

ỨNG DỤNG KỸ THUẬT PCR CHẨN ĐOÁN *PIPER YELLOW MOTTLE VIRUS* GÂY HẠI TRÊN HỒ TIÊU (*Piper nigrum* L.) Ở VIỆT NAM

Nguyễn Xuân Dũng¹, Dương Hoa Xô¹

¹ Trung tâm Công nghệ Sinh học Thành phố Hồ Chí Minh

TÓM TẮT

Piper yellow mottle virus (PYMoV) là một trong 2 loại virus gây hại chính trên hồ tiêu đã được phát hiện ở nhiều nước trên thế giới. Tuy nhiên, vấn đề chẩn đoán virus PYMoV trên hồ tiêu vẫn chưa được quan tâm nhiều tại Việt Nam. Để hỗ trợ cho việc chẩn đoán chính xác tác nhân gây bệnh virus trên hồ tiêu, trong đó có PYMoV, và sản xuất giống tiêu sạch virus ở Việt Nam, quy trình PCR đã được phát triển để chẩn đoán virus này. Theo đó, kỹ thuật PCR được áp dụng để khuếch đại đoạn gen có kích thước khoảng 450 bp hay 400 bp từ bộ gen virus với mỗi PYMoI hay PYMoIII tương ứng. Quy trình chẩn đoán được sử dụng cho việc xác định sự hiện diện của virus ở các vườn trồng hồ tiêu tại các khu vực Tây Ninh, Đồng Nai và Đắk Lắk. Kết quả cho thấy đã phát triển thành công quy trình chẩn đoán PYMoV. Phản ứng PCR có thể phát hiện virus ở mức 100 bản sao/ μ L. Trình tự đoạn gen khuếch đại có độ tương đồng từ 85% - 87% so với trình tự đã được công bố trên Ngân hàng gen. Sự hiện diện của virus được ghi nhận ở tất cả các khu vực khảo sát với tỷ lệ nhiễm trung bình 41,12% (88 trong tổng số 214 mẫu). Tỷ lệ nhiễm virus cao nhất được ghi nhận tại Tây Ninh (57,69%) và thấp nhất tại Đồng Nai (24,51%). Kết quả này cho thấy PYMoV hiện đang gây nhiễm khá phổ biến trên hồ tiêu ở Việt Nam.

Từ khóa: Bệnh virus, *Piper yellow mottle virus*, *Piper nigrum*, PCR, chẩn đoán virus

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Hồ tiêu (*Piper nigrum* L.) là một loại cây trồng có giá trị kinh tế hiện đang được trồng phổ biến ở Việt Nam. Bệnh do virus gây ra gây ảnh hưởng nghiêm trọng đến ngành sản xuất hồ tiêu do làm giảm năng suất thu hoạch. Các triệu chứng đặc trưng của bệnh bao gồm lá bị giảm kích thước, khảm và biến dạng; cây còi cọc, tạo ra giá hoa ngắn và ít hoa. Triệu chứng bệnh có thể khó phân biệt được bằng mắt thường ở một số thời điểm, giai đoạn sinh trưởng và dưới tác động của một số nhân tố khác (de Silva *et al.*, 2002).

Piper yellow mottle virus (PYMoV) là virus DNA mạch kép, gây nhiễm trên các loài thuộc giống tiêu (*Piper* spp) (Lockhart *et al.*, 1997) và đã được phát hiện trên cây hồ tiêu ở các nước như Brazil (Duarte *et al.*, 2001), Sri Lanka (de Silva *et al.*, 2002), Ấn độ (Bhat *et al.*, 2003; Hareesh và Bhat, 2008; Bhat *et al.*, 2009), Malaysia, Philippin, Thái Lan (Lockhart *et al.* 1997). Tuy nhiên, tại Việt Nam, các nghiên cứu phát hiện PYMoV trên hồ tiêu vẫn còn rất ít. Một số nghiên cứu về nhân giống hồ tiêu sạch virus đã công bố chỉ tiến hành kiểm tra sự hiện diện của các loại virus như TMV (*Tobacco mosaic virus*) (Nguyễn Thị Kim Linh *et al.*, 2006), ToMV (*Tomato mosaic virus*), PVX (*Potato virus X*), PVY (*Potato virus Y*) (Đoàn Thị Ái Thuyền *et al.*, 2005; Nguyễn Thị Kim Linh *et al.*, 2006) và CMV (*Cucumber mosaic virus*) (Đoàn Thị Ái Thuyền *et al.*, 2005). Vì vậy, việc nghiên cứu chẩn đoán và từ đó xác định sự hiện diện của PYMoV trên hồ tiêu trồng tại Việt Nam là vấn đề có ý nghĩa

quan trọng đối với việc chẩn đoán bệnh virus trên hồ tiêu ở trong nước.

Nghiên cứu này được thực hiện nhằm đề xuất quy trình chẩn đoán nhanh PYMoV trên hồ tiêu, góp phần then chốt trong công tác sản xuất giống hồ tiêu sạch virus ở Việt Nam.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Mẫu lá hồ tiêu có biểu hiện các triệu chứng như khảm và biến dạng được thu thập tại các vườn trồng hồ tiêu ở Việt Nam.

Mỗi PYMoI và PYMoIII dùng cho khuếch đại đoạn gen của virus.

Chủng vi khuẩn *E.coli* DH5 α sử dụng cho nhân dòng gen.

2.2. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Các thí nghiệm được thực hiện trong khoảng thời gian từ 01/2012 đến 12/2014 tại phòng Công nghệ Sinh học Thực vật, thuộc Trung tâm Công nghệ Sinh học Thành phố Hồ Chí Minh.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Tách chiết DNA

ADN tổng số được tách chiết từ mẫu lá hồ tiêu có biểu hiện triệu chứng nhiễm virus (100 mg) bằng kit tách chiết ADN EZ-10 Spin Column Plant DNA Minipreps (Biobasic, Canada). DNA sau khi tách

¹ Trung tâm Công nghệ Sinh học Thành phố Hồ Chí Minh

chiết được phân tích và xác định hàm lượng bằng máy đo quang phổ NanoDrop (Thermo).

2.3.2. Khuếch đại gen mục tiêu bằng PCR

Đoạn gen ORFI hay ORFIII được khuếch đại bằng phản ứng PCR với mỗi PYMoI (Mỗi xuôi: 5'-TAACAGGACTAGGGATCG-3'; Mỗi ngược: 5'-CAGCTGGTCTTGATAATAG-3' (Bhat và Siju, 2007) hay PYMoIII (Mỗi xuôi: 5'-CTATATGAATGGCTAGTGATG-3'; Mỗi ngược: 5'-TTCCTAGGTTTGGTATGTATG-3') (Bhat *et al.*, 2009). Phản ứng được thực hiện với thể tích 25 µL, chứa 5 µLDream TaqBuffer (10X), 0,2µLDream Taq DNA Polymerase (5 U/µL), 0,5µL dNTP (10 mM) (Thermo), 0,2µLRiboSafe RNase Inhibitor (40U/µL) (Biobasic), 17µL Nuclease-free H₂O, 0,5 µL (10 µM) mỗi loại mỗi xuôi và mỗi ngược, và 1 µL mẫu DNA. Chương trình nhiệt gồm 1 chu kỳ 95°C/5 phút; 39 chu kỳ 95°C/15 giây, 45°C/30 giây, 72°C/1 phút và 1 chu kỳ 72°C/15 phút. Sản phẩm PCR được phân tích bằng điện di trên gel agarose 1,5% với hiệu điện thế 100 V trong thời gian 30 phút.

2.3.3. Xác định trình tự gen

Đoạn gen mục tiêu sau khi khuếch đại bằng phản ứng PCR được gắn vào vector pJET1.2 (CloneJET™ PCR Cloning Kit-Fermentas). Vector sau khi đã gắn gen được biến nạp vào vi khuẩn *E. coli* DH5α bằng phương pháp hóa biến nạp. Dịch tế bào vi khuẩn *E. coli* DH5α sau khi biến nạp được cấy trải trên đĩa petri chứa môi trường LB bổ sung 100mg/L ampicillin, nuôi cấy qua đêm ở 37°C. Khuẩn lạc của các dòng tế bào mọc được trên môi trường kháng sinh được kiểm tra trực tiếp bằng phản ứng PCR với mỗi pJET1.2 (Mỗi xuôi: 5'CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC-3', Mỗi ngược: 5'-AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG-3') định vị trên vector ở hai đầu của vị trí đoạn gen được chèn vào. Dòng vi khuẩn thu được sau khi sàng lọc và kiểm tra được tách plasmid (sử dụng kit ADN-Spin™ Plasmid ADN Purification Kit - Intron) và tiến hành giải trình tự thông qua hãng Macrogen (Hàn Quốc). Kết quả giải trình tự sẽ được so sánh trở lại với các trình tự của virus được công bố trên Ngân hàng gen.

2.3.4. Xác định độ nhạy của phản ứng PCR

Tiến hành tách plasmid từ dòng vi khuẩn đã được tạo dòng, đo hàm lượng DNA và tính toán số lượng bản sao có được theo công thức:

$$\text{Số bản sao (copies)} = \frac{\text{Khối lượng DNA} \times 6.022 \times 10^{23}}{\text{Chiều dài đoạn gen} \times 1 \times 10^9 \times 650}$$

Trong đó khối lượng DNA tính bằng đơn vị ng và chiều dài đoạn gen tính bằng bp (Nguồn: URI Genomics & Sequencing Center, <http://cels.uri.edu/gsc/cndna.html>).

Độ nhạy của phản ứng sẽ được kiểm tra dựa trên việc thực hiện phản ứng với mẫu có số bản sao biết trước, được pha loãng thành các nồng độ khác nhau theo hệ số bậc 10 (10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵,...). Xác định mẫu có nồng độ thấp nhất mà phản ứng có thể phát hiện được, từ đó tính ra số bản sao tương ứng.

2.3.5. Chẩn đoán sự hiện diện của PYMoV trên hồ tiêu ngoài thực tiễn sản xuất

Mẫu lá, thu thập ngẫu nhiên từ các vườn trồng hồ tiêu ở các khu vực Tây Ninh, Đồng Nai, Đắk Lắk, được tách chiết ADN và thực hiện phản ứng PCR khuếch đại gen để xác định sự hiện diện của virus. Tình trạng nhiễm virus được đánh giá dựa trên tỷ lệ giữa số mẫu cho kết quả dương tính với phản ứng PCR và tổng số mẫu được kiểm tra.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Tách chiết ADN

Kết quả phân tích ADN cho thấy chỉ số OD_{260/280} và nồng độ ADN của các mẫu tách chiết đều đạt giá trị gần với mức chuẩn về chất lượng DNA dùng cho phản ứng PCR (OD~1,8 và nồng độ ~ 50-100 ng/µL) (Bảng 1). Các mẫu ADN như vậy có thể đảm bảo độ tinh khiết và nồng độ để sử dụng cho phản ứng PCR khuếch đại gen.

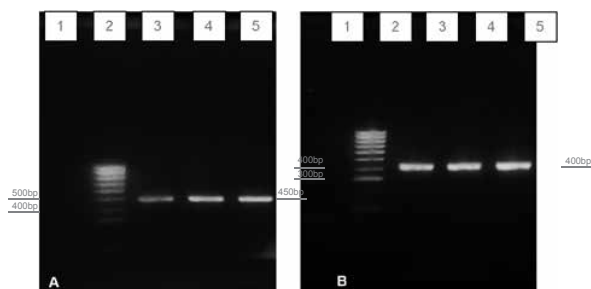
Bảng 1. Kết quả phân tích ADN tách chiết

Mẫu	OD _{260/280}	Nồng độ DNA (ng/µL)
M1	1,74	41,4
M2	1,75	58,2
M3	1,76	43,3
M4	1,75	53,5
M5	1,77	45,8
Trung bình	1,75	48,4

3.2. PCR chẩn đoán PYMoV

Theo tính toán lý thuyết, hai cặp mỗi PYMoI và PYMoIII có khả năng khuếch đại phân đoạn gen có kích thước tương ứng là 450 bp và 400 bp từ vùng gen ORFI và ORFIII của virus. Kết quả phản ứng PCR đã thu được băng DNA ở vị trí giữa 400 bp và 500 bp cho trường hợp mỗi PYMoI; và một băng DNA ở vị trí khoảng 400 bp cho trường hợp mỗi PYMoIII (Hình 1). Kết quả này cho thấy phản

ứng PCR đã khuếch đại được hai phân đoạn DNA có kích thước như dự kiến từ DNA tách chiết từ mẫu lá tiêu. Theo thiết kế của môi khuếch đại, các phân đoạn DNA này là sản phẩm được khuếch đại từ gen của virus. Mặc dù vậy, vẫn không thể khẳng định chắc chắn các trình tự đã được khuếch đại có phải là trình tự gen của virus hay không, bởi vì khả năng bắt cặp và khuếch đại của mỗi với một đoạn DNA nào đó trong DNA tổng số tách chiết từ mẫu lá vẫn có thể xảy ra. Vì vậy, để khẳng định chắc chắn điều này, các phân đoạn DNA thu được sau khi thực hiện phản ứng khuếch đại đã được dòng hóa và giải trình tự.

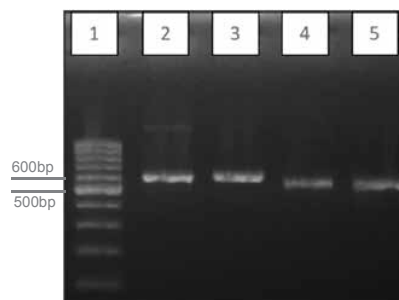


Hình 1. Kết quả kiểm tra sản phẩm của phản ứng khuếch đại gen virus PYMoV với cặp mồi PYMoI (A) và PYMoIII (B). 1. Chứng âm (nước cất), 2. Thang DNA (GeneRuler 100 bp, Thermo Scientific), 3-5. Mẫu.

3.3. Xác định trình tự gen

Sau khi gắn gen vào vector và biến nạp vào vi khuẩn, đã thu được các khuẩn lạc phát triển trên

môi trường LB bổ sung 100 mg/L ampicilin. Các khuẩn lạc này tiếp tục được kiểm tra bằng phản ứng PCR với cặp mồi pJET1.2. Kết quả phản ứng thu được bằng DNA ở vị trí khoảng 600 bp và 500 bp tương ứng cho trường hợp mồi PYMoI và PYMoIII, phù hợp với kích thước sản phẩm dự kiến là 568 bp và 518 bp (Hình 2). Điều này cho thấy các dòng vi khuẩn này có mang vector chứa gen mục tiêu



Hình 2. Kết quả kiểm tra sự hiện diện của đoạn gen mục tiêu trong các dòng vi khuẩn với cặp mồi pJET1.2 nằm trên vector. 1: Thang DNA; 2, 3. Khuẩn lạc mang đoạn gen được khuếch đại với mồi PYMoI; 4,5. Khuẩn lạc mang đoạn gen được khuếch đại với mồi PYMoIII

Kết quả giải trình tự gen từ plasmid và so sánh trên Ngân hàng gen cho thấy đoạn gen khuếch đại được đúng là gen (ORF1/hypothetical protein) của virus PYMoV, với độ tương đồng đạt 85-87% so với các trình tự đã được công bố (Hình 3). Kết quả này cho thấy phản ứng PCR đã khuếch đại đúng đoạn gen cũng như virus mục tiêu.

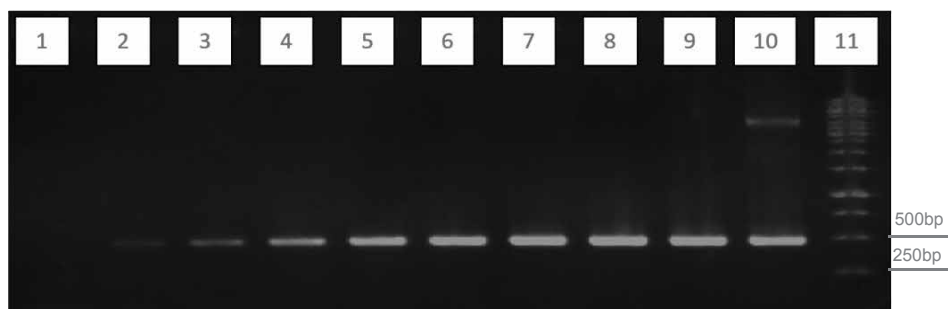
Mô tả	Điểm tối đa	Điểm tổng	Độ bao phủ	Giá trị E	Chỉ số tối đa	Mã đăng ký
<input type="checkbox"/> Piper yellow mottle virus partial ORF1 for hypothetical protein	527	527	33%	1e-145	87%	AJ626981.1
<input type="checkbox"/> Piper yellow mottle virus isolate Coora hypothetical protein gene, partial cds	507	507	33%	1e-139	87%	EU009725.1
<input type="checkbox"/> Piper yellow mottle virus from India hypothetical protein gene, partial cds	505	505	33%	5e-139	87%	DQ836228.1
<input type="checkbox"/> Piper yellow mottle virus from India hypothetical protein gene, partial cds	499	499	33%	2e-137	86%	DQ836234.1
<input type="checkbox"/> Piper yellow mottle virus from India hypothetical protein gene, partial cds	499	499	33%	2e-137	86%	DQ836226.1
<input type="checkbox"/> Piper yellow mottle virus from India hypothetical protein gene, partial cds	457	457	33%	2e-124	85%	DQ836236.1

Hình 3. Kết quả so sánh trình tự đoạn gen khuếch đại được của virus PYMoV với các trình tự được công bố trên Ngân hàng gen.

3.4. Xác định độ nhạy của phản ứng PCR

Để xác định ngưỡng phát hiện, phản ứng PCR đã được thực hiện với cặp mồi PYMoI trên 10 mẫu virus PVY có nồng độ virus từ 10^{10} đến 10^1 bản sao/ μ L, tương ứng ở mức 10 tỉ đến 10 bản sao/ μ L. Kết quả phản ứng đã thu được bằng DNA ở vị trí gần 500 bp, phù hợp với kích thước sản phẩm dự kiến

450 bp. Sản phẩm khuếch đại hiện diện ở các mẫu có nồng độ từ 10^{10} đến 10^2 bản sao/ μ L. Ở trường hợp mẫu có nồng độ 10^1 bản sao/ μ L, không thu được sản phẩm khuếch đại (Hình 4). Như vậy, phản ứng PCR trong trường hợp này có thể phát hiện được gen virus ở mức 100 bản sao/ μ L.



Hình 4. Kết quả kiểm tra sản phẩm của phản ứng khuếch đại gen virus PYMoV với mỗi PYMoI ở các nồng độ mẫu (DNA plasmid) khác nhau

1 - 10: Mẫu có nồng độ 10^1 - 10^{10} theo thứ tự pha loãng bậc 10; 11: Thang DNA

Độ nhạy có ý nghĩa rất quan trọng đối với một phản ứng PCR sử dụng cho mục đích chẩn đoán tác nhân gây bệnh, đặc biệt đối với các tác nhân có biểu hiện tiềm ẩn như virus thực vật. Độ tin cậy của kết quả trong các trường hợp được kết luận âm tính phụ thuộc rất nhiều vào độ nhạy của phản ứng. Một số nghiên cứu sử dụng PCR chẩn đoán virus PYMoV trên hồ tiêu đã xác định độ nhạy thông qua việc thực hiện phản ứng với các mẫu pha loãng theo hệ số bậc 10 từ DNA tách chiết (de Silva *et al.*, 2002; Bhat *et al.*, 2007; Bhat *et al.*, 2009, Bhat và Siljo, 2014). Tuy nhiên, phương thức này chỉ cho phép ước lượng độ nhạy tương đối vì không thể xác định được lượng virus có trong mẫu tách chiết ban đầu là bao nhiêu. Giá trị này nhiều hay ít phụ thuộc vào mức độ nhiễm virus của mẫu được tách chiết DNA. Cùng phương thức sử dụng mẫu pha loãng như trên, tuy nhiên nghiên cứu này đã thực hiện phản ứng trên các mẫu có số lượng bản sao gen virus được biết trước, do đó có thể xác định chính xác độ nhạy của phản ứng. Với độ nhạy đạt mức 100 bản sao/ $1\mu\text{L}$, phản ứng PCR có thể cho phép phát hiện được sự hiện diện của virus trong cây ở giai đoạn sớm của sự lây nhiễm. Kết quả này có ý quan trọng đối với việc tầm soát virus cũng như chọn lọc nguồn cây đầu dòng sạch virus để sản xuất giống hồ tiêu phục vụ cho sản xuất.

3.5. Chẩn đoán sự hiện diện của PYMoV trên hồ tiêu trong thực tế sản xuất

Kết quả kiểm tra cho thấy có 88 mẫu nhiễm PYMoV, chiếm tỷ lệ 41,12%, trong tổng số 214 mẫu hồ tiêu được thu thập tại các khu vực có diện tích trồng hồ tiêu lớn ở Việt Nam như Tây Ninh, Đồng Nai và Đắk Lắk. Trong đó, tỷ lệ nhiễm virus cao nhất được ghi nhận tại Tây Ninh (57,69%) và thấp nhất tại Đồng Nai (24,51%) (Bảng 1). Kết quả này cho thấy có sự hiện diện của PYMoV trên cây hồ tiêu

trồng ở Việt Nam và virus này hiện đang gây hại khá phổ biến ở các vườn trồng tiêu với tỷ lệ trung bình vượt trên mức 40%.

Bảng 2. Tỷ lệ nhiễm PYMoV của mẫu hồ tiêu thu thập tại các khu vực

Khu vực lấy mẫu	Số mẫu kiểm tra	Số mẫu nhiễm virus	Tỷ lệ (%)
Tây Ninh	104	60	57,69
Đồng Nai	102	25	24,51
Đắk Lắk	8	3	37,50
Tổng số	214	88	41,12

PYMoV là một trong hai loại virus gây hại nghiêm trọng trên hồ tiêu, tuy nhiên vẫn chưa được đề cập đến trong các nghiên cứu về phát hiện virus gây hại trên hồ tiêu được công bố chính thức tại Việt Nam. Điều này đã vô tình tạo ra kẽ hở trong việc kiểm soát bệnh do virus gây ra trên hồ tiêu cũng như công tác sản xuất giống hồ tiêu sạch bệnh. Với việc thiết lập được quy trình phát hiện có độ nhạy cao đồng thời khẳng định sự hiện diện của PYMoV tại Việt Nam, nghiên cứu này sẽ mang lại những thay đổi tích cực đối với việc trồng và sản xuất hồ tiêu trong nước.

IV. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

4.1. Kết luận

- Quy trình PCR sử dụng 2 cặp mồi PYMoI và PYMoIII đều có thể chẩn đoán nhanh và chính xác PYMoV trên cây hồ tiêu với ngưỡng phát hiện ở mức 100 bản sao/ μL .

- Ứng dụng quy trình trên vào việc chẩn đoán đã ghi nhận được tỷ lệ trung bình 41,12% nhiễm PYMoV trên tổng số 214 mẫu hồ tiêu thu thập tại 3 tỉnh Tây Ninh, Đồng Nai và Đắk Lắk.

4.2. Đề nghị

Quy trình chẩn đoán có thể được áp dụng để phát hiện nhanh PYMoV trên mẫu lá hồ tiêu. Quy trình này cần được sử dụng rộng rãi để kiểm chứng tính đặc hiệu và độ chính xác của nó trong công tác chẩn đoán bệnh virus gây hại hồ tiêu ở Việt Nam.

LỜI CẢM ƠN

Công trình này được tài trợ kinh phí từ Sở Khoa học và Công nghệ tỉnh Đồng Nai.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Nguyễn Thị Kim Linh, Nguyễn Hữu Định, Lê Đình Đôn, Trần Thị Dung, 2006. Nhân giống tiêu (*Piper nigrum* L.) sạch bệnh virus bằng phương pháp nuôi cấy mô. *Tạp chí KHKT Nông Lâm nghiệp*, 3(2006): 13-18.

Đoàn Thị Ái Thuyền, Thái Xuân Du, Đỗ Đăng Giáp và Nguyễn Tăng Tôn, 2005. Bước đầu nghiên cứu nhân giống *in vitro* một số giống hồ tiêu (*Piper nigrum* L.) sạch virus. *Tạp chí Sinh học*, 27(3): 39-45.

Bhat, A.I., Siljo, A., Jiby, M.V., Thankamani, C.K. and Mathew, P.A., 2009. Polymerase chain reaction (PCR) based indexing of black pepper (*Piper nigrum* L.) plants against *Piper yellow mottle virus*. *JOSAC.*, 18: 28-32.

Bhat, A.I. and Siju, S., 2007. Development of a single-tube multiplex RT-PCR for the simultaneous detection of

Cucumber mosaic virus and *Piper yellow mottle virus* associated with stunt disease of black pepper. *Curr. Sci.*, 93(7): 973-976.

Bhat, A.I. and Siljo, A., 2014. Detection of viruses infecting black pepper by SYBR green-based real-time PCR assay. *JPP.*, 96 (1): 105-109.

Bhat, A.I., Devasahayam, S., Sarma, Y.R. and Pant, R.P., 2003. Association of a Badnavirus transmitted by mealybug (*Ferrisia virgata*) with black pepper (*Piper nigrum* L.) in India. *Curr. Sci.*, 84: 1547-1550.

De Silva, D.P.P., Jones, P. and Shaw, M.W., 2002. Identification and transmission of *Piper yellow mottle virus* and *Cucumber mosaic virus* infecting black pepper (*Piper nigrum* L.) in Sri Lanka. *Plant Pathol.*, 51: 537-545.

Duarte, M.L.R., Albuquerque, F.C. and Chu, E.Y., 2001. New diseases affecting black pepper crop in Brazil. *Int. Pepper Bull.* Apr-Dec: 51-57.

Hareesh, P.S. and Bhat, A.I., 2008. Detection and partial nucleotide sequence analysis of *Piper yellow mottle virus* infecting black pepper (*Piper nigrum* L.) in India. *Indian J. Virol.* 19: 160-167.

Lockhart, B.E.L., Kiratiya-Angul, K., Jones, P., Eng, L., de Silva, P., Olszewski, N.E., Lockhart, N., Deema, N. and Sangalang, J., 1997. Identification of *Piper yellow mottle virus*, a mealybug-transmitted badnavirus infecting *Piper* spp. In Southeast Asia. *EUR J. Plant Pathol.*, 103: 303-11.

Application of PCR technique for detection of *Piper yellow mottle virus* infecting pepper (*Piper nigrum* L.) in Vietnam

Nguyen Xuan Dung, Duong Hoa Xo

Abstract

Piper yellow mottle virus (PYMoV) is one of two main types of pepper-infecting viruses that has been identified in many countries in the world. However, in Vietnam, the diagnosis of this virus in pepper has not been adequate attention. For supporting accurate diagnosis of the agents causing viral diseases in pepper, including PYMoV, and production of the pepper free-virus seedlings in Vietnam, a PCR protocol was developed to detect PYMoV. Accordingly, the PCR was designed to amplify the 400 or 450 bp segment of the viral genome using primer of PYMoI or PYMoIII, respectively. This diagnosis protocol was also used for determining the presence of PYMoV in pepper growing areas of Tay Ninh, Dong Nai and Dak Lak provinces of Vietnam. The results showed that the PCR protocol was successfully developed for detecting PYMoV from pepper leaf. The PCR was able to detect the virus in a pepper leaf sample at a level of 100 copies/ μ L. The sequence of amplified gene fragment with homology of 85% to 87% compared to its published sequence on Genebank. The presence of virus was determined at an average rate of 41.12% (88 of 214 samples) in all surveyed areas. The highest rate of viral infection was recorded in Tay Ninh (57.69%) and the lowest one was in Dong Nai (24.51%). This suggests that the PYMoV is quite prevalent on the pepper in Vietnam.

Key words: *Piper yellow mottle virus*, *Piper nigrum*, PCR, virus detection, viral disease

Ngày nhận bài: 7/6/2017

Người phản biện: TS. Nguyễn Thị Nhung

Ngày phản biện: 13/6/2017

Ngày duyệt đăng: 25/6/2017

NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM SINH HỌC CỦA CHỦNG XẠ KHUẨN VS18 ĐỐI KHÁNG VỚI NẤM *Corynespora cassiicola*

Nguyễn Văn Giang¹, Nguyễn Thị Thu¹, Chu Đức Hà²

TÓM TẮT

Nghiên cứu này được tiến hành với mục đích sàng lọc và tuyển chọn chủng xạ khuẩn có khả năng đối kháng với nấm *Corynespora cassiicola* gây bệnh vàng lá, rụng lá trên cây trồng. Từ 86 chủng xạ khuẩn, chủng VS18 có khả năng kháng nấm *C. cassiicola* mạnh nhất đã được tuyển chọn và khảo sát một số đặc tính. Chủng xạ khuẩn VS18 không tạo sắc tố melanin, có khả năng tổng hợp enzym chitinaza và cellulaza. Khuẩn lạc có màu trắng, hình tròn, kích thước 4 - 6 mm, bề mặt xù xì, sợi khí sinh có dạng thẳng, phân nhánh, có xoắn lò xo mang bào tử ở đầu sợi. Đánh giá khả năng sinh trưởng của VS18 trên các nguồn dinh dưỡng khác nhau cho thấy, chủng VS18 có thể đồng hóa tốt các nguồn đường như I-inositol, sucrose và raffinose và nguồn nitơ khác nhau bao gồm NaNO₃, KNO₃. Mặt khác, chủng xạ khuẩn VS18 sinh trưởng tốt trong dải nhiệt độ 25 - 30°C, pH 6 - 8, chịu được nồng độ muối trong môi trường tới 4%. Dựa trên phân loại ISP, chủng VS18 có thể thuộc loài *S. noursei*.

Từ khóa: *Corynespora cassiicola*, phân lập, *Streptomyces*, xạ khuẩn

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh vàng lá, rụng lá cây trồng, do nấm *Corynespora cassiicola* có ảnh hưởng rất nghiêm trọng tới sản lượng trên đồng ruộng. Bệnh phổ biến trên đối tượng cà chua (*Solanum lycopersicum*) (Sener, 2005), dưa chuột (*Cucumis sativus*) (Muhamad *et al.*, 2010) và đậu tương (*Glycine max*) (Ferreira *et al.*, 2017). Nấm có khả năng phát triển quanh năm, ở mọi giai đoạn phát triển của cây (Sener, 2005). Hiện nay, nhiều nghiên cứu đã tập trung vào chọn giống cây trồng kháng bệnh kết hợp phòng bệnh bằng thuốc trừ sâu hóa học.

Tuy nhiên, việc sử dụng quá nhiều thuốc hóa học đã ảnh hưởng lớn đến chất lượng sản phẩm, tăng tồn dư thuốc trong nông sản. Do đó, biện pháp đấu tranh sinh học trong quản lý bệnh hại có ý nghĩa to lớn trong sản xuất nông sản bền vững. Nghiên cứu này đã được tiến hành nhằm tuyển chọn chủng xạ khuẩn có khả năng đối kháng nấm *C. cassiicola* phục vụ sản xuất chế phẩm sinh học phòng trừ bệnh hại cây trồng.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Nấm *C. cassiicola* gây bệnh được thu thập từ Trung tâm Nghiên cứu bệnh cây nhiệt đới và 86 chủng xạ khuẩn từ Bộ môn Công nghệ vi sinh, Khoa Công nghệ sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

- Phương pháp đánh giá khả năng đối kháng với nấm *C. cassiicola*: Các chủng xạ khuẩn được nuôi cấy

trên môi trường Gause I. Nấm *C. cassiicola* gây bệnh được hoạt hóa và cấy thuần trên môi trường Potato Dextrose Agar (PDA). Khả năng đối kháng của xạ khuẩn với *C. cassiicola* được tiến hành theo phương pháp được mô tả bởi Nguyễn Lâm Dũng và Phạm Thị Trân Châu (1978); Dhanasekaran *et al.* (2012).

- Phương pháp khảo sát đặc điểm sinh học của xạ khuẩn: Hình thái của xạ khuẩn được xác định dựa trên các đặc điểm nuôi cấy, bao gồm màu sắc của khuẩn ty khí sinh (KTKS), màu sắc của khuẩn ty cơ chất (KTCC), cuống sinh bào tử, khả năng sinh sắc tố tan và sự hình thành sắc tố melanin trên hệ thống môi trường Gause I, Gause II, hệ thống môi trường ISP (Newman *et al.*, 2003).

- Phương pháp đánh giá khả năng sinh enzym cellulaza và chitinaza: Chủng xạ khuẩn được nuôi trên môi trường có bổ sung 1% carboxymethylcellulose (thử hoạt tính cellulaza) hoặc 1% chitin (thử hoạt tính chitinaza) theo phương pháp được mô tả bởi Nguyễn Lâm Dũng và Phạm Thị Trân Châu (1978).

- Phương pháp khảo sát ảnh hưởng của điều kiện nuôi cấy: Khả năng đồng hóa các nguồn C, N được đánh giá theo thang điểm chuẩn (Shirling và Gottlieb, 1966), ảnh hưởng của nhiệt độ, pH, nồng độ NaCl được phân tích theo phương pháp được mô tả bởi Nguyễn Xuân Cảnh và *ctv.*, 2016.

2.3. Địa điểm và thời gian nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện tại Bộ môn Công nghệ vi sinh, Khoa Công nghệ sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam từ tháng 3/2016 - tháng 3/2017.

¹ Khoa Công nghệ Sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

² Bộ môn Sinh học Phân tử, Viện Di truyền Nông nghiệp