

Phát hiện *Melon yellow spot virus* tại Việt Nam bằng kỹ thuật RT-PCR

Huỳnh Nguyễn Minh Nghĩa, Nguyễn Thị Kim Thoa,
Phạm Văn Hiểu, Đinh Thiện Quân và Nguyễn Xuân Dũng*
Trung tâm Công nghệ Sinh học Thành phố Hồ Chí Minh

TÓM TẮT

Melon yellow spot virus (MYSV) là loài virus thuộc nhóm *Tospovirus* gây nên bệnh đốm vàng trên cây dưa lưới. Loài virus này lần đầu tiên được phát hiện tại Nhật Bản và hiện được ghi nhận tại nhiều nước trên thế giới. Mặc dù chưa có công bố chính thức về MYSV tại Việt Nam nhưng các triệu chứng bệnh điển hình đã được quan sát trên dưa lưới ở nhiều vườn trồng. Nghiên cứu này đã thiết lập quy trình phát hiện MYSV tại Việt Nam bằng kỹ thuật RT-PCR. RNA virus được tách chiết từ lá dưa lưới và sử dụng làm khuôn cho phản ứng RT-PCR nhằm khuếch đại phân đoạn gen mã hóa nucleocapsid (protein vỏ) bằng cặp mồi đặc hiệu, được thiết kế dựa trên vùng trình tự bảo tồn. Trình tự gen sau khi khuếch đại được dòng hóa và giải trình tự. Nhiệt độ bắt cặp mồi, nồng độ mồi tối ưu và giới hạn phát hiện của phản ứng cũng được xác định. Phản ứng RT-PCR đã khuếch đại thành công phân đoạn gen 186 bp, với độ tương đồng trên 98% so với các trình tự MYSV đã công bố. Nhiệt độ bắt cặp và nồng độ mồi phù hợp cho phản ứng lần lượt là 57°C và 0.2 μ M cùng ngưỡng phát hiện ở mức 10^2 bản sao/ μ L. Cuối cùng, việc kiểm tra trên mẫu thực địa cho thấy có sự hiện diện của MYSV trong các mẫu thu thập tại Thành phố Hồ Chí Minh.

Từ khóa: bệnh virus, dưa lưới, gen nucleocapsid, *Melon yellow spot virus*, RT-PCR

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Melon yellow spot virus (MYSV) là loài virus thuộc nhóm *Tospovirus* gây nên bệnh đốm vàng trên cây dưa lưới được phát hiện lần đầu tiên tại Nhật Bản vào năm 1992 [1 - 3]. Kể từ đó, MYSV cũng đã được ghi nhận tại nhiều quốc gia như Đài Loan, Thái Lan, Trung Quốc, Ecuador trên nhiều loại cây thuộc họ bầu bí và gây ra thiệt hại nghiêm trọng đến năng suất [4 - 9]. Sự lây lan của MYSV chủ yếu thông qua côn trùng chích hút như bọ trĩ (*Thrips palmi*), làm tăng nguy cơ bùng phát dịch bệnh trên diện rộng [10]. Tại Việt Nam, dù chưa có một công bố chính thức về sự hiện diện của MYSV, nhưng các triệu chứng điển hình của bệnh đã được quan sát trên dưa lưới tại nhiều vườn trồng. Điều này đặt ra yêu cầu cấp thiết phải có phương pháp tin cậy để phát hiện MYSV, từ đó có các biện pháp phòng ngừa và kiểm soát hiệu quả. Hiện nay, nhiều phương pháp đã được áp dụng để phát hiện virus thực vật, trong đó phổ biến nhất là ELISA, LAMP-PCR, qRT-PCR và RT-PCR [11]. ELISA

là phương pháp phổ biến nhờ chi phí thấp và dễ thực hiện. Tuy nhiên, ELISA có độ nhạy thấp hơn so với các phương pháp khuếch đại axit nucleic, dễ dẫn đến kết quả âm tính giả, đặc biệt khi nồng độ virus trong mẫu thấp [11]. LAMP-PCR có ưu điểm là nhanh chóng và không yêu cầu thiết bị luân nhiệt như PCR truyền thống nhưng lại dễ bị nhiễm chéo [10]. qddRT-PCR cung cấp khả năng định lượng chính xác lượng virus trong mẫu với độ nhạy rất cao. Tuy nhiên, phương pháp này yêu cầu thiết bị đắt tiền và quy trình thực hiện phức tạp, không phù hợp với các phòng thí nghiệm có điều kiện hạn chế [9, 11]. So với các phương pháp trên, RT-PCR có độ đặc hiệu cao, cho phép phát hiện virus ngay cả khi nồng độ RNA virus trong mẫu rất thấp [10]. Ngoài ra, RT-PCR không đòi hỏi các thiết bị đắt tiền như qRT-PCR, đồng thời có độ ổn định và khả năng tái lập tốt hơn so với LAMP-PCR. Vì vậy, phương pháp này được lựa chọn để phát hiện MYSV trong điều kiện phòng thí nghiệm

Tác giả liên hệ: TS. Nguyễn Xuân Dũng
Email: nxdung.snn@tphcm.gov.vn

tại Việt Nam. Bệnh do MYSV có thể gây tổn thất kinh tế đáng kể, làm giảm năng suất và chất lượng dưa lưới. Theo báo cáo từ Nhật Bản và Đài Loan, năng suất dưa lưới có thể giảm đến 40 - 50% khi nhiễm MYSV [10]. Tại Việt Nam, mặc dù chưa có dữ liệu chính thức về thiệt hại do MYSV gây ra, nhưng cần lưu ý rằng nhiều giống dưa lưới được trồng có nguồn gốc từ Nhật Bản, Đài Loan và Thái Lan - những khu vực có báo cáo về sự xuất hiện của MYSV. Do đó, nguy cơ lây nhiễm MYSV vào Việt Nam là rất cao và việc phát hiện sớm sẽ giúp hạn chế thiệt hại do virus gây ra. Trong nghiên cứu này, kỹ thuật RT-PCR đã được áp dụng để thiết lập quy trình phát hiện MYSV, hỗ trợ trong công tác kiểm soát và phòng ngừa virus gây bệnh trên dưa lưới tại Việt Nam.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Mẫu dưa lưới có biểu hiện triệu chứng bệnh đốm vàng được thu thập ở các vườn trồng dưa lưới tại Thành phố Hồ Chí Minh.

Dòng vi khuẩn *E. Coli* được dùng để dòng hóa (do phòng Công nghệ sinh học Thực vật cung cấp).

Cặp mồi pJET-f: f: 5'-ACCTGCCAACCAAAGCGAGAAC-3', pJET-r: 5'-TCAGGGTTATTGTCTCATGAGCG-3'.

Cặp mồi NAD5-F: 5'-GATGCTTCTTGGGGCTTCTTGTT-3', NAD5-R: 5'-CTCCAGTCACCAACATTGGCATAA-3'.

Các trình tự gen mã hóa protein nucleocapsid virus được thu thập từ ngân hàng gen NCBI (HM590470, LC597361, AM087020, MN550996, GQ397254, MH734112, KU233526, KU233525, FJ386391, AB024332, AY574574, MG366599, FJ947154, MG366603, MG366601, MG366600, FR714507, MG366602, AM087021, AY673635,

KX711613, AY673636, AM113769, AM113768, AM113766, AM113767) được dùng để thiết mồi.

2.2. Phương pháp

2.2.1. Thiết kế mồi

Các trình tự gen mã hóa nucleocapsid protein của virus công bố trên cơ sở dữ liệu GenBank (NCBI) được phân tích và so sánh nhằm lựa chọn vùng bảo tồn đặc trưng, từ đó thiết kế cặp mồi đặc hiệu bằng phần mềm Primer 3. Để tránh khả năng bắt cặp của mồi với các gen của thực vật và các virus khác, phần mềm Blast Primer được sử dụng để kiểm tra tính đặc hiệu. Mồi được thiết kế với trình tự xuôi MYSV-F: 5'-CATCTGGGGATAATGTTGGTCC-3' và ngược MYSV-R: 5'TGTCAAACCTTTCAGGCACA -3'; nhiệt độ nóng chảy (T_m): 58.51°C và 58.82°C lần lượt cho mồi xuôi và mồi ngược; kích thước sản phẩm khuếch đại: 186 bp.

2.2.2. Thu thập nguồn mẫu nhiễm virus

Các mẫu lá được thu thập từ các cây dưa lưới có biểu hiện đặc trưng của bệnh đốm vàng, bao gồm lá có các đốm hoại tử, bị biến dạng, khảm, hóa vàng, quả cũng xuất hiện khảm vàng và cây trở nên thấp với các lóng ngắn [7, 8]. Sau khi thu thập, mẫu được rửa sạch bằng nước và bảo quản tại nhiệt độ -80°C trong tủ đông sâu (Sanyo).

2.2.3. Ly trích RNA virus và khuếch đại gen

RNA được ly trích từ mẫu lá dưa lưới có biểu hiện nhiễm virus bằng GeneJET Plant RNA purification mini Kit (Thermo Fisher Scientific) theo hướng dẫn của hãng sản xuất. Đoạn gen của virus MYSV được khuếch đại thông qua phản ứng RT-PCR (sử dụng cặp mồi thiết kế) với thành phần phản ứng và chương trình nhiệt lần lượt trong Bảng 1 và 2.

Bảng 1. Thành phần phản ứng RT-PCR phát hiện MYSV bằng cặp mồi MYSV-F/MYSV-R

STT	Tên hóa chất	Nồng độ	Thể tích (μ L)
1	Dreamtaq Green PCR Master Mix (2X)	1X	12.50
2	Nuclease-free H ₂ O		10.10
3	RevertAid Reverse Transcriptase (200U/ μ L)	30U	0.15
4	RiboLock RNase Inhibitor (40U/ μ L)	10U	0.25
5	Mồi xuôi (10 μ M)	0.2 μ M	0.50
6	Mồi ngược (10 μ M)	0.2 μ M	0.50

STT	Tên hóa chất	Nồng độ	Thể tích (μL)
7	Mẫu (100 ng/μL)	100 ng	1.00
Tổng			25

Bảng 2. Chương trình nhiệt phản ứng RT-PCR phát hiện MYSV bằng cặp mồi MYSV-F/MYSV-R

Nội dung	Số chu kỳ	Nhiệt độ/Thời gian
Tạo cDNA	1	50°C/15 phút
Biến tính ban đầu	1	95°C/5 phút
Biến tính	40	95°C/30 giây
Bắt cặp		57°C/30 giây
Kéo dài		72°C/60 giây
Kéo dài sau cùng	1	72°C/5 phút

Điện di sản phẩm PCR trên gel agarose 1.5% trong thời gian 30 phút với hiệu điện thế 100V. Sau đó, bản gel được nhuộm với Ethidium Bromide (0.4 μg/mL) trong 30 phút và được quan sát trên máy chụp gel (Geldoc - It).

2.2.4. Dòng hóa và xác định trình tự gen

Sau khi khuếch đại, đoạn gen được chèn vào vector pJET1.2 bằng Kit pJET PCR Cloning (Thermo Fisher Scientific) và được đưa vào vi khuẩn *E. coli* DH5α thông qua phương pháp hóa biến nạp. Các vi khuẩn sau khi biến nạp được chọn lọc trên môi trường LB rắn có bổ sung 100 mg/L ampicillin trong 24 giờ tại 37°C. Sự hiện diện của trình tự gen chèn được xác định bằng phản ứng PCR khuếch đại với cặp mồi pJET-f/p-JET-r. DNA plasmid của các dòng vi khuẩn thu nhận sau biến nạp được tách chiết (sử dụng bộ Kit DNA-Spin™ Plasmid DNA Purification - Thermo Fisher Scientific) và gửi giải trình tự.

2.2.5. Tạo mẫu DNA plasmid

Plasmid chứa gen mục tiêu được xác định hàm lượng DNA (sử dụng máy quang phổ kế vi định lượng Nanodrop) và tính số lượng bản sao gen theo công thức [12]:

$$\text{Số bản sao}_{\text{gen}} = \frac{\text{Khối lượng DNA} \times 6.022 \times 10^{23}}{\text{Chiều dài đoạn gen} \times 1 \times 10^9 \times 650}$$

Trong đó: Đơn vị khối lượng DNA: ng, chiều dài đoạn gen: bp.

Pha loãng mẫu DNA plasmid (xác định được số bản sao) theo hệ số bậc 10 thành các mẫu có nồng độ từ 10^6 đến 10^0 bản sao/μL.

2.2.6. Tối ưu nhiệt độ bắt cặp mồi

Thực hiện phản ứng RT-PCR với thành phần và chương trình nhiệt theo Bảng 1 và 2, chỉ thay đổi 08 mức nhiệt độ bắt cặp mồi từ 51°C đến 65°C. Tại mức nhiệt độ bắt cặp nào cho sản phẩm RT-PCR xuất hiện bằng DNA sáng rõ, sắc nét và không có băng phụ sẽ được xác định là nhiệt độ bắt cặp mồi phù hợp của phản ứng.

2.2.7. Tối ưu nồng độ mồi

Phản ứng RT-PCR được thực hiện với thành phần và chương trình nhiệt theo Bảng 1 và 2, trong đó chỉ thay đổi nồng độ mồi từ 0.1 μM đến 0.5 μM. Nồng độ mồi được xem là tối ưu khi sản phẩm khuếch đại xuất hiện với băng DNA sắc nét, cường độ sáng rõ ràng và không có băng phụ.

2.2.8. Xác định giới hạn phát hiện LOD₉₅

LOD₉₅ được xác định bằng cách lặp lại 3 lần phản ứng PCR trên các mẫu chuẩn có nồng độ virus từ 10^0 đến 10^6 bản sao/μL. Xác định nồng độ virus thấp nhất mà phản ứng có thể phát hiện. Sau đó, lặp lại 20 lần phản ứng PCR trên mẫu có nồng độ

virus thấp nhất có thể phát hiện. Nếu 19/20 lần lặp lại đều cho kết quả dương tính, LOD_{95} sẽ được xác lập tại nồng độ virus này. Trong trường hợp nhỏ hơn 19 lần, thực hiện lại việc xác định LOD_{95} tại mẫu có nồng độ virus cao hơn liền kề.

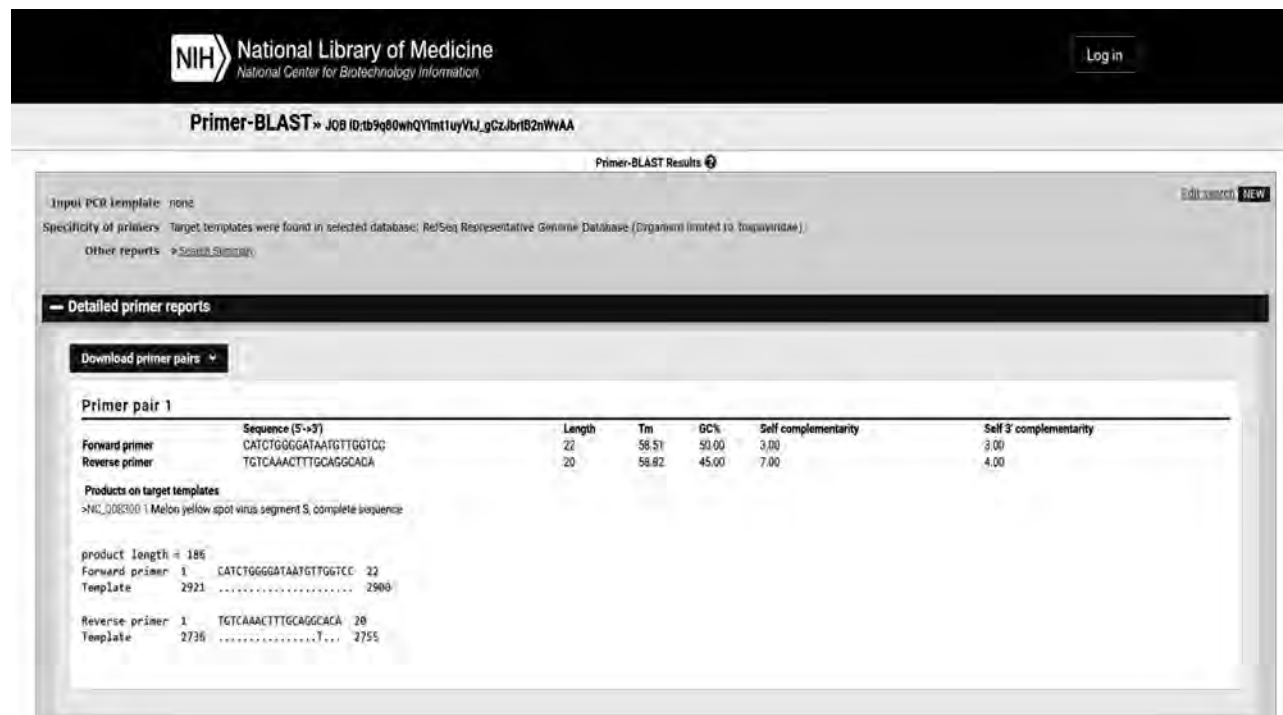
2.2.9. Thử nghiệm trên mẫu thực địa

Khả năng phát hiện thực tế của phản ứng RT-PCR được đánh giá thông qua việc phát hiện trình tự MYSV trên 10 mẫu thu thập.

3. KẾT QUẢ

3.1. Khuếch đại phân đoạn gen mục tiêu của virus

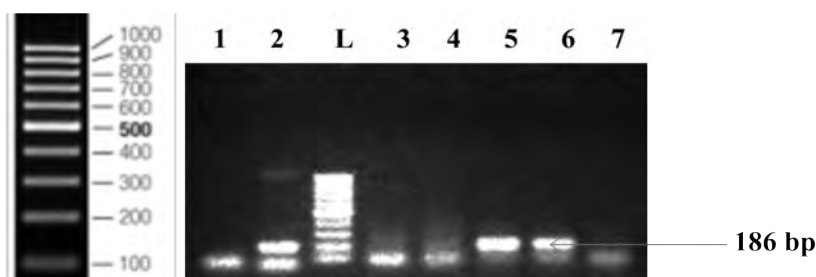
Trong quá trình thiết kế, cặp mồi MYSV được so sánh với các trình tự *Tospovirus* khác trên ngân hàng gen NCBI để đánh giá độ đặc hiệu. Kết quả cho thấy cặp mồi không có khả năng bắt cặp với bất kỳ trình tự *Tospovirus* nào khác ngoài MYSV (Hình 1). Chính vì vậy, cặp mồi được lựa chọn để thiết lập phản ứng RT-PCR khuếch đại phân đoạn gen mục tiêu của virus MYSV.



Hình 1. Kết quả BLAST cặp mồi MYSV với các *Tospovirus* trên ngân hàng gen NCBI

Bằng DNA thu được từ phản ứng RT-PCR với cặp mồi MYSV có kích thước khoảng 200 bp, phù hợp với sản phẩm thiết kế (186 bp) (Hình 2). Tuy điều này cho thấy phân đoạn gen được khuếch đại phù hợp với phân đoạn gen mục tiêu nhưng vẫn không

thể loại trừ trường hợp mồi có khả năng bắt cặp với một đoạn RNA nào đó trong mẫu. Do đó, để khẳng định chắc chắn rằng trình tự được khuếch đại là trình tự gen virus, phân đoạn DNA (khoảng 200 bp) được dòng hóa và giải trình tự.



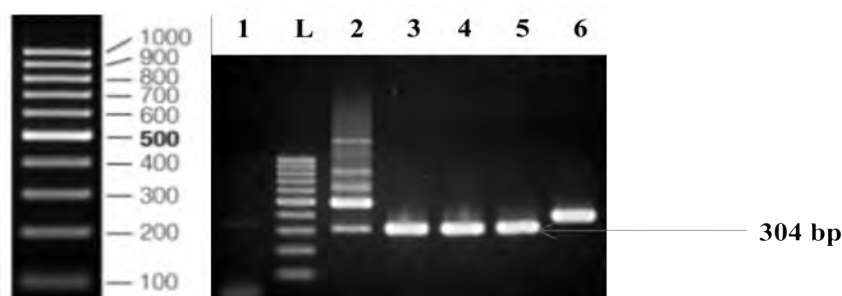
Hình 2. Kết quả điện di sản phẩm RT-PCR khuếch đại gen virus MYSV với cặp mồi MYSV-F/MYSV-R

Ghi chú: L. Thang DNA, 1. Kiểm chứng âm PCR (không chứa DNA mẫu), 2. Kiểm chứng gen nội chuẩn (khuếch đại RNA của ty thể), 3 - 7. RNA ly trích từ lá dừa lười

3.2. Tạo dòng và kiểm tra trình tự của đoạn gen khuếch đại

Sau quá trình biến nạp, các dòng vi khuẩn mang vector pJET1.2 sẽ sống sót và phát triển trên môi trường chứa ampicillin nhờ gen kháng ampicillin của vector. Kết quả thu được các khuẩn lạc phát triển trên môi trường LB bổ sung 100 mg/L ampicillin cho thấy quá trình hóa biến nạp đã

thành công. Việc các khuẩn lạc mang vector có thực sự chứa gen mục tiêu hay không cần được kiểm tra bằng phản ứng PCR với cặp mồi pJET. Kết quả phản ứng thu được phân đoạn DNA có kích thước 304 bp bao gồm phân đoạn gen được chèn (186 bp) và đoạn gen trên plasmid (118 bp) tại khuẩn lạc 2, 3, 4 (Hình 3). Như vậy, đã thu được dòng vi khuẩn mang vector chứa gen mục tiêu.



Hình 3. Kết quả điện di sản phẩm PCR kiểm tra gen mục tiêu trên khuẩn lạc với cặp mồi pJET-f/pJET-r
Ghi chú: L. Thang DNA, 1. Kiểm chứng âm PCR (không chứa DNA mẫu), 2 - 6. Mẫu vi khuẩn

DNA plasmid tách chiết từ dòng khuẩn lạc mang gen mục tiêu được giải trình tự và so sánh trên ngân hàng gen NCBI. Kết quả cho thấy trình tự thu

được có mức độ tương đồng hơn 98% với các trình tự *MYSV* khác (Hình 4). Điều này cho thấy phân đoạn gen thu được là trình tự gen của *MYSV*.

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Melon yellow spot virus isolate Hainan segment S, complete sequence	Melon yellow spot virus	331	331	100%	4e-86	98.92%	3257	MH734112.1
Melon yellow spot virus isolate GX nucleoprotein gene, complete cds	Melon yellow spot virus	331	331	100%	4e-86	98.92%	840	KX118633.1
Melon yellow spot virus isolate HNTG segment S, complete sequence	Melon yellow spot virus	331	331	100%	4e-86	98.92%	3278	OQ784919.1
Melon yellow spot virus isolate GZ nucleoprotein (N) gene, complete cds	Melon yellow spot virus	331	331	100%	4e-86	98.92%	840	HQ711861.1
Melon yellow spot virus isolate Sanya non-structural protein (NSs) and nucleoprotein (N) genes, complete cds	Melon yellow spot virus	331	331	100%	4e-86	98.92%	3257	GQ397254.2
Melon yellow spot virus strain Zhejiang segment S, complete sequence	Melon yellow spot virus	326	326	100%	2e-84	98.39%	3257	MN550996.1
Melon yellow spot virus isolate JN-Kar-Cucumber-21 segment S, complete sequence	Melon yellow spot virus	326	326	100%	2e-84	98.39%	3191	OQ559641.1

Hình 4. Kết quả so sánh trình tự đoạn gen khuếch đại với các trình tự gen *MYSV* được công bố trên ngân hàng Gen NCBI

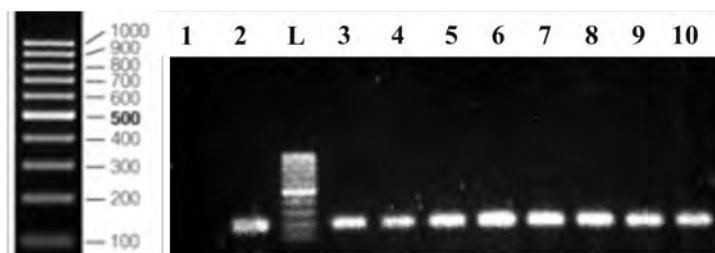
3.3. Tối ưu nhiệt độ bắt cặp mồi

Với 8 nhiệt độ bắt cặp mồi được thiết lập trong khoảng từ 51°C đến 65°C, phản ứng RT-PCR đều cho sản phẩm khuếch đại là một phân đoạn DNA ở

vị trí dưới vạch 200 bp của thang DNA, phù hợp với kích thước sản phẩm dự kiến là 186 bp. Trong đó, phản ứng có nhiệt độ bắt cặp mồi ở 57°C cho kết quả khuếch đại với một phân đoạn DNA có

hình ảnh rõ và sáng nhất và không có sản phẩm phụ kèm theo (Hình 5). Do đó, 57°C được chọn là

hiệu độ bắt cặp mồi phù hợp nhất cho phản ứng RT-PCR phát hiện virus.



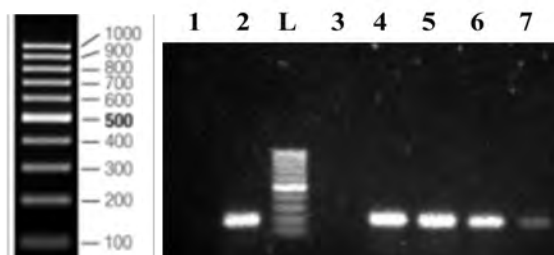
Hình 5. Kết quả điện di sản phẩm RT-PCR khuếch đại gen virus MYSV với cặp mồi MYSV-F/MYSV-R ở các nhiệt độ khác nhau

Ghi chú: L. Thang DNA, 1. Kiểm chứng âm PCR (không chứa DNA mẫu), 2. Kiểm chứng gen nội chuẩn (khuếch đại RNA của ty thể), 3. 51°C, 4. 53°C, 5. 55°C, 6. 57°C, 7. 59°C, 8. 61°C, 9. 63°C, 10. 65°C

3.4. Tối ưu nồng độ mồi

Phản ứng RT-PCR cho sản phẩm khuếch đại là một phân đoạn DNA ở vị trí dưới vạch 200 bp của thang DNA, phù hợp với kích thước sản phẩm dự kiến là 186 bp, từ nồng độ mồi 0.2 μ M

đến 0.5 μ M. Trong đó, băng DNA có độ sáng giảm dần từ 0.2 μ M đến 0.5 μ M, rõ nhất tại 0.2 μ M. Do đó, 0.2 μ M được chọn là nồng độ mồi phù hợp nhất cho phản ứng RT-PCR phát hiện virus (Hình 6).



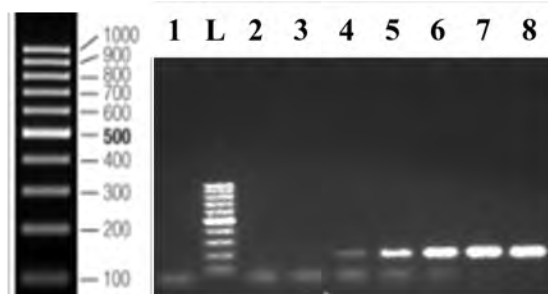
Hình 6. Kết quả điện di sản phẩm RT-PCR khuếch đại gen virus MYSV với cặp mồi MYSV-F/MYSV-R tại các nồng độ mồi khác nhau

Ghi chú: L. Thang DNA, 1. Kiểm chứng âm PCR (không chứa DNA mẫu), 2. Kiểm chứng gen nội chuẩn (khuếch đại RNA của ty thể), 3. 0.1 μ M, 4. 0.2 μ M, 5. 0.3 μ M, 6. 0.4 μ M, 7. 0.5 μ M.

3.5. Xác định giới hạn phát hiện LOD₉₅

Phản ứng với cặp mồi MYSV-F/MYSV-R trên 8 mẫu chuẩn có nồng độ virus thay đổi từ 10⁰ đến 10⁶ bản sao/ μ L chỉ cho sản phẩm khuếch đại đặc hiệu cho

MYSV (186 bp) ở các mẫu có nồng độ virus từ 10² đến 10⁶ bản sao/ μ L (Hình 7). Điều này cho thấy nồng độ virus thấp nhất mà phản ứng có thể phát hiện được trong trường hợp này là 10² bản sao/ μ L.



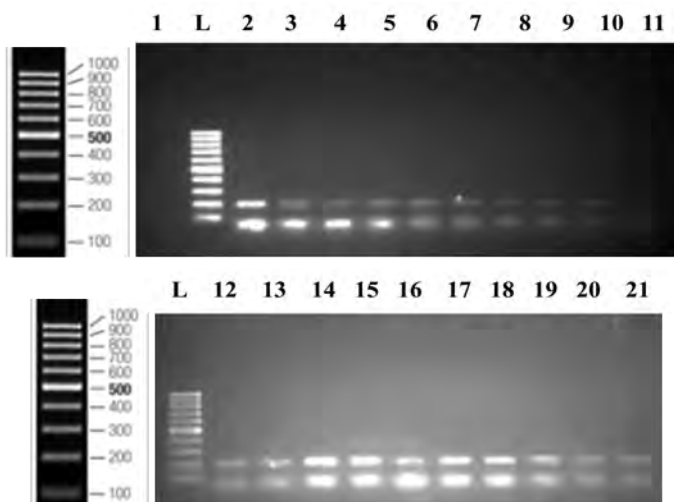
Hình 7. Kết quả điện di sản phẩm khuếch đại gen virus MYSV với cặp mồi MYSV-F/MYSV-R ở các nồng độ virus khác nhau

Ghi chú: L. Thang DNA, 1. Kiểm chứng âm PCR (không chứa DNA mẫu), 2. Mẫu chuẩn 10⁰ bản sao/ μ L, 3. Mẫu chuẩn 10¹ bản sao/ μ L, 4. Mẫu chuẩn 10² bản sao/ μ L, 5. Mẫu chuẩn 10³ bản sao/ μ L, 6. Mẫu chuẩn 10⁴ bản sao/ μ L, 7. Mẫu chuẩn 10⁵ bản sao/ μ L, 8. Mẫu chuẩn 10⁶ bản sao/ μ L

Kết quả phản ứng lặp lại 20 lần với mẫu có nồng độ virus 10^2 bản sao/ μ L cho thấy đã thu được sản phẩm đặc hiệu cho *MYSV* ở tất cả các lần

lặp lại (Hình 8).

Như vậy, LOD_{95} của phản ứng RT-PCR phát hiện *MYSV* đạt mức 10^2 bản sao/ μ L.



Hình 8. Kết quả điện di sản phẩm khuếch đại gen virus *MYSV* với cặp mồi *MYSV-F/MYSV-R* ở mẫu có nồng độ virus 10^2 bản sao/ μ L

Ghi chú: L. Thang DNA, 1. Kiểm chứng âm PCR (không chứa DNA mẫu), 2-21. 10^2 bản sao/ μ L

3.6. Thử nghiệm trên mẫu thực địa

Quy trình phát hiện virus *MYSV* bằng kỹ thuật RT-PCR đã được áp dụng để phát hiện *MYSV* trên mẫu

thu thập. Trong các mẫu dưa lưới thu thập tại TP. Hồ Chí Minh, 05 mẫu cho thấy có sự hiện diện của *MYSV* (Bảng 3).

Bảng 3. Kết quả RT-PCR phát hiện *MYSV* trên mẫu thu thập

STT	Mẫu	Kết quả*	Mẫu	Kết quả*
1	DL-01	ND	DL-06	POS
2	DL-02	ND	DL-07	POS
3	DL-03	ND	DL-08	POS
4	DL-04	ND	DL-09	POS
5	DL-05	ND	DL-10	POS

*: POS: Phát hiện *MYSV*, ND: Không phát hiện *MYSV*

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã xây dựng thành công quy trình phát hiện *Melon yellow spot virus* tại Việt Nam bằng kỹ thuật RT-PCR với độ nhạy cao (ngưỡng phát hiện 10^2 bản sao/ μ L). Quy trình này đã chứng minh tính hiệu quả khi áp dụng trên mẫu thực địa với việc xác định sự hiện diện của *MYSV* tại các vườn dưa lưới ở Thành phố Hồ Chí Minh. Do đó, quy trình RT-

PCR có tiềm năng ứng dụng trong giám sát dịch tễ học, giúp theo dõi sự lây lan của *MYSV*, đánh giá mức độ nhiễm bệnh tại các vùng trồng dưa lưới và hỗ trợ hoạch định chiến lược kiểm soát dịch bệnh hiệu quả. Tuy nhiên, để mở rộng phạm vi ứng dụng, cần nghiên cứu thêm về khả năng triển khai xét nghiệm RT-PCR tại các địa phương cũng như tối ưu hóa quy trình cho điều kiện thực địa.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] K. Kato, K. Handa, M. Kameya-Iwaki, "Melon yellow spot virus: a distinct species of the genus *Tospovirus* isolated from melon," *Phytopathology*, vol. 90, no. 4, pp. 422-426, 2000. DOI: 10.1094/PHYTO.2000.90.4.422.
- [2] S. Takeuchi, Y. Shimomoto, and K. Ishikawa,

"First report of *melon yellow spot virus* infecting balsam pear (*Momordica charantia* L.) in Japan," *J. Gen. Plant Pathol*, vol 75, no. 2, pp. 154-156, 2009. DOI: 10.1007/s10327-009-0143-7

- [3] S. Yamasaki, S. Okazaki, and M. Okuda,

"Temporal and spatial dispersal of *melon yellow spot virus* in cucumber greenhouses and evaluation of weeds as infection sources," *Eur. J. Plant Pathol.*, vol. 132, pp. 169-177, 2012. DOI: 10.1007/s10658-011-9860-9

[4] C. H. Chao, T. C. Chen, Y. C. Kang, J. T. Li, L. H. Huang, and S. D. Yeh, "Characterization of *Melon yellow spot virus* Infecting Cucumber (*Cucumis sativus* L.) in Taiwan," *Plant Pathol. Bull.*, vol. 19, no. 1, pp. 41-52, 2010. DOI: 10.5555/20113039960.

[5] T. C. Chen, Y. Y. Lu, Y. H. Cheng, C. A. Chang, S. D. Yeh, "*Melon yellow spot virus* in watermelon: a first record from Taiwan," *Plant Pathology*, vol. 57, no. 4, 2008. DOI: 10.1111/j.1365-3059.2007.01791.x.

[6] P. Chiemsombat, O. Gajanandana, N. Warin, R. Hongprayoon, A. Bhunchoth, and P. Pongsapich, "Biological and molecular characterization of *tospoviruses* in Thailand," *Arch. Virol.*, vol. 153, pp. 571-577, 2008. DOI: 10.1007/s00705-007-0024-3.

[7] Q. S. Gu, H. J. Wu, H. Y. Chen, X. J. Zhang, M. Z. Wu, D. M. Wang, and T. J. Liu, "*Melon yellow spot virus* identified in China for the first time," *New Disease Reports*, vol. 25, no. 7, pp. 2044-0588, 2012. DOI: 10.5197/j.2044-0588.2012.025.007.

[8] D. F. Quito-Avila, E. L. Peralta, R. R. Martin, M. A. Ibarra, R. A. Alvarez, A. Mendoza, J. Ochoa, "Detection

and occurrence of *melon yellow spot virus* in Ecuador: an emerging threat to cucurbit production in the region," *Eur. J. Plant Pathol.*, vol. 140, pp. 193-197, 2014. DOI: 10.1007/s10658-014-0454-1.

[9] H. Wu, M. Liu, W. Li, M. Wang, J. Xiu, B. Peng, and Q. Gu, "Development and application of droplet digital PCR assay for the detection of *Watermelon silver mottle virus* and *Melon yellow spot virus*," *Horticulturae*, vol. 10, no. 3, p. 199, 2024. DOI: 10.3390/horticulturae10030199.

[10] R. Zeng, L. H. Xu, S. G. Gao, X. H. Ni, C. L. Chen, J. C. Chen, and F. M. Dai, "One-step reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of *Melon yellow spot virus*," *Eur. J. Plant Pathol.*, vol. 145, pp. 119-124, 2016. DOI: 10.1007/s10658-015-0821-6.

[11] A. Kanapiya, U. Amanbayeva, Z. Tulegenova, A. Abash, S. Zhangazin, K. Dyussebayev, and G. Mukiyanova, "Recent advances and challenges in plant viral diagnostics," *Front. Plant Sci.*, vol. 15, p. 1451790, 2024. DOI: 10.3389/fpls.2024.1451790.

[12] A. Staroscik, "Calculator for determining the number of copies of a template" [Online]. Available: <http://cels.uri.edu/gsc/cndna.html>, Accessed: Jan. 26, 2018.

Detection of *Melon yellow spot virus* in Vietnam by RT-PCR

Huynh Nguyen Minh Nghia, Nguyen Thi Kim Thoa,
Pham Van Hieu, Dinh Thien Quan and Nguyen Xuan Dung

ABSTRACT

Melon yellow spot virus (MYSV) is a species of Tospovirus group that causes yellow spot disease in melon. It was first detected in Japan and is now recorded in many countries worldwide. Although there has been no official report on MYSV in Vietnam, typical disease symptoms have been observed on melon in several fields. This study established a detection method for MYSV in Vietnam using RT-PCR. Viral RNA was extracted from melon leaves and used as a template for RT-PCR to amplify the nucleocapsid protein gene segment using specific primers designed based on conserved sequence regions. The amplified gene sequence was cloned and sequenced. The optimal primer annealing temperature, primer concentration, and detection limit of the reaction were also determined. The results showed that the RT-PCR reaction successfully amplified a gene segment (186 bp), which is 98% homologous to published MYSV sequences. The appropriate annealing temperature and primer concentration were 57°C and 0,2 µM, respectively, and the detection limit was 10² copies/µL. Finally, testing on field samples showed the presence of MYSV in samples collected in Ho Chi Minh City.

Keywords: viral disease, melon, nucleocapsid protein gene, *Melon yellow spot virus*, RT-PCR

Received: 28/11/2024

Revised: 17/3/2025

Accepted for publication: 18/3/2025