



DOI:10.22144/ctujos.2025.010

KHẢO SÁT CÁC BỆNH HẠI CHÍNH DO NẤM GÂY RA TRÊN CHI LAN HOÀNG THẢO (*Dendrobium*) TẠI KHU VỰC THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH

Nguyễn Bảo Quốc^{1*}, Nguyễn Thị Như Ý¹, Nguyễn Ngọc Bảo Châu² và Bùi Cách Tuyến³

¹Khoa Khoa học Sinh học, Trường Đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

²Khoa Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Mở Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

³Viện Nghiên cứu Công nghệ Sinh học và Môi trường, Trường Đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

*Tác giả liên hệ (Corresponding author): baoquoc@hcmuaf.edu.vn

Thông tin chung (Article Information)

Nhận bài (Received): 09/07/2024

Sửa bài (Revised): 14/10/2024

Duyệt đăng (Accepted): 26/01/2025

Title: Study on major fungal diseases affecting *Dendrobium* orchids in the Ho Chi Minh City

Author(s): Nguyen Bao Quoc^{1*}, Nguyen Thi Nhu Y¹, Nguyen Ngoc Bao Chau² and Bui Cach Tuyen³

Affiliation(s): ¹Faculty of Biological Science, Nong Lam University Ho Chi Minh city, Ho Chi Minh city, Viet Nam; ²Faculty of Biotechnology, Ho Chi Minh city Open university, Ho Chi Minh city, Viet Nam; ³Institute of Biotechnology and Environment Research, Nong Lam University Ho Chi Minh city, Ho Chi Minh city, Viet Nam

TÓM TẮT

Bệnh hại do nấm gây ra trên lan Hoàng Thảo (*Dendrobium*) đã gây nhiều thiệt hại nghiêm trọng đối với canh tác giống lan này. Nghiên cứu này nhằm định danh các tác nhân nấm gây bệnh hại chính trên chi lan *Dendrobium* tại thành phố Hồ Chí Minh bằng đặc điểm hình thái và PCR-Giải trình tự. Kết quả nghiên cứu cho thấy các bệnh phổ biến trên lan bao gồm: cháy đầu lá, đốm lá và đen thân. Phân lập, định danh đặc điểm hình thái phát hiện 80 mẫu nấm thuộc 3 chi: *Colletotrichum* spp. (38,75%), *Pestalotiopsis* spp. (33,75%), *Fusarium* spp. (27,5%). Xác định loài bằng phương pháp PCR-Giải trình tự vùng gen ITS đã chỉ ra rằng có sự hiện diện của ít nhất ba loại nấm gây bệnh bao gồm *Colletotrichum gloeosporioides*, *Pestalotiopsis vismiae* và *Fusarium oxysporum*. Kết quả đạt được trong nghiên cứu đã góp phần xác định thành phần và các bệnh hại phổ biến trên lan *Dendrobium* nhằm phục vụ công tác nghiên cứu biện pháp phòng trừ bệnh hại hiệu quả.

Từ khóa: *Colletotrichum*, *Dendrobium*, *Fusarium*, lan Hoàng Thảo, PCR, *Pestalotiopsis*

ABSTRACT

The diseases caused by fungi on Hoang Thao (*Dendrobium*) orchids have posed significant challenges to their cultivation. This study aimed to identify major fungal species causing diseases on *Dendrobium* orchids in Ho Chi Minh City using isolation, morphological identification of fungi and PCR methods. The research identified common diseases including leaf tip burn, leaf spotting and stem blackening. Morphological identification isolated 80 fungal samples belonging to three genera: *Colletotrichum* spp. (38.75%), *Pestalotiopsis* spp. (33.75%), and *Fusarium* spp. (27.5%). Species identification using ITS gene sequencing confirmed these fungi as *Colletotrichum gloeosporioides*, *Pestalotiopsis vismiae* and *Fusarium oxysporum*. The study's findings contribute to identifying common diseases on *Dendrobium* orchids, essential for effective disease prevention and control strategies.

Keywords: *Colletotrichum*, *Dendrobium*, *Fusarium*, lan Hoàng Thảo, PCR, *Pestalotiopsis*

1. GIỚI THIỆU

Hoa lan thuộc họ *Orchidaceae*, bao gồm các loại thảo mộc lâu năm có khoảng 700 chi với hơn 20.000 loài thực vật trên cạn, biểu sinh và hoại sinh trên toàn thế giới (Staples & Herbst, 2005). Hoa lan là loài hoa khá phong phú về chủng loại, mỗi loại có đặc điểm sinh trưởng và phát triển khác nhau, tại Thành phố Hồ Chí Minh tập trung 02 chủng loại hoa lan phát triển hàng hóa là *Dendrobium* và *Mokara*. Loài lan *Dendrobium* nổi bật với những bông hoa lớn, có màu sắc đa dạng, kích thước, hình dạng khác nhau, có thể nở quanh năm và kéo dài thời gian nở hoa từ vài tuần đến vài tháng (Kuehnle, 2007). Số lượng các loài lan *Dendrobium* ở Việt Nam được ghi nhận là 107 loài (Van & Nga, 2008). Tuy nhiên, việc nhiễm bệnh ức chế sự phát triển, sức đề kháng của cây, làm giảm giá trị thẩm mỹ theo định kỳ và gây thiệt hại kinh tế cho nhà vườn. Bệnh hại trên lan có thể do nhiều tác nhân gây bệnh khác nhau bao gồm: nấm, vi khuẩn, virus hoặc tuyến trùng. Các nghiên cứu trước đây đã xác định một số tác nhân nấm gây bệnh phổ biến trên lan như: bệnh thán thư (tác nhân gây bệnh: *Colletotrichum gloeosporioides*), bệnh héo rũ (tác nhân gây bệnh: *Fusarium oxysporum*), bệnh bạc lá thối rễ (tác nhân gây bệnh: *Phytophthora capsica*), đốm lá (tác nhân gây bệnh: *Phyllosticta capitalensis*), đốm lá (tác nhân gây bệnh: *Pestalotiopsis* sp., *Phoma multirostrata*, *Phyllosticta capitalensis*, *Nigrospora oryzae*), đốm đen (tác nhân gây bệnh: *Alternaria alternata*) (Jain et al., 2021). Các bệnh thực vật do nấm gây ra thường lây lan qua đất. Nấm có thể lây nhiễm vào cây dẫn đến các triệu chứng trên cây như bị héo, thối rễ thậm chí làm chết cây. Hiện nay, việc sử dụng các chế phẩm sinh học từ các vi sinh vật đối kháng để kiểm soát mầm bệnh hại cây trồng là phương pháp ngày càng được phổ biến nhờ có những ưu điểm không chỉ về kinh tế mà còn về khía cạnh môi trường. Mục tiêu của nghiên cứu này nhằm khảo sát một số tác nhân nấm gây bệnh trên chi lan *Dendrobium*, cung cấp thêm thông tin dịch tễ góp phần xây dựng biện pháp phòng trừ bệnh hại do nấm gây ra trên lan. Việc xác định tác nhân gây bệnh qua phương pháp quan sát hình thái của nấm ít tốn kém hơn, nhưng thời gian phân lập và quan sát hình thái kéo dài, thường khó xác định nấm nội sinh ở cấp loài hoặc đôi khi ở cấp chi. Do đó, giải trình tự phân tử các mẫu nấm bệnh dựa trên vùng gen ITS để xác định chính xác cấp loài của nấm gây bệnh là cần thiết (Parthibhan et al., 2017).

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Phương pháp thu thập và xử lý mẫu bệnh

Các mẫu bệnh trên lan *Dendrobium* được thu thập từ 4 vườn ở các khu vực của Thành phố Hồ Chí Minh như Thủ Đức, Hóc Môn, Bình Chánh, mỗi vườn thu thập 30 mẫu bệnh (Hình 1). Quá trình thu thập và bảo quản mẫu được thực hiện theo phương pháp quản lý mẫu bệnh thực vật của Shivas and Beasley (2005). Việc thu thập mẫu được tiến hành vào thời điểm cây bệnh ở giai đoạn đầu hoặc giữa chu kỳ bệnh, theo một số nguyên tắc sau: nhận dạng được cây ký chủ, sử dụng túi giấy để lấy giữ mẫu bệnh, đóng gói mẫu cẩn thận để tránh va đập và hơi nước ngưng tụ. Sau đó, các mẫu được chuyển về phòng thí nghiệm Bệnh học và Chẩn đoán phân tử, Khoa Khoa học sinh học, Trường Đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh để tiến hành xử lý mẫu phân lập (MPL) của nấm bệnh. Kí hiệu vườn thu, số mẫu, vị trí thu mẫu được thể hiện tại bảng 1



Hình 1. Các địa điểm thu mẫu tại thành phố Hồ Chí Minh

Ghi chú: HM: Phường Nhị Bình, Quận Hóc Môn;
TD: Phường Linh Trung, Tp. Thủ Đức;
BC1: Hoàng Phan Thái, Quận Bình Chánh;
BC2: Tân Quý Tây, Quận Bình Chánh.

Bảng 1. Kí hiệu mã vườn, số mẫu và vị trí mẫu

STT	Mã vườn	Vị trí vườn	Số mẫu bệnh/vườn
1	TD	10,86689° B, 106,78207° Đ	30
2	HM	10,91939° B, 106,66953° Đ	30
3	BC1	10,66961° B, 106,56698° Đ	30
4	BC2	10,67154° B, 106,59395° Đ	30

2.2. Phương pháp phân lập

Phương pháp phân lập và nuôi cấy nấm từ mẫu bệnh trong phòng thí nghiệm được tiến hành theo Burgess et al. (2009). Khử trùng bề mặt mô lá hoặc thân bằng cồn ethanol 70% trong 5 giây, sau đó rửa lại trong nước vô trùng và để khô trên giấy thấm vô trùng. Dụng cụ đã khử trùng được dùng để cắt mẫu thành những mảnh mô nhỏ (khoảng 2×2 mm) từ phần ranh giới giữa mô khỏe và mô bệnh, sau đó cấy lên môi trường nghèo dinh dưỡng Water Agar (WA). Đặt ngược đĩa cấy tránh đọng hơi nước trên bề mặt môi trường, ủ ở nhiệt độ phòng khoảng 25°C-28°C. Kiểm tra đĩa cấy hàng ngày, khi các tản nấm phát triển sẽ tiến hành cấy truyền dinh sinh trường của sợi nấm sang môi trường Potato Dextrose Agar (PDA) để tạo mẫu nấm thuần chủng. Các mẫu nấm sau khi thuần sẽ được lấy nhiễm trở lại trên mô khỏe và tái phân lập tác nhân gây bệnh theo quy tắc Koch (1876).

Quy trình chủng Koch: Dùng một mẫu cấy sạch đã được làm thuần để lấy lên cây khỏe mạnh. Sau thời gian ủ bệnh, các triệu chứng biểu hiện ở các cây đã được lây bệnh nhân tạo, được quan sát và ghi nhận, các triệu chứng phải biểu hiện giống như triệu chứng đã quan sát ban đầu trên cây trồng bị bệnh. Phân lập lại tác nhân gây bệnh từ các bộ phận cây bị bệnh, mẫu nấm cấy từ phương pháp gây bệnh nhân tạo phải giống mẫu nấm được làm thuần ban đầu.

Phương pháp lây bệnh nấm nhân tạo: được tiến hành theo Burgess et al. (2009). Lây bệnh lên thân cây: dùng que cấy hoặc kim tiêm chọc vào phần thân dưới của cây được lây bệnh và gắn một miếng thạch nhỏ từ mẫu tác nhân gây bệnh đã làm thuần vào vị trí vết thương (hoặc dùng ống tiêm bơm một lượng nhỏ dịch bào tử vào thân). Que cấy hoặc kim tiêm được dùng để chọc vào phần thân dưới của cây đối chứng nhưng không lây bệnh. Parafilm được dùng để bọc kín vết thương hoặc vị trí lây bệnh, tưới ẩm cho thân cây mỗi ngày. Lây bệnh lên lá: phun dịch bào tử lên lá cây bị lây bệnh (hoặc nhỏ vài giọt dịch bào tử lên lá). Mẫu lá đối chứng được thực hiện phun nước vô trùng lên trên bề mặt lá (hoặc nhỏ vài giọt nước vô trùng trực tiếp lên lá). Chậu được đặt trong tủ ẩm hoặc che bằng túi nylon trong nhà lưới, tránh ánh nắng trực tiếp. Những cây lây bệnh được kiểm tra và so sánh với những cây đối chứng. Các biểu hiện được quan sát và ghi nhận, sau đó tiến hành phân tích và so sánh với các triệu chứng đã quan sát được trên đồng ruộng.

2.3. Phương pháp ly trích DNA tổng số

Quy trình ly trích DNA nấm bằng hóa chất được thực hiện theo phương pháp của Izumitsu et al. (2012). Quy trình ly trích DNA từ sợi nấm được thực hiện theo các bước: cạo lấy sinh khối 0,1 - 0,5 g sợi nấm phát triển trên đĩa môi trường PDA cho vào Eppendorf 1,5 mL. Sau đó, 400 μ L Lysis buffer được thêm vào, dùng chày vô trùng nghiền nhuyễn mẫu; ủ ở 65°C trong 1 giờ; bổ sung 300 μ L dung dịch PCI; đảo đều hỗn hợp trong ống, ly tâm 13000 vòng/phút trong 8 phút; hút 300 μ L dịch nổi cho vào Eppendorf 1,5 mL mới, sau đó thêm 100 μ L Chloroform, ly tâm 14000 vòng/phút trong 5 phút; hút lấy 200 μ L dịch nổi cho vào eppendorf 1,5 mL mới, thêm 100 μ L Isopropanol, ly tâm 14000 vòng/phút trong 10 phút; loại bỏ dịch nổi và thu cặn kết tủa; thêm 480 μ L cồn 70° vào, ly tâm 13000 vòng/phút trong 10 phút (lặp lại bước này 2 lần); loại bỏ dịch nổi, để khô tự nhiên; thêm vào 50 μ L TE buffer; bảo quản mẫu ở -20°C. Sau khi ly trích, DNA được kiểm tra nồng độ và độ tinh sạch đảm bảo chất lượng DNA. Nguồn DNA này được sử dụng làm vật liệu cho phản ứng PCR trong quá trình nghiên cứu.

2.4. Định danh các mẫu nấm bằng hình thái bào tử và đánh giá tần suất xuất hiện các chi nấm

2.4.1. Định danh các mẫu nấm bằng hình thái bào tử

Những đặc điểm hình thái bào tử nấm được quan sát như: màu sắc, hình thái bào tử, các cấu trúc tạo bào tử và kích thước bào tử. Mẫu được quan sát dưới kính hiển vi Olympus BX40 vật kính 100X để đo kích thước bào tử, giác bám và đặc tính sinh học của từng chủng nấm dựa theo khóa phân loại nấm của Barnett and Hunter (1998).

2.4.2. Đánh giá tần suất xuất hiện các chi nấm

Tần suất xuất hiện chi nấm (Ray & Hill, 2012) được tính theo công thức:

Tần suất xuất hiện chi nấm

$$= \frac{\text{Số lượng phân lập trong 1 chi}}{\text{Tổng số nấm được phân lập}} \times 100$$

Dựa trên tần suất xuất hiện, theo El-Morsy (2004), các giống nấm phân lập được phân loại theo rất thường xuyên (> 20%), thường xuyên (10 - 20%) hoặc không thường xuyên (< 10%).

2.5. Định danh các mẫu nấm bằng phương pháp PCR và giải vùng trình tự gen ITS

Các mẫu DNA được ly trích từ nấm được tiến hành định danh thông qua phương pháp sinh phân

từ bằng cặp mồi ITS1 - ITS4 (White et al., 1990). Trong đó, trình tự của cặp mồi như sau ITS1: 5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3' và trình tự của ITS4: 5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3'. Phản ứng PCR được thực hiện trong 25 μ L bao gồm: 12,5 μ L 2X GoTaq®Colorless Master Mix; mỗi loại mồi 1,2 μ L nồng độ 10 μ M; 9,1 μ L dung dịch H₂O và 1 μ L DNA nấm. Phản ứng PCR theo các điều kiện như sau: tiền biến tính ban đầu của DNA trong 5 phút ở 95°C, sau đó 35 chu kỳ biến tính DNA trong 30 giây ở 95°C, bắt cặp trong 1 phút ở 52°C, kéo dài trong 1 phút ở 72°C và hậu kéo dài cuối cùng trong 7 phút ở 72°C. Các sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1% trong dung dịch đệm TBE 0,5X. Điện di với hiệu điện thế 100 V trong thời gian 25 phút. Kết quả được quan sát và ghi nhận bằng máy chụp gel. Đoạn khuếch đại PCR vùng ITS của từng mẫu nấm gây bệnh trên cây trồng được giải trình tự gen theo phương pháp Sanger. Vùng trình tự ITS của từng mẫu nấm phân lập sau khi giải trình tự gen sẽ được so sánh tính tương đồng với các trình tự ITS đã được công bố trên ngân hàng gen (NCBI, Hoa Kỳ) bằng chương trình Blast (Basic local alignment search tool). Cuối cùng, tiến hành xây dựng cây phân nhóm di truyền để xác định mức độ liên quan của các mẫu nấm phân lập bằng phần mềm Mega 11.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Các triệu chứng bệnh trên chi lan *Dendrobium*

Trong quá trình khảo sát, 3 triệu chứng khác nhau được phát hiện trên lan *Dendrobium* bao gồm cháy đầu lá, đốm lá, đen thân. Triệu chứng cháy đầu lá (Hình 2.A) bắt đầu với màu sắc thay đổi rõ ràng ở phần đầu lá sau đó chuyển sang màu vàng hoặc nâu. Nấm tấn công ở chóp lá làm cho lá bị khô từ trên xuống, có khi xuống tới 2/3 chiều dài lá. Triệu chứng bệnh đốm lá (Hình 2.B) thường xuất hiện các vết đốm mờ, có thể có màu đen hoặc nâu, trải rộng từ phía đỉnh đến cuống lá. Mặc dù ban đầu triệu chứng có thể giữ ở mức độ nhỏ, nhưng theo thời gian, chúng có thể lan rộng và tăng kích thước. Các vết đốm này không chỉ ảnh hưởng đến thẩm mỹ của lá mà còn làm cho lá yếu đi. Lá nhiễm bệnh thường trở nên mềm, nhăn nheo và dễ rụng. Triệu chứng bệnh đen thân (Hình 2.C) thường xuất hiện rõ ràng trên thân cây con, tạo thành những dải đen hoặc màu nâu đậm, chủ yếu ở phía gần giá thể. Những vết đen này có xu hướng mở rộng và trải dài lên trên thân cây. Vị trí nơi triệu chứng xuất hiện thường là ở khu vực cổ của cây con. Các vết đen có kích thước và hình dạng không đồng đều, tùy thuộc vào mức độ nhiễm bệnh. Một trong những đặc trưng của bệnh là

sự yếu đi của thân cây. Các vết đen thường đi kèm với sự suy giảm độ cứng của thân làm ảnh hưởng đến sự phát triển của cây lan.

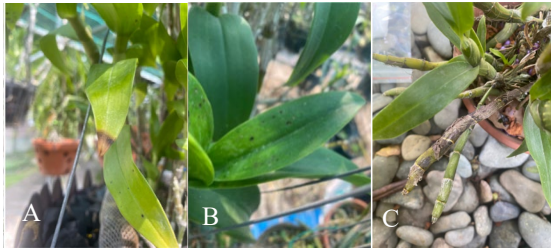


Hình 2. Triệu chứng bệnh trên các mẫu lan thu thập tại địa bàn thành phố Hồ Chí Minh

Ghi chú: A: cháy đầu lá, B: đốm lá, C: đen thân

3.2. Phân lập tác nhân từ các mẫu bệnh trên cây hoa lan *Dendrobium* tại thành phố Hồ Chí Minh

Tất cả 120 mẫu lan bị bệnh có các triệu chứng khác nhau như đốm lá, cháy đầu lá, đen thân từ 4 địa điểm khác nhau tại các khu vực ở thành phố Hồ Chí Minh. Các mẫu bệnh thu thập được phân lập, kết quả được tất cả 120 mẫu nấm thuần chủng. Kết quả chủng Koch cho thấy có 80 mẫu nấm phân lập gây triệu chứng bệnh trên lan giống với triệu chứng bệnh ban đầu quan sát trên đồng ruộng. Thử nghiệm chủng Koch trên mẫu lá lan cho thấy so với mẫu lá không có triệu chứng bệnh ban đầu (Hình 3.A), các triệu chứng ghi nhận sau chủng Koch lần lượt là đốm lá (Hình 3.B), cháy đầu lá (Hình 3.C) và mẫu đối chứng không xuất hiện dấu hiệu nhiễm bệnh (Hình 3.D). Đối với mẫu thân cây, từ mẫu thân lan không có triệu chứng bệnh trước khi chủng (Hình 4.A), sau thời gian ủ bệnh đã ghi nhận kết quả mẫu thân có triệu chứng đen thân (Hình 4.B) và mẫu đối chứng sạch bệnh (Hình 4.C). Sau đó, ta tiến hành tái phân lập nấm từ những vết bệnh do chủng nhân tạo và quan sát đặc điểm hình thái nấm. Kết quả tái phân lập mẫu nấm từ những vết bệnh do chủng nhân tạo cho thấy hình thái tán nấm và hình thái bào tử sau khi tái phân lập từ vết bệnh chủng nhân tạo đều giống với đặc điểm hình thái mẫu nấm phân lập ban đầu gồm: chi *Colletotrichum* spp. gây bệnh cháy đầu lá, chi *Pestalotiopsis* spp. gây bệnh đốm lá và chi *Fusarium* spp. gây bệnh đen thân được thể hiện ở Hình 5.



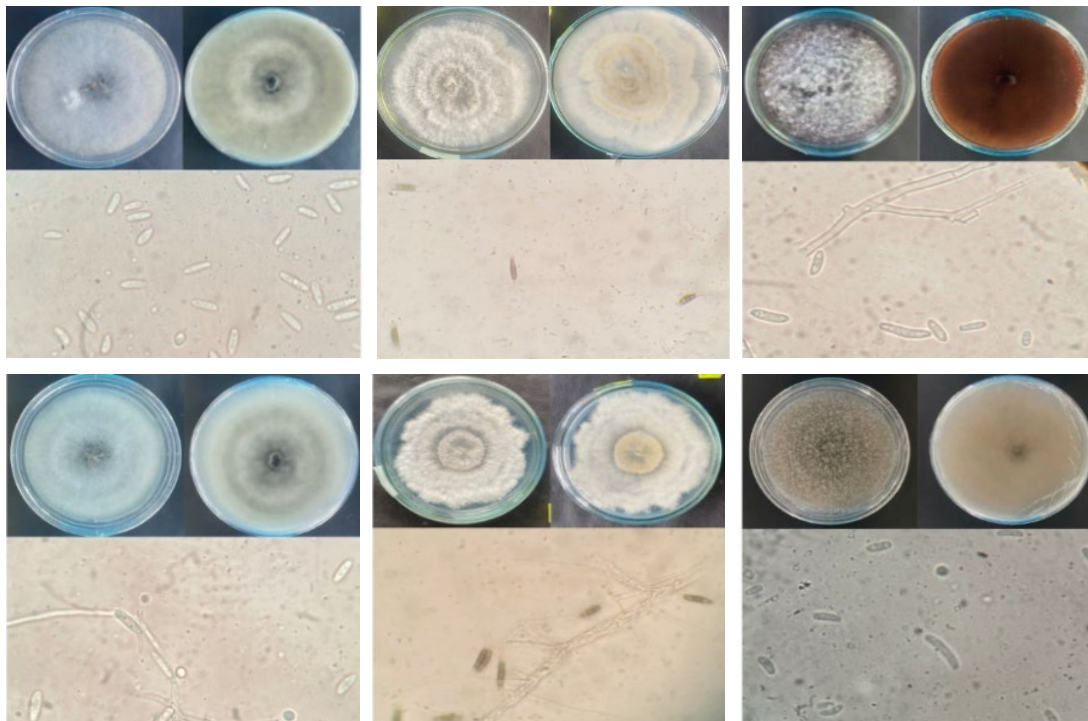
Hình 3. Lá lan sau 7 ngày sau chủng Koch

Ghi chú: A: lá không có triệu chứng bệnh, B: lá có triệu chứng đốm, C: lá có triệu chứng cháy đầu lá, D: lá đối chứng



Hình 4. Thân lan 7 ngày sau chủng Koch so với đối chứng và triệu chứng ban đầu

Ghi chú: A: Thân lan không có triệu chứng bệnh trước khi chủng bệnh, B: thân lan sau 7 ngày chủng bệnh, C: thân lan đối chứng



Hình 5. Hình thái tản nấm và bào tử của các mẫu nấm phân lập sau khi tái phân lập thuộc nhóm B so với mẫu phân lập ban đầu nhóm A

Ghi chú: 1: *Colletotrichum* spp.; 2: *Pestalotiopsis* spp.; 3: *Fusarium* spp.

3.3. Định danh mẫu nấm dựa vào hình thái bào tử và đánh giá tần suất xuất hiện các chi nấm

3.3.1. Định danh nấm gây bệnh dựa vào hình thái bào tử

Dựa vào các đặc điểm hình thái học của tản nấm sau 7 ngày nuôi cấy trên môi trường PDA như màu sắc, cách mọc của sợi nấm kết hợp với quan sát đặc điểm hình dạng kích thước bào tử dưới kính hiển vi để định danh các mẫu nấm. Kết quả phát hiện được

sự hiện diện của 3 chi nấm: *Colletotrichum* spp., *Pestalotiopsis* spp., *Fusarium* spp.

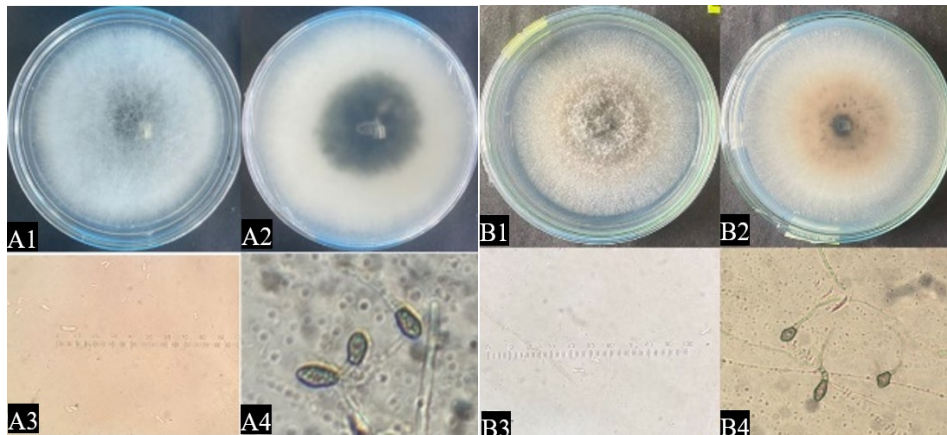
Chi *Colletotrichum* spp.: Có hai dạng đặc điểm hình thái khác nhau được chia làm 2 nhóm như sau: Nhóm I gồm 13 mẫu phân lập (LTD9, LTD10, LHM1, LHM2, LHM5, LHM10, LBC14, LBC16, LBC18, LBC23, LBC29, LBC211, LBC212). Tản nấm dạng tròn, mép tròn đều, mọc bung trên bề mặt thạch. Mặt trên tản nấm ban đầu có màu trắng ngà sau đó chuyển dần sang màu xanh rêu xám đến xanh rêu đen, có vòng đồng tâm (Hình 6.A1). Trên mặt

thạch xuất hiện những hạch nấm màu đen và các khối bào tử dạng giọt dầu màu cam ở những vị trí bất kỳ. Mặt dưới tản nấm ban đầu có màu trắng ngà sau đó chuyển dần thành màu xanh rêu nâu đến xanh rêu đen, có vòng đồng tâm (Hình 6.A2). Tản nấm mọc kín đĩa sau 6 - 7 ngày, tốc độ phát triển trung bình từ 13 đến 15 mm/ngày. Bào tử hình trụ dạng 2 đầu tròn hoặc 1 đầu tròn, 1 đầu nhọn, màu trong suốt, không có vách ngăn (Hình 6.A3). Kích thước bào tử trung bình 15,25 - 17,99 x 5,34 - 6,12 μm . Giác bám ban đầu không màu sau đó chuyển dần sang màu nâu, hình bất định (Hình 6.A4). Không ghi nhận lông gai. Các đặc điểm hình thái những dòng nấm thuộc nhóm I có sự tương đồng với mô tả của Weir (2012) về nấm *Colletotrichum* spp.

Nhóm II gồm 18 mẫu phân lập (LTD1, LTD2, LTD3, LTD4, LTD6, LTD8, LTD11, LTD12, LTD13, LHM3, LHM6, LHM7, LHM8, LHM9, LBC11, LBC12, LBC13, LBC22). Tản nấm dạng

gần tròn đến tròn, mọc bung trên mặt thạch. Mặt trên tản nấm ban đầu có màu trắng sau đó chuyển dần sang trắng xám hoặc cam xám, có hoặc không có vòng đồng tâm, trên mặt thạch xuất hiện những hạch nấm màu đen ở vị trí bất kỳ (Hình 6.B1). Mặt dưới tản nấm có màu cam hồng nhạt, cam xám, đến cam đậm, có hoặc không có vòng đồng tâm (Hình 6.B2). Tản nấm mọc kín đĩa sau 5 - 8 ngày, tốc độ phát triển trung bình từ 10,9 đến 18,8 mm/ngày. Bào tử hình trụ dạng 2 đầu tròn hoặc 1 đầu tròn, 1 đầu nhọn, màu trong suốt, không có vách ngăn (Hình 6.B3). Kích thước bào tử trung bình 11,91 - 14,29 x 4,57 - 5,68 μm . Giác bám ban đầu không màu sau đó chuyển dần sang màu nâu, hình gần tròn hay bất định (Hình 6.B4).

Các đặc điểm hình thái của các dòng nấm thuộc nhóm II có sự tương đồng với mô tả của Weir (2012) về chi nấm *Colletotrichum* spp.



Hình 6. Đặc điểm hình thái của mẫu *Colletotrichum* spp.

Ghi chú: A: nhóm I; B: nhóm II

Chi *Pestalotiopsis* spp.: Tản nấm mịn màu trắng đục, mọc nổi trên môi trường thạch, xếp lớp như cánh hoa, mép gợn sóng, mọc khá chậm thành đĩa (đĩa 90 mm) sau 7 ngày nuôi cấy, ban đầu mặt trên và mặt dưới tản nấm có màu trắng, sau 3 ngày nuôi cấy mặt dưới chuyển sang màu vàng nhạt, càng về sau màu vàng càng đậm hơn (Hình 7.A); có bào tử đa bào, với 4 vách ngăn ngang (5 tế bào), dạng hình thoi thẳng hoặc hơi cong. Tế bào ở đỉnh và tế bào ở gốc không có màu, 3 tế bào ở giữa có màu từ nâu nhạt đến nâu đậm, các vách ngăn có màu nâu đậm. Trên đỉnh bào tử có phần phụ là 2 - 3 lông, không màu, thẳng hoặc hơi cong với kích thước không bằng nhau. Vị trí lông mọc có thể ở đỉnh hoặc hai bên hông của tế bào đỉnh. Ngoài ra, bào tử còn có một phần phụ mọc ở tế bào cuối không màu. Kích thước của bào tử chiều dài từ 19,2 đến 24,0 μm ,

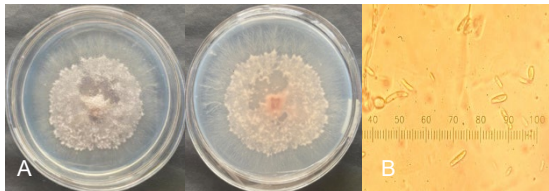
chiều rộng từ 4,8 - 7,2 μm . Số phần phụ ở đỉnh bào tử thay đổi từ 2 đến 3 lông. Trong đó, số bào tử có 2 lông phổ biến hơn, các lông này cũng có kích thước thay đổi, biến động từ 14,4 đến 26,4 μm (Hình 7.B).



Hình 7. Hình thái tản nấm và bào tử chi *Pestalotiopsis* spp. (MPL: LTD15)

Chi *Fusarium* spp.: Tản nấm mọc dày, xốp bông có màu tím hoặc trắng nhạt, tùy theo chủng nấm, tâm đĩa có màu tím, tốc độ tăng trưởng của nấm khá

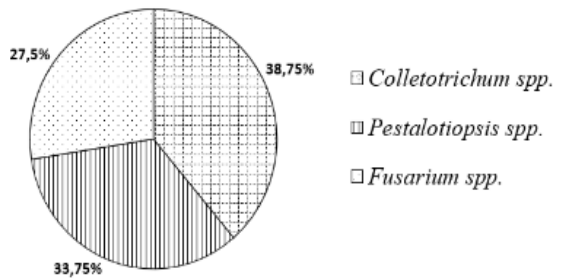
nhanh, đường kính tản nấm có thể đạt 8 - 9 cm sau 7 ngày nuôi cấy (Hình 8.A). Bào tử có dạng hình trứng khuyết, hình trứng, kích thước khoảng 3 - 5 x 5 - 7 μm , có từ 0 đến 1 vách ngang (Hình 8.B). So sánh những đặc điểm về hình thái màu sắc của tản nấm và hình thái bào tử nấm đối chiếu với mô tả của Leslie and Summerell (2006), Hafizi (2013) là nấm *Fusarium* spp.



Hình 8. Hình thái tản nấm và bào tử của chi *Fusarium* spp. (MPL:THM24)

3.3.2. Tần suất xuất hiện các chi nấm

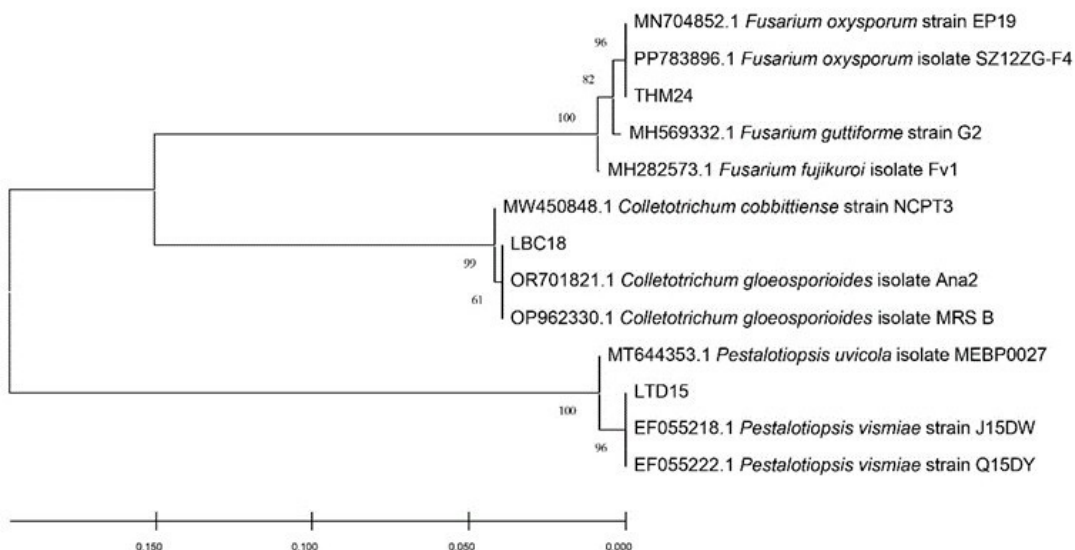
Dựa vào đặc điểm hình thái, trong số các mẫu nấm phân lập có 31 mẫu là nấm *Collectotrichum* spp., 27 mẫu là nấm *Pestalotiopsis* spp., 22 mẫu là nấm *Fusarium* spp. Biểu đồ thể hiện tần suất xuất hiện của các chi nấm đã phân lập được thể hiện ở Hình 9. Theo biểu đồ thống kê, 3 chi nấm phổ biến nhất với tần suất xuất hiện lần lượt là *Collectotrichum* spp. 38,75%, *Pestalotiopsis* spp. 33,75% và *Fusarium* spp. 27,50%.



Hình 9. Biểu đồ thể hiện tần suất xuất hiện của các chi nấm

3.4. Định danh các mẫu nấm thông qua phương pháp PCR và giải trình tự gen

Kết quả phản ứng PCR tất cả các mẫu DNA nấm với cặp primer ITS1 - ITS4 đều khuếch đại vùng trình tự ITS rRNA có kích thước band 500 – 700 bp. c cho thấy mẫu phân lập LBC18 được xác định là loài *Collectotrichum gloeosporioides* có độ tương đồng loài 99%, LTD15 là loài *Pestalotiopsis vismiae* có độ tương đồng là 98,59%, THM24 là loài *Fusarium oxysporum* với độ tương đồng loài là 99,61%. Kết quả vẽ cây phân nhánh di truyền xác định mức độ tương đồng về gen của các loài đã giải trình tự (Hình 10) cho thấy loài *Collectotrichum gloeosporioides* có hệ số bootstrap là 61%, loài *Pestalotiopsis vismiae* hệ số bootstrap là 96% và *Fusarium oxysporum* là 96%.



Hình 10. Cây phân nhánh di truyền loài được vẽ theo phương pháp Neighbor - joining hệ số bootstrap 1000 lần

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã khảo sát được 3 triệu chứng bệnh phổ biến trên lan *Dendrobium* tại khu vực thành phố Hồ Chí Minh bao gồm: cháy đầu lá, đốm lá và đen thân. Phân lập thành công 80 mẫu nấm từ 120 mẫu lan bệnh đã thu thập, xác định được có ít nhất 3 loài nấm gây bệnh thuộc 3 chi khác nhau lần lượt là *Colletotrichum gloeosporioides*, *Pestalotiopsis vismiae*, *Fusarium oxysporum*. Tần suất xuất hiện

các chi nấm trên mẫu lan bệnh là khác nhau. Trong đó, chi *Colletotrichum* spp. có tần suất xuất hiện nhiều nhất gây bệnh cháy đầu lá, tiếp theo là chi *Pestalotiopsis* spp. gây bệnh đốm lá và chi *Fusarium* spp. gây bệnh đen thân trên lan. Kết quả nghiên cứu đã góp phần cung cấp thêm dữ liệu thông tin dịch tễ trên chi lan Hoàng Thảo phục vụ cho công tác nghiên cứu biện pháp phòng trừ nấm bệnh hiệu quả trên lan.

TÀI LIỆU THAM KHẢO (REFERENCES)

- Barnett, H. L., & Hunter, B. B. (1998). Illustrated genera of imperfect fungi. The American phytopathological society. *US Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Washington State University, Pullman. APS Press. USA. St. Paul, Minnesota USA.*
- Burgess, L. W., Knight, T. E., & Tesoriero, L. (2009). *Diagnostic Handbook of Plant Diseases in Vietnam (Translated by Phan Thuy Hien), Part 8: Artificial Inoculation. Australian Centre for International Agricultural Research (in Vietnamese).*
- Van, Đ. T., & Nga, Đ. T. T. (2008). Orchid Textbook (in Vietnamese). Retrieved from http://tailieudientu.lrc.tnu.edu.vn/Upload/Collection/brief/brief_1308_10008_Small_09.Giaotrinhhoalan.pdf
- EL-Morsy E. M. (2004). Evaluation of microfungi for the biological control of water Hyacinth in Egypt. *Fungal Diversity*, 35-51.
- Hafizi, R., Salleh, B., & Latiffah, Z. (2013). Morphological and molecular characterization of *Fusarium solani* and *F. oxysporum* associated with crown disease of oil palm. *Braz J Microbiol*, 44(3), 959-968. <https://doi.org/10.1590/s1517-83822013000300047>
- Izumitsu, K., Hatoh, K., Sumita, T., Kitade, Y., Morita, A., Tanaka, C., & Ota, Y. (2012). Rapid and simple preparation of mushroom DNA directly from colonies and fruiting bodies for PCR. *Mycoscience*, 53(5), 396-401. <https://doi.org/10.1007/S10267-012-0182-3>
- Jain, A., Sarsaiya, S., Chen, J., Wu, Q., Lu, Y., & Shi, J. (2021). Changes in global *Orchidaceae* disease geographical research trends: recent incidences, distributions, treatment, and challenges. *Bioengineered*, 12(1), 13-29. <https://doi.org/10.1080/21655979.2020.1853447>
- Koch, R. (1876). Aetiologie der Milzbrandkrankheit begründet auf die Entwicklungsgeschichte des *Bacillus anthracis*. Cohn's Beiträge zur Biol. der Pflanzen, Breslau Bd II: 277.
- Kuehnle, A. R. (2007). Orchids: *Dendrobium*. In *Flower Breeding and Genetics: Issues, Challenges and Opportunities for the 21st Century* (pp. 539-560). Springer. https://doi.org/10.1007/1-4020-4428-3_21
- Leslie, J. F., & Summerell, B. A. (2006). *Fusarium* laboratory workshops-A recent history. *Mycotoxin Res*, 22(2), 73-74. <https://doi.org/10.1007/BF02956766>
- Parthibhan, S., Rao, M. V., & Kumar, T. S. (2017). Culturable fungal endophytes in shoots of *Dendrobium aqueum* Lindley—An imperiled orchid. *Ecological Genetics and Genomics*, 3, 18-24. <https://doi.org/10.1016/j.egg.2017.06.004>
- Ray, P., & Hill, M. P. (2012). Fungi associated with *Eichhornia crassipes* in South Africa and their pathogenicity under controlled conditions, *Article in African Journal of Aquatic Science*, 37(3), 323-331. <https://doi.org/10.2989/16085914.2012.712912>
- Shivas, R., & Beasley, D. (2005). Management of plant pathogen collections. Department of Agriculture. *Fisheries and Forestry, Canberra.*
- Staples, G., & Herbst, D. R. (2005). A tropical garden flora: plants cultivated in the Hawaiian Islands and other tropical places.
- Weir, B. S., Johnston, P. R., & Damm, U. (2012). The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. *Stud Mycol*, 73(1), 115-180. <https://doi.org/10.3114/sim0011>
- 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(1), 315-322. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1>