

BỘ NÔNG NGHIỆP VÀ PHÁT TRIỂN NÔNG THÔN
VIỆN BẢO VỆ THỰC VẬT - CỤC BẢO VỆ THỰC VẬT

BẢO VỆ THỰC VẬT

ISSN 0868-2801

Số 5 (239)

2011



TẠP CHÍ CHUYÊN NGÀNH
JOURNAL OF PLANT PROTECTION

Tạp chí

BẢO VỆ THỰC VẬT

Ra 2 tháng một kỳ

HỘI ĐỒNG BIÊN TẬP

PGS.TS. NGUYỄN XUÂN HỒNG, TS. BÙI SĨ DOANH, GS.TS. NGUYỄN VĂN ĐÌNH,
TS. ĐINH VĂN ĐỨC, TS. NGUYỄN HỮU HUÂN, TS. NGUYỄN HỮU ĐẠT, TS. LÊ THỊ KIM OANH,
GS.TS. HÀ QUANG HÙNG, GS.TS. PHẠM VĂN LẮM, PGS.TS. VŨ KHẮC NHƯỢNG,
PGS.TS. LÊ LƯƠNG TẾ, TS. NGUYỄN TRƯỜNG THÀNH, TS. LÊ VĂN TRỊNH,
GS.TSKH. HÀ MINH TRUNG, TS. DƯƠNG MINH TÚ, TS. NGÔ VINH VIỄN,
TS. NGUYỄN VĂN VẤN, PGS.TS. PHẠM THỊ VƯỢNG, THS. LÊ MAI NHẤT, KS. NGUYỄN ÁNH TUYẾT

HỘI ĐỒNG THƯỜNG TRỰC

GS.TS. PHẠM VĂN LẮM, TS. LÊ VĂN TRỊNH, PGS.TS. VŨ KHẮC NHƯỢNG,
PGS.TS. LÊ LƯƠNG TẾ, GS.TS. HÀ QUANG HÙNG, TS. ĐINH VĂN ĐỨC,
TS. NGUYỄN VĂN VẤN, TS. NGUYỄN HỮU ĐẠT, THS. LÊ MAI NHẤT, KS. NGUYỄN ÁNH TUYẾT

TỔNG BIÊN TẬP

EDITOR - IN - CHIEF

TS. NGÔ VINH VIỄN

PHÓ TỔNG BIÊN TẬP

ASSOCIATE EDITOR - IN - CHIEF

TS. BÙI SĨ DOANH, PGS.TS. PHẠM THỊ VƯỢNG

THƯ KÝ TOÀ SOẠN

EDITORIAL SECRETARY

NGUYỄN ÁNH TUYẾT

Ảnh bìa 1: Thu thập ruồi đục quả tại Lạng Sơn

(Ảnh: Chi cục KDTV vùng 7 Lạng Sơn)

TẠP CHÍ BẢO VỆ THỰC VẬT

Tòa soạn: Viện Bảo vệ thực vật,

Cục Bảo vệ thực vật,

Từ Liêm, Hà Nội

ĐT: 04.38389724 - Fax 04. 38363563

Email: nipp-tonghop@hn.vnn.vn

149 Hồ Đắc Di, Đống Đa, Hà Nội

ĐT: 04.35333057 - Fax: 04.35330043

Email: lkh@fpt.vn

ISSN 0868-2801

NĂM THỨ XXXX

Số 5 - 2011

MỤC LỤC CONTENTS

CHỦ TRƯỞNG ĐƯỜNG LỐI

1. Bộ Nông nghiệp và PTNT - Công điện v/v Thực hiện các biện pháp cấp bách phòng trừ Bệnh chổi rồng trên nhãn. 3

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU KHOA HỌC

2. Nguyễn Tuấn Lộc, Đào Xuân Ước - Một số kết quả nghiên cứu về sâu hại và thiên địch trên cây keo lá tràm *Acacia auriculiformis* tại Vĩnh Linh, Quảng Trị
The some results of study on insect pests and their natural enemies on *Acacia auriculiformis* at Vĩnh Linh. Quang Tri 5
3. Hoàng Thị Mỹ Lệ, Mai Văn Hào và Ngô Bích Hào - Kết quả giám định và nghiên cứu một số yếu tố ảnh hưởng đến sự phát triển của tác nhân gây bệnh thán thư hại bông tại Ninh Thuận
Results of identification and studies on affecting factors of anthranose pathogen on cotton in Ninh Thuan 9
4. Ngô Gia Bôn, Cao Anh Dương, Trịnh Xuân Hoạt, Nguyễn Đức Quang, Nguyễn Đức Thành, Nguyễn Thanh Thủy, Đỗ Đức Hạnh, Nguyễn Đại Hương, Vũ Duy Hiện và Mai Văn Quân - Phát hiện phytoplasma gây bệnh trắng lá mía bằng phương pháp nested-PCR
Detection of a phytoplasma associated with sugarcane white leaf disease using nested-PCR 14
5. Nguyễn Ngọc Trí và Trần Thị Thu Hà - Đánh giá tính kháng bệnh-sương mai của các giống khoai môn sọ tuyển chọn bằng lây bệnh nhân tạo bào tử động
Evaluation of downy mildew resistance of selected taro cultivars by artificial inoculation of zoospores 18

khoang (*Spodoptera litura* Koch). Các bệnh như thối đen gốc (*Rhizoctonia solani* Kunh), thán thư (*Colletotrichum lindemuthianum* Kunh), mốc trắng thân (*Sclerotium rolfsii* Gum) là những bệnh nguy hiểm hơn cả.

2. Một số thuốc hóa học có hiệu lực cao trong phòng trừ sâu đục quả là Secsaigon 10EC, Vifast 5ND, 3 ngày sau xử lý đạt 78,51% và 82,09 %. Hai loại thuốc sinh học như Dylan 2EC, Bitadin WP có hiệu lực trừ sâu đục quả tương đối cao, 3 ngày sau xử lý đạt 74,73% và 77,63%.

Tài liệu tham khảo

1. Bộ NN-PTNT, 2004. Quy phạm khảo nghiệm thuốc bảo vệ thực vật trên đồng ruộng, Tiêu chuẩn nông nghiệp Việt Nam. Hà Nội.

2. <http://database.prota.org/dbtw->

<http://database.prota.org/search.htm&TN=PROTA-B~1&QB0=AND&QF0=Species+Code&QI0=Vign+a+angularis&RF=Webdisplay>

3. <http://www.hort.purdue.edu/newcrop/afcm/adzuki.html>

4. Niên giám thống kê năm 2009 của tỉnh Thừa thiên Huế

5. Phạm Thị Vượng, 2007. Nghiên cứu mức độ chống chịu sâu bệnh chính hại cây đậu dài ở vùng miền trung và xây dựng quy trình phòng trừ tổng hợp

6. Viện BVTV, 2000. Phương pháp nghiên cứu BVTV, tập I. Phương pháp điều tra cơ bản dịch hại nông nghiệp và thiên địch của chúng. Nxb Nông nghiệp, Hà Nội

Phản biện: TS. Lê Văn Trịnh

Phát hiện phytoplasma gây bệnh trắng lá mía bằng phương pháp nested-PCR

Ngô Gia Bôn^{1*}, Cao Anh Dương^{2*},
Trịnh Xuân Hoạt^{1*}, Nguyễn Đức Quang²,
Nguyễn Đức Thành¹, Nguyễn Thanh Thủy³,
Đỗ Đức Hạnh², Nguyễn Đại Hương²,
Vũ Duy Hiện¹ và Mai Văn Quân¹

Abstract

Detection of a phytoplasma associated with sugarcane white leaf disease using nested-PCR

Nested-PCR and DNA analysis were applied for detection and characterization of a phytoplasma associated with sugarcane white leaf disease collected from Dong Nai Province, Viet Nam. The amplified PCR products about 1200 bp were digested by several digestion enzymes for RFLP analysis. The RFLP profile suggested that all the samples were infected by

the same phytoplasma strain. Nucleotide sequence analysis of the 16S rRNA genes revealed that phytoplasma causing sugarcane white leaf disease in Dong Nai (SCWLDNVN) was very close to the phytoplasma causing sugarcane white leaf disease in Thailand, sharing a sequence identity to 99%.

¹ Viện Bảo vệ thực vật

² Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển Mía Đường (Bến Cát, Bình Dương)

³ Viện Vệ sinh dịch tễ

* Những tác giả đóng góp ngang nhau

* Corresponding author.

Phylogenetic tree indicated that SCWLBDVN and other reported SCWL, RYD and BraGW belong to subgroup SCWL and group 16SrXI.

Keywords: sugarcane white leaf, 16S rRNA, nested-PCR, phytoplasma.

Đặt vấn đề

Nhiều nhà khoa học đã chứng minh phytoplasma là nguyên nhân gây bệnh chổi cỏ mía (SCGS) và trắng lá mía (SCWL). Cả hai loại bệnh này đều xuất hiện đầu tiên tại Châu Á chứ không thấy xuất hiện tại các châu lục khác. Bệnh trắng lá mía đã được ghi nhận tại Thái Lan, Đài Loan, Nhật Bản, Sri Lanka và Việt Nam (Kumarasinghe & Jones, 2001; Nakashima & Murata, 1993; Nakashima *et al.*, 1994; Man *et al.*, 2002). Một số nước khác đã báo cáo sự xuất hiện của bệnh chổi cỏ mía như Bangladesh, Ấn Độ, Malaysia, Nepal, Pakistan, Sri Lanka và Việt Nam (Nakashima & Murata, 1993; Hoat *et al.*, 2011; Srivastava *et al.*, 2006; Viswanathan, 1997, 2001).

Mân *et al.* (2002) đã áp dụng phương pháp chụp ảnh hiển vi điện tử và đã phát hiện thể phytoplasma trong mô cây mía biểu hiện triệu chứng trắng lá mía thu tại một số tỉnh miền Bắc. Tuy nhiên, các tác giả chưa nghiên cứu sâu ở mức độ phân tử tác nhân gây bệnh này. Trong bài báo này, chúng tôi mô tả phương pháp phát hiện tác nhân gây bệnh trắng lá mía bằng phương pháp nested-PCR sử dụng các cặp primer chung khuếch đại trình tự đoạn gen 16S rRNA của phytoplasma.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Ba mẫu cây mía biểu hiện triệu chứng trắng lá mía được thu thập tại 3 huyện: Xuân Lộc, Định Quán và Nhơn Trạch của tỉnh Đồng Nai; tiến hành chụp ảnh hiển vi điện tử, tách chiết DNA, chạy PCR, RFLP, giải mã trình tự đoạn gen 16S rRNA của phytoplasma và xây dựng cây phả hệ theo phương pháp của Hoat *et al.* (2011).

Kết quả nghiên cứu

1. Phát hiện phytoplasma trong mô cây mía bị bệnh bằng kính hiển vi điện tử

Kết quả cho thấy chỉ phát hiện được các cấu trúc điển hình của phytoplasma trong mô cây mía

biểu hiện triệu chứng nhưng không thấy sự hiện diện của chúng trong mô cây mía không biểu hiện triệu chứng. Ngoài ra, chúng tôi không phát hiện được tác nhân khác trong mô cây bị bệnh (Hình ảnh không được công bố). Mân *et al.* (2002) cũng đã phát hiện thấy thể phytoplasma dưới kính hiển vi điện tử, tuy nhiên phương pháp này không thể sử dụng để so sánh hay phân loại tác nhân gây bệnh mà chỉ để xác nhận sự có mặt của phytoplasma trong mô cây bị bệnh.

2. Phát hiện phytoplasma trong mô cây bị bệnh bằng phương pháp nested-PCR

Sản phẩm PCR với kích thước khoảng 1,2-kb đã được khuếch đại từ DNA chiết xuất từ các mẫu mía có biểu hiện triệu chứng trắng lá, trong khi đó không có sản phẩm PCR nào được phát hiện từ mẫu mía không thể hiện triệu chứng. Các sản phẩm PCR được cắt bằng một số enzyme giới hạn *RsaI*, *MseI*, *HpaI* và *HaeIII* và kết quả phân tích tính đa hình PCR-RFLP cho thấy không có sự khác biệt giữa các mẫu, hay nói một cách khác các mẫu bị bệnh đã bị nhiễm cùng một chủng phytoplasma (Hình ảnh không được công bố).

3. Giải mã và phân tích gen

Kết quả đọc trình tự gen cho thấy tất cả các sản phẩm gene 16S rRNA của phytoplasma do Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển Mía Đường Bình Dương thu được trên 3 mẫu mía bị bệnh tại tỉnh Đồng Nai (ký hiệu SCWLBDVN) có chiều dài 1113bp và đều có chất lượng tốt. So sánh trình tự gen giữa các mẫu bằng phần mềm Clustal (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) cho thấy không có sự sai khác giữa các mẫu.

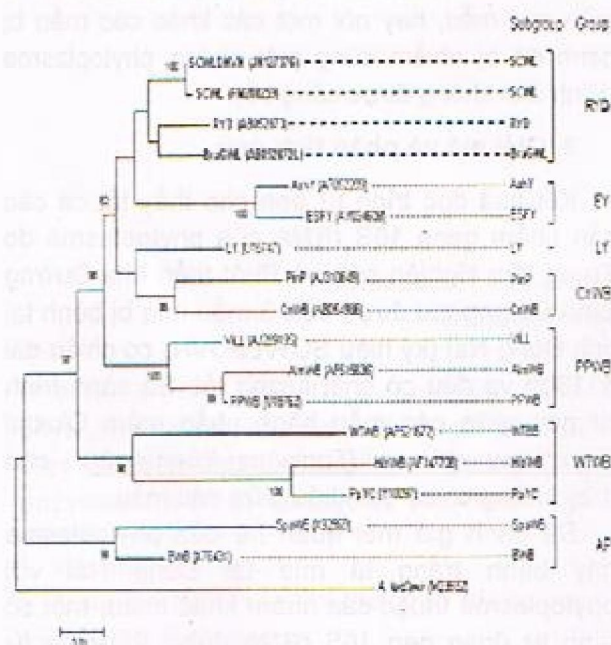
Để đánh giá mối quan hệ của phytoplasma gây bệnh trắng lá mía tại Đồng Nai với phytoplasma thuộc các nhóm khác nhau, một số trình tự đoạn gen 16S rRNA được thu thập từ Ngân hàng gen (Bảng 1). Phân tích phả hệ cho thấy mẫu trắng lá mía Đồng Nai SCWLBDVN (JN127376) có mức tương đồng 100% với

phytoplasma gây bệnh trắng lá mía tại Thái Lan SCWL (AB052874). Bên cạnh đó, SCWLDNVN và SCWL cùng với Brachiaria grass white leaf phytoplasma-BraGWL (AB052287), Rice Yellow

Dwarf Phytoplasma-RYD (AB052873) đã hình thành một nhánh thuộc nhóm Rice Yellow Dwarf Phytoplasma (RYD) hay còn gọi là nhóm 16SrXI (Hình 1).

Bảng 1. Các mẫu phytoplasma sử dụng trong phân tích phả hệ

Mã số	Phytoplasma	II. Bệnh liên quan	Nhóm phụ	Nhóm 16Sr
FM208259	SCWL	III. Sugarcane white leaf	SCWL	RYD
AB052873	RYD	IV. Rice yellow dwarf	RYD	RYD
AB052872	BraGWL	V. Brachiaria grass white leaf	BraGWL	RYD
AF092209	AshY	VI. Ash yellows	AshY.	EY
U18747	LY	VII. Coconut lethal yellowing	LY	LY
AJ310849	PinP	VIII. Pinus sylvestris yellows	PinP	CnWB
AB054986	CnWB	IX. Chestnut witches'-broom	CnWB	CnWB
AF515636	AlmWB	X. Almond witches'-broom	AlmWB	PPWB
U18763	PPWB	XI. Caribbean pigeon pea witches'-broom	PPWB	PPWB
AY034608	ESFY	XII. Erigeron witches'-broom	ESFY	AP
X92869	SpaWB	XIII. Spartium witches'-broom	SpaWB	AP
X76431	BWB	XIV. Buckthorn witches'-broom	BWB	AP
AF147708	HibWB	XV. Hibiscus witches'-broom	HibWB	WBDL
Y10097	PpYC	XVI. Papaya yellow crinkle	PpYC	WBDL
AJ289195	VILL	XVII. Vigna little leaf	ViLL	PPWB
AF521672	WTWB	XVIII. Weeping tea tree witches'-broom	WTWB	WTWB
M23932	<i>Acholeplasma laidlawii</i>	XIX. -	-	-



Hình 1. Cây phả hệ được xây dựng theo phương pháp neighbor-joining.

So sánh trình tự 16S rRNA của phytoplasma gây bệnh trắng lá mía tại Đồng Nai (SCWLDNVN) với các đại diện của phytoplasma khác từ Ngân hàng gen. *Acholeplasma laidlawii* được đưa vào như một đối chứng của nhóm không thuộc nhóm phytoplasma để so sánh. Các mã số Ngân hàng gen được ghi trong ngoặc đơn. Chỉ số ghi trên các nhánh là giá trị thống kê bootstrap (chỉ ghi những giá trị lớn hơn 80%). Tên của các nhóm và các nhóm phụ được ghi bên phải.

Loài *Matsumuratetix hiroglyphicus* đóng vai trò là môi giới truyền bệnh trắng lá mía tại Đài Loan và Thái Lan (Nakashima *et al.*, 1994). Ở Sri Lanka, loài *Deltocephalus menoni* có khả năng truyền cả 2 loại bệnh là trắng lá mía và chổi cỏ mía (Kumarasinghe và Jones, 2001). Tuy nhiên, những loài rầy này chưa được tìm thấy tại Việt Nam. Do vậy, có thể loài côn trùng khác sẽ đóng vai trò môi giới truyền bệnh trắng lá mía tại Việt Nam. Mân và cộng sự đã tiến hành lấy bệnh

nhân tạo và khẳng định các loài rệp mía (*Aphis sachari*), rệp bông (*Aphis gosypii*), rệp đào (*Myzus persicae*) và bọ phấn (*Bemisia* sp.) đều không phải là môi giới truyền bệnh chồi cỏ mía (Mân *et al.*, 2002).

Trong nghiên cứu này, tuy chu trình Koch chưa hoàn thành, nhưng những kết quả chứng minh sự có mặt của phytoplasma chỉ có ở trong mô cây biểu hiện triệu chứng và không có mặt ở trong mô cây khỏe bằng cả phương pháp kính hiển vi điện tử và PCR là những bằng chứng cho thấy phytoplasma là nguyên nhân gây bệnh trắng lá mía tại Đồng Nai. Bên cạnh đó, nhiều phòng nghiên cứu trên thế giới cũng đã tìm thấy phytoplasma SCWL trong mô cây mía biểu hiện triệu chứng trắng lá mía thu tại nhiều nước khác nhau. Do đó, việc khẳng định phytoplasma SCWL là nguyên nhân gây bệnh trắng lá mía tại Đồng Nai là có cơ sở khoa học.

Ở vùng Đồng Nam Bộ từ năm 1997, bệnh trắng lá mía đã xuất hiện gây hại ở Định Quán, Xuân Lộc (tỉnh Đồng Nai) và Bến Cát (Bình Dương) - trên diện tích hơn 2000 ha. Bệnh phát triển mạnh ở giai đoạn cây non. Tuy chưa phát triển thành dịch nhưng đây là bệnh rất nguy hiểm và có thể bùng phát thành dịch khi gặp điều kiện thuận lợi. Tại Thái Lan và Sri Lanka, bệnh trắng lá mía đã ảnh hưởng rất lớn đến ngành mía đường của hai nước này (Nakashima *et al.*, 1994; Kumarasinghe và Jone, 2001). Do đó, các nhà khoa học cần đặc biệt quan tâm và nghiên cứu sâu về bệnh trắng lá mía để chuẩn bị đối phó trước khi bệnh lan rộng ra các vùng khác và phát sinh thành dịch như bệnh chồi cỏ mía tại Nghệ An.

Kết luận

- Nguyên nhân gây bệnh trắng lá mía tại Đồng Nai là do phytoplasma thuộc nhóm phụ SCWL, nhóm 16SrXI gây ra.

- Có thể áp dụng phương pháp nested-PCR và phân tích gen để phát hiện và phân tích tác nhân gây bệnh do phytoplasma gây ra.

Tài liệu tham khảo

1. Hoạt, T.X., Bôn, N.G., Quân, M.V., Hiện, V.D., Thành, N.Đ., Thành và Đ.V.T.Thanh, 2011. Phát hiện phytoplasma gây bệnh chồi cỏ mía bằng phương pháp nested-PCR. *Tạp chí Bảo vệ thực vật* 4: 5 - 9.
2. Nakashima, K. and Murata, N., 1993. Destructive plant diseases caused by mycoplasma-like organisms in Asia. *Outlook Agric* 22, 53-58.
3. Nakashima, K., Chaleeprom, W., Wongkaew, P. and Sirithorn, P., 1994. Detection of mycoplasma-like organisms associated with white leaf disease of sugarcane in Thailand using DNA probes. *JIRCAS Journal* 1, 57-67
4. Kumarasinghe, N.C., Jones, P., 2001. Identification of white leaf disease of sugarcane in Sri Lanka. *Sugar Tech* 3, 55-58.
5. Mân, V.T., Giao, N.K., Liên, N.T.M., Thủy, N.T., Diệp, Đ.N. và Dương, C.A., 2002. Một số nghiên cứu bệnh trắng lá mía. *Hội thảo bệnh cây và sinh học phân tử*. Đại học Nông Lâm TP Hồ Chí Minh, tr. 23-25.
6. Srivastava, S., Singh, V., Gupta, P.S., Sinha, O.K. and Baitha, A., 2006. Nested PCR assay for detection of sugarcane grassy shoot phytoplasma in the leafhopper vector *Deltocephalus vulgaris*: a first report. *Plant Pathology* 55, 25-28.
7. Viswanathan, R., 1997. Detection of phytoplasmas associated with grassy shoot disease of sugarcane by ELISA techniques. *Zeischrift fur flenzenkrankheiten un Pflanzenschutz* 4, 9-16.
8. Viswanathan R. 2001. Serodiagnosis of phytoplasmas causing grassy shoot disease in sugarcane. In: Rao GP, Ford RE, Tosiç M, Teakle DS, eds. *Sugarcane Pathology, Vol. II. Virus and Phytoplasma Diseases*. Enfield, NH, USA: Science Publishers Inc 209-220.

Phản biện: TS. Hà Việt Cường