

NẤM *Alternaria alternata* GÂY BỆNH ĐỐM LÁ TRÊN BẮP CẢI (*Brassica oleracea* L. var. capitata) TẠI TỈNH NGHỆ AN

Nguyễn Xuân Trường¹, Nguyễn Thị Thu², Võ Thị Bích Thủy²,
Đặng Thị Thanh Tâm², Nông Thị Huệ², Phạm Hồng Hiến³, Nguyễn Xuân Cảnh^{2*}

¹Viện Sinh học nông nghiệp, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

²Khoa Công nghệ sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

³Ban Khoa học và Hợp tác quốc tế, Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam

*Tác giả liên hệ: nxcanh@vnua.edu.vn

Ngày nhận bài: 30.08.2023

Ngày chấp nhận đăng: 05.01.2024

TÓM TẮT

Nghiên cứu nhằm mục đích phân lập và xác định rõ tác nhân gây bệnh đốm lá trên bắp cải (*Brassica oleracea* L. var. capitata) tại xã Hùng Tiến, huyện Nam Đàn, tỉnh Nghệ An. Mười mẫu lá bắp cải có các triệu chứng bệnh đốm lá đã được thu thập tại ba ruộng. Bằng biện pháp phân lập và kiểm tra đặc điểm hình thái các chủng nấm phân lập. Kết quả nghiên cứu cho thấy, các khuẩn lạc phân lập từ bề mặt cắt các mảnh lá bệnh đều giống nhau về mặt hình thái (kí hiệu là BC01). Bằng phương pháp phân lập và kiểm tra đặc điểm hình thái cho thấy, các khuẩn lạc phân lập từ bề mặt cắt các mảnh lá bệnh đều giống nhau về mặt hình thái (kí hiệu là BC01). Chủng BC01 có tản nấm màu oliu sẫm, viền trắng, sợi nấm bông, chuỗi bào tử phân nhánh, bào tử màu nâu hình bầu dục hoặc elip với một mỏ hình nón ngắn ở đầu, có từ 0-3 vách ngăn dọc và 1-5 vách ngăn ngang. Kích thước bào tử trong khoảng từ 10,17 đến 40,06 × 4,16 đến 13,09µm. Kết quả phân tích trình tự gen vùng ITS và đặc điểm hình thái đã xác định được chủng BC01 thuộc loài *Alternaria alternata*. Các triệu chứng bệnh quan sát được sau 7 ngày tái lây nhiễm chủng BC01 giống với các triệu chứng ban đầu từ lá phân lập. Tại vị trí lây nhiễm, các sợi nấm bệnh phát triển dày đặc xâm lấn sâu trong mô lá, trong khi trên lá đối chứng không có triệu chứng bệnh.

Từ khoá: *Alternaria alternata*, bắp cải, bệnh đốm lá.

Alternaria Leaf Spot Disease on Cabbage (*Brassica oleracea* L. var. capitata) in Nghe An Province

ABSTRACT

The study was conducted to isolate and identify the causal agent of leaf spot disease on cabbage (*Brassica oleracea* L. var. capitata) in Hung Tien, Nam Dan, Nghe An province. Ten symptomatic cabbage leaves were collected from three diseased fields. Morphological examination revealed that only one type of fungus (designated as BC01) was isolated from the cut surface of the diseased leaf pieces. The isolate BC01 had dark olive colonies, white margin, cottony mycelium, branched conidial chains, brown oval or ellipse conidia shape with a short cone-shaped beak at the head, 0-3 longitudinal septa and 1-5 transverse septa. The conidial size ranged from 10.17 to 40.06 × 4.16 to 13.09µm. Based on the ITS gene sequence analysis and morphological characteristics, the isolate BC01 was identified as *Alternaria alternata*. After 7 days of re-infection, the symptoms on the re-infection leaves were similar to those on the isolated leaves. At the site of infection, the fungal mycelium grew densely and invaded deep into the leaf tissue, while the control leaves showed no symptoms.

Keywords: *Alternaria alternata*, cabbage, leaf spot disease.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bắp cải (*Brassica oleracea* L. var. capitata), một loài rau ăn lá phổ biến trong họ Cải (còn gọi

là họ thập tự - Brassicaceae) có nguồn gốc từ vùng Địa Trung Hải (Maggioni & cs., 2010). Bắp cải là cây thân thảo, sống hai năm với nhiều giá trị dinh dưỡng và được lý nên được trồng và tiêu

thụ trên khắp thế giới (Alexandra & Andreea Daniela, 2020; Favela-González & cs., 2020; Poveda & cs., 2022). Diện tích trồng bắp cải năm 2020 trên thế giới là hơn 2,41 triệu hecta với sản lượng đạt hơn 70,86 triệu tấn (FAOSTAT, 2022). Bangladesh, Trung Quốc, Ấn Độ là các nước có sản lượng trồng và xuất khẩu bắp cải nhiều trên thế giới. Ở Việt Nam, diện tích trồng bắp cải năm 2022 là 37.624ha với sản lượng đạt 1.027.592 tấn (FAOSTAT, 2022), được trồng vào vụ đông ở Đồng bằng sông Hồng và trồng tập trung quanh năm ở Đà Lạt. Tuy nhiên, bắp cải và các loại cây họ Cải khác bị ảnh hưởng nghiêm trọng bởi các mầm bệnh khác nhau gây thiệt hại nặng nề đến năng suất, kinh tế và chất lượng cây trồng. Bệnh đốm lá do nấm *Alternaria* spp. gây ra được coi là bệnh phổ biến và có sức tàn phá lớn nhất trên tất cả các cây họ Cải trên toàn thế giới (Mourou & cs., 2023). *Alternaria brassicae* và *Alternaria brassicicola* là hai loài phổ biến nhất gây ra bệnh đốm lá trên bắp cải và các loại cây họ Cải khác (Köhl & cs., 2010; Nowicki & cs., 2012). Nấm *A. brassicae* có tản nấm màu xanh oliu, sợi nấm màu nâu hoặc xám nâu, cuống sinh bào tử có màu nâu sẫm, có vách ngăn, mọc thành cụm. Bào tử có màu nâu đen, mọc riêng lẻ hoặc thành 2-4 chuỗi, hình quả dầu (muriform) với mỏ dài, kích thước của bào tử trong khoảng $148-184 \times 17-24\mu\text{m}$ với 10-11 vách ngăn ngang và 0-6 vách ngăn dọc. Bên cạnh đó, nấm *A. brassicicola* có tản nấm màu xám đen, sợi nấm có màu từ xanh oliu đến xám đen. Cuống sinh bào tử màu vàng sẫm, có vách ngăn, phân nhánh. Bào tử có màu nâu sẫm, hình quả dầu (muriform) không có mỏ, kích thước trong khoảng $44-55 \times 11-16\mu\text{m}$ với 5-8 vách ngăn ngang và 0-4 vách ngăn dọc (Degenhardt & cs., 1982). Triệu chứng bệnh điển hình do hai loài này gây ra các vết bệnh (các đốm) màu nâu sẫm có các đường tròn đồng tâm đặc trưng, thường có viền màu vàng. Các vết bệnh thường xuất hiện trên lá, thân và quả. Trong điều kiện thuận lợi, trên các vết bệnh hình thành một lớp bào tử nấm màu nâu đen. Các tổn thương hoại tử lan rộng làm giảm đáng kể hiệu quả quang hợp và làm chết cây khi mầm bệnh phát triển mạnh (Nowicki & cs., 2012;

Dharmendra & cs., 2014). Nghiên cứu xác định loài nấm gây bệnh thường được tiến hành dựa trên đặc điểm hình thái và phương pháp sinh học phân tử (Simmons, 2007; Huang & cs., 2021; Anwaar & cs., 2022). Trong tất cả các vùng của nrDNA, vùng trình tự ITS (Internal Transcribed Spacer) được dùng là mã vạch phân tử (barcode) phổ biến và có xác suất định danh thành công cao nhất đối với phạm vi rộng nhất cho các loài nấm (White & cs., 1990; Schoch & cs., 2012; Stielow & cs., 2015). Hiện nay, ở Việt Nam chưa có một báo cáo khoa học nào công bố xác định cụ thể tác nhân gây bệnh đốm lá trên bắp cải, mà chỉ “ngầm” mặc định là do nấm *A. brassicicola* và *A. brassicae* gây nên. Việc chưa xác định được chính xác tác nhân gây bệnh làm giảm hiệu quả phòng trừ bệnh đốm lá trên bắp cải.

Vì vậy, nghiên cứu xác định rõ tác nhân gây bệnh đốm lá trên bắp cải là rất có ý nghĩa khoa học và cần thiết. Kết quả nghiên cứu cung cấp thông tin khoa học, đồng thời là cơ sở khoa học để đưa ra biện pháp quản lý bệnh đốm lá bắp cải hiệu quả.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Mười mẫu lá bắp cải (giống CB 26) có triệu chứng bệnh đốm lá được thu thập trên 3 ruộng tại xã Hùng Tiến, huyện Nam Đàn, tỉnh Nghệ An ($18^{\circ}40'35.2''\text{N}$ $105^{\circ}32'07.7''\text{E}$).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Thu thập mẫu, phân lập và làm thuần

Các mẫu lá bắp cải được thu thập có triệu chứng bệnh cụ thể là: Ban đầu lá xuất hiện những vết bệnh màu vàng không đều, sau đó thành những đốm nâu. Khi bệnh phát triển nặng, vết bệnh lan dần từ phần mép vào gân chính của lá và có màu nâu đen. Các vết đốm phát triển rộng liên kết lại dẫn đến tình trạng khô héo lá. Mẫu lá có triệu chứng bệnh được thu thập đặt trong túi giấy vô trùng, sau đó được bảo quản lạnh ở $7-10^{\circ}\text{C}$ để vận chuyển về Phòng Thí nghiệm Công nghệ vi sinh, Khoa Công nghệ sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam để tiến hành phân lập nấm bệnh.

Nấm bệnh được phân lập theo phương pháp của Shi & cs. (2021) đã được thay đổi. Mẫu lá được rửa dưới vòi nước chảy loại bỏ bụi bẩn trên bề mặt. Các mảnh lá được cắt từ mép vết bệnh có kích thước khoảng 5mm × 5mm và khử trùng bề mặt bằng ethanol 70% trong 60 giây, rửa bằng nước vô trùng 3 lần, mỗi lần 30 giây. Sau đó, các mảnh lá được đặt lên trên giấy thấm vô trùng để làm khô. Dùng kẹp chuyên dụng đặt các mảnh lá lên môi trường PDA (potato dextrose agar) có bổ sung 100 mg/l streptomycin để ức chế sự phát triển của vi khuẩn. Sau 5 ngày nuôi ở 25°C trong tối, các đầu sợi nấm của các khuẩn lạc nấm phát triển từ bề mặt cắt các mảnh lá được tách và cấy chuyển sang đĩa PDA mới để làm thuần.

2.2.2. Nghiên cứu đặc điểm hình thái nấm

Hình thái, màu sắc tản nấm, dịch tiết được quan sát sau 7 ngày nuôi cấy trong tối ở 25°C trên môi trường PDA. Các đặc điểm hình thái vi thể của nấm bệnh: hệ sợi, bào tử, chuỗi bào tử được kiểm tra bằng phương pháp găm lamén. Cụ thể, trên đĩa PDA đặt một khối nấm bệnh có đường kính khoảng 5mm ở chính giữa. Các tấm lamén kích thước 1cm × 1cm đã khử trùng được cắm chéo vào thạch PDA tạo một góc 45° so với bề mặt, khoảng cách từ khối nấm đến vị trí găm lamén là 15mm. Sau 5-7 ngày ủ trong tối ở 25°C, tấm lamén chứa hệ sợi, bào tử của nấm bệnh đang phát triển được quan sát dưới kính hiển vi quang học Olympus CX23 (Olympus, Tokyo, Nhật Bản) ở độ phóng đại 400 lần.

2.2.3. Xác định khả năng gây bệnh trong điều kiện in vivo

Cây bắp cải (giống CB 26) được gieo hạt trồng trong nhà kính. Sau khi được 35 ngày tuổi có 5-6 lá thật cây con được trồng vào các bầu nilong chứa hỗn hợp đất đã khử trùng với tỉ lệ về khối lượng đất thịt: xơ dừa là 4:1. Ba mươi cây bắp cải được chọn có chiều cao, số lá tương đương nhau chia đều ngẫu nhiên vào hai khay nhựa (khoảng cách giữa các cây trong một khay là 20cm) tương ứng với hai công thức: thí nghiệm và đối chứng. Tiến hành lây nhiễm nấm bệnh bằng cách nhỏ 30µl dịch huyền phù bào tử nấm bệnh có nồng độ 10⁶ bào tử/ml lên trên

phiến lá trưởng thành (lá bánh tẻ) của từng cây, mỗi lá tạo hai vết lây nhiễm và mỗi cây lây nhiễm trên 3 lá. Trong công thức đối chứng dịch huyền phù bào tử nấm bệnh được thay bằng nước cất vô trùng. Sau đó, các khay được chụp bằng nắp nhựa trong suốt để cách li và duy trì độ ẩm 85-90% ở nhiệt độ 25-28°C với quang chu kỳ 12 giờ. Vết bệnh lây nhiễm trên lá được theo dõi quan sát mỗi ngày. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

2.2.4. Xác định đặc điểm lây nhiễm của nấm bệnh

Đặc điểm lây nhiễm của chủng nấm bệnh phân lập được trên cây bắp cải được xác định bằng phương pháp nhuộm trypan blue (Fernández-Bautista & cs., 2016). Cụ thể là sau 7 ngày lây nhiễm nấm bệnh, các mẫu lá được tách rời và ngâm trong dung dịch trypan blue bao gồm: 10ml axit lactic, 10ml dung dịch phenol (pH 7,5-8,0), 10ml glycerol, 10ml nước cất và 40mg trypan blue. Sau 45 phút ở nhiệt độ phòng, dung dịch nhuộm trypan blue được loại bỏ và thay thế bằng ethanol tuyệt đối để loại bỏ thuốc nhuộm còn dư và chất diệp lục. Các mẫu được khử màu diệp lục qua đêm trên máy lắc ngang ở tốc độ 150 vòng/phút. Quy trình khử màu được lặp lại cho đến khi khử được hết màu xanh của chất diệp lục. Loại bỏ ethanol và ngâm các mẫu trong dung dịch glycerol 60% rồi tiến hành quan sát mẫu dưới kính hiển vi Olympus CX23 (Olympus, Tokyo, Nhật Bản) với độ phóng đại 40 lần. Sau khi nhuộm, hệ sợi nấm bắt màu nhuộm xanh blue. Vì vậy, trên các vết bệnh lây nhiễm có thể dễ dàng quan sát được sự xâm nhập, phát triển của hệ sợi nấm bệnh trong mô lá bắp cải dưới kính hiển vi.

2.2.5. Phương pháp định danh phân tử chủng nấm gây bệnh

Chủng nấm gây bệnh được định danh phân tử dựa vào phân tích vùng trình tự ITS. DNA tổng số được tách chiết theo phương pháp của Schwessinger & McDonald (2017). Khuếch đại vùng ITS của chủng nấm bằng cặp môi ITS1/ITS4 (White & cs., 1990) có trình tự ITS1: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'; ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'. Hỗn hợp

PCR 20µl chứa 10µl Maxtermix 2xPCR, 1µl ITS1(10µM), 1µl ITS4 (10µM), 7µl nước PCR và 1µl DNA tổng số (20 ng/µl). Máy PCR Thermal Cyclers Gene Atlas (ASTECCo., LTD. 4-6-15, Minamizato, Shime, Kasuya Fukuoka, Japan, 811-2207) được cài đặt với chu trình nhiệt như sau: Biến tính 5 phút ở 94°C tiếp theo là 28 chu kỳ của 30 giây ở 94°C, 40 giây ở 53°C để gắn mỗi, 1 phút 30 giây ở 72°C cho phần kéo dài mạch và cuối cùng ở 72°C trong 7 phút. Sản phẩm PCR được kiểm tra trên gel điện di 1,5% agarose. Tinh sạch và giải trình tự sản phẩm PCR được thực hiện bởi 1st BASE Pte Ltd., Singapore.

Mức độ tương đồng của các trình tự gen mã hóa vùng ITS của chủng nấm được so sánh bằng công cụ tìm kiếm BLAST từ Trung tâm Thông tin Công nghệ sinh học Quốc gia – Hoa Kỳ (NCBI; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Sử dụng phần mềm MEGAX để xây dựng cây phát sinh loài (Kumar & cs., 2018), phương pháp phân tích Maximum Parsimony được chọn với độ tin cậy (bootstrap) là lặp lại 1.000 lần.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân lập và đặc điểm hình thái của chủng nấm bệnh

Sau 5 ngày nuôi cấy, trên tất cả các đĩa phân lập, từ bề mặt cắt các mảnh lá bệnh đều xuất hiện một loại khuẩn lạc nấm đồng nhất và được kí hiệu là BC01. Nuôi cấy chủng nấm phân lập được trên môi trường PDA ở 25°C, tản nấm ban đầu có màu trắng xám, sau đó chuyển sang màu oliu sẫm, có viền trắng kích thước khoảng 2-5mm, sợi nấm bông. Chuỗi bào tử phân nhánh, bào tử màu nâu, hình bầu dục hoặc elip với một mỏ hình nón ngắn ở đầu có từ 0-3 vách ngăn dọc và 1-5 vách ngăn ngang. Kích thước bào tử trong khoảng từ 10,17 đến 40,06 × 4,16 đến 13,09µm. Sợi nấm và cuống sinh bào tử có vách ngăn và có màu nâu nhạt. Các đặc điểm hình thái của chủng nấm phân lập được giống với mô tả của loài *A. alternata* gây bệnh đốm lá trên cây xô thơm (*Salvia farinacea* Benth.), *A. tenuissima* gây bệnh đốm lá trên cây mướp (*Luffa cylindrica*) ở Trung Quốc (Ding & cs., 2020; Yu & cs., 2023). Đồng thời, dựa vào phân

loại hình thái học về *Alternaria* của Simmons (2007) và các mô tả hình thái học đặc trưng về loài *A. alternata* của Troncoso-Rojas & Tiznado-Hernández (2014) sơ bộ xác định rằng chủng nấm phân lập được (BC01) là *A. alternata*.

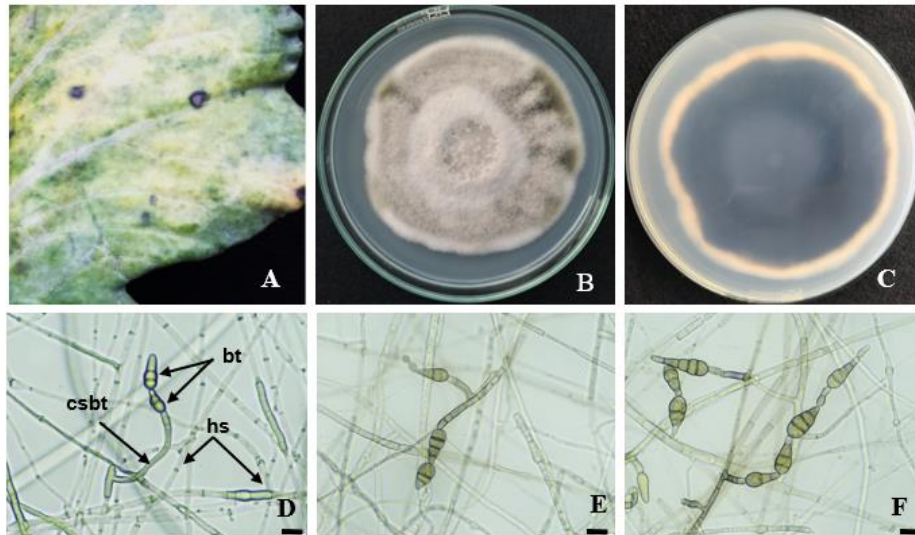
3.2. Tái lây nhiễm của chủng nấm bệnh trong điều kiện *in vivo*

Kết quả ngày thứ 3 sau khi lây nhiễm chủng nấm bệnh qua vết thương cơ giới, lá ở các cây trong công thức thí nghiệm đã xuất hiện các đốm hoạt tử màu vàng nâu tại vị trí lây nhiễm. Sau 7 ngày, các triệu chứng vết bệnh được biểu hiện rất rõ bao gồm đốm màu nâu đen có viền vàng bao quanh. Các triệu chứng quan sát được sau lây nhiễm giống với các triệu chứng ban đầu từ lá phân lập. Các lá ở công thức đối chứng đều không có triệu chứng của bệnh (Hình 2A, 2B). Đánh giá tương tác giữa nấm và thực vật là chìa khoá trong nghiên cứu xác định nấm gây bệnh trên cây ký chủ (Bhadauria & cs., 2010). Nấm *A. alternata* xâm nhập vào mô thực vật bằng nhiều con đường khác nhau như qua vết thương (Pearson & Hall, 1975), các lỗ hở tự nhiên như lỗ khí khổng (Prusky, 1996) hoặc xâm nhập trực tiếp vào mô thực vật bằng cách phá vỡ lớp biểu bì của vật chủ (Mersha & cs., 2012), tạo điều kiện cho mầm bệnh xâm nhập vào mô thực vật. Các phần mô già hoặc bị vết thương dễ bị nhiễm nấm *A. alternata* hơn các mô khoẻ (Mmbaga & cs., 2011).

Tuy nhiên, để xác định rõ hơn về sự tương tác giữa chủng nấm bệnh phân lập này trên cây bắp cải, các mẫu lá trong hai công thức được tách rời để tiến hành nhuộm trypan blue. Quan sát các mô lá sau được loại bỏ chất diệt lục dưới kính hiển vi với độ phóng đại 40 lần cho thấy các sợi nấm bệnh phát triển dày đặc trong mô lá thí nghiệm và các tế bào lá bị hoại tử xung quanh vị trí lây nhiễm (Hình 2E). Mặt khác, phần mô lá ở mẫu đối chứng phát triển bình thường, không có sự xuất hiện của hệ sợi nấm. Kết quả này đã chứng minh rằng, chủng nấm phân lập có khả năng gây bệnh bằng cách phát triển hệ sợi xâm lấn sâu vào trong mô của lá bắp cải. Hơn nữa, sự xâm lấn của hệ sợi ở chủng nấm còn được quan sát thấy cả trong các mô lá cách vết bệnh bị lây nhiễm 1cm - phần lá được

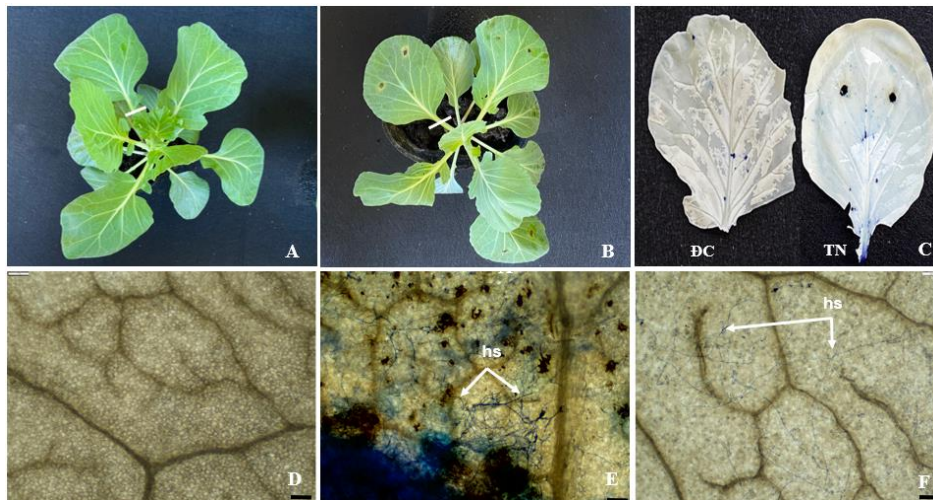
quan sát là chưa có biểu hiện của triệu chứng bệnh (Hình 2F). Phát hiện này không những cho thấy khả năng phát triển, lây lan của nấm bệnh trong mô lá bắp cải mà còn rất có ý nghĩa trong việc xác định phương pháp đánh giá mức độ

thiệt hại của loại nấm này gây ra trên bắp cải. Khi đó, cần phải phân biệt giữa thiệt hại được biểu hiện với các triệu chứng có thể nhìn thấy và thiệt hại mà không có các triệu chứng rõ ràng (Mulaosmanovic & cs., 2020).



Ghi chú: (A): Triệu chứng lá bắp cải bị bệnh thu thập trên ruộng; (B): Mặt trước, (C): Mặt sau của nấm phân lập sau 7 ngày nuôi cấy ở 25°C trên môi trường PDA; (D, E, F): Hệ sợi (hs), cuống sinh bào tử (csbt) và bào tử (bt) của nấm phân lập. Hình thái sợi nấm và bào tử nấm được quan sát dưới kính hiển vi với độ phóng đại 400 lần. Thanh tỉ lệ tương ứng 10µm.

Hình 1. Triệu chứng bệnh đốm lá trên bắp cải và đặc điểm hình thái của tác nhân gây bệnh



Ghi chú: (A): Đối chứng; (B): Thí nghiệm sau 7 ngày lây nhiễm; (C): Mẫu lá đã được nhuộm trypan blue; (D, E, F): Mô lá bắp cải sau khi nhuộm trypan blue được quan dưới kính hiển vi với độ phóng đại 40 lần. Trong đó (D) mô lá đối chứng, (E) mô lá thí nghiệm tại vị trí lây nhiễm, (F) mô lá thí nghiệm tại vị trí cách vết bệnh 1cm (phần lá chưa biểu hiện triệu chứng bệnh). Kí hiệu (hs) là hệ sợi của nấm bệnh, (-) vị trí phần lá tách rời (A, B). Thanh tỉ lệ tương ứng 100µm.

Hình 2. Khả năng lây nhiễm của chủng nấm bệnh

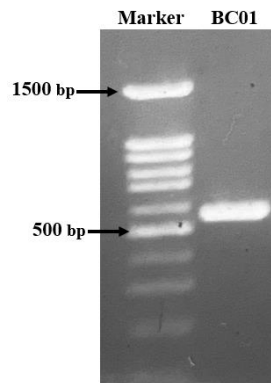
3.3. Định danh chủng nấm gây bệnh

Kết quả điện di sản phẩm PCR xuất hiện một băng DNA có kích thước trong khoảng 500-600bp phù hợp với kích thước đã công bố của White & cs. (1990) khi thiết kế cặp mồi (Hình 3).

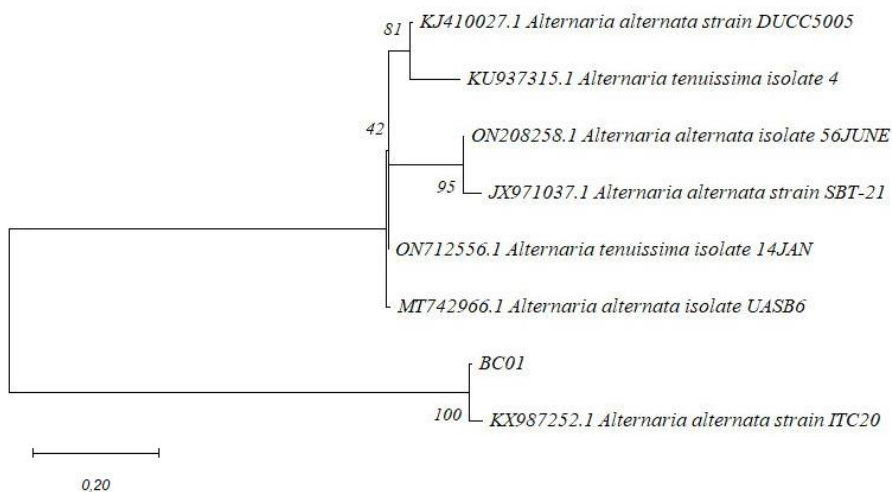
Sản phẩm PCR được gửi đi tinh sạch và giải trình tự. Kết quả trình tự nhận được so sánh với các trình tự khác đã được công bố trên ngân hàng gen bằng công cụ BLAST cho thấy, trình tự ITS của chủng nấm bệnh (BC01) có độ tương đồng trên 99% với các loài *Alternaria alternata* (ON712035.1 (99,81%), ON208242.1 (99,81%), MF422130.1 (99,64%), ON208269.1 (99,62%)). Bên cạnh đó, kết quả dựng cây phân loại dựa trên trình tự vùng ITS của chủng BC01 trong hình 4 cho thấy, chủng BC01 có mối quan hệ gần gũi nhất với chủng nấm *A. alternata* strain ITC20 (KX987252.1) với giá trị bootstrap là 100. Bên cạnh đó, các đặc điểm hình thái của chủng BC01 giống

với các đặc điểm hình thái đặc trưng của loài *A. alternata*. Do đó, loài nấm gây bệnh đốm lá trên bắp cải (*Brassica oleracea* L. var. capitata) tại Nghệ An được xác định là *A. alternata*.

A. alternata được biết đến là nấm gây bệnh đốm lá và các loại bệnh sau thu hoạch của hơn 100 loài ký chủ thực vật khác nhau (Rotem, 1994). Trong những năm gần đây, một số nghiên cứu cũng đã xác định loài *A. alternata* gây ra các bệnh về lá trên các cây họ cải. Cụ thể, *A. alternata* gây bệnh đốm lá trên cây cải thảo (*Brassica rapa* subsp. *Pekinensis*) ở Trung Quốc với tỉ lệ mắc bệnh trung bình là $99,7\% \pm 0,1$ (Shi & cs., 2021), trên cây cải dầu (*Brassica napus*) ở Australia và Ấn Độ (Al-Lami & cs., 2019; Aneja & cs., 2016). Đây là báo cáo khoa học đầu tiên xác định loài *A. alternata* gây bệnh đốm lá trên bắp cải (*Brassica oleracea* L. var. capitata) ở Việt Nam.



Hình 3. Kết quả điện di sản phẩm PCR khuếch đại vùng ITS



Hình 4. Cây phát sinh loài dựa trên trình tự ITS của chủng nấm gây bệnh

Nghiên cứu của Saharan & cs. (2016) đã chỉ ra rằng các loài *Alternaria* lây nhiễm bệnh trên cây bắp cải đều lây nhiễm vào trong hạt. Trong nghiên cứu này, bắp cải là vật chủ tự nhiên của loài *A. alternata*. Vì vậy cần nghiên cứu sâu hơn về khả năng lây nhiễm bệnh vào hạt bắp cải của loài này và khả năng gây bệnh của nó trên các cây khác nhau thuộc họ Cải. Hơn nữa, vì bắp cải và các cây thuộc họ cải được trồng hàng năm ở các vùng khác nhau (Mộc Châu, Hải Dương, Nghệ An, Đà Lạt) với điều kiện khí hậu đa dạng ở Việt Nam, nên cần mở rộng nghiên cứu ở các địa điểm khác nhau nhằm xác định sự đa dạng của loài góp phần vào kế hoạch quản lý dịch bệnh đốm lá trên bắp cải hiệu quả.

4. KẾT LUẬN

Đây là nghiên cứu đầu tiên đã phân lập và xác định được tác nhân gây bệnh đốm lá trên bắp cải (*Brassica oleracea* L. var. capitata) ghi nhận tại xã Hùng Tiến, huyện Nam Đàn, tỉnh Nghệ An là loài *A. alternata*. Kết quả của nghiên cứu này không chỉ mang tính mới mà còn cung cấp nguồn vật liệu, thông tin khoa học hướng đến chiến lược phòng trừ bệnh hại trên bắp cải theo hướng bền vững bằng biện pháp sinh học.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Alexandra S.I.M. & Andreea Daniela O.N.A. (2020). Cabbage (*Brassica oleracea* L.). Overview of the Health Benefits and Therapeutical Uses. Hop and Medicinal Plants. pp. 1-2.
- Al-Lami H.F.D., You M.P. & Barbetti M.J. (2019). Incidence, pathogenicity and diversity of *Alternaria* spp. associated with Alternaria leaf spot of canola (*Brassica napus*) in Australia. Plant Pathology. 68(3): 492-503.
- Aneja J.K., Agarwal A. & Agnihotri A. (2016). Inter and intra-specific diversity in *Alternaria* species infecting oilseed Brassicas in India. Journal of Oilseed Brassica. 1(2): 102-117.
- Anwaar H.A., Perveen R., Chohan S., Saeed A., Cheema M.T., Qadeer A. & Ali A. (2022). First report of *Alternaria alternata* causing Alternaria leaf spot of fig in Pakistan. Plant Disease. 106(2): 759.
- Bhadoria V., Miraz P., Kennedy R., Banniza S. & Wei Y. (2010). Dual trypan-aniline blue fluorescence staining methods for studying fungus-plant interactions. Biotechnic & Histochemistry. 85(2): 99-105.
- Degenhardt K.J., Petrie G.A. & Morrall R.A.A. (1982). Effects of temperature on spore germination and infection of rapeseed by *Alternaria brassicae*, *A. brassicicola*, and *A. raphani*. Canadian Journal of Plant Pathology. 4(2): 115-118.
- Dharmendra K., Neelam M., Yashwant K.B., Ajay K., Kamlesh K., Kalpana S. & Adesh K. (2014). Alternaria blight of oilseed Brassicas: A comprehensive review. African Journal of Microbiology Research. 8(30): 2816-2829.
- Ding J.J., Gu X., Yang X.H., Yao L.L., Gao X.D., Zhang M.M. & Li Y.G. (2020). First report of leaf spot of *Salvia farinacea* caused by *Alternaria alternata* in China. Plant Disease. 104(9): 2517-2517.
- Favela-González K.M., Hernández-Almanza A.Y. & De la Fuente-Salcido N.M. (2020). The value of bioactive compounds of cruciferous vegetables (*Brassica*) as antimicrobials and antioxidants: A review. Journal of Food Biochemistry. 44(10): 1-21.
- Fernández-Bautista N., Domínguez-Núñez J. A., Moreno M.M.C. & Berrocal-Lobo M. (2016). Plant tissue trypan blue staining during phytopathogen infection. Bio-protocol. 6(24): 1-7.
- Huang K., Tang J., Zou Y., Sun X., Lan J., Wang W. & Liu J. (2021). Whole genome sequence of *Alternaria alternata*, the causal agent of black spot of kiwifruit. Frontiers in Microbiology. 12: 1-13
- Köhl J., Van Tongeren C.A.M., Groenenboom-de Haas B.H., Van Hoof R.A., Driessen R. & Van Der Heijden L. (2010). Epidemiology of dark leaf spot caused by *Alternaria brassicicola* and *A. brassicae* in organic seed production of cauliflower. Plant Pathology. 59(2): 358-367.
- Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., & Tamura K. (2018). MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. Molecular Biology and Evolution. 35(6): 1547-1549.
- Maggioni L., Von Bothmer R., Poulsen G. & Branca, F. (2010). Origin and domestication of cole crops (*Brassica oleracea* L.): linguistic and literary considerations. Economic Botany. 64: 109-123.
- Mersha Z., Zhang S. & Bartz J. A. (2012). A postharvest fruit disease-black mold rot caused by *Alternaria* sp on imported plum tomatoes in South Florida. The Vegetarian Newsletter. Horticultural Sciences at University of Florida. 579: 1-3.
- Mmbaga M.T., Shi A. & Kim M.S. (2011). Identification of *Alternaria alternata* as a causal agent for leaf blight in *Syringa* species. The Plant Pathology Journal. 27(2): 120-127.
- Mourou M., Raimondo M.L., Lops F. & Carlucci A. (2023). Brassicaceae Fungal Diseases: Molecular

- Detection and Host-Plant Interaction. *Plants*. 12(5): 1033-1053.
- Mulaosmanovic E., Lindblom T. U., Bengtsson M., Windstam S.T., Mogren L., Marttila S. & Alsanus B.W. (2020). High-throughput method for detection and quantification of lesions on leaf scale based on trypan blue staining and digital image analysis. *Plant Methods*. 16(1): 1-22.
- Nowicki M., Nowakowska M., Niezgoda A. & Kozik E. (2012). *Alternaria* black spot of crucifers: symptoms, importance of disease, and perspectives of resistance breeding. *Vegetable Crops Research Bulletin*. 76: 5-19.
- Pearson R.C. & Hall D.H. (1975). Factors affecting the occurrence and severity of black mold of ripe tomato fruit caused by *Alternaria alternata*. *Phytopathology*. 57: 1352-1359.
- Poveda J., Díaz-González S., Díaz-Urbano M., Velasco P. & Sacristán S. (2022). Fungal endophytes of Brassicaceae: Molecular interactions and crop benefits. *Frontiers in Plant Science*. 13: 1-20.
- Prusky D. (1996). Pathogen quiescence in postharvest diseases. *Annual Review of Phytopathology*. 34: 413-434.
- Rotem J. (1994). The genus *Alternaria*: biology, epidemiology, and pathogenicity. American Phytopathological Society.
- Saharan G.S., Mehta N., Meena P.D. & Dayal P. (2016). *Alternaria* diseases of crucifers: biology, ecology and disease management. Springer Singapore. 87-98
- Schoch C.L., Seifert K.A., Huhndorf S., Robert V., Spouge J.L., Levesque C.A... & White M.M. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the national academy of Sciences*. 109(16): 6241-6246.
- Schoch C.L., Seifert K.A., Huhndorf S., Robert V., Spouge J.L., Levesque C.A., Chen W. & Fungal Barcoding Consortium. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode maker for Fungi. *Proceedings of the national academy of sciences*. 109(16): 6241-6246.
- Schwessinger B. & McDonald M. (2017). High quality DNA from Fungi for long read sequencing eg PacBio, Nanopore MinION V. 2. *Plant Pathology*. 22(7): 1-8.
- Shi X., Zeng K., Wang X., Liang Z. & Wu X. (2021). Characterization of *Alternaria* species causing leaf spot on Chinese cabbage in Shanxi province of China. *Journal of Plant Pathology*. 103: 283-293.
- Simmons E.G. (2007). *Alternaria*: An identification manual. CBS biodiversity series No. 6. CBS Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, the Netherlands.
- Stielow J.B., Levesque C.A., Seifert K.A., Meyer W., Irinyi L., Smits D., Renfurm R., Verkley G.J.M., Groenewald M., Chaduli D., Lomascolo A., Welti S., Lesage-Meessen L., Favel A., Al-Hatmi A.M.S., Damm U., Yilmaz N., Houbraken J., Lombard L., Quaedvlieg W., Binder M., Vaas L.A.I., Vu D., Yurkov A., Begerow D., Roehl O., Guerreiro M., Fonseca A., Samerpitak K., van Diepeningen A.D., Dolatabadi S., Moreno L.F., Casaregola S., Mallet S., Jacques N., Roscini L., Egidì E., Bizet C., Garcia-Hermoso D., Martín M.P., Deng S., Groenewald J.Z., Boekhout T., de Beer Z.W., Barnes I., Duong T.A., Wingfield M.J., de Hoog G.S., Crous P.W., Lewis C.T., Hambleton S., Moussa T.A.A, Al-Zahrani H.S., Almaghrabi O.A., Louis-Seize G., Assabgui R., McCormick W., Omer G., Dukik K., Cardinali G., Eberhardt U., de Vries M. & Robert V. (2015). One fungus, which genes? Development and assessment of universal primers for potential secondary fungal DNA barcodes. *Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*. 35(1): 242-263.
- Troncoso-Rojas R. & Tiznado-Hernández M.E. (2014). *Alternaria alternata* (black rot, black spot). In *Postharvest decay*. pp. 147-187.
- White T.J., Bruns T., Lee S.J.W.T. & Taylor J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*. 18(1): 315-322.
- Yu X., Li Z., Zhang J., Guo L., Wang X., Zhao J. & Xiang W. (2023). First Report of *Alternaria tenuissima* Causing Leaf Spot on *Luffa cylindrica* in China. *Plant Disease*. 107(1): 231.