



DOI:10.22144/ctujos.2025.114

CHẨN ĐOÁN NHANH VIRUS GÂY KHẢM LÁ TRÊN GIỐNG SẴN KM (*Manihot esculenta* Crantz) BẰNG KỸ THUẬT REAL-TIME PCR TẠI KHU VỰC ĐÔNG NAM BỘ, VIỆT NAM

Nguyễn Thành Luân*, Nguyễn Thị Tố Lan, Nguyễn Thị Ngọc Châm và Nguyễn Thị Ngọc
Trường Đại học Công Thương Thành Phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

*Tác giả liên hệ (Corresponding author): luannnt@huit.edu.vn

Thông tin chung (Article Information)

Nhận bài (Received): 19/12/2024

Sửa bài (Revised): 11/02/2025

Duyệt đăng (Accepted): 03/04/2025

Title: A quick diagnosis of Sri Lankan cassava mosaic virus (SLCMV) from cassava leaves (*Manihot esculenta* Crantz) using real-time PCR in the southeast region of Vietnam

Author(s): Nguyen Thanh Luan*,
Nguyen Thi To Lan, Nguyen Thi Ngoc Cham and Nguyen Thi Ngoc

Affiliation(s): Ho Chi Minh City
University of Industry and Trade, Viet
Nam

TÓM TẮT

Virus khảm lá sắn Sri Lankan (*Sri Lankan cassava mosaic virus-SLCMV*) gây biến dạng lá, ảnh hưởng đến quang hợp và làm giảm năng suất, chất lượng cây sắn. Bệnh lây lan nhanh, khó kiểm soát và chưa có thuốc đặc trị. Nghiên cứu này thu thập mẫu lá sắn từ 5 tỉnh thuộc miền Đông Nam Bộ để đánh giá hiệu quả các phương pháp tách chiết DNA và chẩn đoán virus. Kết quả cho thấy phương pháp CTAB–SDS cho hàm lượng ssDNA cao nhất là 9.925 ng/mL, vượt trội hơn so với phương pháp KIT và Phenol–chloroform–isoamyl alcohol. Bên cạnh đó, kỹ thuật real-time PCR sử dụng cặp mồi đặc hiệu 4F/4R giúp phát hiện gen DNA A-AV1 của virus, xác định được tải lượng virus sau 12,1 chu kỳ (Ct) với nồng độ cao nhất đạt 250×10^8 IU/mL. Quy trình này cho phép phát hiện virus ở tải lượng thấp, hỗ trợ chẩn đoán sớm bệnh khảm lá sắn với độ chính xác và độ tin cậy cao. Kết quả nghiên cứu mang lại tiềm năng lớn trong việc kiểm soát mầm bệnh SLCMV, góp phần bảo vệ các giống sắn kháng bệnh và phát triển nền nông nghiệp bền vững.

Từ khóa: Bệnh khảm lá, *Manihot esculenta* Crantz, Real-time PCR, SLCMV

ABSTRACT

The Sri Lankan cassava mosaic virus (SLCMV) causes leaf deformation, disrupts photosynthesis, and reduces both the yield and quality of cassava. The disease spreads rapidly, is difficult to control, and currently has no specific treatment. This study collected cassava leaf samples from five provinces in the Southeast region of Vietnam to evaluate DNA extraction methods and virus detection techniques. Results showed that the CTAB–SDS method yielded the highest ssDNA concentration at 9,925 ng/mL respectively, outperforming both the commercial DNA extraction kit and the phenol–chloroform–isoamyl alcohol method. Additionally, real-time PCR using the specific primer pair 4F/4R effectively detected the DNA A-AV1 gene of the virus, identifying viral load after 12.1 cycles (Ct) with a maximum concentration of 250×10^8 IU/mL. This method enables the detection of low viral loads, supporting early diagnosis of cassava mosaic disease with high accuracy and reliability. The findings offer significant potential for controlling SLCMV infection, helping to protect disease-resistant cassava varieties and support sustainable agricultural development.

Keywords: Cassava mosaic disease, CMDs, *Manihot esculenta* Crantz, Real-time PCR, SLCMV

1. GIỚI THIỆU

Sắn (*Manihot esculanta* Crantz) là một trong ba loại cây trồng quan trọng, nguồn cung cấp carbohydrate trên toàn thế giới. Ở Việt Nam sắn được xem là cây trồng chủ lực có giá trị xuất khẩu cao với diện tích canh tác dao động từ 520 đến 550 nghìn ha (E-information gate of Tay Ninh Province, 2024). Tuy nhiên, hiện nay bệnh khảm lá sắn (Casava mosaic disease – CMDs) đã và đang gây ra tác động nặng nề đến năng suất và chất lượng cây trồng, gây thiệt hại nghiêm trọng về kinh tế cũng như an ninh lương thực ở các vùng trồng sắn.

Bệnh khảm lá sắn (CMDs) được xác định do Sri Lankan casava mosaic virus (SLCMV) gây ra, đây là loại virus thuộc chi *Begomovirus*, họ *Geminiviridae* (Chaowongdee et al., 2024). SLCMV được lây truyền bởi bọ phấn trắng *Bemisia tabaci*, SLCMV có vật liệu di truyền là 2 phân tử DNA mạch đơn (single strand DNA-ssDNA) dạng vòng (DNA-A và DNA-B) có kích thước khoảng 2,7 kb, trong đó DNA-A mã hóa cho 6 loại protein, kí hiệu là AC1-4, AV1 và AV2 (Mugerwa et al., 2018). Protein AV1 có chức năng quan trọng trong quá trình xâm nhiễm và lây truyền, DNA-B mã hóa cho 2 protein BC1 và BV1 liên quan đến quá trình vận chuyển bên trong và ngoại bào và tăng khả năng xâm nhiễm của virus (Hanley et al., 2013). Tuy nhiên, ssDNA của SLCMV có kích thước nhỏ và dễ bị thất thoát trong quá trình tách chiết (Truong et al., 2022). Do đó, trong nghiên cứu này, ba quy trình tách chiết DNA được khảo sát nhằm xác định phương pháp tách chiết ssDNA với hiệu suất cao góp phần tăng khả năng phát hiện được sự hiện diện của virus trên sắn.

Hiện nay, có nhiều phương pháp phát hiện sự có mặt của SLCMV trên sắn như: ELISA, PCR,... Các phương pháp miễn dịch hấp thụ liên kết với Enzyme (ELISA) dựa trên kháng thể đơn dòng kháng lại protein vỏ của SLCMV (Charoenvilaisiri et al., 2021), phương pháp này phù hợp trong việc xét nghiệm hàng loạt mẫu, nhưng không thể phát hiện được những cây bị nhiễm bệnh ở giai đoạn đầu hoặc không biểu hiện bệnh ra bên ngoài vì có độ nhạy thấp hơn so với phương pháp PCR. Tuy nhiên, phương pháp PCR cần tốn nhiều thời gian vì sau khi hoàn tất chu trình khuếch đại cần tiếp tục sử dụng một số kỹ thuật khác như điện di quan sát kết quả trên gel mới có thể xác định được trình tự khuếch đại (Uke et al., 2022). Ngược lại với PCR, phương pháp được đánh giá có nhiều ưu điểm vượt trội hơn so với các phương pháp PCR truyền thống, với độ nhạy cao, real-time PCR có thể xác định được sự

hiện diện của virus ở tải lượng thấp, xác định được tải lượng gây bệnh của virus ngay trên phản ứng dựa trên sự khuếch đại của vùng mục tiêu tại mỗi chu kỳ (chu kỳ ngưỡng Ct), với giá trị Ct càng thấp, biểu thị nồng độ virus càng cao và ngược lại Ct càng cao nồng độ virus càng thấp (Celik et al., 2023). Vì vậy, kỹ thuật real-time PCR được sử dụng với mục tiêu chẩn đoán nhanh và nhạy, góp phần làm giảm thiểu tác hại của virus trong sản xuất nông nghiệp ở Việt Nam và làm tăng giá trị nông sản Việt.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Mẫu lá sắn có biểu hiện đặc trưng của bệnh khảm như lá còi cọc và biến dạng với những khảm màu xanh lục nhạt xen lẫn vàng rõ ràng (Hình 1), được thu nhận tại ruộng sắn ở Bình Chánh (BC), Hóc Môn (HM), Củ Chi (CC), Tây Ninh (TN), Bình Dương (BD), Đồng Nai (ĐN) và Vũng Tàu (VT). Mẫu lá bệnh sau khi chọn lọc được xử lý bằng nitơ lỏng và bảo quản ở nhiệt độ -20°C đến khi được sử dụng để tách chiết DNA.



Hình 1. Mẫu lá (A) và củ sắn (B) với đặc trưng của bệnh khảm lá nhiễm virus SLCMV

2.2. Phương pháp tách chiết DNA

Trong nghiên cứu này, ba phương pháp được sử dụng để khảo sát khả năng trích ly DNA, bao gồm: phương pháp Cetyltrimethylammonium bromide - Sodium Dodecyl Sulfate (CTAB-SDS), tham khảo từ Ali et al. (2019); phương pháp phenol – chloroform – isoamyl alcohol, tham khảo từ McKiernan et al. (2017); bộ KIT tách chiết DNA thực vật của công ty ABT (Việt Nam) cùng với DNA được tách chiết theo quy trình của nhà sản xuất khi sử dụng Kit tách chiết DNA thực vật của công ty ABT (Việt Nam).

2.2.1. Phương pháp CTAB – SDS

Mẫu lá với khối lượng khoảng 2 g được nghiền và trộn đều với 1200 μ L CTAB [Tris – HCl 100 mM, pH 8.0, EDTA 20 mM pH 8, NaCl 1,4 M, PVP 1% (w/v), CTAB 2% (w/v)] và 60 μ L SDS. Mẫu được ủ 65°C trong 30 – 60 phút. Dịch hỗn hợp được ly tâm ở 13000 vòng/phút trong 15 phút và thu dịch nổi với một thể tích tương ứng (1:1) phenol -

chloroform - isoamyl alcohol (25:24:1) được bổ sung và trộn đều. Dịch nổi được thu nhận phía trên và trộn đều với isopropanol tỷ lệ (1:1) và ly tâm ở 13000 vòng/phút trong 15 phút. Phần tủa được giữ và rửa lại bằng dung dịch ethanol 70%. Sản phẩm DNA sau khi tủa được hòa tan và trữ trong đệm TE 1X (Tris HCl 10mM pH 8, EDTA 1 mM, pH 8) ở -20°C cho đến khi sử dụng (Ali et al., 2019).

2.2.2. Phương pháp phenol – chloroform – isoamyl alcohol (P.C.I)

Mẫu lá (2 g) được nghiền và sử dụng natri dodecylsulfate (SDS) và proteinase K để phá vỡ thành tế bào và loại bỏ các thành phần protein có trong mẫu. Dịch nghiền lỏng được ủ ở nhiệt độ 65°C trong 30 phút. Sau đó, hỗn hợp dịch được ly tâm thu dịch nổi và thêm vào một lượng hỗn hợp phenol-chloroform-isoamyl alcohol (25:24:1) với tỷ lệ 1:1 và trộn đều bằng mixer trong 2 phút. Hỗn hợp tiếp tục được ly tâm ở 13000 vòng/phút trong 15 phút thu nhận dịch nổi và kết tủa DNA bằng isopropanol. Phần tủa được giữ và rửa lại bằng ethanol 70%. Sản phẩm tủa DNA được hòa tan và trữ trong dung dịch đệm TE 1X (Tris HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM, pH 8) ở -20°C cho đến khi sử dụng (McKiernan et al., 2017).

2.2.3. Trích ly DNA bằng KIT tách chiết DNA thực vật của công ty ABT (abt-vn.com)

Trong quy trình tách chiết DNA, 30 – 100 mg mẫu lá bệnh được nghiền bằng cối chày cho đến khi thành dạng bột mịn được sử dụng. Tiếp theo, mẫu được li giải bằng hỗn hợp (gồm 400 µL PLS1, 10 µL RNase) được trộn đều bằng máy vortex và ủ 65°C trong 30 phút. Sau khi ủ, hỗn hợp được bổ sung thêm 130 µL PLS2, tiếp tục hỗn hợp DNA được trộn với 450 µL dung dịch PBB và được chuyển sang cột lọc silica. Mẫu DNA được rửa với 500 µL dung dịch rửa PWB và được bảo quản trong 50 µL EB ở -20°C cho đến khi sử dụng.

2.3. Phương pháp PCR phát hiện virus SLCMV gây bệnh khảm lá trên cây sắn

Phản ứng PCR được thực hiện trên tổng thể tích 25 µL chứa 1 µL mẫu DNA; 1 µL cặp mồi; 12,5 µL Master Mix 2X (Meridian Bioscience – Bioline), 0,5 µL Rnase; 0,5 µL dNTP; 4,5 µL nước cất vô trùng. Chu kỳ phản ứng được thực hiện như sau: 95°C trong 5 phút, 30 chu kỳ (95°C 30 giây, 55°C 30 giây, 72°C 30 giây), 72°C trong 5 phút (Minato et al., 2019). Sản phẩm khuếch đại đặc hiệu với kích thước 200bp. Trình tự mồi tham gia phản ứng bao gồm:

AV1 – 4F: ACG CCA GGT CTG AGG CTG TA, AV1 – 4R: GTT CAA CAG GCC GTG GGA

CA; mtCOI – 5F: TGGTCAGTATGCGAGCAAGG, mtCOI – 5R: GAGGCATGAGTACACGCCAT, AV1 – 6F: GGCTGGCAAGTATGAAAATC, AV1 – 6R: TGGATGGATTTCAAGGTCTG (tự thiết kế bằng Primer BLAST). Sản phẩm PCR được điện di kiểm tra kết quả trên agarose gel 0,8%, nhuộm bằng GelRed Loading Buffer with TriColor 6X và quan sát hình ảnh điện di dưới ánh sáng tia tử ngoại.

2.4. Giải và phân tích trình tự

Sản phẩm PCR tinh sạch được giải trình tự tại công ty TNHH APOLLO BIOTEK (Việt Nam) bằng kỹ thuật Sanger một chiều. Mức độ tương đồng của đoạn gen SLCMV được so sánh với các đoạn gen SLCMV được đăng ký trên ngân hàng gen bằng phần mềm trực tuyến BLAST (Basic Local Alignment SearchTool) trên GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

2.5. Chẩn đoán nhanh SLCMV bằng kỹ thuật real-time PCR

Phản ứng real-time PCR nhằm phát hiện nhanh virus SLCMV dựa trên chất thuốc nhuộm huỳnh quang SYBR Green Lo ROX qPCR Master Mix (2X) K0221 Bioline và SYBR Green Lo ROX qPCR Master Mix (2X) K0221 Maxima. RealTime PCR được thực hiện trong 25 µl phản ứng bao gồm: 2 µl mẫu DNA; 1 µl cặp mồi (2µM mỗi mồi); 12,5 µl SYBR Green Lo ROX qPCR Master Mix (2X); 9,5 µl nước cất vô trùng. Điều kiện phản ứng RealTime PCR được thiết lập với: 95°C trong 5 phút, tiếp theo là 40 chu kỳ 95°C trong 30 giây, 55°C trong 30 giây, tín hiệu huỳnh quang được đọc ở 60°C (Celik et al., 2023). Kết quả được xuất kết quả thô và phân tích chất lượng cũng như hiệu chuẩn dữ liệu bằng phần mềm QuantStudio 3/5 Real – Time PCR Software (QuantStudio 3/5 Software, Thermo Fisher Scientific - VN).

2.6. Phương pháp xử lý số liệu

Cây phát sinh loài được xây dựng bằng phương pháp Maximum Likelihood Tree, sử dụng phần mềm MEGA 11. Tất cả các chuỗi tham chiếu được lấy từ cơ sở dữ liệu GenBank.

Các số liệu được trình bày và xử lý thống kê bằng phần mềm Statgraphics phiên bản 15 và Microsoft Excel 2016.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phương pháp trích ly DNA cho phép thu nhận hàm lượng ssDNA cao

Kết quả cho thấy phương pháp CTAB – SDS cho hiệu quả trích ly DNA tốt hơn so với phương pháp P.C.I và KIT ABT, hàm lượng DNA tách chiết được

xác định bằng máy Nanodrop one (Thermo scientific) và chất lượng DNA tách chiết được đánh giá qua tỉ lệ A_{260}/A_{280} (Malandrali, et al., 2017) đều nằm trong khoảng 2,0 – 2,1 và hàm lượng DNA cao nhất là 9925 ng/ml (Bảng 1). Do đó, phương pháp CTAB – SDS được chọn để sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.

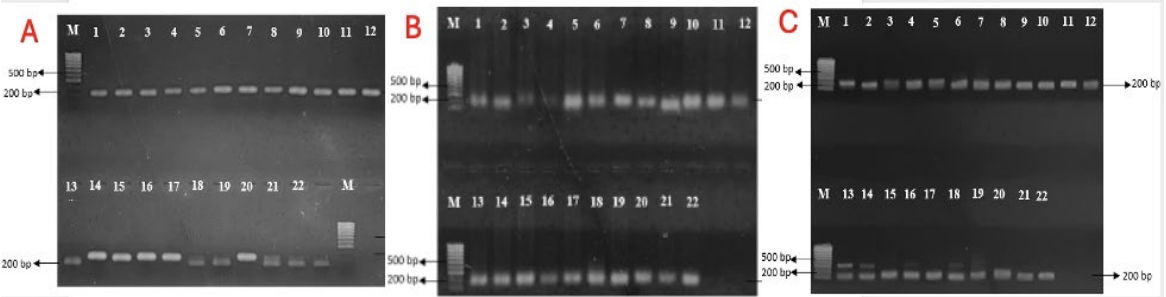
Bảng 1. Kết quả khảo sát quy trình trích ly DNA từ mẫu lá sắn thu nhận được có biểu hiện đặc trưng của bệnh khảm

Mẫu Phân tích	Phương pháp CTAB - SDS		Phương pháp P.C.I		Phương pháp KIT ABT	
	$A_{260/280}$	Hàm lượng DNA (ng/mL)	$A_{260/280}$	Hàm lượng DNA (ng/mL)	$A_{260/280}$	Hàm lượng DNA (ng/mL)
Bình Chánh (BC)	$2,0 \pm 0,06$	$475 \pm 35,4$	$2,1 \pm 0,2$	1773 ± 104	$2,1 \pm 0,4$	$340 \pm 28,3$
Hóc Môn (HM)	$2,0 \pm 0,06$	$810 \pm 127,3$	$1,9 \pm 0,2$	$350 \pm 35,4$	$2,0 \pm 0,3$	$441 \pm 149,2$
Củ Chi (CC)	$2,0 \pm 0,1$	5492 ± 649	$2,2 \pm 0,4$	$27 \pm 23,7$	$1,8 \pm 0,2$	$415 \pm 35,3$
Tây Ninh (TN)	$2,0 \pm 0,06$	9925 ± 781	$2,2 \pm 0,2$	$465 \pm 91,9$	$1,9 \pm 0,2$	193 ± 82
Bình Dương (BD)	$2,0 \pm 0,1$	1025 ± 460	$2,2 \pm 0,1$	500 ± 212	$2,0 \pm 0,06$	$55 \pm 6,3$
Đồng Nai (ĐN)	$2,1 \pm 0,1$	3900 ± 778	$1,8 \pm 0,3$	$390 \pm 14,1$	$2,0 \pm 0,06$	$500 \pm 141,4$
Vũng Tàu (VT)	$2 \pm 0,06$	3192 ± 442	$2,6 \pm 0,2$	$168 \pm 38,9$	$2,0 \pm 0,1$	$450 \pm 70,7$

3.2. Phương pháp PCR cho phép nhận diện sự có mặt của SLCMV trên mẫu lá sắn

Kết quả điện di sản phẩm PCR cho thấy, ba cặp primer AV1 – 4F4R, mtCOI – 5F5R, AV1 – 6F6R khuếch đại được DNA mục tiêu với hầu hết các mẫu lá sắn thu nhận và xuất hiện các vạch rõ trên gel agarose 0,8%, với kích thước khoảng 200bp (Hình 2 A, B, C). Tuy nhiên, cặp primer AV1– 4F4R có vạch điện di sáng và rõ hơn, ngoài với nhiệt độ nóng

chảy cao hiệu quả và độ đặc hiệu sẽ tốt hơn so với các cặp primer còn lại, Chính vì thế, cặp primer AV1– 4R được lựa chọn sử dụng trong phản ứng real-time PCR. Các kết quả này khác biệt với nghiên cứu của Trinh et al. (2021) cho thấy có sự khác biệt về nhóm gen AV1 ở đoạn gen DNA-A ở khu vực so sánh với mẫu SLCMV đã công bố. Điều này có tiềm năng về sự phân hoá gen và có sự khác biệt tiềm năng chủng SLCMV mới tại khu vực Đông Nam Bộ.



Hình 2. Ứng dụng phương pháp PCR nhận diện sự có mặt của SLCMV trên các mẫu lá sắn

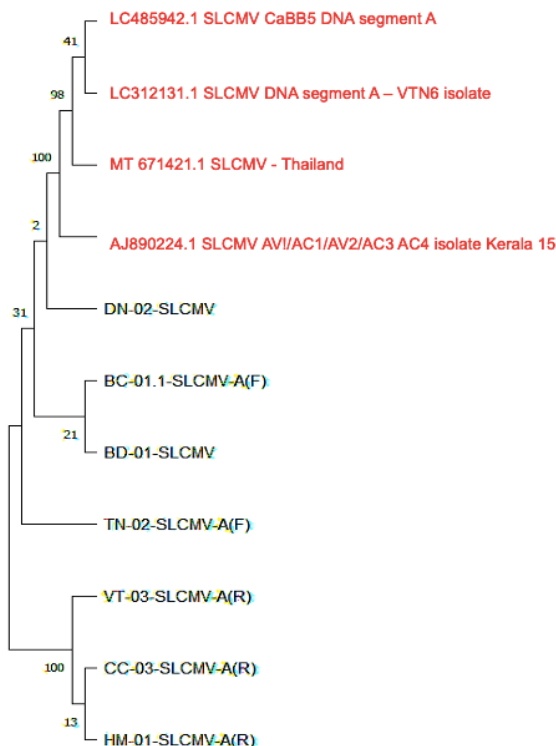
Ghi chú: (A): Kết quả khuếch đại DNA mục tiêu với cặp mồi AV1 – 4F4R; (B): Kết quả khuếch đại DNA mục tiêu với cặp mồi mtCOI – 5F5R; (C): Kết quả khuếch đại DNA mục tiêu với cặp mồi AV1 – 6F6R.

M: thang DNA 100bp; 1-3: Bình Chánh (1: BC1, 2: BC2, 3:BC3);4-6: Hóc Môn (4: HM1, 5: HM2, 6: HM3);7-9: Củ Chi (7: CCI, 2: CC2, 3:CC3);10 -13 Tây Ninh (10: TN1, 11: TN2, 12: TN3, 13: TN4);14-16: Bình Dương (14: BD1, 15:BD2, 16: BD3); 17-19: Đồng Nai (17: ĐN1, 18: ĐN2, 19: ĐN3);20-22: Vũng Tàu (20: VT1, 21: VT2, 22: VT3).

3.3. Giải trình tự xác định nguồn gốc của SLCMV

Để đánh giá độ đặc hiệu của các cặp primer, sản phẩm PCR được tinh sạch và giải trình tự. Kết quả so sánh bằng phần mềm trực tuyến BLAST trên cơ sở dữ liệu NCBI cho thấy, sản phẩm được khuếch đại có độ tương đồng 100% với trình tự bộ gen SLCMV (Genbank LC312131.1). Cây phát sinh loài của các trình tự mục tiêu trên các chủng SLCMV

được công bố gây bệnh khảm trên sắn được thiết lập cho thấy gen AV1 khuếch đại được từ PCR với cặp mồi AV1 – 4F và AV1 – 4R có mối liên hệ gần với những virus SLCMV từ Thái Lan được chia thành nhiều nhóm qua chỉ số bootstrap với nhóm mẫu sắn từ Bình Chánh (BC1) và Đồng Nai (DN2) tương ứng lần lượt là 100% và 95%. Do đó, nhóm BC1 được sử dụng làm đối chứng và cặp mồi AV1 - 4F4R được chọn cho phương pháp real-time PCR để xác định tải lượng virus SLCMV gây bệnh.



Hình 3. Cây phát sinh loài của virus SLCMV với các loài có liên quan đã công bố được phân tích bằng phương pháp maximun likelihood với giá trị bootstrap lặp lại 1000 lần. Giá trị tại các nốt là giá trị % bootstrap

3.4. Phương pháp Real-Time PCR xác định tải lượng gây bệnh của SLCMV trên mẫu lá sắn

Kỹ thuật real-time PCR được áp dụng nhằm chẩn đoán nhanh virus gây bệnh khảm lá trên các mẫu lá sắn thu nhận được tại các vị trí như: Bình Chánh, Hóc Môn, Củ Chi, Tây Ninh, Bình Dương, Đồng Nai và Vũng Tàu với đối chứng âm là mẫu lá không có biểu hiện bệnh, đối chứng dương là mẫu sắn mang bệnh đã được giải trình tự bằng phương pháp Sanger và so sánh độ tương đồng với các chủng đã được phân lập tại trên cơ sở dữ liệu Blast là 100%. Kết quả cho thấy, phương pháp real-time PCR phát hiện các mẫu lá sắn được thu nhận tại các

địa chỉ điều dương tính với virus SLCMV (Hình 4) và xây dựng được đường chuẩn nồng độ với phương trình đường thẳng $Ct = a \log_{10}(\text{nồng độ}) + b$. Từ đó thế vào công thức (1) xác định được nồng độ gây bệnh của virus SLCMV ở các địa chỉ thu nhận mẫu (Bảng 2) cho thấy các mẫu sắn được thu thập từ các tỉnh khu vực Đông Nam Bộ đều có tỷ lệ mẫu nhiễm SLCMV, mang tải lượng virus cao (70% mẫu nhiễm, tương ứng 100% mẫu nhiễm ở Bioline SYBR Green và 72,7% mẫu nhiễm ở Maxima SYBR Green. Do đó, Bioline SYBR Green Master Mix được chọn lựa cho nghiên cứu về Real – time PCR về sau.

$$\text{Nồng độ (IU/ml)} = \frac{KQ \times V_{DNA}}{V_{mẫu}} \quad (1)$$

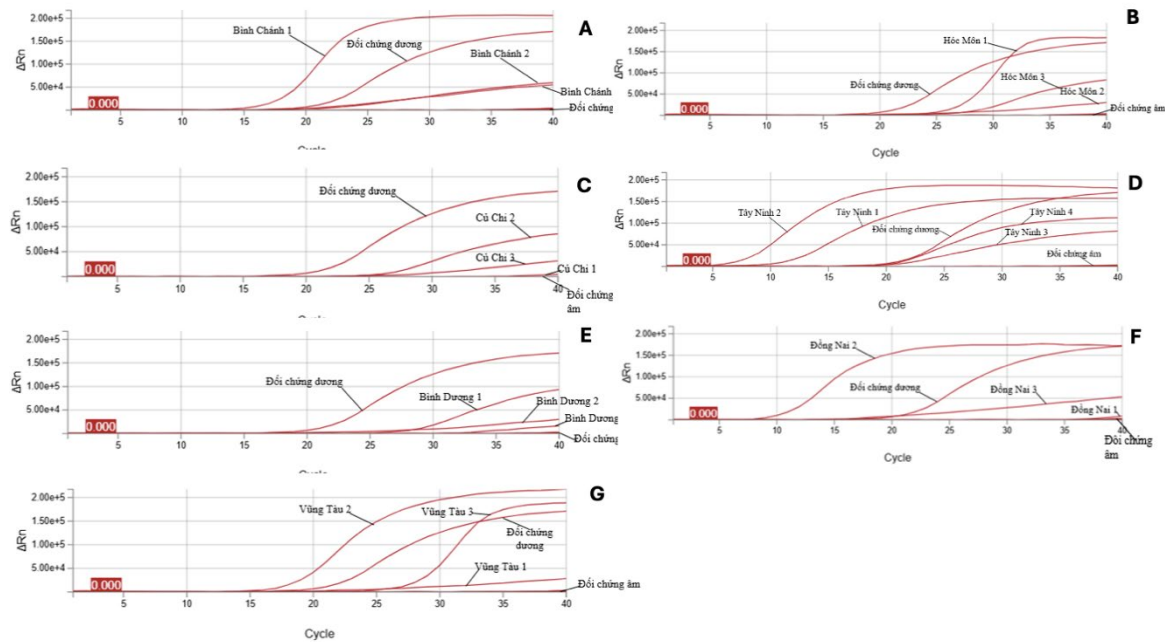
Trong đó:

Nồng độ (UI/ml): nồng độ DNA virus gây bệnh trong 1mL mẫu

KQ: kết quả xuất ra từ máy,

V_{DNA} : thể tích DNA thu được sau tách chiết (μ L),

$V_{mẫu}$: thể tích mẫu sử dụng cho tách chiết (μ L).



Hình 4. Ứng dụng phương pháp real-time PCR xác định nồng độ virus SLCMV gây bệnh trên các mẫu lá sản với các cặp môi tối ưu

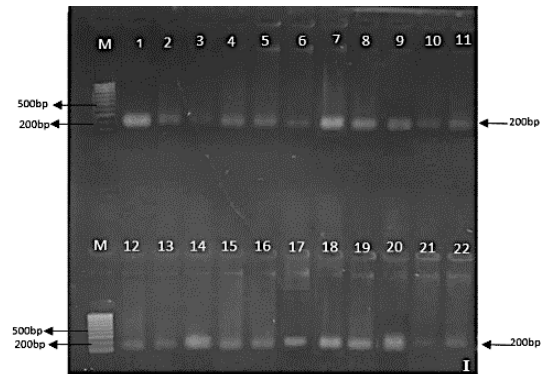
Ghi chú: (A) Kết quả phát hiện SLCMV trên mẫu lá thu nhận tại Bình Chánh, (B) Kết quả phát hiện SLCMV trên mẫu lá thu nhận tại Hóc Môn, (C) Kết quả phát hiện SLCMV trên mẫu lá thu nhận tại Củ Chi, (D) Kết quả phát hiện SLCMV trên mẫu lá thu nhận tại Tây Ninh, (E) Kết quả phát hiện SLCMV trên mẫu lá thu nhận tại Bình Dương, (F) Kết quả phát hiện SLCMV trên mẫu lá thu nhận tại Đồng Nai, (G) Kết quả phát hiện SLCMV trên mẫu lá thu nhận tại Vũng Tàu.

Bảng 2. Nồng độ gây bệnh của virus khảm (SLCMV) trên giống sản tại các địa điểm thu nhận mẫu thông qua giá trị chu kỳ ngưỡng (Ct) sử dụng Real-time PCR Master mix Bioline SYBR Green và Maxima SYBR Green

Vị trí thu mẫu	Mẫu phân tích	Bioline SYBR Green		Maxima SYBR Green	
		Ct mẫu	Nồng độ virus gây bệnh (IU/ml)	Ct mẫu	Nồng độ virus gây bệnh (IU/ml)
Bình Chánh	BC1	14,9	170×10^3	11,308	$102,6 \times 10^6$
	BC2	20,5	28×10^3	N/A	N/A
	BC3	19,8	$53,4 \times 10^3$	14,55123,625	565×10^4
Hóc Môn	HM1	38,5	0,003	23,625	1696
	HM2	30,4	4,13	N/A	N/A
	HM3	25,8	247,5	N/A	N/A
Củ Chi	CC1	38,9	0,002	22,351	5296
	CC2	25,1	490,8	25,147	435
	CC3	27,3	65,5	N/A	N/A
Tây Ninh	TN1	22,1	$7,14 \times 10^3$	21,921	7778
	TN2	5,2	250×10^8	19,11	96×10^3
	TN3	19,7	873×10^3	22,472	4753
	TN4	19,9	705×10^3	27,4	58,1

Vị trí thu mẫu	Mẫu phân tích	Bioline SYBR Green		Maxima SYBR Green	
		Ct mẫu	Nồng độ virus gây bệnh (IU/ml)	Ct mẫu	Nồng độ virus gây bệnh (IU/ml)
Bình Dương	BD1	26,7	1540,37	28,418	23,4
	BD2	33,3	0,31	N/A	N/A
	BD3	22,6	$59,2 \times 10^3$	33,264	0,3
Đồng Nai	ĐN1	37,7	0,01	N/A	N/A
	ĐN2	8,7	$109,3 \times 10^7$	16,795	76×10^4
	ĐN3	18,5	164×10^3	28,801	16,6
Vũng Tàu	VT1	21,5	$11,3 \times 10^3$	33,314	0,3
	VT2	25,6	285,53	15,704	$201,6 \times 10^4$
	VT3	28,7	17,76	24,613	701
Số lượng mẫu dương tính		22 (100%)		16 (72,7%)	
Nồng độ virus gây bệnh cao nhất		250×10^8 (IU/mL)		$102,6 \times 10^6$ (IU/mL)	

Kết quả Bảng 3 cho thấy chất nhuộm huỳnh quang Bioline SYBR Green đo được tính hiệu tốt hơn so với Maxima SYBR Green, với lượng mẫu nhận diện là 22 mẫu và kết quả xác lượng nồng độ gây bệnh củ virus cho thấy TN và ĐN là hai khu vực có tải lượng virus gây bệnh cao nhất với nồng độ lần lượt là 250×10^8 (IU/ml) và $109,3 \times 10^7$ (IU/ml).



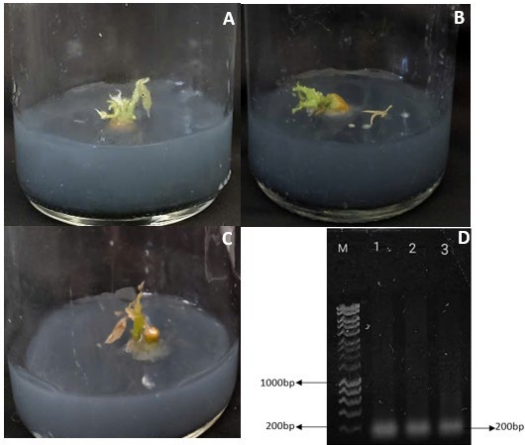
Hình 6. Kết quả điện di kiểm tra khả năng nhận diện SLCMV bằng kỹ thuật real-time PCR

Trong đó: M: thang DNA 100bp; 1-3: Bình Chánh (1: BC1, 2: BC2, 3:BC3); 4-6: Hóc Môn (4: HM1, 5: HM2, 6: HM3;7-9); Củ Chi (7: CC1, 2: CC2, 3:CC3);10 -13 Tây Ninh (10: TN1, 11: TN2, 12: TN3, 13: TN4);14-16: Bình Dương (14: BD1, 15:BD2, 16: BD3), 17-19: Đồng Nai (17: ĐN1, 18: ĐN2, 19: ĐN3; 20-22: Vũng Tàu (20: VT1, 21: VT2, 22: VT3).

3.5. Xác định khả năng gây bệnh của SLCMV trên mô hình cây in vitro bằng kỹ thuật PCR

Kết quả PCR khuếch đại được DNA của virus gây bệnh có mặt trên mẫu lá được thử nghiệm trong môi trường vô trùng, là cơ sở để tiến hành định

lượng khả năng gây bệnh của virus khảm lá bằng kỹ thuật real-time PCR.



Hình 7. Kết quả thử nghiệm khả năng virus khảm lá trên mẫu sản được nuôi cấy in vitro bằng kỹ thuật PCR

Trong đó: A: Mẫu sản được nuôi cấy in vitro sau 7 ngày với thời gian nhiễm virus 15 phút, B: Mẫu sản được nuôi cấy In Vitro sau 7 ngày với thời gian nhiễm virus 20 phút, C: Mẫu sản được nuôi cấy In Vitro sau 7 ngày với thời gian nhiễm virus 25 phút, D: Kết quả PCR xác định sự hiện diện của virus SLCMV trên mẫu sản được nuôi cấy In Vitro, M: Thang DNA 1kb, 1: Mẫu sản được nuôi cấy In Vitro với thời gian nhiễm virus 15 phút, 2: Mẫu sản được nuôi cấy In Vitro với thời gian nhiễm virus 20 phút, 3: Mẫu sản được nuôi cấy In Vitro với thời gian nhiễm virus 25 phút.

4. KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, ba quy trình trích ly DNA được khảo sát. Kết quả cho thấy quy trình trích ly DNA bằng phương pháp CTAB – SDS thu nhận được hàm lượng ssDNA của virus SLCMV cao hơn so với phương pháp KIT tách chiết DNA thực vật và phương pháp Phenol – chloroform – isoamyl alcohol. Bên cạnh đó, phương pháp real-time PCR được kết hợp cùng cặp mồi đặc hiệu AV1 – 4F và AV1 - 4R, giúp phát hiện được sự hiện diện của virus SLCMV ở tải lượng thấp sử dụng Bioline SYBR Green Master Mix. Sự khác biệt về gen SLCMV có tiềm năng về phân hoá gen tại khu vực

Đông Nam Bộ, Việt Nam. Từ đó, quy trình chẩn đoán chính xác và độ tin cậy cao giúp nhận biết sự hiện diện của virus gây bệnh khảm lá ở giai đoạn sớm được cung cấp nhằm giảm thiểu rủi ro trong nền nông nghiệp và cũng là tiền đề giúp kiểm soát được mầm bệnh có trên các giống kháng bệnh khảm lá do SLCMV gây ra.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này do Trường Đại học Công Thương Thành phố Hồ Chí Minh bảo trợ và cấp kinh phí theo Hợp đồng số 3999/QĐ-DCT ngày 29 tháng 12 năm 2024.

TÀI LIỆU THAM KHẢO (REFERENCES)

- Ali, Q., Salisu, I. B., Raza, A., Shahid, A., Rao, A. Q., & Husnain, T. (2019). A modified protocol for rapid DNA isolation from cotton (*Gossypium* spp.). *MethodsX*, 259-264. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2019.01.010>
- Celik, A., Emiralioglu, O., Yeken, M. Z., Ciftci, V., Ozer, G., Yoonha, K., & Baloch, F. S. (2023). A novel study on bean common mosaic virus accumulation shows disease resistance at the initial stage of infection in *Phaseolus vulgaris*. *Front Genet*, 14, 1-11. <https://doi.org/10.3389/fgene.2023.1136794>
- Charoenvilaisiri, S., Seepiban, C., Kumposiri, M., Rukpratanporn, S., Warin, N., Phuauangrat, B., Chitchuea, P., Siripaitoon, S., Chatchawankanphanich, O., & Gajanadana, O. (2021). Development of a triple antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for cassava mosaic disease detection using a monoclonal antibody to Sri Lankan cassava mosaic virus. *Virology Journal*, 18(18), 1-14. <https://doi.org/10.1186/s12985-021-01572-6>
- Chaowongdee, S., Vannatim, N., Malichan, S., Kuncharoen, N., Tongyou, P., & Siriwan, W. (2024). Comparative transcriptomics analysis reveals defense mechanisms of *Manihot esculenta* Crantz against Sri Lanka Cassava Mosaic Virus. *BMC Genomics*, 25:436, 1-17. <https://doi.org/10.1186/s12864-024-10315-0>
- E-information gate of Tay Ninh Province (2024). *Sustainable development of casava products in Vietnam*. <https://www.tayninh.gov.vn/vi/news/dua-nghi/phan-trien-ben-vung-nganh-hang-san-khoai-mi-mi-viet-nam-47619.html>
- Hanley, L. B., Bejarano, E. R., Robertson, D., & Mansoor, S. (2013). Geminiviruses: masters at redirecting and reprogramming plant processes. *Nat Rev Microbiol*, 11(11), 777-788. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3117>
- Malandrali, L., Beris, D., Isaioglou, I., Olmos, A., Varveri, C., & Vasilakos, N. (2017). Simultaneous detection of three pome fruit tree viruses by one-step multiplex quantitative RT-PCR. *PLoS One*, 12(7), 1-14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180877>
- McKiernan, H. E., & Danielson, P. B. (2017). Molecular Diagnostic Applications in Forensic Science. *Molecular Diagnostics*, 371-394. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802971-8.00021-3>
- Minato, N., Sok, S., Chen, S., Delaquis, E., Phirun, I., Le, V. X., Burra, D., Newby, J., Wyxkhuy, K., & Haan, S. (2019). Surveillance for Sri Lankan cassava mosaic virus (SLCMV) in Cambodia and Vietnam one year after its initial detection in a single plantation in 2015. *PLoS One*, 14(2), 1-16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212780>
- Mugerwa, H., Seal, S., Ling, H. W., Patel, M., Kabaalu, R., Omongo, C., Alicai, T., Tairo, F., Ndunguru, J., Sseruwgi, P., & Colvin, J. (2018). African ancestry of New World, Bemisia tabaci-whitefly species. *Scientific Reports*, 1-11. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20956-3>
- Truong, N. T. H., Huynh, M. T. N., Le, K. H., Tran, C. T., Pham, N. T., Le, K., Pham, A. Q., & Nguyen, H. H. (2022). The first step of observational research of Sri Lankan Cassava Mosaic Virus (SLCMV) on casava (*Manihot esculenta* Crantz 1766). *HCMCOUJS- Technique and Technology*, 17(2), 5-20 (in Vietnamese). <https://doi.org/10.46223/HCMCOUJS.tech.vi.17.2.2194.2022>
- Trinh, H. X., Nguyen, H. C., Ngo, H. Q., & Nguyen, D. H. (2021). Identification of infection of Sri Lankan casava mosaic virus (SLCMV) causing CMD in casava species in Vietnam. *Agricultural Science of Vietnam*, 19(2), 206-214 (in Vietnamese).

Uke, A, Khin, S, Kobayashi, K, Satou, T, Kim, O, Hoat, T. X, Natsuaki, K., & Ugaki, M. (2022). Detection of Sri Lankan cassava mosaic virus by

loop-mediated isothermal amplification using dried reagents. *J. Virol Methods*, 1-23.
<https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2021.114336>