

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG NGHIỆP I - HÀ NỘI
..........

Báo cáo tổng kết khoa học và kỹ thuật đề tài:

NGHIÊN CỨU CÁC GIẢI PHÁP CÔNG NGHỆ SINH HỌC
TRONG SẢN XUẤT VÀ THỬ NGHIỆM CÁC LOẠI KIT
CHẨN ĐOÁN BỆNH HẠI CÂY TRỒNG

Mã số: KC.04.15

Chủ nhiệm đề tài: GS.TS. VŨ TRIỆU MÂN

HÀ NỘI, 3 - 2005

Bản quyền 2005 thuộc trường ĐH Nông nghiệp I - Hà Nội

*Đơn xin sao chép toàn bộ hoặc từng phần phải gửi tới Hiệu trưởng Trường
ĐH Nông nghiệp I - Hà Nội, trừ trường hợp sử dụng với mục đích nghiên cứu*

5625

21.1.2005

PHẦN I

BÁO CÁO

DANH SÁCH NHỮNG NGƯỜI THỰC HIỆN

STT	Cán bộ tham gia nghiên cứu	Cơ quan công tác	Số tháng làm việc cho đề tài
1	GS.TS. Vũ Triệu Mân	Trung tâm NCBCND	12/12
2	PGS. TS. Ngô Bích Hào	Nt	Nt
3	Th.S Hà Viết Cường	Nt	Nt
4	TS. Nguyễn Văn Viên	Nt	Nt
5	TS. Đỗ Tấn Dũng	Nt	Nt
6	KS. Đặng Lưu Hoa	Nt	Nt
7	Ths. Trần Thị Như Hoa	Nt	Nt
8	Ths. Nguyễn Thị Ngọc Lan	Nt	Nt
9	TS. Đặng Thị Dung	Nt	Nt
10	PGS.TS. Nguyễn Kim Oanh	Nt	Nt
11	PGS.TS. Nguyễn Văn Tuất	Viện BVTV	8/12
12	KS. Hà Bích Thu	Nt	12/12
13	KS. Nguyễn Thanh Thuý	Nt	Nt
14	KS. Tạ Hoàng Anh	Nt	Nt
15	TS. Nguyễn Ngọc Cường	Viện Di truyền NN	8/12
16	TS. Lê Như Kiều	Nt	12/12
17	KS. Đào Thị Thu Hằng	Nt	Nt
18	KS. Vũ Bích Hậu	Nt	Nt
19	KS. Hoàng Hoa Long	Nt	Nt
20	KS. Lương Văn Chính	Nt	Nt
21	TS. Phạm Văn Vượng	TT nghiên cứu dầu tắm tơ	8/12
22	TS. Nguyễn Văn Biếu	Viện KTKT thuốc lá	8/12
23	TS. Trần Kim Loang	Viện KHKT nông lâm nghiệp Tây Nguyên	8/12
24	Th.S Đào Thị Lan Hoa	Nt	Nt
25	TS. Cao Anh Dương	Viện nghiên cứu mía đường	Nt
26	KS. Phan Tường Lộc	Viện sinh học nhiệt đới Tp HCM	
27	KS. Đoàn Thị Ai Thuyền	Nt	8/12
28	PGS. Nguyễn Kim Giao	Viện Vệ sinh dịch tễ Hà Nội	4/12
29	KS. Nguyễn Thị Minh Liên	Nt	Nt
30	KS. Dương Thiên Tước	Hội sinh vật cảnh Hà Nội	4/12

Ghi chú: PGS.TS. Nguyễn Văn Đình, PGS.TS. Nguyễn Văn Viết chúng tôi có ghi vào danh sách tham gia đề tài trong thuyết minh, nhưng sau này không tham gia đề tài do bận công tác.

BÀI TÓM TẮT

ELISA là phương pháp quan trọng nhất để chẩn đoán nhanh bệnh hại thực vật. Mặc dù đã có các phương pháp sinh học phân tử có độ chính xác cao như PCR, Kit ELISA vẫn được coi trọng vì giá thành rẻ hơn và có thể thực hiện hàng ngàn phản ứng trong thời gian ngắn. Các nước phát triển rất coi trọng phương pháp này, rất nhiều hãng như Agdia, Biorad, Sanofi, Biorba, Amersham biosciences, Ogawaseiki,... sản xuất ra hàng loạt Kit ELISA nhưng giá thành cao và có nhiều bệnh ở Việt Nam có mà họ không sản xuất Kit. Với lý do trên chúng tôi đã thực hiện đề tài: "Nghiên cứu các giải pháp công nghệ sinh học trong sản xuất và thử nghiệm các loại Kit chẩn đoán bệnh hại cây trồng". Thời gian thực hiện: 2001 – 2004. Tổng kinh phí: 1.800 triệu đồng chia cho 4 năm như sau: 350 triệu đồng, 650 triệu đồng, 600 triệu đồng, 200 triệu đồng. Đề tài chủ yếu được thực hiện tại Trung tâm bệnh cây nhiệt đới – ĐHNH I Hà Nội và 6 cơ quan khác.

Mục tiêu của đề tài: Xác định chính xác bệnh virus, nấm và vi khuẩn hại cây trồng bằng kỹ thuật ELISA. Hoàn thiện công nghệ sản xuất kháng huyết thanh và thực nghiệm trị liệu bệnh cây trồng.

Nội dung nghiên cứu: Thực hiện sản xuất kháng huyết thanh virus PVY, PVX, ToMV, Tristeza (CTV), MuMV, nấm *Phytophthora* sp, vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* và khảo nghiệm PCR chẩn đoán Greening. Nghiên cứu bảo vệ cây trồng có giá trị kinh tế như cây tiêu, cây thuốc lá, rau xuất khẩu (khoai tây) và nhiều cây trồng khác.

Vật liệu và phương pháp thí nghiệm: Thu mẫu và sản xuất Kit theo phương pháp tiêu chuẩn của Viện NCNN quốc gia Pháp, TTNC Wageningen Hà Lan và tham khảo các tác giả Mỹ, Nhật Bản, Đài Loan. Dùng PCR chẩn đoán bệnh Greening theo Wu.M.J, Su.H. J và ctv (1999).

Những kết quả đạt được: Chúng tôi đã sản xuất đủ số liệu các loại kháng huyết thanh đã đăng ký trong nội dung đề tài có chất lượng tương đương 90% sản phẩm ngoại nhập và giá thành giảm từ 40 – 50%.

1. PVY: 20.000 liều, 2. PVX: 20.000 liều, 3. ToMV: 30.000 liều,
4. CTV: 20.000 liều, 5. MuMV: 15.000 liều. 6. *Phytophthora* sp: 15.000 liều

7. *Ralstonia solanacearum*: 15.000 liều

8. Thử 1000 phản ứng PCR chẩn đoán bệnh Greening

9. Tạo vật liệu có hàm lượng kháng nguyên cao để sản xuất 170.000 liều KHT virus

10. Chọn lọc ứng dụng 3 quy trình công nghệ: Thử ELISA – Direct; Thử ELISA – Indirect; Quy trình thử PCR cho bệnh Greening để sản xuất cây sạch bệnh

11. Bốn phương pháp sử dụng Kit chẩn đoán bệnh hại trên các bộ phận: lá, củ, quả và mẫu bảo quản lạnh và khô với các bệnh virus hại thực vật.

Thực hiện 3 tiêu chuẩn sử dụng Kit: ELISA - Direct; ELISA – Indirect và PCR

Đề tài chuyển giao kết quả nghiên cứu thông qua hợp đồng với các cơ quan hoặc qua các khảo nghiệm gửi tới các trường ĐH cho sinh viên học tập.

Đã giúp cho Viện KTKT Thuốc lá tạo vườn thuốc lá sạch bệnh ở Cao Bằng Giúp chương trình khoai tây Việt- Đức kiểm tra bệnh virus tạo cây sạch bệnh ở 6 tỉnh và Công ty ; Giúp sản xuất hồ tiêu sạch bệnh ở Tây Nguyên ; Giúp cho Trung tâm nghiên cứu Dâu tằm tơ trung ương và Trại dâu tằm Việt Hùng – Thái Bình tạo vườn dâu sạch bệnh; Giúp cho Chương trình cây cam sạch bệnh tại Hoà Bình, Lạng Sơn và điều tra loại bỏ cây cam bệnh ở nhiều cơ sở sản xuất thuộc các tỉnh do Viện BVTV thực hiện; Giúp các Chi cục Kiểm dịch thực vật dùng ELISA để kiểm tra hàng xuất và nhập khẩu.

MỤC LỤC

BÀI TÓM TẮT	2
I. MỞ ĐẦU	9
A. <i>Lời mở đầu.....</i>	<i>9</i>
B. <i>Những đóng góp mới của đề tài.....</i>	<i>10</i>
II. NỘI DUNG BÁO CÁO	12
2.1. <i>Trích lược các điểm chính của thuyết minh đề tài (Biểu B1-2- TMĐT)</i>	<i>12</i>
2.2. <i>Đối tượng nghiên cứu của đề tài.....</i>	<i>12</i>
2.2.1. <i>Điểm tên các đối tượng nghiên cứu</i>	<i>12</i>
2.2.2. <i>Tổng quan tình hình nghiên cứu ngoài nước và trong nước về các đối tượng nghiên cứu của đề tài</i>	<i>13</i>
2.3. <i>Mục tiêu và nội dung nghiên cứu của đề tài.....</i>	<i>34</i>
III. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	35
3.1. <i>Vật liệu</i>	<i>35</i>
3.2. <i>Phương pháp nghiên cứu.....</i>	<i>35</i>
3.2.1. <i>Phương pháp chọn lọc mẫu và điều tra trên đồng ruộng</i>	<i>35</i>
3.2.2. <i>Phương pháp nhân nuôi virus, phân lập <i>Phytophthora</i> sp và vi khuẩn <i>R. solanacearum</i> trong phòng thí nghiệm.....</i>	<i>37</i>
3.2.3. <i>Phương pháp gây miễn dịch cho động vật và tạo kháng huyết thanh.....</i>	<i>39</i>
3.2.4. <i>Phương pháp sản xuất Kit ELISA.....</i>	<i>39</i>
IV. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU CỦA ĐỀ TÀI.....	41
4.1. <i>Sản xuất kháng huyết thanh virus Y (PVY) và Kit ELISA PVY</i>	<i>41</i>
4.1.1. <i>Các phương pháp chẩn đoán virus PVY</i>	<i>41</i>
4.1.2. <i>Sản xuất kháng huyết thanh chẩn đoán virus PVY.....</i>	<i>42</i>
4.2. <i>Phương pháp chẩn đoán và sản xuất kháng huyết thanh virus X.....</i>	<i>50</i>
4.2.1. <i>Các phương pháp chẩn đoán virus X</i>	<i>50</i>

4.2.1. Các phương pháp chẩn đoán virus X	50
4.2.2. Sản xuất kháng huyết thanh virus X.....	51
4.3. Sản xuất kháng huyết thanh virus ToMV và Kit ELISA ToMV	57
4.3.1. Các phương pháp chẩn đoán virus ToMV (Tomato mosaic virus).....	57
4.3.2. Sản xuất kháng huyết thanh ToMV	58
4.4. Sản xuất kháng huyết thanh virus CTV và Kit ELISA CTV.....	64
4.4.1. Các phương pháp chẩn đoán virus CTV	64
4.4.2. Sản xuất kháng huyết thanh CTV	65
4.5. Sản xuất kháng huyết thanh virus khảm lá dâu MuMV và Kit ELISA MuMV	71
4.5.1. Các phương pháp chẩn đoán MuMV	71
4.5.2. Sản xuất kháng huyết thanh MuMV	71
4.6. Sản xuất kháng huyết thanh nấm Phytophthora sp. và Kit ELISA nấm Phytophthora sp.....	76
4.6.1. Các phương pháp chẩn đoán bệnh nấm Phytophthora sp.	76
4.6.2. Sản xuất kháng huyết thanh Phytophthora sp.	78
4.7. Sản xuất kháng huyết thanh vi khuẩn Ralstonia solanacearum và Kit ELISA vi khuẩn R. solanacearum.....	82
4.7.1. Các phương pháp chẩn đoán vi khuẩn héo xanh.....	82
4.7.2. Sản xuất kháng huyết thanh đa dòng (Polyclonal antibody) của vi khuẩn R. solanacearum.....	83
4.8. Những phương pháp chẩn đoán vi khuẩn gây bệnh Greening và chọn lọc phương pháp PCR trong việc xác định cây bệnh.....	89
4.8.1. Các phương pháp chẩn đoán bệnh Greening	89
4.8.2. Lựa chọn phương pháp PCR trong chẩn đoán bệnh Greening.....	90
4.9. Các sản phẩm của đề tài và ứng dụng của Kit ELISA trong phòng chống bệnh hại.....	93
V. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....	94
5.1. Kết luận	94
5.2. Kiến nghị.....	95

LỜI CẢM ƠN.....	96
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	97
<i>Tài liệu tham khảo trong nước</i>	<i>97</i>
<i>Tài liệu tham khảo nước ngoài.....</i>	<i>99</i>

BẢNG CHỮ CÁI VIẾT TẮT VÀ KÍ HIỆU ĐƠN VỊ ĐO

Việt văn:

BVTV:	Bảo vệ thực vật
Ctv:	Cộng tác viên
ĐHNHI	Đại học Nông nghiệp I
KHKT:	Khoa học kỹ thuật
KHT:	Kháng huyết thanh
NCNN:	Nghiên cứu nông nghiệp

Tiếng Anh và Latinh:

ATSR:	Anti – serum
AP:	Alkaline phosphatase
CTV:	<i>Citrus tristeza virus</i>
DAS – ELISA:	Double antibody sandwich- ELISA
DIBA:	Dot immunobinding Assays.
ELISA:	Enzyme linked immuno sorbent assays
GO:	Greening
HRP:	Horseradish peroxidase
IgG:	Immuno gamaglobuline
NAD:	Nicotiamide adenine dinucleotide
NADP:	Nicotiamide adenine dinucleotide phosphate
NPP	Nitro phenyl phosphate
Mab's:	Kháng thể đơn dòng
nm:	Nanometre
MuMV:	<i>Mullberry mosaic virus</i>
OD:	Optical density
PAMV:	<i>Potato aucuba mosaic virus</i>
PBS – T:	Phosphate buffer saline – Tween
PCR:	Polymerase chain reaction

PEG:	Polyethylen glycol
PO	Polyvinyl-pyrrolidon - ovabumin
PTA- ELISA:	Plate – trapped antigen - ELISA
PLRV:	<i>Potato leaf roll virus</i>
PVA:	<i>Potato virus A</i>
PVC:	Polyvinyl chloride
PVM:	<i>Potato virus M</i>
PVS:	<i>Potato virus S</i>
PVY:	<i>Potato virus Y</i>
PVYc:	Chủng C của virus Y
PVYn :	Chủng N của virus Y
PVYo:	Chủng O của virus Y
PVX:	<i>Potato virus X</i>
Rs:	<i>Ralstonia solanacearum</i>
RT – PCR:	Reverse transcriptase - PCR
SPA:	Staphylococcus protein A
ToMV:	<i>Tomato mosaic virus</i>

Ghi chú : Toàn bộ ảnh trong tài liệu là ảnh chụp của GS.TS. Vũ Triệu Mân, riêng ảnh các vùng cảm sạch bệnh và ảnh điện di trong phòng thí nghiệm chẩn đoán PCR bệnh Greening là của đề tài PGS.TS. Nguyễn Văn Tuất Viện Bảo vệ thực vật (đề tài nhánh của KC- 04- 15) chụp.

I. MỞ ĐẦU

A. LỜI MỞ ĐẦU

Từ cuối thế kỷ thứ 20 đến nay, nông nghiệp thế giới đã đạt được những thành tựu to lớn. Sản lượng và năng suất cây trồng không ngừng ổn định và ngày một nâng cao. Tuy vậy, do khí hậu thay đổi và sự biến động của dịch hại đã dẫn đến những thiệt hại đáng kể năng suất và phẩm chất của cây trồng ở nhiều vùng trên thế giới. Theo tài liệu của tổ chức lương thực và nông nghiệp Liên Hiệp Quốc (FAO), thiệt hại do bệnh cây gây ra trong những năm 90 thế kỷ 20 ước tính đạt 11.6%; trong đó, các bệnh hại do nấm với hàng ngàn loài, 650 loài virus, hơn 600 loài vi khuẩn và hàng trăm loài tuyến trùng ...

Ở Việt Nam, các bệnh do virus tàn lụi cây cam, chanh Tristeza, bệnh vi khuẩn Greening. Bệnh virus X, virus Y và virus ToMV hại cà chua, khoai tây, các loại rau, cây dược liệu, hoa cây cảnh, các vùng nguyên liệu thuốc lá. Virus khảm lá cây dâu MuMV đã gây thoái hoá và thiệt hại nặng cho các cây trồng.

Bệnh do nấm *Phytophthora* sp và vi khuẩn héo xanh *R. solanacearum* phá hoại trên một phạm vi rộng từ cây hàng năm như khoai tây, cà chua và các cây rau họ cà đến các cây ăn quả, cây công nghiệp như dứa, cam, quýt, xoài, sầu riêng, hồ tiêu, cà phê... làm chết hàng loạt cây trên diện tích lớn.

Việc chẩn đoán bệnh tại Việt Nam trước đây chỉ dựa vào mắt thường, sau đó là các phương pháp nuôi cấy phân lập, lây bệnh nhân tạo, quan sát, đo đếm vi sinh vật gây bệnh nhờ kính hiển vi quang học. Với virus, một nguyên nhân gây bệnh rất nhỏ bé, ở nước ta chủ yếu vẫn dùng phương pháp đơn giản là quan sát triệu chứng, lây bệnh nhân tạo bằng cơ học hay bằng côn trùng rồi dựa vào đó, kết luận về nguyên nhân và phương pháp phòng trừ bệnh. Các phương pháp hiển vi điện tử, sinh học phân tử rất ít được ứng dụng trong chẩn đoán vì giá thành cao.

Từ lâu, ở nhiều nước trên thế giới như Mỹ, Anh, Đức, Pháp, Nhật Bản, Hà Lan,... ELISA đều chiếm vị trí quan trọng trong việc kiểm soát và khống chế dịch bệnh, tạo sản phẩm thực vật có chất lượng cao. Rất nhiều hãng sản xuất kháng huyết

thanh và kit ELISA như Agdia, Biorad, Biorba, Sanofi...v.v. ra đời với hàng trăm loại Kit, các sản phẩm này cũng đã có mặt ở Việt Nam.

Kháng huyết thanh và kit ELISA trên thị trường thế giới có khá nhiều chủng loại, nhưng cũng thể hiện những tồn tại sau:

- Giá cả còn quá cao so với một số nước nghèo như Việt Nam. Bộ kit thông thường giá rẻ nhất khoảng 200 Euro hay đô la; bộ kit đắt tiền từ 400-600 Euro hay đô la.
- Có rất nhiều bệnh hại ở Việt Nam có tính chất nhiệt đới hay chỉ có ở Việt Nam thì không có hãng nào trên thế giới sản xuất kit ELISA cho các loại bệnh này, bởi vì nhu cầu tiêu thụ chỉ giành riêng cho Việt Nam và khối lượng sản phẩm ít không bằng khối lượng của các loại kit phổ biến trên thế giới.

Trong khi đó, tại Việt Nam, kinh tế thị trường phát triển mạnh và việc hội nhập vào WTO ngày càng đến gần, nhu cầu sử dụng kit ELISA ngày một tăng: cho nhu cầu xuất, nhập khẩu hàng hoá của ngành kiểm dịch thực vật. Nhu cầu tạo cây sạch và hạt giống, hom giống, mắt ghép, gốc ghép, củ, quả sạch bệnh.

B. NHỮNG ĐÓNG GÓP MỚI CỦA ĐỀ TÀI.

1. Lần đầu tiên ở Việt Nam đề tài đã sản xuất được một số lượng lớn kit ELISA chẩn đoán nhanh bệnh hại thực vật góp phần nâng cao chất lượng sản phẩm nông nghiệp xuất, nhập khẩu. Nâng cao chất lượng giống, tạo giống sạch bệnh...v.v.

2. Đề tài đã chọn lọc và cải tiến các quy trình thử ELISA, PCR thích hợp, tập huấn cho 45 cán bộ kiểm dịch thực vật (2 lớp) và 8 cán bộ các trường Đại học và Viện của toàn quốc, đào tạo được 2 thạc sĩ, 22 sinh viên và đang tiếp tục đào tạo 2 thạc sĩ, 1 nghiên cứu sinh tiến sĩ.

3. Bước đầu đã thử nghiệm có kết quả các Kit ELISA để chẩn đoán bệnh hại tại các Viện nghiên cứu và các cơ sở sản xuất, với các cây khoai tây, cà chua, thuốc lá, hồ tiêu, cam chanh, dâu tằm; hạt giống rau và cây trồng, củ giống... và đưa ra 4 phương pháp sử dụng Kit ELISA giúp cho việc phổ cập phương pháp này trong nghiên cứu khoa học và sản xuất nhanh hơn.

- Sử dụng ELISA cho việc nghiên cứu các chủng loại nấm, vi khuẩn, virus để thực hiện lai tạo và chuyển gen tạo giống kháng hay giống chất lượng cao.

- Dùng Kit ELISA để xác định, phát hiện các bệnh mới ở Việt Nam

- Phục vụ cho việc học tập, đào tạo kỹ thuật viên, kỹ sư tại các trường Đại học và Trung học chuyên nghiệp

II. NỘI DUNG BÁO CÁO

2.1. Trích lược các điểm chính của thuyết minh đề tài (Biểu B1-2- TMĐT)

Mục tiêu:

- Xác định chính xác bệnh do virus, vi khuẩn, nấm bằng kỹ thuật ELISA.
- Sản xuất kháng huyết thanh virus PVY, PVX, ToMV, CTV, MuMV, khảo nghiệm quy trình sản xuất kháng huyết thanh vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* và nấm *Phytophthora* sp nhằm chẩn đoán nhanh bệnh hại. Sử dụng Kit PCR chẩn đoán bệnh Greening phục vụ sản xuất cây sạch bệnh trên cây có múi.
- Hoàn thiện công nghệ sản xuất kháng huyết thanh và thực nghiệm trị liệu bệnh cây trồng.

Kinh phí của đề tài:

Đơn vị tính: triệu đồng

STT	Nội dung các khoản chi	Kế hoạch	ĐC lần 1	Cuối cùng
1	Thuê khoán chuyên môn	562,0	262,0	262,0
2	Nguyên vật liệu, năng lượng	410,9	695,9	695,9
3	Thiết bị máy móc chuyên dùng	380,640	380,640	380,640
4	Xây dựng và sửa chữa nhỏ	110,0	125,0	125,0
5	Chi khác	186,460	186,460	186,460
6	Hợp tác Quốc tế	150,0	150,0	150,0
	Cộng	1.800.000	1.800.000	1.800.000

2. 2. Đối tượng nghiên cứu của đề tài

2.2.1. Điểm tên các đối tượng nghiên cứu

- a. Khảm nhân lá khoai tây: *Potato virus Y* (PVY)
- b. Khảm lá khoai tây: *Potato virus X* (PVX)
- c. Virus khảm lá cà chua: *Tomato mosaic virus* (ToMV)
- d. Tàn lụi cây cam chanh: Tristeza (CTV)

- e. Virus khảm lá dâu: *Mullberry mosaic virus* (MuMV)
- f. Nấm *Phytophthora* sp (Kháng huyết thanh *Phytophthora* sp phản ứng với các loài nấm *Phytophthora* sp)
- g. Vi khuẩn héo xanh cây họ cà: *Ralstonia solanacearum*
- h. Vi khuẩn Greening

2.2.2. Tổng quan tình hình nghiên cứu ngoài nước và trong nước về các đối tượng nghiên cứu của đề tài

a. Tình hình nghiên cứu virus khảm nhãn lá khoai tây: *Potato virus Y* (PVY)

Những nghiên cứu về PVY và sản xuất Kít ELISA của PVY ở nước ngoài:

Virus Y được xếp vào nhóm Potyvirus (Peter, W. 1971; Delgao-Sachez, S. 1970; Zukin, A. G. 1976; và Veerisetty, V. 1979) là nhóm virus hại thực vật lớn được biết đến từ trước đến nay. Virus PVY đã được xác định, miêu tả bởi Smith (1931) và có rất nhiều tên gọi khác nhau:

Potato acropetal necrosis virus (Rev. appl. Mycol. 10: 745)

Potato severe mosaic virus (Rev. appl. Mycol. 22: 367)

Marmor epsilon (Rev. appl. Mycol. 28: 514)

Solanum virus (Rev. app. Mycol. 17: 52)

Tobacco vein- banding virus (Rev. appl. Mycol. 10: 60)

Và một số tên gọi khác như: *Potato virus C* (Rev. appl. Mycol. 16: 31), *Tobacco veinal necrosis virus* (Rev. appl. Mycol. 31: 201). Tên thường gọi hiện nay là *Potato virus Y* viết tắt là PVY.

PVY là một trong hai virus trong nhóm khảm cùng với PVX (Smith. M, 1931). Theo de Bokx. J. A và Huttinga. H (1981), PVY có nhiều chủng (strain) khác nhau (PVY_o, PVY_n, PVY_c và PVV). PVY phân bố rộng rãi: chủng PVY_o phân bố rộng ở nhiều vùng trồng khoai tây, ớt, cà chua, thuốc lá có khí hậu ẩm áp; chủng PVY_n phổ biến ở hầu các nước Châu Âu, Bắc Mỹ, Bắc Phi; chủng PVY_c phổ biến ở Australia, Ấn Độ và một số vùng khác của Bắc Ai-len. Nói chung những vùng có khí hậu ôn đới và cận nhiệt đới, trồng khoai tây, cà chua, ớt, thuốc lá đều thấy xuất hiện PVY.

Theo Thomberry(1960), ký chủ của virus PVY có khoảng 60 loài cây; Trong khi đó, theo Edwardson (1974) và Horvath (1979), PVY được biết đến trong tự nhiên và trong thí nghiệm đã lây nhiễm cho 342 loài của 69 chi trong 27 họ thực vật. Phạm vi ký chủ của PVY chủ yếu là cây họ cà (*Solanaceae*), một số cây thuộc họ rau dền (*Amaranthaceae*), họ rau muống (*Chenopodiaceae*), họ cúc (*Compositae*), họ đậu (*Leguminosae*) (Edwardson, 1974; Horvath, 1979).

Ở Tây Âu, bệnh do PVY gây ra làm sản lượng khoai tây giảm khoảng 50% (Reestman. A. J, 1970). Virus PVY là một trong những virus gây bệnh nghiêm trọng nhất cho khoai tây. Bukashov. S. M và Ya Kamera. A (1972) cho biết: virus PVY làm giảm năng suất khoai tây ở Liên Xô khoảng 50-90% so với sản lượng dự thu; tương tự, sản lượng khoai tây của Đức giảm 60% (Weideman, 1979).

PVY không những làm giảm năng suất mà còn ảnh hưởng đến chất lượng của sản phẩm: hàm lượng tinh bột của khoai tây bị nhiễm PVY giảm 1,8- 3,7% (Ambroxov. A. L và Bloskaia, G. V. 1971). Trong số các chủng của PVY, chủng PVY_o là chủng nguy hiểm và gây hại nhiều nhất tại Châu Âu, Châu Mỹ và Nhật Bản (de Bokx. J. A, 1972; Beemster. A và Rozendaal. A, 1972; Spire. D, 1976). Hơn nữa, sự phối hợp của PVY với các virus khác (Y+X+S, Y+X+A và Y+M+X) có thể làm giảm năng suất của khoai tây hơn 50% ở nhiều vùng trên thế giới. Cho đến những năm gần đây 1999, 2000 bệnh virus khoai tây vẫn tiếp tục gây hại nặng ở các nước chưa xây dựng được hệ thống sản xuất giống khiến năng suất khoai tây ở các nước trong khu vực Đông Nam Á và Nam Mỹ còn rất thấp so với năng suất khoai tây của Bắc Mỹ, Canada và các nước Châu Âu (FAO, 2000).

Đến những năm 1970, kháng huyết thanh và sau đó là Kit ELISA của virus Y đã được sử dụng khá rộng rãi trong nghiên cứu khoa học và phục vụ các hệ thống chọn lọc khoai tây theo dòng, nuôi cấy mô và các hệ thống chọn lọc theo quần thể của các trung tâm nghiên cứu khoa học ở Pháp, Hà Lan, Cộng hoà Liên bang Đức, Mỹ, Canada và nhiều nước Châu Âu khác. Năm 1977, Clark và Adam đã thực nghiệm thử phản ứng ELISA của virus PVY tại Scotlen. ở Pháp, Kit ELISA của PVY được sử dụng lần đầu vào năm 1978. Trong quá trình gây miễn dịch cho động vật tính kháng nguyên của PVY chỉ ở mức trung bình vì vậy, phản ứng ELISA vẫn đặc hiệu nhưng

không có trị số OD cao. Chính vì những đặc điểm trên kháng huyết thanh và Kit ELISA của PVY có giá cao hơn PVX hay ToMV. Hiện nay, ở Việt Nam các hãng Agdia, Sannofi, Biorad đã quảng cáo và bán ra thị trường Việt Nam một số kháng huyết thanh PVY do họ sản xuất nhưng cũng mắc vào những thiếu sót chung: là giá thành cao và phản ứng không mạnh hay chỉ đạt mức trung bình.

Những nghiên cứu virus Y và sản xuất kháng huyết thanh virus Y ở Việt Nam:

Ở nước ta, bệnh virus thực vật đã được nhiều tác giả nghiên cứu. Vũ Triệu Mân (1972-1984) đã xác định được 7 loại virus chính gây hại trên cây khoai tây ở Việt Nam (PVX, PVY, PVA, PVS, PVM, PAMV và PLRV) và cũng theo tác giả, ở miền Bắc nước ta, tỷ lệ bệnh quan sát bằng mắt trên 40% còn tỷ lệ bệnh ẩn trên 90% số khóm điều tra điều tra ở một số vùng. Theo Nguyễn Hữu Thụy, Hà Minh Trung, Nguyễn Thơ và Vũ Triệu Mân (1973 – 1983), virus PVY là virus gây hại nghiêm trọng nhất trên cây khoai tây. PVY của khoai tây thường phối hợp gây hại với các virus khác và gây ra các triệu chứng khảm, xoắn lùn, cuốn lá dẫn đến củ nhỏ hay không có củ. Ngoài ảnh hưởng trực tiếp đến sinh trưởng phát triển khoai tây, giảm năng suất, PVY còn là nguyên nhân của quá trình thoái hoá giống (Trình Khắc Quang và ctv, 1995).

Trên cây cà chua, PVY cũng làm giảm năng suất và chất lượng quả. Tuy nhiên, bệnh trên ruộng cà chua thường xuất hiện với những triệu chứng hỗn hợp do nhiều loại virus gây ra. ở triệu chứng khảm mảng trên cà (cà bát, cà pháo), sự có mặt của PVY và PVX làm tỷ lệ bệnh đạt tới 21%. Trên cây thuốc lá, PVY gây ra triệu chứng sáng gân, tỷ lệ bệnh đạt từ 1 – 5%, khi bị nặng có thể lên đến 10%.

Virus PVY là virus rất phổ biến ở nước ta và gây tác hại trên các cây họ cà, họ rau dền, họ rau muống và một số ít cây công nghiệp như hồ tiêu, thuốc lá...và được truyền nhanh (từ 15 giây đến 30 phút nhờ côn trùng môi giới: rệp đào (*Myzus persicae*) và rệp bông (*Aphis gossypii*)). Vì vậy, bệnh phát tán nhanh và thiệt hại do PVY là lớn nhất trên khoai tây và một số cây trồng ở Việt Nam bị bệnh virus gây thoái hoá (Vũ Triệu Mân, 1985).

Ở Việt Nam, kháng huyết thanh PVY đã được làm theo phương pháp của Viện Bảo vệ thực vật Ucraina vào những năm 80 nhưng không đạt kết quả tốt vì phương pháp này quá đơn giản virus PVY được làm sạch với số lượng rất ít và khả năng gây miễn dịch thấp, nên trong nhiều năm sau việc sản xuất thử này không được lặp lại nữa.

Trong đề tài KC.04.15 lần đầu tiên sản xuất kháng huyết thanh PVY với phương pháp tương đối hiện đại và thu được kết quả tốt hơn hẳn trước đây; từ đó sản phẩm này hứa hẹn được đưa vào sản xuất hàng loạt để phục vụ nghiên cứu, phục vụ sản xuất giống sạch bệnh.

b. Tình hình nghiên cứu virus khảm lá khoai tây: Potato virus X (PVX)

Tình hình nghiên cứu virus PVX và sản xuất Kit ELISA của PVX ở nước ngoài:

PVX được xếp vào nhóm Potexvirus được Smith mô tả năm 1931. PVX được Brandes và Wetter (1959) nghiên cứu cùng với các virus khác có kích cỡ, hình dạng tương tự và các virus này được xếp chung thành một nhóm. Nhóm virus này được đặt tên là nhóm *Potato virus X* (Brandes, 1964). Sau đó, Harrison đặt lại tên nhóm là Potex virus. 5 năm sau, tên nhóm chính thức được công nhận bởi Ủy ban Quốc tế về phân loại virus.

Virus PVX phân bố rộng rãi ở các vùng trồng cây họ cà (*Solanaceae*) trên thế giới. Virus X có nhiều tên gọi khác nhau như :

Tobacco ringspot virus (John son, 1972)

Potato Xpotex virus (Smith, 1931)

Potato latent virus (Pev. Appl Mycol 11.595)

Potato mild mosaic virus (Rev. appl. Mycol 17.52).

Potato virus B.

Potato virus D.

Tên tiếng Anh của virus PVX:

Potato interveinal mosaic.

Potato top necrosis.

Tên thường được sử dụng rộng rãi hiện nay là *Potato virus X* được viết tắt là PVX.

PVX có phổ ký chủ tự nhiên và thí nghiệm rất rộng. Theo Purcifull và Edwardson (1981), PVX lây nhiễm trên 240 loài thực vật thuộc 16 họ. Theo Edwardson và Christie (1997), phổ ký chủ trong tự nhiên của PVX ít nhất là 62 loài thực vật thuộc 27 họ và được lây nhiễm thực nghiệm tới 348 loài thực vật thuộc 33 họ. PVX có mặt khắp mọi nơi trên thế giới và đặc biệt là tác nhân gây bệnh quan trọng trên các cây trồng chính thuộc họ cà, kể cả cây cảnh và cỏ dại.

Virus X chủ yếu hại trên cây khoai tây và được xác định bởi Smith (1931).

Matthews (1919) nhận xét cây khoai tây bị nhiễm virus X năm đầu có thể không có triệu chứng bệnh dẫn đến khi thu hoạch người ta thu nhầm những cây này. Năm thứ hai bệnh thể hiện rất khác nhau: có mầm bệnh rất nặng, có mầm bệnh nhẹ hơn hay hoàn toàn không có triệu chứng bệnh. PVX được Chester (1955) đánh giá gây thiệt hại hàng năm (1931 – 1951) và giảm năng suất 13% ở Mỹ, lớn hơn gấp 2 lần tác động đồng thời của bệnh thối hạch *Rhizotonia* sp và bệnh tàn lụi xuất hiện muộn. Reesiman (1970) cho biết virus X có thể làm giảm năng suất tới 25% ở vùng bị bệnh nặng trong khi theo Bukashov và Yakamera (1972), virus X làm giảm năng suất khoai tây 10 – 20%. Trên các giống khoai tây chống chịu kém thiệt hại lên tới 50%. Beemster và de Bokx (1987) nhận định rằng những chủng độc của virus X thường xuyên gây hại, làm suy giảm năng suất của rất nhiều vụ khoai tây từ 2- 23%. ở Đan Mạch, virus X đã làm mất năng suất 27% trên giống Alpha; 7 – 9 % trên giống Bintje; ở Úc là 5- 20% trên giống Russet Burbank; ở Canada và Mỹ là 21.9% trên giống Red pontia. Ở Anh, PVX đã gây thoái hoá giống qua 3 vụ trồng khoai tây, năng suất liên tục giảm 30%. Tương tự, ở Liên Xô một chủng độc của PVX cũng gây giảm năng suất 43% sau 4 năm sản xuất. Cùng với việc làm giảm năng suất, PVX còn làm giảm thành phần chất khô trong củ - điều đặc biệt quan trọng trong công nghiệp chế biến khoai tây.

Trên cây cà chua, nhiễm virus PVX dẫn đến sinh trưởng chậm và ảnh hưởng nghiêm trọng đến năng suất. ở Phần Lan, cà chua bị nhiễm cả PVY và PVX sau khi hình thành quả, thiệt hại tới 50% năng suất.

Trên cây thuốc lá, chưa có nhiều báo cáo về ảnh hưởng của PVX gây ra. Tuy nhiên, PVX có thể làm ảnh hưởng đến phẩm cấp thuốc lá như độ dài và độ dai của sợi cuốn.

Thiệt hại do PVX gây ra sẽ lớn hơn rất nhiều khi PVX cùng có mặt và gây hại với các virus khác đặc biệt là potato virus Y (PVY), *Potato virus A* (PVA) hoặc *Potato virus S* (PVS). Bệnh khoai tây nhân do PVX và PVA gây ra ở Nam Mỹ và Châu Âu, làm cho cây bị lùn bụi, lá biến vàng, giòn, dẫn đến cây bị chết. Tại Ý năng suất khoai tây giảm 40% bởi sự gây hại đồng thời của 2 virus này. Khi PVX và PVY gây hại đồng thời trên khoai tây và thuốc lá, năng suất có thể bị giảm 10 lần so với nhiễm riêng một mình PVX. Tương tự, năng suất khoai tây giảm bởi PVS cũng tăng lên khi PVX cùng có mặt gây hại trên cây bị nhiễm: nhiễm riêng PVS làm giảm 4.3% năng suất trên giống Saskia (Bungari), trong khi đó nhiễm đồng thời PVS và PVX làm giảm tới 22.3% năng suất. Kit ELISA của PVX ở nước ngoài đã được sản xuất với chất lượng tốt nhưng giá thành còn cao.

Những nghiên cứu virus X và sản xuất kháng huyết thanh virus X ở Việt Nam

Nghiên cứu về sự gây hại của virus PVX ở Việt Nam, năm 1976, Hà Minh Trung và Nguyễn Phương Đại (Viện Bảo vệ thực vật) đã điều tra và kiểm tra virus khoai tây bằng huyết thanh và kết luận là các virus X, Y, S, M đã nhiễm với tỷ lệ 10.3 – 66.1% số mẫu điều tra.

Năm 1978, Vũ Triệu Mân đã nghiên cứu loại trừ virus X khoai tây ra khỏi đồng ruộng và đi đến kết luận: “Virus X rất phổ biến và phá hoại nghiêm trọng trên giống khoai tây Thường Tín và một số giống nhập nội. Tuy nhiên, việc loại trừ chúng ra khỏi đồng ruộng dễ dàng hơn so với các loại virus khoai tây khác bởi vì chúng không có khả năng truyền qua côn trùng môi giới”.

Năm 1979, tại Pháp, Vũ Triệu Mân đã nghiên cứu PVX trên giống Ackersegen của Thường Tín (Hà Tây) và đã xác định được hai chủng là XV1 và XV2 cùng tồn tại trên giống này. Hệ thống sản xuất cây sạch bệnh theo dòng và quần thể đã được thử nghiệm để chống bệnh ở Việt Nam (Nguyễn Văn Viết, 1985; Vũ Triệu Mân, 1987). Cũng như kháng huyết thanh virus Y, virus X đã được sản xuất thử nghiệm trong

những năm 80 ở trường ĐH Nông nghiệp I và Viện BVTV nhưng chưa đạt kết quả mong muốn.

c. Tình hình nghiên cứu virus khảm lá cà chua: Tomato mosaic virus (ToMV)

Những nghiên cứu về virus ToMV và sản xuất Kit ELISA của virus ToMV ở nước ngoài:

Tên thường gọi: virus ToMV (*Tomato mosaic virus*)

Vị trí phân loại thuộc nhóm Tobamovirus

Tên khác thường dùng: *Tomato mosaic tobamovirus*.

Virus có hình gậy, thẳng, không có vỏ, đa số có kích thước 18 x 300nm, có hệ số lắng đọng 195 S và trọng lượng phân tử 40,000,000 (Hollings và Huttinga, 1975 ; Brunt, 1988, Van Regenmortel và Meshi, 1995), ngưỡng nhiệt độ mất hoạt tính (TIP): 80 – 950 C và ngưỡng pha loãng: 10-5 – 10-7.

Thời gian sống và gây hại trong dịch cây bệnh 50 ngày. Virus ToMV có thể tồn tại trong nhiều tháng trên các hạt giống từ cây mẹ bị nhiễm bệnh và được truyền bằng cơ học tới các cây non trong suốt quá trình gieo trồng (Broadbent, 1961). ToMV lan truyền rất nhanh bởi hoạt động của con người, do tính bền vững của nó ngoài tự nhiên. Hạt, lá, rễ và tàn dư là nguồn lây nhiễm quan trọng. Tàn dư rễ cây trồng vụ trước và hạt được coi là nguồn ban đầu của sự lây nhiễm. Trong tàn dư rễ cây bệnh, virus ToMV có thể bền vững trong giai đoạn dài và sống sót trong đất khoảng 22 tháng cũng như trong tàn dư rễ cây bệnh ở độ sâu 120cm. Các cây cỏ dại là nguồn lây nhiễm quan trọng vì chúng là nguồn bệnh cấp 1. ToMV không lan truyền qua côn trùng môi giới mà chủ yếu lan truyền qua hạt, tiếp xúc cơ học và lan truyền bằng dây tơ hồng. Virus ToMV phân bố rộng rãi khắp thế giới đặc biệt là vùng khí hậu nhiệt đới. Virus ToMV có phạm vi ký chủ rất rộng: trên 127 loài thuộc 23 họ thực vật. Nguy hiểm hơn ToMV còn có khả năng tồn tại trên hạt giống, đây chính là nguồn lây nhiễm sau này và có thể là nguyên nhân gây thoái hoá giống.

Virus ToMV gây hại ở hầu hết các vùng trồng cà chua trên thế giới, cà chua bị nhiễm virus ToMV năng suất có thể giảm từ 5 – 50% (Alaxander, 1950, 1951, 1952; Crill, 1973), thậm chí còn cao hơn nếu cà chua bị nhiễm đồng thời các virus khác

(Uschdrweit, 1952). Không những thế nếu cây bị nhiễm virus ToMV cây còi cọc, phẩm chất quả cà chua bị giảm, giống bị thoái hoá, hiệu quả kinh tế giảm. Khi hạt bị nhiễm virus ToMV việc xử lý hạt sẽ làm tăng chi phí trong sản xuất, làm giảm sức sống của hạt và cây con. ở Bắc Carolina, bệnh virus hại cà chua gây thiệt hại kinh tế từ 5 – 90% phụ thuộc vào từng bệnh, chủng virus, giống cà chua, tuổi của cây ở giai đoạn nhiễm, nhiệt độ trong suốt thời gian phát triển bệnh, sự có mặt của các bệnh khác, phạm vi lan truyền của virus trong suốt quá trình gieo trồng.

Kit ELISA của virus ToMV đã được sản xuất ít ở nước ngoài và giá thành cao.

Những nghiên cứu virus ToMV và sản xuất kháng huyết thanh virus ToMV ở Việt Nam

Ở Việt Nam đã nghiên cứu virus ToMV trên các mẫu hạt giống cà chua, ớt, các loại cà khác và xác định chủng virus phổ biến và gây hại ở Việt Nam là chủng 0 và 1. Các chủng này gây triệu chứng khảm lá, biến dạng lá cà chua và một số cây thuộc họ cà (Ngô Bích Hảo kết hợp với Viện nghiên cứu bệnh hạt giống tại Copenhagen - Đan Mạch, 2000).

Các kết quả đã chứng minh sự xuất hiện ToMV trên cà chua và ở miền bắc Việt Nam. Hai chủng của virus ToMV là chủng 0 và 1, xuất hiện thường xuyên nhất trên các mẫu cà chua và cà ở vùng Hà Nội và Hưng Yên ở miền bắc Việt Nam. Tỷ lệ nhiễm ToMV là 24% khá cao ở trên các mẫu hạt cà chua cho thấy rằng hạt nhiễm virus ToMV có thể là nguồn lây nhiễm quan trọng cho cây cà chua ở miền bắc Việt Nam. Bệnh khảm lá cà chua do ToMV gây hại phổ biến trên hầu hết các giống trồng trong sản xuất và gây hại nặng nhất vào giai đoạn quả chín và thu hoạch. Bệnh do virus ToMV đã làm giảm đáng kể một số chỉ tiêu chất lượng cà chua đặc biệt là đường tổng số, caroten và vitamin C.

Kháng huyết thanh ToMV và Kit ELISA chưa được sản xuất ở Việt Nam.

d. Tình hình nghiên cứu bệnh tàn lụi cây cam chanh do Citrus Tristeza virus (CTV)

Những nghiên cứu về bệnh tàn lụi cây cam chanh (CTV) và sản xuất Kit ELISA của virus CTV ở nước ngoài:

Virus Tristeza gây bệnh tàn lụi cam, chanh và các cây có múi có thể xuất hiện từ vùng Đông Nam Châu á. Nơi cội nguồn của các cây có múi như: cam, quýt, bưởi, ở đây người ta dùng gốc ghép phổ biến là cây cam chua.

Virus đã truyền nhanh chóng nhờ rệp cam sang nhiều vùng trồng cam trên thế giới. Có giả thuyết là bệnh có ở nam Trung Quốc từ cuối thế kỷ 19 rồi ở Malaysia, sau năm 1920 bệnh có ở khắp thế giới. Năm 1928 ở Châu Phi, 1930 ở Achantina, rồi Brazil, Uruguay, các nước Nam Mỹ, Tây Ban Nha, Pháp, Bắc Phi. Năm 1939 bệnh xuất hiện ở bang Florida và California (Mỹ).

Bệnh cũng được tìm thấy ở Trung Quốc, Việt Nam, Indonesia, Philippine, Thái Lan, Úc,... ở Địa Trung Hải, Nam và Bắc Mỹ, Trung Quốc bệnh đã tàn phá hàng ngàn ha cam ngọt, quýt, bưởi khi dùng gốc ghép là cam chua, bưởi Pumelo hoặc chanh, làm cây còi cọc, tàn lụi rồi chết.

Năm 1946, các tác giả Meneghini, Fawcett và Wallace đã công bố tài liệu đầu tiên mô tả các triệu chứng của bệnh này. Cũng năm đó, Kiajima và ctv lần đầu tiên đã xác định nguyên nhân gây bệnh là do virus Tristeza gây ra. Virus có kích thước 1800 – 2000nm x 11 – 12nm, virus thuộc nhóm Closterovirus.

Bệnh không truyền qua hạt giống nhưng truyền rất mạnh qua mắt ghép, gốc ghép và các loại rệp như Toxoptera citricidus, Aphis citricola, Aphis spireacola. Toxoptera aurantii... Triệu chứng của bệnh phụ thuộc vào các chủng virus. Các cây cam ở Australia khi dùng giống chanh Eureka và cam Seville làm gốc ghép hay bị bệnh nặng. Cây bệnh biểu hiện bệnh nhanh như lá vàng, cây còi cọc, tàn lụi dần rồi chết trong một vài năm. Còn ở California, mùa hè có mưa nhiều, một số cây cam bị bệnh có hiện tượng phục hồi khi chúng bị nhiễm chủng virus nhẹ (Wallace, 1968). Sự phát hiện này đã giúp cho các nhà khoa học sau này sử dụng được các chủng virus

nhẹ chống lại các chủng có độc tính cao trong việc phòng trừ bệnh bằng phương pháp bảo vệ chéo.

Ở Ấn Độ người ta quan sát thấy 2 nhóm chủng:

- Nhóm 1: Gây hiện tượng đốm gân lá và trong gân trên giống quất ở miền Tây ấn Độ và gây vết lõm thân trên cây bưởi, quýt và một số giống cây có múi khác.
- Nhóm 2: Gây vàng lá, lùn thấp trên cam Seville, chanh Lisbon, bưởi và một số giống khác. Các chủng virus gây ra triệu chứng thuộc nhóm 2 này đã làm tàn lụi rất nhanh chóng cây bị bệnh.

Theo công bố của nhiều tác giả tại Hội thảo về bệnh hại cây có múi vùng Châu Á Thái Bình Dương tại Thái Lan 1990 thì virus Tristeza có khoảng 116 chủng đã được phân lập ở Đài Loan và toàn vùng. Riêng Đài Loan đã có 4 nhóm chủng khác nhau trên đồng ruộng (Tsaimenchen, Hong Ji Su và S M. Garvsey, 1990).

Sản phẩm Kit ELISA của virus CTV được một số hãng nước ngoài sản xuất giá thành rất cao.

Những nghiên cứu virus CTV và sản xuất kháng huyết thanh virus CTV ở Việt Nam:

Những nghiên cứu ở Việt Nam: Việc sản xuất cây có múi ở Việt Nam có xu hướng phát triển khá nhanh: năm 1989 có 17.205 ha, năm 1993 có 27.640 ha đến năm 2001 lên tới 60.000 ha, trong đó có 60% số cây thuộc 5 tỉnh đồng bằng Sông Cửu Long.

Khu vực Hà Nội diện tích giảm từ 3.309 ha (1989) xuống còn 2.325 ha (1993) và sản lượng từ 920 tấn xuống còn 154 tấn.

Bệnh Tristeza và Greening luôn là mối đe dọa nghiêm trọng năng suất, làm cây cam tàn lụi nhanh chóng. Năm 1960, Cuba đã giúp Việt Nam nghiên cứu bệnh cây có múi, 1963 đã thống kê được 60 bệnh và côn trùng ở Việt Nam trong đó bệnh Tristeza và Greening là hai bệnh có vị trí quan trọng nhất (Viện sĩ Canchaveli L. A. 1963). Năm 1967 – 1968 kết quả điều tra cơ bản của Bộ nông nghiệp đã định loại được 105 loài trong đó bệnh hại cam, chanh chưa phải là những dịch hại quan trọng nhất. Mãi tới sau những năm 70 khi việc nhập giống cây có múi do không kiểm soát được bệnh, nên bệnh đã xuất hiện ở hầu hết các vùng trồng cam của nước ta.

Năm 1983 bằng mẫu cam thu từ tỉnh Hải Dương, Nguyễn Văn Mẫn và Phạm Quý Hiệp đã tìm thấy virus Tristeza và Phytoplasma gây bệnh. Tác giả Nguyễn Văn Mẫn đã chế tạo thử kháng huyết thanh CTV. Từ năm 1988 – 1994 Vũ Triệu Mân, Nguyễn Văn Mẫn, Nguyễn Kim Giao dùng phương pháp hiển vi điện tử và ELISA đã tìm thấy virus Tristeza và bệnh Greening trên 10 giống cây có múi ở các tỉnh Cần Thơ, Đồng Nai, Hoà Bình, Hà Tây,... Năm 1992 – 1994 nhóm nghiên cứu của các tác giả Hà Minh trung, Ngô Vĩnh Viễn, Đỗ Thành Lâm đã nghiên cứu về rệp truyền bệnh và kết luận bệnh Tristeza đã xuất hiện phổ biến ở nhiều vùng tại miền bắc Việt Nam. Theo Hong Ji Su (1996) bệnh có ở Việt Nam nhưng thường là chủng nhẹ. Theo Vũ Triệu Mân (1996 – 1997) bệnh khá phổ biến ở khắp các vùng trồng cây có múi tại Việt Nam và đặc biệt là cây bệnh thường nhiễm hỗn hợp cùng một lúc cả virus Tristeza và vi khuẩn gây bệnh Greening.

e. Tình hình nghiên cứu virus khảm lá dâu: Mulberry Mosaic virus (MuMV)

Những nghiên cứu về virus MuMV và sản xuất Kit ELISA của virus MuMV ở nước ngoài:

Virus khảm lá dâu (*Mulberry mosaic virus*) được truyền qua hơn 30 loài rệp, trong đó rệp bông (*Aphis gossypii*), rệp đào (*Myzus persicae*) là những loài truyền mạnh nhất (O'bien R.G, 1997). Rệp bông tấn công gây hại ở mặt dưới của lá (Roy và Ctv, 1983). Chúng xuất hiện đầu tiên ở những lá già, sau đó lan truyền sang các lá non và ngọn (Bannerejec, 1981). Thời tiết nóng trên 40°C và độ ẩm quá cao hoặc quá thấp sẽ làm cho rệp chết nhiều, nhiệt độ tối thấp cho sự phát triển của rệp là 50°C, tối thích là 25°C (Liu và Ctv, 1987). Nghiên cứu của Shara D.D cho biết, virus còn được truyền qua rầy xanh (Shara D.D, 1974). *Mulberry ringspot virus* truyền bệnh qua vector là tuyến trùng (*Longidorus mantini*; *Dorylamidae* sp), cơ giới vật lý (không truyền bằng sự cọ sát giữa các cây), nhân giống vô tính và truyền bằng hạt giống (10% trên hạt đậu tương) (Tsuchizaki, Hibino và Saito, 1971). Virus này truyền bằng tuyến trùng (*Longidorus mantini*) nhưng không truyền bằng loài *Xiphinema* (H. Yagita và Komuto, 1972).

Bệnh virus hại dâu đã được phát hiện khá sớm và có ở hầu hết ở các vùng trồng dâu trên thế giới như Nhật Bản, Liên Xô cũ, Italia, Việt Nam... Theo Bawden, trên cây dâu người ta đã tìm ra trên 100 loại bệnh hại trên các bộ phận khác nhau, trong đó bệnh khảm lá dâu là bệnh quan trọng nhất. Tương tự, Trương Bạch Lâm (1969) cũng đã cho biết trên cây dâu có 100 loại bệnh gây hại và bệnh khảm lá là bệnh nguy hiểm và gây hại hầu như hoàn toàn các tỉnh trồng dâu ở Trung Quốc, Giang Tô, Triết Giang, Sơn Đông, Thiểm Tây. Bệnh có tác hại rất lớn đến quá trình sinh trưởng phát triển của cây. Khi bị bệnh cành cây nhỏ và ngắn lại, lá nhỏ dễ rụng, phát sinh nhiều cành tăm, gây khó khăn cho việc thu hái. Sau khi đốn hè vào tháng 4 – 5 thì tháng 6 – 8 bệnh xuất hiện nhiều, vườn dâu bị hại nghiêm trọng với tỷ lệ bệnh cao lên tới 90% (Trương Bạch Lâm, 1969). ở Nhật Bản kết quả điều tra cho thấy 28% diện tích dâu bị nhiễm bệnh khảm lá dâu, trong đó 5% diện tích nhiễm bệnh đã không cho thu hoạch. Virus khảm dâu không những làm ảnh hưởng đến năng suất mà còn làm ảnh hưởng đến thành phần sinh hoá trong lá: hàm lượng các nguyên tố N, K, Na, Ca, Mg ở các lá bị bệnh đều thấp hơn các lá bình thường, ngược lại hàm lượng các nguyên tố P, Mn ở các lá bị bệnh lại cao hơn (Hishizaki, 1960). Sygiyama đã so sánh lá bị bệnh và lá khoẻ về kích thước trên tế bào biểu bì, mô dậu, mô khuyết là độ dày lá. Kết quả cho thấy các tế bào mô dậu, mô khuyết ở các lá bị bệnh có kích thước nhỏ hơn và dày hơn so với lá bình thường.

Kit ELISA chưa được sản xuất ở nước ngoài.

Những nghiên cứu virus MuMV và sản xuất kháng huyết thanh virus MuMV ở Việt Nam:

Mặc dù bệnh khảm lá dâu khá phổ biến ở Việt Nam nhưng những nghiên cứu chuyên sâu hầu như chưa được thực hiện. Đa số các nghiên cứu chỉ dừng lại ở mức quan sát các triệu chứng và ghi nhận mức độ gây hại của bệnh. Bệnh khảm lá dâu gây hại tương đối phổ biến ở các vùng trồng dâu (Bùi Khắc Vur, 1982). Theo tài liệu nghiên cứu của phòng virus thực vật trường ĐH Nông nghiệp I Hà Nội, bệnh khảm lá dâu phổ biến ở các vùng Bảo Lộc (Lâm Đồng), các tỉnh miền trung, đồng bằng Sông Hồng

Năm 1995, Vũ Triệu Mân và Ngô Bích Hào lần đầu tiên đã nghiên cứu phát hiện bệnh virus hại cây dâu và xác định rệp bông *Aphis gossypii* truyền bệnh theo kiểu không bền vững. Vũ Triệu Mân, Nguyễn Kim Giao, Nguyễn Thị Minh Liên và ctv đã chụp ảnh được virus khảm lá dâu trong tế bào cây bệnh bằng phương pháp lát cắt cực mỏng.

Bệnh virus dâu ngày càng phổ biến rộng khắp ở các vùng trồng dâu trong nước, bệnh đã làm cho cây dâu lùn thấp, lá xoắn, khảm, năng suất giảm rõ rệt và ảnh hưởng tới sản xuất của ngành dâu tằm – tằm chê không ăn lá dâu bị bệnh khiến năng suất kén giảm (Vũ Triệu Mân và ctv, 1998 – 2000).

Việc chẩn đoán sớm, xác định bệnh khảm lá và bệnh đốm hình nhẫn (*Mulberry mosaic virus* và *Mulberry ringspot virus*) là rất quan trọng để có cây dâu sạch bệnh, năng suất và chất lượng cao phục vụ xoá đói giảm nghèo cho nhiều vùng ở Việt Nam.

f. Tình hình nghiên cứu nấm gây bệnh mốc sương *Phytophthora* sp và sản xuất kháng huyết thanh của *Phytophthora* sp

Những nghiên cứu về một số bệnh do nấm *Phytophthora* sp gây hại trên cây trồng và sản xuất Kit ELISA của *Phytophthora* sp ở nước ngoài:

Phytophthora sp. thuộc lớp nấm noãn Oomycetes. Lớp Oomycetes có 76 loài nấm và có tính đa dạng sinh học cao, bao gồm những loài nấm sống thuỷ sinh, bán thuỷ sinh và sống hoàn toàn trên môi trường cạn. Mặc dù hầu hết các loài nấm dựa vào nước để phát tán, nhưng cũng có một số loài không phụ thuộc vào nước. Đa số các loài được biết đều được tìm thấy trong đất và nước ngọt, đặc biệt là xung quanh mép hồ. Chúng là những nấm hoại sinh trên xác thực vật đang thối rữa và xác các loài động vật, kể cả kitin và keratin. Lớp nấm này cũng có những loài ký sinh không bắt buộc và bắt buộc trên một phạm vi ký chủ rộng của các loài động vật (côn trùng, động vật giáp xác và động vật có vú) và các loài thực vật (các loài tảo nước ngọt và tảo biển và thực vật bậc cao).

Bệnh mốc sương cà chua gây hại bởi nấm *Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary là một trong những loại bệnh hại thực vật nguy hiểm trong lịch sử nhân loại

(Abad Z.G. và Ctv, 1997). Năm 1840, bệnh này gây ra thành dịch ở Châu Âu và Châu Mỹ, tạo ra nạn đói khoai tây nổi tiếng năm 1845 tại Ai – Len (Gregory P.H., 1983). Trên một triệu người đã bị chết do nạn đói và khoảng một triệu năm trăm ngàn người phải di cư (Alexopoulos J.C và ctv, 1996). Một cách gián tiếp, sự kiện đó cũng tạo cơ sở cho môn bệnh cây bước sang một giai đoạn phát triển mới và được xem như là một môn khoa học. Bệnh cây ra đời cùng với sự đóng góp của Berkeley và De Bary. Anton De Bary đã chứng minh một cách rõ ràng là: bệnh mốc sương gây ra bởi một loài nấm và ông đặt tên cho nó là *P. infestans* (De Bary, 1876). Hai tác giả này cùng quan điểm và cho rằng loài nấm này được đưa vào châu Âu từ Andes – Nam Mỹ – là nơi nguồn gốc xuất xứ của khoai tây (Berkeley M.J., 1846). Nhiều nhà bệnh cây danh tiếng cũng ủng hộ quan điểm này. Cho tới năm 1939, khi Redick đưa ra một quan điểm mới: Mêhicô là trung tâm xuất xứ của bệnh mốc sương cà chua, khoai tây. Ngày nay, Mêhicô được nhiều người cho rằng là trung tâm phát sinh của bệnh *P. infestans*. Các tác giả khác cho rằng bệnh *P. infestans* được đưa từ Mêhicô vào Mỹ năm 1842, sau đó tới châu Âu năm 1845 (Goodwin S.B và ctv, 1994). Tại Nam Mỹ, bệnh xuất hiện tại Achentina năm 1887 và Braxin năm 1898 (Niederhauser, 1991).

Nếu nấm *P. infestans* là loài nguy hiểm trên cà chua, khoai tây thì *P. nicotianae* var *parasitica*, *P. palmivora*, *P. cinnamomi*, *P. citrophthora* lại là những loài gây hại quan trọng trên cây ăn quả. Triệu chứng các loài nấm này gây ra có thể là thối nõn, thối rễ, thối thân và chảy gôm. Bệnh chảy gôm được ghi nhận đầu tiên ở Azores năm 1834, sau đó được phát hiện ở Bồ Đào Nha năm 1845 và các nước khác thuộc Địa Trung Hải năm 1863. Bệnh xuất hiện ở Florida và California (Mỹ) năm 1876 và gây hại hàng ngàn cây cam quýt ở Ý (Sicil), ở Úc. Ở Ấn Độ, bệnh được ghi nhận đầu tiên bởi Kamat năm 1927. Kamat cho rằng tác nhân gây bệnh là nấm *P. palmivora* Bult. Ở Assam, theo Chowdhary (1951), bệnh do nấm *P. nicotianae* var *Parasitica*. Vào giữa những năm 1863-1870, tất cả các cây có múi ở Sicil (Ý) đều bị phá huỷ bởi bệnh này. Năm 1878 tất cả các vùng nằm trong lãnh thổ Địa Trung Hải trồng cam quýt đều được thông báo là bị bệnh. Đối với các nước ở phía Tây bán cầu, bệnh được ghi nhận đầu tiên ở California (1875), Florida (1876), Cuba (1906),

Paragoay (1920) và Trinidad (1935), Fancett (1936). Bệnh thối nõn và thối rễ trên dứa, theo Isuke Tokashiki (1995), là do nấm *P. nicotianae*, *P. palmivora* và *P. cinnamomi*, *P. palmivora* là loài nấm mới được phát hiện. Kết quả nghiên cứu của K. G. Rohrbach và D. P. Schmitt (1994) lại cho rằng *P. nicotianae*, *P. palmivora* và *P. cinnamomi* không thường xuyên đồng thời xuất hiện trên dứa mà chỉ có *P. nicotianae* và *P. cinnamomi* là phổ biến nhất. Bệnh thường xuất hiện ở vùng đất cao Hawaii, vùng bắc Australia.

Các thiệt hại do *Phytophthora* sp. gây ra trên thế giới:

Từ khi phát hiện đến nay, nấm *Phytophthora* được xác nhận là loài nấm gây bệnh cho rất nhiều loại cây trồng, khoảng 1000 loài như bơ, dứa và đu đủ (bảng 1).

Bảng 1: Một số loài cây trồng và bệnh do nấm *Phytophthora* sp

Loài nấm	Loại cây trồng	Tên bệnh
<i>P. cinnamomi</i>	Bơ	Thối rễ
	Dứa	Thối nõn, thối rễ
	Quýt	Thối mục thân
<i>P. nicotianae</i>	Bơ	Thối rễ
	Dứa	Thối nõn
	Đu đủ	Thối rễ và quả
	cam chanh	Thối nâu, gốc và rễ
<i>P. palmivora</i>	Bơ	Thối rễ
	Cam chanh	Thối gốc và rễ
	Dứa	Thối nõn giữa,
	Đu đủ	Thối rễ và quả, thối mục thân và chết rạp cây con
	Sầu riêng	Thối quả và mục thân
	Sakê	Thối quả

Ở Thái Lan, *Phytophthora* sp là nhóm nấm đất quan trọng và gây hại cho nhiều loại cây trồng. Chúng tấn công tất cả các bộ phận của cây như: rễ, thân, lá,

chối, hoa, quả và gây ra những thiệt hại đáng kể. Nấm *Phytophthora* sp không chỉ tấn công trên một loại cây trồng mà còn gây bệnh trên nhiều loại cây trồng. Theo Kuer Prakone và cộng sự (1990), thiệt hại do bệnh thối rễ cam quýt và chanh dao động 1 – 60 %.

Tại Mỹ, *Phytophthora* sp hàng năm tấn công vào các vụ thu hoạch gây tổn thất hàng tỷ đô la. Bệnh thối rễ do nấm *Phytophthora* sp gây ra cho cây có múi tại bang Ohio (Mỹ) làm thiệt hại trên 50 triệu đô la/ năm.

Theo Broma, bệnh đốm đen trên cây dừa ước tính làm giảm 10 - 30% sản lượng chung của toàn thế giới và làm thất thu khoảng 1500 bảng Anh hàng năm.

Năm 2000, ở nước Nga – nước có sản lượng khoai tây thứ 2 thế giới sau Trung Quốc, bệnh mốc sương làm giảm 15% sản lượng cây trồng (Anon, 2001).

Một vài loài có mặt trên khắp các vùng trên trái đất, ví dụ *P. nicotianae*, trong khi đó những loài khác có phạm vi phân bố hạn chế như *P. clandestina*. Loài nấm *Phytophthora* sp có thể tàn phá thảm thực vật tự nhiên khi được đưa vào những vùng trước đây chúng chưa từng có mặt. *P. cinnamomi* đã tàn phá hơn 282.000 ha rừng ở tây Australia. Vì vậy, loài nấm này có thể gây ảnh hưởng về mặt môi trường rất nghiêm trọng.

Năm 2001, trên thế giới chi phí cho thuốc hoá học để phòng trừ bệnh này ước tính khoảng 3 tỷ đô la. Kit ELISA đã được một số hãng chế tạo để chẩn đoán *Phytophthora* sp trên môi trường.

Những nghiên cứu về nấm *Phytophthora* sp và sản xuất kháng huyết thanh nấm *Phytophthora* sp ở Việt Nam

Ở Việt Nam, bệnh mốc sương cà chua đã được nghiên cứu tương đối sớm. Đánh giá về tác hại của bệnh tác giả Vũ Hoan cho biết: ở ngoại thành Hà Nội những năm 1960 – 1965, thiệt hại trung bình do nấm *P. infestans* gây ra biến động từ 30 – 70%, có khi mất 100% không cho thu hoạch. Nói chung cà chua chính vụ bị nhiễm bệnh nặng hơn cà chua vụ sớm. Vụ cà chua Xuân hè bệnh nhẹ hơn, nhất là ở giai đoạn hoa quả, nhưng ở giai đoạn vườn ươm đến khi ra nụ bệnh phá hoại khá lớn.

Lâm Thị Mỹ Nương (1994) nghiên cứu bệnh thối gốc chảy gôm ở cam quýt cho biết: bệnh do nấm *Phytophthora* sp gây hại trên tất cả các bộ phận của cây từ giai

đoạn vườn ươm, thu hoạch và sau thu hoạch. Theo Vũ Công Hậu (1999) cam quýt bị nhiều bệnh hại nguy hiểm như vàng lá cam chanh, bệnh Tristeza, bệnh ghẻ cam, loét cam, thán thư và đặc biệt là chảy gôm do nấm *Phytophthora citrophthora*. Tác giả còn cho biết tất cả các cây có múi đều bị phá huỷ ở mức độ nặng nhẹ khác nhau. Gần đây, Ngô Vĩnh Viễn, Đặng Lưu Hoa và L.W. Burgess (2000) nghiên cứu bệnh thối nõn dứa ở miền bắc Việt Nam và đã xác định nguyên nhân gây bệnh là do nấm *Phytophthora* sp. Qua kết quả nghiên cứu, phân lập mẫu bệnh nguyên nhân gây bệnh là do nấm *P. nicotianae*, *P. palmivora*, *P. cinnamomi* trong đó *P. nicotianae* là nguyên nhân chính gây ra bệnh thối nõn dứa. Việc chẩn đoán ở Việt Nam hoàn toàn bằng triệu chứng và bằng kính hiển vi quang học, chưa sử dụng phương pháp ELISA.

g. Tình hình nghiên cứu vi khuẩn héo xanh Ralstonia solanacearum

Những nghiên cứu về vi khuẩn *R. solanacearum* và sản xuất Kit ELISA của vi khuẩn ở nước ngoài:

Bệnh héo xanh là một bệnh do vi khuẩn gây ra. Vi khuẩn gây bệnh héo xanh đã được Smith. E nghiên cứu và đặt tên là *Pseudomonas solanacearum* từ năm 1896. Tuy nhiên, đến năm 1996, Yabuuchi. E đã xếp lại vi khuẩn này sang một chi mới trong khoá phân loại và đổi tên vi khuẩn là *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi.

Sự phát sinh phát triển của bệnh héo xanh vi khuẩn có liên quan chặt chẽ với điều kiện ngoại cảnh như nhiệt độ, độ ẩm đất, lượng mưa, gió, kết cấu và pH của đất...v.v..Nhiệt độ thích hợp cho vi khuẩn phát triển là 25 – 35°C, nhiệt độ tối thiểu là 10°C và tối đa là 41°C. pH thích hợp 7.0 – 7.2 (Kelman A. 1994). Bệnh thường gây thiệt hại nặng ở những vùng nhiệt đới với nhiệt độ trên 25°C ở độ sâu 5cm cùng với độ ẩm cao (Wang J. S. 1983). Lượng mưa cũng ảnh hưởng rất lớn đến sự phát triển của vi khuẩn.

Bệnh héo xanh ngày càng gây hại nghiêm trọng ở nhiều vùng trên thế giới do vi khuẩn *R. solanacearum* có phạm vi kí chủ rộng: tới 35 họ thực vật và bao gồm hơn 200 loài cây (Kelman, 1953).

Trên lục, bệnh héo xanh vi khuẩn đã được công bố ở Indonesia vào năm 1905 (Van Brede de Haan, 1906). Ở Srilanca, bệnh phá hại cà chua vào năm 1930, làm chết

81.5% số cây giống khoai tây Marglobe và 47% số cây giống Talatuoya (Abeyguna Wardena, D. V. 1963).

Ở Thái Lan, bệnh do vi khuẩn *R. solanacearum* được phát hiện trên cây cà chua (Chandrasrikul, A. 1957), cây ớt (Chandrasirikul, A. 1972) và cây khoai tây (Titatarn, V. 1983). Bệnh đã làm giảm năng suất đáng kể đối với cà chua, khoai tây, gừng, cà, ớt, thuốc lá, lạc, vừng (Titatarn, V. 1986)

Tương tự, ở Trung Quốc, bệnh không chỉ gây hại nghiêm trọng trên cây họ cà (cà chua, khoai tây, thuốc lá) mà còn gây hại trên một số cây thân gỗ khác như cây ôliu, cây dâu (He, L. Y. 1986).

Bệnh cũng xuất hiện trên nhiều loại cây trồng ở Malaysia (Mehan, V. K. 1986). Lạc bị nhiễm bệnh với tỷ lệ 5-20% là nguyên nhân chính làm giảm diện tích trồng từ 5.197 ha (1980) còn 1.318 ha (1986) và giảm sản lượng từ 19.437 tấn còn 5.000 tấn (Hamidah, S. 1993).

Tỷ lệ bệnh héo xanh trung bình trên 30 vùng điều tra ở Brazil là 13,1% trong đó có 7 vùng nặng, tỷ lệ bệnh từ 20,1-50% và một vùng rất nặng với hơn 90% số cây chết (Silveira, E. B. 1998).

Nhìn chung, trong điều kiện sinh thái phù hợp, bệnh héo xanh vi khuẩn có thể gây chết 15 – 100% số cây cà chua (Trung tâm Rau Châu á, 1986), 70% số cây khoai tây (Sinha, 1986) và 90% cây lạc (Machmud. M, 1986) trên những vùng bị bệnh nặng.

Kit ELISA bước đầu được một số nước sản xuất để giám định vi khuẩn trên môi trường.

Những nghiên cứu về vi khuẩn *R. solanacearum* và sản xuất kháng huyết thanh vi khuẩn ở Việt Nam

Ở Việt Nam, bệnh héo xanh vi khuẩn còn được gọi là bệnh héo rũ, bệnh chết éo lạc... những thông tin đầu tiên về bệnh héo xanh vi khuẩn là hiện tượng chết éo lạc ở Nghệ An và đã gây chết 10-30% số cây (Đặng Thái Thuận, 1968). Kết quả điều tra bệnh cây của Viện Bảo vệ thực vật (1967 – 1968) chỉ rõ bệnh héo xanh vi khuẩn khá phổ biến ở đồng bằng, trung du và miền núi phía bắc Việt Nam.

Bệnh héo xanh vi khuẩn làm chết 4-5% cây khoai tây trên đồng ruộng (Vũ Triệu Mân, 1972) và gây thối củ khoai tây trong bảo quản từ 20-25% số củ (Ngô Đức Thiện, 1978).

Theo Lê Lương Tế (1977), phạm vi ký chủ của *R. solanacearum* ở Việt Nam gồm các cây họ cà, cây lạc, vừng và đậu. Tương tự, theo Đoàn Thị Thanh và ctv (1995), *R. solanacearum* là loài vi khuẩn đa thực, có phạm vi ký chủ rộng, gây hại chủ yếu trên cây họ cà (*Solanaceae*) và họ đậu (*Leguminosae*).

Trên cây lạc, bệnh làm chết từ 20-30% số cây ở Long An và Tây Ninh (Nguyễn Thị Ly và ctv, 1991), trong khi đó, ở Nghệ An và Thanh Hoá bệnh làm chết 15-35% (Nguyễn Xuân Hồng và ctv, 1992).

7 giống thuốc lá tại Ba Vì đều bị bệnh héo xanh vi khuẩn gây hại nặng, đặc biệt 2 giống K51M và DVD có tỷ lệ bệnh lên tới 100% (Vũ Triệu Mân, 1992). Theo kết quả điều tra ở phía bắc Việt Nam của Viện kinh tế kỹ thuật thuốc lá, bệnh héo xanh vi khuẩn là một trong những bệnh phổ biến ở một số vùng trồng thuốc lá như Hà Tây, Bắc Giang, Cao Bằng và Lạng Sơn (Nguyễn Văn Biếu và ctv, 1996).

Đối với cây cà chua, bệnh héo xanh vi khuẩn đã và đang là vấn đề nan giải và nghiêm trọng đối với các vùng trồng rau ngoại thành Hà Nội và phụ cận. Bệnh phát sinh và gây hại nặng từ giai đoạn cây ra hoa rộ- quả non (Đỗ Tấn Dũng, 1997). Kháng huyết thanh và Kit ELISA đã được Trung tâm bệnh cây nhiệt đới sản xuất thử.

h. Tình hình nghiên cứu bệnh vàng lá hoá xanh vỏ quả cam chanh Greening

Những nghiên cứu về bệnh vàng lá và hoá xanh vỏ quả cam chanh Greening ở nước ngoài:

Bệnh vàng lá cam quýt phổ biến ở các vùng trồng cam quýt trên thế giới như ở Châu Mỹ: Achentina, Califocnia, Pena,..., Châu Phi: Maroc, Nam Phi, Tuynidi... Châu Á: Ấn Độ, Trung Quốc, Indonesia, Việt Nam, Châu Âu: Tây Ban Nha, Ý. Vì thế đã có nhiều công trình nghiên cứu bao gồm nhiều vấn đề liên quan đến bệnh như triệu chứng bệnh, chẩn đoán bệnh, nguyên nhân gây bệnh và các biện pháp phòng trừ.

Có nhiều ý kiến cho rằng xuất xứ của bệnh Greening bắt đầu từ tỉnh Phúc Kiến – Trung Quốc vào cuối thế kỷ 19 và được mô tả lần đầu ở Đài Loan năm 1929 với tên gọi Huanglungpin. Bệnh cũng được phát hiện ở Nam Phi năm 1929. Từ đó bệnh được

mô tả ở các nước với tên gọi khác nhau như: khô cành (Dieback) ở Ấn Độ, Likubin ở Đài Loan, Leafmottle ở Philippine và bệnh lá nhỏ ở Isaren. Tuy nhiên tới năm 1970, bệnh được chính thức đặt tên là Greening (McClelland và Schwarts).

Có nhiều trường phái khác nhau về nguyên nhân gây bệnh Greening: Trường phái Akempfer (Mỹ) cho rằng bệnh do yếu tố sinh lý gây ra; trường phái khác cho rằng bệnh do virus gây ra (Schwarz, 1964); Theo Doi và ctv (1967) tác nhân gây bệnh giống như Phytoplasma. Năm 1978, Bore J. M đã nghiên cứu và cho rằng nguồn bệnh Greening là một vi khuẩn nhuộm gram (-). Cuối thập kỷ 80, Garnier. M đã quan sát bằng kính hiển vi điện tử và thấy có nhiều tiểu thể Phytoplasma ở các mẫu thu thập có cấu tạo lớp màng khá hoàn chỉnh gần giống với vi khuẩn và do đó đặt tên là Bacterie like organism (BLO) và nguyên nhân được tìm thấy trước đây gọi là Phytoplasma like organism (MLO). Đến năm 1991 tác giả Kechung Kesui và Likubin ở Đài Loan đã xác định nguồn bệnh Greening là một dạng vi sinh vật mà cơ thể chưa có nhân điển hình, nằm ở vị trí trung gian giữa Phytoplasma và vi khuẩn.

Bệnh Greening hại cam quýt có nhiều triệu chứng phức tạp và đa dạng bởi chịu sự chi phối của nhiều yếu tố sinh vật và phi sinh vật. Bệnh phá hại trên các bộ phận của cây: thịt lá có màu xanh loang lổ, gân chính và gân phụ có màu xanh giống hiện tượng thiếu Mn. Cây bị bệnh nặng lá cong hình thìa giống hiện tượng thiếu Zn, cành có xu thế ngắn lại, hoa rụng nhiều, quả nhỏ và lệch tâm hoặc xanh không chín. Bộ rễ có những vết thối hỏng dẫn đến cây còi cọc kém phát triển. Theo Schneder. N (1968) cho biết có sự tích lũy tinh bột trong lá bệnh một cách không bình thường và có những túi bệnh trên mạch phloem và đại bộ phận mạch này bị phá huỷ.

Những nghiên cứu về bệnh vàng lá và hoá xanh vỏ quả cam chanh Greening ở Việt Nam:

Cây có múi có giá trị về nhiều mặt và là mặt hàng xuất khẩu quan trọng. Tuy nhiên với việc mở rộng diện tích, sâu bệnh hại ngày càng nhiều. Trong thành phần bệnh hại cam quýt thì bệnh Greening là phổ biến và gây hại nghiêm trọng nhất.

Theo Vũ Khắc Hiệu cuối những năm 1960 đầu 1970 do việc nhân giống không được quản lý và coi nhẹ phòng trừ rầy đã dẫn đến nhiều vườn cam ở Phú Quỳ

(Nghệ An), Thanh Hoá bị nhiễm bệnh với tỷ lệ 50 – 60 %. Những năm 1980 bệnh tăng nhanh ở các vùng trồng cam miền bắc như Nghệ An, Thanh Hoá, Hoà Bình với tỷ lệ bệnh 60 – 100%, trong đó 30 – 40 % không cho thu hoạch. Theo Vũ Triệu Mân(1982), bệnh vàng lá Greening được mô tả ở Việt Nam lần đầu vào năm 1982 tại trường đại học Nông nghiệp I – Hà Nội. Năm 1994, Vũ Triệu Mân và Nguyễn Kim Giao đã phát hiện và tìm thấy Greening trên các mẫu thu thập từ Cần Thơ miền nam Việt Nam. Bệnh ngày càng gia tăng theo số liệu thống kê năm 1989 diện tích trồng cam quýt ở đồng bằng sông Cửu Long là 3309 ha đã giảm xuống còn 2,325 ha vào năm 1993. Sản lượng cam của Hà Nội năm 1989 đã đạt đến 920 tấn nhưng năm 1993 chỉ còn 154 tấn, kèm theo đó là vấn đề giảm sút tuổi thọ của vườn kinh doanh.

Theo Hà Minh Trung, Ngô Vĩnh Viễn và một số tác giả khác triệu chứng bệnh Greening biểu hiện trên lá là:

Biến màu vàng hầu hết phiến lá chỉ có gân lá và vùng phụ cận vẫn xanh hay còn gọi là kiểu vàng lá gân xanh (giống với thiếu Mn).

Hầu hết phiến lá và gân lá biến vàng chỉ còn lại một vài điểm xanh giữa nền vàng.

Lá mới biến vàng, nhỏ và uốn cong (giống thiếu Zn).

Lá già có màu xám nhạt, cong vẹo gân lá bị sưng (giống thiếu Bo).

Lá của đợt lộc hè và thu biểu hiện triệu chứng rõ hơn ở lộc xuân. Lá bệnh rụng sớm vào mùa đông, cành bệnh trở nên trơ trụi, dần dần khô chết.

Trên hoa quả: hoa ra trái vụ, quả nhỏ, tâm quả bị vẹo, nhiều hạt bị lép. ở bộ rễ: rễ kém phát triển hơn cây bình thường.

Theo tác giả Lê Thị Thu Hồng, B. Aubert (1996), ở vùng nhiệt đới triệu chứng bệnh có thể thấy trên tán lá ở bất kỳ mùa nào trong năm trên từng phần lá bị đổi màu, cành khô rồi chết, lá đốm xanh vàng, lá vàng gân xanh, cong giống như triệu chứng thiếu Zn.

Về nguyên nhân gây bệnh, ban đầu cũng tồn tại 2 ý kiến khác nhau về nguyên nhân gây bệnh: một bên cho là yếu tố sinh lý gây ra, một bên cho là bệnh do vi sinh vật gây nên và có truyền nhiễm.

Những thí nghiệm về dinh dưỡng và cung cấp nguyên tố vi lượng cho cam, quýt mà trại cam Xuân Mai tiến hành nghiên cứu năm 1965 – 1972 đã cho kết luận bệnh vàng lá cam quýt không phải là bệnh sinh lý. Nghiên cứu lây bệnh nhân tạo bằng mắt ghép và côn trùng *Dipaphorina citri* và *Aphis citri* của Phạm Quý Hiệp (1978 – 1979) ở trạm Nghiên cứu Xuân Mai xác định đây là một bệnh truyền nhiễm và nguyên nhân có thể là siêu vi trùng.

Tuy nhiên trong giai đoạn này chưa xác định được vi sinh vật gây bệnh là virus hay Phytoplasma hay một loại nào đó. Qua giám định bệnh được thực hiện tại IRNA – Pháp J.M Brove và Hà Minh Trung, Monique Gamier(1995) xác định bệnh vàng lá Greening ở Việt Nam gây ra do vi khuẩn *Librobacter ariaticum* còn ở Châu Phi có loài *Librobacter africanus*. Nguyễn Văn Mẫn và Phạm Quý Hiệp (1982) đã xử lý mẫu lấy từ vườn cam Hải Dương đã tìm thấy virus Tristeza và Phytoplasma hại trên cam quýt.

2.3. Mục tiêu và nội dung nghiên cứu của đề tài

Mục tiêu:

- Xác định chính xác bệnh virus, vi khuẩn và nấm bằng kỹ thuật ELISA
- Hoàn thiện công nghệ sản xuất kháng huyết thanh và thực nghiệm trị liệu bệnh cây trồng.

Nội dung của đề tài:

- Thực hiện sản xuất kháng huyết thanh virus (PVY, PVX, ToMV, CTV, MuMV), nấm *Phytophthora* sp và bệnh vi khuẩn héo rũ *Ralstonia solanacearum*
- Khảo nghiệm phương pháp PCR chẩn đoán bệnh Greening
- Sử dụng Kit ELISA đã sản xuất để nghiên cứu bảo vệ cây trồng có giá trị kinh tế

III. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

3.1. Vật liệu

Mẫu bệnh hại được thu thập ngoài đồng thông qua các triệu chứng điển hình của bệnh hại do virus PVX, PVY, ToMV, CTV, MuMV, vi khuẩn héo xanh, nấm *Phytophthora* sp trên các cây khoai tây, cà chua, thuốc lá, cam chanh, dâu, dứa và các cây ăn quả, cây rau khác. Mẫu được bảo quản khô hoặc để trong tủ lạnh ở nhiệt độ -20°C . Mẫu bệnh được lấy nhân tạo bằng cơ học tiếp xúc, côn trùng, bằng ghép cây hoặc phân lập nuôi cấy trên môi trường nhân tạo. Các mẫu này được sử dụng để tách protein tạo kháng huyết thanh và chế tạo kháng huyết thanh và chế tạo thành Kit ELISA sau này.

3.2. Phương pháp nghiên cứu

3.2.1. Phương pháp chọn lọc mẫu và điều tra trên đồng ruộng

a. Phương pháp điều tra

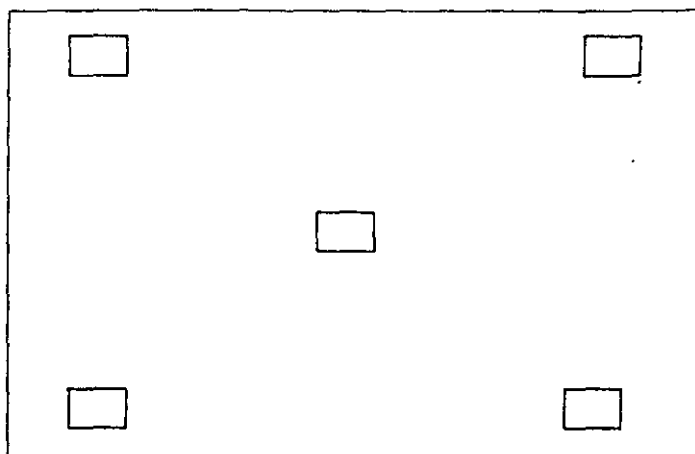
Các bệnh được nghiên cứu, điều tra đồng ruộng theo phương pháp 5 điểm chéo góc hay phương pháp điều tra hàng cách hàng, điều tra 500 cây (khóm)/ruộng (xem hình A và B). Ruộng nhỏ, phân tán điều tra 100% số cây. Cây ăn quả điều tra mỗi điểm 3 cây.

Tỷ lệ phần trăm cây bị bệnh được tính theo công thức:

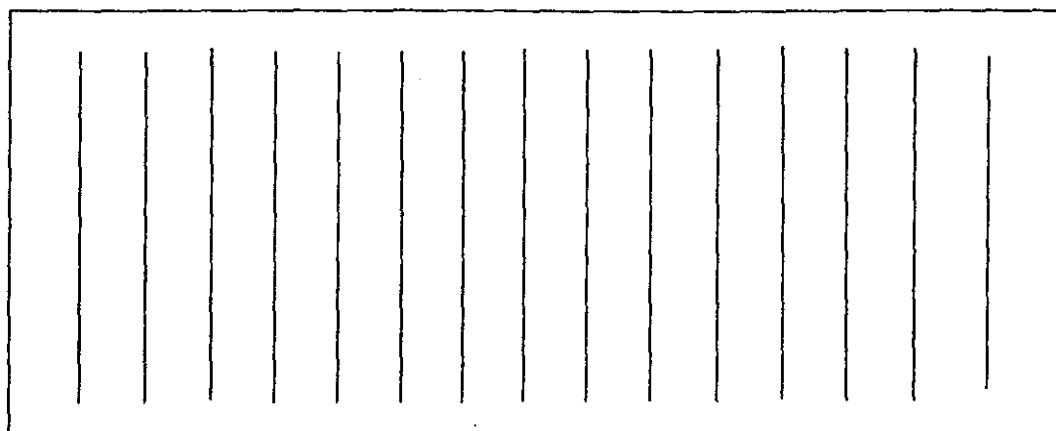
$$\text{Tỷ lệ bệnh} = \frac{A}{B} \times 100$$

Trong đó: A – Số cây bị bệnh

B – Tổng số cây điều tra



Hình A: Phương pháp điều tra lấy mẫu theo 5 điểm



Hình B: Phương pháp điều tra lấy mẫu 5 điểm theo hàng cách hàng

b. Phương pháp lấy mẫu

Mẫu virus các cây thường năm như khoai tây, cà chua, thuốc lá, ớt, cà. v.v ... được thu thập trên ruộng theo phương pháp lấy mẫu 5 điểm chéo góc: mỗi điểm thu 12 mẫu (để đảm bảo có 60 mẫu) cho 1 bản ELISA. Trọng lượng một mẫu tối thiểu là 2 gram. Mẫu virus khảm lá dâu và virus hại cam chanh cũng được thu theo 5 điểm, mỗi điểm 3 cây, mỗi cây thu 4 mẫu theo hướng đông, tây, nam, bắc hoặc thu 3 cây/hàng ở 5 hàng theo theo phương pháp hàng cách hàng. Mỗi mẫu 2 – 4 gram

Ở những vùng trồng trọt phân tán, diện tích nhỏ có thể lấy mẫu đủ số lượng trên tùy theo địa hình và mật độ cây trồng

3.2.2. Phương pháp nhân nuôi virus, phân lập *Phytophthora* sp và vi khuẩn *R. solanacearum* trong phòng thí nghiệm

Nấm *Phytophthora* sp được phân lập từ lá cây bị bệnh (cà chua, khoai tây, thuốc lá, cam chanh, sầu riêng, dứa, ớt, ...) và nuôi cấy trên môi trường:

* Môi trường đậu Hà lan:

Đậu Hà lan:	120g
Agar:	15- 20g
Nước:	1000ml

* Môi trường lúa mạch:

Lúa mạch:	5g
Agrose:	15g
B-Cistosteron:	0,05g
D-Glucose:	20g
Nước cất:	1000ml

* Môi trường PSM (môi trường chọn lọc cho nấm *Phytophthora* sp)

Cà rốt:	20g	Piranicin:	0,4ml hoà trong 6,7ml nước cất vô trùng
Khoai tây:	20g		
Agar:	15g	Rifampicin:	0,05g hoà trong 6,7ml Methanol
Nước cất:	1000ml	Hymexazol:	0,05g hoà trong 6,7ml nước cất vô trùng

* Môi trường bột ngô:

Bột ngô:	25 – 30g
Agar:	18g
Nước cất:	1000ml

Mẫu vi khuẩn *R. solanacearum* được phân lập từ cây cà chua, khoai tây, lạc, ớt, cà, thuốc lá.. bị héo xanh và nuôi cấy trên môi trường.

* Môi trường SPA (Sucrose pepton agar)

Saccarose:	20g	K ₂ HPO ₄ .3 H ₂ O:	0,5g; Chuẩn pH: 7,2 – 7,4
Pepton:	5g	MgSO ₄ .7 H ₂ O:	0,25g
Agar:	15g	Nước cất:	1000ml

* Môi trường King'sB:

Pepton:	15g	K ₂ HPO ₄ .3	1,5g; Chuẩn pH: 7,0 – 7,2
Glycerin:	10ml	H ₂ O:	1,5g
Nước cất:	1000ml	MgSO ₄ .7 H ₂ O:	

* Môi trường TZC (Triphenyl tetrazolium chloride)

Pepton:	5g	Casein hydrolysate:	1g pH: 7,0 – 7,2
Glucose:	5g	TZC:	50mg
Nước cất:	1000ml	Agar:	17g

* Môi trường PDA (Potato Dextrose agar)

Khoai tây:	250g	Agar:	20g
Glucose:	20g	Nước cất	1000ml

Sau khi các mẫu virus, vi khuẩn, nấm đã được thu thập, phân lập và nuôi cấy. Lá cây bị nhiễm virus được bảo quản trong tủ lạnh – 20°C, hoặc bảo quản khô trong lọ chứa Silicagel. Một phần các mẫu này được nghiền trong dung dịch đệm phosphate 0,01M, pH 7.0 và lây bệnh nhân tạo cho cây chỉ thị để tạo vật liệu khởi đầu cho các thí nghiệm làm tinh khiết virus sau này. Các cây chỉ thị được sử dụng gồm:

Virus PVX, PVY lây trên cây *Nicotiana tabacum* var. Xanthi. Virus ToMV lây trên cây *Nicotiana glutinosa*. Virus CTV được ghép trên gốc ghép các cây của giống: Bưởi chua (*Citrus maxima* Osbeck), bưởi Phúc Trạch (*C. grandis* L), Cam đường canh (*C. reticulata*), Cam chua HD (*C. sinen* – hybrid HD), cam sành (*C. nobilis* Lour), cam xā đoài (*C. sinensis* Osbeck), Quýt chum (*C. reticulata* Blanco), cháp (*C. granhy* hybrid), chanh tàu (*C. limon*), chanh sần (*C. jambhiri*)

Virus dầu MuMV được lây bệnh trở lại trên cây dầu trong nhà cách ly. Sau khi có triệu chứng bệnh điển hình, chúng tôi thu mẫu và làm tinh khiết virus.

Mẫu nấm và vi khuẩn héo rũ sau khi đã được phân lập được bảo quản trong tủ lạnh 4°C để làm vật liệu thực hiện các thí nghiệm tiếp sau.

3.2.3. Phương pháp gây miễn dịch cho động vật và tạo kháng huyết thanh

Sau khi thu thập mẫu và lấy bệnh nhân tạo vật liệu có nồng độ virus cao, môi trường chứa mật độ nấm, vi khuẩn cao, các virus, vi khuẩn, nấm đều được làm tinh khiết qua một hệ thống làm sạch loại bỏ cặn thô và các vật chất có cùng trọng lượng phân tử với virus, vi khuẩn, nấm trong dịch. Dịch sạch thu được được gây miễn dịch cho thỏ thông qua nhiều lần tiêm: vào cơ bắp, dưới da, vào xoang bụng hay qua tĩnh mạch tai thỏ. Khi tiêm vào cơ bắp thường sử dụng Adjuvant với lượng 50% để chống gây sốc cho động vật thí nghiệm. Sau 4 tuần tiêm, chúng tôi lần lượt thử máu qua phương pháp ELISA cho đến lúc phản ứng xảy ra ở mức cao – lúc đó sẽ quyết định lấy máu của động vật thí nghiệm để lọc lấy kháng huyết thanh. Kháng huyết thanh được trộn với Glycerin 50% và thêm NaN_3 để bảo quản trong lạnh và trong - 20°C rồi pha chế Kit ELISA tùy theo từng virus, nấm, khuẩn

3.2.4. Phương pháp sản xuất Kit ELISA

Từ kháng huyết thanh đã được sản xuất, chúng tôi đã thực hiện việc sản xuất Kit ELISA để sử dụng theo phương pháp trực tiếp (DAS – ELISA) hay phương pháp gián tiếp (ELISA – Indirect):

- Phương pháp kiểm tra ELISA trực tiếp (DAS – ELISA): để có bộ Kit sử dụng trực tiếp từ kháng huyết thanh, chúng tôi tách IgG (Immuno gamaglobulin) và pha chế các dung dịch đệm gồm:

+ Dung dịch đệm chiết PBS-T + 2%PVP

+ Dung dịch đệm liên kết PBS-T + 2%PVP + 0,2% Ovabumin

+ Dung dịch đệm Substrate 0,25- 0,50mgNPP

- Phương pháp kiểm tra ELISA gián tiếp (ELISA – Indirect): phương pháp này không cần tách IgG, sử dụng trực tiếp kháng huyết thanh pha loãng kết hợp việc sử dụng kháng thể của kháng thể IgG thỏ được lấy từ một động vật khác (chuột bạch).

Bộ Kit sử dụng cho DAS – ELISA và ELISA – Indirect được sản xuất với số lượng mẫu thử 200 và 500 mẫu. Phục vụ cho các phòng nghiên cứu khoa học, các

Trung tâm nghiên cứu sản xuất cây sạch bệnh, các hệ thống giống cây sạch bệnh và phục vụ công tác giảng dạy.

Sau khi đã hoàn thành việc chẩn bị đủ khối lượng virus, vi khuẩn, nấm trên chúng tôi đã thực hiện tách chiết các virus, vi khuẩn và nấm bằng phương pháp ly tâm phân đoạn theo quy trình làm tinh khiết của các tác giả.

Virus, vi khuẩn và nấm thu được đã được gây miễn dịch cho động vật thử nghiệm – mỗi đợt từ 2- 3 con cho một loại virus, vi khuẩn, nấm. Kháng nguyên được tiêm qua tĩnh mạch tai hoặc tiêm cơ bắp hoà thêm 50% Adjuvant.

IV. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU CỦA ĐỀ TÀI

4.1. Sản xuất kháng huyết thanh virus Y (PVY) và Kit ELISA PVY

4.1.1. Các phương pháp chẩn đoán virus PVY

a. Chẩn đoán virus Y bằng triệu chứng

Trên cây khoai tây, PVY gây ra nhiều loại hình triệu chứng như vết đốm dứt quãng, vạch sọc đồng thời gây ra các vết chết hoại dưới gân hay lá nhân có vạch sọc (Beemste và Rozndaal, 1972). Salaman (1932) lại chia các triệu chứng của PVY trên khoai tây thành những nhóm khác nhau tùy theo giống khoai và chủng virus:

- Nhóm không biểu hiện rõ triệu chứng
- Nhóm chỉ gây chết ở mô cây
- Nhóm khảm nhân lá
- Nhóm khảm chết gân
- Nhóm khảm hay nhân lá kèm theo gân lá chết

Nhìn chung triệu chứng do PVY gây ra là các loại hình: đốm chết hoại, khảm đốm, chết hoại, biến vàng lá, lá nhân dễ gãy, lá nhân có nhiều vết sọc, vết đốm trên thân, và gây lùn cây.

Trên cà chua, hầu hết các chủng PVY đều gây ra các vết chết đốm, triệu chứng chết hoại gân rất hiếm trừ khi PVY cùng lúc gây bệnh với các virus khác.

Trên cây thuốc lá, PVY đặc biệt là chủng PVYn gây chết gân rất mạnh; trên lá trưởng thành sớm thường bị chết mảng màu nâu đen và cuối cùng thấy nhiều vết chết hoại trên lá làm cho các ~~lá~~ khác đều bị ảnh hưởng.

Do bệnh virus là một bệnh có triệu chứng biến động nên việc chẩn đoán bằng cách xác định triệu chứng rất khó khăn tùy thuộc vào sự thay đổi các dòng virus khác nhau, liên quan tới tuổi cây và tình trạng lây nhiễm, phụ thuộc giống và điều kiện môi trường.

b. Chẩn đoán PVY bằng cây chỉ thị

Đối với bệnh hại thực vật nói chung, cây chỉ thị là loại cây mẫn cảm hơn so với các cây ký chủ khác. Chỉ trong một thời gian ngắn sau khi được lây bệnh, cây đã

thể hiện triệu chứng rất rõ nét hoặc là những triệu chứng rất đặc trưng với từng nguyên nhân gây bệnh.

Trên cây rau muối (*Chenopodium amaranticolor*) PVY gây triệu chứng vết vàng sau có viền đỏ, bên trong vết có màu trắng bạc hay khô vàng.

Trên cây *Capsicum frutescens* PVY gây hiện tượng những vết đốm sáng nhỏ nhưng không gây héo lá. Trên cây khoai tây đại lai *Solanum demissum* hybride A6 cho đốm chết cục bộ.

Trên cây *Nicotiana tabacum* var Xan thi, PVY gây ra triệu chứng gân lá sáng.

c. Chẩn đoán PVY bằng kính hiển vi điện tử

Chúng tôi sử dụng phương pháp soi trực tiếp DIP sau khi làm sạch virus

d. Phương pháp huyết thanh trong chẩn đoán PVY

PVY là một kháng nguyên gây tính miễn dịch trung bình, vì vậy, PVY có thể được phát hiện tồn tại trong cây bằng kỹ thuật huyết thanh như phương pháp Latex, và ELISA.

Phản ứng ELISA khá nhạy, có thể phát hiện được virus ở nồng độ tương đối thấp. Tuy nhiên, do nồng độ virus trong cây ký chủ và cây chỉ thị không cao nên khả năng gây miễn dịch không mạnh. Trong nhiều trường hợp các kháng huyết thanh do các hãng trên thế giới sản xuất như hãng Agdia, Biorad, Sanofi,... sử dụng cho phương pháp ELISA - Direct và Indirect vẫn chỉ có phản ứng ở mức trung bình và khá cao. Việc tạo ra kháng huyết thanh và kit ELISA có ngưỡng phản ứng cao đòi hỏi phải đầu tư kỹ thuật và chuẩn bị vật liệu rất chu đáo để sản xuất loại kháng huyết thanh này.

4.1.2. Sản xuất kháng huyết thanh chẩn đoán virus PVY

a. Vật liệu:

Chúng tôi chuẩn bị cây *N. tabacum* var. Xanthi trong nhà lưới cách ly, sau 8 – 10 ngày sau lây, khi cây có triệu chứng điển hình thu thập mẫu để làm sạch kháng nguyên.

b. Phương pháp làm sạch virus PVY (Theo Van Regenmort, 1983)

Bước 1: nghiền mẫu lá bệnh trong dung dịch đệm, khuấy trong 30 phút ở nhiệt độ 4°C – 6°C , lọc qua vải lọc lấy nước.

Bước 2: Ly tâm ở 10.000 trong 10 phút ở nhiệt độ 5°C , lấy dịch trong. Bổ sung PEG vào dịch vừa li tâm, khuấy trong 2 giờ.

Bước 3: Ly tâm ở 10.000g trong 10 phút ở 4°C , lấy cặn, hoà cặn bằng dung dịch PE, khuấy trong 15 phút.

Bước 4: Ly tâm ở 5000g trong 5 phút ở 4°C , lấy dịch trong và bỏ cặn. Cất giữ dịch virus đã được làm sạch ở nhiệt độ -20°C .

c. Đánh giá kháng huyết thanh sản xuất

Bảng 2: Xác định độ hoà loãng thích hợp của kháng huyết thanh sản xuất

Thời gian ủ	Độ hoà loãng kháng nguyên kháng thể	Giá trị mật độ quang ở 405 nm			
		1/2	1/10	1/20	1/50
1,5 h	1/200	1.330	1.122	1.012	0.967
	1/500	1.290	1.104	0.958	0.853
	1/1000	1.088	1.055	0.909	0.775
3h	1/200	1.277	1.174	1.048	0.931
	1/500	1.216	1.144	1.012	0.858
	1/1000	1.194	1.110	0.965	0.814

Như vậy, các độ hoà loãng của kháng huyết thanh đều có thể nhận biết được virus PVY trong cây nhiễm bệnh. Nhưng mức độ nhận biết giảm dần theo độ giảm của dịch kháng thể và dịch kháng nguyên.

Giá trị mật độ quang tương đối cao ở độ hoà loãng kháng huyết thanh 1/200 tương ứng với khả năng nhận biết PVY tốt nhất. Tuy nhiên nếu sử dụng độ hoà loãng này để chẩn đoán thì tốn rất nhiều kháng huyết thanh. Hai ngưỡng pha loãng 1/500 và 1/1000 cũng có khả năng nhận biết PVY khá tốt và lượng huyết thanh cần dùng ít

hơn. Do đó có thể dụng 2 ngưỡng này để chẩn đoán PVY. Ngưỡng pha loãng kháng huyết thanh thích hợp nhất là 1/500 (bảng 2).

Thời gian ủ không ảnh hưởng nhiều tới hiệu quả của kháng huyết thanh nhưng do đặc điểm của virus Y là tính kháng nguyên không cao như của các virus khác, kết hợp với việc sản xuất loại kháng huyết thanh này ở Việt Nam trong điều kiện trang thiết bị chưa đủ tiêu chuẩn của một phòng sản xuất kháng huyết thanh loại trung bình ở nước ngoài. Vì vậy khi gặp một virus khó như PVY, ngưỡng pha loãng đạt được như trên chỉ mới ở mức trung bình. Xem xét phản ứng kit PVY sản xuất với kit PVY hãng Agdia (Mỹ) thì mức độ phản ứng của kit ELISA do ta sản xuất chỉ bằng hơn 50% hay 60% của Agdia. Nhưng tính đặc hiệu thì vẫn cao ngang nhau ở mức 100% và mức pha loãng của Agdia là 1/200 còn của ta sản xuất là 1/1000 (loãng hơn) (bảng 3).

Bảng 3: So sánh mức độ phản ứng của kháng huyết thanh tự sản xuất và kháng huyết thanh của hãng Agdia

Mẫu	KHT PVY sản xuất	Kết luận	KHT PVY của Agdia	Kết luận
82	0,157	—	0,160	—
83	0,169	—	0,160	—
84	0,269	+	0,381,6538	+
ĐC +	0,871	+	1,739	+
ĐC +	0,848	+	0,166	+
ĐC —	0,152	—	0,165	—
ĐC —	0,155	—	0,166	—
DD đậm	0,131	—	0,124	—
DD đậm	0,139	—		—

Kết quả này thu được với kháng huyết thanh của hãng Agdia pha loãng ở 1/200 và kháng huyết thanh PVY sản xuất ở ngưỡng pha loãng 1/1000. Vì vậy kháng huyết thanh sản xuất có phản ứng thấp hơn so với kháng huyết thanh của hãng Agdia

(bảng 3). Chúng tôi tiến hành thử nghiệm với dịch khoai tây khoẻ và dịch khoai tây bệnh để kiểm tra tính đặc hiệu của kháng huyết thanh và kit ELISA của virus PVY sản xuất cho thấy virus PVY do chúng tôi sản xuất đạt tính đặc hiệu cao (bảng 4).

Bảng 4: Kiểm tra tính đặc hiệu kit ELISA của virus PVY

STT	Mẫu kiểm tra	Giá trị mật độ quang			Kết luận
		Lần 1	Lần 2	Lần 3	
1	Dịch khoai tây khoẻ	0,177	0,179	0,178	–
2	Dịch khoai tây bệnh	0,804	0,868	0,836	+
3	Nhiễm TRSV	0,184	0,168	0,176	–
4	Nhiễm PVA	0,176	0,158	0,167	–

Điều tra tình hình bệnh trên các cây giống cho nhận xét: trong trường hợp không kiểm tra giống mà thực hiện ngay việc nuôi cấy mô, virus đã nhiễm vào giống Mariella tới 20% số mẫu sau nuôi cấy (bảng 5).

Bảng 5: Thử nghiệm kit ELISA sản xuất để kiểm tra virus trên các cấp giống

Tên giống	Cấp giống	Tỷ lệ nhiễm PVY(%)
Mariella	Nguyên chủng	0
Mariella	Nguyên chủng	0
Marielle	Nuôi cấy mô	20
P3	Siêu nguyên chủng	0
P3	Nguyên chủng	0
P3	Nguyên chủng	0
Diamant	Thế hệ 1	6,82
Diamant	Thế hệ 2	0
Diamant	Nuôi cấy mô	0
PO3	Thế hệ 2	4,17
3810	Thế hệ 2	0
KT3	Thế hệ 2	0

Khảo sát phổ ký chủ của virus Y trên các cây họ cà, họ cúc, họ rau muống, họ rau dền,... cho thấy 17 cây được thu mẫu và lây bệnh nhân tạo đều có triệu chứng của virus PVY. Đặc biệt các cây *N. tabacum* var Xanthi, *N. benthamiana*, *Chenopodium amaranticolor* là những cây thường biểu hiện triệu chứng mạnh, rõ nét có nồng độ virus khá cao trong cây (bảng 6). Việc xác nhận phổ ký chủ là bước quan trọng để đi đến chẩn đoán và phòng trừ bệnh. Tuy nhiên, sự lây lan qua côn trùng của PVY trên đồng ruộng là một vấn đề rất lớn trong phòng trừ .

Bảng 6: Khảo sát phổ ký chủ virus PVY

STT	Họ	Cây lây	Tên khoa học	Triệu chứng
1	Họ Cà <i>Solanaceae</i>	Thuốc lá	<i>Nicotiana benthamiana</i>	Khảm lá, lá ngọn biến dạng
2		Thuốc lá	<i>N. glutinosa</i>	Khảm lá xen lẫn đốm vòng
3		Thuốc lá	<i>N. tabacum</i> var Xanthi	Sáng gân sau chết gân, cây tàn lụi sớm
4		Thuốc lá	<i>N. tabacum</i> cv. White Burley	Chết gân
5		Thuốc lá	<i>Petunia</i>	Khảm nhãn lá
6		Cà chua	<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill	Khảm mảng
7		Ớt	<i>Capsicum annum</i> L.	Xoắn ngọn
8		Cà gai	<i>Datura</i> sp	Khảm vàng
9		Cà độc dược	<i>Datura stramonium</i> L.	Khảm
10		Tầm bóp	<i>Physalis angulata</i>	Khảm
11		Khoai tây	<i>Solanum tuberosum</i>	Khảm
12	Họ Cúc <i>Compositae</i>	Cúc Bách nhật	<i>Gomphnera globosa</i>	Đốm chết hoại có viền đỏ
13	Họ Rau muối <i>Chenopodiaceae</i>	Rau muối	<i>Chenopodium amaranticolor</i>	Đốm chết hoại
14		Rau muối	<i>Chenopodium quinoa</i>	Đốm chết có viền đỏ
15		Rau muối	<i>Chenopodium album</i>	Đốm chết có viền đỏ
16	Họ Rau dền <i>Amaranthaceae</i>	Rau dền xanh	<i>Amarantus viridis</i>	Khảm nhãn

Kết quả thí nghiệm thu được cũng cho thấy khi lây bệnh bằng rệp đào, cây *N. benthamiana*, thời kỳ tiềm dục (ủ bệnh) của virus là ngắn nhất (7 – 8 ngày), sau đó là ở cây thuốc lá *N. tabacum* var Xanthi sau 9 – 10 ngày. Cả 3 loài rệp đều có thể truyền bệnh, nhưng truyền hiệu quả nhất là rệp đào (*Myzus persicae*) rồi đến rệp bông (*Aphis gossypii*) và cuối cùng là rệp xám (*Brevicoryne brassicae*) (bảng 7).

Bảng 7: Khả năng truyền lan PVY bằng rệp đào, rệp bông và rệp xám

Cây lây	Tên khoa học	Rệp đào (<i>M. persicae</i>)		Rệp bông (<i>A. gossypii</i>)		Rệp xám (<i>B. brassicae</i>)	
		% CPB	TKTD (ngày)	% CPB	TKTD (ngày)	% CPB	TKTD (ngày)
Cà chua	<i>L. esculentum</i>	80	14 – 18	40	20 – 21	20	20 – 24
Thuốc lá	<i>N. benthamiana</i>	100	7 – 8	80	8 – 10	60	8 – 12
Thuốc lá	<i>N. tabacum</i> var. Xanthi	80	9 – 10	60	10 – 11	40	10 – 14
Cà gai	<i>Datura</i> sp	60	15 – 17	40	17 – 18	20	18 – 20

Ghi chú: % CPB : Tỷ lệ cây phát bệnh

TKTD : Thời kỳ tiềm dục

Sử dụng Kit ELISA sản xuất của phòng thí nghiệm, chúng tôi đã kiểm tra virus PVY trên khoai tây, cà chua, ớt, cà, thuốc lá trong năm 2002 - 2004 ở một số địa phương thuộc miền Bắc và thu được kết quả: virus đã nhiễm với tỷ lệ rất khác nhau trên các ruộng, có một số trường hợp tỷ lệ bệnh lên cao tới 50 – 100% nhưng vì triệu chứng bị ẩn khi trời ẩm, nóng nên một số cơ sở sản xuất không xác định được bệnh hại (bảng 8).

Bảng 8 : Kết quả kiểm tra tỷ lệ nhiễm bệnh virus PVY bằng kháng huyết thanh

Năm	Cây trồng	Địa phương	Tỷ lệ mẫu nhiễm bệnh (%)
2002	Khoai tây	Hung Yên	22.58
		Hà Nội	100
		Hà Tây	33.33
	Cà chua	Hà Nội	0
		Hà Tây	6.25
		Hung Yên	16.66
		Viện nghiên cứu rau quả	50
	Ớt	Viện nghiên cứu rau quả	0
	Cà	Hà Nội	0
	Thuốc lá	Hà Tây	13.33
2003	Khoai tây	Trung tâm cây có củ	100
		Bắc Giang	28
		Hung Yên	6.85
		Bắc Ninh	14.28
2004	Khoai tây	Hà Nội	50
		Hà tây	50
		Hung Yên	70
		Trung tâm cây có củ	50
	Cà chua	Hà Nội	16.13
		Viện nghiên cứu rau quả	20
	Ớt	Viện nghiên cứu rau quả	0

Thảo luận: Các kết quả nghiên cứu sản xuất kháng huyết thanh PVY cho kết luận: Kháng huyết thanh PVY do chúng tôi sản xuất hoàn toàn có thể sử dụng để chẩn đoán bệnh vì nó có tính đặc hiệu cao. Với trang thiết bị mới của phòng thí nghiệm, chúng tôi tin tưởng các quy trình sản xuất hiện đại sẽ được áp dụng và chúng tôi có thể thu được Kit ELISA phản ứng mạnh, chẩn đoán hiệu quả cao hơn hiện nay nhiều lần.

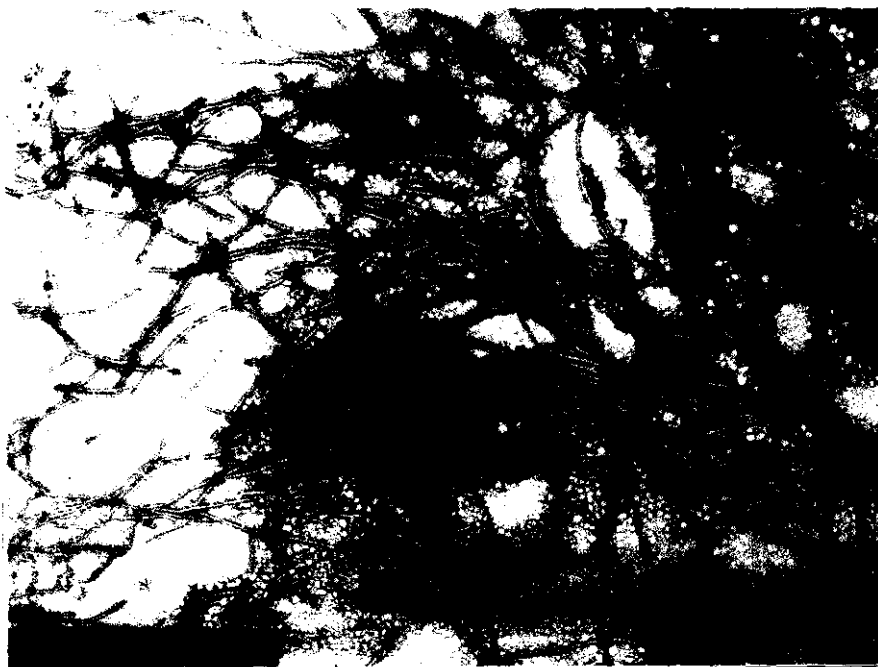
Ảnh 3



Ảnh 4



Ảnh 5



Ảnh 3: Triệu chứng bệnh do virus PVY trên cây khoai tây

Ảnh 4: Triệu chứng bệnh do virus PVY trên cây cà chua

Ảnh 5: Ảnh virus PVY đã được làm sạch trên kính hiển vi điện tử ở độ phóng đại 140.000 lần

4.2. Phương pháp chẩn đoán và sản xuất kháng huyết thanh virus X

4.2.1. Các phương pháp chẩn đoán virus X

a. Phương pháp chẩn đoán virus X bằng triệu chứng

Trên khoai tây, rất nhiều chủng của virus PVX gây ra triệu chứng vàng gân lá, khảm lá, lá loang lỗ, lá ngọn khảm mạnh, cây còi cọc chỗ xanh đậm chỗ xanh nhạt, một vài chỗ biến vàng xanh xen kẽ, bệnh còn gây hiện tượng nhăn lá hoặc chết ngọn có khi dẫn đến cây bị chết. Các triệu chứng thường phát triển ở 16-22 °C. Khi nhiệt độ cao bệnh thường ở dạng ẩn. Khi phối hợp với virus A, Y hiện tượng xoắn lá, lá nhăn nhoe cùng với đốm chết phát triển mạnh, cây khoai tây còi cọc hầu như không có củ. Trên cà chua, PVX gây triệu chứng đốm sáng, khảm lá, đôi khi có đốm chết hoại hoặc chết hoại hình nhẫn. Khi PVX kết hợp với TMV gây đốm chết sọc, gọi là bệnh “tomato double virus streak”. ở cây thuốc lá, PVX gây nên triệu chứng đốm chết hoại hình nhẫn.

Trên cây ớt, PVX gây nên hiện tượng đốm sáng, chết hoại trên lá và thân; khi kết hợp với PVY gây hiện tượng vàng lá hệ thống và biến dạng cây.

b. Phương pháp chẩn đoán PVX bằng cây chỉ thị

PVX có các cây chỉ thị trong họ cà, họ cúc, họ rau muống và 30 họ khác:

Cà dại (*Datura stramonium*) rất dễ bị nhiễm. Hầu hết các chủng đều gây triệu chứng đốm hình nhẫn mà sau hình thành đốm khảm

Thuốc lá (*Nicotiana tabacum*) và các loài khác của thuốc lá, nhiều chủng gây triệu chứng đốm hình nhẫn, đặc biệt là trên giống *N. tabacum* var. xanthi, những chủng khác gây vết đốm lấm chấm như trên *N. benthamiana*. Một vài chủng không gây triệu chứng ở nhiệt độ cao trong nhà kính vào mùa hè

Giống thuốc lá (*Nicotiana tabacum*) và các loài *Nicotiana* thường dùng nhân virus

Cây cúc bạch nhật (*Gomphrena globosa*) là cây chỉ thị xác định bệnh. Khi cây có 8-10 lá trên thân chính là thích hợp nhất để PVX gây nhiễm bộ phận, vết chết hoại có viền đỏ hồng sau 3 – 4 ngày.

Cây khoai tây (*Solanum tuberosum*) giống Arran Crest, Epicure, King Edward: virus X gây nhiễm hệ thống, chết hoại nghiêm trọng dẫn đến chết cả cây.

c. Phương pháp chẩn đoán PVX bằng kính hiển vi điện tử

Chúng tôi sử dụng phương pháp soi trực tiếp DIP sau khi làm sạch virus

d. Phương pháp huyết thanh trong chẩn đoán PVX

PVX là một kháng nguyên gây tính miễn dịch cao, vì vậy, PVX có thể được phát hiện tồn tại trong cây bằng bất kỳ một kỹ thuật huyết thanh nào như: khuếch tán gel miễn dịch, phương pháp Latex, ELISA.

ELISA là một kỹ thuật rất hữu ích để chuẩn đoán virus thực vật cũng như các tác nhân gây bệnh khác. ELISA có thể phát hiện được virus ở nồng độ rất thấp từ 1 – 10 mg/ml.

4.2.2. Sản xuất kháng huyết thanh virus X.

a. Phương pháp tinh sạch virus X

- Sau khi lây bệnh trên cây thuốc lá *Nicotiana benthamiana* hay *N. tabacum* var Xanthi, khi cây xuất hiện triệu chứng điển hình thì thu vật liệu và chuẩn bị sản xuất kháng huyết thanh.

- Kháng nguyên được làm sạch theo phương pháp của Walkeryet, 1972.

Bước 1: nghiền mẫu trong dung dịch đệm Borate 0,5M, pH 7,5, lọc bỏ cặn thô.

Bước 2: cho 8,5% Butanol, khuấy trong lạnh 4°C, trong thời gian 45 phút rồi li tâm ở 5000g/ trong 20 -30 phút, lấy dung dịch trên tựa bỏ kết tủa.

Bước 3: thêm vào dung dịch 1% PEG và 0,1% NaCl 0,2M. Khuấy đều và để trong lạnh 4°C qua 1 đêm.

Bước 4: cho Triston X100 1%

Bước 5: li tâm ở 5500g trong 20 phút và thu dịch trên tựa, loại bỏ cặn.

Bước 6: cho thêm 4% PEG và 0,1% NaCl 0,2M

Bước 7: tâm 7800g trong 30 phút bỏ dịch trên tựa hồi cặn.

Bước 8: hoà cặn trong 20ml đệm phosphate 0,1M, pH 7.4.

- Sau khi làm sạch kháng nguyên, kháng nguyên được gây miễn dịch cho động vật thí nghiệm: dịch PVX đã làm sạch hoà với Freund's Adjuvant incomplet và tiêm vào cơ bắp.

Sau 4 tuần gây miễn dịch kháng huyết thanh bắt đầu được thử để kiểm tra khi thấy có phản ứng ở mức cao, tiến hành lấy máu thử.

- Thử ELISA để xác định độ hoà loãng thích hợp của kháng huyết thanh và của dịch cây bệnh với kháng huyết PVX sản xuất.

b. Kết quả

Với tất cả các độ hoà loãng của kháng huyết thanh sản xuất (1/200, 1/500, 1/1000, 1/1500, 1/2000, 1/4000 đều có thể nhận biết được PVX trong mẫu bệnh (bảng 9). Nhưng với 5 giá trị đầu của độ hoà loãng kháng huyết thanh, phản ứng xảy ra với dịch cây hoà loãng tới 1/160 vẫn rất mạnh. Vì vậy không cần thiết sử dụng các mức này và độ hoà loãng ở 1/4000 là thích hợp cho việc sử dụng kháng huyết thanh PVX trong chẩn đoán bệnh hại.

Bảng 9: Độ hoà loãng của kháng huyết thanh PVX sản xuất

Kháng nguyên Kháng thể	Giá trị mật độ quang ở 405nm				
	1/20	1/40	1/80	1/160	Đ/c khoẻ 1/20
1/200	1.772	1.870	1.849	1.812	0.927
1/500	1.758	1.759	1.784	1.805	0.732
1/1000	1.573	1.626	1.620	1.606	0.462
1/1500	1.448	1.570	1.549	1.538	0.367
1/2000	1.204	1.302	1.323	1.291	0.229
1/4000	0.918	0.973	0.992	0.912	0.241

Khi so sánh phản ứng giữa kháng huyết thanh PVX tự sản xuất và kháng huyết thanh PVX nhập từ nước ngoài (hãng Agdia, Mỹ), chúng tôi nhận thấy kết quả tương tự nhau mặc dù kháng huyết thanh tự sản xuất có mức phản ứng cao hơn của Agdia (thí nghiệm này làm kết hợp với việc kiểm tra virus phục vụ sản xuất của chương trình khoai tây Việt- Đức (bảng 10).

Bảng 10: Mức độ phản ứng của kháng huyết thanh sản xuất và kháng huyết thanh nhập từ Agdia (Mỹ)

Mẫu số		Mẫu cây kiểm tra	PVX sản xuất	Kết luận	PVX của Agdia	Kết luận
Bảng 1	53	Khoai tây khoẻ	0.139	-	0.189	-
	54	Khoai tây khoẻ	0.135	-	0.180	-
	55	Khoai tây khoẻ	0.147	-	0.162	-
	56	Thuốc lá bệnh	1.836	+	1.778	+
	57	Thuốc lá không triệu chứng	0.141	-	0.161	-
	58	Thuốc lá bệnh	1.584	+	1.491	+
Bảng 2	84	Củ giống khoai tây	1.794	+	1.671	+
	85	Củ giống khoai tây	0.133	-	0.135	-
		ĐC dương	2.226	+	2.106	+
		ĐC âm	0.145	-	0.147	-
		DD đệm	0.108	-	0.100	-

Qua kiểm tra bằng ELISA trên các củ giống thu từ các nguồn sản xuất giống, các phẩm cấp khác nhau, chúng tôi nhận thấy : 2 nhóm giống là Diamant thế hệ 2 và KT3 biểu hiện mức độ nhiễm PVX ở mức tương ứng với 4,88% và 6,52%, còn các nguồn khác đều sạch bệnh (bảng 11).

Bảng 11: Tỷ lệ nhiễm PVX trên củ giống khoai tây ở các nguồn giống khác nhau

Tên giống	Cây giống	Tỷ lệ nhiễm PVX (%)
Mariella	Nguyên chủng	0
Mariella	Nguyên chủng	0
Marielle	Nuôi cấy mô	0
P3	Siêu nguyên chủng	0
P3	Nguyên chủng	0
P3	Nguyên chủng	0
Diamant	Thế hệ 1	0
Diamant	Thế hệ 2	4,88
Diamant	Nuôi cấy mô	0
PO3	Thế hệ 2	0
3810	Thế hệ 2	0
KT3	Thế hệ 2	6,52

Điều đó chứng tỏ các giống được trồng càng lâu trên đồng ruộng càng có khả năng nhiễm bệnh cao hơn và dễ đi đến thoái hoá như giống Diamant thế hệ 2 và KT3. Kết quả sử dụng kháng huyết thanh PVX tự sản xuất để chẩn đoán bệnh trên khoai tây, cà chua, cà, ớt (bảng 12) càng cho thấy rõ: các vùng trồng khoai tây truyền thống, trồng cà chua lâu năm không thực hiện thay đổi nguồn giống luôn bị bệnh nặng. Trái lại, các vùng luôn tiếp thu kỹ thuật mới thường xuyên kiểm tra và chọn lọc, điển hình là khu vực Hà Nội, bệnh đã giảm rất rõ rệt, nhiều điểm điều tra đều không thấy bệnh. Điều đáng quan tâm là tại một số cơ sở nghiên cứu khoa học của nhà nước, tỷ lệ cây nhiễm bệnh rất cao, chứng tỏ việc khảo nghiệm giống đã bỏ qua bước kiểm tra giống sạch. Nguồn bệnh tích lũy trên các cây khảo nghiệm một số địa phương ở Hưng yên, Hà Tây cũng có tỷ lệ cây nhiễm bệnh rất cao nhưng không phá bỏ. Đó là những nguồn bệnh dễ lây lan và gây thiệt hại lớn trong sản xuất.

Bảng 12: Kết quả kiểm tra tỷ lệ nhiễm PVX trên cây trồng ở một số địa phương bằng kháng huyết thanh

Năm	Cây trồng	Địa phương	Tỷ lệ mẫu nhiễm PVX (%)
2002	Khoai tây	Viện khoa học kỹ thuật nông nghiệp	12.5
		Hung Yên	22.22
		Hà Tây	11.11
		Hà Nội	0
	Cà chua	Viện Nghiên cứu rau quả	40
		Hà Nội	7.69
	Cà	Hà Nội	0
	Ớt	Hà Nội	0
	Thuốc lá	Hà Tây	0
2003	Khoai tây	Trung tâm cây có củ	20
		Bắc Giang	24
		Hà Nội	0
		Hung Yên	9.59
		Bắc Ninh	14.28
2004	Khoai tây	Hà Nội	0
		Hà Tây	80
		Hung Yên	50
		Trung tâm cây có củ	36.82
	Cà chua	Hà Nội	6.45
		Viện nghiên cứu rau quả	16.66
	Ớt	Viện nghiên cứu rau quả	7.69

Ngoài các kết quả trên, chúng tôi đã khảo sát phổ ký chủ của virus X trên 19 cây thuộc 5 họ và đã xác định được triệu chứng bệnh ngoài tự nhiên và trong phòng thí nghiệm lây bệnh nhân tạo (bảng 13). Điều này có ý nghĩa quan trọng trong việc phòng chống virus X trên đồng ruộng.

Bảng 13: Khảo sát phổ ký chủ virus X (PVX)

STT	Họ	Cây lấy	Tên khoa học	Triệu chứng
1	Họ Cà <i>Solanaceae</i>	Thuốc lá	<i>Nicotiana benthamiana</i>	Khảm mảng, biến dạng lá
2		Thuốc lá	<i>N. glutinosa</i>	Khảm lá xen lẫn đốm vòng
3		Thuốc lá	<i>N. tabacum</i> var Xanthi	Khảm lá, đốm chết trắng
4		Thuốc lá	<i>N. tabacum</i> c.v. White Burley	Đốm chết hoại hình nhẫn
5		Thuốc lá	<i>Petunia</i>	Khảm mảng
6		Cà chua	<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill	Khảm đốm sáng
7		Ớt	<i>Capsicum annuum</i> L.	Đốm hình nhẫn, khảm xanh đậm nhạt
8		Cà pháo	<i>Solanum melongena</i>	Khảm đốm sáng
9		Cà gai	<i>Datura</i> sp	Khảm đốm sáng
10		Cà độc dược	<i>Datura stramonium</i> L.	Khảm đốm sáng, đốm chết hình nhẫn
11	Họ Cúc <i>Compositae</i>	Cúc Bách nhật	<i>Gomphrena globosa</i>	Đốm chết có viền đỏ
12	Họ Rau muối <i>Chenopodiaceae</i>	Rau muối	<i>Chenopodium amaranticolor</i>	Đốm chết có viền đỏ
13		Rau muối	<i>Chenopodium quinoa</i>	Đốm chết có viền đỏ
14		Rau muối	<i>Chenopodium album</i>	Đốm chết có viền đỏ
15	Họ Đậu <i>Fabaceae</i>	Đậu xanh	<i>Phaseolus radiatus</i>	Không thấy triệu chứng
16		Đậu đen	<i>Phaseolus mungo</i>	Không thấy triệu chứng
17		Đậu Cove	<i>Phaseolus vulgaris</i> var Narus	Không thấy triệu chứng
18	Họ Rau dền	Rau dền tía	<i>Amarantus tricolor</i>	Không thấy triệu chứng
19	<i>Amaranthaceae</i>	Rau dền xanh	<i>Amarantus viridis</i>	Không thấy triệu chứng

Thảo luận: Kháng huyết thanh PVX do chúng tôi sản xuất hoàn toàn đạt được yêu cầu và có khả năng sử dụng tốt trong nghiên cứu và phục vụ sản xuất cây trồng ở Việt Nam.

4.3. Sản xuất kháng huyết thanh virus ToMV và Kit ELISA ToMV

4.3.1. Các phương pháp chẩn đoán virus ToMV (*Tomato mosaic virus*)

ToMV là một virus riêng khác TMV ở sự sắp xếp RNA (Harrison, 1971, Ohmo, 1984)

a. Phương pháp quan sát bằng triệu chứng

Triệu chứng của virus ToMV thường biểu hiện ở dạng vàng lá, tạo đốm lá hay đốm quả. Có chủng gây ra hiện tượng biến dạng, méo mó. Cây ký chủ chính là cà chua

b. Phương pháp sử dụng cây chỉ thị

Cây chỉ thị là phương pháp rất dễ dàng để tìm sự hiện diện của virus ToMV. Đặc biệt là cây thuốc lá *N. glutinosa*, cây ớt *Capssicum annum*, cây thuốc lá *N. tabacum*. Các cây này đều cho vết chết cục bộ rất nhanh và rõ nét (bảng 14).

Bảng 14: Cây chỉ thị của virus ToMV

Họ	Tên Việt Nam	Tên khoa học	Triệu chứng
<i>Solanaceae</i>	Thuốc lá	<i>Nicotiana benthamiana</i>	Đổ chết hoại cục bộ trên lá
		<i>N. tabacum</i> cv. Samsun	Cây nhiễm hệ thống, lá khảm
		<i>N. tabacum</i> cv. Xanthi-nc	Đốm chết hoại cục bộ, hình tròn, viền nâu đỏ
		<i>N. tabacum</i> cv. White Burley	Vết chết hoại
		<i>N. tabacum</i>	Vết chết hoại cục bộ
		<i>N. glutinosa</i>	Vết chết hoại
	Ớt	<i>Capsicum annum</i>	Vết chết xám to
	Cà độc dược	<i>Datura stramonium</i>	Vết chết hoại cục bộ
<i>Chenopodiaceae</i>	Rau muống	<i>C. amaranticolor</i>	Vết chết hoại cục bộ, viền màu đỏ
		<i>C. quinoa</i>	Vết chết hoại cục bộ

c. Phương pháp hiển vi điện tử

Là một phương pháp rất tốt để có thể thấy virus ToMV trực tiếp vì virus ToMV có kích thước lớn tới 300 x 15 nm, hình gậy và có thể làm tinh khiết đơn giản hơn các virus khác. Chúng tôi đã dùng phương pháp soi trực tiếp DIP method để quan sát và chụp ảnh virus.

d. Phương pháp huyết thanh

Virus ToMV thuộc nhóm virus Tabamo, có tính kháng nguyên rất cao vì thế phản ứng kháng huyết thanh thường mạnh và dễ dàng làm phản ứng ELISA.

4.3.2. Sản xuất kháng huyết thanh ToMV

a. Vật liệu nghiên cứu

Mẫu lá cà chua, các cây họ cà có triệu chứng nhiễm virus ToMV điển hình và hạt cà chua, cà pháo v.v...

Cây chỉ thị dùng để nhận nguồn virus là cây *Nicotiana tabacum* cv. Samsun

Đất được khử trùng hấp sấy 1,5 atm

Các hoá chất dùng để lấy bệnh nhân tạo, bảo quản mẫu khô bằng silicagel

b. Phương pháp nghiên cứu

* Thu mẫu:

Chọn những mẫu lá bị nhiễm virus ToMV có triệu chứng điển hình đem bảo quản lạnh, hoặc bảo quản khô bằng Silicagel để giữ nguồn.

* Lấy bệnh nhân tạo:

Cây thí nghiệm được để tối 2 ngày trước khi lấy.

Lá bệnh đã được xác định bằng phương pháp ELISA được nghiền bằng chày và cối sứ sạch hoặc bằng túi nghiền nylon. Thêm vào đó dung dịch đệm phosphate 0,01M pH: 8 theo tỷ lệ 2 - 4 ml đệm chiết cho 1 g lá. Dùng pipét nhỏ 1 - 2 giọt dịch lên lá cần lấy (lá được phủ bằng bột Carborandum 600 Mesh). Dùng ngón trỏ đã đi găng sát nhẹ lên lá theo chiều từ cuống tới chóp lá. Sau 30

phút, rửa sạch bằng cách dùng bình tia phun nước vô trùng lên mặt lá. Theo dõi triệu chứng và tính tỷ lệ.

Các cây chỉ thị được lây bệnh nhân tạo gồm: *N. glutinosa*, *Capsicum annum*, và *N. tabacum* cv. Samsun.

*** Làm sạch virus ToMV**

- Thu cây *N. tabacum* cv. Samsun có triệu chứng điển hình. Bảo quản tủ lạnh qua đêm

- Nghiền trong đệm phosphate 0,05 M pH: 7.4 chứa 0,1 % (v/v) thioglycolic acid (4ml đệm/1g mô lá).

- Lọc cặn thô sơ bộ qua vải lọc, thêm n-Butanol 9,3% dung dịch nghiền mẫu

- Ly tâm vòng thấp để loại Chlorophyl và cặn thô.

- Dùng 4% PEG 6.000 để kết lắng virus trong ly tâm vòng cao 10.000 g

- Rồi lặp lại 2 lần. Ly tâm ở 10.000 g (ngoài PEG có thêm 4% NaCl).

- Lần cuối thu dịch trong và bảo quản trong lạnh.

*** Phương pháp gây miễn dịch trên thỏ để tạo kháng huyết thanh:** Theo phương pháp của Viện nghiên cứu bệnh hạt giống Đan Mạch.

Tiêm 2 đợt ở dưới da liều lượng:

- 0,5 ml virus ToMV đã làm sạch

- 0,5 ml Freund's complete adjuvant

- Lấy máu 4 đợt so sánh với huyết thanh thường (không có kháng thể).

Các lần lấy máu—đều phải kiểm tra nồng độ kháng thể trong máu khi nồng độ kháng thể đạt yêu cầu, tiến hành thu toàn bộ máu.

c. Kết quả

Qua bảng 15, chúng tôi thấy kháng huyết thanh tạo ra có tính đặc hiệu rất cao với tỷ lệ độ hoà loãng của kháng huyết thanh 1/ 2000 và độ hoà loãng của kháng nguyên là 1/100. Kết quả cho trị số ELISA cao hơn hẳn so với đối chứng. Điều này chứng tỏ kháng huyết thanh sản xuất được có mật độ kháng thể rất cao và đảm bảo chất lượng cao.

Bảng 15: Kết quả kiểm tra tính đặc hiệu của kháng huyết thanh

Đợt lấy máu	Độ hoà loãng	Độ hoà loãng kháng nguyên					
		1/20		1/50		1/100	
		Trị số ELISA	Kết quả	Trị số ELISA	Kết quả	Trị số ELISA	Kết quả
Lấy máu lần 1 (Normal serum)	1/250	0.102	-	0.098	-	0.100	-
	1/500	0.101	-	0.101	-	0.097	-
	1/1.000	0.100	-	0.102	-	0.103	-
	1/ 2.000	0.105	-	0.099	-	0.101	-
Lấy máu lần 2	1/250	0.456	+	0.433	+	0.487	+
	1/500	0.377	+	0.412	+	0.558	+
	1/1.000	0.341	+	0.341	+	0.422	+
	1/ 2.000	0.324	+	0.332	+	0.399	+
Lấy máu lần 3	1/250	0.553	+	0.572	+	0.805	+
	1/500	0.550	+	0.517	+	0.605	+
	1/1.000	0.446	+	0.460	+	0.598	+
	1/ 2.000	0.421	+	0.412	+	0.545	+
Lấy máu lần 4	1/250	0.721	+	0.652	+	0.767	+
	1/500	0.559	+	0.603	+	0.654	+
	1/1.000	0.550	+	0.534	+	0.610	+
	1/ 2.000	0.606	+	0.461	+	0.650	+

Ghi chú: đôi chứng (+): 0.569

đôi chứng (-): 0.103

Để tìm hiểu chất lượng của kháng huyết thanh này so với kháng huyết thanh của nước ngoài, chúng tôi sử dụng kháng huyết thanh ToMV do viện Nghiên cứu bệnh hạt giống ở Đan Mạch sản xuất để so sánh khả năng phản ứng: Kết quả cho thấy kháng huyết thanh sản xuất phản ứng mạnh hơn cả kháng huyết thanh của Đan Mạch (bảng 16). Nguyên nhân có thể do điều kiện khí hậu nóng ẩm làm khả năng tạo kháng thể ở thỏ tăng cao.

Bảng 16: So sánh huyết thanh ToMV sản xuất và của Đan Mạch

Cây	Triệu chứng	ToMV (Việt Nam)		ToMV (Đan Mạch)	
		OD	Kết luận	OD	Kết luận
Cà chua	Khảm	1.404	+	1.343	+
Cà chua	Khảm	1.312	+	1.223	+
Cà chua	Khảm	1.325	+	1.284	+
Cà chua	Nhiễm ToMV (Đ/c +)	1.306	+	1.427	+
Cà chua	Khoẻ	0.166	-	0.195	-
Thuốc lá	Nhiễm ToMV(đối chứng +)	1.339	+	1.249	+
Thuốc lá	Khoẻ	0.307	-	0.260	-
Dung dịch đậm	Dung dịch đậm	0.247	-	0.224	-

ToMV có ở các dạng triệu chứng khảm vàng (giống Saint pie, Balan, VL2000, HT7, P375), ở dạng khảm xanh vàng lồi lõm với mật độ thấp tạo phản ứng $\pm$ ở giống Saint pie và VL 2000 (bảng 17). Các dạng dương xỉ, xoắn vàng, khảm loang lổ, khảm biến dạng, xoắn vàng ngọn,... đều không do virus ToMV gây nên.

Bảng 17: Kết quả kiểm tra ELISA virus ToMV trên các giống cà chua với các dạng triệu chứng

STT	Giống	Triệu chứng	Kết quả kiểm tra ELISA
1	Saint pie	Khảm vàng	+
2		Dương xỉ	-
3		Xoăn vàng ngọn	-
4		Khảm xanh vàng lồi lõm	±
5	Ba Lan	Khảm vàng	+
6		Dương xỉ	-
7		Khảm loang lổ	-
8	VL 2000	Khảm vàng	+
9		Khảm xanh vàng lồi lõm	±
10	HT 7	Khảm vàng	+
11		Khảm biến dạng	-
12		Lá tím biến vàng	-
13	P375	Khảm vàng	+
14		Xoăn vàng ngọn	-

Sau những nghiên cứu trên, phải nói rằng việc sản xuất kháng huyết thanh virus ToMV là một bước đột phá mới để phát hiện bệnh ở khắp nơi. Chúng tôi đã thu thập được 13 mẫu cây nghi là có bệnh và tất cả đều thể hiện triệu chứng ổn định khi lây nhiễm. Với sự phát hiện 13 ký chủ trên có thể thực hiện phòng bệnh có hiệu quả hơn (bảng 18).

Bảng 18: Phổ ký chủ virus ToMV

Tên Việt Nam	Tên khoa học	Triệu chứng
Cà chua	<i>Lycopersicum esculentum</i>	Khảm vàng
Cà tím	<i>Solanum melongena</i> var. <i>esculentum</i>	Khảm đốm vàng
Cà pháo	<i>S. melongena</i> var <i>depressum</i>	Khảm mảng vàng
Cà bát	<i>S. melongena</i> var <i>esculentum</i>	Khảm mảng
Cà độc dược	<i>Datura stramonium</i>	Khảm nhàn, vàng
Tầm bóp	<i>Physalis floridana</i>	Khảm vàng
Ớt	<i>Capsicum annuum</i>	Khảm vàng loang lổ
Thuốc lá	<i>Nicotiana tabacum</i>	Khảm loang lổ
Rau muối	<i>Chenopodium album</i>	Đốm chết hoại
Đậu cô bơ	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Khảm mảng, lá vàng
Đậu xanh	<i>P. aureus</i>	Khảm
Bí đỏ	<i>Cucurbita pepo</i>	Khảm đốm vàng
Dưa chuột	<i>Cucumis sativus</i>	Khảm vàng loang lổ

Thảo luận: Kit ELISA chẩn đoán bệnh virus ToMV do chúng tôi sản xuất đã có mức phản ứng cao, đáp ứng yêu cầu chẩn đoán để có thể phòng chống bệnh hại đạt kết quả.

4.4. Sản xuất kháng huyết thanh virus CTV và Kit ELISA CTV

4.4.1. Các phương pháp chẩn đoán virus CTV

Bệnh Tristeza trên đồng ruộng thường xuyên xuất hiện thành hai nhóm triệu chứng, hai nhóm này lại thường lẫn với vi khuẩn Greening trên cùng một cây bệnh. Vì vậy, triệu chứng của bệnh Tristeza ở Việt Nam thường có nhiều biến động theo giống và tùy điều kiện thời tiết, tùy tình hình nhiễm bệnh đơn độc hay nhiễm hỗn hợp.

a. Chẩn đoán bằng triệu chứng

Tristeza hay còn gọi là “quick decline” là bệnh tàn lụi cây cam chanh. Triệu chứng là lá cam vàng mất diệp lục, dơ lá dưới ánh mặt trời thấy có hiện tượng khảm xen kẽ các đốm sáng, cây cam tàn lụi dần. Ở nhóm chủng có tính độc cao virus gây ra hiện tượng tạo vết lồi lõm trên thân cây, trên cành, cây tàn lụi nhanh và chết.

b. Chẩn đoán bằng cây chỉ thị

Thường ghép với giống cam ngọt mẫn cảm với bệnh, giống này sẽ cho các cây cam lá nhỏ, sớm tàn lụi và chết. Tuy nhiên thời gian chẩn đoán kéo dài vài tháng.

c. Chẩn đoán bằng hiển vi điện tử

Có thể thấy virus tristeza dạng sợi dài khoảng 2000nm x 12 nm khi ta làm tinh khiết virus và chụp ảnh trên hiển vi điện tử truyền qua có thể quan sát trên lát cắt cực mỏng và tìm thấy các đám virus tập hợp lại thành dạng ô carô trên quang trường của kính hiển vi điện tử truyền qua.

d. Chẩn đoán bằng kháng huyết thanh

Có thể sử dụng kit ELISA để chẩn đoán bệnh khá nhanh chóng.

e. Phương pháp sinh học phân tử:

PCR có thể chẩn đoán nhanh nhóm Clostero virus trong đó có virus CTV.

4.4.2. Sản xuất kháng huyết thanh CTV

a. Địa điểm nghiên cứu

Các địa điểm điều tra thu thập mẫu tại vùng Ba Vì - Hà Nội, Vùng Xuân Mai – Hoà Bình, các tỉnh Hà Giang, Tuyên Quang, Vĩnh Phúc và nhiều vùng Trung Du miền núi phía Bắc, Cần Thơ, các vùng cam phía Nam.

b. Vật liệu nghiên cứu

Các mẫu cây có múi nhiễm bệnh để tinh chiết virus, thử ELISA và các phương pháp chẩn đoán khác được thu thập tại Viện Bảo vệ thực vật và các điểm điều tra.

10 giống cây có múi “sạch bệnh” được mua từ Viện nghiên cứu rau quả để thử nghiệm lây nhiễm nhân tạo qua ghép gồm:

Bưởi chua	-	<i>Citrus maxima</i> Osbeck
Bưởi phúc Trạch	-	<i>Citrus grandis</i> L
Cam đường canh	-	<i>Citrus reticulata</i>
Cam chua HD	-	<i>Citrus sinen</i> hybrid HD
Cam sành	-	<i>Citrus nobilis</i> Lour
Cam xā đoài	-	<i>Citrus sinensis</i> Osbeck
Quýt chùm	-	<i>Citrus reticulata</i> Blanco
Cháp	-	<i>Citrus granhybrid</i>
Chanh Tàu	-	<i>Citrus limon</i>
Chanh sần	-	<i>Citrus jambhiri</i>

Ngoài ra để tiến hành lây nhiễm nhân tạo bằng tiếp xúc cơ học và bằng rệp, chúng tôi đã thu thập và gieo trồng từ hạt 6 giống cây có múi:

Cam sành	-	<i>Citrus nobilis</i> Lour
Quýt chùm	-	<i>Citrus reticulata</i> Blanco
Quýt miền Nam	-	<i>Citrus reticulata</i> Blanco
Cháp	-	<i>Citrus granhybrid</i>
Chanh ta	-	<i>Citrus limonia</i> Osbeck
Quất	-	<i>Fortunella japonica</i> Swingle

- Các loại rệp phục vụ cho việc lây nhiễm nhân tạo bao gồm rệp muội cây có múi (*Toxoptera citricida* + *T. aurantii*)
- Bột cacborandium 600 mesh để gây sát thương cơ giới.
- Hoá chất, dụng cụ và thiết bị tinh chiết CTV, tiêm thỏ, thu thập và bảo quản kháng huyết thanh.
- Kháng thể đơn dòng Đài Loan, hoá chất, dụng cụ và thiết bị thử ELISA.

c. Phương pháp nghiên cứu

Để lây nhiễm nhân tạo, chúng tôi đã chuẩn bị nguồn bệnh và các giống cây sạch bệnh. Sau đó tiến hành lây nhiễm nhân tạo qua ghép và tiếp xúc cơ học.

* Lây nhiễm nhân tạo qua ghép.

Sử dụng phương pháp ghép mắt chữ T, ghép trên thân hoặc cành sát lá bánh tẻ sau đó dùng giấy parafilm quấn quanh mắt ghép. sau 75 ngày mới tiến hành thử ELISA (dựa theo mô tả của Hill (1984) và Kado (1972)).

* Lây bệnh nhân tạo bằng côn trùng môi giới.

Sử dụng 2 loài rệp muội trên cây có múi (*Toxoptera citricida* + *T. aurantii*)

Rệp được thu thập trên cây ký chủ tự nhiên và trên cây bệnh.

Cách lây: xáo trộn quần thể rệp bằng cách thổi hoặc dùng bút lông mềm chạm nhẹ; sau đó cho chúng chích hút lên cây bệnh 24 giờ hoặc chuyển hẳn lên cây lây đối với rệp bắt trên cây bệnh (mỗi cây từ 3 – 5 con). Để rệp chích hút trong 24 giờ trên cây lây và phun thuốc tiêu diệt; sau 2 đến 3 tháng thử mức độ nhiễm bệnh bằng PTA – ELISA.

* Phương pháp làm sạch CTV (theo phương pháp của Bové J. M và Ganier M)

Quy trình làm sạch virus gồm các bước:

- Thu mẫu lá từ cây đã lây bệnh nhân tạo và kiểm tra bằng DAS – ELISA.

Bước 1: Nghiền mẫu trong dung dịch đệm tris HCl 0,1M pH = 8 với lượng 1 mẫu + 2,5 dung dịch đệm rồi lọc.

Bước 2: cho PEG 4 % + NaCl 0,8% vào trong và khuấy trong 30 phút.

Bước 3: ly tâm ở 15000g trong 25 phút, thu kết tủa bỏ dịch trong, hoà kết tủa trong 20ml dung dịch đệm phosphate 0,1M pH = 7,4, ly tâm tiếp ở 4200g trong 10 phút.

Bước 4: Lặp lại bước 2 sau đó ly tâm 15000g trong 25 phút, lấy kết tủa hoà trong 10ml NaCl 0,85%.

Bước 5: Ly tâm ở 4200g trong 10 phút lấy dịch trong và bỏ kết tủa.

*** Gây miễn dịch thử**

Virus được làm sạch được tiêm vào thử cùng chất đệm theo tỷ lệ 1:1 trong thời gian 2 tháng với 4 - 6 lần gây miễn dịch.

d. Thu kháng huyết thanh và bảo quản huyết thanh

- Sau 4 tuần tiêm miễn dịch huyết thanh được lấy thử để kiểm tra ELISA, sau đó tiến hành giết thử để thu toàn bộ máu.

- Ly tâm máu, thu huyết thanh

- Huyết thanh thu được được bảo quản -20°C với chất bảo quản chống vi khuẩn

- Sau khi thu và bảo quản kháng huyết thanh CTV, chúng tôi đã thực hiện thí nghiệm xác định độ hoà loãng của kháng huyết thanh CTV.

e. Kết quả

Kết quả thí nghiệm cho thấy từ 1/5000 trở lại phản ứng được đảm bảo sai khác từ 1,6 đến 2 lần so với đối chứng (cây khỏe) để sử dụng trong các thí nghiệm. Tuy nhiên, độ hoà loãng thích hợp và đảm bảo của kháng huyết thanh là 1/3000 đến 1/1000 việc sử dụng kháng huyết thanh vẫn tiết kiệm mà phản ứng cho kết quả tin cậy (bảng 19).

Bảng 19: Kết quả thử ELISA kháng huyết thanh CTV sản xuất với các độ hoà loãng kháng huyết thanh, độ hoà loãng mẫu và dung dịch đậm

Mẫu	Dung dịch đậm	Độ hoà loãng mẫu	Giá trị mật độ quang			
			Độ hoà loãng kháng huyết thanh			
			1/1000	1/3000	1/5000	1/10.000
Bệnh	PBST-PVP-0,2% BSA	1/50	0.373	0.263	0.239	0.177
		1/100	0.355	0.255	0.210	0.181
		1/200	0.337	0.252	0.205	0.174
	PBST-PVP-0,2% sữa skim	1/50	0.345	0.264	0.230	0.181
		1/100	0.313	0.242	0.206	0.173
		1/200	0.335	0.245	0.204	0.172
	PBST-PVP-0,2 % lòng trắng trứng	1/50	0.380	0.292	0.225	0.201
		1/100	0.354	0.255	0.222	0.186
		1/200	0.334	0.210	0.203	0.178
Khỏe	PBST-PVP-0,2% BSA	1/50	0.175	0.135	0.131	0.122
		1/100	0.185	0.137	0.129	0.122
		1/200	0.184	0.133	0.134	0.122
	PBST-PVP-0,2% sữa skim	1/50	0.162	0.125	0.124	0.128
		1/100	0.167	0.132	0.127	0.12
		1/200	0.168	0.136	0.127	0.121
	PBST-PVP-0,2 % lòng trắng trứng	1/50	0.176	0.147	0.126	0.125
		1/100	0.178	0.138	0.127	0.117
		1/200	0.169	0.133	0.132	0.132

Trong một số trường hợp virus CTV sau khi gây miễn dịch cho động vật thường có phản ứng chéo với một vài loại kháng nguyên. Chúng tôi đã tiến hành kiểm tra tính đặc hiệu của CTV với một số kháng nguyên của các virus BBTv, PRSV, TMV, CMV,... cho thấy các virus này không có phản ứng chéo với CTV mà chỉ phản ứng dao động trên dưới mức của đối chứng khoẻ (cây khoẻ) (bảng 20).

Bảng 20: Đánh giá tính đặc hiệu của kháng huyết thanh CTV sản xuất bằng phản ứng ELISA

Mẫu thử	Giá trị ELISA
Cam bệnh	0.505
Cam bệnh	0.390
Cam bệnh	0.511
Bưởi bệnh	0.359
Bưởi bệnh	0.345
Bưởi bệnh	0.445
Chuối nhiễm BBTv	0.184
Đu đủ nhiễm PRSV	0.265
Thuốc lá nhiễm TMV	0.242
Thuốc lá nhiễm CMV	0.238
Đối chứng – (Cam khoẻ gieo từ hạt)	0.228
Đối chứng – (chất nền)	0.146

Mẫu bệnh sau khi thu hoạch (mẫu tươi) được sử dụng ngay, mẫu bệnh để khô trong Silicagen ở nhiệt độ 4°C sau thu. Mẫu cây khoẻ đối chứng và thời gian ủ chất nền thay đổi đã mang lại kết quả ELISA rất khác nhau (bảng 21).

Bảng 21: Kết quả thử ELISA ở các thời gian ủ chất nền khác nhau

Mẫu	Giá trị mật độ quang sau			
	30 phút	60 phút	120 phút	1 đêm
Mẫu bệnh tươi	0.141	0.185	0.255	0.833
Mẫu bệnh khô	0.228	0.274	0.493	1.316
Cây khỏe	0.117	0.125	0.138	0.235

Qua bảng 21 cho thấy nếu ủ chất nền 1 đêm rồi cho phản ứng tiến hành sẽ có phản ứng rất mạnh (OD đạt tới 1,316); tuy nhiên trong trường hợp này đối chứng cũng rõ nét lên rất nhiều (OD đạt tới 0,235). Vì vậy chúng tôi quan tâm tới thời gian ở 120 phút, mẫu bệnh khô - đối chứng hầu như không thay đổi phản ứng sẽ tránh sự sai lệch của phương pháp khi cây bệnh được thử chỉ nhiễm ở mức nhẹ.

Thảo luận: Kháng huyết thanh CTV (*Citrus tristeza virus*) được sản xuất tại phòng thí nghiệm virus thực vật – Trung tâm Bệnh cây nhiệt đới là một kháng huyết thanh có tính đặc hiệu cao và phản ứng đủ mạnh để xác định các cây cam, chanh bị nhiễm bệnh.

4.5. Sản xuất kháng huyết thanh virus khảm lá dâu MuMV và Kit ELISA MuMV

4.5.1. Các phương pháp chẩn đoán MuMV

Bệnh khảm lá dâu MuMV (*Mullberry mosaic virus*) là một bệnh ít được chú ý nghiên cứu ở Việt Nam. Vì vậy, các thí nghiệm chẩn đoán khảm lá dâu chỉ mới thực hiện ở trường Đại học Nông nghiệp I – Hà Nội.

a. Chẩn đoán bệnh hại bằng triệu chứng

Bệnh khảm lá dâu xuất hiện trên các giống dâu trồng ở Việt Nam thể hiện 2 dạng triệu chứng chủ yếu: dạng khảm đốm, dạng khảm hình nhẫn, đặc biệt lá cây non bị bệnh thể hiện triệu chứng rất rõ rệt.

b. Chẩn đoán bằng cây chỉ thị

Chúng tôi sử dụng cây *Chenopodium quinoa*, cây *N. tabacum* var Xanthi, cây *N. benthamiana* – bệnh cho các vết đốm vàng ở triệu chứng khảm lá hệ thống.

c. Chẩn đoán bệnh bằng phương pháp hiển vi điện tử

Quan sát bằng phương pháp DIP thấy virus có hình sợi mềm, dài 700nm và các dạng caro của nhóm poty và nhóm nepovirus và hiện tượng tạo mảng caro của tập đoàn các virus.

d. Chẩn đoán bằng kháng huyết thanh - ELISA

Phương pháp chẩn đoán bằng kháng huyết thanh – ELISA là phương pháp chẩn đoán nhanh bệnh khảm lá nhưng chưa được áp dụng ở Việt Nam với virus MuMV.

Ngoài ra, bệnh khảm lá dâu còn có thể chẩn đoán bằng phương pháp PCR.

4.5.2. Sản xuất kháng huyết thanh MuMV

a. Vật liệu thí nghiệm

Vật liệu thí nghiệm là các lá dâu có triệu chứng bệnh điển hình. Lấy mẫu lá vào buổi sáng và lấy theo luống, mỗi luống lấy 2 đến 3 cây, mỗi cây lấy

2 – 3 lá. Lá non lấy toàn bộ, lá bánh tẻ lấy ở phần giữa cắt bỏ chóp lá và giáp cuống lá.

Rệp bông *Aphis gossypii* được nuôi trên cây khoai nước.

b. Phương pháp thí nghiệm

* Phương pháp lây bệnh nhân tạo:

- Phương pháp lây bệnh bằng rệp bông (*Aphis gossypii*)

Vật liệu: hom dâu khoẻ được trồng trong điều kiện cách ly, có thời gian sinh trưởng 1 tháng được dùng làm cây lây. Nguồn bệnh (lá dâu bị bệnh có triệu chứng bệnh điển hình) lấy ngoài ruộng sản xuất. Rệp nuôi trên cây khoai nước.

Cách lây: Dùng bút lông chạm nhẹ vào phần bụng của rệp sao cho chúng rút vòi hút khỏi mô khoai nước. Chuyển rệp sang đĩa petri đã lót giấy ẩm, đậy hộp để trong 2 giờ cho rệp đói. Sau khi bỏ đói rệp, chuyển rệp sang lá bệnh (nguồn bệnh) cho rệp chích hút 30 phút, dùng bút lông chuyển rệp sang cây dâu con đã chuẩn bị sẵn, cho rệp chích hút qua đêm, hôm sau dùng thuốc trebon trừ rệp. Mỗi công thức sử dụng 5 cây, mỗi cây thả 10 con rệp.

Để trong điều kiện cách ly, theo dõi triệu chứng hình thành và thời gian tiềm dục của bệnh.

- Phương pháp lây bệnh bằng tiếp xúc cơ học:

Vật liệu: hom dâu sạch bệnh có thời gian sinh trưởng 1 tháng và lá dâu bị bệnh có triệu chứng điển hình lấy ngoài ruộng sản xuất.

Cách lây: dùng bột cacborandium 600 mesh thổi lên lá hom dâu con để tạo vết thương cơ giới. Lá dâu bệnh được rửa sạch, lau khô cuộn tròn thành ống hỏ, một đầu cuộn giấy, đầu kia dùng dao sạch cắt thành những lát mỏng để sát nhẹ lên bề mặt lá trên hom dâu. Sau 30 phút dùng nước rửa sạch bề mặt lá vừa lây. Để cây trong điều kiện cách ly, theo dõi triệu chứng hình thành và thời gian tiềm dục.

Các mẫu cây dâu thu được qua lây bệnh nhân tạo được sử dụng để làm sạch virus. Phương pháp làm sạch (tinh khiết) virus khảm lá dâu được thực hiện theo Tsuchizaki và ctv (1971):

- Thu và nghiền lá trong dung dịch đệm Citrate 0,5M, pH: 7.0, sau đó lọc qua vải thô
- Thêm 20ml carbon tetrachloride cho 100ml dung dịch đã lọc; ly tâm 15 phút ở 5000g, thu nước trong, bỏ cặn. Nếu dung dịch còn xanh thêm 8,5% Butanol khuấy trong một giờ rồi ly tâm tiếp ở 5000g trong 15 phút, thu nước trong bỏ cặn.
- Siêu ly tâm ở 10000g/ trong 90phút, bỏ nước trong thu cặn.
- Cặn được hoà trong dung dịch Citrate 0,01M và được bảo quản để sử dụng.
- Thu hồi và bảo quản kháng huyết thanh: Sau 4 tuần tiêm miễn dịch huyết thanh được lấy thử để kiểm tra ELISA, sau đó tiến hành giết mổ để thu toàn bộ máu :
- Ly tâm máu, thu huyết thanh
- Huyết thanh thu được được bảo quản -20°C với chất bảo quản chống vi khuẩn

c. Kết quả

Chúng tôi đã thử nghiệm xác định ngưỡng pha loãng của kháng huyết thanh. Kết quả được trình bày trên bảng 22.

Kết quả thí nghiệm cho thấy: mặc dù đã hoà loãng kháng nguyên ở mức 1/40 (dịch lá cây dâu bị bệnh) phản ứng vẫn xảy ra mạnh hoặc ở mức trung bình của các mẫu lá dâu chớm bị bệnh có nồng độ virus thấp. Các mẫu dung dịch đệm đều không có phản ứng.

Bảng 22 : Ngưỡng pha loãng của kháng huyết thanh khảm lá dâu

Độ hoà loãng mẫu	Độ hoà loãng huyết thanh	Cây khỏe	Mẫu thử			
			Đốm vàng	Đốm hình nhân	Khảm biến dạng	Đậm
1/20	1/20	0.305	1.894	1.655	1.557	0.114
	1/50	0.265	1.615	1.191	1.206	0.111
	1/100	0.234	1.306	0.867	0.877	0.113
	1/200	0.223	0.870	0.663	0.565	0.111
	1/500	0.215	0.486	0.346	0.328	0.112
	1/1000	0.212	0.372	0.274	0.275	0.109
1/40	1/20	0.3.02	1.600	1.248	1.128	0.113
	1/50	0.267	1.534	1.108	1.021	0.111
	1/100	0.225	1.204	0.848	0.859	0.113
	1/200	0.220	0.925	0.668	0.722	0.115
	1/500	0.214	0.497	0.441	0.473	0.117
	1/1000	0.210	0.443	0.342	0.359	0.122

Để xác định chính xác hơn các phản ứng đặc hiệu của kháng huyết thanh khảm lá dâu, chúng tôi đã tiến hành thử 52 mẫu lá dâu có triệu chứng bệnh nặng, nhẹ và trung bình. Kết quả cho thấy tất cả các mẫu đều phản ứng (+) so với đối chứng (bảng 23).

Mức độ phản ứng của Kit ELISA khảm lá dâu biến động rất lớn từ 1,842 OD đến 0,516OD. Như vậy mẫu có phản ứng ELISA mạnh đã có phản ứng gấp 4 lần so với mẫu có phản ứng ở mức nhẹ. Quan sát triệu chứng và so sánh với mức độ phản ứng chúng tôi có nhận xét : Mẫu lá bánh tẻ có phản ứng mạnh hơn cả so với mẫu lá non và mẫu lá đã có màu xanh thuần thực. Bảng 23 cũng cho thấy mẫu các cây khỏe cũng có giá trị ELISA cao như 0,356 OD. Vấn đề xác định cây dâu hoàn toàn khỏe cần tiếp tục nghiên cứu.

Bảng 23: Kết quả kiểm tra ELISA virus khảm lá dâu bằng huyết thanh sản xuất

STT	Giá trị ELISA	Kết luận	STT	Giá trị ELISA	Kết luận
1	1.842	+	27	0.744	+
2	1.598	+	28	0.860	+
3	1.511	+	29	0.921	+
4	1.592	+	30	0.801	+
5	1.630	+	31	0.986	+
6	1.700	+	32	0.915	+
7	1.768	+	33	0.630	+
8	1.667	+	34	0.694	+
9	1.542	+	35	0.568	+
10	1.434	+	36	0.772	+
11	1.486	+	37	0.872	+
12	1.394	+	38	0.928	+
13	1.698	+	39	0.516	+
14	1.533	+	40	0.555	+
15	1.467	+	41	0.569	+
16	1.306	+	42	0.674	+
17	1.449	+	43	0.889	+
18	1.468	+	44	0.972	+
19	1.665	+	45	0.585	+
20	1.591	+	46	0.575	+
21	1.420	+	47	0.612	+
22	1.503	+	48	0.756	+
23	1.619	+	49	0.999	+
24	1.563	+	50	0.885	+
25	1.770	+	51	0.682	+
26	1.638	+	52	0.674	+
Cây khỏe	0.356	-	Cây khỏe	0.213	-
Cây khỏe	0.263	-	Cây khỏe	0.202	-
Cây khỏe	0.246	-	Cây khỏe	0.204	-

Thảo luận: Sản xuất kháng huyết thanh virus khảm lá dâu làm sạch ruộng dâu để chống virus khảm lá - những virus này đã khiến tằm không ăn lá dâu khảm hoặc dẫn đến một số bệnh giảm sức sống của tằm và giảm sản lượng tơ kén.

4.6. Sản xuất kháng huyết thanh nấm *Phytophthora* sp. và Kit ELISA nấm *Phytophthora* sp

4.6.1. Các phương pháp chẩn đoán bệnh nấm *Phytophthora* sp.

a. Phương pháp xác định triệu chứng

Phương pháp này căn cứ chủ yếu vào các triệu chứng đặc trưng của bệnh đã thể hiện ra bên ngoài trên cây hoặc bộ phận bị bệnh.

* Bệnh mốc sương cà chua

Triệu chứng của bệnh rất đa dạng nó tùy thuộc vào cấp bệnh và điều kiện môi trường. Khi cà chua mới chớm bị bệnh, trên lá lúc đầu chỉ là một điểm nhỏ (2 – 10 mm) và không có giới hạn rõ rệt. Mặt dưới lá chỗ có vết bệnh có lớp trắng xốp như sương muối và xuất hiện rõ nhất khi trời ẩm ướt. Lá bị bệnh sẽ thối nhũn nếu trời tiếp tục ẩm ướt và chết hoại khi trời nắng, khô.

* Bệnh chảy gôm trên cây có múi

Trong số các bệnh hại cây có múi, triệu chứng chảy gôm là loại bệnh hại nghiêm trọng và nguy hiểm nhất. Bệnh do nấm *P. citrophthora* và *P. nicotianae* gây ra. Chúng gây bệnh chảy gôm, thối gốc ở cây họ cam quýt. Đầu tiên rễ bị thối, cây héo vàng. Trên rễ bệnh thường gây các vết thâm đen, Trên thân cành, bệnh gây hiện tượng chảy gôm. Ban đầu phần tiếp giáp với mặt đất xuất hiện vết đốm màu nâu đen thấm nước, sau đó gây nứt thân cành và chảy gôm có thể dẫn đến loét vỏ. Bệnh nặng các vết bệnh có mùi tanh hôi như mùi cá ươn do bị nhiễm các loại vi khuẩn khác, lá cây vàng và rụng nhiều.

* Bệnh thối nõn dứa

Cây dứa có thể nhiễm bệnh từ khi mới trồng đến khi thu hoạch. Bộ phận bị hại gồm: rễ, thân, quả, lá ... nhưng triệu chứng phổ biến nhất là thối nõn.

Rễ ban đầu thường có mầu thâm nước, sau chuyển thành mầu đen, cây phát triển chậm, lá chuyển màu vàng nhạt.

Bệnh phát triển vào thân, gây thối thân và thối nõn, lá chuyển màu vàng nhạt, thối ở gốc lá, dễ rút lá dứa ra khỏi thân cây bị bệnh. Gốc lá bị thối đầu tiên có

màu thâm nước, sau đó thối đen. gianh giới phần bệnh và phần khỏe trên lá thường có màu này thâm. Cây dưa bị bệnh và thối thường đổ ngã trên ruộng.

*** Bệnh thối rễ, chảy gôm cây sầu riêng**

Bệnh nhẹ xuất hiện trên thân, cành gọi là chảy gôm. Bệnh nặng thì gây hại rễ và gây hiện tượng chết rũ.

Trên hoa ban đầu xuất hiện các vết đốm thâm nước, sau chuyển thành màu đen, trời ẩm gây thối ướt và rụng hoa, trời khô hoa bị khô.

Trên quả non ban đầu là các vết đốm thâm đen sau đó lan rộng ra. Nấm ăn sâu vào thịt quả làm quả bị thâm đen và rụng.

Triệu chứng bệnh là biểu hiện bên ngoài phản ánh những đặc điểm riêng biệt của loại bệnh do một nguyên nhân nào đó gây ra. Tuy nhiên trong một số trường hợp cũng dễ dẫn đến những nghi hoặc và nhầm lẫn, nhất là trong trường hợp chẩn đoán bệnh có cùng một triệu chứng bên ngoài tương tự nhau. Hơn nữa triệu chứng bệnh tuy có tính chất ổn định nhưng vẫn có thể biến đổi ít nhiều tùy thuộc vào đặc điểm của giống cây, vào điều kiện ngoại cảnh.

b. Phương pháp kiểm tra nấm bằng kính hiển vi

Phương pháp kiểm tra nấm bằng kính hiển vi cần thiết phải đảm bảo điều kiện thúc đẩy vi sinh vật phát triển nhanh trên môi trường nhân tạo.

Các phương pháp trên thường mất thời gian nuôi cấy và nếu chỉ quan sát triệu chứng thì dễ nhầm lẫn nguyên nhân gây bệnh.

d. Phương pháp huyết thanh và ELISA.

Chẩn đoán bệnh nấm *Phytophthora* sp từ trước tới nay ở Việt Nam chủ yếu chỉ qua triệu chứng, qua quan sát trên kính hiển vi quang học và gần đây là qua nuôi cấy môi trường, lây bệnh nhân tạo . v.v...

Phương pháp dùng kháng huyết thanh và Kit ELISA để chẩn đoán bệnh là một phương pháp hiện đại, được nhiều nước sử dụng nhằm xác định bệnh *Phytophthora* sp tới chủng nấm hoặc xác định chung nhóm nấm *Phytophthora* sp như sản phẩm của hãng Agdia (Mỹ).

4.6.2. Sản xuất kháng huyết thanh *Phytophthora* sp.

a. Vật liệu

Chúng tôi sử dụng các nguồn nấm *Phytophthora* sp trên cây dứa, cây cam, cây bưởi, cây hồ tiêu và sầu riêng làm nguồn nấm nuôi cấy trên môi trường.

b. Phương pháp sản xuất Kit ELISA

Chúng tôi lựa chọn phương pháp sản xuất kháng huyết thanh đa dòng (polyclonal) để chẩn đoán nấm *Phytophthora* trên môi trường (như phương pháp của Agdia, Mỹ), tiến tới kiểm tra ELISA trên mẫu thực vật chưa phân lập trên môi trường.

Sau khi nuôi cấy nấm trên môi trường, chúng tôi thực hiện làm sạch kháng nguyên theo phương pháp của Masago và ctv (1977):

- Nghiền 5 – 10 g sợi nấm trong đệm phosphate 0,1M pH 7.4 + EDTA 0,01M bằng chày cối sứ
- Ly tâm 20000 g trong 30 phút; lấy dịch trên tủa
- Kết tủa protein hoà tan bằng PEG 4% + NaCl; khuấy 2h ở 4 – 6°C
- Ly tâm 15000 v/p trong 30 phút; lấy kết tủa
- Hoà kết tủa trong đệm phosphate
- Ly tâm 4200 g trong 10 phút; lấy dịch trên tủa (dịch chứa protein hoà tan của nấm)
- Bảo quản ở -20°C

Sau khi thu được kháng huyết thanh *Phytophthora* sp, chúng tôi đã tiến hành tìm ngưỡng pha loãng của kháng huyết thanh từ 1/1500 đến 1/7,000 và độ pha loãng của bào tử nấm từ 1/10,000 đến 1/500,000.

c. Kết quả

Phản ứng của Kit ELISA do chúng tôi sản xuất có mức độ rất cao. Do đó qua thí nghiệm này cho thấy mức phản ứng ELISA ở ngưỡng pha loãng của kháng huyết thanh 1/7,000 và sợi nấm pha loãng 1/10,000 phản ứng vẫn đạt ở mức khá cao (OD đạt 0.78) trong khi phản ứng của dung dịch đệm chỉ là 0.146 và chất nền là 0.102 (bảng 24). Qua các kết quả trên, chúng tôi có thể kết luận

ngưỡng pha loãng của kháng huyết thanh *Phytophthora* sp do chúng tôi sản xuất có ngưỡng pha loãng rất cao và có thể sử dụng rộng rãi trong chẩn đoán bệnh nấm do nấm *Phytophthora* sp trên môi trường và mẫu nấm trong tự nhiên có mật độ bào tử và sợi cao.

Bảng 24: Xác định độ hoà loãng thích hợp của kháng huyết thanh *Phytophthora* sản xuất và độ hoà loãng của sợi nấm

Độ hoà loãng của huyết thanh	Độ hoà loãng của sợi nấm					
	1/10.000	1/50.000	1/100.000	1/200.000	1/500.000	Đệm
1/1.500	1.217	0.987	0.765	0.508	0.237	0.152
1/2.000	1.273	0.955	0.672	0.512	0.258	0.152
1/2.500	1.123	0.789	0.700	0.415	0.207	0.142
1/3.000	0.978	0.978	0.785	0.584	0.377	0.147
1/3.500	0.903	0.684	0.549	0.372	0.205	0.143
1/4.000	0.919	0.653	0.551	0.337	0.205	0.138
1/5.000	0.880	0.662	0.449	0.345	0.183	0.121
1/6.000	0.771	0.552	0.474	0.272	0.181	0.147
1/7.000	0.780	0.524	0.433	0.300	0.180	0.155

Chúng tôi đã tiến hành so sánh mức độ phản ứng của Kit ELISA do chúng tôi sản xuất và Kit ELISA của hãng Agdia. Kết quả cho thấy mức độ phản ứng trên cam, dưa, hồ tiêu, sầu riêng mẫu 1, trong đó có một số trường hợp phản ứng của mẫu cam và dưa mạnh hơn hẳn Kit của Agdia; ngược lại ở mẫu sầu riêng 2 và bưởi lại có phản ứng ở mức thấp hơn của Agdia (bảng 25).

Bảng 25: So sánh huyết thanh *Phytophthora* sp sản xuất và Agdia

STT	Cây	Huyết thanh Việt Nam		Huyết thanh Agdia	
		Giá trị ELISA	Kết luận	Giá trị ELISA	Kết luận
1	Bưởi	0.858	+	1.328	+
2	Sầu riêng 1	1.620	+	1.679	+
3	Cam	1.925	+	1.706	+
4	Dứa	2.086	+	1.948	+
5	Hồ tiêu	1.845	+	1.990	+
6	Sầu riêng 2	0.564	+	1.204	+
7	Đem	0.220	-	0.179	-
8	Nền	0.196	-	0.116	-

Độ đặc hiệu của kháng huyết thanh được kết luận với các thí nghiệm thử kit ELISA trên các loài nấm khác nhau ở mức độ hoà loãng từ 1/2000 – 1/2500 (kháng thể nồng độ cao) nhằm xác định các phản ứng chéo có thể xảy ra hay không (bảng 26). Bảng này cho kết luận là tất cả các mẫu nấm *Phytophthora* sp đều cho phản ứng với kháng huyết thanh *Phytophthora* sp, các loài nấm khác đều không cho phản ứng với nấm *Phytophthora* sp.

Bảng 26: Kiểm tra huyết thanh *Phytophthora* sản xuất với các nấm khác

Tỷ lệ kháng huyết thanh	Nấm	Độ hoà loãng nấm	
		1/100.000	1/200.000
1/2000	<i>Phytophthora</i> sp. (quýt)	0.940	0.550
	<i>Phytophthora</i> sp. (dứa)	0.327	0.254
	<i>Phytophthora</i> sp. (điều)	0.730	0.499
	<i>Fusarium solani</i>	0.149	0.141
	<i>Fusarium</i> sp	0.222	0.175
	<i>Sclerotium</i> (cà chua)	0.247	0.153
	<i>Pestalotiopsis</i> sp	0.194	0.164
	<i>Pythium</i> sp	0.298	0.194
	<i>Lasiodiplodia</i> sp	0.245	0.173
	<i>Sclerotium</i> (phong lan)	0.178	0.136
1/2500	<i>Phytophthora</i> sp. (quýt)	0.894	0.513
	<i>Phytophthora</i> sp. (dứa)	0.329	0.264
	<i>Phytophthora</i> sp. (điều)	0.647	0.412
	<i>Fusarium solani</i>	0.146	0.136
	<i>Fusarium</i> sp	0.217	0.162
	<i>Sclerotium</i> (cà chua)	0.207	0.154
	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	0.188	0.159
	<i>Pythium</i> sp	0.265	0.190
	<i>Lasiodiplodia</i> sp	0.222	0.167
	<i>Sclerotium</i> (phong lan)	0.188	0.126

Thảo luận: Kit ELISA polyclonal của nấm *Phytophthora* sp chỉ đặc hiệu với nấm *Phytophthora* sp nuôi cấy phân lập trên môi trường có chất lượng tương đương Kit của hãng Agdia (Mỹ) sản xuất để chẩn đoán nấm trên môi trường. Chúng tôi hi vọng sẽ cải tiến để Kit ELISA của nấm *Phytophthora* sp do chúng tôi sản xuất có thể chẩn đoán trên mẫu nấm trực tiếp lấy từ cây bệnh.

4.7. Sản xuất kháng huyết thanh vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* và Kit ELISA vi khuẩn *R. solanacearum*

4.7.1. Các phương pháp chẩn đoán vi khuẩn héo xanh

a. Chẩn đoán bằng triệu chứng

Vi khuẩn héo xanh thường gây hiện tượng héo xanh ở: khoai tây, cà chua, thuốc lá, ớt, đậu, lạc và nhiều cây trồng khác. Cây bị bệnh có hiện tượng héo lá ngọn, lá dưới rũ xuống, ngọn non gục xuống. Lúc đầu khi mới bị bệnh cây có hiện tượng ban ngày héo ban đêm cây lại hồi phục, sau vài ngày cây không còn khả năng hồi phục mà bắt đầu héo chết hẳn, lá cây thâm lại rồi héo khô không biến vàng. ở khoai tây, cà chua, thuốc lá, ... cắt ngang thân cây bó mạch đều bị thâm lại sẫm màu dần có khi biến thành màu đen bầm. Trên thân còn tươi thường ứa ra những giọt dịch có màu trắng bầm. Củ khoai tây bị bệnh các mạch dẫn ở củ cũng thâm lại có màu nâu và sau thành đen.

b. Chẩn đoán bằng giọt dịch

Lấy thân cây bị bệnh héo xanh có triệu chứng điển hình cắt lấy một đoạn gốc thân dài khoảng 5 cm nhúng vào một cốc nước sạch, sau một vài phút thấy dịch trắng sữa chảy ra ở đầu lát cắt và trong cốc nước, cho phép kết luận là mẫu đã nhiễm bệnh héo xanh (M.C. Carter. SM, 1991).

c. Phương pháp chẩn đoán qua nuôi cấy, phân ly và phản ứng sinh hoá:

Có thể nuôi cấy vi khuẩn (*Ralstonia solanacearum* Smith) trên các môi trường : SPA (Saccarose pepton agar), môi trường King's B, môi trường TZC (Triphenyl tatzolium chloride), môi trường Wakimoto, môi trường PS (Potato saccarose), môi trường PG (Pepton glucose), môi trường PGA (Pepton glucose agar).

Vi khuẩn héo rũ thường mọc lên thành các khuẩn lạc tròn, rìa không đều có màu trắng sữa hay trắng đục: lây bệnh lên cây khoẻ bằng phương pháp ngâm hạt, nhúng rễ vào dịch vi khuẩn, tiêm vào nách lá hay gân lá.

d. Phương pháp chẩn đoán bằng quan sát trên kính hiển vi và dùng kính hiển vi huỳnh quang để quan sát vi khuẩn

Đối với một số bệnh vi khuẩn chẩn đoán cũng có thể dùng phương pháp nhuộm mô bệnh bằng thuốc nhuộm thông thường (Methylen xanh, Nitrat bạc, KMnO_4 , Fucsin...) để phát hiện vi khuẩn bên trong mô bệnh.

e. Phương pháp chẩn đoán bằng phương pháp ELISA

Các kháng thể đa dòng (Polyclonal antibody) đã được các hãng Agdia, Sanofi, Biorad,... sản xuất để chẩn đoán nhanh xác định tên loài của 1 vi khuẩn trên môi trường nuôi cấy. Một số kháng thể đơn dòng (monoclonal antibody) cũng được sản xuất nhằm xác định các chủng (race), nòi (biovar) của vi khuẩn.

4.7.2. Sản xuất kháng huyết thanh đa dòng (Polyclonal antibody) của vi khuẩn *R. solanacearum*.

Chúng tôi chưa có trang bị để sản xuất kháng huyết thanh đơn dòng. Vì vậy, chúng tôi đã lựa chọn sản xuất kháng thể đa dòng của vi khuẩn héo rũ.

Trong thực tế, các nước Châu Âu cũng tập chung sản xuất kháng thể đa dòng: ứng dụng lớn và giá thành hạ. Việc sản xuất chủng, nòi của vi khuẩn đã có phương pháp PCR chẩn đoán chính xác không cần dùng phương pháp sử dụng kháng thể đơn dòng.

a. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Thu mẫu bệnh làm vật liệu trên những cây có triệu chứng điển hình: cà chua, khoai tây, cà, ớt, thuốc lá,... sử dụng phần thân của cây mới chớm bị vi khuẩn gây hại, các mẫu vi khuẩn được kiểm tra bằng phương pháp PCR để xác định đúng loài. Sau đó vi khuẩn được cấy trên môi trường PSA.

Làm tinh sạch protein của vi khuẩn *R. solanacearum* theo phương pháp của S.N. Boer và N.W Schaad (1990):

- Hoà loãng glycoprotein của vi khuẩn trong nước cất 2 lần, trong thời gian 30 phút với lượng 5 – 10 ml/ 1 ống nghiệm.
- Tách tế bào vi khuẩn bằng ly tâm ở 5.000g trong 15 phút và thu nước trong loại bỏ cặn.

- Bổ sung dung dịch $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ bão hoà với thể tích tương đương, để qua 12 giờ ở 4°C .
- Ly tâm 20.000g trong 15 phút để kết tủa glycoprotein, bỏ nước trong thu kết tủa.
- Thẩm tích 24 giờ ở 4°C , giữ dịch trong lạnh cho tới khi tiêm gây miễn dịch cho động vật.

b. Kết quả

Chúng tôi đã tiến hành thử kiểm tra xác định tính đặc hiệu của kháng huyết thanh vi khuẩn.

Bảng 27: So sánh huyết thanh vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* sản xuất với huyết thanh của Agdia

STT	Cây	Huyết thanh sản xuất		Huyết thanh Agdia	
		OD	Kết luận	OD	Kết luận
1	Khoai tây	0.503	+	0.865	+
2		0.464	+	0.617	+
3		0.424	+	0.611	+
4		0.441	+	0.441	+
5		0.482	+	0.685	+
6		0.471	+	0.559	+
7		0.559	+	0.625	+
8		0.467	+	0.573	+
9		0.696	+	0.617	+
10		0.563	+	0.652	+
11		0.816	+	0.689	+
12		0.506	+	0.527	+
	Đối chứng (+)	0.781	+	0.964	+
	Dung dịch đệm	0.130	-	0.135	-

So sánh 2 loại kháng huyết thanh của Việt Nam sản xuất và kháng huyết thanh của hãng Agdia sản xuất, chúng tôi có nhận xét: kết quả phản ứng ở các mẫu số 1,2,3,4,5,6, 7,8,10,12, chứng tỏ kháng huyết thanh sản xuất ở Việt Nam có mức phản ứng thấp hơn không nhiều so với kháng huyết thanh của hãng Agdia (bảng 27). Trong một số ít trường hợp như mẫu số 9 và 11 mức độ phản ứng của kháng huyết thanh Việt Nam còn cao hơn của Agdia. Điều này chứng tỏ mật độ kháng thể của kháng huyết thanh sản xuất chưa ổn định. Với các mẫu có nồng độ kháng nguyên cao mức phản ứng vẫn bị giới hạn cặp đôi tương tự các mẫu có nồng độ kháng nguyên thấp. Mặc dù, kháng huyết thanh Việt Nam phản ứng không mạnh như của Agdia nhưng tính đặc hiệu của 2 bên là ngang bằng nhau: 100% số mẫu cây bị bệnh đều có phản ứng (+) và đối với mẫu âm tính (dung dịch đệm), 2 kháng huyết thanh đều cho kết quả tương tự.

Kiểm tra bệnh vi khuẩn trên các cây cà chua và khoai tây bị bệnh bằng kháng huyết thanh đã sản xuất, kết quả được thể hiện ở bảng 28. Thí nghiệm này cho thấy hầu hết các cây bị bệnh đều có phản ứng dương tính cao hơn cây khỏe, riêng mẫu cà chua số 5 và khoai tây số 11 phản ứng chỉ ở mức $\pm$. Trường hợp này có thể do cây bệnh đã quá thời gian có nồng độ vi khuẩn cao để có thể phản ứng rõ nét.

Bảng 28: Kiểm tra vi khuẩn *R. solanacearum* bằng huyết thanh sản xuất

STT	Cây	Trị số ELISA	Kết luận
1	Cà chua	0.454	+
2		0.426	+
3		0.438	+
4		0.419	+
5		0.350	$\pm$
6	Cà chua khỏe	0.293	-
7	Khoai tây	0.742	+
8		0.756	+
9		0.651	+
10		0.550	+
11		0.376	$\pm$
12	Khoai tây khỏe	0.288	-

Chúng tôi đã xem xét lại thời gian ủ chất nền trong bản ELISA để quan sát mức độ phản ứng (bảng 29): Nếu tăng thời gian ủ lên 60 phút thì kết quả phản ứng sẽ cho sự sai lệch rất xa giữa mẫu bệnh có kháng nguyên và mẫu cây khỏe không có kháng nguyên. Như vậy, phản ứng tạo ra mạnh hơn hẳn so với khi thời gian ủ là 30 phút.

Bảng 29: Kết quả kiểm tra huyết thanh *R. solanacearum* sản xuất với các thời gian ủ chất nền khác nhau

Mẫu	Giá trị ELISA Sau 30 phút	Kết luận	Giá trị ELISA Sau 60 phút	Kết luận
Cà chua	0.454	+	0.595	+
Cà chua	0.426	+	0.555	+
Cà chua	0.438	+	0.588	+
Cà chua	0.419	+	0.511	+
Cà chua	0.350	±	0.411	+
Cà chua khỏe	0.223	—	0.242	—
Khoai tây	0.742	+	1.048	+
Khoai tây	0.756	+	1.136	+
Khoai tây	0.651	+	0.951	+
Khoai tây	0.550	+	0.787	+
Khoai tây	— 0.376	±	0.482	+
Khoai tây khỏe	0.288	—	0.227	—
Đệm	0.248	—	0.291	—
Chất nền	0.224	—	0.240	—

Để kết luận rõ rệt hơn, chúng tôi đã tiến hành thử phản ứng với cả các cây công nghệ, cây ớt bị bệnh. Kết quả cho thấy: ở cây khoai tây và cây ớt, nồng độ vi khuẩn có khả năng cao hơn cây cà chua và nghệ. Vì vậy phản ứng xảy ra rất mạnh và thường chênh lệch lớn với đối chứng (bảng 30).

Bảng 30: Kiểm tra vi khuẩn *R. solanacearum* bằng huyết thanh sản xuất

Cây	Giá trị ELISA	Kết luận
Khoai tây	0.585	+
	0.690	+
	0.610	+
	0.447	+
	0.742	+
	0.756	+
	0.651	+
	0.550	+
	0.376	-
Khoai tây khỏe	0.288	-
Cà chua	0.365	-
	0.282	-
	0.289	-
	0.387	-
	0.454	+
	0.426	+
	0.438	+
	0.419	+
	0.350	-
Cà chua khỏe	0.283	
Nghệ	0.459	+
	0.362	-
	0.305	-
	0.285	-
Ớt	0.880	+
	0.754	+
	0.585	+
	0.425	+
Đệm	0.333	-
Chất nền	0.117	-

Thảo luận: Kháng huyết thanh vi khuẩn *Ralstonia solanacearum*.

Smith do Trung tâm Bệnh cây nhiệt đới sản xuất có giá trị chẩn đoán và phát hiện cây bệnh tốt, do đó có thể sử dụng để chẩn đoán vi khuẩn gây bệnh sau khi phân lập lần đầu trên môi trường (như sản phẩm của Agdia). Do mới thực nghiệm để chẩn đoán cây bệnh nên kết quả chưa cao và cần phải tiếp tục nghiên cứu để nâng cao hiệu quả của kháng huyết thanh. Tuy nhiên qua thử nghiệm so sánh với kháng huyết thanh của hãng Agdia (Mỹ) chứng tỏ kháng huyết thanh sản xuất hoàn toàn có thể sử dụng để loại bỏ mẫu cây bị nhiễm bệnh không có sai sót nào.

4.8. Những phương pháp chẩn đoán vi khuẩn gây bệnh Greening và chọn lọc phương pháp PCR trong việc xác định cây bệnh

4.8.1. Các phương pháp chẩn đoán bệnh Greening

Vi khuẩn Greening thực ra là một loại vi khuẩn đặc biệt. Sau phát hiện của J. Bové và M. Garnier tại phòng thí nghiệm sinh học phân tử về bệnh Mycoplasma ở Bordeaux (Pháp) những năm 80 của thế kỉ 20, Phytoplasma hại cam chanh được gọi là Bacteria like organism (BLO). Thực tế nhóm này chỉ sai khác với các Phytoplasma khác là cấu trúc lớp màng có 3 lớp không phải 2 lớp như các Phytoplasma khác, còn đặc tính thì vẫn không thay đổi: BLO không nuôi cấy được trên môi trường, BLO chỉ truyền qua nhân vô tính và bằng rầy chổng cánh *Diaphorina citri* theo kiểu truyền bền vững mà thôi.

Như vậy, chỉ do cấu tạo mà nhóm này thay đổi vị trí trong phân loại, không phải do đặc tính. Do tình hình trên, việc sản xuất kháng huyết thanh của BLO khó thực hiện

Để chẩn đoán BLO, người ta đã dùng các phương pháp sau:

a. Chẩn đoán bằng triệu chứng

Bệnh Greening thường tạo triệu chứng điển hình nhất là gân xanh, lá vàng hay lá già có màu xám nhạt, gân cong và sưng hoặc có đốm xanh lá vàng, quả nhỏ, tâm quả vẹo, nhiều hạt bị lép. Lọc hè và lọc thu bệnh thể hiện rõ hơn, vụ xuân- mùa đông cây trơ trụi, cành dần khô chết. Rễ kém phát triển. Các hiện tượng trên rất giống hiện tượng thiếu Mn, Zn và Bo. Các kết quả nghiên cứu cho nhận xét: có thể cây sau khi bị bệnh đã dẫn đến thiếu các nguyên tố vi lượng nên biểu hiện ra các triệu chứng trên.

b. Phương pháp lây bệnh qua ghép vô tính

Các cây được chọn gieo hạt làm gốc ghép thường là cam ba lá và bưởi chua làm gốc ghép. Kỹ thuật ghép thông thường hay vi ghép ngày nay đã được áp dụng để lây bệnh nhân tạo hoặc để sản xuất các cây sạch bệnh. Phương pháp này thường là phương pháp lây bệnh cho kết quả rất chậm có khi tới một vài tháng.

c. Phương pháp chụp ảnh trên kính hiển vi điện tử

Một phương pháp chẩn đoán nhanh hơn là chụp ảnh trên kính hiển vi điện tử bằng phương pháp lát cắt cực mỏng giống như bệnh Phytoplasma hại thực vật. Người ta có thể quan sát thấy các vi khuẩn Greening (BLO) với các hình dạng: ô van, quả trứng hay gần giống như hình cầu trong mô cây bị bệnh với các kích thước biến động. Phương pháp này thường cho kết quả trong khoảng 1 tuần lễ.

d. Phương pháp PCR

Do tính kháng nguyên của vi khuẩn Greening gần giống như Phytoplasma nên kháng huyết thanh miễn dịch khó có chất lượng cao. Phương pháp PCR là phương pháp nhanh nhất để chẩn đoán xác định vi khuẩn và có độ chính xác cao. Chỉ sau 2-3 ngày đã có thể kết luận chắc chắn nguyên nhân gây bệnh. Ngày nay ở các nước phát triển việc nghiên cứu giúp các vùng cam nhiệt đới và cận nhiệt đới phổ biến là dùng phương pháp này.

4.8.2. Lựa chọn phương pháp PCR trong chẩn đoán bệnh Greening

a. Vật liệu

Chúng tôi thu thập mẫu theo chương trình điều tra bệnh, chọn tạo cây cam sạch bệnh ở một số địa điểm sau: Từ Liêm (Hà Nội), Ba Vì (Hà Tây), Hòa Bình, Nghệ An, Hà Tĩnh, Hà Giang và Tuyên Quang.

b. Phương pháp thí nghiệm

Chúng tôi tiến hành điều tra ở mỗi điểm 500 cây cam theo 5 điểm chéo góc hay theo 5 hàng cách hàng. Ở nơi cam trồng phân tán thì thu ở 5 vườn nhỏ (hay 5 vùng trồng nhỏ) mỗi vùng quan sát 100 cây lấy những mẫu cây bệnh điển hình nhất để thử PCR.

Chúng tôi lựa chọn phương pháp PCR của GS H. J. Su ở trường Đại học Tổng hợp Đài Bắc - Đài Loan. Quy trình thí nghiệm được thể hiện như sau:

Bước 1: Tách chiết và tinh sạch DNA

- Mẫu thu thập được rửa sạch, tách lấy gân và cân 0,5g/mẫu

- Dùng chày cối sứ nghiền mẫu trong 2700 μl dịch nghiền đặc hiệu + 300 μl Sakosyl, gạn lấy 1500 μl phần dịch đổ vào tuýp 1,7ml. Sau đó ủ trong bể định ôn ở 55°C trong 60 phút.
- Ly tâm 6000 vòng/ phút trong 5 phút, gạn 800 μl dịch trong phía trên sang một tuýp sạch khác. Thêm lần lượt vào mỗi tuýp 100 μl NaCl 5M và 10% CTAB trong NaCl 0,7 M, lắc nhẹ rồi để trong bể định ôn ở 65°C trong 10 phút.
- Thêm 500 μl Chloroform: Isoamyl alcohol 24:1 vào mỗi tuýp, lắc thật mạnh (sử dụng Vortex). Ly tâm 12000 vòng/phút, trong 10 phút.
- Rút lấy 800 μl phần dịch trong phía trên của mỗi tuýp chuyển sang một tuýp mới khác. Thêm 600 μl Phenol: Chloroform: Isoamyl alcohol 25:24:1, lắc thật mạnh (sử dụng vortex) rồi ly tâm 12000vòng/ phút trong 10 phút.
- Gạn lấy 600 μl dịch trong phía trên, thêm 360 μl Isopropanol để kết tủa nucleic axit. Để trong tủ lạnh sâu – 20°C, trong 2 tiếng trước khi ly tâm lạnh (4°C) 12000vòng/ phút, trong 15 phút.
- Đổ nhẹ toàn bộ phần dịch, viên DNA gắn chặt ở đáy tuýp được rửa 2 lần bằng cồn 70°, làm khô rồi lại được làm tan lại bằng 100 μl dung môi TE.
- Bảo quản ở – 20°C hoặc làm tiếp các bước sau.

Bước 2: Khuyếch đại DNA của vi khuẩn Greening bằng kỹ thuật PCR

Thành phần dung môi phản ứng cũng như mỗi của phản ứng và chu trình nhiệt chạy máy PCR đều theo GS. Hong Ji Su, trường Đại học Tổng hợp Đài Loan.

Bước 3: Chạy điện di sản phẩm PCR

Load vào mỗi giếng trên agarose gel 1,4% 10 μl sản phẩm PCR + 2 μl loading dye rồi chạy máy điện di với hiệu điện thế 100V trong 45 phút.

Bước 4: Xác định kết quả.

Nhuộm DNA bằng Ethidium Bromide, soi trên đèn cực tím, chụp ảnh.

+ Căn cứ vào sự xuất hiện một vạch sáng trắng trên miếng thạch của mẫu đối chứng bệnh và đối chứng khỏe không có vạch này.

+ Mẫu thử nào có xuất hiện vạch trắng sáng ngang với vạch trắng sáng của đối chứng bệnh là những mẫu nhiễm bệnh Greening và ngược lại đối với những mẫu không nhiễm bệnh.

c. Kết quả

Qua điều tra và quan sát, các cây bị bệnh Greening thường phân bố rải rác trong các vườn cam mới trồng khoảng 3 năm tuổi.. ở vườn cây lớn hơn, mật độ cây bệnh tăng nhưng cây có triệu chứng thật điển hình và sớm tàn rất ít – thường là những cây bị bệnh tập trung ở một số cành hay trên tán lá chỉ biểu hiện ở một hướng nhất định. Kết quả thử PCR trên vườn cây ở Từ Liêm được trình bày ở bảng sau (bảng 31)

Bảng 31: Kết quả giám định bệnh Greening theo các triệu chứng điển hình tại một số xã huyện Từ Liêm - Hà Nội bằng PCR

Cây	Triệu chứng	Σ mẫu thử	Σ mẫu dương	Tỷ lệ mẫu nhiễm bệnh
Cam canh	Vàng lá gân xanh	6	4	66.66
	Lá biến vàng	7	5	71.42
	Lá nhỏ vàng uốn cong	7	4	57.14
	Lá già xám nhạt, <u>cong</u> gân lá	6	4	66.66
Bưởi	Vàng lá gân xanh	6	3	50.0
	Biến vàng lá	7	4	57.14

Trong số cây có triệu chứng, tỷ lệ bệnh chiếm từ 50-71.42% là Greening, còn lại là một số bệnh virus, điển hình là Tristeza.

4.9. Các sản phẩm của đề tài và ứng dụng của Kit ELISA trong phòng chống bệnh hại

1. Vật liệu có hàm lượng protein, RNA và DNA cao của nguyên nhân gây bệnh để có thể sản xuất 170.000 liều phản ứng (theo tiêu chuẩn INRA Pháp 1989)

2. Chọn lọc 3 quy trình công nghệ ELISA – Indirect, DAS – ELISA và PCR

- Quy trình ELISA - Indirect

- Quy trình DAS - ELISA

- Chẩn đoán Greening bằng phương pháp PCR (Theo Hung T. H, Wu. M. J và Su. H. J, 1999)

3. Chọn 4 phương pháp sử dụng kit phù hợp điều kiện ở Việt Nam

- Chẩn đoán bệnh ở lá

- Chẩn đoán bệnh ở củ

- Chẩn đoán bệnh ở quả

4. Tiêu chuẩn chất lượng của kháng huyết thanh và Kit ELISA – Direct, Kit ELISA – Indirect và phương pháp PCR chẩn đoán bệnh Greening

- Tiêu chuẩn cho việc thực hiện phản ứng ELISA - Direct (DAS - ELISA)

- Tiêu chuẩn cho việc thực hiện phản ứng ELISA - Indirect

- Tiêu chuẩn chất lượng phản ứng PCR chẩn đoán bệnh Greening

5. Kết quả đào tạo các học viên cao học và sinh viên

- Danh sách các sinh viên đã tốt nghiệp do thực hiện các đề tài thuộc nội dung đề tài KC.04.15

- Danh sách các học viên cao học (Thạc sỹ) đã tốt nghiệp trong thực hiện đào tạo trong đề tài KC.04.15

6. Những bài báo và sách đã được xuất bản trong thời gian thực hiện đề tài

Các kháng huyết thanh sản xuất đã được cung cấp cho các cơ sở gồm Trung tâm khảo nghiệm giống cây trồng trung ương, Viện KHKT Nông nghiệp Việt Nam, Viện BVTV, các chi cục BVTV và kiểm dịch thực vật (Bộ NN & PTNT), Viện KTKT Thuốc lá, các trường Đại học Cần Thơ, Nông lâm Tp Hồ Chí Minh, Nông lâm Huế và các công ty giống...

Chúng tôi đã viết mục 4.9 thành một báo cáo riêng - xin xem phần này trong báo cáo sản phẩm của đề tài

V. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

5.1. Kết luận

Qua 4 năm thực hiện đề tài: 2001-2004, chúng tôi đã thu được những kết quả chính sau:

- Đã sản xuất được 7 loại Kit chẩn đoán bệnh virus, nấm và vi khuẩn hại cây trồng đó là: Kit ELISA cho virus Y khoai tây (PVY), virus X khoai tây (PVX), virus khảm cà chua (ToMV), virus hại tàn lụi cam chanh (*Citrus Tristeza virus* – CTV), virus khảm lá dâu (MuMV), Kit ELISA chẩn đoán nấm mốc sương (*Phytophthora* sp), Kit ELISA chẩn đoán bệnh vi khuẩn héo xanh (*Ralstonia solanacearum*) với đủ số lượng liều phản ứng và đảm bảo chất lượng.
- Đã lựa chọn và áp dụng kỹ thuật PCR (của GS H. J. Su Đại học Đài Bắc, Đài Loan, 1999) và thực hiện kỹ thuật này trong chẩn đoán bệnh Greening.
- Các Kit ELISA do đề tài sản xuất đã sử dụng cho việc chẩn đoán loại bỏ cây bệnh cho các ruộng khoai tây sạch bệnh (chương trình khoai tây Việt - Đức), cho bệnh virus thuốc lá ở Cao Bằng do Viện KTKT Thuốc lá sử dụng, cho virus dâu ở Trại Dâu tằm tơ Thái Bình .v.v.... Các chi cục kiểm dịch thực vật và kinh doanh sau nhập khẩu, Viện KHKT Nông nghiệp, Viện Sinh học nhiệt đới và nhiều trường Đại học, Viện ... đã sử dụng Kit ELISA của đề tài phục vụ nghiên cứu khoa học.
- Giá thành của Kit ELISA hiện chỉ bằng 1/3 – 1/2 giá của Kit nhập từ nước ngoài. Tính đặc hiệu tương đương và có độ tin cậy cao khi chẩn đoán bệnh. Riêng các Kit ELISA của virus PVX, ToMV còn có mức độ phản ứng mạnh hơn huyết thanh nhập nội trong một số trường hợp.
- Trong 4 năm thực hiện đề tài, các cán bộ tham gia đã trưởng thành rất nhiều về kỹ thuật và tác phong làm việc. Đề tài đã đào tạo được 12 thạc sĩ, 2 thạc sĩ đang thực hiện đề tài, 1 tiến sĩ đang được đào tạo tại Australia và 22 sinh viên làm luận án tốt nghiệp trong các nội dung thí nghiệm. Đề tài đã công bố 11 bài báo và xuất bản 1 cuốn sách về các phương pháp chẩn đoán nhanh bệnh hại thực vật và sử dụng Kit ELISA.

- Uy tín của phòng thí nghiệm được nâng cao và kỹ thuật sản xuất kháng huyết thanh ổn định để có thể chuẩn bị sản xuất nhiều loại Kit mới.
- Nhược điểm: do trang thiết bị những năm qua còn thiếu thốn, đến năm 2004, phòng đã được trang bị thêm máy siêu ly tâm nên những kháng huyết thanh có hiện tượng phản ứng yếu sẽ được khắc phục để sản xuất những Kit mới có phản ứng mạnh tương đương kháng huyết thanh nhập nội.

5.2. Kiến nghị

Năm 2004 – 2005 trong dự án tăng cường trang thiết bị để ứng dụng công nghệ sinh học trong sản xuất giống cây trồng – Bộ KH-CN, Bộ GDĐT và Bộ Tài Chính đã chú ý đầu tư và trang bị cho phòng thí nghiệm 1 máy siêu ly tâm và 1 số trang bị khác. Chúng tôi mong muốn trong những năm tới, 2 bộ quan tâm giúp phòng thí nghiệm hoàn chỉnh hệ thống sản xuất kháng huyết thanh và Kit ELISA vì đây là cơ sở sản xuất Kit duy nhất ở Việt Nam phục vụ cho việc sản xuất giống sạch và thực hiện nhiều kỹ thuật quan trọng trong công nghệ sinh học trên cơ sở loại bỏ cây bệnh (chuyển gen, lai tạo giống chống bệnh, nhân giống vô tính sạch bệnh...)

Chúng tôi cũng mong muốn bộ giúp đỡ trong chương trình ươm tạo công nghệ trong một số năm để phòng thí nghiệm có thể có đủ điều kiện thương mại hoá sản phẩm ở Việt Nam và một số nước trong khu vực. Với trang thiết bị được bổ sung hiện nay và sự giúp đỡ của bộ KH-CN và bộ GDĐT, Bộ Tài chính, chúng tôi tin tưởng sản phẩm của chúng tôi sẽ ngày càng có vị trí cao hơn và đáp ứng yêu cầu sử dụng ngày càng tăng ở nước ta và có thể mở rộng đến một số quốc gia trong khu vực.

Trung tâm nghiên cứu Bệnh cây nhiệt đới
Trường Đại học Nông nghiệp I

Ngày 28 tháng 04 năm 2005

LỜI CẢM ƠN

Hoàn thành đề tài KC.04.15, chúng tôi xin chân thành cảm ơn Vụ khoa học các ngành KTKT Bộ Khoa học Công nghệ, Vụ Khoa học Công nghệ Bộ Giáo dục đào tạo, Bộ Tài Chính đã xét duyệt và giúp đỡ cho đề tài được thực hiện.

Ban Chủ nhiệm Chương trình KC.04 và GS.TS Trần Duy Quý - Chủ nhiệm Chương trình; Ban Giám Hiệu Trường Đại học Nông nghiệp I và GS.TS Đặng Vũ Bình - Hiệu Trưởng Trường Đại học Nông nghiệp I, Phòng Khoa học và hợp tác Quốc Tế Trường Đại học Nông nghiệp I và các phòng chức năng đã quan tâm giúp đỡ cho Đề tài được tiến hành thuận lợi.

Chúng tôi xin chân thành cảm ơn các nhà Khoa học, các Bộ môn Bảo vệ thực vật của các Trường Đại học, Các Viện nghiên cứu, các Trung tâm, Cục Bảo vệ và Kiểm dịch thực vật, Viện Bảo vệ thực vật và các Công ty có liên quan đã nhiệt tình tham gia và giúp Đề tài khảo nghiệm, sử dụng kit ELISA trong nghiên cứu khoa học và ứng dụng trong sản xuất.

Một lần nữa xin chân thành cảm ơn.

Chủ nhiệm đề tài và các thành viên tham gia đề tài

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tài liệu tham khảo trong nước

1. Vũ Triệu Mân (1979). Nghiên cứu loại trừ virus X (PVX) hại khoai tây ra khỏi đồng ruộng. Tạp chí KHKT – NN 1979.
2. Vũ Triệu Mân (1992). Bệnh Greening hại cam chanh do những nguyên nhân nào gây ra. Tạp chí BVTV số 2/1992.
3. Vũ Triệu Mân (1992). Nghiên cứu tạo kháng huyết thanh và tìm hiểu một số đặc điểm của virus V khoai tây (PVV). Tạp chí BVTV số 4/1992
4. Vũ Triệu Mân (1992). Điều tra bệnh virus hại cây trồng và nghiên cứu một số virus thuộc nhóm Poty tại vùng đồng bằng sông Hồng miền Bắc Việt Nam. Hội thảo Quốc tế virus thực vật 12/1992 tại Thái Lan.
5. Vũ Triệu Mân (1995). Phòng trừ và phân cấp bệnh hại trong hệ thống nhân giống sạch bệnh. Tạp chí BVTV số 5/1995.
6. Vũ Triệu Mân (1996). Một số kết quả sử dụng ELISA và PCR trong chẩn đoán bệnh hại thực vật. Tuyển tập công trình KHKT- Trường Đại học nông nghiệp I Hà Nội.
7. Hà Viết Cường, Đỗ Xuân Đạt, Vũ Triệu Mân, Peter Revill, James Dale, Steven Lieu (2001). Đánh giá sự đa dạng di truyền của virus đốm hình nhẫn hại đu đủ (*Papaya ringspot virus* - PRSV – P) ở miền Bắc Việt Nam bằng kỹ thuật Heteroduplexx Mobility assay (HMA). Tạp chí BVTV 2001.
8. Ngô Bích Hào (2002). Phát hiện những virus trên cà chua, ớt cay, ớt ngọt, cà tím và nhận dạng *Tomato mosaic virus* ở Việt nam. Hội thảo Bệnh cây và sinh học phân tử lần thứ 1 tại Trường đại học Nông Lâm – Tp Hồ Chí Minh
9. Hà Viết Cường- Trần Thị Như Hoa- Vũ Triệu Mân – Peter Revill – James Dale. Phát hiện virus gây bệnh trên cây bầu bí ở Việt Nam. Hội thảo Bệnh cây và sinh học phân tử lần thứ 1 tại Trường đại học Nông Lâm – Tp Hồ Chí Minh

10. Lê Lương Tề, Chu Văn Chuông, Phạm Mỹ Linh, Hà Viết Cường (2002). Nhận dạng *Ralstonia solanacearum* bằng PCR và đánh giá tính kháng bệnh héo xanh của một số giống cà chua với các dòng vi khuẩn ở Hà Nội, Việt Nam. Hội thảo Bệnh cây và sinh học phân tử lần thứ 1 tại Trường đại học Nông Lâm – Tp Hồ Chí Minh
11. Hoàng Hoa Long, Lê Như Kiều, Đào Thu Hằng, Vũ Bích Hậu, Nguyễn Hồng Hải, Nguyễn Ngọc Cường (2002). Giám định vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* bằng kỹ thuật nhân gen PCR. Hội thảo Bệnh cây và sinh học phân tử lần thứ 1 tại Trường đại học Nông Lâm – Tp Hồ Chí Minh
12. Hà Minh Trung, Vũ Đình Phú, Ngô Vĩnh Viễn (2002). Kỹ thuật xác định và sản xuất cây cam quýt sạch bệnh Greening và xây dựng vườn ươm giống cây sạch bệnh. Hội thảo Bệnh cây và sinh học phân tử lần thứ 1 tại Trường đại học Nông Lâm – Tp Hồ Chí Minh
13. Nguyễn Vĩnh Trường, Đặng Lưu Hoa, Lester W. Burgess , Fiona Benyon, Trần Nguyễn Hà, Nguyễn Kim Vân, Ngô Vĩnh Viễn (2002). Bước đầu nghiên cứu nguyên nhân gây bệnh chết héo hồ tiêu” Hội thảo Bệnh cây và sinh học phân tử lần thứ 1 tại Trường ĐH Nông Lâm – Tp Hồ Chí Minh
14. Ngô Bích Hảo và CTV (2003). Một số nghiên cứu về bệnh virus khảm lá cà chua (ToMV) vùng Hà Nội và phụ cận. Hội thảo Bệnh cây và sinh học phân tử lần thứ 2 tại Trường đại học nông nghiệp I- Hà Nội.
15. Đoàn Thị Ái Thuyền, Lưu Việt Dũng, Vũ Triệu Mân (2003). Sử dụng kháng huyết thanh do Trung tâm Bệnh cây nhiệt đới (Đại học Nông nghiệp I) sản xuất trong chẩn đoán một số bệnh virus hại cây trồng. Hội thảo Bệnh cây và sinh học phân tử lần thứ 2 tại Trường đại học nông nghiệp I- Hà Nội.
16. Vũ Triệu Mân – Hà Viết Cường- Ngô Bích Hảo – Trần Thị Như Hoa & CTV (2003). Nghiên cứu sản xuất kháng huyết thanh và Kit ELISA chẩn đoán một số bệnh virus hại thực vật ở Việt Nam. Hội thảo Bệnh

cây và sinh học phân tử lần thứ 2 tại Trường Đại học nông nghiệp I- Hà Nội.

17. Vũ Triệu Mân (2003) “Chẩn đoán nhanh bệnh hại thực vật” - NXB Nông nghiệp (100 trang)
18. Đỗ Tấn Dũng (2004) Nghiên cứu bệnh héo xanh vi khuẩn hại cây trồng ở vùng Hà Nội và phụ cận 1998-2003. Hội thảo Quốc gia Bệnh hại cây trồng có nguồn gốc từ đất - Đại học Cần Thơ 10/2004.
19. Ngô Thị Xuyên, Lê Hồng Vĩnh, Brurberg và Hermansen (2004). Nghiên cứu đặc điểm của nấm *Phytophthora infestans* ở Việt Nam. Hội thảo Quốc gia Bệnh hại cây trồng có nguồn gốc từ đất - Đại học Cần Thơ 10/2004.

Tài liệu tham khảo nước ngoài

1. “Common names of plant diseases”. APS net- the American Phytopathological Society.
2. “Known susceptibilities of Convolvulaceae”. Plant Viruses Online- Descriptions and Lists from the VIDE database
3. “Virology division- International union of microbiological societies”. The International Committee on Taxonomy of Viruses.
4. Ahmad. I. B, Scott. H. A. “An improved immunodiffusion test for the detection of intact cucumber Mosaic Virus in crude tobacco sap”. Techniques-Phytopathology. Vol 74. No 9 (1984). Pg 1097-1100.
5. Dodds. J. A, Lee. J. G, Nameth. S. T, Laemmlen. F. F. “Aphid- and Whitefly-transmitted cucurbit viruses in imperial county, California”. Etiology- Phytopathology. Vol 74. No 2 (1984). Pg 221-225.
6. Edwardson J. R, Christie. R. G, Ko. N. J. “Potyvirus cylindrical inclusions- Subdivision- IV”. Cytology and Histology- Phytopathology. Vol 74. No 9 (1984). Pg 1111-1114

7. Hampton. R, Ball. E, DeBoer. S, editors. "Serological methods for detection and identification of viral and bacterial plant pathogens". A Laboratory Manual.
8. Hocquellet. A, Toorawa.P, Bore. J.M, Ganier. M (1999). " Detection and indentification of the two Candidatus liberobacter species associated with Citrus huanglongbing by PCR amplification of ribosomal protein genes of the B opero" – Molecular and cellular probes (1999) 13, 373 – 379.
9. Hung. T. H, Wu. M. L, Su. H. J (2000). "A rapid method based on the one step Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). Technique for detection strains of Citrus Tristeza virrus". J. Phytopathology 148, 469 – 475.
10. Hung. T.H, Hung. S.C, Chen. C.N, Hsu. M.H and Su. H.J (2004). "Detection PCR of candidatus Liberibacter asiaticus, the Bacterium causing Citrus huanglongbing in vector psyllids; application to the study of vector" – Pathogen relationships. Plant pathology (2004)53, 96 – 102.
11. Hung. T.H, Wu. M.L, Su. H.J (1999) " Development of a rapid method for diagnosis Citrus Greening disease using Polymerase Chain Reaction". J. Phytopathology 147, 599 – 604 (1999). .
12. Jabaji. S. H, Stobbs. L. W. "Electron microscopic examination of tomato roots coinfectd with Glomus sp. and Tobacco Mosaic Virus". Cytology and Histology-Phytopathology. Vol 74. No 3 (1984). Pg 277-279.
13. McLaughlin M. R, Barnett. O. W, Gibson. P. B, Burrows. P. M. "Enzyme-linked immunosorbent assay of viruses infecting forage legumes". Disease detection and Losses- Phytopathology. Vol 74. No 8 (1984). Pg 965-969.
14. Querci. M, Salazar. L. F, Fernandez-Northcote. E. N. "Detection of Andean Virus X isolates by radioactive and nonradioactive nucleic acid

- spot hybridisation tests". *Molecular Plant Pathology- Phytopathology*. Vol 83. No 2 (1993). Pg 171-176
15. Sayama. H, Sato. T, Kominato. M, Natsuaki. T, Kaper. J. M. "Field testing of a Satellite-containing attenuated strain of Cucumber Mosaic Virus for tomato protection in Japan". *Ecology and Epidemiology-Phytopathology*. Vol 83. No 4 (1993). Pg 405-410.
 16. Stobbs. L. W. "Effect of grid rotation in a magnetic field on virus adsorption in immunosorbent electron microscopy". *Techniques-Phytopathology*. Vol 74. No 9 (1984). Pg 1132-1134.
 17. Takeuchi. S, Hikichi. Y, Kawada. Y, Okuno. T. "Detection of tobamoviruses from soils by non-precoated indirect ELISA". *J. Gen. Plant. Pathol.* 66: 153-158 (2000).
 18. Univ. W, Ribeiro. S. "Distribution and genetic diversity of tomato-infecting Begomo viruses in Brazil"
 19. Van de Heuvei J. F. J. M, Verbeek. M, Peters. D. "The relationship between Aphid-transmissibility of potato leafroll virus and surface epitopes of the viral capsid". *Vector Relations- Phytopathology*. Vol 83. No 10 (1993). Pg 1125-1129

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG NGHIỆP I - HÀ NỘI
TRUNG TÂM BỆNH CÂY NHIỆT ĐỚI**

**CÁC SÁNG KIẾN CẢI TIẾN
KỸ THUẬT CỦA ĐỀ TÀI: “BỘ KIT ELISA
CHẨN ĐOÁN BỆNH HẠI THỰC VẬT”**

**Chủ trì đề tài: GS. TS. Vũ Triệu Mân
Giám đốc Trung tâm Bệnh cây nhiệt đới**

HÀ NỘI - 2005

GIỚI THIỆU CÁC SÁNG KIẾN CẢI TIẾN KỸ THUẬT CỦA ĐỀ TÀI

1. CẢI TIẾN KỸ THUẬT LÀM TINH KHIẾT (LÀM SẠCH – PURIFICATION) VIRUS THỰC VẬT.

1.1. Cải tiến phương pháp Nordam 1970

Tác giả: Vũ Triệu Mân

Ngoài phương pháp Walkeryet 1972, chúng tôi đã ứng dụng phương pháp Nordam 1970 do chúng tôi cải tiến thu kết quả cao. Phương pháp cải tiến của chúng tôi thu được hiệu quả cao hơn hẳn phương pháp Nordam 1970, lượng virus thu được ở bước sóng 280nm lên tới 5mg/ml. Trong khi phương pháp cũ chỉ đạt 1 – 2mg/ml dịch làm sạch.

1.2. Cải tiến phương pháp Leiser và Richter 1978.

Tác giả: Vũ Triệu Mân

Ngoài việc sử dụng phương pháp Van Reyemort 1983, chúng tôi đã thực hiện phương pháp Leiser và Richter do chúng tôi cải tiến. Phương pháp tinh khiết của chúng tôi thu được lượng virus thấp hơn phương pháp Leiser và Richter và phải bổ trợ kháng huyết thanh Protein của cây nhưng rất phù hợp với hoàn cảnh của phòng thí nghiệm trước đây khi các trang thiết bị chưa đồng bộ.

1.3. Thiết lập hệ thống làm sạch đơn giản virus CTV từ nhiều chu trình làm sạch.

Tác giả: Vũ Triệu Mân

Hà Viết Cường

Do chúng tôi thiết lập lấy phương pháp của Rocha- Penã MA và Lee R.F., 1991 và phương pháp của Bové J.M. và Garnier M. chúng tôi đã tạo ra quy trình làm tinh khiết virus (xin xem quy trình cụ thể)

II. CẢI TIẾN KỸ THUẬT SỬ DỤNG CÂY CHỈ THỊ (PLANT INDICATOR)

2.1. Sử dụng cây *C. amaranticolor* để chẩn đoán PVY.

Trước đây, việc chẩn đoán PVY chỉ sử dụng cây khoai tây đại *Solanum demissum* hybride A6. Chúng tôi đã hoàn chỉnh phương pháp này bằng cách dùng ánh sáng 2000 lux, bảo đảm nhiệt độ 22⁰ C và giữ ẩm để lá cắt rời trong 3 – 4 ngày.

Thay thế phương pháp này chúng tôi đã sử dụng cây *Chenopodium amaranticolor* và cây *C. schraderanum* lây bệnh PVY. Kết quả sau 4 – 5 ngày vết bệnh viền đỏ dạng đốm tròn kích thước từ 1 – 2mm đã xuất hiện rất rõ mà không cần dùng ánh sáng mạnh 2000 lux cũng không cần khống chế nhiệt độ phòng miễn là thí nghiệm làm vào mùa đông (nhiệt độ từ 20 – 26⁰ C) là bệnh phát.

2.2. Với virus PVX.

Trước đây, các tác giả chỉ sử dụng cây *Gomphrena glubosa*, cây này cho phản ứng rõ sau 4 – 5 ngày ở nhiệt độ 25⁰ C.

Chúng tôi đã cải tiến cách lây như: Chọn cây bệnh điển hình. Thử ELISA kiểm tra và thực hiện lây bệnh trên 2 cây chỉ thị *Nicotiana xanthi* và

N. benthamiana. Kết quả độ nhạy cảm của hai cây rất rõ, cây *N. xanthi* và cây *N. benthamiana* sau 5 – 6 ngày đã có triệu chứng điển hình là các đốm chết, cho nhiễm hệ thống ở cây *N. benthamiana*.

2.3. Với virus ToMV (khảm lá cà chua)

Virus ToMV trước đây được chẩn đoán nhờ cây *Datura stramonium*, cây *Nicotiana tabacum*. Trong quá trình thí nghiệm, chúng tôi đã phát hiện hai cây có độ nhạy cao với virus đó là cây *N. glutinosa* và cây *Capsicum annum*. Chúng tôi đã sử dụng hai cây này trong quá trình thí nghiệm đạt kết quả.

Đặc biệt đã cải tiến việc kiểm tra bệnh bằng thể vùi của virus ToMV trong tế bào lá cây thuốc lá chỉ thị ở độ phóng đại 80 lần thay cho việc sử dụng kính hiển vi đắt tiền.

2.4. Với virus CTV (tàn lụi cây cam)

Nhờ sự cộng tác với viện Bảo vệ thực vật, viện nghiên cứu rau quả, chúng tôi đã có mẫu bệnh từ viện Bảo vệ thực vật và 10 giống cây có múi ở viện Rau quả. Dùng phương pháp ghép chữ T sau 75 ngày thì thực hiện chọn cây có triệu chứng điển hình làm vật liệu thí nghiệm.

Đặc biệt đã cải tiến phương pháp kiểm tra bệnh bằng cách kiểm tra thể vùi của virus CTV trong tế bào cây cam dưới kính hiển vi thường ở độ phóng đại 400 lần thay cho việc sử dụng kính hiển vi điện tử.

**TÍNH TOÁN HIỆU QUẢ KINH TẾ
VÀ GIÁ THÀNH SẢN PHẨM**

I. TÍNH TOÁN HIỆU QUẢ KINH TẾ SẢN XUẤT KIT ELISA Ở VIỆT NAM

KIT ELISA chẩn đoán bệnh virus thực vật được dùng để bảo vệ các hệ thống sản xuất cây sạch bệnh, phát hiện cây bệnh ẩn, kiểm tra sự nhiễm bệnh của hàng hoá xuất nhập khẩu. Vì những lí do trên KIT ELISA có vị trí rất quan trọng trong quá trình hội nhập WTO và mang lại hiệu quả kinh tế cao. Chỉ tính với số kháng huyết thanh chẩn đoán 4 bệnh virus do đề tài KC 04 – 15 sản xuất là 91.000 liều, có khả năng bảo vệ được số sản phẩm nông nghiệp là 910 tấn. Nếu số sản phẩm này đem xuất khẩu trị giá 10.000 VNĐ/ Kg thì tổng doanh thu của các cơ sở sản xuất 910 tấn hàng hoá là 9,1 tỷ đồng (lấy 100 mẫu thử ELISA cho 1 tấn hàng, phương pháp chọn mẫu theo cơ quan kiểm dịch thực vật). Nếu dùng số KIT này để kiểm tra độ sạch bệnh trên đồng ruộng thì có thể kiểm tra được 1516 ha cây trồng để có biện pháp phân cấp giống mang lại lợi ích kinh tế. Nếu tính 1526 ha là khoai tây, với năng suất 12 tấn/ha đề tài đã bảo vệ được 1820 tấn sản phẩm (điều tra theo phương pháp 5 điểm, mỗi điểm thu 10 mẫu để thử ELISA).

II. TÍNH TOÁN GIÁ TRỊ KINH TẾ VÀ GIÁ THÀNH SẢN PHẨM KIT ELISA SẢN XUẤT TẠI VIỆT NAM VỚI SẢN PHẨM KIT ELISA NHẬP NỘI

(của hãng Agdia – Mỹ)

STT	Tên KIT ELISA	Giá thành sản phẩm 1 bộ KIT 500 phản ứng (VNĐ)	
		KIT của Việt Nam	KIT của Agdia
1	PVX	1.500.000	4.796.000
2	PVY	2.000.000	5.000.000
3	ToMV	1.500.000	4.796.000
4	CTV	2.200.000	5.500.000

Giá thành của KIT ELISA của Việt Nam rẻ hơn vì các lí do sau:

- Hai bên sử dụng hoá chất tương tự nhau để chế tạo sản phẩm nhưng công lao động của Việt Nam chỉ tính từ 30.000 - 40.000 VNĐ/ 1 công, rẻ hơn 40 lần lương kỹ thuật viên của hãng Agdia.
- Kháng huyết thanh của Việt Nam được cung cấp tại chỗ, không mất chi phí vận chuyển xa.

Do đó, giá thành KIT ELISA sản xuất ở Việt Nam rẻ hơn ở Mỹ khoảng 50 – 60%.

**HƯỚNG DẪN
CÁC PHƯƠNG PHÁP SỬ DỤNG
KIT ELISA**

HƯỚNG DẪN SỬ DỤNG PHƯƠNG PHÁP ELISA

1. Phương pháp DAS - ELISA (Double antibody sandwich - ELISA)

Bước 1: Cố định IgG đặc hiệu của virus vào bản ELISA

IgG hoà trong dung dịch đệm carbonat, cho vào mỗi giếng 100 μ l/giếng. Đặt bản ELISA trong hộp ẩm, để vào tủ ấm ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 2 - 4h. Sau khi ủ, giếng được rửa bằng dung dịch đệm rửa (PBS - T) ba lần, mỗi lần trong 3 phút.

Bước 2: Cố định dịch cây vào bản ELISA

Nghiền mỗi mẫu 2g trong đệm chiết(PBS - T +2% PVP) với độ pha loãng 1/10 và 1/20. Dịch cây được nhỏ vào bản ELISA với lượng 100 μ l/giếng. Sau đó đặt bản ELISA vào hộp ẩm để trong tủ lạnh ở - 4°C qua một đêm hoặc có thể ủ ở 37°C trong khoảng 2- 4h. Trong quá trình này IgG sẽ xảy ra liên kết giữa IgG và kháng nguyên(nếu mẫu là mẫu bị nhiễm bệnh). Sau khi ủ bản ELISA được rửa như bước 1.

Bước 3: Cố định IgG liên kết Enzyme

Hoà IgG liên kết enzyme(IgG - E) trong dung dịch đệm liên kết (PBS - T +2% PVP + 2% Ovalbumin) theo tỷ lệ cho vào giếng với lượng 100 μ l/giếng. Bản ELISA được ủ ở 37°C trong 2h và rửa như bước 1.

Bước 4: Cố định chất nền vào bản ELISA

Hoà chất nền NPP (nitrophenol phosphate) vào dung dịch đệm substrat (theo tỷ lệ 0,25-0,5mg cho một dung dịch đệm). Sau đó nhỏ vào mỗi giếng 100 μ l. Bản ELISA để trong hộp ẩm được đặt ở nhiệt độ trong phòng thí nghiệm. Sau 1h các giếng có màu vàng là giếng có phản ứng dương tính, giếng không màu là không có phản ứng. Kết quả được đọc chính xác hơn trên máy đọc ELISA(ELISA reader) ở bước sóng 405nm.

Để cố định màu sắc của bản ELISA, bảo quản trong tủ lạnh 4°C và cần xem lại vào khi khác có thể dùng dung dịch NaOH 3M nhỏ vào mỗi giếng 25 - 30 μ l.

2. Phương pháp Indirect ELISA

Bước 1: Cố định dịch cây (ngghi là bị bệnh) cần kiểm tra vào bản: cần mỗi mẫu 0,2g lá cho vào túi nilon nghiền trong dung dịch PBS với tỷ lệ lá/ dung dịch đệm

là 1/20 - 1/100, nhỏ vào bản 1000 μ l/giếng. Sau đó để bản ELISA vào hộp ẩm và ủ qua một đêm ở nhiệt độ 4°C.

Bước 2: Chuẩn bị mẫu cây khoẻ(cây đã được kiểm tra ELISA không bị nhiễm) nghiền trong dung dịch đệm pha huyết thanh(PBS - T 1000ml + 2% PVP + 0,2% Ovabumin) theo tỷ lệ 1/20. Lọc qua vải lọc ta thu được dịch cây khoẻ (DCK). Cho kháng huyết thanh vào dịch cây khoẻ(DCK) theo nồng độ đã pha loãng tùy từng loại kháng huyết thanh khuấy đều và để 45 phút trong điều kiện 37°C.

Bước 3: Rửa bản ELISA với đệm PBS - T 3 lần trong 3 phút

Bước 4: Cố định kháng huyết thanh vào bản ELISA, nhỏ vào mỗi giếng 100 μ l kháng huyết thanh đã pha loãng trong dịch cây khoẻ. Sau đó cho bản ELISA vào trong hộp ẩm và để ở điều kiện nhiệt độ 37°C trong thời gian từ 1 - 1h 30 phút.

Bước 5: Rửa bản ELISA như ở bước 3

Bước 6: Cố định kháng huyết thanh của kháng nguyên IgG thỏ (hay kháng huyết thanh B (conjugate AP) với độ hoà loãng 1/1000 - 1/2000. Mỗi giếng 100 μ l/giếng. Đặt bản ELISA vào hộp và để qua một đêm ở tủ lạnh 4°C(hoặc để ở nhiệt độ 37°C trong 1h - 1h 30phút).

Bước 7: Rửa bản như bước 3.

Bước 8: Cố định chất nền và đánh giá kết quả:

- Pha 0,25 - 0,3mg NNp/1ml đệm subtra rồi hoà tan bằng máy khuấy từ.

-Sau đó nhỏ dung dịch trên vào bản ELISA, mỗi 100 μ l/ giếng.

Đưa bản ELISA vào hộp ẩm và để trong nhiệt độ phòng thí nghiệm(khoảng 20°C) trong thời gian từ 30 - 60 phút.

Bước 9: Đọc kết quả:

Các giếng có màu vàng là các giếng có phản ứng. Giếng không có màu là cây không bị nhiễm bệnh. Đọc kết quả tiếp bằng cách đưa vào máy đọc ELISA ở bước sóng 405 nm. Cũng có thể làm phản ứng bằng Naoh 3M với lượng 25 - 50 μ l/ giếng như phương pháp DAS - ELISA.

KẾT QUẢ

ĐÀO TẠO CÁN BỘ VÀ CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ

22 Kỹ sư ngành bệnh cây

12 Thạc sỹ (trong đó có 2 thạc sỹ bảo vệ Tiến sỹ)

11 Bài báo trong nước

1 Bài báo trên tạp chí Archives of Virology. 2003

1 Cuốn sách: Chẩn đoán nhanh bệnh hại thực vật NXB Nông nghiệp
2003

4.14. Kết quả đào tạo các học viên cao học và sinh viên

**Danh sách các sinh viên đã tốt nghiệp do thực hiện các đề tài
thuộc nội dung đề tài KC.04.15**

Năm	STT	Tên sinh viên	Tên đề tài	Người hướng dẫn
2001	1	Bùi Phương Mỹ Dung	Virus cà chua	GS.TS. Vũ Triệu Mân
	2	Nguyễn Thị Thanh Thuý	Virus khoai tây	GS.TS. Vũ Triệu Mân
	3	Nguyễn Thị Thuận	Virus cây họ cà	GS.TS. Vũ Triệu Mân
2002	4	Lê Thị Ngọc Hoà	CTV và Greening	GS.TS. Vũ Triệu Mân & TS. Ngô Vĩnh Viễn
	5	Lê Đăng Khoa	PVY trên cây họ cà	GS.TS. Vũ Triệu Mân
	6	Đặng Thị Thương Hiền	PVX trên cây họ cà	GS.TS. Vũ Triệu Mân
	7	Trần Thị Minh Hiếu	Virus trên khoai tây	GS.TS. Vũ Triệu Mân
	8	Lê Xuân Vị	Virus Tristeza (CTV)	GS.TS. Vũ Triệu Mân
	9	Phạm Thị Hạnh	Virus cà chua ToMV	TS. Ngô Bích Hảo
	10	Vũ Thị Thanh Huyền	Bệnh virus và sương mai khoai sọ	GS. TS Vũ Triệu Mân
	11	Lê Thị Thanh Tâm	PVX, PVY trên cây họ cà	GS. TS Vũ Triệu Mân
	12	Cần Văn Hồng	Khảm lá dâu	GS. TS Vũ Triệu Mân
2003	13	Nguyễn Thị Thu Hằng	Virus khoai tây	GS.TS. Vũ Triệu Mân
	14	Nguyễn Trường Vương	Virus Tristeza (CTV)	Th.S Hà Viết Cường
	15	Nguyễn Văn Tinh	Virus khảm lá dâu	GS.TS Vũ Triệu Mân
	16	Phạm Thị Hoa	Bệnh trên hoa lan	GS. TS Vũ Triệu Mân

2004	17	Trương Thị Anh	Virus khảm lá dâu	GS.TS Vũ Triệu Mân
	18	Nguyễn Thị Phương	Virus PVX, PVY	GS.TS Vũ Triệu Mân
	19	Nguyễn Văn Toàn	Greening và CTV trên cây có múi	GS.TS Vũ Triệu Mân, TS. Ngô Vĩnh Viễn
	20	Nguyễn Quốc Hiếu	Greening trên cây có múi	GS.TS Vũ Triệu Mân, TS Ngô Vĩnh Viễn
	21	Nguyễn Đức Thành	Cây chỉ thị bệnh virus	GS.TS Vũ Triệu Mân
	22	Bùi Lan Hương	Virus X, Y trên cây họ cà	GS. TS Vũ Triệu Mân

**Danh sách các học viên cao học (Thạc sỹ) đã tốt nghiệp trong thực hiện
đào tạo trong đề tài KC.04.15**

Năm	TT	Tên học viên	Tên đề tài	Người hướng dẫn
2001	1	Nguyễn Thị Hồng Nhung	Bệnh sáng gân thuốc lá PVY	GS.TS. Vũ Triệu Mân
2002	2	Trần Thị Thanh Bình	Virus hại ngô	GS.TS. Vũ Triệu Mân
	3	Nguyễn Thị Ngọc Lan	Virus cà chua ToMV	PGS. TS Ngô Bích Hào
	4	Trần Thị Hưng	Bệnh nấm trên hạt giống lúa	PGS. TS Ngô Bích Hào
2003	5	Trần Thị Như Hoa	Xoăn vàng lá cà chua	GS.TS. Vũ Triệu Mân
	6	Vũ Thị Thanh Huyền	Bệnh nấm hại hạt giống đậu tương	PGS. TS Ngô Bích Hào
	7	Vũ Mạnh Linh	Mốc sương và héo xanh vi khuẩn ở cà chua	PGS. TS Lê Lương Tế
2004	8	Chu Văn Chuông	Héo xanh vi khuẩn ở cà chua	PGS. TS Lê Lương Tế
	9	Lê Thị Thanh Ngọc	PVX, PVY trên khoai tây; Biện pháp tạo củ giống sạch bệnh	GS.TS. Vũ Triệu Mân
2004-	10	Hà Viết Cường* (Luận án Tiến sĩ)	Chẩn đoán bệnh virus hại cây trồng	GS. James L. Dale GS. TS. Vũ Triệu Mân
2005	11	Đặng Lưu Hoa*	Bệnh thối nõn dưa	GS. Lester W. Burgess GS.TS Nguyễn Kim Vân
	12	Hà Giang*	Bệnh đốm dầu hại cây có múi và biện pháp phòng trừ	GS.TS. Vũ Triệu Mân

Ghi chú: *: đang thực hiện đề tài

2. NHỮNG BÀI BÁO VÀ SÁCH ĐÃ ĐƯỢC XUẤT BẢN TRONG THỜI GIAN THỰC HIỆN ĐỀ TÀI

1. Hà Viết Cường, Đỗ Xuân Đạt, Vũ Triệu Mân, Peter Revill, James Dale, Steven Liew (2001). “Đánh giá sự đa dạng di truyền của virus đốm hình nhẫn đu đủ (*Papaya ringspot virus* Lype P (PRSV-P)) ở miền Bắc Việt Nam bằng kỹ thuật Heteroduplexx Mobility assay (HMA)”. *Tạp chí BVTV*. Số 3.
2. Ngô Bích Hảo và Albrechtsen S. E. (2002). “Phát hiện những virus trên cà chua, ớt cay, ớt ngọt và cà tím và nhận dạng *Tomato mosaic virus* ở miền Bắc Việt Nam”. *Hội thảo Bệnh cây và sinh học phân tử lần thứ 1 tại Trường đại học Nông Lâm - Tp Hồ Chí Minh*.
3. Hà Viết Cường, Trần Thị Như Hoa, Vũ Triệu Mân, Peter Revill và James Dale (2002). “Phát hiện virus gây bệnh trên cây bầu bí ở Việt Nam”. *Hội thảo Bệnh cây và sinh học phân tử lần thứ 1 tại Trường đại học Nông Lâm - Tp Hồ Chí Minh*.
4. Lê Lương Tề, Chu Văn Chuông, Phạm Mỹ Linh, Hà Viết Cường (2002). “Nhận dạng *Ralstonia solanacearum* bằng PCR và đánh giá tính kháng bệnh héo xanh của một số giống cà chua với các dòng vi khuẩn ở Hà Nội - Việt Nam”. *Hội thảo Bệnh cây và sinh học phân tử lần thứ 1 tại Trường đại học Nông Lâm - Tp Hồ Chí Minh*.
5. Hoàng Hoa Long, Lê Như Kiều, Đào Thu Hằng, Vũ Bích Hậu, Nguyễn Hồng Hải, Nguyễn Ngọc Cường (2002). “Giám định vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* bằng kỹ thuật nhân gen PCR (Polymerase Chain Reaction)”. *Hội thảo Bệnh cây và sinh học phân tử lần thứ 1 tại Trường đại học Nông Lâm - Tp Hồ Chí Minh*.
6. Nguyễn Vĩnh Trường, Đặng Lưu Hoa, Lester W. Burgess, Fiona Benyon, Trần Nguyễn Hà, Nguyễn Kim Vân, Ngô Vĩnh Viễn (2002). “Bước đầu nghiên cứu nguyên nhân gây bệnh chết héo hồ tiêu”. *Hội thảo Bệnh cây và sinh học phân tử lần thứ 1 tại Trường ĐH Nông Lâm - Tp Hồ Chí Minh*.

7. Vũ Triệu Mân, Hà Việt Cường, Ngô Bích Hảo, Trần Thị Như Hoa & CTV (2003). "Nghiên cứu sản xuất kháng huyết thanh và Kit ELISA chẩn đoán một số bệnh virus hại thực vật ở Việt Nam". *Hội thảo Bệnh cây và sinh học phân tử lần thứ 2 tại Trường Đại học nông nghiệp I- Hà Nội*.
8. Đoàn Thị Ái Thuyền, Lưu Việt Dũng, Vũ Triệu Mân (2003). "Sử dụng kháng huyết thanh do Trung tâm Bệnh cây nhiệt đới (Đại học Nông nghiệp I) sản xuất trong chẩn đoán một số bệnh virus hại cây trồng". *Hội thảo Bệnh cây và sinh học phân tử lần thứ 2 tại Trường đại học nông nghiệp I- Hà Nội*.
9. Ngô Bích Hảo & CTV (2003). "Một số nghiên cứu về bệnh virus khảm lá cà chua (ToMV) vùng Hà Nội và phụ cận". *Hội thảo Bệnh cây và sinh học phân tử lần thứ 2 tại Trường đại học nông nghiệp I- Hà Nội*.
10. Đỗ Tấn Dũng (2004). "Nghiên cứu bệnh héo xanh vi khuẩn (*Ralstonia solanacearum*) hại một số cây trồng vùng Hà Nội và phụ cận, 1998-2003". *Hội thảo Quốc gia Bệnh hại cây trồng có nguồn gốc từ đất - Đại học Cần Thơ 10/2004*.
11. Ngô Thị Xuyên, Lê Hồng Vĩnh, Brurberg và Hermansen (2004). "Nghiên cứu đặc điểm của nấm *Phytophthora infestans* ở Việt Nam". *Hội thảo Quốc gia Bệnh hại cây trồng có nguồn gốc từ đất - Đại học Cần Thơ 10/2004*.
12. P. A. Revill, C. V. Ha, S. C. Porchun, M. T. Vu, and J. L. Dale (2003). "The complete nucleotide sequence of two distinct geminiviruses infecting cucurbits in Vietnam". *Archives of Virology*.

Sách xuất bản:

13. Vũ Triệu Mân (2003) "Chẩn đoán nhanh bệnh hại thực vật". *NXB Nông nghiệp* (100 trang) (sách in khổ 13 x 19cm)

CÁC KẾT QUẢ CHUYỂN GIAO THỬ NGHIỆM KIT ELISA

(Thử nghiệm và Hợp đồng mua kit)

Kết quả thử nghiệm các loại Kit do Đề tài KC – 04 – 15 sản xuất

Tên cơ quan	Số lượng phản ứng cho mỗi loại Kit						
	PVX	PVY	ToMV	CTV	MuMV	Ralstonia	Phytophthora
TT khảo kiểm nghiệm giống cây trồng TW	3.500	3.500				3.500	
Viện BVTV				4.000		1.000	2.000
Viện KHKT Nông nghiệp	500	500				500	500
Trạm N/C Dầu tằm Việt Hùng	1.000		1.000		3.000		
Viện KTKT Thuốc lá	1.000	1.000	1.000				
Viện Sinh học nhiệt đới Tp Hồ Chí Minh	1.000	1.000	1.000				
Chi cục KDTV Vùng I	24	24	24	24			
Chi Cục KDTV vùng II	24	24	24	24			
Chi cục KDTV vùng IV	24	24	24	24			
Chi cục KDTV vùng V	24	24	24	24			
Chi cục KDTV vùng IX	24	24	24	24			
TT kiểm dịch thực vật sau nhập khẩu I	500	500	500		500	500	500
Tổng	7.620	6.620	3.620	4.120	3.500	5.500	3.000

Ngày 20 tháng 3 năm 2005

GIẤY XÁC NHẬN

Trung tâm Khảo, Kiểm nghiệm giống cây trồng Trung ương xác nhận:

Trong năm 2003 – 2004 – 2005 Trung tâm Bệnh cây nhiệt đới - Trường Đại học Nông nghiệp I Hà Nội đã cung cấp cho chúng tôi kháng huyết thanh virus: khảm lá khoai tây (PVX), khảm nhân khoai tây (PVY), và kháng huyết thanh chẩn đoán vi khuẩn héo xanh (*Ralstonia solanacearum*) để chẩn đoán loại bỏ cây bệnh cho các cơ sở nhân giống thuộc Chương trình sản xuất giống khoai tây Việt Đức tại: Công ty giống cây trồng Trung ương, Trung tâm nghiên cứu rau và Hoa - Đà Lạt, Trung tâm khuyến nông Nam định, Trung tâm UTAD hải Phòng, Công ty Hồng Hà, Vùng khoai tây xã Hà Hồi – Thường Tín.

Các kết quả kiểm tra bệnh đã giúp cho Chương trình khoai tây Việt Đức đảm bảo sản xuất giống đạt chất lượng tốt.

Lượng huyết thanh chúng tôi đã dùng là 3500 phản ứng cho mỗi huyết thanh

KỸ THUẬT VIÊN

T.M BAN GIÁM ĐỐC TRUNG TÂM

THAM GIA KIỂM TRA ELISA

Phó Giám đốc

16

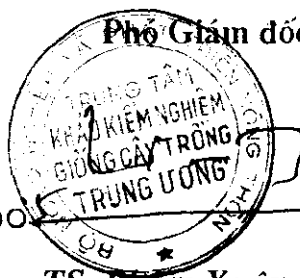
SAO Y BẢN CHÍNH

NGÀY 22 THÁNG 7 NĂM 2005

Th.S Trần Thị Huệ

KHIẾU TRƯỞNG

TRƯỞNG ĐẠI HỌC NÔNG NGHIỆP I TS. Phạm Xuân Liêm



OGS.TS Nguyễn Văn Mườn

Bộ Nông nghiệp và PTNT

Viện Bảo vệ thực vật

Cộng hoà xã hội chủ nghĩa Việt Nam

Độc lập – Tự do – Hạnh phúc

Hà Nội, ngày 18 tháng 4 năm 2005

GIẤY XÁC NHẬN

Viện Bảo vệ thực vật xác nhận các loại kit chuẩn đoán bệnh:

- Virus *Tristera* (CTV) thử trên mẫu lá cây có múi bị bệnh
 - Kit chuẩn đoán vi khuẩn héo xanh *Ralstonia solanacearum* trên cây họ cà và một số cây trồng khác
 - Kit chuẩn đoán các loài nấm *Phytophthora* gây hại trên một số cây trồng
- (Do trường Đại học Nông nghiệp I và đề tài nhánh nghiên cứu sản xuất)

Đã được sử dụng tại Bộ môn bệnh cây – Viện Bảo vệ thực vật có hiệu quả

Kết quả này ứng dụng giám định bệnh nhanh đối với một số cây: cam, quýt, chanh, bưởi và một số cây trồng khác phục vụ cho sản xuất cây ăn quả có múi sạch bệnh và chuẩn đoán nhanh bệnh hại trên cây rau màu, cây ăn quả.

Lượng huyết thanh đã sử dụng:

CTV: 4000 phản ứng

Ralstonia: 1000 phản ứng,

Phytophthora: 2000 phản ứng

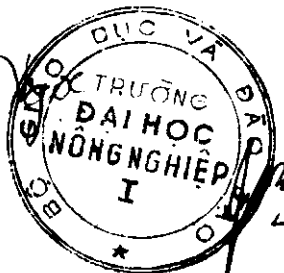
KT Viện trưởng Viện Bảo vệ thực vật

Phó Viện trưởng

lưu giám định mẫu.

Sông?
Ngô Bins

Xác nhận sao y bản, chính



TS. Ngô Vĩnh Viễn

Hiệu phó

TS. Nguyễn Văn Minh

CỘNG HOÀ XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM

Độc lập – Tự do – Hạnh phúc

*****000*****

GIẤY XÁC NHẬN

Sau khi chương trình nghiên cứu, ứng dụng thành công qui trình công nghệ làm sạch bệnh *Greening*, *Tristeza* và một số bệnh vi rút khác, đã được Bộ Nông nghiệp và phát triển Nông thôn cho phép triển khai ở các tỉnh miền Trung và các tỉnh phía Bắc.

Lạng Sơn là một tỉnh phía Bắc mà Viện Bảo vệ thực vật đã chuyển giao tiến bộ khoa học kỹ thuật cho bà con nông dân trồng cây giống có múi sạch bệnh. Với đặc thù của tỉnh Lạng Sơn cây quýt vàng Bắc Sơn là cây đặc sản và cũng là cây chủ lực của tỉnh.

Địa điểm triển khai: huyện Bắc Sơn – Lạng Sơn

Diện tích: Trên 1 ha

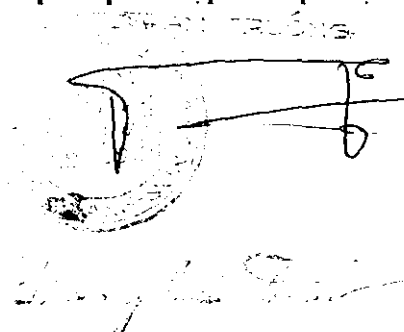
Mô hình trồng mới bằng giống sạch bệnh và qui trình thâm canh cao đã được người dân tin tưởng và yêu cầu cần phát triển thêm diện tích trồng cây quýt vàng Bắc Sơn nói chung và cây ăn quả có múi nói chung.

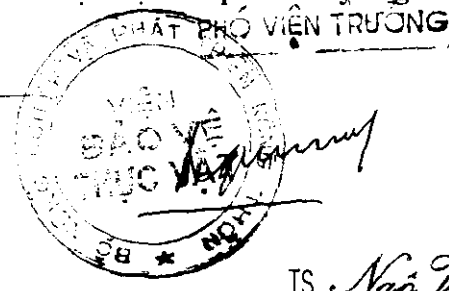
Kính mong quý cơ quan tạo điều kiện giúp đỡ nhiều hơn nữa cho địa phương. Xin chân thành cảm ơn!

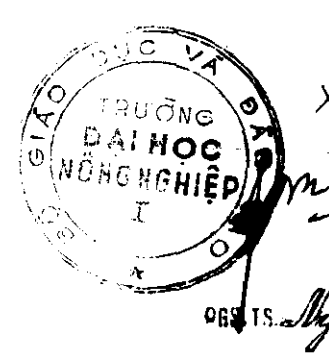
Bắc Sơn, ngày 25 tháng 12 năm 2004

Đại diện cơ quan phối hợp & tiếp nhận

Đại diện cơ quan chuyển giao


Nguyễn Văn Tuấn


TS. Ngô Vĩnh Viên


TS. Nguyễn Văn Tuấn

Xác nhận Sao y bản chính
Hiệu phó

GIẤY XÁC NHẬN

Phòng di truyền miễn dịch – Viện Khoa học kỹ thuật Nông nghiệp Việt Nam đã sử dụng các huyết thanh ở dạng Kit ELISA do Trung tâm bệnh cây nhiệt đới sản xuất, xác nhận:

Kit PVX (Kháng huyết thanh virus X khoai tây)

Kit PVY (kháng huyết thanh virus Y khoai tây)

Hai loại Kit trên dùng chẩn đoán bệnh cây trên đồng ruộng.

Kit Phytophthora (Kháng huyết thanh chẩn đoán các loài nấm *Phytophthora*)

Kit Ralstonia (Kháng huyết thanh chẩn đoán vi khuẩn *Ralstonia solanacearum*)

Hai loại Kit này dùng chẩn đoán nấm và vi khuẩn nuôi cấy trên môi trường nhằm giám định nhanh bệnh hại.

Các loại Kit trên có tính đặc hiệu, đảm bảo chất lượng để có thể dùng để chẩn đoán bệnh phục vụ cho việc chọn giống sạch bệnh.

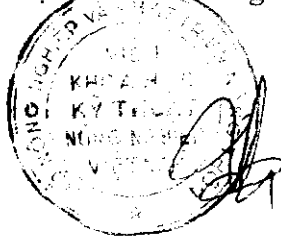
Mỗi loại Kit chúng tôi dùng là 500 phản ứng

Phòng Miễn dịch thực vật

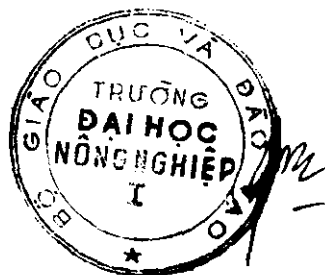
P. Ba1


Nguyễn Thị Bình

Viện KHKT Nông nghiệp Việt Nam



PHÓ VIỆN TRƯỞNG
Phạm Văn Chương



OGS.TS. Nguyễn Văn Minh

Hà Nội, ngày 25 tháng 3 năm 2005

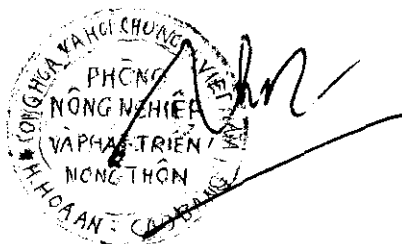
GIẤY XÁC NHẬN

Trong các năm vừa qua, được sự giúp đỡ của đề tài KHCN cấp nhà nước KC 04 -15 trong chương trình điều tra tình hình một số bệnh hại thuốc lá nguy hiểm, sử dụng kỹ thuật ELISA để xác định và ngăn chặn bằng cách loại bỏ nguồn cây bị bệnh virus: Bệnh CMV, Bệnh TMV, Bệnh PVY, bệnh PVX... ngay từ vườn ươm. Trạm nguyên liệu thuốc lá Cao Bằng đã triển khai chọn lọc cây sạch bệnh trên diện tích 10 ha hàng năm tại huyện Hoà An, tỉnh Cao Bằng làm vật liệu khởi đầu để nhân giống cây sạch bệnh virus cung cấp cho các vùng sản xuất thuốc lá nguyên liệu phía Bắc.

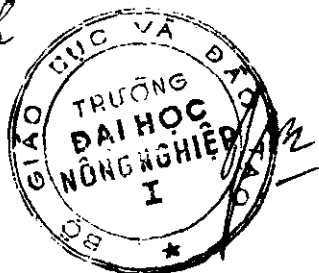
Trạm nguyên liệu thuốc lá Cao Bằng và phòng Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn huyện Hoà An, Cao Bằng đã cùng cộng tác với nhóm đề tài nhánh thực hiện các yêu cầu trên và xác nhận các kết quả của đề tài có tác dụng tốt với sản xuất hiện nay./.

Tổng số mẫu kiểm tra virus là: 4.000 mẫu

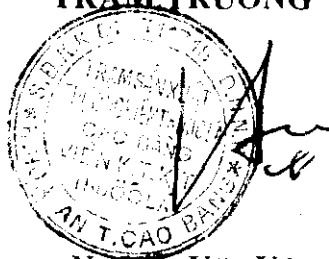
PHÒNG NÔNG NGHIỆP VÀ P.T.N.T
TRƯỞNG PHÒNG



Đinh Quốc Chính



TRAM TRƯỞNG



Nguyễn Văn Vân

06S.TS. *Nguyễn Văn Mườn*

BÁO CÁO KẾT QUẢ
THỬ NGHIỆM KITS ELISA VIRUS ToMV, PVY, PVX

Do Trung Tâm Bệnh cây Nhiệt đới sản xuất

1. Người thực hiện : Đoàn Thị Ai Thuyền, Lưu Việt Dũng
Cán bộ nghiên cứu Viện Sinh học Nhiệt đới, Tp. Hồ Chí Minh
2. Qui trình thử nghiệm: theo qui trình của Trung tâm Bệnh cây Nhiệt đới
3. Đối tượng thử nghiệm: Thuốc lá, Cà tím, Cà bát, Cà pháo, Hồ tiêu, Dưa leo, Dưa lê.
4. Ngày thử : - lần 1 : ngày 7 tháng 5 năm 2003
(không kết quả do trực trực trong quá trình phân tích)
- lần 2 : ngày 26 tháng 6 năm 2003
5. Kết quả thử nghiệm:
 - A/ - Tổng số mẫu thử : 43
- Số mẫu có virus : 13 (chiếm 30,23%).
 - B/ - Số mẫu có virus ToMV: 23,25% (trong tổng số mẫu phân tích)
- Số mẫu có virus PVY: 20,93%
- Số mẫu có virus PVX: 13,95%
 - C/ - Số mẫu có 1 loại virus: 38,48% (trong tổng số mẫu có virus)
- Số mẫu có 2 loại virus : 30,76%
- Số mẫu có 3 loại virus: 30,76%
 - D/ Các giống có virus - phản ứng (+) đối với các loại virus :
 1. Cà tím quả tròn với 3 loại virus ToMV, PVX, PVY
 2. Cà tím quả dài với 3 loại virus ToMV, PVX, PVY
 3. Cà pháo với 3 loại virus ToMV, PVX, PVY
 4. Cà đĩa với 3 loại virus ToMV, PVX, PVY
 5. Dưa leo với ToMV, PVY.
 6. Thuốc lá với virus ToMV.
 - E/ Các giống không có virus - phản ứng (-) đối với ToMV, PVX, PVY:
- Các dòng Hồ tiêu nhận được bằng kỹ thuật nuôi cấy mô in vitro.
6. Kết luận:
 - Qui trình với bộ Kits do Trung tâm Bệnh cây Nhiệt đới sản xuất dễ thực hiện và chính xác.
 - Các giống cây thuộc họ Cà với triệu chứng bị bệnh virus là các mẫu có phản ứng tốt đối với virus ToMV, PVX, PVY.
 - Cần có thêm các bộ Kits đối với các loại virus khác và nghiên cứu thời gian bảo quản Kits lâu hơn.

Xác nhận của cơ quan

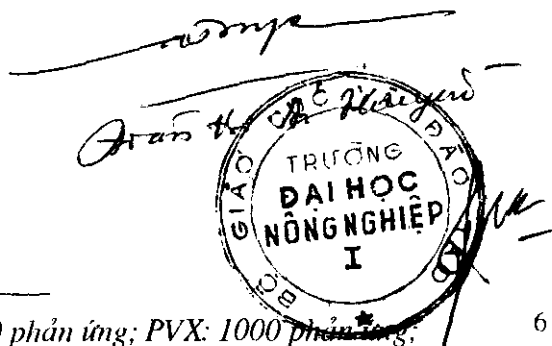
VIỆN TRƯỞNG



Nguyễn Tiến Thống

Thành phố Hồ Chí Minh, ngày 15 tháng 7 năm 2003

Người viết báo cáo:



Ghi chú: ToMV: 1000 phản ứng; PVY: 1000 phản ứng; PVX: 1000 phản ứng;

Ngày 1 tháng 1 năm 2004

GIẤY XÁC NHẬN KẾT QUẢ THỬ NGHIỆM KHÁNG HUYẾT THANH

Vừa qua, Chi cục Kiểm dịch thực vật vùng II... đã tiến hành thử nghiệm kháng huyết thanh của Trung tâm Bệnh cây nhiệt đới Trường Đại học Nông nghiệp I sản xuất gồm các kháng huyết thanh PVX, PVY, TpmV, Tristeza.

Kết quả thử nghiệm:Rất tốt và chính xác.....

Vậy chúng tôi xin làm giấy này kèm theo kết quả thử nghiệm để xác minh kết quả thử nghiệm.

Kiểm dịch viên

Chịu trách nhiệm

Thử nghiệm kháng huyết thanh

Trần Thị Huệ Hà

Trần Thị Huệ Hà

Thanh Quang



Chi cục trưởng

Chi cục Bảo vệ và Kiểm dịch thực vật vùng II...



NGUYỄN HỮU ĐẠT

068.15 Nguyễn Văn Mui

Ngày 24 tháng 9 năm 2004

GIẤY XÁC NHẬN KẾT QUẢ THỬ NGHIỆM KHÁNG HUYẾT THANH

Vừa qua, Chi cục Kiểm dịch thực vật vùng ..IV.... đã tiến hành thử nghiệm kháng huyết thanh của Trung tâm Bệnh cây nhiệt đới Trường Đại học Nông nghiệp I sản xuất gồm các kháng huyết thanh PVX, PVY, ToMV, Tristeza.

Kết quả thử nghiệm: ...Phản ứng rõ rệt, riêng mẫu cam...
các cây đều bệnh (Theo bảng ..I./IV..).....

Này chúng tôi xin làm giấy này kèm theo kết quả thử nghiệm để xác minh kết quả thử nghiệm.

Kiểm dịch viên

Chịu trách nhiệm

Thử nghiệm kháng huyết thanh

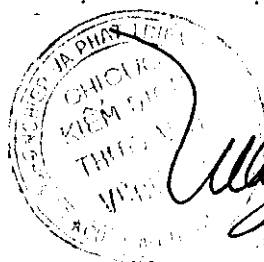
Chi cục trưởng

Chi cục Bảo vệ và Kiểm dịch thực vật vùng IV..

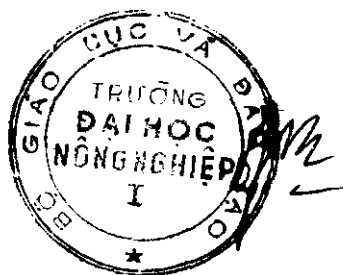
[Signature]

Hà Thị Tam Đình

[Signature]



[Signature]



Ngày 01 tháng 10 năm 2004

GIẤY XÁC NHẬN KẾT QUẢ THỬ NGHIỆM KHÁNG HUYẾT THANH

Vừa qua, Chi cục Kiểm dịch thực vật vùng 5..... đã tiến hành thử nghiệm kháng huyết thanh của Trung tâm Bệnh cây nhiệt đới Trường Đại học Nông nghiệp I sản xuất gồm các kháng huyết thanh PVX, PVY, ToMV, Tristeza.

Kết quả thử nghiệm: Có phản ứng với các kháng huyết thanh PVX, PVY
..... ToMV, Tristeza, cao từ 100%

Vậy chúng tôi xin làm giấy này kèm theo kết quả thử nghiệm để xác minh kết quả thử nghiệm.

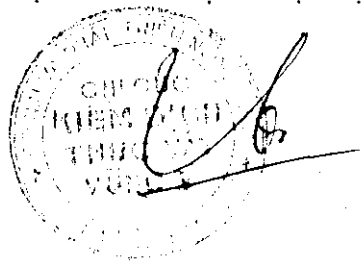
Kiểm dịch viên
Chịu trách nhiệm

Thử nghiệm kháng huyết thanh


Nguyễn Thanh Yên

Chi cục trưởng

Chi cục Bảo vệ và Kiểm dịch thực vật vùng 5.....


Đinh Việt Do



OGS.TS. Nguyễn Văn Mườn

Ngày 29 tháng 9 năm 2004

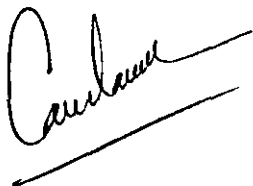
GIẤY XÁC NHẬN KẾT QUẢ THỬ NGHIỆM KHÁNG HUYẾT THANH

Vừa qua, Chi cục Kiểm dịch thực vật vùng ...IX... đã tiến hành thử nghiệm kháng huyết thanh của Trung tâm Bệnh cây nhiệt đới Trường Đại học Nông nghiệp I sản xuất gồm các kháng huyết thanh PVX, PVY, ToMV, Tristeza.

Kết quả thử nghiệm:Như kết quả được kèm sau các mẫu khai tác đã chữa đều khỏe cam bị bệnh 100%.....
Vậy chúng tôi xin làm giấy này kèm theo kết quả thử nghiệm để xác minh kết quả thử nghiệm.

Kiểm dịch viên
Chịu trách nhiệm

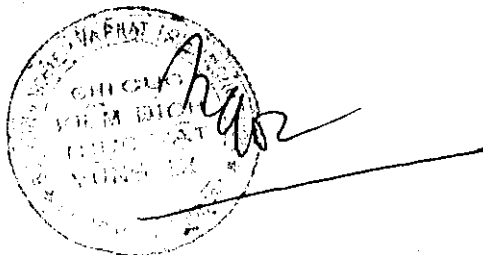
Thử nghiệm kháng huyết thanh



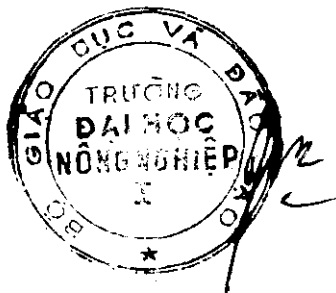
Quân Thị Cẩm Lai

Chi cục trưởng

Chi cục Bảo vệ và Kiểm dịch thực vật vùng ..IX..



Văn Mỹ Ngọc



PGS.TS Nguyễn Văn Mườn

CỘNG HOÀ XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM

Độc lập - Tự do - Hạnh phúc

-----oOo-----

GIẤY XÁC NHẬN

Trung tâm Kiểm dịch thực vật sau nhập khẩu I - Cục Bảo vệ thực vật đã tiến hành sử dụng kháng huyết thanh của các loại virus: PVX, PVY, ToMV, khảm lá dâu (MMV) và kháng huyết thanh của nấm *Phytophthora* spp.; vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* do Trung tâm Bệnh cây nhiệt đới sản xuất để kiểm tra bệnh trên các giống cây nhập nội và cho kết quả tốt, có thể sử dụng để kiểm tra bệnh trên giống cây nhập khẩu.

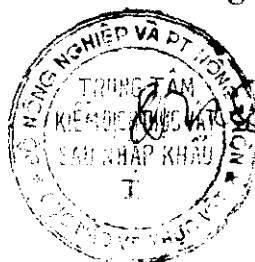
(Mỗi loại huyết thanh đã thử 500 phản ứng)

Người thử nghiệm
Kiểm dịch viên thực vật

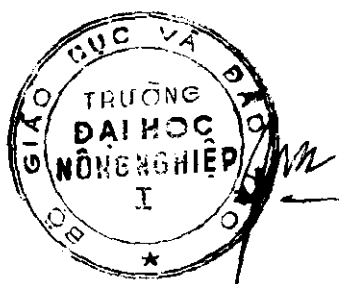


Lê Sơn Hà

Hà Nội, ngày 11 tháng 12 năm 2004
Giám Đốc Trung tâm KDTV SNKI



Ths Lê Đức Đồng



DRS.TS *Nguyễn Văn Mườn*

BÁO CÁO TÓM TẮT KHOA HỌC VÀ KỸ THUẬT ĐỀ TÀI

Tên đề tài:

**"NGHIÊN CỨU CÁC GIẢI PHÁP CÔNG NGHỆ SINH HỌC TRONG SẢN XUẤT
VÀ THỬ NGHIỆM CÁC LOẠI KIT CHẨN ĐOÁN BỆNH HẠI CÂY TRỒNG"**

Mã số: KC - 04 - 15

Cơ quan chủ trì: Trường Đại học Nông nghiệp I - Hà Nội

Chủ nhiệm đề tài: GS.TS. Vũ Triệu Mân

Hà Nội , 3 - 2005

*Bản quyền 2005 thuộc Trường Đại học Nông nghiệp I - Hà Nội
Đơn xin sao chép toàn bộ hoặc từng phần phải gửi tới Hiệu trưởng Trường
ĐH Nông nghiệp I - Hà Nội trừ trường hợp sử dụng với mục đích nghiên cứu*

DANH SÁCH NHỮNG NGƯỜI THỰC HIỆN

STT	Cán bộ tham gia nghiên cứu	Cơ quan công tác	Số tháng làm việc cho đề tài
1	GS.TS.Vũ Triều Mân	Trung tâm NCBCNĐ	12/12
2	PGS. TS. Ngô Bích Hào	Nt	Nt
3	Th.S Hà Viết Cường	Nt	Nt
4	TS. Nguyễn Văn Viên	Nt	Nt
5	TS. Đỗ Tấn Dũng	Nt	Nt
6	KS. Đặng Lưu Hoa	Nt	Nt
7	Ths. Trần Thị Như Hoa	Nt	Nt
8	Ths. Nguyễn Thị Ngọc Lan	Nt	Nt
9	TS. Đặng Thi Dung	Nt	Nt
10	PGS.TS. Nguyễn Kim Oanh	Nt	Nt
11	PGS.TS. Nguyễn Văn Tuất	Viện BVTV	8/12
12	KS. Hà Bích Thu	Nt	12/12
13	KS. Nguyễn Thanh Thuý	Nt	Nt
14	KS. Tạ Hoàng Anh	Nt	Nt
15	TS. Nguyễn Ngọc Cường	Viện Di truyền NN	8/12
16	TS. Lê Như Kiều	Nt	12/12
17	KS. Đào Thị Thu Hằng	Nt	Nt
18	KS. Vũ Bích Hậu	Nt	Nt
19	KS. Hoàng Hoa Long	Nt	Nt
20	KS. Lương Văn Chính	Nt	Nt
21	TS. Phạm Văn Vương	TT nghiên cứu đầu tằm tơ	8/12
22	TS. Nguyễn Văn Biếu	Viện KTKT thuốc lá	8/12
23	TS. Trần Kim Loang	Viện KHKT nông lâm nghiệp Tây Nguyên	8/12
24	Th.S Đào Thị Lan Hoa	Nt	Nt
25	TS. Cao Anh Dương	Viện nghiên cứu mía đường	Nt
26	KS. Phan Tường Lộc	Viện sinh học nhiệt đới Tp HCM	
27	KS. Đoàn Thị ái Thuyền	Nt	8/12
28	PGS. Nguyễn Kim Giao	Viện Vệ sinh dịch tễ Hà Nội	4/12
29	KS. Nguyễn Thị Minh Liên	Nt	Nt
30	KS. Dương Thiên Tước	Hội sinh vật cảnh Hà Nội	4/12

Ghi chú: PGS.TS. Nguyễn Văn Đĩnh, PGS.TS. Nguyễn Văn Viết chúng tôi có ghi vào danh sách tham gia đề tài trong thuyết minh, nhưng sau này không tham gia đề tài do bận công tác.

MỤC LỤC

I. LỜI MỞ ĐẦU	4
II. NỘI DUNG BÁO CÁO	5
2. 1. Đối tượng nghiên cứu của đề tài	5
2.1.1. Điểm tên các đối tượng nghiên cứu	5
2.1.2. Tổng quan tình hình nghiên cứu ngoài nước và trong nước về các đối tượng nghiên cứu của đề tài	5
2.3. Mục tiêu và nội dung nghiên cứu của đề tài	9
III. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	10
3.1. Vật liệu	10
3.2. Phương pháp nghiên cứu	10
3.2.1. Phương pháp chọn lọc mẫu và điều tra trên đồng ruộng	10
3.2.2. Phương pháp nghiên cứu trong phòng thí nghiệm	10
3.2.3. Phương pháp gây miễn dịch cho động vật và tạo kháng huyết thanh	11
3.2.4. Phương pháp sản xuất Kit ELISA	11
IV. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU CỦA ĐỀ TÀI	11
4.1. Sản xuất kháng huyết thanh chẩn đoán virus Y (PVY)	11
4.2. Sản xuất kháng huyết thanh chẩn đoán virus X	12
4.3. Sản xuất kháng huyết thanh virus ToMV	14
4.4. Sản xuất kháng huyết thanh virus CTV	15
4.5. Sản xuất kháng huyết thanh virus khảm lá dâu	17
4.6. Sản xuất kháng huyết thanh nấm <i>Phytophthora</i> sp.	19
4.7. Sản xuất kháng huyết thanh nấm <i>Phytophthora</i> sp.	20

4.8. Lựa chọn phương pháp PCR trong chẩn đoán bệnh Greening	21
4.9. Các ứng dụng của kháng huyết thanh và kết quả bước đầu giúp cho việc phòng chống bệnh hại.....	22
4.10. Vật liệu có hàm lượng protein. RNA và DNA cao của nguyên nhân gây bệnh để có thể sản xuất 170.000 liều phản ứng (theo tiêu chuẩn INRA Pháp 1989).....	22
4.11. Chọn lọc 3 quy trình công nghệ ELISA – Indirect, DAS – ELISA và PCR	23
4.11.1. Quy trình ELISA – Indirect	23
4.11.2 Quy trình DAS – ELISA (Phương pháp ELISA trực tiếp)	23
4.11.3. Chẩn đoán Greening bằng phương pháp PCR (Theo Hung T. H, Wu. M. J và Su. H. J, 1999)	23
4.12. Chọn 4 phương pháp sử dụng kit phù hợp điều kiện ở Việt Nam ..	24
4.13. Tiêu chuẩn chất lượng của kháng huyết thanh và Kit ELISA – Direct, Kit ELISA – Indirect và phương pháp PCR chẩn đoán bệnh Greening	25
4.13.1. Tiêu chuẩn cho việc thực hiện phản ứng ELISA - Direct (DAS - ELISA).....	25
4.13.2. Tiêu chuẩn cho việc thực hiện phản ứng ELISA - Indirect.....	25
4.13.3. Tiêu chuẩn chất lượng phản ứng PCR chẩn đoán bệnh Greening	25
4.14. Kết quả đào tạo các học viên cao học và sinh viên.....	26
4.15. Những bài và sách đã xuất bản trong thời gian thực hiện đề tài....	28
V. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	29
5.1. Kết luận	29
5.2. Kiến nghị.....	30

PHẦN CHÍNH BÁO CÁO

I. LỜI MỞ ĐẦU

Ở Việt Nam, các bệnh hại do virus tàn lụi cây cam, chanh Tristeza và bệnh vi khuẩn Greening gây ra là bệnh hại nghiêm trọng ở các vùng trồng cam chanh và cây có múi. Bệnh virus X, virus Y và virus ToMV làm ảnh hưởng đến sản xuất cà chua, khoai tây, các loại rau, cây dược liệu, hoa cây cảnh và gây nhiều thiệt hại cho các vùng nguyên liệu thuốc lá. Virus khảm lá cây dâu MuMV làm ảnh hưởng đến nguồn thức ăn cho tằm, dẫn đến giảm sản lượng tơ kén.

Bệnh do nấm *Phytophthora* sp và vi khuẩn héo xanh *R. solanacearum* là những bệnh phá hoại trên một phạm vi rộng từ cây hàng năm như khoai tây, cà chua và các cây rau họ cà đến các cây ăn quả, cây công nghiệp như dừa, cam, quýt, xoài, hồ tiêu, cà phê...

Việc chẩn đoán bệnh tại Việt Nam những năm trước đây chủ yếu dựa vào mắt thường, sau đó là dựa vào các phương pháp nuôi cấy phân lập vi sinh vật, lây bệnh nhân tạo, quan sát, đo đếm vi sinh vật gây bệnh nhờ kính hiển vi quang học thông thường. Với virus, một nguyên nhân gây bệnh rất nhỏ bé, ở nước ta chủ yếu vẫn dùng phương pháp đơn giản là quan sát triệu chứng, lây bệnh nhân tạo bằng cơ học hay bằng côn trùng rồi dựa vào đó, kết luận về nguyên nhân và phương pháp phòng trừ bệnh. Các phương pháp hiển vi điện tử, sinh học phân tử rất ít được ứng dụng trong chẩn đoán vì giá thành cao, không đáp ứng nhu cầu của thị trường. Tuy nhiên ngày càng nhiều cơ sở sản xuất và nghiên cứu liên quan đến việc xuất nhập khẩu các sản phẩm nông nghiệp mong muốn được sử dụng phương pháp ELISA (phương pháp miễn dịch liên kết men) để kiểm tra hàng xuất nhập khẩu và các vật liệu thực vật hoàn toàn sạch bệnh phục vụ cho những nghiên cứu lai tạo giống vì phương pháp này có độ chính xác cao, giá thành hạ và có thể thực hiện hàng ngàn phản ứng cùng một lúc.

Kháng huyết thanh và kit ELISA trên thị trường thế giới và ở Việt Nam có khá nhiều chủng loại và rất phong phú, nhưng cũng thể hiện những tồn tại sau:

- Giá cả còn quá cao so với một số nước nghèo như Việt Nam. Bộ kit thông thường giá rẻ nhất khoảng trên dưới 200 Euro hay đô la; bộ kit đắt tiền từ 400-600 Euro hay đô la.

- Có rất nhiều bệnh hại ở Việt Nam có tính chất nhiệt đới hay cục bộ ở địa phương thì không có hãng sản xuất nào trên thế giới cung cấp huyết thanh và kit ELISA cho các loại bệnh này, bởi vì nhu cầu tiêu thụ chỉ giành riêng cho Việt Nam

và khối lượng sản xuất dù khá lớn cũng không bằng khối lượng của các loại kit khác của các bệnh phổ biến khắp nơi trên thế giới.

Trong khi đó, tại Việt Nam, kinh tế thị trường phát triển mạnh và việc hội nhập vào WTO ngày càng đến gần, nhu cầu sử dụng kháng huyết thanh và kit ELISA ngày một tăng.

Với nhiều lý do trên, chúng tôi đã xây dựng đề tài: “Nghiên cứu các giải pháp công nghệ sinh học trong sản xuất và thử nghiệm các loại kit chẩn đoán bệnh hại cây trồng”

Mã số KC. 04.15

Thời gian thực hiện: 2001-2004

II. NỘI DUNG BÁO CÁO

2. 1. Đối tượng nghiên cứu của đề tài

2.1.1. Điểm tên các đối tượng nghiên cứu

- a. Bệnh khảm nhân lá khoai tây: *Potato virus Y* (PVY)
- b. Bệnh khảm lá khoai tây: *Potato virus X* (PVX)
- c. Bệnh virus khảm lá cà chua: *Tomato mosaic virus* (ToMV)
- d. Bệnh tàn lụi cây cam chanh: *Citrus Tristeza virus* (CTV)
- e. Bệnh virus khảm lá dâu: *Mullberry Mosaic virus* (MuMV)
- f. Bệnh mốc sương do nấm *Phytophthora* sp
- g. Bệnh vi khuẩn héo xanh cây họ cà: *Ralstonia solanacearum*
- h. Bệnh vi khuẩn vàng lá Greening hại cam chanh.

2.1.2. Tổng quan tình hình nghiên cứu ngoài nước và trong nước về các đối tượng nghiên cứu của đề tài

a. Virus khảm nhân lá khoai tây: *Potato virus Y* (PVY)

Virus Y được xếp vào nhóm Potyvirus, là virus rất phổ biến ở nước ta và các nước trên thế giới, gây tác hại lớn trên các cây họ cà, họ rau dền, họ rau muống và một số ít cây công nghiệp như hồ tiêu, thuốc lá... Bệnh được truyền nhờ rệp đào (*Myzus persicae*) và rệp bông (*Aphis gossypii*) vì vậy, bệnh phát tán nhanh và thiệt hại lớn nhất trên khoai tây và một số cây trồng (Hà Minh Trung và ctv, 1975 ; Vũ Triệu Mân, 1985). PVY gây thiệt hại năng suất ở các vùng sản xuất khoai tây lớn trên thế giới từ 20 –80% năng suất tùy theo tình hình canh tác, khí hậu và chủng virus (Delgado-Sanchez, S.1970 ; Peter, W. 1971 ; Harrison, 1982)

Ở Việt Nam, kháng huyết thanh PVY đã được làm theo phương pháp của Viện Bảo vệ thực vật Ucraina vào những năm 80 nhưng không đạt kết quả tốt vì phương pháp này quá đơn giản, virus được làm sạch với số lượng rất ít và khả năng gây miễn dịch thấp, nên trong nhiều năm sau việc sản xuất thử này không được làm lại.

b. Virus khảm lá khoai tây: *Potato virus X (PVX)*

PVX được xếp vào nhóm Potexvirus. PVX có phổ ký chủ tự nhiên và thí nghiệm rất rộng. PVX lây nhiễm trên 240 loài thực vật thuộc 16 họ. Edwardson và Christie (1997), phổ ký chủ trong tự nhiên của PVX ít nhất là 62 loài thực vật thuộc 27 họ và được lây nhiễm thực nghiệm tới 348 loài thực vật thuộc 33 họ. PVX có mặt khắp mọi nơi trên thế giới.

Thiệt hại do PVX gây ra sẽ lớn hơn rất nhiều khi PVX cùng có mặt và gây hại với các virus khác đặc biệt là potato virus Y (PVY), *Potato virus A (PVA)* hoặc potato virus S (PVS). Bệnh khoai tây nhân lá do PVX và PVA gây ra ở Nam Mỹ và Châu Âu, làm cho cây bị lùn bụi, lá biến vàng, giòn, dẫn đến cây bị chết. Tại ý năng suất khoai tây giảm 40% bởi sự gây hại đồng thời của 2 virus này. Khi PVX và PVY gây hại đồng thời trên khoai tây và thuốc lá, năng suất có thể bị giảm 10 lần so với nhiễm riêng một mình PVX.

Nghiên cứu về sự gây hại của virus PVX ở Việt Nam, năm 1976, Hà Minh Trung và Nguyễn Phương Đại (Viện Bảo vệ thực vật) đã điều tra virus khoai tây và kết luận là các virus X, Y, S, M đã nhiễm với tỷ lệ 10.3 – 66.1% số mẫu điều tra.

Năm 1979, tại Pháp, Vũ Triệu Mân đã xác định được 2 chủng là XV1 và XV2 cùng tồn tại trên giống Ackersegen. Hệ thống sản xuất cây sạch bệnh theo dòng và quần thể đã được thử nghiệm để chống bệnh virus X và virus Y ở Việt Nam (Nguyễn Văn Viết, 1985; Vũ Triệu Mân, 1987). Cũng như kháng huyết thanh virus Y, virus X đã được sản xuất thử nghiệm trong những năm 80 ở trường ĐH Nông nghiệp I và Viện BVTV nhưng chưa đạt kết quả mong muốn.

c. Virus khảm lá cà chua: *Tomato mosaic virus (ToMV)*

Virus ToMV có phạm vi ký chủ rất rộng: trên 127 loài thuộc 23 họ thực vật.

Virus ToMV gây hại ở hầu hết các vùng trồng cà chua trên thế giới. Cà chua bị nhiễm virus ToMV năng suất có thể giảm từ 5 – 50% (Alexander, 1952; Crill, 1973), thậm chí còn cao hơn nếu cà chua bị nhiễm đồng thời các virus khác (Uschdrweit, 1952). Cây còi cọc, phẩm chất quả bị giảm, giống bị thoái hoá. Khi hạt bị nhiễm virus ToMV việc xử lý hạt sẽ làm tăng chi phí trong sản xuất, làm giảm sức sống của hạt và cây con. Ở Bắc Carolina, bệnh virus hại cà chua gây thiệt hại kinh tế từ 5 – 90% phụ thuộc chủng virus, giống cà chua, tuổi cây và nhiệt độ.

Nghiên cứu virus ToMV trên các mẫu hạt giống cà chua, ớt, các loại cà khác; các tác giả đã xác định chủng virus phổ biến và gây hại ở Việt Nam là chủng 0 và chủng 1. Các chủng này gây triệu chứng khảm lá, biến dạng lá cà chua và một số cây thuộc họ cà (Ngô Bích Hảo và Viện hạt giống Đan Mạch, 2000).

Kháng huyết thanh ToMV và Kit ELISA chưa được sản xuất ở Việt Nam.

d. Bệnh tàn lụi cây cam chanh do *Citrus Tristeza virus* (CTV)

Virus Tristeza gây bệnh tàn lụi cam, chanh và các cây có múi có thể xuất hiện từ vùng Đông Nam Châu Á. Nơi cội nguồn của các cây có múi nơi dùng gốc ghép phổ biến là cây cam chua và bưởi.

Bệnh Tristeza và Greening luôn là mối đe dọa nghiêm trọng năng suất, làm cây cam tàn lụi nhanh chóng. Năm 1960, Cuba đã giúp Việt Nam nghiên cứu bệnh cây có múi. 1963 đã thống kê được 60 bệnh và côn trùng ở Việt Nam trong đó bệnh Tristeza và Greening là hai bệnh có vị trí quan trọng nhất (Viện sĩ Canchaveli L. A. 1963).

Năm 1983 bằng mẫu cam thu từ tỉnh Hải Dương, Nguyễn Văn Mẫn và Phạm Quý Hiệp đã tìm thấy virus Tristeza và Phytoplasma gây bệnh. Tác giả Nguyễn Văn Mẫn đã chế tạo thử kháng huyết thanh CTV. Từ năm 1988 – 1994 Vũ Triệu Mân, Nguyễn Văn Mẫn, Nguyễn Kim Giao dùng phương pháp hiển vi điện tử và ELISA đã tìm thấy virus Tristeza và bệnh Greening trên 10 giống cây có múi ở các tỉnh Cần Thơ, Đồng Nai, Hoà Bình, Hà Tây....

Theo Vũ Triệu Mân, Hà Minh Trung và các ctv (1996 – 1997) bệnh khá phổ biến ở khắp các vùng trồng cây có múi tại Việt Nam và đặc biệt là cây bệnh thường nhiễm hỗn hợp cùng một lúc cả virus Tristeza và vi khuẩn gây bệnh Greening.

e. Virus khảm lá dâu: *Mullberry Mosaic virus* (MuMV)

Virus khảm lá dâu được truyền qua hơn 30 loài rệp, trong đó rệp bông (*Aphis gossypii*), rệp đào (*Myzus persice*) là những loài truyền mạnh nhất (O'bien R.G. 1997).

Bệnh virus hại dâu đã được phát hiện khá sớm và có ở hầu hết ở các vùng trồng dâu trên thế giới như Nhật Bản, Liên Xô cũ, Italia, Việt Nam.... Khi bị bệnh cành cây nhỏ và ngắn lại, lá nhỏ dễ rụng, phát sinh nhiều cành tăm, gây khó khăn cho việc thu hái. Sau khi đốn hè vào tháng 4 – 5 thì tháng 6 – 8 bệnh xuất hiện nhiều, vườn dâu bị hại nghiêm trọng với tỷ lệ bệnh cao lên tới 90% ở Trung Quốc (Trương Bạch Lâm., 1969). Ở Nhật Bản kết quả điều tra cho thấy 28% diện tích dâu bị nhiễm bệnh khảm lá dâu, trong đó 5% diện tích nhiễm bệnh đã không cho thu hoạch. Virus khảm lá dâu không những làm ảnh hưởng đến năng suất mà còn làm ảnh hưởng đến

thành phần sinh hoá trong lá. Năm 1995, Vũ Triệu Mân và Ngô Bích Hảo lần đầu tiên đã nghiên cứu phát hiện bệnh virus hại cây Dâu và xác định rệp bông *Aphis gossypii* truyền bệnh theo kiểu không bền vững. Vũ Triệu Mân- Nguyễn Kim Giao - Nguyễn Thị Minh Liên và ctv đã chụp ảnh được virus khảm lá dâu trong tế bào cây bệnh bằng phương pháp lát cắt cực mỏng. Ở Việt Nam và các nước kháng huyết thanh virus dâu chưa được sản xuất.

f. Nấm gây bệnh mốc sương *Phytophthora* sp.

Nấm *Phytophthora* sp. thuộc lớp nấm noãn Oomycetes. Lớp Oomycetes có 76 loài nấm và có tính đa dạng sinh học cao, bao gồm những loài nấm sống thuỷ sinh, bán thuỷ sinh và sống hoàn toàn trên môi trường cạn.

Năm 2000, ở nước Nga – nước có sản lượng khoai tây thứ 2 thế giới, bệnh mốc sương làm giảm 15% sản lượng (Anon, 2001). Năm 2001, trên thế giới chi phí cho thuốc hoá học để phòng trừ bệnh này ước tính khoảng 3 tỷ đô la.

Ở Việt Nam, bệnh mốc sương do nấm *Phytophthora* đã được nghiên cứu tương đối sớm. Vũ Hoan cho biết: ở ngoại thành Hà Nội những năm 1960 – 1965, thiệt hại trung bình do nấm *P. infestans* gây ra biến động từ 30 – 70%, có khi mất 100% không cho thu hoạch.

Theo Lâm Thị Mỹ Nương (1994) bệnh thối gốc chảy gôm ở cam quýt do nấm *Phytophthora* gây hại trên tất cả các bộ phận của cây từ giai đoạn vườn ươm, thu hoạch và sau thu hoạch. Theo Vũ Công Hậu (1999) cam quýt bị nhiều bệnh hại nguy hiểm đặc biệt là chảy gôm do nấm *Phytophthora citrophthora*. Ngô Vĩnh Viễn, Đặng Lưu Hoa và L.W. Burgess (2000) đã xác định nguyên nhân gây bệnh thối nõn dứa là do nấm *Phytophthora* sp. nguyên nhân gây bệnh là do nấm *P. nicotianae*, *P. palmivora*, *P. cinnamomi* trong đó *P. nicotianae* là nguyên nhân chính. Ở Việt Nam chưa dùng Kit ELISA để chẩn đoán bệnh.

g. Vi khuẩn héo xanh *Ralstonia solanacearum*

Bệnh héo xanh do vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi gây ra. Bệnh ngày càng gây hại nghiêm trọng ở nhiều vùng trên thế giới do vi khuẩn có phạm vi kí chủ rộng: tới 35 họ thực vật và bao gồm hơn 200 loài cây (Kelman, 1953).

Ở Srilanka, bệnh phá hại vào năm 1930, làm chết 81.5% số cây giống khoai tây Marglobe và 47% số cây giống Talatuoya (Abeyguna Wardena, D. V. 1963).

Bệnh cũng xuất hiện trên nhiều loại cây trồng ở Malaysia (Mehan, V. K. 1986). Lạc bị nhiễm bệnh với tỷ lệ 5-20% bệnh là nguyên nhân chính làm giảm diện tích trồng từ 5.197 ha (1980) còn 1.318 ha (1986) và giảm sản lượng từ 19,437 tấn còn 5000 tấn (Hamidah, S. 1993).

Ở Việt Nam, tại Nghệ An bệnh đã gây chết 10-30% số cây lạc (Đặng Thái Thuận, 1968). Bệnh làm chết từ 20-30% số cây ở Long An và Tây Ninh (Nguyễn Thị Ly và ctv, 1991), trong khi đó, ở Nghệ An và Thanh Hoá bệnh làm chết 15-35% (Nguyễn Xuân Hồng và ctv, 1992).

Bệnh héo xanh vi khuẩn là một trong những bệnh phổ biến ở một số vùng trồng thuốc lá như Hà Tây, Bắc Giang, Cao Bằng và Lạng Sơn (Nguyễn Văn Biếu và ctv, 1996).

Theo nhiều tác giả bệnh héo xanh đã gây thiệt hại nặng trên cây họ cà, có nhiều ruộng bị chết 100% số cây trên diện tích 1 vài ha như thuốc lá ở Ba Vì hoặc bị chết rải rác trên cà chua và khoai tây ở các tỉnh đồng bằng Sông Hồng (Lê Lương Tề, Đoàn Thị Thanh, Đỗ Tấn Dũng và Vũ Triệu Mân)

h. Bệnh vàng lá Greening

Bệnh vàng lá cam quýt phổ biến ở các vùng trồng cam quýt trên thế giới như ở Châu Mỹ: Achantina, Califocnia..., Châu Phi: Maroc, Nam Phi, Tuynidi... Châu á: Ấn Độ, Trung Quốc, Indonesia, Việt Nam, Châu Âu: Tây Ban Nha, Ý.

Năm 1978, J.M.Bové và M. Ganier đã nghiên cứu bằng kính hiển vi điện tử và thấy có nhiều tiểu thể Phytoplasma ở các mẫu thu thập có cấu tạo lớp màng khá hoàn chỉnh gần giống với vi khuẩn và do đó đặt tên là Bacterie like organism (BLO).

Ở Việt Nam, trong thành phần bệnh hại cam quýt thì bệnh Greening là phổ biến và gây hại nghiêm trọng nhất. Theo Vũ Khắc Nhượng (1960 – 1970) nhiều vườn cam ở Phú Quỳ (Nghệ An), Thanh Hoá bị nhiễm bệnh với tỷ lệ 50 – 60 %. Những năm 80 các vùng trồng cam miền bắc như Nghệ An, Thanh Hoá, Hoà Bình với tỷ lệ bệnh 60 – 100%, trong đó 30 – 40 % không cho thu hoạch. Bệnh ngày càng gia tăng theo số liệu thống kê năm 1989 diện tích trồng cam quýt ở đồng bằng sông Cửu Long là 3309 ha đã giảm xuống còn 2325 ha vào năm 1993.

Tác giả Hà Minh Trung và ctv đã nghiên cứu về sự truyền bệnh của rệp chổng cánh (*Diaphorina citri*). Vũ Triệu Mân và Nguyễn Kim Giao đã phát hiện bệnh Greening trên các mẫu cam ở vùng Cần Thơ. Lê Thị Thu Hồng đã phát hiện bệnh Greening gây hại ở miền tây Nam Bộ và sử dụng phương pháp PCR để giám định bệnh.

2.3. Mục tiêu và nội dung nghiên cứu của đề tài.

Mục tiêu của đề tài là: Chẩn đoán chính xác bệnh hại bằng ELISA. Hoàn chỉnh kỹ thuật sản xuất kháng huyết thanh

Nội dung của đề tài: là sản xuất các loại Kit ELISA của các virus Y, X, ToMV, MuMV, CTV và Kit ELISA của các loại nấm *Phytophthora*, vi khuẩn *Ralstonia*

solanacearum, chẩn đoán bệnh Greening bằng phương pháp PCR và thử nghiệm phòng chống bệnh.

III. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

3.1. Vật liệu

Mẫu bệnh virus được thu từ ngoài đồng được bảo quản trong tủ lạnh -20°C , hoặc bảo quản khô trong lọ có chứa Silicagel và bảo quản trong tủ lạnh 4°C . Mẫu nấm, vi khuẩn được thu thập ngoài đồng, phân lập trên các môi trường chuyên tính PSM, SPA, được khuếch tán và bảo quản trong tủ lạnh 4°C .

3.2. Phương pháp nghiên cứu

3.2.1. Phương pháp chọn lọc mẫu và điều tra trên đồng ruộng

a. Phương pháp điều tra

Các bệnh được nghiên cứu, điều tra đồng ruộng theo phương pháp 5 điểm chéo góc hay phương pháp điều tra hàng cách hàng, điều tra 500 cây (khóm)/ruộng (xem hình A và B). Ruộng nhỏ, phân tán điều tra 100% số cây. Cây ăn quả điều tra mỗi điểm 3 cây.

Tỷ lệ phần trăm cây bị bệnh được tính theo công thức:

$$\text{Tỷ lệ bệnh (\%)} = \frac{A}{B} \times 100$$

Trong đó: A : là số cây bệnh
B: là tổng số cây điều tra

3.2.2. Phương pháp nghiên cứu trong phòng thí nghiệm

- Với nấm *Phytophthora* sp. Phân lập chủ yếu trên môi trường PSM, ngoài ra còn sử dụng môi trường đậu Hà Lan, môi trường lúa mạch và bột ngô

- Vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* phân lập, nuôi cấy chủ yếu trên môi trường SPA và 2 môi trường TZC, PDA.

- Mẫu virus được nghiền trong dung dịch đệm photphat 0,01M, pH = 7 và lây bệnh nhân tạo cho cây chỉ thị để tạo vật liệu khởi đầu cho các thí nghiệm làm tinh khiết virus sau này. Các cây chỉ thị được sử dụng gồm:

Virus PVX, PVY lây trên cây *Nicotiana tabacum* var. *xanthi*. Virus ToMV lây trên cây *Nicotiana glutinosa*. Virus CTV được ghép trên gốc ghép các cây của giống: Bưởi chua (*Citrus maxima* Osbeck), bưởi Phúc Trạch (*C. grandis* L), Cam đường canh (*C. reticulata*), Cam chua HD (*C. sinen* – hybrid HD), cam sành (*C. nobilis* Lour), cam xã Đoài (*C. sinensis* Osbeck), Quýt chum (*C. reticulata* Blanco), cháp (*C. granhyhybrid*), chanh tàu (*C. limon*), chanh sần (*C. jambhiri*)

Virus dầu MuMV được lây bệnh trở lại trên cây dâu trong nhà cách ly. Sau khi có triệu chứng bệnh điển hình, chúng tôi thu mẫu và làm tinh khiết virus.

3.2.3. Phương pháp gây miễn dịch cho động vật và tạo kháng huyết thanh.

Sau khi thu thập mẫu kháng nguyên được làm tinh khiết qua một hệ thống làm sạch. Dịch sạch thu được được gây miễn dịch cho thỏ thông qua nhiều lần tiêm: vào cơ bắp, dưới da, vào xoang bụng hay qua tĩnh mạch tai thỏ. Khi tiêm vào cơ bắp thường sử dụng Adjuvant với lượng 50%. Sau 4 tuần tiêm, chúng tôi lần lượt thử máu đến lúc phản ứng xảy ra ở mức cao – sẽ lấy máu của động vật thí nghiệm để lọc lấy kháng huyết thanh. Kháng huyết thanh được trộn với Glycerin 50% và thêm NaN_3 để bảo quản trong lạnh 4°C và trong -20°C và pha chế Kit ELISA tùy theo từng virus, nấm, khuẩn.

3.2.4. Phương pháp sản xuất Kit ELISA

Từ kháng huyết thanh đã được sản xuất, chúng tôi đã thực hiện việc sản xuất Kit ELISA để sử dụng theo phương pháp trực tiếp (DAS – ELISA) hay phương pháp gián tiếp (ELISA – Indirect): tức là sử dụng IgG tách ra từ sản phẩm kháng huyết thanh hay để nguyên kháng huyết thanh pha loãng và sử dụng.

IV. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU CỦA ĐỀ TÀI

4.1. Sản xuất kháng huyết thanh virus Y (PVY).

4.1.1. Sản xuất kháng huyết thanh chẩn đoán virus PVY

Chúng tôi chuẩn bị cây *N. tabacum* var. *xanthi* trong nhà lưới cách ly, sau 8 – 10 ngày sau lây, khi cây có triệu chứng điển hình thu thập mẫu để làm sạch kháng nguyên. Làm sạch virus PVY (Theo Van Regenmort, 1983)

Đánh giá kháng huyết thanh sản xuất

Bảng 1: Xác định độ hoà loãng thích hợp của kháng huyết thanh sản xuất

Thời gian ủ	Độ hoà loãng kháng nguyên kháng thể	Giá trị mật độ quang ở 405 nm			
		1/2	1/10	1/20	1/50
1,5 h	1/200	1.330	1.122	1.012	0.967
	1/500	1.290	1.104	0.958	0.853
	1/1000	1.088	1.055	0.909	0.775
3h	1/200	1.277	1.174	1.048	0.931
	1/500	1.216	1.144	1.012	0.858
	1/1000	1.194	1.110	0.965	0.814

Theo bảng 1, các độ hoà loãng của kháng huyết thanh đều có thể nhận biết được virus PVY trong cây nhiễm bệnh. Nhưng mức độ giảm dần theo độ pha loãng của kháng thể và dịch kháng nguyên.

Giá trị mật độ quang, 2 ngưỡng pha loãng 1/500 và 1/1000 cũng có khả năng nhận biết PVY khá tốt. Ngưỡng pha loãng kháng huyết thanh thích hợp nhất là 1/500.

Bảng 2: So sánh mức độ phản ứng của kháng huyết thanh tự sản xuất và kháng huyết thanh của hãng Agdia

Mẫu	KHT PVY sản xuất	Kết luận	KHT PVY của Agdia	Kết luận
82	0,157	–	0,160	–
83	0,169	–	0,160	–
84	0,269	+	0,381,6538	+
ĐC +	0,871	+	1,739	+
ĐC +	0,848	+	0,166	+
ĐC –	0,152	–	0,165	–
ĐC –	0,155	–	0,166	–
DD đậm	0,131	–	0,124	–
DD đậm	0,139	–		–

Xem xét phản ứng kit PVY sản xuất với kit PVY hãng Agdia (Mỹ) thì mức độ phản ứng của kit ELISA do chúng tôi sản xuất chỉ bằng hơn 50% hay 60% của Agdia. Nhưng tính đặc hiệu thì vẫn cao ngang nhau ở mức 100% và mức pha loãng của Agdia là 1/200 còn của chúng tôi sản xuất là 1/1000 (loãng hơn) (Bảng 2).

Chúng tôi tiến hành thử nghiệm với dịch khoai tây khỏe và dịch khoai tây bệnh để kiểm tra tính đặc hiệu của kháng huyết thanh và kit ELISA của virus PVY sản xuất (Bảng 3).

Bảng 3: Kiểm tra tính đặc hiệu kit ELISA của virus PVY

STT	Mẫu kiểm tra	Giá trị mật độ quang			Kết luận
		Lần 1	Lần 2	Lần 3	
1	Dịch khoai tây khỏe	0,177	0,179	0,178	–
2	Dịch khoai tây bệnh	0,804	0,868	0,836	+
3	Nhiễm virus TRSV	0,184	0,168	0,176	–
4	Nhiễm virus PVA	0,176	0,158	0,167	–

4.2. Phương pháp chẩn đoán virus X và sản xuất kháng huyết thanh virus X

4.2.1. Sản xuất kháng huyết thanh virus X.

- Sau khi lây bệnh trên cây thuốc lá *Nicotiana benthamiana* hay *N. tabacum* var *xanthi*, khi cây xuất hiện triệu chứng điển hình thì thu vật liệu và chuẩn bị sản xuất kháng huyết thanh.

- Kháng nguyên được làm sạch theo phương pháp của Walkeryet, 1972.

- Sau khi làm sạch kháng nguyên, kháng nguyên được gây miễn dịch cho động vật thí nghiệm: dịch PVX đã làm sạch hoà với Freund's Adjuvant incomplet và tiêm vào cơ bắp.

Với tất cả các độ hoà loãng của kháng huyết thanh sản xuất (1/200, 1/500, 1/1000, 1/1500, 1/2000, 1/4000 đều có thể nhận biết được PVX trong mẫu bệnh. Độ hoà loãng ở 1/4000 là thích hợp cho việc sử dụng kháng huyết thanh PVX do chúng tôi sản xuất trong chẩn đoán bệnh hại (xem bảng 4).

Bảng 4: Độ hoà loãng của kháng huyết thanh PVX sản xuất

Kháng nguyên Kháng thể	Giá trị mật độ quang ở 405nm				
	1/20	1/40	1/80	1/160	Đ/c khoẻ 1/20
1/200	1.772	1.870	1.849	1.812	0.927
1/500	1.758	1.759	1.784	1.805	0.732
1/1000	1.573	1.626	1.620	1.606	0.462
1/1500	1.448	1.570	1.549	1.538	0.367
1/2000	1.204	1.302	1.323	1.291	0.229
1/4000	0.918	0.973	0.992	0.912	0.241

Để so sánh phản ứng giữa kháng huyết thanh PVX sản xuất và kháng huyết thanh PVX của hãng Agdia (Mỹ) để so sánh và thấy kết quả tương tự nhau mặc dù kháng huyết thanh tự sản xuất có mức phản ứng cao hơn của Agdia đôi chút (thí nghiệm này làm kết hợp với việc kiểm tra virus phục vụ sản xuất của chương trình khoai tây Việt- Đức (Bảng 5).

**Bảng 5: Mức độ phản ứng của kháng huyết thanh sản xuất
và kháng huyết thanh nhập từ Agdia (Mỹ)**

Mẫu số		Mẫu cây kiểm tra	PVX sản xuất	Kết luận	PVX của Agdia	Kết luận
Bảng 1	53	Khoai tây khoẻ	0.139	-	0.189	-
	54	Khoai tây khoẻ	0.135	-	0.180	-
	55	Khoai tây khoẻ	0.147	-	0.162	-
	56	Thuốc lá bệnh	1.836	+	1.778	+
	57	Thuốc lá không triệu chứng	0.141	-	0.161	-
	58	Thuốc lá bệnh	1.584	+	1.491	+
Bảng 2	84	Củ giống khoai tây	1.794	+	1.671	+
	85	Củ giống khoai tây	0.133	-	0.135	-
	1	ĐC dương	2.226	+	2.106	+
	2	ĐC âm	0.145	-	0.147	-
	3	DD đêm	0.108	-	0.100	-

4.3. Sản xuất kháng huyết thanh virus ToMV

4.3.1. Sản xuất kháng huyết thanh ToMV

Cây chỉ thị dùng để nhận nguồn virus là cây *Nicotiana tabacum* cv. Samsun

- Làm sạch virus ToMV và phương pháp gây miễn dịch trên thỏ để tạo kháng huyết thanh (Theo phương pháp của Viện nghiên cứu bệnh hạt giống Đan Mạch, 2001)

Bảng 6 : Kết quả kiểm tra tính đặc hiệu của kháng huyết thanh

STT	Đợt lấy máu	Độ hoà loãng	Độ hoà loãng kháng nguyên					
			1/20		1/50		1/100	
			Trị số ELISA	Kết quả	Trị số ELISA	Kết quả	Trị số ELISA	Kết quả
1	Lấy máu lần 1	1/250	0.102	-	0.098	-	0.100	-
		1/500	0.101	-	0.101	-	0.097	-
		1/1.000	0.100	-	0.102	-	0.103	-
		1/ 2.000	0.105	-	0.099	-	0.101	-
2	Lấy máu lần 2	1/250	0.456	+	0.433	+	0.487	+
		1/500	0.377	+	0.412	+	0.558	+
		1/1.000	0.341	+	0.341	+	0.422	+
		1/ 2.000	0.324	+	0.332	+	0.399	+
3	Lấy máu lần 3	1/250	0.553	+	0.572	+	0.805	+
		1/500	0.550	+	0.517	+	0.605	+
		1/1.000	0.446	+	0.460	+	0.598	+
		1/ 2.000	0.421	+	0.412	+	0.545	+
4	Lấy máu lần 4	1/250	0.721	+	0.652	+	0.767	+
		1/500	0.559	+	0.603	+	0.654	+
		1/1.000	0.550	+	0.534	+	0.610	+
		1/ 2.000	0.606	+	0.461	+	0.650	+

Ghi chú: đối chứng (+): 0.569

đối chứng (-): 0.103

Qua trên bảng chúng tôi thấy kháng huyết thanh tạo ra có tính đặc hiệu rất cao với tỷ lệ độ hoà loãng của kháng huyết thanh 1/ 2.000 và độ hoà loãng của kháng nguyên là 1/100. Kết quả cho trị số ELISA cao hơn hẳn so với đối chứng. Chúng tôi kháng huyết thanh sản xuất được có mật độ kháng thể rất cao và đảm bảo chất lượng cao. Chúng tôi sử dụng kháng huyết thanh ToMV do viện Nghiên cứu bệnh hạt giống ở Đan Mạch sản xuất để so sánh khả năng phản ứng: số liệu bảng cho thấy kháng huyết thanh sản xuất phản ứng mạnh hơn cả kháng huyết thanh của Đan Mạch.

Bảng 7 : So sánh huyết thanh ToMV của Việt Nam sản xuất và của Đan Mạch

Cây	Triệu chứng	ToMV (Việt Nam)		ToMV (Đan Mạch)	
		OD	Kết luận	OD	Kết luận
Cà chua	Khảm	1.404	+	1.343	+
Cà chua	Khảm	1.312	+	1.223	+
Cà chua	Khảm	1.325	+	1.284	+
Cà chua	Nhiễm ToMV (Đ/c +)	1.306	+	1.427	+
Cà chua	Khỏe	0.166	-	0.195	-
Thuốc lá	Nhiễm ToMV(đối chứng +)	1.339	+	1.249	+
Thuốc lá	Khỏe	0.307	-	0.260	-
Dung dịch dêm	Dung dịch dêm	0.247	-	0.224	-

Phát hiện ToMV có ở các dạng triệu chứng khảm vàng (giống Saint pie, Balan, VL2000, HT7, P375) xuất hiện ở dạng khảm xanh vàng lồi lõm với mật độ thấp tạo phản ứng ± ở giống Saint pie và VL 2000.

4.4. Sản xuất kháng huyết thanh virus CTV.

4.4.1. Sản xuất kháng huyết thanh CTV.

Các mẫu cây có mùi nhiễm bệnh để tinh chiết virus, thử ELISA và các phương pháp chẩn đoán khác được thu thập tại Viện Bảo vệ thực vật và các điểm điều tra.

- 10 giống cây có mùi sạch bệnh (Bưởi, cam, quýt, cháp, chanh). .

Sử dụng phương pháp ghép mắt chữ T, ghép trên thân hoặc cành, sau 75 ngày mới tiến hành thử ELISA.

* Lây bệnh nhân tạo bằng 2 loài rệp muội (*Toxoptera citricida* + *T. aurantii*)

Làm sạch CTV theo phương pháp của J.M. Bové và M. Garnier

* Gây miễn dịch thỏ

Virus được làm sạch được tiêm vào thỏ cùng chất dêm theo tỷ lệ 1:1 trong thời gian 2 tháng với 4 - 6 lần gây miễn dịch.

Thu kháng huyết thanh và bảo quản huyết thanh

Về ngưỡng pha loãng cho thấy từ 1/5000 trở lại phản ứng được đảm bảo sai khác từ 1,6 đến 2 lần so với đối chứng (cây khỏe) để sử dụng trong các thí nghiệm. Tuy nhiên, độ hoà loãng thích hợp và đảm bảo của kháng huyết thanh là 1/3000 đến 1/1000 (xin xem bảng 8)

Bảng 8: Kết quả thử ELISA kháng huyết thanh CTV sản xuất với các độ hoà loãng kháng huyết thanh, độ hoà loãng mẫu và dung dịch đệm

Mẫu	Dung dịch đệm	Độ hoà loãng mẫu	Giá trị mật độ quang			
			Độ hoà loãng kháng huyết thanh			
			1/1000	1/3000	1/5000	1/10.000
Bệnh	PBST-PVP- 0.2% BSA	1/50	0.373	0.263	0.239	0.177
		1/100	0.355	0.255	0.210	0.181
		1/200	0.337	0.252	0.205	0.174
	PBST-PVP- 0.2% sữa skim	1/50	0.345	0.264	0.230	0.181
		1/100	0.313	0.242	0.206	0.173
		1/200	0.335	0.245	0.204	0.172
	PBST-PVP-0.2 % lòng trắng trứng	1/50	0.380	0.292	0.225	0.201
		1/100	0.354	0.255	0.222	0.186
		1/200	0.334	0.210	0.203	0.178
Khỏe	PBST-PVP- 0.2% BSA	1/50	0.175	0.135	0.131	0.122
		1/100	0.185	0.137	0.129	0.122
		1/200	0.184	0.133	0.134	0.122
	PBST-PVP- 0.2% sữa skim	1/50	0.162	0.125	0.124	0.128
		1/100	0.167	0.132	0.127	0.12
		1/200	0.168	0.136	0.127	0.121
	PBST-PVP-0,2 % lòng trắng trứng	1/50	0.176	0.147	0.126	0.125
		1/100	0.178	0.138	0.127	0.117
		1/200	0.169	0.133	0.132	0.132

Chúng tôi đã tiến hành kiểm tra tính đặc hiệu của CTV với một số kháng nguyên của các virus BBTV, PRSV, TMV, CMV,... cho thấy các virus này không có phản ứng chéo với CTV mà chỉ phản ứng dao động trên dưới mức của đối chứng khỏe (cây khỏe).

**Bảng 9 : Đánh giá tính đặc hiệu của kháng huyết thanh CTV
sản xuất bằng phản ứng ELISA**

Mẫu thử	Giá trị ELISA
Cam bệnh	0.505
Cam bệnh	0.390
Cam bệnh	0.511
Bưởi bệnh	0.359
Bưởi bệnh	0.345
Bưởi bệnh	0.445
Chuối nhiễm BBTV	0.184
Đu đủ nhiễm PRSV	0.265
Thuốc lá nhiễm TMV	0.242
Thuốc lá nhiễm CMV	0.238
Đối chứng – (Cam khoẻ gieo từ hạt)	0.228
Đối chứng – (chất nền)	0.146

4.5. Sản xuất kháng huyết thanh virus khảm lá dâu .

4.5.1. Sản xuất kháng huyết thanh MuMV

Vật liệu thí nghiệm là các lá dâu có triệu chứng bệnh điển hình. Rệp bông (*Aphis gossypii*) được nuôi trên cây khoai nước.

- Lấy bệnh bằng rệp bông (*Aphis gossypii*) và lây bệnh nhân tạo bằng cơ học tiếp xúc với dung dịch đệm Phosphate 0,1M, pH : 7,2

Các mẫu cây dâu thu được qua lây bệnh nhân tạo được sử dụng để làm sạch virus. Phương pháp làm sạch virus khảm lá dâu được thực hiện theo Tsuchizaki và ctv (1971). Sau đó gây miễn dịch cho thỏ và thu kháng huyết thanh.

Chúng tôi đã thử nghiệm xác định ngưỡng pha loãng của kháng huyết thanh. Kết quả được trình bày trên bảng 10.

Bảng 10 : Độ hoà loãng của kháng huyết thanh Dầu và độ hoà loãng của mẫu bệnh

Độ hoà loãng mẫu	Độ hoà loãng huyết thanh	Cây khỏe	Mẫu thử			
			Đốm vàng	Đốm hình nhân	Khảm biến dạng	Đệm
1/20	1/20	0.305	1.894	1.655	1.557	0.114
	1/50	0.265	1.615	1.191	1.206	0.111
	1/100	0.234	1.306	0.867	0.877	0.113
	1/200	0.223	0.870	0.663	0.565	0.111
	1/500	0.215	0.486	0.346	0.328	0.112
	1/1000	0.212	0.372	0.274	0.275	0.109
1/40	1/20	0.3.02	1.600	1.248	1.128	0.113
	1/50	0.267	1.534	1.108	1.021	0.111
	1/100	0.225	1.204	0.848	0.859	0.113
	1/200	0.220	0.925	0.668	0.722	0.115
	1/500	0.214	0.497	0.441	0.473	0.117
	1/1000	0.210	0.443	0.342	0.359	0.122

bảng 10 cho thấy: mặc dù đã hoà loãng kháng nguyên ở mức 1/40 (dịch lá cây dâu bị bệnh) phản ứng vẫn xảy ra mạnh hoặc ở mức trung bình của các mẫu lá dâu chớm bị bệnh có nồng độ virus thấp. Các mẫu dung dịch đệm đều không có phản ứng.

Để xác định chính xác hơn các phản ứng đặc hiệu của kháng huyết thanh khảm lá dâu, chúng tôi đã tiến hành thử 52 mẫu lá dâu có triệu chứng bệnh nặng, nhẹ và trung bình. Kết quả cho thấy: tất cả các mẫu đều phản ứng (+) so với đối chứng (Bảng 11)

Bảng 11 : Kết quả kiểm tra ELISA virus khảm lá dâu bằng huyết thanh sản xuất

STT	Giá trị ELISA	Kết luận	STT	Giá trị ELISA	Kết luận
1	1.842	+	27	0.744	+
5	1.630	+	31	0.986	+
13	1.698	+	39	0.516	+
22	1.503	+	48	0.756	+
Cây khoẻ	0.356	-	Cây khoẻ	0.213	-

Trích số liệu bảng 11 trong báo cáo chính (10 mẫu điển hình trong số 52 mẫu)

4.6. Sản xuất kháng huyết thanh nấm *Phytophthora* sp.

4.6.1. Sản xuất kháng huyết thanh *Phytophthora* sp.

Chúng tôi sử dụng các nguồn nấm *Phytophthora* trên cây khoai tây, cà chua, cây dứa, cây cam, cây bưởi, cây hồ tiêu làm nguồn nấm nuôi cấy trên môi trường.

Phương pháp nghiên cứu làm tinh sạch kháng nguyên của nấm *Phytophthora* sp. theo Masago và ctv (1977). Chúng tôi sản xuất kháng huyết thanh đa dòng (polyclonal) để chẩn đoán nấm *Phytophthora* trên môi trường (như phương pháp của Agdia, Mỹ), tiến tới kiểm tra ELISA trên mẫu thực vật chưa phân lập trên môi trường có mật độ bào tử và sợi cao.

Sau khi thu được kháng huyết thanh *Phytophthora*, chúng tôi đã tiến hành tìm ngưỡng pha loãng của kháng huyết thanh trong thí nghiệm từ 1/1500 đến 1/7000 và độ pha loãng của bào tử nấm từ 1/10.000 phản ứng vẫn đạt ở mức khá cao (OD đạt 0.780) trong khi phản ứng của dung dịch đệm chỉ là 0.146 và chất nền là 0.102 (Bảng 12).

Bảng 12: Xác định độ hoà loãng thích hợp của kháng huyết thanh *Phytophthora* sản xuất và độ hoà loãng của sợi nấm

Độ hoà loãng của huyết thanh	Độ hoà loãng của sợi nấm					
	1/10.000	1/50.000	1/100.000	1/200.000	1/500.000	Đệm
1/1.500	1.217	0.987	0.765	0.508	0.237	0.152
1/2.000	1.273	0.955	0.672	0.512	0.258	0.152
1/2.500	1.123	0.789	0.700	0.415	0.207	0.142
1/3.000	0.978	0.978	0.785	0.584	0.377	0.147
1/3.500	0.903	0.684	0.549	0.372	0.205	0.143
1/4.000	0.919	0.653	0.551	0.337	0.205	0.138
1/5.000	0.880	0.662	0.449	0.345	0.183	0.121
1/6.000	0.771	0.552	0.474	0.272	0.181	0.147
1/7.000	0.780	0.524	0.433	0.300	0.180	0.155

So sánh mức độ phản ứng của Kit ELISA, sản xuất và Kit ELISA của hãng Agdia. Kết quả cho thấy mức độ phản ứng trên cam, dứa, hồ tiêu, sầu riêng mẫu 1, trong đó có một số trường hợp phản ứng của mẫu cam và dứa mạnh hơn hẳn Kit của Agdia; mẫu sầu riêng 2 và bưởi lại có phản ứng ở mức thấp hơn của Agdia (bảng 13)

Bảng 13 :So sánh huyết thanh *Phytophthora* Việt Nam và Agdia

STT	Cây	Huyết thanh Việt Nam		Huyết thanh Agdia	
		Giá trị ELISA	Kết luận	Giá trị ELISA	Kết luận
1	Bưởi	0.858	+	1.328	+
2	Sầu riêng 1	1.620	+	1.679	+
3	Cam	1.925	+	1.706	+
4	Dứa	2.086	+	1.948	+
5	Hồ tiêu	1.845	+	1.990	+
6	Sầu riêng 2	0.564	+	1.204	+
7	Đêm	0.220	-	0.179	-
8	Nến	0.196	-	0.116	-

Để xét độ đặc hiệu của kháng huyết thanh chúng tôi đã thí nghiệm và kết luận là tất cả các mẫu nấm *Phytophthora* đều cho phản ứng với kháng huyết thanh *Phytophthora*, các loài nấm khác đều không cho phản ứng với nấm *Phytophthora*.

4.7. Sản xuất kháng huyết thanh vi khuẩn *Ralstonia solanacearum*

4.7.1. Sản xuất kháng huyết thanh đa dòng (Polyclonal antibody) của vi khuẩn *R. solanacearum*.

Thu mẫu là những cây có triệu chứng điển hình: cà chua, khoai tây, cà, ớt, thuốc lá,...sử dụng phần thân của cây mới chớm bị vi khuẩn gây hại. Các mẫu vi khuẩn được kiểm tra bằng phương pháp PCR để xác định đúng loài. Sau đó vi khuẩn được cấy trên môi trường PSA.

Làm sạch kháng nguyên được thực hiện theo phương pháp của S.N. Boer và N.W. Schaad (1990).

Qua bảng 14 chúng tôi có nhận xét: kết quả phản ứng ở các mẫu số 1,2,3,4,5, 6, 7,8,10,12, chứng tỏ kháng huyết thanh sản xuất ở Việt Nam có mức phản ứng thấp hơn không nhiều so với kháng huyết thanh của hãng Agdia. Trong một số ít trường hợp như mẫu số 9 và 11 mức độ phản ứng của kháng huyết thanh Việt Nam còn cao hơn của Agdia.

Bảng 14 : So sánh huyết thanh vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* sản xuất với huyết thanh của Agdia

STT	Cây	Huyết thanh sản xuất		Huyết thanh Agdia	
		OD	Kết luận	OD	Kết luận
1	Khoai tây	0.503	+	0.865	+
2		0.464	+	0.617	+
3		0.424	+	0.611	+
4		0.441	+	0.441	+
5		0.482	+	0.685	+
6		0.471	+	0.559	+
7		0.559	+	0.625	+
8		0.467	+	0.573	+
9		0.696	+	0.617	+
10		0.563	+	0.652	+
11		0.816	+	0.689	+
12		0.506	+	0.527	+
	Đối chứng (+)	0.781	+	0.964	+
	Dung dịch đệm	0.130	-	0.135	-

4.8. Những phương pháp chẩn đoán vi khuẩn gây bệnh Greening và lựa chọn lọc PCR trong việc xác định cây bệnh

4.8.1. Lựa chọn phương pháp PCR trong chẩn đoán bệnh Greening

Chúng tôi thu thập mẫu theo chương trình điều tra bệnh, chọn tạo cây cam sạch bệnh ở một số địa điểm sau: Từ Liêm (Hà Nội), Ba Vì (Hà Tây), Hòa Bình, Nghệ An, Hà Tĩnh, Hà Giang và Tuyên Quang.

Chúng tôi lựa chọn phương pháp của GS H. J. Su ở trường Đại học Tổng hợp Đài Bắc - Đài Loan. Quy trình thí nghiệm được thể hiện như sau:

Qua quan sát, các cây bị bệnh Greening thường phân bố rải rác trong các vườn cam mới trồng khoảng 3 năm tuổi.. ở vườn cây lớn hơn, mật độ cây bệnh tăng nhưng cây có triệu chứng thật điển hình và sớm tàn rất ít – thường là những cây bị bệnh tập

trung ở một số cành hay trên tán lá chỉ biểu hiện ở một hướng nhất định. Kết quả thử PCR trên vườn cây ở Từ Liêm được trình bày ở bảng sau (bảng 15)

Bảng 15 : Kết quả giám định bệnh Greening theo các triệu chứng điển hình tại một số xã huyện Từ Liêm - Hà Nội bằng PCR

Cây	Triệu chứng	Σ mẫu thử	Σ mẫu dương	Tỷ lệ mẫu nhiễm bệnh
Cam canh	Vàng lá gân xanh	6	4	66.66
	Lá biến vàng	7	5	71.42
	Lá nhỏ vàng uốn cong	7	4	57.14
	Lá già xám nhạt, cong gân lá	6	4	66.66
Bưởi	Vàng lá gân xanh	6	3	50.0
	Biến vàng lá	7	4	57.14

Trong số cây có triệu chứng, tỷ lệ bệnh chiếm từ 50-71.42% là Greening, còn lại là một số bệnh virus, điển hình là Tristeza. (phần thử nghiệm PCR được trình bày ở phụ lục)

4.9. Các ứng dụng của kháng huyết thanh và kết quả bước đầu giúp cho việc phòng chống bệnh hại.

Chúng tôi đã gửi kháng huyết thanh đến các cơ sở nghiên cứu và sản xuất thuộc Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn, các trường và các Trung tâm thuộc Bộ Giáo dục và Đào tạo và đã nhận được các kết quả khảo nghiệm và theo dõi bệnh hại. Đã ký hợp đồng với chương trình sản xuất giống khoai tây Việt Đức.

(Các tài liệu này xin xem trong phần phụ lục của báo cáo)

4.10. Vật liệu có hàm lượng protein. RNA và DNA cao của nguyên nhân gây bệnh để có thể sản xuất 170.000 liều phản ứng (theo tiêu chuẩn INRA Pháp 1989)

Tạo vật liệu có hàm lượng protein virus cao để trong một tương lai gần có thể sản xuất 170.000 liều kháng huyết thanh – nhằm phát triển đề tài này trong nhiều năm sau.

Chúng tôi đã chọn ba nhóm virus: Tobamo, Potyvirus và Luteo virus. Ba nhóm này về tính chống chịu được xếp trình tự như sau: Rất mạnh (Tobamo), trung bình (Poty) và yếu (Luteo). Để thực hiện thí nghiệm này, chúng tôi đã lựa chọn các mẫu bệnh điển hình của virus TMV, PVY và PLRV sau khi thử ELISA để xác định đúng nguyên nhân gây bệnh. Chúng tôi dùng hai phương pháp lấy bằng cơ học tiếp xúc (với dung dịch đệm phosphate 0,1M pH:7) và lấy bằng côn trùng môi giới rệp bông

A. gossypii và rệp đào *M. persicae* (lây cơ giới: TMV, lây kiểu không bền vững bằng côn trùng: PVY, lây kiểu bền vững bằng côn trùng: PLRV)

Các cây trên được chuẩn bị hạt giống và nguồn virus lây để có thể lây và sản xuất 70.000 liều TMV, 50.000 liều PVY và 50.000 liều PLRV.

Kiểm tra qua làm tinh khiết các virus các cây có mật độ virus như sau:

TMV trên *N. glutinosa* 5mg/ml

PVY trên *N. tabacum* var. Xanthi 2mg/ml

PLRV trên *Physalis floridana* 1mg/ml

Phải có 15kg thân lá khoai tây mới có 1mg/ml virus, chỉ cần 100g thân lá *Physalis floridana* đã có lượng virus trên để tách protein

4.11. Chọn lọc 3 quy trình công nghệ ELISA – Indirect, DAS – ELISA và PCR

4.11.1 Quy trình ELISA – Indirect

Theo quy trình Viện nghiên cứu Nông nghiệp Quốc gia Pháp INRA có cải tiến cho phù hợp điều kiện Việt Nam.

4.11.2 Quy trình DAS – ELISA (Phương pháp ELISA trực tiếp)

Theo quy trình Viện nghiên cứu Nông nghiệp Quốc gia Pháp INRA có cải tiến cho phù hợp điều kiện Việt Nam:

- Thời gian ủ bản ELISA chỉ trong 1- 2h ở 37°C, không cần để ở 12h trong điều kiện 4°C ở giai đoạn cố định kháng huyết thanh hay dịch cây vào bản.
- Chỉ thực hiện nhỏ 100µl thay cho phải nhỏ 200µl theo phương pháp kinh điển.

4.11.3. Chẩn đoán Greening bằng phương pháp PCR (Theo Hung T. H, Wu. M. J và Su. H. J, 1999)

Môi

Cặp môi dùng để phát hiện GFB (greening fastidious bacterium) dựa trên phương pháp PCR đã được lựa chọn từ trình tự gen (sequence) của đoạn DNA đặc trưng được nhân. Cặp môi bao gồm mỗi xuôi : 5'- CAC CGA AGA TAT GGA CAA CA- 3' và mỗi ngược 5'-GAG GTT CTT GTG GTT TTT CTG-3' đã được thiết kế để nhân đoạn DNA đặc trưng của GFB bằng PCR.

Điều kiện của phản ứng PCR

Phản ứng PCR được thực hiện trong 25µl hỗn hợp gồm: 20mM Tris-HCl (pH 8.4), 50mM KCl, 4mM MgCl₂, 0.2mM mỗi dATP, dTTP, dCTP và dGTP, 50ng mỗi xuôi, 50ng mỗi ngược, 0,75 đơn vị của Taq DNA polymerase và 200ng DNA (nucleic axit) của mẫu phân tích.

Điều kiện chu kỳ nhiệt:

- 1 chu kỳ tại 94°C trong 3 phút
- 30 chu kỳ tại 94°C trong 1 phút, 56°C trong 1 phút và 72°C trong 2 phút
- tiếp đó là 72°C trong 10 phút

Tách chiết nucleic axit (DNA) từ mẫu phân tích

- Chỉ cần một lượng nhỏ từ toàn bộ nucleic axit của mẫu đã được chiết xuất dùng cho phản ứng PCR. Mẫu nucleic axit đã được tách chiết bằng phương pháp với cải tiến của Lee và Davis (1988), Lee et al (1988, 1990).

Phân tích sản phẩm của phản ứng PCR bằng điện di (electrophoresis)

Sản phẩm của PCR được xác định bằng điện di trên gel 1.4% agarose trong dung dịch đệm TAE (40mM Tris-acetate (pH 8.0), 1mM EDTA). Sau khi chạy điện di, gel được nhuộm màu bằng ethidium bromide (0.5µg/ml) và chụp hình.

Thang DNA 100 cặp cũng được chạy điện di cùng để so sánh về kích thước. Điện di được chạy trong 30 đến 40 phút ở 100V.

4.12. Chọn 4 phương pháp sử dụng kit phù hợp điều kiện ở Việt Nam

Để đảm bảo thử ELISA luôn có kết quả, chúng tôi hướng dẫn 4 phương pháp sử dụng Kit như sau:

Chẩn đoán bệnh ở lá: Mẫu lá cây được sử dụng để chẩn đoán ELISA các bệnh ở thực vật cần phân loại theo các dạng sau:

Các mẫu thử với những virus cư trú ở nhu mô lá thì cần lấy ở phần nhu mô lá bánh tẻ hoặc lá non đã trưởng thành, mỗi mẫu tối thiểu 1g, bỏ gân nghiền với dung dịch đệm (theo quy định của quy trình thử có gửi kèm theo Kit ELISA). Ví dụ như các virus thuộc nhóm *Potyvirus* hay *Potexvirus*

Các mẫu thử với những virus cư trú chủ yếu ở gân lá thì sử dụng gân lá non, gân lá bánh tẻ (không dùng lá già), bỏ thịt lá và nghiền với dung dịch đệm giống như trên. Ví dụ như các virus thuộc nhóm *Luteovirus* hay nhóm *Geminivirus*.

Chẩn đoán bệnh ở củ: Ở củ khoai lang, sắn, khoai sọ, và khoai tây, v. v..., mật độ virus ở trong củ thường rất thấp. Do đó thường phải làm cho củ nảy mầm; khi đó virus mới tập trung ở mầm với nồng độ khá cao và việc thử mới dễ dàng để phát hiện bệnh. Tuy nhiên trên 1 mầm thì đoạn gốc mầm (có thể dài từ 0.5-1cm) là đoạn virus tập trung nồng độ cao hơn và khi thử luôn đạt kết quả rõ rệt hơn.

Chẩn đoán bệnh ở quả: Quả của các cây trồng và hoa khi cây bị nhiễm virus đều có thể có nồng độ virus cao hơn ở quả và hoa. Phương pháp lấy mẫu là tách các nhị cái (cây cam, chanh và bưởi) hay lấy lõi quả (cam, chanh và bưởi) với điều kiện hoa chưa bị rụng, còn tươi trên cành và quả còn xanh hay chớm chín.

Ví dụ kiểm tra bệnh Tristeza hại cam, chanh, bưởi bằng ELISA thì ngoài việc sử dụng lá có thể sử dụng các vật liệu trên nếu lá già và tàn lụi.

Chẩn đoán bệnh bằng mẫu bảo quản lạnh và khô: Mẫu bệnh tươi và ở bộ phận đang phát triển là rất thuận lợi cho việc kiểm tra virus trên cây. Tuy nhiên, do một số trường hợp phải đi lấy mẫu từ xa, hoặc do số lượng mẫu quá ít, chưa đủ thử 1 lần ELISA thì cần thực hiện như sau: Khi đi lấy mẫu cần để mẫu trong hộp xốp chứa đá

hay phích chứa đá, giữa mẫu và đá có lót 1 lớp giấy báo hay bìa cách nhiệt. Sau khi mẫu được ghi số và cho vào túi nylon, mẫu được xếp vào hộp và gắn kín hộp xếp lại bằng băng dính rồi vận chuyển về phòng thí nghiệm. Tại phòng thí nghiệm có 2 cách giữ mẫu:

- + Cách 1: Các mẫu đưa về, rửa sạch và được bảo quản lạnh ở -20°C

- + Cách 2: Sau khi mẫu được rửa sạch, cắt nhỏ mẫu thành những miếng vuông có kích thước khoảng 0.5 cm và cho vào lọ có chứa silicagen. Các mẫu này được bảo quản lạnh ở 4°C trong thời gian hàng tháng để chờ sử dụng thử ELISA (Chú ý quan sát silicagen: nếu silicagen biến màu phải chuyển qua lọ khác để đảm bảo mẫu khô).

4.13. Tiêu chuẩn chất lượng của kháng huyết thanh và Kit ELISA – Direct, Kit ELISA – Indirect và phương pháp PCR chẩn đoán bệnh Greening

4.13.1. Tiêu chuẩn cho việc thực hiện phản ứng ELISA - Direct (DAS - ELISA)

- Mẫu thu được là mẫu tươi hoặc bảo quản trong tủ lạnh -20°C không quá 1 tháng hoặc bảo quản khô trong lọ chứa silicagen

- Phản ứng phải được thực hiện đúng các bước đã quy định và phải được cố định sau khi hiện màu bằng dung dịch NaOH 3M

- Ở bước sóng 405nm, các mẫu có phản ứng dương tính (+) phải có trị số OD bằng 1.5 lần so với đối chứng âm (-) và phải luôn đặc hiệu như đối chứng (+)

4.13.2. Tiêu chuẩn cho việc thực hiện phản ứng ELISA - Indirect

Ngoài 3 tiêu chuẩn như trên, ELISA – Indirect còn yêu cầu dịch cây khỏe được sử dụng phải là dịch lấy từ cây đã được kiểm tra bằng ELISA và được trồng cách ly trong nhà lưới chống côn trùng.

4.13.3. Tiêu chuẩn chất lượng phản ứng PCR chẩn đoán bệnh Greening

- Các chi tiết thực hiện theo tài liệu của GS. H. J. Su và ctv (1999)

- Lưu ý: Khi chọn mẫu để tách DNA:

- + Gân lá cam, chanh và bưởi được lấy từ lá bánh tẻ và lá non đã trưởng thành, không lấy ở lá già

- + Nếu lấy ở bầu nhụy cái phải lấy ở hoa tươi đang phát triển trên cành

- + Nếu lấy ở cuống lõi quả phải lấy ở quả xanh đang phát triển hoặc quả đã lớn nhưng chưa chín và chưa bị mục, nát, thối...

- Khi tiến hành điện di, cần thực hiện trên bản điện di nằm ngang để đảm bảo so sánh được kết quả chuẩn xác.

4.14. Kết quả đào tạo các học viên cao học và sinh viên

**Danh sách các sinh viên đã tốt nghiệp do thực hiện các đề tài
thuộc nội dung đề tài KC.04.15**

Năm	STT	Tên sinh viên	Tên đề tài	Người hướng dẫn
2001	1	Bùi Phương Mỹ Dung	Virus cà chua	GS.TS. Vũ Triệu Mân
	2	Nguyễn Thị Thanh Thuý	Virus khoai tây	GS.TS. Vũ Triệu Mân
	3	Nguyễn Thị Thuận	Virus cây họ cà	GS.TS. Vũ Triệu Mân
2002	4	Lê Thị Ngọc Hoà	CTV và Greening	GS.TS. Vũ Triệu Mân & TS. Ngô Vĩnh Viễn
	5	Lê Đăng Khoa	PVY trên cây họ cà	GS.TS. Vũ Triệu Mân
	6	Đặng Thị Thương Hiền	PVX trên cây họ cà	GS.TS. Vũ Triệu Mân
	7	Trần Thị Minh Hiếu	Virus trên khoai tây	GS.TS. Vũ Triệu Mân
	8	Lê Xuân Vị	Virus Tristeza (CTV)	GS.TS. Vũ Triệu Mân
	9	Phạm Thị Hạnh	Virus cà chua ToMV	TS. Ngô Bích Hảo
	10	Vũ Thị Thanh Huyền	Bệnh virus và sương mai khoai sọ	GS. TS Vũ Triệu Mân
	11	Lê Thị Thanh Tâm	PVX, PVY trên cây họ cà	GS. TS Vũ Triệu Mân
	12	Cần Văn Hồng	Khảm lá dâu	GS. TS Vũ Triệu Mân
2003	13	Nguyễn Thị Thu Hằng	Virus khoai tây	GS.TS. Vũ Triệu Mân
	14	Nguyễn Trường Vương	Virus Tristeza (CTV)	Th.S Hà Viết Cường
	15	Nguyễn Văn Tình	Virus khảm lá dâu	GS.TS Vũ Triệu Mân
	16	Phạm Thị Hoa	Bệnh trên hoa lan	GS. TS Vũ Triệu Mân

2004	17	Trương Thị Anh	Virus khảm lá dâu	GS.TS Vũ Triệu Mân
	18	Nguyễn Thị Phương	Virus PVX, PVY	GS.TS Vũ Triệu Mân
	19	Nguyễn Văn Toàn	Greening và CTV trên cây có múi	GS.TS Vũ Triệu Mân, TS. Ngô Vĩnh Viễn
	20	Nguyễn Quốc Hiếu	Greening trên cây có múi	GS.TS Vũ Triệu Mân, TS Ngô Vĩnh Viễn
	21	Nguyễn Đức Thành	Cây chỉ thị bệnh virus	GS.TS Vũ Triệu Mân
	22	Bùi Lan Hương	Virus X, Y trên cây họ cà	GS. TS Vũ Triệu Mân

**Danh sách các học viên cao học (Thạc sỹ) đã tốt nghiệp trong thực hiện
đào tạo trong đề tài KC.04.15**

Năm	TT	Tên học viên	Tên đề tài	Người hướng dẫn
2001	1	Nguyễn Thị Hồng Nhung	Bệnh sáng gân thuốc lá PVY	GS.TS. Vũ Triệu Mân
2002	2	Trần Thị Thanh Bình	Virus hại ngô	GS.TS. Vũ Triệu Mân
	3	Nguyễn Thị Ngọc Lan	Virus cà chua ToMV	PGS. TS Ngô Bích Hào
	4	Trần Thị Hưng	Bệnh nấm trên hạt giống lúa	PGS. TS Ngô Bích Hào
2003	5	Trần Thị Như Hoa	Xoăn vàng lá cà chua	GS.TS. Vũ Triệu Mân
	6	Vũ Thị Thanh Huyền	Bệnh nấm hại hạt giống đậu tương	PGS. TS Ngô Bích Hào
	7	Vũ Mạnh Linh	Mốc sương và héo xanh vi khuẩn ở cà chua	PGS. TS Lê Lương Tề
2004	8	Chu Văn Chuông	Héo xanh vi khuẩn ở cà chua	PGS. TS Lê Lương Tề
	9	Lê Thị Thanh Ngọc	PVX, PVY trên khoai tây: Biện pháp tạo củ giống sạch bệnh	GS.TS. Vũ Triệu Mân
2004-2005	10	Hà Viết Cường* (Luận án Tiến sĩ)	Chẩn đoán bệnh virus hại cây trồng	GS. James L. Dale GS. TS. Vũ Triệu Mân
	11	Đặng Lưu Hoa*	Bệnh thối nõn dưa	GS. Lester W. Burgess GS.TS Nguyễn Kim Vân
	12	Hà Giang*	Bệnh đốm dầu hại cây có múi và biện pháp phòng trừ	GS.TS. Vũ Triệu Mân

Ghi chú: *: đang thực hiện đề tài

4.15. Những bài và sách đã được xuất bản trong thời gian thực hiện đề tài

1 cuốn sách và 11 bài báo

V. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

5.1. Kết luận

Qua 4 năm thực hiện đề tài: 2001-2004, chúng tôi đã thu được những kết quả chính sau:

- Đã sản xuất được 7 loại Kit chẩn đoán bệnh virus, nấm và vi khuẩn hại cây trồng đó là: Kit ELISA cho virus Y khoai tây (PVY), virus X khoai tây (PVX), virus khảm cà chua (ToMV), virus hại tàn lụi cam chanh (CTV), virus khảm lá dâu (MuMV), Kit ELISA chẩn đoán nấm mốc sương (*Phytophthora* sp), Kit ELISA chẩn đoán bệnh vi khuẩn héo xanh (*Ralstonia solanacearum*) với đủ số lượng liệu phản ứng và đảm bảo chất lượng.

- Đã lựa chọn và áp dụng kỹ thuật PCR (của GS H. J. Su Đại học Đài Bắc, Đài Loan, 1999) và thực hiện tổ kỹ thuật này trong chẩn đoán bệnh Greening.

- Các Kit ELISA do đề tài sản xuất đã sử dụng cho việc chẩn đoán loại bỏ cây bệnh cho các ruộng khoai tây sạch bệnh (chương trình khoai tây Việt - Đức), cho bệnh virus thuốc lá ở Cao Bằng do Viện KTKT Thuốc lá sử dụng, cho virus dâu ở Trại Dâu tằm tơ Thái Bình .v.v.... Các chi cục kiểm dịch thực vật và kinh doanh sau nhập khẩu, Viện KHKT Nông nghiệp, Viện Sinh học nhiệt đới và nhiều trường Đại học, Viện ... đã sử dụng Kit ELISA của đề tài phục vụ nghiên cứu khoa học.

- Giá thành của Kit ELISA hiện chỉ bằng 1/3 – 1/2 giá của Kit nhập từ nước ngoài. Tính đặc hiệu tương đương. Riêng các Kit ELISA của virus PVX, ToMV còn có mức độ phản ứng mạnh hơn huyết thanh nhập nội trong một số trường hợp.

- Trong 4 năm thực hiện đề tài, các cán bộ tham gia đã trưởng thành rất nhiều về kỹ thuật và tác phong làm việc. Đề tài đã đào tạo được 12 thạc sĩ và 22 sinh viên làm luận án tốt nghiệp trong các nội dung thí nghiệm. Đăng 11 bài báo và viết một cuốn sách. Uy tín của phòng thí nghiệm được nâng cao.

5.2. Kiến nghị

Năm 2004 – 2005 trong dự án tăng cường trang thiết bị để ứng dụng công nghệ sinh học trong sản xuất giống cây trồng – Bộ KH-CN, Bộ GDDT và Bộ Tài Chính đã chú ý đầu tư và trang bị cho phòng thí nghiệm 1 máy siêu ly tâm và 1 số trang bị khác. Chúng tôi mong muốn trong những năm tới, 2 bộ quan tâm giúp phòng thí nghiệm hoàn chỉnh hệ thống sản xuất kháng huyết thanh và Kit ELISA vì đây là cơ sở sản xuất Kit duy nhất ở Việt Nam phục vụ cho việc sản xuất giống sạch và thực hiện nhiều kỹ thuật quan trọng trong công nghệ sinh học trên cơ sở loại bỏ cây bệnh (chuyển gen, lai tạo giống chống bệnh, nhân giống vô tính sạch bệnh...)

Chúng tôi cũng mong muốn Bộ giúp đỡ trong chương trình ương tạo công nghệ trong một số năm để phòng thí nghiệm có thể có đủ điều kiện thương mại hoá sản phẩm ở Việt Nam và một số nước trong khu vực. Với trang thiết bị được bổ sung hiện nay và sự giúp đỡ của bộ KH-CN và bộ GDDT, Bộ Tài chính, chúng tôi tin tưởng sản phẩm của chúng tôi sẽ ngày càng có vị trí cao hơn và đáp ứng yêu cầu sử dụng ngày càng tăng ở nước ta và có thể mở rộng đến một số quốc gia trong khu vực.