

## PHÁT HIỆN *Pepper chat fruit viroid* (PCFVd) BẰNG KỸ THUẬT RT-PCR TRÊN CÂY HỌ CÀ *Solanaceae* TẠI TIỀN GIANG

Trần Đình Phong<sup>1</sup>, Trương Quang Toàn<sup>2</sup>, Huỳnh Văn Biết<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Khoa Khoa học Sinh học – Trường Đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh

<sup>2</sup>Viện Nghiên cứu Công nghệ Sinh học và Môi trường – Trường Đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh

### TÓM TẮT

PCFVd (*Pepper chat fruit viroid*) là một trong những loại viroid gây chậm lớn, còi cọc, lá xoắn, trái nhỏ trên các cây họ cà, nó có khả năng lây lan mạnh từ cây bệnh sang cây khỏe hoặc từ nguồn giống. Bệnh biểu hiện càng sớm thì mức độ ảnh hưởng càng nghiêm trọng làm giảm sản lượng, chất lượng nông sản. Hiện nay chưa có loại thuốc nào có thể tiêu diệt loại viroid này, do đó một trong những phương pháp phòng trừ hiệu quả nhất là sàng lọc hạt giống trước khi gieo trồng và kiểm soát, loại bỏ các cây có biểu hiện bệnh ở giai đoạn sớm chính xác là cần thiết. Trong nghiên cứu này, hai cặp primer PCFVd-FW1/RE1 và FJJ2016-77/78 được sử dụng để khuếch đại và phục vụ cho việc giải trình tự bộ gen PCFVd và cặp primer PCF-seq-F/R được sử dụng để phát triển quy trình phát hiện PCFVd, sau đó sản phẩm PCR từ các primer này được tạo dòng vào vector pJET1.2 và biến nạp vào *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ . Cấu trúc bậc hai của bộ gene PCFVd đã được xác định từ kết quả giải trình tự. Quy trình RT-PCR được xây dựng để phát hiện PCFVd với cặp primer PCF-seq-F/R cho sản phẩm khuếch đại có kích thước 348 bp. Nhiệt độ bắt cặp tối ưu cho phản ứng là 60°C, nồng độ primer tối ưu cho phản ứng là 0,1  $\mu$ M, độ LOD của phản ứng RT-PCR được xác định là 100 copies/ $\mu$ L. Có 14 mẫu trên tổng 20 mẫu thực địa được phát hiện dương tính với PCFVd. Nghiên cứu đã thiết lập thành công quy trình RT-PCR tối ưu để phát hiện sự hiện diện của PCFVd. Đây là báo cáo đầu tiên về sự lây nhiễm của PCFVd trên cây ớt (*Capsicum frutescens* L.) và cây cà chua (*Solanum lycopersicum*) tại đồng bằng sông Cửu Long.

**Từ khóa:** *Capsicum frutescens* L., PCFVd, RT-PCR, *Solanum lycopersicum*, Viroid.

### MỞ ĐẦU

Viroid là tác nhân gây bệnh nhỏ nhất trên thực vật, được phân thành một nhóm tác nhân dưới virus. Chúng là những phân tử RNA sợi đơn, có kích thước dao động từ 246 nt đến 399 nt. Trong các thử nghiệm In-vitro, các viroid có hình que do sự ghép cặp của các nucleotide trong cấu trúc. Viroid khác với virus ở chỗ chúng không có lớp vỏ protein. Ngoài ra, bộ gene nhỏ của chúng không mã hóa bất kỳ một protein nào. Viroid được chia làm hai họ là Avsunviroidae và Pospiviroidae. Pepper chat fruit viroid là một viroid thuộc họ Pospiviroidae được phát hiện lần đầu tiên trên cây ớt chuông vào năm 2006 bởi Verhoeven và đồng tác gia (Verhoeven *et al.*, 2009) tại Hà Lan. Sau đó chúng được báo cáo lây nhiễm trên cà chua tại Thái Lan (Reanwarakorn *et al.*, 2011), Canada (Verhoeven *et al.*, 2011) và Úc (Chambers *et al.*, 2013). Tại Việt Nam, PCFVd đã được báo cáo phát hiện vào năm 2020 bởi Choi và đồng tác giả ở khu vực miền Bắc và Lâm Đồng, Việt Nam (Choi *et al.*, 2020) tuy nhiên vẫn chưa có báo cáo nào về sự xuất hiện của PCFVd tại khu vực đồng bằng sông Cửu Long. PCFVd gây các triệu chứng như cây chậm lớn, còi cọc, lá xoắn, trái nhỏ trên ớt và cà chua; củ thon dài và dị dạng đối với khoai tây. PCFVd gây bệnh trên nhiều cây quan trọng của họ *Solanaceae* như cà chua, ớt và khoai tây gây thiệt hại lớn về kinh tế và rất khó kiểm soát do phạm vi kí chủ rộng. Việc phát hiện bệnh thông qua triệu chứng không hiệu quả do triệu chứng không quá rõ ràng có thể gây nhầm lẫn với các bệnh do thiếu vi khoáng chất. Vì vậy, việc phát hiện bệnh sớm thông qua các kỹ thuật sinh học phân tử được chọn để chẩn đoán bệnh do viroid gây ra là cần thiết nhằm góp phần giảm thiệt hại cho người sản xuất. Các kỹ thuật sinh học phân tử thường dùng cho việc phát hiện tác nhân viroid như là RT-PCR, Realtime-RT-PCR và LAMP. Hiện nay RT-PCR là phương pháp được dùng nhiều trong phát hiện bệnh do độ chính xác cao, giá thành rẻ và dễ thực hiện.

Nghiên cứu này được thực hiện nhằm phân tích đặc điểm phân tử của chủng *Pepper chat fruit viroid* tại Đồng bằng sông Cửu Long và phát triển quy trình phát hiện PCFVd bằng kỹ thuật RT-PCR giúp phát hiện sớm mầm bệnh và ngăn chặn kịp thời, giúp giảm bớt thiệt hại.

### NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

#### Vật liệu

Đối chứng dương PCFVd được cung cấp từ phòng thí nghiệm Sinh học phân tử, Viện Nghiên cứu Công nghệ Sinh học và Môi trường, trường đại học Nông Lâm TPHCM. Hai mươi mẫu lá, gồm mười mẫu lá cây ớt (*Capsicum frutescens*) (kí hiệu từ 1 đến 10) và mười mẫu lá cà chua (*Solanum lycopersicum*) (kí hiệu từ 11 đến 20)

có triệu chứng nghi nhiễm PCFVd được thu thập tại 4 vườn ở thành phố Gò Công, tỉnh Tiền Giang, Việt Nam. Chúng vi khuẩn *E. coli* DH5α và plasmid pJET 1.2 được sử dụng cho nhân dòng.

### Ly trích RNA và tinh sạch RNA

RNA viroid được ly trích từ các mẫu thực địa được thực hiện theo sự hướng dẫn của EZ-10 Spin Column Plant RNA Mini-Preps Kit. RNA tổng số đã được xác định nồng độ (ng/μL) và độ tinh sạch RNA bằng máy đo quang phổ (Biodrop, Anh). RNA tổng số được tinh sạch và được loại bỏ DNA theo hướng dẫn của bộ kit DNase I, RNase-free (Thermo Scientific, Hoa Kỳ). Thành phần phản ứng gồm 1 μL 10X buffer, 1 μL 1U DNase I, 8 μL RNA, sau đó ủ ở 37°C trong 30 phút. Tiếp theo, 1μL EDTA được thêm vào phản ứng và ủ ở 65°C trong 10 phút để dừng phản ứng.

### Phản ứng RT-PCR

RNA sau khi tinh sạch được sử dụng để tổng hợp cDNA theo hướng dẫn của SensiFAST™ cDNA Synthesis Kit. Sử dụng máy luân nhiệt (GeneAmp® PCR System 9700) cho các bước ủ. Chu trình nhiệt cho phản ứng bao gồm: ủ primer 25°C trong 10 phút; phiên mã ngược 42°C trong 15 phút và 48°C trong 15 phút; cuối cùng là 85°C trong 5 phút để dừng phản ứng. Để kiểm soát quá trình xét nghiệm, cặp primer ACT-F/R (Bảng 1) được sử dụng để khuếch đại đoạn gene đối chứng nội actin của vật chủ.

Hai cặp primer PCFVd-FW1/RE1 và FJJ2016-77/78 (bảng 1) được sử dụng về giải toàn bộ trình tự bộ gene và cặp primer PCF-seq-F/R được sử dụng để thực hiện quy trình phát hiện PCFVd. Phản ứng RT-PCR được thực hiện trong 25 μL thể tích phản ứng gồm: 12,5 μL DreamTaq Green PCR Master Mix 2X (Thermo Scientific, Hoa Kỳ), 0,5 μL mỗi primer (10 μM), 1 μL cDNA và 9,5 μL nước DEPC (BioBasic, Canada). Phản ứng được thực hiện bằng máy luân nhiệt Bioer LifeEco, gồm các bước: tiền biến tính 95°C trong 5 phút; 40 chu kì: biến tính 95°C trong 30 giây, bắt cặp 60°C trong 30 giây, kéo dài 72°C trong 30 giây; hậu kéo dài 72°C trong 7 phút. Sau đó sản phẩm RT-PCR sẽ được kiểm tra trên gel agarose 1,5% (Bioline, Vương quốc Anh) trong đệm TAE 0,5X (ABT, Việt Nam) dùng thang chuẩn HyperLadder™ 100 bp (Bioline, Vương quốc Anh) sử dụng chất nhuộm Gelred (ABT) và kết quả được quan sát dưới đèn UV.

**Bảng 1. Danh sách các primer sử dụng**

Tên primer	Trình tự	Kích thước	Mục đích	Nguồn
PCF-seq-F	CCGTCTTCTGACAGGAGTAATCCC	348 bp	Phát hiện PCFVd	(Yanagisawa and Matsushita, 2017)
PCF-seq-R	ACCCGCACGGCGCTTCTC			
PCFVd-FW1	ACCCTTCCTTTCTTCGGGTTTCC	348 bp	Giải trình tự toàn bộ gen PCFVd	(Verhoeven <i>et al.</i> , 2009)
PCFVd-RE1	GAA AACCTGTTTCAGCGGGG AT			
FJJ2016-77	CCGGATTCTTCTAAGGGTGCCTGTG	348 bp	Giải trình tự toàn bộ gen PCFVd	(Tseng <i>et al.</i> , 2021)
FJJ2016-78	AGATCCTCTCGGGTCCCGGGTAGCT			
pJET1.2-F	C GACTCACTATAGGGAGAGCGGC	118 bp + 348 bp	Kiểm tra gen clone	CloneJET™PCR Cloning Kit
pJET1.2-R	AAGAAC ATCGATTTTCCATGGCAG			
ACT-F	AGGCCAACAGAGAGAAGATG	772 bp	Kiểm soát xét nghiệm	(Trương <i>et al.</i> , 2023)
ACT-R	ACAATGGAAGACCAGACTC			

### Tạo dòng

Sản phẩm RT-PCR khuếch đại bằng cặp primer PCF-seq-F/R, PCFVd-FW1/RE1 và FJJ2016-77/78 được chèn vào vector pJET1.2 theo hướng dẫn của CloneJET™ PCR Cloning Kit (Thermo Scientific). Vector sau khi chèn gene mục tiêu được biến nạp vào vi khuẩn *E. coli* DH5α bằng phương pháp hóa biến nạp (Sambrook and Russell, 2001). Sau khi hoàn thành các bước tạo dòng, dịch vi khuẩn sẽ được nuôi cấy trên môi trường LB rắn có bổ sung kháng sinh Ampicillin nồng độ 2 mg/L môi trường. Sau 24 giờ nuôi cấy vi khuẩn, khuẩn lạc mang gen mục tiêu được chọn lọc bằng phản ứng PCR với cặp mồi pJET1.2-F/R (Bảng 1), theo hướng dẫn CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Scientific), sau đó sản phẩm PCR được điện di kiểm tra kích thước. Sản phẩm PCR được gửi giải trình tự bằng phương pháp Sanger tại Công ty TNHH Dịch vụ và Thương mại Nam Khoa Thành phố Hồ Chí Minh.

### Phân tích trình tự, kiểm tra cấu trúc thứ cấp

Trình tự toàn bộ gen của PCFVd được khuếch đại bằng 2 cặp mồi PCFVd-FW1/RE1 và FJJ2016-77/78 được xử lý bằng phần mềm BioEdit để có trình tự hoàn chỉnh. Sau đó trình tự sẽ được kiểm tra bằng công cụ BLASTn của Trung tâm Thông tin Công nghệ sinh học Quốc gia Hoa Kỳ (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Cấu trúc thứ cấp của PCFVd sẽ được dự đoán bằng công cụ RNA Folding Form của Unafold website. Trình tự nucleotide của PCFVd đã được gửi vào NCBI GenBank (Số gia nhập PQ059146).

**Tối ưu phản ứng RT-PCR phát hiện PCFVd**

**Khảo sát nhiệt độ bắt cặp**

Nhiệt độ bắt cặp được khảo sát ở nhiều mức nhiệt độ khác nhau nhằm tìm ra nhiệt độ tối ưu cho phản ứng. Khảo sát được thực hiện từ 55°C đến 65°C bằng máy luân nhiệt Bioer LifeEco, các mức nhiệt khảo sát gồm: 55°C; 55,2°C; 55,6°C; 56,5°C; 57,6°C; 59°C; 60°C; 62,1°C; 63,7°C; 64,2°C; 64,7°C; 65°C. Nhiệt độ tối ưu được chọn là nhiệt độ cho vạch DNA sáng nhất, ít tạo dimer nhất.

**Khảo sát nồng độ mẫu**

Nồng độ mẫu được khảo sát ở nhiều mức khác nhau trong khoảng từ 0,0125 µM đến 1,2 µM cụ thể như là 0,0125 µM; 0,025 µM; 0,05 µM; 0,1 µM; 0,2 µM; 0,4 µM; 0,8 µM; 1,2 µM. Nồng độ mẫu tối ưu được chọn là nồng độ tại đó vạch sáng và không tạo thành dimer, ưu tiên chọn nồng độ thấp nhất giúp tiết kiệm hóa chất.

**Xác định giới hạn phát hiện (LOD)**

Plasmid mang đoạn gen mục tiêu sẽ được đo nồng độ (ng/µL) thông qua độ hấp thụ quang phổ A260 bằng máy quang phổ BioDrop µLITE. Số bản sao DNA plasmid có trong 1 µL được tính theo công thức của Starosciak (Starosciak, 2004).

$$\text{Copies (copies)} = \frac{\text{PC} \times 6,022 \times 10^{23}}{\text{L} \times 10^9 \times 650}$$

Trong đó: PC nồng độ DNA plasmid (ng/µL), L là độ dài đoạn gen (bp).

Giới hạn phát hiện (LOD) của xét nghiệm RT-PCR được xác định là lượng số bản sao DNA plasmid có trong một phản ứng thấp nhất có thể phát hiện trên 90%. Lượng DNA plasmid được pha loãng từ 10<sup>9</sup> đến 10<sup>0</sup> được sử dụng để xác định giá trị LOD. Sản phẩm PCR được phân tích bằng gel agarose 1,5% với điện áp 100V trong 30 phút, sau đó quan sát dưới đèn UV.

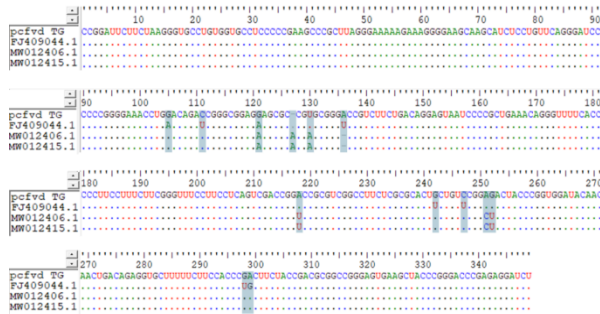
**Áp dụng quy trình RT-PCR đã tối ưu lên mẫu thực địa**

Tổng số 20 mẫu gồm có 10 mẫu lá ớt và 10 mẫu lá cà chua có triệu chứng nhiễm PCFVd được thu thập tại bốn vườn ở khu vực Thành Phố Gò Công, tỉnh Tiền Giang, mỗi vườn lấy 5 mẫu. Trong đó vườn 1 và 2 là các mẫu ớt, vườn 3 và 4 là các mẫu cà chua. Các mẫu thực địa được kiểm tra bằng phản ứng RT-PCR đã được tối ưu.

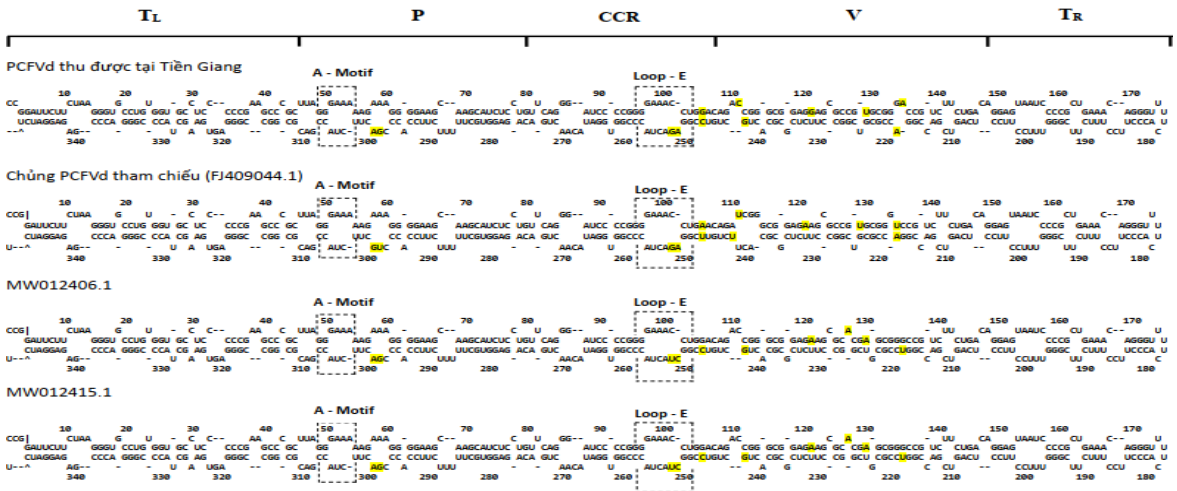
**KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

**Phân tích trình tự và đặt trưng phân tử của chủng PCFVd phân lập ở Việt Nam**

Cấu trúc bậc một của bộ gen PCFVd đã được xác định bằng cách giải trình tự các sản phẩm PCR từ các plasmid mang đoạn khuếch đại của hai cặp primer PCFVd-FW1/RE1 và FJJ2016-77/78. Thành phần nucleic acid của PCFVd chủng thu thập tại Tiền Giang được xác định gồm có 348 nt: 108 C (31%), 103 G (29,6%), 71 U (20,4%) và 66 A (19,0%), hàm lượng C + G là 60,6%. Kết quả so sánh trình tự thu được với các trình tự PCFVd đã được công bố trên GenBank cho thấy trình tự của đoạn gen khuếch đại tương đồng ở mức 98,28% với trình tự gen PCFVd mã số MW422292.1 đã được công bố và tương đồng 97,99% với 2 chủng PCFVd có mã số MW012415.1 và MW012406.1 tại Việt Nam. Trình tự của chủng PCFVd thu được tại Tiền Giang có sự khác biệt với trình tự nucleotide của chủng PCFVd tham chiếu có mã số FJ409044.1 tại vị trí: 105, 111, 120, 136, 242, 247, 298, 299 và khác biệt với 2 trình tự nucleotide của chủng PCFVd có mã số MW012415.1 và MW012406.1 tại vị trí: 105, 121, 127, 130, 136, 218, 251, 252 (Hình 1). Sự khác biệt về thành phần nucleic acid có thể chuyển Tetraloop motif thành Loop - E motif, ngoài ra sự thay đổi thành phần có thể dẫn đến sự thay đổi độc lực của viroid (Hadidi *et al.*, 2017). Cấu trúc thứ cấp được máy tính dự đoán năng lượng tự do có dạng hình que giống với các cấu trúc được báo cáo trước đây (Verhoeven *et al.*, 2009) (Hình 2).



**Hình 1. So sánh trình tự gene giữa chủng PCFVd thu được tại Tiền Giang (PCFVd TG) với trình tự tham chiếu của PCFVd (FJ409044.1) và hai chủng PCFVd thu được tại Việt Nam (MW012406.1 và MW012415.1)**  
 Những trình tự nucleotide giống nhau được thể hiện qua dấu (.) còn những nucleotide có sự khác biệt giữa các chủng được làm nổi bật.

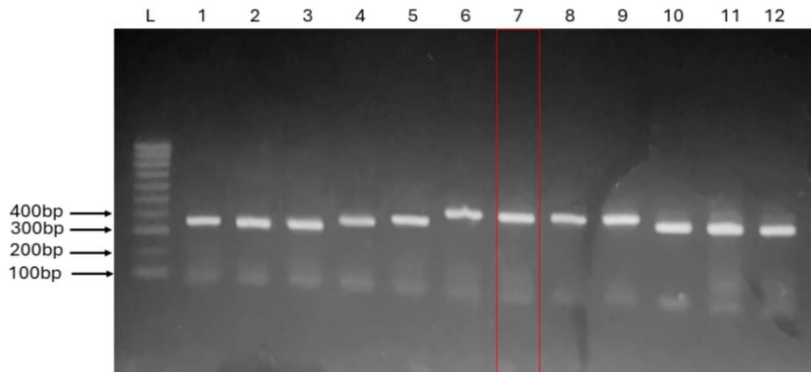


**Hình 2. Cấu trúc thứ cấp của PCFVd thu được tại Tiền Giang, chủng tham chiếu (FJ409044.1) và hai chủng được công bố tại Việt Nam (MW012406.1 và MW012415.1)**  
 Các nucleotide khác biệt giữa các chủng được làm nổi bật, các cấu trúc A-Motif và Loop-E được làm nổi bật.

**Kết quả tối ưu phản ứng**

**Khảo sát nhiệt độ bắt cặp**

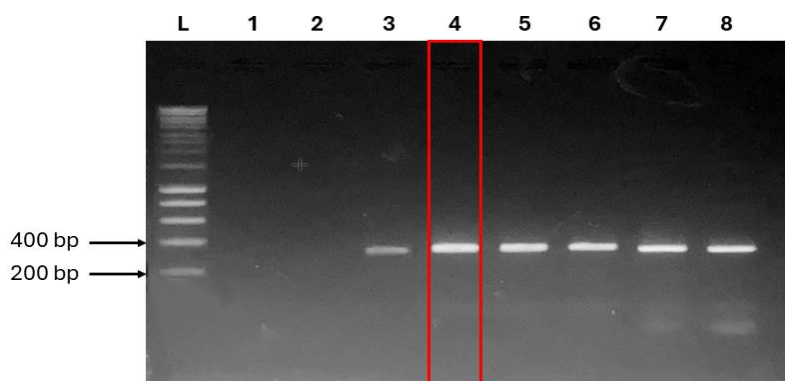
Sản phẩm PCR được điện di với thang chuẩn 100 bp để kiểm tra kích thước. Từ kết quả khảo sát nhiệt độ có thể thấy primer PCF-seq-F/R có thể bắt cặp từ 55°C đến 65°C. Độ sáng của các band không có sự khác biệt quá nhiều vì vậy nhiệt độ tối ưu cho phản ứng được chọn là 60°C, theo nhiệt độ của cặp primer ACT-F/R, để có thể thực hiện cùng một máy PCR và ở cùng một nhiệt độ.



**Hình 3. Kết quả khảo sát nhiệt độ bắt cặp của primer PCF-seq-F/R**  
 L: Thang chuẩn 100bp, 1: 55°C; 2: 55,2°C; 3: 55,6°C; 4: 56,5°C; 5: 57,6°C; 6: 59°C; 7: 60°C; 8: 62,1°C; 9: 63,2°C; 10: 64,2°C; 11: 64,7°C; 12: 65°C. Nhiệt độ tối ưu được đánh dấu bằng khung màu đỏ.

**Khảo sát nồng độ primer**

Sản phẩm PCR giảm dần độ sáng từ nồng độ 1,2 µM đến 0,0125 µM, không thấy xuất hiện band từ nồng độ primer 0,025 µM trở xuống. Trong khi đó dimer sau phản ứng giảm dần từ nồng độ 1,2 µM xuống 0,05 µM. Tại nồng độ 0,1 µM band sáng, rõ ràng và không có tạo thành dimer, vì vậy nồng độ primer này được chọn để thực hiện các xét nghiệm sau này.



**Hình 4. Kết quả khảo sát nồng độ môi tối ưu cho phản ứng**

L: Thang chuẩn; 1: 0,0125  $\mu\text{M}$ ; 2: 0,025  $\mu\text{M}$ ; 3: 0,05  $\mu\text{M}$ ; 4: 0,1  $\mu\text{M}$ ; 5: 0,2  $\mu\text{M}$ ; 6: 0,4  $\mu\text{M}$ ; 7: 0,8  $\mu\text{M}$ ; 8: 1,2  $\mu\text{M}$ .  
Nồng độ môi tối ( $\mu\text{M}$ ) ưu được đánh dấu bằng khung đỏ.

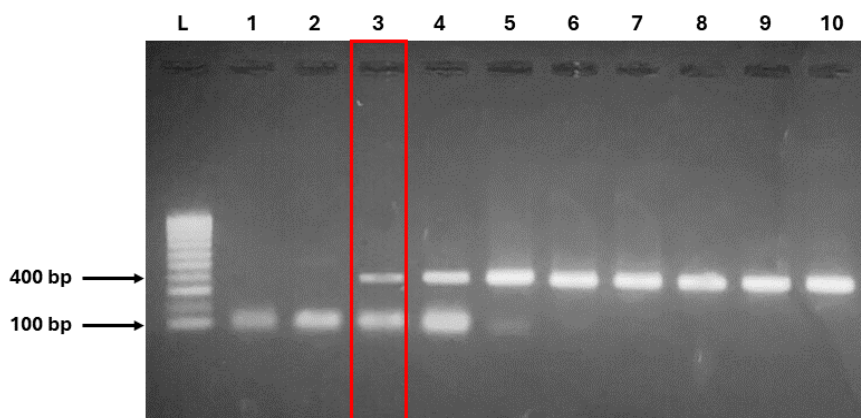
### Kiểm tra xác định giới hạn phát hiện LOD

Nồng độ plasmid thu được sau khi ly trích là 15,53 ng/ $\mu\text{L}$ , số lượng bản copies tính được theo công thức của Staroscik là  $4,3 \times 10^9$  copies/ $\mu\text{L}$ . Kết quả LOD của phản ứng được thể hiện trong hình 5 và bảng 2.

**Bảng 2. Kết quả PCR xác định giới hạn phát hiện (LOD)**

Số bản copies/ $\mu\text{L}$	Lần lặp lại									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
$10^0$	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
$10^1$	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
$10^2$	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)

(-) Âm tính; (+) Dương tính



**Hình 5. Kết quả điện di xác định LOD của xét nghiệm PCR**

(L) Thang DNA 100 bp; (1) – (10) độ pha loãng từ  $10^0$  đến  $10^9$  (copies/ $\mu\text{L}$ ); Khung màu đỏ hiển thị độ nhạy của xét nghiệm RT-PCR.

Kết quả cho thấy nồng độ plasmid thấp nhất có tỉ lệ phát hiện trên 90% là nồng độ  $10^2$ . Vậy LOD phát hiện của phản ứng PCR được xác định là  $10^2$  copies/ $\mu\text{L}$ .

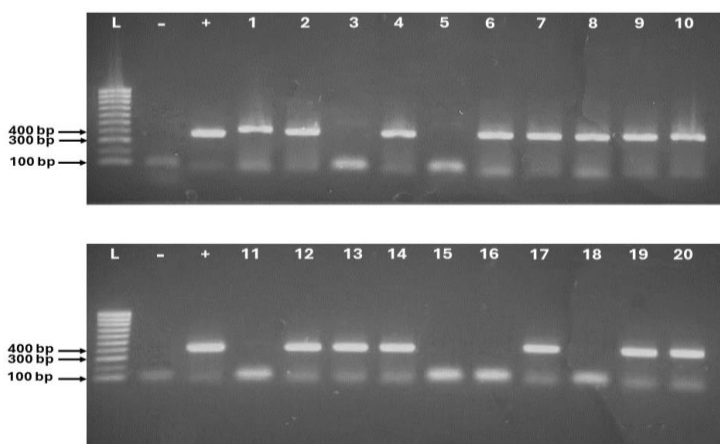
### Kết quả áp dụng quy trình trên mẫu thực địa

Kết quả trong vườn 1 đã có 3/5 mẫu dương tính với PCFVd, vườn 2 có 5/5 mẫu dương tính với PCFVd (tương ứng với 8/10 mẫu ớt bị nhiễm), vườn 3 có 3/5 mẫu dương tính với PCFVd và vườn 4 có 3/5 mẫu dương tính với PCFVd (tương ứng 6/10 mẫu cà chua bị nhiễm) được thể hiện qua bảng 3 và hình 6. Kết quả kiểm tra gen actin điều xuất hiện vạch cho thấy không có mẫu thực địa âm tính giả (Hình 7).

**Bảng 3. Kết quả áp dụng quy trình RT-PCR phát hiện PCFVd có triệu chứng trên mẫu thực địa**

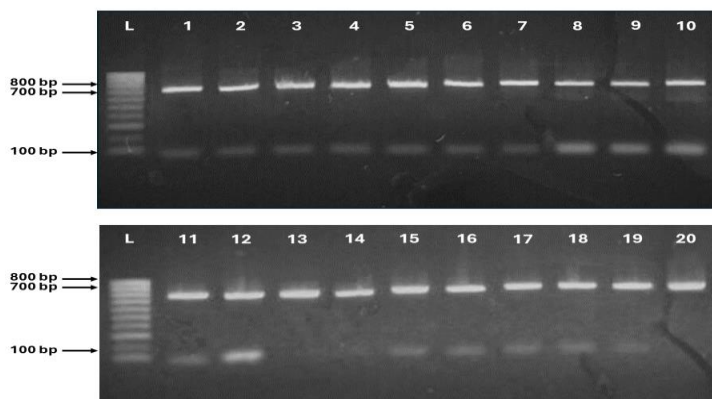
Mẫu	Triệu chứng	RT-PCR	Mẫu	Triệu chứng	RT-PCR	Mẫu	Triệu chứng	RT-PCR	Mẫu	Triệu chứng	RT-PCR	Mẫu	Triệu chứng	RT-PCR
1	(+)	(+)	5	(+)	(-)	9	(+)	(+)	13	(+)	(+)	17	(+)	(+)
2	(+)	(+)	6	(+)	(+)	10	(+)	(+)	14	(+)	(+)	18	(+)	(-)
3	(+)	(-)	7	(+)	(+)	11	(+)	(-)	15	(+)	(-)	19	(+)	(+)
4	(+)	(+)	8	(+)	(+)	12	(+)	(+)	16	(+)	(-)	20	(+)	(+)

(-) Mẫu âm tính; (+) Mẫu dương tính



**Hình 6. Kết quả áp dụng quy trình trên mẫu thực địa**

(L) Thang DNA 100 bp; (-) Đối chứng âm; (+) Đối chứng dương; (1) – (20) kết quả PCR kiểm tra PCFVd mẫu 1 đến 20.



**Hình 7. Kết quả PCR gen actin trên mẫu thực địa**

(L) Thang DNA 100 bp; (1)-(20) Kết quả PCR gen actin mẫu 1 đến 20

Yanagisawa và đồng tác giả (2017) đã sử dụng kỹ thuật RT-PCR và lấy nhiễm ngược nhằm xác định khả năng lây nhiễm của PCFVd trên cây cà chua, kết quả chỉ ra rằng với tỷ lệ lây nhiễm PCFVd qua hạt là 0 - 1,4%, trong hợp lây nhiễm từ hạt phần hoặc bố mẹ bị nhiễm là 65,3% - 69,2%. Với kỹ thuật giải trình tự NGS, dựa trên RNA-seq, Choi và đồng tác giả (2020) đã có thể xác định một số virus và viroid chưa được báo cáo ở Việt Nam. Đây là nghiên cứu đầu tiên báo cáo tám loại virus, bao gồm PVY, ChiVMV, CMV, CaCV, PCSV, PCV-2, TNRV và TMGMV, cũng như hai viroid, CLVd và PCFVd, lây nhiễm trên cây họ cà ở miền Bắc (Hà Nội, Vĩnh Phú, Ninh Bình) và Lâm Đồng, Việt Nam. Trong nghiên cứu này, chúng tôi cũng đã xác định được sự hiện diện của PCFVd trên cây cà chua, và cây ớt tại Tiền Giang. Việc có thêm một trình tự chủng PCFVd từ khu vực Tiền Giang là một bước quan trọng trong nghiên cứu và theo dõi viroid này. Bằng cách phân tích cấu trúc thứ cấp của chủng viroid này, mở ra cơ hội hiểu rõ hơn về tính chất, đặc điểm, và tiềm năng lây lan của viroid trong cộng đồng. Nhờ vào việc này, có thể xác định các biến đổi, mối liên hệ với các chủng khác, và đưa ra các biện pháp phòng ngừa và kiểm soát hiệu quả. Giúp giảm thiệt hại về kinh tế do PCFVd gây ra. Kỹ thuật RT – PCR phát hiện PCFVd với độ đặc hiệu và độ chính xác cao. Quy trình chẩn đoán được sử dụng để phát hiện PCFVd trên các mẫu thu thập từ thực địa. Ứng dụng quy trình này có thể tiết kiệm được thời gian, giúp tầm soát sớm mầm bệnh để có biện pháp ngăn chặn và xử lý kịp thời.

**KẾT LUẬN**

Xác định được thêm một trình tự nucleotide chủng PCFVd từ khu vực Tiền Giang là một bước quan trọng trong nghiên cứu và theo dõi viroid này. Kỹ thuật RT – PCR phát hiện PCFVd với nhiệt độ bắt cặp tối ưu là 60°C, nồng độ primer tối ưu cho phản ứng là 0,1 µM, độ LOD là 100 copies/µL đã được xác định và ứng dụng cho việc phát hiện PCFVd trên mẫu thực địa với tỷ lệ 14/20 mẫu cây họ cà dương tính với PCFVd.

**Tài liệu tham khảo**

- Chambers G A, Seyb A M, Mackie J, Constable F E, Rodoni B C, Letham D, Davis K, Gibbs M J (2013). First Report of Pepper chat fruit viroid in Traded Tomato Seed, an Interception by Australian Biosecurity. *Plant Disease*, 97:1386-1386.
- Choi H, Jo Y, Cho W K, Yu J, Tran P-T, Salaipeth L, Kwak H-R, Choi H-S, Kim K-H (2020). Identification of viruses and viroids infecting tomato and pepper plants in Vietnam by metatranscriptomics. *International Journal of Molecular Sciences*, 21:7565.
- Hadidi A, Flores R, Randles J W, Palukaitis P (2017). *Viroids and Satellites Elsevier Science*.
- Reanwarakorn K, Klinkong S, Porsoongnum J (2011). First report of natural infection of Pepper chat fruit viroid in tomato plants in Thailand. *New Disease Reports*, 24:6-6.
- Sambrook J, Russell D (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual 1*. 3rd Cold Spring Harbor. New York, NY:6.4-6.12.
- Staroscik A (2004). Calculator for determining the number of copies of a template. URI Genomics & Sequencing Center.
- Tseng Y-W, Wu C-F, Lee C-H, Chang C-J, Chen Y-K, Jan F-J (2021). Universal primers for rapid detection of six pospiviroids in Solanaceae plants using one-step Reverse-Transcription PCR and Reverse-Transcription Loop-mediated Isothermal Amplification. *Plant Disease*, 105:2867-2872.
- Trương Q T (2023). Nghiên cứu xây dựng quy trình phát hiện virus tommv (*Tomato mottle mosaic virus*) bằng kỹ thuật real time RT-PCR. Luận văn thạc sĩ. Khoa Khoa học Sinh học, trường đại học Nông lâm TP. HCM, Việt Nam.
- Verhoeven J T J, Botermans M, Jansen C C C, Roenhorst J W (2011). First report of Pepper chat fruit viroid in capsicum pepper in Canada. *New Disease Reports*, 23:15-15.
- Verhoeven J T J, Botermans M, Schoen R, Koenraadt H, Roenhorst J W (2021). Possible Overestimation of Seed Transmission in the Spread of Pospiviroids in Commercial Pepper and Tomato Crops Based on Large-Scale Grow-Out Trials and Systematic Literature Review, *Plants*.
- Verhoeven J T J, Jansen C, Roenhorst J, Flores R, De la Peña M (2009). Pepper chat fruit viroid: biological and molecular properties of a proposed new species of the genus Pospiviroid. *Virus Research*, 144:209-214.
- Yanagisawa H, Matsushita Y (2017). Host ranges and seed transmission of Tomato planta macho viroid and Pepper chat fruit viroid. *European Journal of Plant Pathology*, 149:211-217.

## DETECTION OF *Pepper chat fruit viroid* (PCFVd) BY RT-PCR ON *Solanaceae* IN TIEN GIANG PROVINCE

Tran Dinh Phong<sup>1</sup>, Truong Quang Toan<sup>2</sup>, Huynh Van Biet<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Biological Science, Nong Lam University, Ho Chi Minh City

<sup>2</sup>Research Institute for Biotechnology and Environment, Nong Lam University, Ho Chi Minh City

**SUMMARY**

PCFVd (*Pepper chat fruit viroid*) is a viroid that causes leaf stunting, leaf curling, small fruit on plants in the nightshade family. It spreads vigorously from diseased plants to healthy ones or through contaminated seeds. The earlier the disease manifests, the more severe the impact, resulting in reduced yield and post-harvest quality. Currently, there is no cure available for this viroid, so the most effective method for control is seed screening before planting and removing diseased plants. In this study, two pairs of primers, PCFVd-FW1/RE1 and FJJ2016-77/78, were used to sequence the entire PCFVd gene, and the primer pair PCF-seq-F/R was used to develop a PCFVd detection procedure. Subsequently, the PCR products from these primers were ligated into the pJET1.2 vector and transformed into *Escherichia coli* DH5a. The secondary structure of the PCFVd gene was determined from the sequencing results. An RT-PCR procedure was established to detect PCFVd using the primer pair PC-seq-F/R amplifying a 348 bp fragment. The optimal annealing temperature for the reaction was 60°C, the optimal primer concentration was 0.1 µM, and the limit of detection (LOD) of the RT-PCR reaction was determined to be 100 copies/µL. Out of 20 field samples, 14 tested positive for PCFVd. The study successfully established an optimized RT-PCR procedure to detect the presence of PCFVd. This is the first report of the presence of PCFVd in the Mekong Delta.

**Keywords:** *Capsicum frutescens* L, PCFVd, RT-PCR, *Solanum lycopersicum*, Viroid.

\* Author for correspondence: Tel: +84-932 056 277; Email: hvbiet@hcmuaf.edu.vn