

PHÂN LẬP, DÒNG HÓA VÀ XÂY DỰNG QUY TRÌNH LÂY NHIỄM NHÂN TẠO POTATO VIRUS Y TRÊN CÂY KHOAI TÂY

Trần Thị Huyền¹, Nguyễn Hồng Nhung¹, Vũ Thị Mỹ¹, Phan Quyền¹,
Phạm Quang Huy¹, Nguyễn Thanh Trúc^{1,4}, Nguyễn Trường Vũ^{1,5}, Chu Hoàng Hà^{1,2},
Oleg Stanislavovich Nikonov³, Ekaterina Yu Nikonova³, Đỗ Tiến Phát^{1,2*}

TÓM TẮT

Nghiên cứu này nhằm xây dựng quy trình lây nhiễm nhân tạo Potato virus Y (PVY) trên cây khoai tây. Hai mẫu cây nghi nhiễm PVY được thu thập từ các vùng trồng khoai tây tại Hà Nội. Sự có mặt của chủng PVY^{NTN} trên các mẫu nghi nhiễm được kiểm chứng thông qua phương pháp RT-PCR với mỗi đặc hiệu cho gen CP và phân tích trình tự Sanger. Các chủng virus sau đó được dòng hóa và nhân lên trên cây thuốc lá mô hình *Nicotiana benthamiana*. Nguồn PVY^{NTN} đã dòng hóa này được lây nhiễm nhân tạo thành công trên cây khoai tây Atlantic. Các triệu chứng bệnh điển hình được ghi nhận, sự có mặt của PVY^{NTN} trong các mẫu cây khoai tây có biểu hiện bệnh được khẳng định thông qua phương pháp RT-PCR. Từ các kết quả thu được, một quy trình lây nhiễm nhân tạo PVY trên cây khoai tây đã được thiết lập với thông tin chi tiết. Đây là cơ sở quan trọng cho các nghiên cứu tiếp theo trong đánh giá tính kháng bệnh PVY trên cây khoai tây và có thể mở rộng phạm vi ứng dụng trên các cây trồng khác và đối tượng virus gây bệnh khác.

Từ khóa: Khoai tây, *Nicotiana benthamiana*, Potato virus Y (PVY), PVY^{NTN}, quy trình lây nhiễm

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây khoai tây (*Solanum tuberosum* L.) giữ vai trò quan trọng trong an ninh lương thực toàn cầu, tuy nhiên, năng suất và chất lượng thường bị suy giảm do nhiều tác nhân gây bệnh, trong đó virus là nhóm phổ biến và gây thiệt hại nghiêm trọng nhất (Kreuze *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2011). Khoảng 50 loại virus đã được ghi nhận có khả năng gây nhiễm trên khoai tây trên toàn thế giới, Potato virus Y (PVY) được xem là một trong những tác nhân nguy hiểm nhất do phân bố rộng và ảnh hưởng lớn đến sản xuất, sinh trưởng phát triển, năng suất và chất lượng cây trồng (Scholthof *et al.*, 2011). PVY có mức độ đa dạng di truyền cao, các chủng tái tổ hợp như PVY^{NTN} và PVY^{N-Wi} đang dần thay thế các chủng cổ điển (Karasev & Gray, 2013; Chikh-Ali *et al.*, 2014). Một số chủng có khả năng gây hoại tử vòng trên củ (PTNRD), làm giảm giá trị thương phẩm (Lorenzen *et al.*, 2006).

Phát triển và sử dụng giống kháng bệnh là giải pháp hiệu quả trong sản xuất khoai tây. Gần đây, công nghệ chỉnh sửa gen CRISPR/Cas đã mở ra hướng đi mới trong chọn tạo giống kháng virus, thông qua việc gây đột biến các gen nhiễm như họ gen *eIF4E* nhằm tăng khả năng kháng PVY (Yoon *et al.*, 2020; Kuroiwa *et al.*, 2022; Le *et al.*, 2022; Noreen *et al.*, 2022). Trong đánh giá tính kháng bệnh, lây nhiễm nhân tạo là phương pháp phổ biến nhờ tính hiệu quả, chính xác và khả năng kiểm soát tốt điều kiện thí nghiệm (Wang *et al.*, 2022).

Ở Việt Nam, phương pháp lây nhiễm nhân tạo đã

được áp dụng trong đánh giá mức độ nhiễm bệnh và tính kháng của cây trồng với một số loại virus, trong đó có PVY. Tuy nhiên, còn thiếu những quy trình chi tiết với các bước cụ thể làm cơ sở cho việc nâng cao hiệu quả của quá trình lây nhiễm cũng như đảm bảo tính tin cậy của kết quả đánh giá. Nhằm phục vụ đánh giá tính kháng PVY của các dòng khoai tây chỉnh sửa gen tạo được bằng hệ thống CRISPR/Cas9, nghiên cứu này được triển khai nhằm xây dựng quy trình lây nhiễm nhân tạo sử dụng chủng virus phân lập từ các vùng trồng khoai tây tại Hà Nội. Quy trình bao gồm các bước: thu thập mẫu nghi nhiễm, kiểm chứng virus, dòng hóa và tăng sinh, lây nhiễm trên cây chủ và đánh giá triệu chứng bằng hình thái và phương pháp phân tử. Việc kết hợp giữa phân tích đặc điểm hình thái và kỹ thuật phân tử đảm bảo tính chính xác, độ tin cậy và khả năng lặp lại cao của quy trình đã được xây dựng. Kết quả nghiên cứu đã cung cấp cơ sở quan trọng cho các nghiên cứu tiếp theo trong đánh giá tính kháng PVY trên cây khoai tây và có thể mở rộng cho các virus khác cũng như các đối tượng cây trồng khác.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Cây khoai tây (*Solanum tuberosum*) giống Atlantic sạch bệnh có nguồn gốc từ Liên bang Nga được nhân giống thông qua nuôi cấy mô; cây thuốc lá mô hình (*Nicotiana benthamiana*) 6 tuần tuổi.

Các mẫu cây khoai tây bệnh nghi nhiễm virus PVY được thu thập trực tiếp ngoài đồng ruộng tại xóm Đồng,

¹ Viện Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

² Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

³ Viện Nghiên cứu Protein, Viện Hàn lâm Khoa học Nga; ⁴ Trường Đại học Bách khoa, Đại học Đà Nẵng

⁵ Học viện Nông nghiệp Việt Nam

* Tác giả liên hệ, email: dtphat@ib.ac.vn

xã Đông Anh và xóm Đường, xã Thư Lâm, TP. Hà Nội.

Bộ kit RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit; bộ kit GeneJET Gel Extraction Kit.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Thu thập nguồn PVY ngoài thực địa

Các mẫu cây khoai tây bệnh nghi nhiễm virus PVY được thu thập trực tiếp ngoài đồng ruộng tại 2 địa điểm trồng khoai tây tại Hà Nội: xóm Đồng, xã Đông Anh và xóm Đường, xã Thư Lâm. Việc nhận diện cây bệnh dựa trên các triệu chứng đặc trưng bao gồm xoắn lá, biến dạng lá hoặc thể khảm lá.

2.2.2. Tách dòng và định danh virus PVY thông qua giải trình tự gen CP

RNA tổng số được tách chiết từ các mẫu lá khoai tây nghi nhiễm PVY sử dụng bộ hóa chất chuyên dụng (PureLink Plant RNA Reagent, Invitrogen) theo các bước được nhà sản xuất hướng dẫn. cDNA được tổng hợp từ mẫu RNA tổng số đã được tách chiết, thông qua bộ kit RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (ThermoFisher Scientific). Phân đoạn gen đặc thù của gen CP được nhân bản thông qua phương pháp RT-PCR với cặp mồi đặc hiệu CP-PVY_F (5'-ATGCCAACTGYGATGAATGG-3') và CP-PVY_R (5'-CTCTGTGTTTTCTCTTGTGTAC-3'). Sản phẩm PCR sau đó được điện di trên gel agarose 1% để kiểm chứng sự có mặt và kích thước phân đoạn gen CP được nhân bản. Các sản phẩm RT-PCR với kích thước dự đoán được tinh sạch sử dụng bộ kit GeneJET Gel Extraction Kit (ThermoFisher Scientific) và dùng cho giải trình tự bằng phương pháp Sanger tại Công ty LOBI Việt Nam. Trình tự sau đó được so sánh với các trình tự đã được công bố trên NCBI và cây phân loại được xây dựng bằng phần mềm MEGA12.

2.2.3. Nhân dòng PVY sử dụng cây thuốc lá mô hình

Cây thuốc lá mô hình (*Nicotiana benthamiana*) 6 tuần tuổi được sử dụng làm ký chủ cho việc dòng hóa và nhân nhanh PVY. Quy trình lây nhiễm được thực hiện theo phương pháp của Le và cộng sự (2022) với một số điều chỉnh nhỏ. Các mẫu lá thuốc lá có biểu hiện bệnh đặc trưng tiếp tục được thu thập và kiểm tra sự có mặt của PVY bằng

phương pháp RT-PCR như trình bày ở trên. Cây thuốc lá mang PVY được lưu giữ làm nguồn bệnh phục vụ công tác lây nhiễm nhân tạo trong các phân tích tiếp theo.

2.2.4. Lây nhiễm và đánh giá triệu chứng bệnh PVY trên cây khoai tây

Dung dịch lây nhiễm được chuẩn bị từ mẫu lá cây *N. benthamiana* nhiễm bệnh PVY ở phần trên. Quá trình chuẩn bị dung dịch và lây nhiễm được thực hiện tương tự như các bước tiến hành với cây thuốc lá mô hình theo phương pháp của Le và cộng sự (2022). Trong đó, cây khoai tây 4 tuần tuổi, được ra ngôi trên giá thể gồm perlite và vermiculite (3:1), được sử dụng làm đối tượng lây nhiễm nhân tạo PVY. Thí nghiệm được tiến hành với 3 lần lặp, mỗi lần lây nhiễm trên 9 cây và sử dụng 3 cây đối chứng không lây nhiễm để so sánh. Sau lây nhiễm, các cây khoai tây tiếp tục được chăm sóc và theo dõi trong 4 tuần trong buồng sinh trưởng với chu kỳ chiếu sáng 16 giờ sáng/8 giờ tối, ẩm độ 70 - 80% để đánh giá triệu chứng và mức độ nhiễm. Mẫu lá khoai tây có triệu chứng bệnh khác nhau được thu thập và kiểm chứng sự tồn tại của PVY thông qua phản ứng RT-PCR với cặp mồi đặc hiệu và phương pháp tiến hành như bên trên.

2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện từ tháng 12 năm 2025 đến tháng 03 năm 2026 tại Phòng Công nghệ Tế bào Thực vật, Viện Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Tìm kiếm và thu thập mẫu bệnh

Nhằm thu thập chính xác nguồn PVY gây bệnh trên thực tế đồng ruộng tại Hà Nội, tiến hành khảo sát và tìm kiếm mẫu nghi nhiễm bệnh trên các ruộng trồng khoai tây tại xóm Đồng, xã Đông Anh và xóm Đường, xã Thư Lâm trong vụ Đông Xuân 2026. Qua sàng lọc, 02 mẫu khoai tây nghi nhiễm PVY đã được lựa chọn dựa trên các triệu chứng điển hình như hiện tượng khảm lá, xuất hiện các đốm với mức độ từ nhẹ đến nặng hoặc lá bị nhăn, biến dạng và có kích thước nhỏ bất thường. Một số trường hợp còn ghi nhận sự xuất hiện của các vết hoại tử trên lá (Hình 1).

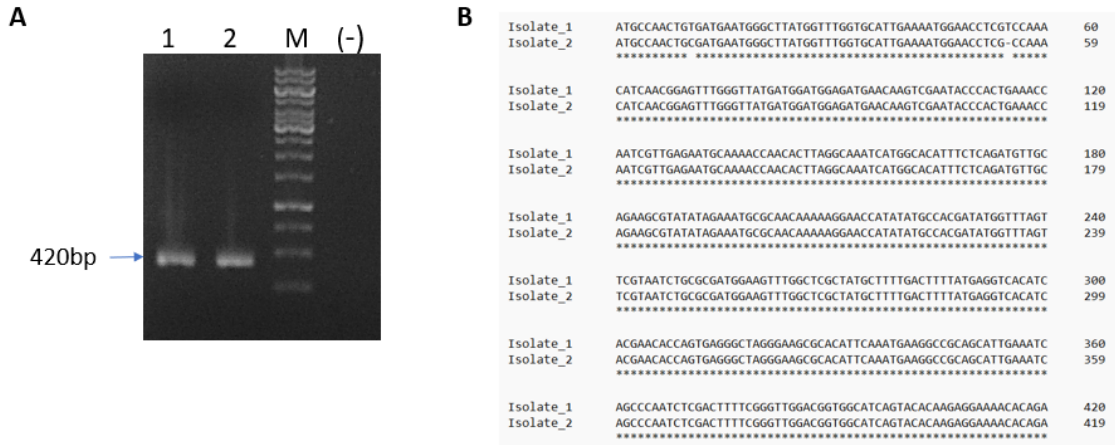


Hình 1. Mẫu khoai tây nghi nhiễm virus PVY

Ghi chú: (A) Mẫu khoai tây nghi nhiễm bệnh thu thập tại xóm Đồng, xã Đông Anh; (B, C) Lá và thân mẫu khoai tây nghi nhiễm bệnh PVY thu thập tại xóm Đường, xã Thư Lâm.

Quan sát thực tế cho thấy các cây khoai tây nhiễm bệnh nặng thường phát triển kém, còi cọc hơn so với các cây không có biểu hiện bệnh trên cùng một thửa ruộng. Ngược lại, các cây nhiễm nhẹ vẫn có thể duy trì sự phát triển bình thường ở các lá phía dưới (lá già); triệu chứng bệnh chủ yếu biểu hiện ở các lá phía trên, đặc biệt là các lá non, lá ngọn. Quan sát thực tế cho thấy bệnh do PVY gây ra có kiểu hình tương đồng và xuất hiện với tần suất cao tại hai vùng trồng khoai tây được khảo sát trong vụ Xuân 2026.

3.2. Xác định chủng PVY gây bệnh trên khoai tây tại 2 vùng trồng ở Hà Nội



Hình 2. Nhân dòng và giải trình tự gen CP của PVY từ các mẫu khoai tây nghi nhiễm bệnh

Ghi chú: (A) Điện di sản phẩm phản ứng RT-PCR với cặp mồi CP-PVY_F/R. M: Thang DNA 1 kb (Thermo Scientific); (-): Mẫu đối chứng âm (cây khoai tây in vitro sạch bệnh); (B) So sánh trình tự nucleotide 2 phân đoạn CP phân lập được từ mẫu khoai tây bệnh thu tại 2 địa điểm khác nhau.

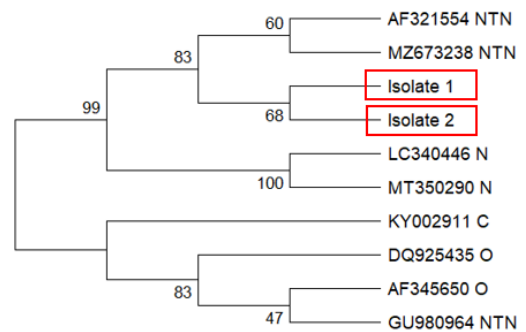
Phản ứng RT-PCR được thực hiện thông qua việc sử dụng cùng một lượng RNA tổng số làm khuôn. Do đó, kết quả RT-PCR thu được có thể được sử dụng để so sánh tương đối mức độ nhiễm virus giữa các mẫu thu thập. Trong nghiên cứu này, 2 mẫu khoai tây được thu thập tại các vùng trồng khác nhau có mức độ nhiễm bệnh tương đương nhau.

Kết quả phân tích trình tự thu được phân đoạn gen CP của 2 mẫu bệnh có sự tương đồng rất cao (Hình 2B). Cụ thể, trong toàn bộ trình tự phân đoạn gen CP dài 420 bp, chỉ ghi nhận 02 điểm sai khác. Trong đó, sự thay đổi 01 nucleotide ở vị trí 11 (T ở isolate 1 và C ở isolate 2); thêm 1 nucleotide T ở vị trí 55 của isolate 1. Sự thay đổi này có thể do các đột biến xuất hiện tự nhiên của các chủng PVY khác nhau. Kết quả so sánh trình tự phân đoạn gen CP từ 2 chủng phân lập với trình tự tương ứng của các chủng PVY (PVY^O, PVY^N, PVY^{NTN}) trên GenBank cho thấy trình tự gen CP của 2 mẫu phân lập có độ tương đồng cao với nhóm PVY^{NTN}. Cây phát sinh chủng loại được xây dựng dựa trên trình tự gen CP của các nhóm virus PVY cũng cho thấy các chủng PVY phân lập từ các mẫu bệnh tại Hà Nội được xếp chung

Nhằm kiểm chứng sự có mặt của PVY trên mẫu khoai tây nghi lây nhiễm bệnh thu thập tại hai vùng trồng tại Hà Nội, tiến hành nhân dòng, tách dòng và giải trình tự phân đoạn gen CP của virus này. Kết quả điện di sản phẩm RT-PCR trên gel agarose với cặp mồi đặc hiệu của gen CP cho thấy cả 2 mẫu khoai tây thu thập đều ghi nhận sự nhân dòng của phân đoạn gen CP với kích thước khoảng 420 bp (Hình 2A). Kết quả này bước đầu xác nhận các mẫu khoai tây thu thập tại hai vùng trồng nêu trên đã bị lây nhiễm PVY.

nhóm với nhóm PVY^{NTN} (Hình 3).

Các nghiên cứu trước đây cho thấy, PVY^{NTN} có thể hình thành thông qua tái tổ hợp di truyền giữa hai nhóm PVY^O và PVY^N (Karasev & Gray 2013; Lorenzen *et al.*, 2006) và phân bố ở nhiều vùng trên thế giới, trong đó có Việt Nam (Schubert *et al.*, 2015). Mặc dù số lượng mẫu phân tích không nhiều, kết quả thu được trong nghiên cứu này cho thấy chủng PVY^{NTN} đang xuất hiện tại các vùng trồng khoai tây phổ biến tại khu vực Hà Nội.



Hình 3. Cây phân loại so sánh trình tự CP của PVY đã phân lập và các trình tự đã được công bố trên NCBI

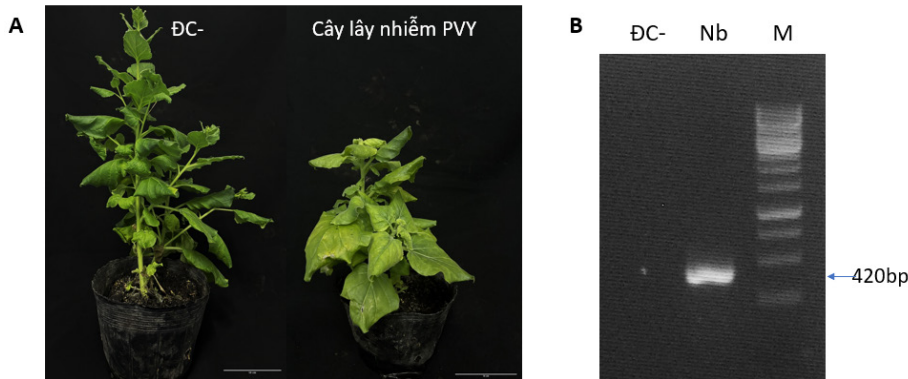
3.3. Dòng hóa và tăng sinh PVY sử dụng cây thuốc lá mô hình *Nicotiana benthamiana*

Thông thường, các mẫu khoai tây nhiễm PVY thu thập ngoài thực địa thường có mật độ virus thấp và không đồng đều. Ngoài ra, các mẫu này có thể mang theo các nguồn bệnh khác đối với cây trồng. Vì vậy, để tạo nguồn virus ổn định và đủ lượng phục vụ cho việc xây dựng quy trình lây nhiễm nhân tạo trên cây khoai tây, hai chủng PVY đã phân lập được lây nhiễm trên cây thuốc lá mô hình *Nicotiana benthamiana*. Thuốc lá mô hình là loài thực vật có tính miễn cảm cao với nhiều loại virus khác nhau, trong đó có PVY. Các biểu hiện bệnh virus trên loài cây thuốc lá này có mức độ rõ ràng và nhanh chóng. Do đó, *Nicotiana benthamiana* được lựa chọn làm ký chủ để làm sạch và nhân dòng nhiều loài virus khác nhau như PVY⁰ (Le *et al.*, 2022), PepMoV (Yoon *et al.*, 2020).

Trong nghiên cứu này, các cây thuốc lá mô hình được nhân giống *in vitro*, nuôi trồng trong điều kiện buồng sinh trưởng nhằm đảm bảo tính sạch bệnh trước khi tiến hành lây nhiễm PVY. Cây thuốc lá 6 tuần tuổi sau khi ra ngôi được dùng làm nguyên liệu trong lây nhiễm nhân tạo với PVY. Ở thời điểm 3 tuần sau lây nhiễm nhân tạo, cây thuốc lá có xuất hiện các triệu chứng rõ ràng và điển hình của bệnh PVY như sinh trưởng chậm, còi cọc (cây thấp, lá nhỏ, ít phân nhánh...) và phát triển kém so với cây đối chứng không lây nhiễm (WT) (Hình 4A). Trên lá, đặc

biệt là lá non, có hiện tượng chuyển vàng từng đốm hoặc toàn bộ phiến lá. Ngoài ra, các lá mới có hiện tượng dị dạng, lá xoắn, nhăn nheo và giảm kích thước, đây là các triệu chứng điển hình của virus PVY (Quenouille *et al.*, 2013). Mức độ biểu hiện bệnh nhanh và mạnh cho thấy tính miễn cảm cao của cây thuốc lá mô hình với chủng virus PVY được phân lập trong nghiên cứu này.

Nhằm kiểm chứng các chủng PVY đã được nhân dòng thành công trên cây thuốc lá mô hình, các mẫu lá có biểu hiện bệnh được thu thập và sử dụng trong việc tách chiết RNA tổng số. Phương pháp RT-PCR với cặp mồi CP-PVY_F/R được sử dụng để khuếch đại trình tự đặc hiệu của gen CP mã hóa protein vỏ của virus PVY (Hình 4B). Kết quả điện di sản phẩm RT-PCR ghi nhận phân đoạn DNA nhân bản với kích thước tương tự như trong các mẫu khoai tây nghi nhiễm bệnh bên trên (420 bp). Ngoài ra, để xác định không có sự lẫn tạp của các virus khác trong quá trình nhân dòng PVY trên cây thuốc lá mô hình, RT-PCR với các cặp mồi đặc hiệu khác được tiến hành cho một số virus phổ biến trên cây họ cà như CMV, TMV, PRSV... Phân tích không phát hiện sự có mặt của các virus này trong mẫu thuốc lá mô hình sau lây nhiễm nhân tạo với PVY (số liệu không trình bày trong bài báo này). Các kết quả này xác nhận rằng PVY đã được lây nhiễm thành công và nhân dòng trong cây thuốc lá mô hình *N. benthamiana* với độ thuần khiết cao.



Hình 4. Hình thái và sự có mặt của PVY trên các cây *N. benthamiana* sau 4 tuần lây nhiễm nhân tạo

Ghi chú: (A) Cây *N. benthamiana* sau lây nhiễm virus; (B) Điện di sản phẩm RT-PCR để kiểm tra sự có mặt của virus PVY trên cây nhiễm bệnh (Nb: mẫu cây *N. benthamiana* sau lây nhiễm; ĐC: mẫu cây không lây nhiễm; M: Thang DNA 1 kb (Thermo Scientific)).

3.4. Kiểm chứng khả năng lây nhiễm nhân tạo PVY^{NTN} trên cây khoai tây và hoàn thiện quy trình

Cây khoai tây giống Atlantic được lây nhiễm nhân tạo virus đã được nhân thành công trên cây *N. benthamiana*. Trong đó, các cây khoai tây được nhân giống thông qua nuôi cấy mô được chuyển ra trồng trong giá thể vô trùng tại buồng sinh trưởng. Cây con 4 tuần tuổi với độ đồng đều cao được sử dụng làm nguyên liệu lây nhiễm. Hai lá kép thứ 3 và 4 được dùng để gây tổn thương cơ giới và

lây nhiễm nhân tạo với PVY.

Kết quả lây nhiễm cho thấy tất cả các cây khoai tây lây nhiễm nhân tạo với virus PVY đã bắt đầu có triệu chứng xoắn ở một số biểu hiện bệnh ở các lá mới nhưng mức độ không rõ ràng sau 7 ngày lây nhiễm. Sau 2 tuần theo dõi, các cây lây nhiễm bắt đầu xuất hiện các triệu chứng bệnh điển hình như hiện tượng co lại của các lá trên ngọn, màu lá nhạt dần (tương tự với triệu chứng quan sát ngoài đồng ruộng). Ở ngày thứ 21 sau lây nhiễm, biểu hiện bệnh

do PVY gây ra được quan sát rõ ràng hơn, bao gồm hiện tượng xoắn của các lá non phía ngọn cây, xuất hiện các vết khảm trên mặt lá, các tầng lá phía dưới co rút và chuyển khô. Cây khoai tây bị bệnh có hiện tượng chuyển vàng toàn cây và ngừng ra lá mới. Sau 4 tuần lây nhiễm, các cây khoai tây ngừng sinh trưởng và chết (Hình 5B). Trong khi

đó, các cây khoai tây không lây nhiễm, sinh trưởng bình thường, lá xanh, khả năng kéo dài chồi tốt và không có dấu hiệu của bệnh do PVY gây ra (Hình 5A). Kết quả này phù hợp với nghiên cứu trước đây trên cây khoai tây của Arcibal và cộng sự (2016). Trong đó, triệu chứng bệnh có thể quan sát được sau 21 - 30 ngày lây nhiễm.



Hình 5. Hình thái và sự có mặt của PVY trên các cây khoai tây sau 4 tuần lây nhiễm nhân tạo

Ghi chú: (A) Cây khoai tây đối chứng không lây nhiễm virus; (B) Cây khoai tây sau lây nhiễm PVY; (C) Điện di sản phẩm RT-PCR kiểm tra sự có mặt của virus PVY trên các cây nhiễm bệnh (1, 2, 3: các mẫu cây khoai tây sau lây nhiễm; (-): Mẫu đối chứng không lây nhiễm; M1: Thang DNA 100 bp (Thermo Scientific).

Phân tích RT-PCR với cặp mồi đặc hiệu CP-PVY_F/R cho thấy toàn bộ 03 mẫu khoai tây được lây nhiễm PVY và xuất hiện triệu chứng trên lá đều có kết quả dương tính. Trong khi mẫu đối chứng âm không ghi nhận sự có mặt của sản phẩm của phản ứng RT-PCR (Hình 5C). Tương tự như thí nghiệm với cây thuốc lá mô hình, các cặp mồi đặc hiệu cho một số loài virus phổ biến có thể lây nhiễm trên cây họ cà như CMT, TMV, PRSV cũng được sử dụng với các mẫu khoai tây sau lây nhiễm nhân tạo. Kết quả không ghi nhận sự có mặt của các virus này trong toàn bộ các mẫu phân tích (kết quả không trình bày trong bài báo này).

Từ các kết quả nêu trên, có thể đưa ra quy trình lây nhiễm nhân tạo PVY trên cây khoai tây gồm 03 bước chính với các thông tin chi tiết như sau:

Bước 1: Thu thập mẫu khoai tây bệnh nghi nhiễm virus PVY trên cây khoai tây từ thực địa, sau đó tiến hành phân lập và định danh bằng phương pháp RT-PCR và giải trình tự gen CP để xác định chủng virus.

Bước 2: Dòng hóa và tăng sinh virus trên cây thuốc lá mô hình *Nicotiana benthamiana*. Trong đó, hỗn dịch lây nhiễm được chuẩn bị bằng cách nghiền nhỏ lá khoai tây nhiễm bệnh trong cối chày sứ với Nitơ lỏng và bổ sung đệm PBS 1X (pH 7,4) với tỉ lệ 10 mL/1 g mẫu lá. Tạo tổn thương cơ giới bằng cách rắc bột SiC lên bề mặt lá (lá thứ 3 và 4 từ ngọn xuống), tiếp theo dùng bông thấm dịch virus chà sát nhẹ nhàng bề mặt lá và giữ ở nhiệt độ phòng trong 10 phút. Sau đó, bề mặt lá được rửa sạch bằng bình xịt với nước cất khử trùng. Các cây thuốc lá sau lây nhiễm được đặt trong các khay đảm bảo độ ẩm, che phủ bởi các nắp chụp cho ánh sáng xuyên qua và được chăm sóc trong buồng sinh trưởng ở 25 - 26°C. Sau 2 - 4 tuần, triệu

chứng bệnh được quan sát, mẫu lá bệnh được thu thập và phân tích RT-PCR với mồi đặc hiệu của gen CP.

Bước 3: Lây nhiễm PVY trên cây khoai tây và đánh giá biểu hiện bệnh. Cụ thể, hỗn dịch lây nhiễm được chuẩn bị từ mẫu lá thuốc lá nhiễm bệnh theo phương thức như bước 2. Quá trình tạo tổn thương và lây nhiễm virus tương tự bước 2 nhưng được thực hiện trên cây khoai tây sạch bệnh 4 tuần tuổi. Sau lây nhiễm 2 - 4 tuần, các triệu chứng bệnh được quan sát, mức độ bệnh được đánh giá thông qua RT-PCR, qPCR hoặc DAS-ELISA.

IV. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

4.1. Kết luận

Trong nghiên cứu này, quy trình lây nhiễm nhân tạo PVY^{NTN} trên cây khoai tây đã được thiết lập với các bước chi tiết bao gồm thu thập nguồn bệnh; phân lập và định danh loài, chủng virus; dòng hóa và tăng sinh trên cây thuốc lá mô hình; lây nhiễm và đánh giá trên cây chủ khoai tây. Thời gian lây nhiễm và đánh giá trong khoảng 2 - 3 tuần với các quan sát hình thái và phân tích phân tử.

4.2. Đề nghị

Quy trình này là cơ sở cho các nghiên cứu tiếp theo trong đánh giá tính kháng bệnh PVY trên cây khoai tây được tạo ra bằng công nghệ chỉnh sửa gen CRISPR/Cas cũng như từ các phương pháp chọn tạo giống khác.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được thực hiện với sự hỗ trợ kinh phí từ đề tài hợp tác quốc tế giữa Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (VAST) và Viện Hàn lâm Khoa học Nga (RAS) với mã số QTRU06.08/24-26 (hoặc 24-44-0400).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Arcibal Erica, Kaitlin Morey Gold, Stephanie Flaherty, Jiming Jiang, Molly Jahn, Aurélie M. Rakotonirafara, 2016. A mutant eIF4e confers resistance to potato virus Y strains and is inherited in a dominant manner in the potato varieties Atlantic and Russet Norkotah. *American Journal of Potato Research*, 93 (1): 64-71. doi:10.1007/s12230-015-9489-x.

Chikh-Ali, Mohamad, Jenny S. Rowley, Joseph Kuhl, Stewart M. Gray, Alexander V. Karasev., 2014. Evidence of a monogenic nature of the Nz gene conferring resistance against potato virus Y strain Z (PVYZ) in potato. *American Journal of Potato Research*, 91 (6): 649-54. doi:10.1007/s12230-014-9395-7.

Karasev Alexander V., Stewart M. Gray., 2013. Continuous and emerging challenges of potato virus Y in potato. *Annual Review of Phytopathology*, 51 (1): 571-86. doi:10.1146/annurev-phyto-082712-102332.

Kuroiwa K., Thenault C., Nogué F., Perrot L., Mazier M., Gallois J.L., 2022. CRISPR-based knock-out of eIF4E2 in a cherry tomato background successfully recapitulates resistance to pepper vein mottle virus. *Plant Science*, 316: 111160.

Kreuze J.F., Souza-Dias J.A.C., Jeevalatha A., Figueira A.R., Valkonen J.P.T., Jones R.A.C., 2020. Viral diseases in potato. In *The Potato Crop*. Cham: Springer International Publishing, pp. 389-430.

Le Ngoc Thu, Huyen Thi Tran, Thao Phuong Bui, Giang Thu Nguyen, Doai Van Nguyen, Dong Thi Ta, Duy Dinh Trinh, Attila Molnar, Ngoc Bich Pham, Ha Hoang Chu, Phat Tien Do, 2022. Simultaneously induced mutations in eIF4E genes by CRISPR/Cas9 enhance PVY resistance in tobacco. *Scientific Reports*, 12 (1): 14627. doi:10.1038/s41598-022-18923-0.

Le N.T., Hoang T.H.T., Tran H.T., Bui T.P., Phan Q., Chu H.H., Fei Y., Mason R.O., Molnar A., Do P.T., 2026. Enhancing papaya resistance to ringspot virus through CRISPR/Cas9-Mediated gene editing of eIF4E. *Frontiers in Plant Science*, 17: 1799408.

Isolation, cloning and establishment of an artificial inoculation protocol for potato virus Y in potato plants

Tran Thi Huyen, Nguyen Hong Nhung, Vu Thi My, Phan Quyen, Pham Quang Huy, Nguyen Thanh Truc, Nguyen Truong Vu, Chu Hoang Ha, Oleg Stanislavovich Nikonov, Ekaterina Yu Nikonova, Do Tien Phat

Abstract

This study aimed to establish an effective protocol for artificial inoculation of Potato virus Y (PVY) in potato plants. Two potato samples suspected to be infected with PVY were collected from different potato cultivation areas in Hanoi. The presence of the PVY^{NTN} strain in these samples was confirmed by RT-PCR using specific primers for the coat protein (CP) gene, followed by Sanger sequencing analysis. The viral isolates were subsequently cloned and propagated in the model plant *Nicotiana benthamiana*. The cloned PVY^{NTN} isolate was then successfully used for artificial inoculation on the potato cultivar Atlantic. Typical disease symptoms were observed, and the presence of PVY^{NTN} in symptomatic potato plants was further verified by RT-PCR. Based on these results, a detailed protocol for artificial PVY inoculation in potato was established. This protocol has potential for future studies on evaluating PVY resistance in potato and could be extended to other crops and plant viruses.

Keywords: Potato, *Nicotiana benthamiana*, Potato virus Y (PVY), PVY^{NTN}, artificial inoculation

Ngày nhận bài: 06/5/2026

Ngày duyệt đăng: 11/6/2026

Người phản biện: PGS.TS. Nguyễn Văn Viết, TS. Trần Nguyễn Hà

Ngày phản biện: 07/5/2026

Lorenzen J.H., Meacham T., Berger P.H., Shiel P.J., Crosslin J.M., Hamm P.B., Kopp H., 2006. Whole genome characterization of Potato virus Y isolates collected in the western USA and their comparison to isolates from Europe and Canada. *Archives of Virology*, 151 (6): 1055-74. doi:10.1007/s00705-005-0707-6.

Noureen Azka, Muhammad Zuhaib Khan, Imran Amin, Tayyaba Zainab, Shahid Mansoor, 2022. CRISPR/Cas9-Mediated targeting of susceptibility factor eIF4E-enhanced resistance against potato virus Y. *Frontiers in Genetics*, 13: 922019. doi:10.3389/fgene.2022.922019.

Quenouille J., Vassilakos N., Moury B., 2013. Potato virus Y: a major crop pathogen that has provided major insights into the evolution of viral pathogenicity. *Molecular Plant Pathology*, 14: 439-452. https://doi.org/10.1111/mpp.12024.

Scholtzof, Karen-Beth G., Scott Adkins, Henryk Czosnek, Peter Palukaitis, Emmanuel Jacquot, Thomas Hohn, Barbara Hohn, Keith Saunders, Thierry Candresse, Paul Ahlquist, Cynthia Hemenway, Gary D.F., 2011. Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 12 (9): 938-54. doi:10.1111/j.1364-3703.2011.00752.x.

Schubert J., Thieme T., Thieme R., Ha C.V., Hoang G.T., 2015. Molecular and biological characterization of *Potato virus Y* isolates from Vietnam. *Journal of Phytopathology*, 163: 620-631. https://doi.org/10.1111/jph.12362.

Valkonen Jari P.T., 2007. Viruses: Economical losses and biotechnological potential. In *Potato Biology and Biotechnology*. Elsevier, pp. 619-41.

Wang B., Ma Y., Zhang Z., Wu Z., Wu Y., Wang Q., Li M., 2011. Potato viruses in China. *Crop Protection*, 30: 1117-1123. https://doi.org/10.1016/j.cropro.2011.04.001.

Yoon Y.J., Venkatesh J., Lee J.H., Kim J., Lee H.E., Kim D.S., Kang B.C., 2020. Genome editing of eIF4E1 in tomato confers resistance to pepper mottle virus. *Frontiers in Plant Science*, 11: 1098. doi:10.3389/fpls.2020.01098.