

D. Mảnh lưng ngực trước

E. Mảnh lưng ngực sau

G. Đốt cuối của phần bụng

Hình 2. Đặc điểm hình thái của *Haplothrips gowdeyi* Franklin

KẾT LUẬN

Trong vụ xuân từ năm 2008 đến năm 2010 tại Nghệ An đã phát hiện và xác định được 9 loài bọ trĩ hại cây lạc, chúng thuộc họ Phlaeothripidae và Thripidae.

Đã ghi nhận bổ sung thêm 2 loài bọ trĩ hại cây lạc, đó là loài *Megalurothrips sjostedti* Trybom (Thripidae) và loài *Haplothrips gowdeyi* Franklin (Phlaeothripidae).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. CABI, 2006. *Crop protection Compendium* (CD-ROM), Wallingford, Oxon, UK.

2. Cục Bảo vệ thực vật, 1998. *Phương pháp điều tra sâu bệnh hại*. Nxb Nông nghiệp, Hà Nội.

3. Trần Văn Lợi, 2001. Nghiên cứu tình hình gây hại, đặc tính sinh học sinh thái của bọ trĩ *Thrips palmi* Karny hại khoai tây vụ đông-xuân, *Luận văn thạc sĩ nông nghiệp*.

4. Mound L.A., 2007. *Thysanoptera biology and identification*, CSIRO Entomology, Canberra, Australia.

5. Nguyễn Văn Thiệp, 2000. Nghiên cứu cơ sở khoa học phòng trừ rầy xanh *Empoasca flavescens* Fabr. và bọ trĩ *Physothrips setiventris* Bagn. hại chè vùng Phú Thọ. *Tóm tắt luận án tiến sĩ nông nghiệp*, Hà Nội.

6. Viện Bảo vệ thực vật, 1999. *Kết quả điều tra côn trùng và bệnh cây ở các tỉnh miền Nam 1977 -1978*. Nxb Nông nghiệp, Hà Nội, 56-57.

7. Phạm Thị Vượng, 1998. Nghiên cứu cơ sở khoa học để phòng trừ rầy xanh và bọ trĩ hại lạc, *Luận án tiến sĩ Nông Nghiệp*, Viện KHKTNN Việt Nam, Hà Nội.

8. Wang C. L. and Chu Y. I., 1986. *Review of the Southern Thrips, Thrips palmi Karny*, *Chinese J. Ent.* 6: 133-143.

Phản biện: GS.TS. Phạm Văn Lâm

**THỬ NGHIỆM SẢN XUẤT KHÁNG HUYẾT THANH
VIRUS KHẢM LÙN NGÔ SUGARCANE MOSAIC VIRUS (SCMV)
Production of Antiserum Against Sugarcane Mosaic Virus (SCMV)
for Diagnosis**

Trần Thị Thanh Bình¹, Trần Thị Như Hoa²,
Hà Viết Cường³, Vũ Triệu Mân⁴

Abstract

Sugarcane mosaic virus (SCMV), a potyvirus of the family *Potyviridae*, is one of the most common viral pathogens of maize in Vietnam. SCMV induces typical mosaic symptoms and dwarfing on maize. Yields of infected plants are remarkably reduced. The most reliable and cheap method for diagnosis of this virus is ELISA. In this study, purified preparations of SCMV were made and used to immunize rabbits. Rabbits were injected with purified SCMV for four times at weekly intervals and the antisera from immunized rabbits were verified for the presence of SCMV antibodies at weekly intervals using an indirect-ELISA method. ELISA tests showed that SCMV antisera produced from this study were able to reliably detect SCMV from infected leaves and comparable with a commercialized ELISA from Agdia.

Keywords: Production, antiserum, *Sugarcane mosaic virus* (SCMV)

1. Trường Cao đẳng NN và PTNT Bắc Bộ
2. Trung tâm Bệnh cây nhiệt đới
3. Bộ môn Bệnh cây- ĐH Nông nghiệp Hà Nội
4. Hội nghiên cứu bệnh hại thực vật Việt Nam

ĐẶT VẤN ĐỀ

Hiện nay, bệnh khảm lùn cây ngô do virus khảm lá mía gây bệnh (*Sugarcane mosaic virus*, SCMV) đang là một trong những bệnh virus gây hại phổ biến trên cây ngô. Bệnh virus khảm lùn ngô làm cây thấp, lá co ngắn lại, hiện tượng khảm đặc biệt ở lá non và lá bánh tẻ. Cây ngô bị bệnh cho năng suất thấp và ảnh hưởng nhiều đến chất lượng hạt. Việc phát hiện bệnh nhanh và sớm trên đồng ruộng là yêu cầu cần thiết trong quá trình chăm sóc và phòng trừ bệnh.

Thử nghiệm miễn dịch liên kết men (Enzyme linked immunosorbent assay, ELSA) là kỹ thuật chẩn đoán bệnh virus chính xác, đơn giản. Tuy nhiên kháng huyết thanh đặc hiệu SCMV không có trên thị trường Việt Nam. Các thử nghiệm ELISA hiện đang thực hiện tại Việt Nam vẫn chủ yếu mua kháng huyết thanh ở nước ngoài với giá cao và thời gian giao nhận chậm.

Thử nghiệm sản xuất kháng huyết thanh đặc hiệu của virus SCMV phục vụ công tác chẩn đoán và kiểm soát bệnh khảm lùn cây ngô ở Việt Nam đã được thực hiện ở phòng thí nghiệm virus thực vật, Trung tâm Bệnh cây nhiệt đới Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Vật liệu

- Các mẫu ngô nhiễm bệnh khảm lùn được thu thập ở Viện nghiên cứu ngô, Huyện Đan Phượng, Huyện Chương Mỹ (Hà Nội). Cây chỉ thị thực hiện trong thí nghiệm là cây thuốc lá *Nicotiana tabacum cv. Xanthi*; *N. cv. samsun*; *N. White Buley* và cây ngô sạch bệnh được kiểm tra bằng ELISA của hãng Agdia (Mỹ).

Thỏ thí nghiệm được nuôi trong phòng thí nghiệm với trọng lượng trên 2 kg.

- Các hóa chất thí nghiệm được nhập từ hãng Merck từ Pháp. Kháng huyết thanh được nhập của hãng Agdia (Mỹ).

2. Phương pháp nghiên cứu

Virus được truyền vào cây chỉ thị nhờ bột Cacborandum 600 Mesh và dung dịch đệm phosphat pH=7,0. Virus SCMV được tinh chiết theo phương pháp của Von Baumgarten & Ford, 1981. Sau đó virus được kiểm tra trên kính hiển vi điện tử JEOL - 1010.

Virus tinh chiết được tiêm vào cơ bắp của thỏ. Dịch virus được trộn với Freund's adjuvant theo thể tích tương đương Thỏ được gây miễn dịch 1 lần/tuần và liên tục trong 4 tuần. Kháng

huyết thanh thỏ được thu sau mỗi lần tiêm tính từ lần tiêm thứ 2 để kiểm tra chất lượng.

Phản ứng ELISA gián tiếp (indirect ELISA) sử dụng kháng huyết thanh thỏ được thực hiện theo phương pháp của Mowat & Dawson (1987).

Phản ứng của kháng huyết thanh do phòng thí nghiệm sản xuất được so sánh với kháng huyết thanh của hãng Agdia (Mỹ).

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

1. Kiểm tra sự có mặt của kháng thể virus SCMV trong kháng huyết thanh(KHT)

Kháng nguyên của virus sau khi làm sạch được tiêm vào cơ bắp thỏ 4 lần, mỗi lần cách nhau 7 ngày. Máu thỏ được kiểm tra sự có mặt của kháng thể virus sau 2, 3 và 4 tuần tiêm. Sử dụng cây ngô bệnh và có đối chứng là cây khỏe của hãng Agdia để kiểm tra với ngưỡng pha loãng kháng huyết thanh thu được là 1/100; 1/200; 1/300 Kết quả thí nghiệm được trình bày ở bảng 1. Sau 2 tuần tiêm, kháng thể virus SCMV đã hình thành trong cơ thể thỏ. Đến tuần thứ 3, 4 kháng thể virus SCMV có mức phản ứng OD cao hơn sau tuần tiêm 2. Như vậy, KHT SCMV tạo được có chất lượng đảm bảo.

Bảng 1. Kiểm tra sự có mặt của kháng thể SCMV trong cơ thể thỏ thí nghiệm sau các tuần tiêm

Mẫu Thử nghiệm	Sau tiêm 2 tuần		Sau tiêm 3 tuần		Sau tiêm 4 tuần	
	OD	KL	OD	KL	OD	KL
NB-1	0,201	+	0,305	+	0,452	+
NB-2	0,232	+	0,328	+	0,480	+
NB-3	0,206	+	0,337	+	0,380	+
X _{NB}	0,213		0,323		0,437	
SD	0,007		0,011		0,008	
NK-1	0,097		0,079		0,083	
NK-2	0,081		0,084		0,089	
NK-3	0,089		0,082		0,086	
X _{NK}	0,089		0,082		0,086	
SD	0,005		0,002		0,002	
MB-1	0,213	+	0,328	+	0,450	+
MB-2	0,211	+	0,280	+	0,477	+
MB-3	0,236	+	0,352	+	0,599	+
X _{mía bệnh}	0,220		0,320		0,509	
SD	0,004		0,005		0,033	
MK-1	0,084		0,091		0,086	
MK-2	0,087		0,080		0,089	
MK-3	0,089		0,089		0,087	
X _{mía khỏe}	0,087		0,087		0,087	
SD	0,002		0,003		0,001	
Đệm	0,083		0,079		0,084	

Ghi chú: NB: Ngô bệnh; NK: Ngô khỏe; MB: Mía bệnh; MK: Mía khỏe;

Kết quả đọc sau 90 phút; Ngưỡng pha loãng dịch cây bệnh 1/20;

Ngưỡng pha loãng dịch cây khoẻ dùng hấp phụ chéo 1/20;

Ngưỡng pha loãng kháng huyết thanh 1/100;1/200; 1/300

DCK: Dịch cây khoẻ; KL: Kết luận; +: Cây nhiễm bệnh -: Cây khoẻ;

OD: Giá trị mật độ quang học đo ở bước sóng 405 nm.

2. Kết quả xác định ngưỡng pha loãng kháng huyết thanh

Xác định ngưỡng pha loãng KHT SCMV theo 3 ngưỡng khác nhau với độ hoà loãng dịch cây bệnh là 1/20 và ngưỡng pha loãng dịch cây khoẻ dùng hấp phụ chéo là 1/20. Kết quả thí nghiệm được trình bày ở bảng 2. Ở cả 3 ngưỡng pha loãng KHT SCMV là 1/100, 1/200, 1/300 đều có khả năng phát hiện phân biệt cây bệnh và cây khoẻ. Giá trị OD của cây bệnh đều cao và sai khác có ý nghĩa so với giá trị OD của cây khoẻ và so với giá trị OD của dung dịch đệm.

Bảng 2. Kết quả xác định ngưỡng pha loãng kháng huyết thanh SCMV

Mẫu thử nghiệm	Ngưỡng pha loãng kháng huyết thanh					
	1/100		1/200		1/300	
	OD	KL	OD	KL	OD	KL
CB-1	0,305	+	0,269	+	0,258	+
CB-2	0,636	+	0,470	+	0,632	+
CB-3	0,431	+	0,360	+	0,366	+
CB-4	0,391	+	0,290	+	0,213	+
X _{Cây bệnh}	0,440	+	0,347	+	0,367	+
SD	0,033		0,039		0,055	
CK-1	0,091		0,088		0,105	
CK-2	0,100		0,094		0,096	
CK-3	0,107		0,098		0,101	
X _{Cây khoẻ}	0,099		0,093		0,101	
SD	0,005		0,003		0,003	
Đệm 1	0,083		0,083		0,083	
Đệm 2	0,089		0,086		0,099	
Đệm 3	0,085		0,093		0,086	
X _{Đệm}	0,086		0,087		0,089	
SD	0,002		0,003		0,004	

Ghi chú: Kết quả đọc sau 90 phút; Ngưỡng pha loãng dịch cây bệnh 1/20; Ngưỡng pha loãng dịch cây khoẻ dùng hấp phụ chéo 1/20; CB: Cây bệnh; CK: Cây khoẻ; OD: Giá trị mật độ quang học đo ở bước sóng 405 nm; X: Giá trị trung bình mẫu; SD: Độ lệch chuẩn mẫu; KL: Kết luận; +: Cây nhiễm bệnh; -: Cây khoẻ

Ở ngưỡng pha loãng KHT SCMV 1/100 giá trị OD của cây bệnh đo được đều cao hơn hẳn so với 2 ngưỡng pha loãng KHT còn lại. Giá trị OD trung bình của cây bệnh cao nhất ở ngưỡng pha loãng KHT 1/100 là 0,636 và giá trị OD của cây bệnh thấp nhất ở ngưỡng pha loãng KHT 1/300 là 0,213 nhưng vẫn có khả năng phân biệt cây bệnh và cây khoẻ.

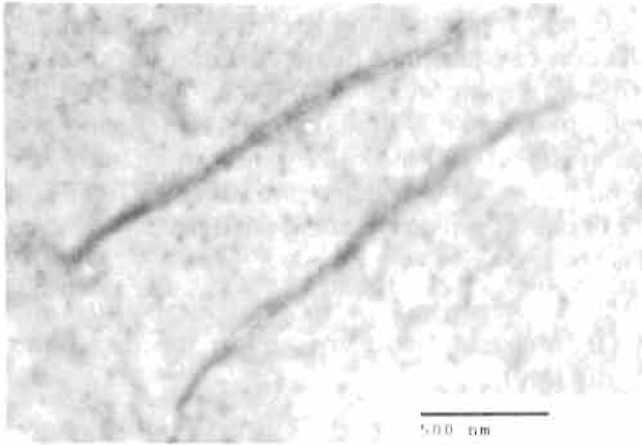
3. So sánh khả năng phát hiện virus của KHT sản xuất được với kháng thể của hãng Agdia (Mỹ)

Kết quả kiểm tra các mẫu ngô có triệu chứng điển hình để có so sánh với kháng huyết thanh của Agdia (Mỹ) được trình bày ở bảng 3.

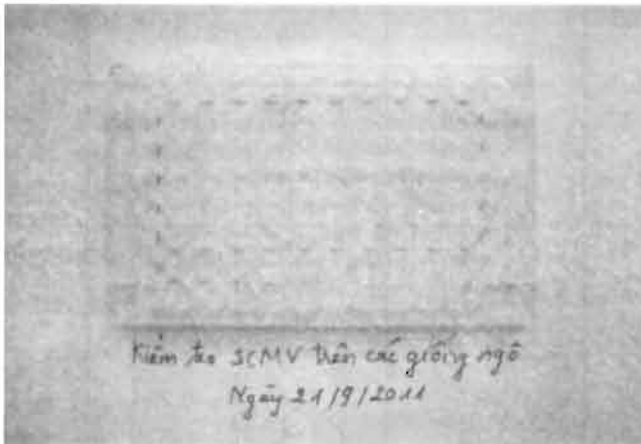
Bảng 3. So sánh kháng huyết thanh mới sản xuất với kháng thể của hãng Agdia (tháng 9/ 2011)

TT	Mẫu thử	Giá trị một độ quang (OD)		Kết luận
		KHT của hãng Agdia (Mỹ)	KHT sản xuất ở Việt Nam	
1	CN 09-2	0,578	0,350	+
2	VS 09-36	0,611	0,421	+
3	LVN 98	0,734	0,590	+
4	CN 09-3	0,923	0,633	+
5	VS 09-37	0,344	0,284	+
6	SB 09-33	0,511	0,339	+
7	H 08-10	0,379	0,230	+
8	KK 09-2	0,303	0,231	+
9	H 09-1	0,401	0,265	+
10	H 09-2	0,569	0,307	+
11	KK 09-36	0,622	0,475	+
12	SB 09-34	0,745	0,481	+
13	SB 09-34	0,599	0,334	+
14	SB 09-9	0,532	0,330	+
15	LVN 4	0,712	0,522	+
16	LVN 99	0,822	0,566	+
17	C 919	0,566	0,447	+
18	Đối chứng âm	0,111	0,098	
19	Đệm	0,088	0,073	

Qua bảng 4 thấy rằng KHT được sản xuất ở Việt Nam so với kháng thể hãng Agdia giá trị OD có thấp hơn nhưng tính đặc hiệu hoàn toàn tương đương với kháng huyết thanh của hãng Agdia và có thể sử dụng tốt cho việc chẩn đoán nhanh bệnh ở Việt Nam.



Hình 1. Sợi virus SCMV sau khi đã được làm tinh khiết từ mẫu thu được ở Huyện Chương Mỹ, Hà Nội (tháng 9/2011)



Hình 2. Kết quả kiểm tra ELISA trên các giống ngô ở Viện nghiên cứu ngô (tháng 9/2011)

4. Kiểm tra SCMV trên côn trùng môi giới là rệp cờ ngô *Rhopalosiphum maydis*

Rệp ngô được thu trên đồng ruộng trên cây bị bệnh và không bị bệnh (rệp nuôi trong thí nghiệm) để kiểm tra ELISA. Tiến hành thử nghiệm trên 4 tuổi sâu số lượng 1,3,5,7 con/giếng và ở hai loại đệm chiết là đệm Cacbonate pH = 9 và đệm PBS. Qua bảng thấy rằng sử dụng đệm PBS có giá trị OD cao hơn so với đệm Cacbonate pH=9,6. Do vậy ở các thí nghiệm kiểm tra về môi giới truyền bệnh bằng rệp sử dụng đệm PBS.

Đã thử nghiệm trên mỗi giống nghiên cứu từ 1,3,5,7 con có độ tuổi từ 1,2,3,4 tuổi để xem số lượng bao nhiêu con và độ tuổi nào là tốt nhất. Qua kết quả trên cho thấy mức độ sai khác không đáng kể. Tuy nhiên nên chọn rệp tuổi 1,2 và lượng từ 1-3 con/giếng.

Bảng 4. So sánh nồng độ virus SCMV trên các độ tuổi của rệp cờ ngô *Rhopalosiphum maydis* và các loại đệm chiết (Đan Phượng - Hà Nội, tháng 10/2011)

STT	Mẫu thử	Giá trị một độ quang (OD)		Kết luận
		Đệm Cacbonate pH = 9,6	Đệm PBS	
1	1 con tuổi 1	0,312	0,423	+
2	1 con tuổi 2	0,311	0,345	+
2	1 con tuổi 3	0,299	0,321	+
3	1 con tuổi 4	0,276	0,298	+
4	3 con tuổi 1	0,281	0,395	+
5	3 con tuổi 2	0,313	0,317	+
6	3 con tuổi 3	0,272	0,282	+
7	3 con tuổi 4	0,315	0,319	+
8	5 con tuổi 1	0,266	0,310	+
9	5 con tuổi 2	0,272	0,282	+
10	5 con tuổi 3	0,205	0,315	+
11	5 con tuổi 4	0,300	0,337	+
12	7 con tuổi 1	0,290	0,301	+
13	7 con tuổi 2	0,299	0,402	+
14	7 con tuổi 3	0,276	0,336	+
15	7 con tuổi 4	0,291	0,295	+
12	Đệm	0,082	0,086	-

KẾT LUẬN

Chất lượng KHT đặc hiệu SCMV do đề tài sản xuất có mức độ đặc hiệu tương đương với KHT của hãng Agdia nhưng giá trị OD thấp hơn. Tuy nhiên qua các thử nghiệm cho thấy KHT này có chứa kháng thể đặc hiệu SCMV cao với mức phản ứng mạnh gấp 23- 63 lần so với đối chứng cây khỏe và dung dịch đệm.

Kháng huyết thanh hoàn toàn có khả năng chẩn đoán phát hiện virus SCMV thay thế các kháng huyết thanh nhập nội.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chen, J., Chen, J. P. & Adams, M. J., 2002. Characterisation of potyviruses from sugarcane and maize in China. *Archives of Virology* 147, 1237-1246.
2. Gibb, A., Harrison, B., 1980. *Plant virology, the principles*, Edward Arnold Press, England.p. 153 - 156; 159 - 167; 187 - 191; 208 - 210.
3. Mowat, W. P. & Dawson, S., 1987. Detection and identification of plant viruses by ELISA using crude sap extracts and unfractionated antisera. *Journal of Virological Methods* 15 233-247.
4. Von Baumgarten & Ford, 1981. *Phytopathology* 71: 36.
5. Vũ Triệu Mân, 1991. Bệnh virus hại ngô, *Tạp chí Bảo vệ thực vật* 2.
6. Vũ Triệu Mân, 2003. *Chẩn đoán nhanh bệnh virus hại thực vật*, Nhà xuất bản Nông nghiệp, Hà Nội.

Phản biện: PGS.TS. Nguyễn Văn Viết