

PHÂN LẬP VÀ NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM SINH HỌC CỦA CHỦNG NẤM *Lasiodiplodia theobromae* GÂY BỆNH CHẾT KHÔ CÀNH TRÊN NHO TẠI HÀ NỘI VÀ HƯNG YÊN

Đặng Thị Thanh Tâm, Đỗ Thúy Hiền, Nguyễn Thanh Huyền*

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

*Tác giả liên hệ: thanhhuyen@vnua.edu.vn

Ngày nhận bài: 30.08.2023

Ngày chấp nhận đăng: 25.12.2023

TÓM TẮT

Bệnh chết khô cành (dieback) là một trong những bệnh gây hại phổ biến trên nho. Bệnh do nấm thuộc họ Botryosphaeriaceae gây ra, trong số đó, *Lasiodiplodia theobromae* là loài nấm có độc lực cao nhất. Hiện nay, biện pháp xử lý bệnh này còn gặp nhiều khó khăn và chưa thực sự hiệu quả. Nghiên cứu này được thực hiện với mục đích xác định tác nhân, đặc điểm sinh học của loài nấm gây bệnh dieback trên nho tại Hà Nội và Hưng Yên, làm cơ sở để xây dựng biện pháp phòng chống bệnh hiệu quả và bền vững. Từ các mẫu nho có biểu hiện triệu chứng của bệnh dieback thu thập tại Hà Nội và Hưng Yên, 3 chủng nấm bệnh đã được phân lập và được sử dụng để lây nhiễm nhân tạo trên lá và thân cây nho. Kết quả cho thấy, chủng CK1 và DN1 có đặc điểm hình thái hệ sợi nấm, cũng như khả năng gây bệnh giống nhau, do đó chủng CK1 được tuyển chọn cho các thí nghiệm tiếp theo. Qua phương pháp định danh phân tử với cặp mồi ITS1/ITS4, chủng CK1 được xác định thuộc loài *Lasiodiplodia theobromae* và được đặt tên là *L. theobromae* CK1. Chủng *L. theobromae* CK1 thể hiện khả năng sinh trưởng tốt trên môi trường PDA, ở điều kiện nhiệt độ 35°C và pH 6-8. Ngoài ra, chủng nấm này còn có khả năng sinh tổng hợp enzyme cellulase, xylanase và pectinase.

Từ khóa: Bệnh dieback, *Lasiodiplodia theobromae*, nho.

Isolation and Characterization of *Lasiodiplodia theobromae* Strain Causing Dieback Disease on Grape in Ha Noi and Hung Yen

ABSTRACT

Dieback is one of the most common diseases on grape that is caused by fungi belonging to the Botryosphaeriaceae family. Among these fungi, *Lasiodiplodia theobromae* has been identified as the most virulent species. Unfortunately, the current treatments for this disease are still challenging and not truly effective. This study was conducted to determine the causative agent and biological characteristics of the grape dieback-causing fungus in Hanoi and Hung Yen as a basis for guiding effective measures in the prevention and treatment of dieback. From grape samples showing dieback disease collected in Hanoi and Hung Yen, three fungal strains were isolated through culture on the PDA medium and these strains were subsequently re-infected onto leaves and stems of grapes. Among them, CK1 and DN1 strains showed similar mycelial characteristics and pathogenicity. Therefore, the CK1 strain was selected for further experiments. Through the molecular identification method with the ITS1/ITS4 primer pair, the CK1 strain was confirmed as *Lasiodiplodia theobromae* and was named *L. theobromae* CK1. *L. theobromae* CK1 exhibited good growth on the PDA medium, and the optimal conditions for the strain were 35°C and a pH in the range of 6-8. In addition, during its growth, this fungal strain was also capable of producing cellulase, xylanase, and pectinase.

Keywords: Dieback, grape, *Lasiodiplodia theobromae*.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Nho (*Vitis* sp., Vitaceae) là một trong những loại cây ăn quả quan trọng có giá trị dinh dưỡng cao và được trồng ở nhiều quốc gia trên thế giới.

Theo Tổ chức Lương thực và Nông nghiệp Liên hợp quốc (FAO), sản lượng nho trên toàn thế giới đạt khoảng 75 triệu tấn mỗi năm. Trong đó, 71% nho được dùng làm nguyên liệu sản xuất rượu vang, 27% dùng tươi và 2% sấy khô (Khan & cs.,

2020). Trung Quốc, Pháp, Hoa Kỳ, Nam Phi, Ý, Chile, Iran, Thổ Nhĩ Kỳ, Tây Ban Nha và Argentina là mười quốc gia có diện tích trồng nho lớn nhất trên thế giới (Khan & cs., 2020). Gần đây, diện tích và sản lượng nho được trồng ở châu Á đang tăng dần lên. Trung Quốc, Ấn Độ, Nhật Bản, Hàn Quốc, Pakistan, Thái Lan và Việt Nam là những quốc gia có sản lượng nho đáng kể ở khu vực châu Á (FAO, 2021).

Ở Việt Nam, có nhiều vùng trồng nho, trong đó Ninh Thuận là tỉnh có diện tích trồng nhiều nhất (Le Quang Quyen & Long, 1999) với tổng sản lượng thu được hàng năm đạt khoảng 26.000-28.000 tấn nho tươi (Vietnamplus, 2023). Theo ghi nhận của Sở NN&PTNT tỉnh Ninh Thuận, năm 2023 giá trị sản xuất hàng năm của cây nho đạt 19-20% tổng giá trị sản xuất trong ngành trồng trọt (Vietnamplus, 2023). Gần đây, nhiều hộ gia đình ở một số tỉnh miền Bắc trong đó có Hà Nội và Hưng Yên cũng đã nhận ra giá trị của quả nho và bắt đầu trồng thử nghiệm loại cây này. Mặc dù chưa có thống kê chi tiết về diện tích và sản lượng nho của các hộ gia đình ở hai địa phương này, nhưng nhiều vườn nho như Chimi Farm 4 (Đông Anh, Hà Nội), vườn nho của ông Nguyễn Hữu Kỳ (Đan Phượng, Hà Nội), vườn nho sữa Hàn Quốc và nho móng tay của anh Nguyễn Văn Duy (Khoái Châu, Hưng Yên), vườn nho Hạ đen của anh Nguyễn Văn Đôn (Yên Mỹ, Hưng Yên) (Minh Sơn, 2021; Hồng Ngọc, 2022; Hồng Ngọc & Đào Hương, 2022; Phương Thảo, 2023) đã được ghi nhận là những vườn nho cho hiệu quả kinh tế cao. Có thể thấy rằng nho có giá trị kinh tế lớn, nhưng năng suất và chất lượng của cây nho ở nhiều nước đang bị giảm sút do một số bệnh hại như sương mai, thán thư, đốm lá, phấn trắng và dieback (Goldammer, 2018; Sanghavi & cs., 2021). Ở Việt Nam, việc trồng nho cũng bị ảnh hưởng nặng nề bởi các bệnh dịch. Cụ thể, Ninh Thuận là địa phương trồng nho lớn nhất cả nước với 2.000ha vào năm 1995, nhưng do tình hình phát triển của sâu bệnh hại và một số nguyên nhân khác khiến cho diện tích trồng nho của Ninh Thuận giảm sút và hiện nay Ninh Thuận đang phấn đấu đến năm 2030 diện tích này tăng lên 1.700ha (Cơ Nguyên, 2023).

Bệnh dieback là một loại bệnh xảy ra khá phổ biến trên nho đã ảnh hưởng đến nghề trồng nho trên toàn thế giới, làm giảm sút đáng kể năng suất nho (Wine-Australia, 2018). Cụ thể, ở Tây Ban Nha, tỷ lệ mắc bệnh dieback ở các vườn nho tăng từ 1,8% (2003) lên 10,5% (2007) (Rubio & Garzón, 2011); Ở Pháp, thiệt hại do bệnh dieback gây ra khoảng 1 tỷ euro mỗi năm (Fontaine & cs., 2016). Loài nấm *Lasiodiplodia theobromae* được xác định là một tác nhân gây bệnh dieback với độc lực cao trên nho. Ban đầu nấm xâm nhập vào hệ thống mạch của nho chủ yếu qua vết thương và gây ra vết loét và hoại tử, từ đó khiến cây nho chậm phát triển và chết (Rangel & cs., 2021). Cây nho khi bị nhiễm nấm *L. theobromae* có các triệu chứng điển hình như: hồng chồi, lá héo úa, cành và thân bị hoại tử hoặc chết khô (Larignon, 2001; Rodríguez-Gálvez & cs., 2015). Hiện nay, có nhiều biện pháp phòng trừ bệnh hại trên cây nho nhưng biện pháp sử dụng thuốc hóa học được áp dụng rộng rãi do có tác dụng nhanh (Wine-Australia, 2018). Tuy nhiên, việc sử dụng thuốc hóa học lâu dài gây ra những hậu quả nghiêm trọng cho sức khỏe. Hơn nữa, các nghiên cứu về bệnh dieback do nấm *L. theobromae* gây ra trên nho còn khá hạn chế. Do đó, nghiên cứu này được thực hiện nhằm đánh giá các đặc tính của chủng nấm *L. theobromae* gây bệnh chết khô cành (dieback) và cung cấp thông tin hữu ích để tìm ra giải pháp khắc phục mức độ ảnh hưởng của bệnh, cũng như duy trì giá trị dinh dưỡng của nho và không làm ảnh hưởng đến sức khỏe của người tiêu dùng.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Mẫu lá và cành của cây nho bị bệnh được thu thập từ khu vực trồng nho thuộc tỉnh Hưng Yên và Hà Nội với các triệu chứng điển hình của bệnh dieback như lá héo úa và xuất hiện các đốm màu nâu, cây phát triển còi cọc, chồi non và cành bên chết khô, thân hoặc cành bên bị thối mục (Larignon, 2001; Rodríguez-Gálvez & cs., 2015).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Thu nhập mẫu nho bệnh và phân lập nấm

Mẫu nho bệnh có biểu hiện của bệnh dieback được thu thập và chuyển về phòng thí nghiệm Bộ môn Công nghệ vi sinh, Khoa Công nghệ sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam để thực hiện thí nghiệm phân lập nấm gây bệnh.

Mẫu bệnh được rửa sạch bằng nước máy, khử trùng bề mặt bằng dung dịch NaOCl 2,5% trong 2 phút và rửa lại bằng nước cất vô trùng 3 lần, sau đó đặt trên giấy thấm đã hấp khử trùng để làm khô các mẫu bệnh. Tiếp theo, mẫu bệnh được đặt trên môi trường PDA, ủ ở 30°C trong 3 ngày. Quan sát sự xuất hiện tản nấm và cấy chuyển hệ sợi nhiều lần trên môi trường PDA mới để làm thuần (Rodríguez-Gálvez & cs., 2015). Các chủng nấm sau đó được bảo quản ở điều kiện 4°C để thực hiện các nghiên cứu tiếp theo.

2.2.2. Phương pháp lây nhiễm nhân tạo

Các chủng nấm phân lập được được lây nhiễm nhân tạo trên lá và cành nho nhằm kiểm tra khả năng gây bệnh dieback của chúng theo phương pháp của (Suwannarach & cs., 2013). Lá và cành nho khỏe mạnh được rửa sạch bằng nước máy, khử trùng bằng dung dịch NaOCl 2,5% trong 2 phút và rửa lại bằng nước cất vô trùng 3 lần. Sau đó, tạo vết thương trên các mẫu nho khỏe mạnh và đặt khối thạch nấm có đường kính 5mm lên. Đối với mẫu đối chứng, thí nghiệm được thực hiện tương tự, tuy nhiên chỉ đặt môi trường PDA không chứa nấm lên vị trí đã được tạo vết thương cơ giới. Các mẫu sau khi thực hiện lây nhiễm được đặt trong hộp có chứa giấy lọc vô trùng đã làm ẩm, ủ ở 30°C trong 5-7 ngày. Quan sát lá và cành nho từng ngày để đánh giá khả năng gây bệnh của các chủng nấm. Nếu thấy xuất hiện hiện tượng lá bị héo úa, đồng thời tại các vị trí thực hiện tái lây nhiễm cũng như các mạch thân bị hoại tử và xuất hiện hệ sợi nấm thì có thể kết luận chủng nấm nghiên cứu gây ra bệnh dieback.

Các mẫu lá và cành nho sau khi thực hiện lây nhiễm nhân tạo có các biểu hiện đặc trưng

của bệnh dieback được sử dụng để phân lập nhằm tìm ra tác nhân gây bệnh. Sau đó, so sánh các đặc điểm của tác nhân gây bệnh này với các chủng nấm sử dụng trước khi lây nhiễm nhân tạo, từ đó có thể khẳng định chính xác chủng nấm gây bệnh dieback trên nho.

2.2.3. Xác định các đặc điểm hình thái nấm

Đặc điểm hình thái của chủng nấm được xác định theo phương pháp của (Oyeleke & Manga, 2008). Khối thạch nấm có đường kính 5mm lấy từ tản nấm sau khi nuôi cấy 5 ngày được đặt vào giữa đĩa petri chứa môi trường PDA và ủ ở 30°C trong 20 ngày. Hình thái sợi nấm và bào tử nấm sau đó được quan sát dưới kính hiển vi quang học.

2.2.4. Định danh chủng nấm gây bệnh

Chủng nấm được nuôi trên môi trường PDB ở 30°C trong 3 ngày, rồi thu sinh khối để tách chiết DNA tổng số theo mô tả của (Masoomi-Aladizgeh & cs., 2016). Sản phẩm DNA được khuếch đại bằng phản ứng PCR sử dụng cặp môi ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') và ITS4 (5'-TCCTCCGCTTTAT TGATATGC-3') (White & cs., 1990). Sản phẩm PCR được gửi đến công ty First BASE (Singapore) để đọc trình tự. Trình tự nucleotide mã hóa vùng ITS1/ITS4 của chủng nấm nghiên cứu được kiểm tra mức độ tương đồng với trình tự nucleotide mã hóa vùng ITS1/ITS4 của các chủng nấm khác đã được công bố trên ngân hàng cơ sở dữ liệu Genbank-NCBI bằng công cụ BLAST. Sau đó, cây phát sinh loài được xây dựng dựa trên mối quan hệ di truyền của chủng nghiên cứu sử dụng phần mềm MEGA X.

2.2.5. Ảnh hưởng của điều kiện nuôi cấy đến sự sinh trưởng của nấm

Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy: Chủng nấm tuyển chọn được nuôi cấy trên các môi trường khác nhau (PDA, SDA, MEA và WA) và ủ ở 30°C. Quan sát và xác định đường kính tản nấm, mật độ hệ sợi trên các môi trường nghiên cứu khác nhau nhằm tìm ra môi trường nuôi cấy thích hợp cho sự sinh trưởng của chủng nấm nghiên cứu (Wesley, 2020).

Ảnh hưởng của pH và nhiệt độ nuôi cấy: Chủng nấm tuyển chọn được nuôi cấy trên môi trường thích hợp với các giá trị pH môi trường khác nhau là 4, 5, 6, 7, 8, 9 và 10 (Latha & cs., 2013), ủ ở các điều kiện nhiệt độ khác nhau (10°C, 15°C, 20°C, 25°C, 30°C, 35°C, 40°C) (Lumínare & cs., 2021). Quan sát và xác định đường kính tản nấm, mật độ hệ sợi nhằm tìm ra pH và nhiệt độ nuôi cấy thích hợp cho sự sinh trưởng của chủng nấm nghiên cứu.

2.2.6. Xác định khả năng sinh enzyme ngoại bào

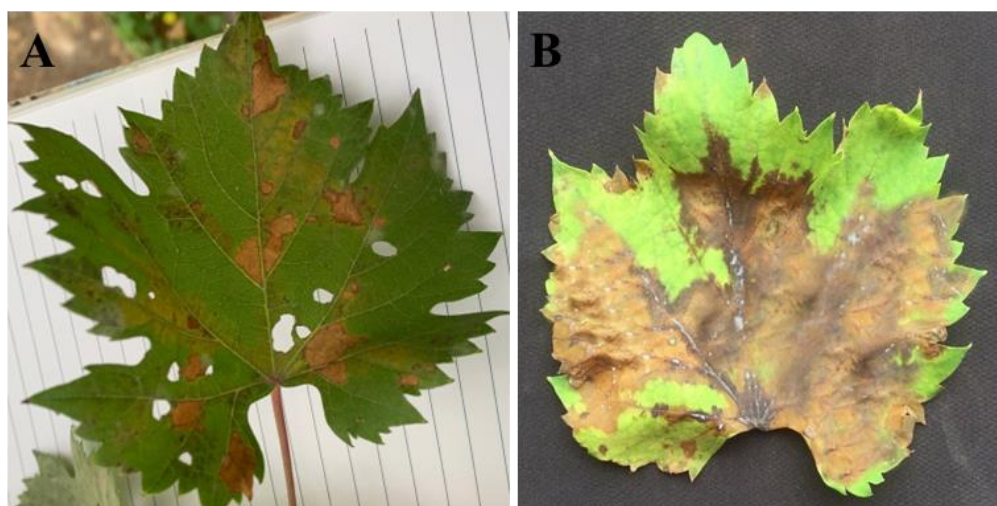
Chủng nấm được đánh giá khả năng sinh enzyme ngoại bào bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch với các cơ chất tương ứng (CMC-cellulase, xylan-xylanase và pectin-pectinase). Chủng nấm được nuôi lỏng trong môi trường PDB với tốc độ lắc 200 vòng/phút ở 30°C trong 5 ngày. Sau đó, dịch nuôi cấy được thu nhận và ly tâm với tốc độ 10.000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C. Nhỏ 100µl dịch sau ly tâm vào các giếng thạch trên đĩa môi trường có chứa cơ chất và ủ ở 30°C trong 24 giờ. Nhuộm các đĩa thí

nghiệm bằng dung dịch lugol 1%. Vùng cơ chất bị phân giải sẽ tạo vòng sáng trong suốt xung quanh giếng thạch (Kasana & cs., 2008). Đối với thí nghiệm đối chứng, nước cất được sử dụng để nhỏ vào các giếng thạch thay vì dịch nuôi cấy nấm.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân lập nấm gây bệnh dieback trên nho

Từ những mẫu nho có triệu chứng bệnh dieback được thu thập ở Hà Nội và Hưng Yên (Hình 1), 03 chủng nấm (CK1, DN1 và DN2) được phân lập (Bảng 1). Trong đó, chủng nấm CK1, DN1 có hệ sợi dày, khuẩn lạc bông xốp màu trắng sau đó chuyển dần sang màu xám và cuối cùng chuyển sang màu nâu đen; Chủng nấm DN2 cũng có hệ sợi dày nhưng khuẩn lạc ở dạng bông mịn màu trắng sau đó chỉ chuyển dần sang xám (Hình 2). Cả ba chủng nấm có tản nấm hình tròn và đường kính tản nấm tăng dần theo từng ngày.

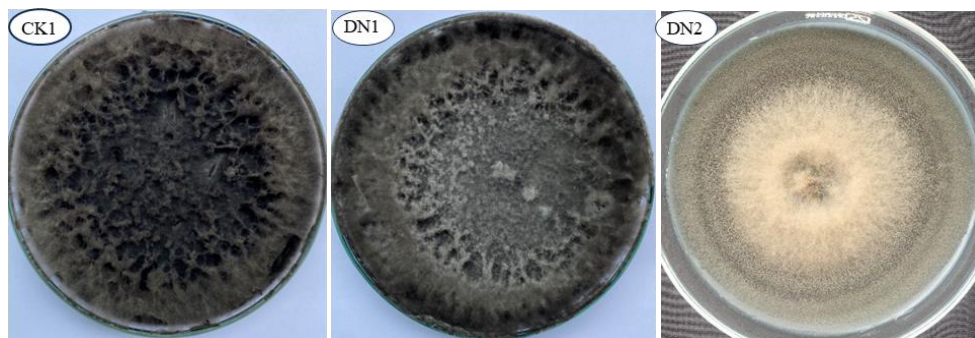


Ghi chú: A: Mẫu bệnh tại Hà Nội; B: Mẫu bệnh tại Hưng Yên.

Hình 1. Hình ảnh mẫu lá nho nhiễm bệnh dieback thu thập được

Bảng 1. Bảng kết quả phân lập nấm từ các mẫu nho nhiễm bệnh dieback

Địa điểm thu thập mẫu	Chủng
Hà Nội	DN1, DN2
Hưng Yên	CK1



Hình 2. Hình ảnh tản nấm CK1, DN1 và DN2 trên môi trường PDA sau 20 ngày nuôi cấy

Chủng nấm CK1, DN1 và DN2 được kiểm tra khả năng gây bệnh dieback trên lá và cành nho khỏe mạnh thông qua việc lây nhiễm nhân tạo. Quan sát kết quả lây nhiễm qua từng ngày có thể thấy rằng, chủng CK1 và DN1 gây ra những triệu chứng của bệnh dieback trên cả lá và cành nho. Sau 5 ngày lây nhiễm nhân tạo, sợi nấm bắt đầu phát triển trên cành, còn lá có biểu hiện bị héo và ở vị trí đặt nấm chuyển sang màu nâu. Vết bệnh lan rộng theo thời gian và ở ngày thứ 7, nấm mọc trên toàn bộ cành nho, sợi nấm bông xốp có màu nâu đen, lá có biểu hiện úa và bắt đầu bị thối ở khu vực gân lá. Trong khi đó, chủng nấm DN2 không gây ra các triệu chứng của bệnh dieback trong 7 ngày thực hiện tái lây nhiễm. Các mẫu nho ở thí nghiệm đối chứng không xảy ra bất kỳ triệu chứng nào trong suốt thời gian thực hiện thí nghiệm (Hình 3). Trong thí nghiệm tương tự của các tác giả Alsaadoon & cs. (2012); Rodríguez-Gálvez & cs. (2015) cũng khẳng định nấm *L. theobromae* gây bệnh dieback có dạng sợi bông, hệ sợi dày và khuẩn lạc có màu trắng sau đó chuyển sang màu xám, cuối cùng chuyển thành màu nâu đen. Khi bị nhiễm nấm, cây nho xuất hiện hiện tượng rụng chồi, úa lá, và các mạch thân bị hoại tử. Như vậy, chủng nấm CK1 và DN1 có các đặc điểm hình thái và khả năng gây bệnh dieback giống nhau, do đó chủng CK1 được lựa chọn để thực hiện các thí nghiệm tiếp theo.

3.2. Đặc điểm hình thái của chủng nấm phân lập được

Chủng nấm CK1 được nuôi cấy trên môi trường PDA ở 30°C trong 20 ngày, sợi nấm phát

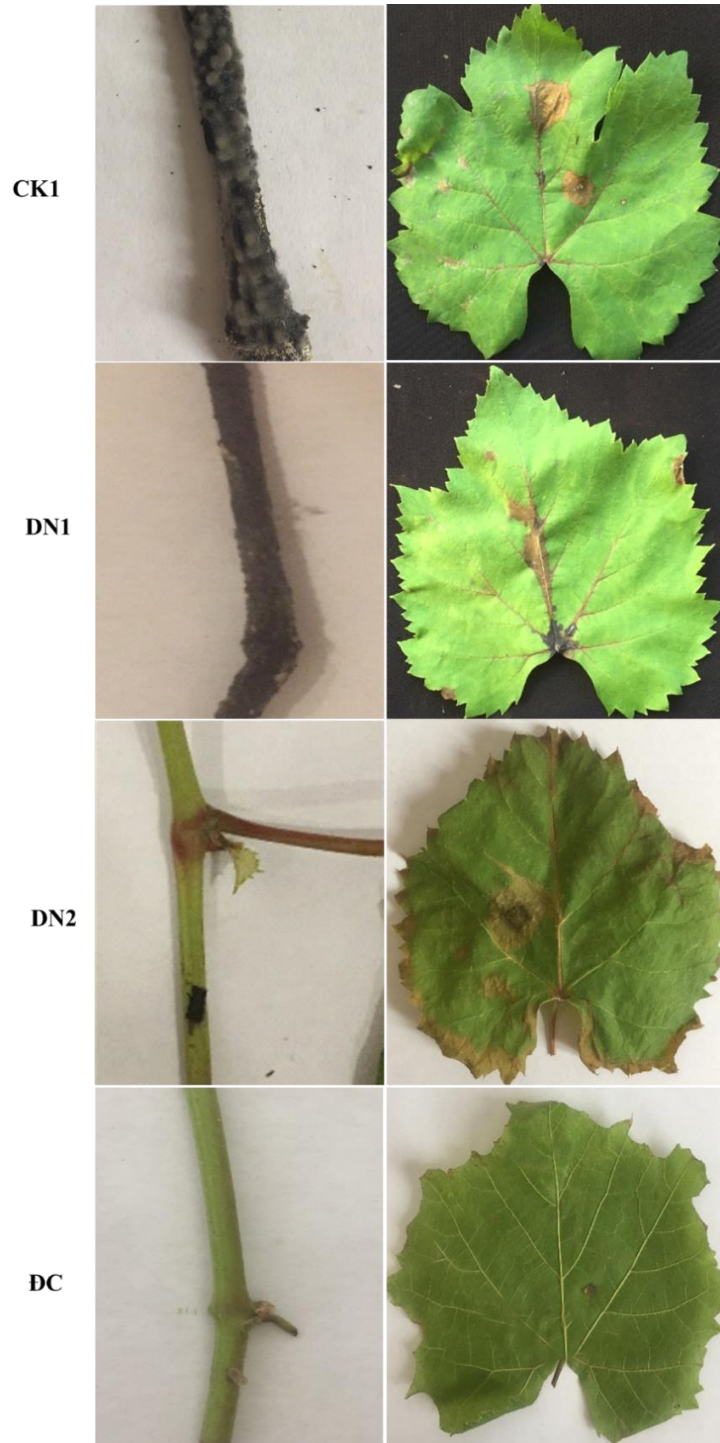
triển nhanh, bao phủ toàn bộ bề mặt môi trường. Hệ sợi phân nhánh, có vách ngăn được hình thành sau 1 ngày nuôi cấy (Hình 4D), hệ sợi mọc phủ kín đĩa petri có đường kính 90mm sau 3 ngày nuôi cấy. Sợi nấm ban đầu có màu trắng, rồi chuyển sang màu xám và sau đó chuyển thành màu nâu đen (Hình 4A - C). Hình ảnh bào tử được quan sát và ghi nhận bằng kính hiển vi quang học ở độ phóng đại 100x sau 16-18 ngày nuôi cấy (Hình 4E, F). Bào tử có hình elip, ban đầu bào tử có thành màu trắng, vách mỏng, sau đó khi bào tử trưởng thành có màu nâu sẫm đến đen, vách ngăn dày ở chính giữa. Kết quả này tương đồng với kết quả nghiên cứu của (Alsaadoon & cs., 2012; Yan & cs., 2013), nấm *L. theobromae* gây bệnh dieback trên nho có đặc điểm hệ sợi cũng như bào tử giống với chủng CK1. Gnanesh & cs. (2022) cũng khẳng định, *L. theobromae* có đặc điểm hệ sợi giống với chủng CK1 và sau 15-20 ngày có thể quan sát thấy hình thái bào tử hình elip có vách mỏng và màu nâu sẫm (Gnanesh & cs., 2022). Như vậy, bước đầu có thể xác định được, chủng nấm CK1 thuộc loài *L. theobromae*.

3.3. Định danh chủng nấm CK1

Chủng CK1 được nuôi cấy trên môi trường PDA ở 30°C, thu sinh khối, tách chiết DNA và khuếch đại trình tự nucleotide sử dụng cặp môi ITS1/ITS4. Sau khi so sánh với các trình tự nucleotide của các chủng nấm đã được công bố trên ngân hàng cơ sở dữ liệu Genbank-NCBI và xây dựng cây phân loại dựa trên mối quan hệ di truyền này có thể thấy rằng, chủng CK1 nằm cùng nhánh với chủng *Lasiodiplodia*

theobromae strain MG54-1 với giá trị tin cậy bootstrap là 100% và có mức độ tương đồng 99,80% với trình tự vùng ITS rDNA gene của chủng *L. theobromae* strain MG54-1 (Hình 5). Trong nghiên cứu tương tự, (Alsaadoon & cs.,

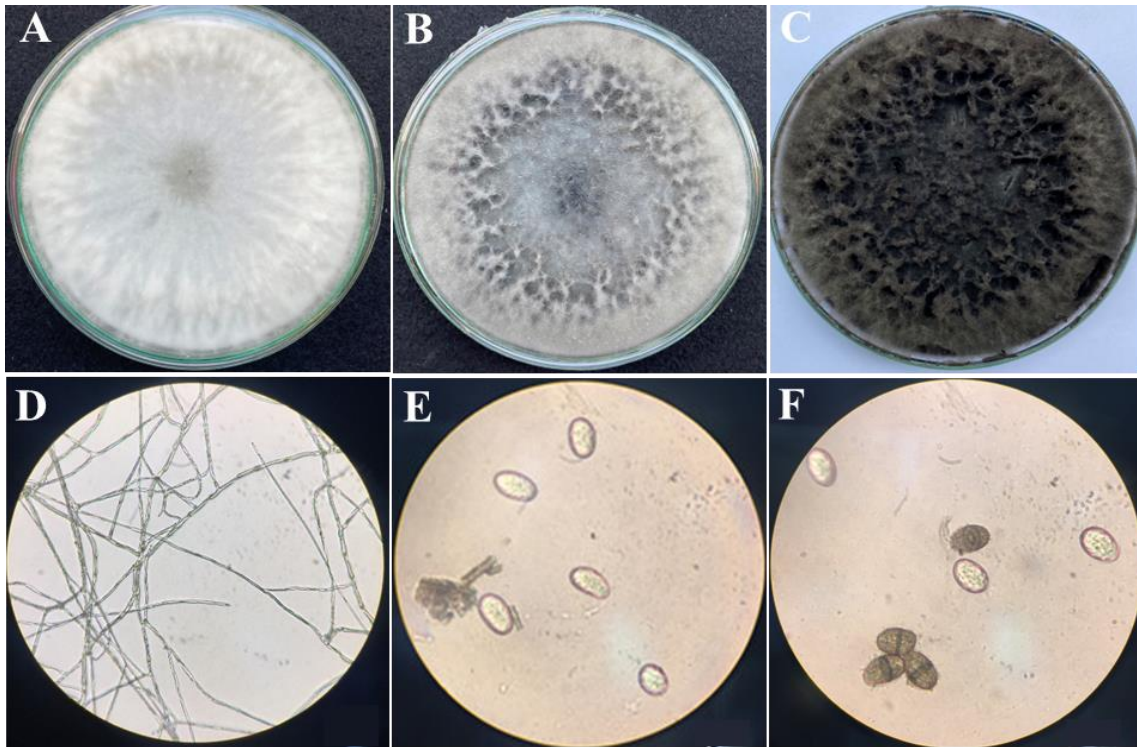
2012; Rodríguez-Gálvez & cs., 2015) cũng đã xác định được, chủng nấm *L. theobromae* là tác nhân gây bệnh dieback trên nho. Như vậy, chủng nấm CK1 thuộc loài *L. theobromae* và được đặt tên là *L. theobromae* CK1.



Ghi chú: DC: Đối chứng.

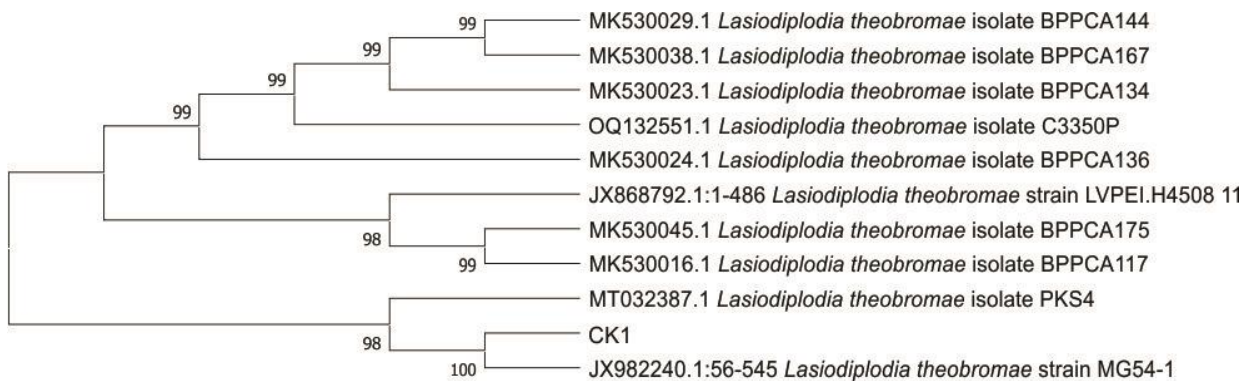
Hình 3. Hình ảnh tái lây nhiễm của các chủng nấm phân lập được sau 7 ngày

Phân lập và nghiên cứu đặc điểm sinh học của chủng nấm *Lasiodiplodia theobromae* gây bệnh chết khô cành trên nho tại Hà Nội và Hưng Yên



Ghi chú: A, B, C: Hình ảnh tản nấm (3, 7, 20 ngày nuôi cấy), B: Hệ sợi nấm (1 ngày nuôi cấy), C: Bào tử chưa trưởng thành (16 ngày nuôi cấy), D: Bào tử trưởng thành (18 ngày nuôi cấy).

Hình 4. Đặc điểm hình thái của chủng nấm CK1



Hình 5. Cây phát sinh loài của chủng nấm CK1

3.4. Ảnh hưởng của điều kiện nuôi cấy đến sự sinh trưởng của chủng *L. theobromae* CK1

Môi trường, nhiệt độ và pH nuôi cấy có ảnh hưởng rất lớn đến sự sinh trưởng của nấm. Do đó, trong nghiên cứu này, việc xác định điều kiện nuôi cấy thích hợp của chủng *L. theobromae* CK1 có thể cung cấp những thông tin hữu ích cho các nghiên cứu tiếp theo nhằm tìm ra biện pháp phòng và điều trị các bệnh thực vật hiệu quả.

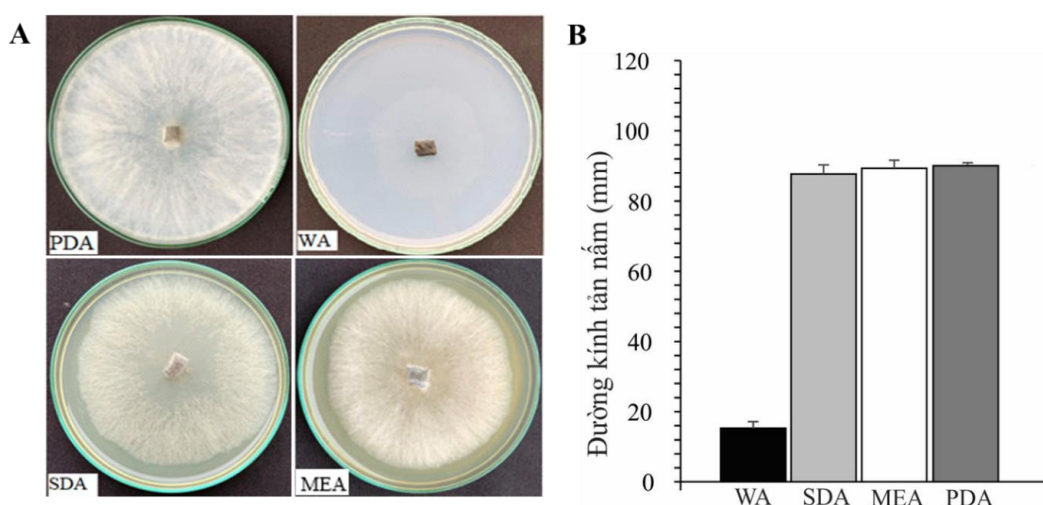
3.4.1. Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến sự sinh trưởng của chủng *L. theobromae* CK1

Chủng nấm *L. theobromae* CK1 được nuôi trên 4 môi trường khác nhau ở 30°C. Kết quả cho thấy, chủng *L. theobromae* CK1 đều có khả năng phát triển trên cả 4 môi trường khảo sát. Trên môi trường PDA, chủng nấm CK1 phát triển tốt nhất, hệ sợi nấm mọc phủ kín đĩa petri với đường kính 90 mm sau 3 ngày nuôi cấy. Mật

độ hệ sợi dày, dạng bông xốp và phát triển mạnh. Trên môi trường SDA và MEA, chủng nấm *L. theobromae* CK1 phát triển chậm hơn với đường kính tản nấm lần lượt là $86,87 \pm 1,51$ mm và $83,83 \pm 1,23$ mm sau 3 ngày nuôi cấy. Mật độ hệ sợi thưa hơn và kém bông xốp hơn trên môi trường PDA. Trên môi trường WA, chủng nấm nghiên cứu phát triển kém nhất với đường kính tản nấm là $15,33 \pm 1,46$ mm. Mật độ hệ sợi rất thưa thớt và khó quan sát được (Hình 6A-B). Những nghiên cứu trước đây đã chứng minh môi trường nuôi cấy có ảnh hưởng tới tốc độ phát triển và hình thái khuẩn lạc của các chủng nấm. Cụ thể, trong nghiên cứu của Saha & cs. (2008) và Latha & cs. (2013) đã cho thấy, nấm *L. theobromae* gây bệnh dieback trên nho cũng có đặc điểm sinh trưởng khác nhau trên các môi trường khác nhau, nấm phát triển tốt nhất trên môi trường PDA. Trong nghiên cứu của Alsaadoon & cs. (2012); Rodríguez-Gálvez & cs. (2015) cũng sử dụng môi trường PDA để thực hiện các nghiên cứu liên quan đến nấm *L. theobromae*. Môi trường WA chỉ bao gồm nước cất và agar nên có thể là lý do chủng nấm CK1 mọc rất yếu (Latha & cs., 2013). Như vậy, dựa trên những đánh giá về tốc độ phát triển và mật độ hệ sợi nấm, có thể thấy chủng nấm *L. theobromae* CK1 phát triển tốt nhất trên môi trường PDA và môi trường PDA được sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo.

3.4.2. Ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi cấy đến phát triển của chủng *L. theobromae* CK1

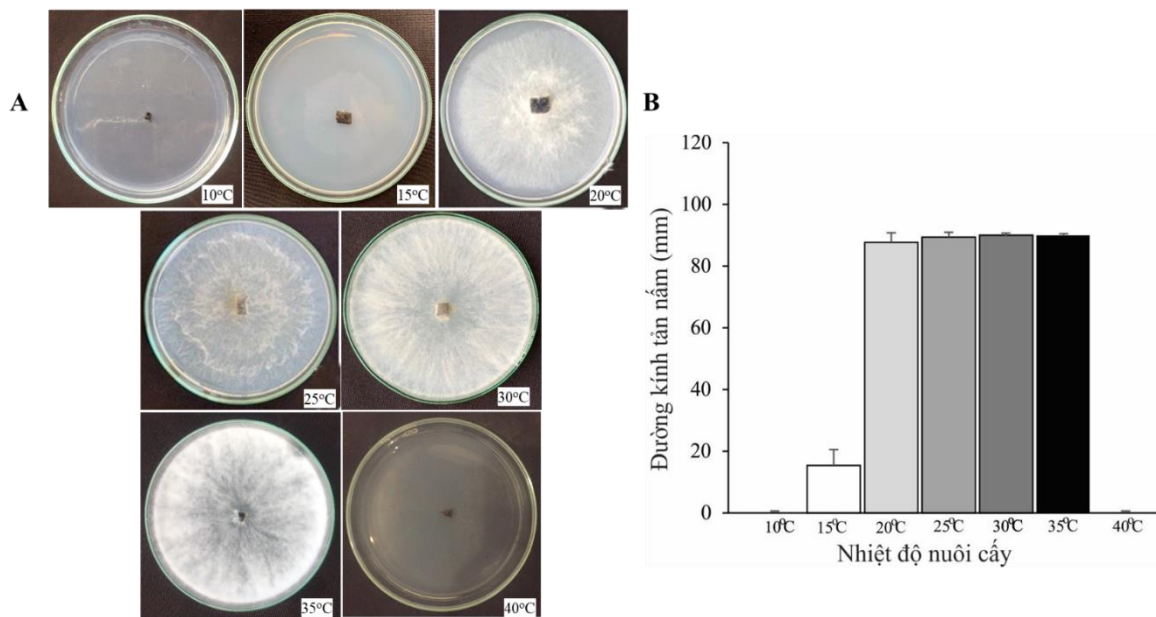
Chủng nấm *L. theobromae* CK1 được nuôi trên môi trường PDA và ủ ở các nhiệt độ khác nhau (10, 15, 20, 25, 30, 35 và 40°C). Sau 3 ngày nuôi cấy, quan sát thấy tốc độ phát triển của chủng nấm là khác nhau. Cụ thể, chủng nấm CK1 có khả năng phát triển trong khoảng nhiệt độ từ 15-35°C với đường kính tản nấm lần lượt là $15,7 \pm 2,36$ mm (15°C) $87,73 \pm 1,46$ mm (20°C), $89,3 \pm 0,61$ mm (ở 25°C), 90mm (30-35°C) (Hình 7B). Tuy nhiên, hệ sợi nấm phát triển nhanh và mạnh nhất ở điều kiện 30-35°C, sợi nấm bắt đầu hình thành sau 1 ngày, sau 3 ngày chủng nấm này mọc kín đĩa, mật độ hệ sợi dày và khuẩn lạc có dạng bông trắng (Hình 7A). Trong đó, mật độ hệ sợi khi nuôi cấy chủng CK1 ở điều kiện 35°C dày hơn ở điều kiện 30°C. Ở 10°C và 40°C, chủng nấm này phát triển kém và thậm chí không phát triển (Hình 7A). Tương tự như vậy Félix & cs. (2018) khẳng định, nấm *L. theobromae* phát triển tốt trong khoảng nhiệt độ từ 25-37°C và nhiệt độ tối ưu cho sự sinh trưởng của nấm *L. theobromae* là 30°C. Trong nghiên cứu của mình, Saha & cs. (2008) lại cho rằng, nấm *L. theobromae* sinh trưởng tốt nhất ở 28°C và ở 40°C nấm không phát triển. Đồng thời, theo Alves & cs. (2008), ở 10°C nấm *L. theobromae* cũng không phát triển.



Ghi chú: A: Hình ảnh hệ sợi của chủng CK1; B: Đường kính tản nấm CK1.

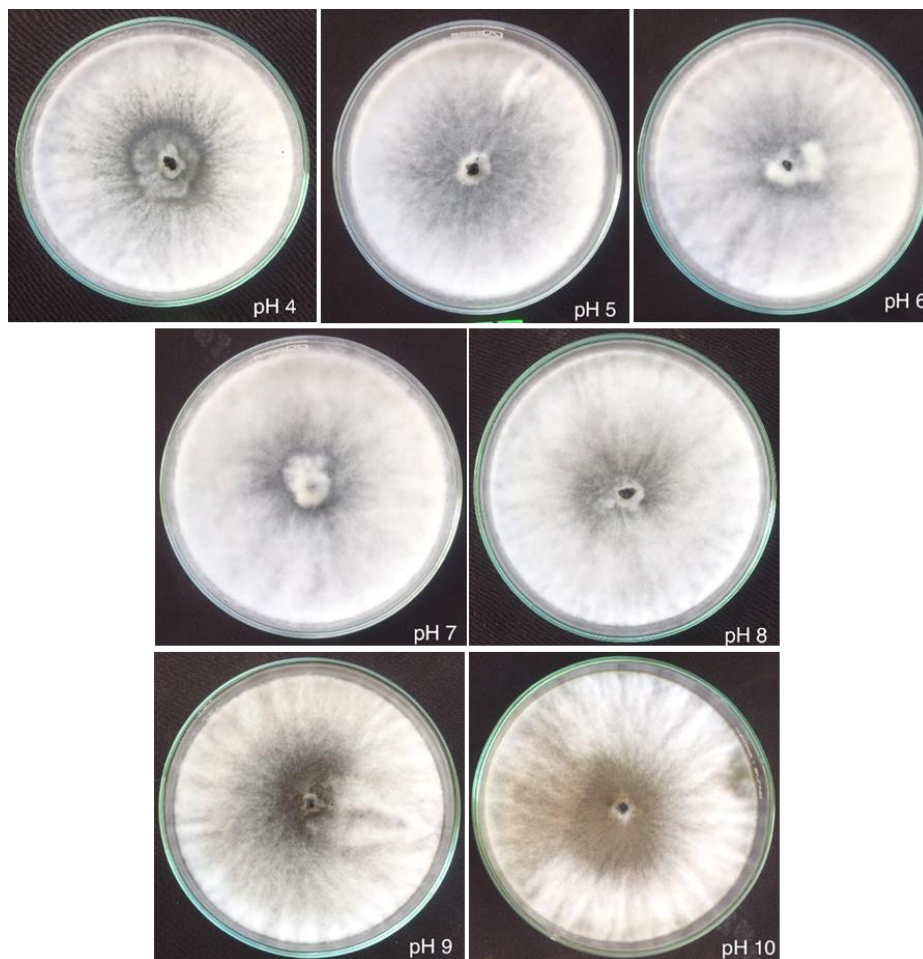
Hình 6. Sự phát triển của chủng CK1 trên các môi trường khác nhau sau 3 ngày nuôi cấy

Phân lập và nghiên cứu đặc điểm sinh học của chủng nấm *Lasiodiplodia theobromae* gây bệnh chết khô cành trên nho tại Hà Nội và Hưng Yên

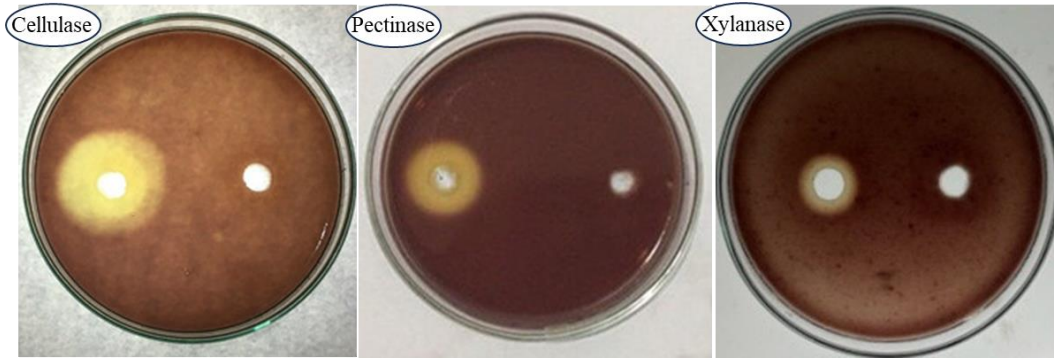


Ghi chú: A: Hình ảnh hệ sợi của chủng CK1; B: Đường kính tán nấm CK1.

Hình 7. Sự phát triển của chủng CK1 ở các nhiệt độ khác nhau sau 3 ngày nuôi cấy



Hình 8. Sự phát triển của chủng CK1 ở các điều kiện pH khác nhau sau 3 ngày nuôi cấy



Ghi chú: Ở mỗi đĩa petri - Giếng bên trái chứa dịch nuôi cấy chủng nấm CK1; Giếng bên phải chứa môi trường PDB (Đối chứng).

Hình 9. Khả năng sinh enzyme ngoại bào của chủng nấm *L. theobromae* CK1

3.4.3. Ảnh hưởng của pH môi trường nuôi cấy đến sự sinh trưởng của chủng *L. theobromae* CK1

Chủng nấm *L. theobromae* CK1 được nuôi trên môi trường PDA với các điều kiện pH khác nhau (4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) ở 35°C. Sau 3 ngày nuôi cấy, tốc độ sinh trưởng của chủng nấm là không khác nhau quá nhiều và hệ sợi đều mọc kín đĩa (90mm). Cụ thể, chủng nấm đều có khả năng phát triển trong khoảng pH từ 4-10; ở pH 6, 7 và 8, chủng nấm phát triển nhanh và mật độ hệ sợi dày; chủng nấm *L. theobromae* CK1 phát triển kém hơn trong môi trường với pH 9 và 10 (Hình 8). Tương tự, nghiên cứu của Latha & cs. (2013) đã khẳng định, nấm *L. theobromae* phát triển tốt trong khoảng pH từ 5-9 và ở pH 7 chủng nấm phát triển tốt nhất. Saha & cs. (2008) cũng cho rằng, nấm *L. theobromae* phát triển được trong khoảng pH từ 3-8, ở pH 6 chủng nấm phát triển tốt nhất.

3.5. Khả năng sinh enzyme ngoại bào của chủng nấm *L. theobromae* CK1

Trong nghiên cứu này, chủng nấm *L. theobromae* CK1 được xác định là có khả năng sinh tổng hợp một số loại enzyme như cellulase, xylanase và pectinase thông qua việc quan sát vòng phân giải trên các cơ chất đặc trưng cho từng loại enzyme (Hình 9). Theo Gibson & cs. (2011), để có thể xâm nhập vào vật chủ và gây bệnh trên đối tượng vật chủ đó, các chủng nấm gây bệnh thực vật thường sản xuất

ra các enzyme có chức năng phân hủy thành tế bào. Những enzyme này đặc biệt quan trọng đối với các nấm gây bệnh không có cấu trúc xâm nhập chuyên biệt. Do đó, việc nghiên cứu và xác định khả năng phân giải enzyme của chủng nấm *L. theobromae* CK1 có thể cung cấp những thông tin liên quan đến cơ chế gây bệnh để từ đó xây dựng được biện pháp phòng và điều trị bệnh dieback do nấm *L. theobromae* gây ra. Tương tự như vậy, Félix & cs. (2018) đã thực hiện nghiên cứu và cũng khẳng định rằng, nấm *L. theobromae* có khả năng sinh tổng hợp nhiều loại enzyme ngoại bào như amylase, gelatinase, cellulase, lipase, xylanase và pectinase.

4. KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, từ các mẫu nho có biểu hiện bệnh dieback thu thập tại Hà Nội và Hưng Yên, 03 chủng nấm đã được phân lập, trong đó chủng nấm CK1 và DN1 có đặc điểm hình thái giống nhau và giống với nấm *L. theobromae*, đồng thời chúng cũng có khả năng gây ra các triệu chứng của bệnh dieback thông qua thí nghiệm lây nhiễm nhân tạo khá giống nhau. Do đó, chủng CK1 được tuyển chọn cho các thí nghiệm tiếp theo. Chủng CK1 được xác định nằm cùng nhánh với chủng *Lasiodiplodia theobromae* strain MG54-1 với giá trị tin cậy bootstrap là 100% và mức độ tương đồng 99,80% với trình tự vùng ITS rDNA gene của chủng *L. theobromae* strain MG54-1. Do đó, chủng CK1 được đặt tên là

L. theobromae CK1. Chủng *L. theobromae* CK1 sinh trưởng tốt trên môi trường PDA ở 35°C, pH 6-8. Ngoài ra, chủng nấm này cũng thể hiện khả năng sinh enzyme cellulase, pectinase và xylanase.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Alsaadoon A., Khalaf M., A.Hameed M., Al-Badran A. & Ali Z. (2012). First report of grapevine dieback caused by *Lasiodiplodia theobromae* and *Neoscytalidium dimidiatum* in Basrah, Southern Iraq. *African Journal of Biotechnology*. 11(95): 16165-16171.
- Alves A., Crous P., Correia A. & Phillips A. (2008). Morphological and molecular data reveal cryptic species in *Lasiodiplodia theobromae*. *Fungal diversity*. 28.
- Cơ Nguyên (2023). Ninh Thuận: Hội thảo phát triển giá trị cây nho và sản phẩm từ nho năm 2023. Truy cập từ <https://khuyennongvn.gov.vn/hoat-dong-khuyen-nong/thong-tin-huan-luyen/ninh-thuan-hoi-thao-phat-trien-gia-tri-cay-nho-va-san-pham-tu-nho-nam-2023-22561.html> ngày 25/12/2023.
- FAO (2021). FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy. <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>, truy cập ngày 30/8/2023.
- Félix C., Libório-Ramos S., Nunes M., Félix R., Duarte A., Alves A. & Esteves A. (2018). *Lasiodiplodia theobromae* as a Producer of Biotechnologically Relevant Enzymes. *International Journal of Molecular Sciences*. 19.
- Fontaine F., Gramaje D., Armengol J., Smart R., Nagy Z. A., Borgo M., Rego C. & Corio-Costet M.F. (2016). Grapevine trunk diseases. A review. OIV publications.
- Gibson D.M., King B.C., Hayes M.L. & Bergstrom G.C. (2011). Plant pathogens as a source of diverse enzymes for lignocellulose digestion. *Current Opinion Microbiology*. 14(3): 264-70.
- Gnanesh B.N., Arunakumar G.S., Tejaswi A., Supriya M., Manojkumar H.B. & Devi S.S. (2022). Characterization and Pathogenicity of *Lasiodiplodia theobromae* Causing Black Root Rot and Identification of Novel Sources of Resistance in Mulberry Collections. *Plant Pathol J*. 38(4): 272-286.
- Goldammer T. (2018). *Grape Grower's Handbook: A Guide to Viticulture for Wine Production*. Apex. 482.
- Hồng Ngọc (2022) Khởi nghiệp từ trồng nho sữa Hàn Quốc. Truy cập từ <https://baohungyen.vn/khoi-nghiep-tu-trong-nho-sua-han-quoc-3869.html> ngày 30/8/2023.
- Hồng Ngọc & Đào Hương (2022) Thành công bước đầu trồng nho Hạ đen. Truy cập từ <https://baohungyen.vn/thanh-cong-buoc-dau-trong-nho-ha-den-4330.html> ngày 30/8/2023.
- Kasana R.C., Salwan R., Dhar H., Dutt S. & Gulati A. (2008). A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using gram's iodine. *Current Microbiology*. 57(5): 503-7.
- Khan N.A., Fahad S., Naushad M. & Faisal S. (2020). *Grape Production Critical Review in the World*. Social Science Research Network.
- Larignon P. (2001). The villainy of Black Dead Arm. *Wines and vines*. 82: 86-89.
- Latha P., Prakasam V., Jonathan E. I., Ramasamy S. & Natarajan C. (2013). Effect of culture media and environmental factors on mycelial growth and pycnidial production of *Lasiodiplodia theobromae* in physic nut (*Jatropha curcas*). *Journal of Environmental Biology*. 34: 683-7.
- Le Quang Quyen & Long V.X. (1999). *Grape production in Vietnam*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.
- Lumînare C., Cojanu D., Mihaela Monica D. & Fătu A.C. (2021). *In vitro* thermal requirements of two isolates of *Metarhizium anisopliae* (Metch.) Sorok. under constant conditions. *Romanian Journal for Plant Protection*. 14: 70-74.
- Masoomi-Aladizgeh F., Jabbari L., Nekouei R. & Aalami A. (2016). A Simple and Rapid System for DNA and RNA Isolation from Diverse Plants Using Handmade Kit. 10.21203/rs.2.1347/v2
- Minh Sơn (2021). Nông trại nho trĩu quả ngay giữa Thủ đô thu hút người dân khám phá. Truy cập từ <https://www.vietnamplus.vn/nong-trai-nho-triu-qua-ngay-giua-thu-do-thu-hut-nguoi-dan-kham-pha-post722912.vnp> ngày 30/8/2023.
- Oyeleke S.B. & Manga S.B. (2008). *Essentials of laboratory practicals in microbiology*. Tobest Publishers Minna, Nigeria. pp. 36-75.
- Phương Thảo (2023) Thu hàng trăm triệu đồng mỗi năm nhờ trồng nho ở Hà Nội. Truy cập từ <https://mekongasean.vn/thu-hang-tram-trieu-dong-moi-nam-nho-trong-nho-o-ha-noi-post23404.html>, ngày 30/8/2023.
- Rangel E., Paolinelli M., Rolshausen P., Valenzuela-Solano C. & Hernandez R. (2021). Characterization of *Lasiodiplodia* species associated with grapevines in Mexico. *Phytopathologia Mediterranea*. 60: 237-251.
- Rodríguez-Gálvez E., Maldonado E. & Alves A. (2015). Identification and pathogenicity of *Lasiodiplodia theobromae* causing dieback of table grapes in Peru. *European Journal of Plant Pathology*. 141(3): 477-489.

- Rubio J. & Garzón E. (2011). Las enfermedades de madera de vid como amenaza del sector vitícola. *Rev. Winetech.* 2: 18-21.
- Saha A., Mandal P., Dasgupta S. & Saha D. (2008). Influence of culture media and environmental factors on mycelial growth and sporulation of *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon and Maubl. *Journal of environmental biology Academy of Environmental Biology, India.* 29: 407-10.
- Sanghavi K., Sanghavi M. & Rajurkar A. M. (2021). Early stage detection of Downey and Powdery Mildew grape disease using atmospheric parameters through sensor nodes. *Artificial Intelligence in Agriculture.* 5: 223-232.
- Suwannarach N., Sujarit K., Kumla J., Bussaban B. & Lumyong S. (2013). First report of leaf spot disease on oil palm caused by *Pestalotiopsis theae* in Thailand. *Journal of General Plant Pathology.* 79: 277-279.
- Vietnamplus (2023). Ninh Thuan province develops grape eco-system. Retrieved from <https://en.vietnamplus.vn/ninh-thuan-province-develops-grape-ecosystem/254068.vnp> on Aug 30, 2023.
- Wesley D.B. (2020). A comparison of several media types and basic techniques used to assess outdoor airborne fungi in Melbourne, Australia. *bioRxiv.* 10.1101/2020.08.27.269704: 2020.08.27.269704.
- White T.J., Bruns T., Lee S. & Taylor J. (1990). 38 - Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Trong: *PCR Protocols.* Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J. & White T.J. (eds.). Academic Press San Diego. pp. 315-322.
- Mark S. (2018). Best practice management guide: *Eutypa dieback.* South Australian Research and Development Institute. Version 1.1.
- Yan J., Xie Y., Zhang W., Wang Y., Liu J.-K., Hyde K., Seem R., Zhang G.-Z., Zhong-Yue W., Yao S.-W., Bai X.-J., Dissanayake A., Peng Y. & Li X.-H. (2013). Species of *Botryosphaeriaceae* involved in grapevine dieback in China. *Fungal diversity.* 61: 221-236.