

## Results of testing BT6 rice variety in Northern central region

Le Van Vinh, Tran Thi Tham, Vo Van Trung

### Abstract

The short duration rice variety BT6 was created in 2006 by selecting from the combination of BT7 and TBR1 rice varieties. It was be tested in Nghe An and Thua Thien Hue provinces from 2010 and then was VCU and DUS tested by the National Seed Testing Center. Results of testing showed that BT6 rice varieties had short duration (120 - 130 days in Spring crop and 100 - 105 days in Summer - Autumn crop season), high yield (6.5 - 7.0 tons/ha in Spring), good quality, resistance to pests and diseases. It is suitable for development in Northern central region.

**Keywords:** BT6 rice variety, short duration, high yield, quality, testing

Ngày nhận bài: 15/10/2017

Người phản biện: TS. Phạm Xuân Liêm

Ngày phản biện: 20/10/2017

Ngày duyệt đăng: 10/11/2017

## XÁC ĐỊNH NẤM *Colletotrichum* GÂY BỆNH THÁN THƯ ỚT Ở ĐỒNG BẰNG SÔNG HỒNG

Nguyễn Duy Hưng<sup>1</sup>, Hà Việt Cường<sup>2</sup>,  
Hoàng Chúng Lâm<sup>1</sup>, Nguyễn Đức Huy<sup>2</sup>

### TÓM TẮT

Nghiên cứu này trình bày kết quả phân loại các mẫu nấm *Colletotrichum* gây bệnh thán thư ớt thu tại Đồng bằng sông Hồng dựa trên đánh giá đặc điểm hình thái, giải trình tự gen mã hóa RNA ribosome (Internal Transcribed Spacer, ITS), vùng liên gen ApMat. Kết quả nghiên cứu đã xác định được ít nhất 5 loài là *C. truncatum*, *C. fruticola*, *C. gloeosporioides* (*sensu stricto*), *C. aeschynomenes* và *C. siamense* hại ớt tại Đồng bằng Sông Hồng, trong đó 4 loài sau được ghi nhận lần đầu tiên tại Việt Nam.

**Từ khóa:** Bệnh thán thư, ớt, nấm *Colletotrichum*, ITS, Đồng bằng sông Hồng

### I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong số các bệnh hại ớt, bệnh thán thư do nấm *Colletotrichum* gây ra được xem là nguy hiểm nhất (Than *et al.*, 2008).

Cho tới năm 2008, thành phần loài của nấm *Colletotrichum* gây bệnh thán thư ớt công bố trên thế giới khá đa dạng, bao gồm ít nhất 7 loài *C. gloeosporioides*, *C. capsici*, *C. acutatum*, *C. coccodes*, *C. dematium*, *C. nigrum* và *C. atramentarium* (Than *et al.*, 2008). Tại Việt Nam, ít nhất 4 loài là *C. acutatum*, *C. capsici*, *C. gloeosporioides* và *C. nigrum* đã được công bố gây bệnh thán thư ớt (Don *et al.*, 2007; Ngô Bích Hào, 1991, 1992).

Việc xác định (định danh) nấm *Colletotrichum* hại ớt ở trên (cũng như các loài *Colletotrichum* khác) chủ yếu dựa vào nguồn gốc ký chủ và các đặc điểm hình thái bao gồm (i) màu sắc, tốc độ phát triển và cấu trúc tản nấm; (ii) hình dạng và kích thước bào tử phân sinh; (iii) hình dạng và kích thước đĩa áp, (iv) có hay không có lông gai của đĩa cạnh; (v) hình thành hay không hình thành hạch nấm; (vi) hình thành hay không hình thành giai đoạn sinh sản hữu

tính. Do các đặc điểm hình hình thái không đủ để phân loại tới mức loài nên đã có quá nhiều nhầm lẫn trong phân loại nấm *Colletotrichum* (Hyde *et al.*, 2009). Trong khoảng 6 năm trở lại đây, nhiều nghiên cứu phân loại lại nấm *Colletotrichum* đã được thực hiện, chủ yếu dựa trên phân tích phân tử. (Cannon *et al.*, 2012; Damm *et al.*, 2012a; Damm *et al.*, 2012b; Weir *et al.*, 2012). Các nghiên cứu này cho thấy, chẳng hạn, *C. gloeosporioides* và *C. acutatum* thực chất là các phức hợp loài (species complex), trong đó *C. gloeosporioides* gồm ít nhất 22 loài khác nhau (Weir *et al.*, 2012) và *C. acutatum* gồm ít nhất 31 loài khác nhau (Damm *et al.*, 2012a).

Đối với nấm *Colletotrichum* gây bệnh thán thư trên ớt, các nghiên cứu phân loại mới gần đây cho thấy đã có thay đổi lớn về thành phần loài so với công bố trước đây. Chẳng hạn, tại Ấn Độ, định danh lại 52 mẫu nấm *C. gloeosporioides* (*sensu lato*, nghĩa rộng) cho thấy chúng thuộc 2 loài là *C. fruticola* và *C. siamense* (Sharma and Shenoy, 2013). Tương tự, 2 loài *C. acutatum* và *C. capsici*, vốn được coi là 2 loài chính gây hại trên ớt tại Thái Lan nay được định

<sup>1</sup> Viện nghiên cứu Rau quả; <sup>2</sup> Học viện Nông nghiệp Việt Nam

đanh lại lần lượt là *C. simmondsii* và *C. truncatum* (Ko *et al.*, 2011).

Xác định chính xác thành phần cũng như định danh đúng nấm *Colletotrichum* có vai trò quan trọng không những về mặt khoa học mà còn trong thực tiễn quản lý bệnh vì quan hệ giữa nấm với cây ký chủ cũng như tính mẫn cảm với thuốc hóa học khác nhau theo loài (Mongkolporn *et al.*, 2010).

Mục tiêu của nghiên cứu này là xác định được chính xác thành phần loài của nấm *Colletotrichum* gây bệnh thán thư ớt tại Đồng bằng sông Hồng.

## II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Vật liệu nghiên cứu

Mẫu nấm: Nấm *Colletotrichum* được phân lập từ vết bệnh thán thư trên quả ớt thu thập trong năm 2015. Nấm được phân lập trên môi trường WA (Water Agar) và được làm thuần trên môi trường PDA (Potato Dextrose Agar).

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.2.1. Đánh giá đặc điểm hình thái

Các đặc điểm hình thái quan trọng trong phân loại nấm *Colletotrichum* gồm hình dạng và kích thước bào tử phân sinh được đánh giá trên nấm nuôi cấy sau 7 ngày trên môi trường PDA ở điều kiện 25 - 28 °C, chiếu sáng liên tục. Đặc điểm của đĩa áp (appressorium) gồm hình dạng và kích thước được đánh giá theo mô tả đã công bố (Cai *et al.*, 2009; Johnston and Jones, 1997). Một mảnh môi trường PDA (1 cm<sup>2</sup>) được đặt trên đĩa Petri vô trùng. Bào tử nấm được cấy vào cạnh của miếng môi trường và một lamên vô trùng được đặt lên trên mảnh môi

trường. Đĩa được ủ 5 - 7 ngày ở 25°C cho tới khi đĩa áp hình thành ở mặt dưới của lam.

#### 2.2.2. Chiết ADN nấm

ADN tổng số của các mẫu nấm được chiết bằng đệm CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) theo phương pháp của Doyle & Doyle (1987). Khoảng 50 mg tàn nấm thuần nuôi cấy trên môi trường PDA được nghiền bằng chày nhựa chuyên dụng (Kontes™ Pellet Pestle) với 0.5 mL đệm CTAB trong ống Eppendorf loại 1.5 mL. ADN được chiết một lần với Chloroform: isoamyl alcohol (24:1). Cặn ADN được rửa hai lần bằng ethanol 70% và hòa trong 30 uL nước cất 2 lần vô trùng. Mẫu ADN được bảo quản ở - 20 °C.

#### 2.2.3. Phản ứng PCR

Các phản ứng PCR được thực hiện bằng kit GoTaq Green Master Mix (Promega) hoặc kit DreamTaq Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific). Phản ứng PCR được thực hiện trên máy PCR PTC-100 (MJ Research Inc.) với điều kiện sau: khởi đầu biến tính ở 94°C trong 2 phút; tiếp theo là 35 chu trình phản ứng gồm biến tính ở 94°C trong 30 giây, gắn mỗi ở 52°C - 54°C trong 30 giây (Bảng 1), tổng hợp sợi ở 72°C trong 1 phút. Phản ứng được kết thúc với 5 phút ở 72°C. Các mẫu sử dụng trong nghiên cứu được trình bày ở Bảng 1.

Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1 % được chuẩn bị bằng đệm TAE (Tris Acetic acid EDTA) và chứa 0.5 mg/mL ethidium bromide. Gel được chạy trên thiết bị điện di Mupid-exU Mini System (Helixxtec) với đệm TAE ở điện thế 100 V trong 30 - 40 phút.

**Bảng 1.** Các mẫu được sử dụng trong định danh phân tử nấm *Colletotrichum*

Mẫu	Trình tự (5'-3')	Sản phẩm (bp)	Vùng gen	Tham khảo
AM-F	TCATTCTACGTATGTGCCCG	~ 910	ApMat	Silva <i>et al.</i> (2012)
AM-R	CCAGAAATACACCGAACTTGC			
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	~ 500	ITS	White <i>et al.</i> (1990)
ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG			

#### 2.2.4. Giải trình tự và phân tích trình tự

Sản phẩm PCR được tinh chiết từ gel agarose dùng kit GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific). Sản phẩm PCR tinh chiết được giải trình tự trực tiếp cả 2 chiều dùng mỗi PCR tại hãng Macrogen (Hàn Quốc).

Các chuỗi mẫu được xác định danh tính khi so sánh với các chuỗi đã công bố từ trước nhờ phần mềm tìm kiếm BLAST tại NCBI (The National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)).

ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/).

Phân tích trình tự và xây dựng cây phả hệ được thực hiện bằng phần mềm ClustalX 2.0 (Larkin *et al.*, 2007) và Mega 6.0 (Tamura *et al.*, 2013).

### 2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện từ tháng 1/2015 đến tháng 12/2017 tại Viện Nghiên cứu Rau quả và Trung tâm Bệnh cây nhiệt đới, Học viện Nông nghiệp Việt Nam (Trâu Quỳ, Gia Lâm, Hà Nội).

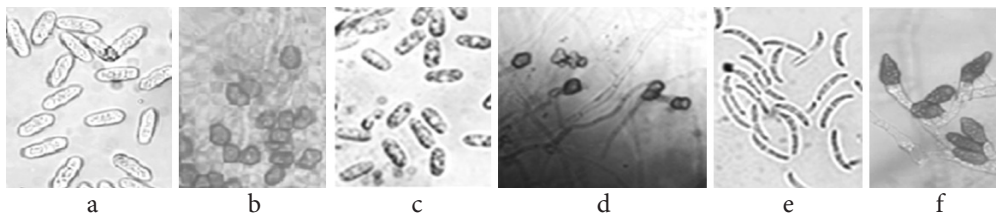
### III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. Đặc điểm hình thái nấm *Colletotrichum*

Mười sáu mẫu nấm đã được phân lập từ vết bệnh thán thư trên quả ớt thu thập tại 8 tỉnh miền Bắc gồm Hà Nội, Hải Phòng, Bắc Ninh, Hưng Yên, Bắc Giang, Thái Bình, Sơn La và Thái Nguyên (Bảng 2).

Đánh giá đặc điểm bào tử phân sinh và đĩa áp của nấm thấy 16 mẫu nấm có thể được chia làm 3 nhóm (Bảng 2).

Nhóm I gồm 12 mẫu là C1, C14, C11, C24, C42, C44, C45, C4, C6, C33, C9 và C26. Nhóm này có bào tử phân sinh hình trụ, hai đầu tù tới tròn, kích thước dao động từ 10,9 - 13,6 × 3,4 - 4,9 μ. Đĩa áp có màu nâu đến nâu đậm, hình trứng, tày, elip tới gần hình thoi, một số có hình dạng không đều (Bảng 2, Hình 1).



Hình 1. Đặc điểm bào tử phân sinh (a, c, e) và đĩa áp (b, d, f) của nấm *Colletotrichum* gây bệnh thán thư ớt tại Đồng Bằng Sông Hồng (đại diện 3 nhóm hình thái C1 (a, b); C29 (c, d) và C25 (e, f))

#### 3.2. Định danh phân tử nấm

Do phân loại nấm *Colletotrichum* chỉ dựa vào các đặc điểm hình thái đã tạo ra quá nhiều sai lầm do sự phụ thuộc cao của các đặc điểm hình thái vào điều kiện môi trường nên vai trò của phân tích phân tử đã ngày càng trở nên quan trọng và được xem là chuẩn vàng trong phân loại nhóm nấm này (Cannon *et al.*, 2000; Hyde *et al.*, 2009).

##### 3.2.1. Định danh phân tử dựa trên giải trình tự vùng ITS

Vùng liên gen ITS (internally transcribed spacers) của cụm gen rDNA là một trong các vùng gen phổ biến nhất để nghiên cứu đa dạng và phân loại nấm (Schoch *et al.*, 2012). Vùng gen này cũng đã từng được sử dụng để định danh nấm *Colletotrichum* (Martínez-Culebras *et al.*, 2000).

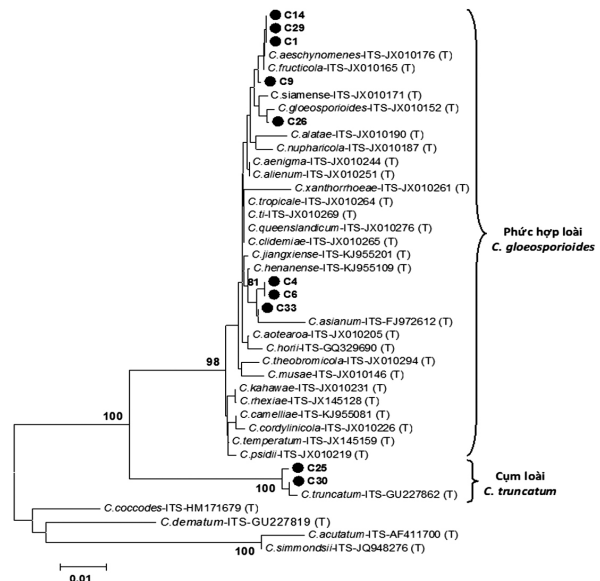
Dựa trên đặc điểm hình thái, 10 mẫu nấm (C1, C4, C6, C9, C14, C25, C26, C29, C30, C33) đã được chọn giải trình tự vùng ITS. Tất cả các mẫu giải trình tự đều có chất lượng tốt và có kích thước từ 529 đến 563 bp (Bảng 3).

Kết quả tìm kiếm trên Ngân hàng gen bằng phần mềm BLAST cho thấy 2 mẫu C25 và C30 thuộc loài *C. truncatum*. Trình tự của tám mẫu còn lại đều có mức đồng nhất trình tự cao (từ 98 - 99%) với các loài thuộc phức hợp loài *C. gloeosporioides* (Bảng 3).

Nhóm II chỉ gồm 1 mẫu là C29. Đặc điểm bào tử của nhóm này nhìn chung giống với nhóm I. Tuy nhiên một số đĩa áp của nấm có mức độ chẻ thùy sâu hơn so với nhóm I (Bảng 2, Hình 1).

Đặc điểm bào tử và đĩa áp của nấm nhóm I và II nhìn chung giống với các loài nấm thuộc phức hợp loài *C. gloeosporioides*. Phức hợp này gồm ít nhất 22 loài, tất cả đều tạo bào tử phân sinh hình trụ thẳng, hai đầu tù, kích thước rất dao động. Đặc điểm hình thái tản cũng như đĩa áp cũng rất đa dạng và thay đổi (Weir *et al.*, 2012).

Nhóm III gồm 3 mẫu là C25, C30 và C48. Nhóm này có bào tử phân sinh hình lưỡi liềm, kích thước dao động từ 21,5 - 22,4 × 3,5 - 3,7 μ. Đĩa áp giống nhóm I, có màu nâu đến nâu đậm, hình trứng, tày, elip tới gần hình thoi, một số có hình dạng không đều (Bảng 2, Hình 1).



Hình 2. Phân tích phả hệ dựa trên trình tự vùng ITS của các mẫu nấm *Colletotrichum* thuộc phức hợp loài *C. gloeosporioides* và các loài được công bố gây bệnh thán thư ớt

Cây được xây dựng bằng phương pháp Neighbor-Joining (NJ). Giá trị ở các nốt là giá trị thống kê bootstrap dưới dạng % (1000 lần lặp) (chỉ trình bày các giá trị > ngưỡng tin cậy chung 75%). Ký tự T trong ngoặc đơn là mẫu đại diện loài (Type strain). Thanh tỷ lệ chỉ khoảng cách di truyền.

**Bảng 2.** Đặc điểm hình thái nấm *Colletotrichum* gây bệnh thán thư ớt

STT	Mẫu nấm	Địa điểm thu thập	Bảo tử phân sinh			Hình thái		Nhóm hình thái
			Hình dạng	Kích thước (đài x rộng, µm)	Màu sắc, hình dạng	Kích thước (µm)		
1	C1	Trầu Quỳ, Gia Lâm, Hà Nội	Trụ, hai đầu tù tới tròn	11,6 ± 0,8 × 4,9 ± 0,4	Màu nâu đến nâu đậm; hình trứng, tay, elip tới gần hình thoi, một số có hình dạng không đều	8,2 ± 1,3 × 6,1 ± 0,7	I	
2	C14	Trần Dương, Vĩnh Bảo, Hải Phòng	Trụ, hai đầu tù tới tròn	12,5 ± 0,8 × 4,4 ± 0,3	Màu nâu đến nâu đậm; hình trứng, tay, elip tới gần hình thoi, một số có hình dạng không đều	7,8 ± 1,3 × 6,0 ± 0,9	I	
3	C11	Trung Kênh, Lương Tài, Bắc Ninh	Trụ, hai đầu tù tới tròn	12,5 ± 0,8 × 4,7 ± 0,4	Màu nâu đến nâu đậm; hình trứng, tay, elip tới gần hình thoi, một số có hình dạng không đều	7,3 ± 1,1 × 5,1 ± 0,8	I	
4	C24	Dạ Trạch, Khoái Châu, Hưng Yên	Trụ, hai đầu tù tới tròn	12,6 ± 0,9 × 3,8 ± 0,5	Màu nâu đến nâu đậm; hình trứng, tay, elip tới gần hình thoi, một số có hình dạng không đều	8,8 ± 1,2 × 4,9 ± 0,4	I	
5	C42	Song Văn, Tân Yên, Bắc Giang	Trụ, hai đầu tù tới tròn	12,6 ± 1,2 × 3,6 ± 0,5	Màu nâu đến nâu đậm; hình trứng, tay, elip tới gần hình thoi, một số có hình dạng không đều	7,0 ± 0,6 × 4,7 ± 0,6	I	
6	C44	Cổ Bi, Gia Lâm, Hà Nội	Trụ, hai đầu tù tới tròn	11,0 ± 1,1 × 3,4 ± 0,2	Màu nâu đến nâu đậm; hình trứng, tay, elip tới gần hình thoi, một số có hình dạng không đều	7,3 ± 1,0 × 4,8 ± 0,8	I	
7	C45	Cổ Bi, Gia Lâm, Hà Nội	Trụ, hai đầu tù tới tròn	12,3 ± 1,3 × 3,6 ± 0,4	Màu nâu đến nâu đậm; hình trứng, tay, elip tới gần hình thoi, một số có hình dạng không đều	6,6 ± 0,6 × 5,4 ± 1,33	I	
8	C4	Quỳnh Hội, Quỳnh Phụ, Thái Bình	Trụ, hai đầu tù tới tròn	10,9 ± 1,2 × 3,9 ± 0,6	Màu nâu đến nâu đậm; hình trứng, tay, elip tới gần hình thoi, một số có hình dạng không đều	6,7 ± 0,7 × 5,7 ± 0,6	I	
9	C6	Dạ Trạch, Khoái Châu, Hưng Yên	Trụ, hai đầu tù tới tròn	11,7 ± 1,3 × 3,9 ± 0,5	Màu nâu đến nâu đậm; hình trứng, tay, elip tới gần hình thoi, một số có hình dạng không đều	6,7 ± 0,8 × 5,1 ± 1,5	I	
10	C33	Đông Sang, Mộc Châu, Sơn La	Trụ, hai đầu tù tới tròn	11,9 ± 1,0 × 4,5 ± 0,7	Màu nâu đến nâu đậm; hình trứng, tay, elip tới gần hình thoi, một số có hình dạng không đều	8,2 ± 1,0 × 5,3 ± 0,6	I	
11	C9	An Bình, Lương Tài, Bắc Ninh	Trụ, hai đầu tù tới tròn	12,0 ± 0,9 × 3,9 ± 0,6	Màu nâu đến nâu đậm; hình trứng, tay, elip tới gần hình thoi, một số có hình dạng không đều	9,5 ± 1,3 × 5,2 ± 0,5	I	
12	C26	Hoàn Long, Yên Mỹ, Hưng Yên	Trụ, hai đầu tù tới tròn	11,0 ± 1,1 × 4,3 ± 0,4	Màu nâu đến nâu đậm; hình trứng, tay, elip tới gần hình thoi, một số có hình dạng không đều	7,3 ± 1,0 × 4,8 ± 0,8	I	
13	C29	Thanh Ninh, Phú Bình, Thái Nguyên	Trụ, hai đầu tù tới tròn	11,9 ± 1,1 × 4,6 ± 0,4	Màu nâu đến nâu đậm; hình trứng, tay, elip tới gần hình thoi, một số có hình dạng không đều	9,7 ± 1,4 × 5,7 ± 0,6	II	
14	C25	Văn Đức, Gia Lâm, Hà Nội	Lưỡi liềm	21,5 ± 1,2 × 3,5 ± 0,6	Màu nâu đến nâu đậm; hình trứng, tay, elip tới gần hình thoi, một số có hình dạng không đều	11,7 ± 0,2 × 6,3 ± 1,0	III	
15	C30	Vân Nội, Đông Anh, Hà Nội	Lưỡi liềm	21,9 ± 1,0 × 3,7 ± 0,4	Màu nâu đến nâu đậm; hình trứng, tay, elip tới gần hình thoi, một số có hình dạng không đều	8,1 ± 1,3 × 5,3 ± 0,7	III	
16	C48	Văn Đức, Gia Lâm, Hà Nội	Lưỡi liềm	22,4 ± 1,2 × 3,6 ± 0,6	Màu nâu đến nâu đậm; hình trứng, tay, elip tới gần hình thoi, một số có hình dạng không đều	11,7 ± 2,2 × 6,3 ± 1,0	III	

Phân tích phả hệ dựa trên trình tự vùng ITS (Hình 2) cũng cho thấy 2 mẫu C25 và C30 thuộc cụm loài *C. truncatum* điển hình. Tương tự như phân tích BLAST, phân tích phả hệ dựa trên vùng ITS cũng cho thấy tám mẫu còn lại phân nhóm trong cụm phức hợp loài *C. gloeosporioides*.

Phân tích phân tử dựa trên vùng ITS đã chứng tỏ vùng gen này có thể xác định rất tốt một số loài như *C. truncatum* nhưng không đủ để phân biệt các loài thuộc một số phức hợp loài như *C. gloeosporioides* (sensu lato) (Canon *et al.*, 2012).

**Bảng 3.** Kết quả tìm kiếm trên Ngân hàng gen các mẫu nấm *Colletotrichum* dựa trên trình tự vùng ITS

STT	Mẫu năm	Kích thước (bp) <sup>1</sup>	Loài xác định <sup>2</sup>
1	C1	548	<i>C. gloeosporioides</i> (sensu lato)
2	C4	529	<i>C. gloeosporioides</i> (sensu lato)
3	C6	548	<i>C. gloeosporioides</i> (sensu lato)
4	C9	547	<i>C. gloeosporioides</i> (sensu lato)
5	C14	549	<i>C. gloeosporioides</i> (sensu lato)
6	C25	556	<i>C. truncatum</i>
7	C26	560	<i>C. gloeosporioides</i> (sensu lato)
8	C29	563	<i>C. gloeosporioides</i> (sensu lato)
9	C30	556	<i>C. truncatum</i>
10	C33	551	<i>C. gloeosporioides</i> (sensu lato)

Ghi chú: <sup>1</sup> Kích thước sau khi loại bỏ các trình tự nhiễu ở 2 đầu sản phẩm giải trình tự; <sup>2</sup> Dựa trên kết quả tìm kiếm BLAST; sensu lato (phức hợp loài)

### 3.2.1. Định danh phân tử dựa trên giải trình tự vùng liên gen ApMat

Do vùng ITS không đủ phân biệt các loài thuộc phức hợp loài *C. gloeosporioides* (sensu lato) nên để định danh chính xác các loài thuộc phức hợp này, phân tích đa gen (multigens) thường được sử dụng (Weir *et al.*, 2012). Tuy nhiên, gần đây, một vùng liên gen khoảng 900 bp (ApMat) nằm giữa 2 gen Apn2 (mã hóa Apurinic-apyrimidinic endonuclease 2, một endonuclease sửa chữa DNA, cắt ở vị trí Apurinic-apyrimidinic) và gen MAT1-2-1 (mã hóa yếu tố qui định kiểu ghép cặp) đã được chứng tỏ rất hiệu quả nhằm phân biệt các loài trong phức hợp loài *C. gloeosporioides* (sensu lato) (Silva *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2015).

Để xác định chính xác danh tính của 8 mẫu nấm đã được giải trình tự vùng ITS (C1, C4, C6, C9, C14, C26, C29, C33) và 1 mẫu số 44 (có bào tử phân sinh hình trụ, Bảng 2), vùng gen ApMat của chúng đã được giải trình tự cả 2 chiều bằng mỗi PCR. Tất cả 9 mẫu giải trình tự đều có chất lượng tốt và có kích thước từ 894 đến 930 bp (Bảng 4).

Phân tích BLAST và phả hệ dựa trên trình tự vùng ApMat (Bảng 4, Hình 3) cho thấy 2 mẫu C4 và C33 là *C. siamense*, 3 mẫu C1, C6 và C14 là *C. fructicola*, 3 mẫu C9, C26 và C44 là *C. gloeosporioides* (sensu stricto) và 1 mẫu C29 là *C. aeshynomenes*.

**Bảng 4.** Kết quả tìm kiếm trên Ngân hàng gen các mẫu nấm *Colletotrichum* dựa trên trình tự vùng ApMat

STT	Mẫu	Kích thước (bp) <sup>1</sup>	Loài xác định <sup>2</sup>
1	C1	915	<i>C. fructicola</i>
2	C4	919	<i>C. siamense</i>
3	C6	910	<i>C. fructicola</i>
4	C9	894	<i>C. gloeosporioides</i> (sensu stricto)
5	C14	915	<i>C. fructicola</i>
7	C26	879	<i>C. gloeosporioides</i> (sensu stricto)
8	C29	930	<i>C. aeshynomenes</i>
10	C33	919	<i>C. siamense</i>
10	C44	894	<i>C. gloeosporioides</i> (sensu stricto)

Ghi chú: <sup>1</sup> Kích thước sau khi loại bỏ các trình tự nhiễu ở 2 đầu sản phẩm giải trình tự; <sup>2</sup> Dựa trên kết quả tìm kiếm BLAST

Như vậy, dựa trên đánh giá hình thái và đặc biệt là phân tích phân tử, ít nhất 5 loài nấm *Colletotrichum* đã được xác định từ mẫu ớt bị bệnh thán thư thu thập tại Đồng bằng sông Hồng.

*C. truncatum*, trước kia được gọi là *C. capsici* (Damm *et al.*, 2009) là một trong các loài *Colletotrichum* có ý nghĩa kinh tế với phổ ký chủ và tính gây bệnh rất đa dạng.

*C. fructicola* là loài được phát hiện đầu tiên trên cà phê tại Thái Lan năm 2009 (Prihastuti *et al.*, 2009) và cũng có phổ ký chủ và phân bố địa lý rất rộng (Weir *et al.*, 2012). Đây là lần đầu tiên, loài này đã được phát hiện thấy tại Việt Nam.

*C. siamense* cũng là loài được phát hiện thấy đầu tiên trên cà phê tại Thái Lan năm 2009 (Prihastuti *et al.*, 2009) và cũng có phổ ký chủ rất rộng (Weir *et al.*, 2009). Hiện trạng phân loại của loài này khá phức tạp. *C. siamense* (sensu stricto) và nhiều loài gần gũi như *C. communis*, *C. dianesei*, *C. endomangiferae*, *C. hymenocallidis*, *C. jasmini-sambac*, *C. melanocaulon* và *C. murrayae* đã được phân loại là các thành viên của phức hợp loài *C. siamense* (sensu lato). Tuy nhiên, một nghiên cứu phân loại mới đây nhất, dựa trên phân tích đa gen, giao phối chéo, hình thái học đã kết luận tất cả các loài trên đều là thành viên của một loài duy nhất là *C. siamense* (Liu *et al.*, 2016).

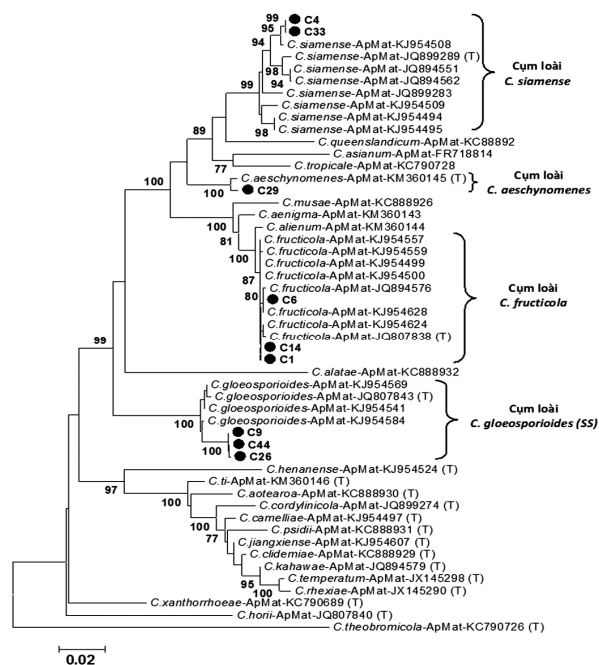
Đây là lần đầu tiên, loài này đã được phát hiện thấy tại Việt Nam.

*C. aeshynomenes* là loài được định danh lại từ *C. gloeosporioides* "f. sp. aeshynomenes". Loài này có phổ ký chủ và phân bố rất hẹp, mới chỉ được công bố gây bệnh trên cây đậu dại (*Aeschynomene virginica*) tại Mỹ (Weir *et al.*, 2012). Đây là lần đầu tiên, loài này đã được phát hiện thấy tại Việt Nam.

*C. gloeosporioides* (sensu stricto) có phổ ký chủ khá hẹp, nhiễm chủ yếu trên cây có múi. Ngoài ra, loài này cũng được phát hiện thấy trên một số cây như xoài, nho, Ficus, Pueraria, chè (Weir *et al.*, 2012; 2013; Liu *et al.*, 2015). Đây là lần đầu tiên loài này được phát hiện thấy tại Việt Nam.

#### IV. KẾT LUẬN

Nghiên cứu này đã định danh chính xác thành phần loài nấm *Colletotrichum* gây bệnh thán thư ớt tại Đồng bằng sông Hồng. Ít nhất 5 loài đã được phát hiện bao gồm *C. truncatum*, *C. fruticola*, *C. gloeosporioides* (sensu stricto), *C. aeshynomenes*, *C. siamense*, trong đó 4 loài sau được ghi nhận lần đầu tiên tại Việt Nam.



Hình 3. Phân tích phả hệ dựa trên trình tự vùng ApMat của các mẫu nấm *Colletotrichum* thuộc phức hợp loài *C. gloeosporioides*

Cây được xây dựng bằng phương pháp Neighbor-Joining (NJ). Giá trị ở các nốt là giá trị thống kê bootstrap dưới dạng % (1000 lần lặp) (chỉ trình bày các giá trị > ngưỡng tin cậy chung 75%). Ký tự T trong ngoặc đơn là mẫu đại diện loài (Type strain). Thanh tỷ lệ chỉ khoảng cách di truyền

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

Ngô Bích Hào, 1991. Kết quả bước đầu nghiên cứu về thành phần bệnh hại ớt và một số đặc điểm sinh học của nấm thán thư hại ớt *Colletotrichum* spp. *Kết quả nghiên cứu khoa học - Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội*, 86-91. NXB Nông nghiệp. Hà Nội: 106-109.

Ngô Bích Hào, 1992. Bệnh thán thư hại ớt. *Tạp chí Bảo vệ thực vật*, T.124, số 4: 15-17.

Cai, L., Hyde, K., Taylor, P., Weir, B., Waller, J., Abang, M., Zhang, J., Yang, Y., Phoulivong, S. & Liu, Z., 2009. A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. *Fungal Diversity* 39, 183-204.

Cannon, P. F., Damm, U., Johnston, P. R. & Weir, B. S., 2012. *Colletotrichum* - current status and future directions. *Studies in Mycology* 73, 181-213.

Damm, U., Cannon, P. F., Woudenberg, J. H. C. & Crous, P. W., 2012a. The *Colletotrichum acutatum* species complex. *Studies in Mycology* 73, 37-113.

Damm, U., Cannon, P. F., Woudenberg, J. H. C., Johnston, P. R., Weir, B. S., Tan, Y. P., Shivas, R. G. & Crous, P. W., 2012b. The *Colletotrichum boninense* species complex. *Studies in Mycology* 73, 1-36.

Don, L. D., Van, T. T., Phuong Vy, T. T. & Kieu, P. T. M., 2007. *Colletotrichum* spp. Attacking on Chilli Pepper Growing in Vietnam. *Country Report In: Oh, DG, Kim, KT* (Eds), Abstracts of the First International Symposium on Chilli Anthracnose National Horticultural Research Institute, Rural Development of Administration, Republic of Korea, 24.

Doyle, J. J. & Doyle, J. L., 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19, 11-15.

Ko, T. W. K., McKenzie, E. H. C., Bahkali, A. H., To-anun, C., Chukeatirote, E., Promputtha, I., Ahmed, K., Wikee, S., Chamyuang, S. & Hyde, K. D., 2011. The need for re-inventory of Thai phytopathogens. *Chiang Mai Journal of Science* 38, 625-637.

Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., & Thompson, J. D., 2007. *Clustal W and Clustal X version 2.0. bioinformatics*, 23(21), 2947-2948.

Liu, F., Wang, M., Damm, U., Crous, P. W., & Cai, L., 2016. Species boundaries in plant pathogenic fungi: a *Colletotrichum* case study. *BMC evolutionary biology*, 16(1), 81.

Liu, F., Weir, B. S., Damm, U., Crous, P. W., Wang, Y., Liu, B., & Cai, L., 2015. Unravelling *Colletotrichum* species associated with Camellia: employing ApMat and GS loci to resolve species in the *C. gloeosporioides* complex. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 35, 63.

Martínez-Culebras, P. V., Barrio, E., García, M. D., & Querol, A., 2000. Identification of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose of strawberry

- based on the internal transcribed spacers of the ribosomal region. *FEMS microbiology letters*, 189(1), 97-101.
- Mongkolporn, O., Montri, P., Supakaew, T. & Taylor, P. W.**, 2010. Differential Reactions on Mature Green and Ripe Chili Fruit Infected by Three *Colletotrichum* spp. *Plant Disease* 94, 306-310.
- Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A., & Miller, A. N.**, 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.
- Sharma, G. & Shenoy, B. D.**, 2013. *Colletotrichum fructicola* and *C. siamense* are involved in chilli anthracnose in India. *Archives of Phytopathology And Plant Protection* 47, 1179-1194.
- Silva, D. N., Talhinhas, P., Várzea, V., Cai, L., Paulo, O. S., & Batista, D.**, 2012. Application of the *Apn2/MAT* locus to improve the systematics of the *Colletotrichum gloeosporioides* complex: an example from coffee (*Coffea* spp.) hosts. *Mycologia*, 104(2), 396-409.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar, S.**, 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution*, 30(12), 2725-2729.
- Than, P. P., Prihastuti, H., Phoulivong, S., Taylor, P. W. & Hyde, K. D.**, 2008. Chilli anthracnose disease caused by *Colletotrichum* species. *Journal of Zhejiang University Science B* 9, 764-778.
- Weir, B. S., Johnston, P. R. & Damm, U.**, 2012. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. *Studies in Mycology* 73, 115-180.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. & Taylor, J.**, 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR protocols: a guide to methods and applications 18, 315-322.

## Identification of *Colletotrichum* causing anthracnose of chilli in the Red River Delta

Nguyen Duy Hung, Ha Viet Cuong,  
Hoang Chung Lam, Nguyen Duc Huy

### Abstract

This study presents the identification of *Colletotrichum* infecting chilli in the Red River Delta based on the morphological and molecular characterization. The sequence analyses of Internal Transcribed Spacer (ITS) and *ApMat* regions identified at least 5 species, including *C. truncatum*, *C. fructicola*, *C. gloeosporioides* (sensu stricto), *C. aeshynomenes* and *C. siamense*, from chilli samples collected in the Red River Delta, of which, the 4 latter species are recognized in Vietnam for the first time.

**Keywords:** Anthracnose, chilli, *Colletotrichum*, Internal Transcribed Spacer, Red River Delta

Ngày nhận bài: 16/11/2017

Ngày phản biện: 21/11/2017

Người phản biện: TS. Hà Minh Thanh

Ngày duyệt đăng: 11/12/2017

## PHÂN LẬP, XÁC ĐỊNH VÀ NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM CỦA VI KHUẨN GÂY BỆNH TRÊN NẤM LINH CHI (*Ganoderma lucidum*)

Nguyễn Xuân Cảnh<sup>1</sup>, Trần Đông Anh<sup>1</sup>, Trần Thị Hương<sup>1</sup>, Lê Hương Giang<sup>1</sup>

### TÓM TẮT

Trong nghiên cứu này đã tiến hành phân lập và xác định các chủng vi khuẩn có khả năng gây bệnh cho nấm linh chi. Phân lập từ các mẫu nấm linh chi nhiễm bệnh đã thu được 13 chủng vi khuẩn. Khảo sát khả năng gây bệnh bằng phương pháp lây nhiễm trực tiếp lên quả thể nấm linh chi, thu được 2 chủng có khả năng gây bệnh cho quả thể là các chủng LC10, LC11. Cả hai chủng LC10 và LC11 đều là trực khuẩn gram dương, sinh nội bào tử, có khả năng sinh catalase và đồng hóa glucose sinh axit, sinh trưởng và phát triển tốt trong khoảng 25 - 35°C. Chúng có khả năng sinh chitinase và cellulase ngoại bào với hoạt tính khá cao. Phân tích trình tự 16S rRNA của chủng vi khuẩn LC10 cho thấy có độ tương đồng lên tới 99% với loài *Bacillus flexus*. Kết hợp các đặc điểm hình thái, sinh hóa và sinh học phân tử có thể kết luận chủng vi khuẩn gây bệnh trên nấm linh chi LC10 thuộc vào loài *Bacillus flexus*.

**Từ khóa:** *Ganoderma lucidum*, 16S rARN, *Bacillus flexus*

<sup>1</sup> Khoa Công nghệ sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam