

PHÁT TRIỂN PHƯƠNG PHÁP XÁC ĐỊNH NHANH VÀ TIN CẬY BỆNH TRISTEZA TRÊN CAM BẰNG KỸ THUẬT ONE-STEP RT-PCR

Nguyễn Hữu Kiên^{1*}, Tống Thị Hương¹, Nguyễn Thị Hòa¹, Đinh Thị Thu Ngân¹, Phạm Thị Hằng¹, Khuất Hữu Trung¹, Nguyễn Duy Phương¹, Nguyễn Lê Trang², Trần Thị Nhung³

TÓM TẮT

Bệnh tristeza trên cây có múi là bệnh hại nguy hiểm do virus *Citrus tristeza* (CTV) gây ra và dẫn đến tàn lụi cây có múi, cuối cùng làm thiệt hại kinh tế nghiêm trọng cho các vùng trồng và sản xuất trên thế giới và Việt Nam. Những năm gần đây, diện tích cam ở miền Bắc nước ta đang ngày càng bị thu hẹp do sự bùng phát của bệnh tristeza. Do vậy, nhu cầu cây giống sạch bệnh là vô cùng lớn đối với các vùng sản xuất cam quan trọng; tuy nhiên, điều này làm cho việc sản xuất cây giống không có kiểm soát sẽ dẫn đến tình trạng bùng phát nghiêm trọng hơn. Để phát hiện CTV cho cây cam một cách nhanh chóng và đảm bảo độ tin cậy, kỹ thuật One-Step RT-PCR được sử dụng như là giải pháp tối ưu. RNA tổng số được tách chiết từ mẫu lá sử dụng Kit QIAGEN RNeasy Plant Mini. Bộ kit MyTaq™ One-Step RT-PCR được sử dụng cho phản ứng RT-PCR và cặp mồi đặc trưng cho gen mã hóa protein vỏ của virus để phát hiện bệnh CTV. Các sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1% bổ sung Redsafe và hiển thị dưới máy UV quang phổ. Trường hợp các mẫu dương tính với CTV được nhận biết khi có 1 băng trùng với kích thước 672 bp; trong khi, những mẫu sạch thì không có sản phẩm khuếch đại. Như vậy, việc phát triển kỹ thuật RT-PCR một bước được sử dụng là phương pháp có độ nhạy và đáng tin cậy để phát hiện nhanh CTV trong các cây bị nhiễm bệnh ở giai đoạn sớm chưa có triệu chứng rõ ràng.

Từ khóa: Cây cam, bệnh tristeza, virus *Citrus tristeza*, RT-PCR một bước

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh tristeza là một trong những bệnh virus gây thiệt hại kinh tế lớn đối với ngành sản xuất cây có múi trên thế giới (Đặng Thị Hương và cs., 2008). Ở Việt Nam, tỷ lệ cây cam (*Citrus sinensis*) nhiễm bệnh tristeza đang ngày càng tăng nhanh tại các vùng trồng trọng yếu từ Bắc đến Nam (Nguyễn Tấn Văn và cs., 2021). Nhu cầu cây giống cam sạch bệnh virus được cho là giải pháp hữu hiệu trong việc ngăn chặn mầm bệnh (Dwiastuti *et al.*, 2019). Kỹ thuật vi ghép đỉnh sinh trưởng và giám định sự có mặt của virus *Citrus tristeza* (bằng que thử nhanh, kỹ thuật ELISA và RT-PCR) là một quy trình hoàn chỉnh cho việc sản xuất các cây giống cam/cây có múi sạch bệnh (Nguyễn Thị Bích Ngọc và cs., 2013). Việc sử dụng que thử nhanh cho thấy tính khả thi và hiệu quả khi chẩn đoán bệnh CTV ngoài đồng ruộng; tuy nhiên, kỹ thuật này có chi phí cao nếu số lượng mẫu lớn. Trong khi đó, kỹ thuật ELISA cũng là một phương pháp được sử dụng trong chẩn đoán CTV ở cây có múi phổ biến; mặc dù vậy, ELISA là kỹ thuật miễn dịch bán tự động nên kết quả xét nghiệm sẽ bị ảnh hưởng nhiều bởi các yếu tố như: con người, dụng cụ thao tác, hóa chất và thiết bị phân tích. Tóm lại, trong mỗi bước của quy trình kỹ thuật ELISA đều có khả năng ảnh hưởng đến kết quả xét nghiệm nếu như người kỹ thuật viên thực hiện không làm đúng theo quy trình đã xây dựng. Ngoài ra, RT-PCR là một phương pháp khác được biết

tới trong việc chẩn đoán bệnh do virus gây ra trên đối tượng cây trồng; tuy nhiên, phương pháp RT-PCR bằng hai bước được áp dụng là chủ yếu. Trong những năm gần đây, cùng với sự cải tiến nhằm giảm thời gian và tối ưu nhất cho phản ứng RT-PCR, thì kit One-step RT-PCR đã được phát triển.

Do vậy, nghiên cứu này được thực hiện nhằm xây dựng một phương pháp chẩn đoán bệnh CTV đối với cây cam bằng One-step RT-PCR đã tiết kiệm thời gian và đảm bảo độ tin cậy và giúp cho việc xác định được cây nhiễm bệnh ở giai đoạn sớm chưa có biểu hiện triệu chứng rõ ràng.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Mẫu lá của giống cam V2 có triệu chứng gân lá bị sưng, mô lá bị vàng (là cây đối chứng dương được xác định chỉ nhiễm bệnh tristeza) được thu từ Trại thực nghiệm Văn Giang và các mẫu lá cam được thu từ các cây sạch bệnh của hai giống cam V2 và BH được chăm sóc và lưu giữ tại Viện Di truyền Nông nghiệp.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Chẩn đoán cây bị bệnh tristeza bằng kỹ thuật ELISA

Để phát hiện sự hiện diện của virus *Citrus Tristeza* trong mẫu cây cam, phương pháp chẩn đoán bằng kỹ thuật ELISA được thực hiện theo các bước như sau:

¹ Viện Di truyền Nông nghiệp; ² Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam; ³ Trường Đại học Tân Trào

* Tác giả liên hệ, email: kienbio280888@gmail.com

- Chuẩn bị đĩa phản ứng: Kháng thể đơn dòng lai đơn tính virus tristeza được pha loãng ở nồng độ thích hợp rồi nhỏ 100 μ L vào mỗi giếng của đĩa ELISA. Sau đó ủ ở 37°C trong 2 tiếng. Bản đĩa được rửa bằng PBS-t (3 - 5 lần) trước khi thực hiện phản ứng kháng nguyên - kháng thể.

- Chuẩn bị dịch mẫu (kháng nguyên): Mẫu lá thu về được rửa sạch, tách gân rồi cân 0,5 g/mẫu. Nghiền mẫu trong 3 mL dung dịch nghiền, thu lấy 1,5 mL phần dịch cho vào ống eppendorf 2 mL, ly tâm 3,000 rpm 5 phút.

- Tạo phản ứng kháng nguyên - kháng thể: Nhỏ 100 μ L dịch mẫu vào mỗi giếng (mỗi mẫu 2 giếng), sau đó ủ ở 37°C 2 tiếng. Tiếp theo, bản đĩa được rửa bằng PBS-t (3 - 5 lần).

- Gắn enzyme: Nhỏ 100 μ L chất cộng hợp đã pha loãng ở nồng độ thích hợp vào mỗi giếng, sau đó ủ ở 37°C 2 tiếng. Tiếp theo, bản đĩa được rửa bằng PBS-t (3 - 5 lần).

- Tạo phản ứng màu: Viên phản ứng được pha trong dung môi phản ứng với nồng độ 1 mg/mL rồi nhỏ 100 μ L vào mỗi giếng, ủ ở 37°C, sau khi nhỏ dịch phản ứng 60 phút tiến hành kiểm tra kết quả bằng mắt thường và máy đo quang phổ phản ứng ELISA ở bước sóng 405 nm.

Chỉ tiêu theo dõi: Căn cứ vào màu vàng đặc trưng của phản ứng ở mẫu đối chứng bệnh và màu trong suốt ở mẫu đối chứng sạch bệnh.

+ Nếu mẫu đối chứng bệnh có màu vàng đồng thời mẫu đối chứng sạch bệnh trong suốt: Phản ứng cho kết quả tốt.

+ So sánh mẫu kiểm tra với các đối chứng bệnh và sạch bệnh.

+ Mức độ đậm, nhạt của phản ứng cũng biểu thị mức độ nặng nhẹ của mẫu nhiễm.

2.2.2. Chẩn đoán cây bị bệnh tristeza bằng One-step RT-PCR

Các mẫu lá sau khi thu thập ngoài việc chẩn đoán bằng kỹ thuật ELISA, thì tiếp tục được chẩn đoán và kiểm chứng bằng kỹ thuật One-step RT-PCR. Sự hiện diện của CTV được xác định thông qua phản ứng chuỗi polymerase ngược (RT-PCR) với cặp mồi đặc hiệu cho protein vỏ của virus tristeza.

Đầu tiên, RNA tổng số từ mẫu lá được tách chiết bằng kit QIAGEN RNeasy Plant Mini theo như hướng dẫn của nhà sản xuất. Nồng độ RNA được kiểm tra bằng máy đo quang phổ NanoDrop ND-1000 UV-Vis (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, Mỹ).

Phản ứng RT-PCR được thực hiện bằng cách sử

dụng RNA tổng số làm khuôn mẫu và kit MyTaq™ One-Step RT-PCR với thành phần phản ứng bao gồm: 12,5 μ L 2x MyTaq One-Step Mix; 1 μ L mỗi xuôi (10 μ M; 5'-CTCTAGATCTTTTGAATTATGGACGAC-3'); 1 μ L mỗi ngược (10 μ M; 5'-CGCGAATTCAACAGATCAACGTGTGT-3'); 0,25 μ L Reverse transcriptase; 0,5 μ L RiboSafe RNase Inhibitor; 0,5 μ g RNA tổng số; Bổ sung nước (không chứa RNase) đạt tổng thể tích 25 μ L.

Chu trình RT-PCR bao gồm: bước phiên mã ban đầu ở 45°C trong 20 phút; tiếp theo là kích hoạt phản ứng PCR ở 95°C trong 1 phút; tiếp theo là 40 chu kỳ (biến tính ở 95°C 10 giây; gắn mồi ở 60°C 10 giây; kéo dài ở 72°C 30 giây).

Sản phẩm khuếch đại của phản ứng RT-PCR được sử dụng cho điện di trên gel agarose 1% bổ sung Red-safe. Sau đó, sản phẩm khuếch đại được trộn với loading dye (nồng độ cuối 1X) cùng với 1 kb DNA ladder và tiến hành chạy điện di ở 50 V trong 1 giờ. Bản gel được soi trên máy UV quang phổ và chụp ảnh. Mẫu được xác định bị nhiễm CTV khi có sự hiện diện của sản phẩm khuếch đại 672 bp trong giếng tương ứng, trong khi đó mẫu sạch không có sự xuất hiện của sản phẩm khuếch đại.

2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

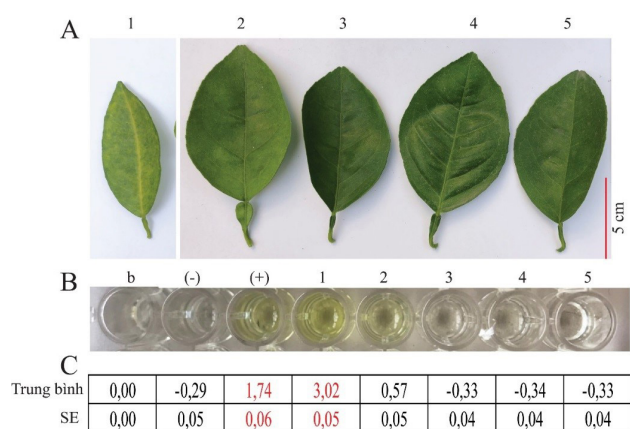
Nghiên cứu được thực hiện từ tháng 7 năm 2021 đến tháng 10 năm 2022 tại phòng Thí nghiệm Trọng điểm Công nghệ Tế bào thực vật, Viện Di truyền Nông nghiệp.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả chẩn đoán bệnh tristeza trên mẫu lá cam bằng kỹ thuật ELISA

Cây cam bị nhiễm bệnh tristeza có biểu hiện thân bị nứt, sần sùi, quả kích thước nhỏ, lá vàng úa, gân bị sưng, đường gân biến dạng được thu thập mẫu lá sử dụng làm đối chứng dương trong nghiên cứu này (Hình 1A). Cùng với đó, các cây cam cây sinh trưởng bình thường của hai giống cam V2 và BH cũng được thu mẫu lá dùng trong chẩn đoán bằng ELISA như đã mô tả ở phần phương pháp (Hình 1A).

Việc kiểm tra các mẫu cam bằng kỹ thuật ELISA được quan sát bằng mắt thường như hình 1B. Mẫu số 1 đã được xác định là bị nhiễm bệnh tristeza cho kết quả hiện màu tương tự như mẫu đối chứng dương (+); trong khi đó, mẫu đối chứng âm (-) không cho kết quả hiện màu. Trong số 4 mẫu còn lại, thì mẫu số 2 được nghi có thể cũng nhiễm bệnh tristeza khi so sánh với mẫu (-) và (+) (Hình 1B), trong khi mẫu số 3, 4 và 5 được xác định không có sự xuất hiện của CTV.



Hình 1. Kết quả chẩn đoán bệnh tristezza từ các mẫu lá cam bằng ELISA

Chú thích: (A), các mẫu cam được thu nhận từ nhà lưới: (1, mẫu lá cam được xác định nhiễm bệnh tristezza của giống V2; 2-3, mẫu lá của giống V2; 4-5, mẫu lá của giống BH). (B), Kết quả chẩn đoán tristezza bằng ELISA được quan sát bằng mắt thường. (C), Kết quả chẩn đoán tristezza bằng ELISA được ghi nhận bằng máy đo quang phổ. b, dung dịch blank; (-), đối chứng âm; (+), đối chứng dương; 1, mẫu lá cam được xác định nhiễm bệnh tristezza của giống V2; 2-3, mẫu lá của giống V2; 4-5, mẫu lá của giống BH. Kết quả trong bảng thể hiện giá trị trung bình của 3 lần đọc và SE là độ sai lệch giữa 3 lần. Thí nghiệm đã được lặp lại 3 lần để đảm bảo độ tin cậy.

Để có thêm cơ sở khoa học, các phản ứng ELISA này được đọc bằng máy đo quang phổ ở bước sóng 405 nm. Kết quả cho thấy, mẫu (-) có giá trị nhỏ hơn 0 và mẫu (+) là $1,74 \pm 0,06$, đây sẽ là mẫu đối chứng âm và dương cho việc chẩn đoán các mẫu cam trong nghiên cứu. Trong số 5 mẫu cam phân tích, mẫu số 1 có chỉ số $3,20 \pm 0,05$, gần cao gấp đôi chỉ số của mẫu đối chứng dương (Hình 1C). Kết quả này khẳng định mẫu số 1 hoàn toàn bị nhiễm bệnh tristezza như đã quan sát bằng mắt thường (Hình 1A và B). Trong số 4 mẫu còn lại, mẫu số 3,4 và 5 được xác định không nhiễm bệnh (Hình 1C); tuy nhiên, mẫu số 2 giá trị chỉ

đạt $0,57 \pm$ thấp hơn 3 lần khi so sánh với đối chứng dương, do vậy được nghi ngờ nhiễm tristezza, kết quả này cũng phù hợp với quan sát trước đó (Hình 1B).

Chẩn đoán bệnh tristezza trên cây cam bằng ELISA được coi là một trong những kỹ thuật sử dụng phổ biến để phát hiện protein virus thông qua kháng thể. Tuy nhiên, mặt hạn chế của kỹ thuật này cần số lượng mẫu phân tích đủ lớn cần thực hiện nhiều các bước thủ công và khi cây ở giai đoạn chớm bệnh chưa có triệu chứng rõ ràng sẽ rất khó có thể đưa ra kết luận chính xác. Do vậy, một phương pháp có thể chẩn đoán nhanh, chính xác, đặc hiệu và đảm bảo độ tin cậy ở giai đoạn sớm sẽ rất có ý nghĩa trong việc chẩn đoán bệnh CTV.

3.2. Kết quả chẩn đoán bệnh tristezza trên mẫu lá cam bằng kỹ thuật One-step RT-PCR

Như đã biết, để xác định được nguồn bệnh do virus gây ra bằng kỹ thuật PCR thì bước đầu tiên là phiên mã ngược các đoạn mRNA của virus sang cDNA trước khi tiến hành các bước tiếp theo. Bộ kit One-step RT-PCR là sự kết hợp của việc phiên mã ngược để tổng hợp cDNA cho PCR ngay trong cùng một phản ứng duy nhất, điều này sẽ tiết kiệm thời gian trong phân tích RT-PCR mà vẫn đảm bảo tính chính xác và đảm bảo tin cậy. Do vậy, ở nghiên cứu này được sử dụng kỹ thuật One-step RT-PCR để xác định sự hiện diện của CTV đối với các mẫu lá cam đã chẩn đoán ELISA ở trên.

Cụ thể, các mẫu lá cam của các cây như mô tả (Hình 1A) và chẩn đoán bằng ELISA (Hình 1B-C) được sử dụng cho việc xây dựng phương pháp chẩn đoán bệnh tristezza bằng RT-PCR một bước.

Đầu tiên, các mẫu lá sau khi thu nhận được tiến hành tách chiết RNA theo như mô tả ở phần phương pháp.

Bảng 1. Kết quả tách chiết RNA tổng số các mẫu lá cam

STT	Nồng độ RNA (ng/μL)	260/280	260/230	A260	A280
1	230,90	2,14	1,92	5,77	2,69
2	146,50	2,10	1,99	3,66	1,74
3	362,40	2,13	2,29	9,06	4,25
4	523,00	2,07	2,28	13,08	6,33
5	332,60	2,15	2,18	8,31	3,87
Trung bình ± SE	$319,08 \pm 56,99$	$2,12 \pm 0,01$	$2,13 \pm 0,07$		

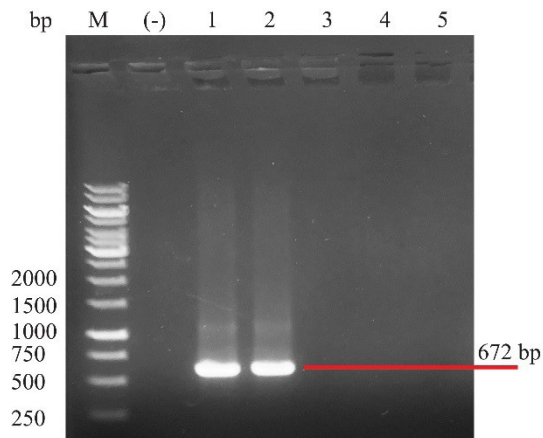
Chú thích: 1, đối chứng dương (mẫu lá cam được xác định nhiễm bệnh tristezza của giống V2); 2-3, mẫu lá của giống V2; 4-5, mẫu lá của giống BH.

Kết quả tách chiết RNA tổng số cho thấy, nồng độ RNA trung bình của 5 mẫu đạt $391,08 \text{ ng}/\mu\text{L}$; nồng độ thấp nhất là $146,5 \text{ ng}/\mu\text{L}$ và cao nhất đạt $523 \text{ ng}/\mu\text{L}$. Chỉ số 260/280 trung bình của các mẫu đạt 2,12 đều

đảm bảo độ tinh khiết trong khoảng cho phép; trong khi đó, chỉ số 260/230 trung bình của các mẫu đạt 2,13 cho thấy các mẫu không có nhiễm các tạp chất còn tồn dư trong quá trình tách chiết và đảm bảo độ

tin cậy cho các phân tích.

Tiếp theo, các mẫu RNA tổng số được sử dụng trực tiếp cho phản ứng RT-PCR sử dụng bộ kit MyTaq™ One-Step RT-PCR cùng với cặp mồi đặc hiệu mã hóa cho protein vỏ của virus như trình bày ở phần phương pháp.



Hình 2. Kết quả xác định bệnh tristeza của các mẫu cam sử dụng RT-PCR một bước với cặp mồi đặc hiệu

Chú thích: (M), GeneRuler 1kb DNA ladder; (-), đối chứng âm; 1, đối chứng dương (mẫu lá cam được xác định nhiễm bệnh tristeza của giống V2); 2-3, mẫu lá của giống V2; 4-5, mẫu lá của giống BH. Thí nghiệm đã được lặp lại 3 lần để đảm bảo độ tin cậy.

Kết quả cho thấy, sản phẩm khuếch đại của mẫu đối chứng dương (mẫu được xác định nhiễm bệnh tristeza và chẩn đoán bằng ELISA như Hình 1) bằng One-step RT-PCR có kích thước 672 bp đúng với chiều dài đầy đủ của trình gen mã hóa protein vỏ của virus tristeza. Một mẫu nghi nhiễm như đã chẩn đoán bằng ELISA ở trên cũng khuếch đại được sản phẩm có kích thước trùng với mẫu đối chứng dương. Trong khi đó, các mẫu lá của cây khỏe không thấy có sản phẩm khuếch đại của gen mã hóa vỏ protein với cặp mồi đặc hiệu (Hình 2). Như vậy, trong số năm mẫu sử dụng cho phân tích RT-PCR một bước thì có hai mẫu

xác định là bị nhiễm CTV và 3 mẫu sạch bệnh. Kết quả này hoàn toàn đảm bảo độ chính xác khi so sánh với kết quả ELISA (Hình 1B-C; Hình 2).

Trong nghiên cứu này, kỹ thuật RT-PCR một bước đã phát hiện được CTV trong các mẫu thu thập từ ngoài vườn cũng như trong mẫu tiềm ẩn mặc dù các cây thu mẫu chưa thấy bất kỳ loại triệu chứng CTV nào trong quá trình thu thập. Việc sử dụng RT-PCR để xác định CTV đã được một số nghiên cứu áp dụng. Một nghiên cứu trước đây của Hung và cộng sự (2000) đã áp dụng kỹ thuật One-step RT-PCR trong chẩn đoán CTV bằng sự kết hợp giữa phiên mã ngược (reverse transcription, RT) và phản ứng PCR trong cùng một phản ứng sử dụng đệm tối ưu và enzyme đặc hiệu. Tương tự, Latanya và cộng sự (2010) sử dụng RT-PCR để phát hiện CTV trong vườn nho, cam ngọt, cam chua ở Jamaica. Trong khi đó, kỹ thuật RT-PCR được sử dụng để phát hiện các chủng CTV ở California và quýt Satsuma (*Citrus unshiu*) ở Hàn Quốc và quýt từ đồi Darjeeling ở Ấn Độ (Nikolaeva *et al.*, 1995; Kim *et al.*, 2000). Nghiên cứu của Harper và cộng sự (2009) sử dụng cả 2 phương pháp RT-PCR một bước và hai bước để xác định CTV ở New Zealand. Trong nghiên cứu của Ganesh và cộng sự (2018) đã sử dụng kit One-step RT-PCR để phát hiện nhanh và tin cậy bệnh CTV ở vườn cam của vùng Meghalaya, Ấn Độ. Ngoài ra, nghiên cứu của Nguyễn Tấn Văn và cộng sự (2021) đã tiến hành cải tiến phương pháp tách chiết RNA tổng số từ mẫu lá cây có mùi để chẩn đoán CTV bằng RT-PCR cho vùng sản xuất cam ở đồng bằng sông Cửu Long. Như vậy, cho thấy One-step RT-PCR là phương pháp hoàn toàn đảm bảo độ tin cậy trong chẩn đoán bệnh CTV ở cây cam/cây có múi khác.

3.3. Sự khác biệt giữa phương pháp chẩn đoán nhanh bệnh tristeza bằng One-step RT-PCR so với phương pháp thông thường

Bảng 2. Các tiêu chí so sánh giữa phương pháp One-step RT-PCR so với phương pháp thông thường

Tiêu chí	Phương pháp thông thường	Chẩn đoán nhanh (One-step RT-PCR)
Phương pháp	Quan sát triệu chứng, phân lập virus, hoặc dùng kháng thể (ELISA)	Khuếch đại RNA virus trực tiếp từ mẫu
Thời gian	Vài ngày đến vài tuần (quan sát triệu chứng hoặc kiểm tra ELISA)	4 - 6 giờ
Độ chính xác	Phụ thuộc kinh nghiệm, dễ nhầm lẫn với bệnh khác, hoặc nhiễm chéo	Cao, nhờ khả năng phát hiện RNA đặc hiệu của virus
Độ nhạy	Thấp hơn, phụ thuộc vào giai đoạn bệnh	Cao hơn, phát hiện ngay cả khi tải lượng virus thấp
Khả năng ứng dụng quy mô lớn	Hạn chế do yêu cầu nhiều bước thủ công	Dễ dàng hơn, có thể tối ưu hóa để kiểm tra nhiều mẫu cùng lúc

Qua bảng 2, đã chỉ ra điểm nổi bật của One-step RT-PCR so với các phương pháp thông thường ở một số khía cạnh như: nhanh chóng hoàn thành trong vài

giờ, độ chính xác cao tránh được sai số từ quan sát triệu chứng hoặc phản ứng chéo trong ELISA, thích hợp cho quy mô lớn bởi quy trình tự động hóa và tích

hợp, giúp xử lý đồng loạt nhiều mẫu. Kỹ thuật này đặc biệt hữu ích trong việc phản ứng nhanh với dịch bệnh hoặc kiểm soát cây giống sạch bệnh.

IV. KẾT LUẬN

Nghiên cứu này khẳng định One-step RT-PCR là phương pháp chẩn đoán CTV nhanh, hiệu quả và đáng tin cậy, hỗ trợ kịp thời việc kiểm soát cây giống cam sạch bệnh tristeza trên quy mô lớn tại Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Đặng Thị Hương, Nguyễn Minh Phương, Lê Văn Sơn, Lê Trần Bình, Chu Hoàng Hà**, 2008. Nghiên cứu đa dạng di truyền của vi rút gây bệnh tristeza trên cây có múi ở đồng bằng sông Cửu Long. *Tạp chí Nông nghiệp & Phát triển nông thôn*, 11: 13-17.
- Nguyễn Tấn Văn, Đoàn Thị Kiều Tiên, Huỳnh Kỳ, Nguyễn Thị Thu Nga**, 2021. Đánh giá hiệu quả các phương pháp ly trích RNA phục vụ giám định bệnh tristeza trên cây có múi và bước đầu khảo sát tỷ lệ nhiễm bệnh trên cây cam sành tại một số cơ sở kinh doanh giống ở đồng bằng sông Cửu Long. *Tạp chí Bảo vệ thực vật*, 3: 35-44.
- Nguyễn Thị Bích Ngọc, Lê Mai Nhất, Ngô Vinh Viễn, Phạm Thị Dung, Nguyễn Nam Dương, Nguyễn Văn Việt**, 2013. Nghiên cứu cải tiến kỹ thuật vi ghép đỉnh sinh trưởng trên cây có múi. *Tạp chí Bảo vệ thực vật*, 5: 36-40.
- Dwiastuti M.E., Wuryantini S., Sugiyatno A., Supriyanto A.**, 2019. Seed health evaluation in the process of free-virus citrus seed production on kampar regency, Riau province of Indonesia. *Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences*, 86 (2): 273-282.
- Ganesh T., Rajesh T., Banerjee A., Rymbai H.**, 2018. One Step RT-PCR method for quick and reliable detection of citrus tristeza virus (CTV) in Mid-Hills of Meghalaya. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 7: 1296-1300.
- Harper S.J., Dawson T.E., Pearson M.N.**, 2009. Complete genome sequences of two distinct and diverse Citrus tristeza virus isolates from New Zealand. *Archives of Virology*, 154: 1505-1510.
- Hung T.H., Wu M.L., Su H.J.**, 2000. A rapid method based on the one-step reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) technique for detection of different strains of Citrus tristeza virus. *Journal of Phytopathology*, 148: 469-475.
- Kim D., Hyun J., Hwang H., Lee S.**, 2000. RT-PCR detection of *Citrus tristeza virus* from early Satsuma mandarin and Yuzu in Cheju island. *The Plant Pathology Journal*, 16 (1): 48-51.
- Latanya C., Fisher-Paula F., Tennant-Wayne A., McLaughlin**, 2010. Detection and characterization of *Citrus tristeza virus* stem pitting isolates in Jamaica. *European Journal of Plant Pathology*, 127: 1-6.
- Nikolaeva O.V., Karasev A.V., Gumpf D.J., Lee R.F., Garnsey S.M.**, 1995. Production of polyclonal antisera to the coat protein of *Citrus tristeza virus* expressed in *Escherichia coli*: application for immunodiagnosis. *Phytopathology*, 85: 691-694.

Developing a rapid and reliable method for detecting Tristeza in oranges using one-step RT-PCR technique

Nguyen Huu Kien, Tong Thi Huong, Nguyen Thi Hoa, Dinh Thi Thu Ngan, Pham Thi Hang, Khuat Huu Trung, Nguyen Duy Phuong, Nguyen Le Trang, Tran Thi Nhung

Abstract

Tristeza is a dangerous disease caused by Citrus tristeza virus (CTV) and leads to the destruction of citrus trees, which causes the serious economic losses to growing areas in the world and Vietnam. In recent years, the area of orange in the North of our country has been increasingly narrowed due to increasing CTV. Therefore, the demand for disease-free seedlings is extremely large for important orange production regions; however, this makes the uncontrolled production of seedlings lead to more serious outbreaks. To detect CTV for orange seedlings quickly and reliably, the one-step RT-PCR technique is used as an optimal solution. Total RNA was extracted from leaf samples using the QIAGEN RNeasy Plant Mini Kit. The MyTaq™ One-Step RT-PCR kit was used to detect CTV with the specific primer pair for the coat protein gene of virus. PCR products were electrophoresed on 1% agarose gel supplemented with Redsafe solution and visualized under UV spectrophotometer. The CTV positive samples were identified by the presence of a band of 672 bp; while the clean samples had no amplification product. Therefore, one-step RT-PCR is found as the most sensitive and reliable method for quick detection of CTV in infected plants without obvious symptoms.

Keywords: Orange, Tristeza disease, citrus tristeza virus, one-step RT-PCR

Ngày nhận bài: 17/7/2024

Ngày phản biện: 16/12/2024

Người phản biện: TS. Lê Mai Nhất

Ngày duyệt đăng: 26/12/2024