

PHÁT HIỆN VÀ XÁC ĐỊNH *Cactus virus X (CVX)*  
NHIỄM TRÊN CÂY THANH LONG Ở VIỆT NAM  
**Detection and Identification of *Cactus virus X (CVX)*  
Infecting *Hylocereus undulatus* in Viet Nam**

Nguyễn Đức Huy<sup>1\*</sup>, Nguyễn Hồng Sơn<sup>2</sup>, Nguyễn Thị Bích Ngọc<sup>3</sup> và Nguyễn Thành Hiếu<sup>4</sup>

Ngày nhận bài: 13.6.2018

Ngày chấp nhận: 02.3.2019

**Abstract**

*Hylocereus undulatus*, commonly known as pitaya, is widely grown in Viet Nam but most in Binh Thuan province. At present, there is no report of virus infecting *H. undulatus* in Viet Nam. During field surveys of 2016-2018, five stem samples of *H. undulatus* showing systemic mild and severe mottling symptom were collected from Binh Thuan, Quang Ninh, Bac Giang and Ha Noi. The infected samples were then mechanically inoculated by sap extraction onto leaves of indicator plants and caused necrotic local lesions on both *Gomphrena globosa* and *Chenopodium quinoa*. Furthermore, total RNAs was extracted from infected stem of *H. undulatus*

and amplified by RT-PCR using universal primers for detecting potexviruses. Sequencing of RT-PCR products revealed that the virus was *Cactus virus X (CVX)*. To our knowledge, this is first report of CVX in Viet Nam.

**Keywords:** *Hylocereus undulatus*, mild and severe mottling, RT-PCR, *Cactus virus X*, Viet Nam

- 
1. Bộ môn Bệnh cây, Khoa Nông học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam
  2. Cục Trồng trọt, Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn
  3. Viện Bảo vệ thực vật, Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam
  4. Viện nghiên cứu cây ăn quả Miền Nam

## 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây thanh long (*Hylocereus undulatus*) thuộc họ xương rồng (*Cactaceae*) có nguồn gốc ở các vùng sa mạc thuộc Mehico và Colombia. Thanh long được trồng phổ biến ở các nước Đông Nam Á như Thái Lan, Philippines, Indonesia, Đài Loan, miền Nam của Trung Quốc (Quảng Tây). Ở Việt Nam, thanh long được trồng nhiều nhất ở Bình Thuận và một số tỉnh như Tiền Giang, Long An, Kiên Giang. Hiện nay, thanh long cũng được trồng ở nhiều tỉnh của miền Bắc như Ba Vì (Hà Nội), Quảng Ninh, Hòa Bình, Cao Bằng, v.v. Cây thanh long thích hợp trồng trên nhiều loại đất, quả thanh long có nhiều chất dinh dưỡng và có giá trị xuất khẩu cao nên thanh long thanh long đã và đang là cây ăn quả quan trọng đem lại hiệu quả kinh tế cho nhiều nước trên thế giới như Đài Loan, Thái Lan, Malaysia, Trung Quốc và Việt Nam.

Tuy nhiên, năng suất thanh long không ổn định do một số bệnh mới xuất hiện và gây hại nặng như bệnh đốm nâu (*Neoscytalidium dimidiatum*), bệnh đốm nâu gây hại nghiêm trọng và có xu hướng ngày càng lan rộng trong những năm gần đây (2013-2018). Theo ghi nhận của Viện nghiên cứu cây ăn quả miền Nam, bệnh đốm nâu đã xuất hiện vào đầu năm 2008 tại Bình Thuận và Tiền Giang. Từ năm 2011 trở lại đây, bệnh gây hại nặng và lây lan trên diện rộng. Có những vườn thanh long bị mất trắng, không thể thu hoạch được do quả bị nhiễm bệnh, gây ra thiệt hại rất lớn cho người trồng thanh long. Bên cạnh đó, bệnh thối nhũn cành, quả do vi khuẩn cũng như bệnh vi rút gây hại trên thanh long ở Việt Nam chưa được xác định tác nhân gây bệnh cũng như phòng trừ bệnh hiệu quả. Xác định được tác nhân gây bệnh thối cành do vi khuẩn hoặc đốm cành do vi rút sẽ góp phần quan trọng vào việc phòng trừ bệnh hại và công tác kiểm dịch thực vật bệnh hại trên thanh long.

Bệnh vi rút gây hại trên thanh long cho tới nay được xác định do *Cactus virus X* (CVX). CVX đã được phát hiện và nghiên cứu lần đầu tiên tại Đài Loan (Liou *et al.*, 2001). CVX thuộc chi *Potexvirus*, họ *Alphaflexiviridae*. CVX truyền qua tiếp xúc cơ học. Thí nghiệm lây bệnh nhân tạo

trên cây chỉ thị cho thấy CVX gây ra các vết chết hoại cục bộ hoặc những vết đốm vàng trên cây rau muối (*Chenopodium amaranticolor* và *C. quinoa*) và cây cúc bách nhật (*Gomphrena globosa*) (Liou *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2016). Hiện nay, đã có 2 chuỗi gene đầy đủ (6.614 bp) của CVX được công bố trên ngân hàng gene (Liou *et al.*, 2004). CVX cũng đã được nghiên cứu trên cây thanh long ở Brazil vào năm 2008 (Duarte *et al.*, 2008). Tính đến thời điểm hiện nay, chưa có công bố trên các tạp chí chuyên ngành trong nước cũng như quốc tế về xác định cũng như nghiên cứu mức độ phổ biến và gây hại của CVX ở Việt Nam. Nghiên cứu này nhằm i) đánh giá mức độ phổ biến của bệnh vi rút trên thanh long ở một số vùng trồng thanh long và ii) xác định vi rút gây bệnh thanh long dựa trên cây chỉ thị, kỹ thuật RT-PCR và giải trình tự gene.

## 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1 Mẫu bệnh

Mẫu cành thanh long có triệu chứng điển hình như đốm vàng hoặc khảm ở mức độ nhẹ hoặc nặng được thu thập và duy trì bằng cách trồng lại trong chậu và giữ trong nhà lưới để theo dõi tiếp sự phát triển của bệnh. Trong nghiên cứu này, 05 mẫu cành thanh long có triệu chứng giống vi rút (đốm vàng, khảm) được thu thập tại Bình Thuận (Hàm Thuận Nam, Hàm Thuận Bắc), Quảng Ninh, Bắc Giang và Hà Nội (bảng 1).

### 2.2 Xác định sự có mặt của vi rút bằng cây chỉ thị

Sự có mặt của vi rút trong mẫu bệnh đã thu thập được xác định bằng phương pháp cây chỉ thị. Theo đó, dịch chiết từ các cành thanh long bị nhiễm bệnh bằng dung dịch đệm photphatase pH 7.0 được lây nhiễm tiếp xúc cơ học lên lá của các cây chỉ thị *Chenopodium quinoa* và *Gomphrena globosa*. Bột Carborundum (600 mesh) được sử dụng để tạo vết thương cơ học trên lá cây chỉ thị trước khi lây. Các cây chỉ thị sau lây nhiễm được đặt trong nhà lưới ở nhiệt độ khoảng 25-27°C. Triệu chứng trên lá được theo dõi sau 10, 20 và 30 ngày.

**2.3 Xác định vi rút bằng RT-PCR và giải trình tự**

RNA tổng số của vi rút được chiết từ mẫu nhiễm bệnh bằng CTAB theo phương pháp của Doyle và Doyle (1990). Phản ứng RT-PCR được thực hiện với M-MLV và DreamTaq sử dụng cặp mồi chung để phát hiện potexvirus gồm potex 1 (CAY CAR CAR GCX AAR GAY SA) và potex 2 (TCD GTR TTD GCR TCR AAD GT) (Duarte *et al.*, 2008).

Sản phẩm PCR được tinh chiết từ 0,7% agarose gel dùng kit tinh chiết thương mại theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Hàm lượng DNA được ước lượng nồng độ bằng điện di agarose. Sản phẩm PCR được giải trình tự trực tiếp 1 chiều dùng mồi potex 1 (CAY CAR CAR GCX AAR GAY SA) tại hãng Macrogen của Hàn Quốc. Trình tự nucleotide được so sánh với cơ sở dữ liệu trên Genbank bằng phần mềm tuyến BLAST tại NCBI (the National Center for Biotechnology Information) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Tiếp theo, cây phả hệ về mối quan hệ giữa các chuỗi nucleotide được xây dựng bằng phương pháp Neighbor-Joining (Saitou và Nei, 1987) sẵn có trong phần mềm MEGA 7.0 (Kumar *et al.*, 2016).

**2.4 Đánh giá sự truyền bệnh qua nhân giống vô tính**

Trong nghiên cứu này, 30 mẫu cành thanh long bị nhiễm vi rút thu thập tại Ba Vì - Hà Nội, Bắc Giang và Quảng Ninh được trồng và duy trì trong chậu, 1 cành/chậu và chăm sóc ở nhà lưới với nhiệt độ 25-28°C trong thời gian 3 tháng để theo dõi sự nhiễm bệnh của các mầm/cành mới mọc.

**3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN**

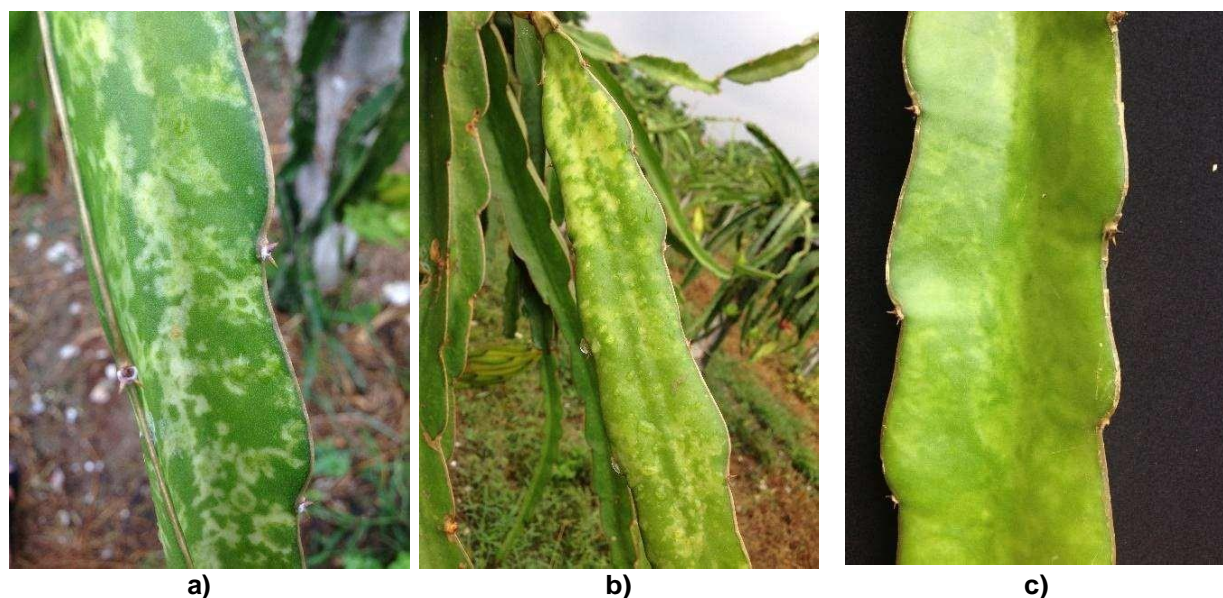
**3.1 Mức độ và thu thập mẫu bệnh virus gây hại cây thanh long**

Trong các lần điều tra đồng ruộng về mức độ và thu mẫu bệnh vi rút trên cây thanh long ruột đỏ và ruột trắng tại Bình Thuận, thanh long ruột đỏ tại Ba Vì – Hà Nội, Bắc Giang và Quảng Ninh đều có triệu chứng nhiễm vi rút. Triệu chứng điển hình là các đốm vàng (hình 1b), đôi khi dạng vòng (hình 1a) hoặc khảm (hình 1c), toàn cây bị nhiễm với triệu chứng từ nhẹ (systemic mild mottling) đến nặng (systemic severe mottling) với tỷ lệ bệnh 8-10% tại Bình Thuận, 15-20% tại Quảng Ninh và Bắc Giang, 51-55% tại Ba Vì – Hà Nội (bảng 1, hình 1). Trên thế giới, hiện tại mới chỉ ghi nhận duy nhất *Cactus virus X* (CVX) gây hại trên thanh long.

**Bảng 1. Mức độ và triệu chứng bệnh vi rút trên cây thanh long**

Địa điểm thu thập	Giống	Thời gian thu thập	Bộ phận bị bệnh	Triệu chứng	Mức độ phổ biến
Hàm Thuận Nam- Bình Thuận	ruột đỏ, trắng	2016	cành	đốm biến vàng nhẹ	+
Hàm Thuận Bắc – Bình Thuận	ruột đỏ, trắng	2016	cành	đốm biến vàng rõ	+
Quảng Yên- Quảng Ninh	ruột đỏ	2017	cành	đốm biến vàng rõ	++
Bắc Giang	ruột đỏ	2017	cành	đốm vàng, khảm nhẹ	++
Ba Vì – Hà Nội	ruột đỏ	2018	cành	đốm biến vàng nhẹ	+++

Ghi chú: +: Tỷ lệ bệnh ≤10%; ++: Tỷ lệ bệnh 11 - ≤25%; +++: Tỷ lệ bệnh 25 - < 50%



Hình 1. Triệu chứng bệnh vi rút trên thanh long ruột đỏ. a-b) Triệu chứng đốm vàng điển hình (systemic severe mottling) tại Bình Thuận và Quảng Ninh. c) Triệu chứng đốm vàng/khảm nhẹ (systemic mild mottling) tại Ba Vì – Hà Nội.

Tuy nhiên, đến nay chưa có đánh giá về ảnh hưởng của bệnh vi rút tới năng suất trồng thanh long. Quan sát triệu chứng trên đồng ruộng đã ghi nhận đa số ở các cây có triệu chứng bị nhiễm vi rút thì quả thanh long cung bình thường giống như cây không có triệu chứng. Tuy nhiên, ở những cây có triệu chứng nặng thì cho quả nhỏ hơn. Đặc biệt, ở những cây thanh long nhiễm bệnh vi rút, tỷ lệ nhiễm bệnh đốm nâu (*Neoscytalidium dimidiatum*) giảm rõ rệt so với các cây không có triệu chứng vi rút.

### 3.2 Kiểm tra sự xuất hiện của vi rút trong mẫu bệnh bằng cây chỉ thị

Triệu chứng do vi rút gây ra có thể nhầm lẫn với các triệu chứng sinh lý của cây hoặc côn

trùng gây hại. Tuy nhiên, khi lây nhiễm mẫu lá bệnh lên các cây chỉ thị như cây rau muối (*Chenopodium quinoa*, *C. amaranticolor*), cúc bách nhật (*Gomphrena globosa*) và thuốc lá cảnh (*Nicotiana benthamiana*) thì chỉ mẫu nhiễm vi rút mới có biểu hiện triệu chứng như vết đốm chết hoại, đốm màu vàng trên cây rau muối hoặc triệu chứng khảm trên cây thuốc lá cảnh. Ngược lại, nếu triệu chứng do sinh lý của cây hoặc côn trùng gây hại giống với vi rút thì se không có triệu chứng khi lây trên các cây chỉ thị. Vì vậy, các mẫu thanh long có triệu chứng giống vi rút đã thu thập được trong nghiên cứu này bước đầu được kiểm tra sự xuất hiện của vi rút bằng lây nhiễm lên các cây chỉ thị rau muối (*C. quinoa*) và cúc bách nhật (*G. globosa*) (bảng 2).

Bảng 2. Kết quả kiểm tra mẫu thanh long nhiễm vi rút bằng cây chỉ thị

Ngày sau lây	Triệu chứng trên cây chỉ thị	
	Cây rau muối ( <i>Chenopodium quinoa</i> )	Cây cúc bách nhật ( <i>Gomphrena globosa</i> )
5	-	-
10	Các vết đốm vàng mờ	-
15	Các vết đốm vàng mờ	Đốm chết hoại có viền đỏ, rõ
20	Các vết đốm vàng rõ	Đốm chết hoại có viền đỏ, rõ

Ghi chú: - (chưa xuất hiện triệu chứng)



**a)** **b)**  
 Hình 2. Lây bệnh nhân tạo mẫu thanh long nhiễm bệnh vi rút thu thập ở Bình Thuận lên cây rau muối với biểu hiện triệu chứng đốm vàng trên lá (a) và đốm chết hoại có quầng màu đỏ trên cây cúc bách nhật (b).

Lây nhiễm nhân tạo mẫu thanh long nhiễm vi rút lên cây rau muối và cúc bách nhật cho triệu chứng đốm vàng và đốm chết hoại giống như các nghiên cứu đã công bố do vi rút gây ra (Liou, 2001; 2004; Kim *et al*, 2016). Kết quả này đã minh chứng được các mẫu cành thanh long đã thu thập là do vi rút.

**3.4 Phát hiện và xác định vi rút bằng RT-PCR và giải trình tự gene**

Với kết quả thí nghiệm đã khẳng định sự có mặt của vi rút trong mẫu thanh long, dựa trên các kết quả công bố về triệu chứng cũng như sự xác định vi rút gây bệnh thanh long của các

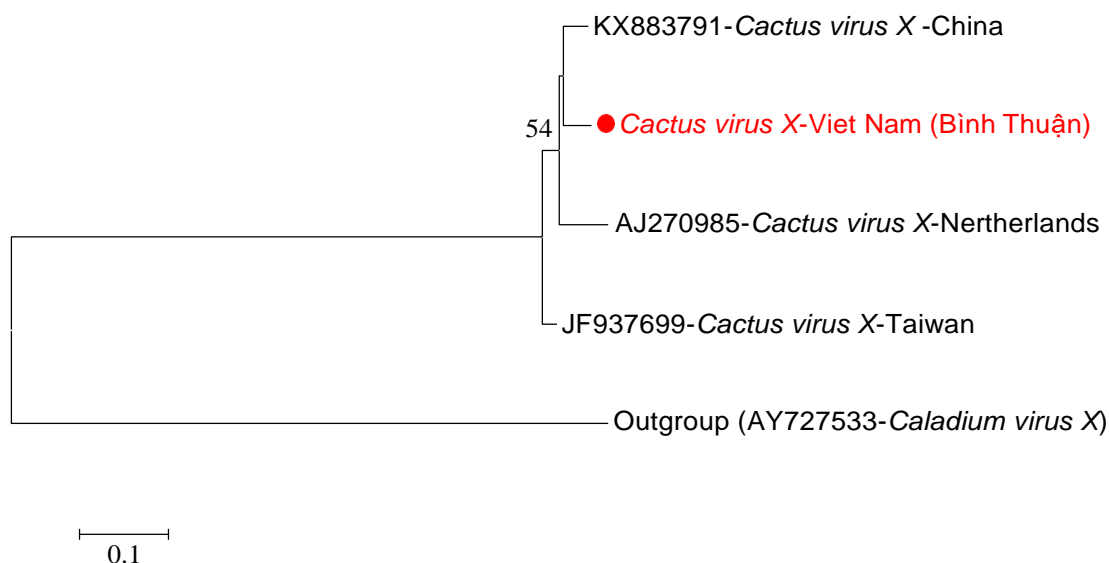
nghiên cứu trước (Liou, 2001; 2004; Kim *et al*, 2016) cũng như sự giống nhau về triệu chứng từ các mẫu thanh long đã thu thập. Trong phạm vi nghiên cứu này, đã tập trung xác định potexvirus bằng kỹ thuật RT-PCR và giải trình tự gene bằng cặp mồi chung potex1 và potex2. Sản phẩm RT-PCR thu được có kích thước khoảng 700 bp. Trình tự nucleotide thu được khoảng 650 bp đọc rõ nét, chất lượng tốt, không nhiễu. Kết quả tìm kiếm chuỗi gần trên Genbank được xác định là *Cactus virus X* (CVX) với % đoạn so sánh là 100% và mức đồng nhất trình tự là 96-97% (bảng 3).

Bảng 3. Kết quả tìm kiếm chuỗi gần gũi trên ngân hàng gene (GeneBank) đối với mẫu vi rút thanh long ở Việt Nam

Mã trình tự	Loài xác định	Quốc gia	% đoạn so sánh	Mẫu đồng nhất trình tự (%)
KX883791	<i>Cactus virus X</i>	Trung Quốc	100	97,0
JF937699	<i>Cactus virus X</i>	Đài Loan	100	96,0
AJ270895	<i>Cactus virus X</i>	Hà Lan	77,0	95,0
AY727533	<i>Caladium virus X</i>	Braxin	7,0	90,0

Dựa vào kết quả tìm kiếm chuỗi trên ngân hàng gene, từ đó đã xây dựng cây phả hệ với mẫu CVX (Trung Quốc, Hà Lan và Đài Loan) sẵn có trên Genbank, mẫu đối chứng (outgroup) được sử

dụng là *Caladium virus X* (hình 3). Căn cứ vào các kết quả nghiên cứu công bố trên các tạp chí trong nước và quốc tế, CVX là vi rút được xác nhận lần đầu tiên nhiễm trên thanh long ở Việt Nam.



Hình 3. Cây phả hệ được xây dựng bằng phương pháp Neighbor-Joining trong MEGA 7.0. Giá trị ở các nốt của cây phả hệ là giá trị thống kê bootstrap dưới dạng % (1000 lần lặp). Thanh bar (0.1) thể hiện khoảng cách di truyền.

**3.3** Đánh giá sự lan truyền bệnh qua nhân giống vô tính của *Cactus virus X*

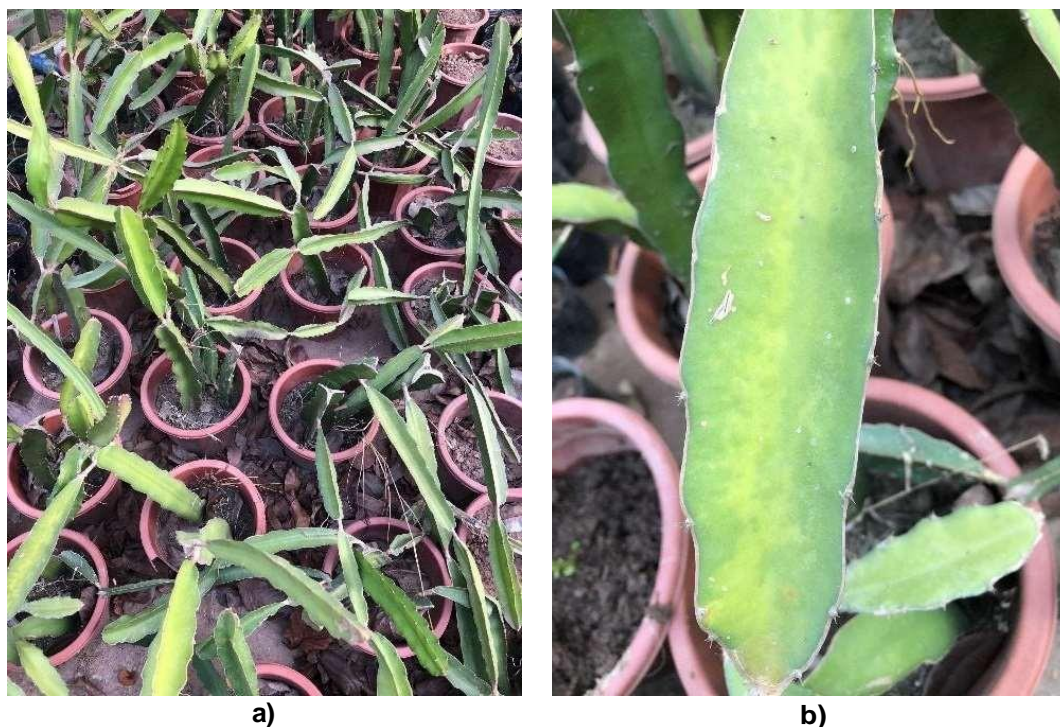
Vi rút thực vật nói chung lan truyền qua con đường tiếp xúc cơ học, nhưng hiếm gặp ở ngoài tự nhiên, chủ yếu lan truyền qua côn trùng môi giới như rầy, rệp... và qua nhân giống vô tính. Thanh long được trồng bằng nhân giống vô tính là chủ yếu, nên khi nhân

giống không kiểm soát được cây mẹ nhiễm bệnh thì sẽ làm gia tăng bệnh trong sản xuất. Theo trang Plant Virus Online (<http://sdb.im.ac.cn/vide/descr132.htm>), CVX truyền qua tiếp xúc cơ học, ghép và tiếp xúc giữa các cây trồng. Trong nghiên cứu này, 30 mẫu bị nhiễm CVX được trồng trong chậu và theo dõi trong thời gian 3 tháng (bảng 4).

Bảng 4. Đánh giá sự truyền *Cactus virus X* qua nhân giống vô tính

Thời gian sau trồng	Số cành nhiễm bệnh được trồng	Số chồi mọc mới nhiễm vi rút	Triệu chứng
15	30	n	
30	30	-	
45	30	25	đốm vàng mờ
60	30	27	đốm vàng rõ
75	30	27	đốm vàng rõ
90	30	27	đốm vàng rõ

Ghi chú: n (chưa mọc cành mới), - cành mới nhú 5cm và chưa quan sát thấy triệu chứng vi rút.



Hình 4. Duy trì các cành thanh long nhiễm **Cactus virus X** trong chậu để theo dõi sự truyền bệnh virus (a) và triệu chứng đốm biến vàng ban đầu trên các cành thanh long mới (b)

Kết quả theo dõi cho thấy, khi mới hình thành chồi non từ đoạn thân làm giống, các chồi non này chưa biểu hiện triệu chứng sau 30 ngày trồng. Triệu chứng bắt đầu xuất hiện trên các chồi mới sau 45 ngày và rõ nhất sau 60 ngày trồng, triệu chứng điển hình trong thí nghiệm giống với triệu chứng ngoài đồng ruộng. Tỷ lệ các chồi mới nhiễm bệnh rất cao (27/30 cành bị nhiễm bệnh). Như vậy, trong sản xuất khi nhân giống vô tính thanh long bằng giâm cành cần quản lý cây mẹ nghiêm ngặt, phải sạch bệnh và phải được kiểm tra trước khi dùng để nhân giống.

#### 4. KẾT LUẬN

Triệu chứng khảm cành thanh long được xác định là *Cactus virus X* (CVX) thuộc chi Potexvirus. Lần đầu tiên phát hiện, xác định và ghi nhận vi rút này ở Việt Nam. CVX nhiễm trên cây chỉ thị như rau muối (*Chenopodium quinoa*) và cúc bách nhật (*Gomphrena globosa*). Phát hiện này góp phần vào kiểm soát bệnh vi rút hại thanh long qua con đường nhân giống vô tính.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu này được hỗ trợ bởi đề tài

“Nghiên cứu phòng chống bệnh đốm nâu và một số bệnh hại chính khác trên cây thanh long” thuộc đề tài nghiên cứu khoa học cấp bộ giai đoạn 2015-2017.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Doyle J.J. and Doyle J.L, 1990. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull.*, 19: pp. 11–15.
2. Duarte L.M.L., Alexandre M.A.V., Rivas E.B., Harakava R., Galletti S.R. and Barradas M.M, 2008. Potexvirus diversity in Cactaceae from Sao Paulo State in Brazil. *Journal of Plant Pathology* 90: pp. 545-551.
3. Kim J.S., Park. C.Y., Nam M., Kim H.G. and Lee S.H, 2016. First Report of *Cactus virus X* Infecting *Hylocereus undatus* in Korea. *Plant Disease*, 100 (12): p. 2544.
4. Kumar S., Stecher G., and Tamura K, 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33: pp.1870-1874.
5. Lin W., Liao F., Chen X, 2015. Isolation and identification of the pathogen causing soft rot

in *Hylocereus undatus*. *Acta Phytopathologica Sinica*, 45(2): pp. 220-224.

6. Liou M.R., Hung C.L., Liou R.F, 2001. First report of *Cactus virus X* on *Hylocereus undatus* (Cactaceae) in Taiwan. *Plant Disease*. pp. 85: 229.

7. Liou M.R., Chen Y.R., Liou R.F, 2004. Complete nucleotide sequence and genome organization of a Cactus virus X strain from *Hylocereus*

*undatus* (Cactaceae). *Achieve of Virology*. 149(5): pp.1037-43.

8. Saitou N. and Nei M, 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4:406-425.

*Phản biện:* TS. Lê Mai Nhất