

PHÁT HIỆN CÁC LOÀI *Colletotrichum* GÂY BỆNH THÁN THƯ ỚT BẰNG PHẢN ỨNG CHUỖI POLYMERASE

Nguyễn Duy Hưng^{1*}, Hà Viết Cường², Hoàng Chúng Lâm¹

¹*Viện nghiên cứu Rau quả, ²Khoa Nông học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam*

*Tác giả liên hệ: duyhungfavri@gmail.com

Ngày nhận bài: 21.01.2019

Ngày chấp nhận đăng: 19.02.2019

TÓM TẮT

Bệnh thán thư do nấm *Colletotrichum* spp. là một trong các bệnh nguy hiểm nhất trên ớt tại Việt Nam và thế giới. Định danh loài *Colletotrichum* gây bệnh thán thư ớt dựa trên các đặc điểm hình thái thường gây ra sự nhầm lẫn. Mục tiêu của nghiên cứu là thiết kế được các cặp mồi đặc hiệu phục vụ chẩn đoán nhanh, chính xác loài nấm *Colletotrichum* gây bệnh thán thư ớt bằng phản ứng chuỗi polymerase (PCR). Trong nghiên cứu này dựa trên trình tự vùng Internal Transcribed Spacer (ITS) và vùng liên gen của 2 gen *apn2* và *MAT1-2-1* genes (ApMat) đã thiết kế được 4 cặp mồi đặc hiệu. Các cặp mồi thiết kế đã phát hiện đặc hiệu 4 loài *C. truncatum*, *C. fruticola*, *C. gloeosporioides* sensu stricto và *C. siamense* gây bệnh thán thư ớt tại đồng bằng sông Hồng và một số tỉnh. Nghiên cứu cũng chứng tỏ phương pháp chiết nhanh DNA bằng NaOH có hiệu quả cao nhằm chuẩn bị mẫu DNA từ nấm *Colletotrichum* cho phản ứng PCR. Phân tích PCR dùng các mồi đặc hiệu trên 52 mẫu nấm *Colletotrichum* gây bệnh thán thư ớt thu tại 9 tỉnh đồng bằng Sông Hồng, 3 tỉnh trung du và miền núi phía Bắc và 1 tỉnh đồng bằng Sông Cửu Long đã xác định được loài phổ biến nhất là *C. siamense* (chiếm 51,9% tổng số mẫu), tiếp theo là *C. fruticola* (21,2%), *C. truncatum* (15,4%), và *C. gloeosporioides* sensu stricto (9,6%).

Từ khóa: Bệnh thán thư ớt, *Colletotrichum*, chẩn đoán, mồi đặc hiệu, PCR.

Detection of *Colletotrichum* Species Causing Anthracnose of Chili by Polymerase Chain reaction

ABSTRACT

Anthracnose caused by *Colletotrichum* spp. is one of the most destructive diseases of chili in Vietnam and worldwide. Identifying *Colletotrichum* species that cause anthracnose based on morphological characteristics often causes confusion. The objective of the study was to design specific primer pairs for rapid and accurate diagnosis of *Colletotrichum* fungus causing anthracnose by PCR (polymerase chain reaction). In the study, based on the Internal Transcribed Spacer (ITS) region and the intergenic region of *apn2* and *MAT1-2-1* genes (ApMat) four specific primer pairs were designed. Four species, i.e. *C. truncatum*, *C. fruticola*, *C. gloeosporioides* sensu stricto and *C. siamense* that cause chili anthracnose in the Red River Delta and some other provinces were detected. The study also showed that a modified rapid extraction protocol using NaOH was highly effective to prepare DNA samples from *Colletotrichum* cultures for PCR reaction. PCR analyses using the newly designed specific primers on 52 chili *Colletotrichum* isolates collected from 13 provinces, mainly the Red River Delta, revealed *C. siamense* as the most abundant species (51.9% of total isolates), followed by *C. fruticola* (21.2%), *C. truncatum* (15.4%), and *C. gloeosporioides* sensu stricto (9.6%).

Keywords: *Colletotrichum*, chili, specific primer design, diagnosis, PCR.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong số các bệnh hại ớt, bệnh thán thư do nấm *Colletotrichum* spp. gây ra được xem là nguy hiểm nhất. Cho tới năm 2008, thành phần

loài *Colletotrichum* gây bệnh thán thư ớt công bố trên thế giới khá đa dạng, bao gồm ít nhất 7 loài *C. gloeosporioides*, *C. capsici*, *C. acutatum*, *C. coccodes*, *C. dematium*, *C. nigrum* và *C. atramentarium* (Than et al., 2008). Tại Việt

Nam, ít nhất 4 loài là *C. acutatum*, *C. capsici*, *C. gloeosporioides*, *C. nigrum* đã được công bố gây bệnh thán thư ớt (Don *et al.*, 2007; Ngô Bích Hảo, 1992).

Định danh nấm *Colletotrichum* dựa vào các đặc điểm hình thái thường không đủ để phân loại tới mức loài nên đã có quá nhiều nhầm lẫn trong phân loại chi nấm này (Hyde *et al.*, 2009). Gần đây, định danh nấm *Colletotrichum* dựa trên phân tích phân tử ngày càng phổ biến và dẫn tới nhiều thay đổi trong phân loại các loài thuộc chi này (Cannon *et al.*, 2012).

Đối với nấm *Colletotrichum* gây bệnh thán thư trên ớt, các nghiên cứu phân loại mới gần đây cho thấy có sự thay đổi lớn về thành phần loài so với các công bố trước đây. Tại Ấn Độ, định danh lại 52 mẫu nấm *C. gloeosporioides* sensu lato cho thấy chúng thuộc 2 loài là *C. fruticola* và *C. siamense* (Sharma & Shenoy, 2013). Tương tự, 2 loài *C. acutatum* và *C. capsici*, vốn được coi là 2 loài chính gây hại trên ớt tại Thái Lan nay được định danh lại lần lượt là *C. simmondsii* và *C. truncatum* (Ko *et al.*, 2011). Cũng tại Thái Lan, gần đây hơn 4 loài *Colletotrichum* gây bệnh thán thư ớt đã được xác định là *C. gloeosporioides* sensu stricto, *C. siamense*, *C. acutatum* và *C. truncatum* (Suwannarat *et al.*, 2017). Tại Trung Quốc, phân tích trình tự của 1285 mẫu nấm *Colletotrichum* thu tại 29 tỉnh đã xác định được 15 loài trong đó có 5 loài phổ biến là *C. fioriniae*, *C. fruticola*, *C. gloeosporioides* sensu stricto, *C. scovillei*, and *C. truncatum* (Diao *et al.*, 2017). Tại Úc, phân tích 45 mẫu nấm *Colletotrichum* gây bệnh thán thư ớt đã xác định được 5 loài *C. siamense*, *C. simmondsii*, *C. queenslandicum*, *C. truncatum* và *C. cairnsense* (De Silva *et al.*, 2017).

Trong năm 2017, dựa trên đặc điểm hình thái và giải trình tự vùng Internal Transcribed Spacer (ITS) và vùng liên gen của 2 gen *apn2* và *MAT1-2-1* (ApMat) của các mẫu *Colletotrichum* gây bệnh thán thư ớt thu tại đồng bằng sông Hồng, ít nhất 5 loài là *C. truncatum*, *C. fruticola*, *C. gloeosporioides* sensu stricto, *C. aeshynomenes*, *C. siamense* đã được xác định (Nguyễn Duy Hưng và cs., 2017).

Xác định chính xác thành phần cũng như định danh đúng nấm *Colletotrichum* có vai trò quan trọng không những về mặt khoa học mà còn trong thực tiễn quản lý bệnh vì quan hệ giữa nấm với cây ký chủ cũng như tính miễn cảm với thuốc hóa học khác nhau theo loài (Mongkolporn *et al.*, 2010; Peres *et al.*, 2004).

Do xác định các loài *Colletotrichum* dựa trên các đặc điểm hình thái thường mất thời gian nên kỹ thuật PCR đã được áp dụng. Nhiều cặp mồi PCR đã được thiết kế để phát hiện các loài *Colletotrichum* gây hại trên ớt (Imjit *et al.*, 2012; Srinivasan *et al.*, 2014) cũng như các cây trồng khác (Kamle *et al.*, 2013; Torres-Calzada *et al.*, 2011; Shi *et al.*, 2008; Yao *et al.*, 2018). Tuy nhiên, các cặp mồi này đều được thiết kế trên vùng ITS vốn bảo thủ cao nên khó có thể phân biệt được các loài, đặc biệt trong các phức hợp loài như *C. gloeosporioides* sensu lato.

Mục tiêu của nghiên cứu này là thiết kế các cặp mồi đặc hiệu cho mỗi loài *Colletotrichum* phát hiện được trên ớt tại Việt Nam, chủ yếu tại đồng bằng sông Hồng, và ứng dụng chúng để phát hiện và đánh giá mức độ phổ biến của các loài *Colletotrichum* gây bệnh thán thư trên ớt.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Mẫu nấm

Các mẫu nấm *Colletotrichum* được phân lập từ vết bệnh thán thư trên quả ớt thu thập từ năm 2015-2017. Bào tử trên vết bệnh được hòa trong nước cất vô trùng và cấy rìa 3 chiều trên môi trường WA (Water Agar) chứa Streptomycin (100 ppm). Mẫu nấm thuần được tạo ra bằng cách cấy truyền tản nấm đơn (từ 1 bào tử) từ môi trường WA sang môi trường PDA (Potato Dextrose Agar).

2.2. Thiết kế mồi PCR

Để thiết kế mồi đặc hiệu, trình tự các mẫu đại diện cho các loài *Colletotrichum* (Type species) được tải từ Genbank và được căn trình tự đa chuỗi bằng phần mềm CLUSTAL X version 2.1 (Larkin *et al.*, 2007). Dựa trên các trình tự được căn trình tự đa chuỗi, các mồi được lựa chọn từ các trình tự đặc hiệu cho mỗi loài.

Đối với loài *C. truncatum*, mỗi đặc hiệu được thiết kế trên vùng ITS vì vùng này chứa nhiều vị trí khác biệt đặc trưng cho loài này (Nguyễn Duy Hưng và cs., 2017). Vùng ITS của loài này đã được căn trình tự đa chuỗi với 7 loài *Colletotrichum* đã được công bố gây bệnh thán thư ớt (Than *et al.*, 2008).

Đối với 3 loài *C. gloeosporioides sensu stricto*, *C. siamense* và *C. fructicola* của phức hợp loài *C. gloeosporioides sensu lato*, do trình tự ITS của chúng quá bảo thủ, nên trình tự vùng ApMat (Silva *et al.*, 2012) đã được sử dụng để thiết kế mỗi đặc hiệu. Trình tự ApMat của 28 loài thuộc phức hợp loài *C. gloeosporioides sensu lato* (Liu *et al.*, 2015) đã được lựa chọn để căn trình tự đa chuỗi.

Các mẫu *Colletotrichum* dùng để tối ưu hóa các môi thiết kế trong phản ứng PCR là các mẫu nấm phân lập từ ớt và đã xác định danh tính (Nguyễn Duy Hưng và cs., 2017) bao gồm *C. truncatum* (mẫu C25 và C30), *C. fructicola* (mẫu C1 và C14), *C. siamense* (mẫu C4 và C33), *C. gloeosporioides sensu stricto* (mẫu C9 và C44), *C. aescrynomenes* (mẫu C29).

2.3. Chiết DNA nấm

DNA tổng số của các mẫu nấm được chiết bằng 2 phương pháp.

Phương pháp 1 (CTAB) sử dụng đệm CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) theo qui trình của Doyle & Doyle (1987). Khoảng 50 mg tán nấm thuần nuôi cấy trên môi trường PDA được nghiền bằng chày nhựa chuyên dụng (Kontes™ Pellet Pestle) với 0,5 mL đệm CTAB trong ống Eppendorf loại 1,5 mL. DNA được chiết một lần với Chloroform: isoamyl alcohol (24:1). Cặn DNA được rửa hai lần bằng ethanol 70% và hòa trong 30 uL nước cất 2 lần vô trùng. Mẫu DNA được bảo quản ở -20°C.

Phương pháp 2 (NaOH) là phương pháp chiết nhanh bằng NaOH được cải tiến theo phương pháp của Wang *et al.* (1993). Tán nấm thuần (khoảng 50 mg) trên môi trường PDA được cho vào ống Eppendorf 1,5 mL chứa 50 µL NaOH 0,5 M và được nghiền bằng đầu tip loại 100-200 µL. Dịch nghiền, 5 µL, được chuyển sang ống Eppendorf 1,5 mL chứa 50 µL đệm Tris 0,1M, pH 8. Mẫu DNA được bảo quản ở -20°C.

2.4. Phản ứng PCR

Các phản ứng PCR được thực hiện bằng kit GoTaq Green Master Mix (Promega) hoặc kit 2X i-Taq PCR Master Mix (iNtRON Biotechnology). Phản ứng PCR được thực hiện với điều kiện sau: khởi đầu biến tính ở 94°C trong 2 phút; tiếp theo là 35 chu trình phản ứng gồm biến tính ở 94°C trong 30 giây, gắn mỗi ở 54-62°C trong 30 giây (thay đổi theo thí nghiệm và môi), tổng hợp sợi ở 72°C trong 1 phút. Phản ứng được kết thúc với 5 phút ở 72°C.

Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1% đã chuẩn bị bằng đệm TAE (Tris Acetic acid EDTA) và chứa 0,5 mg/mL ethidium bromide. Gel được chạy trên thiết bị điện di Mupid-exU Mini System (Helixxtec) với đệm TAE ở điện thế 100 V trong 30-40 phút.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Thiết kế mỗi đặc hiệu loài *Colletotrichum*

Dựa trên so sánh trình tự, bốn cặp mỗi đặc hiệu cho 4 loài *C. truncatum*, *C. gloeosporioides sensu stricto*, *C. siamense* và *C. fructicola* đã được thiết kế. Một loạt các tham số liên quan đến chất lượng của mỗi cũng đã được xác định dựa theo các hướng dẫn về thiết kế môi PCR (Dieffenbach *et al.*, 1993; Rychlik, 1993; Judelson, 2006) (Bảng 1).

Độ dài mỗi: Các môi có kích thước 17-22 nucleotit. Các kích thước này nằm trong phạm vi phù hợp của mỗi: đủ dài để đảm bảo tính đặc hiệu và đủ ngắn để mỗi gắn dễ dàng vào khuôn.

Nhiệt độ tách sợi (T_m): Hai cặp môi C.sia-F1/-R1 và C.glo-F/-R có nhiệt độ tách chuỗi từ 51,6-53,8°C, nằm trong phạm vi phù hợp 50-60°C. Hai cặp môi còn lại, C-tru-F/-R và C.fru-F1/-R1 có nhiệt độ tách sợi thấp hơn từ 41,2-49°C (Bảng 1).

Nhiệt độ gắn mỗi (T_a): Nhiệt độ gắn mỗi là một trong các tiêu chí quan trọng, được tính dựa trên nhiệt độ tách sợi. Nhiệt độ gắn mỗi quá cao làm mỗi khó gắn vào khuôn dẫn tới năng suất PCR thấp. Nhiệt độ gắn mỗi quá thấp làm mỗi dễ gắn không đặc hiệu vào khuôn dẫn tới tạo các sản phẩm không đặc hiệu. Một trong các công

thức phổ biến nhất nhằm xác định nhiệt độ gắn mỗi tối ưu của cặp mỗi là: $T_a = 0,3 \times T_m$ (của mỗi có nhiệt độ tách sợi thấp hơn) $+ 0,7 T_m$ (của sản phẩm) $-14,9$ (Rychlik *et al.*, 1990). Sử dụng công thức này trong phần mềm PrimerSelect (DNASTAR Inc.), nhiệt độ gắn mỗi tối ưu của 4 cặp mỗi thiết kế được xác định là từ $53-55,9^\circ\text{C}$ (Bảng 1), nằm trong phạm vi phù hợp $50-60^\circ\text{C}$.

Hàm lượng GC: Hàm lượng các gốc G và C của các mỗi thiết kế từ $42,9-57,9\%$ (Bảng 1) nằm trong phạm vi phù hợp $40-60\%$.

Mẫu GC đầu 3': Tất cả 7 mỗi thiết kế ngoại trừ mỗi C.sia-R1 đều có ở đầu 3' là G hoặc C hoặc GC hoặc CG hoặc GG (Bảng 1). Mẫu GC cho phép mỗi bám đặc hiệu vào khuôn.

Độ ổn định đầu 3': Khoảng 5 nucleotit (pentamer) đầu 3' cần có độ ổn định phù hợp để gắn đặc hiệu vào khuôn. Giá trị ΔG của 5 nucleotit đầu 3' của tất cả các mỗi thiết kế có giá trị từ $-10,5$ kcal/mol đến $-7,1$ kcal/mol (Bảng 1), nằm trong ngưỡng giới hạn tối đa ≥ -12 kcal/mol.

Cấu trúc thứ cấp: Cấu trúc thứ cấp có thể hình thành trong cùng một mỗi hoặc giữa 2 mỗi. Mỗi chứa cấu trúc thứ cấp xấu thường dẫn tới năng suất PCR bị giảm, thậm chí không có sản phẩm. Tính ổn định của cấu trúc thứ cấp được đo bằng năng lượng tự do Gibbs ΔG (năng lượng cần để phá vỡ cấu trúc thứ cấp). Các loại cấu trúc thứ cấp là:

+ Cấu trúc kẹp tóc (Hairpins). Là cấu trúc thứ cấp hình thành trong nội bộ mỗi. Tất cả các mỗi thiết kế đều có giá trị ΔG tối đa từ -3 kcal/mol đến 2 kcal/mol (Bảng 1), nằm trong ngưỡng giới hạn tối đa ≥ -5 kcal/mol.

+ Tự mỗi (Self Dimer). Là cấu trúc hình thành giữa các phân tử của cùng loại mỗi. Tất cả các mỗi thiết kế đều có giá trị ΔG tối đa từ $-5,9$ kcal/mol đến $0,3$ kcal/mol (Bảng 1), nằm trong ngưỡng giới hạn tối đa ≥ -6 kcal/mol.

+ Tự mỗi chéo (Cross Dimer). Là cấu trúc hình thành giữa các phân tử của 2 mỗi khác nhau (cặp mỗi trong phản ứng PCR). Tất cả các mỗi thiết kế đều có giá trị ΔG tối đa từ $-0,4$ kcal/mol đến $-0,2$ kcal/mol (Bảng 1), nằm trong ngưỡng giới hạn tối đa ≥ -6 kcal/mol.

3.2. Xác định nhiệt độ gắn mỗi phù hợp cho bốn cặp mỗi thiết kế

Một trong các yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến tính đặc hiệu và hiệu suất của mỗi là nhiệt độ gắn mỗi. Mặc dù nhiệt độ gắn mỗi tối ưu cho 4 cặp mỗi đã được xác định bằng phần mềm (Bảng 1) nhưng chúng cần phải được xác định bằng thực nghiệm. Sử dụng DNA được chiết từ các mẫu nấm đã được xác định danh tính, phản ứng PCR đã được thực hiện ở 3 ngưỡng nhiệt độ là 54 , 58 và 62°C nhằm xác định nhiệt độ gắn mỗi phù hợp cho 4 cặp mỗi thiết kế. Kết quả kiểm tra PCR (Bảng 2, Hình 1) cho thấy:

Cặp mỗi C.tru-F và C.tru-R (đặc hiệu loài *C. truncatum*) có khả năng phát hiện đặc hiệu loài này ở phạm vi nhiệt độ rất rộng. Ở cả 3 ngưỡng nhiệt độ, cặp mỗi này chỉ tạo băng sản phẩm mong muốn 321 bp đối với 2 mẫu C30 và C25 (*C. truncatum*).

Tương tự, cặp mỗi C.glo-F và C.glo-R (đặc hiệu loài *C. gloeosporioides sensu stricto*) cũng có khả năng phát hiện đặc hiệu loài nấm này ở cả 3 ngưỡng nhiệt độ, chỉ tạo băng sản phẩm mong muốn 211 bp đối với 2 mẫu C9 và C44 (*C. gloeosporioides sensu stricto*).

Đối với cặp mỗi C.fruc-F1 và C.fruc-R1 (đặc hiệu loài *C. fructicola*), ở nhiệt độ gắn mỗi 54°C , băng đặc hiệu 307 bp mặc dù chỉ hình thành ở 2 mẫu C1 và C14 (*C. fructicola*) nhưng mờ, có lẽ do hình thành nhiều sản phẩm tự mỗi hoặc tự mỗi chéo (dimer). Ngoài ra, ở ngưỡng nhiệt độ này, cặp mỗi cũng tạo sản phẩm không đặc hiệu ~ 800 bp đối với mẫu C29 (*C. aeshynomenes*) và ~ 150 bp đối với mẫu C25 (*C. truncatum*). Ở nhiệt độ gắn mỗi 58°C , cặp mỗi đã tạo băng đặc hiệu rõ đối với 2 mẫu C1 và C14 (*C. fructicola*) chứng tỏ mức độ hình thành dimer đã giảm. Tuy nhiên, ở ngưỡng nhiệt độ 58°C , cặp mỗi cũng tạo băng sản phẩm đặc hiệu rất mờ đối với mẫu C44 (*C. gloeosporioides sensu stricto*). Khi tăng nhiệt độ lên 62°C , cặp mỗi này chỉ tạo băng đặc hiệu và rõ đối với 2 mẫu C1 và C14 và không tạo bất kỳ băng sản phẩm nào đối với các mẫu *Colletotrichum* khác.

Bảng 1. Đặc điểm 4 cặp mồi được thiết kế để phát hiện *C. truncatum*, *C. fructicola*, *C. siamense* và *C. gloeosporioides sensu stricto*

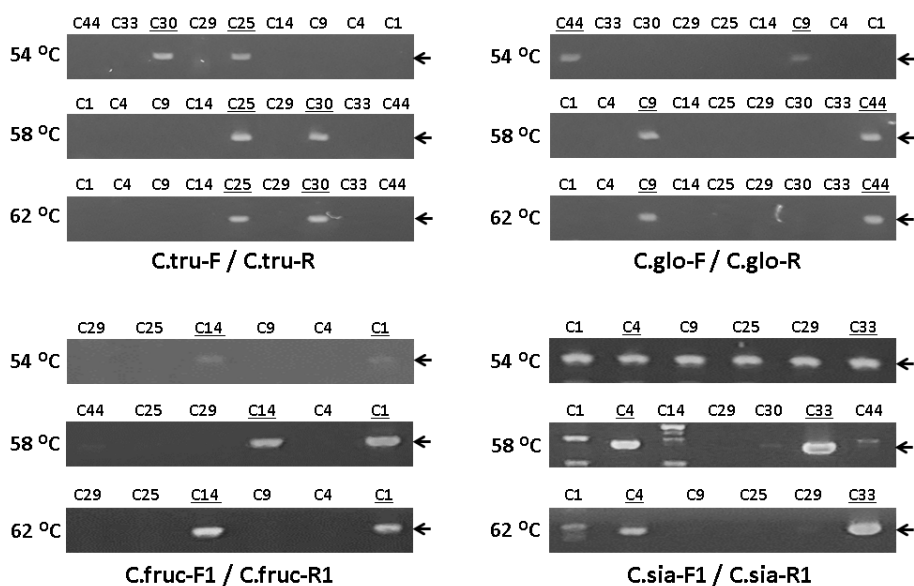
Mồi	Trình tự (5'-3')	Độ dài mồi (nu)	Mẫu GC đầu 3'	Hàm lượng GC (%)	Nhiệt độ tách mồi (°C)	ΔG pentamer đầu 3' (kcal/mol)	ΔG cấu trúc kẹp tóc tối đa (kcal/mol)	ΔG tự mồi tối đa (kcal/mol)	ΔG tự mồi chéo tối đa (kcal/mol)	Nhiệt độ gắn mồi tối ưu (°C)	Độ dài sản phẩm (bp)
C.tru-F	GTCCCCTAAAAAGGACGTC	19	C	52,6	47,7	-9,4	-1,9	-4,4	-2,9	53	321
C.tru-R	CCTACGTCAACCGTAGAG	18	G	55,6	42,2	-7,1	-3,1	-2,5			
C.fruc-F1	CATCAAATCGAAGATCTCTGC	21	GC	42,9	49,0	-9,9	1,1	-2,8	-0,2	55,3	307
C.fruc-R1	CTTTAGGTCGTCCTTGTGTTC	21	C	47,6	48,2	-8,2	1,2	0,3			
C.sia-F1	TGACAGCGGCTGTGTATCG	19	CG	57,9	52,8	-9	0,8	-3	-0,4	54,2	345
C.sia-R1	GATACTTAGGCGTACGAATGCA	22	Không	45,5	51,6	-10,5	2	-5,9			
C.glo-F	ACTCTTGCCGCAGCATATAGG	21	GG	52,4	53,8	-8,1	0,8	-0,1	-2	55,9	211
C.glo-R	GTAGCATCAGCAACGAATTGG	21	GG	47,6	52,5	-10,4	2	-0,4			

Ghi chú: Các tham số nhiệt động học của mồi gồm nhiệt độ tách mồi, ΔG pentamer đầu 3', ΔG cấu trúc kẹp tóc tối đa, ΔG tự mồi tối đa và ΔG tự mồi chéo tối đa được xác định dùng phần mềm VectorNTI Advance 11.5 (Invitrogen), trong đó ΔG là năng lượng tự do Gibbs. Nhiệt độ gắn mồi tối ưu được xác định bằng phần mềm PrimerSelect (DNASTAR, Inc.).

Bảng 2. Xác định nhiệt độ gắn mỗi phù hợp của 4 cặp môi thiết kế

Cặp môi	Loài nấm kiểm tra	Bảng PCR đặc hiệu ở các ngưỡng nhiệt độ		
		54°C	58°C	62°C
C.tru-F/-R	<i>C. truncatum</i>	++	+++	+++
	<i>C. fruticola</i>	-	-	-
	<i>C. siamense</i>	-	-	-
	<i>C. gloeosporioides sensu stricto</i>	-	-	-
	<i>C. aeshynomenes</i>	-	-	-
C.fruc-F1/-R1	<i>C. truncatum</i>	-	-	-
	<i>C. fruticola</i>	+	+++	+++
	<i>C. siamense</i>	-	-	-
	<i>C. gloeosporioides sensu stricto</i>	-	-	-
	<i>C. aeshynomenes</i>	-	-	-
C.sia-F1/-R1	<i>C. truncatum</i>	+++	+	-
	<i>C. fruticola</i>	+++	-	-
	<i>C. siamense</i>	+++	+++	+++
	<i>C. gloeosporioides sensu stricto</i>	+++	-	-
	<i>C. aeshynomenes</i>	+++	-	-
C.glo-F/-R	<i>C. truncatum</i>	-	-	-
	<i>C. fruticola</i>	-	-	-
	<i>C. siamense</i>	-	-	-
	<i>C. gloeosporioides sensu stricto</i>	++	+++	+++
	<i>C. aeshynomenes</i>	-	-	-

Chú thích: (-): không xuất hiện băng đặc hiệu; (+, ++, +++): mức độ đậm của băng đặc hiệu



Ghi chú: Mũi tên chỉ bằng sản phẩm mong muốn cho từng cặp môi. Các giếng là các mẫu nấm đã xác định danh tính: C25 và C30 (*C. truncatum*), C1 và C14 (*C. fruticola*), C4 và C33 (*C. siamense*), C9 và C44 (*C. gloeosporioides sensu stricto*), C29 (*C. aeshynomenes*).

Hình 1. PCR xác định nhiệt độ gắn mỗi phù hợp cho 4 cặp môi đặc hiệu *Colletotrichum*

Đối với cặp mỗi C.sia-F1 và C.sia-R1 (đặc hiệu loài *C. siamense*), phản ứng PCR ở nhiệt độ gần mỗi 54°C đã tạo băng đặc hiệu 345 bp với tất cả các mẫu nấm. Ở nhiệt độ gần mỗi 58°C, cặp mỗi này đã tạo băng đặc hiệu rõ đối với 2 mẫu C4 và C33 (*C. siamense*) và rất mờ đối với mẫu C30 (*C. truncatum*). Ở ngưỡng nhiệt độ 58°C, cặp mỗi cũng tạo băng sản phẩm không đặc hiệu đối với mẫu C1 (*C. fructicola*) và C44 (*C. gloeosporioides sensu stricto*). Khi tăng nhiệt độ gần mỗi lên 62°C, cặp mỗi này đã tạo băng đặc hiệu, rõ đối với 2 mẫu C4 và C33 (*C. siamense*). Ở nhiệt độ gần mỗi 62°C, cặp mỗi vẫn tạo băng không đặc hiệu đối với mẫu C1 (*C. fructicola*), tuy nhiên băng này có thể phân biệt được với băng đặc hiệu.

Dựa trên các kết quả trên, nhiệt độ gần mỗi tối ưu đối với 3 cặp mỗi C.tru-F/-R, C.fru-F1/-R1 và C.glo-F/-R là từ 58-62°C, đối với cặp mỗi C.sia-F1/-R1 là 62°C.

3.3. Đánh giá phương pháp chiết nhanh DNA từ mẫu nấm *Colletotrichum* bằng NaOH

Bốn cặp mỗi thiết kế đặc hiệu cho 4 loài *Colletotrichum* đã được kiểm tra PCR trên các mẫu nấm đã được định danh loài. DNA của mỗi mẫu nấm được chiết bằng cả 2 phương pháp là CTAB và chiết nhanh bằng NaOH. Kết quả kiểm tra PCR (Bảng 3 và Hình 2) cho thấy băng PCR đặc hiệu hình thành ở 8 mẫu nấm đều rõ tương đương nhau ở 2 phương pháp.

Phương pháp chiết nhanh bằng NaOH vốn được áp dụng đầu tiên để chiết DNA từ mô thực vật (Wang *et al.*, 1993) dựa trên khả năng phân hủy nhanh vách và màng tế bào thực vật và giải phóng DNA của NaOH. Gần đây, Osmundson *et al.* (2013) đã đánh giá phương pháp chiết nhanh DNA của nhiều loài nấm thật và *Phytophthora* bằng NaOH cho phản ứng PCR và đã khẳng định phương pháp rất hiệu quả, tin cậy mặc dù năng suất DNA thu được không cao bằng các phương pháp chiết khác. Trong qui trình của Wang *et al.* (1993) và Osmundson *et al.* (2013), dịch nghiền mô thực vật hoặc nấm trong NaOH 0,5 M được hòa loãng 500 lần với đệm Tris 0,1 M, pH8. Trong nghiên cứu của chúng tôi,

dịch nghiền nấm *Colletotrichum* trong NaOH chỉ được hòa loãng 11 lần trọng đệm Tris, và do đó làm tăng nồng độ DNA của mẫu chiết. Kết quả so sánh phản ứng PCR giữa 2 phương pháp cũng chứng tỏ nấm *Colletotrichum* không tạo các chất ức chế phản ứng PCR và độ hòa loãng thấp của dịch NaOH trong đệm Tris không làm thay đổi nồng độ ion Na⁺ và pH tới mức ảnh hưởng tới hiệu suất phản ứng PCR.

Dựa trên kết quả nghiên cứu, phương pháp chiết nhanh bằng NaOH cải tiến hoàn toàn phù hợp để chiết DNA từ mẫu nấm *Colletotrichum* cho phản ứng PCR. Phương pháp có nhiều ưu điểm nhưng rất đơn giản, nhanh, rẻ và giảm thiểu nguy cơ nhiễm chéo giữa các mẫu.

3.3. Xác định thành phần loài *Colletotrichum* gây bệnh thán thư ớt bằng PCR

Sau khi xác định được nhiệt độ gần mỗi phù hợp cho 4 cặp mỗi thiết kế và phương pháp chiết DNA tối ưu từ mẫu nấm *Colletotrichum*, phản ứng PCR đã được thực hiện trên 52 mẫu nấm *Colletotrichum* gây bệnh thán thư ớt thu tại 9 tỉnh đồng bằng sông Hồng và 4 tỉnh khác gồm Bắc Giang, Thái Nguyên, Sơn La và Tiền Giang. Đầu tiên, các mẫu nấm được kiểm tra PCR bằng cặp mỗi C.sia-F1/-R1. Tiếp theo các mẫu nấm âm tính với cặp mỗi này lại được kiểm tra lần lượt bằng các cặp mỗi C.fru-F/-R1, C.glo-F/-R và C.tru-F/-R theo phương pháp loại trừ.

Kết quả kiểm tra PCR các mẫu nấm *Colletotrichum* thu thập (Bảng 4) đã xác định được 27 mẫu nấm là loài *C. siamense*, 11 mẫu nấm là loài *C. fructicola*, 5 mẫu nấm là loài *C. gloeosporioides sensu stricto* và 8 mẫu nấm là loài *C. truncatum*. Riêng mẫu C29 phản ứng âm tính với cả 4 cặp mỗi và giải trình tự vùng ApMat đã xác định mẫu này là loài *C. aeshynomenes* (Nguyễn Duy Hưng và cs., 2017).

3.4. Phân bố và mức độ đa dạng của các loài *Colletotrichum* gây bệnh thán thư ớt

Dựa trên kết quả PCR, phân bố các loài nấm *Colletotrichum* gây bệnh thán thư ớt tại đồng bằng sông Hồng và một số tỉnh đã được xác định (Bảng 5, Hình 3).

3.4.1. Phân bố của *C. siamense*

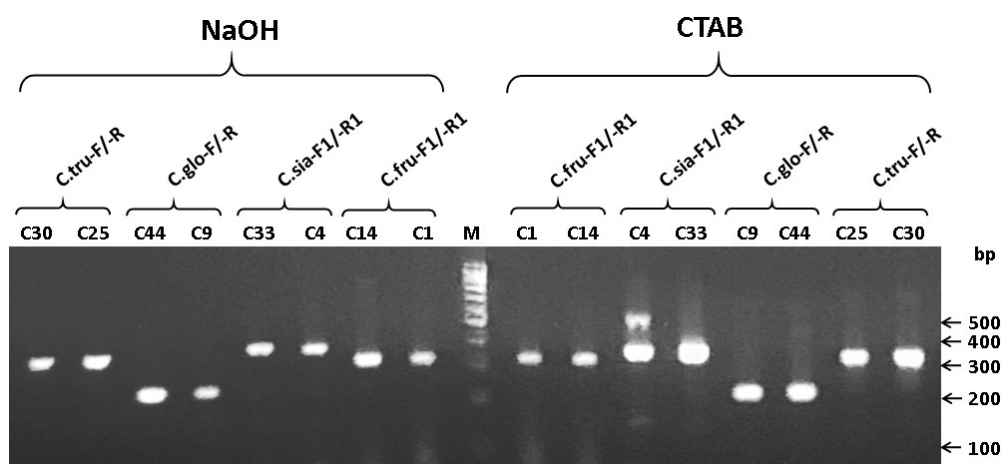
C. siamense là loài nấm phổ biến nhất, được phát hiện ở tất cả 13 tỉnh thu thập mẫu gồm 9 tỉnh đồng bằng sông Hồng, 3 tỉnh trung du miền núi phía Bắc (Thái Nguyên, Bắc Giang, Sơn La) và 1 tỉnh đồng bằng sông Cửu Long (Tiền Giang) (Bảng 5). Số lượng loài này được phát hiện cũng nhiều nhất, chiếm 51,9% tổng số mẫu thu thập tại 13 tỉnh (tổng mẫu = 52) và 51,2% tổng số mẫu thu thập tại đồng bằng sông Hồng (tổng mẫu = 41) (Hình 3).

C. siamense là loài được phát hiện đầu tiên trên cà phê tại Thái Lan năm 2009 (Prihastuti *et al.*, 2009) và có phổ ký chủ rất rộng (Weir *et al.*, 2012). Mặc dù loài này đã phát hiện gây hại trên ớt tại Thái Lan (Suwannarat *et al.*, 2017) và Ấn Độ (Sharma & Shenoy, 2013), Úc (De Silva *et al.*, 2017) nhưng lại không được liệt kê trong thành phần loài hại ớt tại Trung Quốc (Diao *et al.*, 2017). Loài *C. hymenocallidis*, một trong các loài phát hiện trên ớt tại Trung Quốc (Diao *et al.*, 2017) cũng chính là *C. siamense* theo nghiên cứu của Liu *et al.* (2016).

Bảng 3. PCR so sánh hai phương pháp chiết DNA mẫu nấm

Cặp mồi	Loài	Mẫu kiểm tra	Bảng PCR đặc hiệu ở hai phương pháp chiết DNA nấm	
			CTAB	NaOH
C.glo-F/-R	<i>C. gloeosporioides sensu stricto</i>	C9	+++	+++
		C44	+++	++
C.fruc-F1/-R1	<i>C. fructicola</i>	C1	++	++
		C14	++	+++
C.sia-F1/-R1	<i>C. siamense</i>	C4	+++	++
		C33	+++	++
C.tru-F/-R	<i>C. truncatum</i>	C25	+++	++
		C30	+++	+++

Chú thích: ++, +++; mức độ đậm của băng đặc hiệu



Ghi chú: M là thang DNA 100 bp (Generuler 100 bp, Thermo Scientific) với các băng từ 100-500 bp được chỉ bằng mũi tên. Các giếng là các mẫu nấm đã xác định danh tính: C25 và C30 (*C. truncatum*), C1 và C14 (*C. fructicola*), C4 và C33 (*C. siamense*), C9 và C44 (*C. gloeosporioides sensu stricto*)

Hình 2. Phản ứng PCR so sánh 2 phương pháp chiết DNA (CTAB và NaOH) nấm *Colletotrichum* với 4 cặp mồi đặc hiệu

Bảng 4. Phát hiện các loài *Colletotrichum* gây bệnh thán thư ớt thu thập bằng PCR

Mẫu	Địa điểm thu thập	Năm thu thập	Phản ứng PCR				Loài xác định
			C.sia-F1/-R1	C.fruc-F1/-R1	C.glo-F/-R	C.tru-F/R	
C1	Trâu Quỳ, Gia Lâm, Hà Nội	2015	-	+	-	-	<i>C. fruticola</i>
C2	Trâu Quỳ, Gia Lâm, Hà Nội	2015	+	0	-	0	<i>C. siamense</i>
C3	Quỳnh Hội, Quỳnh Phụ, Thái Bình	2015	-	+	-	0	<i>C. fruticola</i>
C4	Quỳnh Hội, Quỳnh Phụ, Thái Bình	2015	+	-	0	-	<i>C. siamense</i>
C5	Hoàn Long, Yên Mỹ, Hưng Yên	2015	+	0	0	0	<i>C. siamense</i>
C6	Dạ Trạch, Khoái Châu, Hưng Yên	2015	-	+	-	0	<i>C. fruticola</i>
C7	Đông Tảo, Khoái Châu, Hưng Yên	2015	+	0	0	0	<i>C. siamense</i>
C8	Tiền Phong, Ân Thi, Hưng Yên	2015	-	0	0	+	<i>C. truncatum</i>
C9	An Bình, Lương Tài, Bắc Ninh	2015	-	0	+	0	<i>C. gloeosporioides</i> s.s
C10	An Bình, Lương Tài, Bắc Ninh	2015	-	+	-	0	<i>C. fruticola</i>
C11	Trung Khê, Lương Tài, Bắc Ninh	2015	+	0	0	0	<i>C. siamense</i>
C12	Trung Khê, Lương Tài, Bắc Ninh	2015	+	0	0	0	<i>C. siamense</i>
C13	Trần Dương, Vĩnh Bảo, Hải Phòng	2015	-	0	0	+	<i>C. truncatum</i>
C14	Trần Dương, Vĩnh Bảo, Hải Phòng	2015	-	+	0	0	<i>C. fruticola</i>
C15	Trần Dương, Vĩnh Bảo, Hải Phòng	2015	-	0	+	0	<i>C. gloeosporioides</i> s.s
C16	Trần Dương, Vĩnh Bảo, Hải Phòng	2015	+	0	0	0	<i>C. siamense</i>
C17	Trần Dương, Vĩnh Bảo, Hải Phòng	2015	+	0	0	0	<i>C. siamense</i>
C18	Trần Dương, Vĩnh Bảo, Hải Phòng	2015	+	0	0	0	<i>C. siamense</i>
C19	Quỳnh Hải, Quỳnh Phụ, Thái Bình	2015	+	0	0	0	<i>C. siamense</i>
C20	Quỳnh Hải, Quỳnh Phụ, Thái Bình	2015	0	-	0	+	<i>C. truncatum</i>
C22	Nhân Hưng, Lý Nhân, Hà Nam	2015	+	0	0	0	<i>C. siamense</i>
C23	Nhân Hưng, Lý Nhân, Hà Nam	2015	+	0	0	0	<i>C. siamense</i>
C24	Dạ Trạch, Khoái Châu, Hưng Yên	2015	+	0	0	0	<i>C. siamense</i>
C25	Văn Đức, Gia Lâm, Hà Nội	2015	-	0	-	+	<i>C. truncatum</i>
C26	Hoàn Long, Yên Mỹ, Hưng Yên	2015	-	0	+	0	<i>C. gloeosporioides</i> s.s

Phát hiện các loài *Colletotrichum* gây bệnh thán thư ớt bằng phản ứng chuỗi polymerase

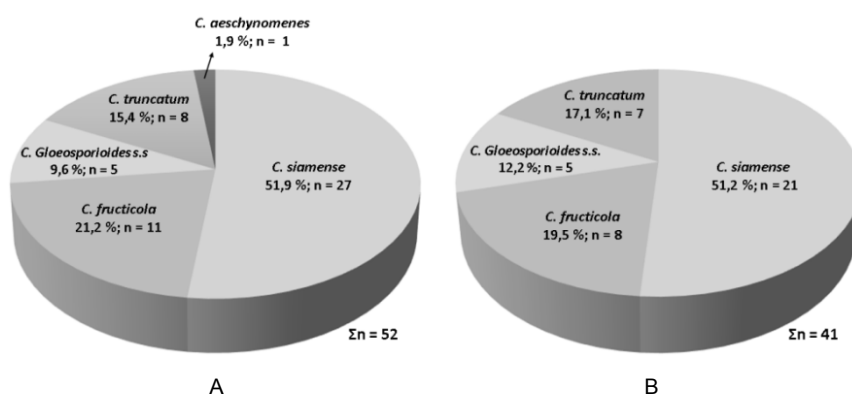
C27	Nhân Hưng, Lý Nhân, Hà Nam	2015	+	0	0	0	<i>C. siamense</i>
C28	Thanh Ninh, Phú Bình, Thái Nguyên	2015	+	0	0	0	<i>C. siamense</i>
C29	Thanh Ninh, Phú Bình, Thái Nguyên	2015	-	-	-	-	<i>C. aeschynomenes</i>
C30	Vân Nội, Đông Anh, Hà Nội	2015	-	-	0	+	<i>C. truncatum</i>
C31	Nhân Hưng, Lý Nhân, Hà Nam	2015	+	0	-	0	<i>C. siamense</i>
C32	Thị trấn Nông trường, Mộc Châu, Sơn La	2015	-	+	-	0	<i>C. fructicola</i>
C33	Đông Sang, Mộc Châu, Sơn La	2015	+	0	0	0	<i>C. siamense</i>
C34	Đông Sang, Mộc Châu, Sơn La	2015	-	+	-	0	<i>C. fructicola</i>
C35	Long Thành, Long Định, Tiền Giang	2016	-	0	0	+	<i>C. truncatum</i>
C36	Long Thành, Long Định, Tiền Giang	2016	+	0	0	0	<i>C. siamense</i>
C37	Nhân Hưng, Lý Nhân, Hà Nam	2016	+	0	-	0	<i>C. siamense</i>
C38	Mỹ Tiến, Mỹ Lộc, Nam Định	2016	+	0	0	0	<i>C. siamense</i>
C39	Mỹ Tân, Mỹ Lộc, Nam Định	2016	-	0	+	0	<i>C. gloeosporioides s.s</i>
C40	Hợp Đức, Tân Yên, Bắc Giang	2016	+	0	0	0	<i>C. siamense</i>
C41	Hợp Đức, Tân Yên, Bắc Giang	2016	+	0	0	0	<i>C. siamense</i>
C42	Song Vân, Tân Yên, Bắc Giang	2016	+	0	0	0	<i>C. siamense</i>
C43	Song Vân, Tân Yên, Bắc Giang	2016	-	+	-	0	<i>C. fructicola</i>
C44	Cổ Bi, Gia Lâm, Hà Nội	2016	-	-	+	-	<i>C. gloeosporioides s.s</i>
C45	Cổ Bi, Gia Lâm, Hà Nội	2016	-	+	-	0	<i>C. fructicola</i>
C46	Khánh Vân, Yên Khánh, Ninh Bình	2017	-	+	-	0	<i>C. fructicola</i>
C47	Khánh Vân, Yên Khánh, Ninh Bình	2017	+	0	0	0	<i>C. siamense</i>
C48	Văn Đức, Gia Lâm, Hà Nội	2017	0	0	0	+	<i>C. truncatum</i>
C50	Việt Hồng, Thanh Hà, Hải Dương	2017	+	0	0	0	<i>C. siamense</i>
C51	Thanh Hải, Thanh Hà, Hải Dương	2017	+	-	-	0	<i>C. siamense</i>
C52	Kim Tân, Kim Thành, Hải Dương	2017	-	+	-	0	<i>C. fructicola</i>
C53	Kim Tân, Kim Thành, Hải Dương	2017	-	0	0	+	<i>C. truncatum</i>
C54	Hoàng Hanh, Ninh Giang, Hải Dương	2017	+	0	0	0	<i>C. siamense</i>

Chú thích: +: phản ứng PCR dương tính; -: phản ứng PCR âm tính; 0: Không kiểm tra

Mẫu nấm C29 đã được xác định là loài *C. aeschynomenes* dựa trên giải trình tự vùng liên gen ApMat (Nguyễn Duy Hưng và cs., 2017)

Bảng 5. Phân bố mẫu nấm *Colletotrichum* gây bệnh thán thư ớt thu tại các tỉnh đồng bằng sông Hồng và một số tỉnh khác

Tỉnh	Số mẫu nấm	Số lượng mẫu nấm theo loài				
		<i>C. siamense</i>	<i>C. fructicola</i>	<i>C. gloeosporioides</i> sensu stricto	<i>C. truncatum</i>	<i>C. aeshynomenes</i>
Bắc Ninh	4	2	1	1	0	0
Hà Nam	5	5	0	0	0	0
Hà Nội	7	1	2	1	3	0
Hải Dương	5	3	1	0	1	0
Hải Phòng	6	3	1	1	1	0
Hưng Yên	6	3	1	1	1	0
Nam Định	2	1	0	1	0	0
Ninh Bình	2	1	1	0	0	0
Thái Bình	4	2	1	0	1	0
Đồng bằng sông Hồng	41	21	8	5	7	0
Bắc Giang	4	3	1	0	0	0
Thái Nguyên	2	1	0	0	0	1
Sơn La	3	1	2	0	0	0
Tiền Giang	2	1	0	0	1	0
Tổng	52	27	11	5	8	1



Hình 3. Phân bố các loài *Colletotrichum* gây bệnh thán thư ớt từ tất cả các tỉnh (A) và các tỉnh đồng bằng sông Hồng (B)

3.4.2. Phân bố của *C. fructicola*

C. fructicola là loài nấm phổ biến thứ hai, được phát hiện ở 9/13 tỉnh thu thập mẫu gồm 7 tỉnh đồng bằng sông Hồng và 2 tỉnh trung du miền núi phía Bắc (Thái Nguyên, Sơn La) (Bảng 5). Số lượng loài này được phát hiện nhiều thứ hai, chiếm 21,2% tổng số mẫu thu thập tại 13 tỉnh và 19,5% tổng số mẫu thu thập tại đồng bằng sông Hồng (Hình 3).

C. fructicola cũng là loài được phát hiện đầu tiên trên cà phê tại Thái Lan năm 2009

(Prihastuti *et al.*, 2009) và cũng có phổ ký chủ và phân bố địa lý rất rộng (Weir *et al.*, 2012). Giống như Việt Nam, loài này cũng phổ biến trên ớt tại Ấn Độ (Sharma & Shenoy, 2013) và Trung Quốc (Diao *et al.*, 2017).

3.4.3. Phân bố của *C. truncatum*

C. truncatum là loài nấm phổ biến thứ ba, được phát hiện ở 6/13 tỉnh thu thập mẫu gồm 5 tỉnh đồng bằng sông Hồng và Tiền Giang (Bảng 5). Số lượng loài này được phát hiện nhiều thứ

ba, chiếm 15,4% tổng số mẫu thu thập tại 13 tỉnh và 17,1% tổng số mẫu thu thập tại đồng bằng sông Hồng (Hình 3).

C. truncatum, trước kia được gọi là *C. capsici*, là một trong các loài *Colletotrichum* có ý nghĩa kinh tế với phổ ký chủ và tính gây bệnh rất đa dạng (Ranathunge *et al.*, 2012). Loài này cũng là loài phổ biến trên ớt tại Ấn Độ (Sharma & Shenoy, 2013), Thái Lan (Ko *et al.*, 2011; Suwannarat *et al.*, 2017), Úc (Da Silva *et al.*, 2017) và là loài phổ biến nhất trên ớt tại Trung Quốc (Diao *et al.*, 2017).

3.4.4. Phân bố của *C. gloeosporioides* sensu stricto

C. gloeosporioides sensu stricto là loài phổ biến thứ tư, được phát hiện ở 5 tỉnh đồng bằng sông Hồng là Hà Nội, Bắc Ninh, Hải Phòng, Hưng Yên và Nam Định (Bảng 5). Số lượng loài này được phát hiện là 5 mẫu, chiếm 9,6% tổng số mẫu thu thập tại 13 tỉnh và 12,2% tổng số mẫu thu thập tại đồng bằng sông Hồng (Hình 3).

C. gloeosporioides sensu stricto ban đầu được biết có phổ ký chủ khá hẹp, nhiễm chủ yếu trên cây có múi. Tuy nhiên gần đây, loài này cũng được phát hiện thấy trên xoài, nho, Ficus, Pueraria, chè (Weir *et al.*, 2012; Udayanga *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2015). Đáng chú ý, loài này đã được xác định phổ biến hàng thứ hai trên ớt tại Trung Quốc (Diao *et al.*, 2017).

3.4.5. Phân bố của *C. aeschynomenes*

Riêng loài *C. aeschynomenes* chỉ phát hiện được 1 mẫu thu tại Thái Nguyên. *C. aeschynomenes* là loài được định danh lại từ *C. gloeosporioides* “f. sp. *aeschynomenes*” Loài này có phổ ký chủ và phân bố rất hẹp, mới chỉ được công bố gây bệnh trên cây đậu đại (*Aeschynomene virginica*) tại Mỹ (Weir *et al.*, 2012). Cho tới nay vẫn chưa có công bố thêm về sự xuất hiện của loài này trên thế giới.

3.4.6. Mức độ đa dạng các loài *Colletotrichum* tại các tỉnh

Nhìn chung, các tỉnh đồng bằng sông Hồng có mức độ đa dạng loài khá cao (Bảng 5). Trong số các tỉnh thu thập mẫu, Hà Nội, Hưng Yên và

Hải Phòng là 3 tỉnh có thành phần loài đa dạng nhất khi có sự xuất hiện của 4 loài nấm là *C. gloeosporioides*, *C. siamense*, *C. fructicola* và *C. truncatum* tại mỗi tỉnh. Hai tỉnh Hải Dương và Thái Bình cũng ghi nhận sự xuất hiện của 3 loài nấm là *C. siamense*, *C. fructicola* và *C. truncatum*. Tỉnh Bắc Ninh xuất hiện 3 loài nấm *C. siamense*, *C. fructicola* và *C. gloeosporioides*. Các tỉnh Ninh Bình, Bắc Giang và Sơn La ghi nhận sự xuất hiện chỉ 2 loài là *C. siamense* và *C. fructicola*. Duy nhất, tỉnh Hà Nam có 100% số mẫu thu thập là loài *C. siamense*.

5. KẾT LUẬN

Bốn cặp mồi được thiết kế mới đã phát hiện đặc hiệu 4 loài nấm phổ biến gây bệnh thán thư ớt là *C. truncatum*, *C. fructicola*, *C. gloeosporioides* sensu stricto và *C. siamense*.

Phương pháp chiết nhanh DNA bằng NaOH có hiệu quả cao để chuẩn bị mẫu DNA từ nấm *Colletotrichum* cho phản ứng PCR.

Bằng phân tích PCR với mồi đặc hiệu trên 52 mẫu nấm *Colletotrichum* gây bệnh thán thư ớt thu tại 9 tỉnh đồng bằng sông Hồng, 3 tỉnh trung du miền núi phía Bắc và 1 tỉnh đồng bằng sông Cửu Long xác định được mức độ phổ biến của các loài *Colletotrichum* lần lượt là *C. siamense* (51,9%), *C. fructicola* (21,2%), *C. truncatum* (15,4%), *C. gloeosporioides* sensu stricto (9,6%). Chỉ phát hiện thấy 1 mẫu là loài *C. aeschynomenes*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Cannon P.F., Damm U., Johnston P.R. & Weir B.S. (2012). *Colletotrichum* - current status and future directions. *Studies in Mycology*, 73: 181-213.
- De Silva D.D., Ades P.K., Crous P.W. & Taylor P.W.J. (2017). *Colletotrichum* species associated with chili anthracnose in Australia. *Plant pathology*, 66(2): 254-267.
- Diao Y.Z., Zhang C., Liu F., Wang W.Z., Liu L., Cai L. & Liu X.L. (2017). *Colletotrichum* species causing anthracnose disease of chili in China. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 38: 20.
- Dieffenbach C.W., Lowe T.M., & Dveksler G.S. (1993). General concepts for PCR primer design. *PCR Methods Appl*, 3(3): S30-S37.

- Don L.D., Van T.T., Phuong Vy T.T. & Kieu P.T.M. (2007). *Colletotrichum* spp. Attacking on Chilli Pepper Growing in Vietnam. Country Report In: Oh D.G., Kim K.T. (Eds.), Abstracts of the First International Symposium on Chilli Anthracnose National Horticultural Research Institute, Rural Development of Administration, Republic of Korea, p. 24.
- Doyle J.J. & Doyle J.L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19: 11-15.
- Hyde K., Cai L., McKenzie E., Yang Y., Zhang J. & Prihastuti H. (2009). *Colletotrichum*: a catalogue of confusion. *Fungal Diversity*, 39: 1-12.
- Imjit N., Rattanakreetakul C. & Pongpisutta R. (2012). Polymerase chain reaction based detection of Chilli anthracnose disease. In I International Conference on Postharvest Pest and Disease Management in Exporting Horticultural Crops-PPDM2012 973, pp. 199-206
- Judelson H. (2006). Guidelines For Designing Primers. *Primer Guidelines*, 10(6): 1-5.
- Kamle M., Pandey B.K., Kumar P. & Kumar M. (2013). A Species-Specific PCR based Assay for rapid detection of mango anthracnose pathogen *Colletotrichum gloeosporioides* Penz and Sacc. *J. Plant Pathol. Microbiol.*, 4(184): 10-4172.
- Ko T.W.K., McKenzie E.H.C., Bahkali A.H., To-anun C., Chukeatirote E., Promputtha I., Ahmed K., Wikee S., Chamyuang S. & Hyde K.D. (2011). The need for re-inventory of Thai phytopathogens. *Chiang Mai Journal of Science*, 38: 625-637.
- Larkin M.A., Blackshields G., Brown N.P., Chenna R., McGettigan P.A., McWilliam H. & Thompson J.D. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *bioinformatics*, 23(21): 2947-2948.
- Liu F., Wang M., Damm U., Crous P.W., & Cai L. (2016). Species boundaries in plant pathogenic fungi: a *Colletotrichum* case study. *BMC evolutionary biology*, 16(1): 81.
- Liu F., Weir B.S., Damm U., Crous P.W., Wang Y., Liu B. & Cai L. (2015). Unravelling *Colletotrichum* species associated with Camellia: employing ApMat and GS loci to resolve species in the *C. gloeosporioides* complex. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 35: 63.
- Mongkolporn O., Montri P., Supakaew T. & Taylor P. W. (2010). Differential Reactions on Mature Green and Ripe Chili Fruit Infected by *Three Colletotrichum* spp. *Plant Disease*, 94: 306-310.
- Ngô Bích Hào (1992). Bệnh thán thư hại ớt, *Tạp chí Bảo vệ thực vật*, 124(4): 15-17.
- Nguyễn Duy Hưng, Hà Viết Cường, Hoàng Chúng Lãm, Nguyễn Đức Huy (2017). Xác định nấm *Colletotrichum* gây bệnh thán thư ớt ở đồng bằng sông Hồng. *Tạp chí khoa học công nghệ nông nghiệp Việt Nam*, 12(85): 87-93.
- Osmundson T.W., Eyre C.A., Hayden K.M., Dhillon J. & Garbelotto M.M. (2013). Back to basics: an evaluation of NaOH and alternative rapid DNA extraction protocols for DNA barcoding, genotyping, and disease diagnostics from fungal and oomycete samples. *Molecular ecology resources*, 13(1): 66-74.
- Peres N., Souza N., Peever T. & Timmer L. (2004). Benomyl sensitivity of isolates of *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* from citrus. *Plant Disease*, 88: 125-130.
- Prihastuti H., Cai L., Chen H., McKenzie E.H.C. & Hyde K.D. (2009). Characterization of *Colletotrichum* species associated with coffee berries in northern Thailand. *Fungal Diversity*, 39(1): 89-109.
- Ranathunge N.P., Mongkolporn O., Ford R. & Taylor P.W.J. (2012). *Colletotrichum truncatum* Pathosystem on *Capsicum* spp: infection, colonization and defence mechanisms. *Australasian Plant Pathology*, 41(5): 463-473.
- Rychlik W. (1993). Selection of primers for polymerase chain reaction. In *PCR Protocols*. Humana Press, Totowa, NJ., pp. 31-40.
- Rychlik W.J.S.W., Spencer W.J. & Rhoads R.E. (1990). Optimization of the annealing temperature for DNA amplification *in vitro*. *Nucleic acids research*, 18(21): 6409-6412.
- Sharma G. & Shenoy B.D. (2013). *Colletotrichum fructicola* and *C. siamense* are involved in chilli anthracnose in India. *Archives Of Phytopathology And Plant Protection*, 47: 1179-1194.
- Shi A., Kantartzi S.K., Mmbaga M.T., Chen P., Mrema F. & Nnodu E. (2008). PCR-based markers for detection of *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* in flowering dogwood (*Cornus florida*). *Australasian Plant Pathology*, 37(1): 65-68.
- Silva D.N., Talhinas P., Várzea V., Cai L., Paulo O.S. & Batista D. (2012). Application of the Apn2/MAT locus to improve the systematics of the *Colletotrichum gloeosporioides* complex: an example from coffee (*Coffea* spp.) hosts. *Mycologia*, 104(2): 396-409.
- Srinivasan M., Kothandaraman S.V., Vaikuntavasan P. & Rethinasamy V. (2014). Development of conventional and real-time PCR protocols for specific and sensitive detection of *Colletotrichum capsici* in chilli (*Capsicum annum* L.). *Phytoparasitica*, 42(4): 437-444.
- Suwannarat S., Steinkellner S., Songkumarn P. & Sangchote S. (2017). Diversity of *Colletotrichum* spp. isolated from chili pepper fruit exhibiting

- symptoms of anthracnose in Thailand. *Mycological Progress*, 16(7): 677-686.
- Than P.P., Prihastuti H., Phoulivong S., Taylor P.W. & Hyde K.D. (2008). Chilli anthracnose disease caused by *Colletotrichum* species. *Journal of Zhejiang University Science B*, 9: 764-778.
- Torres-Calzada C., Tapia-Tussell R., Quijano-Ramayo A., Martin-Mex R., Rojas-Herrera R., Higuera-Ciajara I. & Perez-Brito D. (2011). A species-specific polymerase chain reaction assay for rapid and sensitive detection of *Colletotrichum capsici*. *Molecular biotechnology*, 49(1): 48-55.
- Udayanga D., Manamgoda D.S., Liu X., Chukeatirote E. & Hyde K.D. (2013). What are the common anthracnose pathogens of tropical fruits? *Fungal Diversity*, 61(1): 165-179.
- Wang H., Qi M. & Cutler A.J. (1993). A simple method of preparing plant samples for PCR. *Nucleic acids research*, 21(17): 4153.
- Weir B.S., Johnston P.R. & Damm U. (2012). The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. *Studies in Mycology* 73: 115-180
- Yao J., Lan C., Huang P. & Yu D. (2018). PCR detection of *Colletotrichum gloeosporioides* in *Psidium guajava*. *Australasian Plant Pathology*, 47(1): 95-100.