

ẢNH HƯỞNG CỦA NỒNG ĐỘ BRASSINOLIDE ĐẾN BỆNH VÀNG LÁ GÀN XANH, NĂNG SUẤT VÀ PHẨM CHẤT TRÁI BUỒI DA XANH (*Citrus maxima* (Burm.) Merr.) TẠI HUYỆN KẾ SÁCH, TỈNH SÓC TRĂNG

Lăng Hoài Phong¹, Huỳnh Lê Anh Như²,

Trần Văn Hậu², Trần Sỹ Hiếu²

TÓM TẮT

Để tài được thực hiện nhằm xác định hiệu quả của các nồng độ Brassinolide phun qua lá lên tỷ lệ và chỉ số bệnh vàng lá gân xanh, năng suất và phẩm chất bưởi Da xanh. Thí nghiệm được thực hiện trên cây bưởi Da xanh 15 năm tuổi tại huyện Kế Sách, tỉnh Sóc Trăng. Thời gian thực hiện từ tháng 6/2017 đến tháng 6/2018. Thí nghiệm được bố trí theo thể thức khối ngẫu nhiên hoàn toàn, sáu lần lặp lại, mỗi lặp lại tương ứng với một cây. Nghiệm thức là nồng độ Brassinolide (BR): (i) 0,05 μM ; (ii) 0,10 μM ; (iii) 0,15 μM và hai nghiệm thức đối chứng là đối chứng dương phun dung dịch ZnSO_4 , 0,5% + MnSO_4 , 0,5% và đối chứng âm phun nước. Các nghiệm thức phun BR được phun định kỳ 2 tuần/lần từ khi cây bưởi chuẩn bị ra lá đến khi thu hoạch trái (12 tháng). Sự hiện diện của vi khuẩn *Candidatus Liberibacter asiaticus* trong lá trước và sau thí nghiệm được xác định bằng phương pháp PCR với cặp mồi đặc hiệu và định lượng hàm lượng tinh bột trong lá ở giai đoạn trước khi thu hoạch. Kết quả cho thấy phun Brassinolide (BR) ở các nồng độ 0,10 và 0,15 μM định kỳ 2 tuần một lần có hiệu quả lên các chỉ tiêu đánh giá bệnh vàng lá Greening, sự hiện diện của vi khuẩn, cải thiện đặc tính ra hoa, năng suất và phẩm chất trái bưởi Da xanh. Phun BR ở nồng độ 0,15 μM có hiệu quả làm giảm tỷ lệ lá bị bệnh, chỉ số bệnh và tỷ lệ đọt non nhiễm bệnh sau 3 tháng xử lý và giảm đến mức thấp nhất sau 12 tháng xử lý. Xử lý BR 0,15 μM còn làm giảm sự hiện diện của vi khuẩn đến mức không phát hiện được bằng kỹ thuật PCR ở thời điểm 12 tháng sau khi xử lý, giảm hàm lượng tinh bột trong lá, tăng tỷ lệ ra hoa đầu trái, năng suất và phẩm chất trái bưởi Da xanh.

Từ khóa: Brassinolide, điện di DNA, tinh bột trong lá, bưởi Da xanh, vàng lá Greening.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Sự đa dạng khí hậu ở các vùng trồng trọt là điều kiện thích hợp cho nhiều loài sâu bệnh phát sinh gây hại trên cây bưởi, là nguyên nhân ảnh hưởng trực tiếp đến năng suất và chất lượng trái (Lê Mai Nhật, 2014). Một số bệnh điển hình ở cây bưởi như: Bệnh Tristeza, bệnh vàng lá thối rễ, ghê nhảm... Trong đó bệnh vàng lá Greening (VL Greening) gây hại nghiêm trọng trên hầu hết vườn cây bưởi. Bệnh do 3 dòng vi khuẩn *Liberibacter* gây ra là *Candidatus Liberibacter asiaticus* (Las), *Candidatus Liberibacter africanus* và *Candidatus Liberibacter americanus* (Canales và *ctv.*, 2016). Các dòng vi khuẩn này sống trong mạch libe của cây và lây truyền từ cây này sang cây khác thông qua các mắt ghép và mối giới truyền

bệnh là rầy chổng cánh (*Diaphorina citri*) ở châu Á và rầy cam (*Trioza erytreae*) ở châu Phi (Hung và *ctv.*, 2004). Đặc điểm của bệnh VL Greening là có thời gian ủ bệnh dài, nên khó phát hiện bệnh ở giai đoạn đầu và thường hay nhầm lẫn với bệnh khác như khi cây bị thiếu kẽm (Zn) (Lê Mai Nhật, 2014).

Brassinosteroids (BRs) là nhóm các hormone thực vật có tác động thúc đẩy sự sinh trưởng và kháng bệnh ở cây trồng (Nguyễn Minh Chơn, 2010). BRs có liên quan đến nhiều quá trình phát triển của thực vật: sự vươn dài, sự mở rộng lá, sự nảy mầm của hạt, sự ra hoa và lão hóa (Rao và *ctv.*, 2002). Kết quả nghiên cứu về điều trị bệnh VL Greening với BRs của Canales và *ctv.* (2016) cho thấy áp dụng Epibrassinolide (EBR) làm giảm đáng kể tác nhân gây bệnh VL Greening trên cây có múi, cây bị bệnh phục hồi rất tốt và phát triển bình thường. Đồng thời, EBR còn kích thích một số gen phòng vệ với vi khuẩn Las của cây bưởi (Canales và *ctv.*, 2016). Do vậy, nghiên cứu này được thực hiện nhằm đánh giá hiệu quả của nồng độ Brassinolide phun qua lá lên tỷ

¹ Học viên cao học ngành Khoa học cây trồng, Trường Đại học An Giang

² Bộ môn Khoa học cây trồng, Khoa Nông nghiệp, Trường Đại học Cần Thơ

Email: tshoc@ctu.edu.vn

lệ và chỉ số bệnh vàng lá gân xanh, năng suất và phẩm chất bưởi Da xanh.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP THÍ NGHIỆM

Thí nghiệm được thực hiện tại vườn bưởi Da xanh 15 năm tuổi từ tháng 6/2017 đến 6/2018 tại huyện Kế Sách, tỉnh Sóc Trăng. Các nghiệm thức phun Brassinolide (BR) được phun định kỳ 2 tuần một lần bắt đầu từ tháng 6/2017. BR được sử dụng là dạng chế phẩm thương mại Nyro 0,01SL (Brassinolide: 0,01% w/w) của Công ty TNHH TM & SX Ngọc Yến. Cây bưởi Da xanh 15 năm tuổi được nhân giống bằng phương pháp chiết, cây bưởi được trồng trên nền đất phù sa có lên liếp, có mương tưới tiêu, thoát nước tốt, khoảng cách trồng (cây x cây x hàng): 3 x 3 x 4 m. Cây được chọn có thời gian sinh trưởng, tỷ lệ bệnh và cấp bệnh tương đương nhau. Tình trạng bệnh của cây trước khi thí nghiệm được xác nhận bằng phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu (Forward primer O11: 5' CAC CGA AGA TAT GGA CAA CA 3' và Reverse primer O12: 5' GAG GTT CTG GTG GTT TTT CTG 3') của Jagouex *và ctv.* (1996).

Thí nghiệm được bố trí theo thể thức khối ngẫu nhiên hoàn toàn, có 5 nghiệm thức trong đó 3 nghiệm thức là nồng độ BR phun qua lá: (0,05 μM, 0,10 μM, 0,15 μM) và hai nghiệm thức đối chứng là đối chứng dương phun hỗn hợp ZnSO₄ 0,5% + MnSO₄ 0,5% ở dạng EDTA dựa trên nghiên cứu của Nguyễn Thị Minh Châu và Nguyễn Bảo Vệ (2005) và đối chứng âm phun nước. Mỗi nghiệm thức có 6 lần lặp lại, mỗi lần lặp lại tương ứng với một cây. Tất cả các nghiệm thức được phun định kỳ 2 tuần/lần, trong 12 tháng.

Các chỉ tiêu sinh trưởng của cây được theo dõi trong 12 tháng, định kỳ 1 tháng/lần bắt đầu từ khi bố trí thí nghiệm cho đến khi thu hoạch trái, tổng cộng 12 lần. Các chỉ tiêu quan sát bao gồm: chu vi gốc (cm) đo ở vị trí gốc lớn nhất trên mặt đất; chu vi thân cây (cm): đo ở vị trí thân lớn nhất; chiều cao cây (cm): đo từ mặt đất đến đỉnh chồi cao nhất của cây; chiều rộng tán cây (cm): đo từ hai chóp lá rộng nhất của cây.

Tỷ lệ bệnh và cấp bệnh được đánh giá theo QCVN 01 - 119:2012/BNN-PTNT, Quy chuẩn kỹ thuật Quốc gia về phương pháp điều tra phát hiện sinh vật gây hại trên cây ăn trái có múi. Trên mỗi cây 5 cành chính có tỷ lệ bệnh và cấp bệnh VL Greening tương đương nhau được đánh dấu và đánh giá tỷ lệ (%) lá trên cành bị nhiễm bệnh và "phân cấp bệnh

như sau: Mỗi cây chọn và đánh dấu 5 cành chính có tỷ lệ bệnh và cấp bệnh VL Greening tương đương nhau, điều tra tỷ lệ (%) lá trên cành đánh dấu bị nhiễm bệnh và phân cấp bệnh (Cấp 1: 1-10%; cấp 3: >10-20%; cấp 5: >20-40%; cấp 7: >40-80%; cấp 9: >80% tỷ lệ diện tích lá bị hại trên cành cây), từ đó tính chỉ số bệnh (CSB) - Disease index (%) bằng công thức: CSB (%) = ((N₁ x 1) + ... + (N_n x n)) / (N x K) x 100, trong đó: N_j là số lá điều tra bị hại ở cấp j; N_n là số lá điều tra bị hại ở cấp n; N: là tổng lá điều tra; K: là cấp hai cao nhất của thang phân cấp (cấp 9)", từ đó tính chỉ số bệnh.

Các chỉ tiêu năng suất và thành phần năng suất được thu thập bằng cách cân và đếm tổng số trái/cây; phẩm chất trái bao gồm acid tổng số, độ Brix, hàm lượng vitamin C, hàm lượng nước trong thịt trái được ghi nhận bằng cách phân tích 5 trái/cây. Hàm lượng acid tổng số trong trái được phân tích dựa theo qui trình của TCVN 5483-1991. Hàm lượng vitamin C được phân tích theo phương pháp chuẩn độ với dung dịch 2,6 dichlorophenolindophenol (TCVN 6427-2:1998). Tình trạng bệnh của cây trước và sau thí nghiệm được xác định dựa trên phản ứng PCR thực hiện trên 10 lá thu xung quanh tán trên mỗi cây. Qui trình phản ứng PCR được thực hiện theo mô tả của Hung *và ctv.* (1999). Ngoài ra, hàm lượng tinh bột trong lá cũng được xác định để đánh giá tình trạng bệnh VL Greening do cây có mùi nhiễm bệnh VL Greening có sự tích lũy tinh bột trong lá cao. Định lượng tinh bột trong lá được thực hiện dựa trên phản ứng iod - tinh bột theo quy trình của Whitaker *và ctv.* (2014).

Phần mềm Genstat được dùng để phân tích phương sai có hiệu chỉnh cho lấy mẫu lặp lại (repeated measure ANOVA) và so sánh sự khác biệt giữa các nghiệm thức bằng phép kiểm định LSD ở mức ý nghĩa 5%.



Hình 1. Cây bưởi Da xanh 15 năm tuổi dùng làm vật liệu thí nghiệm. Cây bị bệnh vàng lá Greening (còi cọc, vàng lá), lá nhỏ hơn bình thường (tai thò)

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Tình hình sinh trưởng của cây bưởi Da xanh trong thí nghiệm

Qua kết quả phân tích thống kê (Bảng 1) cho thấy chu vi gốc, chu vi thân, chiều cao cây, chiều rộng tán cây bưởi Da xanh được đo trước khi thí nghiệm khác biệt không có ý nghĩa thống kê. Điều này cho thấy cây bưởi Da xanh được dùng trong thí nghiệm có độ đồng đều nhau.

Bảng 1. Đặc tính nông học cây bưởi Da xanh trước khi thí nghiệm tại huyện Kế Sách, tỉnh Sóc Trăng, 2018

Nghiệm thức	Chu vi gốc (cm)	Chu vi thân (cm)	Chiều cao cây (cm)	Chiều rộng tán (cm)
BR 0,05 μ M	40,7	37,5	251,0	322,5
BR 0,10 μ M	40,7	37,7	250,3	321,3
BR 0,15 μ M	40,3	37,5	250,8	321,8
ĐC dương	40,3	37,5	250,2	322,8
ĐC âm	40,2	37,7	250,5	323,5
F	ns	ns	ns	ns
LSD	1,12	0,80	0,84	3,19
CV (%)	2,3	1,8	0,3	0,8

Ghi chú: ns: khác biệt không có ý nghĩa thống kê mức ý nghĩa 5%. BR: Brassinolide; ĐC dương: phun $ZnSO_4 + MnSO_4$, 0,5%; ĐC âm: Phun nước.

3.2. Tỷ lệ bệnh, chỉ số bệnh vàng lá Greening

3.2.1. Diễn biến tỷ lệ lá bệnh trên cành cây

Qua kết quả ở bảng 2 cho thấy ở thời điểm trước khi phun BR chỉ số bệnh giữa các nghiệm thức khác biệt không ý nghĩa qua phân tích thống kê, điều này cho thấy các cây bưởi Da xanh được chọn làm vật liệu thí nghiệm có chỉ số bệnh đồng đều nhau. Đối với diễn biến trung bình tỷ lệ lá bệnh trên cành qua các tháng, nhìn chung giảm đều và có ý nghĩa bắt đầu từ tháng thứ 4 sau khi xử lý (SKXL) (42,5%). Ở thời điểm tháng thứ 6 sau khi xử lý trung bình tỷ lệ lá bệnh giảm có ý nghĩa so với 2 tháng trước (40%). Từ tháng thứ 7 đến tháng thứ 12 SKXL trung bình tỷ lệ lá bệnh giảm chỉ còn 25,9%. Sau khi xử lý BR trung bình tỷ lệ lá bệnh trên cành giảm 56% sau 12 tháng xử lý. Theo Khuripach và ctv (2003). Brassinolide là một lactone steroid tự nhiên thuộc nhóm chất BRs, có khả năng giúp cây trồng tăng tính chống chịu các tác nhân sinh học như sâu bệnh và phi sinh học như điều kiện môi trường bất lợi. Bên cạnh đó, đây là hoạt chất có nguồn gốc tự nhiên được chiết từ thực vật và được sử dụng với liều lượng thấp, an toàn với môi trường và không lưu tồn dư lượng độc tố trên nông sản (Nguyễn Minh Chon, 2005).

Bảng 2. Tỷ lệ (%) lá bệnh vàng lá Greening trên cành ở các thời điểm quan sát dưới sự ảnh hưởng của các nồng độ Brassinolide khác nhau tại huyện Kế Sách, tỉnh Sóc Trăng, 2018

Nghiệm thức	Thời điểm quan sát (tháng sau khi xử lý)												
	TKXL	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
BR 0,05 μ M	46,8	54,1	51,0	47,5	40,2	39,0	33,8	36,9	32,4	38,8	38,5	39,6	36,6
BR 0,10 μ M	46,2	45,2	43,9	41,7	34,9	34,6	35,6	29,1	26,8	21,6	17,7	11,7	11,2
BR 0,15 μ M	46,9	47,2	39,6	37,6	28,9	22,5	15,6	11,8	7,0	3,7	2,4	1,5	1,4
ĐC dương	45,3	48,5	45,7	47,7	38,9	40,1	43,1	37,7	33,0	32,2	28,3	25,4	20,1
ĐC âm	46,6	48,9	48,1	74,2	69,8	74,7	72,0	72,0	72,2	71,0	71,4	71,4	70,2
Trung bình	46,3 ^B	48,8 ^A	45,7 ^B	49,7 ^A	42,5 ^C	42,2 ^C	40,0 ^B	37,5 ^F	34,3 ^F	33,4 ^G	31,7 ^G	27,9 ^H	25,9 ^I
F (Nghiệm thức - NT)**	LSD _{0,05} = 2,04												
F (Thời điểm quan sát - TBQS)**	LSD _{0,05} = 2,21												
F (NT x TBQS)**	LSD _{0,05} = 5,22												
CV (%) = 10,0													

Ghi chú: Trong cùng một cột hoặc hàng, các số có chữ theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê theo phép thử LSD 5%; **: khác biệt có ý nghĩa thống kê 1%. BR: Brassinolide; ĐC: Đối chứng; ĐC dương: phun $ZnSO_4 + MnSO_4$, 0,5%; ĐC âm: Phun nước; TB: Trung bình; TKXL: trước khi xử lý.

Xử lý BR với nồng độ 0,15 μ M tỷ lệ bệnh giảm dần từ 46,9% (TKXL) xuống chỉ còn 1,4% ở thời điểm 12 tháng SKXL, thấp nhất trong các nghiệm thức khảo sát. Điều này cho thấy tỷ lệ lá bệnh VL Greening trên cành cây bưởi Da xanh được xử lý với BR hai nồng

độ 0,10 và 0,15 μ M giảm dần theo thời gian xử lý và hiệu quả tăng lên cùng với sự gia tăng nồng độ BR. Canales và ctv. (2016) khẳng định rằng một số vi khuẩn gây bệnh VL Greening cây xoài giảm đáng kể khi xử lý Epibrassinolide (EBR) sau 3 tháng. Sau

khi xử lý EBR, các gen phòng thủ đều có mức biểu hiện cao rõ rệt và được duy trì ở tất cả các thời điểm khảo sát từ đó làm giảm bệnh theo thời gian, duy trì ổn định và giúp cây phục hồi sau khi nhiễm bệnh VL Greening (Canales và *crv.*, 2016).

3.2.2. Diễn biến chỉ số bệnh (%) trên cánh cây

Chỉ số bệnh trung bình khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các nghiệm thức phun BR ở các nồng độ, nghiệm thức đối chứng dương và nghiệm thức đối chứng âm ở mức ý nghĩa 1% (Bảng 3). Chỉ số bệnh trung bình có xu thế giảm dần có ý nghĩa bắt đầu từ tháng thứ 3 SKXL (57,3%). Ở thời điểm tháng thứ 4 SKXL trung bình chỉ số bệnh giảm rõ rệt

(39,3%) và đến tháng thứ 12 SKXL chỉ còn (27,6%). Chỉ số bệnh VL Greening ở nghiệm thức xử lý BR 0,15 μM đã giảm 70% sau 4 tháng xử lý và đến tháng thứ 12 thì chỉ số bệnh chỉ còn 1,9%. Điều này cho thấy phun BR nồng độ 0,15 μM có hiệu quả làm giảm chỉ số bệnh rất rõ sau 12 tháng xử lý. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Canales và *crv.* (2016) khẳng định rằng mật số vi khuẩn gây bệnh VL Greening cây có mùi giảm rõ rệt khi xử lý với EBR sau 3 tháng xử lý. Chính vì vậy, khi phun BR trên cây bưởi da xanh nhiễm VL Greening làm giảm chỉ số bệnh rõ rệt.

Bảng 3. Chỉ số bệnh – Disease index (%) ghi nhận trên cây bưởi Da xanh ở các thời điểm quan sát tại huyện

Kế Sách, tỉnh Sóc Trăng, 2018

Nghiệm thức	Thời điểm quan sát (tháng sau khi xử lý)												
	TKXL	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
BR 0,05 μM	63,0	65,2	70,4	48,2	29,3	17,8	18,5	28,2	28,2	23,7	25,9	25,2	25,9
BR 0,10 μM	68,2	60,7	71,1	57,8	40,0	27,4	20,7	18,5	15,6	14,1	9,3	8,9	8,5
BR 0,15 μM	65,9	63,0	59,3	55,6	15,2	12,2	7,8	5,9	5,9	3,3	2,6	4,4	1,9
ĐC dương	65,9	63,0	65,9	53,3	39,3	22,2	22,2	21,1	20,0	17,8	16,3	12,6	10,7
ĐC âm	65,9	65,9	71,9	71,9	72,6	73,3	80,0	83,0	83,0	83,0	83,7	91,1	91,1
Trung bình	65,8 ^{AB}	63,6 ^{AB}	67,7 ^A	57,3 ^C	39,3 ^D	30,6 ^{DE}	29,9 ^{DE}	31,3 ^E	30,5 ^D	28,4 ^{EF}	27,6 ^F	28,4 ^{EF}	27,6 ^F
F (Nghiệm thức - NT) = **, LSD _{0,05} = 2,17													
F (Thời điểm quan sát - TĐQS) = **, LSD _{0,05} = 3,44													
F (NT*TĐQS) = **, LSD _{0,05} = 7,77													
CV (%) = 14,3													

Ghi chú: Trong cùng một cột hoặc hàng, các số có chữ theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê theo phép thử LSD 5%; **: khác biệt có ý nghĩa thống kê 1%. BR: Brassinolide; ĐC dương: phun ZnSO₄ + MnSO₄ 0,5%; ĐC âm: Phun nước; TB: Trung bình; TKXL: trước khi xử lý.

3.3. Tỷ lệ đọt non bị nhiễm bệnh vàng lá

Greening (%)

Bảng 4. Tỷ lệ (%) bệnh vàng lá Greening trên đọt non bưởi Da xanh ở các thời điểm quan sát dưới sự ảnh hưởng của các nồng độ Brassinolide tại huyện Kế Sách, tỉnh Sóc Trăng, 2018

Nghiệm thức	Thời điểm quan sát (tháng sau khi xử lý)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
BR 0,05 μM	9,3	16,7	26,2	15,6	18,3	9,9	11,3	17,9	17,4	16,0
BR 0,10 μM	7,6	10,8	15,7	7,4	8,2	9,9	9,8	9,8	10,6	8,4
BR 0,15 μM	2,8	3,4	3,9	1,9	0,8	0,6	0,5	0,5	0,4	0,0
ĐC dương	8,5	15,0	15,4	10,0	10,4	10,4	9,2	10,1	10,4	11,4
ĐC âm	39,5	86,0	76,5	74,6	44,9	61,1	76,0	67,0	71,5	64,7
Trung bình	13,5 ^E	26,4 ^A	27,5 ^A	21,9 ^B	16,5 ^{DE}	18,4 ^{CD}	21,4 ^{BC}	21,1 ^{BC}	22,0 ^B	20,1 ^{BC}
F (Nghiệm thức - NT) = **, LSD _{0,05} = 1,54										
F (Thời điểm quan sát - TĐQS) = **, LSD _{0,05} = 2,99										
F (NT*TĐQS) = **, LSD _{0,05} = 6,56										
CV (%) = 6,2										

Ghi chú: Trong cùng một cột hoặc hàng, các số có chữ theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê theo phép thử LSD 5%; **: khác biệt có ý nghĩa thống kê 1%. BR: Brassinolide; ĐC dương: phun ZnSO₄ + MnSO₄ 0,5%; ĐC âm: Phun nước; TB: Trung bình.

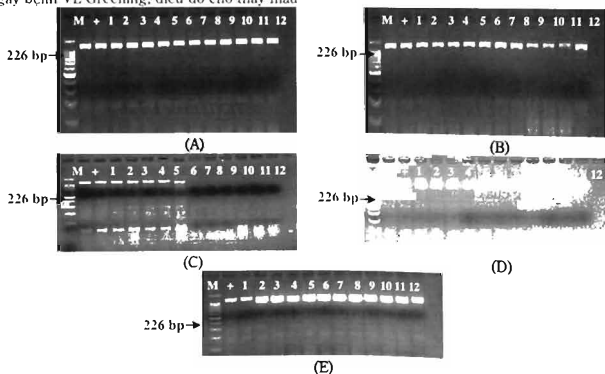
Kết quả ở bảng 4 cho thấy tại các thời điểm quan sát tỷ lệ đợt non bị nhiễm bệnh VL Greening trung bình của các nghiệm thức phun BR và đối chứng dương khác biệt có ý nghĩa thông kê so với nghiệm thức đối chứng âm vào các thời điểm quan sát. Nghiệm thức phun BR nồng độ 0,15 μM có tỷ lệ đợt non nhiễm bệnh giảm rõ rệt và có ý nghĩa ở thời điểm 4 thang SKXL (1,9%). Ở thời điểm thang thứ 5 SKXL tỷ lệ đợt non giảm xuống (0,8%), giảm 42% so với thang trước, sau 12 thang tỷ lệ bệnh trên đợt non gần như không có (0,0%). Kết quả cho thấy phun BR làm cây bưởi Da xanh bị nhiễm bệnh VL Greening phục hồi, những đợt non trên cành cây bị nhiễm bệnh VL Greening sinh trưởng, phát triển tốt và tỷ lệ nhiễm bệnh rất thấp.

3.4. Chẩn đoán bệnh vàng lá Greening

3.4.1. Chẩn đoán bằng phương pháp PCR

Phản ứng PCR sử dụng cặp mồi chuyên biệt, với sản phẩm khuếch đại có kích thước 226 bp, được dùng để chẩn đoán sự hiện diện của vi khuẩn gây bệnh VL Greening. Qua kết quả phổ điện di DNA ở hình 2A (0,05 μM), 2B (0,10 μM) và 2D (đối chứng dương) cho thấy tất cả 12 giếng đều dương tính với vi khuẩn gây bệnh VL Greening, điều đó cho thấy mẫu

lá bưởi Da xanh trước và sau thí nghiệm đều nhiễm bệnh. Như vậy, các nghiệm thức phun BR nồng độ 0,05 μM và 0,10 μM và nghiệm thức đối chứng dương trên bưởi Da xanh đều không làm hạn chế bệnh VL Greening. Riêng nghiệm thức đối chứng âm thể hiện bệnh VL Greening trước và sau thí nghiệm rõ nhất (Hình 2E). Tuy nhiên đối với nghiệm thức phun BR nồng độ 0,15 μM trước thí nghiệm cho kết quả dương tính với bệnh, nhưng sau thí nghiệm cho kết quả âm tính với bệnh (Hình 2C). Kết quả này cho thấy khi phun qua lá với BR nồng độ 0,15 μM sau 12 thang giúp cây bưởi Da xanh nhiễm bệnh VL Greening phục hồi và giảm bệnh rõ rệt. Điều này phù hợp với nhận định của Canales *và ctv.* (2016) cho rằng mật độ vi khuẩn gây bệnh VL Greening trên cây có mùi giảm đáng kể hầu như bằng không sau 12 thang điều trị với EBR. Khi xử lý EBR có tác dụng kích thích các gen phòng thủ với vi khuẩn gây bệnh VL Greening ngăn cản sự xâm nhập và biểu hiện của vi khuẩn này, chính vì thế cây bưởi Da xanh bị nhiễm bệnh VL Greening được xử lý với BR sau 12 thang cho kết quả âm tính khi chẩn đoán bằng kỹ thuật PCR với cặp mồi đặc hiệu.

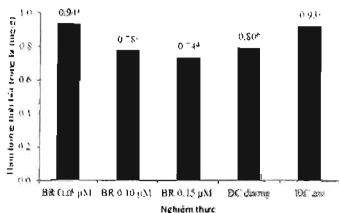


Hình 2. Phổ điện di DNA trong lá bưởi Da xanh trước và sau khi xử lý ở các nồng độ Brassinolide (BR) khác nhau. A) nghiệm thức phun BR 0,05 μM ; B) nghiệm thức phun BR 0,10 μM ; C) nghiệm thức phun BR 0,15 μM ; D) đối chứng dương; E) đối chứng âm

Ghi chú: Trong tất cả hình A, B, C, D, E: Giếng M: thang DNA chuẩn 1 kb; Giếng "+": đối chứng mẫu dương; Giếng từ 1-6: mẫu lá bưởi Da xanh trước thí nghiệm; Giếng từ 7-12: mẫu lá bưởi Da xanh sau thí nghiệm.

3.4.2. Định lượng tinh bột trong lá

Hàm lượng tinh bột trong lá bưởi Da xanh giữa các nghiệm thức phun BR và đối chứng khác biệt có ý nghĩa thống kê (Hình 3). Hàm lượng tinh bột thấp nhất ở nghiệm thức phun BR 0,15 µM (0,74 mg/g mẫu lá), thấp nhất ở nghiệm thức đối chứng âm và phun BR 0,05 µM điều này cho thấy phun BR ở nồng độ thấp không làm giảm hàm lượng tinh bột trong lá. Schneider (1968) cho rằng tinh bột trong lá cây có mùi tích lũy bất thường trong khi cây bị nhiễm bệnh VL Greening. Kết quả phân tích định lượng tinh bột trung bình của ba giống cam quýt (*Citrus depressa*, *Citrus reticulata*, *Citrus oto*) cho thấy hàm lượng tinh bột trong lá bị nhiễm VL greening cao hơn so với trong lá khỏe mạnh (Takushi và ctv., 2007). Do đó, định lượng hàm lượng tinh bột trong lá là một chỉ tiêu quan trọng để chẩn đoán mức độ nhiễm bệnh VL Greening trên cây có mùi, sau khi xử lý BR ở nồng độ 0,15 µM hàm lượng tinh bột giảm xuống rõ rệt cho thấy cây bưởi Da xanh bị nhiễm bệnh VL Greening đã phục hồi tốt.



Hình 3. Hàm lượng tinh bột trong lá bưởi Da xanh dưới sự ảnh hưởng của các nồng độ Brassinolide khác nhau tại huyện Kế Sách, tỉnh Sóc Trăng, 2018

3.5. Sự ra hoa, đậu trái

Qua kết quả ở bảng 5 cho thấy tỷ lệ ra hoa ở các nghiệm thức phun BR và đối chứng dương khác biệt có ý nghĩa qua phân tích thống kê ở mức ý nghĩa 1% so với nghiệm thức đối chứng âm. Trong đó, tỷ lệ ra hoa cao nhất ở nghiệm thức phun BR nồng độ 0,15 µM là 60,5%, thấp nhất ở nghiệm thức đối chứng âm là 29,2%. Tỷ lệ ra hoa trên cây bưởi Da xanh được xử lý với BR có xu hướng tăng dần với sự gia tăng nồng độ BR.

Tỷ lệ đậu trái giữa các nghiệm thức có phun BR và đối chứng dương khác biệt có ý nghĩa thống kê ở

mức ý nghĩa 1% so với đối chứng âm (Bảng 5). Nhìn chung, tất cả các nghiệm thức có phun BR đều làm tăng tỷ lệ đậu trái trên cây bưởi Da xanh.

Bảng 5. Tỷ lệ ra hoa và tỷ lệ đậu trái trên cây bưởi Da xanh dưới sự ảnh hưởng của các nồng độ Brassinolide khác nhau tại huyện Kế Sách, tỉnh Sóc Trăng, 2018

Nồng độ Brassinolide	Tỷ lệ ra hoa (%)	Tỷ lệ đậu trái (%)
BR 0,05 µM	30,4 ^{cd}	47,5 ^b
BR 0,10 µM	42,7 ^b	64,2 ^a
BR 0,15 µM	60,5 ^a	61,6 ^a
ĐC dương	35,8 ^c	58,5 ^a
ĐC âm	29,2 ^d	48,3 ^b
Trung bình	39,7	56,0
F	**	**
CV (%)	13,46	9,71

Ghi chú: Trong cùng một cột, các số có chữ theo sau giống nhau thì không khác biệt có ý nghĩa thống kê theo phép thử LSD 5%. **: khác biệt có ý nghĩa thống kê 1%. BR: Brassinolide; ĐC dương: phun ZnSO₄ + MnSO₄ 0,5%; ĐC âm: Phun nước.

3.6. Năng suất và yếu tố cấu thành năng suất

Tổng số trái/cây ở các nghiệm thức có phun BR ở các nồng độ khác nhau so với đối chứng khác biệt có ý nghĩa qua phân tích thống kê ở mức ý nghĩa 1%, trong đó nghiệm thức phun BR nồng độ 0,15 µM có số trái/cây cao nhất (27,3 trái/cây) thấp nhất ở nghiệm thức đối chứng âm (12,5 trái/cây) (Bảng 6).

Qua kết quả ở bảng 6 cho thấy khối lượng trái giữa các nghiệm thức phun BR ở các nồng độ khác nhau so với đối chứng khác biệt có ý nghĩa qua phân tích thống kê ở mức ý nghĩa 1%. Trong đó, khối lượng trái ở nghiệm thức phun BR 0,15 µM là cao nhất (1.046,2 g), thấp nhất là nghiệm thức đối chứng âm (431,4 g).

Năng suất trái được quyết định bởi số trái và khối lượng trái. Kết quả thống kê (Bảng 6) cho thấy năng suất trái giữa các nghiệm thức phun BR so với đối chứng khác biệt có ý nghĩa thống kê (mức ý nghĩa 1%). Nghiệm thức có năng suất cao nhất là nghiệm thức phun BR 0,15 µM (28,6 kg/cây), khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức còn lại, thấp nhất là nghiệm thức đối chứng âm (5,4 kg/cây). Điều này phù hợp với nhận định của Wang và ctv. (2004) cho rằng khối lượng trái cam tăng khi

xử lý vón BR. Kết quả này cho thấy việc phun BR xử lý bệnh VL Greening đồng thời cũng làm tăng năng suất trên cây bưởi Da xanh. Điều này phù hợp với ghi nhận từ nghiên cứu của Vardhini & Rao (1998), Krishna (2003) về vai trò giúp gia tăng năng suất cây trồng của Brassinosteroid.

Bảng 6. Số trái/cây, khối lượng trái và năng suất trái trên cây bưởi Da Xanh dưới ảnh hưởng của các nồng độ Brassinolide khác nhau tại huyện Kế Sách, tỉnh Sóc Trăng, 2018

Nghiệm thức	Số trái/cây	Khối lượng trái (g)	Năng suất (kg/cây)
BR 0,05 μM	14,3	925,4 ^a	13,3
BR 0,10 μM	19,7 ^b	1.010,7 ^{ab}	19,9 ^b
BR 0,15 μM	27,3 ^a	1.046,2 ^{ab}	28,6 ^a
ĐC dương	20,2 ^b	984,1 ^a	19,9 ^b
ĐC âm	12,5 ^d	431,4 ^d	5,4 ^d
Trung bình	18,8	879,6	17,4
F	**	**	**
CV (%)	6,59	3,54	8,18

Ghi chú: ** khác biệt có ý nghĩa thống kê 1%. Trong cùng một cột, các số có chữ theo sau giống nhau thì không khác biệt có ý nghĩa thống kê theo phép thử LSD 5%. BR: Brassinolide; ĐC dương: phun $\text{ZnSO}_4 + \text{MnSO}_4$, 0,5%; ĐC âm: Phun nước.

3.7. Phẩm chất trái

Qua kết quả thống kê ở bảng 7 cho thấy độ Brix của trái bưởi Da xanh ở các nghiệm thức phun BR và đối chứng dương khác biệt có ý nghĩa thống kê với đối chứng âm mức ý nghĩa 1%. Nghiệm thức phun BR 0,15 μM có độ Brix cao nhất (10,9%) khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức đối chứng dương và 2 nghiệm thức phun BR còn lại, thấp nhất ở nghiệm thức đối chứng âm (7,3%). Do đó, phun BR nồng độ 0,15 μM có ý nghĩa làm tăng độ Brix của cây bưởi Da xanh, BR không những giúp giảm triệu chứng bệnh VL Greening ở cây bưởi Da xanh mà còn giúp tăng độ Brix là một chỉ tiêu quan trọng trong việc quyết định phẩm chất trái bưởi. Theo Nguyễn Bảo Vê và Lê Thanh Phong, (2011) bưởi Da xanh có độ Brix 9,5 - 12%.

Hàm lượng axit tổng số trong trái bưởi Da xanh giữa các nghiệm thức có phun BR ở các nồng độ khác nhau và đối chứng dương khác biệt có ý nghĩa thống kê mức ý nghĩa 5% so với nghiệm thức đối

chung âm. Nghiệm thức có hàm lượng axit tổng số cao nhất là phun BR 0,15 μM (0,22 g/L) và thấp nhất ở nghiệm thức đối chứng âm (0,04 g/L) (Bảng 7).

Hàm lượng nước và hàm lượng vitamin C trong dịch trái bưởi Da xanh giữa các nghiệm thức có phun BR ở và đối chứng dương khác biệt có ý nghĩa thống kê mức ý nghĩa 1% so với nghiệm thức đối chứng âm (Bảng 7). Nghiệm thức đối chứng dương và các nghiệm thức có xử lý BR đều có hàm lượng nước và hàm lượng vitamin C trong thịt trái cao hơn so với đối chứng không xử lý.

Tóm lại, các nghiệm thức xử lý BR giúp khác phục hiện tượng trái bị xơ và tăng hàm lượng acid tổng số, hàm lượng nước trong thịt trái và hàm lượng vitamin C cũng gia tăng so với đối chứng âm, điều này cho thấy cây bưởi Da xanh bị bệnh VL Greening đã được phục hồi sau khi phun qua lá với BR ở nồng độ 0,15 μM .

Bảng 7. Hàm lượng nước, độ Brix, axit tổng số, vitamin C trong trái bưởi Da xanh dưới sự ảnh hưởng của các nồng độ BR khác nhau tại huyện Kế Sách, tỉnh Sóc Trăng, 2018

Nghiệm thức	Độ Brix (%)	TA (g/L)	Hàm lượng nước (%)	Vitamin C (mg/100 g mẫu uớt)
0,05 μM	8,4 ^d	0,09 ^b	67,3 ^a	27,9 ^b
0,10 μM	9,3 ^c	0,10 ^b	71,4 ^a	31,1 ^b
0,15 μM	10,9 ^a	0,22 ^a	73,9 ^a	40,3 ^a
ĐC dương	10,3 ^b	0,10 ^b	70,2 ^a	39,5 ^a
ĐC âm	7,3 ^c	0,04 ^c	48,8 ^b	18,9 ^c
Trung bình	9,3	0,11	66,3	31,5
F	**	*	**	**
CV (%)	3,91	9,09	7,74	13,2

Ghi chú: *, ** khác biệt có ý nghĩa thống kê 5% và 1%. Trong cùng một cột, các số có chữ theo sau giống nhau thì không khác biệt có ý nghĩa thống kê theo phép thử LSD 5%. BR: Brassinolide; ĐC dương: phun $\text{ZnSO}_4 + \text{MnSO}_4$, 0,5%; ĐC âm: Phun nước.

4. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ XUẤT

4.1. Kết luận

Phun BR qua lá 2 tuần một lần ở các nồng độ khác nhau liên tục trong 12 tháng có hiệu quả đối với bệnh VL Greening, tỷ lệ bệnh và chỉ số bệnh giảm dần kể từ thời điểm 1 tháng sau khi xử lý và đạt hiệu

quả cao nhất lên sự sinh trưởng, năng suất và phẩm chất trái bưởi Da xanh ở thời điểm 12 tháng sau khi xử lý.

Phun BR qua lá ở nồng độ 0,15 μM trên bưởi Da xanh định kỳ 2 tuần/lần liên tục từ khi cây chuẩn bị ra lá cho đến khi thu hoạch có hiệu quả làm giảm tỷ lệ bệnh, chỉ số bệnh và tỷ lệ bệnh của lá non mới xuất hiện gần như không đáng kể, tăng tỷ lệ ra hoa và đậu trái cao (60,5 và 61,6%), số trái/cây, khối lượng trái và năng suất (27,3 trái, 1046,2 g và 28,6 kg/cây). Phun BR nồng độ 0,15 μM cũng làm tăng hàm lượng nước trong thịt trái, độ Brix và hàm lượng vitamin C, nâng cao phẩm chất trái bưởi Da xanh. Ngoài ra, kết quả điện di DNA đối với cây bưởi Da xanh bị nhiễm bệnh VL Greening thời điểm 12 tháng sau phun BR nồng độ 0,15 μM cho kết quả âm tính, hàm lượng tinh bột tích lũy trong lá thấp nhất (0,74 mg/g lá) so với các nghiệm thức còn lại.

4.2. Đề xuất

Có thể áp dụng phun BR nồng độ 0,15 μM định kỳ 2 tuần một lần để làm giảm các triệu chứng bệnh vàng lá Greening, tăng năng suất và phẩm chất trái bưởi Da xanh.

Cần tiếp tục nghiên cứu hiệu quả của BR lên bệnh vàng lá Greening trên cây bưởi Da xanh và các giống bưởi khác để có kết luận chắc chắn hơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Canales, E., Coll, Y., Hernández, I., Portieles, R., Garcia, M. R., López, Y., ... Hidalgo, O. B. (2016). *Candidatus Liberibacter asiaticus*, Causal agent of citrus huanglongbing, is reduced by treatment with brassinosteroids. PLOS ONE. 2012, 185, 118 - 130.
- Hung, T. H., Wu, H. L. & Su, H. J. (1999). Development of a rapid method for the diagnosis of citrus greening disease using the polymerase chain reaction. Journal of Phytopathology, 147, 599 - 604.
- Hung, T. H., Hung, S. C., Chen, S. N., Hsu, M. H., & Su, H. J. (2004). Detection by PCR of *Candidatus Liberibacter asiaticus*, the bacterium causing citrus of huanglongbin in vector psyllids: application to the study of vector-pathogen relationships. Plant pathology, 53, 96 - 102.
- Jagoueix, S., Bové, J. M., & Garnier, M. (1996). PCR detection of the two *Candidatus liberobacter* species associated with greening

disease of citrus. Molecular Cellular Probes, 10, 43 - 50

- Jagoueix, S., Bové, J. M., & Garnier, M. (1997). Comparison of the 16S/23S Ribosomal Intergenic Regions of "*Candidatus Liberobacter asiaticum*" and "*Candidatus Liberobacter africanum*", the two species associated with Citrus Huanglongbing (Greening) Disease", International Journal of Systematic Bacteriology, 47, 224 - 227.

- Khripach, V., Zhabinskii, V., & De Groot, A. (2003). Twenty years of brassinosteroids: Steroidal plant hormones warrant better crops for the XXI century. Ann. Bot. 2000; 86: 441-447.

- Krishna, P. (2003). Brassinosteroid-mediated stress responses. Journal of Plant Growth Regul; 22: 289-297.

- Lê Mai Nhật (2014). Nghiên cứu bệnh vàng lá Greening hại cây có múi ở một số tỉnh phía Bắc Việt Nam và đề xuất biện pháp phòng chống. Luận án Tiến sĩ nông nghiệp. Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam. 148 trang.

- Nguyễn Minh Chon (2010). Giáo trình chất điều hòa sinh trưởng thực vật. Nxb Đại học Cần Thơ.

- Nguyễn Bảo Vệ, Lê Thanh Phong (2011). Giáo trình cây ăn trái. Nxb Đại học Cần Thơ. 205 trang.

- Nguyễn Thị Minh Châu, Nguyễn Bảo Vệ (2005). Ảnh hưởng của dung dịch phun lá ($\text{ZnSO}_4 + \text{MnSO}_4$) đến triệu chứng vàng lá gân xanh ở cam Mát và quýt Đường có tuổi cây và mức độ bệnh khác nhau. Hội thảo Quốc gia năm 2005 "Cây có múi, xoài và khóm" tại Đại học Cần Thơ, tổ chức ngày 1/3/2005. Nxb Nông nghiệp. 416 trang.

- Rao, S. S. R., Vardhini, B. V., Sujatha, E., & Anuradha, S. (2002). Brassinosteroids-A new class of phytohormones. India. Current Sci., 10 (82), 1239 - 1245.

- Schneider, H., 1968. Anatomy of greening diseased sweet orange shoots. Phytopathology, 58: 1155-1160.

- Whitaker, D. C., Giurcanu, M. C., Young, L. J., Gonzalez, P., Etxeberria, E., Roberts, P., ... Roman, F. (2014). Starch content of citrus leaves permits diagnosis of huanglongbing in the warm season but not cool season. HortScience, 49: 757 - 762.

15. Takushi, T., T. Toyozato, S. Kawano, S. Taba, K. Taba, A. Ooshiro, M. Numazawa and M. Tokeshi. 2007. Scratch method for simple, rapid diagnosis of citrus huanglongbing using iodine to detect high accumulation of starch in the citrus leaves. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, Vol. 73, No.1 (20070225) pp. 3-8.
16. Vardhini, B. V., & Rao, S. S. R., (1998). Effect of brassinosteroids on growth, metabolite content and yield of *Arachis hypogaea*. *Phytochemistry*: 48: 927-930.
17. Wang, C. F., You, Y., Chen, F., Li, X. S., Wang, J., & Wang, J. S. (2004). Adjusting effect of brassinolide and GA₃ on the orange growth. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis*, 26(5): 759 - 762.

EFFECT OF BRASSINOLIDE CONCENTRATIONS ON THE CITRUS GREENING, YIELD AND FRUIT QUALITY OF "DA XANH" POMELO (*Citrus maxima* (Burm.) Merr.) ON KE SACH DISTRICT, SOC TRANG PROVINCE

Lang Hoai Phong, Huynh Le Anh Nhi,
Tran Van Hau, Tran Sy Hieu

Summary

The study was conducted to determine the effect of Brassinolide concentration spraying on leaves on the rate and index of greening yellowing disease, productivity and quality of 'Da xanh' pomelo. The experiment was conducted on a 15-year-old 'Da xanh' pomelo tree in Ke Sach district, Soc Trang province. Implementation period from June 2017 to June 2018. The experiment was arranged in a completely randomized block form, with 5 treatments which were BR concentrations: (i) 0.05 μ M; (ii) 0.10 μ M; and (iii) 0.15 μ M. Positive control treatment with ZnSO₄ + MnSO₄ solution 0.5%. Negative control water spray, 6 repetitions, each repetition corresponds to one tree. Treatment of BR spraying is done periodically every 2 weeks when pomelo trees are prepared to leaves until the fruits are harvested (12 months). The presence of *Candidatus liberibacter asiaticus*, before and after the completion of the experiment was determined by PCR using specific primers and iodine-starch reaction quantifying starch content in leaves. The results showed that spraying BR at 0.10 and 0.15 μ M periodically twice a week for 12 months was effective on observe red parameters relating to disease assessment, the presence of causal bacteria, improving flowering, yield and fruit quality of 'Da xanh' grapefruit. Particularly, spraying BR at 0.15 μ M resulted in a significant reduction on both rate of disease leaf on branches and disease index only after three months of treatment, and the lowest levels of the two parameters at the 12th month after treatment (MAT). In addition, BR 0.15 μ M treatment also reduced the presence of the causal agent to an undetectable level by PCR at the 12th MAT, reduced starch content in the leaves, increased the rate of fruiting, yield and quality of 'Da xanh' pomelo.

Keywords: *Brassinolide, DNA electrophoresis, leaf starch content, 'Da xanh' pomelo.*

Người phản biện: TS. Hà Minh Thanh
Ngày nhận bài: 15/4/2019
Ngày thông qua phản biện: 16/5/2019
Ngày duyệt đăng: 23/5/2019