

THE INITIAL STUDY ON LEAF SPOT DISEASE OF GOLDEN TEA CAUSED BY *Phomopsis* AT THE TAMDAO NATIONAL PARK

La Viet Hong^{1*}, Duong Thi Thanh Thao², Nguyen Van Thiep³

¹Hanoi Pedagogical University 2

²Hanoi Metropolitan University

³Northern mountainous Agriculture and Forestry Science Institute

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Received: 09/02/2022	The golden tea belongs to <i>Camellia</i> genus tree, it contains many important compounds for the human health. However, the growth and development of golden tea were affected by diseases. In this study, leaf spot disease was recorded in two species of yellow tea at the TamDao National Park. The results showed that the percentage of diseased plants in two species of <i>Camellia tamdaoensis</i> Ninh et Hakoda and <i>Camellia phanii</i> Hakoda & Ninh were 85.0 and 80.0% respectively. The typical symptom of the disease was the appearance of small brown or black spots, they scattered on the leaves, where the leaves were dried (necrotic). At severe disease spots, mycelium was clearly observed. Pathogenic fungi were isolated on PDA medium, mycelium was white and fast-growing. Spores were mound-shaped with glossy, bright, black in color. The ITS sequence of the fungal pathogen causing leaf spot disease was amplified, sequencing and characterized. Its length was 519 bp, its GC content was 52.22%. By analysis of identity value and the genetic relationship, the pathogenic fungus on the leaf of two golden tea species was <i>Phomopsis</i> sp. TD2.
Revised: 14/6/2022	
Published: 14/6/2022	
KEYWORDS	
Leaf spot disease	
Phomopsis	
Golden tea	
TamDao	
National Park	

NGHIÊN CỨU BƯỚC ĐẦU VỀ BỆNH ĐỐM LÁ Ở CÂY TRÀ HOA VÀNG GÂY BỞI *Phomopsis* TẠI VƯỜN QUỐC GIA TAM ĐẢO

La Việt Hồng^{1*}, Dương Thị Thanh Thảo², Nguyễn Văn Thiệp³

¹Trường Đại học Sư phạm Hà Nội 2, ²Trường Đại học Thủ Đô Hà Nội

³Viện Khoa học kỹ thuật Nông lâm nghiệp miền núi phía Bắc

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
Ngày nhận bài: 09/02/2022	Cây trà hoa vàng thuộc chi <i>Camellia</i> chứa nhiều hợp chất quan trọng cho sức khỏe con người. Tuy nhiên, sự sinh trưởng, phát triển của cây trà hoa vàng chịu ảnh hưởng bởi bệnh hại. Trong nghiên cứu này, bệnh đốm lá đã được ghi nhận ở hai loài trà hoa vàng tại vườn quốc gia Tam Đảo. Kết quả cho thấy tỷ lệ cây bị bệnh ở hai loài trà hoa vàng <i>Camellia tamdaoensis</i> Ninh et Hakoda và <i>Camellia phanii</i> Hakoda & Ninh lần lượt là 85,0 và 80,0%. Triệu chứng của bệnh điển hình là xuất hiện các đốm nhỏ màu nâu hoặc đen, thường rải rác trên lá, tại đó lá bị khô (hoại tử), tại các đốm bệnh nặng, quan sát được thể sợi phủ phía trên. Nấm gây bệnh đã được phân lập trên môi trường PDA có hệ sợi nấm màu hơi trắng, sinh trưởng nhanh. Quả bào tử có dạng ụ, mặt bóng, sáng, màu hơi đen. Trình tự ITS của tác nhân nấm gây bệnh đốm lá đã được khuếch đại, giải trình tự và phân tích. Chiều dài của ITS là 519 bp, hàm lượng GC 52,22%. Bằng phân tích độ tương đồng và mối quan hệ di truyền, bước đầu xác định nấm gây bệnh trên lá ở hai loài trà hoa vàng là <i>Phomopsis</i> sp. TD2.
Ngày hoàn thiện: 14/6/2022	
Ngày đăng: 14/6/2022	
TỪ KHÓA	
Bệnh đốm lá	
Phomopsis	
Trà hoa vàng	
Tam Đảo	
Vườn quốc gia	

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.5513>

* Corresponding author. Email: laviethong@hpu2.edu.vn

1. Giới thiệu

Cây trà hoa vàng thuộc chi *Camellia*, họ Chè có dạng cây bụi, kích thước cây nhỏ, phân bố ngoài tự nhiên ở Việt Nam. Vườn quốc gia Tam Đảo có 16 trong 77 loài trà hoa vàng và là vườn quốc gia có nhiều loại trà hoa vàng nhất so với các vườn quốc gia và khu bảo tồn thiên nhiên ở nước ta [1]. Theo các nghiên cứu gần đây, trà hoa vàng có chứa nhiều dược chất quý giúp ngăn chặn biến chứng đột quỵ, kìm hãm sự phát triển của tế bào ung thư, chứa nhiều chất chống ôxi hoá có lợi cho sức khỏe [2], [3].

Hiện nay, bệnh hại trên họ chè nói chung và các loài trà hoa vàng nói riêng khá phức tạp, có nhiều loại bệnh hại ở cả thân, lá và rễ gây tổn thương cho cây, cuối cùng là giảm năng suất, chất lượng chè. Một trong các bệnh phổ biến trên cây trà hoa vàng là bệnh đốm lá. Vết bệnh đầu tiên là những chấm nhỏ màu vàng, vết bệnh lan rộng dần làm chết khô mô lá, có thể xuất hiện nhiều vết bệnh trên một lá ảnh hưởng đến sinh trưởng của cây. Nghiên cứu xác định nguyên nhân gây bệnh giúp hiểu được dịch tễ học của bệnh, từ đó đề xuất các biện pháp kiểm soát hiệu quả.

Cho đến nay, việc xác định tác nhân gây bệnh bằng hình thái học vẫn bị hạn chế do nhiều loài vi sinh vật có các đặc điểm hình thái tương tự nhưng hoạt động sống khác nhau dễ gây nhầm lẫn. Do vậy, các phương pháp dựa vào độc lực và khả năng gây bệnh, hóa sinh, chất chuyển hóa, sinh lý học, đối kháng, phát sinh phân tử của loài và các thí nghiệm lai tỏ ra hiệu quả hơn cả [4]. Các kết quả công bố về bệnh hại trên lá cây chè thường đề cập đến các bệnh do các loài nấm gây hại như bệnh thán thư trên cây chè (*C. sinensis*) gây bởi chi *Collectotrichum*, bệnh chấm xám (*Pestalotia*), bệnh đốm mắt cua (*Cercospora*)... đây là những bệnh gây ra nhiều thiệt hại cho cây chè ở Trung Quốc, Ấn Độ, Sri Lanka và các nước trồng chè trên thế giới [4]-[6]. Chi nấm *Phomopsis* bao gồm nhiều loài gây hại phổ rộng ở hầu hết các hệ sinh thái nông nghiệp trên thế giới, ít được ghi nhận hại trên lá chè hơn các nấm bệnh khác. Ghi nhận lần đầu tiên trên cây chè tại Thổ Nhĩ Kỳ, vết bệnh gây bởi *Phomopsis* có màu vàng kem và dạng chấm nhỏ có quả bào tử [7]. Phân lập mô bệnh thu được các khuẩn lạc của nấm với hệ sợi màu hơi trắng xốp, quả bào tử được tạo ra trên môi trường nuôi cấy [4].

Đến nay, chưa có những công bố về bệnh đốm lá gây bởi nấm *Phomopsis* trên cây trà hoa vàng nói chung và cây trà hoa vàng Tam Đảo nói riêng. Trong phạm vi bài báo này, chúng tôi trình bày một số kết quả bước đầu về nấm *phomopsis* gây bệnh đốm lá trên cây trà hoa vàng Tam Đảo.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Mẫu lá cây Trà hoa vàng Tam Đảo bị bệnh thu thập tại vườn quốc gia Tam Đảo, Vĩnh Phúc vào tháng 5 năm 2021. Môi trường để phân lập nấm gây bệnh là PDA (Potato Dextrose Agar) được cung cấp bởi Viện Nghiên cứu Khoa học và Ứng dụng, Trường Đại học Sư phạm Hà Nội 2.

Các hoá chất sinh học phân tử dùng để tách chiết DNA, primers sử dụng là cặp *ITS1* và *ITS4*, tách chiết DNA và giải trình tự nấm bệnh được thực hiện bởi Phòng Thí nghiệm Trọng điểm Công nghệ gen, Viện Công nghệ Sinh học.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Mô tả đặc điểm của bệnh đốm lá

Mẫu lá có triệu chứng bệnh sau khi thu thập tại thực địa được đựng trong túi polyetylen, chuyển về phòng thí nghiệm. Chụp ảnh toàn bộ lá, vết bệnh (mặt trên và mặt dưới), mô tả triệu chứng bệnh theo Karakaya (2009) [7], Win và cộng sự (2017) [8].

2.2.2. Phân lập nấm gây bệnh

Phân lập nấm bệnh theo quy tắc Koch [4], [8], lá bệnh được rửa sạch bằng nước xà phòng, sau đó khử trùng bề mặt bằng ngâm cồn 70% trong 30 giây, sau đó rửa lại bằng nước cất đã khử

trùng 3-4 lần; ngâm tiếp lá bệnh trong dung dịch Javel 5% trong 1 phút, rửa lại 3-4 lần. Lá được thấm khô trên giấy thấm đã được khử trùng, cắt những mẫu lá 2 x 2 mm ở rìa vết bệnh rồi đặt lên đĩa petri chứa môi trường PDA, ủ trong điều kiện tối, khi thấy tản nấm đã mọc thì cấy truyền nấm sang đĩa petri PDA khác và làm thuần nấm theo phương pháp cấy đơn bào tử. Nấm thuần được lây bệnh trở lại lá trà hoa vàng, khi thấy triệu chứng như ban đầu, tiếp tục phân lập và làm thuần nấm từ vết bệnh. Nấm thuần được sử dụng để phân tích DNA, xác định tên khoa học.

2.2.3. Tách chiết DNA và phân lập trình tự ITS

Thu 0,5 gram hệ sợi nấm trên môi trường PDA vào ống eppendorf 2 ml để tách chiết DNA bằng phương pháp CTAB. DNA được tinh sạch bằng bộ kit AccuPrep® Gel Purification (Bioneer, Hàn Quốc) và điện di kiểm tra chất lượng trên gel agarose 0,8% (w/v) và được dùng làm khuôn cho phản ứng khuếch đại. Trình tự của *ITS1* (forward): 5'- TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'; *ITS4* (reverse): 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' [9], [8].

2.2.4. Giải trình tự, xác định đặc điểm phân tử, độ tương đồng và xây dựng cây phả hệ

Trình tự nucleotide đoạn *ITS* được xác định bằng máy giải trình tự ABI PRISM® 3100 Avant Genetic Analyzer tại phòng Thí nghiệm trọng điểm và Công nghệ gen, Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học & Công nghệ Việt Nam.

Trình tự *ITS* được kiểm tra bằng phần mềm Bioedit, phân tích tương đồng bằng chương trình BLAST. Các trình tự *ITS* được dùng để xây dựng cây phả hệ bằng phương pháp maximum likelihood trên chương trình MEGA (version 5.0), được phân nhóm bằng chỉ số bootstrap với 1000 nhắc lại.

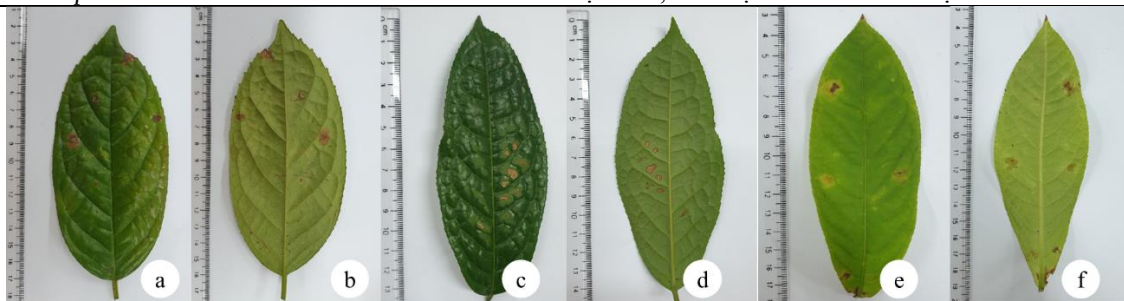
3. Kết quả và bàn luận

3.1. Đặc điểm ở cây trà hoa vàng

Kết quả điều tra đã ghi nhận bệnh đốm lá trên cây trà hoa vàng ở vườn quốc gia Tam Đảo có những đặc điểm chung thể hiện ở Bảng 1 và Hình 1.

Bảng 1. Đặc điểm bệnh đốm lá ở một số loài trà được khảo sát
(Vườn quốc gia Tam Đảo, Vĩnh Phúc, tháng 5/2021)

STT	Loài	Cơ quan bị bệnh	Đặc điểm	Tỷ lệ bệnh (%)
1	<i>Camellia tamdaoensis</i> Ninh et Hakoda	Lá	Vết bệnh hơi tròn hoặc không định hình, màu nâu nhạt hoặc hơi đen. Trên vết bệnh có nấm dạng thể sợi, sau thành thể hạch màu đen.	85,0
2	<i>Camellia phanii</i> Hakoda & Ninh	Lá	Đốm xuất hiện rải rác trên lá, thấy rõ ở cả mặt trên và mặt dưới, đốm bệnh có màu nâu hoặc đen	80,0



Hình 1. Triệu chứng bệnh trên lá trà hoa vàng Tam Đảo

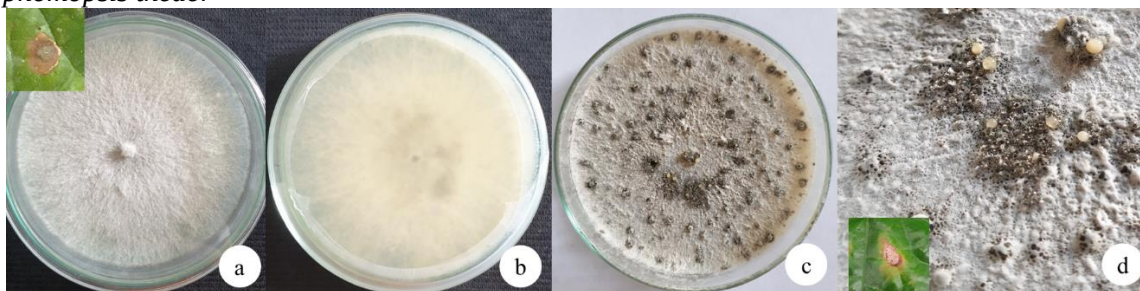
(a, b, c): *Camellia tamdaoensis* Ninh et Hakoda; (d, e, f): *Camellia phanii* Hakoda & Ninh

Bệnh có đặc điểm chung xuất hiện các đốm nhỏ màu nâu hoặc đen, vết bệnh thường gặp rải rác trên lá, tại đó lá bị khô (hoại tử) ở loài *Camellia tamdaoensis* Ninh et Hakoda (Hình 1a, 1b,

1c) và loài *Camellia phanii* Hakoda & Ninh (Hình 1d, 1e, 1f), vết bệnh ban đầu nhỏ, sau lan rộng ra phần lá bệnh, tại các đốm bệnh nặng, quan sát được thể sợi phủ phía trên. Tỷ lệ thường gặp ở hai loài được nghiên cứu cao, lần lượt là 85 và 80%.

3.2. Phân lập nấm gây bệnh đốm lá ở cây trà hoa vàng

Trên môi trường PDA khuẩn lạc của nấm dạng sợi có màu hơi trắng phát triển nhanh (Hình 2a, 2b), các quả bào tử có dạng u mặt bóng, sáng, màu đen được hình thành sau 20 ngày nuôi cấy (Hình 2c, 2d). Kết quả nghiên cứu này tương tự với công bố trước đây của A. Karakaya (2009) [7], Linner và cộng sự (2017) [10] về đặc điểm hình thái hệ sợi của nấm, màu sắc khuẩn lạc của *phomopsis theae*.



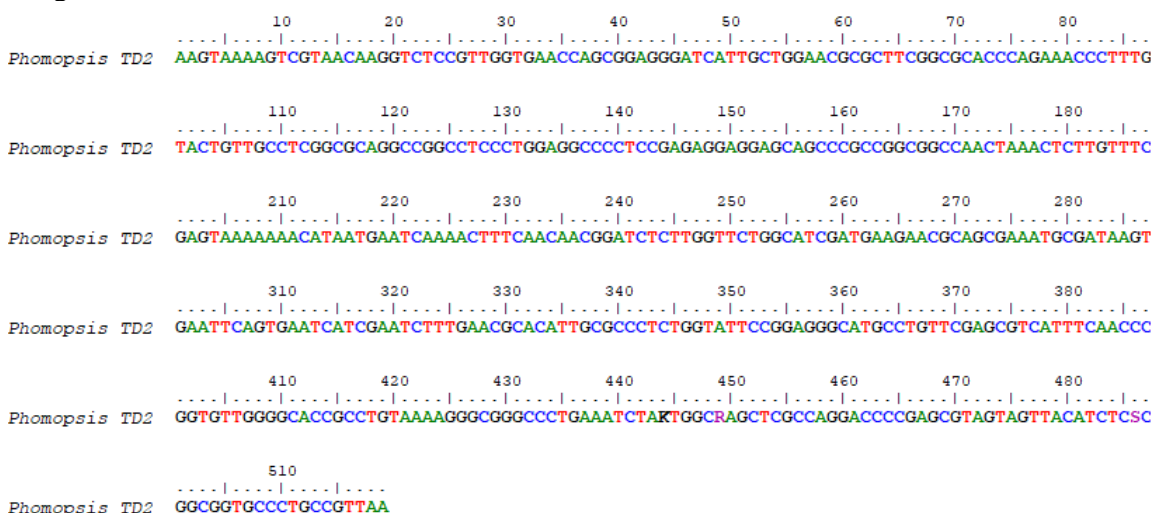
Hình 2. Đặc điểm hệ sợi nấm gây bệnh đốm lá ở cây trà hoa vàng Tam Đảo
(a), (b). Mặt trên và mặt dưới của đĩa petri chứa hệ sợi của *phomopsis* sau 7 ngày nuôi cấy trên môi trường PDA; (c), (d). Các u bào tử của *phomopsis* sau 20 ngày nuôi cấy; Mảnh lá ở hình (a) và (d) tương ứng mẫu lá bệnh dùng để phân lập và mẫu lá được lây nhiễm bởi chủng phân lập sau 7 ngày

3.3. Đặc điểm trình tự ITS, mối quan hệ di truyền *Phomopsis* gây bệnh đốm lá

Đặc điểm trình tự ITS

Các chủng nấm đã được chuyên gia lựa chọn làm chế phẩm dựa vào đặc điểm hình thái, dự án đã tiến hành phân tích DNA xác định tên khoa học của chúng. Sản phẩm DNA của các chủng được giải trình tự. Kết quả trình tự được so sánh với các chủng trên GenBank để xác định tên khoa học của chúng.

Chủng nấm phân lập từ mẫu bệnh đốm lá cây trà hoa vàng đã được xác định danh pháp khoa học dựa trên sự kết hợp của đặc điểm hình thái và phân tích DNA của chúng [4]. Sản phẩm DNA được giải trình tự và so sánh với các chủng trên Genbank, trình tự đoạn DNA chủng phân lập sử dụng môi ITS1 thể hiện ở Hình 3.



Hình 3. Trình tự ITS của tác nhân gây bệnh đốm lá gây bởi *Phomopsis* sp. trên cây trà hoa vàng

Trình tự ITS có chiều dài 519 bp, được đăng ký trên ngân hàng GeneBank với mã số OK560698. Tiếp tục phân tích độ tương đồng, chiều dài đoạn gen và hàm lượng GC, kết quả thể hiện ở Bảng 2.

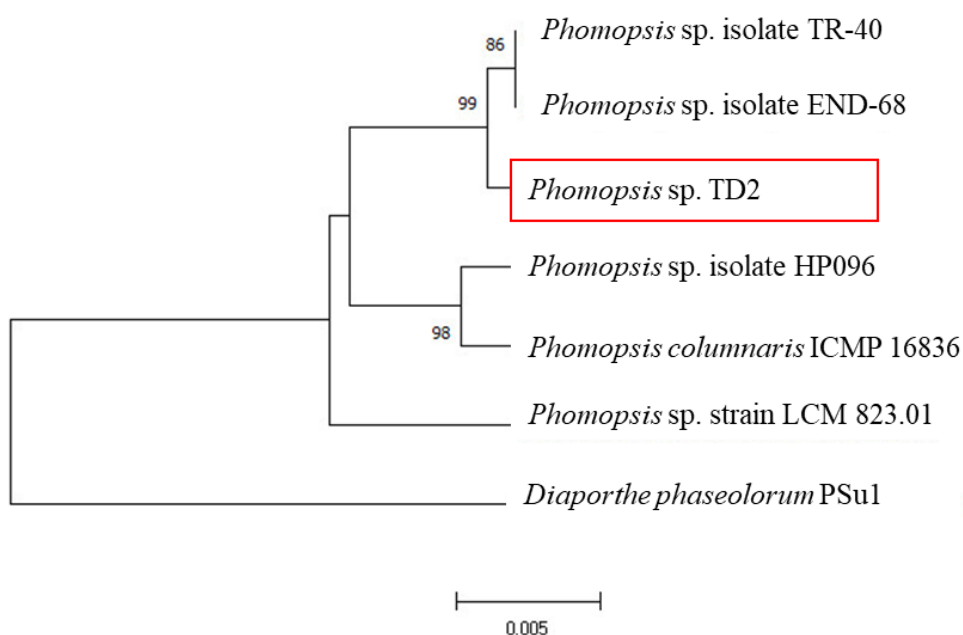
Bảng 2. Đặc điểm của trình tự ITS từ mẫu bệnh đốm lá và một số trình tự ITS của *Phomopsis* khác từ GeneBank

Loài/chủng	Mã số trên GeneBank	E-value	Identity (%)	Chiều dài gen (bp)	Hàm lượng GC (%)
<i>Phomopsis</i> sp. TD2	OK560698	0.0	100,0	519	52,22
<i>Phomopsis columnaris</i> ICMP 16836	KC145883.1	0.0	96,35	598	51,34
<i>Phomopsis</i> sp isolate HP096	KT323173.2	0.0	96,74	534	52,25
<i>Phomopsis</i> sp. isolate END-68	MK733256.1	0.0	98,65	556	53,06
<i>Phomopsis</i> sp. isolate TR-40	KX385026.1	0.0	98,63	580	52,41
<i>Phomopsis</i> sp. strain LCM 823.01	MF495388.1	0.0	95,98	588	52,55

Phân tích cho thấy ITS của mẫu nghiên cứu có độ tương đồng cao, dao động từ 95,98% (so với *Phomopsis* sp. strain LCM 823.01) đến 98,65% (*Phomopsis* sp. isolate TR-40), chiều dài trình tự ITS thấp nhất ở chủng *Phomopsis* sp. TD2 (519 bp), cao nhất ở *Phomopsis columnaris* ICMP 16836 (598 bp). Hàm lượng GC của ITS ở các loài/chủng trong chi *Phomopsis* khá phong phú, dao động từ 51,34% ở *Phomopsis columnaris* ICMP 16836 đến 53,06% ở *Phomopsis* sp. isolate END-68. Hàm lượng GC của ITS trong nghiên cứu này khá cao (52,22%). Nghiên cứu trước đây chỉ ra đoạn ITS giàu hàm lượng GC có thể tạo thành cấu trúc thứ cấp, đảm bảo cho sự ổn định với nhiệt độ ở mức DNA, RNA và thích nghi với môi trường tự nhiên [11]. Các kết quả này củng cố thêm cho giả thiết tác nhân gây bệnh đốm lá thuộc chi *Phomopsis*.

Mối quan hệ di truyền của một số loài/chủng *phomopsis* dựa trên trình tự ITS

ITS là chỉ thị phân tử có giá trị để phân tích cây phả hệ của loài [12]. Để tìm hiểu về mối quan hệ di truyền giữa các loài/chủng thuộc chi *Phomopsis*, các trình tự ITS tiếp tục được sử dụng để xây dựng cây phả hệ, kết quả thể hiện ở Hình 4.



Hình 4. Cây phả hệ giữa các loài thuộc chi *phomopsis*. Giá trị trên hình thể hiện độ tương đồng

Dựa trên phân tích mối quan hệ di truyền trình tự ITS cho thấy mẫu nghiên cứu và những trình tự thu thập từ GeneBank được chia thành 3 nhóm riêng biệt trên cây phả hệ. Nhóm I gồm *Phomopsis* sp. isolate TR-40, *Phomopsis* sp. isolate END-68 và *Phomopsis* sp. TD2. Nhóm II gồm *Phomopsis* sp. isolate HP096 và *Phomopsis columnaris* ICMP 16836, nhóm III gồm duy nhất *Phomopsis* sp. strain LCM 823.01. Căn cứ cây phả hệ thấy chủng nghiên cứu trùng nhánh với các chủng *Phomopsis* sp. TR-40 và *Phomopsis* sp. END-68 với mức độ tương đồng cao lần lượt là 98,63% và 98,65% (Bảng 2), bước đầu nhận định, chủng nấm bệnh nghiên cứu là *Phomopsis* sp., đặt tên là *Phomopsis* sp. TD2.

4. Kết luận

Bệnh đốm lá xuất hiện khá phổ biến ở hai loài trà hoa vàng *Camellia tamdaoensis* Ninh et Hakoda và *Camellia phanii* Hakoda & Ninh tại vườn quốc gia Tam Đảo, tỷ lệ bệnh ở hai loài lần lượt 85,0% và 80,0%. Bệnh có triệu chứng điển hình là xuất hiện các đốm nhỏ màu vàng, màu nâu hoặc đen, xuất hiện rải rác trên lá ở cả mặt trên và mặt dưới lá, vết bệnh dạng tròn hoặc không định hình, ban đầu vết nhỏ, sau lan rộng làm chết mô lá. Trên vết bệnh có những hạt nhỏ màu đen, đó là các quả bào tử nấm bệnh. Nấm bệnh phát triển mạnh trên môi trường PDA, tản nấm màu hơi trắng, quả bào tử dạng u với mặt sáng bóng, màu đen. Trình tự ITS của nấm gây bệnh được đăng ký trên GenBank mã số OK560698, có độ tương đồng cao với các trình tự ITS của *Phomopsis* đã công bố, từ đó xác định loài nấm gây bệnh đốm lá trên cây trà hoa vàng ở vườn quốc gia Tam Đảo là *Phomopsis* sp. TD2.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] N. Tran, "Diversity of wild *Camellia* species of Tam Dao National Park," *Journal of Science, Natural Science and Technology*, vol. 23, pp. 152-154, 2007.
- [2] W. Koch, J. Zagórska, Z. Marzec, and W. Kukula-Koch, "Applications of Tea (*Camellia sinensis*) and its Active Constituents in Cosmetics," *Molecules (Basel, Switzerland)*, vol. 24, p. 4277, 2019.
- [3] M. I. Prasanth, B. S. Sivamaruthi, C. Chaiyasut, and T. Tencomnao, "A Review of the Role of Green Tea (*Camellia sinensis*) in Antiphotaging, Stress Resistance, Neuroprotection, and Autophagy," *Nutrients*, vol. 11, p. 474, 2019.
- [4] D. Udayanga, X. Liu, E. McKenzie, E. Chukeatirote, A. Bahkali, and K. Hyde, "The genus *Phomopsis*: Biology, applications, species concepts and names of common phytopathogens," *Fungal diversity*, vol. 50, pp. 189-225, 2011.
- [5] F. Liu, B. Weir, U. Damm, P. Crous, Y. Wang, B. Liu *et al.*, "Unravelling *Colletotrichum* species associated with *Camellia*: Employing ApMat and GS loci to resolve species in the *C. gloeosporioides* complex," *Persoonia*, vol. 35, pp. 63-86, 2016.
- [6] H. Lehmann-Danzinger, "Diseases and Pests of Tea: Overview and Possibilities of Integrated Pest and Disease Management," *Journal of Agriculture and Rural Development in the Tropics and Subtropics*, vol. 101, pp. 13-38, 2000.
- [7] A. Karakaya, "Phomopsis theae on *Camellia sinensis* in Turkey," *Journal of Plant Pathology*, vol. 91, no. 4, p. S105, 2009.
- [8] P. Win, "Diversity of tea endophytic fungi: Cultivar- and tissue preferences," *Applied Ecology and Environmental Research*, vol. 16, pp. 677-695, 2018.
- [9] T. J. White, T. D. Bruns, S. B. Lee, and J. W. Taylor, "Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics," In *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. and White, T.J., Eds. New York: Academic Press, vol. 31, pp. 315-322, 1990.
- [10] C. Linner, J. Birgen, and J. Maingi, "In vitro response of *Phomopsis* theae to the products of *Azadirachta indica* and extracts of *Warburgia ugandensis*," *Bioteknologi*, vol. 14, pp. 37-46, 2017.
- [11] B. G. Baldwin, M. J. Sanderson, J. M. Porter, M. F. Wojciechowski, C. S. Campbell, and M. J. Donoghue, "The ITS Region of Nuclear Ribosomal DNA: A Valuable Source of Evidence on Angiosperm Phylogeny," *Annals of the Missouri Botanical Garden*, vol. 82, pp. 247-277, 1995.
- [12] P. S. Soltis and R. K. Kuzoff, "ITS sequence variation within and among populations of *Lomatium grayi* and *L. laevigatum* (Umbelliferae)," *Mol Phylogenet Evol*, vol. 2, pp. 166-170, Jun 1993.