NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM SINH HỌC VÀ ĐỘC TÍNH GÂY BỆNH CỦA NẤM *Colletotrichum* spp. GÂY BỆNH THÁN THƯ TRÊN CÂY NHO Ở NINH THUẬN

Hoàng Thị Ngát, Nguyễn Thanh Hà, Lê Kim Hoàn,
Nguyễn Thu Hà, Phạm Xuân Hội

SUMMARY

Research biological characteristic and toxicity of fungi *Colletotrichum* spp. caused anthracnose disease on grape in Ninh thuan

Anthracnose in various kinds of plant are caused by Colletotrichum spp., therefore characterising biological is necessary to estimate disease damages and precaution. The results show that Colletotrichum spp. grows vigorously in PDA medium at 30°C and pH 6, which are favor conditions of other anthracnoses. According toxicological assays, it harms leaves heavier than fruits, partially, in leaves, isolate CQ26 is on the top by 89%, follow by isolate CQ5, 72%, in fruits, it is 72% and 67% with the former and the latter.

Keywords: Anthracnose, Colletotrichum spp., temperature,pH,nutritious,toxicity

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trên thế giới, bệnh thán thư do nấm *Colletotrichum* spp. gây hại nguy hiểm đối với tất cả các loài cây trồng: Cây bông, cây bầu bí, cà chua, chuối, đậu, ngũ cốc, xoài, củ hành, cây tiêu... mức độ thiệt hại rất lớn.

Ở Việt Nam, bệnh thán thư do nấm *Colletotrichum* spp. là bệnh hại rất phổ biến trên nhiều cây ăn quả (xoài, chôm chôm, đu đủ..), cây công nghiệp dài ngày (cà phê, ca cao, điều...), cây công nghiệp ngắn ngày mức độ gây hại rất lớn, những cây bị bệnh gây hại nặng ảnh hưởng lớn đến sinh trưởng của cây, ảnh hưởng đến năng suất và phẩm chất.

Cây nho được trồng chủ yếu ở Ninh Thuận đã một thời được xem là cây trồng "nữ hoàng", là cây giúp người dân nơi đây thoát nghèo mức thu nhập từ 100 - 300 triệu đồng. Trong những năm gần đây diện tích trồng nho giảm đáng kể, có địa phương chỉ còn 60 - 80% diện tích. Theo thống kê của ngành nông nghiệp tỉnh, năm 2005 diện tích nho là 1.576 ha, sản lượng đạt 28,6 nghìn tấn đến năm 2010 giảm xuống còn 900 ha, sản lượng đạt 16,5 nghìn tấn.

Bệnh thán thư gây hại nho xuất hiện từ năm 1999 ở Ninh Thuận và sau đó lan sang các vùng trồng nho của cả nước. Bệnh gây hại trên tất cả các bộ phận của cây trên mặt đất, đặc biệt tập trung vào các chồi, quả non... Nghiêm trọng nhất khi quả bắt đầu bước vào giai đoạn chuẩn bị thu hoạch và làm giảm năng suất tới 70-80%.

Để có thể đưa ra được các biện pháp phòng trừ một cách hiệu quả, ít tốn kém, không ảnh hưởng đến chất lượng sản phẩm cũng như môi trường cần phải có nhiều hơn nữa những nghiên cứu chuyên sâu để xác định chính xác tác nhân gây bệnh, những đặc điểm về hình thái, sinh học, sinh lý và khả năng gây bệnh của chúng. Do vậy, *"Nghiên cứu đặc điểm sinh học và độc tính gây bệnh của nấm Colletotrichum* spp. *gây bệnh thán thư trên cây nho ở Ninh Thuận"* là hết sức cần thiết.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Vật liệu nghiên cứu

- Mẫu lá, thân, quả nho bị bệnh thán thư được thu thập tại huyện Ninh Sơn, tỉnh Ninh Thuận trên các giống nho Cardinal, NH01- 48, NH01- 53... ở giai đoạn sắp thu hoạch và đang thu hoạch.

- Các loại môi trường WA, PDA, PDA lỏng, Czapek, CMA, PCA...

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Phương pháp phân lập và làm thuần mẫu bệnh

Mẫu bệnh được rửa dưới vòi nước chảy cho trôi hết chất bẩn. Sau đó mẫu được khử trùng bằng NaOCl 1% trong 5-7 phút, dùng cồn 70^0 khử trùng trong 5 phút, rửa bằng nước cất khử trùng 3 lần và thấm khô bằng giấy thấm khử trùng. Cắt mẫu bệnh với kích trước 0,5 - 0,7 mm tại mép vùng bị bệnh (bao gồm cả vùng bị bệnh và vùng không bị bệnh) 8-10 miếng bệnh nhỏ đặt lên môi trường PDA có chứa kháng sinh Streptomycin (100 µg/ml). Ủ tại nhiệt độ 25^0 C ± 2. Sau khi nấm mọc cấy sang môi trường PDA. Làm thuần nấm bằng phương pháp cấy bào tử đơn và cất giữ mẫu nấm trong môi trường thạch nghiêng hoặc nước cất khử trùng tại 4^0C.

2.2. Phương pháp nghiên cứu đặc điểm sinh học

- Nghiên cứu ảnh hưởng của nhiệt độ: Isolate *Colletotrichum*. spp được cấy trên môi trường PDA và được đặt ở các nhiệt độ khác nhau: 10ºC, 20ºC, 25ºC, 30ºC, 35ºC và 40ºC

- Nghiên cứu ảnh hưởng của pH đến đường kính khuẩn lạc : Với 4 loại pH khác nhau pH 4, 5, 6 và 7 trên môi trường PDA.

- Nghiên cứu ảnh hưởng của môi trường : Mỗi isolate được cấy trên các môi trường CMA, PCA, Czapeck và PDA.

Cả 3 thí nghiệm được lặp lại 3 lần và ủ tại nhiệt độ 25ºC ± 2. thường xuyên theo dõi sau 6 ngày đo đường kính khuẩn lạc theo 2 đường kẻ vuông góc ở mặt sau của đĩa (mm).

2.3. Đánh giá độc tính gây bệnh của một số chủng nấm bệnh trên lá, quả của cây nho.

20 isolate *Colletotrichum* spp. cấy trên môi trường PDA đặt dưới đèn UV nhằm kích thích nấm sinh bào tử. Sau khi xuất hiện bào tử đem pha dịch bào tử lây nhiễm với nồng độ 2×10^6 bào tử/µl.

Lá và quả nho sạch bệnh được ngắt về đem rửa sạch dưới vòi nước, đặt trên khay lót giấy thấm khử trùng và có giữ ẩm. Mỗi isolate nhiễm trên 6 lá và 6 quả với 3 lần nhắc lại. Bơm 20 µl dịch bào tử trên mỗi lá hoặc quả sau 24h bơm tiếp dịch bào tử để trong 12h tối và 12h sáng phủ khay nhiễm bằng túi nilông trắng, đặt nhiệt độ 25ºC ± 2. Khay đối chứng sử dụng nước cất khử trùng để bơm thay cho dịch bào tử nấm. Luôn giữ ẩm trong khay nhiễm bằng phun nước cất khử trùng lên giấy thấm hàng ngày. Sau 7 ngày chụp ảnh triệu chứng gây bệnh và đánh giá tỷ lệ nhiễm bệnh trên lá hoặc quả theo công thức:

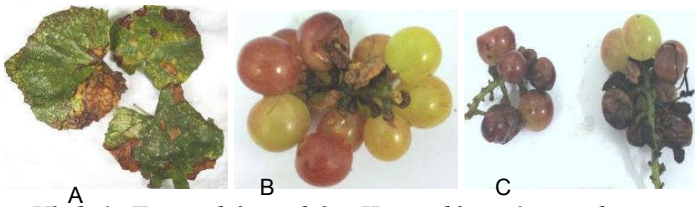
$$\text{Tỷ lệ nhiễm bệnh trên lá (quả) (\%)} = \frac{\text{Số lá (quả) bị nhiễm bệnh bệnh}}{\text{Tổng số lá (quả) lây nhiễm bệnh bệnh}} \times 100$$

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Kết quả thu thập, phân lập và làm thuần mẫu bệnh thán thư

Các mẫu bệnh được thu thập tại các vườn nho thuộc huyện Ninh Sơn, tỉnh Ninh Thuận trong giai đoạn bước vào thời kỳ thu hoạch, tháng 10 - 11 năm 2010. Tổng số mẫu nho bị bệnh thu thập được gồm 75 mẫu

Triệu chứng bệnh trên lá: Ban đầu có những đốm nhỏ như mũi kim màu nâu, sau đó vết bệnh phát triển liên kết với nhau thành từng mảng và lan rộng ra thành vết bệnh lớn màu nâu, xung quanh viền nâu sậm, vết bệnh trông như bị bỏng hoặc như bị cháy lá (hình 1A). Vết bệnh trên quả ban đầu xuất hiện là những chấm nhỏ li ti màu nâu nhạt trên vỏ quả sau chuyển sang màu nâu sẫm làm nứt vỏ quả có xuất hiện khối bào tử màu hồng trên bề mặt quả trông giống như vết bỏng, làm quả bị nứt và gây thối quả toàn bộ (hình 1B). Từ 75 mẫu bệnh nhóm 2 đem phân lập và làm thuần thu được 33 mẫu nấm. Đặc điểm triệu chứng bệnh của nhóm này giống như những mô tả về bệnh thán thư gây ra bởi nấm *Colletotrichum* (Mai Văn Hào).

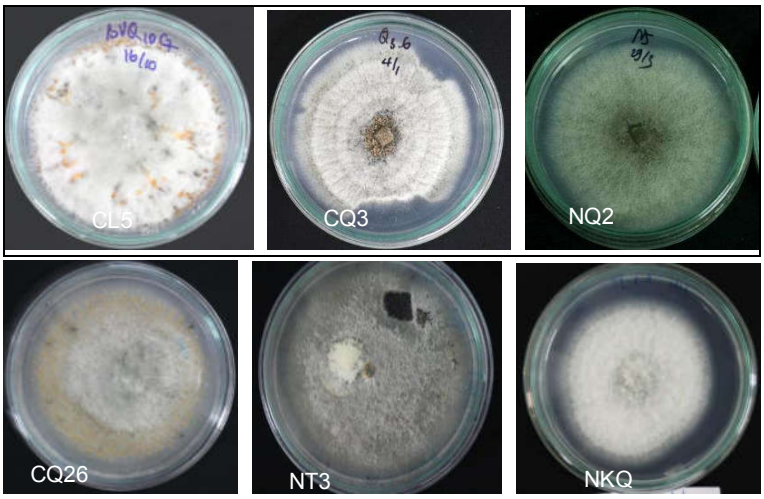


Hình 1: Triệu chứng nhóm II trên lá, quả cây nho

A. Triệu chứng trên lá B,C. Triệu chứng trên quả

Đặc điểm hình thái khuẩn lạc của 33 mẫu nấm trên môi trường PDA rất đa dạng về màu sắc, hình thái được mô tả chi tiết ở bảng 1. Màu sắc khuẩn lạc có màu trắng tinh, trắng bẩn, xám đến màu nâu (hình 2).

Đặc điểm hình thái khuẩn lạc và bào tử phù hợp với những nghiên cứu của nhiều tác giả khi mô tả loài *C. gloeosporioides*.



Hình 2: Hình thái khuẩn lạc Colletotrichum spp.

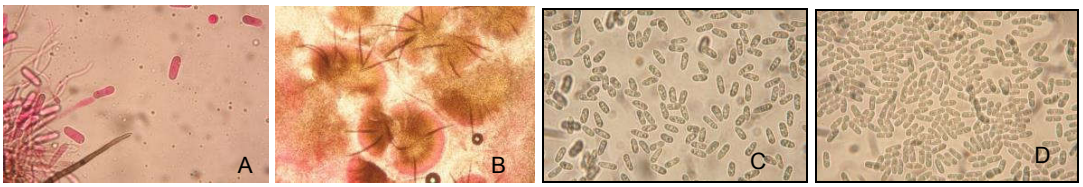
Bảng 1. Đặc điểm hình thái khuẩn lạc của các isolate *Colletotrichum* spp. sau 6 ngày trên môi trường PDA

STT	Isolate	Khuẩn lạc		Sợi nấm			Cơ quan sinh sản		
		Màu sắc (a)	Mép (b)	Dạng (c)	Mức độ cao (d)	Hạch nấm (e)	Túi bào tử (f)	Lông cứng (g)	Hình dạng (h)
1	CL1	1	+	+	1	-	0	-	2
2	CL3	2	+	+	2	-	0	-	1
3	CL5	2	+	+	2	-	2	-	1
4	CL7	2	+	+	2	-	1	-	2
5	CL10	4	+	+	2	-	1	-	2
6	CL13	2	+	+	2	-	1	-	2
7	CL14	2	+	+	2	-	0	-	1
8	CL15	2	+	+	2	-	0	-	2
9	CL17	2	+	+	2	-	1	-	2
10	CL19	1	+	+	2	-	0	-	2
11	CQ3	3	++	++	1	-	2	+	2

STT	Isolate	Khuẩn lạc		Sợi nấm			Cơ quan sinh sản		
		Màu sắc (a)	Mép (b)	Dạng (c)	Mức độ cao (d)	Hạch nấm (e)	Túi bào tử (f)	Lông cứng (g)	Hình dạng (h)
12	CQ5	1	+	+	2	-	1	-	1
13	CL21	2	+	+	1	-	1	-	2
14	CL22	3	+	+	2	-	1	-	2
15	CL25	4	+	+	2	-	0	-	2
16	CL27	3	+	+	2	-	0	-	2
17	CL28	4	+	+	2	-	1	-	2
18	CL30	4	+	+	2	-	0	-	1
19	CQ26	2	+	+	2	-	2	-	2
20	CQ28	1	+	+	2	-	0	-	1
21	CQ29	3	+	+	2	-	0	-	2
22	NL2	2	+	+	2	-	1	-	2
23	NL3	2	+	+	2	-	1	-	2
24	NL5	2	+	+	2	-	0	-	2
25	NL7	2	+	+	2	-	0	-	1
26	NT3	4	+	+	2	-	2	-	2
27	NQ2	4	+	+	2	+	0	-	2
28	NQ4	1	+	+	2	-	0	-	2
29	NQ6	2	+	+	2	-	0	-	2
30	NKL1	4	+	+	2	-	0	-	2
31	NKL3	1	+	+	2	-	0	-	2
32	NKL5	4	+	+	2	-	0	-	1
33	NKQ	1	+	+	2	-	1	-	2

Ghi chú:

CL: Mẫu bệnh trên lá của giống Cardinal, CQ: Mẫu bệnh trên quả của giống Cardinal
NL: Mẫu bệnh trên lá của giống NH01-53, NQ: Mẫu bệnh trên quả của giống NH01-53
NKL: Mẫu bệnh trên lá và NKQ: Mẫu bệnh trên quả của giống không có tên
a. Màu sắc khuẩn lạc : 1.trắng; 2. xám; 3. trắng bẩn; 4. xám nâu e. Hạch nấm: - không; + có
b. Mép khuẩn lạc: +.xốp; ++. chắc f. Túi bào tử: 0 hiếm; 1 ít; 2 nhiều
c. Dạng sợi nấm : +.xốp; ++.chắc g. Lông cứng: - không; + có
d. Chiều cao sợi nấm; 1. thấp; 2. trung bình; 3. cao
h. hình dạng bào tử : 1. trụ thẳng tròn một đầu. 2.trụ thẳng tròn 2 đầu



Hình 3: Hình thái bào tử Colletotrichum spp.

A. cuống sinh bào tử CL5; B. lông cứng (NQ2); C. bào tử nhóm 1; D. bào tử nhóm 2

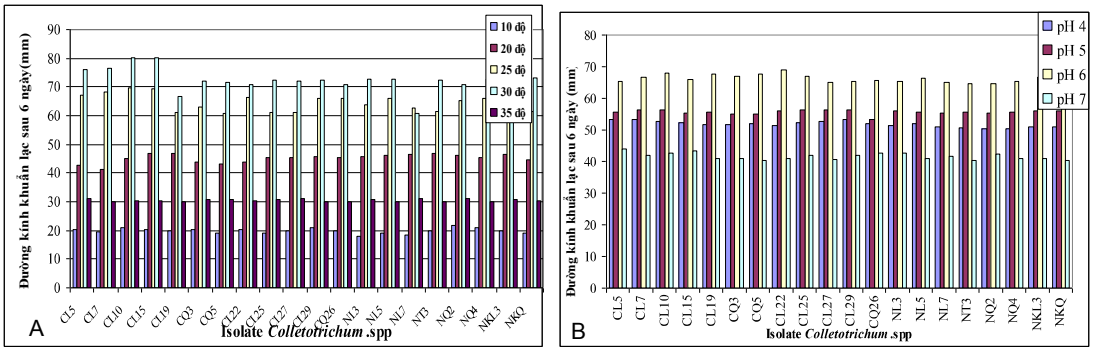
Bào tử nấm có hai dạng: Dạng 1 bào tử hình trụ thẳng, một đầu tròn một đầu hơi nhọn; dạng 2 có bào tử hình trụ thẳng 2 đầu tròn chiếm phần lớn các isolate (hình 3C và D). Bào tử nấm trong suốt không có vách ngăn, kích thước trung bình 13-18 µm × 4.5 - 6 µm. Trên thực tế phát hiện được một số isolate có lông cứng (hình 3B) đĩa cành xếp

sít nhau. Quan sát cơ quan sinh sản sinh dưỡng hay còn gọi bào tử đính dưới kính hiển vi bào tử được mọc ra từ cuống đó là hình thức sinh sản vô tính.

2. Kết quả nghiên cứu đặc điểm sinh học của nấm *Colletotrichum* spp.

2.1. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến sự phát triển đường kính khuẩn lạc của nấm Colletotrichum spp.

Lấy đại diện 20 isolate được cấy trên môi trường PDA ở 6 nhiệt độ khác nhau 10^{o}C, 20^{o}C, 25^{o}C, 30^{o}C, 35^{o}C và 40^{o}C. Tại 40^{o}C các isolate không phát triển. Trung bình đường kính khuẩn lạc phát triển tại 10^{o}C thấp nhất (19.9 mm), ở 20^{o}C đạt 45,15 mm, nhiệt độ 25^{o}C là 64,62 mm và 30^{o}C là 72,48 mm, 35^{o}C là 30,45 mm. Chúng tôi nhận thấy, nhiệt độ 30^{o}C đường kính khuẩn lạc phát triển cao nhất. Biểu đồ hình 4A cho ta thấy có sự khác biệt nhau giữa nhiệt độ 10^{o}C, 35^{o}C thấp hơn so với nhiệt độ 25 - 30^{o}C. Tại 30^{o}C, isolate phát triển cao nhất đặc biệt là isolate CL10 đạt 80 mm, CL15 đạt 80 mm. Chứng tỏ nhiệt độ ở 30^{o}C thích hợp nhất cho sự phát triển của loài này.



Hình 4: Đồ thị biểu diễn sự phát triển đường kính khuẩn lạc của các isolate Colletotrichum spp. *trên môi trường PDA ở các nhiệt độ và pH khác nhau*

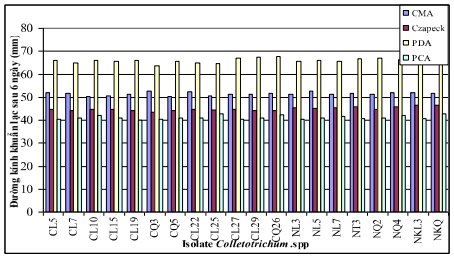
2.2. Ảnh hưởng của pH đến sự phát triển của đường kính khuẩn lạc Colletotrichum spp.

20 isolate được cấy trên môi trường PDA ở 4 pH khác nhau, pH 4, 5, 6 và 7. Trung bình đường kính khuẩn lạc phát triển tại pH 4 là thấp nhất đạt 51,8 mm, pH 5 đạt 55,76 mm, pH 6 đạt 66,27mm và pH 7 đạt 41,65 mm. Chúng tôi nhận thấy, pH 6 đường kính khuẩn lạc phát triển cao nhất.

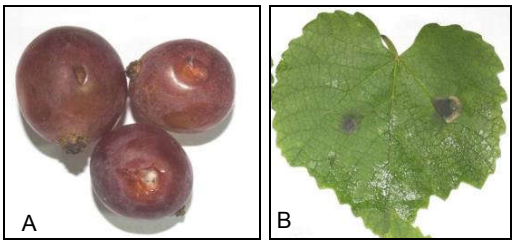
Qua hình 4B cho ta thấy cột thể hiện sự phát triển đường kính khuẩn lạc pH 6 cao nhất, trong đó đường kính khuẩn lạc isolate CL10 là 68 mm, CL 22 là 69 mm, pH 7 thấp nhất. Chứng tỏ pH 6 thích hợp cho sự phát triển của các mẫu nấm.

2.3. Kết quả ảnh hưởng của 4 loại môi trường đến sự phát triển đường kính khuẩn lạc Colletotrichum spp.

20 isolate tiếp tục đem nghiên cứu điều kiện dinh dưỡng tại các môi trường khác nhau. Khi so sánh trung bình sự phát triển đường kính khuẩn lạc tại môi trường CMA là 51,51 mm, Czapek là 44,76 mm, PDA là 66,01 mm, PCA là 41,15 mm. Trung bình đường kính khuẩn lạc trên môi trường PDA cao nhất. Do vậy, môi trường PDA là môi trường thích hợp cho sự phát triển của các isolate *Colletotrichum* spp. Cho ta thấy trên môi trường PDA mẫu phát triển cao nhất là isolate CQ26 đạt 67,67 mm, NKL3 đạt 67,67mm (hình 5).



Hình 5: Đồ thị biểu diễn sự phát triển đường kính khuẩn lạc của các isolate Colletotrichum spp. *trên các môi trường khác nhau*



Hình 6: Kết quả lây nhiễm nhân tạo Colletotrichum spp. *trên quả, lá cây nho sau 7 ngày trong phòng thí nghiệm*

A. Quả bị nhiễm bệnh; B. Lá bị nhiễm bệnh

3. Tính độc gây bệnh của nấm *Colletotrichum* spp. trong phòng thí nghiệm

Mục đích để sàng lọc một số chủng nấm có tính độc gây bệnh cao. Sau 7 ngày lây nhiễm kết quả thu được của 20 isolate *Colletotrichum* spp. lây nhiễm trên lá và quả (bảng 2).

Bảng 2. Kết quả đánh giá độc tính gây bệnh của isolate *Colletotrichum* spp. trên lá và quả nho sau 7 ngày

Isolate	Tỷ lệ nhiễm trên lá (%)	Tỷ lệ nhiễm bệnh trên quả (%)	Isolate	Tỷ lệ nhiễm trên lá (%)	Tỷ lệ nhiễm bệnh trên quả (%)
CL5	44 ± 0,9	39 ± 0,9	CL29	34 ± 0,9	33 ± 0
CL7	56 ± 0,9	34 ± 0,9	CQ26	89 ± 0,9	72 ± 8
CL10	34 ± 0,9	28 ± 0,9	NL3	72 ± 3	50 ± 0
CL15	50 ± 2	44 ± 0,9	NL5	39 ± 0,9	33 ± 2
CL19	61 ± 0,9	56 ± 0,9	NL7	61 ± 0,9	61 ± 0,9
CQ3	50 ± 2	44 ± 0,9	NT3	39 ± 0,9	34 ± 0,9
CQ5	72 ± 0,9	67 ± 0	NQ2	44 ± 0,9	39 ± 0,9
CL22	67 ± 2	61 ± 0,9	NQ4	50 ± 2	44 ± 3
CL25	44 ± 0,9	44 ± 0,9	NKL3	39 ± 0,9	33 ± 0
CL27	44 ± 0,9	39 ± 0,9	NKQ	56 ± 6	44 ± 0,9
Đ/C	0	0	Đ/C	0	0

Qua bảng 2 cho thấy độc tính trên lá mẫu CQ26 cao nhất đạt 89%, mẫu CQ5 đạt 72%. Độc tính trên quả isolate CQ26 cao nhất đạt 72%, isolate CQ5 đạt 67%. Chứng tỏ 2 isolate này có độc tính gây bệnh cao cả trên lá và quả. Nhìn chung các isolate độc tính gây bệnh trên lá cao hơn trên quả, chứng tỏ lá dễ bị nhiễm bệnh hơn quả.

Qua hình 6 cho thấy triệu chứng trên quả sau khi lây nhiễm ban đầu là những chấm nhỏ màu nâu nhạt dần dần chuyển sang màu nâu sẫm làm nứt vỏ quả ăn sâu vào bên trong của thịt quả (hình 6A) xuất hiện những dịch màu hồng và gây thối quả. Trên lá sau khi lây nhiễm vết bệnh ban đầu màu nâu, sau đó vết bệnh phát triển thành

vết bệnh lớn màu nâu xám, xung quanh viền nâu sậm phồng rộp lên (hình 6B).

IV. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

1. Kết luận

- Thu được 75 mẫu bệnh phân lập được 33 isolate *Colletotrichum* spp.

- Môi trường PDA, pH 6 và nhiệt độ 25-30^{o}C là điều kiện thích hợp cho sự phát triển của nấm bệnh.

- Độc tính của nấm *Colltotrichum* spp. gây bệnh trên lá cao hơn trên quả, 2 isolate CQ26 và CQ5 có tính độc cao nhất trung bình lần lượt là 89% và 72%, trong đó trên lá chủng CQ26 có khả năng gây bệnh lên tới 72% và chủng còn lại có khả năng gây bệnh 67%.

2. Đề nghị

Tiếp tục nghiên cứu nấm gây bệnh thán thư trên nho nhận dạng và phân tích tính đa dạng di truyền của chúng giữa các vùng sinh thái khác nhau để từ đó có biện pháp phòng trừ bệnh một cách hiệu quả.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Tổng cục Thống kê, (2010), *Niên giám thống kê 2010*.
2. Mai Văn Hào, Phan Công Kiên, Hoàng Thị Mỹ Lệ, Nguyễn văn Chính, (2005) "*Kết quả nghiên cứu giám định và định danh tác nhân gây bệnh thán thư hại nho tại Ninh Thuận*" Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn, số 22:25-27.
3. Nguyễn Thanh Hà, Hoàng Thị Ngát, Nguyễn Thu Hà, Phạm Xuân Hội, (2011), "*Nghiên cứu độc tính gây bệnh nấm Colletotrichum gloeosporioides gây bệnh trên cà phê ở miền Bắc Việt Nam*". Tạp chí Sinh học 33(1):67-73.
4. Jamadar.M.M, (2007) "*Etiology, epidemiology and management of anthracnose of grapevine*" Doctor of philosophy in Plant pathology:140tr

Ngày nhận bài: 5/2/2012
Người phản biện: PGS. TS. Nguyễn Văn Viết , ngày 8/2/2012
Ngày duyệt đăng: 20/3/2012

NGHIÊN CỨU MỘT SỐ BIỆN PHÁP KỸ THUẬT PHÒNG TRỪ MỌT ĐỤC QUẢ CÀ PHÊ CHÈ TẠI VÙNG TÂY BẮC

Nguyễn Quang Trung

SUMMARY

Some research office except engineering measures tea be4rries of a madonna in northwestem

In Son La area is now almost coffee growers did not apply all the technical measures for planting and care, especially in technical methods of insect control. To address that many managers and farmers concerned about the possibility arises of pests affecting the income of coffee growers. This report introduces some initial results of the investigation, study some technical measures to prevent termites coffee fruit (*Stéphanoderes hampei* Ferr). Through survey research shows that most of the coffee growing areas in Son La weevil damage were heavy losses from July to October. The thinning out 30 to 40% lower branches that yield differences, post-harvest fruit trees and remnants of the lowest harvest was 5.8%. Thu ignore, including the ripe fruit, dried fruit and brown on the plant, underground and then destroyed by a destroy the source of damage to fruit next season. Preventive medicine in the period when chemistry results 8 weeks onwards, the restrictions arising developed a fruit. Effect of chemicals VeTemex20EC 0.15%, Suprathion 0.15% 40EC prevent termite spray fruit with the highest effective eradication of 15 and 45 days after injection.

Keywords: Coffee, northwestem