

# ẢNH HƯỞNG CỦA ĐỘ THÀNH THỤC LÁ, TUỔI CÂY VÀ THỜI GIAN TRONG BUỒNG SINH TRƯỞNG ĐẾN LÂY NHIỄM NHÂN TẠO BỆNH SƯƠNG MAI (*Phytophthora infestans*) PHỤC VỤ CHỌN TẠO GIỐNG CÀ CHUA CHỐNG CHỊU BỆNH

Trần Ngọc Hùng<sup>1</sup>, Đặng Thị Mai<sup>1</sup>

## SUMMARY

Improvement of artificial inoculation technique applied in breeding tomato resistant to late blight (*Phytophthora infestans*)

To improve the artificial inoculation technique for breeding tomato resistant to late blight caused by *Phytophthora infestans*, the effects of tomato leaf and seedling ages as well as incubating duration in chamber after inoculation on the disease development were studied. Our results indicated that the disease symptom exposed more clearly in mature leaves than in young or old leaves, and 30 day-old seedlings are more sensitive to the pathogen. In addition, the incubating duration of inoculated seedlings in chamber set at 17°C, RH=100% and illuminated 8h daily by fluorescent affected strongly to the disease development. Tomato genotypes resistant or susceptible to the pathogen were discriminated clearly by incubation in the chamber for 24 - 48h and then moving the inoculated seedlings to greenhouse with natural light, 22-27°C, and high humidity. Disease severity is rated after inoculation 7 days.

## I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cà chua thích hợp trong điều kiện 20<sup>0</sup> - 25<sup>0</sup>C, và là cây rau chính ở nước ta trong vụ đông xuân. Đây cũng là thời vụ hội tụ nhiều yếu tố môi trường (nhiệt độ, ẩm độ, ánh sáng...) rất thuận lợi cho bệnh sương mai phát triển. Do tác hại gây ra mà bệnh sương mai được xếp vào loại bệnh nguy hiểm nhất đối với cà chua (Umaerus và Umaerus, 1994; Judelson, 1997; Garelik, 2002). Lý do dễ khẳng định mức độ nguy hiểm của bệnh này là: (1) Bệnh có thể hủy hoại toàn bộ cà chua chỉ trong vài ngày khi thấy xuất hiện trên đồng ruộng; (2) Nấm bệnh thường tồn tại với lượng rất thấp trên đồng ruộng do đó rất khó phát hiện, thông thường khi thấy bệnh xuất hiện là thời điểm quá muộn để phun thuốc phòng trừ, đồng thời hầu hết các isolate của nấm bệnh đều kháng thuốc Metalaxyl, loại thuốc được coi là hiệu quả nhất đối với bệnh này; (3) Mỗi vết bệnh sương mai có thể sản sinh ra đến 300.000

bào tử 1 ngày làm cho bệnh phát tán rất nhanh; (4) Chu kỳ sinh sản vô tính của nấm bệnh từ khi xâm nhập vào mô kỹ chủ đến khi tạo thành bào tử phát tán ra môi trường chưa đến 5 ngày (Fry và Goodwin, 1997b). Để hạn chế bệnh, kỹ thuật phổ biến nhất đang được nông dân áp dụng là phun thuốc trừ bệnh. Thời gian phun thuốc dựa vào các bản tin dự báo thời tiết (Raposo và CS, 1993; Davis và CS, 1996, 1998). Tuy nhiên, việc phun thuốc nhiều khi ít hiệu quả do tại thời điểm bệnh bùng phát thường trong giai đoạn mưa kéo dài và sự thay đổi độ ẩm của nấm (Kato và CS 1997; Fry và Goodwin, 1997a, 1997b; Goodwin và CS, 1998). Hơn nữa, các nghiên cứu mới đây cho thấy nhiều isolate nấm sương mai kháng lại hoạt chất Metalaxyl có trong các thuốc này (Le và CS, 2008).

Nguồn gen kháng bệnh sương mai đã được tìm thấy trong một số mẫu giống cà chua dại. Các gen *Ph1*, *Ph2*, *Ph3*, *Ph4*, *Ph5* đều có nguồn gốc từ nhóm cà chua

<sup>1</sup> Viện Nghiên cứu Rau quả.

*Lycopersicon pimpinellifolium* (Bonde và Murphy, 1952; Peirce 1970,1971; AVRDC, 1994). Để chuyển các gen kháng bệnh từ cà chua dại sang cà chua trồng trọt, lây bệnh nhân tạo là kỹ thuật không thể thiếu. Có một số nghiên cứu về lây bệnh nhân tạo với nấm *P. infestans*. Nhưng khi áp dụng các phương pháp đó chúng tôi gặp một số khó khăn: (1) Kết quả không đồng nhất khi sử dụng lá có độ tuổi khác nhau để lây nhiễm. (2) Không phản ánh rõ rệt mẫu kháng và mẫu nhiễm bệnh.... Đó là các vấn đề sẽ được làm sáng tỏ trong nghiên cứu này.

## II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 1. Vật liệu nghiên cứu

Nấm *P. infestans* được phân lập từ mẫu lá cà chua bị bệnh điển hình thu thập tại Viện Nghiên cứu Rau quả, và trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội vụ xuân 2009. Ngoài việc dựa trên triệu chứng vết bệnh, nguyên nhân gây bệnh còn được xác định dựa trên hình thái của bào tử sinh ra trên vết bệnh. Để duy trì tính độc, nấm bệnh luôn được giữ trên lá cà chua tươi, ở 17°C, 7 ngày cấy chuyển 1 lần.

### 2. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.1. Thí nghiệm nghiên cứu ảnh hưởng của tuổi lá đến mức độ miễn cảm bệnh sương mai

Lá của 2 mẫu giống cà chua miễn cảm bệnh là 08TP43 và 08TP48 dùng lây bệnh, các lá chét ở vị trí giữa lấy vào 3 giai đoạn có độ thành thực khác nhau: Lá già, lá bánh tẻ, lá non

Phương pháp lây bệnh: Ngắt lá cần nghiên cứu vào lúc sáng sớm (trước 9h), giữ trong khăn ẩm, mát. Sử dụng đĩa petry chứa môi trường thạch nước (water agar - WA) để tạo ẩm khí lây bệnh. Lá cà chua đặt úp xuống lớp WA, rồi nhỏ vào vị trí giữa lá 30µl dung dịch bào tử *P. infestans* có nồng độ 5000 bọc bào tử (sporangia/ml). Sau khi

lây nhiễm, hộp petry được đậy kín lại, giữ trong tủ định ôn 17°C. Đánh giá bệnh được thực hiện sau 7 ngày với 2 phương pháp: xác định số bào tử hình thành và cho điểm theo thang đánh giá như sau:

Điểm	Mức độ lá nhiễm bệnh	Đánh giá
1	Lá không xuất hiện vết bệnh	Kháng mạnh
2	Xuất hiện các chấm nhỏ trên lá (~1mm)	Kháng
3	Khoảng 25% diện tích lá bị bệnh	Kháng trung bình
4	~ 50% diện tích lá bệnh	Nhiễm nhẹ
5	~ 75% diện tích lá bệnh	Nhiễm trung bình
6	Hầu hết diện tích lá bị bệnh	Nhiễm nặng

#### 2.2. Nghiên cứu ảnh hưởng của tuổi cây đến mức độ miễn cảm của bệnh sương mai

Thí nghiệm được thực hiện trên 3 giống cà chua: P375 (Minh châu- Đài loan), Hồng châu (Syngenta), Savior (Syngenta), với 2 isolate nấm sương mai: R (thu thập tại Viện nghiên cứu Rau quả), N (thu thập tại Đại học Nông nghiệp Hà Nội). Dựa vào kết quả của thí nghiệm xác định mối liên quan giữa độ thành thực của lá với độ miễn cảm bệnh, lá bánh tẻ trên cây có độ tuổi khác nhau được chọn lây bệnh. Tuổi cây lây bệnh là: Sau gieo 30 ngày; sau gieo 45 ngày; sau gieo 60 ngày. Phương pháp lây nhiễm và đánh giá bệnh tương tự như thí nghiệm nghiên cứu ảnh hưởng của tuổi lá.

#### 2.3. Nghiên cứu ảnh hưởng của thời gian xử lý trong buồng sinh trưởng sau khi lây nấm *P. infestans* cây con

Hạt giống cà chua trước khi gieo được xử lý bằng dung dịch NaOCl 1% trong 15 phút rồi xả dưới vòi nước chảy 30 phút. Gieo hạt trong khay nhựa (70 lỗ/khay). Giá thể sử dụng để gieo hạt được phối trộn theo tỷ lệ: 50% xơ dừa + 50% giá thể GT5 (Viện thổ nhưỡng - nông hóa). Khay gieo được đặt trong nhà lưới, nhiệt độ 24°C - 30°C, luôn đảm bảo đủ ẩm.

Thí nghiệm 2 nhân tố được thiết kế như sau:

- Nhân tố giống: Sử dụng 2 mẫu giống cà chua là 09C13 (nhiễm bệnh) và 09C82 (kháng bệnh), với 3 lần lặp lại: mỗi lần gồm 35 cây, bố trí ngẫu nhiên hoàn toàn (CRD).

- Nhân tố thời gian xử lý trong buồng sinh trưởng: Dựa vào kết quả của thí nghiệm xác định thời gian miễn cảm nhất của cây với nấm bệnh, sau khi cây được 30 ngày sẽ phun dịch bào từ nấm sương mai với nồng độ  $10^4$  bào tử/ml vào cuối buổi chiều. Dung dịch được phun ướt đẫm toàn bộ cây thí nghiệm. Sau khi phun xong chia làm các công thức thí nghiệm sau:

+ CT1: Để cây sau lây nhiễm ở ngoài tự nhiên ( $22-27^{\circ}\text{C}$ ), luôn duy trì mặt lá ướt (âm độ 80-100%). Đây là công thức đối chứng.

+ CT2: Sau khi phun dịch bào từ dùng màng nylon trong suốt bọc toàn bộ khay cây nhằm duy trì ẩm độ bão hoà ( $\sim 100\%$ ). Sau đó cho vào buồng sinh trưởng có chế độ nhiệt  $17^{\circ}\text{C}$  và 8 giờ sáng, 16 giờ tối. Thời xử lý là 24h, sau đó bỏ ra ngoài như CT1.

+ CT3: Làm tương tự CT 2 nhưng thời gian xử lý là 48h

+ CT4: Thời gian xử lý là 72h

Sau 7 ngày lây nhiễm sẽ đánh giá mức độ biểu hiện bệnh của các công thức thí nghiệm theo thang điểm sau:

Điểm 0: cây không xuất hiện vết bệnh;  
Điểm 1: 1-10% diện tích lá bị bệnh; điểm 2: 11-20% diện tích lá bị bệnh; điểm 3: 21-40% diện tích lá bị bệnh; điểm 4: 41-70% diện tích lá bị bệnh; điểm 5: 71-90% diện tích lá bị bệnh; điểm 6: 91-100% diện tích lá bị bệnh

Điểm số sẽ cho theo từng cây riêng biệt, mức độ kháng - nhiễm bệnh sẽ chia ra các nhóm sau:

Kháng bệnh cao: có điểm từ 0.0-2.0; chống chịu bệnh: 2.1-4.0; nhiễm bệnh: 4.1-6.0.

### III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 1. Ảnh hưởng của tuổi lá đến mức độ nhiễm bệnh sương mai cà chua

Bằng kỹ thuật lây bệnh nhân tạo, và đánh giá ngoài đồng ruộng cho thấy mẫu giống 08TP43 và 08TP48 đều rất miễn cảm với bệnh sương mai nên đã được dùng trong thí nghiệm này.

Kết quả ở bảng 1 cho thấy, nếu căn cứ vào chỉ số bệnh thì mức độ nhiễm của các lá non (chưa thành thực) cao hơn các lá già trên cả 2 mẫu giống cà chua. Tuy nhiên, nếu xét theo số bào tử được hình thành thì thấy trên lá bánh tẻ bào tử tạo ra nhiều hơn rõ rệt. Kết quả này phần nào đồng nhất với kết quả của Nelson (2006): Các lá khác nhau về độ tuổi thành thực sẽ có mức phản ứng bệnh không giống nhau. Theo Nelson trên cây các lá già miễn cảm với bệnh nhiều hơn lá non dựa trên chỉ số bệnh. Cũng tương tự, trong cùng một lá, lá chết ở vị trí chính giữa dễ bị nhiễm bệnh hơn các lá chết xung quanh do lá chết giữa sớm thành thực hơn. Sự khác nhau giữa 2 thí nghiệm này có thể được cho rằng điều kiện thí nghiệm không hoàn toàn giống nhau. Thí nghiệm của Nelson cây được trồng trong buồng sinh trưởng với điều kiện nhiệt độ là  $26-28^{\circ}\text{C}$ , cường độ ánh sáng là  $135 \mu\text{mol photon/m}^2/\text{s}$ . Với điều kiện thí nghiệm này mô lá sẽ non hơn trồng ngoài tự nhiên. Tuy nhiên nếu căn cứ vào số lượng bào tử được hình thành thì giường như có quy luật chung là lá non ít miễn cảm bệnh hơn lá già và lá bánh tẻ. Vì vậy khi lấy mẫu lá để lây bệnh nhân tạo không nên chọn lá non. Các lá già nằm phía dưới dễ bị dính bẩn do mưa hoặc do quá trình canh tác nên kết quả lây nhiễm khó tránh khỏi nhiễm tạp bởi các vi sinh vật khác.

Bảng 1: Mối quan hệ giữa độ thành thực lá cà chua và độ miễn cảm bệnh sương mai

Mẫu giống cà chua	Độ thành thực lá	Chỉ số bệnh	Số bào tử sinh ra trên lá chết ( $\times 10^3$ )
08TP43	Non	5,7a	13,7c <sup>2</sup>
	Bánh tẻ	5,3b	19,0a
	Già	5,0c	15,7b
08TP48	Non	5,3a	12,3c
	Bánh tẻ	5,3a	20,7a
	Già	4,7b	14,3b

<sup>2</sup> Các số theo sau bởi các chữ giống nhau nghĩa là không sai khác có ý nghĩa  $\alpha_{.05}$

## 2. Ảnh hưởng của tuổi cây đến độ miễn cảm bệnh sương mai cà chua

Với 2 isolate nấm được lấy trên 3 giống cà chua miễn cảm với bệnh ở các độ tuổi khác nhau cho thấy mặc dù đều thực hiện lây bệnh trên lá bánh tẻ nhưng cây có độ tuổi khác nhau có mức độ nhiễm bệnh rất khác nhau. Tuy có sự sai khác ở mỗi giống, nhưng nhìn chung cây già ít miễn cảm bệnh hơn cây non. Kết quả nghiên cứu này phù hợp với nghiên cứu của Carnegie và Colhoun 1982, Stewart 1990. Khi nghiên cứu trên khoai tây cho thấy rằng cây non

thuận lợi hơn cho bệnh sương mai phát triển. Visker và cộng sự (2003) cũng chỉ ra rằng cây già kháng bệnh tốt hơn cây non. Nhưng trong thí nghiệm của Nelson (2006) thì sự khác biệt này không rõ ràng.

Trong thí nghiệm này chúng tôi nhận thấy đối với tất cả các giống được lây với các isolate khác nhau đều có chỉ số bệnh và số bào tử sinh ra cao nhất khi cây đạt 30 ngày tuổi. Đây là thời điểm tốt nhất để lây bệnh mà thí nghiệm này chỉ ra.

Bảng 2: Mối liên hệ giữa tuổi cây và độ miễn cảm bệnh sương mai

Isolate nấm	Giống cà chua	Tuổi cây (ngày)	Chỉ số bệnh	Bào tử ( $\times 1000$ /lá chết)
N	P375	30	6,0a	27a <sup>2</sup>
		45	6,0a	25a
		60	4,3b	14b
	Hong châu	30	6,0a	36a
		45	6,0a	30b
		60	5,3b	15c
	Savior	30	6,0a	26a
		45	6,0a	19b
		60	4,3b	16c
R	P375	30	6,0a	24a
		45	4,3b	16b
		60	4,0b	12b
	Hong châu	30	5,3b	30a
		45	6,0a	31a
		60	4,7c	17b
	Savior	30	6,0a	22a
		45	6,0a	17b
		60	4,3b	21a

<sup>2</sup> Các số theo sau bởi các chữ giống nhau nghĩa là không sai khác có ý nghĩa  $\alpha_{.05}$

**3. Ảnh hưởng của thời gian xử lý cây con trong buồng sinh trưởng (17°C, ẩm độ bão hòa ~100%) sau khi lây nấm *P.infestans***

Kết quả ở bảng 3 cho thấy thời gian xử lý nhiệt độ 17°C và ẩm độ bão hòa trong buồng sinh trưởng có ảnh hưởng rõ rệt đến kết quả lây bệnh nhân tạo. Ở công thức không xử lý, sau khi lây xong để ngoài điều kiện thường có phun ẩm thường xuyên nhưng do nhiệt độ cao 22°C-27°C nên nấm bệnh không phát triển được. Vì vậy bộ lá của cả 2 giống còn nguyên vẹn, không phân biệt được giống kháng và nhiễm bệnh.

Trong công thức xử lý từ 24h đến 48h phân biệt rất rõ giống kháng bệnh và giống nhiễm bệnh. Hầu hết các cây của giống nhiễm bệnh chết trong khi đó các cây của

giống kháng chỉ có các đốm nhỏ. Điều này cho thấy: Với thời gian trên trong điều kiện nhiệt độ và ẩm độ phù hợp, nấm sương mai có thể xâm nhập vào mô tế bào ký chủ để gây bệnh.

Tiếp tục xử lý trong buồng sinh trưởng đến 72h cũng phân biệt được rõ ràng mức độ nhiễm bệnh của các giống. Tuy nhiên với công thức này do thời gian để trong buồng sinh trưởng kéo dài nên các cây sống sót của giống kháng bệnh chuyển vàng, cây yếu. Vì vậy sau khi lây bệnh nhân tạo cần để cây trong điều kiện 17°C, ẩm độ bão hòa, trong 24-48h sau đó đưa ra ngoài nhưng vẫn thường xuyên duy trì ẩm độ trên bề mặt lá cao đến 7 ngày sau lây thì đánh giá tính kháng- nhiễm.

*Bảng 3: Mối quan hệ giữa tính kháng bệnh sương mai và thời gian xử lý cây lây nhiễm trong buồng sinh trưởng*

Thời gian xử lý	Mẫu giống	Chỉ số bệnh	Đánh giá
0h	09C13	0,06	Kháng bệnh cao
	09C82	0,00	Kháng bệnh cao
24h	09C13	5,46	Nhiễm bệnh
	09C82	0,23	Kháng bệnh cao
48h	09C13	5,83	Nhiễm bệnh
	09C82	1,03	Kháng bệnh cao
72h	09C13	6,00	Nhiễm bệnh
	09C82	2,29	Chống chịu bệnh

**IV. KẾT LUẬN**

1. Độ thành thực của lá cà chua có liên quan đến mức độ nhiễm bệnh. Khi lây bệnh nhân tạo bằng phương pháp lá tách rời nên dùng lá bánh tẻ.

2. Cây cà chua già ít mẫn cảm với bệnh sương mai hơn cây non. Sau khi gieo 30 ngày (cây có 4-5 lá thật) là thời điểm thích hợp cho lây bệnh sương mai nhân tạo

3. Đối với kỹ thuật lây bệnh nhân tạo cây con, sau khi lây nhiễm xong cần để cây trong điều kiện 17°C, ẩm độ bão hòa từ 24-48h sau đó để ở chỗ mát (22-27°C) thường xuyên phun ẩm, sau 7 ngày lây nhiễm sẽ đánh giá mức nhiễm bệnh.

**TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. AVRDC. 1994. 1993 progress report. Asian vegetable research and development center, Shanhua, Tainan, Taiwan: 201-203.
2. Davis, R.M., G. Hamilton, W.T.Lanini, T.H. Spreen and C.Osteen. 1998. The importance of pesticides and other pest management practices in U.S. tomato production. USDA, NAPIAP: Document number I-CA-98.
3. Fry, W.E. and S.B. Goodwin.1997a. Resurgence of the Irish potato famine fungus. Bioscience 47(6): 363-371.