

## Xác định nấm *Erysiphe diffusa* gây bệnh phấn trắng trên cây đậu tương tại tỉnh Vĩnh Phúc

Lê Thị Thanh Tâm<sup>1\*</sup>, Phạm Văn Trục<sup>2</sup>, Phạm Ngọc Dung<sup>1</sup>, Nguyễn Văn Liêm<sup>1</sup>, Yukio Sato<sup>3</sup>, Susumu Takamatsu<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Viện Bảo vệ thực vật (PPRI), Viện Khoa học nông nghiệp Việt Nam (VAAS)

<sup>2</sup>Chi cục Bảo vệ thực vật tỉnh Vĩnh Phúc

<sup>3</sup>Đại học Toyama (TPU), Nhật Bản

<sup>4</sup>Đại học Mie (MU), Nhật Bản

Ngày nhận bài 17/11/2015, ngày chuyển phản biện 20/11/2015, ngày nhận phản biện 11/1/2016, ngày chấp nhận đăng 20/1/2016

Nấm *Erysiphe diffusa* Cooke & Peck 2000 ký sinh chuyên tính gây bệnh phấn trắng trên cây đậu tương (*Glycine max* (L) Merr) trồng tại Vĩnh Phúc đã được xác định bằng kết hợp giữa phương pháp sinh học phân tử và phân loại hình thái học mới nhất của Braun và Cook (2012) cũng như được xác nhận bởi kết quả lây bệnh nhân tạo đáp ứng đủ yêu cầu của chu trình Koch. 6 sequence vùng ITS của nấm phấn trắng đậu tương đã được đăng ký trên GenBank với mã số KM260706, KM260708-KM260712. Bệnh phấn trắng đã xuất hiện và gây hại trên cây đậu tương trồng tại Vĩnh Phúc ở vụ đông xuân 2013-2014, đạt đỉnh cao nhất vào khoảng đầu tháng 4, với tỷ lệ bệnh (TLB) là 22%, chỉ số bệnh (CSB) là 9,5%.

**Từ khóa:** đậu tương, *Erysiphe diffusa*, lây bệnh nhân tạo, phấn trắng.

**Chỉ số phân loại** 4.6

### Identification of hyperparasitic fungus *Erysiphe diffusa* causing powdery mildew on soybean in Vinh Phuc, Vietnam

#### Summary

Hyperparasitic fungus *Erysiphe diffusa* Cooke & Peck 2000, which causes powdery mildew on soybean (*Glycine max* (L) Merr) cultivated in Vinh Phuc province, has been identified by the combination of molecular biotechnology and standard morphological classification of Braun and Cook 2012 as well as being confirmed by pathogenicity test fulfilling Koch's postulate. Six sequences of ITS rRNA region of this fungus on soybean have been registered in the GenBank with Accession numbers including KM260706 and from KM260708 to KM260712. The disease appeared on soybean cultivated in Vinh Phuc during winter-spring crop 2013-2014, reached the peak at the beginning of April with the highest disease incidence 22% and disease severity 9.5%.

**Keywords:** *Erysiphe diffusa*, pathogenicity test, powdery mildew, soybean.

**Classification number** 4.6

### Đặt vấn đề

Việt Nam có khí hậu nhiệt đới gió mùa với đặc trưng là mưa nhiều, nhiệt độ và độ ẩm cao. Đây là điều kiện khí hậu thuận lợi cho nhiều loại nấm bệnh hại cây trồng phát triển. Trong đó, phấn trắng là loại bệnh thường xuyên xuất hiện, gây hại hàng năm trên nhiều loại cây trồng khác nhau.

Trên thế giới, bệnh phấn trắng gây hại ở nhiều vùng trồng đậu tương như ở châu Á (Trung Quốc, Nhật Bản, Hàn Quốc), châu Mỹ (Mỹ, Argentina...). Bệnh đã từng gây thành dịch ở Hàn Quốc làm nhiều khu vực canh tác giảm 65-70% năng suất [1]. Ở tỉnh Oita, đảo Kyushu, Nhật Bản, bệnh phấn trắng trên đậu tương bùng phát thành dịch làm giảm đến 35-40% về sản lượng [2].

Sự bùng nổ nghiêm trọng bệnh phấn trắng gây ra bởi một loại nấm thuộc chi *Erysiphe* đã được ghi nhận trên một số mẫu bệnh phấn trắng trên cây đậu tương thu được ở một số vùng Đông Á (trong đó có Việt Nam) từ năm 1998 [3]. Sự hình thành giai đoạn hữu tính (tạo quả thể) là một chỉ tiêu quan trọng để phân loại nấm phấn

\*Tác giả liên hệ: Email: thanhntamle10\_2012@yahoo.co.uk

trắng. Tuy nhiên, vị trí phân loại và phát sinh của nấm gây hại này chưa được xác định vì thiếu giai đoạn hữu tính. Trên thực tế, khó có thể tìm thấy sự hình thành quả thể của nấm phấn trắng ở các nước thuộc vùng nhiệt đới, trong đó có Việt Nam. Vì vậy, việc nghiên cứu phân loại nấm phấn trắng theo chỉ tiêu này thường ít hoặc hầu như không được phát triển ở các quốc gia thuộc vùng nhiệt đới.

Theo thống kê của Tổng cục Thống kê (GSO), Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn, mặc dù cây đậu tương có thị trường tiêu thụ lớn, song từ năm 2011 đến nay, diện tích đậu tương nước ta có xu hướng giảm dần, từ 181.000 ha xuống còn chưa đầy 120.000 ha, trong khi năng suất đậu tương bình quân của thế giới đạt 25 tạ/ha thì nước ta vẫn chỉ khoảng 14,3 tạ/ha.

Hiện nay, đậu tương là cây vụ đông chủ lực trên đất 2 vụ lúa của tỉnh Vĩnh Phúc. Năm 2014, Yên Lạc là huyện có diện tích trồng đậu tương vụ đông lớn nhất tỉnh Vĩnh Phúc (1.128 ha), trong đó, xã Liên Châu có 196 ha cây đậu tương, tập trung chủ yếu ở vùng đất phía trong đê. Giống đậu tương trồng phổ biến tại đây là DT96, DT84 cùng một số giống địa phương khác. Trồng đậu tương không chỉ giúp tăng thu nhập cho nông dân mà còn từng bước tạo ra các vùng sản xuất hàng hoá tập trung, đồng thời mở ra hướng chuyển đổi cơ cấu cây trồng vụ đông bền vững của huyện Yên Lạc nói riêng và tỉnh Vĩnh Phúc nói chung. Tuy nhiên, bệnh phấn trắng được ghi nhận là một trong những nguyên nhân chính hạn chế diện tích, năng suất, sản lượng đậu tương và đã gây hại trên nhiều diện tích trồng đậu tương và trên nhiều giống mới có năng suất cao như DT26, DT84... [4].

Để có cơ sở phòng chống bệnh phấn trắng trên cây trồng có hiệu quả, Bộ Khoa học và Công nghệ đã cho phép thực hiện đề tài Nghị định thư giữa Việt Nam và Nhật Bản “Nghiên cứu ứng dụng công nghệ sinh học trong phân loại và phòng trừ sinh học nấm phấn trắng trên một số cây trồng ở Việt Nam” giai đoạn 2013-2015. Bài báo này cung cấp kết quả nghiên cứu mới nhất xác định chính xác tên loài nấm phấn trắng gây hại trên cây đậu tương ở Vĩnh Phúc, Việt Nam bằng cách kết hợp cả phương pháp phân loại theo hình thái và sinh học phân tử mới nhất hiện nay trên thế giới đã được Viện Bảo vệ thực vật (PPRI) thực hiện trong năm 2014 [5].

## Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

*Địa điểm thu thập nguồn nấm:* các xã Tam Dương (huyện Tam Đảo), Yên Lập (huyện Vĩnh Tường), Liên Châu (huyện Yên Lạc), tỉnh Vĩnh Phúc.

*Chuẩn bị nguồn nấm:* các mẫu nấm phấn trắng gây hại trên cây đậu tương được tách bào tử từ vết bệnh phấn trắng có triệu chứng điển hình trên các lá bánh tẻ thu thập tại tỉnh Vĩnh Phúc.

*Quan sát hình thái học nấm phấn trắng:* cành bào tử, bào tử vô tính từ các mẫu nấm bệnh phấn trắng trên lá cây đậu tương còn tươi được tách ra bằng băng dính trong, dính trên lamên và được đếm số lượng qua quan sát dưới kính hiển vi (KHV) tổng hợp ở vật kính 40 X. Hình dạng, kích thước của bào tử có hay không có fibrosine, các đặc trưng của cành bào tử như hình dạng và kích thước của tế bào chân đế (TBCĐ), hình dạng và vị trí của giác bám trên sợi nấm được mô tả và ghi nhận. Trong mỗi mẫu kiểm tra, 100 bào tử vô tính và 30 TBCĐ được đo kích thước.

Quan sát các ống mầm của bào tử vô tính nấm phấn trắng được tiến hành theo phương pháp của K. Hirata (1942) [6].

*Lây bệnh nhân tạo:* để xác định tác nhân gây bệnh, việc lây bệnh nhân tạo được tiến hành trong điều kiện nhà lưới trên cây đậu tương giống DT84, 2 tuần tuổi với 1-2 lá thật bằng cách áp sát lá đậu tương bị bệnh phấn trắng lên các lá non sạch bệnh của 30 cây đậu tương. Trong khi 30 cây không được lây nhiễm dùng như là đối chứng âm.

*Tách chiết ADN:* ADN tổng thể (gADN) của nấm phấn trắng được tách chiết từ bào tử vô tính (conidia) của 6 mẫu nấm phấn trắng trên lá cây đậu tương, trên các giống địa phương (Cộc Nông) và giống phổ biến (DT84), thu được ở các xã Tam Dương (huyện Tam Đảo), Yên Lập (huyện Vĩnh Tường), Liên Châu (huyện Yên Lạc), tỉnh Vĩnh Phúc, bằng DNAeasy Blood and Tissue Kit (QIAGEN).

*Phản ứng PCR (Polymerase Chain Reaction):* phản ứng PCR nhân vùng ITS dùng cặp mồi chung HF1/HR4 theo phương pháp của Lê Thị Thanh Tâm và cs (2015) [7]. Phản ứng PCR đầu tiên được sử dụng làm khuôn cho phản ứng PCR tiếp theo. Phản ứng PCR đầu tiên được thực hiện trong tube 0,5 ml với tổng thể tích phản ứng 20  $\mu$ l, 0,5  $\mu$ M mỗi loại mồi xuôi và ngược (đều được chuẩn bị ở nồng độ 20  $\mu$ M), 10

μl Taq polymerase Master mix (TaKaRa, Tokyo), 4,0 μl nước cất 2 lần khử trùng dung dịch H<sub>2</sub>O và 5,0 μl DNA nấm phấn trắng và được tiến hành dưới các điều kiện chu trình nhiệt trong máy PCR thermal cycler SP (Takara, Kyoto, Japan) như sau: khởi đầu biến tính ở 94°C trong 3 phút; tiếp theo là 30 chu kỳ (mỗi chu kỳ biến tính ở 94°C trong 30 s, gắn mồi ở 58°C trong 30 s và tổng hợp sợi ở 72°C trong 48 s); phản ứng được kết thúc ở 72°C trong 10 phút. Phản ứng PCR tiếp theo (thứ hai) được tiến hành trong tổng thể tích 30 μl bao gồm 20 μl Taq PCR Master Mix, 1,0 μl mỗi loại primer (nồng độ 20 μM), nước cất tinh sạch 2 lần 5,0 μl và 3,0 μl khuôn ADN là sản phẩm của phản ứng PCR đầu tiên.

Các sản phẩm PCR được phân tách trên 2% agarose gels trong 1% TAE buffer bởi điện di electrophoresis, nhuộm màu bằng nhúng ngập trong dung dịch 1% TAE chứa Ethidium Bromide hoặc Green safe trong 30 phút. Các giải băng chứa các đoạn gen mong muốn từ sản phẩm PCR được nhìn thấy dưới đèn cực tím sóng dài, sau khi chụp ảnh được cất, tinh sạch bằng sử dụng QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN), như được miêu tả theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

*Giải trình tự và phân tích trình tự:* để giải mã (sequencing) vùng ITS rADN, cả 2 chiều của đoạn gen đều được giải mã sử dụng cặp primer cho phản ứng PCR thứ hai, HF1 và HR4 được nhắc đến ở trên. Các đoạn nucleotide của sản phẩm PCR sau cùng, phản ứng PCR thứ hai, sau khi tinh sạch, được gửi đi giải mã tại First Base Co. (Malaysia/Singapore) hoặc tại Macrogen Co. (Hàn Quốc).

Trình tự giải mã được lắp ráp tổng hợp từ kết quả giải mã 2 chiều bằng sử dụng phần mềm DNASTAR Lasergene 11 Core Suite software (<http://www.dnastar.com/t-allproducts.aspx>). Dùng BLAST, NCBI để tìm kiếm chuỗi tương đồng cao 98-100%. Sau đó, sử dụng ClustalX package [8] để căn trình tự (align) các chuỗi nucleotide vùng ITS các loài nấm phấn trắng xác định được trong nghiên cứu này với các chuỗi (sequence) của nấm phấn trắng thu được từ DDBJ database.

Trình tự các chuỗi được căn (alignment) sau đó được sàng lọc, cắt gọn, tiến hành trong MEGA5.2 [9].

Phân tích cây phả hệ maximum parsimony (MP) được tiến hành trong PAUP 4.0 b10 [10]. Các nhánh với giá trị bootstrap được kiểm tra bằng bootstrap (BS) analysis [11], với 1.000 lần lặp sử dụng các điều kiện

tối ưu của stepwise addition được đặt trước.

#### *Điều tra diễn biến:*

+ Địa điểm và thời gian điều tra: các xã Liên Châu, Đại Tự, Hồng Phương và Tam Hồng của huyện Yên Lạc, tỉnh Vĩnh Phúc.

+ Phương pháp điều tra: điều tra theo phương pháp của PPRI [12].

+ Điều tra TLB: chọn 5 ruộng/cánh đồng, mỗi ruộng 5 điểm, mỗi điểm 100 cây, đếm tổng số cây bị bệnh/tổng số cây của mỗi điểm để điều tra TLB của mỗi điểm trong ruộng.

+ Tính CSB: vì cây đậu tương bị phấn trắng chủ yếu trên lá nên chúng tôi áp dụng cách phân cấp bệnh theo phương pháp nghiên cứu bảo vệ thực vật của PPRI [12].

Cấp 1: < 5% diện tích lá có vết bệnh; cấp 2: 5-10% diện tích lá có vết bệnh; cấp 3: 10-15% diện tích lá có vết bệnh; cấp 4: 15-20% diện tích lá có vết bệnh; cấp 5: > 20% diện tích lá có vết bệnh.

#### *Chỉ tiêu theo dõi:*

$$\text{TBL (\%)} = \frac{\text{Số lá bị bệnh}}{\text{Tổng số lá điều tra}} \times 100$$

$$\text{CSB (\%)} = \frac{\sum(a \times b)}{N \times T} \times 100$$

Trong đó, a: số lượng bộ phận điều tra bị bệnh của mỗi cấp bệnh tương ứng; b (trị số cấp): bệnh của mỗi cấp tương ứng; N: tổng số bộ phận điều tra; T: trị số cấp bệnh của cấp bệnh cao nhất.

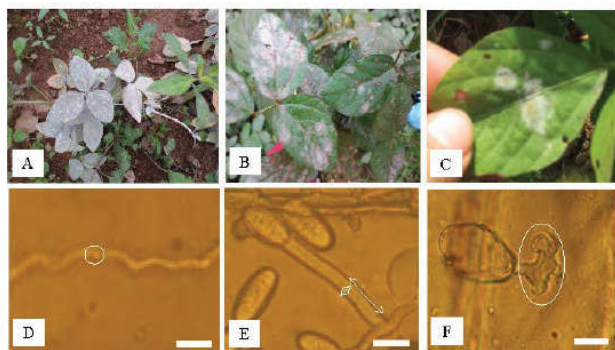
### **Kết quả và thảo luận**

#### ***Đặc điểm hình thái nấm bệnh phấn trắng gây hại trên cây đậu tương ở Vĩnh Phúc***

Nấm bệnh phấn trắng chủ yếu gây hại trên các lá bánh tẻ và lá già của cây đậu tương. Triệu trứng ban đầu là những đốm nấm màu trắng ở cả hai mặt lá, sau 1-2 tuần các vết bệnh này lan rộng và liên kết với nhau khiến toàn bộ lá đậu tương bị bao phủ bởi màu trắng như được phun vôi bột. Quan sát dưới KHV, sợi nấm bệnh có hình dạng ngoằn ngoèo, đôi khi có đốm sáng lớn. Sợi nấm có giác bám dạng thùy, hai thùy mọc đối diện hoặc đa thùy. Cành bào tử phân sinh mọc vuông góc với sợi nấm, dạng đơn, theo sau 1-2 tế bào có chiều dài (43,3-48,3-66,5(-71,5) μm. TBCĐ hình trụ



có kích thước chiều dài x chiều rộng = (25-)27,5-35(-37,5) x 6,3-7,5(-8,8)  $\mu\text{m}$ . Bào tử vô tính có chiều dài x chiều rộng = (27,5-)30-40(-45) x (15-)17,5-20(-22,5)  $\mu\text{m}$ , có tỷ lệ dài/rộng (1,6-)1,8-2,0. Bào tử vô tính được tạo ra thay đổi trong hình dạng từ hình trứng đến hình trụ hay ovan, không có fibrosin. Bào tử vô tính nảy mầm theo kiểu *Pseudoidium*. Quả thể của giai đoạn hữu tính không được tìm thấy. Căn cứ vào đặc điểm hình thái của giai đoạn vô tính và so sánh với khóa phân loại mới nhất về hình thái của nấm phấn trắng theo Braun và Cook [5], nấm phấn trắng gây hại trên cây đậu tương ở Việt Nam thuộc chi *Erysiphe* (hình 1).



Hình 1: một số đặc điểm hình thái của nấm phấn trắng gây hại trên cây đậu tương ở Vĩnh Phúc, Việt Nam: A, B, C: triệu chứng của bệnh phấn trắng trên lá của cây đậu tương trong nhà lưới của PPRI và trên cánh đồng ở Vĩnh Phúc; D: sợi nấm với đốm sáng lớn được chỉ ra bằng vòng tròn trắng; E: cảnh bào tử phân sinh với chiều dài và rộng của TBCĐ được chỉ ra bằng các mũi tên trắng; F: bào tử nảy mầm với dạng *Pseudoidium* được chỉ ra bằng vòng tròn trắng. Thanh bar = 30  $\mu\text{m}$  (D, E) và 15  $\mu\text{m}$  (F)

### Lây bệnh nhân tạo

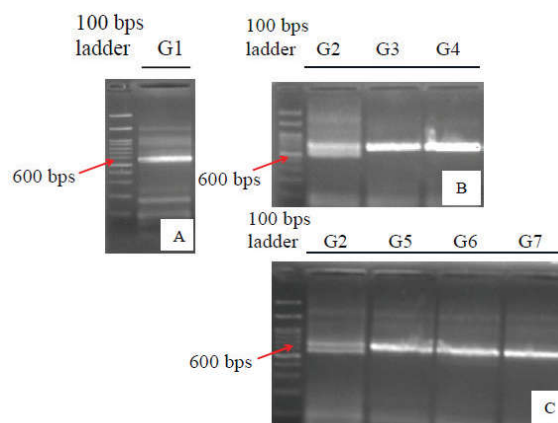
Tính gây bệnh của nấm phấn trắng được xác định thông qua thí nghiệm chủng nhiễm bằng cách áp sát các lá đậu tương bị bệnh lên 1-2 lá non sạch bệnh của các cây đậu tương 2 tuần tuổi, giống DT84, giống trồng phổ biến ngoài sản xuất của 30 cây được chủng nhiễm, trong khi 30 cây không chủng nhiễm dùng như là đối chứng âm.

Các cây được duy trì trong nhà lưới của PPRI ở 26 đến 28°C. Các lá được chủng nhiễm phát triển triệu chứng sau 10 ngày, trong khi các cây đối chứng không xuất hiện triệu chứng bệnh. Nấm bệnh có mặt trên các lá được chủng nhiễm có các đặc điểm hình thái học tương tự như nấm bệnh trên lá cây đậu tương của nguồn lây ban đầu với sequence ITS rRNA giống nhau khi giải trình tự cho sản phẩm PCR (*Erysiphe diffusa* Cooke & Peck, 2000), đáp ứng đủ yêu cầu của chu trình Koch.

### PCR xác định nấm phấn trắng trên cây đậu tương

Kết quả chạy PCR để xác định nấm phấn trắng trên

cây đậu tương được minh họa ở hình 2.



Hình 2: minh họa kết quả PCR nhân vùng ITS của nấm phấn trắng trên cây đậu tương ở Vĩnh Phúc (PPRI, 2014)

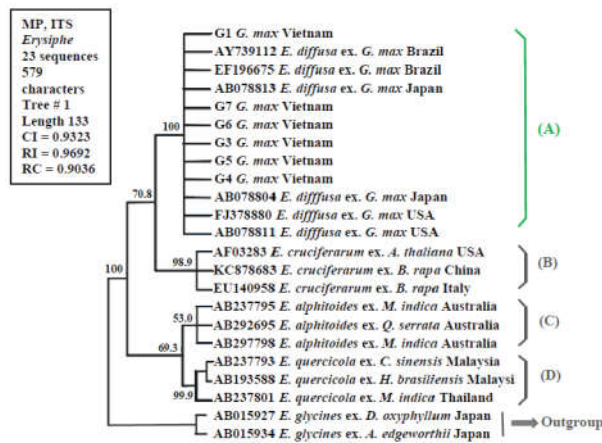
### Nguồn vật liệu nấm phấn trắng dùng cho phân tích cây phả hệ ITS

Các trình tự vùng ITS của nấm phấn trắng trên 6 mẫu đậu tương G1 và G3-G7 với GenBank accession (GA.) từ KM260706, KM260708-KM260712 cùng với các trình tự khác được lấy từ trong Database.

### Kết quả xây dựng và phân tích cây phả hệ MP dựa trên các trình tự ITS của nấm phấn trắng gây hại trên cây đậu tương ở Việt Nam bằng PAUP\* 4.0

6 sequence vùng ITS của nấm phấn trắng trên cây đậu tương thu được ở Vĩnh Phúc, Việt Nam được căn chuỗi với 17 sequence vùng ITS của nấm phấn trắng trên cây đậu tương và các cây ký chủ khác thuộc chi *Erysiphe* đạt được từ ADN databases. Sequence ITS của nấm phấn trắng *E. glycines* trên cây đậu dại (*D. oxypheillum*), GenBank accession (GA.) AB015927, và trên cây lưu niên thuộc họ đậu (*A. edgeworthii*), GA. AB015934 của Nhật Bản được sử dụng như nhóm khác (outgroup). Căn chuỗi các trình tự bao gồm 23 taxa và 579 character, trong đó 24 character (tương đương với 4,15%) thay đổi và 86 character (14,85%) chứa thông tin cho phân tích tiến hóa. Phân tích MP, sử dụng PAUP, tiến hành Heuristic search tính likelihoods, cho kết quả tỷ lệ Transition/transversion = 2 (kappa = 4,0437887). Các tần số nucleotide được giả định là A = 0,19871; C = 0,27734; G = 0,27874; T = 0,24521. Trong 8.016 lần sắp xếp lại, số các cây đạt được kết quả là 2, score của các cây tốt nhất được tìm thấy là 133. Sử dụng Kishino-Hasegawa test để tìm được cây phả hệ tối ưu, cây số 1, có các thông số bao gồm chiều dài cây = 133 (tree length), Consistency index (CI) = 0,9323; Retention index (RI) = 0,9692; Rescaled consistency index (RC) = 0,9036 và Homoplasy index (HI) = 0,0849. Sử dụng phương pháp Heuristic search với Branch-

swapping algorithm: tree-bisection-reconnection (TBR), với 1.000 lần lặp, chúng tôi tìm được giá trị bootstrap của các cụm trong cây phả hệ như ở hình 3.



Hình 3: cây phả hệ MP, PAUP 4.0 dựa trên phân tích các sequence vùng ITS của nấm phân trắng trên cây đậu tương ở Vĩnh Phúc, Việt Nam và nấm phân trắng trên các cây ký chủ khác trên thế giới. Các nhóm: (A) = *E. diffusa*; (B) = *E. cruciferarum*; (C) = *E. alphitoides*; (D) = *E. quercicola*; nhóm khác (outgroup) = *E. glycines*. Giá trị bootstrap được tính với 1.000 lần lặp sử dụng các điều kiện tối ưu của stepwise addition được đặt trước, chỉ hiển thị các giá trị bootstrap > 50%

Phân tích cây phả hệ dựa trên các sequence vùng ITS của nấm phân trắng trên cây đậu tương (*G. max*) ở Vĩnh Phúc, Việt Nam và thế giới cũng như các loài nấm phân trắng thuộc chi *Erysiphe* trên các cây ký chủ khác được chia thành 4 nhóm chính.

**Nhóm A**, nhóm nấm phân trắng *E. diffusa* trên cây đậu tương (*G. max*), với giá trị bootstrap 100 bao gồm 6 mẫu phân trắng ở Vĩnh Phúc, Việt Nam, G1, G3-7; 2 mẫu phân trắng ở Brazil, GA. AY739112, EF196675; 2 mẫu phân trắng ở Mỹ, GA. FJ378880, AB078811; và 2 mẫu phân trắng ở Nhật Bản, GA. AB078813, AB078804.

**Nhóm B**, với giá trị bootstrap 98,9 bao gồm tất cả các mẫu của nấm phân trắng *E. cruciferarum* trên cây cải (*B. rapa*) ở Trung Quốc và Ý, GA. KC878683, EU140958; trên cây *A. thaliana* ở Mỹ, GA. AF031283.

Nhóm A và nhóm B được phân tách nhau bởi giá trị bootstrap 70.8.

**Nhóm C**, nhóm nấm phân trắng *E. alphitoides*, gồm 2 mẫu nấm phân trắng trên cây xoài (*M. indica*) ở Australia, GA. AB237795, AB237798 và 1 mẫu nấm phân trắng trên cây sồi (*Q. serrata*) ở Nhật Bản, GA. AB292695 có giá trị bootstrap 53,0.

**Nhóm D**, gồm các mẫu nấm phân trắng *E. quercicola* trên 3 cây trồng chính là cây cam (*C. sinensis*) và cây cao su (*H. brasiliensis*) ở Malaysia, GA. AB237793,

AB193588; trên cây xoài (*M. indica*) ở Thái Lan, GA. AB237801, với giá trị bootstrap 99,9.

Nhóm C và nhóm D được phân tách nhau bởi giá trị bootstrap 69.3.

Các nhóm A-B và C-D cùng nhóm khác (outgroup) được phân tách nhau bởi giá trị bootstrap 100.

*Erysiphe diffusa* Cooke & Peck, 2000 đồng nghĩa (synonym) với *Microsphaera diffusa* Cooke & Peck, 1872 hoặc *Trichocladia diffusa* Cooke & Peck, 1927. Nấm phân trắng này có phạm vi ký chủ trên cây đậu tương (*Glycine max*), đậu cô ve (*Phaseolus vulgaris*), và các cây có hoa khác trong họ Đậu (*Alysicarpus longifolius*, *Apios americana*, *Crotalaria brevidens*, *Lespedeza bicolor*, *Lupinus perennis*, *Oxytropis campestris*...), phân bố ở Bắc Mỹ (Canada, Mexico, Mỹ), Trung và Nam Mỹ, quần đảo Galapagos, châu Á (Trung Quốc, Hàn Quốc, Nhật Bản, phía đông của Liên bang Nga). *E. diffusa* có thể được phân chia tiếp thành 2 mức thấp hơn loài về mặt hình thái phụ thuộc vào giác bóm trên quả thể hữu tính:

(1) *E. diffusa* var. *diffusa* có giác bóm dài gấp 1,5-2,5 chiều dài đường kính của quả thể, các giác bóm ngắn hơn thì thường khá cứng và loài này thường phân bố trên các chi ký chủ bao gồm: *Apios*, *Desmodium*, *Dolichos*, *Glycine*, *Glycyrrhiza*, *Lespedeza*, *Phaseolus*, *Senna*, *Strophostyles*.

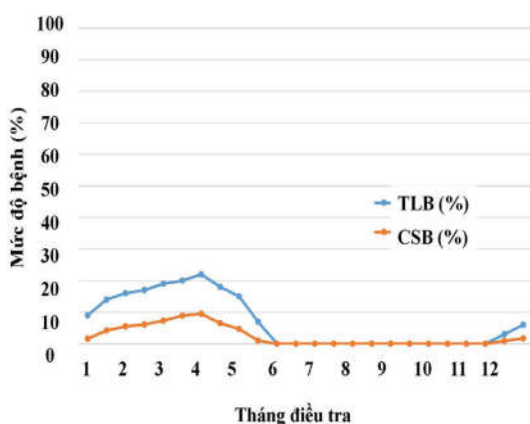
(2) *E. diffusa* var. *elongata* (Braun, comb. Et stat.nov.) MycoBank, No. 561423, có giác bóm dài và ngoằn ngoèo, gấp 2-4,5 lần chiều dài đường kính của quả thể và loài này thường phân bố trên các chi ký chủ bao gồm: *Desmodium*, *Psoralea*, *Robinia*, *Ruprechtia*.

Tuy nhiên, các báo cáo về *E. diffusa* từ châu Á không chắc chắn. Sự xác định của các báo cáo châu Á trên *Lespedeza* không rõ ràng. *E. diffusa* xảy ra trên một phạm vi rộng các cây họ đậu và có thể đại diện cho một phức hợp của một vài loài liên kết chặt chưa được phân tách (allied taxa) [5]. Ví dụ, phân tích sinh học phân tử các mẫu bệnh phân trắng cây đậu tương thu thập từ Nhật Bản, Hàn Quốc, Việt Nam và Mỹ đã phát hiện ra 2 loài *Erysiphe* kết hợp gây ra sự bùng phát thành dịch. Một loài tìm thấy giai đoạn hữu tính là loài *Erysiphe glycines*. Loài thứ 2 ở Việt Nam (Hà Nội) không tìm thấy giai đoạn hữu tính và rất có thể là *E. diffusa*, nguyên nhân gây ra bệnh phân trắng trên đậu tương ở Mỹ, bởi vì các chuỗi ITS giống nhau. Tuy nhiên, các tác giả chưa dám khẳng định chính xác là *E. diffusa* và vẫn yêu cầu phải tìm thấy giai đoạn hữu tính với sự có mặt của quả thể thì mới khẳng định được tới mức loài (species name) [3]. Ngày nay, nấm

phần trắng này hoàn toàn có thể được phân loại đến loài cho dù giai đoạn hữu tính không được tìm thấy, bằng các khóa phân loại mới nhất về hình thái ở giai đoạn vô tính kết hợp với sử dụng các kỹ thuật sinh học phân tử để giải mã vùng ITS [5]. Trong nghiên cứu của chúng tôi, nấm phần trắng đậu tương ở Vĩnh Phúc có đặc điểm hình thái thuộc chi *Erysiphe*, và có sequence ITS tương đồng với *E. diffusa* từ cây ký chủ đậu tương ở Brazil, Nhật Bản, Mỹ với giá trị bootstrap 100 trong cây phả hệ MP được phân tích bởi phần mềm chuyên dụng dành cho nấm phần trắng, PAUP 4.0. Vì vậy, bài báo này công bố báo cáo đầu tiên về xác định phân loại nấm phần trắng trên cây đậu tương ở Vĩnh Phúc, Việt Nam là do *Erysiphe diffusa* Cooke & Peck, 2000 gây hại [13].

#### Diễn biến bệnh phần trắng trên cây đậu tương tại Vĩnh Phúc năm 2013-2014

Năm 2014 có khí hậu mát hơn 2013, nên bệnh phần trắng trên đậu tương do *E. diffusa* gây ra xuất hiện sớm hơn, vào đầu tháng 1 có TLB 9,0%, CSB 1,6%, cuối tháng 1 có TLB 14%, CSB 4,2% là trên cây đậu tương cuối cùng của vụ đông. Trong vụ xuân, bệnh bắt đầu xuất hiện với mức độ cao hơn và tăng dần từ TLB 16%, CSB 5,5% lên đến TLB 20%, CSB 8,9% vào cuối tháng 3, đạt đỉnh cao nhất vào khoảng đầu tháng 4, với TLB 22%, CSB 9,5%, sau đó bệnh giảm dần xuống 18% cho TLB, 6,5% cho CSB vào cuối tháng 4, và sang cuối tháng 5 TLB, CSB lần lượt chỉ còn 7% và 1%. Đậu tương xuân đã được thu hoạch hết và đất để trồng rau màu khác cũng như hầu hết các diện tích đất trồng đậu tương vụ xuân được chuyển sang trồng lúa vụ mùa, không thấy bệnh xuất hiện trên đồng ruộng trong khoảng thời gian này cho đến tháng 12/2014 mới thấy bệnh xuất hiện ở mức độ nhẹ với TLB 2-5%, CSB 0,5-1,2% trên cây đậu tương vụ đông đã vào chắc quả (hình 4).



Hình 4: diễn biến của bệnh phần trắng do *E. diffusa* gây hại trên cây đậu tương ở Vĩnh Phúc, năm 2014 (PPRI, 2014)

Năm 2014, cây đậu tương vụ đông bị bệnh phần trắng ở mức độ nhẹ theo kết quả điều tra của Chi cục Bảo vệ thực vật tỉnh Vĩnh Phúc và của dự án. Bệnh ít xuất hiện trên các giống đậu tương phổ biến ngoài sản xuất như DT84, mà chủ yếu gây hại nặng trên các giống địa phương như Cộc Nông, cây thấp lùn, phiến lá to, dày và xanh đậm. Bệnh gây hại chủ yếu vào tháng 3-5 trên vụ xuân, lúc có điều kiện thời tiết phù hợp, sương mù và nhiệt độ khoảng 25°C.

#### Kết luận

1. Nấm phần trắng gây hại trên cây đậu tương ở Vĩnh Phúc, Việt Nam được xác định là *E. diffusa*.

2. Trong vụ đông xuân năm 2013-2014 tại Vĩnh Phúc, bệnh phần trắng gây hại nhiều nhất vào đầu tháng 4 với TLB 22% và CSB 9,5%.

#### Tài liệu tham khảo

- [1] H.D. Shin (2000), "Erysiphaceae of Korea", *Nat Inst Agric Sci Tech*, Suwon, Korea.
- [2] W. Hasama, T. Kato (2000), "New record in Japan of powdery mildew on soybean by *Oidium* sp. of *Erysiphe polygoni* type (in Japanese)", *Kyushu Pl Prot Res*, **46**, pp.18-21.
- [3] S. Takamatsu, Hyeon-Dong shin, Uraikak Paksiri, Saranya Limkaisang, U. Taguchi, Nguyen Thi Binh, Y. Sato (2002), "Two *Erysiphe* species associated with recent outbreak of soybean powdery mildew: results of molecular phylogenetic analysis based on nuclear rDNA sequences", *Mycoscience*, **43**(4), pp.333-341.
- [4] Vũ Triệu Mân (2007), *Giáo trình bệnh cây*, Nhà xuất bản Nông nghiệp.
- [5] U. Braun, R.T.A. Cook (2012), "Taxonomic Manual of the Erysiphales (Powdery Mildews)", *CBS Biodiversity*, CBS, Utrecht.
- [6] K. Hirata (1942), "On the shape of the germ tubes of *Erysipheae*", *Bull Chiba Coll Hort*, **5**, pp.34-49.
- [7] L.T.T. Tam, P.N. Dung, N.V. Liem (2015) (In press), "First report of powdery mildew caused by *Erysiphe cruciferarum* on *Brassica juncea* in Viet Nam", *Plant Disease* (APS Journals) (<http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-06-15-0678-PDN>).
- [8] J.D. Thompson, T.J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin, D.G. Higgins (1997), "The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools", *Nucleic Acids Research*, **25**, pp.4876-4882.
- [9] K. Tamura, D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei, S. Kumar (2011), "MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods", *Molecular Biology and Evolution*, **28**, pp.2731-2739.
- [10] D.L. Swofford (2001), *PAUP - phylogenetic analysis using parsimony (and other methods)*, Version 4.0b8. Sinauer Associates, Sunderland MA.
- [11] J. Felsenstein (1985), "Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap", *Evolution*, **39**, pp.783-791.
- [12] Đặng V.T. Thanh, Hà Minh Trung (1997), *Phương pháp nghiên cứu*, Viện PPRI, Nhà xuất bản Nông nghiệp.
- [13] D.F. Farr, A.Y. Rossman (2014), *Fungal Databases. Syst. Mycol. Microbiol. Lab.*, Online publication, ARS, USDA, Retrieved 6 November 2014 (<http://nt.ars-grin.gov/fungalatabases/index.cfm>).