

XÁC ĐỊNH TÁC NHÂN GÂY BỆNH THỐI KHÔ CUỐNG TRÁI CAM SOÀN (*Citrus sinensis* L.) TẠI ĐỒNG THÁP

Nguyễn Thị Hoàng Nữ¹, Mai Nguyễn Minh Trí², Đoàn Thị Kiều Tiên³, Văn Quốc Giang³, Huỳnh Kỳ³ và Nguyễn Thị Thu Nga^{3*}

¹Chi cục Trồng trọt và Bảo vệ thực vật Đồng Tháp

²Sinh viên Bảo vệ Thực vật K39, Trường Đại học Cần Thơ

³Khoa Nông nghiệp và Sinh học Ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ

*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Nguyễn Thị Thu Nga (email: ntnnga@ctu.edu.vn)

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 29/09/2017

Ngày nhận bài sửa: 27/10/2017

Ngày duyệt đăng: 19/06/2018

Title:

Identification of the causal agent of peduncle dry rot disease of sweet orange (*Citrus sinensis* L.) in Dong Thap

Từ khóa:

Bệnh thối khô cuống, *Citrus sinensis* L., *Colletotrichum gloeosporioides*, đặc điểm hình thái, kỹ thuật sinh học phân tử, vùng ITS

Keywords:

Citrus sinensis L., *Colletotrichum gloeosporioides*, ITS region, molecular technology, morphology, peduncle dry rot disease

ABSTRACT

Peduncle dry rot disease was a new disease of sweet orange, causing loss of productivity. The disease samples were collected in Dong Thap province for observing symptoms, isolating pathogen and testing disease-causing ability by Koch's postulates of 8 fungal isolates, the results showed that six out of eight isolates expressed ability to cause peduncle dry rot on sweet orange in garden condition and LVg-4 was isolate causing the highest disease incidence. The causal agent for peduncle dry rot disease was identified as *Colletotrichum gloeosporioides* by morphological characteristics and by sequencing the internal transcribed spacer regions of rRNA. The result obtained from this study will contribute for the next study on management of peduncle dry rot disease of sweet orange in Dong Thap province.

TÓM TẮT

Bệnh thối khô cuống trái cam soàn là một đối tượng bệnh mới gây ảnh hưởng nghiêm trọng đến năng suất. Mẫu bệnh được thu thập tại Đồng Tháp để quan sát triệu chứng, phân lập và thực hiện quy trình Koch kiểm tra khả năng gây bệnh của 8 dòng nấm. Kết quả xác định được 6/8 dòng phân lập có khả năng xâm nhiễm gây triệu chứng khô cuống trái cam soàn ở điều kiện ngoài vườn và LVg-4 là dòng cho tỷ lệ bệnh cao nhất. Dòng LVg-4 gây bệnh thối cuống trái trên cam soàn ở Đồng Tháp được nhận diện do nấm thuộc loài *Colletotrichum gloeosporioides* dựa vào đặc tính hình thái và trình tự vùng gen ITS của rRNA. Kết quả này sẽ giúp cho những nghiên cứu tiếp theo về quản lý bệnh khô cuống trái cam soàn ở Đồng Tháp.

Trích dẫn: Nguyễn Thị Hoàng Nữ, Mai Nguyễn Minh Trí, Đoàn Thị Kiều Tiên, Văn Quốc Giang, Huỳnh Kỳ và Nguyễn Thị Thu Nga, 2018. Xác định tác nhân gây bệnh thối khô cuống trái cam soàn (*Citrus sinensis* L.) tại Đồng Tháp. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 54(4B): 100-107.

1 ĐẶT VẤN ĐỀ

Giống cam soàn có ưu điểm trái tròn, vỏ mỏng, ít hạt, thơm và độ ngọt cao nên được trồng nhiều bởi giá trị kinh tế cao và đầu ra ổn định. Diện tích

trồng cam soàn liên tục tăng vài năm gần đây. Theo kết quả điều tra cơ bản của Chi cục Trồng trọt và Bảo vệ thực vật Đồng Tháp về cây cam soàn, tính đến cuối năm 2016, huyện Lai Vung có 2.209 ha trồng cam, trong đó diện tích trồng giống cam soàn

khoảng 985 ha. Năng suất cam soàn bình quân khoảng 3 - 4 tấn/100 gốc/năm, giá cam soàn dao động từ 25.000 - 40.000 đ/kg. Từ đó cho thấy thu nhập kinh tế cây cam soàn mang lại là rất lớn.

Từ năm 2011 đến nay, cây cam soàn bị một hiện tượng mà nhà vườn gọi là “bệnh khô cuống trái”. Bệnh thối khô cuống xuất hiện và gây hại khá nghiêm trọng, làm khô cuống và rụng trái vào giai đoạn gần thu hoạch, ảnh hưởng đáng kể đến năng suất cam (Hội làm vườn huyện Lai Vung, 2016). Theo điều tra tình hình dịch bệnh của Trạm Trồng trọt và Bảo vệ thực vật Lai Vung, huyện có khoảng 230 ha diện tích cam soàn bị thiệt hại với tỷ lệ từ 10 - 30%, cục bộ trên một ít diện tích bệnh gây hại nặng đến 50%. Bên cạnh, bệnh còn xuất hiện và gây hại ở các vùng trồng cam soàn lân cận như huyện Lấp Vò, thành phố Sa Đéc, Châu Thành, ... Cho đến nay chưa có nghiên cứu nào báo cáo về tác nhân gây bệnh khô cuống trái cam soàn cũng như chưa có biện pháp quản lý bệnh hiệu quả ngoài vườn. Do vậy, việc nghiên cứu xác định tác nhân gây bệnh làm cơ sở cho những nghiên cứu phòng trừ bệnh là rất cần thiết.

2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Vật liệu nghiên cứu

Mẫu bệnh khô cuống trái cam soàn được thu thập tại 4 huyện Lai Vung, Lấp Vò, Châu Thành và Thành phố Sa Đéc, tỉnh Đồng Tháp.

Môi trường phân lập WA (Water Agar, Agar 20 gr, nước cất vừa đủ 1.000 ml) và làm thuần trên môi trường PDA (Potato Dextrose Agar, khoai tây 200 gr, đường Dextrose 20 gr, agar 20 gr, nước cất vừa đủ 1.000 ml, pH 6,8).

Hóa chất ly trích DNA, PCR, điện di: CTAB buffer, Chloroform:Isoamyl alcohol (24:1), β -mercaptoethanol, SDS 10%, Proteinase K, enzyme RNAase, Isopropanol, Ethanol 70%, TE buffer, Agarose 1%, Loading dye, TAE buffer 1X, Gelred, nước dùng cho PCR, EZ PCR Mix, Phusa 1X PCR buffer, Primer ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') và ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'). Cặp môi ITS4 và ITS5 sẽ khuếch đại vùng gen ITS 590 bp (White *et al.*, 1990; Jitareerat *et al.*, 2006).

2.2 Phương pháp nghiên cứu

2.2.1 Phân lập mẫu nấm, kiểm chứng khả năng gây bệnh

Áp dụng 4 bước của quy trình Koch (Agrios, 2005; Burgess *et al.*, 2009) gồm: (i) Mô tả triệu chứng bệnh, quan sát sự hiện diện của vi sinh vật; (ii) Phân lập mẫu bệnh và làm thuần; (iii) Lây bệnh

nhân tạo ở điều kiện ngoài vườn: Vệ sinh cuống và trái cam soàn, rửa qua nước và lau lại với cồn 70%, tạo vết thương vào vị trí cuống trái bằng bó kim, nhỏ 100 μ l huyền phù bào tử nấm ở mật số 10⁸ bào tử/ml lên vết thương, bao trái bằng túi nylon, tạo ẩm độ bằng bông có thấm nước cất vô trùng; (iv) Tái phân lập mầm bệnh và so sánh với mầm bệnh ban đầu.

2.2.2 Định danh tác nhân bằng đặc điểm hình thái

Đặc điểm phân loại nấm dựa vào hình thái (Beales, 2012) gồm: (i) Màu sắc, tốc độ phát triển và cấu trúc tản nấm, (ii) Hình dạng và kích thước bào tử phân sinh, (iii) Hình dạng và kích thước đĩa áp, (iv) Hình thành hay không hình thành hạch nấm.

Tham khảo, đối chiếu với các tài liệu phân loại của Barnett và Hunter (1998), Sutton (1980) và CABI (2003) để xác định loài nấm gây bệnh.

2.2.3 Định danh bằng kỹ thuật sinh học phân tử

Tách chiết DNA: Mẫu được nghiền trong CTAB buffer theo phương pháp của Doyle và Doyle (1987) có điều chỉnh. Khoảng 50 mg tản nấm được nuôi cấy trong môi trường PDA lỏng 3 ngày, nghiền trong 1 ml CTAB buffer bằng cối chày sứ, chuyển sang ống effendoft 1,5 ml, loại bỏ protein bằng β -mercaptoethanol, SDS 10%, Proteinase K. Lọc bỏ cặn bằng Chloroform:Isoamyl alcohol (24:1). Ủ mẫu trong Isopropanol ở -20°C trong 30 phút. Cặn DNA được rửa 2 lần bằng Ethanol 70%. Làm khô mẫu và trữ trong 30 μ l TE buffer.

Phản ứng PCR: Thể tích phản ứng 50 μ l gồm 5 μ l EZ PCR mix, 40 μ l Phusa 1x PCR buffer, 0,5 μ l ITS4, 0,5 μ l ITS5, 1 μ l DNA mẫu và 3 μ l nước cất PCR. Phản ứng PCR được thực hiện theo Weir *et al.* (2012) có điều chỉnh trên máy GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems, Malaysia) với chu trình nhiệt: khởi đầu biến tính ở 95°C trong 5 phút, tiếp theo là 35 chu trình 3 bước gồm: 95°C trong 30 giây (biến tính); 58°C trong 30 giây (bắt cặp); 72°C trong 30 giây (kéo dài). Cuối cùng là 10°C trong 20 phút Sản phẩm PCR nhuộm với gelred được điện di trên gel agarose 1% trong TAE buffer, chạy trên thiết bị điện di ATTA Compact PAGE-Twin (ATTA, Nhật), hiệu điện thế 85V trong 35 phút.

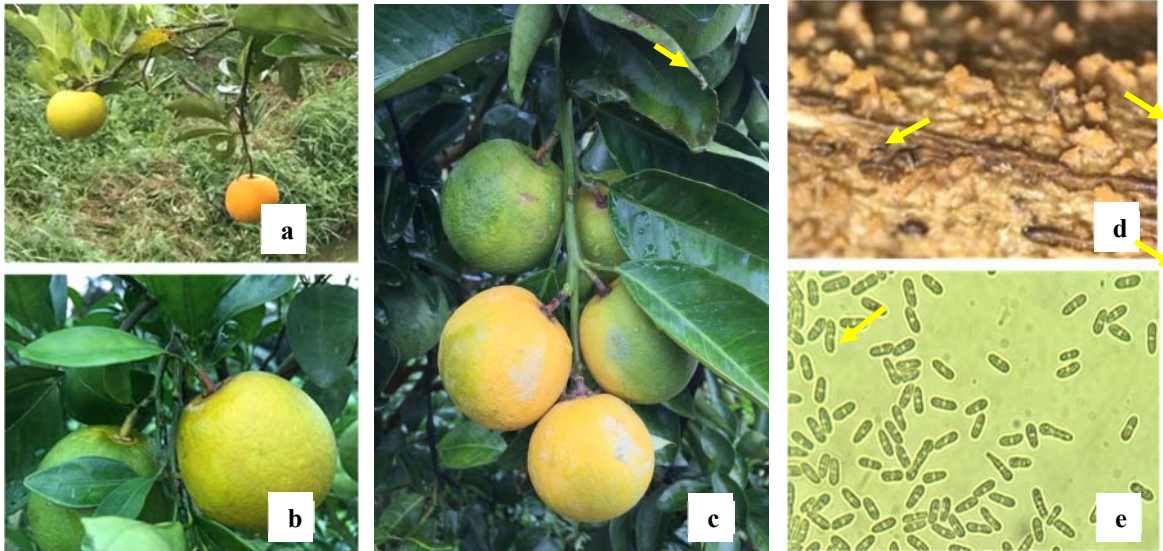
Giải trình tự và phân tích trình tự: Sản phẩm PCR được gửi giải trình tự tại Công ty TNHH MTV Sinh hóa Phù Sa. Trình tự 2 chuỗi Forward và Reverse được Contig để cắt bỏ hoặc bổ sung những đoạn không giống nhau bằng phần mềm

BioEdit, so sánh trình tự đoạn sản phẩm với trình tự trong cơ sở dữ liệu đã được công bố nhờ công cụ tìm kiếm BLAST tại NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Trình tự ITS của LVg-4 được so sánh với trình tự trên ngân hàng gen NCBI, sau đó sử dụng chương trình CLUSTAL-W để nhận diện sự sai khác giữa các nucleotide của vùng đoạn gen ITS giữa các chi và loài. Sơ đồ nhánh so sánh mối quan hệ di truyền giữa các loài được thiết lập dựa trên phân mềm MEGA 6 (Tamura *et al.*, 2013).

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

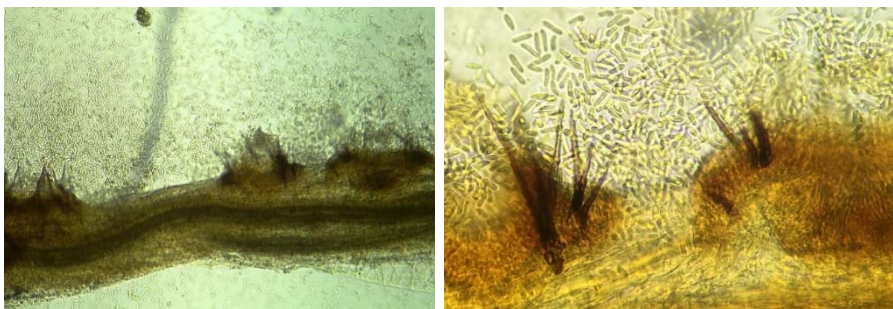
3.1 Phân lập mẫu nấm, kiểm chứng khả năng gây bệnh

Bệnh thối khô cuống trái gây hại chủ yếu ở 2



Hình 1: Triệu chứng và sự hiện diện của vi sinh vật trên vết bệnh

(a) Trái 2 tháng tuổi (b) Trái 7 tháng tuổi (c) Triệu chứng bệnh điển hình (d) Ô bào tử nấm màu cam trên vết bệnh (e) Bào tử vô tính hình thành trên vết bệnh



Hình 2: Gai cứng và bào tử hình thành trên vết bệnh

Kết quả phân lập được 8 dòng nấm từ cuống trái cam soàn nhiễm bệnh, các dòng nấm được làm thuần và lây bệnh nhân tạo tại vườn cam soàn 3 năm tuổi tại xã Long Hậu, Lai Vung, Đồng Tháp.

độ tuổi trái: (i) Trái nhỏ (Hình 1a), 2 tháng sau khi đậu trái và trái lớn (Hình 1b), khoảng 7 tháng sau khi đậu trái. Quan sát triệu chứng bệnh ghi nhận được vết bệnh ban đầu là đoạn cuống dài 0,5 - 0,7 cm ở vị trí gần trái sậm màu, chuyển dần sang màu nâu, khô dần, trái mất nước, vàng từ từ rồi dẫn đến trái khô trên cành hoặc rụng (Hình 1c).

Quan sát vết bệnh dưới kính soi nổi ghi nhận những ô bào tử nấm màu cam (Hình 1d), làm tiêu bản dưới kính hiển vi nhìn thấy những lốm đen hình đĩa, trên một vài vết bệnh có hình thành gai cứng, bào tử đơn bào, hình trụ, có giọt dầu ở giữa, không màu, dính trên cành bào đài (Hình 1e). Bước đầu nhận định bệnh do nấm thuộc chi *Colletotrichum* gây hại.

Kết quả có 6/8 dòng nấm cho biểu hiện triệu chứng bệnh trên cuống trái cam soàn (Hình 3).

Quan sát và tái phân lập từ vết bệnh lây nhiễm nhân tạo nhận thấy có sự tương đồng lớn so với mầm bệnh quan sát được ban đầu (Hình 4).

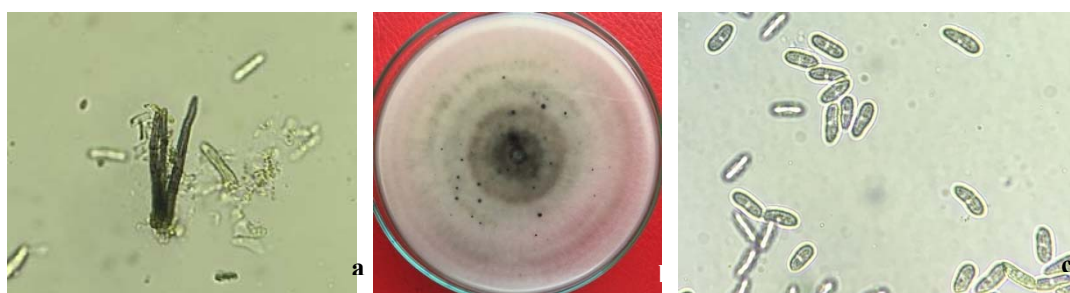


Hình 3: Triệu chứng bệnh khi thực hiện nguyên tắc Koch

Bảng 1: Tỷ lệ trái cam soàn nhiễm bệnh thối khô cuồng khi thực hiện nguyên tắc Koch ở điều kiện ngoài vườn

Ký hiệu mẫu	Vị trí	Tỷ lệ trái nhiễm bệnh		
		3 NSKC	7 NSKC	14 NSKC
LVg-1	xã Vĩnh Thới - Lai Vung	-	3/15	3/15
LVg-2	thị trấn Lai Vung - Lai Vung	-	3/15	3/15
LVo-1	xã Tân Khánh Trung - Lấp Vò	-	3/15	3/15
LVo-2	xã Tân Mỹ - Lấp Vò	-	3/15	3/15
LVg-3	xã Tân Thành - Lai Vung	3/15	4/15	4/15
LVg-4	xã Tân Hòa - Lai Vung	6/15	8/15	9/15
SĐ-1	xã Tân Khánh Đông - Thành phố Sa Đéc	-	-	-
CT-1	xã An Nhơn - Châu Thành	-	-	-

Ghi chú: NSKC = Ngày sau khi chùng



Hình 4: Tái phân lập mầm bệnh từ mẫu lây nhiễm nhân tạo

a. Gai cứng hình thành trên mô vết bệnh lây nhiễm nhân tạo b. Tàn nấm phân lập lại trên PDA 7 ngày c. Bào tử phân sinh

3.2 Định danh tác nhân bằng đặc điểm hình thái

Bước đầu quan sát sự hiện diện của vi sinh vật trên bề mặt vết bệnh tìm thấy những lỗm đen hình đĩa, bào tử đơn bào, không màu, dính trên cạnh bào đài, trên một vài vết bệnh có hình thành gai cứng.

Các đặc điểm này phù hợp với mô tả của Barnett và Hunter (1998) về chi *Colletotrichum*.

Về hình thái khuẩn lạc của các dòng nấm phân lập khi được nuôi cấy trên môi trường PDA trong 7 ngày: các dòng nấm LVg-1, LVg-2, LVo-1 và LVg-4 có khuẩn lạc màu trắng xám, riêng dòng LVo-2 màu trắng và LVg-3 màu trắng vàng, và màu sắc này thay đổi nhiều giữa các lần nuôi cấy,

đa dạng từ trắng xám, xám đen, cam đen. Sợi nấm bông như sợi bông gòn, có vòng tròn đồng tâm. Đến 9 NSNC, hầu hết các dòng nấm khảo sát đều xuất hiện hạch nấm màu đen rải rác trên môi trường nuôi cấy.

Về hình dạng và kích thước bào tử: Có hai hình dạng bào tử là hình trụ với hai đầu cùn (LVg-1, LVg-2, LVo-1, LVg-3) và hình trụ một đầu cùn, một đầu hẹp lại ở đế (LVo-2 và LVg-4). Kích thước bào tử của 6 dòng nấm được khảo sát biến thiên từ 10,0 - 17,5 x 2,5 - 5,0 μm .

Về hình dạng và kích thước đĩa áp: các dòng nấm đều tạo đĩa áp qua phương pháp nuôi cấy trên lame. Số lượng đĩa áp hình thành ở mỗi dòng nấm khác nhau, màu sắc đĩa áp từ nâu nhạt đến nâu đậm, có hình dạng chùy, trứng đến trứng ngược và dạng xẻ thùy. Ở cả 6 dòng nấm, dạng trứng xuất hiện khá ít, trong khi dạng trứng ngược hình thành nhiều. Trong cùng một dòng nấm, kích thước đĩa áp không đều nhau. Đĩa áp của các chủng nấm biến thiên rất lớn từ 7,5 - 12,5 x 5,0 - 10,0 μm . Hình dạng đĩa áp được phân làm 4 nhóm sau:

- **Dạng chùy:** Thường mọc từ đầu sợi nấm; đôi khi được tạo ra bằng cách chen vào khoảng giữa của sợi nấm, hai đầu của đĩa áp dính liền với hai đầu của sợi nấm. Có màu nâu nhạt đến nâu. Hình dạng đĩa áp ít thay đổi. Xuất hiện trên LVg-1, LVo-1, LVo-2, LVg-3 và LVg-4.

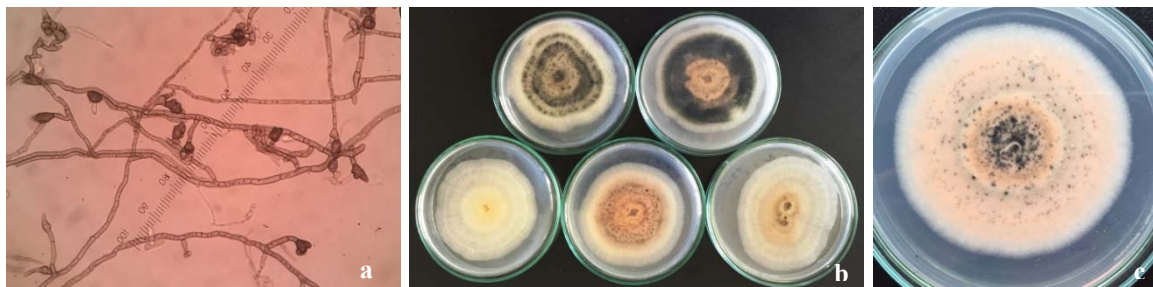
- **Dạng trứng ngược:** Hơi kéo dài, mép rìa có nếp nhăn, đôi khi có những gờ hơi nhỏ cao dọc theo một bên hoặc hai bên thành đĩa áp. Có màu nâu nhạt đến nâu sậm. Đĩa áp mọc từ đầu sợi nấm

hoặc khoảng giữa sợi nấm. Xuất hiện trên LVg-2, LVo-1, LVo-2, LVg-3 và LVg-4.

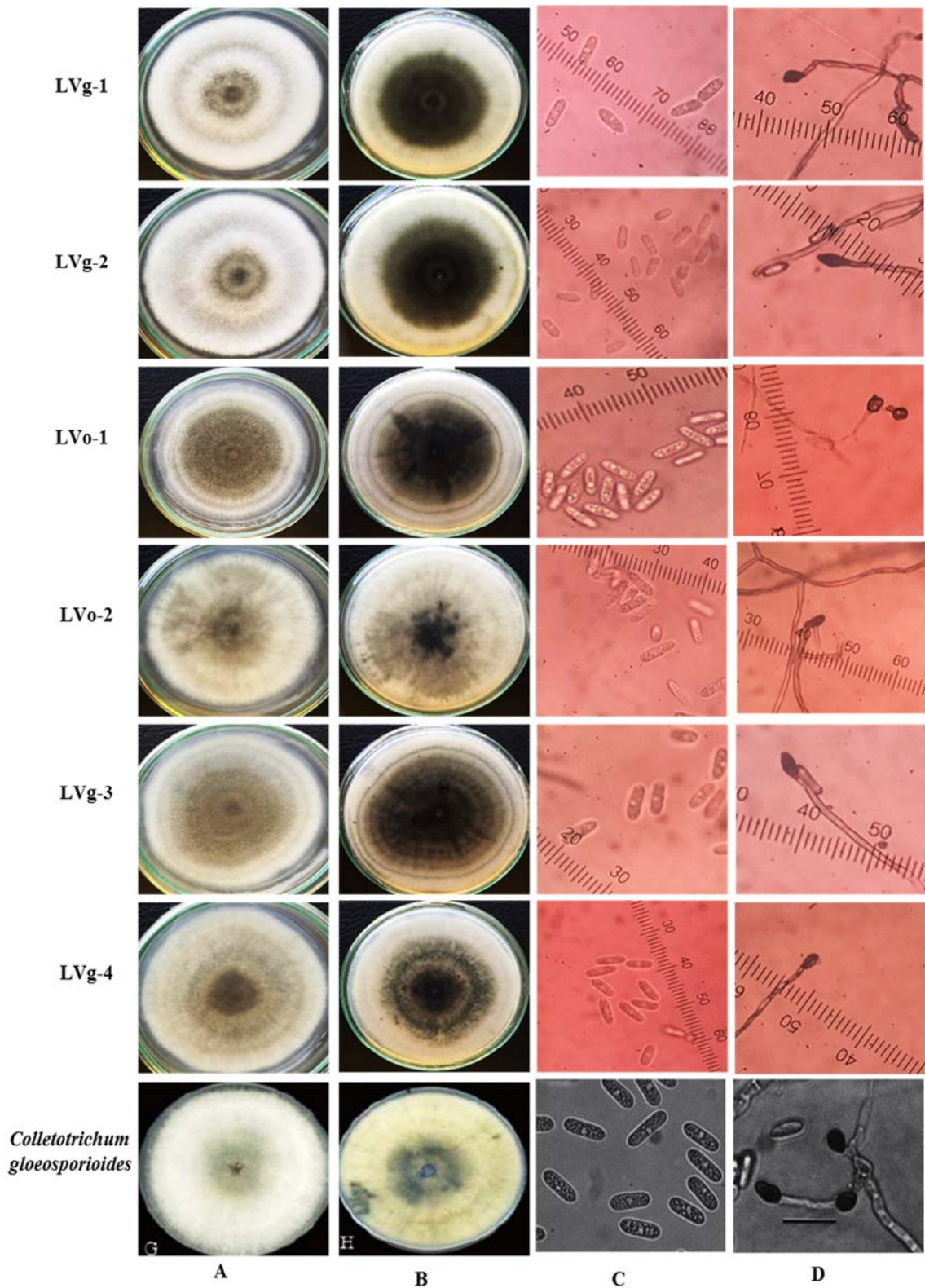
- **Dạng trứng:** Dạng giống quả trứng, ít nếp nhăn, có màu nâu đến nâu đen. Đĩa áp mọc lên từ đầu sợi nấm. Xuất hiện trên LVg-1, LVg-2, LVo-1, LVo-2 và LVg-3.

- **Dạng xẻ thùy:** Thành đĩa áp có những vết xẻ thùy sâu, màu nâu nhạt đến nâu sậm. Chỉ xuất hiện trên LVg-1, LVo-2 và LVg-4.

Từ các đặc điểm hình thái của nấm gây bệnh khô cuống trái cam soàn nêu trên so sánh với loài chuẩn *Colletotrichum gloeosporioides* theo nghiên cứu Lê Hoàng Lê Thủy và Phạm Văn Kim (2008) có nhiều điểm tương đồng. Loài *C. gloeosporioides* có hình thái trong nuôi cấy biến động rất lớn vì vậy không có tiêu chuẩn nào được đưa ra để mô tả. Khuẩn lạc *C. gloeosporioides* có màu sắc đa dạng từ cam, vàng nhạt, hồng cam, màu nâu xám đậm và màu xám. Có khối bào tử màu cam trên bề mặt khuẩn lạc. Cấu trúc sợi nấm như ni, bông vải, len và dạng mạng nhện; có sự phân tầng, tạo vòng đồng tâm và dạng rẽ quạt. Đôi khi có hạch nấm hiện diện. Bào tử dạng thẳng hai đầu cùn; dạng hình trụ với một đầu cùn, một đầu hơi hẹp lại ở đế; dạng hình chùy hai đầu; dạng hình trụ hai đầu cùn và vùng tâm hẹp lại (dạng trái đậu phộng), kích thước từ 9,0 - 24,0 x 3,0 - 4,5 μm . Đĩa áp dạng trứng ngược hoặc trứng ngược không đều, rất phức tạp, kích thước từ 6,0 - 20,0 x 4,0 - 12,0 μm . Đây là nhóm loài phức tạp, gồm ít nhất 22 chủng, tất cả đều tạo bào tử phân sinh hình trụ thẳng, hai đầu cùn, kích thước rất dao động. Đặc điểm hình thái tản nấm cũng như đĩa áp cũng rất đa dạng và thay đổi (Weir *et al.*, 2012).



Hình 5: Sự đa dạng về hình dạng đĩa áp (a), hình thái tản nấm (b), và hạch nấm (c)



Hình 6: Đặc điểm hình thái của nấm gây bệnh khô cuống trái cam sành tại Đồng Tháp

A: Mặt trên tảo nấm B: Mặt dưới tảo nấm C: Bào tử phân sinh D: Hình dạng đĩa áp phổ biến

Nguồn: *Colletotrichum gloeosporioides* A, B: Sakinah et al. (2014), C,D: Kim et al. (2009)

3.3 Định danh bằng sinh học phân tử

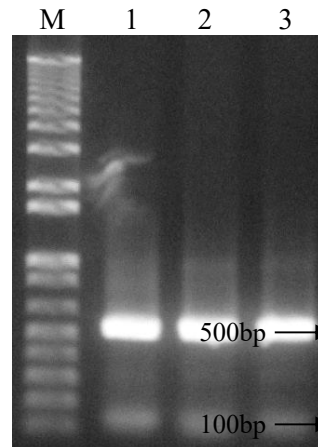
Do phân loại chi nấm *Colletotrichum* chỉ dựa vào đặc điểm hình thái gặp khó khăn vì phụ thuộc nhiều vào điều kiện môi trường nuôi cấy, từ đó vai trò của sinh học phân tử càng trở nên quan trọng và được xem là rất cần thiết khi phân loại nấm thuộc nhóm này (Cannon *et al.*, 2012).

Dựa trên đặc điểm hình thái ở Hình 6, cả 6 dòng nấm phân lập được có nhiều đặc điểm tương đồng nhau và trùng khớp với loài *Colletotrichum gloeosporioides*. Trong đó, dòng LVg-4 là dòng cho tỷ lệ khô cuống trái khi lây nhiễm nhân tạo cao nhất, hình thái tản nấm, bào tử, đĩa áp có nhiều biến động trong quá trình nuôi cấy. Do đó, dòng nấm LVg-4 được chọn để giải trình tự vùng ITS. Mẫu được giải trình tự có kích thước trùng khớp với báo cáo của Jitareerat *et al.* (2006) là 590bp (Hình 7).

Kết quả so sánh trình tự DNA trên NCBI bằng công cụ tìm kiếm BLAST cho thấy mẫu LVg-4 tương đồng loài *Colletotrichum gloeosporioides* có độ tương đồng 100 % (Hình 8).

Như vậy, tác nhân gây bệnh thối khô đầu cuống trên cam Soàn tại tỉnh Đồng Tháp được xác định thuộc loài *Colletotrichum gloeosporioides*. Kết quả nghiên cứu phù hợp với ghi nhận ban đầu về tác nhân gây bệnh rụng trái sớm trên cây có múi (Postbloom fruit drop) (Fagan, 1979; Liyanage *et al.*, 1992) là *C. gloeosporioides*. Tuy nhiên, những nghiên cứu tiếp theo bởi Agostini *et al.* (1992) và Brown *et al.* (1996) chứng minh tác nhân gây bệnh rụng trái sớm là *C. acutatum*. Đồng thời, *C. gloeosporioides* là tác nhân gây bệnh khô đầu cành (Citrus wither tip) trên cây có múi được xác định từ

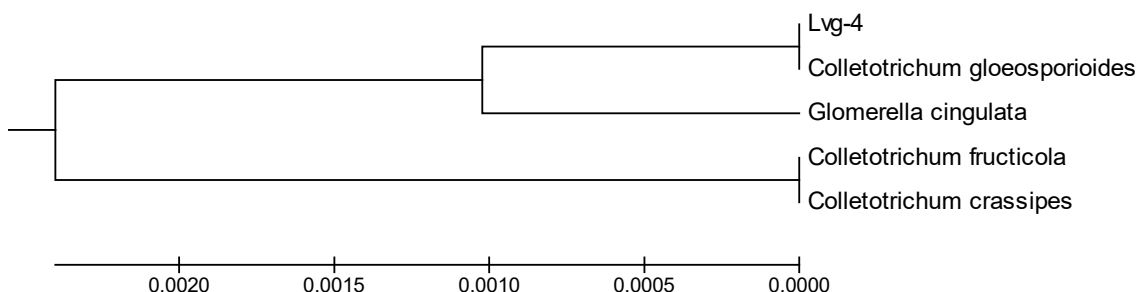
rất sớm bởi Rolfs năm 1904 (Burger, 1921).



Hình 7: Kết quả điện di sản phẩm PCR dòng nấm LVg-4 sử dụng cặp mồi ITS4 và ITS5

Giếng M: 1kb plus DNA Ladder, Giếng 1, 2 và 3: dòng nấm LVg-4 thực hiện lặp lại 3 lần

Tuy nhiên, theo nghiên cứu gần đây của tác giả Huang *et al.* (2013), có đến 312 dòng *Colletotrichum* được phân lập từ lá, chồi và quả cây có múi và cây quýt ở Trung Quốc, có thể ký sinh và hoại sinh gây bệnh trước và sau thu hoạch. Trong đó, có 4 nhóm phức hợp loài được ghi nhận chủ yếu gồm *C. gloeosporioides*, *C. boninense*, *C. acutatum* và *C. truncatum*. Và ở Châu Âu, 174 dòng *Colletotrichum* được phân lập từ lá, quả, cánh hoa và cành cây, được xác định chủ yếu thuộc 3 nhóm phức hợp loài *C. gloeosporioides*, *C. boninense*, *C. acutatum* (Guarnaccia *et al.*, 2017). Từ đó cho thấy, chi *Colletotrichum* gây hại trên nhóm cây có múi rất đa dạng và phức tạp cả về loài gây hại lẫn vị trí và thời điểm gây hại.



Hình 8: Cây quan hệ giữa chủng nấm LVg-4 với các loài *Colletotrichum* spp.

(*Glomerella cingulata* là tên hữu tính của loài *C. gloeosporioides*). Thang bên dưới cây phân nhánh phản ánh mức độ khác biệt về di truyền

4 KẾT LUẬN VÀ ĐỀ XUẤT

Nghiên cứu này đã xác định tác nhân gây bệnh khô cuống trái cam soàn tại Đồng Tháp là *Colletotrichum gloeosporioides* bằng đặc điểm

hình thái và sinh học phân tử. Cần tiếp tục thu mẫu bệnh tại các vùng trồng cam soàn khác để nghiên cứu về tác nhân gây bệnh và nghiên cứu mối quan hệ giữa bệnh khô cuống trái và bệnh khô đầu cành trên cam soàn cũng như các bệnh khác trên cây có

múi, đồng thời nghiên cứu biện pháp phòng trừ để quản lý bệnh hiệu quả.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Agostini, J.P., L.W. Timmer and D.J. Mitchell, 1992. Morphological and pathological characteristics of strains of *Colletotrichum gloeosporioides* from citrus. *Phytopathology*, 82(11): 1377-1382.
- Agrios, G.N., 2005. Plant Pathology. 5th edition. Dana Dreibelbis. Department of plant pathology, University of Florida. 922 pages.
- Barnett, H.L. and B.B. Hunter, 1998. Illustrated genera of imperfect fungi. 4th edition. APS Press. St. Paul, MN. 218 pages.
- Beales, P.A., 2012. Identification of Fungi Based on Morphological Characteristics. In: C. R. Lane, P. A. Beales and K. J. D. Hughes. Fungal Plant Pathogens. CAB International. 112-114.
- Brown, A.E., S. Sreenivasaprasad and L.W. Timmer, 1996. Molecular characterization of slow-growing orange and key lime anthracnose strains of *Colletotrichum* from citrus as *C. acutatum*. *Phytopathology*, 86(5): 523-527.
- Burger, O.F., 1921. Variations in *Colletotrichum gloeosporioides*. *Journal of Agricultural Research*, XX 723-736.
- Burgess, L.W., E.K. Timothy, L. Tesoriero và Phan Thúy Hiền, 2009. Cẩm nang chẩn đoán bệnh cây ở Việt Nam. ACIAR. 210 pages.
- Cannon, P., U. Damm, P. Johnston and B. Weir, 2012. *Colletotrichum* – current status and future directions. *Studies in Mycology*, 73:181-213.
- Doyle, J.J. and J.L. Doyle, 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19:11-15.
- Guarnaccia, V., J. Groenewald, G. Polizzi and P. Crous, 2017. High species diversity in *Colletotrichum* associated with citrus diseases in Europe. *Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 39:32-50.
- Hội làm vườn huyện Lai Vung, 2016. Công văn về việc đề nghị hỗ trợ phòng trừ bệnh trên cây cam soàn ngày 18 tháng 01 năm 2016. 1 trang.
- Huang, F., G. Chen, X. Hou, Y. Fu, L. Cai, K. Hyde and H. Li, 2013. *Colletotrichum* species associated with cultivated citrus in China. *Fungal Diversity*, 61(1): 61-74.
- Jitareerat, P., C. Wongs-Aree and S. Sangchote 2006. Detection of quiescent infection of *Colletotrichum gloeosporioides* on green mango fruit by polymerase chain reaction. *Acta Horticulture*. 712, 927-936
- Kim, W.G., S.K. Hong, H.W. Choi and Y.K. Lee, 2009. Occurrence of anthracnose on highbush blueberry caused by *Colletotrichum* species in Korea. *Mycobiology* 37 (4): 310-312
- Lê Hoàng Lê Thủy và Phạm Văn Kim, 2008. Phân loài nấm *Colletotrichum* gây bệnh thán thư trên xoài và sầu riêng tại Đồng bằng sông Cửu Long và thử hiệu lực của 6 loại thuốc đối với các loài nấm này. *Tạp chí Khoa học trường Đại học Cần Thơ*, 10:31-40.
- Sakinah, M.I., I. Suzianti and Z. Latiffah, 2014. Phenotypic and molecular characterization of *Colletotrichum* species associated with anthracnose of banana (*Musa* spp.) in Malaysia. *Genetics and Molecular Research*, 13 (2): 3627-3637.
- Sutton, B.C., 1980. The Coelomycetes: Fungi Imperfecti with Pycnidia Acervuli and Stomata. Commonwealth Mycological Institute Kew. 696 pages.
- Tamura, K., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski and S. Kumar, 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30: 2725-2729.
- Weir, B., P. Johnston and U. Damm, 2012. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. *Studies in Mycology*, 73:115-180.
- White, T.J., T. Bruns, S. Lee and J. Taylor, 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*, 18(1): 315-322.