

XÁC ĐỊNH MỐI QUAN HỆ GIỮA RỆP SÁP BỘT HỒNG VÀ BỆNH CHỐI RỒNG GÂY HẠI CÂY KHOAI MÌ TRÊN ĐỊA BÀN TỈNH TÂY NINH

CONFIRMATION OF RELATIONSHIP BETWEEN PINK CASSAVA MEALYBUG AND WITCHES BROOM DISEASE ON CASSAVA IN TAY NINH PROVINCE

An Quang Vinh¹, Phạm Đức Toàn¹, Bùi Cách Tuyến²

¹ Viện nghiên cứu Công nghệ Sinh học và Môi trường, Trường Đại học Nông Lâm Tp. HCM,

² Khoa Tài nguyên và Môi trường, Trường Đại học Nông Lâm Tp. HCM

TÓM TẮT

Rệp sáp bột hồng và bệnh chối rồng trên khoai mì là những đối tượng gây hại nghiêm trọng trên cây khoai mì trong những năm gần đây trên địa bàn tỉnh Tây Ninh và những vùng có canh tác cây khoai mì. Kết quả của nghiên cứu này đưa ra thông tin về mối quan hệ giữa rệp sáp bột hồng và bệnh chối rồng trên khoai mì, cũng như mức độ nhiễm phytoplasma từ triệu chứng chối rồng. Kết quả cho thấy khi phân tích chẩn đoán bằng kỹ thuật Nested PCR chỉ phát hiện 3 mẫu dương tính với Phytoplasma trên tổng số 18 mẫu có triệu chứng chối rồng thu được, tỉ lệ dương tính là 16,7%, do đó triệu chứng chối rồng trên khoai mì ngoài thực địa đồng ruộng không phải do 100% phytoplasma gây ra. Thêm nữa, chưa thấy sự hiện diện của phytoplasma trên cây khoai mì sau 60 ngày lây nhiễm rệp sáp hồng. Vì vậy chưa thể kết luận rệp sáp bột hồng là môi giới truyền phytoplasma gây bệnh chối rồng trên cây khoai mì. Kết quả của nghiên cứu này là những thông tin bước đầu về mối quan hệ giữa rệp sáp bột hồng và bệnh chối rồng do phytoplasma gây ra trên cây khoai mì, để từ đó các nhà Bảo vệ Thực vật có định hướng nghiên cứu chuyên sâu hơn.

Từ khóa: bệnh chối rồng, khoai mì, nested PCR, rệp sáp bột hồng, phytoplasma.

ABSTRACT

Recent years, Pink cassava mealybug and witches broom disease are the serious pests on cassava in Tay Ninh province and other cultivated cassava regions. The results of this study displayed information for relationship between pink cassava mealybug and witches broom disease on cassava, as well as the rate of phytoplasma from witches broom disease symptom of cassava. The results showed that 3/18 samples collected has positive with phytoplasma by using nested PCR, with 16.7%. Therefore, witches broom disease symptom at cassava farms was not 100% caused by phytoplasma. Addition, phytoplasma was not found after 60 days of pink cassava mealybug infection in cassava plant. Hence, pink cassava mealybug could not be phytoplasma vector on cassava. The results of this study was one of the first information of relationship between pink cassava mealybug and witches broom disease on cassava, since, that plant protection researchers have a trend to deep study in pink cassava mealybug and witches broom disease.

Keywords: cassava, nested PCR, pink cassava mealybug, phytoplasma, witches broom disease.

GIỚI THIỆU

Cây khoai mì (*Manihot esculenta* Crantz) là một trong những loại cây lương thực có nguồn gốc từ lưu vực sông Amazone (Nam Mỹ). Ở nước ta, cây khoai mì đã được du nhập vào khoảng thế kỉ 18 và được trồng ở nhiều tỉnh thành như Tây Ninh, Đồng Nai. Tại Việt Nam, khoai mì là cây lương thực lấy củ có vị trí quan trọng trong cơ cấu phát triển cây lương thực của cả nước và có sản lượng đứng hàng thứ ba sau lúa và ngô. Cùng với truyền thống trồng khoai mì từ lâu đời, nhân dân ta đã biết chế biến củ khoai mì làm lương thực cho người và làm thức ăn cho gia súc. Bên cạnh đó, khoai mì còn có rất nhiều ứng dụng trong các ngành kinh tế khác nhau. Khoai mì rất dễ trồng, hợp với nhiều loại đất, hợp với khả năng kinh tế với nhiều hộ gia đình nông dân nghèo, thiếu lao động. Khoai mì cũng có khả năng cạnh tranh cao vì sử dụng hiệu quả tiền vốn, đất đai, tận dụng tốt các loại đất nghèo dinh dưỡng, cho năng suất cao và ổn định, chi phí đầu tư thấp, sử dụng ít nhân công, hiệu quả đầu tư cao. Tuy nhiên gần đây, nhiều nông dân đã bị “trắng tay” do bệnh chổi rồng hoành hành. Bệnh này lây lan rất nhanh và chưa có thuốc điều trị hiệu quả. Theo công bố mới nhất của Viện Bảo vệ thực vật, bệnh chổi rồng do phytoplasma là tác nhân gây bệnh. Cây khoai mì bị bệnh sớm thường không cho thu hoạch, cây bị bệnh muộn thường giảm 10 – 30 % năng suất và giảm 20 – 30 % hàm lượng tinh bột. Điều lo lắng nhất hiện nay là việc xác định các vật chủ truyền bệnh thuộc nhóm các côn trùng chích hút như nhện đỏ, rệp sáp, rệp sáp bột hồng còn nằm trong diện nghi vấn gây khó khăn cho việc phòng bệnh. Chính vì vậy việc xác định chính xác vector mang nguồn bệnh chổi rồng trên cây khoai mì là rất cần thiết và cấp bách, để từ đó có phương hướng ngăn chặn sự lây lan, phòng trừ hữu hiệu bệnh chổi rồng trên cây khoai mì. Hiện nay rệp sáp hồng là đối tượng côn trùng gây hại nặng nhất trong nhóm các côn trùng gây hại khoai mì. Năm 2013, tỉnh Tây Ninh đã công bố dịch rệp sáp hồng gây hại khoai mì trên toàn bộ địa bàn của tỉnh. Vì vậy mục tiêu của nghiên cứu này là xác định rệp sáp bột hồng có phải là đối tượng vector truyền bệnh chổi rồng hay không, để từ đó có hướng quản lý và phòng trừ hiệu quả hai đối tượng dịch hại này.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu mẫu khoai mì dùng lây nhiễm rệp sáp bột hồng

Giống khoai mì để thực hiện lây nhiễm là giống KM419, đây là một trong những giống bị nhiễm rệp sáp bột hồng nặng ngoài đồng ruộng trong mùa nắng, cũng như bị nhiễm bệnh chổi rồng. Các hom khoai mì được kiểm tra sạch bệnh bằng kỹ thuật Nested PCR để đảm bảo nguồn hom giống sạch phytoplasma trước khi trồng. Tổng số chậu trồng là 15 chậu, 2 cây/chậu, rệp được lây nhiễm khi khoai mì lên cao khoảng 25-35 cm, nguồn rệp được thu trên cây khoai mì bệnh chổi rồng do phytoplasma gây ra, rệp được nhân thả trên ngọn của khoai mì khỏe (Hình 1), các lần theo dõi bao gồm 15; 30; 45; 60 ngày sau khi lây nhiễm thu mẫu khoai mì để kiểm tra sự hiện diện của phytoplasma bằng kỹ thuật Nested PCR.



Hình 1. Rệp sáp bột hồng được lây nhiễm trên khoai mì khỏe có lồng lưới bảo vệ



Hình 2. Các triệu chứng bệnh trên cây khoai mì thu từ tỉnh Tây Ninh.

A: Cây mọc nhiều chồi thân và chồi ngọn; B: Cây mọc nhiều chồi giữa thân; C: Cây bị nhiễm rệp và các đốt thân gắn khít lại với nhau. D: Lá cây bị khô, gỗ hóa nâu

Nguồn rệp và phytoplasma thu thập từ đồng ruộng

Tổng số mẫu thu thập được là 18 mẫu khoai mì có các biểu hiện bệnh như nhiều chồi, lá vàng đen, thân cây có nhiều đốt ngắn khít lại với nhau, xoắn đọt, cây kém phát triển, nhiễm rệp sáp bột hồng đã được thu thập từ tỉnh Tây Ninh (hình 2). Những cây khoai mì này sau khi thu về, được trồng tại khu thực nghiệm Viện Nghiên cứu Công nghệ Sinh học và Môi trường nhằm giữ mẫu và nuôi rệp sáp bột hồng.

Ly trích DNA và thực hiện nested PCR

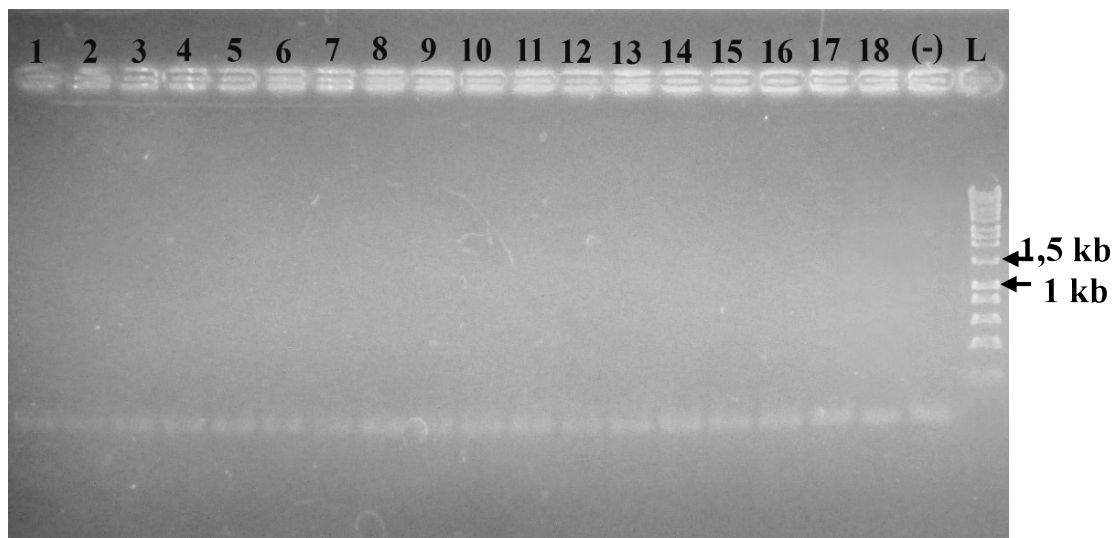
DNA tổng số của các mẫu lá ở các giai đoạn lây nhiễm rệp sáp hồng được ly trích bằng kit ly trích DNA tổng số của hãng Promega, Mỹ. Quy trình ly trích được tiến hành theo như hướng dẫn của nhà sản xuất. DNA ly trích từ các mẫu nghi ngờ nhiễm Phytoplasma được sử dụng làm khuôn DNA để thiết lập quy trình nested PCR. PCR bước 1 được tiến hành theo tham khảo từ nghiên cứu của Smart và cs (1996). Sản phẩm khuếch đại của PCR bước 1 có kích thước khoảng 1,6 kb. Tiếp theo, sản phẩm PCR bước 1 được pha loãng 5 lần để sử dụng làm khuôn DNA cho PCR bước 2. Cặp mồi và quy trình PCR bước 2 được dựa trên nghiên cứu của tác giả Gundersen và Lee (1996). Kích thước DNA được khuếch đại bởi PCR bước 2 khoảng 1,2 kp. Sau khi thực hiện nested PCR (PCR bước 2) 8 μ l sản phẩm PCR điện di trên gel agarose 1%, hiệu điện thế 80 V, cường độ dòng điện 400 mA, trong 30 phút. Gel được nhuộm và quan sát dưới tia UV. Việc đánh giá mẫu thu thập có sự hiện diện của Phytoplasma dựa vào việc xuất hiện băng đích với kích thước 1,2 kb của sản phẩm PCR bước 2.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Kết quả kiểm tra 18 mẫu khoai mì có biểu hiện bệnh chổi rồng được thu từ thực địa

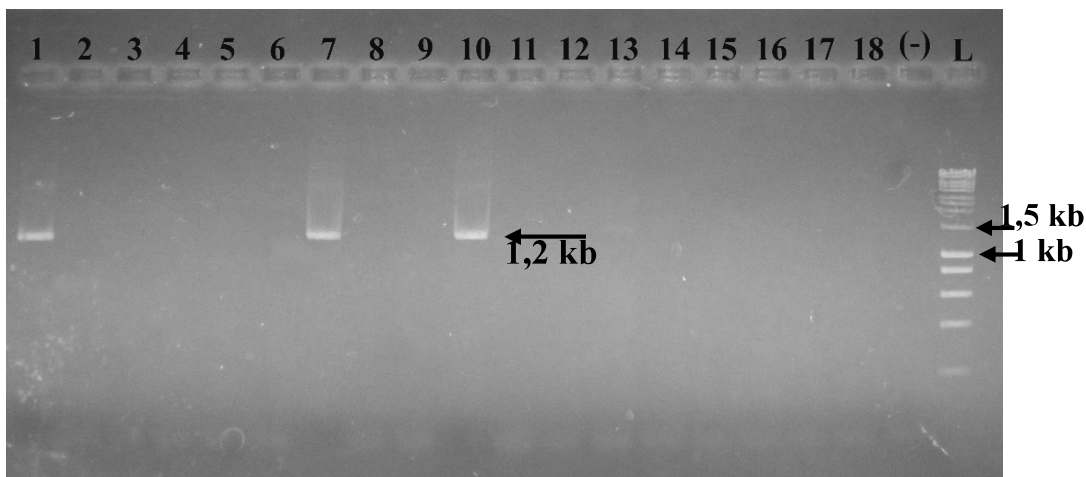
Kết quả phản ứng PCR bước 1

DNA của 18 mẫu khoai mì sau khi ly trích được kiểm tra bằng phản ứng PCR bước 1 với cặp mồi đầu tiên là P1/Tint. Kích thước sản phẩm sau khi khuếch đại khoảng 1,6 kb (Smart và cs, 1996). Kết quả phản ứng PCR bước 1 được thể hiện trong hình 3. Khác hoàn toàn với kết quả được công bố trong báo cáo của Smart và cs (1996) là sau khi được khuếch đại bằng phản ứng PCR với cặp mồi P1/Tint, sản phẩm thu được có kích thước khoảng 1,6 kb. Kiểm tra thực tế không quan sát được sự xuất hiện của sản phẩm có kích thước 1,6 kb trên gel điện di sau khi thực hiện phản ứng PCR bước 1, điều này đã được kiểm chứng lại 3 lần trên 18 mẫu khoai mì được thu về từ tỉnh Tây Ninh, chứng tỏ 18 mẫu khoai mì có biểu hiện bệnh sau khi thực hiện phản ứng PCR bước 1 đều chưa thể nhận diện phytoplasma. Nguyên nhân có thể là hàm lượng DNA của phytoplasma trong DNA tổng số ly trích được quá thấp. Điều này cũng phù hợp với nghiên cứu của Gundersen và cs (1996) đã đề cập đến vấn đề này, tác giả cho rằng khi phytoplasma mới xâm nhập vào cây ký chủ thì hàm lượng của phytoplasma trong hệ mạch dẫn là rất thấp, sau đó hàm lượng phytoplasma bắt đầu tăng dần. Hàm lượng phytoplasma hiện diện trong cây còn thay đổi thất thường theo mùa (Gundersen và cs, 1996; Jabcofs và cs, 2003). Tương tự kết quả của Bectaccini (2007) cũng chỉ ra rằng DNA của phytoplasma chỉ chiếm khoảng 1 % DNA tổng số ly trích được, sau khi thực hiện phản ứng khuếch đại lượng sản phẩm vẫn chưa đủ để có thể quan sát thấy trên gel điện di. Để có cơ sở khẳng định, những sản phẩm của PCR bước 1 tiếp tục được thực hiện phản ứng PCR bước 2 với cặp mồi R16F2n/R16R2.



Hình 3. Kết quả điện di sản phẩm PCR bước 1 của 18 mẫu khoai mì có biểu hiện bệnh. 1 – 18: 18 mẫu khoai mì, (-): Đối chứng âm, L: Ladder 1 kb. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1 % ở 100V trong 30 phút.

Kết quả PCR bước 2



Hình 4. Kết quả điện di sản phẩm PCR bước 2 18 mẫu khoai mì có biểu hiện bệnh. 1 – 18: 18 mẫu khoai mì, (-): Đối chứng âm, L: Ladder 1 kb. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1 % ở 100V trong 30 phút.

Sản phẩm của phản ứng PCR bước 1 sau khi thu nhận được pha loãng 5 lần và được làm nguyên liệu khuôn mẫu cho phản ứng PCR bước 2 với cặp mồi R16F2n/R16R2. Kết quả điện di sản phẩm của phản ứng PCR bước 2 cho thấy có xuất hiện sản phẩm khuếch đại, kích thước khoảng 1,2 kb ở các mẫu số 1, 7 và 10. Kết quả này tương tự với báo cáo của Flores và cs (2013) là sau phản ứng khuếch đại với cặp mồi R16F2n/R16R2 sẽ thu được sản phẩm có kích thước khoảng 1,2 kb (Hình 4).

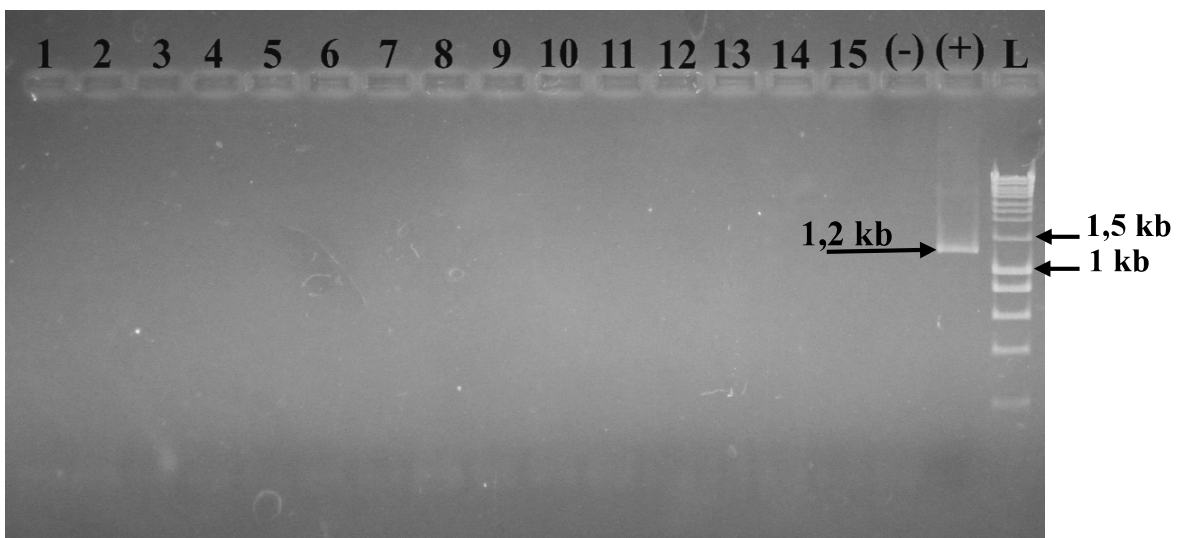
Sự xuất hiện sản phẩm trên băng điện di chứng tỏ trong mẫu số 1, 7 và 10 có sự xuất hiện của phytoplasma, như vậy do lượng DNA của phytoplasma ly trích được trong cây khoai mì là rất ít nên sau khi thực hiện phản ứng PCR bước 1, lượng DNA phytoplasma khuếch đại

vẫn chưa thể quan sát được trên gel điện di. Các mẫu còn lại không thu được sản phẩm có thể do trong mẫu không chứa DNA của phytoplasma, hoặc mẫu khoai mì có biểu hiện bệnh không phải do phytoplasma gây ra. Những mẫu dương tính với phytoplasma ở trên sẽ được sử dụng làm đối chứng dương cho các nội dung ở sau. Đồng thời hình 4 cũng cho băng kích thước sản phẩm 1,2 kb khá rõ, có thể thấy được, lượng phytoplasma thu được sau khi qua 2 bước khuếch đại là đủ để có thể quan sát trên gel điện di. Chứng tỏ, với phương pháp ly trích DNA này, tuy nồng độ DNA phytoplasma ban đầu thu được thấp nhưng vẫn đủ điều kiện để thực hiện phản ứng PCR sau đó. Như vậy quy trình ly trích DNA và quy trình PCR được sử dụng trong nghiên cứu này đều có thể sử dụng để phát hiện phytoplasma trên cây khoai mì và cho thí nghiệm kiểm tra lây nhiễm trong thí nghiệm tiếp theo.

Kết quả kiểm tra mẫu khoai mì trước và sau khi lây nhiễm

Kết quả PCR bước 2 các mẫu khoai mì trước khi lây nhiễm

Những mẫu khoai mì từ những cây không có biểu hiện bệnh sau khi trồng được thu nhận, ly trích DNA và kiểm tra bằng phản ứng nested PCR theo các quy trình đã được kiểm chứng trước đó. Kết quả điện di sản phẩm PCR bước 1 của những mẫu này cũng không cho thấy có sự xuất hiện của băng sản phẩm có kích thước khoảng 1,6 kb trên gel điện di nhưng vẫn tiếp tục dùng làm nguyên liệu khuôn mẫu cho phản ứng PCR bước 2. Kết quả kiểm tra của những mẫu khoai mì trước khi lây nhiễm được thể hiện trong hình 5.



Hình 5. Kết quả điện di sản phẩm PCR bước 2 mẫu khoai mì trước khi lây nhiễm.

1 – 15: 15 mẫu khoai mì; (-): Đối chứng âm; (+): Đối chứng dương; L: Ladder 1 kb. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1 % ở 100V trong 30 phút.

Hình 5 cho thấy không có sự xuất hiện của băng sản phẩm có kích thước 1,2 kb trên gel điện di hay các mẫu khoai mì trước khi lây nhiễm đều cho kết quả âm tính với phytoplasma, chứng tỏ những mẫu này khỏe mạnh và có thể sử dụng để thực hiện lây nhiễm rệp sáp bột hồng.

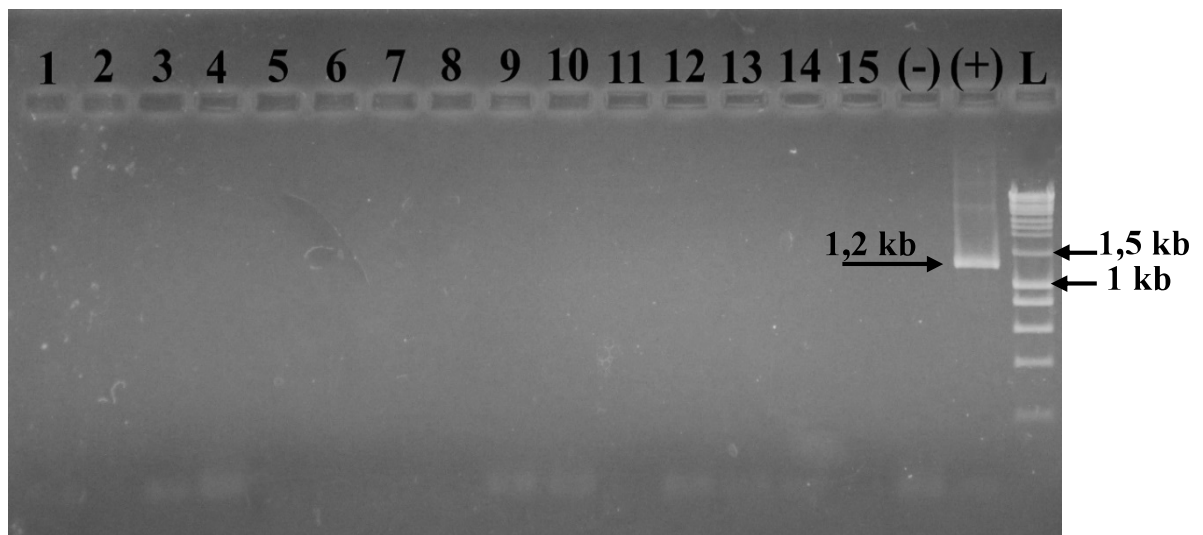
Kết quả PCR bước 2 mẫu khoai mì sau các khoảng thời gian lây nhiễm

Các mẫu khoai mì sạch bệnh được lây nhiễm rệp sáp bột hồng. Qua các khoảng thời gian, rệp sáp bột hồng đã phát triển trên cây khoai mì, gây ra các triệu chứng như xoắn đọt, xoắn lá, cây còi cọc (Hình 6).



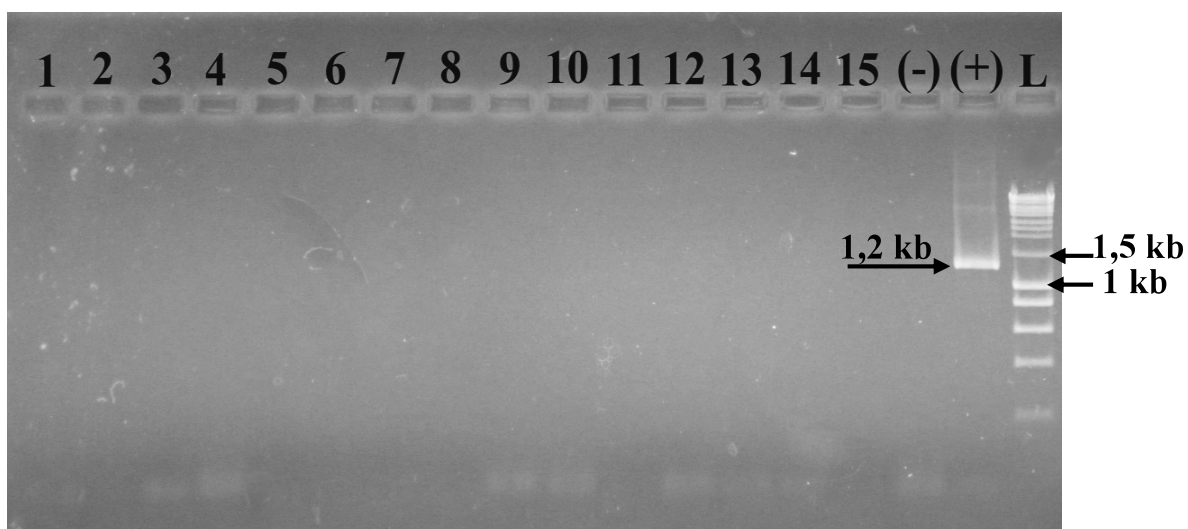
Hình 6. Cây khoai mì bị xoắn đọt sau 30 ngày lây nhiễm rệp sáp bột hồng.

Sau khi lây nhiễm 15, 30, 45 và 60 ngày, tại từng khoảng thời gian, các mẫu khoai mì lần lượt được thu nhận và kiểm tra bằng phản ứng nested PCR sự hiện diện của phytoplasma. Kết quả điện di sản phẩm PCR bước 2 qua các khoảng thời gian 15, 30, 45 và 60 ngày lây nhiễm rệp sáp bột hồng được thể hiện ở các hình 7, 8, 9 và 10.



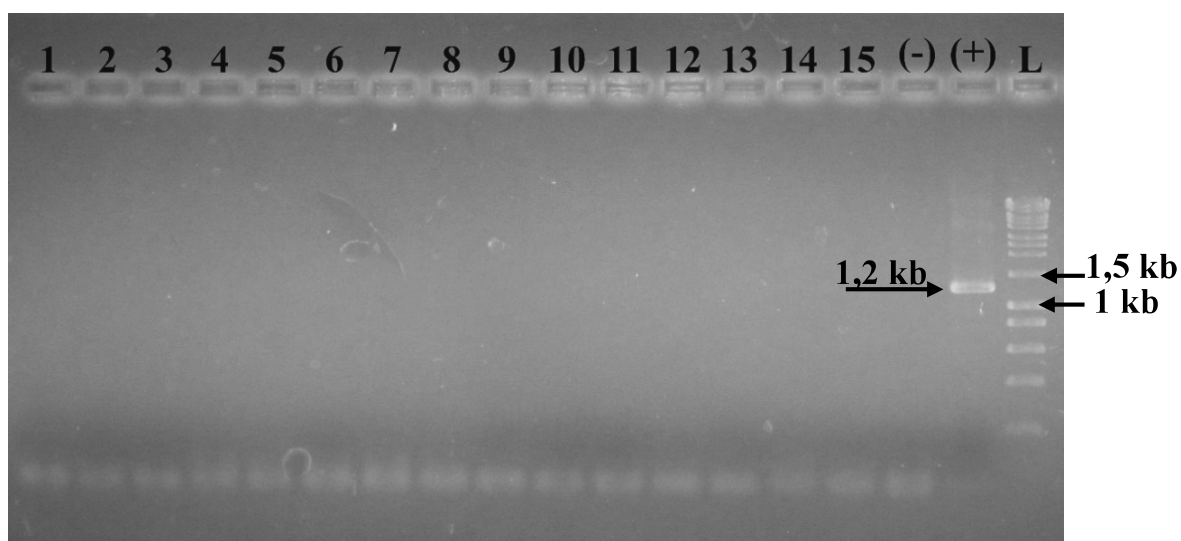
Hình 7. Kết quả PCR bước 2 các mẫu khoai mì sau 30 ngày lây nhiễm.

1 – 15: 15 mẫu khoai mì; (-): Đối chứng âm; (+): Đối chứng dương; L: Ladder 1 kb. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1 % ở 100V trong 30 phút.



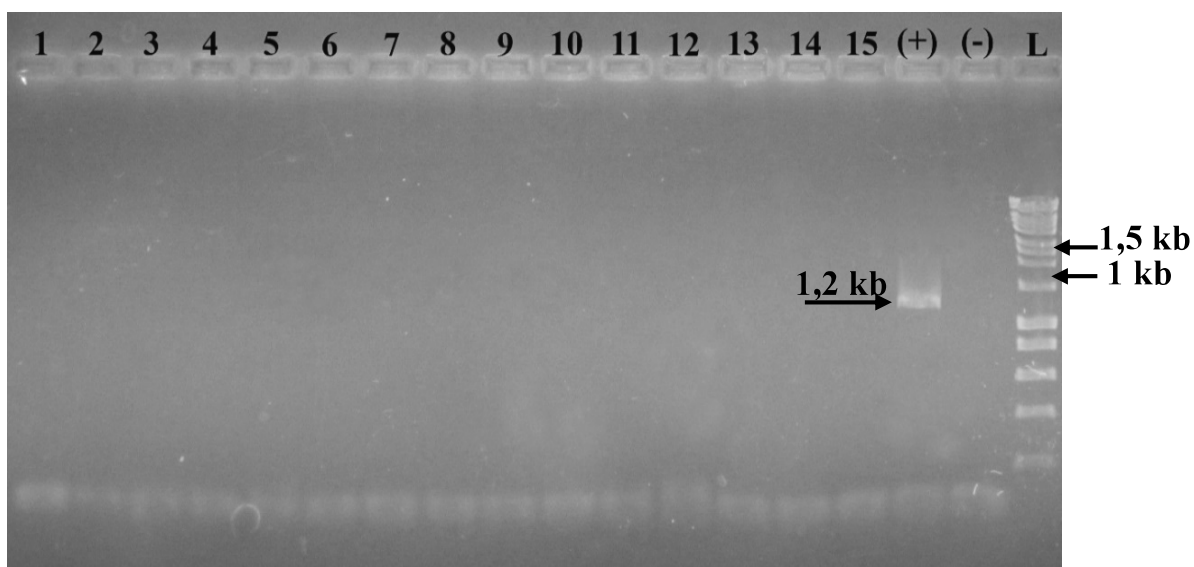
Hình 8. Kết quả PCR bước 2 các mẫu khoai mì sau 30 ngày lây nhiễm.

1 – 15: 15 mẫu khoai mì; (-): Đối chứng âm; (+): Đối chứng dương; L: Ladder 1 kb. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1 % ở 100V trong 30 phút.



Hình 9. Kết quả PCR bước 2 các mẫu khoai mì sau 45 ngày lây nhiễm.

1 – 15: 15 mẫu khoai mì; (-): Đối chứng âm; (+): Đối chứng dương; L: Ladder 1 kb. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1 % ở 100V trong 30 phút.



Hình 10. Kết quả PCR bước 2 các mẫu khoai mì sau 60 ngày lây nhiễm.

1 – 15: 15 mẫu khoai mì; (-): Đối chứng âm; (+): Đối chứng dương; L: Ladder 1 kb. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1 % ở 100V trong 30 phút.

Kết quả điện di kiểm tra cho thấy 15 mẫu khoai mì sau 15, 30, 45 và 60 ngày lây nhiễm rệp sáp bột hồng đều cho kết quả âm tính với phytoplasma. Điều này có thể do nhiều nguyên nhân như lượng phytoplasma được truyền từ rệp sáp bột hồng vào cây khoai mì chưa đủ để có thể gây bệnh cũng như chưa đủ để có thể kiểm tra phát hiện, quan sát trên gel điện di. Ngoài ra cũng có thể rệp sáp bột hồng không phải là côn trùng môi giới truyền phytoplasma gây bệnh chổi rồng trên cây khoai mì.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

Tổng số mẫu khoai mì có triệu chứng bệnh chổi rồng (triệu chứng xù đầu lân) được thu thập từ thực địa là 18 mẫu. Tuy nhiên khi phân tích chẩn đoán bằng kỹ thuật Nested PCR chỉ phát hiện 3 mẫu dương tính với Phytoplasma, tỉ lệ dương tính là 16,7%. Điều này cho thấy rằng triệu chứng chổi rồng trên khoai mì ngoài thực địa đồng ruộng không phải do 100% Phytoplasma gây ra. Thêm vào đó, từ kết quả lây nhiễm rệp sáp bột hồng trên khoai mì để kiểm tra sự hiện diện của phytoplasma cũng cho thấy sau 60 ngày lây nhiễm, chưa thấy sự xuất hiện của phytoplasma trên cây khoai mì. Điều này cho thấy có thể rệp sáp bột hồng chưa truyền phytoplasma trong khoảng thời gian 60 ngày sau lây nhiễm, hoặc rệp sáp bột hồng không phải là đối tượng vector truyền phytoplasma gây bệnh chổi rồng trên khoai mì. Do đó từ kết quả này chưa thể kết luận rệp sáp bột hồng truyền phytoplasma gây bệnh chổi rồng trên cây khoai mì. Đề nghị cần nghiên cứu thêm để làm sáng tỏ nghi vấn này. Kết quả của nghiên cứu này là những thông tin bước đầu về mối quan hệ giữa rệp sáp bột hồng và bệnh chổi rồng do phytoplasma gây ra trên cây khoai mì, để từ đó các nhà Bảo vệ Thực vật có định hướng nghiên cứu chuyên sâu hơn.

LỜI CẢM ƠN

Nhóm tác giả muốn gửi lời cảm ơn đến tất cả quý đồng nghiệp ở các địa phương trên địa bàn tỉnh Tây Ninh, nơi đã thu thập mẫu bệnh khoai mì, và quý đồng nghiệp tại Trường Đại học Nông Lâm Tp. Hồ Chí Minh đã tận tình giúp đỡ và hỗ trợ trong suốt quá trình nghiên cứu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bertaccini A. 2007. Phytoplasmas: diversity, taxonomy, and epidemiology. *Frontieres in Bioscience*, 12: 673 – 689.
- Flores D., Haas I.C., Canale M.C. and I.P. Bedendo. 2013. Molecular identification of a 16SrIII-B phytoplasma associated with cassava witches' broom disease. *European Journal of Plant Pathology*, 137: 237 – 242.
- Gundersen D.E và Lee I.M. 1996. Ultrasensitive detection of phytoplasma by nested-PCR assays using two universal pairs. *Phytopath. Medit*, 35, 144-151.
- Gundersen D.E, Lee I.M, Schaff D.A, Harrison N.A, Chang C.J, Davis R.E, Kinsbury D.T. 1996. Genomic diversity among phytoplasma strains in 16S rRNA group I (Aster Yellows and related phytoplasma) and III (X-Disease and related phytoplasma). *International journal of systematic bacteriology*, 46, 64-75.
- Gundersen D.E và Lee I.M. 1996. Ultrasensitive detection of phytoplasma by nested-PCR assays using two universal pairs. *Phytopath. Medit*, 35, 144-151.
- Jacobs K.A, Lee I.M, Griffiths H.M, Miller F.D, Bottner K.D. 2003. A new member of the clover proliferation phytoplasma group (16SrVI) associated with em yellows in Illinois. *Plant Disease*, 87, 241-246.
- Smart C.D, B. Scheider, C.L Blomquist and L.J Guerra. 1996. Phytoplasma-Specific PCR Primers Based on Sequences of the 16S-23S rRNA Spacer Region. *Applied and environmental microbiology*, 62, 2988–2993.