

BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM
HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Trần Thị Hoa

**NGHIÊN CỨU NGUYÊN NHÂN GÂY BỆNH RỤNG LÁ
PESTALOTIOPSIS HẠI CÂY CAO SU TẠI MỘT SỐ VÙNG TRỒNG
CHÍNH CỦA VIỆT NAM**

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

Hà Nội - 2024

BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Trần Thị Hoa

**NGHIÊN CỨU NGUYÊN NHÂN GÂY BỆNH RỤNG LÁ
PESTALOTIOPSIS HẠI CÂY CAO SU TẠI MỘT SỐ VÙNG
TRỒNG CHÍNH CỦA VIỆT NAM**

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC
Mã số: 842 01 14

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC :

1. PGS.TS Trịnh Xuân Hoạt

A handwritten signature in blue ink, appearing to be "Trinh Xuan Hoat", written over a horizontal line.

2. TS. Hồ Ngọc Anh

A handwritten signature in blue ink, appearing to be "Ho Ngoc Anh", written below the name.

Hà Nội - 2024

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đề tài nghiên cứu trong luận văn này là công trình nghiên cứu của tôi dựa trên những tài liệu, số liệu do chính tôi tự tìm hiểu và nghiên cứu. Chính vì vậy, các kết quả nghiên cứu đảm bảo trung thực và khách quan nhất. Đồng thời, kết quả này chưa từng xuất hiện trong bất cứ một nghiên cứu nào. Các số liệu, kết quả nêu trong luận văn là trung thực nếu sai tôi hoàn toàn chịu trách nhiệm trước pháp luật.

Hà Nội, ngày 25 tháng 08 năm 2024

Học viên



Trần Thị Hoa

LỜI CẢM ƠN

Với tất cả tấm lòng, em xin bày tỏ lòng kính trọng và biết ơn sâu sắc nhất tới **PGS.TS Trịnh Xuân Hoạt** – Phó Viện trưởng Viện Bảo vệ thực vật, người đã trực tiếp hướng dẫn, dành nhiều công sức, thời gian đóng góp ý kiến vô cùng quan trọng và tạo mọi điều kiện để em thực hiện và hoàn thành luận văn. Em xin cảm ơn **TS. Hồ Ngọc Anh** - Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ là người thầy đã dành cho em những ý tưởng quý báu, cũng như sự hướng dẫn tận tình và động viên em trong suốt quá trình thực hiện luận văn.

Em xin gửi lời cảm ơn tới các anh chị cán bộ, bộ môn Chẩn đoán giám định dịch hại và thiên địch, Viện Bảo vệ thực vật nhiệt tình giúp đỡ và tạo điều kiện cho em thực hiện luận văn.

Em xin gửi lời cảm ơn chân thành đến Ban giám đốc, các thầy giáo, cô giáo thuộc Khoa Công nghệ sinh học, phòng Đào tạo, các phòng chức năng của Học viện Khoa học và Công nghệ - Viện Hàn lâm Khoa học và công nghệ Việt Nam đã dạy dỗ, truyền đạt kiến thức để em có thể hoàn thành chương trình học tập cũng như thực hiện đề tài.

Cuối cùng, em xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc đến gia đình và những người bạn thân thiết đã luôn bên cạnh, động viên và khích lệ em trong suốt quá trình học tập và nghiên cứu.

Học viên



Trần Thị Hoa

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN	i
LỜI CẢM ƠN	ii
MỤC LỤC.....	iii
DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ CÁI VIẾT TẮT	vi
DANH MỤC HÌNH ẢNH	viii
MỞ ĐẦU	1
1. Mục đích nghiên cứu.....	2
2. Nội dung nghiên cứu.....	2
Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU	4
1.1. TỔNG QUAN VỀ CÂY CAO SU VÀ BỆNH HẠI CÂY CAO SU ...	4
1.1.1. Tình hình sản xuất cao su trên thế giới.....	4
1.1.2. Tình hình sản xuất cao su tại Việt Nam.....	4
1.1.3. Một số nghiên cứu bệnh hại trên cây cao su.....	5
1.1.4. Một số nghiên cứu về biện pháp quản lý tổng hợp bệnh rụng lá cao su ⁷	
1.2. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU VỀ BỆNH RỤNG LÁ CAO SU <i>PESTALOTIOPSIS</i>	9
Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	14
2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU.....	14
2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	14
2.2.1. Phương pháp điều tra, thu thập mẫu bệnh bệnh rụng lá cao su	14
2.2.2. Xác định thành phần và loài nấm chính gây bệnh rụng lá <i>Pestalotiopsis</i> trên cây cao su tại Việt Nam.....	15
2.2.3. Phân lập, làm thuần nấm gây bệnh rụng lá cao su.....	15
2.2.4. Định danh loài nấm gây bệnh rụng lá trên cây cao su.....	16
2.2.4.1. Định danh bằng phương pháp hình thái học.....	16

2.2.4.2. Định danh dựa trên kỹ thuật phân tử	17
2.2.5. Nghiên cứu đặc điểm sinh học của loài nấm gây bệnh rụng lá trên cây cao su	17
2.2.5.1. Nghiên cứu khả năng sinh trưởng và phát triển của nấm trên các môi trường dinh dưỡng khác nhau	17
2.2.5.2. Nghiên cứu khả năng sinh trưởng và phát triển của nấm ở các mức nhiệt độ khác nhau	17
2.2.5.3. Nghiên cứu khả năng sinh trưởng và phát triển của nấm ở các mức pH khác nhau trên môi trường dinh dưỡng	18
Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	19
3.1. Kết quả điều tra thành phần bệnh trên cây cao su	19
3.2. Kết quả phân lập, làm thuần tác nhân gây bệnh rụng lá cao su.....	21
3.2.1. Triệu chứng bệnh	21
3.2.2. Kết quả phân lập tác nhân gây triệu chứng rụng lá cao su tại Đồng Nai và Gia Lai	25
3.2.3. Kết quả lây nhiễm nhân tạo chủng nấm phân lập trên cây cao su	26
3.3. Định danh loài nấm <i>Pestalotiopsis</i> gây bệnh rụng lá trên cây cao su ..	28
3.3.1. Định danh loài nấm <i>Pestalotiopsis</i> gây bệnh rụng lá trên cây cao su bằng hình thái học	28
3.3.2. Định danh loài nấm <i>Pestalotiopsis</i> gây bệnh rụng lá trên cây cao su bằng kỹ thuật phân tử.....	29
3.4. Xác định đặc điểm sinh học của tác nhân gây bệnh rụng lá trên cây cao su.....	37
3.4.1. Nghiên cứu khả năng sinh trưởng và phát triển của chủng nấm gây bệnh trên các môi trường dinh dưỡng khác nhau	37
3.4.2. Nghiên cứu khả năng sinh trưởng và phát triển của nấm <i>Neopestalotiopsis saprophytica</i> chủng ĐN1 ở các mức nhiệt độ khác nhau trên môi trường PDA	39
3.4.3. Nghiên cứu khả năng sinh trưởng và phát triển của nấm <i>Neopestalotiopsis saprophytica</i> chủng ĐN1 trên môi trường PDA ở các mức pH khác nhau	41
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	44
KẾT LUẬN.....	44

KIẾN NGHỊ	45
TÀI LIỆU THAM KHẢO	46

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ CÁI VIẾT TẮT

BVTV	Bảo vệ thực vật
CSB	Chỉ số bệnh
CTAB	Cetyltrimethyl ammonium bromide
DNA	Deoxyribonucleic acid
ITS	Internally transcribed spacers
PCR	Phản ứng chuỗi trùng hợp (polymerase chain reaction)
PDA	Potato dextrose agar
Czapek	Potato glucose agar
TE buffer (pH8,0)	Tris acetate EDTA buffer
TLB	Tỉ lệ bệnh
VRL	Vàng rụng lá
VNCCSVN	Viện nghiên cứu cao su Việt Nam
WA	Water agar

DANH MỤC BẢNG

Bảng 3.1. Thành phần bệnh hại trên cây cao su tại Đồng Nai và Gia Lai năm 2024	19
Bảng 3.2. Kết quả phân lập nấm <i>Pestalotiopsis</i> trên cây cao su tại Đồng Nai và Gia Lai	25
Bảng 3.3. Mã GenBank của các loài nấm được sử dụng để so sánh và lập cây phả hệ với trình tự hai chủng nấm ĐN1 và GL1 gây bệnh rụng lá cao su trong nghiên cứu này	31
Bảng 3.4. Khả năng sinh trưởng và phát triển của chủng nấm <i>Neopestalotiopsis saprophytica</i> ĐN1 trên các môi trường dinh dưỡng	38
Bảng 3.5. Khả năng sinh trưởng và phát triển của chủng nấm <i>Neopestalotiopsis saprophytica</i> ĐN1 trên các mức nhiệt độ khác nhau	40
Bảng 3.6. Khả năng sinh trưởng và phát triển của nấm <i>Neopestalotiopsis saprophytica</i> chủng ĐN1 trên môi trường PDA ở các mức pH khác nhau	42

DANH MỤC HÌNH ẢNH

Hình 3.1. Triệu chứng bệnh rụng lá trên cây cao su ghi nhận tại Đồng Nai và Gia Lai, Việt Nam.....	23
Hình 3.2. Triệu chứng bệnh rụng lá trên cây cao su ghi nhận do nấm <i>Pestalotiopsis</i> sp. tại Indonesia (Damiri và cs., 2022)	24
Hình 3.3. Triệu chứng bệnh rụng lá trên cây cao su ghi nhận do nấm <i>Neopestalotiopsis saprophytica</i> tại Indonesia (Pornsuriya và cs., 2020) ...	24
Hình 3.4. Triệu chứng bệnh rụng lá trên cây cao su ghi nhận do nấm <i>Neopestalotiopsis</i> sp. tại Thái Lan (Pornsuriya và cs., 2020)	24
Hình 3.5. Triệu chứng bệnh trên lá (có sát thương) sau 7 ngày lây nhiễm	27
Hình 3.6. Triệu chứng bệnh lây nhiễm trên cây sau 7 ngày lây nhiễm.....	27
Hình 3.7. Đặc điểm hình thái của 2 chủng nấm ĐN1, GL1.	28
Hình 3.8. Kết quả so sánh trình tự của hai chủng ĐN1 và GL1	Error! Bookmark not defined.
Hình 3.9. So sánh trình tự chủng nấm ĐN1 và GL1 với dữ liệu Ngân hàng gen.....	32
Hình 3.10. Phân tích cây phả hệ dựa trên trình tự vùng ITS của mẫu nấm gây bệnh rụng lá cao su và các loài nấm đã được công bố trên Genbank gây bệnh trên các loại cây trồng khác	36
Hình 3.11. Biểu đồ biểu thị khả năng sinh trưởng và phát triển của chủng nấm <i>Neopestalotiopsis saprophytica</i> ĐN1 trên các môi trường dinh dưỡng	39
Hình 3.12. Khả năng sinh trưởng và phát triển của nấm <i>Neopestalotiopsis saprophytica</i> ĐN1 trên các môi trường dinh dưỡng khác nhau	39
Hình 3.13. Biểu đồ biểu thị khả năng sinh trưởng và phát triển của chủng nấm <i>Neopestalotiopsis saprophytica</i> ĐN1 trên các mức nhiệt độ khác nhau	40
Hình 3.14. Hình ảnh khả năng sinh trưởng và phát triển của chủng nấm <i>Neopestalotiopsis saprophytica</i> chủng ĐN1 trên môi trường PDA ở các mức nhiệt độ khác nhau sau 7 ngày nuôi cấy	41
Hình 3.15. Biểu đồ biểu thị khả năng sinh trưởng và phát triển của nấm <i>Neopestalotiopsis saprophytica</i> chủng ĐN1 trên môi trường PDA ở các mức pH khác nhau	42
Hình 3.16. Hình ảnh khả năng sinh trưởng và phát triển chủng nấm <i>Neopestalotiopsis saprophytica</i> chủng ĐN1 trên môi trường PDA ở các	

mức pH khác nhau sau 7 ngày nuôi cấy 43

MỞ ĐẦU

Cây cao su (*Hevea brasiliensis*) là cây trồng có giá trị, được canh tác trên toàn cầu để sản xuất cao su tự nhiên [1]. Cây cao su phát triển tốt ở vùng khí hậu nhiệt đới với nhiệt độ trung bình 28°C và lượng mưa hàng năm phân bố đều từ 1.500 – 4.000 mm [2]. Với điều kiện khí hậu thuận lợi, các nước Đông Á và Đông Nam Á trở thành các nước sản xuất cao su chiếm ưu thế. Hiện tại, các quốc gia sản xuất cao su chính bao gồm Thái Lan, Indonesia, Việt Nam, Malaysia, Trung Quốc, Ấn Độ và Bờ Biển Ngà, chiếm hơn 90% sản lượng cao su toàn cầu [3]. Hơn 60% cao su thiên nhiên được tiêu thụ trong ngành công nghiệp ô tô, đặc biệt là sản xuất lốp xe [4], trong đó Trung Quốc chiếm lĩnh 18% thị trường [5]. Giai đoạn 1990 đến 2019, sản lượng cao su toàn cầu có sự phát triển đáng kinh ngạc với mức tăng trưởng trung bình 3%/năm, từ 0,5 tỷ tấn lên 1,4 tỷ tấn [6].

Trong những năm gần đây, cùng với sự thay đổi cơ cấu giống cây trồng kết hợp với biến đổi khí hậu. Nhiều giống cao su cho năng suất mủ cao, tuy nhiên lại khá mẫn cảm với điều kiện ngoại cảnh, khả năng chống chịu sâu bệnh kém. Chính vì vậy, một số dịch hại mới liên tục phát sinh và gây hại gây ảnh hưởng đến năng suất mủ cao su. Giá thành mủ cao su đã giảm đi đáng kể trong mấy năm qua đã làm cho các doanh nghiệp cao su, tiểu điền cao su chưa thực sự quan tâm và đầu tư vào công tác chăm sóc, lựa chọn chế phẩm sinh học, thời điểm hay chủng loại thuốc bảo vệ thực vật trong phòng chống bệnh.

Bệnh rụng lá Pestalotiopsis trên cây cao su được ghi nhận lần đầu tiên vào năm 2021, cho đến nay đã có 13.450 ha cao su bị nhiễm bệnh ở các tỉnh miền Đông Nam Bộ và Tây Nguyên và có nguy cơ lây lan ra khắp nước. Bệnh phát triển mạnh trong mùa mưa đặc biệt là mưa dầm và kéo dài liên nhiều ngày khi đó khó khăn trong việc phun thuốc phòng trừ. Mặt khác bệnh rụng lá Pestalotiopsis gây hại chủ yếu trên lá đã thuần thực, cây cao su giai đoạn kinh doanh có chiều cao 15-20 m. Vì vậy, lựa chọn được phương pháp phun rải thuốc, thời điểm phun thuốc là khó khăn để quản lý bệnh.

Hiện nay đã có nhiều công trình nghiên cứu trên thế giới về xác định tác nhân gây rụng lá Pestalotiopsis bệnh trên cao su ở một số nước như Thái Lan, Indonesia, Trung Quốc, Ấn Độ, Sri Lanka ... cũng như một số biện pháp, chủng loại hoạt chất trong phòng trừ. Việc kế thừa các kết quả nghiên cứu trên thế

giới sẽ giúp nhóm nghiên cứu đề tài rút ngắn thời gian nghiên cứu, kế thừa và lựa chọn vấn đề nghiên cứu phù hợp với điều kiện canh tác cao su tại Việt Nam.

Viện Bảo vệ thực vật là viện nghiên cứu chuyên ngành, Viện đã chủ động phối hợp cùng Viện nghiên cứu Cao su Việt Nam là nơi có nhiều kinh nghiệm trong nghiên cứu bệnh hại cao su. Các phương pháp nghiên cứu hiện đại như sử dụng công nghệ sinh học trong giải trình tự nấm *Pestalotiopsis* gây bệnh kết hợp với phương pháp truyền thống như lây bệnh nhân tạo tuân thủ nguyên tắc Koch để xác định chính xác tác nhân gây bệnh đến loài. Từ đó có thể xác định chủng loại hoạt chất, biện pháp phòng chống có hiệu quả nhất.

Đề tài tập trung nghiên cứu, kế thừa có chọn lọc các kết quả nghiên cứu trước đây về cây cao su như: *Nghiên cứu giải pháp khoa học công nghệ để quản lý tổng hợp bệnh vàng rụng lá cao su tại Đông Nam Bộ*, và các nghiên cứu khác về quản lý bệnh hại lá trên cây cao su để tránh lặp lại các nghiên cứu khác không có hiệu quả và cần thiết. Từ đó sẽ thiết lập các nghiên cứu có triển vọng, sát với thực tiễn sản xuất và có thể dễ dàng áp dụng vào sản xuất cao su tại Việt Nam nói chung và các tỉnh miền Đông Nam Bộ nói riêng.

1. Mục đích nghiên cứu

Xác định loài nấm *Pestalotiopsis* gây bệnh rụng lá cao su bằng phương pháp hình thái và sinh học phân tử.

2. Nội dung nghiên cứu

- Điều tra thu thập, đánh giá hiện trạng, sự phân bố và mức độ gây hại của bệnh rụng lá *Pestalotiopsis* tại một số vùng trồng chính của Việt Nam
- Nghiên cứu đặc điểm sinh học, sinh thái của nấm gây bệnh rụng lá *Pestalotiopsis* trên cây cao su tại Việt Nam
- Xác định đặc điểm phân tử của loài nấm gây bệnh rụng *Pestalotiopsis* lá cao su.

3. Cơ sở khoa học và thực tiễn của đề tài

Trong những năm gần đây, cùng với sự thay đổi cơ cấu giống cây trồng kết hợp với biến đổi khí hậu. Nhiều giống cao su cho năng suất mủ cao, tuy nhiên lại khá mẫn cảm với điều kiện ngoại cảnh, khả năng chống chịu sâu bệnh kém. Chính vì vậy, một số dịch hại mới liên tục phát sinh và gây hại gây ảnh hưởng đến năng suất mủ cao su. Giá thành mủ cao su đã giảm đi đáng kể trong

mấy năm qua đã làm cho các doanh nghiệp cao su, tiểu điền cao su chưa thực sự quan tâm và đầu tư vào công tác chăm sóc, lựa chọn chế phẩm sinh học, thời điểm hay chủng loại thuốc bảo vệ thực vật trong phòng chống bệnh.

Bệnh rụng lá Pestalotiopsis trên cây cao su được ghi nhận lần đầu tiên vào năm 2021, cho đến nay đã có 13.450 ha cao su bị nhiễm bệnh ở các tỉnh miền Đông Nam Bộ và Tây Nguyên và có nguy cơ lây lan ra khắp nước. Bệnh phát triển mạnh trong mùa mưa đặc biệt là mưa dầm và kéo dài liên nhiều ngày khi đó khó khăn trong việc phun thuốc phòng trừ. Hiện nay đã có nhiều công trình nghiên cứu trên thế giới về xác định tác nhân gây rụng lá Pestalotiopsis bệnh trên cao su ở một số nước như Thái Lan, Indonesia, Trung Quốc, Ấn Độ, Sri Lanka ... cũng như một số biện pháp, chủng loại hoạt chất trong phòng trừ. Việc kế thừa các kết quả nghiên cứu trên thế giới sẽ giúp nhóm nghiên cứu đề tài rút ngắn thời gian nghiên cứu, kế thừa và lựa chọn vấn đề nghiên cứu phù hợp với điều kiện canh tác cao su tại Việt Nam.

Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. TỔNG QUAN VỀ CÂY CAO SU VÀ BỆNH HẠI CÂY CAO SU

1.1.1. Tình hình sản xuất cao su trên thế giới

Hiện tại, các quốc gia sản xuất cao su chính bao gồm Thái Lan, Indonesia, Việt Nam, Malaysia, Trung Quốc, Ấn Độ và Bờ Biển Ngà, chiếm hơn 90% sản lượng cao su toàn cầu [3]. Hơn 60% cao su thiên nhiên được tiêu thụ trong ngành công nghiệp ô tô, đặc biệt là sản xuất lốp xe [5], trong đó Trung Quốc chiếm lĩnh 18% thị trường [3]. Giai đoạn 1990 đến 2019, sản lượng cao su toàn cầu có sự phát triển đáng kinh ngạc với mức tăng trưởng trung bình 3%/năm, từ 0,5 tỷ tấn lên 1,4 tỷ tấn [6].

1.1.2. Tình hình sản xuất cao su tại Việt Nam

Cây cao su là cây trồng dài ngày có vị trí quan trọng trong ngành nông nghiệp Việt Nam, được xác định là cây đa mục đích có thể sử dụng cho mục đích nông nghiệp và lâm nghiệp theo quyết định số 2855/QĐ-BNN-KHCN của Bộ NN và PTNT. Ngoài khả năng cho khai thác nhựa liên tục từ 25-30 năm, cây cao su cho khai thác gỗ sản xuất sản phẩm mộc dân dụng và xuất khẩu. Hơn nữa, rừng cao su còn có tác dụng phủ xanh đất trống đồi trọc, có tác động tích cực đến bảo vệ môi trường và cân bằng sinh thái nói chung. Theo GS. Vương Văn Quỳnh, rừng cao su với lượng sinh khối hàng trăm mét khối trên mỗi hecta có tác động tích cực đến bảo vệ môi trường và cân bằng sinh thái nói chung, nên trong lâm nghiệp cây cao su được xem là loài cây rừng đa mục đích, nhiều tính tính diện tích rừng cao su là diện tích rừng, thậm chí còn xem là diện tích được chi trả tiền dịch vụ môi trường rừng. Trong chương trình kiểm kê rừng quốc gia người ta tính diện tích cao su là diện tích rừng [7].

Năm 2022, tổng diện tích trồng cao su ở Việt nam là khoảng 745.000 ha, năng suất mù bình quân đạt 1.791 kg/ha/năm, cho sản lượng gần 1,3 triệu tấn (Hiệp hội Cao su Việt Nam, 2022). Đông Nam Bộ là vùng có diện tích cao su lớn nhất chiếm gần 60% diện tích, 3 tỉnh có diện tích đứng đầu là Bình Dương (gần 250 nghìn ha), kế tiếp là Bình Dương và Tây Ninh. Ở Tây Nguyên, cả 5 tỉnh đều trồng cao su, trong đó Gia Lai có diện tích lớn nhất vùng, hơn 100 ha đứng thứ 4 cả nước. Hiện nay, cao su Việt nam đã được xuất khẩu đi hơn 80 quốc gia và vùng lãnh thổ. Theo thống kê của Hải quan Việt Nam, năm 2022, kim ngạch xuất khẩu toàn ngành cao su đạt 3,3 tỉ USD đứng thứ 3 toàn cầu về

giá trị xuất khẩu. Hai thị trường nhập khẩu cao su chính của nước ta là Trung Quốc và Ấn Độ, lần lượt chiếm 70,2% và 6,2% trong tổng giá trị xuất khẩu của cả nước. Tuy nhiên, hơn 50% diện tích cao su ở Việt Nam là cao su tiêu điền, điều này gây khó khăn trong việc quản lý dịch bệnh cũng như áp dụng các biện pháp phòng trừ sâu bệnh hại và dập dịch khi phát sinh dịch bệnh xuất hiện.

1.1.3. Một số nghiên cứu bệnh hại trên cây cao su

Các đồn điền cao su phải đối mặt với nhiều bệnh gây ảnh hưởng đến cả chất lượng và sản lượng cao su. Gần đây, các bệnh do nấm gây ra trên cao su được ghi nhận trên toàn thế giới, đặc biệt ở các nước vùng nhiệt đới, nơi sản xuất phần lớn cao su cho thế giới.

Một số loài nấm gây bệnh được phát hiện gần đây như *Fusarium oxysporum* gây thối thân ở Trung Quốc [8], *Alternaria alternata* gây đốm đen lá [9], *Bipolaris bicolor* và *Lasiodiplodia pseudotheobromae* được ghi nhận gây bệnh đốm lá [10] và *Neofusicoccum ribis* gây bệnh cháy lá [11]. Đặc biệt, một trong những bệnh gây thiệt hại nặng nhất cho các vườn cao su là bệnh rụng lá. Nhiều loài nấm được xác định gây nên bệnh rụng lá như *Corynespora cassiicola* [12], *Phytophthora botryosam*, *P. palmivora*, *P. citrophthora* [13], *Colletotrichum gloeosporioides* và *Oidium heveae*, *Phyllosticta capitalensis* [14]. Tuy nhiên, những tác nhân này gây ra triệu chứng bệnh khác nhau. Cụ thể, nấm *Phytophthora* gây chảy mủ ở vết bệnh trên cuống lá [15]. *Colletotrichum* làm lá cao su xoắn lại và chết ở đầu lá. Nhiễm *Corynespora* trên lá xuất hiện đốm như vây cá, lá đổi màu từ vàng sang nâu rồi rụng. Nấm *Oidium heveae* tấn công lá cao su tạo nên lớp phấn màu trắng chứa bào tử nấm trên phiến lá, khiến lá bị khô và rụng [16].

Việt Nam đã ghi nhận 19 bệnh hại và 13 loài sâu hại phổ biến trên cây cao su. Các bệnh quan trọng gồm bệnh phấn trắng (*Oidium heveae*), héo đen đầu lá (*Colletotrichum gloeosporioides*), rụng lá mùa mưa (*Phytophthora palmivora* và *P. botryosa*), phấn hồng (*Corticium salmonicolor*), loét sọc mặt cạo (*P. palmivora* và *P. botryosa*), nứt vỏ (*Botryodiplodia theobromae*), và bệnh vàng rụng lá *Corynespora* (*Corynespora cassiicola*).

Bệnh nứt vỏ do nấm *Botryodiplodia theobromae*

Bệnh lần đầu bùng phát ở Việt Nam vào năm 1998, gây thiệt hại lớn trên cây cao su, đặc biệt trong mùa mưa từ tháng 6-12. Nấm phát triển mạnh trên vỏ

cây, chồi non, gây khó khăn trong việc bóc vỏ và làm giảm năng suất mủ. Cây ở giai đoạn kiến thiết cơ bản nhiễm bệnh nặng có thể chết trong 3-4 tuần. Bệnh có thể làm vỏ cây bị nứt, dẫn đến tổn thương mô và mạch mủ, giảm sản lượng mủ.

Bệnh phấn trắng do nấm *Oidium heveae* xuất hiện chủ yếu vào tháng 1-3, khi cây cao su tái sinh lá mới trong điều kiện độ ẩm cao và nhiệt độ thấp. Bệnh làm cây rụng lá nhiều lần, khiến cây yếu và kéo dài thời gian nghỉ cạo, giảm năng suất. Nghiên cứu cho thấy sử dụng thuốc Vixazol 275SC kết hợp với chế phẩm gây rụng lá giúp kiểm soát bệnh hiệu quả, nhưng từ năm 2019, hoạt chất carbendazim trong thuốc đã bị cấm. Các hoạt chất thay thế như tebuconazole và azoxystrobin đã chứng minh có hiệu quả trong việc kiểm soát bệnh. Bên cạnh *Oidium heveae*, nấm *Erysiphe quercicola* cũng gây bệnh phấn trắng trên cây cao su, đặc biệt từ tháng 2-5 ở nhiều vùng trồng cao su. Nấm này làm lá biến dạng, xoắn và rụng sớm, ảnh hưởng tới năng suất mủ, có thể giảm tới 30%.

Bệnh rụng lá mùa mưa và loét sọc mặt cạo do nấm *Phytophthora palmivora* và *P. botryosa* gây ra. Bệnh rụng lá mùa mưa thường xuất hiện trên ngọn cây, làm lá rụng và gây khó khăn trong việc tái sinh lá. Nấm cũng tấn công mặt cạo, tạo ra các sọc màu nâu, làm vỏ cây bị thối, chảy mủ và giảm năng suất mủ tới 100%. Phòng bệnh hiệu quả bằng cách cạo đúng kỹ thuật, không cạo khi mặt cạo ướt và xử lý vườn cây trong mùa mưa.

Bệnh vàng rụng lá *Corynespora* lần đầu ghi nhận ở Việt Nam vào năm 1999, gây hại nghiêm trọng ở nhiều khu vực trồng cao su. Bệnh làm lá xoắn, biến dạng và rụng, ảnh hưởng nghiêm trọng đến khả năng quang hợp của cây. Nấm có thể tồn tại trên lá rụng đến 12 tháng, là nguồn lây nhiễm cho mùa vụ sau. Các hoạt chất như hexaconazole và carbendazim có hiệu quả trong việc phòng trừ, tuy nhiên carbendazim đã bị cấm từ năm 2019. Difenoconazole hiện được khuyến cáo thay thế, mang lại hiệu quả cao trong việc phòng ngừa bệnh.

Để phòng trừ bệnh *Corynespora*, cần phun thuốc vào giai đoạn cây ra lá non và đầu mùa mưa. Các biện pháp sinh học như *Bacillus thuringiensis* và *Trichoderma* cũng giúp kiểm soát bệnh. Ngoài ra, vệ sinh vườn cây, thu gom tàn dư cây bệnh và tăng cường bón phân kali giúp cây tăng sức đề kháng và giảm thiệt hại từ bệnh.

Bệnh rụng lá Pestalotiopsis

Lần đầu tiên được ghi nhận sự xuất hiện của bệnh rụng lá *Pestalotiopsis* tại Việt Nam từ tháng 10 năm 2021 tại nông trường Túc Trung, Đồng Nai [27]. Theo kết quả điều tra của Viện Nghiên cứu Cao su Việt Nam, tính đến ngày 31/12/2022, bệnh rụng lá *Pestalotiopsis* được phát hiện trên cây cao su ở Việt Nam tại các tỉnh Đồng Nai, Bình Phước, Tây Ninh, Lâm Đồng, Kon Tum. Tổng diện tích ghi nhận nhiễm bệnh rụng lá *Pestalotiopsis* khoảng gần 13.450 ha, chủ yếu ở mức rất nhẹ - nhẹ (do mới phát sinh dịch bệnh), diện tích nhiễm ở mức trung bình – nặng khoảng 2.382 ha (tỷ lệ 17,7%). Bệnh gây ra các đốm tròn đường kính 3-10 mm trên phiến lá. Các vết bệnh màu nâu sẫm đến đen, hầu như chỉ ghi nhận trên lá trưởng thành, không thấy xuất hiện trên lá non dưới 15 ngày tuổi [27].

Tác nhân gây rụng lá ở Đồng Nai và Bình Phước được giám định do phức hợp nấm *Pestalotiopsis* spp./*Neopestalotiopsis* spp., và *Colletotrichum* spp. gây ra. Kết quả kiểm chứng trong phòng thí nghiệm và điều kiện nhà lưới cho kết quả tương đồng về mức độ gây bệnh của các tác nhân phân lập được. Trong đó, mức độ gây bệnh của các dung dịch bào tử nấm lần lượt giảm dần là dung dịch bào tử 3 loài nấm, dung dịch bào tử *Colletotrichum* sp. và dung dịch *Pestalotiopsis* spp./*Neopestalotiopsis* spp. [27]. Viện Bảo vệ thực vật năm 2021 đã tiến hành giám định mẫu bệnh rụng lá thu thập tại Định Quán (Đồng Nai) và Quảng Ngãi bằng phương pháp phân tích trình tự gen ITS cho kết quả phức hợp nấm *Pestalotiopsis* spp. và *Neopestalotiopsis* spp.

1.1.4. Một số nghiên cứu về biện pháp quản lý tổng hợp bệnh rụng lá cao su

a) Biện pháp canh tác

Hiện nay vẫn chưa có nhiều nghiên cứu về biện pháp phòng trừ bệnh rụng lá trên cây cao su. Ở Ấn Độ, phương pháp bón phân NPK được nghiên cứu trong quản lý tổng hợp bệnh vàng rụng lá *Corynespora*. Kết quả nghiên cứu cho thấy, bón tăng 25% kali giúp giảm tỉ lệ bệnh dưới 30% và hiệu lực cao hơn so với bón tăng cường photpho và ni tơ [28]. Nghiên cứu khác tại Indonesia cho thấy, sử dụng tinh dầu sả java (citronella oil), tinh dầu đinh hương (clove oil), và khói lỏng (liquid smoke) có tác dụng ức chế nấm bệnh vàng rụng lá *Corynespora* tương đương thuốc hóa học (mancozeb). Hai công thức tinh dầu sả java với KCl 312,5 g/cây/năm và tinh dầu đinh hương với KCl 375g/cây/năm

có thể làm giảm khả năng lây lan lên tới 7,33%, ức chế bệnh hơn 90% và duy trì năng suất 94,33%. Ngoài ra, phân kali giúp tăng 22,63% lượng lignin trong lá cao su [29].

b) Biện pháp sinh học

Các nhà khoa học Ấn Độ đã phân lập được vi khuẩn *Alcaligenes* có khả năng ức chế nấm *Phytophthora meadii* gây rụng lá cao su đến 62,5% trong điều kiện phòng thí nghiệm và khả năng giảm kích thước vết bệnh trên lá 43% và 30% tương ứng trên giống RR11 và RRIM 600 [30]. Bên cạnh đó, Manju và cộng sự (2019b) đã phân lập được nấm *Trichoderma viride*, *T. harzianum* và *Pseudomonas fluorescens* cho khả năng ức chế nấm *Corynespora* sp.. Một số dịch chiết tỏi và lá neem cũng cho khả năng ức chế nhưng không hoàn toàn [31].

Đối với bệnh rụng lá do *Phytophthora botryosa*, khả năng phân hủy sinh học của chitosan cho hiệu lực ức chế cao trong điều kiện phòng thí nghiệm, cảnh bào tử vào bào tử nấm *Phytophthora* bị héo quan sát được dưới kính hiển vi điện tử quét. Nghiên cứu khác cho thấy, chitosan có khả năng ức chế phát triển của nấm *P. palmivora* trên môi trường agar đến 91% ở nồng độ 1mg/ml và giảm sự phát triển của vết bệnh. Tuy nhiên, hiệu lực ức chế sự hoại tử vết bệnh suy giảm sau 72 giờ ở điều kiện *in vivo* [16]. Một giải pháp sinh học thay thế cho chitosan trong phòng trừ *P. palmivora* cũng được các nhà khoa học Thái Lan nghiên cứu là dịch chiết rong nâu. Dịch chiết rong nâu có tác dụng kích thích tính kháng trong cây cao su khi nhiễm bệnh. Hiệu lực của dịch chiết là tương đương với thuốc diệt nấm metalaxyl 1% [32].

Hai chủng *Trichoderma harzianum* (KUFA0436 và KUFA0437) được phân lập từ lá cao su khỏe ở Thái Lan cho khả năng đối kháng với nấm *Phytophthora* (tác nhân gây rụng lá cao su) hiệu lực 43-48%, và 30-33% tương ứng với điều kiện nhà lưới và điều kiện đồng ruộng [33].

c) Biện pháp hóa học

Biện pháp hóa học được xem là có hiệu quả nhất trong phòng trừ bệnh thực vật [34]. Hạt nano kẽm oxit (Zinc oxide nanoparticles) được biết là có hoạt tính kháng một số loài nấm gây bệnh. Ngoài ra, salicylic axit có vai trò quan trọng trong bảo vệ cây trồng chống lại sự xâm nhiễm của nhiều tác nhân gây bệnh [35]. Các hoạt chất metalaxyl, carbendazim, sulfur x2 lần nồng độ khuyến

cáo; captan, mancozeb, propineb và salicylic axit nồng độ x0,5 lần nồng độ khuyến cáo có hiệu lực ngăn bào tử nấm nảy mầm. Trong khi đó, chỉ carbendazim, mancozeb, propineb và salicylic axit có hiệu lực ngăn cản sự phát triển của cành bào tử [36]. Khả năng kháng bệnh rụng lá phụ thuộc nhiều vào đặc tính di truyền của các dòng vô tính. Cơ chế kháng bệnh của lá được xác định bởi khả năng ức chế sự lây lan độc tố do nấm bệnh tiết ra [37].

1.2. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU VỀ BỆNH RỤNG LÁ CAO SU PESTALOTIOPSIS

Pestalotiopsis và các chi gần được xem là khả năng gây bệnh yếu [38], phần lớn các mầm bệnh này xâm nhập vào tế vào vật chủ qua các lỗ mở tự nhiên [39]. Các loài *Pestalotiopsis* và *Neopestalotiopsis* được cho rằng chỉ nhiễm cho những cây bị tổn thương vật lý hoặc cây bị stress [40]. Belisario và cộng sự (2020) gần đây đã chỉ ra *Neopestalotiopsis* spp. có thể nhiễm vào cây bạch đàn chỉ bằng phun qua lá mà không cần vết thương.

Ba chi nấm *Neopestalotiopsis*, *Pestalotiopsis* và *Pseudopestalotiopsis* đa dạng về hình thái bào tử [41]. Hình thái nấm *Neopestalotiopsis* khác với các chi nấm khác ở sự tiêu biến không rõ ràng của cuống bào tử và 2 tế bào phía trên có màu đậm hơn tế bào dưới [41]. Kết hợp hai phương pháp hình thái và giải trình tự nucleotide cho khả năng phân biệt các loài nấm khác nhau trong chi này. Phân tích trình tự ba gen internal transcribed spacer (ITS), translation elongation factor (TEF) và β -tubulin (TUB) là các phương pháp được sử dụng để định danh các loài thuộc 2 chi *Pestalotiopsis* và *Neopestalotiopsis* [41].

Bệnh rụng lá *Pestalotiopsis* gây hại nghiêm trọng tới các nước trồng cao su ở châu Á như Thái Lan, Indonesia, Trung Quốc, Malaysia, Ấn Độ và Sri Lanka. Bệnh rụng lá mới này có triệu chứng khác với bệnh rụng lá do các loài nấm khác gây ra.

Bệnh rụng lá *Pestalotiopsis* ở Thái Lan bắt đầu xuất hiện từ khoảng tháng 10-11 năm 2019 được giám định do nấm *Neopestalotiopsis cubana* và *N. formicarum* [36]. Triệu chứng điển hình của bệnh là vết đốm lá màu nâu đậm hoặc nhạt, không có hình dạng nhất định, viền vết đốm có màu đậm hơn. Các ổ bào tử xuất hiện nhưng phân bố không đều, mật độ dày hơn trên vết bệnh lá già [42].

Bệnh rụng lá do *Pestalotiopsis* gần đây phát hiện ở Indonesia đã được

giám định do nấm *Pestalotiopsis microspora* gây ra. Bệnh gây rụng lá sớm trước thời kỳ rụng lá sinh lý của cây cao su. Bệnh lần đầu bùng phát tại Indonesia năm 2016 từ Bắc Sumatra, sau đó lan đến Nam Sumatra năm 2017 đến giữa 2018 [43]. Bệnh gây triệu chứng đốm nâu, và chuyển màu đậm hơn khi bệnh phát triển nặng. Diễn hình, có đường viền bao quanh vết bệnh, ngăn cách giữa với phần lá khỏe. Cây cao su trông khô héo, lá chuyển vàng rồi rụng [44]. Theo số liệu của Tổng cục Trồng trọt Indonesia, tính đến năm 2021, hơn 30 nghìn hecta cao su bị nhiễm nấm và làm giảm sản lượng cao su tới 30%. Nghiên cứu của Alchemi và Jamin (2022) cho thấy mối tương quan chặt chẽ giữa chỉ số bệnh rụng lá *Pestalotiopsis* tăng và chỉ số diện tích lá giảm đáng kể dẫn đến giảm sản lượng mủ [45]. Bệnh gây rụng lá liên tục lên đến 75-90%, dẫn đến tán cây mỏng hơn và sản lượng giảm 25-45% [46].

Bệnh rụng lá *Pestalotiopsis* lần đầu được phát hiện vào khoảng tháng 5-7 năm 2020 trong vườn nhân giống 2 năm tuổi ở đảo Hải Nam, Trung Quốc. Tác nhân gây bệnh được giám định do nấm *Neopestalotiopsis aotearoa* bằng phân tích đặc điểm hình thái kết hợp với giải trình tự ba vùng gen (ITS, TEF và TUB2). Bào tử nấm có hình dạng hơi cong, gồm 4 tế bào, kích thước 18,35 đến 27,12 x 4,11 đến 7,03 μm . Bệnh gây triệu chứng vàng lá, lá chảy nước, vết bệnh màu nâu sẫm, hình tròn đường kính 1-2mm trên phiến lá. Trong điều kiện ẩm độ cao, ở giữa vết bệnh có màu trắng sáng, xuất hiện nhiều chấm đen nhỏ viền đen. Sau đó, lá rụng khi bệnh nặng.

Ở Malaysia, gần đây ghi nhận sự xuất hiện của bệnh gây đốm lá do *Colletotrichum siamense* và *Pestalotiopsis jesteri*. Triệu chứng bệnh là vết đốm tròn hoại tử màu nâu trên phiến lá, tương tự với triệu chứng bệnh rụng lá *Pestalotiopsis* mới phát hiện ở các nước Indonesia, Ấn Độ, Thái Lan, và Sri Lanka [47]. Nghiên cứu cho thấy, cả 2 loài *C. siamense* và *P. jesteri* đều không thể nhiễm vào lá không bị tổn thương trong khoảng thời gian ngắn khi lớp vách tế bào của lá còn nguyên vẹn. Sự căng thẳng sinh học và phi sinh học tạo điều kiện thuận lợi ban đầu cho mầm bệnh xâm nhập vào tế bào. Nghiên cứu của Alysia và cộng sự (2022) cho thấy *C. siamense* là tác nhân chính gây bệnh đốm lá cao su mới ở Malaysia và *P. jesteri* là tác nhân gây bệnh thứ cấp làm tình trạng bệnh nghiêm trọng hơn [47].

Cho đến nay bệnh rụng lá *Pestalotiopsis* trên cây cao su mới xuất hiện từ

năm 2021, tuy nhiên cho đến nay một diện tích rộng lớn 13.450 ha bị nhiễm bệnh. Tỷ lệ nhiễm bệnh không ngừng tăng và chưa có các nghiên cứu chuyên sâu nào về sinh học, sinh thái của bệnh. Nguy cơ bệnh bùng phát trên diện rộng ảnh hưởng đến năng suất mủ và sự phát triển của ngành cao su Việt Nam vẫn tiếp diễn. Hiện nay chưa có bộ giống chống chịu, hay bộ thuốc nào được đăng ký phòng trừ bệnh rụng lá *Pestalotiopsis* trên cây cao su tại Việt Nam. Bệnh gây hại nặng vào mùa mưa và trên lá đã thành thục. Việc nghiên cứu lựa chọn bộ thuốc, thời điểm và phương pháp phun rải thuốc cũng chưa có công trình nào đề cập đến. Do vậy, cần có các nghiên cứu các giải pháp khoa học công nghệ đồng bộ để giải quyết nhu cầu của sản xuất và đạt hiệu quả kinh tế và môi trường là cần thiết.

Bệnh rụng lá *Pestalotiopsis* đã được quan tâm nhưng mới chỉ ở mức độ thông báo và thống kê diện tích. Tuy nhiên chưa có công trình nào đánh giá thiệt hại, quy luật phát sinh cũng như nguyên nhân gây bùng phát bệnh. Chưa có công trình khoa học nào nghiên cứu ứng dụng sinh học phân tử trong việc xác định chính xác các loài nấm gây rụng lá *Pestalotiopsis* trên cao su ở Việt Nam. Hiện tại các phương pháp chẩn đoán chủ yếu dựa vào đặc điểm hình thái và tra cứu tài liệu nước ngoài vì vậy thiếu thực tế và độ chính xác không cao. Việc xác định chính xác tác nhân gây bệnh, phân tích nguyên nhân gây bùng phát dịch bệnh sẽ là cơ sở lý luận vững chắc phục vụ cho việc nghiên cứu các giải pháp quản lý bệnh có hiệu quả. Chưa có bộ giống chống chịu bệnh đề xuất ra sản xuất vì hiện nay một số giống cho năng suất mủ cao nhưng nhiễm nhiều bệnh. Chưa có bộ thuốc BVTV cũng như một số loại chế phẩm sinh học đề xuất sử dụng luân phiên để tránh tính kháng thuốc của nấm, nâng cao hiệu quả phòng trừ bệnh vàng rụng lá. Như vậy, với thực trạng tình hình dịch bệnh như đã phân tích ở trên, việc nghiên cứu tác nhân gây bệnh chính, các đặc tính sinh học và qui luật phát sinh của bệnh, các biện pháp quản lý tổng hợp nhằm hạn chế dịch bệnh cho sản xuất cao su là một nhu cầu cấp bách. Các nội dung nghiên cứu cần thỏa mãn các yêu cầu như xác định được các tác nhân gây bệnh chính, nắm được qui luật phát sinh phát triển bệnh, xác định được đặc điểm sinh học và sinh thái và phạm vi ký chủ của bệnh trên các cây trồng có giá trị kinh tế ở phụ cận, có được phương pháp chẩn đoán nhanh và chính xác tác nhân gây bệnh, đọc trình tự gen của chúng.

Trong những năm gần đây, cùng với sự phát triển của ngành cao su, sự biến đổi khí hậu đã gây ra những dịch hại mới ảnh hưởng không nhỏ đến năng suất mủ cao su như: Bệnh vàng rụng lá cao su do nấm *Corynespora*, bệnh phấn trắng cao su, bệnh loét sọc mặt cao... nhiều chuyên gia về bệnh học cũng dự đoán dịch bệnh trên cao su có thể còn phát triển mạnh hơn nữa do quá trình chuyển đổi cơ cấu giống cây trồng, chế độ dinh dưỡng và biến đổi khí hậu. Bệnh rụng lá rụng lá do nấm *Pestalotiopsis* trên cao su được ghi nhận gần đây, tuy nhiên tốc độ phát triển của bệnh rất nhanh và chưa có dấu hiệu dừng lại. Hiện nay chưa có các công trình nghiên cứu đồng bộ, các quy trình quản lý bệnh có thể áp dụng vào thực tiễn sản xuất.

Tại Việt Nam, hiện chưa có nghiên cứu ứng dụng sinh học phân tử để xác định chính xác các loài nấm gây bệnh rụng lá trên cây cao su. Các phương pháp chẩn đoán hiện tại chủ yếu dựa vào đặc điểm hình thái và tài liệu từ nước ngoài, do đó thiếu tính thực tiễn và độ chính xác không cao. Việc xác định chính xác tác nhân gây bệnh và phân tích nguyên nhân bùng phát dịch bệnh sẽ là nền tảng quan trọng để phát triển các giải pháp quản lý bệnh hiệu quả.

Ngoài ra, chưa có nghiên cứu nào về ký chủ của nấm *Pestalotiopsis* gây rụng lá trên cao su, cũng như chưa có đánh giá về mức độ kháng bệnh của các giống cây, sinh học và sinh thái của bệnh để đưa ra các biện pháp quản lý hợp lý. Vì vậy, cần thiết phải thực hiện một nghiên cứu toàn diện để giải quyết vấn đề bệnh rụng lá *Pestalotiopsis* trên cây cao su một cách cơ bản và hiệu quả. Trong quản lý dịch hại tổng hợp, việc sử dụng giống chống chịu là biện pháp bền vững.

Như vậy, với thực trạng tình hình dịch bệnh như đã phân tích ở trên, việc nghiên cứu tác nhân gây bệnh chính, các đặc tính sinh học và qui luật phát sinh của bệnh, các biện pháp quản lý tổng hợp nhằm hạn chế dịch bệnh cho sản xuất cao su là một nhu cầu cấp bách. Các nội dung nghiên cứu cần thoả mãn các yêu cầu sau:

- Xác định được các tác nhân gây bệnh chính, nắm được qui luật phát sinh phát triển bệnh.
- Có được phương pháp chẩn đoán nhanh và chính xác tác nhân gây bệnh.
- Xác định được đặc điểm sinh học của bệnh trên cây cao su

Viện BVTV cũng đã có kinh nghiệm nghiên cứu 3 đề tài nghiên cứu về

bệnh hại trên cây cao su: Nghiên cứu và quản lý bệnh mất mủ cao su do nấm *Phytophthora* gây ra, nghiên cứu và quản lý bệnh phấn trắng và nấm hồng trên cao su, 2009-2011), nghiên cứu giải pháp khoa học công nghệ để quản lý tổng hợp bệnh vàng rụng lá cao su tại Đông Nam Bộ (2011-2014). Do đó, chúng tôi lựa chọn các biện pháp kỹ thuật đồng bộ như kết hợp công nghệ sinh học hiện đại trong giải trình tự gen vi sinh vật gây bệnh, công nghệ truyền thống lấy bệnh nhân tạo theo nguyên tắc Koch, các nghiên cứu về nâng cao sức khỏe cây cao su để tăng tính chống chịu, nghiên cứu về kỹ thuật, giống chống chịu, các biện pháp phun rải thuốc... để thực hiện trong đề tài này.

Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

- Mẫu bệnh liên quan đến triệu chứng rụng lá trên cây cao su được thu thập tại các vùng trồng cao su ở Đồng Nai và Gia Lai.
- Chủng nấm gây bệnh rụng lá cao su tại Đồng Nai và Gia Lai.
- Hoá chất được dùng cho các thí nghiệm trong nghiên cứu được mua từ các hãng Sigma, Merk.

2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.2.1. Phương pháp điều tra, thu thập mẫu bệnh bệnh rụng lá cao su

Tiến hành điều tra thu thập, đánh giá hiện trạng, sự phân bố và mức độ gây hại của bệnh rụng lá *Pestalotiopsis* tại một số vùng trồng chính của Việt Nam (Tây Nguyên, Đông Nam Bộ) theo phương pháp nghiên cứu BVTV quyển I, II, III ấn hành năm 1997, 1998, Viện Nghiên cứu Cao su và TCVN 13268-3:2021. Điều tra tại xã Suối Tre, huyện Long Khánh, tỉnh Đồng Nai và huyện Chư Prong, tỉnh Gia Lai. Mỗi vườn điều tra 5 điểm trên hai đường chéo góc, mỗi điểm điều tra 3 cây. Sử dụng ống nhòm để quan sát, quan sát từ xa tới gần, sau đó kết hợp điều tra trực tiếp trên cây.

Thu thập tất cả các triệu chứng bệnh hại trên tất cả các bộ phận của cây (trên lá, trên chồi, cuống lá và cành...). Mẫu bệnh được thu thập trên vườn ươm và giai đoạn kinh doanh. Các mẫu được đựng trong các túi đựng mẫu. Sau khi thu thập sẽ mang về giám định tại phòng thí nghiệm tại Viện Bảo vệ thực vật.

Thông tin của mẫu bao gồm:

- + Ngày, địa điểm thu mẫu, tên chủ vườn lấy mẫu
- + Cây trồng (giống, tuổi cây, lịch sử chăm sóc, cây trồng xen...)
- + Bộ phận cây bị hại
- + Điều kiện đất đai (đất đỏ, đất xám, đồng bằng...), các biện pháp quản lý (phân bón, thuốc bảo vệ thực vật và vệ sinh đồng ruộng)
- Thời gian điều tra: Điều tra 1 tháng/lần.
- Số mẫu điều tra:

Điều tra 1 huyện/tỉnh x 2 tỉnh x 1 xã/huyện x 3 vườn/xã x 20 mẫu/vườn = 120 mẫu.

2.2.2. Xác định thành phần và loài nấm chính gây bệnh rụng lá Pestalotiopsis trên cây cao su tại Việt Nam

Các nguồn nấm gây bệnh rụng lá cao su đã thu thập, phân lập và làm thuần, được nuôi cấy trên môi trường PDA, đặt ở điều kiện 25-28⁰C trong 7-10 ngày trong điều kiện ẩm độ >75% để tăng khả năng hình thành bào tử. Dung dịch bào tử của từng nguồn nấm được pha loãng 10⁶ bào tử/ml. Sau đó tiến hành lây bệnh trên lá cắt rời trong điều kiện invitro và trên lá bánh tẻ của cây trong nhà lưới. Theo dõi và ghi nhận sự biểu hiện của từng nguồn bệnh. Theo dõi triệu chứng biểu hiện bệnh của các loại nấm, tái phân lập để xác định chính xác thành phần loài nấm chính gây bệnh rụng lá Pestalotiopsis trên cây cao su.

2.2.3. Phân lập, làm thuần nấm gây bệnh rụng lá cao su

Tổng số mẫu bệnh thu sẽ được phân loại thành từng nhóm triệu chứng khác nhau, phân lập, xử lý để xác định tác nhân gây bệnh bằng việc thực hiện đồng bộ các phương pháp như sau:

** Phương pháp để ẩm:*

Rửa mẫu bệnh sạch đất cát dưới vòi nước sau đó đặt mẫu bệnh vào hộp petri có giấy thấm vô trùng bổ sung nước cất vô trùng để tạo độ ẩm. Sau 1 - 2 ngày, tiến hành quan sát đặc điểm hình thái của nấm mọc ra từ mô bệnh dưới kính lúp soi nổi và kính hiển vi chuyên dụng.

** Phương pháp phân lập tác nhân gây bệnh trực tiếp từ mẫu bệnh:*

Phân lập nấm từ vết bệnh trên lá được thực hiện theo các bước sau: Chọn vết bệnh điển hình, cắt phần lá tiếp giáp giữa mô khỏe và mô bệnh kích thước 0,5 × 0,5cm. Khử trùng bề mặt bằng cồn 70⁰C trong 15 - 20 giây, sau đó rửa sạch bằng nước cất vô trùng. Thấm khô mẫu bệnh bằng giấy thấm vô trùng. Đặt các mảnh mô cây vào môi trường WA (Water agar) chứa kháng sinh. Ấn nhẹ các miếng cấy lên mặt thạch sao cho chúng được giữ trong môi trường phân lập. Đặt đĩa cấy ở nhiệt độ khoảng 25⁰C và quan sát hàng ngày dưới kính lúp soi nổi để kiểm tra nấm mọc từ các mẫu nuôi cấy. Cấy truyền đỉnh sinh trưởng của sợi nấm lên môi trường PDA để làm các nghiên cứu tiếp theo.

** Làm thuần mẫu nấm bằng phương pháp cấy đơn bào tử:*

Tạo dung dịch bào tử bằng cách dùng que cấy lấy một lượng nhỏ sợi nấm trên mặt thạch có lẫn bào tử rồi cho vào ống nghiệm chứa 10ml nước vô

trùng. Lắc ống nghiệm để phân tán các bào tử và kiểm tra mật độ bào tử dưới kính lúp soi nổi. Dịch bào tử được đổ vào đĩa Petri có chứa một lớp mỏng môi trường thạch nước cất. Loại bỏ dịch bào tử thừa từ đĩa Petri đi sau đó để 12-18h cho đến khi bào tử nảy mầm. Dùng que cấy dẹp cất lấy ra từng bào tử nảy mầm và chuyển sang từng đĩa môi trường PDA mới.

** Xác định tác nhân gây bệnh theo nguyên tắc Koch*

Để tuân thủ các bước xác định chính xác tác nhân gây bệnh theo nguyên tắc Koch (Robert Koch, 1884) tiến hành lây nhiễm lại chủng nấm phân lập được từ vết bệnh điển hình lên lá cao su khỏe. Lây bệnh trên lá cao su được tiến hành bằng cả phương pháp lây trên lá cắt rời và trên cây con.

+ Lây trên lá cắt rời: Lá cây cao su dòng vô tính RRIV124 không bị nhiễm bệnh, được rửa sạch bằng thuốc chống mốc sodium benzoate 0,2% trong 30 giây và rửa sạch 3 lần bằng nước cất vô trùng, dùng giấy vô trùng thấm lên lá. Tạo vết thương bằng cách dùng dao mũi mác đã khử trùng cạo bỏ lớp biểu bì trên mặt sau của lá, vết xước có dạng đốm tròn đường kính 2mm nằm giữa 2 gân phụ của lá. Mỗi bên gân chính của lá tạo 4 vết. Đặt lá theo chiều úp vào hộp nhựa có chứa giấy thấm nước vô trùng. Lây bệnh bằng cách nhỏ 1 lượng dịch chứa bào tử 1×10^6 bào tử/ml tại vị trí đã tạo vết thương. Đặt hộp trong phòng nhiệt độ 25-28°C. Theo dõi biểu hiện của triệu chứng bệnh sau đó tái phân lập vết bệnh trên môi trường PDA. Mô tả triệu chứng và nhận dạng chi tiết mẫu (27).

+ Lây trên lá cao su của cây con: Lá cao su bánh tẻ của cây đã thành thực được lây bệnh bằng cách phun dịch bào tử 1×10^6 bào tử/ml lên cả hai bề mặt lá. Đặt cây đã lây bệnh trong điều kiện nhà kính với nhiệt độ 25-28°C, độ ẩm >75% để tăng khả năng hình thành bào tử. Quan sát biểu hiện của triệu chứng bệnh.

2.2.4. Định danh loài nấm gây bệnh rụng lá trên cây cao su

2.2.4.1. Định danh bằng phương pháp hình thái học

Đặc điểm hình thái của nấm gây bệnh rụng lá *Pestalotiopsis* sau đó được phân loại dựa theo khóa phân loại của Steyaert năm 1949 thực hiện bao gồm hình thái học, cơ quan sinh sản, dạng bào tử, đặc điểm sinh học, tốc độ phát triển, khả năng sinh bào tử để phân loại nấm. Tiến hành làm tiêu bản lam để lưu giữ các loài nấm đã được phân loại.

2.2.4.2. Định danh dựa trên kỹ thuật phân tử

Để xác định tác nhân gây bệnh rụng lá trên cao su. Nấm gây bệnh được nuôi cấy trên môi trường PDA sau 48 giờ. DNA được tách chiết từ sợi nấm được thực hiện theo phương pháp (Saitoh và cộng sự, 2006). Vùng ITS, ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') và ITS5 (5 TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') (White và cộng sự, 1990), sử dụng máy Eppendorf Mastercylers X50s. Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng cách điện di trên gel agarose 1% trong dung dịch 1×TAE buffer có chứa dung dịch nhuộm Redsafe và chụp ảnh bằng máy Gel Doc™ XR+ System. Sản phẩm PCR được tinh sạch từ agarose gel sử dụng Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Mỹ) và được giải trình tự gen trực tiếp cả hai chiều bằng các môi sử dụng trong phản ứng PCR tương ứng trên máy ABI3100 sử dụng BigDye Terminator 3.1 Kit (Applied Biotech). Trình tự các mẫu được so sánh với Ngân hàng Gen bằng phần mềm trực tuyến <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (Altschul và cộng sự, 1990). Cây phả hệ xây dựng theo phương pháp Maximum parsimony (Farris, 1970).

2.2.5. Nghiên cứu đặc điểm sinh học của loài nấm gây bệnh rụng lá trên cây cao su

2.2.5.1. Nghiên cứu khả năng sinh trưởng và phát triển của nấm trên các môi trường dinh dưỡng khác nhau

Sau khi đã xác định được loài nấm gây bệnh từ kết quả của Công việc 2.1.1 tiến hành nghiên cứu, đánh giá khả năng sinh trưởng và phát triển của các nguồn nấm được làm thuần và nuôi cấy trên 4 loại môi trường nhân tạo: WA (Water Agar), PDA (Potato Dextrose Agar), CDA (Czapek Dox Agar) và môi trường có chứa dịch chiết lá cao su (lá cao su – Agar). Mỗi loài nấm được đánh giá trên cả 4 loại môi trường, mỗi loại môi trường là một công thức thí nghiệm, được nhắc lại 5 lần (1 đĩa petri/lần nhắc lại). Hàng ngày, đo đường kính tán nấm sau khi cấy 1, 3, 5, và 7 ngày nuôi cấy ở điều kiện nhiệt độ phòng (khoảng 28°C).

* Chỉ tiêu theo dõi: Đường kính tán nấm, tốc độ phát triển của nấm (mm/giờ) và khả năng hình thành bào tử.

2.2.5.2. Nghiên cứu khả năng sinh trưởng và phát triển của nấm ở các mức nhiệt độ khác nhau

Các nguồn nấm sau khi phân lập, làm thuần trên môi trường WA, được

tiến hành nuôi cấy trên môi trường đĩa Petri ($\Phi = 9$ cm) chứa môi trường. Thí nghiệm gồm 5 lần nhắc lại, mỗi lần 1 đĩa Petri. Thí nghiệm được đặt trong tủ định ôn ở các điều kiện nhiệt độ 10, 15, 20, 25, 28, 30, 35 và 40°C. Hàng ngày, đo đường kính tản nấm sau khi cấy 1, 3, 5, và 7 ngày nuôi cấy.

Chỉ tiêu theo dõi: Đường kính tản nấm, tốc độ phát triển của nấm (mm/giờ) và khả năng hình thành bào tử.

2.2.5.3. Nghiên cứu khả năng sinh trưởng và phát triển của nấm ở các mức pH khác nhau trên môi trường dinh dưỡng

Từ thí nghiệm ở trên, chọn mức nhiệt độ phù hợp nhất đối với sự phát triển của nấm và đánh giá ảnh hưởng của các điều kiện pH: 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 và 8,0 của môi trường (sẽ được lựa chọn từ Công việc 2.2.1). Hàng ngày, đo đường kính tản nấm sau khi cấy 1, 3, 5, và 7 ngày nuôi cấy ở điều kiện nhiệt độ

Chỉ tiêu theo dõi: Đường kính tản nấm, tốc độ phát triển của nấm (mm/giờ) và khả năng hình thành bào tử.

Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả điều tra thành phần bệnh trên cây cao su

Cây cao su chủ yếu được trồng ở các tỉnh Đông Nam Bộ như Đồng Nai, Bình Dương, Bình Phước, Tây Ninh, Vũng Tàu, và vùng Tây Nguyên như Kon Tum và Gia Lai. Tuy nhiên, trong những năm gần đây, ngành sản xuất cao su đang đối mặt với nhiều bệnh hại nghiêm trọng, ảnh hưởng trực tiếp đến chất lượng và sản lượng mủ. Đặc biệt, sự gia tăng các bệnh do nấm gây ra trên cây cao su đã được ghi nhận nhiều ở các vùng nhiệt đới.

Để hiểu rõ hơn về tình trạng này, chúng tôi đã tiến hành điều tra thành phần bệnh hại phổ biến trên cây cao su tại Gia Lai và Đồng Nai. Kết quả thu được, như được trình bày trong bảng 3.1, cho thấy các bệnh do nấm gây ra đang phổ biến và có ảnh hưởng nghiêm trọng đến cây cao su ở hai tỉnh này.

Bảng 3.1. Thành phần bệnh hại trên cây cao su tại Đồng Nai và Gia Lai năm 2024

Tên bệnh	Triệu chứng	Tác nhân gây bệnh	Tần xuất bất gặp
Đốm đen trên lá	Các đốm bệnh có kích thước nhỏ xuất hiện rải rác trên bề mặt lá, có thể liên kết với nhau tạo thành các mảng cháy lớn gây vàng lá và cháy lá	<i>Alternaria sp.</i>	++
Đốm lá	Trên lá xuất hiện các đốm bệnh màu vàng đến nâu đen có kích thước khác nhau, không có quầng vàng.	<i>Bipolaris sp.</i>	+++
		<i>Lasiodiplodia sp.</i>	
Bạc lá	Trên lá xuất hiện các đốm bệnh lớn, màu bạc, có thể gây thủng lá, các vết đốm không có quầng vàng, bên	<i>Neofusicoccum sp.</i>	+

	trong vết bệnh có các ổ bào tử màu đen		
Rụng lá	Trên lá vết bệnh màu đen hình xương cá chạy dọc theo gân lá. Vết bệnh lan rộng gây chết từng phần lá, sau đó toàn bộ lá đổi màu vàng cam và rụng hàng loạt. Trên chồi và cuống lá có các vết nứt dạng hình thoi, có mũ rỉ ra sau đó hóa đen.	<i>Corynespora sp.</i>	++
	Trên cuống lá bị rụng có một hoặc nhiều cục mũ trắng. Nấm có thể gây chết cây con ở vườn nhân giống. Lá có những đốm tròn, màu bạc ở giữa, quầng vàng, các đốm liên kết với nhau gây cháy lá. Các ổ bào tử đen xuất hiện dày đặc trên vùng đốm. Vườn bị bệnh rụng 50% - 90% tán lá.	<i>Phytophthora spp.</i>	+++
		<i>Pestalotiopsis sp.</i>	++++
Phân trắng	Bệnh hại nặng ở giai đoạn cây ra lá mới, có thể gây rụng lá hàng loạt trên cây non, và cây trưởng thành trong điều kiện thời tiết lạnh và có sương mù. Lá không bị rụng có các vết bệnh có nhiều dạng loang	<i>Oidium sp.</i>	+

	lỗ khác nhau thậm chí toàn bộ phiến lá bị biến dạng và chuyển qua màu vàng nhạt, trên các vết bệnh sinh ra lớp bột màu trắng như phấn, cây sinh trưởng kém, hoa bị bệnh thì nhỏ hoặc thối rụng.		
Thán thư	Nấm bệnh gây hại lá non và chồi non, dẫn đến lá khô, rụng lá non dưới hai tuần tuổi. Lá già méo mó, mặt lá gò ghề. Bệnh gây khô ngọn non, khô cành từng phần hoặc chết cả cây.	<i>Colletotrichum sp.</i>	+++

Ghi chú: +: <10% cây bị bệnh (Không phổ biến). ++: 11 – 25% cây bị bệnh: Ít phổ biến. +++: 26 - 50% cây bị bệnh (Phổ biến). ++++: > 50% cây bị bệnh (Rất phổ biến).

3.2. Kết quả phân lập, làm thuần tác nhân gây bệnh rụng lá cao su

3.2.1. Triệu chứng bệnh

Bệnh rụng lá cao su có thể xuất hiện ở tất cả các giai đoạn sinh trưởng và trên tất cả các bộ phận của cây như cuống lá, chồi non, cành, quả, hạt. Triệu chứng chung ban đầu của bệnh rụng lá gây ra do nấm *Pestalotiopsis* là những đốm nhỏ màu nâu sẫm với quầng sáng màu vàng, sau đó vết bệnh trở thành những đốm tròn màu nâu sáng. Các đốm bệnh khác nhau về kích thước, có thể nằm riêng lẻ hoặc liên kết với nhau để tạo thành đốm lớn hơn gây ra triệu chứng nặng trên lá trên một số giống mẫn cảm làm lá biến vàng sau đó gây rụng từ 50% đến 90% lá trên cây, ảnh hưởng lớn đến chất lượng và sản lượng mủ.

Trên vườn ương:

Triệu chứng phổ biến của bệnh là các đốm tròn trên lá có đường kính từ 1- 3mm nằm rải rác khắp phiến lá, gân chính. Tâm vết đốm có màu xám bạc,

mỏng, đôi khi hình thành các lỗ thủng, viền vết bệnh màu vàng hoặc nâu tối. Các vết đốm có thể gây ra rách lá hoặc làm lá biến dạng. Lá non bị rụng ở giai đoạn bệnh nặng.

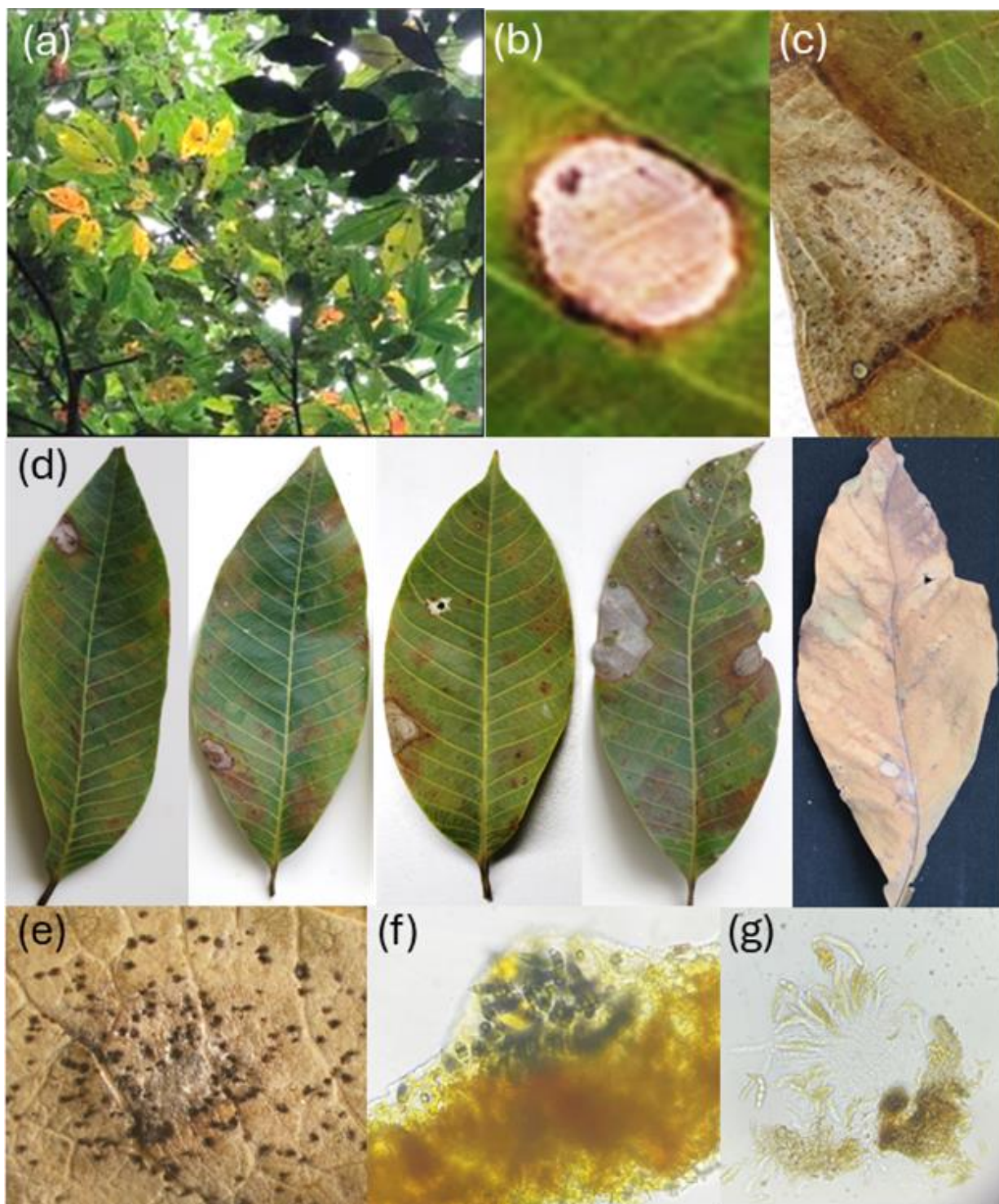
Trên vườn khai thác:

Trên lá: xuất hiện các vết đen có hình dạng như xương cá dọc theo các gân lá. Trong điều kiện thuận lợi, các vết bệnh có thể mở rộng, dẫn đến việc lá bị héo và chuyển màu vàng, cuối cùng rụng do sự hư hỏng của lục lạp. Triệu chứng điển hình của bệnh là các vết bệnh trên lá có dạng đốm hình tròn, màu từ xám đến nâu xám, với viền vàng xung quanh, vết bệnh có thể xuất hiện lỗ thủng nhỏ ở tâm. Bằng mắt thường có thể quan sát thấy có các ổ màu đen mọc rải rác quanh vết bệnh.

Trên cuống lá và chồi: Các vết bệnh trên cuống lá và chồi thường có hình dạng đốm hình thoi, màu nâu đen, tâm vết bệnh màu nâu xám. Trên cuống lá, vết nứt màu đen có kích thước từ 0,5 đến 3 mm, kéo dài dọc theo cuống. Các cây bị nhiễm bệnh thường có tán lá thưa thớt, còi cọc, với nhiều cành nhánh bị chết, và trên mặt đất phủ đầy lá rụng với các vết đốm trên mặt lá.

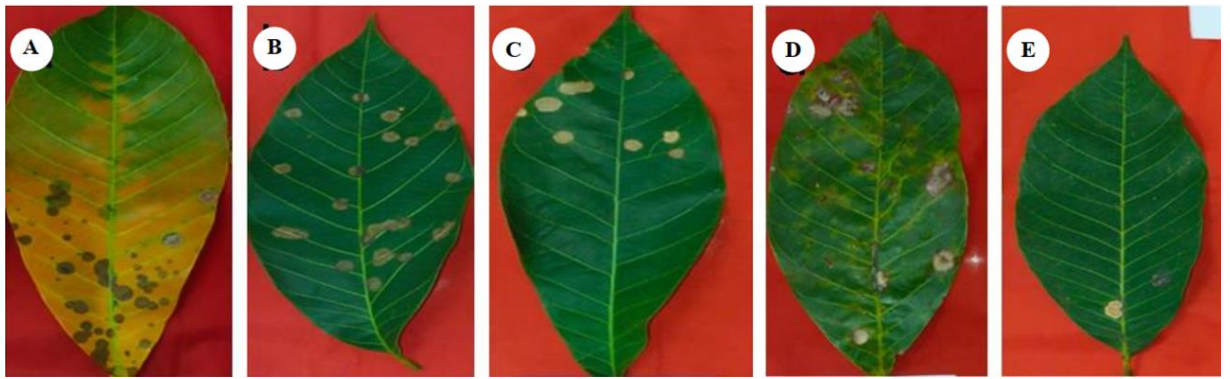
Các nghiên cứu gần đây về bệnh rụng lá cao su tại Việt Nam và các nước trong khu vực cho thấy có sự tương đồng đáng kể về triệu chứng, tác nhân gây bệnh, và điều kiện phát sinh bệnh. Sự giống nhau về tác nhân gây bệnh: Các nghiên cứu tại Indonesia, Thái Lan, và Trung Quốc đều ghi nhận các loài nấm thuộc chi *Pestalotiopsis* là tác nhân chính gây bệnh rụng lá cao su. Cụ thể:

- Tại Indonesia, *Pestalotiopsis* sp. và *Neopestalotiopsis saprophytica* được ghi nhận gây ra triệu chứng rụng lá tương tự với các triệu chứng ở Việt Nam.
- Tại Thái Lan, loài *Neopestalotiopsis* sp. cũng là tác nhân gây bệnh.
- Tại Trung Quốc, nghiên cứu của Li và cộng sự năm 2021 ghi nhận loài *Neopestalotiopsis aotearoa* là nguyên nhân gây bệnh.

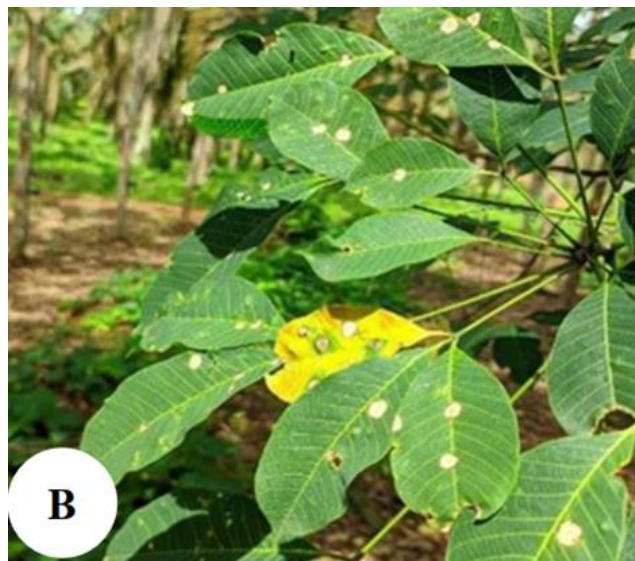


Hình 3.1. Triệu chứng bệnh rụng lá trên cây cao su ghi nhận tại huyện Long Thành tỉnh Đồng Nai và huyện Chư Prong Gia Lai

Tán lá mang triệu chứng (a), đốm lá (b, c), triệu chứng bệnh trên lá (d), ổ bào tử trên vết đốm (e), lát cắt ổ bào tử (f), bào tử túi của nấm gây bệnh (g)



Hình 3.2. Triệu chứng bệnh rụng lá trên cây cao su ghi nhận do nấm *Pestalotiopsis* sp. tại Indonesia (Damiri và cs., 2022)



Hình 3.3. Triệu chứng bệnh rụng lá trên cây cao su ghi nhận do nấm *Neopestalotiopsis saprophytica* tại Indonesia (Pornsuriya và cs., 2020)



Hình 3.4. Triệu chứng bệnh rụng lá trên cây cao su ghi nhận do nấm *Neopestalotiopsis* sp. tại Thái Lan (Pornsuriya và cs., 2020)

Triệu chứng bệnh: Các triệu chứng rụng lá do *Pestalotiopsis* ở các quốc gia này đều có đặc điểm chung:

- Xuất hiện các đốm tròn, từ màu nâu sẫm đến xám bạc, thường có viền vàng xung quanh.
- Các đốm bệnh này dễ phát triển thành các vết bệnh lớn hơn khi gặp điều kiện thuận lợi, gây biến dạng và rụng lá.
- Ở các giai đoạn nặng, lá cây bị vàng, khô, dẫn đến rụng từ 50% đến 90%, gây thiệt hại lớn đến năng suất và chất lượng mủ.

Các nghiên cứu cho thấy điều kiện môi trường ẩm ướt và nhiệt đới như ở các nước Đông Nam Á tạo điều kiện thuận lợi cho sự phát triển của các loài nấm này, góp phần làm gia tăng tình trạng bệnh.

Mặc dù có sự tương đồng chung, nhưng các loài nấm *Pestalotiopsis* khác nhau được ghi nhận tại từng quốc gia, cho thấy có sự đa dạng về tác nhân gây bệnh trong cùng một chi nấm. Điều này có thể do các đặc trưng sinh thái hoặc giống cây trồng khác nhau giữa các quốc gia.

3.2.2. Kết quả phân lập tác nhân gây triệu chứng rụng lá cao su tại Đồng Nai và Gia Lai

Các mẫu lá cao su mang triệu chứng đốm lá, vàng lá, được thu thập trên các dòng giống cao su tại Gia Lai và Đồng Nai được kí hiệu mẫu và xử lý phân lập trên môi trường WA. Tiến hành cấy truyền đỉnh sinh trưởng của sợi nấm sang môi trường PDA. Kết quả phân lập được thể hiện ở bảng sau:

Bảng 3.2. Kết quả phân lập nấm *Pestalotiopsis* trên cây cao su tại huyện Long Thành tỉnh Đồng Nai và huyện Chư Prong Gia Lai

Nhóm triệu chứng	Số mẫu phân lập	Số mẫu xuất hiện <i>Pestalotiopsis</i> sp.	Tỷ lệ (%)
Đốm tròn, tâm màu trắng bạc, có quầng nâu vàng	30	30	100
Đốm nâu, nhỏ, không có quầng vàng	20	0	0

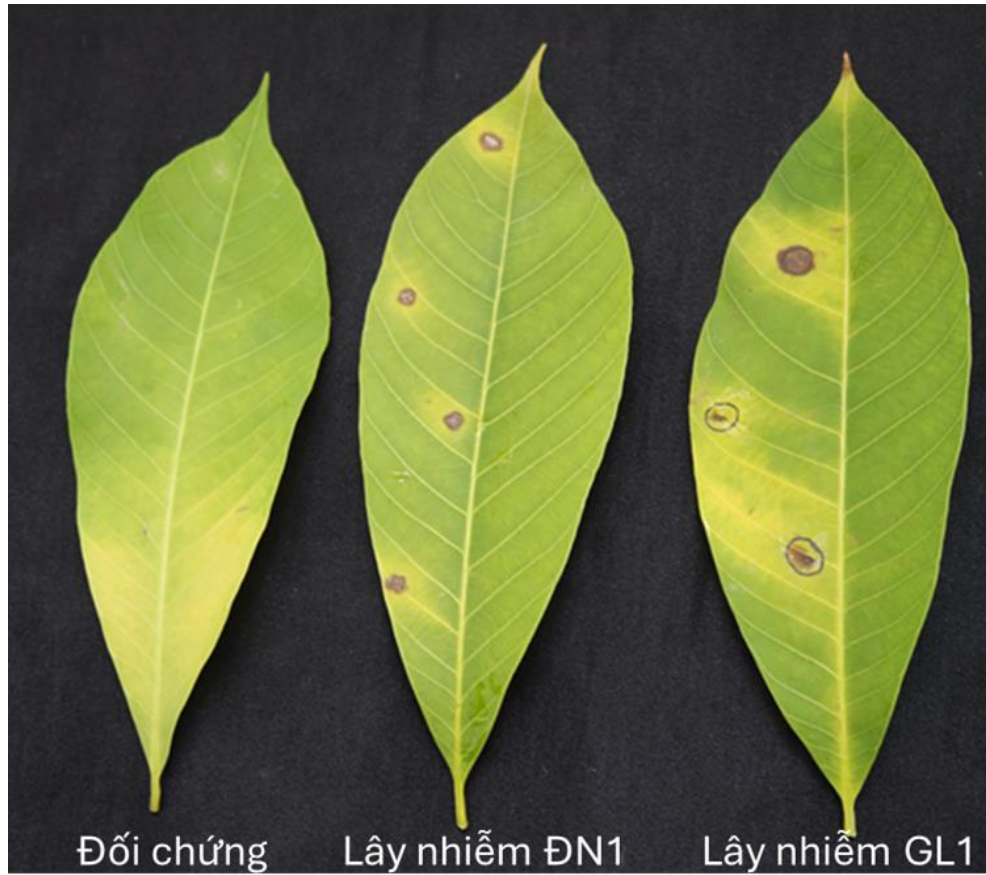
Đốm tròn, trung tâm màu hơi vàng, quầng vàng nhẹ	20	10	50
Đốm nhỏ, nổi gờ trên bề mặt	20	0	0
Tổng cộng	90	40	44,4

Trong tổng số 90 mẫu thu thập với 4 nhóm triệu chứng khác nhau trên cây cao su tại Gia Lai và Đồng Nai, có 40 mẫu phân lập được nấm *Pestalotiopsis*, chiếm tỷ lệ 44,4 %. Trong đó tỷ lệ 100 % phân lập được nấm *Pestalotiopsis* là các mẫu có triệu chứng điển hình đốm tròn, tâm màu trắng bạc, có quầng nâu vàng trên lá.

3.2.3. Kết quả lây nhiễm nhân tạo chủng nấm phân lập trên cây cao su

Hai chủng nấm phân lập từ mẫu bệnh cao su tại Đồng Nai và Gia Lai được kí hiệu là ĐN1 và GL1 được nhân sinh khối lớn để tiến hành lây nhiễm trong chậu vại nhằm xác định chính xác tác nhân gây bệnh thối gốc cây cao su con. Hai chủng nấm được nuôi cấy môi trường PDA và sau 7 ngày nuôi cấy được mang đi lây nhiễm lên cây cao su giống (cao khoảng 60 cm) (theo phương pháp gây sát thương và không gây sát thương trên lá).

Triệu chứng bệnh xuất hiện sau 3 ngày lây nhiễm ở công thức gây sát thương và vết bệnh bắt đầu lan rộng sau 4 ngày lây nhiễm, triệu chứng rõ rệt sau 7 ngày lây nhiễm (hình 3.2). Ở công thức không gây sát thương, triệu chứng bệnh bắt đầu xuất hiện sau 7 ngày lây nhiễm, triệu chứng rõ ràng sau 9 ngày lây nhiễm. Trong khi đó, công thức đối chứng lây bằng nước cất vô trùng lên cả lá có gây vết thương và không gây vết thương đều không biểu hiện triệu chứng.



Hình 3.5. Triệu chứng bệnh trên lá (có sát thương) sau 7 ngày lây nhiễm



Hình 3.6. Triệu chứng bệnh lây nhiễm trên cây sau 7 ngày lây nhiễm

Tiến hành tái phân lập nấm gây bệnh từ vết đốm bệnh trên lá sau lây nhiễm thành công để xác định chính xác tác nhân gây bệnh rụng lá cao su. Các chủng nấm tái phân lập được tiếp tục định danh tên loài bằng phương pháp hình thái học và phân tích phân tử.

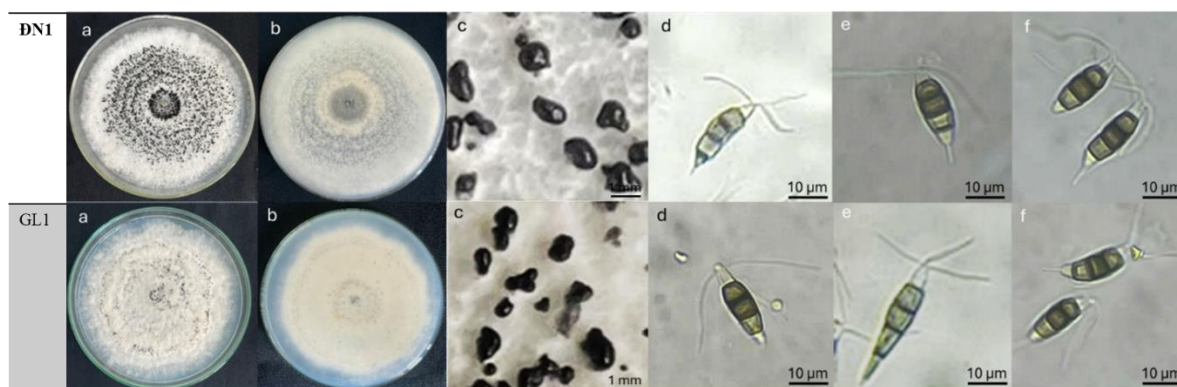
3.3. Định danh loài nấm *Pestalotiopsis* gây bệnh rụng lá trên cây cao su

3.3.1. Định danh loài nấm *Pestalotiopsis* gây bệnh rụng lá trên cây cao su bằng hình thái học

Tiến hành đánh giá đặc điểm hình thái tản nấm, đặc điểm bào tử của hai chủng nấm ĐN1 và GL1 phân lập được sau 7 ngày nuôi cấy ở điều kiện phòng thí nghiệm. Kết quả cho thấy:

Bào tử của ĐN1 có dạng hình cầu đến hình elip, hơi cong và bao gồm 5 tế bào ($18,48\text{--}29,40 \times 5,80\text{--}8,65 \mu\text{m}$). Ba tế bào ở giữa có màu sắc đậm nhất, trong đó tế bào thứ 3 có màu nâu nhạt, 2 tế bào đầu có màu nâu sẫm (Hình 2). Đỉnh tế bào có hình nón, trong suốt và có từ 2 đến 3 râu. Tế bào đáy cũng có hình nón, trong suốt và có một đuôi phụ. Trên môi trường PDA, hình thành các ổ bào tử nhầy màu đen phát triển trên bề mặt tản nấm.

Bào tử của GL1 gần tương tự của nấm *Pestalotiopsis* chủng ĐN1, dạng hình cầu đến hình elip, hơi cong và bao gồm 5 tế bào ($18,48\text{--}29,43 \times 5,79\text{--}8,65 \mu\text{m}$). Ba tế bào ở giữa có màu sắc đậm nhất, trong đó tế bào thứ 3 có màu nâu nhạt, 2 tế bào đầu có màu nâu sẫm (Hình 2). Tế bào đỉnh có từ 2 đến 3 râu và tế bào đáy có một đuôi phụ đều có hình nón, trong suốt. Trên môi trường PDA, hình thành các ổ bào tử nhầy màu đen phát triển trên bề mặt tản nấm. Tuy nhiên, thời gian sinh ổ bào tử trên đĩa môi trường PDA là chậm hơn so với chủng ĐN1.



Hình 3.7. Đặc điểm hình thái của 2 chủng nấm ĐN1, GL1.

Mặt trên tản nấm (a) và mặt dưới tản nấm (b) trên môi trường PDA, dịch tiết ổ bào tử trên đĩa môi trường (c), bào tử nấm trên môi trường PDA (d–e).

Dựa trên các đặc điểm hình thái, hai chủng nấm ĐN1 và GL1 thuộc chi *Pestalotiopsis*. Hai chủng nấm phân lập được tiếp tục phân tích phân tử để xác định tên loài nấm gây hại.

3.3.2. Định danh loài nấm *Pestalotiopsis* gây bệnh rụng lá trên cây cao su bằng kỹ thuật phân tử

Đơn bào tử nấm được cấy trên môi trường PDA ở nhiệt độ 25 - 27°C trong 7 ngày. Hệ sợi tơ của mỗi mẫu nấm được sử dụng cho tách chiết DNA theo phương pháp được hiệu chỉnh bởi Gardes và Bruns (1993), 50mg tơ nấm được nghiền khoảng 5 phút, thêm 500µl đệm tách chiết, voxtex và để ở nhiệt độ phòng trong 10 phút, sau đó đem ly tâm rồi thu lấy dung dịch bên trên. DNA được tủa bằng cồn 96° và rửa 2 lần bằng cồn 70°. DNA sau đó được phơi khô trong tủ sấy vô trùng và hòa tan trong 100µl TE 0.1X. Cuối cùng DNA được kiểm tra chất lượng thông qua quá trình đo quang phổ và điện di trên gel agarose 0,8%. Những sản phẩm đạt yêu cầu được trữ ở -20C cho những bước tiếp theo.

Vùng ITS (Internal transcribed spacer) là vùng gen cơ bản thường được sử dụng trong phân loại tên chi hoặc tên loài của nấm. Vùng ITS có giá trị trong định danh loài nấm thuộc chi *Pestalotiopsis*. Vì vậy, trong nghiên cứu này, để định danh chính xác loài nấm gây bệnh, chúng tôi lựa chọn phân tích vùng gen ITS của hai chủng nấm gây bệnh.

Phản ứng PCR khuếch đại vùng gen của chủng nấm được thực hiện với cặp mồi ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') và ITS5 (5 TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') với nhiệt độ gắn mồi: 94°C trong 2 phút, 94°C trong 30 giây, 52°C trong 30 giây, 54°C trong 30 giây và 72°C trong 5 phút., sau cùng DNA được bảo quản ở 4°C (kích thước sản phẩm khoảng 500 bp). Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System. Sản phẩm sau tinh chiết được giải trình tự một chiều sử dụng mồi xuôi PCR (ITS5) bằng phương pháp Sanger. Trình tự vùng gen ITS của 2 chủng nấm :

>ĐN1

CATTATAGAGTTTTCTAAACTCCCAACCCATGTGAACTTACCTTTTGTTG
 CCTCGGCAGGAGTTATAGGTCTTCTTATAGCTGCTGCCGGTGGACCATTA
 AACTCTTGTTATTTTATGTAATCTGAGCGTCTTATTTTAATAAGTCAAAA
 CTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGA
 AATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTT
 TGAACGCACATTGCGCCCATTAGTATTCTAGTGGGCATGCCTGTTTCGAG
 CGTCATTTCAACCCTTAAGCCTAGCTTAGTGTTGGGAATCTACTTCTCTT
 AGGAGTTGTAGTTCCTGAAATACAACGGCGGATTTGTAGTATCCTCTGA
 GCGTAGTAATTTTTTTCTCGCTTTTGTTAGGTGCTATAACTCCCAGCCGC
 TAAACCCCAATTTTTTTGTGGTTGACCTCGGATCAGGT

>GL1

ATTATAGAGTTTTCTAAACTCCCAACCCATGTGAACTTACCTTTTGTTGC
 CTCGGCAGGAGTTATAGGTCTTCTTATAGCTGCTGCCGGTGGACCATTA
 AACTCTTGTTATTTTATGTAATCTGAGCGTCTTATTTTAATAAGTCAAAA
 CTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGA
 AATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTT
 TGAACGCACATTGCGCCCATTAGTATTCTAGTGGGCATGCCTGTTTCGAG
 CGTCATTTCAACCCTTAAGCCTAGCTTAGTGTTGGGAATCTACTTCTCTT
 AGGAGTTGTAGTTCCTGAAATACAACGGCGGATTTGTAGTATCCTCTGA
 GCGTAGTAATTTTTTTCTCGCTTTTGTTAGGTGCTATAACTCCCAGCCGC
 TAAACCCCAATTTTTTTGTGGTTGACCTCGGATCAGGTTA

Kết quả cho thấy, hai chủng nấm này có kết quả tương đồng nhau (Hình 3.4):

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

ĐN1	CATTATAGAGTTTTCTAAACTCCCAACCCATGTGAACTTACCTTTTGTTCCTCGGCAGG	60
GL1	-ATTATAGAGTTTTCTAAACTCCCAACCCATGTGAACTTACCTTTTGTTCCTCGGCAGG	59

ĐN1	AGTTATAGGTCTTCTTATAGCTGCTGCCGGTGGACCATTAAACTCTTGTTATTTTATGTA	120
GL1	AGTTATAGGTCTTCTTATAGCTGCTGCCGGTGGACCATTAAACTCTTGTTATTTTATGTA	119

ĐN1	ATCTGAGCGTCTTATTTTAATAAGTCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGTTCTGGCA	180
GL1	ATCTGAGCGTCTTATTTTAATAAGTCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGTTCTGGCA	179

ĐN1	TCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCAT	240
GL1	TCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCAT	239

ĐN1	CGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCATTAGTATTCTAGTGGGCATGCCTGTTTCGAGCGT	300
GL1	CGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCATTAGTATTCTAGTGGGCATGCCTGTTTCGAGCGT	299

ĐN1	CATTTCAACCCTTAAGCCTAGCTTAGTGTGGGAATCTACTTCTCTTAGGAGTTGTAGTT	360
GL1	CATTTCAACCCTTAAGCCTAGCTTAGTGTGGGAATCTACTTCTCTTAGGAGTTGTAGTT	359

ĐN1	CCTGAAATACAACGGCGGATTTGTAGTATCCTCTGAGCGTAGTAATTTTTTCTCGCTTT	420
GL1	CCTGAAATACAACGGCGGATTTGTAGTATCCTCTGAGCGTAGTAATTTTTTCTCGCTTT	419

ĐN1	TGTTAGGTGCTATAACTCCAGCCGCTAAACCCCAATTTTTTGTGGTTGACCTCGGATC	480
GL1	TGTTAGGTGCTATAACTCCAGCCGCTAAACCCCAATTTTTTGTGGTTGACCTCGGATC	479

ĐN1	AGGT-- 484	
GL1	AGGTTA 485	

Hình 3.8. Kết quả so sánh trình tự của hai chủng ĐN1 và GL1.

Kết quả so sánh mức đồng nhất trình tự bằng phần mềm BLAST cho thấy, mẫu ĐN1 và GL1 có mức đồng nhất trình tự cao (99,93%) với loài *Neopestalotiopsis saprophytica* thuộc chi *Neopestalotiopsis*, và có mức đồng nhất thấp hơn (<96%) với các loài thuộc chi *Pestalotiopsis* và *Pseudopestalotiopsis* trong chi phức hợp *Neopestalotiopsis* s.l. Như vậy, dựa vào kết quả tìm kiếm trên Ngân hàng gen bằng phần mềm BLAST cho thấy,

hai chủng nấm gây bệnh ĐN1 và GL1 trùng với loài *Neopestalotiopsis saprophytica* (hình 3.5.). Nghiên cứu tác nhân gây bệnh rụng lá cao su tại Indonesia của Pornsuriya và cộng sự năm 2020 cũng xác định được loài *Neopestalotiopsis saprophytica* bằng giải trình tự vùng gen ITS.

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

ĐN1	CATTATAGAGTTTTCTAAACTCCCAACCCATGTGAACCTACCTTTTGTTGCCTCGGCAGG	60
Neopestalotiopsis	CATTATAGAGTTTTCTAAACTCCCAACCCATGTGAACCTACCTTTTGTTGCCTCGGCAGG	60
GL1	-ATTATAGAGTTTTCTAAACTCCCAACCCATGTGAACCTACCTTTTGTTGCCTCGGCAGG	59

ĐN1	AGTTATAGGTCTTCTTATAGCTGCTGCCGGTGGACCATTAAACTCTTGTTATTTTATGTA	120
Neopestalotiopsis	AGTTATAGGTCTTCTTATAGCTGCTGCCGGTGGACCATTAAACTCTTGTTATTTTATGTA	120
GL1	AGTTATAGGTCTTCTTATAGCTGCTGCCGGTGGACCATTAAACTCTTGTTATTTTATGTA	119

ĐN1	ATCTGAGCGTCTTATTTTAATAAGTCAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGTTCTGGCA	180
Neopestalotiopsis	ATCTGAGCGTCTTATTTTAATAAGTCAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGTTCTGGCA	180
GL1	ATCTGAGCGTCTTATTTTAATAAGTCAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGTTCTGGCA	179

ĐN1	TCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCAT	240
Neopestalotiopsis	TCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCAT	240
GL1	TCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCAT	239

ĐN1	CGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCATAGTATTCTAGTGGCATGCCTGTTTCGAGCGT	300
Neopestalotiopsis	CGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCATAGTATTCTAGTGGCATGCCTGTTTCGAGCGT	300
GL1	CGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCATAGTATTCTAGTGGCATGCCTGTTTCGAGCGT	299

ĐN1	CATTTCAACCCCTTAAGCCTAGCTTAGTGTTGGGAATCTACTTCTCTTAGGAGTTGTAGTT	360
Neopestalotiopsis	CATTTCAACCCCTTAAGCCTAGCTTAGTGTTGGGAATCTACTTCTCTTAGGAGTTGTAGTT	360
GL1	CATTTCAACCCCTTAAGCCTAGCTTAGTGTTGGGAATCTACTTCTCTTAGGAGTTGTAGTT	359

ĐN1	CCTGAAATACAACGGCGGATTGTAGTATCCTCTGAGCGTAGTAATTTTTTCTCGCTTT	420
Neopestalotiopsis	CCTGAAATACAACGGCGGATTGTAGTATCCTCTGAGCGTAGTAATTTTTTCTCGCTTT	420
GL1	CCTGAAATACAACGGCGGATTGTAGTATCCTCTGAGCGTAGTAATTTTTTCTCGCTTT	419

ĐN1	TGTTAGGTGCTATAACTCCCAGCCGCTAAACCCCAATTTTTTGTGGTTGACCTCGGATC	480
Neopestalotiopsis	TGTTAGGTGCTATAACTCCCAGCCGCTAAACCCCAATTTTTTGTGGTTGACCTCGGATC	480
GL1	TGTTAGGTGCTATAACTCCCAGCCGCTAAACCCCAATTTTTTGTGGTTGACCTCGGATC	479

ĐN1	AGGT-- 484	
Neopestalotiopsis	AGGT-- 484	
GL1	AGGTTA 485	

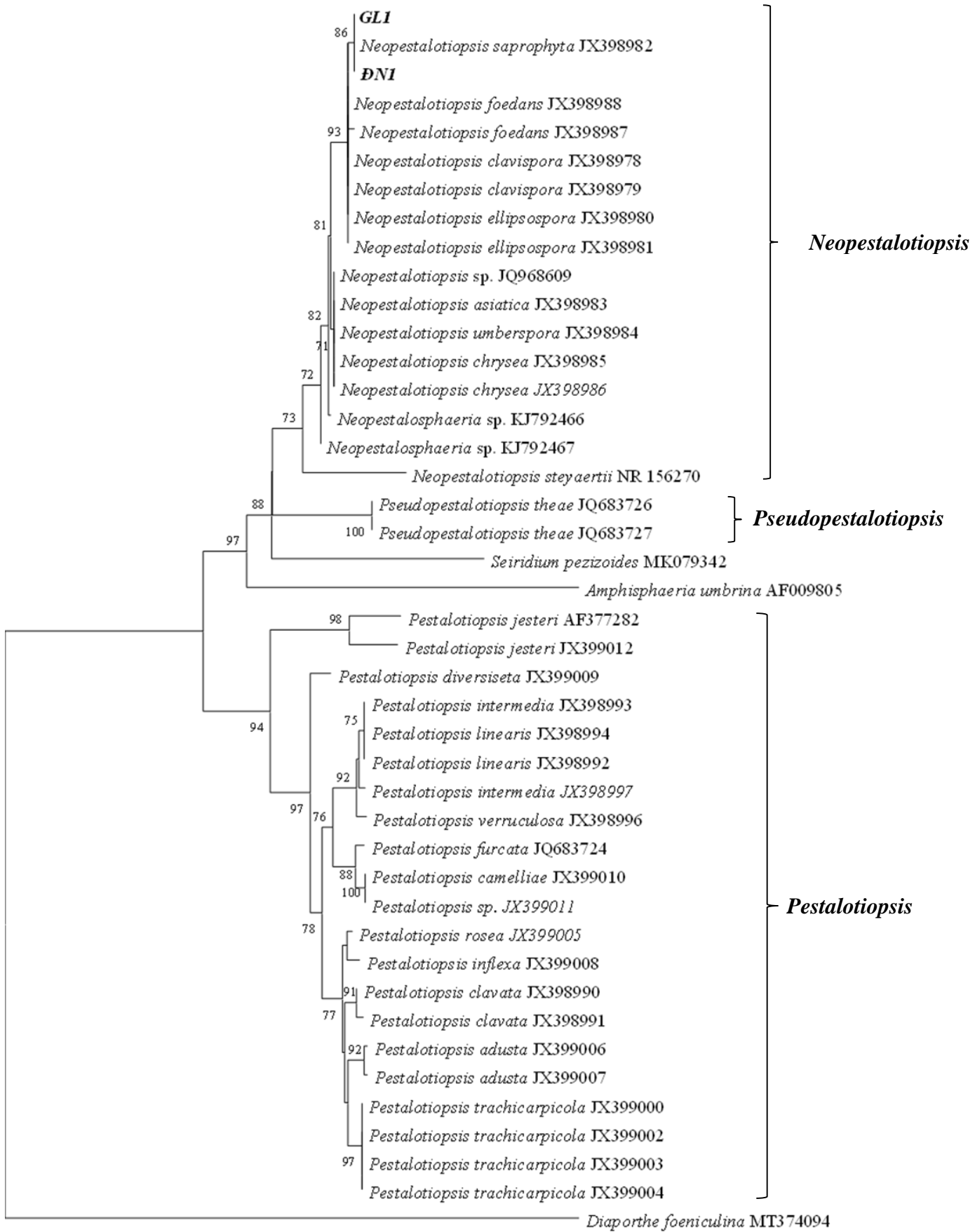
Hình 3.9. So sánh trình tự chủng nấm ĐN1 và GL1 với dữ liệu Ngân hàng gen.

Bảng 3.3. Mã GenBank của các loài nấm được sử dụng để so sánh và lập cây phả hệ với trình tự hai chủng nấm ĐN1 và GL1 gây bệnh rụng lá cao su trong nghiên cứu này

Phức hợp loài	Loài	Mã Genbank
<i>Pseudopestalotiopsis</i>	<i>Pseudopestalotiopsis theae</i>	JQ683726
	<i>Pseudopestalotiopsis theae</i>	JQ683727
<i>Pestalotiopsis</i>	<i>P.jesteri</i>	AF377282
	<i>P.furcata</i>	JQ683724
	<i>P.clavata</i>	JX398990
	<i>P.clavata</i>	JX398991
	<i>P.linearis</i>	JX398992
	<i>P.intermedia</i>	JX398993
	<i>P.linearis</i>	JX398994
	<i>P.verruculosa</i>	JX398996
	<i>P.intermedia</i>	JX398997
	<i>P.trachicarpicola</i>	JX399000
	<i>P.trachicarpicola</i>	JX399002
	<i>P.trachicarpicola</i>	JX399003
	<i>P.trachicarpicola</i>	JX399004
	<i>P.rosea strain</i>	JX399005
<i>P.adusta</i>	JX399006	

	<i>P.adusta</i>	JX399007
	<i>P.inflexa</i>	JX399008
	<i>P.diversiseta</i>	JX399009
	<i>P.camelliae</i>	JX399010
	<i>P.camelliae</i>	JX399011
	<i>P.jesteri</i>	JX399012
<i>Neopestalotiopsis</i>	<i>N.samarangensis</i>	JQ968609
	<i>N.clavispora</i>	JX398978
	<i>N.clavispora</i>	JX398979
	<i>N.ellipospora</i>	JX398980
	<i>N.ellipospora</i>	JX398981
	<i>Neopestalotiopsis saprophytica</i>	JX398982
	<i>N.asiatica</i>	JX398983
	<i>N.umberspora</i>	JX398984
	<i>N.chrysea</i>	JX398985
	<i>N.chrysea</i>	JX398986
	<i>N.foedans</i>	JX398987
	<i>N.foedans</i>	JX398988
	<i>N.samarangensis</i>	JQ968609
	<i>N.clavispora</i>	JX398978
	<i>N.clavispora</i>	JX398979
	<i>N.pernambucana</i>	KJ792466
	<i>N.pernambucana</i>	KJ792467
	<i>N.steyaertii</i>	NR156270
<i>Seiridium</i>	<i>Seiridium pezizoides</i>	MK079342

<i>Diaporthe</i>	<i>Diaporthe foeniculina</i>	MT374094
<i>Amphisphaeria</i>	<i>Amphisphaeria umbrina</i>	AF009805



Hình 3.10. Phân tích cây phả hệ dựa trên trình tự vùng ITS của mẫu nấm gây bệnh rụng lá cao su và các loài nấm đã được công bố trên Genbank gây bệnh trên các loại cây trồng khác

Chú thích: Cây được xây dựng bằng phương pháp Neighbor-Joining (NJ). Giá trị ở các nút là giá trị thống kê bootstrap dưới dạng phần trăm (1000 lần lặp) (chỉ trình bày các giá trị > ngưỡng tin cậy chung 70%). Thanh tỉ lệ chỉ khoảng cách di truyền.

Xác định tên khoa học của loài nấm gây bệnh dựa trên cơ sở xây dựng cây phát sinh theo phương pháp Neighbor-Joining (NJ). Giá trị tại các nút là giá trị thống kê bootstrap dưới dạng % (1000 lần lặp) (chỉ trình bày những giá trị lớn hơn 70%). Trình tự vùng ITS của 2 chủng nấm gây bệnh ĐN1 và GL1 được phân tích đầy đủ với trình tự của các mẫu Genbank đại diện cho 27 loài đã được công bố bởi Silvério và cs. (2016). Kết quả cho thấy, hai chủng nấm ĐN1 và GL1 thuộc loài *Neopestalotiopsis saprophytica*. Nấm *Neopestalotiopsis saprophytica* (thuộc họ Sporocadaceae), là đối tượng gây bệnh trên một số loại cây trồng trên thế giới như xoài, ổi, măng cụt... đã được công bố ở các tài liệu trước đây trên thế giới gây bệnh đốm lá, rụng lá cao su.

3.4. Xác định đặc điểm sinh học của tác nhân gây bệnh rụng lá trên cây cao su

3.4.1. Nghiên cứu khả năng sinh trưởng và phát triển của chủng nấm gây bệnh trên các môi trường dinh dưỡng khác nhau

Nghiên cứu về khả năng sinh trưởng và phát triển của 2 chủng nấm *Neopestalotiopsis saprophytica* gây bệnh rụng lá cao su đã được thực hiện trên 4 loại môi trường dinh dưỡng khác nhau bao gồm WA, Czapek, PDA và môi trường dịch chiết lá cây cao su ở điều kiện 25°C. Kết quả được thể hiện qua bảng 3.4:

Sau 3 ngày nuôi cấy, đường kính tản nấm ở các điều kiện môi trường dinh dưỡng khác nhau có ý nghĩa ở độ tin cậy 95%. Trong đó đường kính tản nấm phát triển mạnh nhất trong môi trường chứa dịch chiết lá cao su, đạt 3,60cm, tiếp theo là trong môi trường PDA đạt 3,44 cm, môi trường Czapek đạt 3,2 cm và thấp nhất là môi trường WA đạt 2,47cm. Tuy trên môi trường dịch chiết lá, sợi nấm phát triển nhanh nhưng tản nấm mọc thưa mỏng và hầu như mọc sát bề mặt môi trường như trên môi trường WA. Trên môi trường PDA, tản nấm phát triển dày nhất, bông trắng, sợi nấm mọc khí sinh.

Sau 5 ngày nuôi cấy, đường kính tản nấm ở các điều kiện môi trường dinh dưỡng khác nhau có ý nghĩa ở độ tin cậy 95%. Trong đó đường kính tản nấm phát triển mạnh nhất trong môi trường dịch chiết lá, đạt 6,63 cm, tiếp theo là trong môi trường PDA đạt 6,00cm, môi trường Czapek đạt 5,88 cm và thấp nhất là môi trường WA đạt 5,20 cm. Tản nấm mọc dày nhất trên môi trường

PDA và Czapek, tuy nhiên, đã bắt đầu xuất hiện các ổ bào tử trên môi trường PDA.

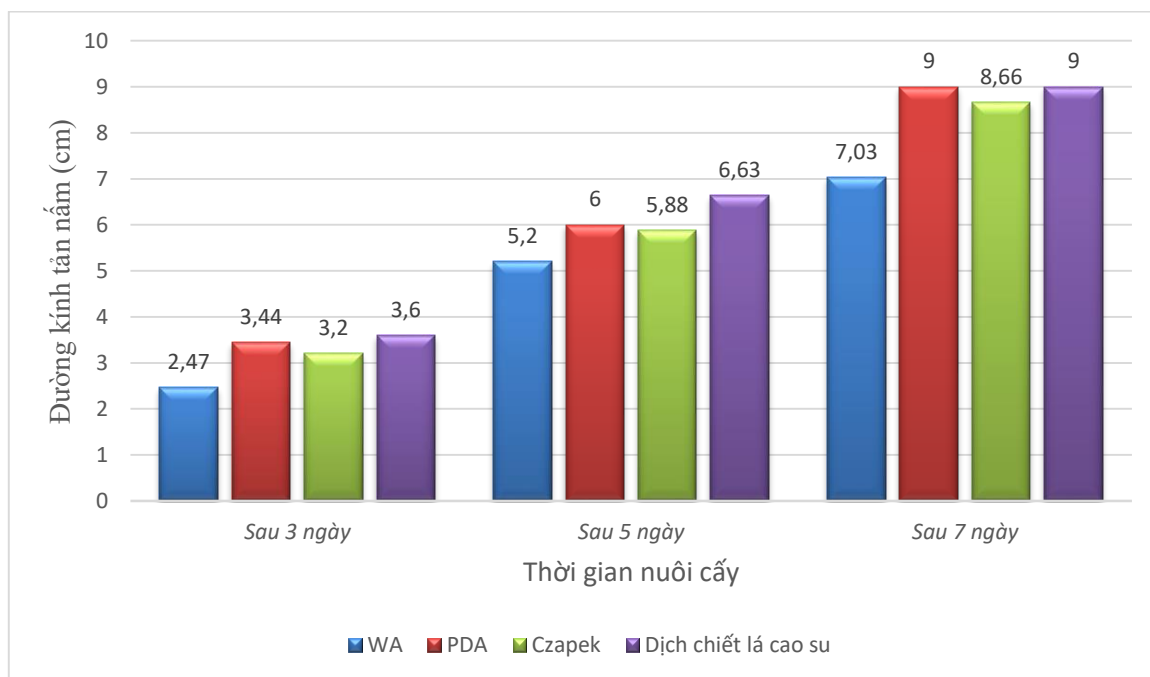
Sau 7 ngày nuôi cấy, đường kính tản nấm ở các điều kiện môi trường dinh dưỡng khác nhau dao động từ 7,03 - 9,00cm. Sai khác về đường kính tản nấm ở các môi trường dinh dưỡng khác nhau là có ý nghĩa thống kê, trong đó đường kính tản nấm trong môi trường PDA và dịch chiết lá cao su là tương đương nhau, đạt 9,00cm, tiếp theo là trong môi trường Czapek đạt 8,66 cm và thấp nhất là môi trường WA đạt 7,03 cm. Tuy sợi nấm mọc nhanh trên môi trường dịch chiết lá cao su, nhưng sau 7 ngày nuôi cấy, tản nấm rất thưa mỏng và không hình thành ổ bào tử, trên môi trường PDA và Czapek tản nấm mọc dày và hình thành số lượng lớn các ổ bào tử đen nhầy, đặc biệt là trên môi trường PDA (bảng 3.4 và hình 3.5).

Từ kết quả nghiên cứu này, môi trường PDA là môi trường thích hợp nhất cho nấm *Neopestalotiopsis saprophytica* chủng ĐN1 phát triển và được sử dụng để đánh giá ảnh hưởng của các yếu tố khác (nhiệt độ, pH môi trường) đến sự phát triển của nấm (Hình 3.5).

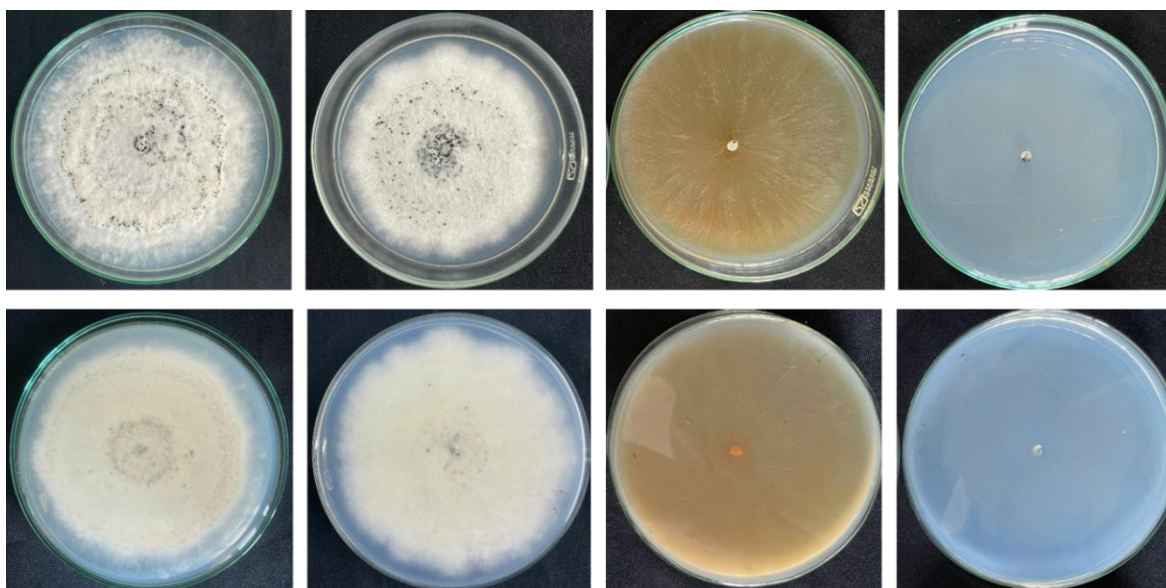
Bảng 3.4. Khả năng sinh trưởng và phát triển của chủng nấm *Neopestalotiopsis saprophytica* ĐN1 trên các môi trường dinh dưỡng

ST T	Môi trường	Đường kính tản nấm (cm) saungày nuôi cấy			Hình thái tản nấm	Thời gian hình thành ổ bào tử
		3	5	7		
1	WA	2,47 ^d	5,20 ^d	7,03 ^c	Tản nấm mỏng	Không hình thành
2	PDA	3,44 ^b	6,00 ^b	9,00 ^a	Tản nấm dày, mịn	Sau 4 ngày
3	Czapek	3,20 ^c	5,88 ^c	8,66 ^b	Tản nấm dày, mịn	Sau 5 ngày
4	Dịch chiết lá cao su	3,60 ^a	6,63 ^a	9,00 ^b	Tản nấm mỏng	Không hình thành
CV(%)		3,08	1,69	0,87		

Ghi chú: các chữ khác nhau trong cùng một cột chỉ sự sai khác có ý nghĩa với $P \leq 0,05$.



Hình 3.11. Biểu đồ biểu thị khả năng sinh trưởng và phát triển của chủng nấm *Neopestalotiopsis saprophytica* ĐN1 trên các môi trường dinh dưỡng



Hình 3.12. Khả năng sinh trưởng và phát triển của nấm *Neopestalotiopsis saprophytica* ĐN1 trên các môi trường dinh dưỡng khác nhau

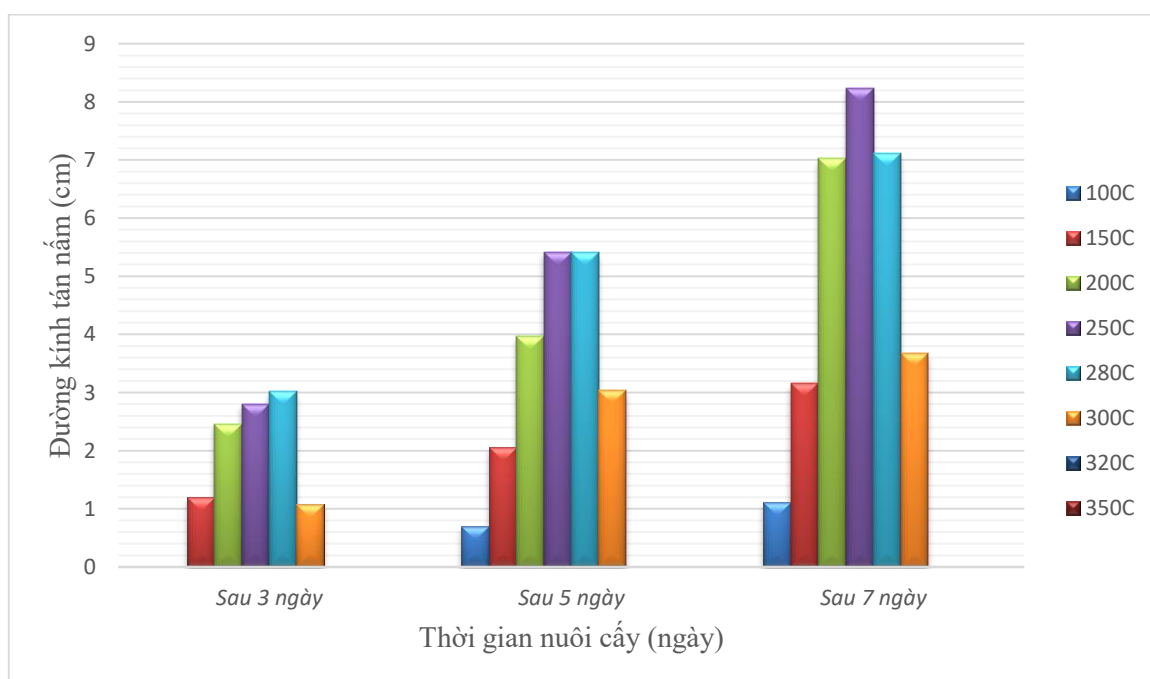
3.4.2. Nghiên cứu khả năng sinh trưởng và phát triển của nấm *Neopestalotiopsis saprophytica* chủng ĐN1 ở các mức nhiệt độ khác nhau trên môi trường PDA

Nghiên cứu về sự phát triển của chủng nấm *Neopestalotiopsis saprophytica* chủng ĐN1 được thực hiện trên môi trường PDA ở các mức nhiệt độ khác nhau bao gồm: 10, 20, 25, 28, 30, 32 và 35°C. Kết quả theo dõi đường kính tán nấm sau 7 ngày nuôi cấy được thể hiện qua bảng 3.5 và hình 3.6 như sau:

Bảng 3.5. Khả năng sinh trưởng và phát triển của chủng nấm *Neopestalotiopsis saprophytica* ĐN1 trên các mức nhiệt độ khác nhau

TT	Điều kiện nhiệt độ	Đường kính tán nấm sau cấy (cm)			Thời gian hình thành ổ bào tử
		3 ngày	5 ngày	7 ngày	
1	10°C	0	0,70 ^e	1,11 ^f	Không hình thành
2	15°C	1,20 ^d	2,05 ^d	3,16 ^e	Sau 6 ngày
3	20°C	2,46 ^c	3,97 ^b	7,30 ^b	Sau 4 ngày
4	25°C	2,80^b	5,42^a	8,23^a	Sau 4 ngày
5	28°C	3,02 ^a	5,41 ^a	7,11 ^c	Sau 5 ngày
6	30°C	1,07 ^d	3,03 ^c	3,67 ^d	Sau 9 ngày
7	32°C	0	0	0	
8	35°C	0	0	0	

Ghi chú: các chữ khác nhau trong cùng một cột chỉ sự sai khác có ý nghĩa với $P \leq 0,05$.



Hình 3.13. Biểu đồ biểu thị khả năng sinh trưởng và phát triển của chủng nấm *Neopestalotiopsis saprophytica* ĐN1 trên các mức nhiệt độ khác nhau

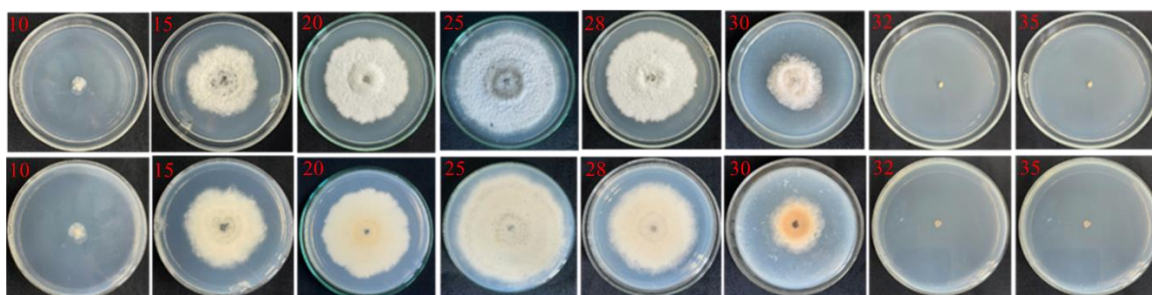
Yếu tố nhiệt độ có ảnh hưởng lớn đến sự phát triển của chủng nấm *Neopestalotiopsis saprophytica* chủng ĐN1, cụ thể:

Sau 3 ngày nuôi cấy, đường kính tản nấm ở các mức nhiệt độ khác nhau có ý nghĩa thống kê ở mức độ tin cậy 95%, trong đó ở nhiệt độ 28°C đường kính tản nấm phát triển nhanh nhất đạt 3,02cm, tiếp theo là ở 25°C đạt 2,80 cm, ở nhiệt độ 20°C đạt 2,46cm, ở nhiệt độ 15°C đạt 1,20cm, ở 30°C đạt 1,07cm, nấm không phát triển ở nhiệt độ 10°C, 32°C và 35°C.

Sau 5 ngày nuôi cấy, đường kính tản nấm ở các mức nhiệt độ khác nhau sai khác có ý nghĩa thống kê, dao động từ 0,70 – 5,42cm, trong đó ở nhiệt độ 25°C đường kính tản nấm phát triển nhanh nhất đạt 5,42cm, tiếp theo là ở 28°C đạt xấp xỉ 5,51cm, ở nhiệt độ 20°C đạt 3,97cm, ở nhiệt độ 30°C đạt 3,03cm, ở 15°C đạt 2,07cm, ở 10°C đạt 0,7cm, từ 32°C trở lên nấm không phát triển.

Sau 7 ngày nuôi cấy, sự phát triển của nấm ở các mức nhiệt độ có sự khác biệt rõ rệt nhất, trong khi tản nấm ở nhiệt độ 25°C phát triển mạnh nhất đạt 8,23cm, sau đó là 20°C đạt 7,30cm tương đương với ở nhiệt độ 28°C đạt 7,11cm, nấm phát triển chậm ở nhiệt độ 10°C, 15°C và 30°C (Hình 3.6).

Như vậy, 20 - 28°C là khoảng nhiệt độ tốt nhất cho sự phát triển của tản nấm *Neopestalotiopsis saprophytica* chủng ĐN1, nấm phát triển tốt nhất ở nhiệt độ 25°C và thời gian hình thành ổ bào tử nhầy là nhanh và mạnh nhất, nhiệt độ lạnh hơn 10°C hoặc cao hơn 32°C nấm không có khả năng phát triển



Hình 3.14. Hình ảnh khả năng sinh trưởng và phát triển của chủng nấm *Neopestalotiopsis saprophytica* chủng ĐN1 trên môi trường PDA ở các mức nhiệt độ khác nhau sau 7 ngày nuôi cấy

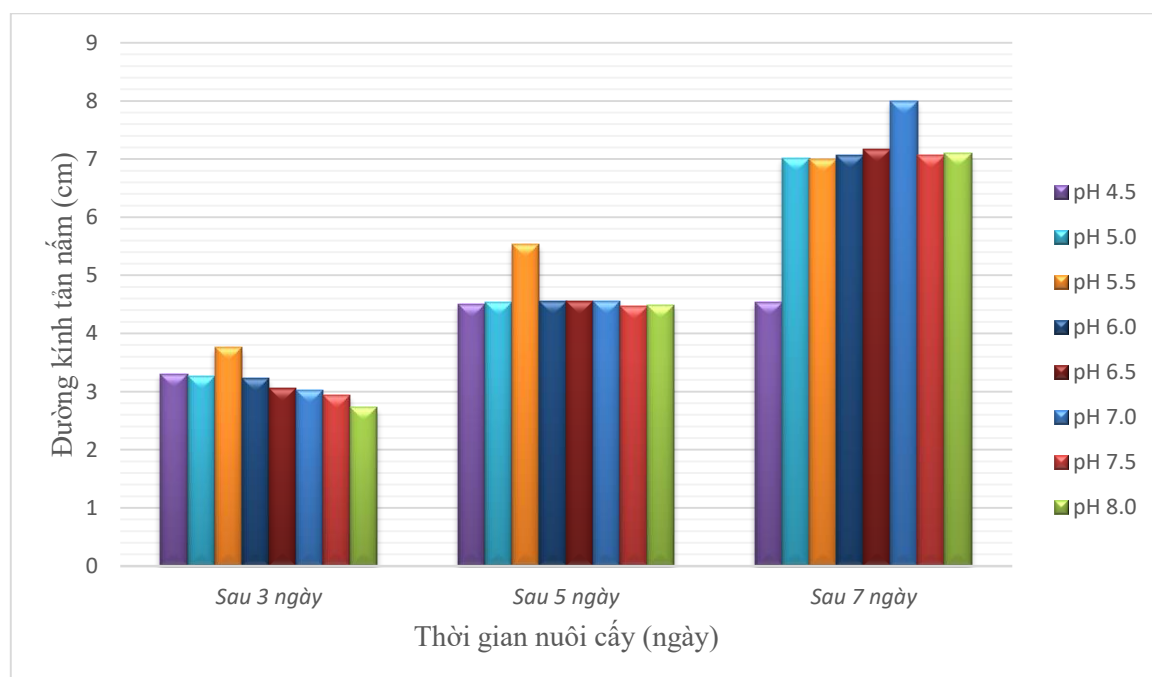
Hình ảnh mặt trên tản nấm nuôi cấy trên môi trường PDA lần lượt từ trái sang phải ở các mức nhiệt độ 10, 15, 20, 25, 28, 30, 32 và 35°C, tương ứng.

3.4.3. Nghiên cứu khả năng sinh trưởng và phát triển của nấm *Neopestalotiopsis saprophytica* chủng ĐN1 trên môi trường PDA ở các mức pH khác nhau

Nuôi cấy chủng nấm *Neopestalotiopsis saprophytica* chủng ĐN1 trên môi trường PDA ở 8 mức pH 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 và 8,0 đặt ở trong nhiệt độ từ 25°C. Theo dõi sự phát triển của tản nấm ở các mức pH sau 3, 5 và 7 ngày nuôi cấy, kết quả thu được ở bảng 3.5 và hình 3.7 như sau:

Bảng 3.6. Khả năng sinh trưởng và phát triển của nấm *Neopestalotiopsis saprophytica* chủng ĐN1 trên môi trường PDA ở các mức pH khác nhau

TT	Độ pH	ĐK tản nấm sau khi cấy (cm)		
		3 ngày	5 ngày	7 ngày
1	4,5	3,3	4,51	7,02
2	5,0	3,27	4,53	7,00
3	5,5	3,76	5,53	7,00
4	6	3,23	4,55	7,07
5	6,5	3,06	4,56	7,17
6	7	3,03	4,56	8,00
7	7,5	2,93	4,46	7,07
8	8	2,73	4,49	7,09

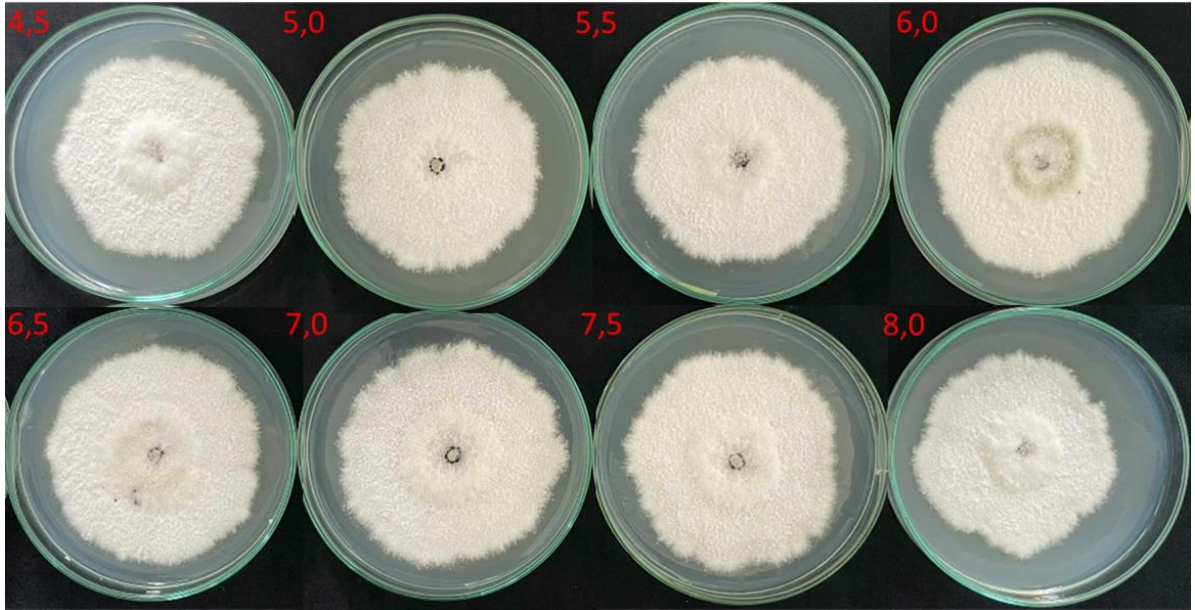


Hình 3.15. Biểu đồ biểu thị khả năng sinh trưởng và phát triển của nấm *Neopestalotiopsis saprophytica* chủng ĐN1 trên môi trường PDA ở các

mức pH khác nhau

Qua bảng 3.5 cho thấy:

Nấm *Neopestalotiopsis saprophytica* chủng ĐN1 có khả năng phát triển trong phạm vi pH rộng từ 4,5 đến 8,0; hầu như không có sự khác biệt rõ ràng ở các mức pH khác nhau, nấm phát triển tương đối nhanh nhất ở mức pH từ 6,5-7,5 sau 7 ngày nuôi cấy, đường kính tản nấm đạt từ 7-8 cm, sau 9 ngày nấm mọc kín đĩa.



Hình 3.16. Hình ảnh khả năng sinh trưởng và phát triển chủng nấm *Neopestalotiopsis saprophytica* chủng ĐN1 trên môi trường PDA ở các mức pH khác nhau sau 7 ngày nuôi cấy

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

KẾT LUẬN

1. Triệu chứng bệnh rụng lá cao su do nấm *Pestalotiopsis* là xuất hiện các đốm tròn nâu với quang vàng, các đốm có thể liên kết, làm lá chuyển vàng và rụng. Ở vườn ươm, vết bệnh nhỏ có màu xám bạc và viền vàng hoặc nâu tối có thể gây rách hoặc biến dạng lá. Ở vườn khai thác, bệnh xuất hiện dưới dạng các đốm xám đến nâu xám có viền vàng, có thể có lỗ thủng nhỏ và các ổ màu đen.
2. Trong tổng số 90 mẫu thu thập với 4 nhóm triệu chứng khác nhau trên cây cao su tại Gia Lai và Đồng Nai, có 40 mẫu phân lập được nấm *Pestalotiopsis*, chiếm tỷ lệ 44,4 %. Trong đó tỷ lệ 100 % phân lập được nấm *Pestalotiopsis* là các mẫu có triệu chứng điển hình đốm tròn, tâm màu trắng bạc, có quang nâu vàng trên lá.
3. Hai chủng nấm ĐN1 và GL1 từ Đồng Nai và Gia Lai được nuôi cấy và lây nhiễm lên cây cao su. Triệu chứng bệnh thối gốc xuất hiện sau 3 ngày trong công thức gây sát thương và sau 7 ngày trong công thức không gây sát thương. Công thức đối chứng không biểu hiện triệu chứng.
4. Định danh hình thái học và phân tích phả hệ dựa trên vùng gen ITS của nấm gây bệnh xác định được loài nấm gây bệnh rụng lá cao su tại Đồng Nai và Gia Lai là loài *Neopestalotiopsis saprophytica*.
5. Bào tử của GL1 tương tự, nhưng thời gian sinh ổ bào tử trên PDA chậm hơn ĐN1.
6. Nghiên cứu đặc điểm sinh học của nấm *Neopestalotiopsis saprophytica* chủng Đồng Nai 1 cho thấy: (1) PDA là môi trường thích hợp nhất cho sự phát triển và hình thành bào tử, (2) nhiệt độ tốt nhất cho sự phát triển của nấm ở 25°C, nhiệt độ lạnh hơn 10°C hoặc cao hơn 32°C nấm không có khả năng phát triển, (3) nấm *Neopestalotiopsis saprophytica* có khả năng phát triển trong phạm vi pH rộng từ 4,5 đến 8,0.

KIẾN NGHỊ

Tiếp tục nghiên cứu đặc điểm sinh thái và các yếu tố kiểm soát sự phát triển của nấm, đồng thời nghiên cứu sự tương tác của nấm *Neopestalotiopsis saprophyta* với các tác nhân gây bệnh khác có liên quan đến triệu chứng vàng lá và rụng lá cao su nhằm hiểu rõ hơn về các đặc điểm dịch tễ học của bệnh.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Priyadarshan, P. M., 2017, *Biology of Hevea Rubber*, Springer.
2. Abd Karim, Y., 2006, Modelling the rubber tree system.
3. Watson, G. A., 1989, Climate and soil, *Rubber*, pp. 124-164.
4. Fox, J., & Castella, J. C., 2013, Expansion of rubber (*Hevea brasiliensis*) in Mainland Southeast Asia: what are the prospects for smallholders?, *The Journal of Peasant Studies*, 40(1), pp. 155-170.
5. Carr, M. K. V., 2012, The water relations of rubber (*Hevea brasiliensis*): a review, *Experimental Agriculture*, 48(2), pp. 176-193.
6. Malaysian Rubber Board (MRB), January 2020, Pocket Book, Kuala Lumpur, Malaysia.
7. Vương Văn Quỳnh, 2020, Cây cao su không phải là cây có hại với môi trường, *Tap chí Cao su*, <http://tapchicaosu.vn/2020/11/16/cay-cao-su-khong-phai-la-cay-co-hai-voi-moi-truong/>
8. Li, B. X., Shi, T., Liu, X. B., Lin, C. H., & Huang, G. X., 2014, First report of rubber tree stem rot caused by *Fusarium oxysporum* in China, *Plant Disease*, 98(7), pp. 1008-1008.
9. Cai, Z. Y., Liu, Y. X., Li, G. H., Wang, Y. F., & Zhou, M., 2015, First report of *Alternaria alternata* causing black leaf spot of rubber tree in China, *Plant Disease*, 99(2), pp. 290-290.
10. Liang, X., Peng, Y., Liu, Y., Wang, M., Yang, Y., & Zhang, Y., 2019, First report of *Bipolaris bicolor* causing a leaf spot disease on rubber tree, *Journal of Phytopathology*, 167(10), pp. 553-557.
11. Ngobisa, A. N., Abidin, M. Z., Wong, M. Y., & Noordin, M. W., 2013, *Neofusicoccum ribis* associated with leaf blight on rubber (*Hevea brasiliensis*) in Peninsular Malaysia, *The Plant Pathology Journal*, 29(1), pp. 10-16.
12. Jinji, P., Xin, Z., Yangxian, Q., Yixian, X., Huiqiang, Z., & He, Z., 2007, First record of *Corynespora* leaf fall disease of Hevea rubber tree in China, *Australasian Plant Disease Notes*, 2(1), pp. 35-36.
13. Jacob, C. K., Edathil, T. T., Idicula, S. P., Jayarathnam, K., & Sethuraj, M. R., 1989, Effect of abnormal leaf fall disease caused by

- Phytophthora* sp. on the yield of rubber tree, *Indian Journal of Natural Rubber Research*, 2, pp. 77-80.
14. Guevara, A., López, M., Rivano, F., & Castro, O., 2022, First report of secondary leaf fall in rubber trees caused by *Phyllosticta capitalensis* in the Eastern Plains of Colombia, *New Disease Reports*, 45(2), pp. e12096.
 15. Guevara, A., López, M., Rivano, F., & Castro, O., 2022, First report of secondary leaf fall in rubber trees caused by *Phyllosticta capitalensis* in the Eastern Plains of Colombia, *New Disease Reports*, 45(2), pp. e12096.
 16. Sunpapao, A., & Pornsuriya, C., 2013, Chitosan inhibits the growth of *Phytophthora botryosa*: The causal agent of Para rubber leaf fall disease, *Plant Pathology Journal*, 12(2), pp. 92-97.
 17. Kusdiana, A. P. J., Sinaga, M. S., & Tondok, E. T., 2020, Diagnosis of causal agent of new rubber leaf fall disease (*Hevea brasiliensis* Muel. Arg), *Indonesian Journal of Natural Rubber Research*, 38(2), pp. 165-178.
 18. Le Thi Thanh Tam, Cuong, H. V., Khue, N. M., Tri, M. V., Thanh, H. M., Dung, P. N., ... & Liem, N. V., 2016, First report of powdery mildew caused by *Erysiphe quercicola* on *Hevea brasiliensis* in Viet Nam, *Plant Disease*, 100(6), pp. 1239-1239.
 19. Nguyễn Anh Nghĩa, 2018, Quản lý bệnh phấn trắng hiệu quả: Tiềm đề nâng cao năng suất mủ cao su, *Tạp chí Cao su*, <http://tapchicaosu.vn/2018/01/07/quan-ly-benh-phan-trang-hieu-qua-tien-de-nang-cao-nang-suat-mu-cao-su/>
 20. Le Thi Thanh Tam, Cuong, H. V., Khue, N. M., Tri, M. V., Thanh, H. M., Dung, P. N., ... & Liem, N. V., 2016, First report of powdery mildew caused by *Erysiphe quercicola* on *Hevea brasiliensis* in Viet Nam, *Plant Disease*, 100(6), pp. 1239-1239.
 21. Phan Thành Dũng, Vi Văn Toàn, 2000, Tình hình bệnh cây cao su tại Tây Nguyên, hiện trạng và hướng giải quyết, *Báo cáo hội thảo khoa học và công nghệ thành phố HCM và tỉnh Gia Lai phục vụ phát triển kinh tế xã hội*, tr. 35.

22. Nguyễn Thị Bích Ngọc, Ngô Vĩnh Viễn, Đoàn Thị Thanh, Phạm Thị Dung, Nguyễn Nam Dương, Đỗ Duy Hưng, Nguyễn Xuân Hồng, 2013, Nghiên cứu sự tồn tại của nấm *Corynespora cassiicola* (Berk. & Curt.) gây bệnh vàng rụng lá trên cây cao su tại Đông Nam Bộ, *Tạp chí Bảo vệ thực vật*, 6, tr. 36-42.
23. Nguyễn Tuấn Lộc, 2013, Bệnh rụng lá hại cao su và biện pháp phòng trừ, *Tạp chí Khoa học Công nghệ - Nghệ An*, 10, tr. 62-64.
24. Lê Thị An Nhiên, Lượng, N. D., Tiên, L. T. T., Quang, N. T., 2016, Khảo sát ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy, nhiệt độ, pH và thuốc bảo vệ thực vật đến sự phát triển của nấm *Corynespora cassiicola* (Berk. and Curt.) trên cây cao su, *Tạp chí Bảo vệ thực vật*, 5, tr. 51-56.
25. Nguyễn Thị Bích Ngọc, Ngô Vĩnh Viễn, Phạm Thị Dung, Nguyễn Nam Dương, Đỗ Duy Hưng, Ngô Thanh Hương, 2014, Nghiên cứu thử nghiệm một số biện pháp quản lý tổng hợp bệnh vàng rụng lá *Corynespora cassiicola* (Berk. & Curt.) hại cao su, *Tạp chí Bảo vệ thực vật*, 4, tr. 20-27.
26. Phạm Thị Ngọc Giàu, & Nguyễn Bảo Quốc, 2017, Biological control of *Corynespora cassiicola* causing Corynespora leaf fall disease (CLF) on rubber tree by *Bacillus thuringiensis* (T3), *International Proceedings of IRC 2017*, pp. 459-476.
27. Nguyễn Đôn Hiệu, Uyên, N. T. K., Vinh, N. P., Trang, N. T. T., Mai, N. N., Luân, Đ. N., Tuấn, B. T., Pha, T. A., & Nghĩa, N. A., 2022, Tác nhân gây bệnh rụng lá đốm tròn trên cây cao su ở tỉnh Đồng Nai và Bình Phước, *Hội thảo Quốc gia Bệnh hại thực vật Việt Nam lần thứ 21*, tr. 183-190.
28. Manju, M. J., Idicula, S. P., Jacob, C. K., Vinod, K. K., Prem, E. E., Suryakumar, M., & Kothandaraman, R., 2001, Incidence and severity of *Corynespora* leaf fall (CLF) disease of rubber in coastal Karnataka and North Malabar region of Kerala, *Indian Journal of Natural Rubber Research*, 14(2), pp. 137-141.
29. Putra, S., Ferry, Y., & Heryana, N., 2023, September, The effectiveness of essential oils as a bio-fungicide and potassium fertilizers in control of rubber leaf fall disease (*Corynespora* sp.), *In E3S Web of Conferences* Vol. 373, pp. 07007.

30. Abraham, A., Philip, S., Kuruvilla Jacob, C., & Jayachandran, K., 2013, Novel bacterial endophytes from *Hevea brasiliensis* as biocontrol agent against *Phytophthora* leaf fall disease, *BioControl*, 58, pp. 675-684.
31. Manju, M. J., Mushrif, S., Santhosh, H. M., Patil, R. S., Shankarappa, T. H., Benagi, V. I., & Idicula, S. P., 2019b, Evaluation of different fungi toxicants against *Corynespora cassicola* causing *Corynespora* Leaf Fall (CLF) disease of rubber [*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.], *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*, 8(2), pp. 1640-1647.
32. Khompatara, K., Pettongkhao, S., Kuyyogsuy, A., Deenamo, N., & Churngchow, N., 2019, Enhanced resistance to leaf fall disease caused by *Phytophthora palmivora* in rubber tree seedling by *Sargassum polycystum* extract, *Plants*, 8(6), 168.
33. Sirikamonsathien, T., Kenji, M., & Dethoup, T., 2023, Potential of endophytic *Trichoderma* in controlling *Phytophthora* leaf fall disease in rubber (*Hevea brasiliensis*), *Biological Control*, 179, pp. 105175.
34. Hirooka, T., & Ishii, H., 2013, Chemical control of plant diseases, *Journal of General Plant Pathology*, 6(79), pp. 390-401.
35. Murphy, A. M., Holcombe, L. J., & Carr, J. P., 2000, Characteristics of salicylic acid-induced delay in disease caused by a necrotrophic fungal pathogen in tobacco, *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 57(2), pp. 47-54.
36. Thaochan, N., Pornsuriya, C., Chairin, T., & Sunpapao, A., 2020, Roles of systemic fungicide in antifungal activity and induced defense responses in rubber tree (*Hevea brasiliensis*) against leaf fall disease caused by *Neopestalotiopsis cubana*, *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 111, pp. 101511.
37. Daslin, A., 2013, Genetic resistance of various introduced rubber clones to leaf fall diseases, *Indonesian Journal of Natural Rubber Research*, 32(2), pp. 79-87.
38. Coyier, D. L., & Roane, M. K., 1986, Compendium of rhododendron and azalea diseases, *Aps Press*.
39. Agrios, G. N., 2005, *Plant pathology*, Elsevier.

40. Keith, L. M., Velasquez, M. E., & Zee, F. T., 2006, Identification and characterization of *Pestalotiopsis* spp. causing scab disease of guava, *Psidium guajava*, in Hawaii, *Plant Disease*, 90(1), pp. 16-23.
41. Maharachchikumbura, S. S., Hyde, K. D., Groenewald, J. Z., Xu, J., & Crous, P. W., 2014, *Pestalotiopsis* revisited, *Studies in Mycology*, 79(1), pp. 121-186.
42. Pornsuriya, C., Chairin, T., Thaochan, N., & Sunpapao, A., 2020, Identification and characterization of *Neopestalotiopsis* fungi associated with a novel leaf fall disease of rubber trees (*Hevea brasiliensis*) in Thailand, *Journal of Phytopathology*, 168(7-8), pp. 416-427.
43. Cahyo, A. N., 2018, July, The Relationship between Climate and Plant Nutrient Status on *Fusicoccum* sp. In Leaf Fall Disease Outbreak in South Sumatra, Indonesia, *International Plant Protection Workshop* (Vol. 31).
44. Damiri, N., Pratama, Y., Febbiyanti, T. R., Rahim, S. E., Astuti, D. T., & Purwanti, Y., 2022, *Pestalotiopsis* sp. infection causes leaf fall disease of new arrivals in several clones of rubber plants, *Biodiversitas*, 23(8), pp. 3943-3949.
45. Alchemi, P. J. K., & Jamin, S., 2022, April, Impact Of *Pestalotiopsis* Leaf Fall Disease On Leaf Area Index and Rubber Plant Production, In IOP Conference Series: *Earth and Environmental Science*, Vol. 995, No. 1, pp. 012030.
46. Febbiyanti, T. R., & Fairuza, Z., 2019, Identification of causes of rubber leaves outbreak in Indonesia, *Jurnal Penelitian Karet*, 37(2), pp. 193-206.
47. Aliya, S. S. S., Nusaibah, S. A., Mahyudin, M. M., Yun, W. M., & Yusop, M. R., 2022, *Colletotrichum siamense* and *Pestalotiopsis jesteri* as potential pathogens of new rubber leaf spot disease via detached leaf assay, *Journal of Rubber Research*, 25(3), pp. 195-212.
48. Steyaert, R. L., 1949, Contribution à l'étude monographique de *Pestalotia* de Not. et *Monochaetia* Sacc. (*Truncatella* gen. nov. et *Pestalotiopsis* gen. nov.), *Bulletin du Jardin botanique de l'Etat, Bruxelles/Bulletin van den Rijksplantentuin, Brussel*, pp. 285-347.