

Sử dụng kỹ thuật RT-PCR phát hiện *Cucurbit aphid-borne yellows virus* gây bệnh trên dưa lưới (*Cucumis melo* L.)

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

TÓM TẮT

Cucurbit aphid-borne yellows virus (CABYV) là virus thuộc chi Polerovirus, được mô tả lần đầu tiên ở Pháp vào năm 1992 và đến nay đã được ghi nhận tại nhiều quốc gia trên thế giới. CABYV gây thiệt hại lớn về năng suất trên các cây thuộc họ bầu bí, bao gồm dưa lưới với tỷ lệ thiệt hại 10 - 15%. Bài báo này trình bày kết quả phát hiện CABYV trên dưa lưới thông qua việc khuếch đại phân đoạn gen protein vỏ của chúng bằng phản ứng RT-PCR. Hiệu quả phản ứng được tối ưu hóa với hai thông số nồng độ và nhiệt độ bắt cặp mồi. Độ tương đồng của phân đoạn gen khuếch đại được xác định bằng cách giải trình tự và so sánh với các trình tự gen đã được công bố trên ngân hàng gen. Phản ứng RT-PCR hoàn thiện đã được sử dụng để kiểm tra CABYV trong các mẫu dưa lưới thu thập tại Thành phố Hồ Chí Minh. Kết quả cho thấy đã thiết lập được phản ứng RT-PCR khuếch đại gen virus với nhiệt độ bắt cặp mồi: 57°C, nồng độ mồi: 0.2 μ M và ngưỡng phát hiện: 10^2 bản sao/ μ L. Phân đoạn gen thu được tương đồng 95.93 - 99.42% với các trình tự gen tương ứng của CABYV đã được công bố. Sự hiện diện của CABYV được ghi nhận ở 3 trong tổng số 20 mẫu dưa lưới thu thập.

Từ khóa: bệnh virus, *Cucurbit aphid-borne yellows virus*, dưa lưới, gen protein vỏ, RT-PCR

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Dưa lưới (*Cucumis melo* L.) là cây ăn quả có giá trị kinh tế cao [1 - 3] và hiện đang bị ảnh hưởng lớn về năng suất cũng như chất lượng bởi bệnh do virus gây ra [4 - 5]. CABYV (*Cucurbit aphid-borne yellows virus*) được xem là virus gây bệnh chủ yếu trong số các virus có khả năng lây nhiễm trên dưa lưới. Virus này gây ra các triệu chứng điển hình như lá hóa vàng, dày và giòn, xuất hiện đầu tiên trên lá già sau đó lan ra các lá còn lại [6]. Cho đến nay vẫn chưa có biện pháp điều trị đặc hiệu đối với bệnh do virus gây ra trên dưa lưới cũng như các loại cây trồng khác. Do đó, nghiên cứu phát hiện sớm và chính xác sự hiện diện của virus để phục vụ cho phòng ngừa và quản lý bệnh có ý nghĩa rất lớn đối với sản xuất. Mặt khác, các quy trình phát hiện virus chính xác và hiệu quả cũng sẽ góp phần nâng cao hiệu quả hoạt động kiểm dịch xuất nhập khẩu trên đối tượng cây trồng.

Thông thường để phát hiện virus có bộ gen RNA như CABYV, nhà nghiên cứu có thể sử dụng kỹ thuật ELISA hay RT-PCR. Tuy nhiên, do có độ nhạy

cao nên RT-PCR thường được sử dụng phổ biến hơn [7]. Kỹ thuật RT-PCR cũng đã được sử dụng cho nghiên cứu phát hiện CABYV trên nhiều loại cây trồng khác nhau ở một số nước trên thế giới [8 - 12]. Mặc dù vậy, việc nghiên cứu ứng dụng RT-PCR để phát hiện CABYV hiện vẫn chưa nhận được sự quan tâm đúng mức ở Việt Nam.

Nghiên cứu này được thực hiện nhằm thiết lập quy trình phát hiện CABYV trên dưa lưới bằng kỹ thuật RT-PCR phục vụ cho công tác kiểm soát và quản lý bệnh do virus gây ra trên dưa lưới tại Việt Nam.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Mẫu lá dưa lưới có biểu hiện triệu chứng nhiễm virus được thu thập ở một số vườn trồng dưa lưới tại Thành phố Hồ Chí Minh.

Chủng vi khuẩn *E. coli* DH5 α (được cung cấp bởi Phòng Công nghệ Sinh học Thực vật - Trung tâm Công nghệ Sinh học Thành phố Hồ Chí Minh).

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

Mỗi kiểm tra hiệu quả tạo dòng pJET1.2 (pJET1.2-F: 5'-CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC-3', mỗi ngược pJET1.2-R: 5'-AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG-3') và kiểm chứng PCR NAD5 (NAD5-F: 5'-GATGCTTCTTGGGGCTTCTTGTT-3', NAD5-R: 5'-CTCCAGTCACCAACATTGGCATAA-3') [13].

Trình tự gen mã hóa cho protein vỏ (CP) của CABYV sử dụng cho thiết kế mồi: EU636992.1, EF063706.1, EF063707.1, EU244327.1, EU244326.1, EU244325.1, EU244324.1, EU244323.1, EU244322.1, EU244321.1, EU244320.1, EU244319.1, EU244318.1, EU244317.1, EU244316.1, EU244315.1, EU091148.1, FJ460216.1, FJ460214.1, FJ425880.1, EF488997.1, EF488996.1, HQ439023.1, GQ221223.1, EU000535.1, EU262631.1, EU262630.1, EU262629.1, EU262627.1, EU262626.1, EU262625.1, EU262624.1, EU262623.1, MW002437.1, MW752438.1, MT943520.1, GQ221224.1, FJ425879.1, GU324104.1, GU324103.1, GU324102.1, GU324101.1, GU324100.1, GU324099.1, GU324098.1, GU324097.1, GU324096.1, GU324095.1, HQ700824.1, HQ700823.1, KF427707.1, KF427706.1, KF427705.1, KF427704.1.

2.2. Phương pháp

2.2.1. Thiết kế mồi

Chọn lọc vùng bảo tồn của gen mã hóa cho protein

vỏ virus dựa vào các trình tự đã công bố trên ngân hàng gen NCBI bằng chương trình Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/msa/clustalo>) và tiến hành thiết kế mồi với Primer 3 (<https://primer3.ut.ee/>). Độ đặc hiệu của mồi được kiểm tra bằng chương trình FAST PCR (<https://primerdigital.com/fastpcr.html>) và Primer Blast (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?GROUP_TARGET=on).

2.2.2. Thu thập nguồn mẫu nhiễm virus

Mẫu lá dưa lưới có triệu chứng nhiễm CABYV (úa vàng, dày và giòn) được thu thập, rửa sạch bằng nước và bảo quản ở nhiệt độ -80°C để sử dụng cho tách chiết RNA.

2.2.3. Tách chiết RNA và thiết lập phản ứng RT-PCR

Tách chiết RNA tổng số từ mẫu lá thu thập bằng bộ kit GeneJET Plant RNA Purification Mini Kit (Thermo Fisher Scientific) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Thiết lập phản ứng RT-PCR khuếch đại đoạn gen CP từ RNA tách chiết bằng cặp mồi đã thiết kế. Thành phần phản ứng và chương trình nhiệt (Bảng 1, 2) được tính toán phù hợp để phản ứng có thể thực hiện việc tổng hợp cDNA và khuếch đại trong một bước duy nhất. Sản phẩm phản ứng được điện di (sử dụng gel agarose 1.5%, thời gian 30 phút, hiệu điện thế 100V) và nhuộm với Ethidium Bromide trước khi đọc kết quả trên máy chụp gel (Geldoc-It).

Bảng 1. Thành phần phản ứng RT-PCR với cặp mồi đã thiết kế

Thành phần hóa chất	Nồng độ	Thể tích (μL)
Nước		10.10
DreamTaq Green PCR Master Mix (2X)	1 X	12.50
Ribolock RNase Inhibitor (40 U/μL)	6 U	0.15
RevertAid Reverse Transcriptase (200 U/μL)	50 U	0.25
Mồi xuôi, 10 μM	0.2 μM	0.50
Mồi ngược, 10 μM	0.2 μM	0.50
RNA mẫu/đối chứng (100 ng/μL)		1.00
Tổng		25

Bảng 2. Chương trình nhiệt cho phản ứng RT-PCR với cặp mồi đã thiết kế

Nội dung	Số chu kỳ	Nhiệt độ/ thời gian
Tạo cDNA	1	50°C/ 15 phút
Biến tính	1	95°C/ 10 phút
Bắt cặp	40	95°C/ 30 giây T _a / 30 giây

Nội dung	Số chu kỳ	Nhiệt độ/ thời gian
Bắt cặp	40	72°C/ 30 giây
Kéo dài	1	72°C/ 10 phút

* T_a : nhiệt độ bắt cặp mỗi được thiết lập ở mức thấp hơn nhiệt độ nóng chảy của mỗi (60°C) 3°C

2.2.4. Tạo dòng và kiểm tra trình tự gen

Phân đoạn gen mục tiêu được dòng hóa vào vi khuẩn *E. coli* DH5α thông qua vector pJET 1.2. Theo đó, gen được gắn vào vector bằng Kit CloneJET PCR Cloning (Thermo Fisher Scientific) và chuyển vào vi khuẩn bằng phương pháp hóa biến nạp. Vi khuẩn sau biến nạp được kiểm tra thông qua nuôi cấy sàng lọc (môi trường thạch LB bổ sung 100 mg/L ampicillin, nhiệt độ 37°C, thời gian 24 giờ) và khuếch đại vùng mang gen trên vector pJET 1.2 bằng phản ứng PCR (sử dụng mẫu khuẩn lạc và mồi pJET 1.2). Các dòng vi khuẩn sống sót sau sàng lọc và cho kết quả dương tính với PCR khuẩn lạc sẽ được tách DNA plasmid (sử dụng Kit GeneJET Plasmid Miniprep (Thermo Fisher Scientific) và gửi mẫu giải trình tự vùng mang gen (sử dụng mồi pJET 1.2) tại công ty TNHH DNA sequencing. Mức độ tương đồng của trình tự gen thu được với các trình tự đã công bố được phân tích bằng công cụ BLAST trên NCBI (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome).

2.2.5. Tối ưu hóa phản ứng RT-PCR

Việc tối ưu hóa được thực hiện dựa trên sự thay đổi hai yếu tố nhiệt độ bắt cặp mồi và nồng độ mồi của phản ứng RT-PCR đã thiết lập trước đó (mục 2.2.3). Trong đó, nhiệt độ bắt cặp mồi được khảo sát ở 8 điểm từ 55 - 62°C thông qua chương trình gradient nhiệt trên máy PCR và nồng độ mồi được khảo sát ở 5 mức từ 0.1 - 0.5 μM. Thí nghiệm được lặp lại ít nhất 03 lần. Nhiệt độ bắt cặp và nồng độ mồi tối ưu được xác định khi phản ứng tạo ra sản phẩm khuếch đại duy nhất và có độ sáng rõ nhất trên gel điện di.

2.2.6. Xác định ngưỡng phát hiện của phản ứng (LOD)

Ngưỡng phát hiện được xác định dựa vào mẫu chuẩn (DNA plasmid mang gen mục tiêu) có số bản sao được tính theo công thức [14]:

$$\text{Số bản sao gen} = \frac{\text{Khối lượng DNA} \times 6,022 \times 10^{23}}{\text{Chiều dài đoạn gen} \times 1 \times 10^9 \times 650}$$

Trong đó: Khối lượng DNA được tính theo đơn vị ng và chiều dài đoạn gen được tính theo bp.

Từ nồng độ ban đầu, mẫu chuẩn được pha loãng thành các nồng độ 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 , 10^0 bản sao/μL để sử dụng cho phản ứng xác định LOD. Thực hiện phản ứng với mẫu chuẩn ở các nồng độ đã pha loãng và xác định nồng độ thấp nhất mà phản ứng có thể phát hiện được. Lặp lại phản ứng 20 lần với mẫu chuẩn ở nồng độ vừa xác định được. Nếu phản ứng cho kết quả dương tính ≥ 19 lần, mức nồng độ này chính là LOD của phản ứng. Nếu kết quả dương tính nhỏ hơn 19 lần, lặp lại thí nghiệm với mẫu chuẩn có nồng độ cao hơn liền kề với nồng độ của mẫu vừa thực hiện để xác định lại LOD.

2.2.7. Kiểm tra CABYV trong mẫu thu thập

Thu thập mẫu lá dưa lưới tại các vườn trồng dưa lưới và tiến hành kiểm tra tình trạng nhiễm CABYV bằng phản ứng RT-PCR đã được thiết lập thành công. Kết quả kiểm tra được lặp lại 03 lần trên cùng một mẫu để đảm bảo tính chính xác.

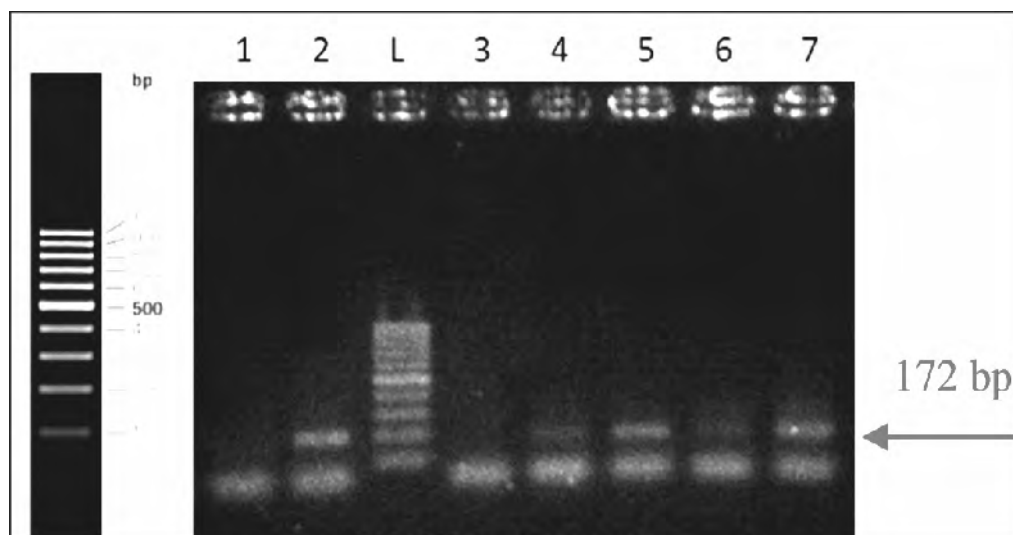
3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Thiết kế mồi

Sau khi phân tích chọn vùng bảo tồn và thiết kế, kiểm tra tính đặc hiệu, cặp mồi có trình tự xuôi CABYV-F: 5'- CGGTCGCGGTTAGAAATCAA' và ngược CABYV-R: 5' CCTCTAGCTCTGCCTCCTCT -3' và kích thước sản phẩm khuếch đại là 172 bp đã được chọn để thiết lập phản ứng RT-PCR.

3.2. Thiết lập phản ứng RT-PCR

Kết quả điện di sản phẩm RT-PCR cho thấy phản ứng đã thu được băng DNA với kích thước nằm trong khoảng 100 - 200 bp, phù hợp với kích thước sản phẩm thiết kế mồi (172 bp) (Hình 1). Điều này bước đầu chứng minh rằng phân đoạn gen của mục tiêu đã được khuếch đại thành công. Tuy nhiên, trình tự đoạn gen mục tiêu này vẫn chưa được chắc chắn đúng là trình tự gen của virus, vì mồi có thể khuếch đại một trình tự RNA khác ngoài RNA virus. Do đó cần thực hiện việc dòng hóa và giải trình tự để xác định chính xác đây là phân đoạn gen của virus.



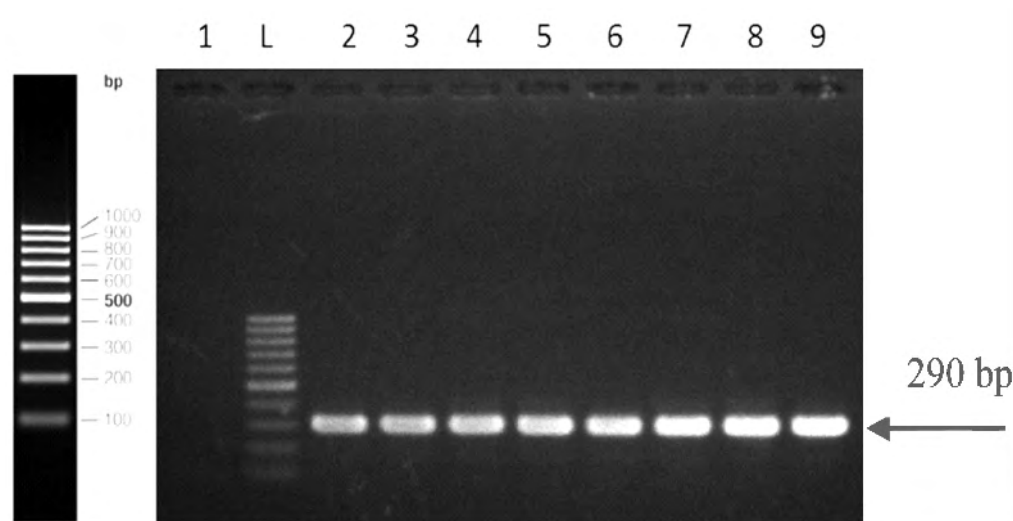
Hình 1. Kết quả khuếch đại đoạn gen virus CABYV bằng phản ứng RT-PCR

Ghi chú: 1: Chứng âm, 2: Kiểm chứng PCR (gen Nad5 ở thực vật, 181 bp), L: Thang DNA; 3 - 7: RNA ly trích từ lá dừa lười

3.3. Tạo dòng và kiểm tra trình tự gen

Sau 24 giờ nuôi cấy, các vi khuẩn mang gen mục tiêu phát triển và tạo khuẩn lạc trên môi trường thạch LB bổ sung 100 mg/L ampicillin. Điều này cho thấy quá trình biến nạp đã thành công. Tuy nhiên, các khuẩn lạc cần được kiểm tra bằng phản ứng PCR với cặp mồi pJET 1.2 để khẳng định chính xác đoạn gen gắn

vào vector là đoạn gen mục tiêu. Kết quả điện di sản phẩm PCR ghi nhận có sự xuất hiện băng DNA có kích thước (290 bp) phù hợp với kích thước theo tính toán (bao gồm 172 bp đoạn gen mục tiêu và 118 bp đoạn gen trên vector). Điều này xác nhận rằng đoạn gen mục tiêu đã được chèn thành công vào vector và chuyển vào các dòng vi khuẩn (Hình 2).

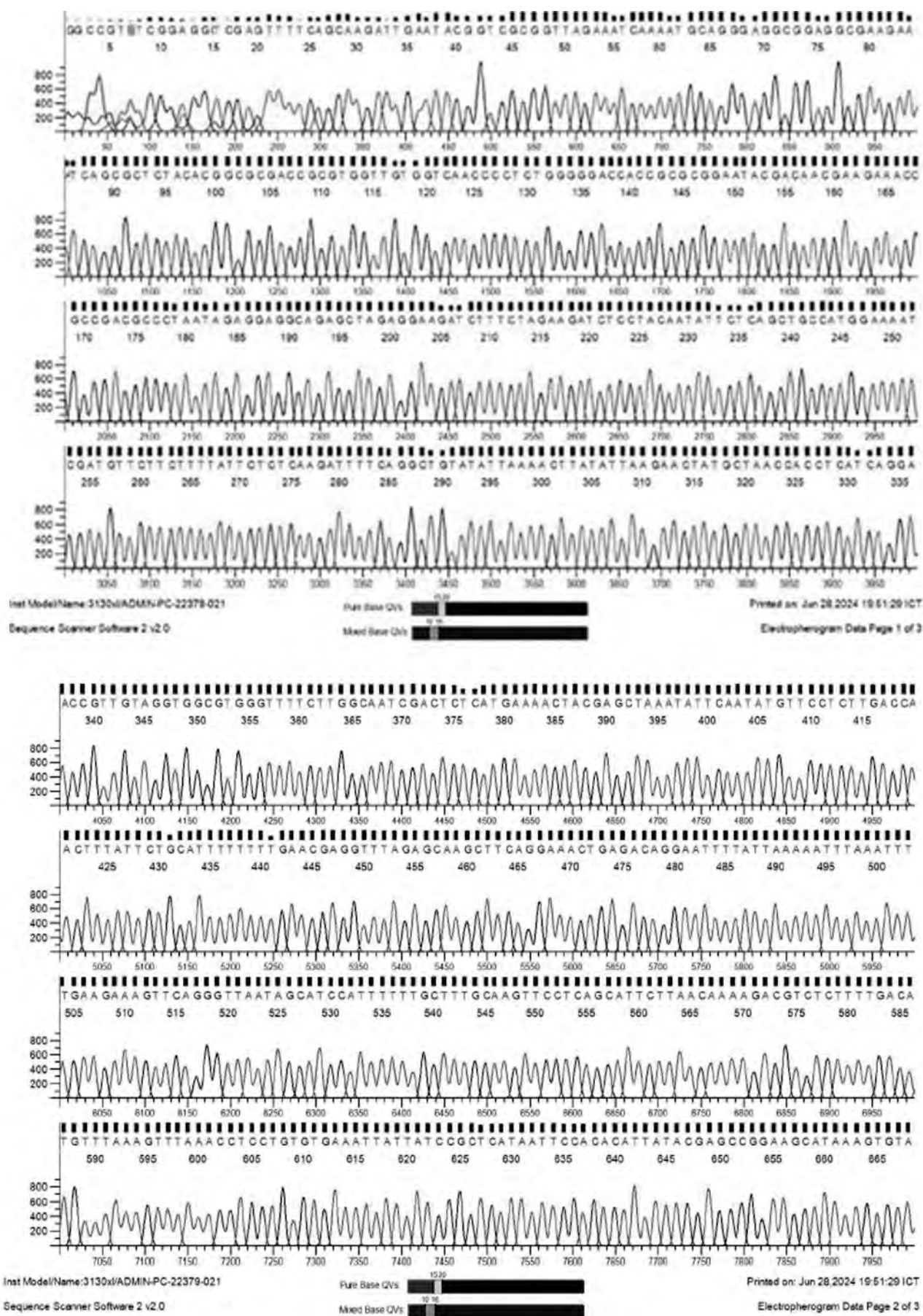


Hình 2. Kết quả kiểm tra trình tự gen mục tiêu trên các khuẩn lạc bằng cặp mồi pJET1.2

Ghi chú: 1: Chứng âm, L: Thang DNA, 2-9: Các khuẩn lạc phát triển trên môi trường nuôi cấy

Đoạn gen được dòng hóa vào vi khuẩn đã được giải trình tự (Hình 3) và sau đó so sánh với các trình tự của CABYV đã được công bố trên ngân hàng gen NCBI. Kết quả cho thấy có sự tương đồng của trình

tự khuếch đại với các trình tự của virus CABYV ở mức 95.93 - 99.42% (Hình 4). Điều này cho thấy đoạn gen được khuếch đại là đoạn trình tự mã hóa cho protein vỏ của CABYV.



Hình 3. Kết quả giải trình tự đoạn gen khuếch đại được của *CABYV*

select all 100 sequences selected		GenBank	Graphics	Distance tree of results			MSA Viewer		
	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
✓	Cucurbit aphid-borne yellows virus isolate Yunnan RdRp and coat protein genes, partial cds	Cucurbit aphid-b...	313	313	100%	2e-81	99.42%	1360	EF488997.1
✓	Cucurbit aphid-borne yellows virus isolate C:TH25 RdRp protein (RdRp), coat protein (CP), and movement protei...	Cucurbit aphid-b...	307	307	100%	1e-79	98.84%	1361	KF427704.1
✓	Cucurbit aphid-borne yellows virus isolate CABYV-C:TH53 RdRp protein (RdRp) gene, partial cds, and coat prote...	Cucurbit aphid-b...	307	307	100%	1e-79	98.84%	1400	KF815688.1
✓	Cucurbit aphid-borne yellows virus isolate CABYV-C:TH263 RdRp protein (RdRp) gene, partial cds, and coat prot...	Cucurbit aphid-b...	307	307	100%	1e-79	98.84%	1403	KF815687.1
✓	Cucurbit aphid-borne yellows virus isolate CABYV-C:TH235 RdRp protein (RdRp) gene, partial cds, and coat prot...	Cucurbit aphid-b...	307	307	100%	1e-79	98.84%	1403	KF815683.1
✓	Cucurbit aphid-borne yellows virus isolate CABYV-C:TH207 RdRp protein (RdRp) gene, partial cds, and coat prot...	Cucurbit aphid-b...	307	307	100%	1e-79	98.84%	1403	KF815682.1
✓	Cucurbit aphid-borne yellows virus isolate CABYV-C:TH99 RdRp protein (RdRp) gene, partial cds, and coat prote...	Cucurbit aphid-b...	307	307	100%	1e-79	98.84%	1403	KF815681.1
✓	Cucurbit aphid-borne yellows virus pM071015-3 RdRp (RdRp) and coat protein (CP) genes, partial cds	Cucurbit aphid-b...	307	307	100%	1e-79	98.84%	1360	EU244327.1
✓	Cucurbit aphid-borne yellows virus isolate SGR01, partial genome	Cucurbit aphid-b...	302	302	100%	5e-78	98.26%	683	MN275836.1
✓	Cucurbit aphid-borne yellows virus isolate 20180707-6-3 RdRp (RdRp) gene, partial cds, protein 3a (ORF3a) gen...	Cucurbit aphid-b...	302	302	100%	5e-78	98.26%	1108	MN654407.1
✓	Cucurbit aphid-borne yellows virus isolate 20180623-5-3 RdRp (RdRp) gene, partial cds, protein 3a (ORF3a) gen...	Cucurbit aphid-b...	302	302	100%	5e-78	98.26%	1108	MN654404.1
✓	Cucurbit aphid-borne yellows virus isolate CABYV-C:TH228 RdRp protein (RdRp) gene, partial cds, and coat prot...	Cucurbit aphid-b...	302	302	100%	5e-78	98.26%	1403	KF815686.1
✓	Cucurbit aphid-borne yellows virus isolate AZ15-09 RNA-dependent RNA polymerase, capsid protein, and move...	Cucurbit aphid-b...	291	291	100%	1e-74	97.09%	1026	MG964108.1
✓	Cucurbit aphid-borne yellows virus isolate AZ14-42 RNA-dependent RNA polymerase, capsid protein, and move...	Cucurbit aphid-b...	291	291	100%	1e-74	97.09%	1026	MG964097.1
✓	Cucurbit aphid-borne yellows virus isolate C-AS1, complete genome	Cucurbit aphid-b...	291	291	100%	1e-74	97.09%	5683	MG257899.1

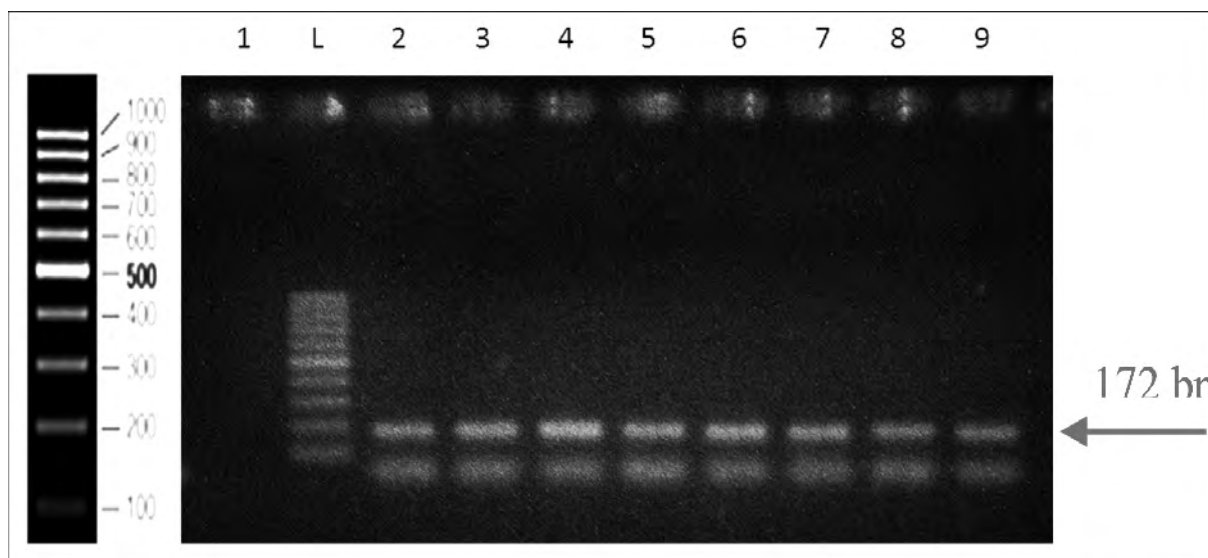
Hình 4. Kết quả trình tự đoạn gen khuếch đại được so sánh với các trình tự gen CABYV đã công bố trên ngân hàng gen NCBI

3.4. Tối ưu hóa phản ứng phát hiện virus

3.4.1. Tối ưu hóa nhiệt độ bắt cặp mồi

Với 8 nhiệt độ bắt cặp mồi được thiết lập trong khoảng từ 55°C đến 62°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 172 bp ở tất cả các nhiệt độ. Tuy nhiên, độ sáng của băng DNA tăng dần theo nhiệt độ, đạt cao nhất ở 57°C, sau đó giảm xuống và đạt mức thấp nhất ở 62°C (Hình 5). Do đó, 57°C được chọn là nhiệt độ bắt cặp mồi phù hợp nhất cho phản ứng RT-PCR phát hiện virus.

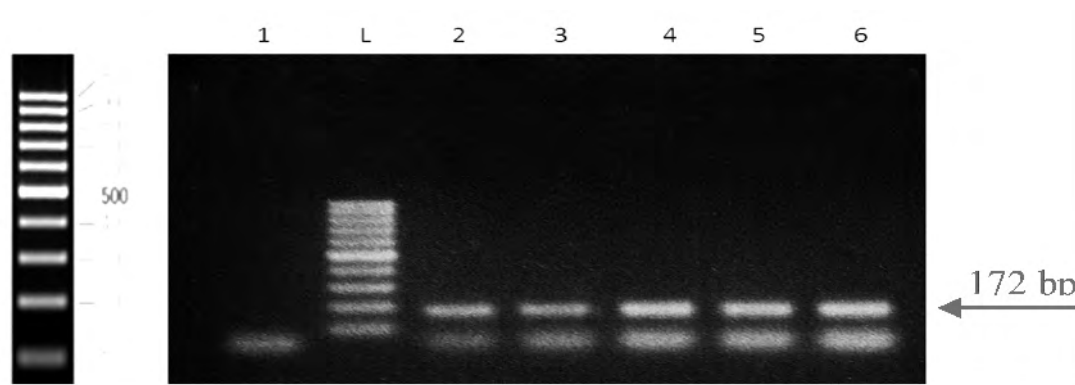


Hình 5. Kết quả điện di sản phẩm RT-PCR khuếch đại gen virus CABYV với cặp mồi CABYV-F/CABYV-R ở các nhiệt độ khác nhau

Ghi chú: 1. Chứng âm, L. Thang DNA, 2. 55°C, 3. 56°C, 4. 57°C, 5. 58°C, 6. 59°C, 7. 60°C, 8. 61°C, 9. 62°C

3.4.2. Tối ưu hóa 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 172 bp ở tất cả các nồng độ mồi từ nồng độ 0.1 μ M đến 0.5 μ M. Trong đó, băng DNA có độ sáng rõ nhất ở nồng độ 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).



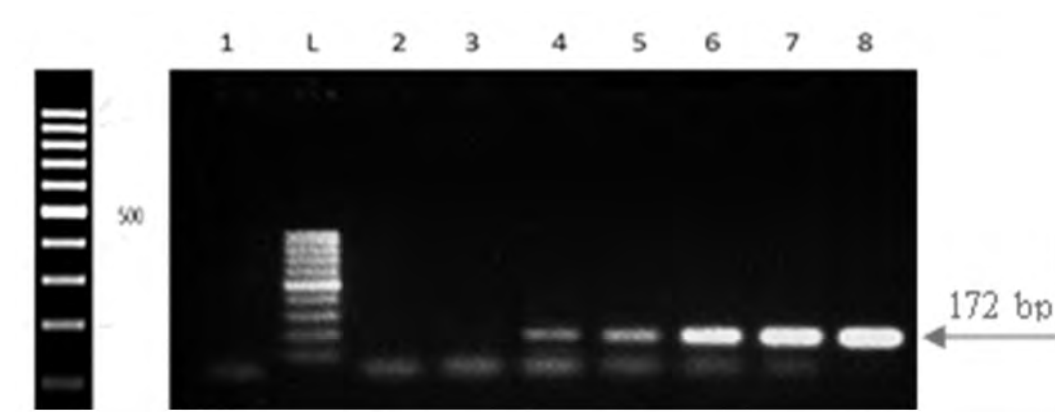
Hình 6. Kết quả điện di sản phẩm RT-PCR khuếch đại gen virus CABYV với cặp mồi CABYV-F/CABYV-R tại các nồng độ mồi khác nhau

Ghi chú: 1. Chứng âm, L. Thang DNA, 2. Nồng độ 0.1 μM, 3. Nồng độ 0.2 μM, 4. Nồng độ 0.3 μM, 5. Nồng độ 0.4 μM, 6. Nồng độ 0.5 μM

3.5. Xác định giới hạn phát hiện của phản ứng (LOD)

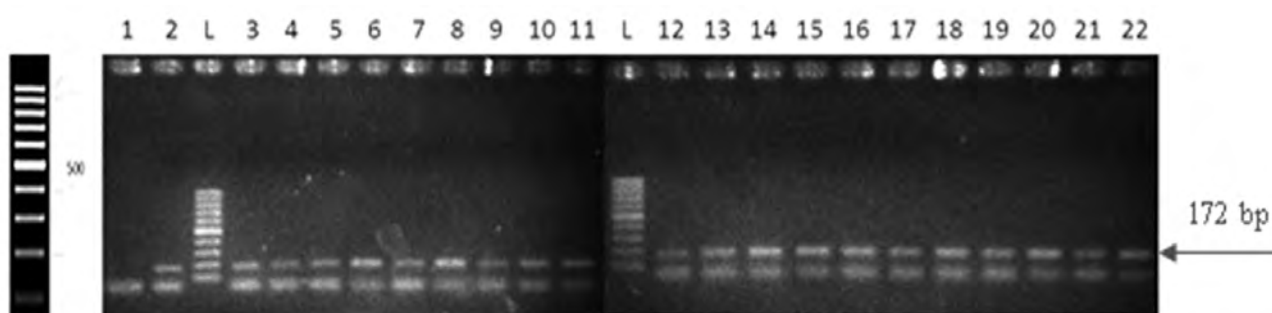
Kết quả thực hiện phản ứng với 7 mẫu chuẩn có nồng độ virus thay đổi từ 10^0 đến 10^6 bản sao/μL cho thấy chỉ thu được sản phẩm khuếch đại đặc

hiệu cho CABYV (172 bp) ở các mẫu có nồng độ từ 10^2 đến 10^6 bản sao/μL (Hình 7). Điều này cho thấy nồng độ thấp nhất mà phản ứng có thể phát hiện được là 10^2 bản sao/μL.



Hình 7. Kết quả điện di sản phẩm PCR xác định ngưỡng phát hiện của phản ứng với cặp mồi CABYV-F/CABYV-R

Ghi chú: 1: Chứng âm, L: Thang DNA, 2 - 8: 10^0 - 10^6



Hình 8. Kết quả điện di sản phẩm PCR khẳng định ngưỡng phát hiện của phản ứng với cặp mồi CABYV-F/CABYV-R

Ghi chú: 1: Chứng âm, 2: Chứng dương, L: Thang DNA, 3 - 22: Mẫu chuẩn nồng độ 10^2

Dựa vào kết quả trên, phản ứng PCR đã được lặp lại 20 lần với mẫu chuẩn có nồng độ 10^2 bản sao/μL và kết quả cho thấy đã thu được sản phẩm đặc hiệu

cho CABYV ở tất cả các lần lặp lại (Hình 8). Như vậy, ngưỡng phát hiện của phản ứng trong trường hợp này được xác định là 10^2 bản sao/μL.

3.6. Kiểm tra *CABYV* trong mẫu thu thập

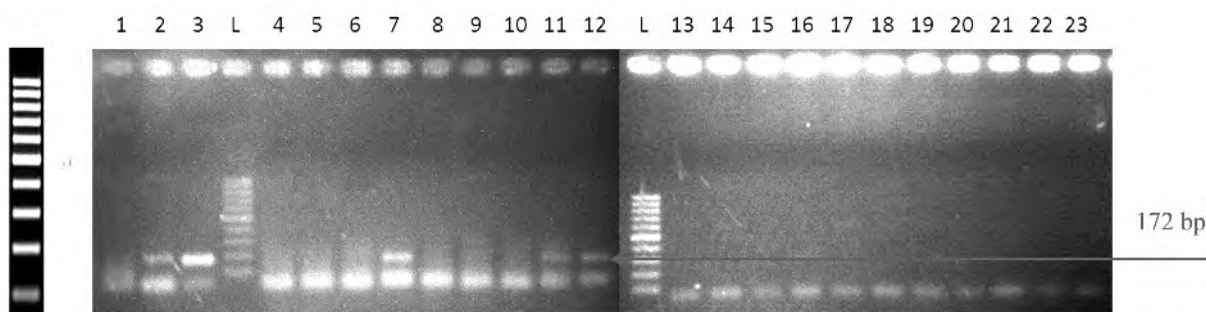
Sự hiện diện của *CABYV* được ghi nhận ở 03 mẫu trong tổng số 10 mẫu dưa lưới (thu thập tại vườn trồng dưa lưới tại Thành phố Hồ Chí Minh) khi tiến hành kiểm tra

bằng phản ứng RT-PCR đã được thiết lập và tối ưu hóa trong nghiên cứu này (Bảng 3, Hình 9). Kết quả này chứng minh tính hiệu quả và khả năng ứng dụng thực tế của việc phát hiện virus bằng RT-PCR.

Bảng 3. Kết quả kiểm tra sự hiện diện của *CABYV* trong các mẫu thu thập

STT	Ký hiệu mẫu	Sự hiện diện của <i>CABYV</i>	STT	Ký hiệu mẫu	Sự hiện diện của <i>CABYV</i>
1	DL-01	-	11	DL-11	-
2	DL-02	-	12	DL-12	-
3	DL-03	-	13	DL-13	-
4	DL-04	+	14	DL-14	-
5	DL-05	-	15	DL-15	-
6	DL-06	-	16	DL-16	-
7	DL-07	-	17	DL-17	-
8	DL-08	+	18	DL-18	-
9	DL-09	+	19	DL-19	-
10	DL-10	-	20	DL-20	-

Ghi chú: (-): Không có sự hiện diện virus *CABYV*, (+): Có sự hiện diện virus *CABYV*



Hình 9. Kết quả điện di sản phẩm RT-PCR khuếch đại gen virus *CABYV* trên các mẫu dưa lưới thu thập tại Thành phố Hồ Chí Minh với cặp mồi *CABYV-F/CABYV-R*

Ghi chú: 1: Chứng âm; 2: Kiểm chứng PCR (gen *Nad5* ở thực vật, 181 bp); L: Thang DNA; 3: Chứng dương; 4-23: RNA ly trích từ 20 mẫu lá dưa lưới

4. KẾT LUẬN

Đã thiết lập thành công quy trình RT-PCR phát hiện *CABYV* gây bệnh trên dưa lưới với ngưỡng phát hiện 10^2 bản sao/ μ L. Khả năng ứng dụng của quy trình đã

được chứng minh thông qua việc kiểm tra và ghi nhận có sự hiện diện của *CABYV* trong 3 trên tổng số 20 mẫu dưa lưới thu thập tại Thành phố Hồ Chí Minh. Kết quả này cho thấy có sự hiện diện của virus này tại Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] Tripathi, S., Verma, A., Kushwah, S. S., & Verma, R., "First report of cucurbit aphid-borne yellows virus infecting muskmelon (*Cucumis melo*) in India", *Journal of Plant Pathology*, 105(1), 383-383, 2023.

[2] Chikh-Rouhou, H., Abdedayem, W., Solmaz, I.,

Sari, N., & Garcés-Claver, A., "Melon (*Cucumis melo* L.): Genomics and breeding", *In Smart Plant Breeding for Vegetable Crops in Post-genomics Era*, 25-52, 2023.

[3] Ali S., Rahman A.U., Ali E., Karabulut F., Ali S., Ahmad R., Fadl M.E., AbdelRahman M.A.,

Ahmed M.A., Scopa A., "Insights on the Nutritional Profiling of Cantaloupe (*Cucumis melo* L.) via 1-Naphthalene Acetic Acid", *Plants*, 12(16), 2969, 2023.

[4] Zhan, B., Cao, M., Wang, K., Wang, X., & Zhou, X., "Detection and characterization of *cucumis melo* cryptic virus, *cucumis melo* amalgavirus 1, and melon necrotic spot virus in *Cucumis melo*", *Viruses*, 11(1), 81, 2019.

[5] Dhami, D. S., Kaur, S., Sharma, A., Sharma, S. P., Dhillon, N. K., & Jain, S., "Characterization of multiple disease resistance in melons (*Cucumis melo* L.) against *Meloidogyne incognita*, *Fusarium oxysporum* and tomato leaf curl Palampur virus", *Plant Genetic Resources*, 22(1), 27-36, 2024.

[6] Lecoq, H., Desbiez, C., "Viruses of cucurbit crops in the Mediterranean region: an ever-changing picture", *Advances in virus research*, 84, 67-126, 2012.

[7] Jeong, J. J., Ju, H. J., & Noh, J., "A review of detection methods for the plant viruses", *Research in Plant Disease*, 20(3), 173-181, 2014.

[8] Listihani, L., Damayanti, T. A., Hidayat, S. H., & Wiyono, S., "First report of cucurbit aphid-borne yellows virus on cucumber in Java, Indonesia", *Journal of general plant pathology*, 86, 219-223, 2020.

[9] Choi, S. K., Yoon, J. Y., Choi, G. S., "Biological and molecular characterization of a Korean isolate of Cucurbit aphid-borne yellows virus infecting *cucumis* species in Korea", *The plant pathology journal*, 31(4), 371, 2015.

[10] Bae, M., Park, M. R., "First report of cucurbit aphid-borne yellows virus causing yellow spots in *Momordica charantia* in Korea", *Journal of Plant Pathology*, 105(1), 347-347, 2023.

[11] Kumar, A., Bhattarai, A., Rathore, A.S., Jat, G.S., Behera, T. K., Renukadevi, P., Baranwal, V.K., Jain, R.K., Basavaraj, Y.B., "Association of cucurbit aphid-borne yellows virus with cucumber plants in India", *VirusDis*, 32(1), 183–185, 2021.

[12] Topkaya, S., & Desbiez, C., "Molecular characterization of Cucurbit aphid-borne yellows virus (CABYV) affecting cucurbits in Turkey", *Zemdirbyste-Agriculture*, 107(4), 2020.

[13] Menzel W, Wilhelm J, Maiß E., "Detection of four apple viruses by multiplex RT-PCR assays with coamplification of plant mRNA as internal control", *Journal of Virological Methods*, 99(1-2):81-92, 2002.

[14] A. Staroscik, "Calculator for determining the number of copies of a template". URI Genomics & Sequencing Center, accessed 26 January 2018. Available from: <http://cels.uri.edu/gsc/cndna.html>.

Using RT-PCR to detect *Cucurbit aphid-borne yellows virus* affecting melon (*Cucumis melo* L.)

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

ABSTRACT

CABYV (*Cucurbit aphid-borne yellows virus*), a virus from the *polerovirus* genus, was first described in France in 1992 and has been reported in various countries worldwide [1 - 5]. This virus causes significant yield losses in cucurbit crops, including melon, with a yield reduction of 10 - 15% [1]. This study presents the results of CABYV detection in melons by amplifying the coat protein gene fragment using RT-PCR. The reaction efficiency was enhanced through the optimization of two parameters: primer concentration and annealing temperature. The homology of the amplified gene segment was determined by sequencing and aligning with published sequences in GenBank. The complete RT-PCR reaction was used to test for CABYV in collected melon samples in Ho Chi Minh City. The results showed that the RT-PCR reaction amplifying the virus gene was established with a primer annealing temperature of 57°C, primer concentration of 0.2 µM,

and detection threshold of 10^2 copies/ μ L. The gene segment obtained was homologous to the CABYV-published sequences at a score of between 95.93% and 99.42%. The presence of CABYV was found in three of the 20 melon samples that were collected.

Keywords: *viral disease, Cucurbit aphid-borne yellows virus, melon, coat protein gene, RT-PCR*

Received: 28/11/2024

Revised: 18/3/2025

Accepted for publication: 25/4/2025