN3C-1.18 có khả năng tạo vết bệnh trên lá chanh dây Đài Nông 1 sau 7 ngày chủng với đường kính vết bệnh là 7,9 mm (chủng có gây vết thương) và 7,2 mm (chủng không gây vết thương). Các MPL DN1C-1.18, DN2C-1.18; LD1C-1.18, LD4C-1.18 đều không tạo vết bệnh sau 7 ngày chủng bệnh (bảng 3.28).

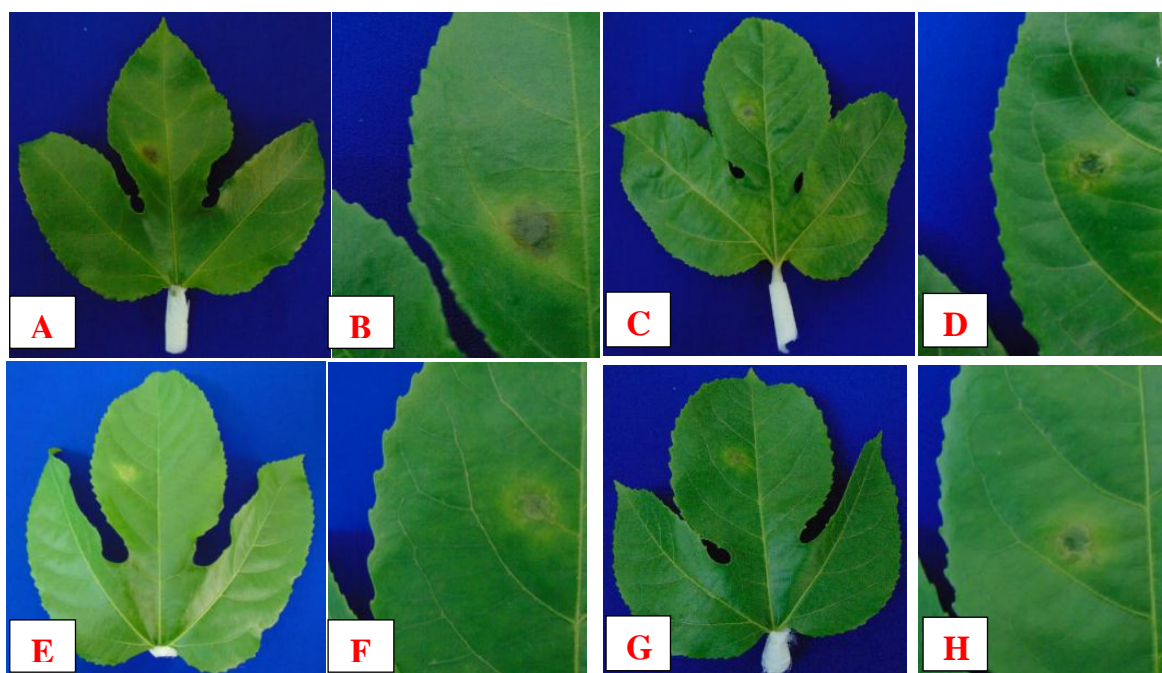
**Bảng 3.28.** Đường kính trung bình vết bệnh (mm) trên lá chanh dây Đài Nông 1 sau khi chủng các MPL *Alternaria* spp. phân lập trên cỏ.

Mẫu phân lập	Đường kính trung bình vết bệnh (mm)					
	Có gây vết thương			Không gây vết thương		
	3NSC	5NSC	7NSC	3NSC	5NSC	7NSC
DN1C-1.18	0	0	0	0	0	0
DN2C-1.18	0	0	0	0	0	0
DN3C-1.18	3,6 ± 0,5	5,5 ± 1,2	7,9 ± 2,1	2,9 ± 0,9	5 ± 0,8	7,2 ± 0,4
LD1C-1.18	0	0	0	0	0	0
LD4C-1.18	0	0	0	0	0	0

*Ghi chú:* Mẫu DN1C-1.18: phân lập từ lá cỏ cắt lộn; mẫu DN2C-1.18: phân lập từ lá cỏ mần trâu; mẫu DN3C-1.18: phân lập từ lá cỏ song nha lông; mẫu LD1C-1.18: phân lập từ lá cỏ cắt lộn; mẫu LD4C-1.18: phân lập từ lá cỏ song nha lông; (DN): Đắc Nông; (LD): Lâm Đồng; C: Bộ phận bị hại là lá cỏ. Các giá trị là trung bình trên 5 lá chanh dây Đài Nông 1, NSC: ngày sau chủng.

Tiếp tục kiểm chứng lại khả năng gây bệnh của MPL DN3C-1.18 trên cây cỏ song nha lông bằng phương pháp chủng bệnh nhân tạo theo quy tắc Koch, kết quả đã xác nhận MPL DN3C-1.18 gây bệnh trên cây cỏ song nha lông sau 14 ngày chủng bệnh. Điều này đã minh chứng rằng, cỏ song nha lông (*Bidens pilosa* L.) và cây chanh dây là ký chủ và ký chủ phụ của *A. passiflorae* trong điều kiện trồng tại Việt Nam. Do

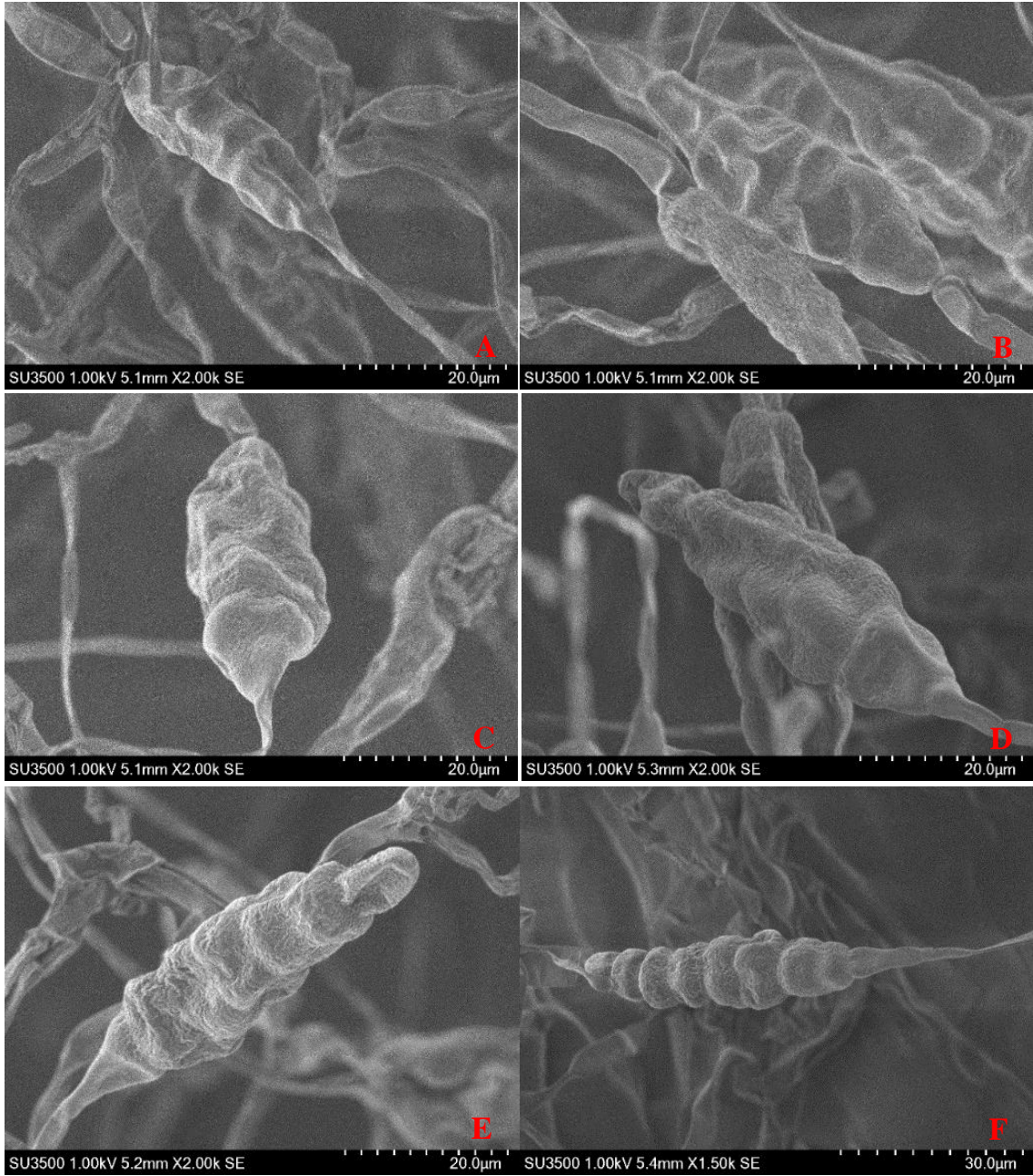
đỏ, làm sạch cỏ song nha lông trong vườn chanh dây cần được xem là then chốt nhằm cắt đứt nguồn bệnh tái nhiễm cho cây chanh dây.



**Hình 3.24.** Triệu chứng bệnh đốm nâu trên lá chanh dây Đài Nông 1 ở 7 ngày sau khi chủng *Alternaria passiflorae* (mẫu DN3C-1.18). (A-D): Chủng có gây vết thương; (E – H): Chủng không gây vết thương.



**Hình 3.25.** Triệu chứng bệnh đốm lá cỏ song nha lông sau khi chủng *Alternaria passiflorae* (mẫu DN3C-1.18). (A): Đối chứng; (B): vết bệnh 3 ngày sau chủng; (C): Vết bệnh 7 ngày sau chủng; (D): Vết bệnh 14 ngày sau chủng.



**Hình 3.26.** Đặc điểm hình thái *Alternaria passiflorae* (mẫu DN3C-1.18) dưới kính hiển vi điện tử quét SU3500, thế gia tốc 1 kV, hình ảnh được thu ở đầu dò SE. (A, B): Bào tử trưởng thành đỉnh trên cành bào tử được chụp ở độ phóng đại 2.000 lần; (C-E): Các dạng bào tử trưởng thành được chụp ở độ phóng đại 2.000 lần; (F): Bào tử trưởng thành dạng thon dài được chụp ở độ phóng đại 1.500 lần.



### **3.5. Khả năng gây bệnh của MPL *Alternaria* spp. trên một số cây trồng phổ biến**

#### **3.5.1. Khả năng gây bệnh của *Alternaria passiflorae***

##### **3.5.1.1. Kết quả chủng bệnh trong phòng thí nghiệm**

Kết quả cho thấy, MPL *A. passiflorae* có khả năng gây bệnh trên 3 loại cây gồm lá cây cao su, nhãn và sầu riêng; vết bệnh trên là đốm nhỏ có màu nâu nhạt và chuyển sang màu nâu đậm sau 10 ngày, tuy nhiên, mức độ gây bệnh khác nhau giữa các MPL

MPL LD4T-3.10 gây bệnh sau 4 ngày sau chủng trên lá cao su, 3 ngày sau chủng trên lá sầu riêng và sau 8 ngày trên lá nhãn khi có gây vết thương. Trên lá cao su, đường kính vết bệnh là 7,8 mm sau 7 ngày chủng có gây vết thương và 0,04 mm với kiểu chủng không gây vết thương. Với lá nhãn, MPL LD4T-3.10 gây hại trên lá với kích thước vết bệnh là 2,85 mm có gây vết thương và 0,55 mm chủng bệnh không gây vết thương sau 10 ngày chủng bệnh. Trên lá sầu riêng, MPL LD4T-3.10 kích thước vết bệnh lớn hơn lá cao su và lá nhãn ở cả hai kiểu chủng có gây vết thương và không gây vết thương. Đường kính vết bệnh lần lượt đạt 17,75 mm và 2,65 mm.

MPL DN9L-1.10 gây bệnh sau 5 ngày sau chủng trên lá cao su, lá sầu riêng và sau 7 ngày trên lá nhãn khi có gây vết thương. Trên lá cao su, đường kính vết bệnh là 7,6 mm sau 7 ngày chủng có gây vết thương và không gây bệnh với kiểu chủng không gây vết thương. Với lá nhãn, MPL DN9L-1.10 gây hại trên lá với kích thước vết bệnh là 3,5 mm có gây vết thương và không gây bệnh khi chủng không gây vết thương sau 10 ngày chủng bệnh. Trên lá sầu riêng, MPL DN9L-1.10 kích thước vết bệnh lớn hơn lá cao su và lá nhãn ở cả hai kiểu chủng có gây vết thương và không gây vết thương. Đường kính vết bệnh lần lượt đạt 13,15 mm và 2,95 mm.

MPL LD16L-1.14 gây bệnh sau 5 ngày sau chủng trên lá cao su, lá sầu riêng và lá nhãn khi có gây vết thương. Trên lá cao su, đường kính vết bệnh là 8,83 mm sau 7 ngày chủng có gây vết thương và 2,7 mm với kiểu chủng không gây vết thương. Với lá nhãn, MPL LD16L-1.14 gây hại trên lá với kích thước vết bệnh là 6,00 mm có gây vết thương và không gây bệnh khi chủng không gây vết thương sau 10 ngày chủng bệnh. Trên lá sầu riêng, MPL LD16L-1.14 kích thước vết bệnh lớn hơn lá cao su và lá nhãn

ở cả hai kiểu chủng có gây vết thương và không gây vết thương. Đường kính vết bệnh lần lượt đạt 7,50 mm và 3,10 mm sau 7 ngày chủng.

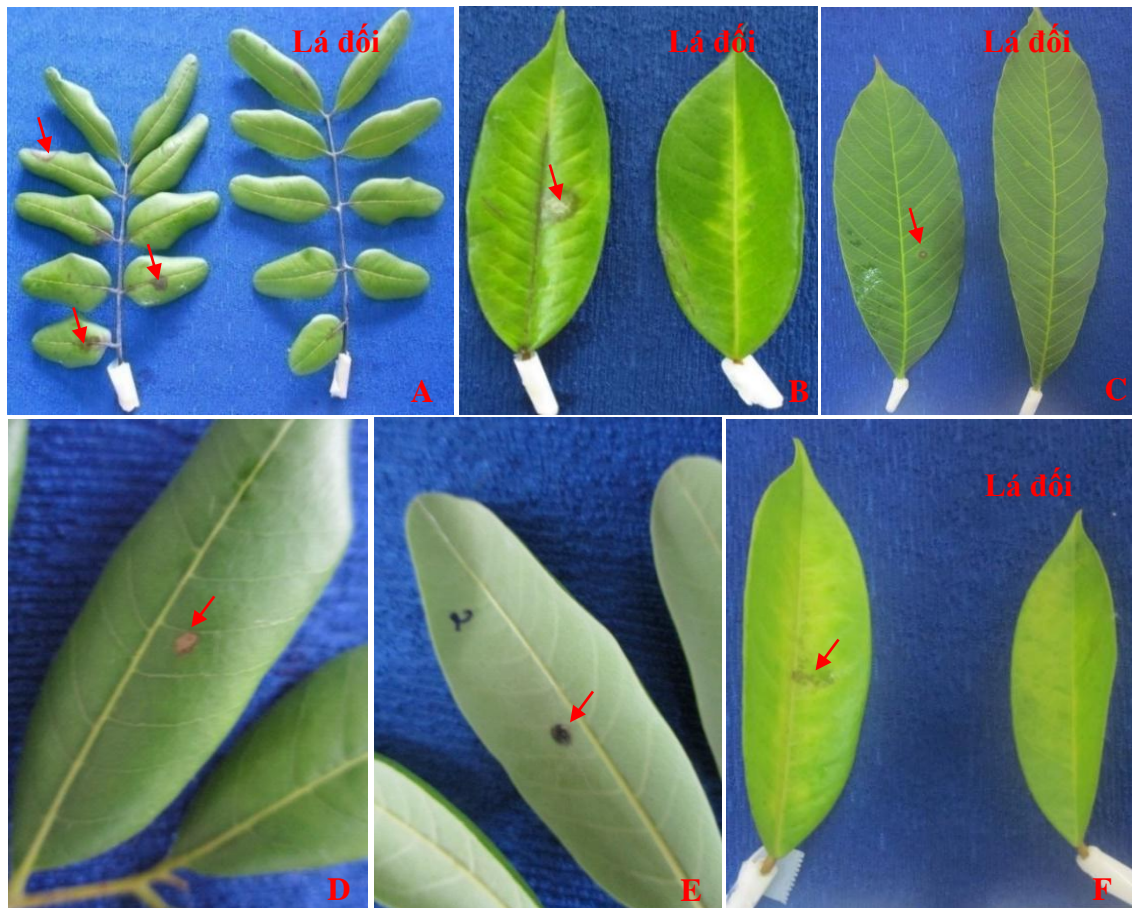
Kết quả từ bảng 3.29 và bảng 3.30 cho thấy MPL LD4T-3.10, DN9L-1.10, LD16L-1.14 thuộc loài *A. passiflorae* đều không tạo triệu chứng bệnh trên lá điều, bưởi, ca cao, cà phê, mít, xoài và vú sữa.

Khả năng gây bệnh của các MPL LD4T-3.10, DN9L-1.10, LD16L-1.14 thuộc loài *A. passiflorae* trên lá sầu riêng là cao hơn, với kích thước vết bệnh lớn hơn so với các lá cao su và nhãn. Thời gian cần thiết để hình thành vết bệnh trên lá cao su và lá nhãn dài hơn lá sầu riêng, chứng tỏ sầu riêng miễn cảm hoặc nhiễm với *A. passiflorae*. Do đó, không trồng gần chanh dây với cao su, nhãn và sầu riêng. Quy hoạch cơ cấu vùng trồng chanh dây cần quan tâm đến chủng loại cây trồng và cỏ dại liền kề đặc biệt cây cao su và sầu riêng.

**Bảng 3.29.** Thời gian ủ bệnh sau khi chủng *Alternaria passiflorae* trên lá cây công nghiệp và cây ăn quả

Tên thường gọi	Tên khoa học	Thời gian ủ bệnh trên lá (ngày)		
		LD4T-3.10	DN9L-1.10	LD16L-1.14
<b>Có gây vết thương</b>				
Cao su	<i>Hevea brasiliensis</i>	4	5	5
Nhãn	<i>Dimocarpus longan</i>	8	7	5
Sầu riêng	<i>Durio zibethinus</i>	3	5	5
<b>Không gây vết thương</b>				
Cao su	<i>Hevea brasiliensis</i>	6	-	5
Nhãn	<i>Dimocarpus longan</i>	10	-	-
Sầu riêng	<i>Durio zibethinus</i>	6	6	5

Ghi chú: (-): Lá không biểu hiện triệu chứng bệnh sau chủng, LD: Lâm Đồng, DN: Đắk Nông, L: Lá, T: Quả.



**Hình 3.27.** Triệu chứng bệnh do *Alternaria passiflorae* (LD4T-3.10) gây ra trên lá các loại cây sau 7 ngày chủng bệnh có gây vết thương. (A, D): Mặt trước lá nhãn; (B, F): Mặt trước lá sầu riêng; (C): Mặt trước lá cao su; (E): Mặt sau lá nhãn.

**Bảng 3.30.** Đường kính trung bình vết bệnh (mm) do *Alternaria passiflorae* gây ra trên lá cây công nghiệp và cây ăn quả sau các ngày chủng bệnh trong điều kiện phòng thí nghiệm

Tên thường gọi	Tên khoa học	Mẫu phân lập	Đường kính trung bình vết bệnh (mm) <sup>(a)</sup>											
			Có gây vết thương						Không gây vết thương					
			5NSC	6NSC	7NSC	8NSC	9NSC	10NSC	5NSC	6NSC	7NSC	8NSC	9NSC	10NSC
Cao su	<i>Hevea brasiliensis</i>	LD4T-3.10	2,95	4,75	7,80	-	-	-	0,00	0,04	0,04	0,04	-	-
		DN9L-1.10	3,30	5,15	7,60	-	-	-	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
		LD16L-1.14	3,20	4,90	8,83	-	-	-	0,50	1,20	2,70	-	-	-
Nhãn	<i>Dimocarpus longan</i>	LD4T-3.10	0,00	0,00	0,00	1,60	2,40	2,85	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,55
		DN9L-1.10	0,00	0,00	0,35	1,60	2,20	3,50	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
		LD16L-1.14	0,55	1,60	2,15	3,30	5,60	6,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Sầu riêng	<i>Durio zibethinus</i>	LD4T-3.10	5,05	6,72	16,00	17,75	-	-	0,00	0,90	2,65	-	-	-
		DN9L-1.10	5,25	6,70	11,85	13,15	-	-	0,00	1,45	2,95	-	-	-
		LD16L-1.14	3,30	4,60	7,50	15,00	-	-	1,30	2,25	3,10	-	-	-

Ghi chú: NSC: Ngày sau chủng, (a): Các giá trị là trung bình của 10 lá, LD: Lâm Đồng, DN: Đắk Nông, L: Lá, T: Quả; (-): Không ghi nhận số liệu vì lá bị vàng, chuyển sang màu nâu và bị hư.



### 3.5.1.2. Kết quả chủng bệnh trong điều kiện nhà lưới

Thí nghiệm được thực hiện trên 12 loại cây trồng là cải ngọt, cải bẹ xanh, khoai lang, bí đỏ, khổ qua, bầu, cà chua, ớt, khoai tây, lúa, ngô thức ăn gia súc, ngô nếp trong điều kiện nhà lưới. Trong thí nghiệm này, các MPL được chọn cũng là các MPL đã được khảo sát ở thí nghiệm trong phòng, bao gồm MPL LD4T-3.10, DN9L-1.10, LD16L-1.14.

Kết quả chủng bệnh cho thấy, MPL LD4T-3.10, DN9L-1.10, LD16L-1.14 gây bệnh trên cải bẹ xanh, khoai lang, bí đỏ, bầu, cà chua và ớt với thời điểm xuất hiện triệu chứng bệnh từ 3 đến 7 ngày sau chủng, trên cây khổ qua chỉ có 2 MPL DN9L-1.10, LD16L-1.14 gây ra triệu chứng bệnh sau 3 đến 5 ngày chủng (bảng 3.31). Trong đó, triệu chứng bệnh xuất hiện sớm nhất trên cà chua, chỉ sau 3 ngày chủng, chứng tỏ cà chua là cây mẫn cảm với *A. passiflorae* so với các cây khác. Tỷ lệ lá bệnh trên cà chua là 100%, trên ớt là 72,5 – 100%, trên bí đỏ từ 77,5 – 95%, trên khoai lang là 27 – 42,5%, trên cải bẹ xanh từ 82,5 – 97,5%, trên cây bầu là 90 – 100% và trên khổ qua là 100% (ngoại trừ MPL LD4T-3.10) sau 25 ngày chủng bệnh, (bảng 3.32). Trong khi cây cải ngọt, khoai tây, ngô nếp, ngô thức ăn gia súc và lúa không có triệu chứng bệnh, chứng tỏ tồn tại tính chuyên biệt ký chủ của *A. passiflorae*. Để đánh giá tính độc của từng MPL *Alternaria*, ngoài kích thước vết bệnh thì việc phân cấp bệnh do *Alternaria* gây ra theo phương pháp của Vokalounakis (1990) đã được ghi nhận. Kết quả từ bảng 3.33 cho thấy cải bẹ xanh, khoai lang, bí đỏ, bầu, khổ qua, cà chua và ớt có cấp bệnh dao động từ 1 – 4 sau 25 ngày chủng bệnh. Các MPL DN9L-1.10 và LD16L-1.14 có cấp bệnh cao nhất (cấp 4) trên cây khổ qua sau 25 ngày phun nấm. Trên cây bầu thì tính độc cao nhất chỉ thể hiện khi chủng MPL DN9L-1.10. Trên cà chua MPL LD4T-3.10, DN9L-1.10 và LD16L-1.14 gây bệnh chỉ 3 ngày sau khi chủng với cấp bệnh từ cấp 0 – 1.

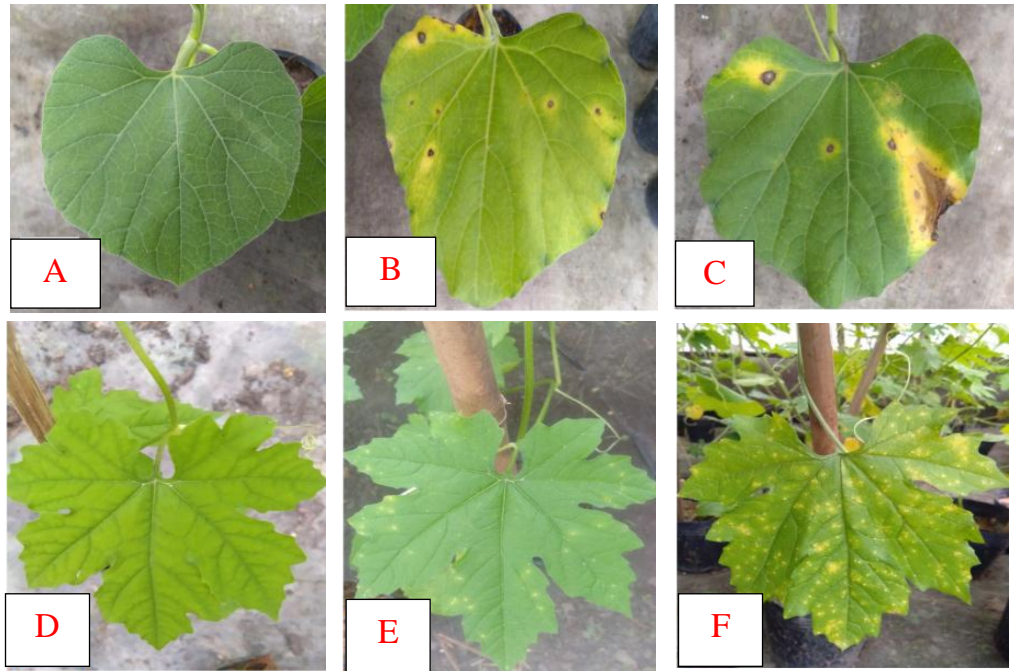


**Hình 3.28.** Triệu chứng bệnh do *Alternaria passiflorae* gây ra trên các loại cây trồng sau 20 ngày chủng bệnh. (A): Cây bí đỏ; (B): cây cà chua; (C): cây cải xanh, (D): cây ớt và (E, F): cây khoai lang.

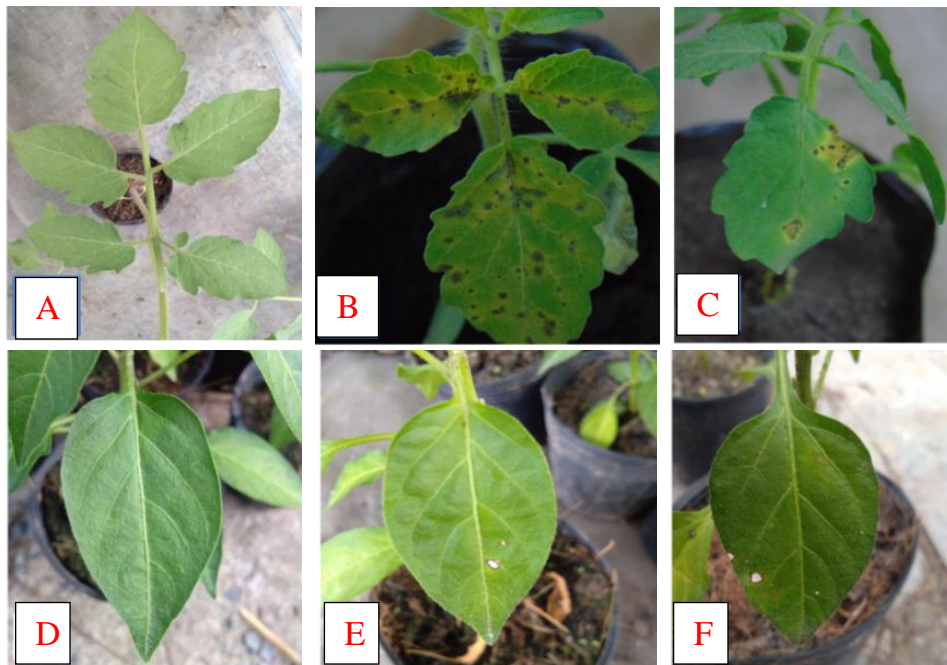
**Bảng 3.31.** Thời gian ủ bệnh sau khi chủng *Alternaria passiflorae* trên các loại cây trồng khác nhau

Tên thường gọi	Tên khoa học	Thời gian ủ bệnh trên lá (ngày)		
		LD4T-3.10	DN9L-1.10	LD16L-1.14
Cải bẹ xanh	<i>Brassica juncea</i>	4	4	6
Khoai lang	<i>Ipomoea batatas</i>	7	6	4
Bí đỏ	<i>Cucurbita maxima</i>	5	4	4
Khổ qua	<i>Momordica charantia</i>	-	3	5
Bầu	<i>Lagenaria siceraria</i>	7	7	7
Cà chua	<i>Solanum lycopersicum</i>	3	3	3
Ớt	<i>Capsicum annuum</i>	6	6	6

Ghi chú: (-) cây không biểu hiện triệu chứng bệnh sau chủng, LD: Lâm Đồng, DN: Đắk Nông, L: Lá, T: Quả.



**Hình 3.29.** Triệu chứng bệnh đốm lá do *Alternaria passiflorae* (Mẫu DN9L-1.10) gây ra trên cây bầu và cây khổ qua. (A, D): Lá đối chứng; (B, E): Triệu chứng bệnh 9 ngày sau chủng; (C, F): Triệu chứng bệnh 15 ngày sau chủng; (A-C): Lá cây bầu; (D-F): Lá cây khổ qua.



**Hình 3.30.** Triệu chứng bệnh đốm lá do *Alternaria passiflorae* (Mẫu DN9L-1.10) gây ra trên cây cà chua và cây ớt. (A, D): Lá đối chứng; (C, E): Triệu chứng bệnh 7 ngày sau chủng; (B, F): Triệu chứng bệnh 15 ngày sau chủng; (A-C): Lá cây cà chua; (D-F): Lá cây ớt.

**Bảng 3.32.** Tỷ lệ lá bệnh (%) do *Alternaria passiflorae* gây ra trên các loại cây trồng sau chủng bệnh trong điều kiện nhà lưới

Tên thường gọi	Tên khoa học	Mẫu phân lập	Tỷ lệ lá bệnh (%) <sup>(a)</sup>									
			3NSC	5NSC	7NSC	9NSC	11NSC	13NSC	15NSC	17NSC	20NSC	25NSC
Cải bẹ xanh	<i>Brassica juncea</i>	LD4T-3.10	0,00	20,00	35,00	40,00	40,00	55,00	75,00	75,00	80,00	92,50
		DN9L-1.10	0,00	10,00	35,00	42,50	50,00	52,50	72,50	82,50	87,50	97,50
		LD16L-1.14	0,00	0,00	20,00	30,00	32,50	47,50	65,00	72,50	80,00	82,50
Khoai lang	<i>Ipomoea batatas</i> L.	LD4T-3.10	0,00	0,00	5,00	27,50	30,00	35,00	37,50	37,50	40,00	42,50
		DN9L-1.10	0,00	0,00	12,50	17,50	22,50	22,50	27,50	27,50	27,50	27,50
		LD16L-1.14	0,00	5,00	10,00	10,00	10,00	10,00	15,00	17,50	27,50	35,00
Bí đỏ	<i>Cucurbita maxima</i>	LD4T-3.10	0,00	32,50	35,00	42,50	45,00	50,00	62,50	72,50	82,50	95,00
		DN9L-1.10	0,00	30,00	37,50	45,00	45,00	50,00	52,50	52,50	62,50	77,50
		LD16L-1.14	0,00	17,50	30,00	60,00	60,00	60,00	67,50	80,00	85,00	90,00
Khổ qua	<i>Momordica charantia</i> L.	LD4T-3.10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
		DN9L-1.10	10,00	25,00	47,50	60,00	80,00	95,00	100,00	100,00	100,00	100,00
		LD16L-1.14	0,00	20,00	42,50	55,00	80,00	85,00	97,50	100,00	100,00	100,00
Bầu	<i>Lagenaria siceraria</i>	LD4T-3.10	0,00	12,50	25,00	50,00	55,00	75,00	82,50	100,00	100,00	100,00
		DN9L-1.10	0,00	15,00	32,50	50,00	62,50	82,50	100,00	100,00	100,00	100,00
		LD16L-1.14	0,00	2,50	20,00	30,00	47,50	67,50	80,00	87,50	90,00	90,00
Cà chua	<i>Solanum lycopersicum</i>	LD4T-3.10	7,50	35,00	45,00	70,00	70,00	72,50	85,00	87,50	95,00	100,00
		DN9L-1.10	15,00	30,00	45,00	62,50	65,00	70,00	80,00	92,50	100,00	100,00
		LD16L-1.14	12,50	25,00	40,00	57,50	60,00	67,50	82,50	90,00	97,50	100,00
Ớt	<i>Capsicum annum</i>	LD4T-3.10	0,00	0,00	37,50	57,50	67,50	75,00	75,00	82,50	82,50	100,00
		DN9L-1.10	0,00	0,00	25,00	32,50	55,00	77,50	82,50	90,00	92,50	97,50
		LD16L-1.14	0,00	0,00	15,00	27,50	47,50	60,00	65,00	67,50	72,50	72,50

Ghi chú: NSC: ngày sau chủng, <sup>(a)</sup> Trung bình của 40 lá trên 10 chậu cây, LD: Lâm Đồng, DN: Đắk Nông, L: Lá, T: Quả.

**Bảng 3.33.** Cấp bệnh cao nhất do nấm *Alternaria passiflorae* gây ra trên các loại cây trồng sau chủng bệnh trong điều kiện nhà lưới

Tên thường gọi	Tên khoa học	Mẫu phân lập	Cấp độ bệnh (Cấp)	Ngày xuất hiện (Ngày)
Cải bẹ xanh	<i>Brassica juncea</i>	LD4T-3.10	3	25
		DN9L-1.10	3	15
		LD16L-1.14	2	13
Khoai lang	<i>Ipomoea batatas</i>	LD4T-3.10	2	25
		DN9L-1.10	2	20
		LD16L-1.14	2	15
Bí đỏ	<i>Cucurbita maxima</i>	LD4T-3.10	3	25
		DN9L-1.10	3	25
		LD16L-1.14	3	25
Khổ qua	<i>Momordica charantia</i>	LD4T-3.10	0	0
		DN9L-1.10	4	17
		LD16L-1.14	4	17
Bầu	<i>Lagenaria siceraria</i>	LD4T-3.10	4	25
		DN9L-1.10	4	20
		LD16L-1.14	4	20
Cà chua	<i>Solanum lycopersicum</i>	LD4T-3.10	3	17
		DN9L-1.10	4	20
		LD16L-1.14	3	25
Ớt	<i>Capsicum annuum</i>	LD4T-3.10	3	25
		DN9L-1.10	3	20
		LD16L-1.14	2	15

Ghi chú: LD: Lâm Đồng, DN: Đắk Nông, L: Lá, T: Quả.

### 3.5.2. Khả năng gây bệnh của *Alternaria tenuissima*

#### 3.5.2.1. Kết quả chủng bệnh trong phòng thí nghiệm

Chọn MPL CDNK1.13, CDNK7.13 và LD1T-1.16 cho loài *A. tenuissima* chủng trên 10 loại lá của cây ăn quả, cây công nghiệp trong điều kiện có gây vết thương và không gây vết thương, kết quả được trình bày trong bảng 3. 34 và bảng 3.35.

Thời gian xuất hiện bệnh trên từng loại cây là khác nhau. Khi gây vết thương MPL CDNK1.13 tạo vết bệnh trên lá cây bưởi và lá cây điều; nhưng không tạo vết

bệnh trên ca cao, cao su, cà phê, mít, nhãn, sầu riêng, xoài và vú sữa. LD1T-1.16 chỉ gây bệnh trên lá cây bưởi cao su và điều sau 6 ngày chủng bệnh (bảng 3.34).

Thí nghiệm không gây thương, MPL CDNK1.13 không gây bệnh trên 10 loại cây; MPL CDNK7.13 gây bệnh trên lá điều; mẫu LD1T-1.16 gây bệnh trên lá của cây bưởi, cao su và điều.

Vết bệnh trên bưởi có triệu chứng đầu tiên là một đốm nâu nhỏ, có quang vàng xung quanh, vết bệnh lớn dần sau 10 ngày chủng và chuyển sang màu nâu đậm. MPL LD1T-1.16 tạo vết bệnh 2,56 mm (gây thương) và 2,3 mm (không gây thương) sau 10 ngày chủng bệnh (bảng 3.35).

Đối với cây điều, cả ba mẫu nấm đều gây bệnh trong điều kiện gây thương; trong điều kiện không gây thương, chỉ có CDNK7.13 và LD1T-1.16 có khả năng gây bệnh. Triệu chứng bệnh điển hình trên lá điều ban đầu là một đốm nhỏ màu nâu đậm, sau vết bệnh chuyển màu nâu xám đến xám đen, trên bề mặt vết bệnh có các sợi nấm phát triển mạnh và nhô lên cao ở mẫu LD1T-1.16.

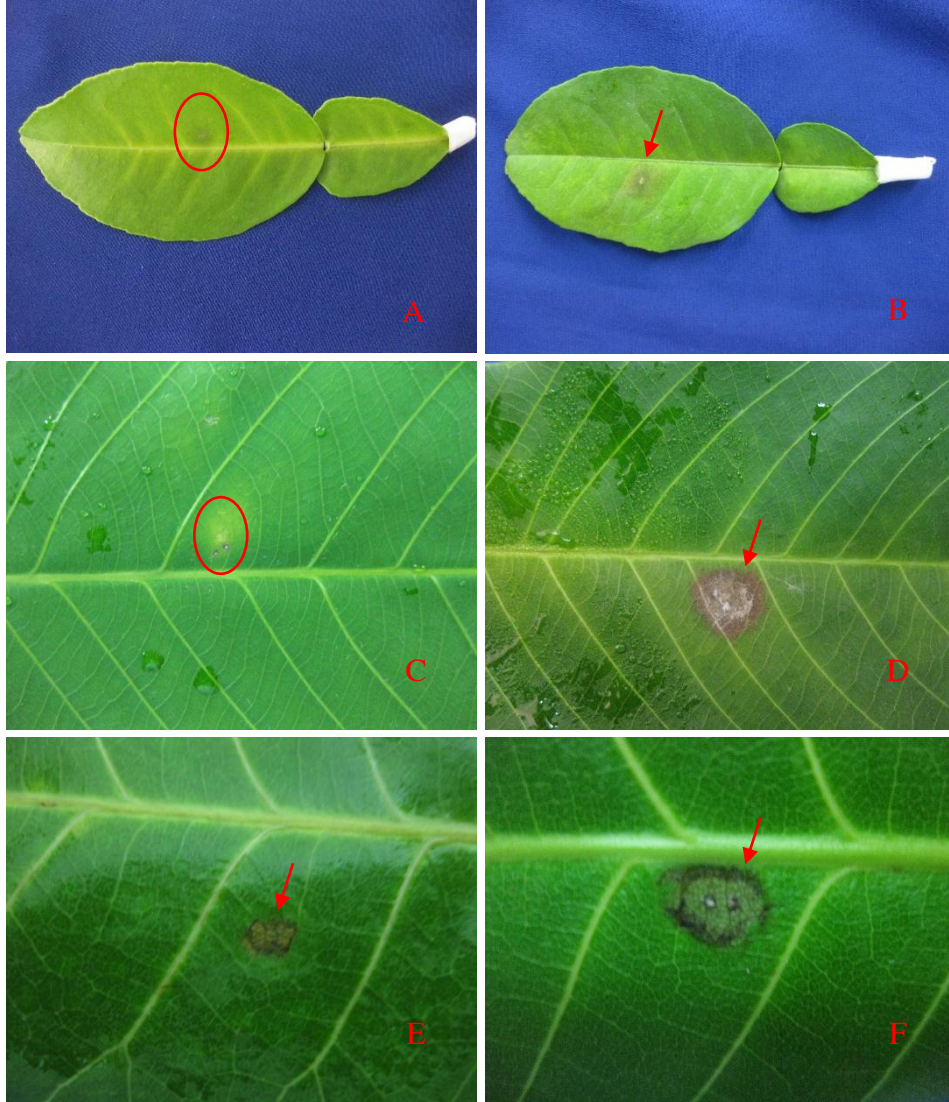
Trên cây cao su, chỉ có mẫu LD1T-1.16 gây bệnh, triệu chứng xuất hiện sau 6 ngày chủng có gây thương và 7 ngày sau chủng bệnh không gây thương. Triệu chứng ban đầu là một đốm nhỏ tròn màu vàng, có quang nâu vàng bao quanh bên ngoài. Các sợi nấm phát triển trên cả hai mặt của lá có màu nâu đậm. Vết bệnh lớn dần sau các ngày chủng bệnh, đạt đường kính 3,03 mm sau 10 ngày chủng (bảng 3.35).

**Bảng 3.34.** Thời gian ủ bệnh sau khi chủng *Alternaria tenuissima* trên lá cây công nghiệp và cây ăn quả

Tên thường gọi	Tên khoa học	Thời gian ủ bệnh trên lá (ngày)		
		CDNK1.13	CDNK7.13	LD1T-1.16
<b>Có gây vết thương</b>				
Bưởi	<i>Citrus grandis</i> L.	6	-	5
Điều	<i>Anacardium occidentale</i> L	7	6	6
Cao su	<i>Hevea brasiliensis</i>	-	-	6
<b>Không gây vết thương</b>				
Bưởi	<i>Citrus grandis</i> L.	-	-	7
Điều	<i>Anacardium occidentale</i> L	-	7	6
Cao su	<i>Hevea brasiliensis</i>	-	-	7



Ghi chú: (-): Lá không biểu hiện triệu chứng bệnh sau chủng, LD: Lâm Đồng, DN: Đắk Nông, L: Lá, T: Quả.



**Hình 3.31.** Triệu chứng bệnh do *Alternaria tenuissima* gây ra trên các loại lá cây bưởi, cây cao su và cây điều sau 10 ngày chủng bệnh. (A, B): lá bưởi; (C, D): lá cao su; (E, F): lá điều; (A, C, E): có gây vết thương; (B, D, F): không gây vết thương.

Như vậy, *A. tenuissima* có phổ ký chủ hẹp hơn và chuyên biệt hơn khi so với *A. passiflorae*. Ký chủ chuyên biệt; cây điều và bưởi, có thể được sử dụng như loài cây “chỉ thị” giúp phân tách giữa hai loài *Alternaria* gây bệnh trên chanh dây.

**Bảng 3.35.** Đường kính trung bình vết bệnh (mm) do *Alternaria tenuissima* gây ra trên lá cây công nghiệp và cây ăn quả sau các ngày chủng bệnh trong điều kiện phòng thí nghiệm

Tên thường gọi	Tên khoa học	Mẫu phân lập	Đường kính trung bình vết bệnh (mm) <sup>(a)</sup>											
			5NSC	6NSC	7NSC	8NSC	9NSC	10NSC	5NSC	6NSC	7NSC	8NSC	9NSC	10NSC
			Có gây vết thương						Không gây vết thương					
Bưởi	<i>Citrus grandis</i> L.	CDNK1.13	0,00	0,55	0,91	1,47	1,88	2,26	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
		CDNK7.13	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
		LD1T-1.16	0,44	0,94	1,37	1,72	2,19	2,56	0,00	0,00	0,33	0,43	0,61	2,30
Điều	<i>Anacardium occidentale</i> L.	CDNK1.13	0,00	0,00	1,02	2,01	2,58	3,21	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
		CDNK7.13	0,00	0,92	1,45	2,32	2,87	3,31	0,00	0,00	0,55	0,76	0,97	1,20
		LD1T-1.16	0,00	1,50	1,89	2,73	3,41	3,84	0,00	0,39	0,81	1,06	1,53	1,64
Cao su	<i>Hevea brasiliensis</i>	CDNK1.13	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
		CDNK7.13	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
		LD1T-1.16	0,00	0,80	1,11	1,91	2,67	3,03	0,00	0,00	0,40	0,65	1,04	-

Ghi chú: NSC: Ngày sau chủng, (a): Các giá trị là trung bình của 10 lá, LD: Lâm Đồng, CDNK: Chanh dây nhập khẩu, T: Quả; (-): Không ghi nhận số liệu vì lá bị vàng, chuyển sang màu nâu và bị hư.



### 3.5.2.2. Kết quả chủng bệnh trong điều kiện nhà lưới

Trên cây cà chua, cả ba MPL CDNK1.13, CDNK7.13 và LD1T-1.16 gây bệnh nhanh chỉ sau 3 ngày chủng với tỷ lệ lá bệnh lần lượt là 22,50%, 12,50% và 10%. Sau 25 ngày 50% lá bệnh khi chủng mẫu CDNK1.13, 40% với mẫu CDNK7.13 và 57,50% khi chủng LD1T-1.16 (bảng 3.36). Triệu chứng bệnh trên cây cà chua ban đầu là những đốm rất nhỏ, có màu vàng, có viền vàng sáng xung quanh vết bệnh. Vết bệnh tròn đều và tương đối đồng đều giữa các mẫu CDNK1.13, CDNK7.13, LD1T-1.16. Trên cùng một lá có thể xuất hiện từ một đến nhiều đốm bệnh, chưa ghi nhận được triệu chứng bệnh trên thân cà chua.

Trên cây bầu, cả ba MPL CDNK1.13, CDNK7.13, LD1T-1.16 đều gây bệnh. Mẫu CDNK1.13 và LD1T-1.16 gây hại chỉ sau 3 ngày chủng với tỷ lệ bệnh lần lượt là 7,50 – 22,50% và 10,00 – 25,00%; 7,50 – 15,00% với mẫu CDNK7.13 gây bệnh sau 11 ngày chủng (bảng 3.37). Cấp bệnh của ba MPL dao động từ cấp 0 – 4 sau 25 ngày chủng (bảng 3.38). Triệu chứng bệnh trên cây bầu, lúc đầu là những đốm tròn nhỏ màu vàng, có quầng đồng tâm màu nâu xung quanh, khi vết bệnh nặng chuyển sang màu nâu đậm, xuất hiện trên các vị trí khác nhau của lá như mép lá, gân lá hay chính giữa các mô lá.

Kết quả từ bảng 3.36, 3.37, 3.38 cho thấy CDNK1.13, CDNK7.13 và LD1T-1.16 đều có khả năng gây bệnh trên cây bí đỏ, thời gian xuất hiện triệu chứng bệnh lần lượt là 3, 5, 7 ngày sau chủng. Tỷ lệ lá bệnh tăng dần từ 3 đến 25 ngày sau chủng với tỷ lệ bệnh từ 2,50 – 17,50% đối với mẫu CDNK1.13; 5,00 – 15,00% với mẫu CDNK7.13 và 7,50 – 27,50% với mẫu LD1T-1.16. Khả năng gây bệnh của ba mẫu này được đánh giá ở cấp 2 đến 4 sau 25 ngày chủng. Triệu chứng bệnh ghi nhận được trên cây bí đỏ là những đốm nhỏ, quầng vàng xung quanh vết bệnh. Vết bệnh phát triển chậm qua các ngày theo dõi được trình bày trong bảng phân cấp bệnh (bảng 3.38).

Trên cây cải ngọt, cây cải xanh các mẫu CDNK1.13, CDNK7.13, LD1T-1.16 gây bệnh lần lượt ở 3, 5, 3 ngày sau chủng. Tỷ lệ lá bệnh đạt 32,50% (CDNK1.13), mẫu CDNK7.13 chiếm tỷ lệ lá bệnh 10,00 – 25,00%; 5,00 – 25,00% (mẫu LD1T-1.16) sau 25 ngày chủng. Vết bệnh ban đầu trên cây cải ngọt, cây cải xanh là những

đốm vàng nhỏ, có quầng vàng bao quanh, đốm bệnh phát triển chậm sau các ngày chủng bệnh.

**Bảng 3.36.** Thời gian ủ bệnh sau khi chủng *Alternaria tenuissima* trên các loại cây trồng khác nhau

Tên thường gọi	Tên khoa học	Thời gian ủ bệnh trên lá (ngày)		
		CDNK1.13	CNDK7.13	LD1T-1.16
Cải ngọt	<i>Brassica integrifolia</i>	5	5	5
Cải bẹ xanh	<i>Brassica juncea</i>	3	5	3
Bí đỏ	<i>Cucurbita maxima</i>	3	5	7
Bầu	<i>Lagenaria siceraria</i>	3	11	3
Cà chua	<i>Solanum lycopersicum</i>	3	3	3

Ghi chú: CDNK: Chanh dây nhập khẩu, LD: Lâm Đồng, T: Quả.

Dựa vào kết quả trong bảng 3.37 cho thấy *A. tenuissima* gây bệnh trên 5 loại cây trồng là bầu, bí đỏ, cà chua, cải ngọt, cải bẹ xanh (cải xanh) và chưa ghi nhận xuất hiện bệnh trên các loại cây khô qua, khoai lang, khoai tây, ớt, lúa, ngô thức ăn gia súc, ngô nếp.

Kết quả chủng bệnh xác định phổ ký chủ của 2 loài *A. passiflorae* và *A. tenuissima* cho thấy có sự khác biệt về phổ ký chủ của 2 loài *Alternaria*. Với *A. passiflorae*, có khả năng gây bệnh trên lá cây cao su, lá cây nhãn, lá cây sầu riêng; cây cải bẹ xanh, cây khoai lang, cây bí đỏ, cây bầu, cây cà chua và cây ớt; không có khả năng gây bệnh trên lá cây điều, lá cây bưởi, lá cây ca cao, lá cây cà phê, lá cây mít, lá cây xoài, lá cây vú sữa, cây cải ngọt, cây khoai tây, cây ngô nếp, cây ngô thức ăn gia súc và cây lúa. Với loài *A. tenuissima*, gây bệnh trên lá cây bưởi, lá cây điều, lá cây cao su, cây bầu, cây bí đỏ, cây cà chua, cây cải ngọt, cây cải bẹ xanh (cải xanh); không gây bệnh trên cây khô qua, cây khoai lang, cây khoai tây, cây ớt, cây lúa, cây ngô thức ăn gia súc, cây ngô nếp, lá cây mít, lá cây xoài, lá cây nhãn, lá cây sầu riêng, lá cây vú sữa, lá cây cà phê vối và lá cây ca cao.

**Bảng 3.37.** Tỷ lệ lá bệnh (%) do *Alternaria tenuissima* gây ra trên các loại cây trồng sau chủng bệnh trong điều kiện nhà lưới

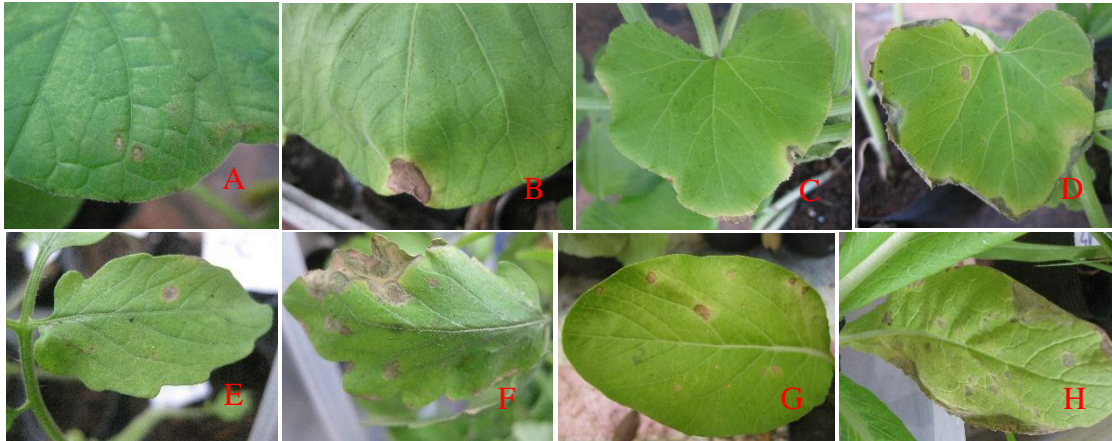
Tên thường gọi	Tên khoa học	Mẫu phân lập	Tỷ lệ lá bệnh (%) <sup>(a)</sup>									
			3NSC	5NSC	7NSC	9NSC	11NSC	13NSC	15NSC	17NSC	20NSC	25NSC
Cải ngọt	<i>Brassica integrifolia</i>	CDNK1.13	0,00	5,00	7,50	12,50	15,00	15,00	17,50	17,50	22,50	22,50
		CDNK7.13	0,00	5,00	7,50	7,50	12,50	12,50	15,00	15,00	20,00	25,00
		LD1T-1.16	0,00	5,00	5,00	7,50	7,50	12,50	15,00	20,00	20,00	20,00
Cải bẹ xanh	<i>Brassica juncea</i>	CDNK1.13	15,00	17,50	25,00	27,50	27,50	30,00	30,00	32,50	32,50	32,50
		CDNK7.13	0,00	10,00	10,00	12,50	15,00	17,50	20,00	20,00	20,00	25,00
		LD1T-1.16	5,00	10,00	15,00	20,00	20,00	20,00	22,50	22,50	25,00	25,00
Bí đỏ	<i>Cucurbita maxima</i>	CDNK1.13	2,50	7,50	7,50	12,50	15,00	15,00	15,00	15,00	17,50	17,50
		CDNK7.13	0,00	5,00	7,50	10,00	15,00	15,00	15,00	15,00	15,00	15,00
		LD1T-1.16	0,00	0,00	7,50	10,00	17,50	17,50	20,00	22,50	22,50	27,50
Bầu	<i>Lagenaria siceraria</i>	CDNK1.13	7,50	15,00	15,00	17,50	17,50	20,00	20,00	20,00	22,50	22,50
		CDNK7.13	0,00	0,00	0,00	0,00	7,50	10,00	15,00	15,00	15,00	15,00
		LD1T-1.16	10,00	17,50	17,50	20,00	20,00	22,50	22,50	22,50	25,00	25,00
Cà chua	<i>Solanum lycopersicum</i>	CDNK1.13	22,50	27,50	37,50	37,50	42,50	42,50	45,00	47,50	50,00	50,00
		CDNK7.13	12,50	15,00	15,00	22,50	25,00	27,50	32,50	35,00	37,50	40,00
		LD1T-1.16	10,00	15,00	22,50	27,50	35,00	40,00	50,00	52,50	57,50	57,50

Ghi chú: NSC: ngày sau chủng, <sup>(a)</sup> Trung bình của 40 lá trên 10 chậu cây, CDNK: Chanh dây nhập khẩu, LD: Lâm Đồng, T: Quả.

**Bảng 3.38.** Cấp bệnh cao nhất do nấm *Alternaria tenuissima* gây ra trên các loại cây trồng sau chủng bệnh trong điều kiện nhà lưới

Tên thường gọi	Tên khoa học	Mẫu phân lập	Cấp độ bệnh (Cấp)	Ngày xuất hiện (Ngày)
Cải ngọt	<i>Brassica integrifolia</i>	CDNK1.13	3	20
		CDNK7.13	4	25
		LD1T-1.16	4	20
Cải bẹ xanh	<i>Brassica juncea</i>	CDNK1.13	3	17
		CDNK7.13	4	17
		LD1T-1.16	4	15
Bí đỏ	<i>Cucurbita maxima</i>	CDNK1.13	2	20
		CDNK7.13	4	20
		LD1T-1.16	3	17
Bầu	<i>Lagenaria siceraria</i>	CDNK1.13	3	17
		CDNK7.13	3	20
		LD1T-1.16	4	20
Cà chua	<i>Solanum lycopersicum</i>	CDNK1.13	4	15
		CDNK7.13	4	17
		LD1T-1.16	4	17

Ghi chú: NSC: ngày sau chủng, CDNK: Chanh dây nhập khẩu, LD: Lâm Đồng, T: Quả.



**Hình 3.32.** Triệu chứng bệnh đốm lá do *Alternaria tenuissima* gây ra sau khi chủng bệnh. (A, B): cây bầu; (C, D): cây bí đỏ; (E, F): cây cà chua; (G): cây cải ngọt; (H): cây cải bẹ xanh.

### 3.6. Xác định sự hiện diện của độc tố alternariol và ảnh hưởng của hợp chất thứ cấp sinh ra từ *Alternaria* spp.

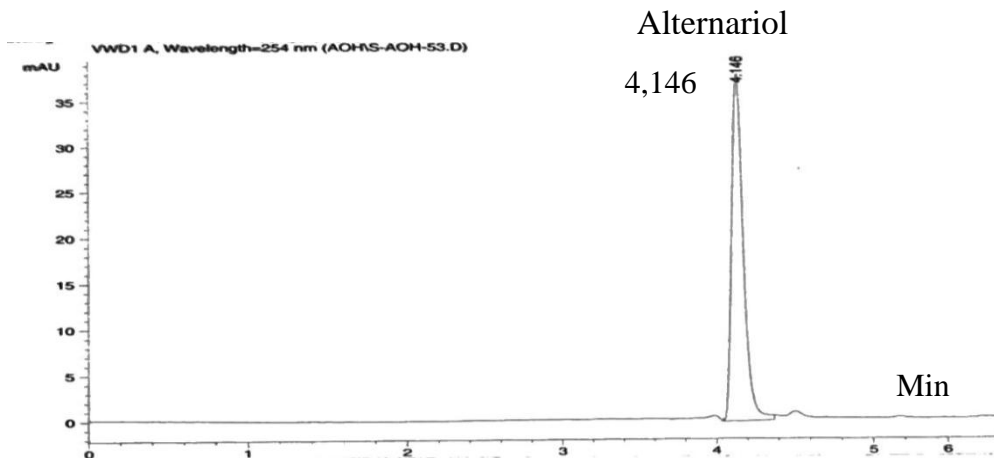
#### 3.6.1. Điều kiện xác định sự hiện diện của độc tố alternariol

Tiến hành khảo sát với ba thành phần dung môi pha động khác nhau, bao gồm: MeOH 100%, MeOH 10% và đệm phosphate. Sau khi thực hiện chạy pha động với

điểm chuẩn 0,02 ppm bằng phương pháp HPLC, thu được kết quả dung môi MeOH 100% cho xuất hiện pic (peak) của chất chuẩn alternariol tại thời gian lưu 4,146 phút (Hình 3.33).

Sau khi phân tích khả năng phân tách AOH của các dung môi khác nhau trên mẫu và chất chuẩn. Kết quả từ sắc ký đồ cho thấy MeOH có khả năng phân tách AOH ra khỏi cột sắc ký.

Khảo sát môi trường dinh dưỡng cho tăng sinh khối *Alternaria* nhằm xác định loại môi trường dinh dưỡng thích hợp cho sinh tạo hợp chất thứ cấp phục vụ cho thí nghiệm khảo sát độc tố AOH. Thí nghiệm khảo sát môi trường tăng sinh khối đã được tiến hành với mẫu nấm đại diện cho loài *A. tenuissima* và *A. passiflorae* trên bốn môi trường SA, PD, LA, RA, kết quả được trình bày trong bảng 3.39.

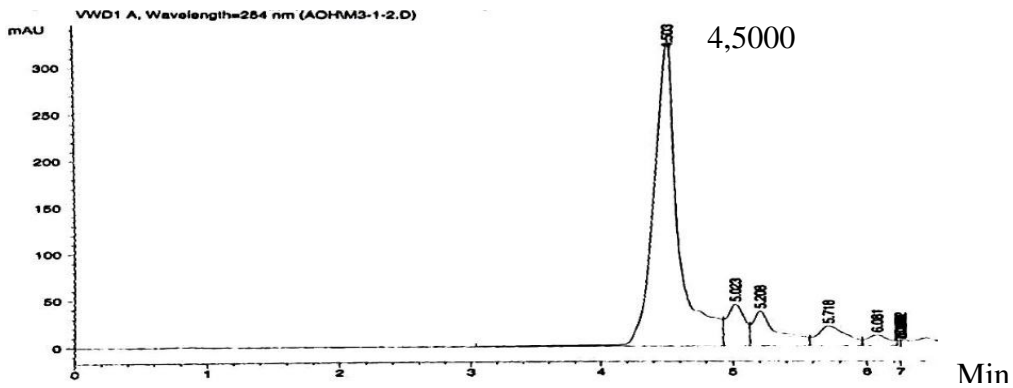


**Hình 3.33.** Sắc ký đồ của chất chuẩn AOH trong pha động MeOH 100%

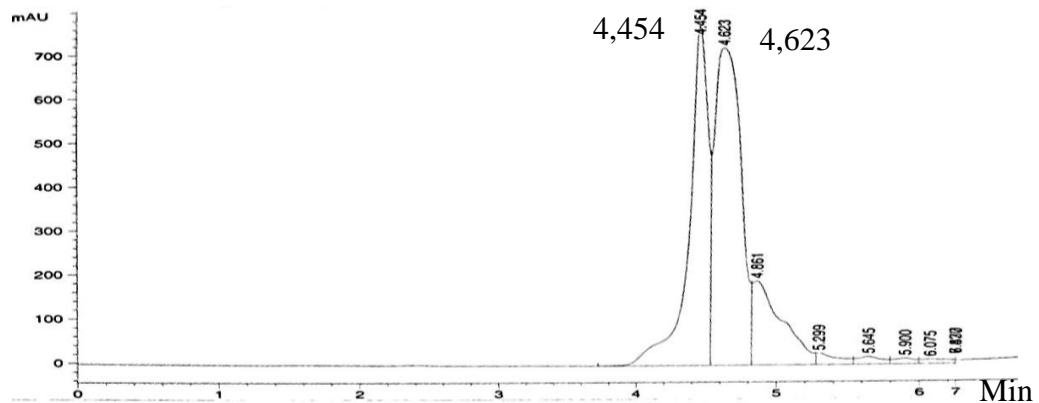
**Bảng 3.39.** Kết quả khảo sát môi trường nhân sinh khối nấm *Alternaria*

Môi trường	SA		PD		LA		RA	
	ĐPT	KNS AOH	ĐPT	KNS AOH	ĐPT	KNS AOH	ĐPT	KNS AOH
<i>A. tenuissima</i>	++	KHD	++	HD	+	HD	-	KHD
<i>A. passiflorae</i>	++	KHD	++	HD	-	KHD	-	KHD

Ghi chú: ĐPT: Độ phát triển; KNS OAH: Khả năng sinh ra độc tố AOH trên mỗi loại môi trường; HD: Hiện diện; KHD: Không hiện diện; (++) Phát triển tốt; (+) Phát triển; (-) Không phát triển hoặc không tồn tại.



**Hình 3.34.** Sắc ký đồ AOH trên nền mẫu môi trường PD (mẫu LD16L-1.14)



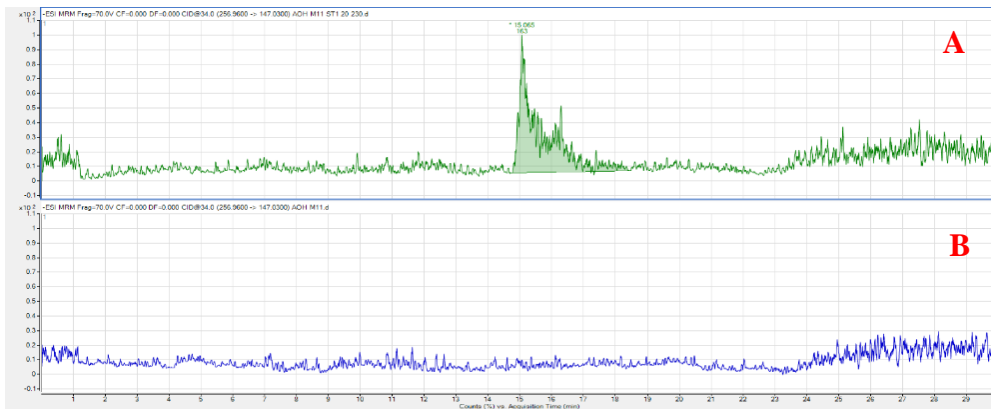
**Hình 3.35.** Sắc ký đồ AOH trên nền mẫu môi trường PD (mẫu DN8T-4.11)

Kết quả cho thấy SA, PD và LA là môi trường thích hợp tăng sinh *A. tenuissima*. Môi trường RA tản nấm mọc yếu, điều này có sự khác biệt so với thí nghiệm của Koley và Mahapatra (2015) với nấm *A. solani*. Đối với *A. passiflorae* môi trường SA và PD là thích hợp cho tăng sinh khối tản nấm. Tuy nhiên AOH được tìm thấy khi nuôi ủ nấm trong môi trường PD và không phát hiện AOH trong SA.

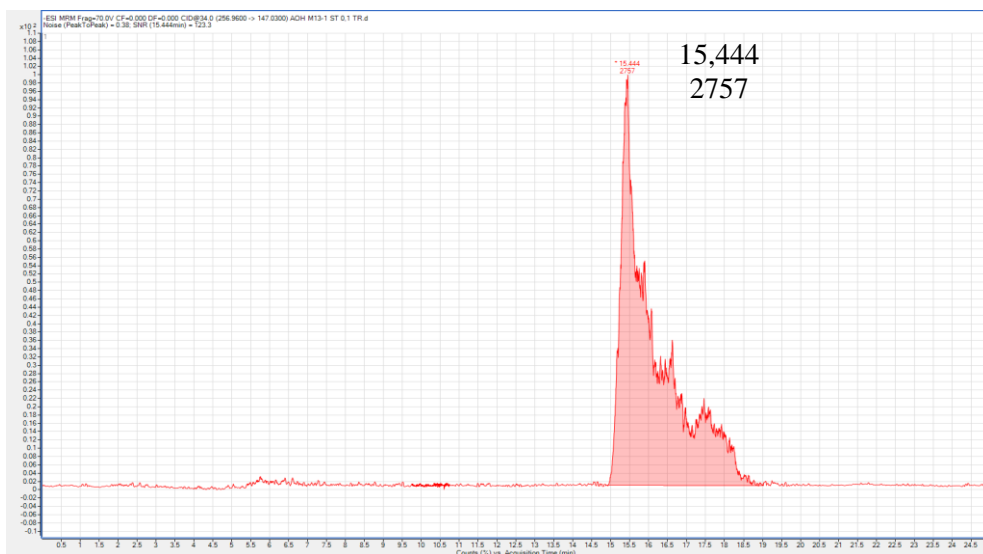
Tính đặc hiệu của phương pháp phân tích được xác định thông qua việc sử dụng mẫu trắng và mẫu trắng thêm chất chuẩn AOH. Sắc ký đồ của mẫu trắng thêm chuẩn hiển thị một pic trong khi mẫu trắng không thêm chuẩn ở cùng thời gian lưu không cho pic AOH trên sắc ký đồ. Dựa vào kết quả được thể hiện trong hình 3.36 cho thấy sắc ký đồ của mẫu trắng không xuất hiện pic nhiều tại thời gian lưu của chất phân tích AOH. Vậy kết luận phương pháp có tính đặc hiệu cao.

Phân tích lặp lại mẫu thêm chuẩn ở nồng độ 0,1  $\mu\text{g/ml}$ , thu được tỉ lệ S/N là 123,3. Vậy giới hạn định lượng (LOQ) ở khoảng nồng độ 0,01  $\mu\text{g/ml}$  (ứng với tỉ lệ S/N khoảng 10) và giới hạn định tính khoảng 0,003  $\mu\text{g/ml}$ .

Kết quả trong bảng 3.40 cho thấy 10 trong số 13 mẫu *Alternaria* spp. cho kết quả dương tính đối với alternariol. Mẫu DN3T - 2.17 có khả năng sinh độc tố cao nhất (0,46  $\mu\text{g/ml}$ ); mẫu CDNK7.13, mẫu CDNK1.13; LD16L-1.14 với nồng độ mẫu < LOQ, 3/13 mẫu không phát hiện độc tố AOH: mẫu LD1T-1.16; LD2T-1.16 và DN11T-1.16. Vì alternariol là nội độc tố được sinh ra từ quá trình nảy mầm của bào tử *Alternaria* spp. nên lượng độc tố còn phụ thuộc vào mật độ bào tử nảy mầm trong dung dịch dinh dưỡng.



**Hình 3.36.** Sắc ký đồ trong thẩm định tính đặc hiệu. (A) Sắc ký đồ mẫu trắng thêm chuẩn, (B) Sắc ký đồ mẫu trắng.



**Hình 3.37.** Sắc ký đồ mẫu chuẩn tại nồng độ 0,1 µg/ml**Bảng 3.40.** Kết quả phân tích hàm lượng AOH trung bình trên mẫu *Alternaria*

STT	Tên loài		Hàm lượng AOH (µg/ml)	Kết quả chứng bệnh trên lá chanh dây
		Mẫu phân lập		
1	<i>A. tenuissima</i>	CDNK1.13	+	Bệnh
2	<i>A. tenuissima</i>	CDNK7.13	+	Bệnh
3	<i>A. tenuissima</i>	CDNK18.14(2)	0,03	Bệnh
4	<i>A. passiflorae</i>	DN9L-1.10	0,065	Bệnh
5	<i>A. passiflorae</i>	DN8T-4.11	0,045	Bệnh
6	<i>A. tenuissima</i>	DN11T-1.16	-	Bệnh
7	<i>A. passiflorae</i>	DN3T-2.17	0,46	Không Bệnh
8	<i>A. passiflorae</i>	LD4T-3.10	0,02	Bệnh
9	<i>A. passiflorae</i>	LD16L-1.14	+	Bệnh
10	<i>A. tenuissima</i>	LD1T-1.16	-	Bệnh
11	<i>A. tenuissima</i>	LD2T-1.16	-	Bệnh
12	<i>A. passiflorae</i>	DN1C-1.18	0,145	Không bệnh
13	<i>A. passiflorae</i>	DN3C-1.18	0,02	Bệnh
14	<i>Sclerotium roflsii</i>	Mẫu trắng	-	-

Ghi chú: CDNK: Chanh dây giống nhập khẩu và được thu thập mẫu tại Cảng hàng không Tân Sơn Nhất, LD: Lâm Đồng, DN: Đắk Nông, (+) Phát hiện độc tố AOH nồng độ nhỏ hơn LOQ (< 0,01 µg/ml); (-) Không phát hiện độc tố AOH (<LOD).

### 3.6.2. Khảo sát ảnh hưởng của các hợp chất thứ cấp và độc tố alternariol sinh ra từ *Alternaria* spp.

#### 3.6.2.1. Ảnh hưởng của các hợp chất thứ cấp trên ngọn chanh dây Đài Nông 1



Thí nghiệm được thực hiện trên 3 loại dung dịch môi trường là modified Fries No.3, PC (môi trường cà rốt và khoai tây lỏng), PG (môi trường khoai tây và đường glucose) với 3 mức thời gian nuôi cấy nấm là 7 ngày, 14 ngày và 21 ngày; sử dụng 2 môi trường không nuôi cấy nấm và nước cất làm mẫu đối chứng.

#### **a. Đánh giá ảnh hưởng trên dung dịch môi trường modified Fries No.3**

Sau 3 ngày sau cấy ngọn chanh dây trong môi trường Fries No.3 chứa CDNK1.13 trong 7 ngày, số lá rụng xuất hiện sớm và lá rụng nhiều khi lưu thí nghiệm đến 7 ngày, với 9 lá rụng. Các MPL DN1T-4.11, DN9L-1.10, CDNK7.13, LD12T-5.10, LD16L-1.14, LD4T-3.10, DN11T-3.11, DN8T-4.11, DN8L-2.11 không gây hiện tượng rụng lá chanh dây.

Trong dung dịch nuôi cấy nấm 14 ngày, ở 3 ngày sau khi cấy ngọn, MPL CDNK1.13 gây 9 lá rụng, DN11T-3.11 có số lá rụng thấp nhất là 1 lá sau khi cấy ngọn chanh dây Đài Nông 1. Bảy ngày sau khi cấy ngọn, cả 10 MPL *Alternaria* gây rụng lá hoàn toàn.

Dung dịch nuôi cấy nấm 21 ngày: quan sát ở 3 ngày sau cấy ngọn, mẫu CDNK1.13 và mẫu CDNK7.13 có số lá rụng cao nhất (9 lá), mẫu LD12T-5.10 rụng thấp nhất (1 lá). Năm ngày sau khi cấy ngọn, số lá rụng tiếp tục tăng ở 2 mẫu LD16L-1.14 và LD4T-3.10 là 8 lá và mẫu DN11T-3.11 có số lá rụng thấp nhất là 2 lá. Quan sát ở 7 ngày sau khi cấy ngọn, mẫu CDNK1.13, CDNK7.13, LD16L-1.14, LD4T-3.10 có 9 lá rụng; 6 mẫu nấm còn lại bao gồm DN1T-4.11, LD12T-5.10, DN11T-3.11, DN8T-4.11, DN9L-1.10, DN8L-2.11 có số lá rụng cao hơn mẫu đối chứng môi trường và nước cất vô trùng.

Qua đó, có thể ghi nhận các mẫu *Alternaria* đều có khả năng sản sinh ra các hợp chất thứ cấp trong môi trường modified Fries No.3 gây hiện tượng rụng lá chanh dây trong thời gian tiếp xúc. Các mẫu đối chứng môi trường không nuôi cấy nấm và nước cất vô trùng cũng có hiện tượng rụng lá, nhưng với số lá thấp hơn và thời gian rụng chậm hơn (bảng 3.41, Phụ lục 15 – bảng 15.1).

#### **b. Đánh giá ảnh hưởng trên dung dịch môi trường PG**

Sau 3 ngày cắm ngọn chanh dây trong môi trường PG chứa CDNK1.13 trong 7 ngày số lá rụng xuất hiện sớm và lá rụng nhiều khi lưu thí nghiệm đến 7 ngày với 6 lá rụng. Các MPL DN8T-4.11, DN9L-1.10, LD16L-1.14 và CDNK7.13 không gây rụng lá sau 3 ngày lưu thí nghiệm; và sau 7 ngày số lá rụng của mẫu DN1T-4.11 và CDNK7.13 là cao nhất với 9 lá rụng.

Trong dung dịch nuôi cấy nấm 14 ngày, ở 3 ngày sau khi cắm ngọn, MPL LD16L-1.14 gây 9 lá rụng, LD4T-3.10 không gây rụng lá sau khi cắm ngọn chanh dây Đài Nông 1. Bảy ngày sau khi cắm ngọn, cả 10 MPL *Alternaria* gây rụng lá hoàn toàn.

Dung dịch nuôi cấy nấm 21 ngày: quan sát ở 3 ngày sau cắm ngọn, mẫu CDNK1.13, CDNK7.13, LD16L-1.14 và DN1T-4.11 có số lá rụng cao nhất (9 lá), mẫu LD4T-3.10 rụng thấp nhất (1 lá). Năm ngày sau khi cắm ngọn, số lá rụng tiếp tục tăng ở cả 9 MPL là 9 lá và mẫu LD12T-5.10 có số lá rụng thấp nhất là 8 lá. Quan sát ở 7 ngày sau khi cắm ngọn, cả 10 MPL CDNK1.13, CDNK7.13, LD16L-1.14, LD4T-3.10, DN1T-4.11, LD12T-5.10, DN11T-3.11, DN8T-4.11, DN9L-1.10, DN8L-2.11 có 9 lá rụng (bảng 3.41, Phụ lục 15 – bảng 15.2).

### **c. Đánh giá ảnh hưởng trên dung dịch môi trường PC**

Sau 3 ngày cắm ngọn chanh dây trong môi trường PC chứa DN8L-2.11 trong 7 ngày số lá rụng xuất hiện nhiều nhất (2 lá) và lá rụng nhiều khi lưu thí nghiệm đến 7 ngày với 4 lá rụng. Các MPL DN1T-4.11, DN8T-4.11, DN9L-1.10, LD12T-5.10, LD16L-1.14 và CDNK7.13 không gây rụng lá sau 3 ngày lưu thí nghiệm; và sau 7 ngày số lá rụng của cả 10 MPL tăng dần từ 1 – 4 lá rụng.

Trong dung dịch nuôi cấy nấm 14 ngày, ở 3 ngày sau khi cắm ngọn, MPL LD16L-1.14 và DN9L-1.10 có số lá rụng cao nhất (3 lá) so với 8 MPL còn lại, mẫu CDNK7.13 không gây rụng lá sau khi cắm ngọn chanh dây Đài Nông 1. Bảy ngày sau khi cắm ngọn, cả 10 MPL *Alternaria* gây rụng lá từ 2 – 6 lá.

Dung dịch nuôi cấy nấm 21 ngày: quan sát ở 3 ngày sau cắm ngọn, mẫu CDNK1.13 và DN11T-3.11 có số lá rụng cao nhất (6 lá), mẫu LD16L-1.14, LD12T-5.10, DN1T-4.11 rụng thấp nhất (1 lá). Năm ngày sau khi cắm ngọn, số lá rụng tiếp tục tăng ở cả 10 MPL là 3 - 9 lá. Quan sát ở 7 ngày sau khi cắm ngọn, 5 MPL CDNK1.13,

CDNK7.13, LD4T-3.10, DN8T-4.11, DN8L-2.11 có 9 lá rụng và mẫu DN9L-1.10 có số lá rụng thấp nhất (3 lá) (bảng 3.41, Phụ lục 15 – bảng 15.3).

Tóm lại, trên môi trường dinh dưỡng nhân tạo nấm *A. passiflorae* và *A. tenuissima* có khả năng sinh tổng hợp các hợp chất thứ cấp, tham gia vào quá trình hình thành tầng rời nhanh gây hiện tượng rụng lá. Modified Fries No.3 là môi trường phù hợp sử dụng cho thực hiện sàn lọc đánh giá MPL *A. passiflorae* và *A. tenuissima* có khả năng gây bệnh cho chanh dây.

**Bảng 3.41.** Số lá rụng sau khi cắm ngọn chanh dây Đài Nông 1 vào dung dịch môi trường modified Fries No.3 đã nuôi cấy nấm *Alternaria* spp.

STT	Mẫu phân lập	Môi trường Fries No.3			Môi trường PG			Môi trường PC		
		DD	DD	DD	DD	DD	DD	DD	DD	DD
		7	14	21	7	14	21	7	14	21
<i>Alternaria passiflorae</i>										
1	DN9L-1.10	3	9	8	3	9	9	0	3	3
2	DN1T-4.11	2	9	6	9	9	9	0	2	6
3	DN8T-4.11	5	9	6	5	9	9	1	3	9
4	DN11T-3.11	4	9	7	6	9	9	3	6	6
5	DN8L-2.11	1	9	8	3	9	9	4	4	9
6	LD4T-3.10	9	9	9	7	7	9	2	6	9
7	LD12T-5.10	5	9	5	3	9	9	2	2	6
8	LD16L-1.14	9	9	9	2	9	9	3	4	6
<i>Alternaria tenuissima</i>										
1	CDNK1.13	9	9	9	6	9	9	3	3	9
2	CDNK7.13	5	9	9	9	9	9	2	6	9
Môi trường trắng		1	3	3	1	4	3	2	3	3
Nước cất vô trùng		0	3	2	1	4	1	1	0	2

Ghi chú: (DD7): là dung dịch nuôi nấm *Alternaria* sau 7 ngày nuôi ủ; (DD14): là dung dịch nuôi nấm *Alternaria* sau 14 ngày nuôi ủ; (DD21): là dung dịch nuôi nấm *Alternaria* sau 21 ngày nuôi ủ.

**3.6.2.2. Ảnh hưởng của độc tố alternariol trên lá chanh dây Đài Nông 1 với điều kiện chủng bệnh trong phòng thí nghiệm**

Để khảo sát và tìm hiểu về mối quan hệ giữa độc tố AOH với khả năng gây bệnh cũng như mức độ bệnh của các mẫu phân lập *Alternaria* spp. thí nghiệm đã được tiến hành chủng bệnh nhân tạo trên lá cây chanh dây Đài Nông 1.

**Bảng 3.42.** Ảnh hưởng của hợp chất trong dung dịch nuôi nấm *Alternaria* trên lá chanh dây Đài Nông 1 sau 7 ngày chủng

Mẫu phân lập	Biểu hiện triệu chứng bệnh									
	Có gây vết thương					Không gây vết thương				
	SS	AAS	AOH	H <sub>2</sub> O	MT	SS	AAS	AOH	H <sub>2</sub> O	MT
CDNK1.13	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
CDNK7.13	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
CDNK18.14(2)	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
DN11T-1.16	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
LD4T-3.10	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
LD9L-1.10	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
DN8T-4.11	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
LD16L-1.14	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
DN3C-1.18	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-

Ghi chú: SS: Dung dịch bào tử nấm; AAS: Dung dịch môi trường đã nuôi cấy nấm *Alternaria* spp.; AOH: Dung dịch chất chuẩn alternariol; H<sub>2</sub>O: nước cất vô trùng; MT: Dung dịch môi trường nuôi cấy; (+): Có biểu hiện triệu chứng bệnh hoặc có phản ứng với dung dịch chủng bệnh; (-): Không có biểu hiện triệu chứng bệnh hoặc không có phản ứng với dung dịch chủng bệnh.

Kết quả được trình bày ở bảng 3.42 cho thấy chỉ có dung dịch chứa bào tử *Alternaria* có khả năng gây bệnh trên lá chanh dây Đài Nông 1 và các dung dịch còn lại (SS, AAS, AOH, H<sub>2</sub>O, MT) không có biểu hiện triệu chứng bệnh (kể cả dung dịch độc tố AOH). Trên lá chanh dây vết bệnh có dạng hình tròn đồng tâm, ban đầu có màu vàng nhạt sau khi bệnh phát triển dần chuyển sang màu vàng sậm hơn và gây thối lá ở tâm. Bảy ngày sau chủng dung dịch bào tử *A. passiflorae* và *A. tenuissima*, cả 9 MPL *Alternaria* LD16L-1.14, DN8T-4.11, LD4T-3.10, LD9L-1.10, CDNK1.13, CDNK7.13, CDNK18.14, DN11T-1.16 và DN3C-1.18 đều gây bệnh trên lá chanh dây Đài Nông 1.

Ở nghiệm thức chủng bệnh bằng dung dịch AOH không xuất hiện triệu chứng bệnh, một giải thích là AOH không gây hại trực tiếp gây hoại tử lá mà là yếu tố

cộng hưởng góp phần làm cho sự phân hủy lá diễn ra nhanh hơn, kết quả phù hợp với nhận định không có tương quan rõ ràng giữa độc lực và sự sản sinh độc tố của nấm (Sicisiano, 2017).

Đối với nghiệm thức dung dịch nuôi nấm vẫn không phát hiện được triệu chứng bệnh. Điều này tạo ra sự sai khác với thí nghiệm của Slavov và cộng sự (2004) đã tiến hành tách chiết và tinh sạch độc tố AT-toxin từ dung dịch nuôi nấm, dung dịch sau khi được tách chiết tiến hành chủng bệnh trên lá. Kết quả cho thấy tất cả các lá đều xuất hiện vết bệnh, nồng độ càng cao thì vết bệnh càng lớn.

Đã có nhiều nghiên cứu chuyên sâu về độc tố của *Alternaria*, cũng như những nghiên cứu về vai trò của các hợp chất thứ cấp gây ảnh hưởng đến khả năng gây bệnh trên cây trồng, đặc điểm cấu trúc của các gen đóng vai trò trong việc xác định phạm vi tác động lên ký chủ. Các độc tố còn phụ thuộc vào các giai đoạn sinh lý và hình thái của chúng; khả năng gây bệnh của các loài *Alternaria* phụ thuộc vào tính miễn cảm hoặc sức đề kháng của cây ký chủ cũng như nồng độ của các độc tố trên cây ký chủ. Độc tố AOH là một loại độc tố không chuyên tính cây ký chủ, có tác dụng gây độc tế bào tương đối nhẹ, ảnh hưởng đến phổ rộng của các loài thực vật và được cho là một yếu tố liên quan đến khả năng gây bệnh như tăng triệu chứng bệnh lý nhưng không phải là tác nhân chính gây bệnh cho cây (Meena, 2017).

## **THẢO LUẬN CHUNG**

Cây chanh dây được trồng hiện nay nhằm thu quả phục vụ cho ngành chế biến nước trái cây và xuất khẩu, có thể được xem là loại cây trồng giúp tăng nguồn thu cho ngành nông nghiệp ở các vùng trồng chanh dây. Sự mở rộng diện tích trồng đã làm gia tăng sinh vật gây hại, đồng thời gia tăng nguồn bệnh trên chanh dây, tạo nên những áp lực phòng trừ và là thách thức lớn cho ngành sản xuất chanh dây tại Việt Nam.

Việc xác định chính xác tên loài của tác nhân gây bệnh có ý nghĩa rất quan trọng trong công tác bảo vệ và kiểm dịch thực vật; Đặc biệt là quá trình phân tích nguy cơ dịch hại phục vụ công tác đàm phán xin mở cửa thị trường nông sản xuất khẩu. Hiện nay, quả chanh dây đang được Cục Bảo vệ thực vật đàm phán với các nước Hoa Kỳ, Úc, New Zealand, Hàn Quốc và Trung Quốc để xin được cấp phép xuất khẩu quả chanh

dây vào các thị trường này. Đây là một thị trường chiếm thị phần xuất khẩu lớn nhất, đóng góp vào kim ngạch xuất khẩu rau quả của Việt Nam. Do đó, nghiên cứu về bệnh đốm nâu do *Alternaria* gây hại trên chanh dây hết sức cần thiết và rất có ý nghĩa.

Bệnh đốm nâu chanh dây được ghi nhận từ năm 2011 với mức độ phổ biến xuất hiện thường xuyên đến nhiều và được ghi nhận do tác nhân *Alternaria* gây ra, có tần suất xuất hiện 66,67 – 79,69% trên lá và quả chanh dây trồng tại Đắk Nông và Lâm Đồng (Trung tâm Kiểm dịch thực vật sau nhập khẩu II, 2011). Bên cạnh 100% nguồn cây giống là nhập nội đã được ghi nhận có nguy cơ nhập nội nguồn bệnh, chưa có nghiên cứu và minh chứng.

Kết quả thực hiện trong 5 năm với nguồn mẫu thu thập và phân lập từ các vùng trồng chanh dây chính tại Đắk Nông, Lâm Đồng và cây giống nhập nội đã được xem xét, mô tả, phân tích từ mức độ phân tử đến hình thái bào tử với các phương pháp thường quy trong ngành bảo vệ thực vật, sắc ký, giải trình tự và dùng kính hiển vi điện tử để ghi nhận hình thái bào tử ở mức độ phóng đại lớn (270 – 4.500 lần).

Kết quả đã chứng minh rằng có ít nhất 2 tác nhân gây bệnh cho lá và quả chanh dây hiện đang trồng tại Việt Nam. *Alternaria passiflorae* đã được ghi nhận trong các tài liệu công bố ở nước ngoài và được ghi nhận trong gần đây (Nguyễn Văn Tuất và cộng sự, 2019) tại Việt Nam.

*Alternaria passiflorae* với triệu chứng bệnh đốm nâu trên lá, thân và quả chanh dây ở vùng Úc, New Zealand, Kenya, Uganda, Colombia, Malaysia (CABI, 2007) và gây thiệt hại năng suất đáng kể từ 2 – 100% (Amata, 2009). Ở Việt Nam loài *Alternaria sesami* là tác nhân gây bệnh đốm nâu trên chanh dây tại Nghệ An (Võ Thị Dung, 2019).

Theo Nguyễn Văn Tuất và cộng sự (2019) đã điều tra nghiên cứu về thành phần dịch hại và thiên địch trên cây chanh dây ở Việt Nam giai đoạn 2015 – 2016 cho thấy có 11 bệnh gây hại trên chanh dây do 11 loài vi sinh vật gây ra. Bệnh đốm nâu do *Alternaria passiflorae* là bệnh bắt gặp nhiều và gây hại nguy hiểm trên chanh dây được trồng tại các tỉnh thuộc các vùng sinh thái Trung du miền núi Bắc Bộ ( Sơn La), Đồng bằng sông Hồng (Vĩnh Phúc, Hải Phòng), Duyên hải Bắc Trung Bộ (Nghệ An) và Tây Nguyên (Lâm Đồng).

Ít nhất có 11 loài *Alternaria* được ghi nhận trên quả chanh dây, trong đó *A. passiflorae* và *A. alternata* là phổ biến; *A. macrospora*, *A. aliena*, *A. aragakii*, *A. hawaiiensis*, *A. tenuissima*, *A. tropica*, *A. guangxiensis*, *A. bannaensis* và *A. tomato* là ít phổ biến (trích dẫn bởi Manicom và cộng sự, 2003) .

Tổng hợp cho thấy, *A. alternata* chưa ghi nhận trên cây chanh dây tại Việt Nam và *A. passiflorae* là loài phổ biến, bên cạnh *A. tenuissima* mới được ghi nhận trong nghiên cứu này. Đây là loài ký sinh chính trên cây chanh dây làm gốc ghép, nhập nội vào Việt Nam được phân lập lưu giữ tại Trung tâm Kiểm dịch thực vật sau nhập khẩu II.

Kết quả của nghiên cứu cho thấy *A. passiflorae* thể hiện triệu chứng bệnh trên lá và trên quả chanh dây rất khác biệt so với triệu chứng bệnh do loài *A. tenuissima* gây ra. Điều này có ý nghĩa trong việc nhận dạng tác nhân gây bệnh và phát triển phương pháp định danh phục vụ công tác kiểm dịch thực vật.

Những dữ liệu về hình thái học, đặc biệt hình ảnh dưới kính hiển vi điện tử đã xác nhận *A. tenuissima* với đặc điểm khác *A. sesami* được ghi nhận bởi Võ Thị Dung và cộng sự (2019). Phân nhóm phân tử với 3 vùng DNA như ITS, ACT và GPDH cho thấy các mẫu phân lập thuộc loài *A. passiflorae* luôn tạo thành nhóm phân biệt với loài *A. tenuissima* với một số thay đổi tùy thuộc vào vùng DNA phân tích. Dữ liệu phân tử công bố trên genbank là nguồn dữ liệu hữu ích dùng so sánh và xác định sự biến đổi di truyền của tác nhân gây bệnh trong tương lai. Đặc điểm phân tử vùng ITS, ACT và GPDH của hai loài giúp theo dõi sự biến động quần thể theo thời gian, ký chủ và môi trường, cũng như sử dụng cho xác định nguồn gốc tác nhân, đặc biệt cho trường hợp *A. tenuissima*.

Một trong những yếu tố quan trọng trong bảo vệ thực vật là thông tin đầy đủ về cấu trúc di truyền của quần thể sinh vật gây hại và nhiều thông tin hơn sẽ đảm bảo hiệu quả chọn lựa chiến lược kiểm soát. Ví dụ như nghiên cứu xác định độc tố AOH sinh ra từ *A. passiflorae* và *A. tenuissima* nhằm cung cấp thêm cơ sở dữ liệu về tác nhân gây bệnh trong mối liên quan giữa độc tố và tính độc của *Alternaria*.



Đã củng cố kết luận rằng *A. passiflorae* và *A. tenuissima* là hai loài hiện diện trên chanh dây đang trồng tại Việt Nam hiện nay. Dựa trên kết quả có thể đề xuất một quy trình phân biệt mẫu phân lập dựa vào môi trường nuôi cấy, nhiệt độ nuôi ủ, nhiệt độ tác động lên bào tử và nhóm phân tử. Ví dụ sự khác biệt giữa màu sắc khuẩn lạc, sự phân bố, sự sinh trưởng của khuẩn ti trên môi trường nhân tạo của 2 loài *Alternaria*. Sự phân biệt nhanh và chính xác tên loài giúp kiểm soát bệnh có hiệu quả bởi vì loài *A. tenuissima* chỉ tấn công vào phần gốc ghép là chính, dẫn đến việc loại bỏ triệt để chồi gốc ghép là biện pháp hữu hiệu và tốn ít chi phí.

Những kết quả chủng bệnh nhân tạo, chủng trên nhiều loại cây trồng dài ngày và ngắn ngày cho phép xác định nguồn ký chủ/ký chủ phụ của loài *Alternaria* từ đó đề xuất cơ cấu cây trồng hoặc quy hoạch vùng trồng chanh dây khoa học và an toàn hơn giảm chi phí dùng thuốc hoá học. Vùng trồng chanh dây nên có khoảng cách với cây trồng dài ngày như sầu riêng, cao su, nhãn, bưởi, điều hoặc không nên trồng gần với các loại cây ngắn ngày như cải bẹ xanh, cải ngọt, khoai lang, bí đỏ, khổ qua, bầu, cà chua, ớt. Đặc biệt kết quả phát hiện cây cỏ song nha lông là nguồn ký chủ có thể phát tán nguồn bệnh sơ cấp và thứ cấp, cần được làm vệ sinh triệt để trong vùng trồng chanh dây.

Những dữ liệu về đặc điểm của từng loài nấm *A. passiflorae* và *A. tenuissima*, khả năng gây bệnh là cơ sở để đề xuất các biện pháp phòng trừ hiệu quả an toàn sinh học, tuy nhiên đặc điểm biến đổi tính gây bệnh giữa các mẫu phân lập, đặc biệt tính gây bệnh chuyên biệt là trở ngại cho đề xuất biện pháp phòng ngừa mang tính bền vững.

## KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

### I. KẾT LUẬN

1. Xác định được có hai loài *Alternaria* gây bệnh đốm nâu trên chanh dây, *A. passiflorae* và *A. tenuissima*, triệu chứng và đặc điểm gây bệnh có sự khác biệt. *A. passiflorae* gây bệnh với kích thước vết bệnh nhỏ hơn *A. tenuissima* và xuất hiện phổ biến hơn loài *A. tenuissima*. Trong đó, *A. tenuissima* là loài được phân lập trên nguồn cây giống chanh dây nhập nội.
2. Phân tích 3 vùng DNA ITS, ACT và GPDH cho thấy các mẫu phân lập thuộc loài *A. passiflorae* luôn tạo thành nhóm phân biệt với loài *A. tenuissima*. Dữ liệu phân tử của 23 MPL *Alternaria* được công bố trên genbank là nguồn dữ liệu hữu ích dùng so sánh và xác định sự biến đổi di truyền của tác nhân gây bệnh.
3. Nhiệt độ thích hợp cho sự sinh trưởng của *A. passiflorae* và *A. tenuissima* là 25 – 30°C; Bào tử có khả năng sống sót ở ngưỡng nhiệt độ 45 – 48°C đối với loài *A. tenuissima* và ở 45 – 50°C đối với loài *A. passiflorae*.
4. Cỏ song nha lông (*Bidens pilosa* L.) trong vườn chanh dây là nơi lưu tồn nguồn *A. passiflorae*; Các loài cỏ dại và cây trồng như cỏ song nhĩ răng tơ, cỏ cút lợn, cỏ kim thất, cỏ vi cúc, cỏ ruột gà lớn, cỏ tục đoạn rau, cỏ ráng tây sơn, cỏ nghệ, cúc dã quỳ, rau dền com, cỏ túc tưng tơ, cỏ túc hình rìa, cỏ đuôi chồn, cỏ mần trâu, cỏ đuôi voi, cỏ hôi, cỏ kim thất, bí đỏ, bơ, cà chua, cà tím, cà phê vối, cà phê chè, lạc, đinh lăng, đinh lăng lá nhọn, cây trứng cá, hoa lay ơn, khoai lang, ớt, mít không phải là ký chủ của *A. tenuissima* và *A. passiflorae*. Các cây trồng như điều (*Anacardium occidentale*), bưởi (*Citrus grandis*), cao su (*Hevea brasiliensis*), bầu (*Lagenaria siceraria*), bí đỏ (*Cucurbita maxima*), cải ngọt (*Brassica integrifolia*), cải bẹ xanh (*Brassica juncea*) và cà chua (*Solanum lycopersicum*) là ký chủ của *A. tenuissima*; Cây cao su (*Hevea brasiliensis*), nhãn (*Dimocarpus longan*), sầu riêng (*Durio zibethinus*), bầu (*Lagenaria siceraria*), bí đỏ (*Cucurbita maxima*), khổ qua (*Momordica charantia*), cải bẹ xanh (*Brassica juncea*),

khoai lang (*Ipomoea batatas*), ớt (*Capsicum annuum* L.) và cà chua (*Solanum lycopersicum*) là ký chủ của *A. passiflorae*.

## **II. ĐỀ NGHỊ**

1. Kiểm soát nguồn bệnh *Alternaria* spp. du nhập vào Việt Nam qua cây giống chanh dây nhập khẩu thông qua kênh kiểm dịch thực vật.
2. Xây dựng quy trình phát hiện và phân biệt loài *Alternaria* trên cây chanh dây phục vụ công tác kiểm tra phát hiện tác nhân gây bệnh cho các phòng thí nghiệm.
3. Nghiên cứu xây dựng quy trình phòng trừ bệnh đốm nâu.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Agrios N.G., 1997. *Plant pathology*. Academic press, USA, pp. 300-302.
2. Akamine E.K., Aragaki M., Beaumont J.H., Bowers F.A.I., Hamilton R.A., Nishida T., Sherman G.D., Martinez A.P., Yee W.Y.J, Onsdorff T. and Shaw T.N., 1974. Passion Fruit culture in Hawaii. *Circular 345, Hawaii*, pp. 9-35.
3. Amata R.L., Otipa M.J., Waiganjo M., Wabule M., Truranira E.G., Erbaugh M. and Miller S., 2009. Incidence, prevalence and severity of passion fruit fungal diseases in major production regions of Kenya. *Journal of Applied Biosciences* 20: 1146-1152.
4. Anastassiades M. and Lehotay S.J., 2003. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. *Journal of AOAC international* 86: 412-431.
5. AOAC International, 2007. How to meet ISO 17025 requirements for method verification, USA.
6. Baldwin B.G., Sanderson M., Porterz J. and Wojciechowski M.F., 1995. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 82: 247-277.
7. Bashir U., Mushtaq S. and Akhtar N., 2014. First report of *Alternaria metachromatica* from Pakistan causing leaf spot of tomato. *Pakistan Journal of Agricultural Sciences* 51: 305-308.
8. Bruns T.D., White T.J. and Taylor J.W., 1991. Fungal molecular systematics. *Annual Review of Ecology and systematics* 22: 525-564.
9. CAB International, 2007. *Crop Protection Compendium*, CABI International, UK. <URL:<http://www.cabicompendium.org/cpc>>.
10. CAB International, 2012. *Crop Protection Compendium*, CABI International, UK. <URL:<http://www.cabicompendium.org/cpc>>.
11. Cục trồng trọt, 2020. Hiện trạng và định hướng sản xuất chanh leo tại Việt Nam trong *Tài liệu hội nghị thúc đẩy phát triển sản xuất chanh leo bền vững*. Gia Lai, ngày 03 tháng 7 năm 2020. Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn, trang 1-19.

12. Chou H.H. and Wu W.S., 2002. Phylogenetic analysis of internal transcribed spacer regions of the genus *Alternaria*, and the significance of filament-beaked conidia. *Mycological Research* 06: 164-169.
13. Dagno K., Crovadore J., Lefort F., Lahlali R., Lassois L. and Jijakli M.H., 2011. *Alternaria jacinthicola*, a new fungal species causing blight leaf disease on water hyacinth [*Eichhornia crassipes* (Martius) Solms-Laubach]. *Journal of Yeast and Fungal Research* 2: 99-105.
14. Đào Quang Hưng, 2010. *Hướng dẫn kỹ thuật trồng Lạc Tiên (Chanh Dây) theo VietGAP*. Nhà xuất bản Nông nghiệp, 72 trang.
15. Đặng Vũ Thị Thanh, 2008. *Các loài nấm gây bệnh hại cây trồng ở Việt Nam*. Nhà xuất bản Nông nghiệp Hà Nội, 251 trang.
16. Elliott J.A., 1917. Taxonomic characters of the genera *Alternaria* and *Macrosporium*. *American Journal of Botany* 4: 439-476.
17. Elliott M.S., Zettler F.W. and Crane J.H., 1992. Surveys for viruses of *Passiflora* spp. which threaten the Passion fruit industry in South Florida. In *Florida State Horticultural Society. Meeting*.
18. Eshel D., Ben-Arie R., Dinoor A. and Prusky D., 2000. Resistance of gibberellins treated persimmon fruit to *Alternaria alternata* arises from the reduced ability of the fungus to produce endo-1,4- $\beta$ -glucanase. *Phytopathology* 90: 1256-1262.
19. Eshel D., Lichter A., Dinoor A. and Prusky D., 2002. Characterization of *Alternaria alternata* glucanase genes expressed during infection of resistant and susceptible persimmon fruits. *Molecular plant pathology* 3: 347-358.
20. Eshel D., Miyara I., Ailing T., Dinoor A. and Prusky D., 2002. pH regulates endoglucanase expression and virulence of *Alternaria alternata* in persimmon fruit. *Molecular Plant Microbe Interaction* 15: 774-779.
21. European Food Safety Authority (EFSA), 2011. *Scientific opinion on the risks for animal and public health related to the presence of Alternaria toxins in feed and food*. EFSA Journal 9, 97 pages.
22. Francisco Dini-Andreote, Vivian Cristina Pietrobon, Fernando Dini Andreote, Aline Silva Romão, Marcel Bellato Spósito and Welington Luiz Araújo, 2009. Genetic variability of brazilian isolates of *Alternaria alternata* detected by AFLP and rapd techniques. *Brazilian Journal of Microbiology* 40: 670-677.

23. Gannibal P.B., Klemsdal S.S. and Levitin M.M., 2007. AFLP analysis of Russian *Alternaria tenuissima* populations from wheat kernels and other hosts. *European Journal of Plant Pathology* 119: 175-182.
24. Gherbawy Y.A.M.H., 2005. Genetic variation among isolates of *Alternaria* spp. from select Egyptian crops. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 38: 77-89.
25. <http://en.wikipedia.org>
26. Hutton D.G. and Mayers P.E., 1988. Brown spot of Murcott tangor caused by *Alternaria alternata* in queensland. *Australasian Plant Pathology* 17: 69-73.
27. Iram S. and Ahmad I., 2005. Prevalence and disease incidence of foliar blight of wheat in rice wheat cropping system of punjab. *Pakistan Journal of Botany* 37: 973-980.
28. Johnson R.D., Johnson L., Kohmoto K., Otani H., Lane C.R. and Kodama M., 2000. A polymerase chain reaction based method to specifically detect *Alternaria alternata* apple pathotype (*A. mali*), the causal agent of *Alternaria* blotch of apple. *Phytopathology* 90: 973-976.
29. Keissler K.V., 1912. Zur kenntnis der pilz ora krains. *Beihefte Zum Botanischen Zentralblatt* 29: 395-440.
30. Koley S., Mahapatra S.S., 2015. Evaluation of culture media for growth characteristics of *Alternaria solani*, causing early blight of tomato. *Plant Pathology Microbiology* S1:005.
31. Kusaba M. and Tsuge T., 1994. Nuclear ribosomal DNA variation and pathogenic specialization in *Alternaria* fungi known to produce host-specific toxins. *Applied and environmental microbiology* 60: 3055-3062.
32. Kusaba M. and Tsuge T., 1995. Phylogeny of *Alternaria* fungi known to produce host-specific toxins on the basis of variation in internal transcribed spacers of ribosomal DNA. *Current Genetics* 28: 491-498.
33. Kusaba M. and Tsuge T., 1997. Mitochondrial DNA variation in host-specific toxin-producing pathogens in the genus *Alternaria*. *Japanese Journal of Phytopathology* 63: 463-469.
34. Laemmlen F., 2001. *Alternaria* Diseases. *ANR Publication* 8040: 1-5.
35. Landschoot S., Vandecasteele M., De Baets B., Hofte M., Audenaert K. and Haesaert G., 2017. Identification of *A. arborescens*, *A. grandis*, and *A. protenta* as new members of the European *Alternaria* population on potato.

*Fungal Biology* 121: 172-188.

36. Lawrence D.P., Gannibal P.B., Peever T.L. and Pryor B.M., 2013. The sections of *Alternaria*: formalizing species-groups concepts. *Mycologia* 105: 530-546.
37. Lawrence D.P., Park M.S. and Pryor B.M., 2012. *Nimbya* and *Embellisia* revisited, with nov. comb for *Alternaria celosiae* and *A. perpunctulata*. *Mycological Progress* 11: 799-815.
38. Lawrence D.P., Rotondo F. and Gannibal B.P., 2016. Biodiversity and taxonomy of the pleomorphic genus *Alternaria*. *Mycological Progress* 15: 1-22.
39. Lee S.B. and Taylor J.W., 1990. Isolation of DNA from fungal mycelia and single spore. In *PCR protocols, a guide to methods and applications* (Eds. M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky and T. J. White). Academic Press, San Diego, pp. 282-287.
40. Lê Cảnh Tuấn, 2009. *Quy trình sản xuất nước chanh dây lên men*. Luận văn Thạc sĩ Công nghệ thực phẩm, Trường Đại Học Công Nghiệp Thực Phẩm, Tp. Hồ Chí Minh, Việt Nam.
41. Linde C.C., Liles J.A. and Thrall P.H., 2010. Expansion of genetic diversity in randomly mating founder populations of *Alternaria brassicicola* Infecting *Cakile maritima* in Australia. *Applied and environmental microbiology* 76: 1946-1954.
42. Linde C.C., Zala M. and McDonald B.A., 2009. Molecular evidence for recent founder populations and human-mediated migration in the barley scald pathogen *Rhynchosporium secalis*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 51: 454-464.
43. Linde C.C., Zhan J. and McDonald B.A., 2002. Population structure of *Mycosphaerella graminicola*: from lesions to continents. *Phytopathology* 92: 946-955.
44. Liu B., Wasilwa L.A., Morelock T.E., O'Neill N.R. and Correll J.C., 2007. Comparison of *Colletotrichum orbiculare* and several allied *Colletotrichum* spp. for mtDNA RFLPs, Intron RFLP and sequence variation, vegetative compatibility, and host specificity. *Phytopathology* 97: 1305-1314.
45. Lizaso M.T., Martínez A., Asturias J.A., Algorta J., Madariaga B., Labarta N. and Tabar A.I., 2006. Biological standardization and maximum tolerated dose estimation of an *Alternaria alternata* allergenic extract. *Journal of investigational allergology and clinical immunology* 16: 94-103.
46. Mangain A., Roychowdhury R. and Tah J., 2013. *Alternaria* pathogenicity and

its strategic controls. *Research Journal of Biology* 1: 01-09.

47. Manicom B., Ruggiero C., Ploetz R.C. and Goes A.D., 2003. Disease of Passion Fruit. In *Disease of Tropical Fruit Crops* (Eds. R.C. Ploetz). CABI international, UK, pp. 413-441.
48. María de Lourdes Fraire-Cordero, Daniel N.A and Elizabeth C.S., 2010. *Alternaria tenuissima*, *A. alternata* and *Fusarium oxysporum* fungi causes of the rotting of the floret of broccoli. *Revista Mexicana de Fitopatología* 28: 25-33.
49. Masunaka A., Ohtani K., Peever T.L., Timmer L.W., Tsuge T., Yamamoto M., Yamamoto H. and Akimitsu K., 2005. An isolate of *Alternaria alternata* that is pathogenic to both tangerines and rough lemon and produces two host-selective toxins, ACT- and ACR-toxins. *Phytopathology* 95: 241-247.
50. McKenzie E., 2008-2009. *Diagnosis of plant disease specimens - towards recognising 100 genera of fungi*. Nzaid Phytosanitary Capacity building project, Landcare research, New Zealand.
51. McMaugh T., 2008. *Hướng dẫn điều tra dịch hại thực vật ở Á Châu và Khu vực Thái Bình Dương*. ACIAR Chuyên khảo số 119b, 192 trang.
52. Meena M., Swapnil P. and Upadhyay R. S., 2017. Isolation, characterization and toxicological potential of *Alternaria*-mycotoxins (TeA, AOH and AME) in different *Alternaria* species from various regions of India. *Scientific reports* 7: 8777.
53. Meena P.K. and Ratnoo R.S., 2013. Effect of growth and sporulation on different solid media and toxin production by *Alternaria* spp. causing leaf spot on cotton. *International Journal of Plant Protection* 6: 293-295.
54. Meena R.K., Sharma S.S. and Meena S.C., 2013. Studies on host range and seed transmission nature of *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler causing leaf blight of Isabgol. *Journal of Biopesticides* 6: 112-116.
55. Meier F.C., Drechsler C. and Eddy E.D., 1922. Black rot of carrots caused by *Alternaria radicina*. *Phytopathology* 12: 157-166.
56. Milgroom M.G. and Fary W.E., 1997. Contribution of population genetics to plant disease epidemiology and management. *Advances in Botanical Research* 24: 1-30.
57. Mmbaga M.T., Shi A. and Kim M.S., 2011. Identification of *Alternaria alternata* as a causal agent for leaf blight in syringa species. *Plant Pathology* 27: 120-127.



58. Morris P.F., Connolly M.S. and Clair D.A.S., 2000. Genetic diversity of *Alternaria alternata* isolated from tomato in California assessed using RAPDs. *Mycological Research* 104: 286-292.
59. Morton J., 1987. Passion fruit. In *fruits of warm climates* (Eds. F. Julia, J. Morton, F. L. Miami), pp. 320-328.
60. Murthy K.K., Shenoi M.M. and Sreenivas S.S., 2003. Perpetuation and host range of *Alternaria alternata* causing brown spot disease of tobacco. *Indian phytopathology* 56: 138-141.
61. Myresiotis C.K., Testempasis S., Vryzas Z., Karaoglanidis G.S., Mourkidou E. P., 2015. Determination of mycotoxins in pomegranate fruits and juices using a QuEChERS-based method. *Food Chemistry* 182: 81-88.
62. Nasim G., Khan S. and Khokhar I., 2012. Molecular polymorphism and phylogenetic relationship of some *Alternaria alternata* isolates. *Pakistan Journal of Botany* 44: 1267-1270.
63. Nguyen Duc Thanh, Le Thi Bich Thuy and Nguyen Hoang Nghia, 2012. Genetic diversity of *Afzelia xylocarpa* (Kurz) Craib in Vietnam based on analyses of chloroplast markers and random amplified polymorphic DNA (RAPD). *African Journal of Biotechnology* 11: 14529-14535.
64. Nguyễn Thị Hoàng Yên, 2009. *Chanh dây và ứng dụng*. Nhà xuất bản Hà Nội, 94 trang.
65. Nguyễn Văn Bá, Cao Ngọc Diệp và Nguyễn Văn Thành, 2005. *Giáo trình môn nấm học*. Trường Đại học Cần Thơ và Viện nghiên cứu và phát triển công nghệ sinh học. Trang 76-79.
66. Nguyễn Văn Tuất, Nguyễn Văn Liêm, Lê Thu Hiền, Bùi Thị Hải Yên, Hà Minh Thanh, Trần Thanh Tháp, Nguyễn Kim Hoa và Nguyễn Việt Hà, 2019. Điều tra nghiên cứu về thành phần dịch hại và thiên địch trên cây chanh leo ở Việt Nam giai đoạn 2015 – 2016. *Tạp chí Khoa học Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam* 8: 25-32.
67. Ostry V., 2008. *Alternaria* mycotoxins: an overview of chemical characterization, producers, toxicity, analysis and occurrence in foodstuffs. *World Mycotoxin Journal* 1: 175-188.
68. Peever T.L., Olsen L., Ibañez A. and Timmer L.W., 2000. Genetic differentiation and host specificity among populations of *Alternaria* spp. Causing brown spot of grapefruit and tangerine X grapefruit hybrids in Florida. *Phytopathology* 90: 407-414.

69. Prasada R. and Prabhu A.S., 1962. Leaf blight of wheat caused by new species of *Alternaria*. *Indian Phytopathology* 15: 292-293.
70. Pryor B.M. and Gilbertson R.L., 2000. Molecular phylogenetic relationships amongst *Alternaria* species and related fungi based upon analysis of nuclear ITS and mt SSU rDNA sequences. *Mycological Research* 104: 1312-1321.
71. Phan Thị Thu Hiền, 2012. *Nghiên cứu nấm Alternaria spp. gây bệnh đốm nâu trên cây chanh dây (Passiflora edulis)*. Luận văn Thạc sĩ Khoa học Nông nghiệp. Trường Đại Học Nông Lâm Tp. Hồ Chí Minh, Việt Nam.
72. Rheinlander P.A., 2010. *Field guide to common diseases and disorders of Passionfruit in New Zealand*. The New Zealand Institute for Plant & Food Research Limited, 38 pages.
73. Roger S., Dean B., Thomas J., Andrew G. and Riley I., 2005. *Phương pháp quản lý mẫu bệnh thực vật*. Nhà xuất bản Commonwealth, Australia, 81 trang.
74. Shivas R., Beasley D., Thomas J., Geering A. và Riley I., 2005. *Phương pháp quản lý mẫu bệnh thực vật*. Nhà xuất bản Commonwealth, Australia, 81 trang.
75. Siciliano I., Gilardi G., Ortu G., Gisi U., Gullino M.L. and Garibaldi A., 2017. Identification and characterization of *Alternaria* species causing leaf spot on cabbage, cauliflower, wild and cultivated rocket by using molecular and morphological features and mycotoxin production. *European Journal of Plant Pathology* 149: 401-413.
76. Simmons E.G., 2007. *Alternaria: An identification manual*. 1<sup>st</sup> edition, American Society Microbiology, USA, pp. 310-582.
77. Slavov S., Mayama S. and Atanassov A., 2004. Toxin production of *Alternaria alternata* tobacco pathotype. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 18: 90-95.
78. Somma S., Pose G., Pardo A., Mulè G., Pinto V.F., Moretti A. and Logrieco A.F., 2011. AFLP variability, toxin production and pathogenicity of *Alternaria* species from Argentinean tomato fruits and puree. *International Journal of Food Microbiology* 145: 414-419.
79. Suk Jin Koo, Yong Woong Kwon, Dương Văn Chín và Hoàng Anh Cung, 2005. *Cỏ dại phổ biến tại Việt Nam*. Công ty TNHH Một Thành Viên Bảo vệ thực vật Sài Gòn, 488 trang.
80. Templeton G.E., 1972. *Alternaria* toxins related to pathogenesis in plants. *In*

*Microbial toxins, Academic press*, pp. 169-192.

81. Tu J.C., 1985. Biology of *Alternaria alternata*, the causal agent of black pod disease of white bean in southwestern ontario. *Canadian journal of plant science* 65: 913-919.
82. Từ Văn Mặc, 2003. *Phân tích lý hóa phương pháp phổ nghiệm nghiên cứu cấu trúc phân tử*. Nhà xuất bản khoa học và kỹ thuật, 176 trang.
83. Thomma B.P.H.J., 2003. *Alternaria* spp.: from general saprophyte to specific parasite. *Molecular Plant Pathology* 4: 225-236.
84. Travis S., Maschinski J. and Keim P., 1996. An analysis of genetic variation in *Astragalus cremnophylax* var. *cremnophylax*, a critically endangered plant, using AFLP markers. *Molecular Ecology* 5: 735-745.
85. Trần Cao Sơn, 2010. *Thẩm định phương pháp trong phân tích hóa học và vi sinh vật*. Nhà xuất bản Khoa học và kỹ thuật Hà Nội, 103 trang.
86. Trung tâm Kiểm dịch thực vật sau nhập khẩu II, 2011. *Điều tra sâu bệnh trên cây chanh dây (Passiflora edulis) ở Tây Nguyên*. Đề tài nghiên cứu khoa học cấp cơ sở. Cục bảo vệ thực vật, Việt Nam.
87. Vakalounakis D.J., 1990. Host range of *Alternaria alternata* f. sp. *cucurbitae* causing leaf spot of cucumber. *Plant disease* 74: 227-230.
88. Valdir L., Andrés M., Fernando G.C., Ignazio C., Luiz A.M. and Eduardo S.G.M., 2009. Molecular diversity and evolutionary processes of *Alternaria solani* in Brazil inferred using genealogical and coalescent approaches. *Phytopathology* 99: 765-774.
89. Võ Thị Dung, Hà Viết Cường, Hà Minh Thanh và Đỗ Duy Hưng, 2019. Định danh loài *Alternaria sesami* gây bệnh đốm nâu chanh leo tại Nghệ An. *Tạp chí Bảo vệ thực vật* 4: 39-49.
90. Vũ Triệu Mân, 2007. *Giáo trình bệnh cây chuyên khoa*. Nhà xuất bản Nông nghiệp Hà Nội, 252 trang.
91. Waller J.M., Ritchie B.J. and Holderness M., 1998. *Plant clinic handbook*. CABI international, UK, 94 pages.
92. Walton J.D., 2000. Horizontal gene transfer and the evolution of secondary metabolite gene clusters in fungi: a hypothesis. *Fungal Genetics Biology* 30: 167-171.

93. Welsh J. and McClelland M., 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research* 18: 7213-7218.
94. Williams J.G.K., Kubelik A.R., Livak K.J, Rafalski J.A. and Tingey S.V., 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18: 6531-6535.
95. Wiltshire S.P., 1933. The foundation species of *Alternaria* and *Macrosporium*. *Transactions of the British Mycological Society* 18: 135-160.
96. Wiltshire S.P., 1938. The original and modern conceptions of *Stemphylium*. *Transactions of the British Mycological Society* 21: 211-239.
97. Woudenberg J.H.C., Groenewald J.Z., Binder M. and Crous P.W., 2013. *Alternaria* redefined. *Studies in Mycology* 75: 171-212.
98. Woudenberg J.H.C., Groenewald J.Z., Binder M. and Crous P.W., 2014. Large-spored *Alternaria* pathogens in section *Porri* disentangled. *Studies in Mycology* 79: 1-47.
99. Woudenberg J.H.C., van der Merwe N.A., Jurjevic Z., Groenewald J.Z. and Crous P.W., 2015. Diversity and movement of indoor *Alternaria alternata* across the mainland USA. *Fungal Genetics and Biology* 81: 62-72.
100. [www. Cebiovem. Unito. It/graphics/alternaria](http://www.Cebiovem.Unito.It/graphics/alternaria)
101. [www. Groups. Exter. Ac. Uk/devonfungusgroup/IMAGES/Alternaria – tenuisi](http://www.Groups.Exter.Ac.Uk/devonfungusgroup/IMAGES/Alternaria-tenuisi)
102. [www.micotoxinas.com.br/altertox ins.htm](http://www.micotoxinas.com.br/altertoxins.htm)
103. [www.mycobank.org](http://www.mycobank.org)
104. [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)
105. [www.plantbio.berkeley.edu/~buns/picts/results/its-map.GIF](http://www.plantbio.berkeley.edu/~buns/picts/results/its-map.GIF)
106. Zur G., Shimoni E., Hallerman E. and Kashi Y., 2002. Detection of *Alternaria* fungal contamination in cereal grains by a polymerase chain reaction based assay. *Journal of food protection* 65: 1433-1440.

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

1. **Phan Thị Thu Hiền**, Đặng Thị Hạnh, Huỳnh Tiến Đông và Lê Đình Đôn. 2015. Nghiên cứu nấm *Alternaria passiflorae* gây bệnh đốm nâu trên cây chanh dây (*Passiflora edulis*). Tạp chí Bảo vệ thực vật 6(263): 17 – 23.
2. **Phan Thị Thu Hiền**, Võ Thị Bảo Trang, Đàng Nguyên Lưu Vi Vy, Mai Quốc Cường, Lê Đình Đôn. 2019. Xác định phổ ký chủ của *Alternaria passiflorae* gây bệnh đốm nâu trên chanh dây (*Passiflora edulis*) trong điều kiện lây nhiễm nhân tạo. Tạp chí Bảo vệ thực vật 2(283): 18 – 25.
3. Lê Phạm Đoan Trang, **Phan Thị Thu Hiền**, Lê Tiểu Yến và Lê Đình Đôn. 2019. Xác định sự hiện diện độc tố alternariol của *Alternaria* spp. Gây bệnh đốm nâu trên cây chanh dây (*Passiflora edulis*). Hội thảo quốc gia bệnh hại thực vật Việt Nam lần thứ 18.