

## PHÁT HIỆN *Tomato yellow leaf curl Kanchanaburi virus* GÂY HẠI TRÊN CÂY CÀ CHUA BẰNG REAL-TIME PCR

Huỳnh Nguyễn Minh Nghĩa, Nguyễn Vinh, Dương Hoa Xô, Nguyễn Xuân Dũng\*

Trung tâm Công nghệ Sinh học Thành phố Hồ Chí Minh

### TÓM TẮT

*Tomato yellow leaf curl Kanchanaburi virus* (TYLCKaV) là virus gây bệnh vàng xoắn lá hiện đang ảnh hưởng nghiêm trọng đến năng suất và chất lượng cà chua ở Việt Nam. Việc phát hiện sớm và chính xác sự hiện diện của TYLCKaV trên cà chua để phục vụ cho công tác kiểm soát bệnh hiện đang là vấn đề cấp thiết. Nghiên cứu này thiết lập quy trình phát hiện và định lượng TYLCKaV dựa trên phương pháp Real-time PCR. Theo đó, DNA virus được ly trích từ mẫu nhiễm bệnh và khuếch đại bằng phản ứng PCR với cặp mồi được thiết kế để khuếch đại một phân đoạn gen có kích thước 165 bp của vùng gen mã hóa protein vỏ. Trình tự đoạn gen khuếch đại được dòng hóa và giải trình tự để kiểm tra độ đặc hiệu của phản ứng khuếch đại trước khi thiết lập phản ứng Real-time PCR. Quy trình Real-time PCR đã được sử dụng để định lượng virus trong các mẫu cà chua thu thập. Kết quả cho thấy đã khuếch đại được phân đoạn gen của virus với trình tự tương đồng 89% so với các trình tự đã được công bố trên Ngân hàng gene NCBI. Phản ứng Real-time PCR được thiết lập thành công với phương trình đường chuẩn  $y = 3,404x + 36,401$ , hệ số tương quan  $R^2 = 0,9975$ . Ngưỡng phát hiện và giới hạn định lượng của phản ứng đạt mức tương ứng 10 bản sao/ $\mu\text{L}$  và 100 bản sao/ $\mu\text{L}$ . Số lượng virus trong các mẫu kiểm tra dao động từ  $1,02 \times 10^3$  đến  $2,73 \times 10^8$  số bản sao/ $\mu\text{L}$ .

*Từ khóa:* Bệnh virus, gen protein vỏ, *Solanum lycopersicum*, *Tomato yellow leaf curl Kanchanaburi virus*, Real-time PCR.

### MỞ ĐẦU

Cà chua (*Solanum lycopersicum* L.) là một loại cây trồng có giá trị kinh tế hiện đang trồng phổ biến tại Việt Nam. Diện tích trồng cà chua hằng năm đạt 15.000 - 17.000 ha với năng suất ước tính khoảng 15 - 17 tấn/ha và hơn 30 tấn/ha đối với một số vùng chuyên canh (Tuan, Mao, 2015). Tuy nhiên, cà chua lại khá nhạy cảm với các loại bệnh do nấm, vi khuẩn và virus gây ra (Jolly, 2016). Trong đó, bệnh vàng xoắn lá do các virus dạng *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCVs) gây ra hiện đang gây hại và làm giảm nghiêm trọng năng suất, chất lượng cà chua (Ashish *et al.*, 2020). Hiện có 10 loài virus thuộc nhóm TYLCVs đã được ghi nhận trên thế giới, bao gồm *Tomato yellow leaf curl Axarquia virus* (TYLCAxV), *Tomato yellow leaf curl China virus* (TYLCCNV), *Tomato yellow leaf curl Guangdong virus* (TYLGGuV), *Tomato yellow leaf curl Indonesia virus* (TYLCIDV), *Tomato yellow leaf curl Kanchanaburi virus* (TYLCKaV), *Tomato yellow leaf curl Malaga virus* (TYLCMaIV), *Tomato yellow leaf curl Mali virus* (TYLCMLV), *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* (TYLCSV), *Tomato yellow leaf curl Thailand virus* (TYLCTHV), *Tomato yellow leaf curl Vietnam virus* (TYLCVNV) and *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) (Díaz-pendón *et al.*, 2010). Trong đó, *Tomato yellow leaf curl Kanchanaburi virus* (TYLCKaV) và *Tomato yellow leaf curl Vietnam virus* (TYLCVNV) là hai loại virus hiện đang gây bệnh phổ biến ở Việt Nam (Ha *et al.*, 2008). Bệnh virus trên cà chua có khả năng lây lan rất nhanh và chỉ được phát hiện khi cây đã biểu hiện triệu chứng bệnh nghiêm trọng. Đến nay, vẫn chưa có biện pháp điều trị hữu hiệu mà chỉ có thể quản lý dịch bệnh thông qua kiểm soát nguồn nhiễm và tạo giống kháng (Dhaliwal *et al.*, 2019). Việc chẩn đoán chính xác sự hiện diện của virus ở giai đoạn sớm của quá trình nhiễm bệnh có ý nghĩa rất lớn trong quản lý bệnh. Thông thường quy trình chẩn đoán virus có thể được thiết lập dựa trên các phương pháp khác nhau như ELISA, PCR và Real-time PCR. Trong đó, ELISA là phương pháp đơn giản, dễ sử dụng nhưng thường có độ nhạy không cao và tiêu tốn nhiều thời gian (Hu *et al.*, 1993); PCR thường được sử dụng rộng rãi cho chẩn đoán các loại virus nhưng ngưỡng phát hiện thường không chạm đến được các trường hợp mẫu có nồng độ virus rất thấp (Ume *et al.*, 2017). Real-time PCR là phương pháp có thể phát hiện và định lượng virus một cách chính xác và nhanh chóng hơn so với các phương pháp khác (Papayiannis *et al.*, 2010). Phương pháp này đã được sử dụng trong công tác kiểm soát bệnh virus và nghiên cứu tạo giống cây trồng kháng virus (Giovanna *et al.*, 2008).

Trong nghiên cứu này, phương pháp Real-time PCR đã được sử dụng để thiết lập quy trình chẩn đoán sớm và chính xác TYLCKaV gây bệnh trên cà chua nhằm hỗ trợ cho công tác quản lý bệnh do virus gây ra trên cà chua cũng như nghiên cứu tạo giống cà chua kháng virus ở Việt Nam.

### NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Mẫu lá cà chua nghi nhiễm virus TYLCKaV được thu thập ở các vườn trồng cà chua tại Lâm Đồng, Việt Nam.

Chủng vi khuẩn *E. coli* DH5 $\alpha$  sử dụng cho nhân dòng gen.

### Thiết kế cặp mồi đặc hiệu cho việc phát hiện virus

Mồi phát hiện virus TYLCKaV được thiết kế trên vùng gen mã hóa protein vỏ (CP), kích thước sản phẩm khuếch đại 165bp.

### Thu thập nguồn mẫu nhiễm virus

Mẫu lá được thu thập dựa trên các triệu chứng đặc trưng của bệnh vàng xoăn lá trên cà chua: lá cong (hướng xuống dưới vào bên trong), hóa vàng (từ mép và chót lá vào giữa gân, giòn và nhỏ hẹp; cuống lá xoăn vụn; cây lùn phát triển chậm, còi cọc, mọc nhiều nhánh nhỏ, đốt thân ngắn, không ra quả, hoặc quả nhỏ (Ashish *et al.*, 2020). Mẫu được thu thập tại các vườn trồng cà chua tại huyện Đơn Dương, tỉnh Lâm Đồng. Sau khi thu thập, các mẫu sẽ được rửa sạch với nước, sau đó bảo quản trong tủ lạnh sâu - 80°C.

### Ly trích DNA virus và khuếch đại phân đoạn gen mục tiêu của virus

DNA virus được ly trích từ mẫu lá cà chua có biểu hiện triệu chứng nhiễm virus theo quy trình tách chiết DNA thực vật (Healy *et al.*, 2014) có cải tiến. Đoạn gen CP của virus được khuếch đại bằng phản ứng PCR với mồi TL6 (Mồi xuôi: 5'- TCGCGACAGAAGACCTGTTA -3', Mồi ngược: 5'- TCCTTGCTGGCATATTGACC -3'. Phản ứng được thực hiện với thể tích 25 µl, chứa 12,5 µL Dreamtaq Green PCR Master Mix (2X), 10,5 µL Nuclease-free H<sub>2</sub>O, 0,5 µL (10 µM) mỗi loại mồi xuôi và mồi ngược, và 1 µL mẫu DNA. Chương trình nhiệt gồm 1 chu kỳ 95°C/5 phút; 40 chu kỳ 95°C/30 giây, 44-52°C/30 giây, 72°C/30 giây và 1 chu kỳ 72°C/10 phút. Sản phẩm PCR được phân tích bằng điện di trên gel agarose 1,5% trong khoảng 30 phút dưới hiệu điện thế 100V, sau đó nhuộm với Ethidium Bromide (0,4 µg/ml) trong 30 phút và quan sát sự xuất hiện của băng DNA trên máy chụp gel (Geldoc).

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

Đoạn gen mục tiêu sau khi khuếch đại bằng phản ứng PCR được gắn vào vector pJET1.2 (CloneJET™ PCR Cloning Kit). Vector sau khi đã gắn gen được biến nạp vào vi khuẩn *E. coli* DH5α bằng phương pháp hóa biến nạp. Dịch tế bào vi khuẩn *E. coli* DH5α sau khi biến nạp được cấy trải trên đĩa petri chứa môi trường LB bổ sung 50 mg/L ampicillin, nuôi cấy qua đêm ở 37°C. Khuẩn lạc của các dòng tế bào phát triển được trên môi trường kháng sinh được kiểm tra trực tiếp bằng phản ứng PCR với mồi pJET1.2 (Mồi xuôi: 5'CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC-3', Mồi ngược: 5'-AAGAAC ATCGATTTTCCATGGCAG-3') định vị ở hai đầu vị trí đoạn gen được chèn vào trên vector. Dòng vi khuẩn thu được sau khi sàng lọc và kiểm tra được tách plasmid (sử dụng kit DNA-Spin™ Plasmid DNA Purification Kit - Intron) và gửi mẫu giải trình tự (Phòng CNSH Y Dược, Trung tâm Công nghệ sinh học). Kết quả giải trình tự sẽ được so sánh trở lại với các trình tự của virus được công bố trên Ngân hàng gen NCBI.

### Chuẩn bị mẫu chuẩn

Ly trích DNA plasmid mang phân đoạn gen từ vi khuẩn đã được tạo dòng, đo hàm lượng DNA và tính toán số lượng bản sao có được theo công thức:

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

Trong đó: Khối lượng DNA tính bằng đơn vị ng và chiều dài đoạn gen tính bằng bp (URI Genomics & Sequencing Cente, <http://cels.uri.edu/gsc/cndna.html>)

DNA plasmid sau khi xác định số bản sao sẽ được pha loãng theo hệ số bậc 10 thành các mẫu có nồng độ từ 10<sup>6</sup> đến 10<sup>0</sup> bản sao/µl.

### Thiết lập phản ứng Real-time PCR

Phản ứng Real-time PCR được thiết lập với các mẫu chuẩn có nồng độ 10<sup>6</sup>, 10<sup>5</sup>, và 10<sup>4</sup> bản sao/µL. Thành phần phản ứng gồm có 12,5 µL Maxiam SYBR Green/Rox qPCR Master Mix (2X), 10,5 µL Nuclease-free H<sub>2</sub>O, 0,5 µL (10 µM) mỗi loại mồi xuôi và mồi ngược, và 1 µL mẫu DNA. Chương trình nhiệt bao gồm 1 chu kỳ 95°C/5 phút; 40 chu kỳ 95°C/30 giây, 58°C/30 giây, 72°C/30 giây; 1 chu kỳ 95°C/10 giây, 65°C 1 phút, 97°C 1 giây và 1 chu kỳ 37°C 30 giây. Kết quả của phản ứng được phân tích trực tiếp trên máy Real-time PCR LightCycler® 96 (Roche) thông qua biểu đồ tín hiệu huỳnh quang và nhiệt độ nóng chảy (melt-curve).

### Dựng đường chuẩn

Thực hiện phản ứng Real-time PCR (thành phần phản ứng và chu trình nhiệt tương tự như phần thiết lập phản ứng) với các mẫu chuẩn có nồng độ từ 10<sup>6</sup> đến 10<sup>0</sup> bản sao/µl. Xác định chu kỳ ngưỡng (Ct) của phản ứng tương ứng với các nồng độ mẫu chuẩn. Đường chuẩn được xây dựng dựa trên chu kỳ ngưỡng (Ct) và giá trị log (số bản sao) tương ứng của các mẫu chuẩn. Phương trình đường chuẩn có dạng Y= aX + b, trong đó X: Ct và Y: log (số bản sao).

### Xác định giới hạn phát hiện (LOD)

Thực hiện phản ứng Real-time PCR lặp lại 10 lần với mẫu chuẩn có nồng độ thấp nhất mà phản ứng có thể phát

hiện được (tín hiệu huỳnh quang của mẫu chuẩn vượt trên tín hiệu nền). LOD của phản ứng sẽ được xác lập ở nồng độ được kiểm tra khi tất cả 10 lần lặp lại đều cho kết quả dương tính. Trong trường hợp nếu số lần cho kết quả dương tính nhỏ hơn 10, việc xác định LOD sẽ được thực hiện lại với mẫu chuẩn có nồng độ cao hơn liền kề.

**Xác định giới hạn định lượng (LOQ)**

Thực hiện phản ứng Real-time PCR định lượng lặp lại 10 lần với các mẫu chuẩn có nồng độ bản sao biết trước, trong đó bao gồm một mẫu chuẩn có nồng độ ở mức LOD và hai mẫu có nồng độ cao hơn LOD. Sau khi xác định được nồng độ mẫu thông qua phản ứng định lượng, tính toán độ lệch chuẩn (SD) và độ lệch chuẩn tương đối (RSD) của phương pháp theo công thức:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum Xi^2 - \frac{(\sum Xi)^2}{n}}{n - 1}} \quad \text{và} \quad RSD = \frac{SD}{\bar{X}} \times 100$$

Trong đó:

- +  $\sum Xi^2$ : tổng bình phương các giá trị đo được tại một nồng độ.
- +  $\sum Xi$ : tổng các giá trị đo được tại một nồng độ.
- + n: số lần lặp lại tại một nồng độ.
- +  $\bar{X}$ : giá trị trung bình các lần đo được tại một nồng độ:  $\bar{X} = \frac{\sum Xi}{n}$

LOQ là nồng độ thấp nhất mà ở đó phản ứng cho kết quả dương tính và có giá trị RSD  $\leq 25\%$ .

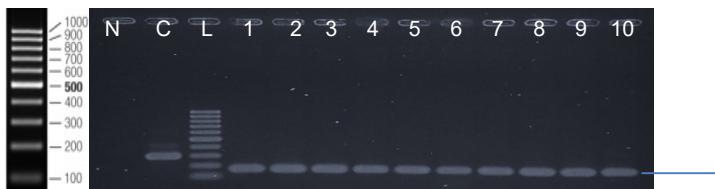
**Định lượng virus TYLCKaV trên mẫu lá cà chua**

Sau khi được thiết lập thành công, quy trình real-time PCR được áp dụng để định lượng virus TYLCKaV có trong các mẫu lá cà chua thu thập.

**KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

**Khuếch đại phân đoạn gen mục tiêu của virus**

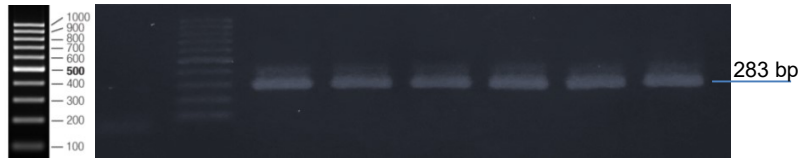
Theo tính toán lý thuyết, cặp mồi TL6-F/TL6-R có khả năng khuếch đại phân đoạn gen có kích thước tương ứng là 165 bp trên vùng gen CP của virus. Kết quả phản ứng PCR đã thu được băng DNA ở vị trí giữa 100 bp và 200 bp (Hình 1). Kết quả này cho thấy phản ứng PCR đã khuếch đại được phân đoạn DNA có kích thước như dự kiến. Theo thiết kế của mồi khuếch đại, các phân đoạn DNA này là sản phẩm được khuếch đại từ gen của virus. Mặc dù vậy, vẫn không thể khẳng định chắc chắn các trình tự đã được khuếch đại có thực sự là trình tự gen của virus hay không bởi vì khả năng bắt cặp và khuếch đại của mồi với một đoạn DNA nào đó trong DNA ly trích từ mẫu lá cà chua vẫn có thể xảy ra. Vì vậy, để khẳng định chắc chắn điều này, các phân đoạn DNA thu được sau khi thực hiện phản ứng khuếch đại đã được dòng hóa và giải trình tự.



Hình 1. Kết quả điện di sản phẩm PCR phát hiện TYLCKaV với cặp mồi TL6-F/TL6-R  
 N: đối chứng âm, C: đối chứng control, L: Thang DNA ; 1-10: DNA mẫu lá cà chua

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

Theo lý thuyết, khi đoạn gen mục tiêu được chèn vào vector pJET1.2 và quá trình biến nạp vector vào vi khuẩn thành công, các chủng vi khuẩn biến nạp sẽ phát triển và tạo khuẩn lạc trên môi trường chứa ampicilin do pJET1.2 có mang gen kháng ampicilin (cho phép vi khuẩn mang vector phát triển trên môi trường có ampicilin) và gen chọn lọc âm *eco47IR* (cho phép loại bỏ các dòng mang vector tự đóng vòng). Kết quả biến nạp đã thu được các dòng vi khuẩn phát triển trên môi trường LB bổ sung 50 mg/L ampicilin; cho thấy quá trình chèn và biến nạp sơ bộ đã thành công. Tuy nhiên, để đảm bảo chắc chắn đoạn gen đã được chèn vào đúng là gen mục tiêu, các khuẩn lạc đã được kiểm tra bằng phản ứng PCR với cặp mồi pJET1.2. Sản phẩm khuếch đại theo tính toán có kích thước khoảng 283 bp. Kết quả phản ứng đã thu được băng DNA ở vị trí khoảng gần 300 bp, phù hợp với tính toán. Điều này cho thấy các dòng vi khuẩn được kiểm tra chắc chắn có mang vector chứa phân đoạn gen mục tiêu (Hình 2).



**Hình 2. Kết quả điện di sản phẩm PCR kiểm tra khuẩn lạc với cặp mồi pJET-F/pJET-R**  
*N: Đối chứng âm, L: Thang DNA ; 1-6: Mẫu khuẩn lạc đơn*

Để chắc chắn đã khuếch đại đúng gen của virus mục tiêu, plasmid từ các dòng vi khuẩn mang gen đã được giải trình tự với mồi pJET1.2. Kết quả so sánh trình tự thu được trên Ngân hàng Gen NCBI cho thấy trình tự của phân đoạn gen khuếch đại được tương đồng ở mức 89% với các trình tự đã được công bố của virus TYLCKaV (Bảng 1). Điều này cho thấy phản ứng PCR được thiết lập trong nghiên cứu này đã khuếch đại đúng phân đoạn gen cũng như virus mục tiêu, có thể được sử dụng để xác định sự hiện diện của virus trên mẫu cà chua.

**Bảng 1. Kết quả so sánh trình tự đoạn gen khuếch đại được của virus TYLCKaV với các trình tự được công bố trên Ngân hàng Gen NCBI**

Tên chủng virus	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<i>Tomato yellow leaf curl Kanchanaburi virus isolate Cambodia:Siem Reap: 2013 clone Cd5 coat protein (AV1) gene, partial cds</i>	215	215	100%	1e-53	89,31%	KR073085.1
<i>Tomato yellow leaf curl Kanchanaburi virus isolate Cambodia:Siem Reap: 2013 clone Cd4 coat protein (AV1) gene, partial cds</i>	215	215	100%	1e-53	89,31%	KR073084.1
<i>Tomato yellow leaf curl Kanchanaburi virus isolate Cambodia:Siem Reap: 2013 clone Cd4 segment DNA-A, complete sequence</i>	215	215	100%	1e-53	89,31%	KR073086.1
<i>Tomato yellow leaf Kanchanaburi virus segment DNA-A, complete sequence</i>	215	215	100%	1e-53	89,31%	DQ641702.1
<i>Tomato yellow leaf Kanchanaburi virus segment DNA A, complete sequence</i>	215	215	100%	1e-53	89,31%	DQ169054.1

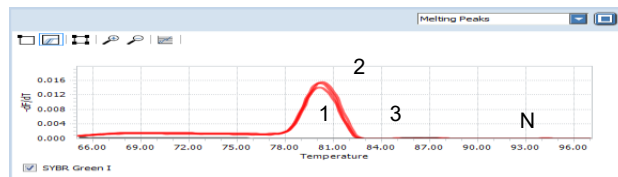
**Thiết lập phản ứng Real-time PCR**

Phản ứng Real-time PCR phát hiện TYLCKaV cho sản phẩm khuếch đại được thể hiện bằng đường biểu diễn tín hiệu huỳnh quang. Trong đó, đường biểu diễn tín hiệu của các mẫu có số bản sao  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4/\mu\text{L}$  đều vượt trên tín hiệu nền (Hình 3).



**Hình 3. Biểu đồ khuếch đại phân đoạn gen CP của virus TYLCKaV dựa trên tính hiệu huỳnh quang**  
*Trục tung (Y): tín hiệu huỳnh quang, trục hoành (X): chu kỳ ngưỡng (Ct). N: Đối chứng âm; 1: mẫu  $10^6$  bản sao/ $\mu\text{L}$ ; 2: mẫu  $10^5$  bản sao/ $\mu\text{L}$ ; 3: mẫu  $10^4$  bản sao/ $\mu\text{L}$*

Sản phẩm khuếch đại của cả 3 mẫu có nhiệt độ nóng chảy ( $T_m$ ) ở khoảng  $80^\circ\text{C}$  (Hình 4). Điều này cho thấy việc thử nghiệm phản ứng Real-time PCR khuếch đại phân đoạn gen CP TYLCKaV đã thực hiện thành công.



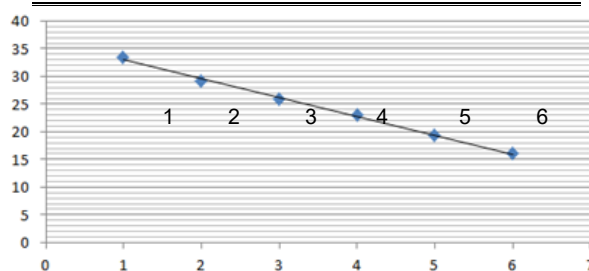
**Hình 4. Biểu đồ phân tích nhiệt độ nóng chảy phân đoạn gen CP TYLCKaV.**  
*N: Đối chứng âm; 1: mẫu  $10^6$  bản sao/ $\mu\text{L}$ ; 2: mẫu  $10^5$  bản sao/ $\mu\text{L}$ ; 3: mẫu  $10^4$  bản sao/ $\mu\text{L}$*

### Dựng đường chuẩn

Dựa trên giá trị chu kỳ ngưỡng (Ct) thu được khi thực hiện phản ứng Real-time PCR với mẫu mang phân đoạn gen CP ở các nồng độ khác nhau (Bảng 2), phương trình đường chuẩn đã được thiết lập có dạng  $y = -3,404x + 36,401$  với hệ số tương quan  $R^2 = 0,9975$  (Hình 5).

**Bảng 2. Giá trị Ct của phản ứng khuếch đại mẫu mang phân đoạn gen CP**

Mẫu (bản sao/ $\mu$ L)	Logarit số bản sao	Ct
$10^6$	6	16,04
$10^5$	5	19,42
$10^4$	4	22,99
$10^3$	3	25,84
$10^2$	2	29,20
$10^1$	1	33,43



**Hình 5. Biểu đồ đường chuẩn của phản ứng khuếch đại phân đoạn gen CP TYLCKaV**

Trục tung (Y): Chu kỳ ngưỡng (Ct), trục hoành (X): logarit số bản sao. 6: mẫu  $10^6$  bản sao/ $\mu$ L; 5: mẫu  $10^5$  bản sao/ $\mu$ L; 4: mẫu  $10^4$  bản sao/ $\mu$ L; 3: mẫu  $10^3$  bản sao/ $\mu$ L; 2: mẫu  $10^2$  bản sao/ $\mu$ L; 1: mẫu  $10^1$  bản sao/ $\mu$ L

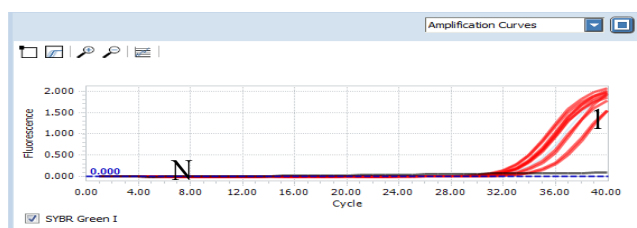
### Xác định giới hạn phát hiện

Phản ứng Real-time PCR được thực hiện trên 6 mẫu chuẩn có số bản sao/ $\mu$ L thay đổi từ  $10^0$  -  $10^6$  chỉ cho tín hiệu khuếch đại ở các mẫu có nồng độ  $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$  (bản sao/ $\mu$ L) với chu kỳ ngưỡng tương ứng là 33,28; 29,39; 25,86; 22,98 và 16,32 (Bảng 3). Điều này cho thấy số bản sao thấp nhất mà phản ứng Real-time PCR có thể phát hiện được trong trường hợp này là  $10^1$  (bản sao/ $\mu$ L).

**Bảng 3. Kết quả phản ứng Real-time PCR khuếch đại phân đoạn gen CP TYLCKaV**

Số bản sao/ $\mu$ L	Ct <sub>tb</sub>
$10^6$	16,22 $\pm$ 0,18
$10^5$	19,39 $\pm$ 0,12
$10^4$	22,98 $\pm$ 0,02
$10^3$	25,86 $\pm$ 0,01
$10^2$	29,39 $\pm$ 0,16
$10^1$	33,28 $\pm$ 0,35
$10^0$	-

Khi thực hiện phản ứng PCR lặp lại 10 lần với mẫu  $10^1$  bản sao/ $\mu$ L cho kết quả thu được tín hiệu khuếch đại ở tất cả các lần lặp lại với giá trị chu kỳ ngưỡng trung bình 33,28 (Hình 6).



**Hình 6. Biểu đồ tín hiệu huỳnh quang 10 lần lặp lại của phản ứng Real-time PCR khuếch đại phân đoạn gen CP TLCKaV trên mẫu  $10^1$  bản sao/ $\mu$ L**

N: Đối chứng âm, 1: mẫu  $10^1$  bản sao/ $\mu$ L lặp lại 10 lần

Như vậy, phản ứng Real-time PCR phát hiện TYLCKaV với cặp primer TL6-F/TL6-R có ngưỡng phát hiện ở mức  $10^1$  bản sao/ $\mu$ L. Với ngưỡng phát hiện này, phản ứng PCR được thiết lập có thể cho phép phát hiện được sự hiện diện của virus trong cây ở giai đoạn sớm của sự lây nhiễm. Kết quả này có ý quan trọng đối với việc tầm soát virus cũng như chọn lọc nguồn cây đầu dòng sạch virus để sản xuất giống cà chua vụ cho sản xuất.

**Xác định giới hạn định lượng**

Giới hạn định lượng của phản ứng Real-time PCR phát hiện TYLCKaV được phân tích với mẫu ở các nồng độ  $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$  bản sao/ $\mu$ L. Kết quả cho thấy, giá trị RSD của phản ứng đạt mức thấp hơn 25% ở mẫu có nồng độ  $10^2$  và  $10^3$  bản sao/ $\mu$ L (Bảng 4). Kết quả này cho thấy mẫu có nồng độ thấp nhất mà ở đó phản ứng có giá trị RSD phù hợp ( $\leq 25\%$ ) là  $10^2$  bản sao/ $\mu$ L. Như vậy, giới hạn định lượng của phản ứng được xác định ở mức  $10^2$  bản sao/ $\mu$ L.

**Bảng 4. Kết quả xác định giới hạn định lượng phản ứng Real-time PCR khuếch đại phân đoạn gen CP của virus TYLCKaV**

Số bản sao lý thuyết	Số bản sao thực nghiệm	Độ chệch (%)	SD	RSD (%)
$10^1$	18,28	-82,78	9,59	52,49
$10^2$	137,57	-37,56	19,23	13,98
$10^3$	883,55	11,65	99,28	11,24

**Định lượng virus TYLCKaV trên mẫu lá cà chua**

Định lượng TYLCKaV có trong mẫu lá cà chua dựa trên số lượng phân đoạn gen CP của mẫu. Giá trị này được tính toán dựa trên đường chuẩn đã thiết lập và chu kì ngưỡng trung bình của mẫu thử nghiệm (Bảng 5). Giá trị định lượng virus của 10 mẫu dao động từ  $1,02 \times 10^3$  đến  $2,73 \times 10^8$  số bản sao/ $\mu$ L, giá trị thấp nhất thuộc về mẫu CC-5 và mẫu CC-10 cho giá trị định lượng cao nhất.

**Bảng 5. Giá trị Ct trung bình của mẫu lá cà chua đã thu thập và giá trị định lượng tương ứng**

Kí hiệu mẫu	Ct trung bình $\pm$ SD	Giá trị định lượng $\pm$ SD (Số bản sao/ $\mu$ L)
CC-1	22,05 $\pm$ 0,08	$3,23 \times 10^4 \pm 1,60 \times 10^3$
CC-2	8,12 $\pm$ 0,15	$2,70 \times 10^8 \pm 2,74 \times 10^7$
CC-3	16,18 $\pm$ 0,36	$1,47 \times 10^6 \pm 3,53 \times 10^5$
CC-4	26,28 $\pm$ 0,21	$1,49 \times 10^3 \pm 2,13 \times 10^2$
CC-5	27,40 $\pm$ 0,28	$1,02 \times 10^3 \pm 1,83 \times 10^2$
CC-6	27,17 $\pm$ 0,21	$1,18 \times 10^3 \pm 1,59 \times 10^2$
CC-7	25,49 $\pm$ 0,18	$3,48 \times 10^3 \pm 4,13 \times 10^2$
CC-8	15,08 $\pm$ 0,38	$3,02 \times 10^6 \pm 7,84 \times 10^5$
CC-9	8,19 $\pm$ 0,10	$2,58 \times 10^8 \pm 1,60 \times 10^7$
CC-10	8,11 $\pm$ 0,16	$2,73 \times 10^8 \pm 2,87 \times 10^7$

**KẾT LUẬN**

Đã thiết lập được quy trình chẩn đoán virus TYLCKaV gây bệnh trên cà chua ở Việt Nam bằng phương pháp Real-time PCR. Quy trình có khả năng phát hiện và định lượng ở mức tương ứng 10 bản sao/ $\mu$ L và 100 bản sao/ $\mu$ L. Quy trình chẩn đoán đã được sử dụng để định lượng thành công sự hiện diện của virus TYLCKaV trong các mẫu cà chua thu thập với lượng virus dao động từ  $1,02 \times 10^3$  đến  $2,73 \times 10^8$  số bản sao/ $\mu$ L.

**TÀI LIỆU THAM KHẢO**

Ashish P, Namisha S, Gunaseelen HG, Mehanathan M, Manoj P (2020). Tomato yellow leaf curl virus: Impact, challenges and management. *Trends in Plant Science*: 1-15.

Dhaliwal MS, Jindal SK, Abhishek S, Prasanna HC (2019). Tomato yellow leaf curl virus disease of tomato and its management through resistance breeding: a review. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*: 1-20.

Giovanna M, Piero C, Gian PA, Emanuela N (2008). Real-time PCR for the quantitation of Tomato yellow leaf curl Sardinia virus in tomato plants and in Bemisia tabaci. *J Virol Methods* 147: 282-289.

Healy A, Agnelo, Cooper T, Henry RJ (2014). Protocol: A simple method for extracting next-generation sequencing quality genomic DNA from recalcitrant plant species. *Plant Method*: 10-21.

Ha C, Coombs S, Reville P, Harding R, Vu M, Dale J (2008). Molecular characterization of begomoviruses and DNA satellites from Vietnam: additional evidence that the New World geminiviruses were present in the Old World prior to continental separation. *Journal of General Virology* 89: 312-326.

Díaz-pendón JA, Cañizares MC Moriones, E, Bęarano ER, Czosnek H and Navas-castillo J (2010). Tomato yellow leaf curl viruses: ménage à trois between the virus complex, the plant and the whitefly vector. *Molecular plant pathology* (2010) 11(4), 441-450.

Hu JS, Ferreira S, Wang M (1993). Detection of *cymbidium mosaic virus*, *odontoglossum ringspot virus*, *tomato spotted wilt virus*, and *potyvirus* infecting orchids in Hawaii. *Plant Disease* 77 (5): 464-468.

Jolly B (2016). Tomato yellow leaf curl virus: A serious threat to tomato plants world wide. *J Plant Pathol Microbiol* 7 (4): 1-5.

Nguyen Minh Tuan, Nguyen Thi Mao (2015), Effect of plant density on growth and yield of Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) at Thai Nguyen, Vietnam. *International Journal of Plant & Soil Science* 7 (6): 357-361.

Papayiannis LC, Iacovides TA, Katis NI, Brown JK (2010). Differentiation of tomato yellow leaf curl virus and tomato yellow leaf curl Sardinia virus using real-time TaqMan® PCR. *J Virol Methods* 165: 238-245.

## DETECTION OF Tomato yellow leaf curl Kanchanaburi virus INFECTING TOMATO USING REAL-TIME PCR

**Huynh Nguyen Minh Nghia, Nguyen Vinh, Dương Hoa Xo, Nguyen Xuan Dung\***

*Biotechnology Center of Ho Chi Minh City*

### SUMMARY

*Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCKaV) is a virus that cause yellow leaf curl disease which is seriously affecting tomato productivity and quality. Early and accurate detection of TYLCKaV's present in tomatoes for disease control is currently an urgent issue. This work proved the detected and quantitative procedures for TYLCKaV based on Real-time PCR. Accordingly, viral DNA was extracted from the infected sample and amplified by PCR reaction with primers designed to amplify a 165 bp gene segment of the coat protein gene. The amplified gene sequences were cloned and sequenced to determine the specificity of the amplification reaction before establishing the Real-time PCR reaction. The Real-time PCR procedure was applied to quantify the virus in the collected tomato samples. The results showed that we amplified the viral gene segment with the homology of 89% compared to the sequences published by the NCBI gene bank. The Real-time PCR reaction was successfully established with the calibration curve  $y = 3.404x + 36.401$ , the correlation coefficient  $R^2 = 0.9975$ . The detection threshold and the quantitative limit of the reaction reach 10 copies/ $\mu$ L and 100 copies/ $\mu$ L, respectively. The number of viruses in the test samples ranged from  $10^3$  to  $10^8$  copies/ $\mu$ L.

*Keywords:* Viral diseases, coat protein gene, *Solanum lycopersicum*, *Tomato yellow leaf curl Kanchanaburi virus*, Real-time PCR.

---

\* Author for correspondence: Tel: +84-903800438; Email: nxdung.snn@tphcm.gov.vn