

XÁC ĐỊNH NẤM *Erysiphe quercicola* S.Takam & U.Braun GÂY BỆNH PHẤN TRẮNG TRÊN CÂY CAO SU TẠI VIỆT NAM

Identification Powdery Mildews Fungi *Erysiphe quercicola* S.Takam
& U.Braun Parasiting on Para-Rubber Trees in Vietnam

Lê Thị Thanh Tâm¹, Hà Minh Thanh¹, Phạm Ngọc Dung¹, Nguyễn Văn Liêm¹,
Nguyễn Minh Khuê², Mai Văn Trí³, Hà Việt Cường⁴, Yukio Sato⁵, Susumu Takamatsu⁶

Ngày nhận bài: 6.3.2015

Ngày chấp nhận đăng: 27.3.2015

Abstract

In the world, powdery mildews fungi (PM) have been recorded to damage over 700 botanic species (Braun and Cook, 2012). Several PM species parasite on oaks *Quercus* sp (Takamatsu et al., 2007) and para rubber tree *Hevea brasiliensis* (Limkaisang et al., 2006) such as *E. alphitoides*, *E. quercicola*, *E. extensa* và *E. hypophylla*, etc... In Vietnam, resin yield of para rubber tree could be reduced even 30% due to PM. This species belonging to *Erysiphe* genus which has some morphological characteristics including conidiophore with single chain, conidia with ellipsoid shape and size (length: width) (*lw*) (30-)35-42.5(-45) x 15-20(-22.5) um without fibrosine, footcell with cylindrical shape with size (length: width) (37.5-)42.5-50 x 7.5-10.0 (-11.3) um, mycelium bearing appressorium with lobe/lobed opposite/multilobed shapes; conidia germination with *Pseudoidium* type, *Extensitubus* sub-type. Using primer pairs, HF1/HR4 (this study), and NL1, NLP2 (Mori et al., 2000) for cloning and sequencing ITS and 28S rRNA regions of samples PM fungi HB1-HB6 and HB1-HB2, respectively from provinces including Sơn La, Lai Châu, Bình Phước, Đồng Nai, Bà Rịa - Vũng Tàu, Đắk Lắk in Vietnam, obtained sequences were registered in GenBanks with accession numbers (GA.) KM260698-KM260703 for ITS and KM260680-KM260681 for 28S. Powdery mildews fungi on all samples from Vietnam belong to *Erysiphe quercicola* group which separates from *E. alphitoides* group extracted from DNA database with strong bootstrap values support 100% and 98.1% in MP phylogenetic trees based on analysing ITS and 28S rRNA sequences, respectively.

Keywords: *Erysiphale*, *Erysiphe quercicola*, *Hevea brasiliensis*, Phylogenetic tree, powdery mildews.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trên thế giới, nấm phấn trắng đã được ghi nhận gây bệnh hại trên 700 loài thực vật (Braun và Cook, 2012). Điều kiện khí hậu nóng ẩm là nhân tố lý tưởng cho sự phát sinh, phát triển của nhiều loài nấm phấn trắng. Nấm phấn trắng gây hại trên nhiều loài cây sồi ở nhiều nước thuộc Châu Á, Châu Âu và Bắc Mỹ...trong đó có các loài như *E. alphitoides*, *E. quercicola*, *E. extensa* và *E. hypophylla* (Takamatsu và cs., 2007). Các loài nấm này có thể gây hại riêng lẻ hoặc đồng thời trên nhiều loài cây trồng kinh tế

quan trọng khác trong đó có cây cao su (Limkaisang và cs., 2006).

Việt Nam là một đất nước có khí hậu nhiệt đới gió mùa với đặc trưng mưa nhiều, nhiệt độ và độ ẩm cao là điều kiện thuận lợi cho bệnh phấn trắng thường xuyên xuất hiện, gây hại hàng năm trên nhiều loại cây trồng khác nhau. Cây cao su được trồng lâu đời ở Việt Nam và bệnh phấn trắng đã được ghi nhận gần đây trên rất nhiều vùng trồng cao su trong cả nước. Bệnh thường gây hại lá non, lá bánh tẻ, thậm chí gây rụng lá hàng loạt làm giảm khả năng quang hợp dẫn đến giảm năng suất mù tới 30%. Bào tử nấm phấn trắng được hình thành trên các bộ phận bị nhiễm bệnh của cây và được phát tán nhờ gió rời gây sự lây nhiễm thứ cấp. Nấm phấn trắng trên cây cao su (*H. brasiliensis*) trước đây thường biết đến với tên *Oidium heveae* Steinm.

Sự hình thành giai đoạn hữu tính (teleomorph) với các đặc điểm của quả thể (cleistothecium) là một chỉ tiêu quan trọng để phân loại nấm phấn trắng. Tuy nhiên, trên thực tế khó có thể tìm thấy sự hình thành quả thể của

1. Viện Bảo vệ thực vật, Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam
2. Chi cục Bảo vệ thực vật tỉnh Lai Châu
3. Trung tâm Nghiên cứu Cây ăn quả miền Đông Nam Bộ, Viện nghiên cứu Cây ăn quả Miền Nam
4. Trung tâm Bệnh cây nhiệt đới, Học Viện Nông nghiệp Việt Nam
5. Bộ môn Công nghệ, Đại học Toyama, Nhật Bản
6. Bộ môn Bệnh cây, Đại học Mie, Nhật Bản.

các loài nấm phân trắng ở các nước thuộc vùng nhiệt đới, trong đó có Việt Nam. Vì vậy, việc nghiên cứu phân loại nấm phân trắng theo chỉ tiêu này thường ít hoặc hầu như không được phát triển ở các quốc gia thuộc vùng nhiệt đới.

Những năm gần đây sinh học phân tử đã được áp dụng trong phân loại tác nhân gây bệnh trên thế giới và ở Việt Nam. Bài báo này cung cấp thông tin nghiên cứu cập nhật chính xác tên loài nấm phân trắng gây hại trên cây cao su ở Việt Nam trong những năm gần đây.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Chuẩn bị nguồn nấm

Các mẫu nấm phân trắng gây hại trên cây cao su được tách bảo tồn từ vết bệnh phân trắng có triệu chứng điển hình trên lá non thu thập tại một số vùng trồng cao su ở Việt Nam.

2.2. Quan sát hình thái học nấm phân trắng

Cành bảo tử, bào tử vô tính từ các mẫu nấm bệnh phân trắng trên lá cao su tươi được tách ra bằng băng dính trong, dính trên lamên và được đếm số lượng, băng quan sát dưới kính hiển vi (KHV) tổng hợp ở vật kính 40 X. Hình dạng, kích thước của bào tử, có hay không có fibrosine, các đặc trưng của cành bào tử như hình dạng và kích thước của tế bào chân đế (TBCĐ), hình dạng và vị trí của giác bám trên sợi nấm được mô tả và ghi nhận. Trong mỗi mẫu kiểm tra, 100 bào tử vô tính và 30 TBCĐ được đo kích thước.

Quan sát các ống mầm của bào tử vô tính nấm

phân trắng được tiến hành theo phương pháp của Hirata (1942). Lớp vỏ bên trong của củ hành tây với kích cỡ 1 cm³ được tách ra bằng dao, sau đó được giữ trong cồn 70° khoảng 1-2 tuần và trước khi dùng cho thí nghiệm này mầm của bào tử vô tính nấm phân trắng được rửa dưới vòi nước chảy trong 2 giờ. Lớp màng bên trong của vỏ củ hành tây sau đó bị loại nước dư thừa bằng giấy lọc, và được chủng nhiễm với bào tử vô tính nấm phân trắng bằng cách áp nhẹ bề mặt lá bị bệnh lên. Tiếp theo, lớp vỏ củ hành này được đặt nổi trên đĩa petri chứa nước cất khử trùng và ủ ở các mức nhiệt độ 20, 25, 30° C cho quan sát dưới KHV để ghi nhận đặc điểm của ống mầm bào tử vô tính sau 4, 6, 8, 10, 12, 24 giờ.

2.3. Lấy bệnh nhân tạo

Để xác định tác nhân gây bệnh, việc lấy bệnh nhân tạo được tiến hành trong điều kiện nhà lưới trên cây cao su giống PB260 2 năm tuổi, trồng bằng giâm cành. Lấy bệnh bằng phương pháp quét bảo tử lên lá 5-7 ngày tuổi sạch bệnh.

2.4. Tách chiết ADN

DNA tổng thể (gDNA) của nấm phân trắng được tách chiết từ bào tử vô tính conidia của 6 mẫu nấm phân trắng trên lá cây cao su thu được ở 6 tỉnh: Sơn La, Lai Châu, Đắk Lắk, Bình Phước, Đồng Nai và Bà Rịa – Vũng Tàu, bằng DNAeasy Blood and Tissue Kit (QIAGEN) và được so sánh với các mẫu nấm phân trắng đã được công bố trên thế giới. (bảng 1).

Bảng 1. Nguồn vật liệu nấm phân trắng trên cây cao su và các cây ký chủ khác được sử dụng cho phân tích cây phả hệ và DNA database accession numbers (Viện BVTV, 2014)

Nhóm	Chủng nấm phân trắng	Cây ký chủ		Địa điểm và thời gian	Isolate / voucher no.	Database accession no.		Tài liệu tham khảo
		Tên la tinh	Tên tiếng Việt			ITS	28S	
A	<i>E. quercicola</i>	<i>H. brasiliensis</i>	Cao su	Sơn La, Vietnam, 2013	HB1	KM260698	KM260680	Nghiên cứu này
A	<i>E. quercicola</i>	<i>H. brasiliensis</i>	Cao su	La Châu Vietnam, 2013	HB2	KM260699	KM260681	Nghiên cứu này
A	<i>E. quercicola</i>	<i>H. brasiliensis</i>	Cao su	Bình Phước, Vietnam, 2014	HB3	KM260700		Nghiên cứu này
A	<i>E. quercicola</i>	<i>H. brasiliensis</i>	Cao su	Đồng Nai Vietnam, 2014	HB4	KM260701		Nghiên cứu này
A	<i>E. quercicola</i>	<i>H. brasiliensis</i>	Cao su	Vũng Tàu Vietnam, 2014	HB5	KM260702		Nghiên cứu này
A	<i>E. quercicola</i>	<i>H. brasiliensis</i>	Cao su	Đắk Lắk, Vietnam, 2014	HB6	KM260703		Nghiên cứu này
A	<i>E. quercicola</i>	<i>H. brasiliensis</i>	Cao su	Brazil	MUMH2419	AB193607		Limkaisang, S., 2006
A	<i>E. quercicola</i>	<i>H. brasiliensis</i>	Cao su	Thailand	MUMH2602	AB193589	AB197136	Limkaisang, S., 2005
A	<i>E. quercicola</i>	<i>H. brasiliensis</i>	Cao su	Brazil	MUMH2418	AB193606		Limkaisang, S., 2005
A	<i>E. quercicola</i>	<i>Quercus</i> sp.	Cây thuộc chi sồi	Iran	MUMH3242	AB292693	AB292693	Takamatsu, S., 2007
A	<i>E. quercicola</i>	<i>H. brasiliensis</i>	Cao su	Malaysia	MUMH2545	AB193588	AB197132	Limkaisang, S., 2005
A	<i>E. quercicola</i>	<i>A. auriculiformis</i>	Kèo lá trám	Thái Lan	MUMH1805		AB237831	Limkaisang, S., 2006
A	<i>E. quercicola</i>	<i>A. auriculiformis</i>	Kèo lá trám	Malaysia	MUMH2546		AB237830	Limkaisang, S., 2006

Nhóm	Chủng nấm phân trắng	Cây ký chủ		Địa điểm và thời gian	Isolate / voucher no.	Database accession no.		Tài liệu tham khảo
		Tên latin	Tên tiếng Việt			ITS	28S	
A	<i>E. quercicola</i>	<i>A. mangium</i>	Xe tại trường	Nhật Bản	MUMH1183		AB237834	Limkaisang, S., 2006
A	<i>E. quercicola</i>	<i>B. orellana</i>	Điều nhuộm	Thái Lan	MUMH3230		AB237818	Limkaisang, S., 2006
A	<i>E. quercicola</i>	<i>A. occidentale</i>	Đào tợn họ	Tanzania	MUMH781		AB237814	Limkaisang, S., 2006
A	<i>E. quercicola</i>	<i>Q. crispula</i>	Sồi	Toyama, Nhật Bản	MUMH1956, HAL 1968 F	AB292691	AB292691	Takamatsu, S., 2007
A	<i>E. quercicola</i>	<i>Quercus</i> sp.	Cây thuộc họ sồi	Phetchabun, Thái Lan	MUMH3229, HAL 1975 F	AB292692	AB292692	Takamatsu, S., 2007
A	<i>E. quercicola</i>	<i>Q. serrata</i>	Sồi	Shiga, Nhật Bản	MUMH3796, HAL 1974 F	AB292694	AB292694	Takamatsu, S., 2007
A	<i>E. quercicola</i>	<i>C. limon</i>	Chanh tây	East Timor	VPR130172		AB237818	
A	<i>E. quercicola</i>	<i>C. reticulata</i>	Quýt	East Timor	VPR130173		AB237819	
A	<i>E. quercicola</i>	<i>M. indica</i>	Xoài	Thailand	MUMH3267		AB237827	
B	<i>E. alphitoides</i>	<i>Q. serrata</i>	Sồi	Nhật Bản	MUMH1160	AB292695	AB292695	
B	<i>E. alphitoides</i>	<i>Q. robur</i>	Sồi châu Âu	Nyon, Thụy Sĩ	MUMH1143	AB257431	AB257431	Takamatsu, S., 2006
B	<i>E. alphitoides</i>	<i>Q. petraea</i>	Sồi ở châu Âu và Tiểu Á	Geneva, Thụy Sĩ	MUMH1448	AB257435	AB257435	Takamatsu, S., 2006
B	<i>E. alphitoides</i>	<i>Q. robur</i>	Sồi châu Âu	Banloche, Argentina	MUMH3169		AB292702	Takamatsu, S., 2007
B	<i>E. alphitoides</i>	<i>Q. serrata</i>	Sồi	Ehime, Nhật Bản	MUMH550	AB292707	AB292707	Takamatsu, S., 2007
B	<i>E. alphitoides</i>	<i>Q. mongolica</i>	Sồi Mongolian	Nhật Bản	MUMH242		AB237811	Takamatsu, S., 2007
B	<i>E. alphitoides</i>	<i>Quercus</i> sp.	Cây thuộc họ sồi	Victoria, Australia	MUMH3250		AB292704	Takamatsu, S., 2007
B	<i>E. alphitoides</i>	<i>Quercus</i> sp.	Cây thuộc họ sồi	Victoria, Australia	MUMH3259	AB292705	AB292705	Takamatsu, S., 2007
B	<i>E. alphitoides</i>	<i>Q. robur</i>	Sồi châu Âu	Anh	MUMH960		AB237812	Limkaisang, S., 2006
Nhóm khác cho 28S (Out-group)	<i>E. abbreviata</i>	<i>Q. falcaia</i> var. <i>pagodifolia</i>	Cây sồi đỏ miền nam	Tennessee, McMinnvil, Mỹ	MUMH3790	AB271785	AB271785	Takamatsu, S., 2007
Nhóm khác cho ITS	<i>E. glycines</i>	<i>D. oxypylitum</i>	Cây đậu đại	Nhật Bản	MUMH52		AB015927	Takamatsu, S., 1999
Nhóm khác cho ITS	<i>E. glycines</i>	<i>A. edgeworthii</i> var. <i>japonica</i>	Cây lưu niên thuộc họ đậu	Nhật Bản	MUMH56		AB015934	Takamatsu, S., 1999

2.5. Phản ứng PCR (Polymerase Chain Reaction)

Phản ứng PCR nhân vùng ITS dùng cặp mồi chung HF1

(5'-GGATCCTCGTACAAGGTTTCCGTAG-3')/ HR4 (5'-CTGCAGCTCCGCTTATTGATA TGCTT-3') (được tạo ra trong nghiên cứu này). Phản ứng PCR đầu tiên (thứ nhất) được sử dụng làm khuôn cho phản ứng PCR tiếp theo. Phản ứng PCR đầu tiên được thực hiện trong tube 0,5ml với tổng thể tích phản ứng 20ul, 0,5 um mỗi loại mỗi muối và ngược (đều được chuẩn bị ở nồng độ 20uM), 10ul Taq polymerase Master mix (TaKaRa, Tokyo), 4,0ul nước cất 2 lần khử trùng dd H₂O và 5,0ul DNA nấm phân trắng và được tiến hành dưới các điều kiện chu trình nhiệt trong máy PCR

thermal cycler SP (Takara, Kyoto, Japan) như sau. khởi đầu biến tính ở 94°C trong 3 phút; theo sau là 30 chu kỳ (biến tính ở 94°C trong 30s, gắn mồi ở 58°C trong 30s và tổng hợp sợi ở 72°C trong 48s. Phản ứng được kết thúc ở 72°C trong 10 phút. Phản ứng PCR tiếp theo (thứ hai) được tiến hành trong ống thể tích 30ul bao gồm 20ul Taq PCR Master Mix, 1,0 ul mỗi loại primer (nồng độ 20uM), nước cất tinh sạch 2 lần ddH₂O 5,0 ul, and 3,0 ul khuôn là sản phẩm của phản ứng PCR đầu tiên.

Vùng D1 và D2 của gen 28S rRNA được nhân lên bằng phản ứng PCR đầu tiên (thứ nhất) sử dụng các cặp primer PM3 (5'-GKGCTYTMCGCGTAGT-3')

(Takamatsu và Kano, 2001)/ TW14 (5'-GCTATCCTGAGGGAACTTC-3') (Mori và cs ,

2000). Phản ứng PCR đầu tiên được thực hiện trong tube 0,5ml với tổng thể tích phản ứng 20ul, 0,5 um mỗi loại mỗi muối và ngược (nồng độ 20uM), 10ul Taq polymerase Master mix (TaKaRa, Tokyo) và 9ul gDNA nấm phân trắng, được tiến hành dưới các điều kiện chu trình nhiệt trong máy PCR thermal cycler SP (Takara, Kyoto, Japan) như sau: khởi đầu biến tính ở 94°C trong 3 phút; theo sau là 30 chu trình PCR (biến tính ở 94°C trong 30s, gắn mồi ở 50°C trong 30s, và tổng hợp sợi ở 72°C trong 54s). Phản ứng được kết thúc ở 72°C trong 10 phút. Phản ứng PCR tiếp theo (thứ hai) được nhân lên bằng cặp nested-primer NL1(5'-AGTAACGGCGAGTGAAGCGG-3')/TW14 (Mori và cộng sự, 2000), thực hiện trong tube 0,5ml với tổng số thể tích 30ul, bao gồm 20ul Taq PCR Master Mix, 1.0 ul mỗi loại primer (nồng độ 20uM), dd H₂O 2.0 ul và 6.0 ul of gDNA là sản phẩm của phản ứng PCR đầu tiên, với chu trình nhiệt tương tự như trong phản ứng PCR thứ nhất.

Các sản phẩm PCR được phân tách trên 2% agarose gels trong 1% TAE buffer bởi điện di electrophoresis, nhuộm màu bằng nhúng ngập trong dung dịch 1% TAE chứa Ethidium Bromide hoặc Green safe trong 30 phút. Các giải băng chứa các đoạn gen mong muốn từ sản phẩm PCR được nhìn thấy dưới đèn cực tím sóng dài, sau khi chụp ảnh được cất, tinh sạch bằng sử dụng QIAquick Gel ExtractionKit (QIAGEN), như được miêu tả theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

2.6. Giải trình tự và phân tích trình tự

Để giải mã (sequencing) vùng ITS rDNA, cả hai chiều của đoạn gen đều được giải mã sử dụng cặp primer cho phản ứng PCR thứ hai, HF1 và HR4 được nhắc đến ở trên, trong khi cặp primer NL1, NLP2 (5'-GGTCCA ACAGCTATGCTCT-3') (Mori và cộng sự, 2000) được sử dụng để giải mã vùng 28S rDNA.

Các đoạn nucleotide của sản phẩm PCR sau cùng, phản ứng PCR thứ hai, sau khi tinh sạch, được gửi đi giải mã tại First Base Co. (Malaysia/Singapore), Macrogen Co (Korea).

Trình tự mã đã được lắp ráp tổng hợp từ kết quả giải mã 2 chiều bằng sử dụng phần mềm DNASTAR Lasergene 11 Core Suite software (<http://www.dnastar.com/allproducts.aspx>). Dùng BLAST, NCBI để tìm kiếm chuỗi tương đồng cao

98-100%. Sau đó, sử dụng ClustalX package (Thompson và cộng sự, 1997) để căn trình tự (align) các chuỗi nucleotide vùng ITS hoặc 28S các loài nấm phân trắng xác định được trong nghiên cứu này với các chuỗi (sequence) của nấm phân trắng được từ DDBJ database.

Trình tự các chuỗi được căn (alignment) sau đó được nhìn, sàng lọc, cắt gọn, tiến hành trong MEGA5.2.

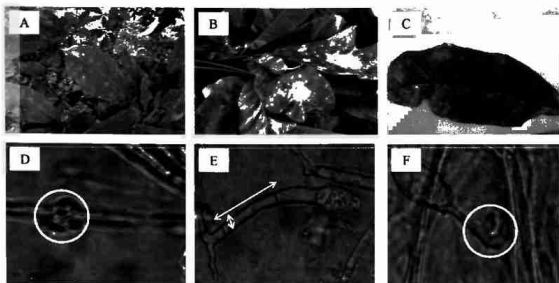
Các cây phân loại đạt được từ data, sử dụng phương pháp phân tích maximum parsimony (MP). Phân tích MP được tiến hành trong PAUP 4.0 b10 (Swofford, 2002). Các nhánh với giá trị bootstrap được kiểm tra bằng bootstrap (BS) analysis (Felsenstein, 1985), với 1000 lần lặp sử dụng các điều kiện tối ưu của stepwise addition được đặt trước.

Các mã GenBank cho trình tự vùng ITS và 28S của các mẫu nấm phân trắng gây bệnh trên cây cao su từ nghiên cứu này và trên các cây trồng khác trích dẫn từ Database được thể hiện trong bảng 1.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Đặc điểm hình thái nấm phân trắng trên cây cao su ở Việt Nam

Nấm bệnh phân trắng chủ yếu gây hại trên lá non, lá bánh tẻ của cây cao su. Vết bệnh màu trắng ở cả hai mặt lá, có thể gây biến dạng lá và gây rụng lá non hàng loạt, làm giảm khả năng quang hợp dẫn đến giảm năng suất mủ tới 30%. Sợi nấm bệnh có màu trắng trong, phát sáng, ngoằn ngoèo, có cành bảo tử phân sinh mọc vòng góc với sợi nấm, dạng đơn, tế bào chân đế (TBCĐ) hình trụ có chiều dài: chiều rộng = (37,5-) 42,5-50 x 7,5-10,0 (-11,3) um, hầu hết được theo sau bởi 1 tế bào nhỏ hơn, hiếm khi có tới 2 tế bào. Bào tử vô tính có chiều dài: chiều rộng = (30-)35-42,5(-45) x 15-20 (-22,5) um, có tỷ lệ dài : rộng (1,8-)2,0-2,3; bào tử vô tính có hình trứng (ovoid), không có fibrosin. Sợi nấm có giác bám (appressoria) dạng thùy, hai thùy mọc đối diện hoặc đa thùy (lobe/lobed opposite/multilobed). Bào tử vô tính nảy mầm theo kiểu *Pseudoidium* dạng *Extensitubus*. Căn cứ vào đặc điểm hình thái so sánh với khóa phân loại mới nhất về hình thái của nấm phân trắng theo Braun and Cook, 2012, nấm phân trắng gây hại trên cây cao su ở Việt nam thuộc chi *Erysiphe* (hình 1).



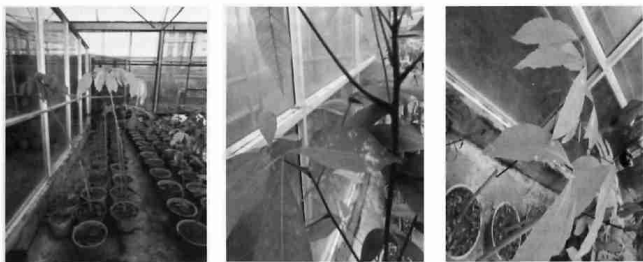
Hình 1. Một số đặc điểm hình thái của nấm phần trắng gây hại trên cây cao su ở Việt Nam.

A, B, C: triệu chứng bệnh nấm PT trên cây và lá cao su; D: giác bám dạng thùy mọc đối diện trên sợi nấm PT được đánh giá bằng vòng tròn màu trắng; E: Cảnh bảo từ đơn của nấm PT trên lá cao su với TBCĐ có chiều dài và rộng được đánh dấu bằng mũi tên 2 chiều màu trắng; F: Bào tử vô tính nấm PT trên cao su nảy mầm theo kiểu *Pseudoidium*, dạng *Extensitubus* được đánh dấu bằng vòng tròn màu trắng

3.2. Lây bệnh nhân tạo

Tính gây bệnh của nấm phần trắng được xác định thông qua các thí nghiệm chủng nhiễm bằng cách ấn nhẹ các lá cao su bị bệnh lên các lá non 5-7 ngày tuổi của 10 cây cao su 2 năm tuổi, giống PB260 (Đăk Lắc). Mười cây tương tự không được chủng nhiễm được sử dụng như là đối chứng âm (hình 2). Các cây được duy trì trong nhà lưới Viện BVTV ở 20 đến 25°C. Các lá được chủng

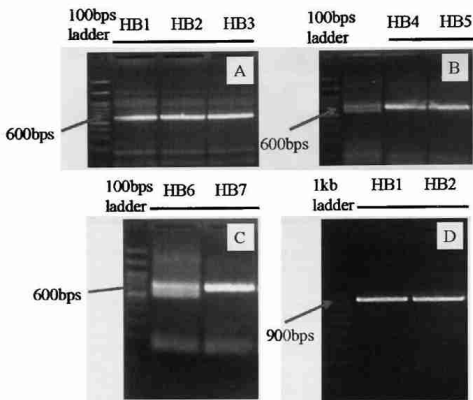
nhằm phát triển triệu chứng sau 7-10 ngày với tỷ lệ bệnh là 70% trong khi các cây đối chứng không xuất hiện triệu chứng. Nấm bệnh có mặt trên các lá bị chủng nhiễm có các đặc điểm hình thái học tương tự như nấm bệnh trên lá cây cao su của nguồn lây ban đầu và cho kết quả kiểm tra xác định chủng bằng kỹ thuật PCR giống nhau (*E. quercicola* S.Takam & U.Braun), đáp ứng đủ yêu cầu của chu trình Koch.



Hình 2. Lây bệnh nấm phần trắng nhân tạo trên cây cao su trong nhà lưới Viện BVTV, 2014

3.3. PCR xác định nấm phấn trắng trên cây cao su

Kết quả chạy PCR cho ảnh được minh họa ở hình 3 dưới đây.



Hình 3. Minh họa kết quả PCR: A, B, C. nhân vùng ITS; D. nhân vùng 28S của nấm phấn trắng trên cây cao su ở Việt Nam, Viện BVTV, 2014

3.4. Nguồn vật liệu nấm phấn trắng dùng cho phân tích cây phả hệ ITS và 28S

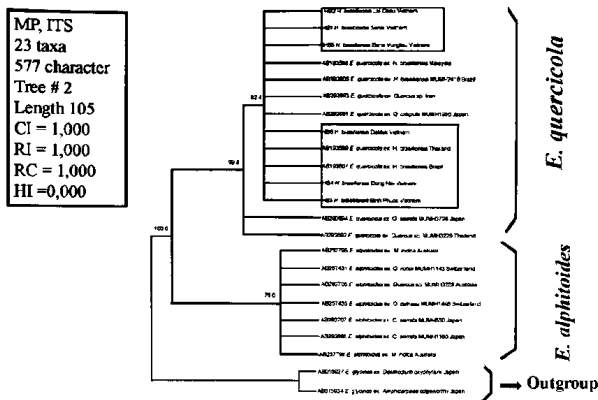
Các trình tự vùng ITS của nấm phấn trắng trên các mẫu cao su HB1-HB6 lần lượt lấy từ Sơn La, Lai Châu, Bình Phước, Đồng Nai, Vũng Tàu, Đắk Lắk với GenBank accession (GA.) từ KM260698-KM260703 và các trình tự vùng 28S của nấm phấn trắng trên các mẫu cao su HB1-HB2 với GA. KM260680-KM260681 cùng với các trình tự khác được lấy từ trong Database được ghi lại trong bảng 1.

3.5. Phân tích cây phả hệ ITS

Sáu trình tự vùng ITS của 6 mẫu nấm phấn trắng trên cây cao su, thu được từ các vùng trồng khác nhau ở Việt Nam, được căn chuỗi với 17 trình tự vùng ITS của nấm phấn trắng trên cây cao su và các cây ký chủ đạt được từ DNA databases. Các trình tự ITS của nấm phấn trắng *E. glycines* trên cây ký chủ *D.*

oxyphyllum, GA. AB015927, và trên cây ký chủ *A. edgeworthii*, GA. AB015934 của Nhật Bản được sử dụng như Nhóm khác (outgroup). Căn chuỗi các trình tự bao gồm 23 taxa và 577 character, trong đó 33 character (tương đương với 5,72%) là thay đổi và 64 character (11,09%) chứa thông tin cho phân tích tiến hóa. Phân tích MP, sử dụng PAUP, cây phả hệ tốt nhất có thể tìm được là cây số 2, có các thông số bao gồm chiều dài cây = 105, CI = 1,000, RI = 1,000, RC = 1,000 và HI = 0,000. Sử dụng phương pháp Heuristic search với Branch-swapping algorithm, tree-bisection-reconnection (TBR) với 1000 lần lặp, đã tìm được giá trị bootstrap của các cụm trong cây phả hệ được trình bày ở hình 4.

Phân tích cây phả hệ dựa trên các trình tự vùng ITS của nấm phấn trắng trên cây cao su ở Việt Nam và thế giới cũng như trên các cây ký chủ khác được chia thành 2 nhóm chính.



Hình 4. Cây phả hệ MP, PAUP 4.0 dựa trên phân tích vùng ITS các loài nấm phấn trắng gây hại trên cây cao su ở Việt Nam trong so sánh với các kỷ chủ trên thế giới, (Viện BVTV, 2014)

Nhóm A với giá trị bootstrap rất cao 99,8 bao gồm một nhóm phụ (sub-group) chứa tất cả các mẫu phấn trắng trên cây cao su (*H. brasiliensis*) thu được ở các vùng trồng khác nhau của Việt Nam và phấn trắng *E. quercicola* trên cây cao su ở Malaysia, GA. AB193588, ở Brazil, GA. AB193606, AB193607, ở Thái Lan, GA. AB193589, các mẫu nấm phấn trắng *E. quercicola* trên cây thuộc họ sồi (*Quercus* sp.) ở Iran, GA. AB292693, trên cây sồi (*Q. crispula*) ở Nhật Bản, GA. AB292691 với giá trị bootstrap 84,2 cùng với các mẫu nấm phấn trắng *E. quercicola* trên cây sồi (*Q. serrata*) ở Nhật Bản, GA. AB292694 và trên cây thuộc họ sồi (*Quercus* sp.) ở Thái Lan, GA. AB292692.

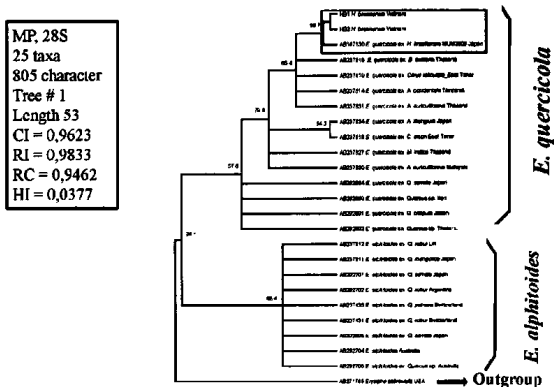
Nhóm B với giá trị bootstrap 76,0 bao gồm tất cả các mẫu của nấm phấn trắng *E. alphitoides* trên các cây xoài (*M.indica*) ở Australia, GA. AB237795, AB237798; trên cây thuộc họ sồi (*Quercus* sp.) ở Australia, GA. AB292705, trên cây sồi (*Q. serrata*) ở Nhật Bản, GA. AB292695, AB292707 và trên cây sồi châu Âu (*Q. robur*), GA. AB257431, cây sồi châu Âu và tiểu Á (*Q. petraea*) ở Thụy Sĩ, GA. AB257435.

Nhóm A, Nhóm B và Nhóm khác (outgroup)

được phân tách nhau bởi giá trị bootstrap 100.

3.6. Phân tích cây phả hệ 28S

Hai trình tự vùng 28S của nấm phấn trắng trên cây cao su, thu được từ Việt Nam, với GA. KM260680- KM260681, được căn chuỗi với 23 trình tự vùng 28S của nấm phấn trắng trên các cây ký chủ được lấy từ DNA databases. Trình tự vùng 28S của nấm phấn trắng *E. abbreviata* trên cây sồi đỏ miền Nam của Mỹ (*Q. falcata* var. *pagodifolia*), GA. AB271785 được sử dụng như Nhóm khác (outgroup). Căn chuỗi các trình tự bao gồm 25 taxa và 805 character, trong đó 16 character (tương đương với 1,98%) là thay đổi và 33 character (4,1%) chứa thông tin cho phân tích tiến hóa. Phân tích MP, sử dụng PAUP, số các cây phả hệ đạt được kết quả là 286387, trong đó, cây phả hệ tốt nhất có thể tìm được là cây số 1, có các thông số bao gồm chiều dài cây = 53, CI = 0,9623; RI = 0,9833; RC = 0,9462; HI = 0,0377. Sử dụng phương pháp Heuristic search với Branch-swapping algorithm: tree-bisection-reconnection (TBR), với 1000 lần lặp, đã tìm được giá trị bootstrap của các cụm trong cây phả hệ được trình bày ở hình 5.



Hình 5. Cây phả hệ MP, PAUP 4.0 dựa trên phân tích vùng 28S các loài nấm phấn trắng gây hại trên cây cao su ở Việt Nam trong so sánh với các kỷ chủ trên thế giới, Viện BVTV, 2014.

Các loài nấm phấn trắng trong cây phả hệ dựa trên phân tích các trình tự vùng 28S của nấm phấn trắng trên cây cao su ở Việt Nam và thể giống cũng như trên các cây ký chủ khác được chia thành 2 nhóm chính.

Hai mẫu nấm phấn trắng trên cây cao su của Việt Nam, HB1, HB2 và mẫu nấm phấn trắng *E. quercicola* trên cây cao su của Nhật Bản, GA. AB197136, tạo thành một nhóm phụ với giá trị bootstrap cao 99,7. Nhóm phụ này cùng với nấm phấn trắng *E. quercicola* trên cây quýt (*C. reticulata*) ở East Timor, GA. AB237819, trên cây đào lộn hột (*A. occidentale*) ở Tanzania, GA. AB237814, trên các cây keo lá trầm (*A. auriculiformis*) và trên cây điều nhuộm (*B. orellana*) ở Thái Lan, GA. AB237831, AB237816 tạo thành một nhóm phụ với giá trị bootstrap 65,4; tiếp đến cùng với nấm phấn trắng *E. quercicola* trên cây keo tai tượng (*A. mangium*) ở Nhật Bản, GA. AB237834, trên cây chanh tây (*C. limon*) ở East Timor, GA. AB237818, trên cây xoài ở Thái Lan, GA. AB237827, trên cây keo lá trầm (*A. auriculiformis*) ở Malaysia, GA. AB237830 tạo thành một sub-group lớn hơn với giá trị bootstrap 79,8. Nấm phấn trắng trên các

mẫu này cùng với nấm phấn trắng *E. quercicola* trên các cây sồi (*Q. serrata* và *Q. crispula*) ở Nhật Bản, GA. AB292694, AB292691, trên cây thuộc họ sồi (*Quercus* sp.) ở Iran và Thái Lan, GA. AB292693, AB292692 tạo thành nhóm A, nhóm nấm phấn trắng *E. quercicola* với giá trị bootstrap 57,6.

Nhóm B bao gồm tất cả các mẫu của nấm phấn trắng *E. alphitoides* trong đó 1 mẫu trên cây sồi Mongolia (*Q. mongolica*), 2 mẫu trên cây sồi (*Q. serrata*) của Nhật Bản với GA. lần lượt là AB237811, AB292707, AB292695; 2 mẫu trên cây thuộc họ sồi (*Quercus* sp.) của Australia, GA. AB292704, AB292705, 2 mẫu trên cây sồi ở châu Âu và tiểu Á (*Q. petraea* và *Q. robur*) của Thụy Sĩ, GA. AB257435, AB257431; 1 mẫu trên cây sồi châu Âu (*Q. robur*) của Argentina, GA. AB292702 và 1 mẫu của Anh, GA. AB237812 với giá trị bootstrap 68,4.

Nhóm A gồm các mẫu nấm phấn trắng *E. quercicola* được tách biệt bởi nhóm B gồm các mẫu nấm phấn trắng *E. alphitoides* và nhóm khác với giá trị bootstrap cao 98,1.

Nấm phấn trắng *E. quercicola*, dạng vô tính *P. anacardii*, trên cây cao su (*H. brasiliensis*)

trước đây có tên là *Oidium heveae* Steinm. Vì chưa xác định được giai đoạn hữu tính để phân loại nấm và thời điểm này khoa học cũng chưa áp dụng được CNSH chưa được áp dụng để phân loại nấm phấn trắng dựa trên trình tự gen ITS. Do vậy tác giả U. Braun, 1987 đã xếp nấm phấn trắng này vào lớp *Oidium*. Ngoài ra, nấm còn có thể gây bệnh trên cây điều (*A. occidentale*), cây điều nhuộm (*B.orellana*), cây cam quýt (*Citrus spp.*), cây xoài (*M. indica*), và *Acacia spp.*, lan rộng trong các vùng nhiệt đới và bán nhiệt đới châu Phi, châu Á và Nam Mỹ. Dạng vô tính của nấm phấn trắng *E. quercicola* có các bào tử hình trứng hoặc hình cầu có chiều dài: chiều rộng 25-40(-45)x12-22um, tỷ lệ dài rộng 1,5-2,3, hầu hết ≤ 2 , TBCĐ hình trụ có kích cỡ 20-40x7-11um, thẳng hoặc cong tại chân đáy, được theo sau bởi 1-2 tế bào, ngắn hơn (Braun và Cook, 2012).

Nấm này, về mặt hình thái rất gần với nấm phấn trắng *E. alphitoides* s. str. nhưng phân biệt bởi có các giác bám của quả thể ngắn hơn. *E. alphitoides* trước kia được xác định là được tìm thấy trên cây sồi, cây xoài,... và chủng này có thể gây hại riêng biệt hoặc đồng thời với các chủng nấm phấn trắng khác như *E. quercicolor*, *E. hypogena*, *E. epigena*, vv... trong nghiên cứu của Takamatsu và cộng sự (2007). Ngoài ra, *E. alphitoides* var. *chenii* được báo cáo lần đầu tiên như *M. alphitoides* var. *chenii* bởi Braun (1982:139). Chủng nấm phấn trắng này trên cây *Q. chenii* ở Trung Quốc khác *E. alphitoides* var. *alphitoides* trong các giác bám dài hơn (1-)-1.5-2.5(-3) lần cũng như đường kính của quả thể.

Trong tất cả các phân tích tiến hóa được tiến hành bởi Takamatsu và cs. (2007), *E. alphitoides* s. lat. trên cây *Q. phillyraeoides* thiết lập các cụm tách khỏi cụm *E. quercicola* được hỗ trợ bởi giá trị bootstrap (60-65%). Vì vậy, trong sự vắng mặt của dữ liệu về chuỗi trình tự hay quả thể, rất khó để phân biệt *E. quercicola* khỏi *E. alphitoides* vì dạng vô tính của hai chủng nấm phấn trắng này rất giống nhau (Braun & Cook, 2012).

Đặc biệt, cây phả hệ dựa trên phân tích các trình tự vùng ITS đã chỉ ra rằng nấm phấn trắng trên cây cao su ở Việt Nam thuộc về nhóm *E. quercicola* tách khỏi nhóm *E. alphitoides* từ DNA database với giá trị bootstrap cao 100 % trong phân tích MP.

Bên cạnh đó, cây phả hệ dựa trên phân tích các trình tự của vùng D1/D2 của gen 28S rDNA nấm phấn trắng trên 2 mẫu đại diện HB1 và HB2 đã được thực hiện để làm rõ hơn vị trí phân loại

của nấm phấn trắng gây hại trên cây cao su vì ngay cả bản thân trình tự vùng ITS của hai chủng nấm *E. quercicola* và *E. alphitoides* có độ tương đồng rất cao. Một lần nữa, kết quả từ cây phả hệ dựa trên phân tích vùng 28S đã chỉ ra rằng nấm phấn trắng gây hại trên cây cao su ở Việt Nam thuộc về cụm *E. quercicola*, tách biệt khỏi cụm *E. alphitoides* với giá trị bootstrap cao 98,1 % trong phân tích MP.

4. KẾT LUẬN

Bằng kỹ thuật sinh học phân tử đã xác định được nấm phấn trắng gây hại trên cây cao su ở Việt Nam là loài *E. quercicola* S.Takam & U.Braun.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Braun, U. and Cook, R.T.A. 2012. Taxonomic Manual of the Erysiphales (Powdery Mildews), CBS Biodiversity Series No. 11. CBS, Utrecht.
2. Felsenstein J, 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791.
3. Hirata K, 1942. On the shape of the germ tubes of *Erysipheae* Bull Chiba Coll Hortie 5:34-49.
4. Limkaisang S, Cunnington JH, Liew KW, Salleh B, Sato Y, Divarangkoon R, Fangjuk W, To-anun C, Takamatsu S, 2006. Molecular phylogenetic analyses reveal a close relationship between powdery mildew fungi on some tropical trees and *Erysiphe alphitoides*, an oak powdery mildew. *Mycoscience* 47: 327-335.
5. Mori Y, Sato Y, Takamatsu S, 2000. Evolutionary analysis of the powdery mildew fungi (Erysiphales) using nucleotide sequences of the nuclear ribosomal DNA. *Mycologia* 92.74-93.
6. Saranya Limkaisang, Sawanee Kom-un, Edson Luiz Furlado, Kon Wui Liew, Baharuddin Salleh, Yukio Sato, Susumu Takamatsu (2005). Molecular phylogenetic and morphological analyses of *Oidium heveae*, a powdery mildew of rubber tree. *Mycoscience* August 2005, Volume 46, Issue 4, pp 220-226.
7. Swofford DL, 2001. PAUP⁴ phylogenetic analysis using parsimony (and other methods), Version 4.0b8. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
8. Takamatsu S, Bolay,A., Limkaisang,S., Kom-un,S. and To-anun,C., 2006. Identity of a powdery mildew fungus occurring on Paeonia and its relationship with *Erysiphe hypophylla* on oak. *Journal Mycoscience* 47, 367-373.
9. Takamatsu S, Braun U, Limkaisang S, Kom-Un U, Sato Y, Cunnington JH, 2007. Phylogeny and

taxonomy of the oak powdery mildew *Erysiphe alphitoides* sensu lato. *Mycological Research* 111(7):809-826.

10. Takamatsu, S., Hirata, T., Sato, Y., Nomura, Y. and Sato, Y. 1999. Phylogenetic relationships of *Microspheera* and *Erysiphe* section *Erysiphe* (powdery mildews) inferred from the rDNA ITS sequences. *Journal Mycology* 40, 259-268.

11. Takamatsu S, Kano Y, 2001. PCR primers

useful for nucleotide sequences of rDNA of the powdery mildew fungi. *Mycoscience* 42:135-139.

12. Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG, 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 24: 4876-4882.

Phân biệt: TS. Ngô Vinh Viễn

XÁC ĐỊNH PHYTOPLASMA NHÓM 16SRII-A GÂY HẠI TRÊN CÂY Sắn TẠI ĐÔNG NAM BỘ BẰNG KỸ THUẬT PCR, RFLP

**Molecular Identification of a 16SrII-A Phytoplasma Associated
with Witches' Broom Disease of Cassava in South Eastern Region**

Nguyễn Đức Thành¹, Trịnh Xuân Hoạt², Mai Văn Quân² và Hà Việt Cường³

Ngày gửi bài: 10.3.2015

Ngày chấp nhận đăng: 15.4.2015

Abstract

In recent years, witches' broom disease of cassava is one of the most serious disease in the South Eastern region. The infected plants showing typical witches' broom symptoms were observed on cassava: small leaves, yellowing and formation of excessive buds. Total DNAs were extracted from the symptomatic and the asymptomatic cassava plants. Using universal primer P1/P7 followed by R16mF2/R16mR1 by nested polymerase chain reaction assay to detect the presence of phytoplasma in symptomatic cassava plants. No amplification products were obtained from templates of asymptomatic. PCR products were sequenced directly and the result of BLAST search in the GenBank confirmed that the nucleotide sequences had 99% identity with several members of the peanut witches' broom group. Virtual restriction fragment length polymorphism pattern and phylogenetic analysis showed that phytoplasma associated with diseased cassava plants belongs to the subgroup A of the peanut witches' broom group. This is the first report of a 16SrII-A phytoplasma infecting cassava in Vietnam.

Keywords: 16SrII-A, cassava, virtual RFLP, witches' broom.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh phytoplasma gây hại trên cây sắn (*Manihot esculenta*) là một trong những nguyên nhân quan trọng làm giảm sút năng suất và chất lượng sắn, ảnh hưởng đến lợi ích của người trồng sắn tại nhiều vùng trên thế giới. Tại Việt Nam, cây sắn bị bệnh chổi rồng giảm năng suất từ 10-30%, hàm lượng tinh bột giảm từ 20-30% (Nguyễn Khuê, 2011). Ở Brazil, tại một số vùng

trồng sắn thuộc phía đông bắc nước này, tỷ lệ cây sắn bị bệnh chổi rồng lên đến 85% và làm giảm năng suất củ đến 70%, thậm chí năng suất củ giảm sút đến 90% cũng đã được ghi nhận (Lozano, 1992). Bệnh phytoplasma gây hại trên cây sắn được ghi nhận lần đầu ở Brazil và phía nam Mexico. Lúc đó, nguyên nhân gây bệnh được xác định là do MLOs (phytoplasma) gây ra. Dựa vào vùng gen rDNA mã hóa 16S rRNA (RNA ribosome), phytoplasma xác định được thuộc nhiều nhóm khác nhau bao gồm nhóm 16SrI (Davis *et al.*, 2005), 16SrII (Arocha *et al.*, 2008b) và 16SrIII (Alvarez *et al.*, 2009; Flores *et*

1. Nghiên cứu sinh, Học viện Nông nghiệp Việt Nam;

2. Viện Bảo vệ thực vật;

3. Khoa Nông học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam