

PHÁT HIỆN VÀ XÁC ĐỊNH VIRUS GÂY BỆNH KHẢM LÁ RAU DIẾP Ở MỘT SỐ TỈNH ĐỒNG BẰNG SÔNG HỒNG

Nguyễn Đức Huy^{1*}, Nguyễn Thị Thanh Hồng¹, Bùi Phương Anh²

¹Khoa Nông học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

²Lớp K57BVTVA, Khoa Nông học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

*Email: ndhuy@vnua.edu.vn

Ngày gửi bài: 03.04.2018

Ngày chấp nhận: 14.06.2018

TÓM TẮT

Rau diếp (*Lactuca sativa* L.) được trồng phổ biến khắp thế giới. Các nghiên cứu trước đây đã ghi nhận rằng cây trồng này nhiễm virus thuộc các chi potyvirus (*Lettuce mosaic virus*, *Bidden mosaic virus*), cucumovirus (*Cucumber mosaic virus*) và tospovirus (*Tomato spotted wilt virus*). Hiện tại, rau diếp được trồng phổ biến ở các tỉnh miền Bắc và các vùng khác của Việt Nam. Tuy nhiên, chưa có ghi nhận nào về virus nhiễm trên rau diếp ở Việt Nam đến thời điểm hiện tại. Mục đích của nghiên cứu này nhằm xác định các potyvirus từ sáu mẫu lá rau diếp có triệu chứng khảm giống virus thu thập ở sáu tỉnh thuộc đồng bằng sông Hồng. Các mẫu bệnh được lây nhiễm lên cây chỉ thị rau muống (*Chenopodium quinoa* và *C. amaranticolor*) và thuốc lá cảnh (*Nicotiana benthamiana*) để kiểm tra sự có mặt của virus. Tiếp theo, các mẫu bệnh được kiểm tra sự có mặt của potyvirus bằng kỹ thuật RT-PCR sử dụng cặp mồi chung CIFor và CIRev. Sản phẩm RT-PCR được giải trình tự sử dụng cùng cặp mồi chung RT-PCR để xác định loài virus. Kết quả nghiên cứu cho thấy các cây chỉ thị *C. quinoa*, *C. amaranticolor* và *N. benthamiana* đều xuất hiện triệu chứng, trong đó, *C. quinoa*, *C. amaranticolor* xuất hiện các đốm chết hoại màu vàng và nhiễm hệ thống, *N. benthamiana* có triệu chứng khảm. Điều đó chứng tỏ các mẫu rau diếp thu được đều bị nhiễm virus. Hơn nữa, kết quả RT-PCR cho thấy sản phẩm khuếch đại có kính thước khoảng 0,7 kb. Ngoài ra, kết quả giải trình tự sản phẩm PCR cho thấy virus gây bệnh là *Lettuce mosaic virus* (LMV). Thử nghiệm tính gây bệnh của LMV trên một số cây chỉ thị và ký chủ khác cho thấy LMV có thể nhiễm trên cúc bách nhật (*Gomphrena globosa*), cà độc dược (*Datura metel*), đậu Hà Lan (*Pisum sativum*) và cà chua (*Solanum lycopersicum*). Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy lần đầu tiên phát hiện LMV ở Việt Nam.

Từ khóa: *Lactuca sativa*, potyvirus, *Lettuce mosaic virus*, cây chỉ thị, RT-PCR.

Detection and Identification of Virus Causing Mosaic on Lettuce in Some Provinces of the Red River Delta

ABSTRACT

Lettuce (*Lactuca sativa* L.) is grown worldwide. The crop is commonly infected by potyvirus (*Lettuce mosaic virus*, *Bidden mosaic virus*), cucumovirus (*Cucumber mosaic virus*) and tospovirus (*Tomato spotted wilt virus*). The aim of this study was to identify potyviruses from lettuce leaf samples showing virus-like symptom collected from six provinces in the Red River Delta. The leaf samples were inoculated onto indicator plants such as *Chenopodium quinoa*, *C. amaranticolor* and *Nicotiana benthamiana* for examining the presence of the viruses. Furthermore, total RNAs were extracted from the leaf samples and amplified by RT-PCR using universal primer pairs, CI-For and CI-Rev, for the detection of potyvirus. After inoculation, indicator plants showed yellow spot and systemic infection on *C. quinoa*, *C. amaranticolor* and mosaic on *N. benthamiana*, indicating that lettuce the leaves were infected with virus. RT-PCR amplification of about 0.7 kb revealed that the leaf samples were infected by genus potyvirus. Sequencing of RT-PCR products showed 99.0 % nucleotide identity of C terminus of the cylindrical inclusion (CI) with *Lettuce mosaic virus* (LMV). LMV infects *Gomphrena globosa*, *Datura metel*, *Pisum sativum* and *Solanum lycopersicum* in the pathogenicity test. This is the first report on LMV in Vietnam.

Keywords: *Lactuca sativa*, potyvirus, *Lettuce mosaic virus*, indicator plants, RT-PCR.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Rau diếp (*Lactuca sativa* L.) thuộc họ cúc (*Asteraceae*) có nguồn gốc từ Ai Cập và được trồng phổ biến ở nhiều quốc gia trên thế giới. Giống như các cây trồng nông nghiệp khác, rau diếp cũng bị nhiều bệnh gây hại như bệnh lở cổ rễ (*Rhizoctonia solani*); bệnh đốm lá, thối ngọn (*Xanthomonas campestris* pv. *vitians*); bệnh thối nhũn vi khuẩn (*Pectobacterium carotovorum*), bệnh khảm lá do virus (*Lettuce mosaic virus*, *Cucumber mosaic virus*,...); bệnh sưng rễ do tuyến trùng (*Meloidogyne* spp.) (Subbarao *et al.*, 2017). Bệnh khảm lá rau diếp do *Lettuce mosaic virus* (LMV) là bệnh virus gây hại rau diếp có ý nghĩa kinh tế nhất và được lan truyền khắp thế giới thông qua hạt giống (Dinant & Lot, 1992). LMV cũng được phát hiện và ghi nhận lần đầu tiên gây hại trên rau diếp ở Iran (Soleimani *et al.*, 2004; 2011), Ấn Độ với triệu chứng khảm nhẹ và làm lùn cây (Sharma *et al.*, 2013). Virus này cũng được phát hiện và nghiên cứu ở Hàn Quốc (Lim *et al.*, 2014). Ngoài LMV, triệu chứng khảm trên rau diếp ở Đài Loan còn được xác định là do *Bidens mottle virus* (BiMoV) (Chen & Li, 2012).

Theo Ủy ban phân loại virus quốc tế (ICTV, 2014), LMV thuộc chi Potyvirus trong họ Potyviridae với bộ genome là một phân tử RNA sợi đơn, cực dương ((+) ssRNA). Phân tử virus hình sợi mềm, kích thước khoảng 680 - 900 nm (chiều dài) và khoảng 11 - 15 nm (chiều rộng) (Moreno *et al.*, 2007). LMV được chia thành 3 nhóm chính gồm: LMV-Yar (một chủng thu được từ Yemen), LMV-Greek (10 chủng thu được từ Hy Lạp) và LMV-RoW (các chủng còn lại xuất hiện phổ biến ở nhiều vùng lãnh thổ (Krause-Sakate *et al.*, 2002). Kết quả nghiên cứu cho rằng chỉ có nhóm LMV-RoW có khả năng lây truyền qua hạt giống và ức chế tính kháng của cây (Lim *et al.*, 2014). Nhóm này gồm 2 nhóm phụ là LMV - Common (không lây nhiễm cho các cây có chứa gene kháng lặn *mo1¹* hoặc *mo1²*) và LMV-Most ("LMV *mo1*-breaking, seed transmitted", có khả năng ức chế gen kháng *mo1* (*mo1*-breaking)) (Sorel *et al.*, 2014). Triệu chứng thường thấy trên rau diếp là lùn

cây, cây không cuốn được (đối với những giống rau diếp cuốn bắp như xà lách cuộn, xà lách Romaine), lá bị biến dạng, có triệu chứng khảm hoặc đốm, sáng gân và đôi khi xuất hiện triệu chứng hoại tử (Candresse *et al.*, 2007). Ngoài ra, lây nhiễm nhân tạo LMV lên một số cây chỉ thị cho thấy LMV nhiễm trên cây rau muối đỏ (*Chenopodium amaranticolor*) với các triệu chứng điển hình như đốm chết hoại màu vàng, có quầng đỏ, rau muối trắng (*Chenopodium quinoa*) với đốm chết hoại màu vàng, không có quầng đỏ, lá ngọn có thể bị vàng gân, xoắn và còi cọc, cúc bách nhật (*Gomphrena globosa*) với triệu chứng điển hình là đốm màu nâu đỏ (Pavan *et al.*, 2008). Ngoài ra, LMV có thể gây bệnh trong suốt thời kỳ phát triển của rau diếp, từ giai đoạn cây non đến cây trưởng thành, tỷ lệ bệnh trên đồng ruộng có thể lên đến 75% (Jagger, 1921) hoặc 100% (Ryder, 2002). LMV được lan truyền trên đồng ruộng thông qua môi giới truyền bệnh là rệp muội theo kiểu bán bền vững (German-Retana *et al.*, 2008). Kết quả nghiên cứu của Abd El-Wahab (2012) về sự lan truyền LMV thông qua các loài rệp muội khác nhau tại Ai Cập cho thấy: *Myzus persicae* (rệp đào) là vector chính lan truyền LMV với tỷ lệ lan truyền lên đến 86%, theo sau đó là loài *Hyperomyzus lactucae* (42,3%), *Aphis gossypii* (rệp bông) (38,0%), *Acyrtosiphon lactucae* (25,3%) và *Macrosiphum euphorbiae* (24,5%). Ngoài ra, LMV còn có khả năng lan truyền thông qua hạt giống, phụ thuộc vào loại giống và thời điểm lây nhiễm virus vào các giai đoạn trưởng thành khác nhau của hạt (German-Retana *et al.*, 2008).

Cho đến thời điểm hiện nay, ở Việt Nam chưa có xác định về virus gây bệnh khảm lá trên cây rau diếp nói chung và LMV nói riêng. Trên đồng ruộng, triệu chứng khảm lá rau diếp thường xuyên xuất hiện với tỷ lệ cây bị bệnh đáng kể. Do đó, nghiên cứu này nhằm i) điều tra tình hình nhiễm bệnh khảm lá trên rau diếp, thu thập mẫu bệnh tại một số tỉnh thuộc đồng bằng sông Hồng của Việt Nam và diễn biến bệnh khảm lá rau diếp tại Hà Nội, ii) xác định virus gây bệnh khảm lá rau diếp dựa vào trình tự vùng gene CI và iii) đánh giá tính gây bệnh

trên một số cây ký chủ và sự truyền bệnh qua hạt giống rau diếp của virus.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Thu thập và phát hiện sự có mặt của virus trong mẫu bệnh

2.1.1. Thu thập mẫu bệnh

Các cây, lá rau diếp (*Lactuca sativa* L. var. *crispa*) có triệu chứng giống virus được thu thập tại 6 tỉnh thuộc đồng bằng sông Hồng gồm Hà Nội, Hải Dương, Hải Phòng, Hưng Yên, Nam Định và Thái Bình từ các ruộng trồng rau diếp 30 - 45 ngày tuổi trong vụ Đông xuân 2016 và 2017. Các mẫu bệnh được lưu giữ dưới dạng i) mẫu tươi, cây bệnh trồng và duy trì trong nhà lưới làm nguồn lây nhiễm và ii) bảo quản trong Silica gel ở 4°C dùng để chiết RNA tổng số. Ngoài ra, rau diếp ngồng (*Lactuca sativa* L. var. *angustana*) và rau diếp cuộn (*Lactuca sativa* L. var. *capitata*) cũng được điều tra nhưng không phát hiện thấy triệu chứng khảm hoặc triệu chứng giống virus.

2.1.2. Phát hiện sự có mặt của virus trong mẫu bệnh bằng cây chỉ thị

Mẫu thu thập bước đầu được kiểm tra sự có mặt của virus bằng lây nhiễm lên các cây chỉ thị (rau muống và thuốc lá cảnh...). Các mẫu bệnh được nghiền trong đệm Photphatase pH 7.0 với bột Carborundum có đường kính 600 mesh bổ sung thêm 0,1% Na₂SO₃ (Soneimai *et al.*, 2011). Cây chỉ thị 4 - 5 lá thật được sử dụng để lây nhiễm. Cây sau lây nhiễm được giữ ở nhà lưới với nhiệt độ khoảng 20 - 25°C. Quan sát triệu chứng trên các lá lây và các lá mới xuất hiện sau 7 - 10 ngày lây. Thí nghiệm được thực hiện tại nhà lưới số 7, Khoa Nông học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam.

2.2. Xác định virus bằng kỹ thuật RT-PCR và giải trình tự gene

2.2.1. Chiết RNA tổng số

RNA tổng số được chiết từ sáu mẫu lá rau diếp (Bảng 1) bằng Kit chiết thương mại Trizol theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Cặn RNA tổng số được hòa trong 30 µl Diethyl

pyrocarbonate (DEPC), sau đó ủ dung dịch ở 65°C trong 10 phút. RNA tổng số được bảo quản trong tủ -30°C và sử dụng để xác định virus bằng kỹ thuật RT-PCR.

2.2.2. RT-PCR và giải trình tự gene

Phản ứng RT-PCR được thực hiện theo 2 bước i) Phản ứng RT (reverse transcriptase) tạo cDNA (complementary DNA) với tổng thể tích phản ứng là 20,0 µl gồm 11,0 µl DEPC, 4,0 µl 5xRT buffer, 2,0 µl dNTPs, 1,0 µl môi CI-Rev, 1,0 µl M-MLV và 1,0 µl RNA tổng số. Phản ứng được thực hiện trong ống 0,5 ml ở 42°C trong 1 giờ. ii) Phản ứng PCR khuếch đại và nhân một phần vùng gene CI với kích thước ~ 0,7 kb bằng cặp môi CI-For và CI-Rev (Ha *et al.*, 2008) với tổng thể tích của phản ứng là 25 µl gồm các thành phần 9,5 µl dH₂O, 12,5 µl 2xDreamTaq, 0,5 µl môi CI-For, 0,5 µl môi CI-Rev và 2,0 µl cDNA. Phản ứng PCR được thực hiện trong ống 0,5 ml với chu trình nhiệt 94°C trong 4 phút. Tiếp theo là 94°C trong 35 giây, 40°C trong 35 giây, 72°C trong 1 phút với 35 chu kỳ. Cuối cùng là 72°C trong 5 phút. Sản phẩm RT-PCR được tinh sạch bằng Kit thương mại theo hướng dẫn của nhà sản xuất và giải trình tự dùng môi CIFor tại hãng Macrogen (Hàn Quốc). Các thí nghiệm được thực hiện tại Bộ môn Bệnh cây, Khoa Nông học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam trong năm 2016 và 2017.

2.2.3. Tìm kiếm chuỗi gần gũi trên ngân hàng gene

Trình tự sequence được tìm kiếm và so sánh với các trình tự gần gũi, sẵn có trên ngân hàng gene GenBank bằng sử dụng phần mềm trực tuyến BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

2.3. Tính gây bệnh của virus gây bệnh khảm lá rau diếp

Sau khi xác định được virus gây bệnh khảm lá rau diếp, tính gây bệnh của virus được thử nghiệm trên một số cây như cúc bách nhật (*Gomphrena globosa*), cà chua (*Solanum lycopersicum*), đậu Hà lan (*Pisum sativum*) bằng tiếp xúc cơ học. Phương pháp lây như mô tả ở mục 2.1.2.

2.4 Thử nghiệm virus truyền qua hạt giống

Trong thí nghiệm này, 1.000 hạt giống được gieo trong chậu nilon đen đường kính 20 cm, mỗi chậu 10 hạt. Các hạt rau diếp sau nảy mầm được chăm sóc để cây sinh trưởng phát triển tốt. Các chậu rau diếp được giữ trong điều kiện nhà lưới 20 - 25°C. Thí nghiệm được tiến hành từ tháng 10 - 12 năm 2016 và 2017 tại Khoa Nông học. Theo dõi và quan sát sự hình thành triệu chứng trên các cây rau diếp trong 60 ngày. Các cây có triệu chứng giống virus được kiểm tra bằng cây chỉ thị (xem 2.1.2) và RT-PCR (xem 2.2).

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Mức độ nhiễm bệnh, diễn biến bệnh và thu thập mẫu bệnh khảm lá rau diếp

Điều tra đồng ruộng cho thấy bệnh khảm lá rau diếp thường xuất hiện từ 30 ngày sau trồng. Triệu chứng chủ yếu là các lá bị khảm nhẹ đến dữ dội (Hình 1), một số trường hợp cây bị lùn, còi cọc. Trong nghiên cứu này, sáu tỉnh thuộc đồng bằng sông Hồng được điều tra và thu thập mẫu bệnh khảm lá (Bảng 1). Diễn biến bệnh khảm lá cũng được điều tra tại Hà Nội và vùng phụ cận (Bảng 2).

Bệnh khảm lá rau diếp xuất hiện chủ yếu khoảng 30 ngày sau trồng. Bệnh nặng nhất vào giai đoạn cây rau bắt đầu vào thu hoạch (43 - 50

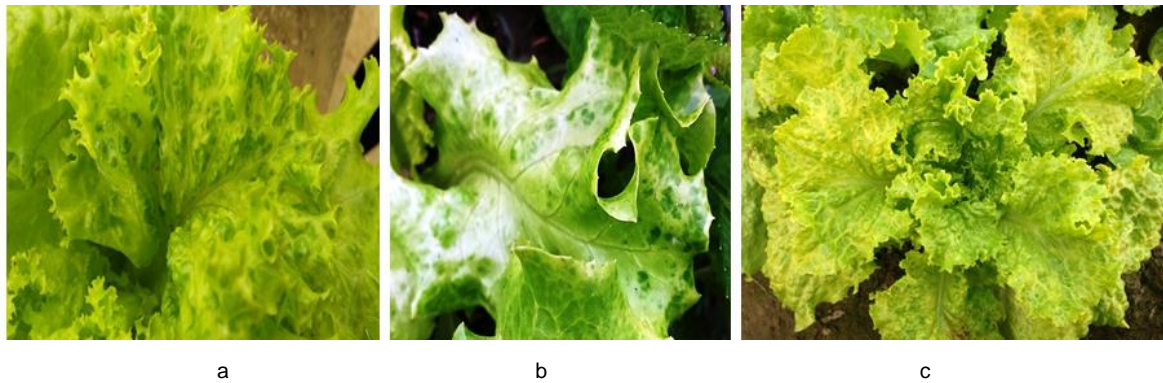
ngày sau trồng). Bệnh khảm lá trên rau diếp tại Trâu Quỳ - Gia Lâm - Hà Nội xuất hiện tương đối sớm từ giai đoạn cây có 4 - 6 lá thật (22 ngày sau trồng). Ở giai đoạn này, bệnh tuy mới xuất hiện trên lá nhưng biểu hiện tương đối rõ như lá bị khảm dữ dội và có hiện tượng nhăn nhệ. Tỷ lệ bệnh vào lúc này đạt 15,05%. Tỷ lệ này không thay đổi cho đến khi cây có 10 - 12 lá thật (36 ngày sau trồng), lúc này, tỷ lệ bệnh tăng lên thành 16,50%; triệu chứng trên lá không thay đổi, chỉ lan rộng hơn. Tỷ lệ bệnh tiếp tục tăng lên sau đó 7 ngày, đạt mức 17,46% vào thời điểm 43 ngày sau trồng. Từ giai đoạn 43 - 50 ngày sau trồng (khi ruộng bắt đầu được thu hoạch), tỷ lệ bệnh giữ nguyên ở mức 17,46%. Triệu chứng bệnh ở 2 giai đoạn này không thay đổi, chỉ lan rộng hơn và chiếm gần như toàn bộ lá.

Tại Văn Trì - Đông Anh - Hà Nội, bệnh bắt đầu xuất hiện khi cây đã có 7 - 9 lá thật (29 ngày sau trồng) với tỷ lệ 1,29% số cây trên ruộng có triệu chứng khảm lá. Tỷ lệ bệnh tiếp tục tăng vào giai đoạn 43 ngày sau trồng và không thay đổi cho tới giai đoạn thu hoạch (50 ngày sau trồng) với tỷ lệ bệnh là 1,58%. Qua các giai đoạn phát triển, triệu chứng của bệnh không thay đổi nhiều: lá khảm rõ, hơi nhăn, khi mới bắt đầu chỉ xuất hiện triệu chứng khảm ở mép lá, sau đó bệnh phát triển lan rộng, lá bị khảm dọc theo gân chính và mép lá (Hình 1a).

Bảng 1. Mức độ nhiễm bệnh khảm lá trên rau diếp xoăn (*Lactuca sativa* L. var. *crispa*) tại 6 tỉnh thuộc đồng bằng sông Hồng vụ Đông xuân 2016 và 2017

Địa điểm	Giai đoạn sinh trưởng (ngày sau trồng)	Triệu chứng	TLB (%)	Năm thu thập	Bộ phận	Số mẫu thu	Ký hiệu mẫu
Gia Lâm - Hà Nội	35	Lá khảm rõ, bề mặt lá hơi nhăn	10,65	2017	lá	01	LM01
Hòa Đình - Bắc Ninh	45	Lá khảm rõ, bề mặt lá hơi nhăn	1,35	2017	lá	01	LM02
Thái Thụy - Thái Bình	40	Khảm rõ	6,79	2014	lá	01	LM04
Vĩnh Bảo - Hải Phòng	45	Khảm rõ	1,61	2016	lá	01	LM05
Mỹ Lộc - Nam Định	50	Khảm nhẹ	3,55	2017	lá	01	LM06
Hiển Thành - Hải Dương	40	Khảm rõ	8,02	2017	lá	01	LM07

Ghi chú: TLB (tỷ lệ bệnh). Tại các vùng trồng rau diếp được điều tra, tỷ lệ bệnh khảm lá rau diếp cao nhất tại Gia Lâm, Hà Nội (10,56%), sau đó là Hiển Thành, Hải Dương với tỷ lệ bệnh là 8,02%. Tỷ lệ bệnh khảm lá thấp nhất ở Hòa Đình, Bắc Ninh (1,35%) và Vĩnh Bảo, Hải Phòng (1,61%).



Hình 1. Triệu chứng bệnh khảm lá rau diếp

Ghi chú: a) Vân Trì - Đông Anh-Hà Nội; b) Hòa Đình - Bắc Ninh và c) Thái Thụy - Thái Bình

Bảng 2. Diễn biến bệnh khảm lá trên rau diếp xoăn (*Lactuca sativa* L. var. *crispa* L.) tại một số vùng trồng rau diếp ở Hà Nội và vùng phụ cận vụ Đông xuân 2017

Giai đoạn sinh trưởng	Trâu Quỳ - Gia Lâm, Hà Nội		Vân Trì - Đông Anh, Hà Nội		Hoà Đình, Bắc Ninh	
	Triệu chứng	TLB (%)	Triệu chứng	TLB (%)	Triệu chứng	TLB (%)
2 lá mầm (7 ngày sau trồng)	Chưa xuất hiện	0	Chưa xuất hiện	0	Chưa xuất hiện	0
2 - 3 lá thật (15 ngày sau trồng)	Chưa xuất hiện	0	Chưa xuất hiện	0	Chưa xuất hiện	0
4 - 6 lá thật (22 ngày sau trồng)	Lá bị khảm rõ rệt, hơi nhăn	15,05	Chưa xuất hiện	0	Lá bị khảm mờ, hơi nhăn	1,15
7 - 9 lá thật (29 ngày sau trồng)	Lá bị khảm rõ rệt, hơi nhăn	15,05	Lá bị khảm rõ rệt, hơi nhăn	1,29	Lá bị khảm rõ rệt, hơi nhăn	1,23
10 - 12 lá thật (36 ngày sau trồng)	Lá bị khảm rõ rệt, hơi nhăn	16,50	Lá bị khảm rõ rệt, hơi nhăn	1,56	Lá bị khảm rõ rệt, hơi nhăn	1,30
Thu hoạch (43 ngày sau trồng)	Lá bị khảm rõ rệt, hơi nhăn	17,46	Lá bị khảm rõ rệt, hơi nhăn	1,58	Lá bị khảm rõ rệt, hơi nhăn	1,30
Thu hoạch (50 ngày sau trồng)	Lá bị khảm rõ rệt, hơi nhăn	17,46	Lá bị khảm rõ rệt, hơi nhăn	1,58	Lá bị khảm rõ rệt, hơi nhăn	1,30

Ghi chú: TLB (tỷ lệ bệnh)

Tương tự kết quả điều tra tại Trâu Quỳ - Gia Lâm, tại Hoà Đình - Bắc Ninh, bệnh xuất hiện sớm vào giai đoạn cây 4 - 6 lá thật (22 ngày sau trồng) với tỷ lệ 1,15%. Lúc này, lá biểu hiện triệu chứng khảm mờ, hơi nhăn. Bệnh nặng dần trong những giai đoạn về sau, đạt tỷ lệ cao nhất là 1,30% vào giai đoạn 10 - 12 lá thật (36 ngày sau trồng) và giữ nguyên tỷ lệ bệnh này cho đến khi cây được thu hoạch. Triệu chứng trở nên rõ rệt hơn kể từ giai đoạn 7 - 9 lá thật: lá khảm rõ, loang rộng, hơi nhăn.

3.2. Sự có mặt của virus trong mẫu bệnh bằng cây chỉ thị

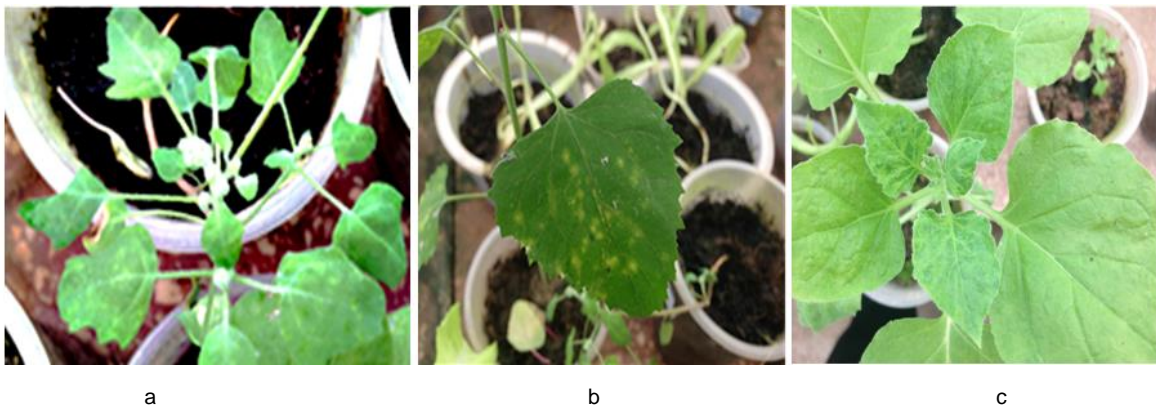
Sáu mẫu lá rau diếp thu thập tại sáu tỉnh thuộc đồng bằng sông Hồng được lây nhiễm lên 3 cây chỉ thị gồm *C. quinoa*, *C. amaranticolor* và *N. benthamiana* (Bảng 3, Hình 2) để kiểm tra sự có mặt của virus như đã mô tả trong phần phương pháp nghiên cứu.

Kết quả lây nhiễm cho thấy cả 3 loài cây chỉ thị *C. quinoa*, *C. amaranticolor* và *N. benthamiana*

Bảng 3. Kết quả kiểm tra sự có mặt của virus trong mẫu khảm lá rau diếp bằng cây chỉ thị

Ký hiệu mẫu	<i>Chenopodium quinoa</i>		<i>Chenopodium amaranticolor</i>		<i>Nicotiana benthamiana</i>	
	SCL	SCN	SCL	SCN	SCL	SCN
LM01	5	5	5	5	3	2
LM02	5	5	5	5	3	3
LM04	5	5	5	5	3	3
LM05	5	5	5	5	3	3
LM06	5	5	5	5	3	2
LM07	5	5	5	5	3	3

Ghi chú: SCL (Số cây lây); SCN (Số cây nhiễm)



Hình 2. Triệu chứng lây bệnh nhân tạo trên cây chỉ thị

Ghi chú: a) *Chenopodium quinoa*; b) *Chenopodium amaranticolor* và c) *Nicotiana benthamiana*.

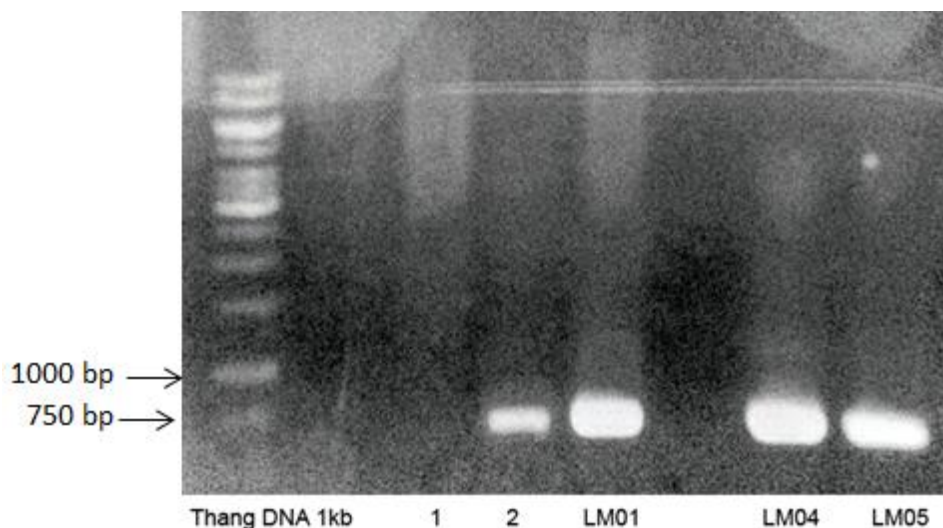
đều xuất hiện triệu chứng. Trên các cây *C. quinoa* và *C. amaranticolor* xuất hiện các triệu chứng đốm vàng và nhiễm hệ thống. *N. benthamiana* có triệu chứng khảm rõ và nhiễm hệ thống. Điều đó chứng tỏ 6 mẫu khảm lá rau diếp thu thập tại 6 tỉnh thuộc đồng bằng sông Hồng đều bị nhiễm virus. Tuy nhiên, để xác định chính xác chi và loài virus, kỹ thuật RT-PCR và giải trình tự gene được sử dụng để nhân vùng gene CI với mục đích xác định chi potyvirus (Hình 3).

3.3. Xác định virus gây bệnh khảm lá rau diếp bằng kỹ thuật RT-PCR và giải trình tự gene vùng CI

Các nghiên cứu trước đây cho thấy triệu chứng khảm lá rau diếp chủ yếu do *Lettuce mosaic virus* (LMV). LMV là thành viên thuộc

chi potyvirus trong họ potyviride. Trong phạm vi và mục tiêu của nghiên cứu này, các mẫu khảm lá được tập trung xác định sự có mặt của potyvirus với cặp mồi chung CIFor và CIRev. Sản phẩm RT-PCR đã được khuếch đại có kích thước khoảng 0,7 kb. Như vậy, 3 mẫu khảm lá được lựa chọn đều có phản ứng dương tính với potyvirus, giống với mẫu đối chứng dương (bệnh khảm lá đu đủ do *Papaya ringspot virus*), trong khi đó đối chứng âm (nước cất) không có phản ứng (Hình 3).

Tiếp theo, để xác định tên loài potyvirus gây bệnh trên cây rau diếp, sản phẩm RT-PCR của 3 mẫu LM01, LM04 và LM05 được cắt và tinh sạch DNA bằng kit tinh sạch theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Sản phẩm RT-PCR được giải trình tự dùng mồi CIFor và thu được kết quả tốt, rõ nét với chiều dài trình tự đọc được là 640 bp.



Hình 3. Sản phẩm RT-PCR được khuếch đại với kích thước khoảng 0.7kb

Ghi chú: 1) Đôi chứng âm (nước cất), 2) Đôi chứng dương (mẫu bệnh đốm hình nhẫn do Papaya ringspot virus, PRSV), LM01 (mẫu khảm lá rau diếp thu tại Hà Nội), LM04 (mẫu khảm lá rau diếp thu tại Thái Bình và LM05 (mẫu khảm lá rau diếp thu tại Hải Phòng).

Bảng 4. Kết quả giải trình tự vùng gene CI và tìm kiếm các chuỗi gần gũi trên ngân hàng gene (GenBank)

Mẫu	Mã đồng nhất ¹	Tên virus	Đoạn đọc được (bp)	% Đoạn so sánh	Mức đồng nhất trình tự (%)
LM01	AJ306288, X97704, KF955619, KF268955 và KF268954	<i>Lettuce mosaic virus</i>	~ 640	100	99,0
LM04	AJ306288, X97704, KF955619, KF268955 và KF268954	<i>Lettuce mosaic virus</i>	~ 640	100	99,0
LM05	AJ306288, X97704, KF955619, KF268955 và KF268954	<i>Lettuce mosaic virus</i>	~ 640	100	99,0

Ghi chú: ¹Mã trình tự gene sẵn có trên ngân hàng gene (GenBank)

Từ kết quả thu được, các trình tự được so sánh với các chuỗi sẵn có trên ngân hàng gene (Genbank) bằng phần mềm BLAST trực tuyến. Kết quả cho thấy trình tự của các mẫu LM01, LM04 và LM05 đều giống với *Lettuce moaic virus* (LMV) với mức độ đồng nhất trình tự là 99,0% (Bảng 4).

Kết quả xác định cho thấy mẫu virus gây bệnh khảm lá rau diếp tại một số tỉnh thuộc đồng bằng sông Hồng là do *Lettuce moaic virus* (LMV) và lần đầu tiên phát hiện virus này tại Việt Nam. LVM thuộc chi Potyvirus trong họ Potyviridae, được truyền theo kiểu không bền vững qua nhiều

loài rệp muội như *Myzus persicae* and *Macrosiphum euphorbiae*. LMV cũng truyền qua hạt giống (German-Retana *et al.*, 2008).

3.4. Lây nhiễm nhân tạo trên một số cây ký chủ phụ

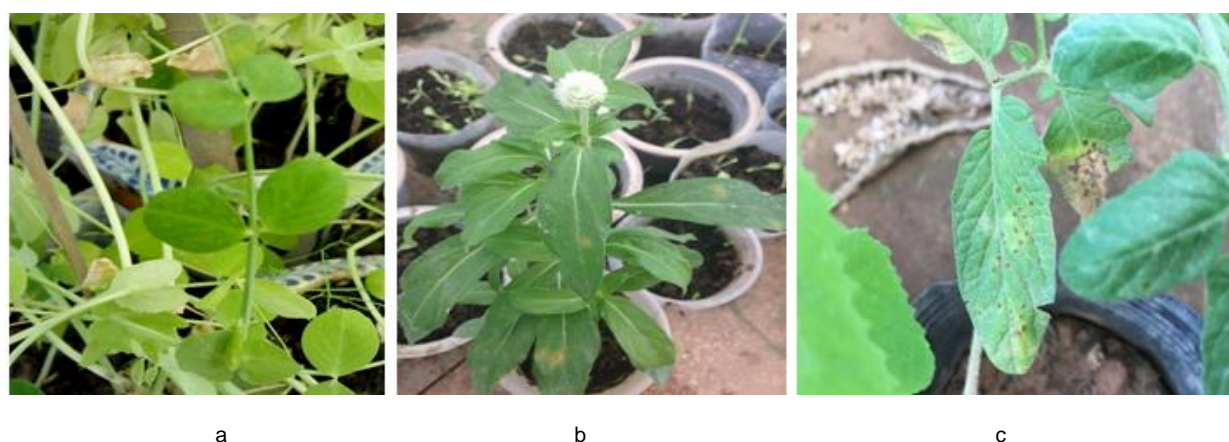
Để đánh giá tính gây bệnh cũng như phổ ký chủ của LVM, 7 cây chỉ thị và ký chủ khác được lây nhiễm với mẫu LM01 (Bảng 5). LMV nhiễm trên đậu Hà Lan (khảm nhẹ) và vết đốm chết hoại màu đen trên cà chua, vết đốm cục bộ màu vàng trên cà độc dược. LMV không nhiễm trên củ cải đỏ, củ dền đỏ và đậu thơm.

Phát hiện và xác định virus gây bệnh khảm lá rau diếp ở một số tỉnh đồng bằng sông Hồng

Bảng 5. Kết quả lây nhiễm nhân tạo trên một số cây ký chủ phụ (sử dụng mẫu LM01)

Cây ký chủ	Tên khoa học	Họ	Số cây lây	Số cây nhiễm bệnh	Triệu chứng
Rau diếp	<i>Lactuca sativa</i>	Asteraceae	10	10	Khảm rõ
Cà độc dược	<i>Datura metel</i>	Solanaceae	4	4	Đốm vàng trên lá
Cà chua	<i>Solanum lycopersicum</i>	Solanaceae	4	4	Đốm chết hoại màu đen
Đậu Hà Lan	<i>Pisum sativum</i>	Fabaceae	15	7	Khảm nhẹ
Đậu thơm	<i>Lathyrus odoratus</i>	Fabaceae	10	0	-
Củ dền đỏ	<i>Beta vulgaris</i>	Amaranthaceae	15	0	-
Củ cải đỏ	<i>Raphanus sativus</i>	Brassicaceae	10	0	-

Ghi chú: - (không có triệu chứng)



Hình 4. Triệu chứng lây bệnh nhân tạo

Ghi chú: a) đậu Hà lan (khảm nhẹ); b) Cúc bách nhật (đốm chết hoại và c) cà chua (đốm cục bộ màu đen).

3.4. Khả năng truyền qua hạt giống của *Lettuce mosaic virus*

Đánh giá virus truyền qua hạt giống là quan trọng nhằm phát hiện và ngăn chặn sự lây

lan của virus trên đồng ruộng. Trong nghiên cứu này, mẫu hạt giống rau diếp được mua tại các cửa hàng bán hạt giống của Đông Anh và Gia Lâm - Hà Nội. Số cây theo dõi sau gieo hạt là 1.000 cây (Bảng 6) từ 15 - 60 ngày sau trồng.

Bảng 6. Kết quả đánh giá khả năng truyền bệnh qua hạt của giống rau diếp của *Lettuce mosaic virus* trên rau diếp xoăn (*Lactuca sativa* L. var. *crispa* L.)

Ngày sau gieo hạt	Số cây theo dõi	Triệu chứng	Số cây có triệu chứng giống virus	Kiểm tra bằng cây chỉ thị ¹	Kiểm tra bằng RT-PCR ²
15	1.000	Không	0		
30	1.000	Khảm nhẹ giống virus	4	Không có triệu chứng	-
45	1.000	Khảm nhẹ giống virus	7	Không có triệu chứng	-
60	1.000	Khảm nhẹ giống virus	5	Không có triệu chứng	-

Ghi chú: ¹*Chenopodium quinoa*, *C. armanticolor* và *Nicotiana benthamiana*; ²Kiểm tra bằng RT-PCR sử dụng cặp mồi chung để phát hiện potyvirus CIFor và CIREv.



Hình 5. Thí nghiệm đánh giá truyền qua hạt giống của *Lettuce mosaic virus*

Ghi chú: a) cây rau diếp sau trồng 30 ngày và b) cây rau diếp sau trồng 45 ngày

Từ 30 - 60 ngày sau gieo hạt triệu chứng quan sát thấy chủ yếu là các đốm vàng trên lá, một số cây giống triệu chứng khảm nhẹ do virus gây ra, nhưng không rõ. Tuy nhiên, khi lây nhiễm các triệu chứng này lên các cây chỉ thị *C. quinoa*, *C. amaranticolor* và *N. benthamiana* không thấy có triệu chứng. Sử dụng kỹ thuật RT-PCR với cặp mồi chung CIFor và CIREv để phát hiện potyvirus cũng cho kết quả âm tính. Như vậy, trong phạm vi thí nghiệm này, chưa phát hiện thấy virus truyền qua hạt giống rau diếp.

4. KẾT LUẬN

Bệnh khảm lá rau diếp tại 6 tỉnh thuộc đồng bằng sông Hồng được xác định là do *Lettuce mosaic virus* (LMV). LMV được phát hiện lần đầu tiên ở Việt Nam. LMV nhiễm trên rau diếp (*Lactuca sativa*), các cây chỉ thị như rau muối (*Chenopodium quinoa* và *C. amaranticolor*), thuốc lá cảnh (*Nicotiana benthamiana*), cúc bách nhật (*Gomphrena globosa*) và một số cây ký chủ khác như cà chua (*Solanum lycopersicum*) và đậu Hà Lan (*Pisum sativum*). Nghiên cứu này chưa phát hiện thấy LMV truyền qua hạt giống rau diếp.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi dự án Việt - Bỉ mã số T2017-01-02VB của Học viện Nông nghiệp Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Abd El-Wahab A.S. (2012). Transmission efficiency of Lettuce mosaic virus (LMV) by different aphid species and new aphid vectors in Egypt. *Academic Journal of Entomology*, 5(3): 158-163.
- Subbarao K.V., Davis R.M., Gilbertson R.L., and Raid R.N. (2017). Diseases of lettuce (*Lactuca sativa* L.), primary collator. *Common Names of Plant Diseases*. The American Phytopathology Society (<https://www.apsnet.org/publications/commonnames/Pages/Lettuce.aspx>).
- Candresse T., Lot H., German-Retana S., Krause-Sakate R., Thomas J., Souche S., Delaunay T., Lanneau, M. and Le Gall O. (2007). Analysis of the serological variability of Lettuce mosaic virus using monoclonal antibodies and surface Plasmon resonance technology. *Journal of General Virology*, 88(9): 2605-2610.
- Chen Y.K. and Lee J.Y. (2012). First Report of Bidens mottle virus Causing Mosaic and Leaf Deformation in Garland Chrysanthemum and Lettuce in Taiwan. *Plant Disease*, 96(3): 464.
- Dinant S. and Lot H. (1992). Lettuce mosaic virus. *Plant Pathology*, 41(5): 528-542.
- German-Retana S., Walter J., Le Gall O. (2008). Lettuce mosaic virus: From pathogen diversity to host interactors. *Molecular Plant Pathology*, 9(2): 127-136.
- Ha C., Coombs S., Revill P.A., Harding R.M., Vu M. and Dale J.L. (2008). Design and application of two novel degenerate primer pairs for the detection and complete genomic characterization of potyviruses. *Archieve of Virology*, 153(1): 25-36.
- Jagger I.C. (1921). A transmissible mosaic disease of lettuce. *Journal of Agricultural Research*, 20(10): 737-741.

- Krause-Sakate R., Le Gall O., Fakhfakh H., Peypelut M., Marrakchi M., Varveri C., Pavan M.A., Souche S., Lot H., Zerbini F.M., and Candresse T. (2002). Molecular and biological characterization of Lettuce mosaic virus (LMV) isolates reveals a distinct and widespread type of resistance-breaking isolate: LMV-Most. *Phytopathology*, 92(5): 563-572.
- Lim S., Zhao F., Yoo R.H., Igori D., Lee S.H., Lim H.S. and Moon J.S. (2014). Characteristics of a *Lettuce mosaic virus* isolate infecting lettuce in Korea. *Plant Pathology Journal*, 30(2): 183-187.
- Moreno A., Bertolini E., Olmos A., Cambra M., and Fereres A. (2007). Estimation of vector propensity for Lettuce mosaic virus based on viral detection in single aphids. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 5(3): 376-384.
- Pavan M.A., Krause-Sakate R., da Silva N., Zerbini F.M., and Le Gall O. (2008). Virus diseases of lettuce in Brazil. *Plant Viruses*, 2(1): 35-41.
- Ryder E.J. (2002). A mild systemic reaction to Lettuce mosaic virus in lettuce: inheritance and interaction with an allele for resistance. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 127(5): 814-818.
- Sharma P. and Jain R.K (2012). First Report of Lettuce mosaic virus Infecting *Lactuca sativa* in India. *Plant Disease*, 97(6): 849.
- Soleimani P., Mosahebi G. and Habibi M.K. (2011). Identification of some viruses causing mosaic on lettuce and characterization of Lettuce mosaic virus from Tehran province in Iran. *African Journal of Agricultural Research*, 6(13): 3029-3035.
- Sorel M., Svanella-Dumas L., Candresse T., Acelin G., Pitarch A., Houvenaghel M.C. and German-Retana S. (2014). Key mutations in the cylindrical inclusion involved in lettuce mosaic virus adaptation to eI4E-mediated resistance in lettuce. *Molecular Plant-Microbe Interact*, 27(9): 1014-1024.