

NGHIÊN CỨU SO SÁNH *Phytophthora* sp. GÂY HẠI TRÊN CÂY CA CAO VÀ CÂY SẦU RIÊNG Ở MỘT SỐ TỈNH NAM BỘ

Nguyễn Văn¹, Từ Thị Mỹ Thuận¹, Lê Đình Đôn¹ và Bùi Cách Tuyến²

TÓM TẮT

Dựa vào đặc điểm hình thái và trình tự vùng gen *sac* tổ tể bao oxydaza (*xitocrôm oxydaza*) (*Cox2*), đã xác định *Phytophthora palmivora* là loài gây bệnh thối trái ca cao và nứt thân chảy nhựa sầu riềng tại Bà Rịa - Vũng Tàu, Đồng Nai, Lâm Đồng, Tiền Giang và Bến Tre. *P. palmivora* phân lập từ ca cao gây bệnh cho sầu riềng, nhưng mẫu từ sầu riềng chỉ tạo triệu chứng bệnh không điển hình trên lá ca cao trong điều kiện phòng thí nghiệm. Kết quả nghiên cứu cho thấy, đã có sự phân hóa về đặc điểm hình thái và tình gây bệnh chuyên biệt theo ký chủ trong quần thể *P. palmivora*, đặc biệt với ký chủ là ca cao và sầu riềng.

Từ khóa: Ca cao, sầu riềng, *Phytophthora palmivora*, sắc tổ tể bao oxydaza (*xitocrôm oxydaza*).

1. MỞ ĐẦU

Phytophthora là tác nhân gây hại phổ biến ở hầu hết các vùng trồng ca cao và sầu riềng trên thế giới. Ở Việt Nam, ca cao và sầu riềng được trồng nhiều tại một số tỉnh ở Đông Nam bộ và Tây Nam bộ với các giống sầu riềng nổi tiếng như Ri6, sầu riềng hạt lép, khổ qua xanh. Mô hình trồng xen canh cây ca cao dưới tán cây sầu riềng được áp dụng khá phổ biến ở một số tỉnh như: Bà Rịa - Vũng Tàu, Đồng Nai và Lâm Đồng, đã nảy sinh nghi vấn hiện tượng nhiễm chéo *Phytophthora palmivora* tác nhân gây bệnh thối trái ca cao (Lê Thanh Truyền, 2010) và chảy nhựa thân sầu riềng (Đình Thị Hương, 2010). Nghiên cứu xác định mức độ nhiễm bệnh của hai loài cây ký chủ do một ký sinh và xác định mức độ thiết lập khả năng lây nhiễm theo ký chủ của *P. palmivora* trong cùng một vườn cây là cần thiết hiện nay. Kết quả nghiên cứu góp phần đề xuất cơ cấu cây trồng hợp lý nhằm giảm thiệt hại về năng suất và chi phí đầu tư thuốc bệnh, cũng như cung cấp thêm thông tin về đặc điểm gây bệnh của *P. palmivora* một tác nhân đa ký chủ chưa được nghiên cứu nhiều ở Việt Nam.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Thu thập mẫu nghiên cứu: Các mẫu bệnh trên trái, nứt thân chảy nhựa trên cây ca cao và cây sầu riềng thu thập tại huyện Châu Đức (Bà Rịa - Vũng

Tàu), Long Khánh (Đồng Nai), Đạ Tẻ (Lâm Đồng), Châu Thành (Bến Tre) và Cai Lậy (Tiền Giang) từ tháng 3 năm 2012 đến tháng 2 năm 2014. Rửa sạch bề mặt mẫu bệnh dưới vòi nước, cắt bỏ phần vỏ ngoài tại nơi tiếp xúc giữa mô bệnh và mô khỏe, lấy phần mô bên trong xử lý với cồn 70⁰ và rửa lại bằng nước cất vô trùng. Sau đó mẫu được cắt thành các mảnh nhỏ có kích thước 4 x 2 x 1 mm, khi khô bề mặt thì tiến hành cấy mẫu lên môi trường WA (15 g aga và nước cất đến 1 lít). Dựa vào hình thái để xác định *Phytophthora palmivora* như hình dạng và kích thước của túi bào tử, tỷ lệ D/R (dài/rộng) túi bào tử, chiều dài cuống rụng, kích thước nấm, lỗ phóng thích và bào tử vách dày trên môi trường CR 20% ở thời điểm 4 ngày sau cấy (Ho và Chang, 1995; Erwin và Ribeiro, 1996). Dựa vào trình tự vùng gen *Cox2* để xác định lần nữa tên loài của mẫu phân lập theo phương pháp của Martin và Tooley (2003) sau khi thực hiện PCR với cặp mồi sử dụng là FM75 và FM78.

Chủng các mẫu phân lập *Phytophthora* lên lá sầu riềng và lá ca cao được thực hiện trong phòng thí nghiệm 25 - 27⁰C. Lá sầu riềng và ca cao thành thực được rửa sạch dưới vòi nước chảy sau đó rửa lại bằng nước cất vô trùng. Lá được đặt trong hộp nhựa (25 x 15 x 10 cm) đã khử trùng bằng cồn 70⁰, có đặt giấy thấm để giữ ẩm (85%). Lá sầu riềng giống Ri6, được chủng dịch động bào tử (10⁶ bào tử/ml) của mẫu *Phytophthora* phân lập từ ca cao, mỗi lá chủng 2 điểm (không gây vết thương) tại đường gân giữa của lá và mỗi mẫu phân lập chủng lên 6 lá. Lá ca cao giống TD5, được chủng dịch động bào tử (10⁶ bào tử/ml) của mẫu *Phytophthora* phân lập từ sầu riềng,

¹Phòng Thí nghiệm Bệnh cây, Viện Nghiên cứu Công nghệ Sinh học và Môi trường, Trường Đại học Nông Lâm, Thành phố Hồ Chí Minh

²Tổng cục Môi trường, Bộ Tài nguyên và Môi trường

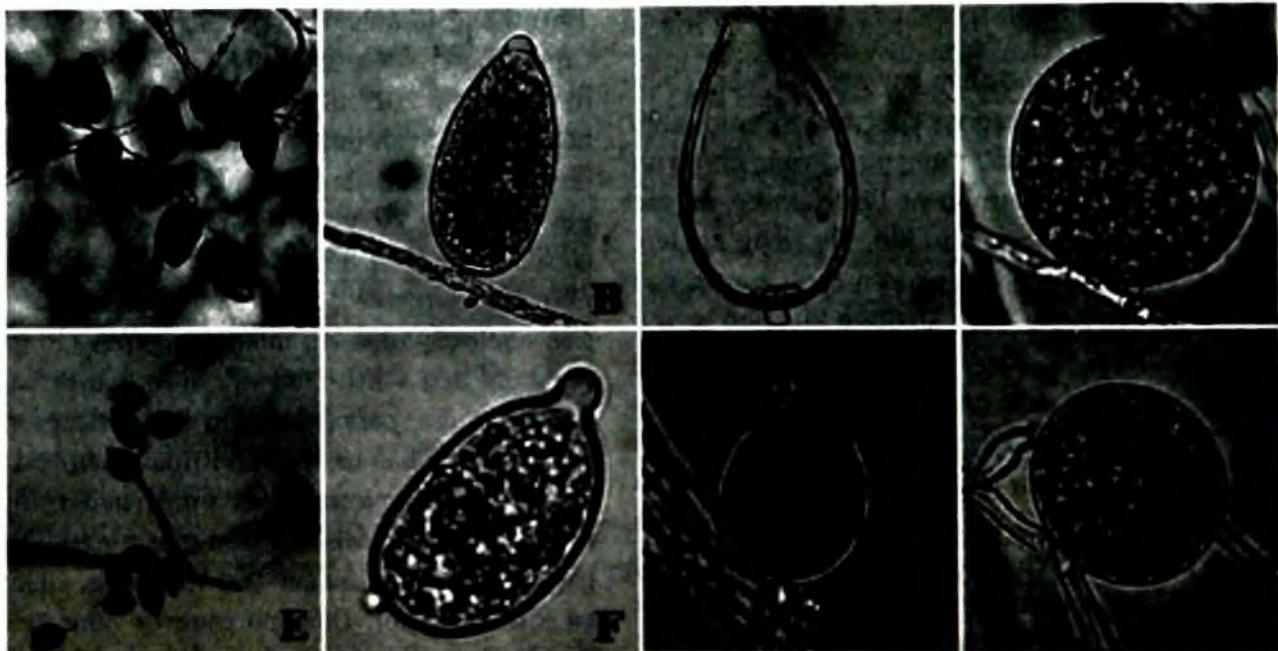
môi là chùng 4 điểm (không gây vết thương) trên phiến lá và mỗi mẫu phân lập chùng lên 3 lá. Theo dõi thời gian xuất hiện bệnh, triệu chứng bệnh và đo kích thước vết bệnh ở thời điểm 3 ngày sau chùng.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Đặc điểm *Phytophthora palmivora* phân lập trên ca cao và sầu riềng

Kết quả khảo sát các đặc điểm hình thái của các mẫu *Phytophthora* phân lập từ sầu riềng và ca cao (Bảng 1 và 2) cho thấy tất cả nằm trong giới hạn của loài *P. palmivora* với chiều dài cuống rụng trung bình 3,5 µm, kích thước lỗ phóng thích hẹp (4,5 – 5,3 µm), không có sự hình thành túi tương phóng trên môi trường nuôi (Ho và Chang, 1995). Tuy nhiên, giữa nhóm *P. palmivora* phân lập từ ca cao (*P.*

palmivora ca cao) và nhóm *P. palmivora* phân lập từ sầu riềng (*P. palmivora* sầu riềng) có một số khác biệt về kích thước túi bào tử. Túi bào tử của *P. palmivora* sầu riềng lớn hơn túi bào tử của *P. palmivora* ca cao về kích thước, tỷ lệ D/R là 1,5 và kích thước lỗ phóng thích rộng bào tử. Như vậy, tiềm năng sản sinh và phóng thích động bào tử của *P. palmivora* sầu riềng trong tự nhiên sẽ nhiều hơn *P. palmivora* ca cao, đặc biệt khả năng chống chịu điều kiện bất lợi của *P. palmivora* sầu riềng cần được chú ý do kích thước bào tử vách dày lớn. Giữa các mẫu phân lập trong một ký chủ có sự khác nhau trong kích thước bào tử có thể do sự khác biệt giữa các vùng trồng hoặc điều kiện sinh thái khác nhau.



Hình 1: Đặc điểm hình thái túi bào tử các mẫu *Phytophthora* phân lập. A, B, C, D: Hình thái *P. palmivora* sầu riềng ; E, F, G, H: Hình thái *P. palmivora* ca cao . Phóng đại 100 lần ở A và E, phóng đại 400 lần ở B, C, D, F, G, và H.

Bảng 1: Kích thước túi bào của các mẫu *P. palmivora*

Nguồn nấm	Kích thước (µm)		Tỷ lệ dài/rộng túi bào tử	
	Biến thiên	Trung bình	Biến thiên	Trung bình
Mẫu <i>Phytophthora palmivora</i> phân lập từ ca cao				
PCBR	36,7 – 52,5 x 26,7 – 38,3	44,6 x 31,0	1,3 – 1,7	1,4
PCBT	36,7 – 57,5 x 25,0 – 37,5	45,7 x 31,1	1,3 – 1,7	1,5
PCĐN	34,2 – 54,2 x 25,0 – 37,3	44,4 x 29,7	1,3 – 1,8	1,5
PCLĐ	34,2 – 52,5 x 23,3 – 36,7	44,9 x 30,7	1,3 – 1,7	1,5
Trung bình	34,5 – 54,2 x 25,0 – 37,5	44,9 x 30,6	1,3 – 1,7	1,5
Mẫu <i>Phytophthora palmivora</i> phân lập từ sầu riềng				
PSBR	45,2 – 73,3 x 30,0 – 43,3	61,3 x 35,7	1,4 – 2,1	1,7
PSĐN	44,2 – 79,2 x 29,2 – 44,5	60,7 x 36,4	1,3 – 2,0	1,7

PSLĐ	46,8 – 73,3 x 30,2 – 38,3	60,2 x 34,1	1,4 – 2,1	1,8
PSTG	36,7 – 80,0 x 25,8 – 40,8	60,9 x 32,1	1,5 – 2,4	1,7
Trung bình	43,2 – 76,5 x 28,8 – 41,3	60,8 x 34,9	1,4 – 2,2	1,7

Số liệu đo trung bình của 45 túi bảo tử. PC: mẫu *Phytophthora* phân lập từ ca cao; PS: mẫu *Phytophthora* phân lập từ sầu riêng; BR: Bà Rịa-Vũng Tàu, BT: Bến Tre, ĐN: Đồng Nai, LD: Lâm Đồng và TG: Tiền Giang.

Bảng 2: Kích thước nấm, lỗ phóng thích, chiều dài cuống rung và bào tử vách dày của các mẫu *P. palmivora* phân lập

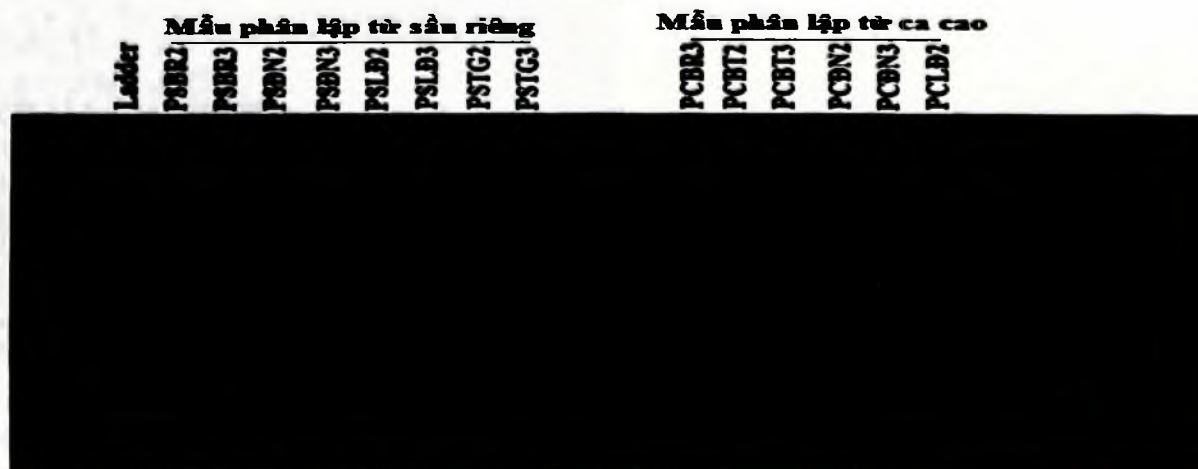
Nguồn nấm	Kích thước nấm (µm)		Kích thước lỗ phóng thích (µm)		Chiều dài cuống rung (µm)		Kích thước bào tử vách dày (µm)	
	Biến thiên	TB	Biến thiên	TB	Biến thiên	TB	Biến thiên	TB
Mẫu <i>Phytophthora palmivora</i> phân lập từ ca cao								
PCBR	2,5 – 7,1	4,2	4,0 – 7,1	5,2	1,0 – 5,4	3,6	25,8 – 40,0	34,0
PCBT	2,1 – 6,3	4,2	3,2 – 5,0	3,7	1,7 – 5,0	3,3	25,8 – 40,8	34,5
PCĐN	2,1 – 6,3	4,1	3,8 – 5,4	4,5	1,5 – 7,1	3,7	28,3 – 42,5	35,8
PCLĐ	1,5 – 5,8	3,6	3,3 – 5,0	4,1	1,4 – 5,9	3,3	25,8 – 44,2	35,3
Trung bình	2,1 – 6,4	4,0	3,6 – 5,6	4,4	1,4 – 5,9	3,5	26,5 – 41,9	34,9
Mẫu <i>Phytophthora palmivora</i> phân lập từ sầu riêng								
PSBR	1,1 – 6,3	3,6	4,7 – 6,4	5,3	1,5 – 5,0	3,5	30,0 – 48,3	37,7
PSĐN	1,3 – 6,5	3,8	4,4 – 7,1	5,4	1,1 – 6,3	3,9	28,3 – 45,0	36,4
PSLĐ	2,1 – 5,4	3,7	4,8 – 6,7	5,4	0,8 – 6,7	3,5	30,0 – 44,2	36,4
PSTG	1,9 – 5,8	3,6	4,0 – 7,1	5,0	1,1 – 5,0	3,2	25,8 – 46,7	35,7
Trung bình	1,6 – 6,0	3,7	4,5 – 6,8	5,3	1,1 – 5,7	3,5	28,5 – 46,0	36,5

TB: số đo trung bình của 45 mẫu độc lập.

3.2. So sánh trình tự vùng Cox 2 của các mẫu *Phytophthora palmivora*

Kết quả khuếch đại vùng gen sắc tố tế bào oxydaza (xitocrom oxydaza) (Cox2) của các mẫu phân lập với cặp mồi FM75 và FM78 cho ra một sản phẩm duy nhất với kích thước khoảng 570 bp. Trình tự vùng Cox2 của 14 mẫu phân lập và so sánh độ tương đồng trên NCBI, cho thấy, các mẫu phân lập có độ

tương đồng cao (95-98%) với vùng gen Cox2 của *Phytophthora palmivora* (GenBank: AY129217) được phân lập trên ca cao ở Nigeria (Martin và ctv, 2003), trong khi đó độ tương đồng thấp hơn (81 – 95%) với các loài *Phytophthora* khác (Bảng 3). Kết quả hình thái và trình tự Cox2 cũng cho thấy các mẫu nghiên cứu là *P. palmivora*.



Hình 2: Kết quả điện di sản phẩm PCR khuếch đại vùng gen Cox2 của các mẫu phân lập. Sản phẩm ADN có kích thước 570 bp được ghi nhận duy nhất trong PCR.

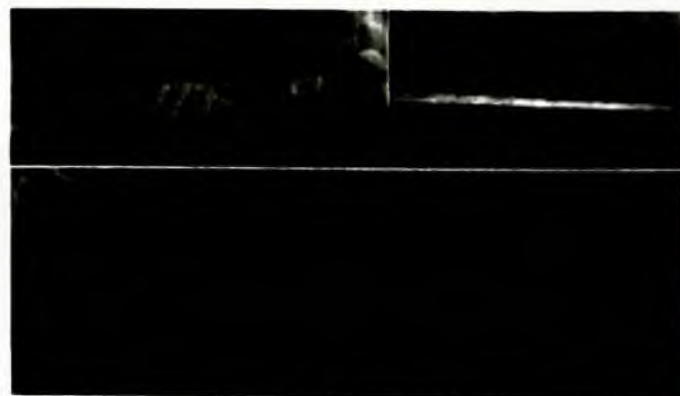
Bảng 3: Tỷ lệ tương đồng (%) trình tự Cox2 giữa các mẫu *Phytophthora* được nghiên cứu với cơ sở dữ liệu trên GenBank

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
1	AF086698P.litchii	ID	99	80	80	80	93	92	93	92	95	93	95	95	94	94	94	95	95	91	94	94	94	94	94
2	DQ365746P.litchii	99	ID	80	80	80	92	92	92	92	94	92	94	94	94	94	94	94	94	90	93	93	93	93	94
3	JN618605P.botryosa	80	80	ID	100	100	77	76	76	80	80	81	80	80	80	80	79	80	80	80	80	81	81	81	81
4	JN618618P.palmivora	80	80	100	ID	100	77	76	76	80	80	81	80	80	80	80	79	80	80	80	80	81	81	81	81
5	JN618670P.colocasiae	80	80	100	100	ID	77	76	76	80	80	81	80	80	80	80	79	80	80	80	80	81	81	81	81
6	AY129209P.megakarya	93	92	77	77	77	ID	93	95	89	96	91	94	93	94	93	93	93	93	92	93	93	93	93	93
7	DQ071414P.megasperma	92	92	76	76	76	93	ID	94	89	95	90	92	92	92	92	94	92	92	90	92	92	92	92	92
8	AY129216P.nicotianae	93	92	76	76	76	95	94	ID	90	95	91	93	93	93	93	93	93	93	91	93	93	92	92	92
9	DQ365749P.nemorosa	92	92	80	80	80	89	89	90	ID	90	91	90	90	90	90	89	90	90	89	90	90	90	91	91
10	AY129217P.palmivora	95	94	80	80	80	96	95	95	90	ID	95	97	97	97	97	97	97	96	98	97	97	97	97	97
11	PSBR2	93	92	81	81	81	91	90	91	91	95	ID	96	96	96	97	95	96	96	96	96	97	98	97	97
12	PSBR3	95	94	80	80	80	94	92	93	90	97	96	ID	100	99	99	99	99	100	94	98	99	98	98	98
13	PSĐN2	95	94	80	80	80	93	92	93	90	97	96	100	ID	100	99	98	100	100	94	98	99	98	98	98
14	PSĐN3	94	94	80	80	80	94	92	93	90	97	96	99	100	ID	99	98	99	100	95	98	99	98	98	98
15	PSLĐ2	94	94	80	80	80	93	92	93	90	97	97	99	99	99	ID	97	99	99	94	98	98	99	98	98
16	PSLĐ3	94	94	79	79	79	93	94	93	89	97	95	99	98	98	97	ID	98	98	94	97	98	97	97	97
17	PSTG2	95	94	80	80	80	93	92	93	90	97	96	99	100	99	99	98	ID	100	94	98	99	98	98	98
18	PSTG3	95	94	80	80	80	93	92	93	90	97	96	100	100	100	99	98	100	ID	94	98	99	98	98	98
19	PCBR3	91	90	80	80	80	92	90	91	89	96	96	94	94	95	94	94	94	ID	95	95	95	95	95	95
20	PCBT2	94	93	80	80	80	93	92	93	90	98	96	98	98	98	98	97	98	98	95	ID	98	98	98	99
21	PCBT3	94	93	81	81	81	93	92	93	90	97	97	99	99	99	98	98	99	99	95	98	ID	99	98	99
22	PCĐN2	94	93	81	81	81	93	92	92	90	97	98	98	98	98	99	97	98	98	95	98	99	ID	99	99
23	PCĐN3	94	93	81	81	81	93	92	92	91	97	97	98	98	98	98	97	98	98	95	98	98	99	ID	99
24	PCLĐ2	94	94	81	81	81	93	92	92	91	97	97	98	98	98	98	97	98	98	95	99	99	99	99	ID

3.3. Khả năng lây nhiễm của các mẫu *P. palmivora* từ ca cao và sầu riêng

Cây ca cao và sầu riêng thường được trồng xen trong vườn với các loài cây ăn trái khác trong một vườn, nảy sinh “nhận xét” sự lây nhiễm qua lại nguồn bệnh *Phytophthora palmivora* gây xì mù chảy nhựa thân trên sầu riêng hoặc thối đen trái ca cao. Chủng *P. palmivora* ca cao lên lá sầu riêng gây triệu chứng bệnh ở thời điểm 1 ngày sau chủng; vết bệnh ban đầu là những đốm đen nhỏ, sau lớn dần và liên kết lại thành vết màu nâu đen và ướt nước, có thể thấy hệ sợi màu trắng ở mặt dưới của lá (Hình 3). Sau 4 ngày, kích thước vết bệnh biến thiên từ 19,4 mm đến 24,7 mm. Khi chủng *P. palmivora* sầu riêng lên lá ca cao TD5, cho vết bệnh không rõ ràng với vài đốm đen nhỏ tại vị trí chủng, kích thước đốm bệnh tăng chậm tạo nên vùng bệnh không rõ ràng, có màu sắc không đồng nhất và ranh giới giữa mô bệnh và mô khỏe khó phân biệt. Không tìm thấy sợi nấm và túi bào tử tại vết bệnh, cũng như tỉ lệ vết bệnh thấp. Như vậy, mặc dù cùng loài *P. palmivora*, nhưng nguồn gốc ký

chủ khác nhau đã phân hóa tính gây bệnh theo hướng chuyên biệt ký chủ. Nguồn bệnh trên ca cao có khả năng xâm nhiễm gây bệnh trên sầu riêng, tuy nhiên *P. palmivora* trên sầu riêng gây bệnh nhẹ hoặc không hình thành vết bệnh điển hình ngay cả trong điều kiện chủng bệnh nhân tạo (Bảng 4).



Hình 3: Hệ sợi và túi bào tử trên bề mặt vết bệnh do *P. palmivora* ca cao gây ra trên lá sầu riêng R16 ở 4 ngày sau chủng. A: triệu chứng bệnh ở mặt trên của lá; B: hệ sợi *P. palmivora* mặt dưới vết bệnh; C,D: Triệu chứng bệnh do *P. palmivora* sầu riêng gây ra trên lá ca cao TD5 ở 3 ngày sau chủng.

Bảng 4: Kích thước vết bệnh sau khi chủng trên lá theo ký chủ và mẫu phân lập

Nguồn mẫu		Kích thước vết bệnh (mm)	Số vết bệnh/số vết chủng
		Trên lá sầu riêng Ri 6 sau 4 ngày	
<i>P. palmivora</i> cao cao	PCBR	21,3	8/12
	PCBT	19,8	6/12
	PCĐN	24,7	9/12
	PCLĐ	19,4	8/12
<i>P. palmivora</i> sầu riêng	Trên lá cao cao TD 5 sau 3 ngày		
	PSBR	12,3	9/12
	PSĐN	11,0	8/12
	PSLĐ	11,1	9/12
	PSTG	10,8	7/12

Kích thước vết bệnh (mm): kích thước trung bình từ các vết chủng nhiễm bệnh

4. KẾT LUẬN

Dựa vào đặc điểm hình thái và trình tự vùng gen Cox2 của các mẫu phân lập trên cao cao và sầu riêng tại các tỉnh Bà Rịa - Vũng Tàu, Đồng Nai, Lâm Đồng, Bến Tre và Tiền Giang, thì *P. palmivora* là loài duy nhất được ghi nhận. Tuy cùng loài *P. palmivora*, nhưng mẫu phân lập từ sầu riêng có một số đặc điểm khác biệt so với mẫu từ cao cao. Các mẫu *P. palmivora* từ cao cao và sầu riêng đều có khả năng gây bệnh trên lá sầu riêng và cao cao trong điều kiện phòng thí nghiệm. Tuy nhiên, các mẫu phân lập từ sầu riêng chỉ tạo triệu chứng bệnh không điển hình, mức độ nhẹ trên lá cao cao, như vậy đã có sự phân hóa về đặc

điểm hình thái và tình gây bệnh chuyên biệt theo ký chủ trong quần thể *P. palmivora*.

TAI LIỆU THAM KHẢO

- Đinh Thị Hương, 2010. *Nghiên cứu nấm Phytophthora palmivora gây bệnh cháy nhựa thân và thối trái trên cây sầu riêng (Durio zibethinus)*. Luận văn thạc sĩ khoa học nông nghiệp ngành bảo vệ thực vật. Đại học Nông Lâm Tp. Hồ Chí Minh.
- Erwin D. C. and Ribeiro O. K., 1996. *Phytophthora diseases worldwide*. St. Paul, Minnesota, USA. The American Phytophthorological Society Press, 562 pages.
- Ho H. H., Ann P. J. and Chang H. S., 1995. *The genus Phytophthora in Taiwan*. Institute of Botany, Academia Sinica, Taipei, 85 pages.
- Lee, S. B. and Taylor, S. W., 1990. Isolation of DNA from fungal mycelia and single spores. In: *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Eds: M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky and T. J. White, Academic Press, San Diego, pp 282-287.
- Lê Thanh Truyền, 2010. *Nghiên cứu nấm Phytophthora palmivora gây bệnh thối trái cao cao (Theobroma cacao) tại huyện Châu Thành - Bến Tre*. Luận văn thạc sĩ khoa học nông nghiệp ngành bảo vệ thực vật. Đại học Nông Lâm Tp. Hồ Chí Minh.
- Martin F. N. and Tooley P. W., 2003. *Phylogenetic relationships among Phytophthora species inferred from sequence analysis of the mitochondrially encoded cytochrome oxidase I and II genes*. Mycologia 95: 269 - 284.

COMPARATIVE STUDY ON PHYTOPHTHORA SP INFECTING COCOA AND DURIAN TREES GROWN IN SOME PROVINCES OF SOUTHERN VIETNAM

Nguyen Van, Tu Thi My Thuan, Le Dinh Don, Bui Cach Tuyen
Summary

Based on morphological characteristics and comparison of sequences of cytochrome oxidase gene, *Phytophthora palmivora* is a sole species causing black spot disease on cocoa and cancer gummosis on durian trees collected in Ba Ria-Vung Tau, Dong Nai, Lam Dong, Tien Giang, and Ben Tre provinces. *P. palmivora* isolated from cocoa can infect and cause the disease symptom on durian, but isolates from durian can not infect cocoa, in laboratory conditions. Results indicated that there was a differentiation in morphology and divergence in pathogenicity of *P. palmivora* population, specially with cocoa and durian hosts.

Key words: *Cocoa, durian, Phytophthora palmivora, cytochrome oxidase (Cox2)*.

Người phản biện: TS. Ngô Vĩnh Viễn

Ngày nhận bài: 21/4/2014

Ngày thông qua phản biện: 21/5/2014

Ngày duyệt đăng: 28/5/2014