

## PHÁT HIỆN PHYTOPLASMA LIÊN QUAN ĐẾN HỘI CHỨNG VÀNG LÁ MÍA TẠI NGHỆ AN BẰNG KỸ THUẬT NESTED-PCR

Dương Thị Nguyên<sup>1\*</sup>, Trịnh Xuân Hoạt<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Trường Đại học Nông Lâm – ĐH Thái Nguyên, <sup>2</sup>Viện Bảo vệ thực vật

### TÓM TẮT

Mía được xem là một trong những cây trồng chính tại tỉnh Nghệ An. Hội chứng vàng lá mía (Sugar cane Yellow Leaf Syndrome - SCYLS) đã xuất hiện những năm gần đây và có thể trở thành một trong những bệnh hại nguy hiểm cho cây mía tại Nghệ An. Triệu chứng điển hình là lá biến vàng với gân chính của lá có màu vàng tươi, phần thịt lá vẫn giữ màu xanh. Chúng phytoplasma đã được phát hiện từ 16 mẫu trong tổng số 19 mẫu lá mía biểu hiện triệu chứng màu vàng ở gân chính của lá. Kỹ thuật nested-PCR với cặp primer P1/P7 và R16F2n/R16R2 đã khuếch đại được sản phẩm PCR với kích thước khoảng 1,2 kb. Trình tự đoạn 16S rRNA của chủng phytoplasma này có độ tương đồng 100% với đoạn 16S rRNA của chủng phytoplasma liên quan đến hội chứng vàng lá mía tại Hy Lạp. Các chủng phytoplasma này thuộc nhóm 16SrXII (Stolbur group). Đây là lần đầu tiên, chủng phytoplasma liên quan đến hội chứng vàng lá mía được phát hiện và giải mã tại Việt Nam.

**Từ khóa:** 16SrXII (Stolbur group), nested-PCR, phytoplasma, cây mía (*Saccharum officinarum* L.), hội chứng vàng lá mía

### ĐẶT VẤN ĐỀ

Mía (*Saccharum officinarum* L.) là một trong những cây trồng tiềm năng cho ngành sản xuất mía trên thế giới nói chung và tại Việt Nam nói riêng. Tại Việt Nam, cây mía đã trở thành cây xóa đói giảm nghèo, cung cấp nguyên liệu cho ngành công nghiệp sản xuất đường phục vụ tiêu thụ nội địa. Hội chứng vàng lá mía (Sugar cane Yellow Leaf Syndrome - SCYLS), có đặc điểm là gân chính của lá có màu vàng và phần thịt lá vẫn giữ màu xanh, lần đầu tiên được báo cáo trong những năm 1960 tại Đông Phi và sau đó tại Hawaii, Nam Phi và Cuba. Hiện nay, đang phân bố rộng rãi ở hầu hết các nước trồng mía của tất cả các châu lục; bệnh gây tổn thất từ 30% đến trên 60% của các giống nhiễm đã được báo cáo. Các dạng triệu chứng của SCYLS là do nhiều nguyên nhân, cả sinh học và phi sinh học, các nguyên nhân sinh học có liên quan đến sự nhiễm bệnh của luteovirus hoặc phytoplasma được phát hiện ở Hawaii, Brazil, Úc, Nam Phi, Cuba, Mỹ và Mauritius. Phytoplasma đã được chứng minh là có liên quan đến hội chứng vàng lá mía [2].

Phytoplasmas thuộc lớp dịch khuẩn bào (Mollicutes), là tác nhân gây bệnh cho nhiều

loại cây trồng khác nhau, cây cảnh và cỏ đại từ vùng ôn đới đến nhiệt đới, nhưng vẫn chưa nuôi cấy được trong ống nghiệm. Chúng được lan truyền bởi một số loài rầy chích hút mạch phloem theo phương thức bền vững. Các loài côn trùng thuộc họ Cicadellidae và một số họ rầy (Fulgoromorpha) là những nhóm truyền bệnh phytoplasma phổ biến nhất.

Tại Việt Nam, bệnh chồi cỏ đã xuất hiện từ năm 2005, và đặc biệt gây hại nặng từ năm 2007-2010 tại Nghệ An; bệnh trắng lá mía xuất hiện và trở thành đối tượng gây hại quan trọng cho cây mía tại một số tỉnh như Đồng Nai và hiện nay đã lan rộng ra Bình Dương, Khánh Hòa và Tây Ninh. Trong năm 2016, tại vùng trồng mía của huyện Nghĩa Đàn, tỉnh Nghệ An, đã ghi nhận triệu chứng giống với hội chứng vàng lá mía nghi ngờ có liên quan đến phytoplasma.

Trong bài báo này, phương pháp nested-PCR sử dụng các cặp primer chung P1/P7 và R16F2n/R16R2 đã được áp dụng khuếch đại trình tự đoạn gen 16S rRNA kết hợp phân tích gen và lần đầu tiên xác định chủng phytoplasma liên quan đến hội chứng vàng lá mía tại Nghệ An.

\* Tel: 0945 514967, Email: nguyentuaf1@gmail.com

**VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**

**Vật liệu nghiên cứu**

Năm 2016, mười chín mẫu lá mía biểu hiện triệu chứng điển hình của hội chứng vàng lá mía thu từ các địa điểm khác nhau tại các vùng trồng mía của huyện Nghĩa Đàn, tỉnh Nghệ An. Triệu chứng điển hình của hội chứng vàng lá mía bao gồm lá mía chuyển màu vàng, gân chính của lá có màu vàng tươi, phần phiến là còn lại thường giữ nguyên màu xanh (Hình 1). Phytoplasma gây bệnh chổi cỏ mía tại Nghệ An được sử dụng làm đối chứng dương của phản ứng PCR [10] và 01 mẫu cây mía khỏe được sử dụng làm đối chứng âm. Tất cả các mẫu lá được bảo quản trong silicagel cho đến khi chiết suất DNA.

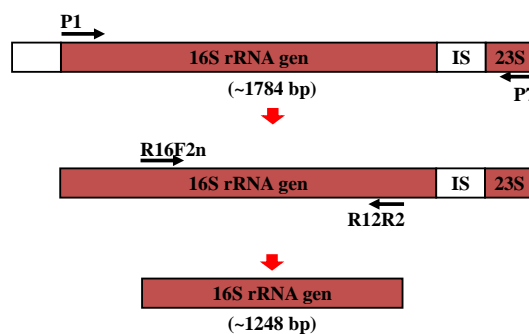


**Hình 1.** Triệu chứng điển hình của hội chứng vàng lá mía tại huyện Nghĩa Đàn, tỉnh Nghệ An

**Phương pháp nghiên cứu**

DNA được chiết suất theo phương pháp CTAB. Phản ứng PCR được thực hiện với các cặp primer P1 (5'- AAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG GAT T -3')/-P7 (5'- CGT CCT TCA TCG GCT CTT -3') [6] trong 25 µl phản ứng chứa 0,4 µM mỗi loại primer, 0,2 µM của mỗi loại dNTP, 1,25 Unit của DreamTaq DNA polymerase (Thermo Scientific, Germany) và 1xTaq polymerase buffer. Phản ứng PCR được thực hiện trong 35 chu kỳ với chu trình nhiệt bao gồm: 95°C trong 1 phút, 55°C trong 2 phút, và 72°C trong 3 phút bằng máy thermocycler (Eppendorf, Germany). Đối với phản ứng

nested-PCR, 1 µl của sản phẩm PCR đầu tiên được sử dụng làm DNA khuôn cho vào hỗn hợp phản ứng PCR sử dụng cặp primer R16F2n (5'-GAA ACG AGT GCT AAG ACT GG-3')/R16R2 (5'-TGA CGG GCG GTG TGT ACA CCC G-3') [8]. Vị trí của các primer sử dụng trong nghiên cứu được mô tả trong hình 2 [9]. Điều kiện nhiệt độ phản ứng nested-PCR giống như phản ứng PCR đầu tiên. Hai mẫu đối chứng âm bao gồm DNA chiết suất từ cây khỏe và nước cất được sử dụng trong cả hai phản ứng PCR. Sau khi kết thúc phản ứng neded-PCR, 5 µl của sản phẩm nested-PCR được điện di bằng 1% (w/v) agarose gel trong TAE buffer, nhuộm với ethidium bromide và chụp ảnh bằng hệ thống Geldoc-It™ Imaging System (USA).



**Hình 2.** Vị trí của một số primer trên đoạn gen 16-23S rRNA. Các cặp primer chung (universal primer) P1/P7, R16F2n/R16R2 được thiết kế dựa trên đoạn bảo thủ của gene 16 và 23SrRNA từ nhiều chủng phytoplasma gây bệnh thực vật khác nhau. IS = intergenic spacer; 23S = 23S rRNA gen [9]

Tất cả các sản phẩm PCR được tinh sạch bằng DNA Purification Kit Qiagen, Singapore và giải trình tự trực tiếp sử dụng 2 primer R16F2n và R16R2 bằng máy ABI3100 tại Hàn Quốc (BigDye Terminator 3.1 Kit, Applied Biotech). Trình tự các mẫu được so sánh với Ngân hàng Gen bằng phần mềm trực tuyến <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Cây phả hệ xây dựng theo phương pháp Neighbor-joining với khoảng cách di truyền giữa các chuỗi được xác định dựa trên mô hình thay thế Kimura hai tham số, giá trị thống kê bootstrap (%) với 1000 lần lặp lại trong phần mềm MEGA 6.0 [12].

**Thời gian và địa điểm nghiên cứu**

Thí nghiệm được tiến hành tại phòng thí nghiệm của Viện Bảo vệ thực vật trong năm 2017.

**KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU**

**Phát hiện phytoplasma trong mô cây bị bệnh bằng phương pháp Nested-PCR**

Do phytoplasma thường phân bố không đồng đều trong mô cây bị nhiễm bệnh; do đó, sau phản ứng PCR lần thứ nhất sử dụng cặp primer P1/P7, không quan sát thấy sản phẩm PCR nào bằng phương pháp nhuộm ethidium bromide (số liệu không thể hiện).

Nested PCR sử dụng cặp primer R16F2n/R16R2 đã khuếch đại sản phẩm nested PCR với kích thước khoảng 1,2-kb từ DNA chiết suất từ 16 mẫu trong tổng số 19 mẫu lá mía có biểu hiện triệu chứng điển hình của hội chứng vàng lá mía và mẫu đối chứng dương (bệnh chổi cỏ mía) trong khi đó không có sản phẩm PCR nào được phát hiện từ mẫu mía khỏe (hình 3).

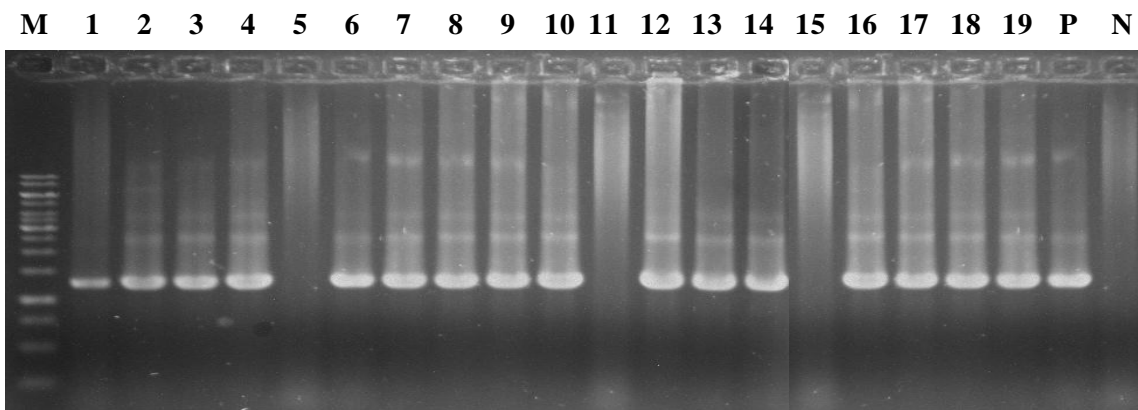
**Giải mã và phân tích gen**

Kết quả đọc trình tự cho thấy sản phẩm nested PCR thu được chính là đoạn trình tự 16S rRNA từ phytoplasma, tất cả các mẫu thu được tại Nghệ An đều có trình tự 16S rRNA đồng nhất 100%. Các sản phẩm đã được cắt hai đầu và có chiều dài 1210 bp (mẫu đại diện

được ký hiệu SCYLNAVN). Trình tự đoạn gen 16S rRNA của SCYLNAVN có độ tương đồng 100% so với gen 16S rRNA của nguồn phytoplasma liên quan đến hội chứng vàng lá mía tại Hy Lạp (Mã số Ngân hàng: JX157631), 99% so với nguồn phytoplasma gây bệnh diệp lục hóa cây dứa cạn (*Catharanthus roseus*) tại Ấn Độ (Mã số Ngân hàng: KY695170), 99% so với nguồn phytoplasma gây bệnh vàng lá cây xoan (*Melia azedarach*) tại Trung Quốc (Mã số Ngân hàng: KX683297), 99% tương đồng với nguồn phytoplasma gây bệnh chổi rồng cây bí ngô (*Cucurbita pepo*) tại Ấn Độ (Mã số Ngân hàng: KY471168) (số liệu không thể hiện).

Cây phả hệ đã được xây dựng dựa trên trình tự 16S rRNA của chủng phytoplasma của Việt Nam (SCYLNAVN) cùng với 22 đoạn trình tự gen 16S rRNA của 22 chủng phytoplasma thuộc nhiều nhóm khác nhau và gây nhiều loại bệnh cây trồng khác nhau (Bảng 1). Trong đó, SCYLNAVN có độ tương đồng 100% với chủng phytoplasma gây hội chứng vàng lá mía tại Hy Lạp và cùng với Rice Orange Leaf Phytoplasma (ROL, mã số AB052870) và Onion Yellow Phytoplasma (OY, mã số D12569.2) tạo thành một nhóm và đều thuộc nhóm 16SrXII (Stolbur group) (Hình 4).

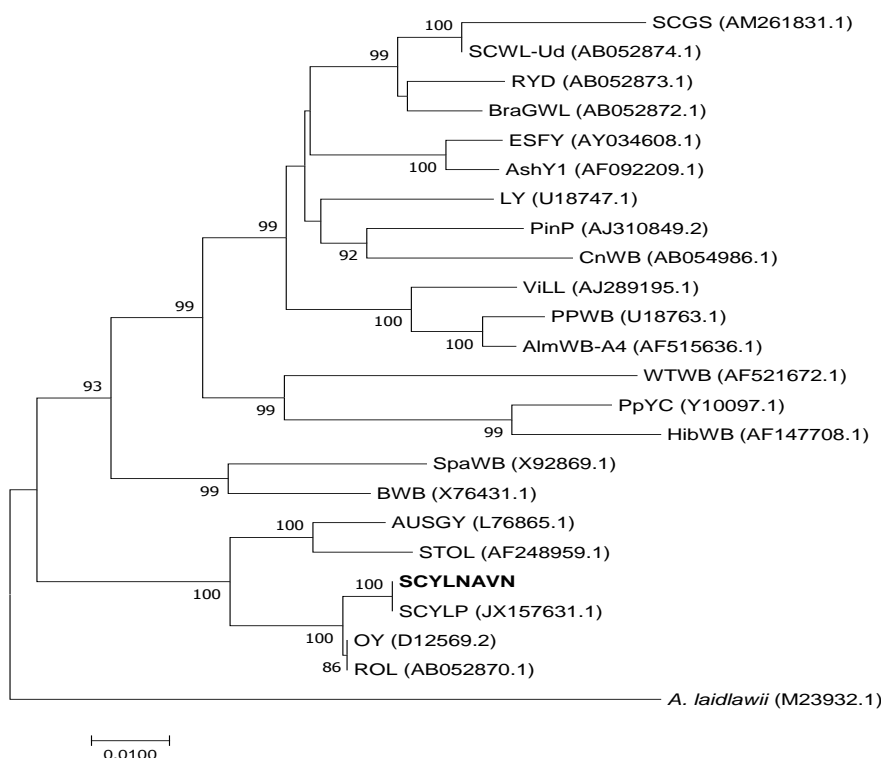
**P1/P7-R16F2n/R16R2**



**Hình 3.** Kết quả phản ứng PCR đối với các mẫu mía Biểu hiện triệu chứng SCYLS thu tại Nghệ An. Hình đại diện sản phẩm PCR khuếch đại bằng các cặp primer P1/P7-R16F2n/R16R2. M: 1kb DNA marker, mẫu 1-19: Các mẫu mía biểu hiện triệu chứng điển hình của hội chứng vàng lá mía thu tại Nghệ An, mẫu P: Mẫu mía bị nhiễm bệnh chổi cỏ mía làm đối chứng dương, và mẫu N: Mẫu mía khỏe làm đối chứng âm

**Bảng 1.** Các phytoplasma sử dụng trong phân tích phả hệ

Mã số	Phytoplasma	Bệnh liên quan	Nhóm phụ	Nhóm 16S
AF515636	AlmWB-A4 <sup>T</sup>	Almond witches'-broom	AlmWBA4 <sup>T</sup>	PPWB
AF092209	AshY1 <sup>T</sup>	Ash yellows	AshY1 <sup>T</sup>	EY
L76865	AUSGY	Australian grapevine yellows	AUSGY	AY
X76431	BWB	Buckthorn witches'-broom	BWB	AP
AB052872	BraGWL	Brachiaria grass white leaf	BraGWL	RYD
AB054986	CnWB	Chestnut witches'-broom	CnWB	CnWB
U18763	PPWB	Caribbean pigeon pea witches'- broom	PPWB	PPWB
AY034608	ESFY	Erigeron witches'-broom	ESFY	AP
AF147708	HibWB	Hibiscus witches'-broom	HibWB	WBDL
U18747	LY	Coconut lethal yellowing	LY	LY
D12569	OY	Onion yellows	AY	AY
AJ310849	PinP	Pinus sylvestris yellows	PinP	CnWB
Y10097	PpYC	Papaya yellow crinkle	PpYC	WBDL
AB052870	ROL	Rice orange leaf	AY	AY
AB052873	RYD	Rice yellow dwarf	RYD-J <sup>T</sup>	RYD
AB052874	SCWL-Ud	Sugarcane white leaf	SCWL-Ud	RYD
AM261831	SCGS	Sugarcane grassy shoot	SCGS	RYD
X92869	SpaWB	Spartinum witches'-broom	SpaWB	AP
AF248959	STOL	Capsicum annuum stolbur	STOL	AY
AJ289195	ViLL	Vigna little leaf	ViLL	PPWB
AF521672	WTWB	Weeping tea tree witches'-broom	WTWB	WTWB
JX157631	SCYLS	Sugarcane yellow syndrome	SCYLS	SCYLS
M23932	<i>Acholeplasma laidlawii</i>	-	-	-



**Hình 4.** Cây phả hệ được xây dựng bằng phương pháp Neighbor-Joining trong phần mềm MEGA6.0. Chúng phytoplasma của Việt Nam ký hiệu SCYLSNAVN (bôi đậm) cùng với 22 chủng phytoplasma thuộc các nhóm khác nhau gây bệnh trên nhiều loại cây trồng khác nhau. Mã số Ngân hàng gen được đặt trong ngoặc kép. *A. laidlawii* được sử dụng làm nhóm ngoài

```

SCYLNNAVN          ctaagactggataggagacaagaaggcatcttcttgtttttaaagacctagcaataggt
SCWLBDVN (JN127376) -----taaagacttttctggaagt
                      * * * * *
SCYLNNAVN          atgcttagggaggagcttgcgtcacattagttagttgggtgggtaaaagcctaccaagac
SCWLBDVN (JN127376) atgcttaaagaggggcttgcgtcacattagttagttggcagggtaaaagcctaccaagac
                      *****
SCYLNNAVN          tatgatgtgtagccgg-gctgagaggttgaacggccacattgggactgagacacggccca
SCWLBDVN (JN127376) tatgatgtgtagctggacctgagaggttgaacagccacattgggactgagacacggccca
                      *****
SCYLNNAVN          aactcctacgggagcagcagtagggaattttcggcaatggaggaaactctgaccgagca
SCWLBDVN (JN127376) aactcctacgggagcagcagtagggaattttcggcaatggaggaaactctgaccgagca
                      *****
SCYLNNAVN          acgccgctgaacgatgaagtattt-cggtacgtaaaagttctttattgcaagaataa
SCWLBDVN (JN127376) acgccgctgaacgatgaagtattt-cggtacgtaaaagttctttattgcaagaagaaaa
                      *****
SCYLNNAVN          atgatgaaaaatcattctgacggtacctaataaagcgcggctaaactatgtgccag
SCWLBDVN (JN127376) atgatgaaaaactatcttgacgatattcaatgaataagcccgcaactatgtgccag
                      **
SCYLNNAVN          cagccgctgattacatagggggcaagcgttatccggaattattgggcgtaaaaggtgcg
SCWLBDVN (JN127376) cagccgctgtaatacatagggggcagcgttatccggaattattgggcgtaaaaggtgcg
                      *****
SCYLNNAVN          tagcggttaaataagtaaatggtctaaagtgcaactgctcaacattgtgatgctataaaa
SCWLBDVN (JN127376) tagcggttaaataagtctatagtttaatttcagtgcttaacactgctctgctatagaaa
                      *****
SCYLNNAVN          ctgttagctagagtaagatagaggcaagtggaa-ttccatgtgtagtggtaaaatgctg
SCWLBDVN (JN127376) ctattagactagagtgagatagaggcaagtggaa-ttccatgtgtagcggtaaaatgctg
                      **
SCYLNNAVN          aaatatatggaggaaaccagtagcgaaggcggcttctgctgggtcttactgacgctgagg
SCWLBDVN (JN127376) aaatatatggaggaaaccagagggcgttagcggcttctgctgggtcttactgacgctgagg
                      *****
SCYLNNAVN          cagaaagcgtggggcaaacaggattagataccctggtagtccacgcccgtaaacgatg
SCWLBDVN (JN127376) cagaaagcgtggggagcaaacaggattagataccctggtagtccacgcccgtaaacgatg
                      *****
SCYLNNAVN          agtactaaacgttgggtaaacaccagtggtgaagtttcacattaagtagtccgctgagt
SCWLBDVN (JN127376) agtactaaagtgctgggattactcggtagtgaagttaacacataaagtagtccgctgagt
                      *****
SCYLNNAVN          agtacgtacgcaagtatgaaagttaaaggaattgacgggactccgcacaagcgggtggatc
SCWLBDVN (JN127376) agtacgtacgcaagtatgaaacttaaaggaattgacgggactccgcacaagcgggtggatc
                      *****
SCYLNNAVN          atgttgtttaattcgaaggtaccggaaaaacctcaccaggtcttgacatgctctcgaaa
SCWLBDVN (JN127376) atgttgtttaattcgaagatcacgaaaaacctcaccaggtcttgacatgctctcgaaa
                      *****
SCYLNNAVN          gctgtagaaacacagtgagggttatcagttgcacaggtggtgcatggtgtgctgagctc
SCWLBDVN (JN127376) ctataggcaatatagtggaggttatcagggatacaggtggtgcatggtgtgctgagctc
                      * * *
SCYLNNAVN          gtgtcgtgagatgttgggttaagtcccgcacagcgcgaacccttattgttagttaccag
SCWLBDVN (JN127376) gtgtcgtgagatgttaggttaagtcccgcacagcgcgaacccttattgttagttaccag
                      *****
SCYLNNAVN          cacgtaagtggggg-actttagcaagactgcccagtgataaattggaggaggtgggac
SCWLBDVN (JN127376) cacgtaagtggggg-actttagcaagactgcccagtgataaattggaggaggtgggac
                      *****
SCYLNNAVN          gacgtcaaatcatcatgccccttatggacctgggctacaaaacgtgatacaatggctgta
SCWLBDVN (JN127376) gacgtcaaatcatcatgccccttatg-atctgggctacaaaacgtgatacaatggctgta
                      *****
SCYLNNAVN          caaagggtagctgaagcgaagttttggcgaatctcaaaaaacagctcagttcggat
SCWLBDVN (JN127376) caaagggtagctgaagcgaagttttggcgaatctcaaaaaacagctcagttcggat
                      *****
SCYLNNAVN          tgaagtctgcaactcgacttcatgaagttggaatcgctagtaatcgcaatcagcatgtc
SCWLBDVN (JN127376) tgaagtctgcaac-----
                      *****
SCYLNNAVN          gcggtgaatacgtt
SCWLBDVN (JN127376) -----
    
```

**Hình 5.** So sánh trình tự gen 16S rRNA của chủng phytoplasma liên quan đến bệnh trắng lá mía tại Bình Dương (SCWLBDVN, mã số JN127376) và hội chứng vàng lá mía (SCYLS) trong nghiên cứu

Trong một thời gian dài, hội chứng vàng lá mía được cho là do mất cân bằng dinh dưỡng, úng nước, nhiệt độ lạnh hoặc đất thiếu dinh dưỡng. Tuy nhiên, các dạng triệu chứng và cách phân bố trên đồng ruộng cho thấy tác nhân sinh học là nguyên nhân gây bệnh và giả thuyết này đã được chứng minh từ việc phát hiện được một loại virus trong cây mía biểu hiện triệu chứng của hội chứng vàng lá. Virus này cũng đã được lây truyền thành công sang cây mía khỏe bằng loài rầy

*Melanaphis sacchari* và loài rệp *Rhopalosiphum maidis* [1]. Tuy nhiên, các nhóm nghiên cứu ở Nam Phi, Cuba và Mauritius đã không thể tách được SCYLV từ cây mía biểu hiện hội chứng vàng lá mía; và đã đưa ra giả thuyết là ở những nước này, phytoplasma có nhiều khả năng liên quan đến hội chứng vàng lá mía. Luteoviruses và phytoplasmas là hai loại tác nhân gây bệnh thực vật với các đặc trưng là gây ra các triệu chứng vàng cho cây ký chủ; vì vậy, khó có thể phân biệt tác nhân gây bệnh này bằng việc quan sát và phân tích triệu chứng đơn thuần [4].

Một nhóm nghiên cứu đã thu thập triệu chứng vàng gân chính của lá mía tại Thái Lan và kiểm tra sự có mặt của phytoplasma bằng phương pháp PCR; tuy nhiên, nhóm tác giả đã kết luận triệu chứng vàng gân chính của lá là triệu chứng đầu tiên của bệnh trắng lá mía [11]. Chúng tôi tiến hành so sánh trình tự gen 16S rRNA của chủng phytoplasma liên quan đến bệnh trắng lá mía tại Bình Dương (SCWLBDVN, mã số JN127376) và hội chứng vàng lá (trong nghiên cứu này). Trình tự hai đoạn gen của 2 chủng phytoplasma này có nhiều vị trí nucleotide hoàn toàn khác nhau (Hình 5). Như vậy, chúng tôi đã khuếch đại được đoạn gen của phytoplasma liên quan đến hội chứng vàng lá mía tại Nghệ An, Việt Nam; và cũng chứng minh rằng triệu chứng vàng gân chính của lá mía không phải là triệu chứng ban đầu của bệnh trắng lá mía.

Phytoplasma đã được chứng minh là có liên quan đến hội chứng vàng lá mía [3], [7]. Gần đây, loài rệp *Saccharosydne saccharivora* đã được chứng minh là môi giới truyền phytoplasma liên quan đến bệnh vàng lá mía tại Cuba. Loài *S. saccharivora* chính hút 72 giờ trên cây mía biểu hiện hội chứng vàng lá thu thập ngoài đồng ruộng và được thả lên cây khỏe trong 15 ngày; sau 7-12 tháng lây nhiễm, có 24 trong tổng số 36 cây mía lây nhiễm đã biểu hiện hội chứng vàng lá giống với triệu chứng quan sát ngoài đồng ruộng và phytoplasma cũng đã được tách từ cây mía

biểu hiện triệu chứng sau khi lây nhiễm nhân tạo. Nhóm nghiên cứu đã hoàn thành chu trình Koch chứng minh phytoplasma là nguyên nhân gây ra hội chứng vàng lá mía tại Cuba [5].

Trong nghiên cứu của chúng tôi, lần đầu tiên đã phát hiện được chủng phytoplasma từ hội chứng vàng lá mía tại Nghệ An, Việt Nam. Tuy chưa hoàn thành được chu trình Koch xác định môi giới truyền bệnh, nhưng đây là kết quả nghiên cứu ban đầu quan trọng cho thấy nhiều khả năng phytoplasma liên quan đến hội chứng vàng lá mía. Những nghiên cứu tiếp theo cần được thực hiện bao gồm thu thập, đánh giá sự có mặt của các loài rệp trên cây mía; tiến hành lây nhiễm nhân tạo để xác định được loài côn trùng nào có khả năng truyền phytoplasma sang cây khỏe. Ngoài ra, cần nghiên cứu, đánh giá sự liên quan của virus với hội chứng vàng lá tại Nghệ An.

#### KẾT LUẬN

Bằng kỹ thuật nested-PCR với cặp primer P1/P7 và R16F2n/R16R2, đã phát hiện được chủng phytoplasma từ mẫu mía biểu hiện triệu chứng hội chứng vàng lá thu tại Nghệ An. Đoạn trình tự 16S rRNA của chủng phytoplasma này có độ tương đồng 100% với đoạn 16S rRNA của chủng phytoplasma liên quan đến hội chứng vàng lá mía tại Hy Lạp. Các chủng phytoplasma này thuộc nhóm 16SrXII (Stolbur group). Đây là lần đầu tiên, chủng phytoplasma liên quan đến hội chứng vàng lá mía được phát hiện và giải mã tại Việt Nam.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Aljanabi S., Parmessur Y., Moutia Y., Saumtally S., Dookun A. (2001), "Further evidence of the association of a phytoplasma and a virus with yellow leaf syndrome in sugarcane", *Plant Pathology*, 50, pp. 628-636.
2. Arocha Y., Jones P., Sumac I., Peralta E. L. (2000), "Detection of phytoplasmas associated with yellow leaf syndrome in Cuba", *Revista de Protección Vegetal*, 15, pp. 81-87.
3. Arocha Y., López M., Piñol B., Fernández M., Picornell B., Almeida O., Palenzuela

- I., Wilson M. R., Jones P. (2005a), "Candidatus Phytoplasma graminis' and 'Candidatus Phytoplasma caricae', two novel phytoplasmas associated with diseases of sugarcane, weeds and papaya in Cuba", *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 55(6), pp. 2451-2463.
4. Arocha Y., González L., Peralta E. L., Jones P. (1999), "First report of virus and phytoplasma pathogens associated with yellow leaf syndrome of sugarcane in Cuba", *Plant Disease*, 83, pp. 1171.
5. Arocha Y., López M., Fernández M., Piñol B., Horta D., Perlta E. L., Almeida R., Carvajal O., Picornell S., Wilson M. R., Jones P. (2005b), "Transmission of a sugarcane yellow leaf phytoplasma by the delphacid planthopper *Saccharosydne saccharivora*, a new vector of sugarcane yellow leaf syndrome", *Plant Pathology*, 54, pp. 634-642.
6. Deng S., Hiruki C. (1991), "Amplification of 16S rRNA gens from culturable and non-culturable mollicutes", *Journal of Microbiological Methods*, 14, pp. 53-61.
7. Gaur R. K., Rao G. P. (2010), "Detection of a 16SrXII phytoplasma associated with sugarcane yellow leaf syndrome in India", *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 43(11), pp. 1132-1137.
8. Gundersen D. E., Lee I. M. (1996), "Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primer pairs", *Phytopathologia Mediterranea*, 35, pp. 144-151.
9. Heinrich M., Botti S., Caprara L., Arthofer W., Strommer S., Hanzer V., Katinger H., Bertaccini A., Laimer da Camara Machado M. (2001), "Improved detection methods for fruit tree phytoplasmas", *Plant Mol. Biol. Rep.*, 19, pp. 169-179.
10. Hoat T. X., Bon N. G., Quan M. V., Thanh N. D., Hien V. D., Dickinson M. (2012), "Molecular detection and characterization of a phytoplasma associated with sugarcane grassy shoot disease in Vietnam", *Phytoparasitica*, 40(4), pp. 351-359.
11. Soufi Z., Sakuanrungsirikul S., Wongwarat T., Hamarn T., Srisink S., Komor E. (2013), "Sugarcane yellow leaf symptomatic plants in Thailand are infected by white leaf phytoplasma, not by leaf yellows phytoplasma", *Australian Plant Pathology*, 42(6), pp. 723-729.
12. Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S. (2013), "MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0", *Molecular Biology and Evolution*, 30, pp. 2725-2729.

## ABSTRACT

### MOLECULAR DETECTION AND IDENTIFICATION OF A PHYTOPLASMA ASSOCIATED WITH SUGARCANE YELLOW LEAF SYNDROME IN NGHE AN PROVINCE, VIETNAM

Duong Thi Nguyen<sup>1\*</sup>, Trinh Xuan Hoat<sup>2</sup>

<sup>1</sup>TNU-University of Agriculture and Forestry, <sup>2</sup>Plant Protection Research Institute

Sugarcane is the one of the main crop in Nghe An province. Sugarcane Yellow Leaf Syndrome (SCYLS) has occurred in recent years and suspected to be among of the most important diseases of sugarcane in Nghe An province. The typical symptoms of the disease have been observed in Nghe An were similar to that in other countries characterized by yellow leaves with a bright yellow midrib, the rest of the lamina is still green. Phytoplasma strain was consistently detected in leaves of sugarcane in Nghe An exhibiting symptoms of yellowing of midribs. A phytoplasma characteristic 1.2 kb rDNA PCR product was amplified by the universal primer pairs P1/P7 and R16F2n/R16R2 from 16 of 19 diseased samples but not in healthy sugarcane plants. The sequences of the 16S rRNA genes, confirmed the identity of the phytoplasma with phytoplasma associated with SCYL in Egypt and they were belonging to 16SrXII (Stolbur group). This is the first time we detected a phytoplasma associated with sugarcane yellow syndrome in Nghe An, Vietnam.

**Keywords:** 16SrXII (Stolbur group), nested-PCR, phytoplasma, sugarcane (*Saccharum officinarum* L.), sugarcane yellow leaf syndrome

Ngày nhận bài: 13/9/2017; Ngày phản biện: 01/10/2017; Ngày duyệt đăng: 31/10/2017

\* Tel: 0945 514967, Email: nguyentuaf1@gmail.com