

## Bước đầu nghiên cứu sự hiện diện của *Sri Lankan Cassava Mosaic Virus* (SLCMV) trên sắn (*Manihot esculenta* Crantz 1766)

### Initial research on the presence of ssDNA *Sri Lankan Cassava Mosaic Virus* (SLCMV) on cassava (*Manihot esculenta* Crantz 1766)

Trương Thị Huỳnh Như<sup>1</sup>, Huỳnh Thị Ngọc Mai<sup>1</sup>, Lê Hồng Kông<sup>1</sup>, Trần Trung Chánh<sup>1</sup>,  
Phạm Thị Nhật<sup>2</sup>, Lê Khanh<sup>3</sup>, Phạm Quốc An<sup>1</sup>, Nguyễn Hữu Hoàng<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Trung tâm Nghiên cứu Ứng dụng Công nghệ cao trong Nông Nghiệp (RCHAA),  
Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM, Việt Nam

<sup>2</sup>Trung tâm Nghiên cứu Thực nghiệm Nông nghiệp Hưng Lộc, tỉnh Đồng Nai, Việt Nam

<sup>3</sup>Cisbay Global Inc., California, Hoa Kỳ

\*Tác giả liên hệ, Email: nhhoang@hcmus.edu.vn

#### THÔNG TIN

#### TÓM TẮT

DOI:10.46223/HCMCOUJS.  
tech.vi.17.2.2194.2022

Ngày nhận: 28/02/2022

Ngày nhận lại: 07/04/2022

Duyệt đăng: 18/04/2022

Từ khóa:

*Begomovirus*; bệnh học; sinh học  
phân tử virus; xét nghiệm

Các khảo cứu về *Sri Lankan Cassava Mosaic Virus* (SLCMV) ở tải lượng virus thấp trên cây sắn (*Manihot esculenta* Crantz 1766), đặc biệt là giống kháng virus hoặc giống sạch bệnh thường đòi hỏi cao về hiệu suất tách chiết và phát hiện DNA mạch đơn của virus (ssDNA). Trong nghiên cứu, bốn quy trình ly trích DNA tổng số khác nhau được dùng nhằm mục đích tách được hàm lượng ssDNA cao. Đồng thời, sử dụng quy trình Polymerase Chain Reaction (PCR) và Real-time PCR (RT-PCR) để phát hiện sự hiện diện của SLCMV với các cặp môi nhân bản gen *Rep/AC1* của virus và cặp môi nhân bản gen nội chuẩn *Beta-Actin* của sắn. Kết quả cho thấy, quy trình ly trích DNA cải tiến từ Mason, Caciagli, Accotto, và Noris (2008) và Osen, Nyaboga, và Amugune (2017), tạm gọi là R-kit, cho hàm lượng ssDNA tương đối cao tại vị trí thùy lá, được đề nghị sử dụng. Quy trình PCR và RT-PCR kiểm tra được sự hiện diện của SLCMV trên vật liệu nhiễm bệnh. Ngoài ra, quy trình RT-PCR với cặp môi SqPCR1 và probe đặc hiệu cho phép phát hiện tín hiệu SLCMV trong mẫu lá bệnh. Hệ số nhân bản gen của cặp môi SqPCR1 (1.851X) và *Beta-Actin* (1.896X) cho phép thực hiện đồng thời và phân tích kết quả cùng nhau. Ngưỡng phát hiện của RT-PCR cũng ở mức pha loãng cao hơn PCR. Đây là cơ sở hỗ trợ các khảo cứu SLCMV ở tải lượng thấp trên cây mô hình và giống kháng.

#### ABSTRACT

Investigation of the *Sri Lankan Cassava Mosaic Virus* (SLCMV) resistant cassava (*Manihot esculenta* Crantz 1766) varieties requires high-efficiency single-strand viral DNA (ssDNA) extraction and molecular detection procedures. In our study, we tested four different DNA extraction methods to isolate total DNA containing high concentration of ssDNA. In addition, using Polymerase Chain Reaction (PCR) and Real-time PCR (RT-

PCR), we can detect SLCMV from infected samples by amplifying a region of the *Rep/AC1* viral gene and cassava's housekeeping gene, *Beta-Actin*. As our results, a modified DNA extraction method, from Mason, Caciagli, Accotto, and Noris (2008) and Osen, Nyaboga, and Amugune (2017), namely R-kit, gained high ssDNA content from young lamina tissue (from lobes) leaf tissue. Therefore, R-kit is recommended to be used for further ssDNA-using studies. The infection of SLCMV in cassava samples can be detected by PCR and RT-PCR procedures. Moreover, in RT-PCR optimization processes we figured out that PCR efficiency of SqPCR1 primer set (1.851X) and *Beta-Actin* primer set (1.896X) is compatible for being processed and analyzed at once. The RT-PCR procedure showed ability to detect lower level of SLCMV in samples than the PCR procedure. Our results provide some essential ideas for studying on low virus titer circumstances, especially for model plants studies, resistant varieties development, or clean germplasm maintenance.

*Keywords:*

*Begomovirus*; pathogen; molecular virology; diagnostic

## 1. Giới thiệu

Sắn (*Manihot esculanta* Crantz 1766) là loại cây trồng sinh trưởng tốt trong vùng khí hậu xích đạo (Yeoh & Truong, 1996). Trong đó, Châu Á và Châu Phi chiếm 70% tổng diện tích trồng sắn trên thế giới (El-Sharkawy, de Tafur, & Cadavid, 1993). Từ năm 2013 đến năm 2016, diện tích canh tác và sản lượng sắn tại Việt Nam tăng qua các năm. Trong năm 2014, tổng sản lượng sắn tươi xuất khẩu đạt đến 70% (Le, Hoang, Nguyen, Nguyen, & Reinhardt Howeler, 2016). Đến năm 2017 giá trị xuất khẩu sắn đạt hơn một tỷ USD góp phần tăng nguồn thu nhập chính cho các hộ nông nhỏ lẻ (Jonathan, Dominic, Rob, Erik, & Lava, 2019). Tuy nhiên bệnh khảm lá sắn (Cassava Mosaic Diseases - CMDs) đã và đang gây ra các tác động nặng nề đến sản lượng và chất lượng sắn toàn cầu. Một số đề xuất ngăn hạn khẩn cấp được áp dụng nhằm kiểm soát ảnh hưởng của CMD như kiểm dịch thực vật, sử dụng giống sạch, giống kháng, ngâm hom giống trong thuốc trừ sâu, sử dụng vi khuẩn nội cộng sinh, côn trùng hay loại trừ các loài trung gian truyền bệnh (Dixon, Ogbe, & Okechukwu, 2010; Mubarik & ctg., 2020; Rey & Vanderschuren, 2017; Slakie & ctg., 2013) chưa phải là giải pháp tối ưu. Các nỗ lực của International Center for Tropical Agriculture (CIAT) trong chọn lọc giống kháng CMD cho tín hiệu khả quan nhưng vẫn cần thêm thời gian và phương pháp đánh giá giống kháng hiệu quả.

Năm 2015, *Sri Lankan Cassava Mosaic Virus* (SLCMV) lần đầu được ghi nhận tại khu vực Đông Nam Á (Minato & ctg., 2019). Tại Việt Nam, bệnh khảm lá sắn tại tỉnh Tây Ninh được xác định là do SLCMV gây ra vào năm 2017 (Uke & ctg., 2018). Đây là loài virus thuộc chi *Begomovirus*, họ Germiniviridae có vật chất di truyền là hai phân tử DNA mạch đơn (single strand DNA-ssDNA) dạng vòng (DNA A & DNA B) có kích thước khoảng 2.7kb (Leiva, Siriwan, Lopez-alvarez, Barrantes, & Saokham, 2020). Trong đó, DNA A liên quan đến sự mã hóa cho sáu protein có vai trò trong quá trình xâm nhiễm và lây truyền, DNA B mã hóa cho hai protein liên quan đến quá trình vận động bên trong và ngoài tế bào, và gia tăng khả năng xâm nhiễm, triệu chứng trên cây bệnh (Hanley-Bowdoin, Bejarano, Robertson, & Mansoor, 2013). Trong nghiên cứu SLCMV, ssDNA virus, có kích thước nhỏ, dễ bị thất thoát khi sử dụng quy trình tách DNA genome thông thường (Mathieson & Thomas, 2013). Ngoài ra, các giống kháng

còn có tải lượng DNA khá thấp nên có tình trạng âm tính giả (Korimbocus, Coates, Barker, & Boonham, 2002). Do đó, các phương pháp thu nhận ssDNA của SLCMV với hiệu suất cao giúp tăng khả năng phát hiện sự hiện diện của virus trên cây nhiễm bệnh cũng như cây mô hình, và đây cũng là tiền đề quan trọng cho phép thực hiện các nghiên cứu chuyên sâu về SLCMV.

Đối với giống tập đoàn (foundation stock), những virus như SLCMV buộc phải được kiểm tra và đánh giá bằng phương pháp Real-time PCR (RT-PCR) như một quy trình chuẩn. Với độ nhạy cao, phương pháp RT-PCR cho phép xác định sự hiện diện của virus một cách đặc hiệu ở tải lượng thấp. Bên cạnh đó, tải lượng virus phân bố trên các bộ phận của cây là một biến số phụ thuộc vào nhiều yếu tố khác nhau. Vị trí lấy mẫu (Ví dụ: vị trí các lá khác nhau trên thân, vị trí trên cùng một lá), thời điểm lấy mẫu (Ví dụ: các mùa trong năm) có thể chứa tải lượng virus khác nhau đáng kể (Monis & Bestwick, 1996; Nie & Molen, 2015; Tromas, Zwart, Lafforgue, & Elena, 2014), phương pháp thu mẫu, do đó có thể ảnh hưởng đến hiệu suất của phương pháp tách chiết và chẩn đoán dựa trên PCR (PCR-based).

Ngoài ra, để đánh giá nồng độ ssDNA virus, quy trình định lượng ssDNA dựa trên thuốc nhuộm huỳnh quang đặc hiệu (fluorometric quantification) ra đời được cho là chính xác hơn phương pháp sử dụng tia UV (spectrophotometric quantification) (Masago & ctg., 2021). Thuốc nhuộm huỳnh quang đặc hiệu cho phép phân biệt được từng loại vật liệu di truyền có trong mẫu tách chiết tổng số (Morozkin, Laktionov, Rykova, & Vlassov, 2003; Schweitzer & Scaiano, 2003). Trong đó, ssDNA và dsDNA có thể phân biệt thông qua tương tác có chọn lọc của thuốc nhuộm như PicoGreen (PG) (Schweitzer & Scaiano, 2003) được phân tích kỹ trong các nghiên cứu liên quan đến DNA trên người và động vật (Nakayama, Yamaguchi, Einaga, & Esumi, 2016). Các công trình về ssDNA trên thực vật còn hạn chế nhưng đã bắt đầu được quan tâm, đặc biệt trong các nghiên cứu liên quan đến virus thực vật (Khan, Haider, Mansoor, & Amin, 2019).

Trong nghiên cứu này, chúng tôi phân tích các yếu tố có thể gia tăng hiệu suất tách chiết ssDNA và hướng đến chuẩn hoá một số yếu tố trong quy trình thu mẫu, tách chiết cho phép phát hiện sự hiện diện SLCMV trong vật liệu. Đây là tiền đề quan trọng cho các nghiên cứu về sự hiện diện của virus SLCMV trên giống kháng, giống tập đoàn, cây mô hình.

## **2. Phương pháp nghiên cứu**

### **2.1. Vật liệu sản**

Hom cây sản sạch bệnh được thu nhận từ Trung tâm Nghiên cứu Thực nghiệm Nông nghiệp Hưng Lộc (Trảng Bom, Đồng Nai). Hom cây sản có biểu hiện bệnh khảm được thu nhận tại ruộng sản ở Tây Ninh (11°36'59,07" Bắc, 106°3'46,65" Đông) và Đồng Nai (10°52'40,5" Bắc, 106°58'57,84" Đông). Mẫu DNA virus được giải trình tự trước khi dùng làm vật liệu nghiên cứu. Các hom sản được trồng trong khung lưới chống côn trùng (16 mesh) tại nhà lưới Trung tâm Nghiên cứu Ứng dụng Công nghệ Cao trong Nông nghiệp (RCHAA), Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh (ĐH KHTN, ĐHQG-HCM). Thùylá và cuống lá thu nhận từ các hom sản này được sử dụng cho các thí nghiệm.

### **2.2. Các phương pháp tách chiết DNA**

Khoảng 2g mẫu sản được nghiền trong nito lỏng và trữ trong tủ -80°C cho đến khi sử dụng. Trong đề tài này, bốn phương pháp được sử dụng để khảo sát khả năng ly trích DNA, bao gồm: Phương pháp Cetyltrimethylammonium bromide - Sodium Dodecyl Sulfate (CTAB-SDS), tham khảo từ Osen và cộng sự (2017); phương pháp Bot-Blot, tham khảo từ Mason và cộng sự (2008);

Kit tách chiết DNA thực vật của Công ty Abt (Việt Nam); phương pháp cải tiến từ Mason và cộng sự (2008) và Osená và cộng sự (2017) được tạm gọi là R-kit trong nghiên cứu này (Mason & ctg., 2008; Osená & ctg., 2017). Mẫu sắn được thực hiện tách chiết DNA theo quy trình của nhà sản xuất, khi sử dụng bộ kit của Công ty Abt (Việt Nam).

### 2.2.1. Phương pháp CTAB-SDS

Khoảng 100mg mẫu nghiền sắn được trộn đều với 500 $\mu$ l đệm CTAB [Tris-HCl 100mM, pH 8.0, NaCl 1.4M, Ethylen diamine tetraacetic Acid (EDTA) 0.2M (pH 8.0), Polyvinylpyrrolidone (PVP) 4% (w/v), CTAB 2% (w/v)] và 150 $\mu$ l SDS. Ủ ở 55°C trong 20 phút. Sau khi ly tâm ở 13,800rpm và thu dịch nổi, một thể tích tương ứng (1:1) chloroform - isoamyl alcohol (24:1) được bổ sung và trộn đều. Dung dịch ở pha trên được thu nhận và trộn đều với hai lần thể tích ethanol, bổ sung 50 $\mu$ l ammonium acetate (NH<sub>4</sub>OAc) 7.4M. DNA tổng số được kết tủa bằng cách ủ ở -20°C và ly tâm ở 10,000rpm trong 05 phút. Tủa được rửa bằng dung dịch chứa 75% ethanol và NH<sub>4</sub>OAc 15mM. Sản phẩm DNA ly trích được hòa tan và trữ trong đệm TE (Tris-HCl 10mM, pH 8.0 EDTA 1mM) ở -20°C đến khi sử dụng.

### 2.2.2. Phương pháp Dot-Blot

100mg mẫu được trộn trong 500 $\mu$ l dung dịch ly giải (NaCl 500mM, Tris-HCl 100mM, pH 8.0, EDTA 50mM, beta-mercaptoethanol 10mM, SDS 1%) và ủ ở 65°C trong vòng 05 phút. Sau khi làm lạnh và bổ sung 150 $\mu$ l potassium acetate (KOAc) 5M, mẫu được ly tâm 12,000rpm để thu 500 $\mu$ l dịch nổi, 350 $\mu$ l isopropanol lạnh được bổ sung và ly tâm lạnh trong 10 phút. Tủa được hòa lại trong TE và xử lý với RNase A trước khi thực hiện tinh sạch bằng chloroform-isoamyl alcohol (24:1) như mô tả ở phương pháp CTAB-SDS.

### 2.2.3. Phương pháp R-kit (RCHAA)

100mg bột được hòa trong 400 $\mu$ l dung dịch ly giải [NaCl 500mM, Tris-HCl 100mM, pH 8.0, EDTA 50mM, beta-mercaptoethanol 10mM, SDS 1% (w/v) có thêm 15 $\mu$ l RNase (10 mg/ml)]. Mẫu được trộn và ủ ở 65°C, 30 phút. Sau đó, bổ sung 120 $\mu$ l CH<sub>3</sub>COOK 5M, mẫu được ly tâm ở 13,000rpm trong 05 phút và thu 300 $\mu$ l dịch nổi. Dịch nổi được trộn với 450 $\mu$ l dung dịch WB1 (Tris-HCl 30mM, pH 7.5; Guanidine-HCl (GuHCl) 5M; Isopropanol 30% (v/v)) và được cho qua cột silica (Biocomma, NP20-A). Cột được rửa lại bằng WB2 (Tris-HCl 10mM, pH 7.5; Ethanol 80%), làm khô bằng ly tâm, trước khi bổ sung dung dịch TE để thu nhận lại DNA.

DNA sau ly trích được điện di qua gel agarose 1% để kiểm tra. Hàm lượng ssDNA và dsDNA được xác định thông qua máy Qubit (ThermoFisher).

### 2.2.4. Phương pháp PCR và điện di

Mỗi sử dụng cho phương pháp PCR và điện di trong bài báo được liệt kê trong **Bảng 1**. Trong đó, các trình tự mỗi đặc hiệu gen *Rep/AC1* của SLCMV và gen *Beta-Actin* của cây sắn được thiết kế bằng phần mềm CLC Main Workbench 5.5 (California, Hoa Kỳ); tính đặc hiệu của mỗi được xác nhận bằng Primer-BLAST (National Center for Biotechnology Information, n.d.) và kiểm tra lại bằng OligoAnalyzer (Integrated DNA Technologies, n.d.) với các thông số như sau: monovalent cation 10mM; divalent cation 3mM; dNTPs 1.0mM, annealing primer 50nM, SantaLucia/SantaLucia (National Center for Biotechnology Information, n.d.).

**Bảng 1**

Các trình tự mỗi và probe đặc hiệu cho trình tự gen *Rep/AC1* của SLCMV và *Beta-Actin* của cây sắn được sử dụng trong quy trình PCR và Real-time PCR

Thí nghiệm	Tên trình tự	Trình tự	Nhiệt độ bắt cặp	
PCR	Actin-Cassava-1R	AGCTCCTGTTCAAAGTCAA	58.50	
	Actin-Cassava-1F	ACTGAGCGTGGATATTCT	56.90	
	Sắn ( <i>Beta-Actin</i> )	Actin-Cassava-2F	TCTAGCTCCTGTTCAAAGTC	58.30
		Actin-Cassava-2R	ACTGAGCGTGGATATTCT	56.90
	Actin-Cassava-3F	GCCCATCAGGCAATTCAT	59.50	
	Actin-Cassava-3R	ATTCTTTCACCACCTCAGC	59.10	
	SLCMV ( <i>Rep/AC1</i> )	SLCMV-P1-F	AAGAGGCTGAGAAGGGAG	59.20
		SLCMV-P1-R	AGCTTGAGTCTTCCGACA	59.50
		SLCMV-P2-F	AATGAAGAGGCTGAGAAGGG	60.70
		SLCMV-P2-R	AGCTTGAGTCTTCCGACA	59.50
		SLCMV-P3-F	GGTCAAATGAAGAGGCTGAG	59.60
		SLCMV-P3-R	AAGCTTGAGTCTTCCGACA	60.30
	Sắn ( <i>Beta-Actin</i> )	Actin-Cassava-Probe	TCTTTCATGTCCCTCACAAATTTCCCG	60.35
Real-time PCR	SqPCR-1f	ACTTGACGTCTGAGCTGG	60.20	
	SqPCR-1r	GAACCTCACCTCCATGCT	60.35	
	SLCMV ( <i>Rep/AC1</i> )	SqPCR-2f	ACTTGACGTCTGAGCTGG	61.74
		SqPCR-2r	TCACCTCCATGCTCTGCT	61.31
	SqPCR-3f	TGACGTCTGAGCTGGACT	62.38	
	SqPCR-3r	TCACCTCCATGCTCTGCTT	68.23	
	SLCMV ( <i>Rep/AC1</i> )	qPCR-F (probe)	FAM-TGTTGGGGTGGAAACTGGTGCT-BHQ1	68.23

Nguồn: Các trình tự mỗi sử dụng được thiết kế bởi nhóm tác giả bằng phần mềm CLC Main Workbench 5.5 (California, Hoa Kỳ); tính đặc hiệu của mỗi được xác nhận bằng Primer-BLAST (National Center for Biotechnology Information, n.d.) và kiểm tra lại bằng OligoAnalyzer (Integrated DNA Technologies, n.d.)

Phản ứng PCR được thực hiện trên tổng thể tích 25 $\mu$ l chứa 1 $\mu$ l DNA mẫu, 1 $\mu$ l cặp mỗi 8 $\mu$ M, 12.5 $\mu$ l Master Mix 2X (Phù sa Biochem, Việt Nam). Chu kỳ phản ứng PCR như sau: 95°C trong 03 phút, 30 chu kỳ (95°C trong 15 giây, 56°C trong 15 giây, 72°C trong 30 giây), 72°C trong 05 phút. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1-2% (w/v) trong đệm Tris-Borate-EDTA (TBE) 1X. Sản phẩm PCR được bổ sung Gelred® loading dye và điện di ở 100V - 240mA trong 35 phút để quan sát kết quả dưới ánh sáng UV.

### 2.3. Giải trình tự

Sản phẩm PCR tinh sạch được giải trình tự tại Công ty Sinh hóa Phù Sa (Việt Nam) bằng kỹ thuật Sanger hai chiều. Kết quả được phân tích bằng BLAST và cơ sở dữ liệu NCBI (National Center for Biotechnology Information, n.d.).

### 2.4. Phát hiện nhanh SLCMV bằng phương pháp Real-time PCR

Phản ứng Real-time PCR nhằm phát hiện nhanh virus SLCMV được phát triển dựa trên mẫu dò probe (Taqman) đi cùng với cặp mỗi đặc hiệu (Bảng 1). Trong đó, các probe sử dụng thuốc nhuộm và quencher là 5'FAM-3'BHQ1.

Real-time PCR được thực hiện trong 10 $\mu$ l phản ứng bao gồm 1 $\mu$ l dịch chiết DNA được sử dụng làm khuôn mẫu, 1 $\mu$ l hỗn hợp mỗi (4 $\mu$ M mỗi mỗi), 0.5 $\mu$ l probe qPCR\_F, 5 $\mu$ l Master Mix 2X (Bioline), 2.5 $\mu$ l nước. Điều kiện cho phản ứng Real-time PCR được thiết lập như sau: 95°C trong 03 phút, 40 chu kỳ (95°C trong 15 giây, 60°C trong 30 giây, đọc tín hiệu huỳnh quang ở 61°C). Kết quả Real-time PCR được xuất kết quả thô và phân tích chất lượng cũng như hiệu chuẩn dữ liệu bằng phần mềm LinRegPCR (Amsterdam UMC - University Medical Centers, n.d.).

## 3. Kết quả nghiên cứu và thảo luận

### 3.1. Phương pháp ly trích DNA bằng R-kit và CTAB-SDS cho phép thu nhận hàm lượng ssDNA cao

Bệnh khảm lá sắn (CMD) được cho là xuất hiện ở Đông Nam Á vào khoảng năm 2015, tại Campuchia, và có báo cáo công bố đầu tiên vào năm 2016 (Wang & ctg., 2016). Năm 2017, bệnh do SLCMV gây ra này đã được phát hiện tại Việt Nam, đặc biệt ở giống sắn HLS-11 và HLS-12. Một năm sau đó, trên gần 125 ngàn hecta sắn cả nước, hơn 36 ngàn hecta đã nhiễm bệnh này, với Tây Ninh là nặng nề nhất và có xu hướng lây lan nhanh sang các tỉnh lân cận như Bình Dương, Bình Phước, Bà Rịa-Vũng Tàu (Cục bảo vệ thực vật, 2021). Với tình hình nêu trên, việc phát triển các phương pháp xác định nhanh, chính xác sự hiện diện của virus gây bệnh trên cây sắn là cần thiết để: 1) xác định mức độ lây lan và khoanh vùng nhiễm; 2) có cơ sở cách ly và tiêu hủy nhằm kiểm soát dịch; 3) cung cấp công cụ kiểm tra cho các nghiên cứu sâu hơn nhằm tạo ra giống sắn kháng bệnh.

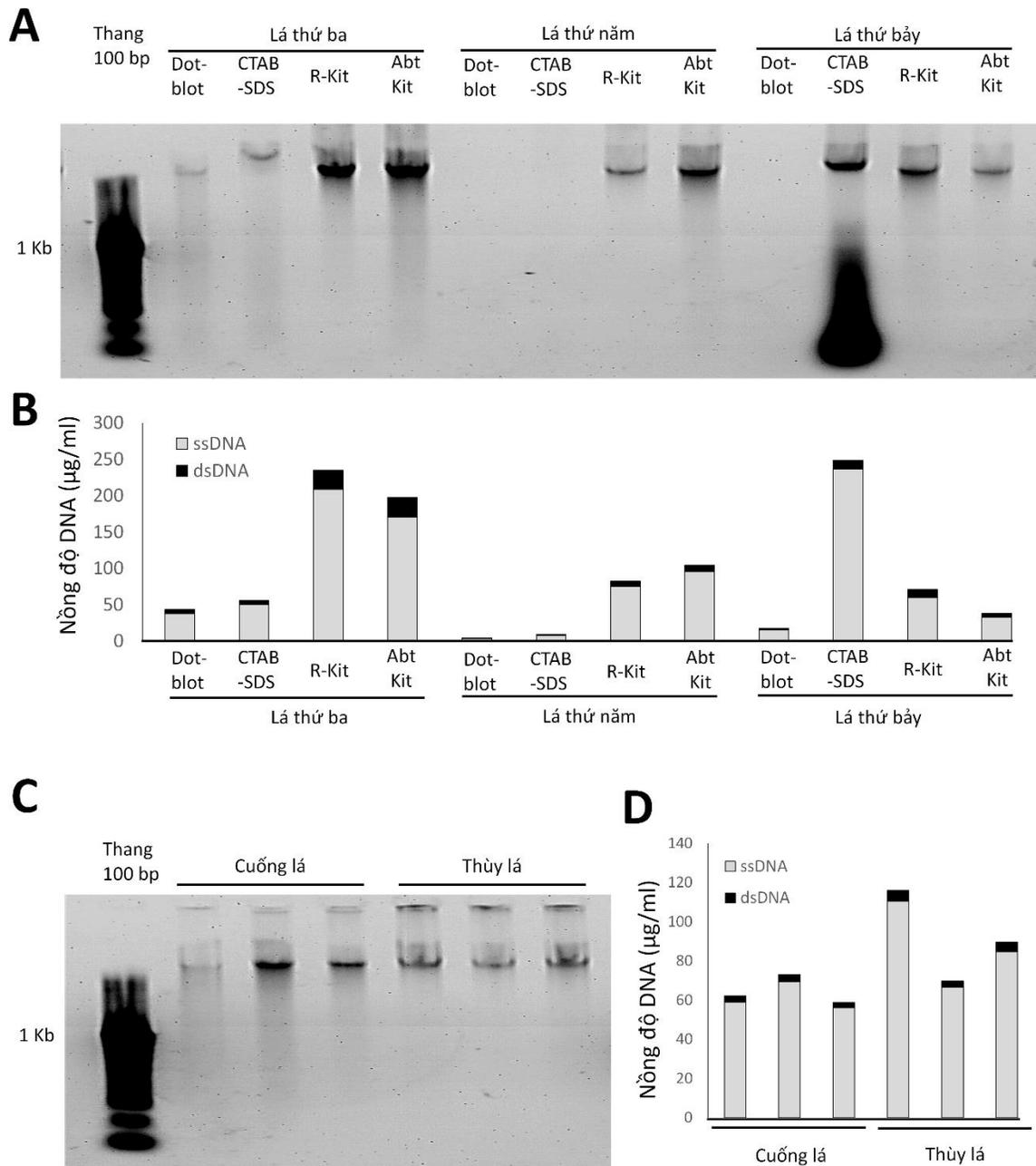
Với mục tiêu trên, câu hỏi nghiên cứu đầu tiên được đặt ra là phương pháp ly trích DNA nào cho phép thu nhận được nhiều ssDNA từ lá cây sắn. Điều này cho phép tăng khả năng nhận biết sự hiện diện của SLCMV trong mẫu sắn mang bệnh khảm. Để trả lời câu hỏi này, nghiên cứu khảo sát khả năng ly trích DNA của phương pháp Dot-blot (Mason & ctg., 2008), CTAB-SDS (Osena & ctg., 2017) và bộ kit Plant DNA Extraction Kit (HI-122) của công ty Abt (Việt Nam), so sánh với phương pháp R-kit, do trung tâm RCHAA cải tiến. Sản phẩm tách chiết DNA từ cùng một mẫu lá cây sắn bệnh đã nghiền bằng các phương pháp khác nhau được kiểm tra bằng phương pháp điện di trên gel agarose 1% (**Hình 1A**). Tiếp theo đó, ứng dụng phương pháp fluorometric quantification, hàm lượng ssDNA và dsDNA được xác định bằng máy Qubit (ThermoFisher) (**Hình 1B**).

Kết quả của thí nghiệm cho thấy, phương pháp Dot-Blot cho hiệu quả ly trích DNA không cao, nồng độ DNA thu được thấp và khó thấy bằng mục tiêu trên gel agarose; trong khi các phương pháp CTAB-SDS, Abt kit và R-kit đều ly trích được lượng lớn DNA (**Hình 1A**). Khi phân tích kỹ, phương pháp sử dụng kit (R-kit và Abt kit) cho lượng DNA nhiều ở mẫu lá sắn non (lá thứ ba) trong khi CTAB-SDS lại thu nhận được nhiều DNA ở lá sắn già (lá thứ bảy) (**Hình 1B**). Tuy nhiên, lượng DNA lớn từ mẫu lá sắn già lại đến từ sản phẩm DNA bị đứt gãy, phần lớn là các đoạn dưới 100bp (**Hình 1A**) và không được khuyến cáo sử dụng. Phương pháp R-kit, cho kết quả hàm lượng ssDNA khả quan hơn phương pháp Abt kit (208.80  $\mu\text{g/ml}$  so với 170.53  $\mu\text{g/ml}$ ) trong thí nghiệm ban đầu (**Hình 1B**), được chọn để sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.

Như vậy, để phát triển các phương pháp xác định sự hiện diện của DNA SLCMV trong mẫu sắn, việc thu nhận được DNA mục tiêu đóng vai trò tiên quyết. Vì SLCMV có bộ gen là ssDNA, đề tài tập trung để xác định phương pháp có khả năng thu nhận được nhiều ssDNA từ lá sắn. Kết quả khảo sát cho thấy, phương pháp cải tiến từ Mason và cộng sự (2008) và Osen và cộng sự (2017) (R-kit) và phương pháp CTAB-SDS cho hàm lượng ssDNA cao hơn các phương pháp còn lại (**Hình 1**). Tuy nhiên, CTAB-SDS là phương pháp có sử dụng hóa chất độc (CTAB và SDS) ở nồng độ cao, và đòi hỏi kỹ thuật viên có kinh nghiệm thực hiện. Trong khi đó, R-kit được cải tiến và phát triển với mục tiêu đơn giản hóa quy trình và giá thành rẻ, không đòi hỏi kỹ thuật phức tạp. Chính vì vậy, chúng tôi tiếp tục áp dụng quy trình ly trích ssDNA này cho các nghiên cứu sâu trên SLCMV.

### **3.2. Vị trí thu mẫu ảnh hưởng đến lượng DNA thu được khi sử dụng R-kit**

Nhận thấy có sự khác biệt về hàm lượng DNA thu được ở các vật liệu mẫu khác nhau, nghiên cứu tiến hành đánh giá vị trí thu mẫu trên lá cây sắn. Bằng phương pháp ly trích R-kit và đánh giá sản phẩm thông qua điện di trên gel agarose 1% cùng máy đo DNA Qubit (ThermoFisher), kết quả so sánh các mẫu vật liệu khác nhau được đánh giá (**Hình 1C và D**). Kết quả cho thấy phương pháp R-kit có thể ly trích được DNA từ các mẫu khảo sát. Tuy nhiên so với cuống lá, DNA từ các mẫu ly trích từ thùy lá đa phần có kích thước lớn hoặc ở dạng xoắn chặt và khó di chuyển trên gel agarose (**Hình 1C**). Điều này có thể là do mẫu cuống lá cứng hơn, để có thể nghiền được thành bột, cần thời gian xử lý cơ học lâu dẫn đến tác động đến độ toàn vẹn của DNA. Lý giải này phù hợp với kết quả về nồng độ DNA thu được (**Hình 1D**). Theo đó, nồng độ DNA thu được ở các mẫu thùy lá cao hơn các mẫu cuống lá vì bản chất mẫu dễ nghiền (phá vỡ) hơn. Từ các kết quả thí nghiệm trên, mẫu DNA thu nhận ở thùy lá thứ 03 bằng phương pháp R-kit được chọn sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.



**Hình 1.** Khảo sát điều kiện ly trích DNA từ lá cây sắn. (A) Kết quả điện di qua gel agarose 1% sau khi tách chiết bằng các phương pháp Dot-blot, CTAB-SDS, R-kit, Abt kit. (B) Nồng độ ssDNA và dsDNA trong các mẫu ly trích DNA ở hình A. (C) Kết quả điện di sau khi ly trích DNA bằng phương pháp R-kit ở cuống lá và thùy lá thứ ba, năm, bảy. (D) Nồng độ ssDNA và dsDNA ở các mẫu ly trích DNA ở hình C. Các thí nghiệm đã được thực hiện ít nhất hai lần với kết quả tương tự nhau

### 3.3. Phương pháp PCR cho phép nhận biết sự xâm nhiễm của SLCMV trên mẫu sắn bệnh

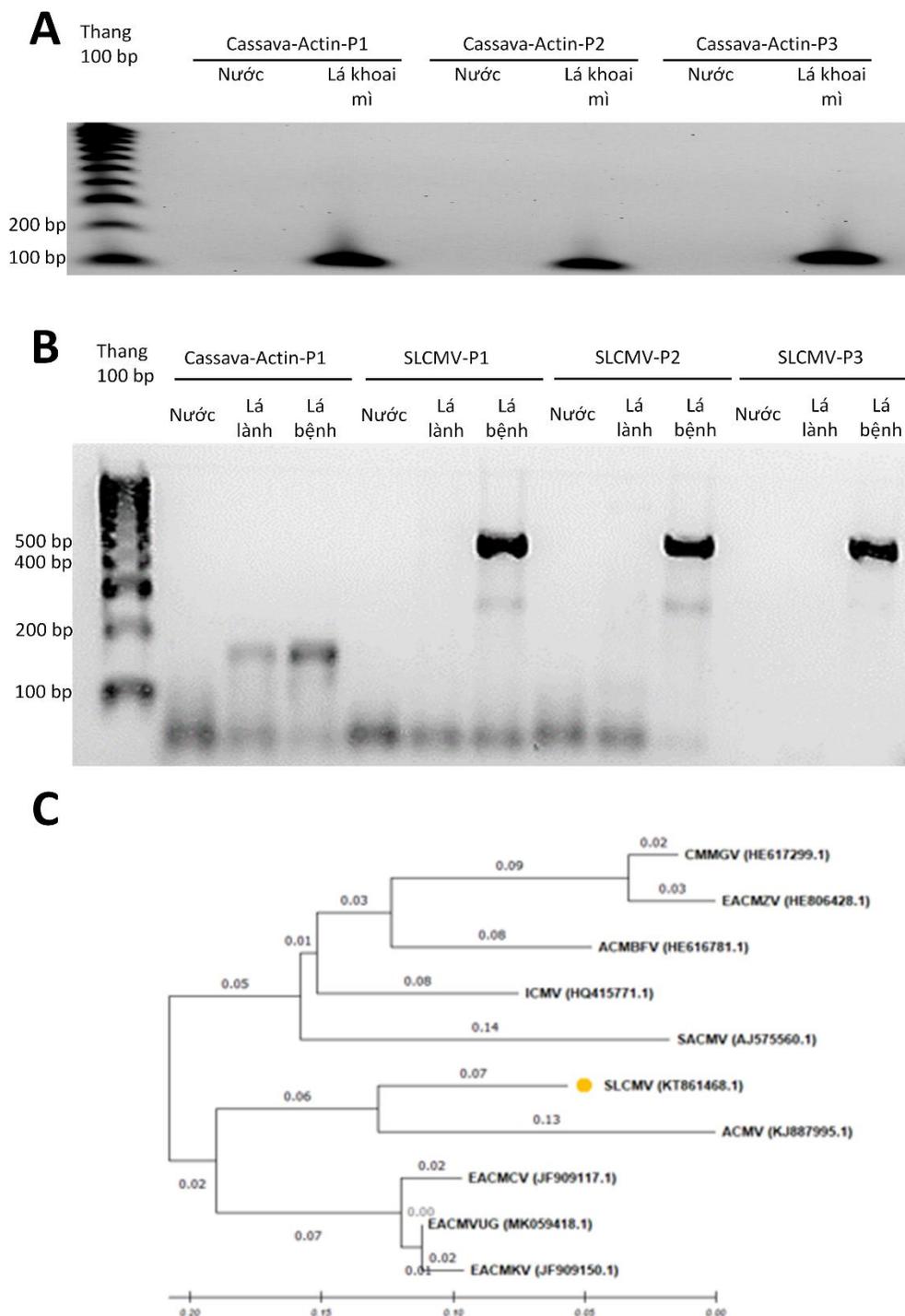
Đề bước đầu xây dựng phương pháp nhận biết sự hiện diện của SLCMV trong mẫu lá sắn, nghiên cứu lựa chọn phương pháp PCR với ưu điểm là giá thành thấp và dễ thực hiện. Ba cặp mồi cho gen *Beta-Actin* của sắn (*Manihot esculenta*) được thiết kế bằng phần mềm Primer-blast trên trang web NCBI (Bảng 1). Khảo sát tính đặc hiệu của ba cặp mồi *Beta-Actin* này được thực hiện

nhằm chọn ra một cặp mồi tốt nhất, dùng làm nội chuẩn cho phương pháp xác định sự hiện diện SLCMV trong mẫu lá sắn. Kết quả thí nghiệm (**Hình 2A**) cho thấy, cả ba cặp mồi đều nhân bản đặc hiệu, chỉ cho một băng rõ đậm trên gel agarose 2%, không có băng ký sinh và không có băng trong mẫu đối chứng âm (nước). Trong đó, cặp mồi Cassava-Actin-P3 cho vạch đậm hơn. Ngoài ra, cặp mồi này cũng có nhiệt độ nóng chảy cao nhất cho phép nâng nhiệt độ bắt mồi lên cao để tăng tính đặc hiệu. Chính vì vậy, cặp mồi Cassava-Actin-P3 được chọn cho các thí nghiệm tiếp theo.

Nghiên cứu cũng đồng thời thiết kế ba cặp mồi đặc hiệu để nhân bản một phần trình tự gen *Rep/AC1* nhằm phát hiện sự hiện diện của SLCMV trong mẫu lá sắn. Kết quả thí nghiệm khảo sát độ đặc hiệu của các cặp mồi này được trình bày ở **Hình 2B**. Theo đó, thí nghiệm sử dụng nước và lá sắn sạch bệnh được trồng tại trung tâm RCHAA là đối chứng âm. Kết quả cho thấy, gen nội chuẩn được nhân bản bởi cặp mồi Cassava-Actin-P3 hoạt động tốt; các cặp mồi đặc hiệu để phát hiện SLCMV đều không nhân bản sản phẩm mục tiêu ở các đối chứng âm và nhân bản rõ sản phẩm mục tiêu ở mẫu lá sắn bệnh. Trong đó, cặp mồi SLCMV-P3 cho rất ít sản phẩm ký sinh so với hai cặp mồi còn lại (**Hình 2B**). Vì vậy, cặp mồi SLCMV-P3 được chọn cho các thí nghiệm tiếp theo.

Để đánh giá liệu cặp mồi SLCMV-P3 nhân bản chính xác trình tự mục tiêu là gen *Rep/AC1* hay không, sản phẩm PCR được tinh sạch và gửi giải trình tự. Kết quả giải trình tự được blast trên cơ sở dữ liệu NCBI cho thấy sản phẩm được nhân bản giống 100% với trình tự trên bộ gen SLCMV (Mã số NCBI KT861468.1). Cây phát sinh loài của trình tự mục tiêu trên mười virus đã được công bố gây bệnh khảm trên sắn được thiết lập. Trình tự gen *Rep/AC1* cho thấy có sự khác biệt giữa các loài virus này (**Hình 2C**) và có thể dùng để xác nhận nhanh được SLCMV trong số các *Begomovirus* gây bệnh khảm. Từ các kết quả này, nghiên cứu đã bước đầu sử dụng phương pháp PCR với gen nội chuẩn là *Beta-Actin* của sắn, cặp mồi Cassava-Actin-P3 và gen *Rep/AC1*, cặp mồi SLCMV-P3 để phát hiện sự hiện diện SLCMV trong mẫu DNA lá sắn.

Như vậy, phương pháp PCR là phương pháp đơn giản, chi phí thấp, dễ thực hiện, có thể sử dụng để phát hiện SLCMV trong mẫu lá sắn bệnh (**Hình 2**). Trong nghiên cứu này, kết quả cho thấy phản ứng PCR với mồi đặc hiệu cho SLCMV có thể phát hiện sự hiện diện của DNA virus trong mẫu ly trích DNA từ lá sắn bệnh. Quy trình thực hiện phản ứng PCR không quá phức tạp nên tất cả các phòng thí nghiệm sinh học phân tử đều có thể thực hiện được. Với các cặp mồi đã được sử dụng trong nghiên cứu này (cặp mồi Cassava-Actin-P3 dùng làm nội chuẩn và SLCMV-P3 để kiểm tra sự hiện diện của SLCMV) và phương pháp R-kit, các phòng thí nghiệm sinh học phân tử có thể tự áp dụng để có quy trình phát hiện SLCMV trong mẫu sắn. Tuy nhiên, vì phải đi qua các bước điện di, phương pháp PCR mất thời gian và khó áp dụng trên diện rộng với số lượng mẫu lớn. Bên cạnh đó, phương pháp PCR có độ nhạy không cao (**Hình 4**), do đó có thể bỏ sót cây mang bệnh. Mặc dù vậy, với giá thành không cao và không đòi hỏi trang thiết bị quá đắt tiền, phương pháp PCR hoàn toàn có thể ứng dụng rộng rãi tại các địa phương.



**Hình 2.** Ứng dụng phương pháp PCR phát hiện SLCMV trong mẫu lá sắn. (A) Đánh giá khả năng khuếch đại gen *Beta-Actin*, dùng làm nội chuẩn, của các cặp mồi. (B) Đánh giá khả năng khuếch đại gen *Rep/AC1*, dùng để phát hiện SLCMV, của các cặp mồi. Các Thí nghiệm đã được lặp lại với kết quả tương tự. (C) Cây phát sinh loài virus gây bệnh khảm (vị trí đánh dấu) với các loài có liên quan đã được công bố. Mã số Genbank Accession được thể hiện trong ngoặc đơn. Các trình tự được sắp giống cột bằng ClustalW với các tham số mặc định, cây phát sinh loài được xây dựng bằng phương pháp Neighbor-Joining Tree trên phần mềm MEGA X. Thanh thước biểu thị sự phân kỳ trình tự nucleotide 5%. Các thí nghiệm đã được thực hiện ít nhất hai lần với kết quả tương tự nhau

### 3.4. Bước đầu sử dụng phương pháp Real-time PCR nhận biết sự xâm nhiễm SLCMV trong mẫu sản bệnh

Mặc dù giá thành cao hơn, phương pháp Real-time vẫn được xem là phương pháp chuẩn trong sản xuất giống cũng như nghiên cứu virus ở thực vật. Vì vậy, chúng tôi tiến hành phương pháp Real-time PCR để phát hiện nhanh sự hiện diện của SLCMV trong mẫu DNA lá sản. Với trình tự trên gen *Rep/AC1*, ba cặp mồi đặc hiệu và một probe được thiết kế và sử dụng. Với trình tự trên gen nội chuẩn *Beta-Actin*, cặp mồi Cassava-Actin-P3, có sản phẩm nhân bản ngắn và probe đặc hiệu được sử dụng (**Bảng 1**).

Thí nghiệm sử dụng máy Real-time PCR khảo sát khả năng hoạt động của ba cặp mồi phát hiện SLCMV được thực hiện với thiết kế như sau: cặp mồi Cassava-Actin-P3 và probe đặc hiệu được sử dụng làm nội chuẩn. Mẫu DNA lá sản lạnh thu ở trung tâm RCHAA được sử dụng làm đối chứng âm. Các mẫu được thực hiện đồng thời trong một lần chạy máy Real-time PCR với ba lần lặp lại. Kết quả thực tế trên màn hình máy Real-time PCR được hiển thị ở **Hình 3A**. Như vậy, cặp mồi Cassava-Actin-P3 và probe đặc hiệu cho gen *Beta-Actin* sản có thể nhân bản gen nội chuẩn ở cả mẫu lá sản lạnh và bệnh. Các cặp mồi SqPCR1, SqPCR2, SqPCR3 và probe đặc hiệu cho gen *Rep/AC1* của SLCMV có khả năng nhận diện đặc hiệu sự hiện diện của DNA SLCMV trong mẫu lá sản bệnh và không nhận diện sai trong mẫu lá sản lạnh. Trong đó cặp mồi SqPCR1 cho đường cong phát hiện tín hiệu mục tiêu cao hơn hai cặp mồi còn lại (**Hình 3A**). Vì vậy cặp mồi SqPCR1 được chọn để tiếp tục cho các thí nghiệm tiếp theo.

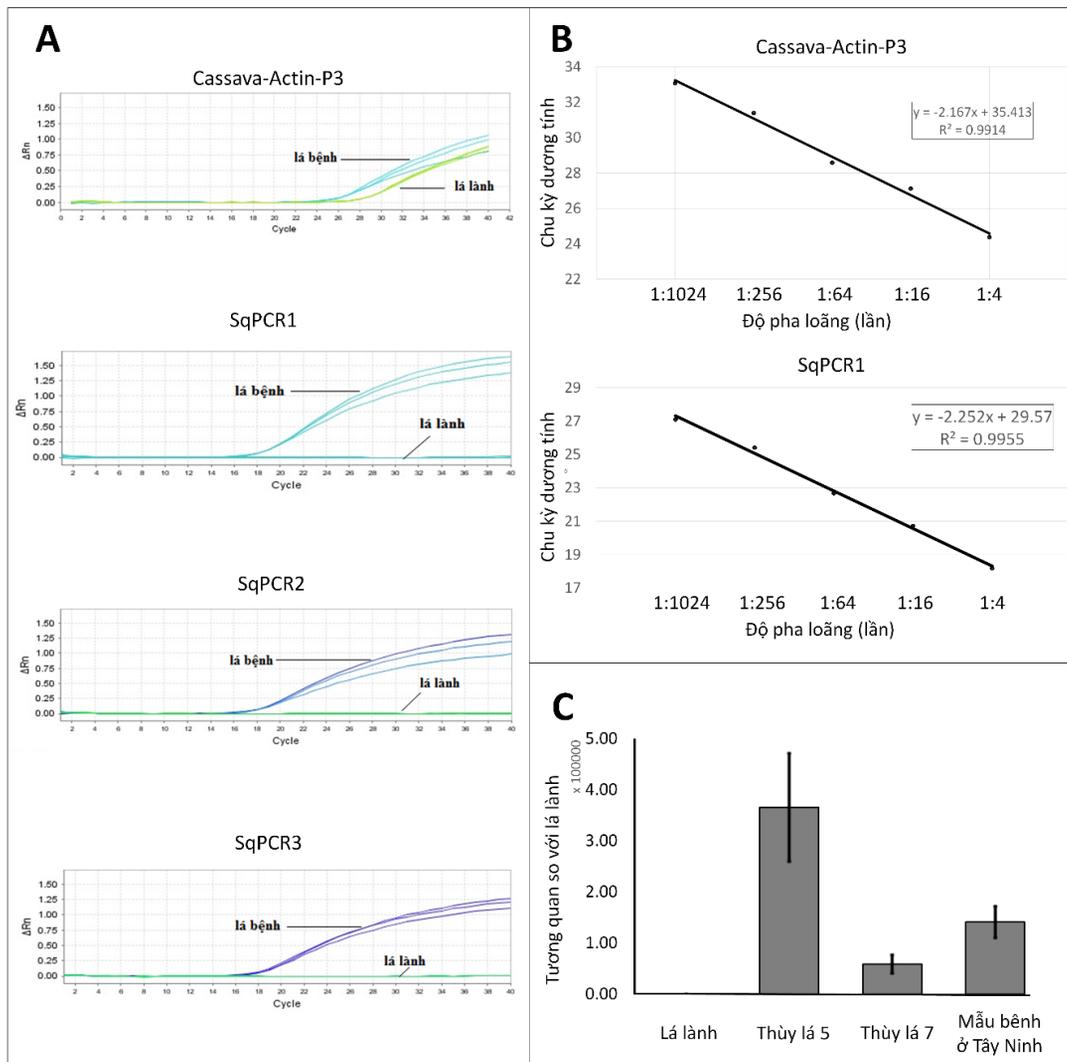
Nghiên cứu cũng tiến hành khảo sát hệ số nhân bản gen của cặp mồi Cassava-Actin-P3 và SqPCR1 cho gen nội chuẩn và gen *Rep/AC1* tương ứng. Kết quả tại **Hình 3B** cho thấy ở các nồng độ pha loãng theo thứ tự đậm đặc hơn, chu kỳ phát hiện trình tự mục tiêu giảm tuyến tính. Dựa vào phương pháp tính hệ số nhân bản gen (PCR efficiency), nghiên cứu cho thấy hệ số nhân gen *Beta-Actin* đạt 1.896x trong khi hệ số nhân gen *Rep/AC1* đạt 1.851x (Schmittgen & Livak, 2008). Như vậy cả hai cặp mồi sử dụng cho phương pháp Real-time PCR đều đạt giá trị nhân gen trong khoảng khuyến cáo từ 1.800x tới 2.200x và có giá trị gần bằng nhau. Điều này cho phép áp dụng quy trình Real-time PCR này cho các thí nghiệm sau. Bên cạnh khảo sát hệ số nhân bản gen, nghiên cứu còn khảo sát nhiệt độ tối ưu cho phản ứng. Kết quả (không trình bày) cho thấy nhiệt độ tốt nhất nên áp dụng là 61°C.

Nghiên cứu áp dụng thực hiện thử nghiệm quy trình ứng dụng Real-time PCR đã phát triển trên mẫu sản bệnh khảm ở Tây Ninh với đối chứng âm là mẫu sản lạnh và đối chứng dương là mẫu sản mang bệnh khảm ở trung tâm RCHAA. Kết quả cho thấy, phương pháp Real-time PCR phát hiện mẫu sản ở Tây Ninh dương tính với virus SLCMV (**Hình 3C**).

Chính vì một số nhược điểm của phương pháp PCR, nghiên cứu này phát triển phương pháp Real-time PCR nhằm phục vụ cho các mục đích như đánh giá mức độ nhiễm bệnh trên diện rộng, phát hiện sớm vùng có bệnh và phục vụ các nghiên cứu đòi hỏi độ nhạy phát hiện sự hiện diện của DNA SLCMV cao. Kết quả cho thấy, phương pháp được phát triển khả năng phân biệt được mẫu lá lạnh và lá bệnh khảm cùng với hệ số nhân bản gen của gen mục tiêu và gen nội chuẩn tương đương nhau và trong khoảng 1.8 đến 2.2 (**Hình 3**). Bên cạnh đó, phương pháp Real-time PCR, cho thấy độ nhạy cao hơn so với phương pháp PCR (**Hình 4**).

Mặc dù có chi phí cao, phương pháp Real-time PCR với mẫu dò Taqman là phương pháp mang tính tiêu chuẩn, được chấp nhận và sử dụng rộng rãi tại các trung tâm giống sạch bệnh. Độ nhạy cao hơn là một lợi thế cho phép phương pháp Real-time PCR ứng dụng nhiều trong các nghiên cứu chuyên sâu, trong đó có tìm hiểu cơ chế lây truyền bệnh của virus SLCMV, so sánh các cơ chế kháng và phát triển giống sản kháng SLCMV. Mặc dù phương pháp Real-time PCR

trong nghiên cứu này được thiết kế để dựng đường chuẩn và định lượng tương đối số bản sao SLCMV trong các mẫu lá nhiễm bệnh, nồng độ virus chuẩn vẫn còn thiếu, lượng mẫu cần thử nghiệm còn hạn chế, vì thế, chúng tôi chưa rút ra kết luận về tải lượng chính xác của virus trên từng mẫu cụ thể. Các thủy lá ở vị trí thứ năm luôn cho kết quả ly trích ssDNA với nồng độ cao và ổn định.

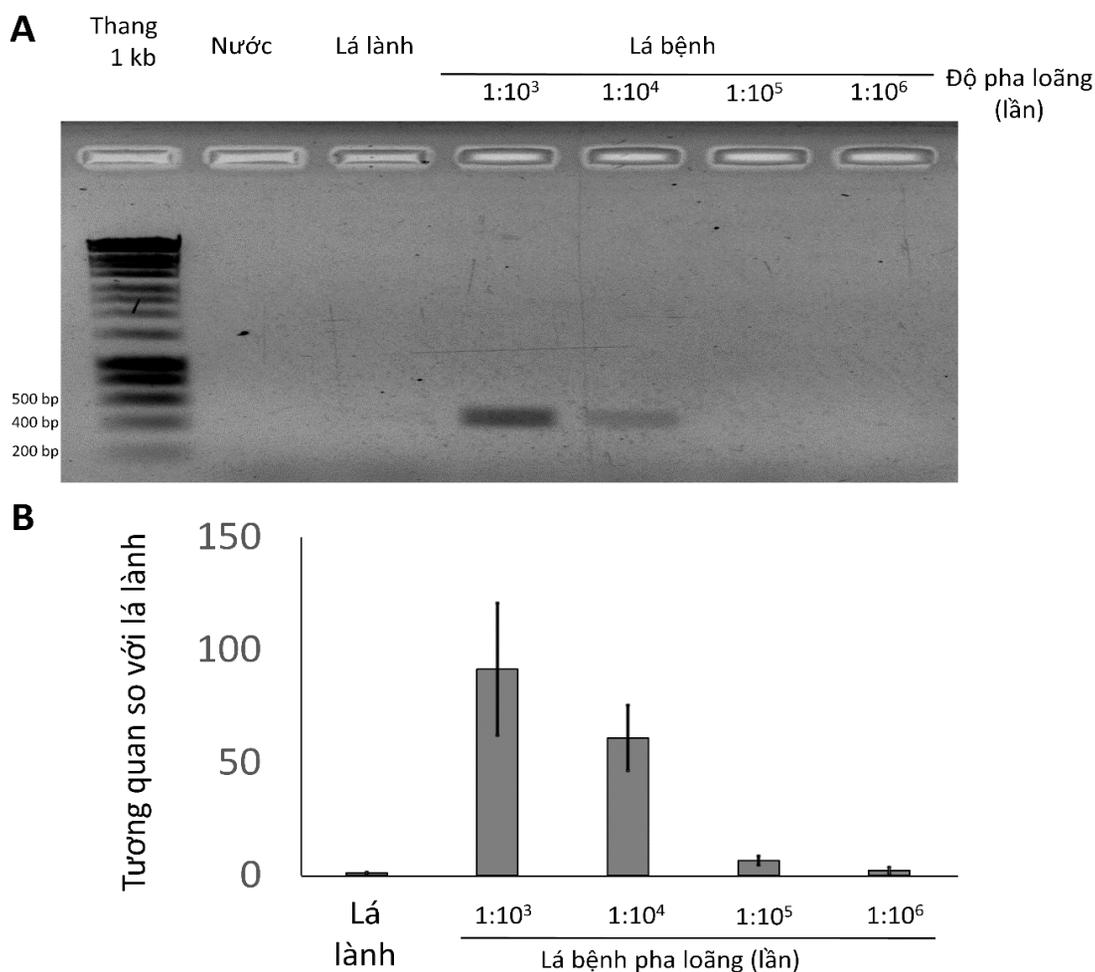


**Hình 3.** Khảo sát khả năng phát hiện SLCMV trong mẫu lá sản bệnh bằng phương pháp Real-time PCR. (A) Kết quả khảo sát các primer và probe trên lá sản lành và bệnh. (B) Hệ số nhân bản gen của primer Cassava-Actin-P3 cho gen *Beta-Actin* (dùng làm nội chuẩn) và primer SqPCR1 cho gen *Rep/AC1* (để phát hiện SLCMV). (C) Kết quả phát hiện SLCMV trên mẫu lá sản lành và sản bệnh trồng tại trung tâm RCHAA so sánh với mẫu sản bệnh thu nhận ở Tây Ninh. Kết quả được hiệu chuẩn bằng phần mềm LinRegPCR. Các thí nghiệm đã được thực hiện ít nhất hai lần với kết quả tương tự nhau

### 3.5. Phương pháp Real-time PCR cho phép nhận biết SLCMV nhạy hơn phương pháp PCR

Bên cạnh các tiêu chí về giá thành, tính đơn giản, khả năng tự động hóa hay thời gian phát hiện nhanh, độ nhạy của phương pháp đóng vai trò quan trọng trong việc phát hiện sớm bệnh. Chính vì vậy, nghiên cứu thực hiện đánh giá khả năng phát hiện sự tồn tại của DNA SLCMV trong mẫu lá sản bệnh được pha loãng nhiều lần. Kết quả ở **Hình 4** cho thấy nước và lá lành (không pha loãng) ở cả hai phương pháp đều cho kết quả âm tính. Ở mức pha loãng DNA lá bệnh  $10^3$  và  $10^4$

lần, phương pháp PCR vẫn có thể phát hiện sự hiện diện của virus SLCMV trong mẫu. Tuy nhiên, từ độ pha loãng  $10^5$  lần, chỉ có phương pháp Real-time PCR có thể phát hiện được sự hiện diện của DNA SLCMV trong mẫu. Kết quả này cho thấy phương pháp Real-time PCR đã được phát triển có khả năng phát hiện SLCMV trong mẫu lá sản bệnh ở nồng độ SLCMV thấp hơn so với phương pháp PCR.



**Hình 4.** Khả năng nhận biết sự hiện diện của DNA SLCMV trong mẫu lá sản bệnh pha loãng bằng phương pháp PCR và Real-time PCR. (A) Khả năng nhận diện sự hiện diện của SLCMV trong mẫu pha loãng bằng phương pháp PCR. Cặp mồi được sử dụng là SLCMV-P3. (B) Khả năng nhận diện sự hiện diện của SLCMV trong mẫu sản bệnh pha loãng bằng phương pháp Real-time PCR. Kết quả được hiệu chuẩn bằng phần mềm LinRegPCR. Các thí nghiệm đã được thực hiện ít nhất hai lần với kết quả tương tự nhau

#### 4. Kết luận

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã xây dựng và thử nghiệm bước đầu một số quy trình cơ bản, có thể dùng trong nghiên cứu khảo sát sự hiện diện của SLCMV trên mẫu thực vật. Trong đó, việc phát triển quy trình ly trích DNA cải tiến (R kit) cho phép thu nhận được hàm lượng cao ssDNA virus tại vị trí thùy lá từ các mẫu sản bệnh. Bên cạnh đó, kết hợp với phương pháp Real-time PCR khi sử dụng các cặp mồi và probe đặc trưng có khả năng phát hiện sự hiện diện của virus ở tải lượng thấp. Từ đó, chúng tôi cung cấp một quy trình chẩn đoán SLCMV hiệu quả hơn trên cây mang bệnh, đây cũng là tiền đề quan trọng trong việc hỗ trợ quản lý bệnh khảm trên các giống cây mô hình và giống kháng SLCMV tại Việt Nam.

## LỜI CẢM ƠN

Nhóm tác giả chân thành cảm ơn Trung tâm Nghiên cứu Thực nghiệm Hưng Lộc-Đồng Nai, Công ty Cisbay Global Incoperation-Hoa Kỳ và Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM đã hỗ trợ hoàn thành nghiên cứu này.

Nghiên cứu được tài trợ bởi Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM trong khuôn khổ Đề tài mã số T2020-36.

## Tài liệu tham khảo

- Amsterdam UMC - University Medical Centers. (n.d.). Truy cập ngày 10/10/2021 tại <http://LinRegPCR.nl>
- Cục bảo vệ thực vật. (2021). *Sở NN&PTNT: Bệnh khảm lá virus lại gây hại trên cây sắn trên địa bàn tỉnh Bà Rịa - Vũng Tàu [Department of Agriculture and Rural Development: Virus mosaic disease again harms cassava in Ba Ria - Vung Tau Province]*. Truy cập ngày 10/10/2021 tại Cổng thông tin điện tử tỉnh Bà Rịa - Vũng Tàu web: <https://baria-vungtau.gov.vn/sphere/baria/vungtau/page/xem-tin.cpx?item=6188ec5d8ea5ccfc8db062b5#:~:text=R%E1%BB%8Ba%20%2D%20V%C5%A9ng%20T%C3%A0u-,S%E1%BB%9F%20NN%26PTNT%3A%20B%E1%BB%87nh%20kh%E1%BA%A3m%20I%C3%A1%20virus%20I%E1%BA%A1i%20g%C3%A2y%20h%E1%BA%A1i%20tr%C3%AAn,t%E1%BB%89nh%20B%C3%A0%20R%E1%BB%8Ba%20%2D%20V%C5%A9ng%20T%C3%A0u&text=B%E1%BB%87nh%20kh%E1%BA%A3m%20I%C3%A1%20virus%20h%E1%BA%A1i,thu%E1%BB%99c%20chi%20Begomovirus%20g%C3%A2y%20ra>
- Dixon, A. G. O., Ogbe, F. O., & Okechukwu, R. U. (2010). Cassava mosaic disease in Sub-Saharan Africa: A feasible solution for an unsolved problem. *Outlook on Agriculture*, 39(2), 89-94. doi:10.5367/000000010791745349
- El-Sharkawy, M. A., de Tafur, M. M. S., & Cadavid, L. L. F. (1993). Photosynthesis of cassava and its relation to crop productivity. In W. M. Roca & A. M. Thro (Eds.), *International scientific meeting cassava biotechnology network* (pp. 314-324). Cali, CO: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT).
- Hanley-Bowdoin, L., Bejarano, E. R., Robertson, D., & Mansoor, S. (2013). Geminiviruses: Masters at redirecting and reprogramming plant processes. *Nature Reviews Microbiology*, 11(11), 777-788. doi:10.1038/nrmicro3117
- Integrated DNA Technologies. (n.d.). *OligoAnalyzer™ tool*. Truy cập ngày 10/10/2021 tại <https://sg.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>
- Jonathan, N., Dominic, S., Rob, C., Erik, D., & Lava, Y. (2019). Cassava value chains and livelihoods in South-East Asia. *Proceedings 148 Affiliation: Australian Centre for International Agricultural Research*. Truy cập ngày 10/10/2021 tại <https://www.aciar.gov.au/publication/cassava-value-chains>
- Khan, M. Z., Haider, S., Mansoor, S., & Amin, I. (2019). Targeting Plant ssDNA Viruses with Engineered Miniature CRISPR-Cas14a. *Trends in Biotechnology*, 37(8), 800-804. doi:10.1016/j.tibtech.2019.03.015
- Korimbocus, J., Coates, D., Barker, I., & Boonham, N. (2002). Improved detection of Sugarcane yellow leaf virus using a real-time fluorescent (TaqMan) RT-PCR assay. *Journal of Virological Methods*, 103(2), 109-120. doi:10.1016/S0166-0934(01)00406-2

- Le, H. H., Hoang, K., Nguyen, M. T. T., Nguyen, M. B., & Reinhardt Howeler. (2016). *The cassava revolution in Vietnam*. Truy cập ngày 10/10/2021 tại <http://www.foodcrops.vn/>
- Leiva, A. M., Siriwan, W., Lopez-alvarez, D., Barrantes, I., & Saokham, K. (2020). Nanopore-based complete genome sequence of a Sri Lankan cassava mosaic virus (Geminivirus) strain from Thailand. *Microbiology Resource Announcements*, 9(6), 8-10. doi:10.1128/MRA.01274-19
- Masago, K., Fujita, S., Oya, Y., Takahashi, Y., Matsushita, H., Sasaki, E., & Kuroda, H. (2021). Comparison between Fluorimetry (Qubit) and Spectrophotometry (NanoDrop) in the Quantification of DNA and RNA Extracted from Frozen and FFPE Tissues from Lung Cancer Patients: A Real-World Use of Genomic Tests. *Medicina (Kaunas, Lithuania)*, 57(12), Article 1375. doi:10.3390/medicina57121375
- Mason, G., Caciagli, P., Accotto, G. P., & Noris, E. (2008). Real-time PCR for the quantitation of Tomato yellow leaf curl Sardinia virus in tomato plants and in *Bemisia tabaci*. *Journal of Virological Methods*, 147(2), 282-289. doi:10.1016/j.jviromet.2007.09.015
- Mathieson, W., & Thomas, G. A. (2013). Simultaneously extracting DNA, RNA, and protein using kits: Is sample quantity or quality prejudiced? *Analytical Biochemistry*, 433(1), 10-18. doi:10.1016/j.ab.2012.10.006
- Minato, N., Sok, S., Chen, S., Delaquis, E., Phirun, I., Le, V. X., ... de Haan, S. (2019). Surveillance for Sri Lankan Cassava Mosaic Virus (SLCMV) in Cambodia and Vietnam one year after its initial detection in a single plantation in 2015. *PLoS One*, 14(2), 1-16. doi:10.1371/journal.pone.0212780
- Monis, J., & Bestwick, R. K. (1996). Detection and localization of grapevine leafroll associated *Closteroviruses* in greenhouse and tissue culture grown plants. *American Journal of Enology and Viticulture*, 47(2), 199-205.
- Morozkin, E. S., Laktionov, P. P., Rykova, E. Y., & Vlassov, V. V. (2003). Fluorometric quantification of RNA and DNA in solutions containing both nucleic acids. *Analytical Biochemistry*, 322(1), 48-50. doi:10.1016/j.ab.2003.07.009
- Mubarik, M. S., Khan, S. H., Ahmad, A., Raza, A., Khan, Z., Sajjad, M., ... Elshikh, M. S. (2020). Controlling geminiviruses before transmission: Prospects. *Plants*, 9(11), 1-12. doi:10.3390/plants9111556
- Nakayama, Y., Yamaguchi, H., Einaga, N., & Esumi, M. (2016). Pitfalls of DNA quantification using dnabinding fluorescent dyes and suggested solutions. *PLoS One*, 11(3), 1-12. doi:10.1371/journal.pone.0150528
- National Center for Biotechnology Information. (n.d.). Truy cập ngày 10/10/2021 tại <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- National Center for Biotechnology Information. (n.d.). *Primer-BLAST*. Truy cập ngày 10/10/2021 tại <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>
- Nie, X., & Molen, T. A. (2015). Host recovery and reduced virus level in the upper leaves after Potato virus Y infection occur in tobacco and tomato but not in potato plants. *Viruses*, 7(2), 680-698. doi:10.3390/v7020680
- Osen, G., Nyaboga, E. N., & Amugune, N. O. (2017). Rapid and efficient isolation of high quality DNA from cassava (*Manihot esculenta* Crantz) suitable for PCR based downstream applications. *Annual Research and Review in Biology*, 12(2), 1-10. doi:10.9734/ARRB/2017/32195

- Rey, C., & Vanderschuren, H. (2017). Cassava mosaic and brown streak diseases: Current perspectives and beyond. *Annual Review of Virology*, 4(6), 429-452. doi:10.1146/annurev-virology-101416-041913
- Schmittgen, T. D., & Livak, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols*, 3(6), 1101-1108. doi:10.1038/nprot.2008.73
- Schweitzer, C., & Scaiano, J. C. (2003). Selective binding and local photophysics of the fluorescent cyanine dye PicoGreen in double-stranded and single-stranded DNA. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 5(21), 4911-4917. doi:10.1039/b305921a
- Slakie, E., Mckee, C., Gaffney, A., Anderson, C. L., Gugerty, M. K., & Anderson, L. (2013). Control strategies for whitefly as a vector for cassava viral diseases. *EPAR Technical Report*, 233, 1-28.
- Tromas, N., Zwart, M. P., Lafforgue, G., & Elena, S. F. (2014). Within-host spatiotemporal dynamics of plant virus infection at the cellular level. *PLoS Genetics*, 10(2), 1-15. doi:10.1371/journal.pgen.1004186
- Uke, A., Trinh, H. X., Mai, Q. V., Nguyen, L. V., Ugaki, M., & Natsuaki, K. T. (2018). First report of Sri Lankan Cassava Mosaic Virus infecting cassava in Vietnam. *Plant Disease*, 102(12), Article 2669. doi:10.1094/PDIS-05-18-0805-PDN
- Wang, H. L., Cui, X. Y., Wang, X. W., Liu, S. S., Zhang, Z. H., & Zhou, X. P. (2016). First report of Sri Lankan cassava mosaic virus infecting cassava in Cambodia. *Plant Disease*, 100(5), 1029-1032. doi:10.1094/PDIS-10-15-1228-PDN
- Yeoh, H. H., & Truong, D. V. (1996). Protein contents, amino acid compositions and nitrogen-to-protein conversion factors for Cassava roots. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 70(1), 51-54. doi:10.1002/(SICI)1097-0010(199601)70:1<51::AID-JSFA463>3.0.CO;2-W

## PHỤ LỤC

### DANH MỤC TỪ VIẾT TẮT

CIAT: International Center for Tropical Agriculture

CMD: Cassava Mosaic Diseases

CTAB: Cetyltrimethylammonium bromide

EDTA: Ethylen diamine tetraacetic Acid

GuHCl: Guanidine - HCl

NH<sub>4</sub>OAc: Ammonium acetate

PCR: Polymerase chain reaction

RT-PCR: Real-time PCR

SDS: Sodium Dodecyl Sulfate

SLCMV: *Sri Lankan Cassava Mosaic Virus*

