

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

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ NÔNG NGHIỆP

TP. HCM – Năm 2021

Công trình được hoàn thành tại:

TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM TP. HCM

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

Phản biện 1:

Phản biện 2:

Phản biện 3:

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

Vào hồigiờ ngày tháng năm

Có thể tìm hiểu luận án tại:

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

- Thư viện Quốc gia Hà Nội

MỞ ĐẦU

Tính cấp thiết của 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 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.

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 *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* 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.

Bố cục của luận án

Luận án chính thức gồm có 3 chương, 149 trang. Các phần: Mở đầu (4 trang), tổng quan (23 trang), vật liệu và phương pháp nghiên cứu (23 trang), kết quả và thảo luận (88 trang), kết luận và đề nghị (2 trang); 42 bảng số liệu và 40 hình. Luận án đã tham khảo tổng cộng 106 tài liệu trong đó 13 tài liệu tiếng Việt và 93 tài liệu tiếng Anh.

Chương 1 TỔNG QUAN

1.1. 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 *Alternaria passiflorae* gây hại trên lá, cành và quả. Một số bệnh quan trọng khác do *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae*, *Phytophthora nicotianae*, *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 chanh dây bị bệnh héo cành do nấm *Thanatephorus cucumeris* và *Pythium* spp. gây ra. Một số bệnh do virus, đáng chú ý là virus gây hóa gỗ *Passionfruit woodiness virus* (PWV), virus gây bệnh tiềm ẩn do *Passiflora latent virus* (PLV) và *Passionfruit ringpot virus*. Các bệnh này lây lan bởi rệp (*Aphis gossypii*, *Myzus persicae*) và dao cắt tĩa (CABI, 2020).

Ở Việt Nam, các nghiên cứu đã ghi nhận có loài *A. passiflorae*, *A. sesami* gây bệnh đốm nâu trên chanh dây (Võ Thị Dung, 2019; Nguyễn Văn Tuất và cộng sự, 2019).

1.2. Triệu chứng gây hại của *Alternaria* trên cây chanh dây

Triệu chứng do *Alternaria passiflorae* và *Alternaria alternata* gây bệnh trên cây chanh dây 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 chất lượng 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. Các độc tố sinh ra từ *Alternaria*

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 tố 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 (AOH), alternariol monomethyl ether (AME), acid tenuazonic (TeA) và altertoxins 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).

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

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 (Kusaba và Tsuge, 1994, 1995; Milgroom và Fary, 1997).

Nghiên cứu sự đa dạng di trong quần thể *Alternaria* bằng các chỉ thị phân tử RFLP, AFLP, RAPD, rDNA-ITS, rDNA SSU đã chứng minh có sự đa dạng về di truyền rất lớn giữa các mẫu phân lập *Alternaria* và thậm chí trong cùng một nhóm loài (Keissler, 1912; William và cs, 1990; Welsh và McClelland, 1990; Morris và cs, 2000; Peever và cs, 2000; Pryor và Gilberton, 2000; Chou và Wu, 2002; Iram và Ahmad, 2005; Gherbawy, 2005; Philipp và cs, 2007; Valdir, 2009; Francisco và cs, 2009; Linde và cs, 2010; Maria và cs, 2010; Nasim, 2012; Bashir và cs, 2014; Woudenberg và cs, 2015).

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 (Simmons, 2007; Mmbaga, 2011; Lawrence, 2012; Woudenberg, 2013). 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.

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

Đề tài đã được tiến hành từ tháng 12 năm 2013 đến tháng 5 năm 2020 tại Trung tâm Kiểm dịch thực vật sau nhập khẩu II, 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 thuộc Cục Bảo vệ thực vật.

2.3. Vật liệu nghiên cứu

Cây chanh dây cho quả màu tím khi chín (*Passiflora edulis* f. *edulis* - giống Đài Nông 1) và chanh dây cho quả màu vàng khi chín (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* - giống gốc ghép); Các loại cây rau màu, cây ăn quả, cây công nghiệp; Môi trường nuôi cấy nấm: WA, Modified – CMA, PCA và V – 8 juice; 97 mẫu *Alternaria* được phân lập trên cây chanh dây bị bệnh đốm nâu tại Đắk Nông, Lâm Đồng và trên cây chanh dây giống nhập khẩu từ Đài Loan qua cảng hàng không Tân Sơn Nhất.

2.4. Phương pháp nghiên cứu

2.4.1. Phương pháp thu thập mẫu bệnh và bảo quản mẫu

Thu thập mẫu bệnh từ các vườn trồng chanh dây ở tỉnh Đắk Nông, Lâm Đồng theo phương pháp của McMaugh (2008); Thu thập cây chanh dây giống được nhập khẩu từ Đài Loan tại cảng hàng không Tân Sơn Nhất theo Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia QCVN 01-141: 2013/BNNPTNT.

2.4.2. Phương pháp phân lập tác nhân gây bệnh

Áp dụng theo phương pháp của Shivas và cộng sự (2005).

2.4.3. Phương pháp thu đơn bào tử

Theo phương pháp của McKenzie (2008) và Siciliano (2017).

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

2.5.1. Phương pháp đo kích thước bào tử

Đo kích thước bào tử nấm theo chiều dài và chiều rộng tại vị trí lớn nhất dưới kính hiển vi quang học; đo ngẫu nhiên 30 bào tử, 10 cành bào tử có kích thước lớn nhỏ khác nhau.

2.5.2. Phương pháp nuôi ủ nấm trên lam kính

Nuôi ủ nấm trên lam kính được thực hiện theo phương pháp của Eric (2008).

2.5.3. Mô tả và định danh các loài *Alternaria* dựa vào các đặc điểm hình thái và chụp hình bằng kính hiển vi điện tử quét (SEM)

Sử dụng phương pháp mô tả đặc điểm hình thái và định danh dựa vào khóa phân loại, định danh của Simmons (2007).

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).

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

2.6.1. Phương pháp ly trích DNA tổng số

DNA tổng số được ly trích theo quy trình của Lee và Taylor (1990) có cải tiến.

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

Sử dụng ba cặp primer: ITS4, ITS5; ACT512F, ACT783R và GDF1, GDR1 để khuếch đại vùng rDNA-ITS, actin và glyceraldehyde – 3 – phosphate dehydrogenase. Sản phẩm PCR sẽ được gửi mẫu giải trình tự nucleotide tại công ty MacroGen ở Hàn Quốc.

2.7. Khảo sát một số đặc tính sinh học của MPL *Alternaria* spp.

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

Sáu mươi một mẫu nấm của loài *A. passiflorae* và 36 mẫu *A. tenuissima* được nuôi cấy trên 3 loại môi trường: Modified – CMA, PCA và V – 8 juice. Nghiệm thức thí nghiệm được lặp lại 3 lần với loài *A. passiflorae* và 5 lần với loài

A. tenuissima, mỗi lần lặp lại là một đĩa petri, đo đường kính tản nấm ở 2, 4, 6, 8, 10 ngày sau cấy.

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

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

Mỗi loài *Alternaria* được 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 *A. passiflorae* và 5 lần với loài *A. tenuissima*, mỗi lần lặp lại là một đĩa petri, đo đường kính tản nấm ở 2, 4, 6, 8, 10 ngày sau cấy.

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

Chọn 10 MPL đại diện cho *A. passiflorae* và *A. tenuissima*.

Dùng micropipette hút 10 ml dịch bào tử nồng độ 10^5 bào tử/ml cho vào ống nghiệm và nhúng các ống nghiệm vào bồn gia nhiệt trong 10 phút lần lượt với từng mức nhiệt độ: 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 có chứa môi trường PCA và đặt các đĩa petri ở nhiệt độ phòng ($25 \pm 2^\circ\text{C}$). Nghiệm thức thí nghiệm được lặp lại 5 lần, mỗi lần lặp lại là một đĩa petri. 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.

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

Chọn 10 mẫu đại diện cho *A. passiflorae* và *A. tenuissima* được thử nghiệm với 3 nghiệm thức tương ứng với chế độ ánh sáng: tối liên tục, sáng liên tục và 12 giờ sáng: 12 giờ tối trên môi trường PCA. Nghiệm thức thí nghiệm được lặp lại 5 lần, mỗi lần lặp lại là một đĩa petri, đo đường kính tản nấm ở 2, 4, 6, 8, 10 ngày sau ủ.

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

Mỗi loài *Alternaria* thử nghiệm ở 11 mức pH: 4; 4,5; 5; 5,5; 6; 6,5; 7; 7,5; 8; 8,5; 9 trên môi trường PCA. Nghiệm thức thí nghiệm được lặp lại 5 lần, mỗi lần lặp lại là một đĩa petri, đo đường kính tản nấm ở 2, 4, 6, 8, 10 ngày sau cấy.

2.8. Xác định khả năng gây bệnh của MPL *Alternaria* spp. trên lá, quả

chanh dây và xác định cây trồng nhiễm *Alternaria* trong vườn chanh dây bị bệnh đốm nâu

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

Chủng bệnh trên lá chanh dây: 61 mẫu phân lập (MPL) *A. passiflorae* và 36 MPL *A. tenuissima* được chủng trên lá chanh dây Đài Nông 1 (lá bánh tẻ), nồng độ bào tử là 10^7 bào tử/ml, thực hiện với hai kiểu chủng bệnh là chủng gây vết thương và không gây vết thương, mỗi MPL chủng với 5 lá và mỗi lá gây 6 vết thương tại 6 vị trí khác nhau, mỗi một phần xẻ thùỳ của lá tạo 2 vết thương ở 2 điểm khác nhau.

Chủng bệnh trên quả chanh dây: 29 MPL *A. passiflorae* và 29 MPL *A. tenuissima* được chủng trên quả chanh dây Đài Nông 1 (quả già), mỗi mẫu chủng 3 quả. Sử dụng kim ghim côn trùng số 0 để tạo 3 vết thương trên mặt rộng nhất của quả; sau đó đặt một mảnh nấm 14 ngày tuổi, có kích thước 2 mm^2 lên vết thương. Đối chứng đặt một mảnh agar vô trùng lên trên vị trí gây vết thương.

Quả hoặc lá chanh dây sau khi chủng được đặt trong hộp giữ ẩm, 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. Theo dõi thời gian xuất hiện bệnh và kích thước vết bệnh. Đo kích thước vết bệnh ở 3, 5, 7 ngày sau khi chủng bệnh đối với mẫu lá và ở 5, 7, 14 ngày sau khi chủng bệnh đối với mẫu quả.

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

Mẫu cây cỏ, cây trồng xen trong vườn chanh dây tại tỉnh Đắk Nông và Lâm Đồng có biểu hiện triệu chứng bệnh đốm nâu được thu thập. Xác định thành phần nấm bệnh xuất hiện trên các mẫu thu thập và định danh các loài *Alternaria* phân lập được. Kiểm chứng tác nhân gây bệnh bằng cách thực hiện chủng bệnh nhân tạo trên lá chanh dây Đài Nông 1: Thực hiện tương tự thí nghiệm 2.8.1.

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

Nguồn cây giống: cây mít, cây xoài, cây bưởi, cây nhãn, cây sầu riêng, cây vú sữa, cây điều, cây cao su, cây cà phê vối, cây ca cao, cây lúa,

cây ngô nếp, cây ngô thức ăn gia súc, cây khoai lang, cây khoai tây, cây cà chua, cây ớt, cây khổ qua, cây bầu, cây bí đỏ, cải ngọt, cải bẹ xanh.

2.9.1. Chủng bệnh trong nhà lưới

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. Phun dung dịch bào tử nấm 1×10^7 bào tử/ml trực tiếp lên cây với lượng dung dịch vừa đủ ướt đẫm, đối chứng phun nước cất vô trùng. Giữ cây trong tối 24 giờ bằng cách sử dụng bịch nilon đen bao các chậu cây. Theo dõi thời gian xuất hiện bệnh, tỷ lệ lá bệnh, chỉ số bệnh ở 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 20, 25 ngày sau khi chủng bệnh. Tỷ lệ bệnh ở mỗi nghiệm thức được tính theo công thức: $TLB (\%) = (\text{số lá bị bệnh} / \text{tổng số lá điều tra}) * 100$.

Chỉ số bệnh được tính theo quy ước trong bảng phân cấp mức độ bệnh của Vakalounakis (1990).

2.9.2. Chủng bệnh trong phòng thí nghiệm

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 để giữ lá tươi lâu.

Thí nghiệm được thực hiện với hai kiểu chủng bệnh: có gây vết thương và không gây vết thương. Mỗi MPL *Alternaria* được chủng với 10 lần lặp lại, mỗi lần lặp lại gồm 1 lá.

Phương pháp chủng bệnh: thực hiện tương tự mục 2.8.1. Theo dõi thời gian xuất hiện bệnh và đo kích thước vết bệnh ở 5, 6, 7, 8, 9, 10 ngày sau khi chủng bệnh.

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

Từ thí nghiệm ở mục 2.8.1 chọn ra những MPL *Alternaria* có và không có khả năng gây bệnh để tiến hành ly trích độc tố sinh ra từ nấm *Alternaria*, xác định bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) và phương pháp sắc ký lỏng ghép khối phổ (LC-MS/MS).

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

Sử dụng ngọn chanh dây Đài Nông 1, có 3 lá thật và được rửa sạch bằng cồn 70°, sau đó rửa lại bằng nước cất vô trùng 3 lần.

Nhân nuôi nấm trong bình thủy tinh có chứa 100ml dung dịch môi trường Modified Fries No.3, PG và PC. Sau 7, 14 và 21 ngày nuôi ủ, lọc bỏ khuẩn ty và bào tử nấm trong dung dịch, dùng micropipette hút dung dịch nuôi cấy cho vào ống eppendorf và ly tâm ở 6.600 vòng/phút trong vòng 10 phút. Sau đó, dùng đầu lọc 2 μ m để lọc dung dịch. Lấy 10ml dung dịch đã lọc cho vào ống nhựa vô trùng để tiến hành cấy ngọn cây chanh dây.

Thí nghiệm được bố trí với 3 dung dịch nuôi cấy tương ứng với 3 mức thời gian nuôi nấm 7, 14 và 21 ngày. Mỗi thời gian nuôi cấy và môi trường được chủng với 3 lần lặp lại, mỗi lần lặp lại gồm 1 ngọn chanh dây. Cắm mỗi ngọn vào từng ống chứa 10ml dung dịch nuôi cấy. Theo dõi số lá rụng ở 3, 5, 7 ngày sau khi cấy nấm.

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

Thí nghiệm được chủng trên lá chanh dây Đài Nông 1 với 5 lần lặp lại, mỗi lần lặp lại gồm một lá. Sử dụng kim ghim côn trùng số 0 để gây vết thương trên mỗi lá ở 5 vị trí khác nhau.

Hút 20 μ l dung dịch SS, AAS, AOH, nước cất vô trùng (H₂O), dung dịch môi trường nuôi cấy (MT); tiến hành nhỏ lần lượt các dung dịch này lên 5 vị trí gây vết thương. Đặt các lá vừa chủng ở nhiệt độ 25°C, trong tối. Theo dõi biểu hiện triệu chứng bệnh trên lá của từng nghiệm thức và ghi nhận kết quả ở 7 ngày sau chủng.

2.11. 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, MEGA X version 10.1.7.

Chương 3

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

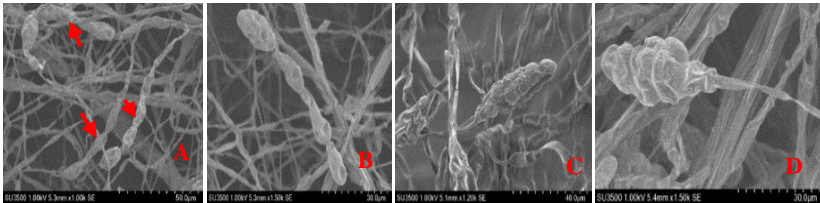
3.1. Xác định tên loài, đặc tính sinh học và đặc điểm hình thái của các mẫu phân lập (MPL) *Alternaria* spp.

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

Kết quả đã ghi nhận có 2 loài *Alternaria passiflorae* và *A. tenuissima* gây bệnh gây bệnh đốm nâu trên lá và quả chanh dây.



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*; (B, D): Triệu chứng bệnh do *A. tenuissima*; (E): Triệu chứng bệnh do *A. tenuissima* gây ra trên lá chanh dây giống nhập khẩu từ Đài Loan.



Hình 3.2. Hình bào tử *A. tenuissima* và *A. passiflorae* 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 *A. tenuissima* (mẫu CDNK7.13); (C, D): Bào tử *A. passiflorae* (mẫu LD16L-01.1).

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

DNA tổng số của 23 MPL được ly trích theo quy trình của Lee và Taylor (1990) có cải tiến sao cho phù hợp với điều kiện 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.

So sánh trình tự tương đồng

Bảng 3.1. 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 3.2. Số vị trí đa hình trên từng vùng gen của 23 MPL *Alternaria*

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

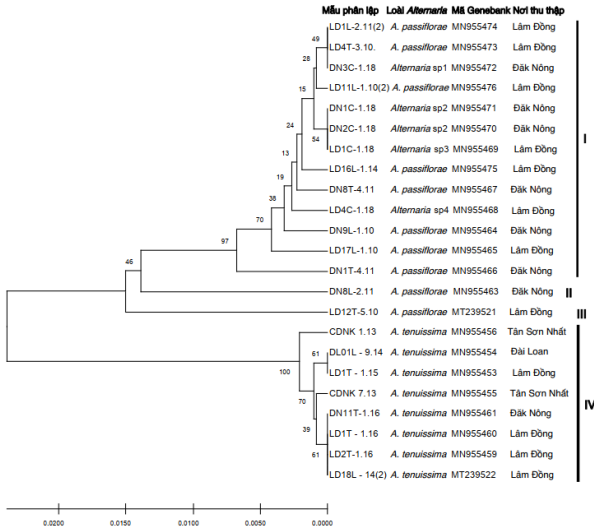
Phân tích đa hình

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 di truyền cũng được quan sát và thể hiện đối với từng vị trí (bảng 3.2).

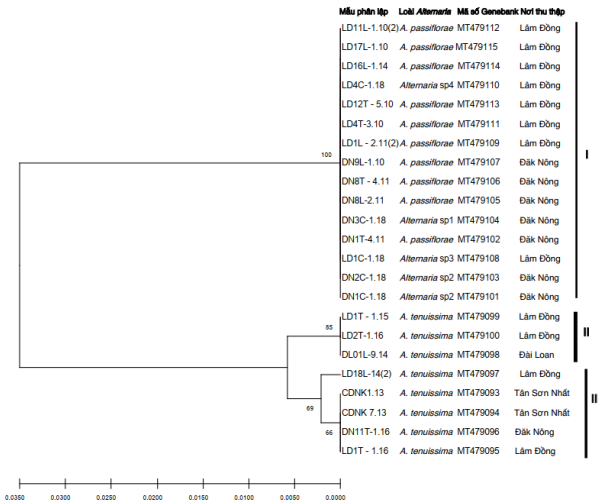
Phân tích tương quan di truyền

Các mẫu phân lập (MPL) từ cây chanh dây nhập khẩu có mối tương quan di truyền gần gũi với các MPL từ Lâm Đồng và Đắk Nông. Các MPL từ vùng Lâm Đồng có mức đa dạng di truyền cao. Các MPL từ vùng Đắk Nông có mức đa dạng di truyền thấp hơn, tần suất xuất hiện của các MPL này trên các nhánh phân loại cũng ít hơn so với các phân lập từ vùng Lâm Đồng. Vùng ACT là vùng gen có mức ổn định di truyền cao nhất, khả năng phân nhánh thấp nhất so với vùng rDNA-ITS có mức biến động di truyền cao nhất, khả năng phân nhánh cao nhất. 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 ngược lại vùng rDNA-ITS có thể được áp dụng trong nghiên cứu sâu hơn về đặc tính đa dạng quần thể (Hình 3.3, hình 3.4, hình 3.5).

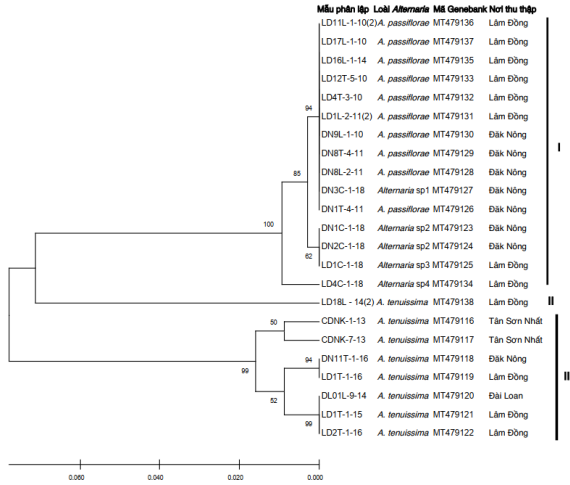
Kết quả nghiên cứu này đã cho thấy các mẫu nấm *Alternaria* có mối liên quan về đa dạng di truyền cao. Trình tự vùng rDNA-ITS, ACT, GPDH của 23 mẫu phân lập *Alternaria* được đưa vào genbank như là nguồn dữ liệu cho nghiên cứu so sánh (bảng 3.3).



Hình 3.3. Cây phát sinh chủng loài 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.



Hình 3.4. Cây phát sinh chủng loài 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.



Hình 3.5. Cây phát sinh chủng loài 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.

Bảng 3.3. Mã số trên ngân hàng gen (GenBank accession number) của 23 MPL *Alternaria* đã được xác định trong nghiên cứu này

Loài <i>Alternaria</i>	Mẫu phân lập	Accession number ^a		
		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

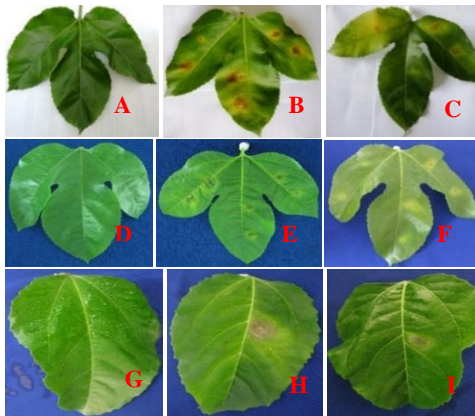
3.2. Đặc tính sinh học của các MPL *Alternaria*

Kết quả đã ghi nhận các loài *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*); Ánh sáng và pH ít ảnh hưởng đến khả năng sinh trưởng của *A. tenuissima* và *A. passiflorae*.

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

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

3.3.1.1. Kết quả chủng bệnh trên lá chanh dây



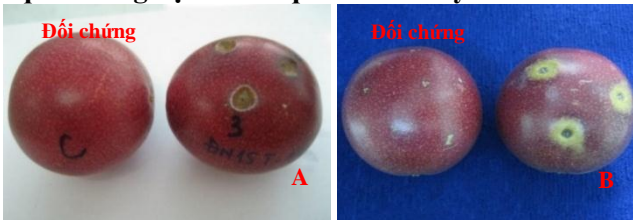
Hình 3.6. Triệu chứng bệnh đốm nâu trên lá chanh dây do *A. passiflorae* và *A. tenuissima* gây ra sau 7 ngày chủng bệnh. (A, D, G): đối chứng không bệnh; (B, E, H): chủng bệnh có gây vết thương; (C, F, I): chủng bệnh không gây vết thương; (B, C): do *A. passiflorae* gây bệnh; (E, F, H, I): do *A. tenuissima* gây bệnh; (A-F): giống Đài Nông 1; (G-I): giống mắt ghép.

Thí nghiệm chủng bệnh có gây vết thương, 98,59% số mẫu *A. passiflorae* gây bệnh trên lá chanh dây sau 7 ngày chủng bệnh và 1,41% mẫu không có khả năng gây bệnh trong điều kiện chủng bệnh nhân tạo. Các MPL

A. passiflorae tạo vết bệnh với kích thước khác nhau. Khi chủng bệnh không gây vết thương thì 69,01% MPL *A. passiflorae* có khả năng gây bệnh với đường kính vết bệnh dao động từ 0,19 – 5,78 mm và 30,99% không có khả năng gây bệnh.

A. tenuissima cũng đã được xác định gây hại trên chanh dây trồng ở Đăk Nông, Lâm Đồng và hiện diện trên cả nguồn cây giống nhập khẩu từ Đài Loan. Các mẫu gây bệnh với kiểu chủng không gây vết thương thì có đường kính vết bệnh nhỏ hơn các mẫu gây bệnh với kiểu chủng có gây vết thương.

3.3.1.2. Kết quả chủng bệnh trên quả chanh dây



Hình 3.7. Triệu chứng bệnh trên quả chanh dây sau 14 ngày chủng bệnh. (A): Chủng *A. passiflorae* (mẫu DN15T-1.10(1)); (B): Chủng *A. tenuissima* (mẫu CDNK7.13).

Trong 29 MPL *A. passiflorae* có 65,52% mẫu khả năng gây bệnh trên quả chanh dây và 34,48% MPL không gây bệnh trên quả nhưng có gây bệnh trên lá. Các MPL *A. passiflorae* gây bệnh với các kích thước vết bệnh khác nhau, từ 2,00 – 8,39 mm sau 14 ngày theo dõi. MPL *A. tenuissima* thì gây bệnh trên quả với 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 sau 14 ngày chủng bệnh.

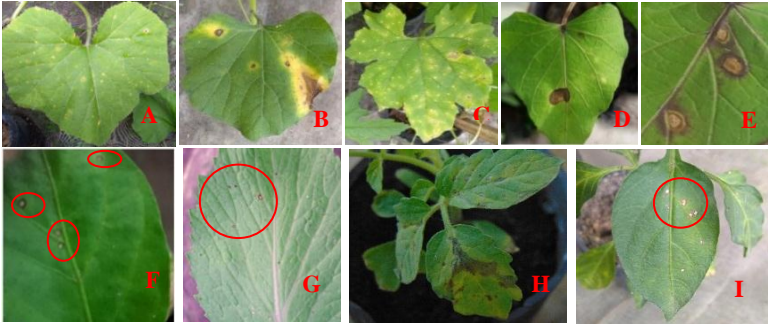
3.4. Xác định cỏ dại, cây trồng nhiễm *Alternaria* trong vườn chanh dây bị bệnh đốm nâu

Có ít nhất 8 loài nấm gây bệnh đốm trên cây cỏ hoặc cây trồng xen, trồng xung quanh vườn chanh dây ở Đăk Nông và Lâm Đồng, bao gồm: *Alternaria* spp., *Curvularia* sp., *Puccinia* sp., *Septoria* sp., *Nigrospora* sp., *Pseudocercospora* sp., *Colletotrichum* sp. *Phoma* sp., *Helminthosporium* sp. và *Puccinia* sp..

Vùng trồng chanh dây ở Lâm Đồng, *Alternaria* spp. hiện diện trên cỏ cắt lợn, cỏ song nha lông; ở Đăk Nông thì xuất hiện trên cỏ cắt lợn, cỏ song nha lông và cỏ mần trầu. Quan sát hình thái, phân tích di truyền trên 3

vùng rDNA-ITS, ACT, GPDH và chủng bệnh nhân tạo bước đầu xác nhận *Alternaria* spp. gây hại trên các loại cỏ trong vườn chanh dây là loài *A. passiflorae*.

3.5. Đánh giá khả năng gây bệnh của MPL *Alternaria* spp. trên một số cây trồng phổ biến



Hình 3.8. Triệu chứng bệnh do *A. passiflorae* gây ra trên các loại cây trồng sau 20 ngày chủng bệnh. (A): Cây bí đỏ; (B): cây bầu; (C): cây khổ qua; (D, E): cây khoai lang; (F, I): cây ớt; (G): cây cải xanh; (H): cây cà chua.

Tính gây bệnh của *A. passiflorae* và *A. tenuissima* được xác định bằng cách chủng bệnh nhân tạo trên lá cắt rời 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, lá bưởi, lá cao su, cây bầu, cây bí đỏ, cây cải ngọt, cây cải bẹ xanh và cây cà chua. Trong khi đó, *A. passiflorae* có khả năng gây bệnh trên lá cao su, lá nhãn, lá sầu riêng, cây bầu, cây bí đỏ, cây khổ qua, cây cải bẹ xanh, cây khoai lang, cây ớt, cây cà chua.

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. Xác định sự hiện diện độc tố alternariol của *Alternaria* spp. bằng phương pháp LC-MS/MS

Kết quả phân tích bảng 3.4 cho thấy 10 trong số 13 mẫu *Alternaria* spp. thí nghiệm cho kết quả dương tính đối với độc tố alternariol. Mẫu DN3T-2.17 cho khả năng sinh độc tố cao nhất (0,46 µg/ml), 3/13 mẫu chỉ mang tính chất định tính, bao gồm mẫu CDNK7.13, mẫu CDNK1.13; LD16L-1.14 với nồng độ mẫu < LOQ ở khoảng nồng độ 0,01 µg/ml, 3/13 mẫu không phát hiện độc tố AOH: mẫu LD1T-1.16; LD2T-1.16 và DN11T-1.16.

Bảng 3.4. Kết quả phân tích hàm lượng AOH trung bình trên mẫu *Alternaria*

STT	Tên loài	Mẫu phân lập	Hàm lượng AOH ($\mu\text{g/ml}$)	Kết quả chủng bệnh trên lá chanh dây ^(a)
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: (+): Phát hiện độc tố AOH nồng độ nhỏ hơn LOQ ($< 0,01 \mu\text{g/ml}$); (-): Không phát hiện độc tố AOH ($< \text{LOD}$), (a): Kết quả chủng bệnh trên lá chanh dây với kiểu chủng không gây vết thương.

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 Đà Nông 1

Trên môi trường PC nấm *A. passiflorae* và *A. tenuissima* có khả năng sinh ra độc tố ít gây độc hơn so với 2 dung dịch môi trường modified Fries No.3 và PG. Trong số 10 mẫu *Alternaria* thí nghiệm, các mẫu đều có khả năng sản sinh độc tố và gây rụng lá chanh dây ở các mức thời gian nuôi cấy khác nhau (bảng 3.5).

Bảng 3.5. Số lá rụng sau khi cắm ngọn chanh dây vào dung dịch các môi trường đã nuôi cấy nấm *Alternaria* spp. sau 7 ngày quan sát

STT	Mẫu phân lập	Môi trường Fries No.3			Môi trường PG			Môi trường PC		
		DD 7	DD 14	DD 21	DD 7	DD 14	DD 21	DD 7	DD 14	DD 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

Kết quả được trình bày ở bảng 3.6 cho thấy chỉ có dung dịch chứa bào tử nấm có khả năng gây bệnh trên lá chanh dây Đài Nông 1 và các dung dịch còn lại (SS, AAS, AOH, H₂O, 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.

Bảng 3.6. 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 ₂ O	MT	SS	AAS	AOH	H ₂ 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; H₂O: nước cất vô

trùng; MT: Dung dịch môi trường; (+): 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.

THẢO LUẬN CHUNG

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 gần đây (Nguyễn Văn Tuất và cộng sự, 2019) tại Việt Nam. 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 bệnh 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

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 *A. passiflorae* luôn tạo thành nhóm phân biệt với *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 tơi, cỏ cứt lợn, cỏ kim thất, cỏ vi cúc, cỏ ruột gà lớn, cỏ tục đoạn rau, cỏ rắng tây sơn, cỏ nghệ, cúc dã quý, rau dền com, cỏ túc tùng tơi, cỏ túc hình rìa, cỏ đuôi chồn, cỏ mần trầu, cỏ đuôi voi, cỏ hôi, cỏ kim thất, bí đỏ, bọ, cà chua, cà tím, cà phê vối, cà phê chè, lạc, đinh lăng, đinh lăng lá nhọn, cây trướng 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*.

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.

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.