

# Xác định vi nấm gây bệnh thối thân cây Xương rồng Nopal (*Opuntia ficus-indica*) trồng tại Ninh Thuận

Hồ Thị Cẩm Nguyên\*, Nguyễn Thị Thư Nhã, Đoàn Thị Kim Phụng, Nguyễn Thị Nhã

Ngành Công nghệ Sinh học, Viện Kỹ thuật Công nghệ cao NTT, Trường Đại học Nguyễn Tất Thành

\*htcnguyen@ntt.edu.vn

## Tóm tắt

Xương rồng Nopal (*Opuntia ficus-indica*) vừa là nguồn thực phẩm giàu dinh dưỡng cho người và gia súc, vừa là giải pháp lý tưởng cho những vùng đất hoang hóa, đất cát nhiễm mặn ven biển bỏ hoang không canh tác nông nghiệp được của Việt Nam, đặc biệt là Ninh Thuận. Những năm gần đây, bệnh thối thân Xương rồng Nopal đã xuất hiện và nhanh chóng lây lan làm đổ gãy cây, ảnh hưởng đến đến năng suất và làm giảm hiệu quả canh tác. Dựa vào đặc điểm hình thái và trình tự DNA vùng ITS, vi nấm gây bệnh được xác định là *Macrophomina* sp. và *Lasiodiplodia theobromae*. Phân tích cây phát sinh loài dựa trên trình tự vùng ITS cho thấy 2 vi nấm này phân bố cùng nhóm với các phân lập khác của *Macrophomina* sp. và *L. theobromae* trên GenBank. Các thí nghiệm về khả năng gây bệnh đã được thực hiện và đáp ứng định đề của Koch. Kết quả nghiên cứu đã chứng minh vai trò của cả 2 vi nấm trong việc gây bệnh thối thân trên Xương rồng Nopal, cung cấp thông tin quan trọng giúp nghiên cứu các biện pháp phòng trừ hợp lý, hiệu quả.

Nhận 04/12/2023

Được duyệt 02/01/2024

Công bố 29/03/2024

## Từ khóa

*Opuntia ficus-indica*,  
Xương rồng Nopal, thối  
thân, *Macrophomina*,  
*Lasiodiplodia*  
*theobromae*

© 2024 Journal of Science and Technology - NTTU

## 1 Giới thiệu

Xương rồng Nopal (*Opuntia ficus-indica* - OFI) hay còn được gọi là xương rồng lê gai, phân bố rộng rãi ở rất nhiều quốc gia trên thế giới. Thân và quả OFI có lớp biểu bì rất dày, lá nhỏ rụng sớm, hệ thống rễ nông lan rộng giúp loài cây này dự trữ lượng nước lớn, có thể sống sót cả khi thời tiết khắc nghiệt, trở thành nguồn thức ăn giúp gia súc vượt qua thời kỳ hạn hán [1]. OFI chứa nhiều thành phần dinh dưỡng tốt cho sức khỏe, đặc biệt là đa dạng về muối khoáng, do đó thân và quả được sử dụng như một loại rau xanh và quả tươi phổ biến tại châu Mỹ [2, 3]. Ngoài ra, thành phần từ thân và quả OFI chứa nhiều hoạt chất với khả năng giảm ung độc, chống viêm, chống ung thư, kháng khuẩn, hạ đường huyết, kháng oxy hóa, bảo vệ gan, bảo vệ thần kinh và giảm tác hại của các gốc tự do; do đó có tiềm

năng lớn trong sản xuất thực phẩm chức năng, mỹ phẩm và dược phẩm [4-6]. Do có thể phát triển ở điều kiện khô hạn, nghèo dinh dưỡng, nhưng lại cung cấp tiềm năng lớn để làm thực phẩm và dược liệu, nên OFI đã được thuần hóa và trồng thương mại ở nhiều nơi.

Việt Nam hiện nay vẫn còn rất nhiều diện tích đất hoang hóa, đất cát nhiễm mặn ven biển, bỏ hoang không canh tác nông nghiệp được, tiêu biểu như vùng đất cát Ninh Thuận; và OFI là loại cây được xem là lý tưởng để phủ xanh những vùng đất này. Tuy nhiên, khi canh tác ở quy mô lớn, nhiều bệnh hại xuất hiện, đặc biệt khi độ ẩm không khí cao kéo dài, bệnh thối thân do vi nấm gây ra nhanh chóng lây lan làm đổ gãy các bẹ thân, gây thiệt hại nghiêm trọng. Nhiều triệu chứng bệnh thối đã được ghi nhận trên OFI như bệnh thối khô (dry rot), bệnh thối chân (foot rot), bệnh thối mềm (soft rot), thối rễ, thối quả và thối thân; với các tác nhân gây hại cũng rất đa dạng [3].



*Alternaria tenuissima* và *Bisifusarium lunatum* được phát hiện gây bệnh thối trên thân OFI ở Cộng hòa Nam Phi [7, 8]; trong khi *Pythium aphanidermatum* mới là tác nhân gây các triệu chứng này ở Mexico [9]. Ngoài ra, *Alternaria alternata*; *Lasiodiplodia theobromae* và *Fusarium solani* cũng đã được báo cáo có khả năng gây thối bẹ thân và quả (cladode and fruit rot) trên OFI ở Ai Cập [10]. Có thể thấy vi nấm gây nên các triệu chứng thối thân OFI ở những quốc gia khác nhau trên thế giới cũng rất đa dạng. Trong khi những báo cáo về bệnh thối thân OFI còn rất hạn chế, đa số là các nghiên cứu từ nhiều năm trước không đánh giá được thành phần và mức độ bệnh hại OFI ở hiện tại. Đặc biệt, ở khu vực châu Á vẫn chưa có công bố về bệnh hại trên OFI.

Việc xác định đúng tác nhân gây bệnh là bước đầu tiên rất quan trọng để giúp cho việc đề ra các biện pháp phòng trừ hợp lý, hiệu quả hơn. Nghiên cứu được thực hiện với mục tiêu định danh được tác nhân gây bệnh thối thân trên OFI trồng tại tỉnh Ninh Thuận, để làm cơ sở cho các nghiên cứu về biện pháp phòng trừ.

## 2 Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

### 2.1 Vật liệu

Mẫu bẹ thân OFI bị thối được thu tại Trung tâm Thông tin – Ứng dụng tiến bộ khoa học công nghệ Ninh Thuận. Mẫu được bọc trong giấy đã khử trùng và chứa trong túi zip kín, phân lập trong vòng 24 giờ sau khi thu.

**2.2 Phương pháp phân lập và làm thuần vi nấm gây bệnh**  
Các mẫu bệnh được rửa dưới vòi nước máy, sau đó rửa sạch bằng nước vô trùng, khử trùng bề mặt bằng cồn 70 %, và để khô trên giấy thấm vô trùng. Trong tủ cấy, những mẫu cây nhỏ (khoảng 5 mm × 5 mm) ở phần ranh giới giữa mô khỏe và mô bệnh được cắt lấy từ mẫu bệnh, sau đó đặt lên môi trường WA – water agar (môi trường 2 % agar) và để ở nhiệt độ phòng (25 ± 2) °C. Sau 2 ngày, khi tơ nấm đã xuất hiện từ mẫu cây, tiến hành cấy chuyển lên môi trường PDA – potato dextrose agar (Himedia, India) nhiều lần để được mẫu nấm bệnh thuần.

Sau khi các vi nấm đã được làm thuần, sợi nấm và bào tử được nhuộm bằng thuốc nhuộm lactophenol cotton blue, sau đó quan sát dưới kính hiển vi. Đặc điểm hình thái của khuẩn lạc trên môi trường thạch cùng với đặc điểm hệ sợi nấm và bào tử được ghi nhận.

**2.3 Phương pháp lây nhiễm nhân tạo xác định vi nấm gây bệnh**

Thí nghiệm lây nhiễm nhân tạo kiểm chứng tác nhân gây bệnh nhằm cung cấp thông tin để khẳng định một vi sinh vật được phân lập là tác nhân gây bệnh, được thực hiện theo định đề Koch. Các bước lây nhiễm nhân tạo được tham khảo theo Ammar, M. I. Và cộng sự (2004), có điều chỉnh cho phù hợp [10]. OFI giống được chăm sóc trong nhà màng để đảm bảo cây khỏe mạnh, không bị bất cứ sâu bệnh hại gì. Các bẹ thân OFI được sử dụng cho thí nghiệm là các bẹ thân 3 tuần tuổi (tính từ thời điểm chồi mầm nhú ra 5 mm), khỏe mạnh được cắt từ các cây giống. Bẹ thân được rửa sạch bụi bẩn dưới vòi nước máy, khử trùng bằng cách ngâm trong dung dịch ethanol 70 % trong 1 phút, rửa lại 3 lần với nước cất vô trùng để làm vật chủ lây nhiễm.

Ở mỗi bẹ thân sử dụng dao mổ vô trùng cắt 2 ô vuông (5 × 5 × 2) mm ở 2 đầu bẹ thân để tạo vết thương; cắt lấy 4 mẫu thạch (5 × 5) mm ở phần rìa khuẩn lạc nấm 7 ngày tuổi (tính từ thời điểm cấy chuyển mẫu lên môi trường thạch) đặt lên trên bẹ thân; trong đó 2 mẫu thạch đặt vào 2 ô vuông đã cắt, 2 mẫu thạch nấm còn lại đặt lên trên bề mặt bẹ thân ở giữa trên đường thẳng nối 2 ô vuông này. Mẫu đối chứng được thực hiện tương tự, nhưng thay 4 mẫu thạch chứa vi nấm thành 4 mẫu thạch môi trường PDA vô trùng.

Mẫu khi lây nhiễm nhân tạo được giữ trong các hộp kín (đã được hấp khử trùng) có chứa giấy lọc thấm nước cất vô trùng để duy trì độ ẩm cao; giữ ở nhiệt độ phòng. Tất cả những mẫu lây nhiễm có xuất hiện triệu chứng bệnh được tái phân lập để xác định tác nhân gây bệnh.

**2.4 Phương pháp định danh phân tử tác nhân gây bệnh**  
Vi nấm được định danh dựa trên vùng trình tự ITS của cụm gen rDNA. DNA được thu bằng cách nghiền sợi khuẩn ty với nitor lỏng trong cối chày sứ, sau đó tinh sạch bằng TopPURE® Plant DNA Extraction Kit (HI-122-ABT, Việt Nam) theo quy trình hướng dẫn của nhà sản xuất. Vùng trình tự ITS được khuếch đại bằng phương pháp PCR với cặp mồi ITS1 và ITS4 [11]; trong đó ITS1-F: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'; ITS4-R: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'.

Phản ứng PCR được thực hiện theo chu trình: biến tính ở 95 °C trong 5 phút, 35 chu kỳ (biến tính ở 95 °C trong 1 phút, gắn mồi ở 56 °C trong 1 phút, kéo dài ở 72 °C trong 1 phút), tổng hợp sợi ở 72 °C trong 10 phút, trữ ở 4 °C. Sản phẩm PCR sau đó được điện di trên gel agarose 1 % với thang chuẩn HyperLadder 1 kb (Bioline, England).



Sau khi giải trình tự vùng ITS, vi nấm được định danh dựa trên việc so sánh tương đồng trình tự vùng ITS với các trình tự đã công bố nhờ công cụ BLAST của NCBI (National Center for Biotechnology Information) thông qua các giá trị E-value và Percent identify. Các trình tự tương đồng sau khi được sắp giống cột đa trình tự bằng chương trình Seaview [12], được dùng làm dữ liệu để tạo cây phát sinh loài bằng phần mềm MEGA 11 sử dụng phương pháp Maximum Likelihood với Bootstrap re-sampling 1 000 lần.

### 3 Kết quả và thảo luận

#### 3.1 Triệu chứng bệnh thối thân OFI

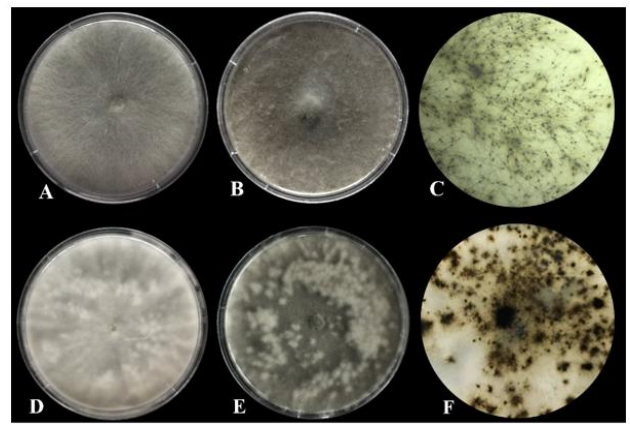
OFI trong điều kiện độ ẩm cao dễ dàng bị vi sinh vật tấn công gây thối trên bề thân đặc trưng với triệu chứng là các đốm nâu đen xuất hiện trên mặt bề thân, phát triển lan rộng dần thành vùng thối đen, phần thịt phía trong thối mềm, sau đó khô dần làm mất cấu trúc ban đầu, dẫn đến đổ gãy cành cây (Hình 1). Bệnh thường xuất hiện và lây lan nhanh chóng sau những đợt mưa kéo dài, gây tổn thất lớn cho vùng trồng OFI.



**Hình 1** Triệu chứng thối thân trên bề thân OFI

#### 3.2 Phân lập và làm thuần vi nấm gây bệnh

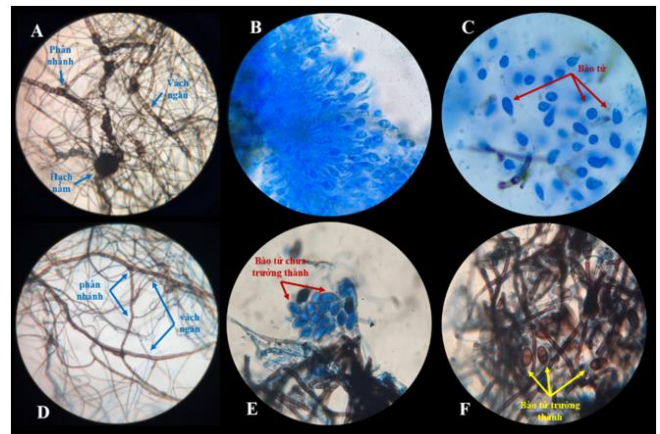
Từ 3 mẫu OFI bị thối thân phân lập được 2 nhóm vi nấm có khả năng gây bệnh thối thân. Khuẩn lạc vi nấm XR1 trên môi trường thạch PDA ban đầu có màu trắng, nhanh chóng chuyển dần sang màu xám sau 3 ngày nuôi cấy, màu khuẩn lạc sẫm dần theo thời gian thành màu xám đen hoặc đen ở cả 2 mặt thạch (Hình 2A và 2B). Hệ sợi phát triển rất nhanh, phủ kín bề mặt thạch đĩa (đường kính 90 mm) sau 3 ngày nuôi cấy. Trong môi trường thạch WA, hệ sợi xuất hiện rất nhiều hạch nấm nhỏ màu đen (Hình 2C).



**Hình 2** Đặc điểm hình thái khuẩn lạc vi nấm XR1 và XR7 trên môi trường thạch PDA và WA

A – khuẩn lạc XR1 trên môi trường PDA sau 4 ngày nuôi cấy; B – khuẩn lạc XR1 trên môi trường PDA sau 7 ngày nuôi cấy; C – hệ sợi nấm XR1 trên môi trường WA; D – khuẩn lạc XR7 trên môi trường PDA sau 4 ngày nuôi cấy; E – khuẩn lạc XR7 trên môi trường PDA sau 7 ngày nuôi cấy; F – sắc tố đen hình thành khi nuôi cấy XR7 trên môi trường WA

Dưới kính hiển vi, hệ sợi nấm của XR1 có màu nâu đến nâu đen, phân nhánh, có vách ngăn. Hệ sợi đặc trưng bởi các sợi nấm có nhiều vách ngăn gần nhau tạo nên các tế bào dạng tròn hoặc dạng barrel (Hình 3A). Túi bào tử là khối cấu trúc màu nâu đen đến đen, là nơi sinh ra các bào tử chưa trưởng thành (Hình 3B). Bào tử có hình trứng hoặc gần tròn, trong suốt, không vách ngăn, có thành bao bọc, bắt màu xanh đặc trưng của thuốc nhuộm lactophenol cotton blue (Hình 3C).



**Hình 3** Đặc điểm hệ sợi nấm và bào tử vi nấm XR1 và XR7 dưới kính hiển vi, vật kính 40X

A – hệ sợi nấm XR1; B – thể phát sinh bào tử của XR1 trong túi bào tử; C – bào tử XR1; D – hệ sợi nấm XR7; E – bào tử chưa trưởng thành của XR7; F – bào tử trưởng thành của XR7

Khuẩn lạc vi nấm XR7 trên môi trường thạch PDA ban đầu có màu trắng hoặc trắng xám, màu xám sẫm hơn theo thời gian, sợi nấm phòng xốp trên bề mặt thạch (Hình 2D và Hình 2E). Khuẩn lạc phát triển rất nhanh, đạt đường kính 9 cm chỉ sau 3 ngày nuôi cấy. Mặt sau của khuẩn lạc xuất hiện các sắc tố đen, nhìn thấy nhiều và rõ nhất khi nuôi cấy trên môi trường WA (Hình 2F). Túi bào tử là những khối màu trắng xám có tâm màu đen, phát triển lồi lên trên bề mặt thạch.

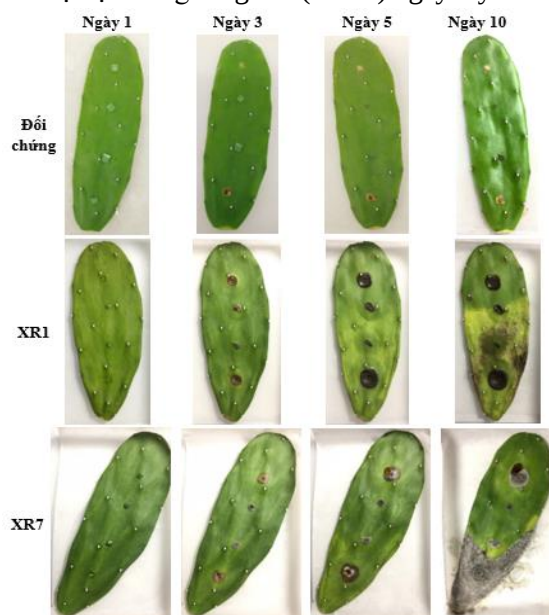
Hệ sợi của XR7 dưới kính hiển vi có màu nâu đến nâu đen, phân nhánh và có vách ngăn (Hình 3D). Bào tử của XR7 trải qua giai đoạn chưa trưởng thành ở dạng trong suốt, hình trứng hoặc bầu dục, không có vách ngăn, có thành bao bọc bên ngoài, bắt màu xanh đặc trưng của thuốc nhuộm lactophenol cotton blue (Hình 3E); ở giai đoạn trưởng thành, bào tử chuyển sang màu nâu và hình thành 1 vách ngăn ngang (Hình 3F).

### 3.3 Lây nhiễm nhân tạo xác định tác nhân gây bệnh

Vết bệnh thối xuất hiện ở 2 trong 4 nghiệm thức lây nhiễm vi nấm, thể hiện trong Hình 4. Khi lây nhiễm XR1, vết bệnh xuất hiện nhanh chóng chỉ 2 ngày sau khi lây nhiễm ở cả vị trí tạo vết thương và không tạo vết thương. Vết bệnh dưới dạng thối mềm vào trong thịt bẹ xương rồng, ban đầu có màu nâu nhạt, sau đó sẫm dần thành nâu đen và đen. Kết quả cho thấy vết bệnh ở vị trí tạo sẵn vết thương lan ra nhanh hơn, đạt đường kính (1,5-2) cm sau 4 ngày lây nhiễm, trong khi chỉ (0,5-1) cm ở vị trí không tạo vết thương. Sau đó, vết bệnh bên ngoài hầu như không tăng đường kính, tuy nhiên, bệnh vẫn phát triển bên trong thịt bẹ xương rồng gây héo và thối mô từ bên trong, kết quả gây thối mềm hầu như toàn bộ mẫu sau (15-20) ngày lây nhiễm.

Tương tự như XR1, vi nấm XR7 cũng có khả năng tạo vết bệnh thối nhanh chóng chỉ sau 2 ngày lây nhiễm. Tuy nhiên, vết bệnh thối chỉ phát triển ở vị trí có tạo vết thương, ban đầu màu vàng nâu, chuyển dần sang màu nâu đen đến đen; vết bệnh có đường kính (0,7-1) cm sau 2 ngày nuôi cấy, tăng lên thành (1,5-2) cm sau 10 ngày nuôi cấy, sau đó tơ nấm phát triển lan rộng bề mặt mẫu, xuất hiện các cụm tơ nấm màu trắng xám phòng xốp trên bề mặt đặc trưng của vi nấm XR7 khi nuôi cấy trên môi trường PDA. Tại 2 vị trí không gây vết thương, tơ nấm chỉ phát triển trên bề mặt xung quanh miếng thạch, không ăn vào thịt bẹ xương rồng. Bên cạnh đó, không có sự xuất hiện của triệu chứng bệnh ở nghiệm thức đối chứng. Kết quả lây nhiễm nhân tạo ở quy mô phòng thí nghiệm cho thấy cả 2 vi nấm đều có khả năng gây bệnh

nhẹ chóng chỉ sau 2 ngày lây nhiễm, vi nấm phát triển mạnh mẽ bên trong thịt bẹ xương rồng, gây thối hầu như toàn bộ bẹ xương rồng sau (15-20) ngày lây nhiễm.

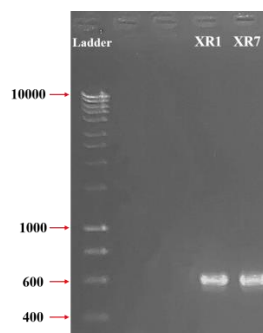


**Hình 4** Kết quả lây nhiễm nhân tạo vi nấm XR1 và XR7 trên OFI

Tuy nhiên, có sự khác nhau về khả năng lây nhiễm giữa XR1 và XR7, cụ thể vi nấm XR1 có thể tự xâm nhập qua lớp biểu bì dày của OFI trong khi vi nấm XR7 cần có vết thương để gây bệnh. Cả 2 loại vi nấm đều gây thối mềm bẹ OFI, do đó nếu cây OFI ngoài đồng bị nhiễm bệnh sẽ dễ dàng xảy ra hiện tượng đổ gãy cây, hoặc nặng hơn, gây chết cây.

Thí nghiệm tái phân lập các vết bệnh do lây nhiễm nhân tạo XR1 và XR7 thu được duy nhất 1 vi nấm đối với mỗi loại. Hình thái khuẩn lạc và đặc điểm vi thể của 2 loại vi nấm tương ứng giống với XR1 và XR7 phân lập được từ mẫu ngoài đồng ).

### 3.4 Định danh vi nấm gây bệnh bằng phương pháp sinh học phân tử



**Hình 5** Kết quả điện di sản phẩm PCR khuếch đại vùng trình tự ITS của XR1 và XR7 trên gel agarose 1 %

Sản phẩm PCR khuếch đại gen mã hóa vùng trình tự ITS của 2 vi nấm XR1, XR7 với cặp mồi ITS1-F/ITS4-R được phát hiện phát hiện trên gel agarose

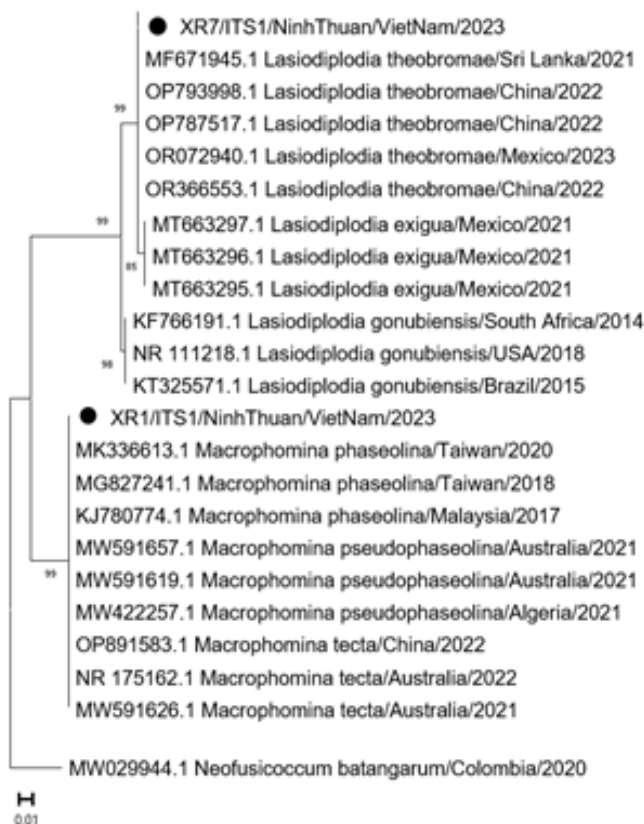
1 % cho thấy ở cả 2 mẫu XR1 và XR7 đều xuất hiện 1 băng có kích thước khoảng 600 bp, phù hợp với kích thước vùng ITS của vi nấm [13] (Hình 5).

|   | Description                                           | Scientific Name   | Max Score | Total Score | Query Cover | E value | Per. Ident | Acc. Len | Accession  |
|---|-------------------------------------------------------|-------------------|-----------|-------------|-------------|---------|------------|----------|------------|
| ✓ | Macrophomina phaseolina strain Y.H. Yeh I0106 interne | Macrophomina p... | 1016      | 1016        | 100%        | 0.0     | 100.00%    | 558      | MK336613.1 |
| ✓ | Macrophomina phaseolina strain Y.H. Yeh V0408 small   | Macrophomina p... | 1016      | 1016        | 100%        | 0.0     | 100.00%    | 626      | MH141281.1 |
| ✓ | Macrophomina phaseolina strain Y.H. Yeh V0108 small   | Macrophomina p... | 1016      | 1016        | 100%        | 0.0     | 100.00%    | 597      | MH141234.1 |
| ✓ | Macrophomina phaseolina strain Mp001 small subunit ri | Macrophomina p... | 1016      | 1016        | 100%        | 0.0     | 100.00%    | 586      | MG827241.1 |
| ✓ | Macrophomina phaseolina isolate A3S6-D2 18S ribosom   | Macrophomina p... | 1016      | 1016        | 100%        | 0.0     | 100.00%    | 590      | KJ780774.1 |
| ✓ | Macrophomina pseudophaseolina strain WAC 2767 sm      | Macrophomina p... | 1016      | 1016        | 100%        | 0.0     | 100.00%    | 717      | MW591657.1 |

Hình 6 Kết quả BLAST đối chiếu trình tự vi nấm XR1 với dữ liệu Genbank

|   | Description                                        | Scientific Name      | Max Score | Total Score | Query Cover | E value | Per. Ident | Acc. Len | Accession  |
|---|----------------------------------------------------|----------------------|-----------|-------------|-------------|---------|------------|----------|------------|
| ✓ | Lasiodiplodia theobromae isolate ADB7 small sub    | Lasiodiplodia the... | 985       | 985         | 100%        | 0.0     | 100.00%    | 556      | MF671945.1 |
| ✓ | Lasiodiplodia theobromae strain BF49 internal trar | Lasiodiplodia the... | 985       | 985         | 100%        | 0.0     | 100.00%    | 541      | OP793998.1 |
| ✓ | Lasiodiplodia theobromae strain AF38 small subur   | Lasiodiplodia the... | 985       | 985         | 100%        | 0.0     | 100.00%    | 548      | OP787517.1 |
| ✓ | Lasiodiplodia theobromae strain AF37 internal trar | Lasiodiplodia the... | 985       | 985         | 100%        | 0.0     | 100.00%    | 535      | OP787516.1 |
| ✓ | Lasiodiplodia theobromae strain AF14 internal trar | Lasiodiplodia the... | 985       | 985         | 100%        | 0.0     | 100.00%    | 535      | OP787499.1 |
| ✓ | Lasiodiplodia theobromae strain C. C. Lee AgF1-1   | Lasiodiplodia the... | 983       | 983         | 99%         | 0.0     | 100.00%    | 571      | MH793568.1 |

Hình 7 Kết quả BLAST đối chiếu trình tự vi nấm XR7 với dữ liệu Genbank



Hình 8 Cây phát sinh loài của vi nấm XR1 và XR7 được xây dựng dựa trên vùng trình tự ITS bằng phương pháp Maximum Likelihood (Bootstrap re-sampling 1 000 lần)

Kết quả giải trình tự vùng ITS của vi nấm XR1 và XR7 có độ dài lần lượt là 556 bp và 534 bp. Vùng ITS của XR1 tương đồng 100 % với loài *Macrophomina phaseolina* và *M. pseudophaseolina* khi đối chiếu với cơ sở dữ liệu GenBank, trong khi XR7 tương đồng 100 % với vi nấm *Lasiodiplodia theobromae* (Hình 6 và 7). Trên cây phát sinh loài, XR1 phân bố chung nhóm với các chủng tham chiếu *M. phaseolina*, *M. pseudophaseolina* và *M. tecta*; trong khi XR7 phân bố cùng nhóm với nhiều phân lập *L. theobromae* khác từ Mexico, Trung Quốc và Sri Lanka với giá trị bootstrap đều đạt 99 % (Hình 8). Qua đó, vi nấm XR1 và XR7 là *Macrophomina* sp. và *L. theobromae*, gây bệnh thối thân cho OFI trồng tại Ninh Thuận.

#### 4 Thảo luận

*Macrophomina* sp. và *Lasiodiplodia theobromae* đều có khả năng gây thối thân OFI trồng tại Ninh Thuận với triệu chứng là những vết thối mềm màu nâu đến đen, tương tự như triệu chứng do *Alternaria tenuissima*, *A. alternata*, *Bisifusarium lunatum*, *Pythium aphanidermatum* và *Fusarium solani* gây ra trên OFI ở nhiều quốc gia khác trên thế giới [7-10]. Kết quả cho thấy bệnh thối thân OFI rất đa dạng về tác nhân gây bệnh tùy thuộc vào các điều kiện tự nhiên khác nhau,

điều này sẽ dẫn đến gây khó khăn trong việc phòng trừ và kiểm soát tác nhân gây bệnh.

*Macrophomina* là chi nấm gây bệnh thực vật phổ biến khắp thế giới. *M. phaseolina* được báo cáo có khả năng gây bệnh thối gốc và rễ (crown and root rot) ở California, Argentina và Israel [14-16]; gây bệnh thối than (charcoal rot) cho 5 loại nông sản quan trọng của Senegal gồm đậu đũa, đậu phộng, búp giấm, cao lương và đậu bắp [17] và nhiều cây trồng khác như hướng dương, đậu adzuki, đậu gà và đậu xanh [18-21]. Ngoài ra, *M. phaseolina* còn gây bệnh thối rễ (root rot) ở cà tím [22], thối gốc rễ (crown and root rot) cây hồ trăn [23] và gây bệnh bạc lá (leaf blight) trên 2 loại cây kiểng của Malaysia là đại tướng quân và bạch trinh biển [24]. Cùng chi này, *M. pseudophaseolina* cũng được ghi nhận là tác nhân gây bệnh thối than (charcoal rot) cho đậu lăng ở Algeria và thối khô (stem dry rot) cây sắn ở Brazil [25, 26]. Có thể thấy *Macrophomina* là một mầm bệnh thực vật nguy hiểm, có khả năng gây bệnh ở cả cây một và hai lá mầm, phân bố ở nhiều điều kiện tự nhiên khác nhau khắp thế giới. Vi nấm XR1 trong nghiên cứu có thể gây bệnh cả ở vị trí tạo và không tạo vết thương do *Macrophomina* spp. có khả năng xâm chiếm cả mô thực vật còn sống và mô chết, xâm nhập qua lớp biểu bì của ký chủ bằng cách tiết ra các enzyme phân giải thành tế bào hoặc xâm nhập gián tiếp thông qua vết thương [27]. Nghiên cứu của Islam và cộng sự đã phân tích bộ gen của *M. phaseolina* cho thấy bộ gen chứa một lượng lớn các gen liên quan đến khả năng gây bệnh liên quan đến tương tác giữa mầm bệnh và ký chủ; cho phép vi nấm bám vào mô vật chủ, vô hiệu hóa khả năng phòng vệ ban đầu của vật chủ, xâm nhập qua lớp biểu bì thực vật, giải phóng một loạt các độc tố khác nhau và các enzym phân hủy thành tế bào; khẳng định *M. phaseolina* là mầm bệnh thực vật có khả năng tàn phá nghiêm trọng [28]. Nguồn lây nhiễm chính của *Macrophomina* spp. là các hạch nấm nhỏ được sinh ra từ mô thân và rễ của ký chủ, có thể tồn tại trong đất khoảng 15 năm [27], do đó nếu không có biện pháp xử lý phù hợp sẽ dễ dàng lây nhiễm cho nhiều mùa vụ liên tiếp.

*L. theobromae* được biết đến phổ biến với vai trò vừa là vi sinh vật nội sinh vừa là mầm bệnh thực vật. Dưới vai trò là vi sinh vật nội sinh trong cây, đặc biệt là cây thân gỗ, *L. theobromae* cho thấy khả năng thích nghi rộng rãi với khoảng 189 loài thực vật khác nhau ở các khu vực nhiệt đới và cận nhiệt đới, khả năng tổng hợp rất nhiều hợp chất có hoạt tính sinh học và enzyme

ngoại bào như cellulase, protease và lipase [29]. Vi nấm nội sinh có khả năng lây lan trong các mô của ký chủ mà không gây ra triệu chứng bệnh, tuy nhiên, trong điều kiện cây gặp stress, giảm khả năng chống chịu bệnh hại sẽ dẫn đến sự tấn công của mầm bệnh tiềm ẩn [30]. Do đó, tại những vị trí tạo vết thương, *L. theobromae* gây thối mủ, phát triển và lây lan nhanh bên trong bẹ thân OFI. *L. theobromae* từng được phát hiện có khả năng gây nhiều bệnh trên cây xoài gồm bệnh bạc lá (twig blight), chết khô (dieback), chảy mủ (gummosis), nứt thân (bark splitting), thối cổ rễ (collar rot), thối cuống quả sau thu hoạch (stem end rot) ở Pakistan [31, 32] và bệnh thối quả trước thu hoạch (fruit rot) ở Malaysia [33]. Đối với cacao, *L. theobromae* là tác nhân gây bệnh bạc lá (leaf blight), thối thân (stem canker), thối quả (pod rot) và chết khô (dieback) [34, 35]. Ngoài ra, một số báo cáo khác cho rằng *L. theobromae* còn là tác nhân gây bệnh đốm lá (leaf spot), khô cành (branch dieback), thối thân (stem canker) cho cây gỗ tẻch [36], bệnh chết khô (dieback) cây nho [37], bệnh bạc lá (leaf blight) dừa [38]. Bên cạnh đó, một nghiên cứu khác đã chứng minh được 4 phân lập *L. theobromae* là tác nhân gây bệnh thối (rot) tương ứng cho 4 loại cây trồng cacao, xoài, chuối và khoai từ, có khả năng lây nhiễm bệnh chéo cho nhau [39]. Những nghiên cứu trên cho thấy *L. theobromae* là một mầm bệnh thực vật phổ biến và thích nghi với nhiều ký chủ. Điều kiện cần thiết để *L. theobromae* gây bệnh là thông qua vết thương hở trên ký chủ [32, 34, 38], hơn nữa lớp biểu bì của OFI rất dày, được bao bọc bởi lớp cutin chống thoát nước, vì vậy tại những vị trí không gây vết thương trên bẹ thân xương rồng, vi nấm không xâm nhập gây bệnh được. Do đó, việc hạn chế gây vết thương như hạn chế các động vật hút chích, vết thương cơ học do cắt tỉa,..., trên ruộng OFI sẽ giúp hạn chế sự lây lan bệnh hại.

## 5 Kết luận

Cả 2 vi nấm *Macrophomina* sp. và *L. theobromae* phân lập được đều có khả năng gây bệnh thối thân OFI. *Macrophomina* sp. có khả năng xâm nhập bẹ thân OFI không cần thông qua vết thương trong khi *L. theobromae* cần vết thương hở để gây bệnh. Nghiên cứu đóng góp thông tin về bệnh thối thân OFI tại Việt Nam, là cơ sở cho các nghiên cứu xây dựng biện pháp phòng trừ, quản lý bệnh thối thân OFI trồng tại Ninh Thuận.



### Lời cảm ơn

Nghiên cứu được tài trợ bởi Quỹ Phát triển Khoa học và Công nghệ – Trường Đại học Nguyễn Tất Thành, đề tài mã số 2022.01.139/HĐ-NCKH.

### Tài liệu tham khảo

1. Nguyễn Thị Cẩm Duyên. (2019). Tìm hiểu đặc điểm hình thái giải phẫu xương rồng lê gai *Opuntia ficus indica* (L.) Mill. ở Việt Nam. *Tạp chí Khoa học & Công nghệ - Trường ĐH Nguyễn Tất Thành*, 2(1), 62-66.
2. C. Sáenz-Hernández, J. Corrales-García, G. Aquino-Pérez. (2002). Nopalitos, mucilage, fiber, and cochineal. In P. S. Nobel (Ed.), *Cacti: Biology and uses* (pp. 211-234): University of California Press.
3. P. Inglese, C. Mondragon, A. Nefzaoui, et al. (2017). *Crop ecology, cultivation and uses of cactus pear: Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO).
4. R. Sharma, M. Kaur, A. Kaur. (2012). Pharmacological actions of *Opuntia ficus indica*: A review. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 2(7), 15-18.
5. M. Cherkaoui-Malki, K. El-Mostafa, Y. El Kharrassi, et al. (2014). Nopal cactus (*Opuntia ficus-indica*) as a source of bioactive compounds for nutrition, health and disease. *Molecules*, 19(9), 14879-14901.
6. T. Marino, R. Castañeda-Arriaga, A. Perez-Gonzalez, et al. (2021). Antioxidants into Nopal (*Opuntia ficus-indica*), important inhibitors of free radicals' formation. *Antioxidants*, 10(12), 2006.
7. V. R. Swart, W. J. Swart. (2000). *The current status of research on diseases of Opuntia ficus-indica in South Africa*. Paper presented at the IV International Congress on Cactus Pear and Cochineal 581.
8. M. Gryzenhout, H. J. Fouche, W. J. Swart. (2017). First report of a serious cladode disease of *Opuntia ficus-indica* (Prickly Pear) in South Africa caused by *Bisifusarium lunatum*. *Plant Disease*, 101(12), 2148-2148.
9. G. Rodríguez-Alvarado, S. P. Fernández-Pavía, L. Landa-Hernández. (2001). First report of *Pythium aphanidermatum* causing crown and stem rot on *Opuntia ficus-indica*. *Plant Disease*, 85(2), 231-231.
10. M. I. Ammar, A. M. Shltout, M. A. Kamhawy. (2004). Cladode and fruit rots of prickly pear (*Opuntia ficus-indica* L. Mill.) in Egypt. *Egyptian Journal of Phytopathology*, 32(1/2), 119-128.
11. T. J. White, T. Bruns, S. Lee, et al. (1990). Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. In M. A. Innis, et al. (Eds.), *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (Vol. 31, pp. 315-322). San Diego, CA, USA: Academic Press.
12. M. Gouy, S. Guindon, O. Gascuel. (2010). SeaView Version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Molecular Biology and Evolution*, 27(2), 221-224.
13. Z. Embong, W. H. Wan Hitam, C. Y. Yean, et al. (2008). Specific detection of fungal pathogens by 18S rRNA gene PCR in microbial keratitis. *BMC Ophthalmol*, 8, 7.
14. S. T. Koike. (2008). Crown rot of strawberry caused by *Macrophomina phaseolina* in California. *Plant Disease*, 92(8), 1253.
15. O. M. Bairo, S. M. Salazar, A. C. Ramallo, et al. (2011). First report of *Macrophomina phaseolina* causing strawberry crown and root rot in Northwestern Argentina. *Plant Disease*, 95(11), 1477.
16. A. Zveibil, S. Freeman. (2005). First report of crown and root rot in strawberry caused by *Macrophomina phaseolina* in Israel. *Plant Disease*, 89(9), 1014.
17. M. P. Sarr, M. B. Ndiaye, J. Z. Groenewald, et al. (2014). Genetic diversity in *Macrophomina phaseolina*, the causal agent of charcoal rot. *Phytopathologia Mediterranea*, 53(2), 250-268.
18. S. Khan. (2007). *Macrophomina phaseolina* as causal agent for charcoal rot of sunflower. *Mycopath*, 5(2), 111-118.
19. S. Sun, W. Xiaoming, Z. Zhu, et al. (2015). Occurrence of charcoal rot caused by *Macrophomina phaseolina*, an emerging disease of adzuki bean in China. *Journal of Phytopathology*, 164, 1-5.

20. E. Dell'Olmo, P. Tripodi, M. Zaccardelli, *et al.* (2022). Occurrence of *Macrophomina phaseolina* on chickpea in Italy: Pathogen identification and characterization. *Pathogens*, 11(8), 1-14.
21. J. Zhang, Z. Zhu, C. Duan, *et al.* (2011). First report of charcoal rot caused by *Macrophomina phaseolina* on mungbean in China. *Plant Disease*, 95(7), 872.
22. H. Ramezani. (2008). Biological control of root-rot of eggplant caused by *Macrophomina phaseolina*. *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences*, 4(2), 218-220.
23. F. P. Trouillas, M. T. Nouri, D. P. Lawrence, *et al.* (2020). *Macrophomina* crown and root rot of pistachio in California. *Plants*, 9(2), 1-18.
24. A. R. Huda-Shakirah, Y. J. Kee, A. B. M. Hafifi, *et al.* (2019). Identification and characterization of *Macrophomina phaseolina* causing leaf blight on white spider lilies (*Crinum asiaticum* and *Hymenocallis littoralis*) in Malaysia. *Mycobiology*, 47(4), 408-414.
25. M. E. A. Kouadri, A. A. Bekkar, S. Zaim. (2023). Morphological, molecular and pathogenic characterization of *Macrophomina pseudophaseolina* the causal agent of charcoal rot disease on lentil (*Lens culinaris*) in Algeria. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 128, 102143.
26. A. C. d. Q. Brito, J. F. de Mello, S. J. Michereff, *et al.* (2019). First report of *Macrophomina pseudophaseolina* causing stem dry rot in cassava in Brazil. *Journal of Plant Pathology*, 101(4), 1245-1245.
27. S. Kaur, G. S. Dhillon, S. K. Brar, *et al.* (2012). Emerging phytopathogen *Macrophomina phaseolina*: Biology, economic importance and current diagnostic trends. *Critical Reviews in Microbiology*, 38(2), 136–151.
28. M. S. Islam, M. S. Haque, M. M. Islam, *et al.* (2012). Tools to kill: Genome of one of the most destructive plant pathogenic fungi *Macrophomina phaseolina*. *BMC Genomics*, 13(1), 493.
29. M. M. Salvatore, A. Andolfi, R. Nicoletti. (2020). The thin line between pathogenicity and endophytism: The case of *Lasiodiplodia theobromae*. *Agriculture*, 10(488), 1-22.
30. B. Slippers, M. J. Wingfield. (2007). Botryosphaeriaceae as endophytes and latent pathogens of woody plants: diversity, ecology and impact. *Fungal Biology Reviews*, 21(2), 90-106.
31. M. Shahbaz, Z. Iqbal, A. Saleem, *et al.* (2009). Association of *Lasiodiplodia theobromae* with different decline disorders in mango (*Mangifera indica* L.). *Pakistan Journal of Botany*, 41(1), 359-368.
32. S. Ullah, Y. Hussain, S. Iram. (2016). Pathogenic characterization of *Lasiodiplodia* causing stem end rot of mango and its control using botanicals. *Pakistan Journal of Botany*, 49(4), 1605-1613.
33. M. S. Munirah. (2017). Characterization of *Lasiodiplodia theobromae* and *L. pseudotheobromae* causing fruit rot on pre-harvest mango in Malaysia. *Plant Pathology & Quarantine*, 7(2), 202-213.
34. A. R. Huda-Shakirah, N. M. I. Mohamed Nor, L. Zakaria, *et al.* (2022). *Lasiodiplodia theobromae* as a causal pathogen of leaf blight, stem canker, and pod rot of *Theobroma cacao* in Malaysia. *Scientific Reports*, 12(1), 8966.
35. M. Mbenoun, E. H. Momo Zeutsa, G. Samuels, *et al.* (2008). Dieback due to *Lasiodiplodia theobromae*, a new constraint to cocoa production in Cameroon. *Plant Pathology*, 57(2), 381.
36. K. D. Hyde, M. Doilom, L. A. Shuttleworth, *et al.* (2015). Botryosphaeriaceae associated with *Tectona grandis* (teak) in Northern Thailand. *Phytotaxa*, 233(1), 1–26.
37. E. Rodríguez-Gálvez, E. Maldonado, A. Alves. (2015). Identification and pathogenicity of *Lasiodiplodia theobromae* causing dieback of table grapes in Peru. *European Journal of Plant Pathology*, 141(3), 477-489.
38. R. Ramjegathesh, I. Johnson, H. Manjunath, *et al.* (2019). Characterization of *Lasiodiplodia theobromae* causing leaf blight disease of coconut. *Journal of Plantation Crops*, 47(2), 62-71.
39. P. Twumasi, O.-M. Godfried, E. Moses. (2014). The rot fungus *Botryodiplodia theobromae* strains cross infect cocoa, mango, banana and yam with significant tissue damage and economic losses. *African Journal of Agricultural Research*, 9, 613-619.

## Identification of phytopathogenic fungus causing stem rot on *Opuntia ficus-indica* grown in Ninh Thuan

Ho Thi Cam Nguyen\*, Nguyen Thi Thu Nha, Doan Thi Kim Phung, Nguyen Thi Nha  
Department of Biotechnology, NTT Hi-Tech Institute, Nguyen Tat Thanh University  
\*htcnguyen@ntt.edu.vn

**Abstract** *Opuntia ficus-indica* known as both a nutritious food source for both humans and livestock, and an ideal solution for regions affected by desertification and salinity in sandy soils along coastal areas, that were unsuitable for cultivation in Viet Nam, especially in Ninh Thuan province. In recent years, *O. ficus-indica* stem rot disease has emerged and rapidly spread, leading to the collapse of plants and causing many difficulties for farmers. Based on morphological characteristics and DNA sequence analysis of the internal transcribed spacer (ITS) region, the pathogenic fungi were identified as *Macrophomina* sp. and *Lasiodiplodia theobromae*. Phylogenetic analysis based on ITS region sequences showed that these two fungi were grouped into the same clade with reference isolates of *Macrophomina* sp. and *L. theobromae* from GenBank. Pathogenicity tests were performed, meeting Koch's postulates. The research results confirming the roles of both fungi in causing stem rot on *O. ficus-indica*, providing essential information for studying reasonable and effective disease prevention and control measures.

**Keywords** *Opuntia ficus-indica*, nopal cactus, stem rot, *Macrophomina*, *Lasiodiplodia theobromae*