

## PHÁT HIỆN CÁC LOÀI *Colletotrichum* GÂY BỆNH THÁN THƯ ỚT BẰNG PHẢN ỨNG CHUỖI POLYMERASE

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

<sup>1</sup>*Viện nghiên cứu Rau quả, <sup>2</sup>Khoa Nông học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam*

\*Tác giả liên hệ: [duyhungfavri@gmail.com](mailto:duyhungfavri@gmail.com)

Ngày nhận bài: 21.01.2019

Ngày chấp nhận đăng: 19.02.2019

### TÓM TẮT

Bệnh thán thư do nấm *Colletotrichum* spp. là một trong các bệnh nguy hiểm nhất trên ớt tại Việt Nam và thế giới. Định danh loài *Colletotrichum* gây bệnh thán thư ớt dựa trên các đặc điểm hình thái thường gây ra sự nhầm lẫn. Mục tiêu của nghiên cứu là thiết kế được các cặp mồi đặc hiệu phục vụ chẩn đoán nhanh, chính xác loài nấm *Colletotrichum* gây bệnh thán thư ớt bằng phản ứng chuỗi polymerase (PCR). Trong nghiên cứu này dựa trên trình tự vùng Internal Transcribed Spacer (ITS) và vùng liên gen của 2 gen *apn2* và *MAT1-2-1* genes (ApMat) đã thiết kế được 4 cặp mồi đặc hiệu. Các cặp mồi thiết kế đã phát hiện đặc hiệu 4 loài *C. truncatum*, *C. fructicola*, *C. gloeosporioides* sensu stricto và *C. siamense* gây bệnh thán thư ớt tại đồng bằng sông Hồng và một số tỉnh. Nghiên cứu cũng chứng tỏ phương pháp chiết nhanh DNA bằng NaOH có hiệu quả cao nhằm chuẩn bị mẫu DNA từ nấm *Colletotrichum* cho phản ứng PCR. Phân tích PCR dùng các mồi đặc hiệu trên 52 mẫu nấm *Colletotrichum* gây bệnh thán thư ớt thu tại 9 tỉnh đồng bằng Sông Hồng, 3 tỉnh trung du và miền núi phía Bắc và 1 tỉnh đồng bằng Sông Cửu Long đã xác định được loài phổ biến nhất là *C. siamense* (chiếm 51,9% tổng số mẫu), tiếp theo là *C. fructicola* (21,2%), *C. truncatum* (15,4%), và *C. gloeosporioides* sensu stricto (9,6%).

Từ khóa: Bệnh thán thư ớt, *Colletotrichum*, chẩn đoán, mồi đặc hiệu, PCR.

### Detection of *Colletotrichum* Species Causing Anthracnose of Chili by Polymerase Chain reaction

#### ABSTRACT

Anthracnose caused by *Colletotrichum* spp. is one of the most destructive diseases of chili in Vietnam and worldwide. Identifying *Colletotrichum* species that cause anthracnose based on morphological characteristics often causes confusion. The objective of the study was to design specific primer pairs for rapid and accurate diagnosis of *Colletotrichum* fungus causing anthracnose by PCR (polymerase chain reaction). In the study, based on the Internal Transcribed Spacer (ITS) region and the intergenic region of *apn2* and *MAT1-2-1* genes (ApMat) four specific primer pairs were designed. Four species, i.e. *C. truncatum*, *C. fructicola*, *C. gloeosporioides* sensu stricto and *C. siamense* that cause chili anthracnose in the Red River Delta and some other provinces were detected. The study also showed that a modified rapid extraction protocol using NaOH was highly effective to prepare DNA samples from *Colletotrichum* cultures for PCR reaction. PCR analyses using the newly designed specific primers on 52 chili *Colletotrichum* isolates collected from 13 provinces, mainly the Red River Delta, revealed *C. siamense* as the most abundant species (51.9% of total isolates), followed by *C. fructicola* (21.2%), *C. truncatum* (15.4%), and *C. gloeosporioides* sensu stricto (9.6%).

Keywords: *Colletotrichum*, chili, specific primer design, diagnosis, PCR.

#### 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong số các bệnh hại ớt, bệnh thán thư do nấm *Colletotrichum* spp. gây ra được xem là bệnh hiểm nhất. Cho tới năm 2008, thành phần

loài *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*, *C. nigrum* đã được công bố gây bệnh thán thư ớt (Don *et al.*, 2007; Ngô Bích Hào, 1992).

Định danh nấm *Colletotrichum* dựa vào các đặc điểm hình thái thường không đủ để phân loại tới mức loài nên đã có quá nhiều nhầm lẫn trong phân loại chi nấm này (Hyde *et al.*, 2009). Gần đây, định danh nấm *Colletotrichum* dựa trên phân tích phân tử ngày càng phổ biến và dẫn tới nhiều thay đổi trong phân loại các loài thuộc chi này (Cannon *et al.*, 2012).

Đối với nấm *Colletotrichum* gây bệnh thán thư trên ớt, các nghiên cứu phân loại mới gần đây cho thấy có sự thay đổi lớn về thành phần loài so với các công bố trước đây. Tại Ấn Độ, định danh lại 52 mẫu nấm *C. gloeosporioides* sensu lato cho thấy chúng thuộc 2 loài là *C. fructicola* và *C. siamense* (Sharma & 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 danh lại lần lượt là *C. simmondsii* và *C. truncatum* (Ko *et al.*, 2011). Cũng tại Thái Lan, gần đây hơn 4 loài *Colletotrichum* gây bệnh thán thư ớt đã được xác định là *C. gloeosporioides* sensu stricto, *C. siamense*, *C. acutatum* và *C. truncatum* (Suwannarat *et al.*, 2017). Tại Trung Quốc, phân tích trình tự của 1285 mẫu nấm *Colletotrichum* thu tại 29 tỉnh đã xác định được 15 loài trong đó có 5 loài phổ biến là *C. fiorinae*, *C. fructicola*, *C. gloeosporioides* sensu stricto, *C. scovillei*, and *C. truncatum* (Diao *et al.*, 2017). Tại Úc, phân tích 45 mẫu nấm *Colletotrichum* gây bệnh thán thư ớt đã xác định được 5 loài *C. siamense*, *C. simmondsii*, *C. queenslandicum*, *C. truncatum* và *C. cairnsense* (De Silva *et al.*, 2017).

Trong năm 2017, dựa trên đặc điểm hình thái và giải trình tự vùng Internal Transcribed Spacer (ITS) và vùng liên gen của 2 gen *apn2* và *MAT1-2-1* (ApMat) của các mẫu *Colletotrichum* gây bệnh thán thư ớt thu tại đồng bằng sông Hồng, ít nhất 5 loài là *C. truncatum*, *C. fructicola*, *C. gloeosporioides* sensu stricto, *C. aeshynomenes*, *C. siamense* đã được xác định (Nguyễn Duy Hưng và cs., 2017).

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 miễn cảm với thuốc hóa học khác nhau theo loài (Mongkolporn *et al.*, 2010; Peres *et al.*, 2004).

Do xác định các loài *Colletotrichum* dựa trên các đặc điểm hình thái thường mất thời gian nên kỹ thuật PCR đã được áp dụng. Nhiều cặp mồi PCR đã được thiết kế để phát hiện các loài *Colletotrichum* gây hại trên ớt (Imjit *et al.*, 2012; Srinivasan *et al.*, 2014) cũng như các cây trồng khác (Kamle *et al.*, 2013; Torres-Calzada *et al.*, 2011; Shi *et al.*, 2008; Yao *et al.*, 2018). Tuy nhiên, các cặp mồi này đều được thiết kế trên vùng ITS vốn bảo thủ cao nên khó có thể phân biệt được các loài, đặc biệt trong các phức hợp loài như *C. gloeosporioides* sensu lato.

Mục tiêu của nghiên cứu này là thiết kế các cặp mồi đặc hiệu cho mỗi loài *Colletotrichum* phát hiện được trên ớt tại Việt Nam, chủ yếu tại đồng bằng sông Hồng, và ứng dụng chúng để phát hiện và đánh giá mức độ phổ biến của các loài *Colletotrichum* gây bệnh thán thư trên ớt.

## 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### 2.1. Mẫu nấm

Các mẫu nấm *Colletotrichum* được phân lập từ vết bệnh thán thư trên quả ớt thu thập từ năm 2015-2017. Bào tử trên vết bệnh được hòa trong nước cất vô trùng và cấy rìa 3 chiều trên môi trường WA (Water Agar) chứa Streptomycin (100 ppm). Mẫu nấm thuần được tạo ra bằng cách cấy truyền tản nấm đơn (từ 1 bào tử) từ môi trường WA sang môi trường PDA (Potato Dextrose Agar).

### 2.2. Thiết kế mồi PCR

Để thiết kế mồi đặc hiệu, trình tự các mẫu đại diện cho các loài *Colletotrichum* (Type species) được tải từ Genbank và được căn trình tự đa chuỗi bằng phần mềm CLUSTAL X version 2.1 (Larkin *et al.*, 2007). Dựa trên các trình tự được căn trình tự đa chuỗi, các mồi được lựa chọn từ các trình tự đặc hiệu cho mỗi loài.

Đối với loài *C. truncatum*, mỗi đặc hiệu được thiết kế trên vùng ITS vì vùng này chứa nhiều vị trí khác biệt đặc trưng cho loài này (Nguyễn Duy Hưng và cs., 2017). Vùng ITS của loài này đã được căn trình tự đa chuỗi với 7 loài *Colletotrichum* đã được công bố gây bệnh thán thư ớt (Than *et al.*, 2008).

Đối với 3 loài *C. gloeosporioides sensu stricto*, *C. siamense* và *C. fructicola* của phức hợp loài *C. gloeosporioides sensu lato*, do trình tự ITS của chúng quá bảo thủ, nên trình tự vùng ApMat (Silva *et al.*, 2012) đã được sử dụng để thiết kế mỗi đặc hiệu. Trình tự ApMat của 28 loài thuộc phức hợp loài *C. gloeosporioides sensu lato* (Liu *et al.*, 2015) đã được lựa chọn để căn trình tự đa chuỗi.

Các mẫu *Colletotrichum* dùng để tối ưu hóa các môi thiết kế trong phản ứng PCR là các mẫu nấm phân lập từ ớt và đã xác định danh tính (Nguyễn Duy Hưng và cs., 2017) bao gồm *C. truncatum* (mẫu C25 và C30), *C. fructicola* (mẫu C1 và C14), *C. siamense* (mẫu C4 và C33), *C. gloeosporioides sensu stricto* (mẫu C9 và C44), *C. aesclynomenes* (mẫu C29).

### 2.3. Chiết DNA nấm

DNA tổng số của các mẫu nấm được chiết bằng 2 phương pháp.

Phương pháp 1 (CTAB) sử dụng đệm CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) theo qui trình của Doyle & Doyle (1987). Khoảng 50 mg tán 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. DNA được chiết một lần với Chloroform: isoamyl alcohol (24:1). Cặn DNA được rửa hai lần bằng ethanol 70% và hòa trong 30 uL nước cất 2 lần vô trùng. Mẫu DNA được bảo quản ở -20°C.

Phương pháp 2 (NaOH) là phương pháp chiết nhanh bằng NaOH được cải tiến theo phương pháp của Wang *et al.* (1993). Tán nấm thuần (khoảng 50 mg) trên môi trường PDA được cho vào ống Eppendorf 1,5 mL chứa 50 µL NaOH 0,5 M và được nghiền bằng đầu tip loại 100-200 µL. Dịch nghiền, 5 µL, được chuyển sang ống Eppendorf 1,5 mL chứa 50 µL đệm Tris 0,1M, pH 8. Mẫu DNA được bảo quản ở -20°C.

### 2.4. Phản ứng PCR

Các phản ứng PCR được thực hiện bằng kit GoTaq Green Master Mix (Promega) hoặc kit 2X i-Taq PCR Master Mix (iNtRON Biotechnology). Phản ứng PCR được thực hiện 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 nối ở 54-62°C trong 30 giây (thay đổi theo thí nghiệm và môi), tổng hợp sợi ở 72°C trong 1 phút. Phản ứng được kết thúc với 5 phút ở 72°C.

Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1% đã 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.

## 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1. Thiết kế mỗi đặc hiệu loài *Colletotrichum*

Dựa trên so sánh trình tự, bốn cặp mỗi đặc hiệu cho 4 loài *C. truncatum*, *C. gloeosporioides sensu stricto*, *C. siamense* và *C. fructicola* đã được thiết kế. Một loạt các tham số liên quan đến chất lượng của mỗi cũng đã được xác định dựa theo các hướng dẫn về thiết kế môi PCR (Dieffenbach *et al.*, 1993; Rychlik, 1993; Judelson, 2006) (Bảng 1).

Độ dài môi: Các môi có kích thước 17-22 nucleotit. Các kích thước này nằm trong phạm vi phù hợp của môi: đủ dài để đảm bảo tính đặc hiệu và đủ ngắn để môi gắn dễ dàng vào khuôn.

Nhiệt độ tách sợi (Tm): Hai cặp môi C.sia-F1/-R1 và C.glo-F/-R có nhiệt độ tách chuỗi từ 51,6-53,8°C, nằm trong phạm vi phù hợp 50-60°C. Hai cặp môi còn lại, C-tru-F/-R và C.fru-F1/-R1 có nhiệt độ tách sợi thấp hơn từ 41,2-49°C (Bảng 1).

Nhiệt độ gắn môi (Ta): Nhiệt độ gắn môi là một trong các tiêu chí quan trọng, được tính dựa trên nhiệt độ tách sợi. Nhiệt độ gắn môi quá cao làm môi khó gắn vào khuôn dẫn tới năng suất PCR thấp. Nhiệt độ gắn môi quá thấp làm môi dễ gắn không đặc hiệu vào khuôn dẫn tới tạo các sản phẩm không đặc hiệu. Một trong các công

thức phổ biến nhất nhằm xác định nhiệt độ gắn mỗi tối ưu của cặp môi là:  $T_a = 0,3 \times T_m$  (của mỗi có nhiệt độ tách sợi thấp hơn) +  $0,7 T_m$  (của sản phẩm) -14,9 (Rychlik *et al.*, 1990). Sử dụng công thức này trong phần mềm PrimerSelect (DNASTAR Inc.), nhiệt độ gắn mỗi tối ưu của 4 cặp môi thiết kế được xác định là từ 53-55,9°C (Bảng 1), nằm trong phạm vi phù hợp 50-60°C.

Hàm lượng GC: Hàm lượng các gốc G và C của các môi thiết kế từ 42,9-57,9% (Bảng 1) nằm trong phạm vi phù hợp 40-60%.

Mẫu GC đầu 3': Tất cả 7 môi thiết kế ngoại trừ môi C.sia-R1 đều có ở đầu 3' là G hoặc C hoặc GC hoặc CG hoặc GG (Bảng 1). Mẫu GC cho phép mỗi bám đặc hiệu vào khuôn.

Độ ổn định đầu 3': Khoảng 5 nucleotit (pentamer) đầu 3' cần có độ ổn định phù hợp để gắn đặc hiệu vào khuôn. Giá trị  $\Delta G$  của 5 nucleotit đầu 3' của tất cả các môi thiết kế có giá trị từ -10,5 kcal/mol đến -7,1 kcal/mol (Bảng 1), nằm trong ngưỡng giới hạn tối đa  $\geq -12$  kcal/mol.

Cấu trúc thứ cấp: Cấu trúc thứ cấp có thể hình thành trong cùng một môi hoặc giữa 2 môi. Mỗi chứa cấu trúc thứ cấp xấu thường dẫn tới năng suất PCR bị giảm, thậm chí không có sản phẩm. Tính ổn định của cấu trúc thứ cấp được đo bằng năng lượng tự do Gibbs  $\Delta G$  (năng lượng cần để phá vỡ cấu trúc thứ cấp). Các loại cấu trúc thứ cấp là:

+ Cấu trúc kẹp tóc (Hairpins). Là cấu trúc thứ cấp hình thành trong nội bộ môi. Tất cả các môi thiết kế đều có giá trị  $\Delta G$  tối đa từ -3 kcal/mol đến 2 kcal/mol (Bảng 1), nằm trong ngưỡng giới hạn tối đa  $\geq -5$  kcal/mol.

+ Tự môi (Self Dimer). Là cấu trúc hình thành giữa các phân tử của cùng loại môi. Tất cả các môi thiết kế đều có giá trị  $\Delta G$  tối đa từ -5,9 kcal/mol đến 0,3 kcal/mol (Bảng 1), nằm trong ngưỡng giới hạn tối đa  $\geq -6$  kcal/mol.

+ Tự môi chéo (Cross Dimer). Là cấu trúc hình thành giữa các phân tử của 2 môi khác nhau (cặp môi trong phản ứng PCR). Tất cả các môi thiết kế đều có giá trị  $\Delta G$  tối đa từ -0,4 kcal/mol đến -0,2 kcal/mol (Bảng 1), nằm trong ngưỡng giới hạn tối đa  $\geq -6$  kcal/mol.

### 3.2. Xác định nhiệt độ gắn môi phù hợp cho bốn cặp môi thiết kế

Một trong các yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến tính đặc hiệu và hiệu suất của mỗi là nhiệt độ gắn môi. Mặc dù nhiệt độ gắn mỗi tối ưu cho 4 cặp môi đã được xác định bằng phần mềm (Bảng 1) nhưng chúng cần phải được xác định bằng thực nghiệm. Sử dụng DNA được chiết từ các mẫu nấm đã được xác định danh tính, phản ứng PCR đã được thực hiện ở 3 ngưỡng nhiệt độ là 54, 58 và 62°C nhằm xác định nhiệt độ gắn mỗi phù hợp cho 4 cặp môi thiết kế. Kết quả kiểm tra PCR (Bảng 2, Hình 1) cho thấy:

Cặp môi C.tru-F và C.tru-R (đặc hiệu loài *C. truncatum*) có khả năng phát hiện đặc hiệu loài này ở phạm vi nhiệt độ rất rộng. Ở cả 3 ngưỡng nhiệt độ, cặp môi này chỉ tạo bằng sản phẩm mong muốn 321 bp đối với 2 mẫu C30 và C25 (*C. truncatum*).

Tương tự, cặp môi C.glo-F và C.glo-R (đặc hiệu loài *C. gloeosporioides sensu stricto*) cũng có khả năng phát hiện đặc hiệu loài nấm này ở cả 3 ngưỡng nhiệt độ, chỉ tạo bằng sản phẩm mong muốn 211 bp đối với 2 mẫu C9 và C44 (*C. gloeosporioides sensu stricto*).

Đối với cặp môi C.fruc-F1 và C.fruc-R1 (đặc hiệu loài *C. fructicola*), ở nhiệt độ gắn môi 54°C, bằng đặc hiệu 307 bp mặc dù chỉ hình thành ở 2 mẫu C1 và C14 (*C. fructicola*) nhưng mờ, có lẽ do hình thành nhiều sản phẩm tự môi hoặc tự môi chéo (dimer). Ngoài ra, ở ngưỡng nhiệt độ này, cặp môi cũng tạo sản phẩm không đặc hiệu ~ 800 bp đối với mẫu C29 (*C. aeshynomenes*) và ~ 150 bp đối với mẫu C25 (*C. truncatum*). Ở nhiệt độ gắn môi 58°C, cặp môi đã tạo bằng đặc hiệu rõ đối với 2 mẫu C1 và C14 (*C. fructicola*) chứng tỏ mức độ hình thành dimer đã giảm. Tuy nhiên, ở ngưỡng nhiệt độ 58°C, cặp môi cũng tạo bằng sản phẩm đặc hiệu rất mờ đối với mẫu C44 (*C. gloeosporioides sensu stricto*). Khi tăng nhiệt độ lên 62°C, cặp môi này chỉ tạo bằng đặc hiệu và rõ đối với 2 mẫu C1 và C14 và không tạo bất kỳ bằng sản phẩm nào đối với các mẫu *Colletotrichum* khác.

**Bảng 1. Đặc điểm 4 cặp mồi được thiết kế để phát hiện *C. truncatum*, *C. fructicola*, *C. siamense* và *C. gloeosporioides sensu stricto***

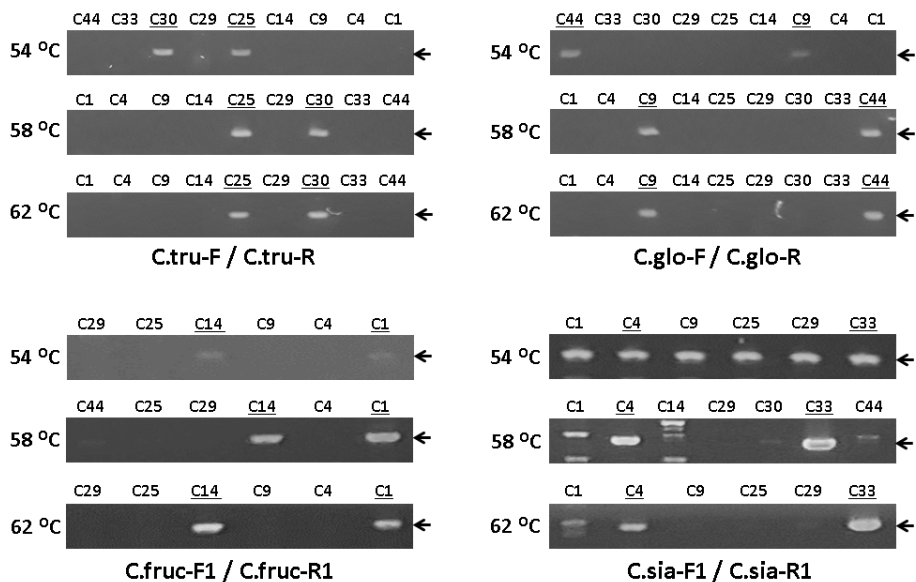
Mồi	Trình tự (5'-3')	Độ dài mồi (nu)	Mẫu GC đầu 3'	Hàm lượng GC (%)	Nhiệt độ tách mồi (°C)	$\Delta G$ pentamer đầu 3' (kcal/mol)	$\Delta G$ cấu trúc kẹp tóc tối đa (kcal/mol)	$\Delta G$ tự mồi tối đa (kcal/mol)	$\Delta G$ tự mồi chéo tối đa (kcal/mol)	Nhiệt độ gắn mồi tối ưu (°C)	Độ dài sản phẩm (bp)
C.tru-F	GTCCCCTAAAAAGGACGTC	19	C	52,6	47,7	-9,4	-1,9	-4,4	-2,9	53	321
C.tru-R	CCTACGTCAACCGTAGAG	18	G	55,6	42,2	-7,1	-3,1	-2,5			
C.fruc-F1	CATCAAATCGAAGATCTCTGC	21	GC	42,9	49,0	-9,9	1,1	-2,8	-0,2	55,3	307
C.fruc-R1	CTTTAGGTCGTCCTTGTTTC	21	C	47,6	48,2	-8,2	1,2	0,3			
C.sia-F1	TGACAGCGGCTGTGTATCG	19	CG	57,9	52,8	-9	0,8	-3	-0,4	54,2	345
C.sia-R1	GATACTTAGGCGTACGAATGCA	22	Không	45,5	51,6	-10,5	2	-5,9			
C.glo-F	ACTCTTGCCGCAGCATATAGG	21	GG	52,4	53,8	-8,1	0,8	-0,1	-2	55,9	211
C.glo-R	GTAGCATCAGCAACGAATTGG	21	GG	47,6	52,5	-10,4	2	-0,4			

*Ghi chú:* Các tham số nhiệt động học của mồi gồm nhiệt độ tách mồi,  $\Delta G$  pentamer đầu 3',  $\Delta G$  cấu trúc kẹp tóc tối đa,  $\Delta G$  tự mồi tối đa và  $\Delta G$  tự mồi chéo tối đa được xác định dùng phần mềm VectorNTI Advance 11.5 (Invitrogen), trong đó  $\Delta G$  là năng lượng tự do Gibbs. Nhiệt độ gắn mồi tối ưu được xác định bằng phần mềm PrimerSelect (DNASTAR, Inc.).

**Bảng 2. Xác định nhiệt độ gắn môi phù hợp của 4 cặp môi thiết kế**

Cặp môi	Loài nấm kiểm tra	Bảng PCR đặc hiệu ở các ngưỡng nhiệt độ		
		54°C	58°C	62°C
C.tru-F/-R	<i>C. truncatum</i>	++	+++	+++
	<i>C. fructicola</i>	-	-	-
	<i>C. siamense</i>	-	-	-
	<i>C. gloeosporioides sensu stricto</i>	-	-	-
	<i>C. aeshynomenes</i>	-	-	-
C.fruc-F1/-R1	<i>C. truncatum</i>	-	-	-
	<i>C. fructicola</i>	+	+++	+++
	<i>C. siamense</i>	-	-	-
	<i>C. gloeosporioides sensu stricto</i>	-	-	-
	<i>C. aeshynomenes</i>	-	-	-
C.sia-F1/-R1	<i>C. truncatum</i>	+++	+	-
	<i>C. fructicola</i>	+++	-	-
	<i>C. siamense</i>	+++	+++	+++
	<i>C. gloeosporioides sensu stricto</i>	+++	-	-
	<i>C. aeshynomenes</i>	+++	-	-
C.glo-F/-R	<i>C. truncatum</i>	-	-	-
	<i>C. fructicola</i>	-	-	-
	<i>C. siamense</i>	-	-	-
	<i>C. gloeosporioides sensu stricto</i>	++	+++	+++
	<i>C. aeshynomenes</i>	-	-	-

Chú thích: (-): không xuất hiện băng đặc hiệu; (+, ++, +++): mức độ đậm của băng đặc hiệu



Ghi chú: Mũi tên chỉ bằng sản phẩm mong muốn cho từng cặp môi. Các giếng là các mẫu nấm đã xác định danh tính: C25 và C30 (*C. truncatum*), C1 và C14 (*C. fructicola*), C4 và C33 (*C. siamense*), C9 và C44 (*C. gloeosporioides sensu stricto*), C29 (*C. aeshynomenes*).

**Hình 1. PCR xác định nhiệt độ gắn môi phù hợp cho 4 cặp môi đặc hiệu *Colletotrichum***

Đối với cặp môi C.sia-F1 và C.sia-R1 (đặc hiệu loài *C. siamense*), phản ứng PCR ở nhiệt độ gắn môi 54°C đã tạo băng đặc hiệu 345 bp với tất cả các mẫu nấm. Ở nhiệt độ gắn môi 58°C, cặp môi này đã tạo băng đặc hiệu rõ đối với 2 mẫu C4 và C33 (*C. siamense*) và rất mờ đối với mẫu C30 (*C. truncatum*). Ở ngưỡng nhiệt độ 58°C, cặp môi cũng tạo băng sản phẩm không đặc hiệu đối với mẫu C1 (*C. fructicola*) và C44 *C. gloeosporioides sensu stricto*). Khi tăng nhiệt độ gắn môi lên 62°C, cặp môi này đã tạo băng đặc hiệu, rõ đối với 2 mẫu C4 và C33 (*C. siamense*). Ở nhiệt độ gắn môi 62°C, cặp môi vẫn tạo băng không đặc hiệu đối với mẫu C1 (*C. fructicola*), tuy nhiên băng này có thể phân biệt được với băng đặc hiệu.

Dựa trên các kết quả trên, nhiệt độ gắn môi tối ưu đối với 3 cặp môi C.tru-F/-R, C.fru-F1/-R1 và C.glo-F/-R là từ 58-62°C, đối với cặp môi C.sia-F1/-R1 là 62°C.

### 3.3. Đánh giá phương pháp chiết nhanh DNA từ mẫu nấm *Colletotrichum* bằng NaOH

Bốn cặp môi thiết kế đặc hiệu cho 4 loài *Colletotrichum* đã được kiểm tra PCR trên các mẫu nấm đã được định danh loài. DNA của mỗi mẫu nấm được chiết bằng cả 2 phương pháp là CTAB và chiết nhanh bằng NaOH. Kết quả kiểm tra PCR (Bảng 3 và Hình 2) cho thấy băng PCR đặc hiệu hình thành ở 8 mẫu nấm đều rõ tương đương nhau ở 2 phương pháp.

Phương pháp chiết nhanh bằng NaOH vốn được áp dụng đầu tiên để chiết DNA từ mô thực vật (Wang *et al.*, 1993) dựa trên khả năng phân hủy nhanh vách và màng tế bào thực vật và giải phóng DNA của NaOH. Gần đây, Osmundson *et al.* (2013) đã đánh giá phương pháp chiết nhanh DNA của nhiều loài nấm thật và *Phytophthora* bằng NaOH cho phản ứng PCR và đã khẳng định phương pháp rất hiệu quả, tin cậy mặc dù năng suất DNA thu được không cao bằng các phương pháp chiết khác. Trong qui trình của Wang *et al.* (1993) và Osmundson *et al.* (2013), dịch nghiền mô thực vật hoặc nấm trong NaOH 0,5 M được hòa loãng 500 lần với đệm Tris 0,1 M, pH8. Trong nghiên cứu của chúng tôi,

dịch nghiền nấm *Colletotrichum* trong NaOH chỉ được hòa loãng 11 lần trọng đệm Tris, và do đó làm tăng nồng độ DNA của mẫu chiết. Kết quả so sánh phản ứng PCR giữa 2 phương pháp cũng chứng tỏ nấm *Colletotrichum* không tạo các chất ức chế phản ứng PCR và độ hòa loãng thấp của dịch NaOH trong đệm Tris không làm thay đổi nồng độ ion Na<sup>+</sup> và pH tới mức ảnh hưởng tới hiệu suất phản ứng PCR.

Dựa trên kết quả nghiên cứu, phương pháp chiết nhanh bằng NaOH cải tiến hoàn toàn phù hợp để chiết DNA từ mẫu nấm *Colletotrichum* cho phản ứng PCR. Phương pháp có nhiều ưu điểm nhưng rất đơn giản, nhanh, rẻ và giảm thiểu nguy cơ nhiễm chéo giữa các mẫu.

### 3.3. Xác định thành phần loài *Colletotrichum* gây bệnh thán thư ớt bằng PCR

Sau khi xác định được nhiệt độ gắn môi phù hợp cho 4 cặp môi thiết kế và phương pháp chiết DNA tối ưu từ mẫu nấm *Colletotrichum*, phản ứng PCR đã được thực hiện trên 52 mẫu nấm *Colletotrichum* gây bệnh thán thư ớt thu tại 9 tỉnh đồng bằng sông Hồng và 4 tỉnh khác gồm Bắc Giang, Thái Nguyên, Sơn La và Tiền Giang. Đầu tiên, các mẫu nấm được kiểm tra PCR bằng cặp môi C.sia-F1/-R1. Tiếp theo các mẫu nấm âm tính với cặp môi này lại được kiểm tra lần lượt bằng các cặp môi C.fru-F/-R1, C.glo-F-R và C.tru-F/-R theo phương pháp loại trừ.

Kết quả kiểm tra PCR các mẫu nấm *Colletotrichum* thu thập (Bảng 4) đã xác định được 27 mẫu nấm là loài *C. siamense*, 11 mẫu nấm là loài *C. fructicola*, 5 mẫu nấm là loài *C. gloeosporioides sensu stricto* và 8 mẫu nấm là loài *C. truncatum*. Riêng mẫu C29 phản ứng âm tính với cả 4 cặp môi và giải trình tự vùng ApMat đã xác định mẫu này là loài *C. aeshynomenes* (Nguyễn Duy Hưng và cs., 2017).

### 3.4. Phân bố và mức độ đa dạng của các loài *Colletotrichum* gây bệnh thán thư ớt

Dựa trên kết quả PCR, phân bố các loài nấm *Colletotrichum* gây bệnh thán thư ớt tại đồng bằng sông Hồng và một số tỉnh đã được xác định (Bảng 5, Hình 3).

### 3.4.1. Phân bố của *C. siamense*

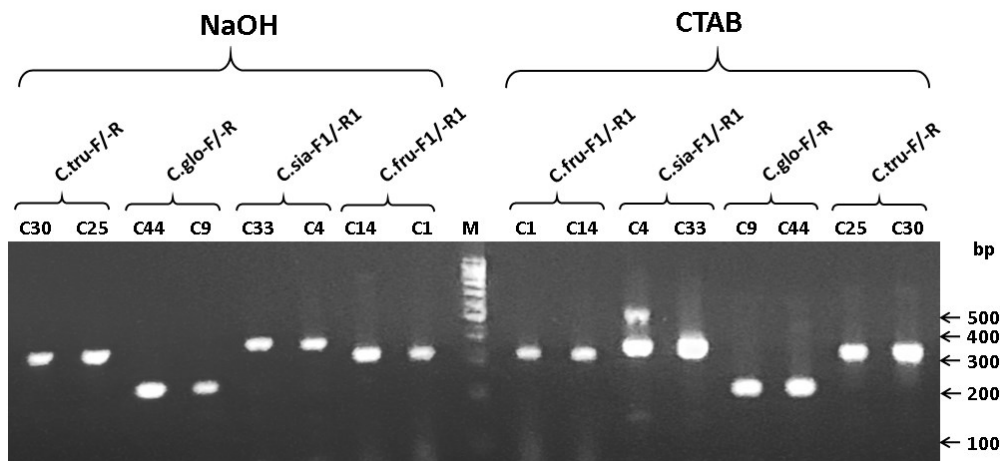
*C. siamense* là loài nấm phổ biến nhất, được phát hiện ở tất cả 13 tỉnh thu thập mẫu gồm 9 tỉnh đồng bằng sông Hồng, 3 tỉnh trung du miền núi phía Bắc (Thái Nguyên, Bắc Giang, Sơn La) và 1 tỉnh đồng bằng sông Cửu Long (Tiền Giang) (Bảng 5). Số lượng loài này được phát hiện cũng nhiều nhất, chiếm 51,9% tổng số mẫu thu thập tại 13 tỉnh (tổng mẫu = 52) và 51,2% tổng số mẫu thu thập tại đồng bằng sông Hồng (tổng mẫu = 41) (Hình 3).

*C. siamense* là loài được phát hiện đầu tiên trên cà phê tại Thái Lan năm 2009 (Prihastuti *et al.*, 2009) và có phổ ký chủ rất rộng (Weir *et al.*, 2012). Mặc dù loài này đã phát hiện gây hại trên ớt tại Thái Lan (Suwannarat *et al.*, 2017) và Ấn Độ (Sharma & Shenoy, 2013), Úc (De Silva *et al.*, 2017) nhưng lại không được liệt kê trong thành phần loài hại ớt tại Trung Quốc (Diao *et al.*, 2017). Loài *C. hymenocallidis*, một trong các loài phát hiện trên ớt tại Trung Quốc (Diao *et al.*, 2017) cũng chính là *C. siamense* theo nghiên cứu của Liu *et al.* (2016).

**Bảng 3. PCR so sánh hai phương pháp chiết DNA mẫu nấm**

Cặp mồi	Loài	Mẫu kiểm tra	Bảng PCR đặc hiệu ở hai phương pháp chiết DNA nấm	
			CTAB	NaOH
C.glo-F/-R	<i>C. gloeosporioides sensu stricto</i>	C9	+++	+++
		C44	+++	++
C.fruc-F1/-R1	<i>C. fructicola</i>	C1	++	++
		C14	++	+++
C.sia-F1/-R1	<i>C. siamense</i>	C4	+++	++
		C33	+++	++
C.tru-F/-R	<i>C. truncatum</i>	C25	+++	++
		C30	+++	+++

Chú thích: ++, +++: mức độ đậm của băng đặc hiệu



Ghi chú: M là thang DNA 100 bp (*Generuler 100 bp*, *Thermo Scientific*) với các băng từ 100-500 bp được chỉ bằng mũi tên. Các giếng là các mẫu nấm đã xác định danh tính: C25 và C30 (*C. truncatum*), C1 và C14 (*C. fructicola*), C4 và C33 (*C. siamense*), C9 và C44 (*C. gloeosporioides sensu stricto*)

**Hình 2. Phản ứng PCR so sánh 2 phương pháp chiết DNA (CTAB và NaOH) nấm *Colletotrichum* với 4 cặp mồi đặc hiệu**



**Bảng 4. Phát hiện các loài *Colletotrichum* gây bệnh thán thư ớt thu thập bằng PCR**

Mẫu	Địa điểm thu thập	Năm thu thập	Phản ứng PCR				Loài xác định
			C.sia-F1/-R1	C.fruc-F1/-R1	C.glo-F/-R	C.tru-F/R	
C1	Trâu Quỳ, Gia Lâm, Hà Nội	2015	-	+	-	-	<i>C. fructicola</i>
C2	Trâu Quỳ, Gia Lâm, Hà Nội	2015	+	0	-	0	<i>C. siamense</i>
C3	Quỳnh Hội, Quỳnh Phụ, Thái Bình	2015	-	+	-	0	<i>C. fructicola</i>
C4	Quỳnh Hội, Quỳnh Phụ, Thái Bình	2015	+	-	0	-	<i>C. siamense</i>
C5	Hoàn Long, Yên Mỹ, Hưng Yên	2015	+	0	0	0	<i>C. siamense</i>
C6	Dạ Trạch, Khoái Châu, Hưng Yên	2015	-	+	-	0	<i>C. fructicola</i>
C7	Đông Tảo, Khoái Châu, Hưng Yên	2015	+	0	0	0	<i>C. siamense</i>
C8	Tiền Phong, Ân Thi, Hưng Yên	2015	-	0	0	+	<i>C. truncatum</i>
C9	An Bình, Lương Tài, Bắc Ninh	2015	-	0	+	0	<i>C. gloeosporioides s.s</i>
C10	An Bình, Lương Tài, Bắc Ninh	2015	-	+	-	0	<i>C. fructicola</i>
C11	Trung Khê, Lương Tài, Bắc Ninh	2015	+	0	0	0	<i>C. siamense</i>
C12	Trung Khê, Lương Tài, Bắc Ninh	2015	+	0	0	0	<i>C. siamense</i>
C13	Trần Dương, Vĩnh Bảo, Hải Phòng	2015	-	0	0	+	<i>C. truncatum</i>
C14	Trần Dương, Vĩnh Bảo, Hải Phòng	2015	-	+	0	0	<i>C. fructicola</i>
C15	Trần Dương, Vĩnh Bảo, Hải Phòng	2015	-	0	+	0	<i>C. gloeosporioides s.s</i>
C16	Trần Dương, Vĩnh Bảo, Hải Phòng	2015	+	0	0	0	<i>C. siamense</i>
C17	Trần Dương, Vĩnh Bảo, Hải Phòng	2015	+	0	0	0	<i>C. siamense</i>
C18	Trần Dương, Vĩnh Bảo, Hải Phòng	2015	+	0	0	0	<i>C. siamense</i>
C19	Quỳnh Hải, Quỳnh Phụ, Thái Bình	2015	+	0	0	0	<i>C. siamense</i>
C20	Quỳnh Hải, Quỳnh Phụ, Thái Bình	2015	0	-	0	+	<i>C. truncatum</i>
C22	Nhân Hưng, Lý Nhân, Hà Nam	2015	+	0	0	0	<i>C. siamense</i>
C23	Nhân Hưng, Lý Nhân, Hà Nam	2015	+	0	0	0	<i>C. siamense</i>
C24	Dạ Trạch, Khoái Châu, Hưng Yên	2015	+	0	0	0	<i>C. siamense</i>
C25	Văn Đức, Gia Lâm, Hà Nội	2015	-	0	-	+	<i>C. truncatum</i>
C26	Hoàn Long, Yên Mỹ, Hưng Yên	2015	-	0	+	0	<i>C. gloeosporioides s.s</i>

Phát hiện các loài *Colletotrichum* gây bệnh thán thư ớt bằng phản ứng chuỗi polymerase

C27	Nhân Hưng, Lý Nhân, Hà Nam	2015	+	0	0	0	<i>C. siamense</i>
C28	Thanh Ninh, Phú Bình, Thái Nguyên	2015	+	0	0	0	<i>C. siamense</i>
C29	Thanh Ninh, Phú Bình, Thái Nguyên	2015	-	-	-	-	<i>C. aeschynomenes</i>
C30	Vân Nội, Đông Anh, Hà Nội	2015	-	-	0	+	<i>C. truncatum</i>
C31	Nhân Hưng, Lý Nhân, Hà Nam	2015	+	0	-	0	<i>C. siamense</i>
C32	Thị trấn Nông trường, Mộc Châu, Sơn La	2015	-	+	-	0	<i>C. fructicola</i>
C33	Đông Sang, Mộc Châu, Sơn La	2015	+	0	0	0	<i>C. siamense</i>
C34	Đông Sang, Mộc Châu, Sơn La	2015	-	+	-	0	<i>C. fructicola</i>
C35	Long Thành, Long Định, Tiền Giang	2016	-	0	0	+	<i>C. truncatum</i>
C36	Long Thành, Long Định, Tiền Giang	2016	+	0	0	0	<i>C. siamense</i>
C37	Nhân Hưng, Lý Nhân, Hà Nam	2016	+	0	-	0	<i>C. siamense</i>
C38	Mỹ Tiến, Mỹ Lộc, Nam Định	2016	+	0	0	0	<i>C. siamense</i>
C39	Mỹ Tân, Mỹ Lộc, Nam Định	2016	-	0	+	0	<i>C. gloeosporioides s.s</i>
C40	Hợp Đức, Tân Yên, Bắc Giang	2016	+	0	0	0	<i>C. siamense</i>
C41	Hợp Đức, Tân Yên, Bắc Giang	2016	+	0	0	0	<i>C. siamense</i>
C42	Song Vân, Tân Yên, Bắc Giang	2016	+	0	0	0	<i>C. siamense</i>
C43	Song Vân, Tân Yên, Bắc Giang	2016	-	+	-	0	<i>C. fructicola</i>
C44	Cổ Bi, Gia Lâm, Hà Nội	2016	-	-	+	-	<i>C. gloeosporioides s.s</i>
C45	Cổ Bi, Gia Lâm, Hà Nội	2016	-	+	-	0	<i>C. fructicola</i>
C46	Khánh Vân, Yên Khánh, Ninh Bình	2017	-	+	-	0	<i>C. fructicola</i>
C47	Khánh Vân, Yên Khánh, Ninh Bình	2017	+	0	0	0	<i>C. siamense</i>
C48	Văn Đức, Gia Lâm, Hà Nội	2017	0	0	0	+	<i>C. truncatum</i>
C50	Việt Hồng, Thanh Hà, Hải Dương	2017	+	0	0	0	<i>C. siamense</i>
C51	Thanh Hải, Thanh Hà, Hải Dương	2017	+	-	-	0	<i>C. siamense</i>
C52	Kim Tân, Kim Thành, Hải Dương	2017	-	+	-	0	<i>C. fructicola</i>
C53	Kim Tân, Kim Thành, Hải Dương	2017	-	0	0	+	<i>C. truncatum</i>
C54	Hoàng Hanh, Ninh Giang, Hải Dương	2017	+	0	0	0	<i>C. siamense</i>

Chú thích: +: phản ứng PCR dương tính; -: phản ứng PCR âm tính; 0: Không kiểm tra

Mẫu nấm C29 đã được xác định là loài *C. aeschynomenes* dựa trên giải trình tự vùng liên gen ApMat (Nguyễn Duy Hưng và cs., 2017)