

Các phương pháp chẩn đoán bệnh virus trên cà chua (*Solanum lycopersicum*)

Vũ Tuấn Nam^{1,2}, Chu Đức Hà³, Lê Tiến Dũng^{4*}

¹Trung tâm Nghiên cứu thực phẩm và Chuyển đổi sinh học, Đại học Quốc gia Seoul, Hàn Quốc

²Viện Nghiên cứu hệ gen, Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam

³Khoa Công nghệ nông nghiệp, Trường Đại học Công nghệ, Đại học Quốc gia Hà Nội, Việt Nam

⁴Khoa Công nghệ sinh học, Trường Đại học Nguyễn Tất Thành, Việt Nam

Ngày nhận bài 14/5/2021; ngày chuyển phản biện 17/5/2021; ngày nhận phản biện 15/6/2021; ngày chấp nhận đăng 22/6/2021

Tóm tắt:

Việc quản lý dịch bệnh do virus gây nên đối với cà chua (*Solanum lycopersicum*) vốn ảnh hưởng nghiêm trọng đến năng suất dù được quan tâm thực hiện một cách nghiêm ngặt trong sản xuất, nhưng còn gặp rất nhiều khó khăn do thiếu hụt thông tin về bệnh lý, tác nhân gây bệnh và các kỹ thuật phát hiện bệnh ở giai đoạn sớm. Trong bài viết này, các tác giả tổng hợp một số bệnh virus thường gặp trên cây cà chua kèm theo mô tả ngắn gọn về loài virus cùng với các triệu chứng điển hình. Đồng thời thảo luận về tiềm năng ứng dụng các phương pháp sinh học phân tử trong kiểm soát và chẩn đoán sớm một số nhóm virus gây bệnh hại chính trên cà chua, góp phần cung cấp những dẫn liệu cơ bản cho việc quản lý dịch bệnh do virus trên cây cà chua.

Từ khóa: cà chua, chẩn đoán, dịch bệnh, LAMP, virus.

Chỉ số phân loại: 4.1

Mở đầu

Cà chua (*Solanum lycopersicum*) là cây rau giàu dinh dưỡng, cung cấp nhiều hợp chất quan trọng, đặc biệt là một số chất chống oxy hóa như lycopene [1]. Tổng sản lượng cà chua xuất khẩu năm 2015 trên toàn thế giới đạt giá trị khoảng 1,3 tỷ USD (<http://www.fao.org/faostat>), riêng Việt Nam doanh thu xuất khẩu năm 2011 đạt 2,4 triệu USD (Tổng cục thống kê, 2012). Mặc dù là loại cây trồng dễ canh tác, phổ sinh thái tương đối rộng, góp phần quan trọng trong việc nâng cao thu nhập và giải quyết vấn đề việc làm cho các nông hộ nhưng do nhiều nguyên nhân (chủ yếu là bệnh hại [2]), hiệu quả sản xuất cà chua ở Việt Nam chưa cao, có thời kỳ còn đi xuống (giai đoạn 2011-2014, giá trị xuất khẩu giảm từ 2,4 xuống 1,6 triệu USD - Tổng cục thống kê, 2012, 2015).

Bệnh hại trên cà chua chủ yếu gây ra bởi các tác nhân vi sinh vật, như vi khuẩn, nấm, tuyến trùng (nematode), phytoplasma và virus. Trong đó với đặc trưng khả năng lây lan cao, khó phát hiện triệu chứng ở giai đoạn sớm, bệnh do virus thường gây nên thiệt hại nặng nề [2]. Trong bối cảnh đó, nghiên cứu của chúng tôi tập trung vào việc tổng hợp một số bệnh hại virus chính trên đối tượng cà chua và các phương pháp chẩn đoán ở mức độ phân tử nhằm góp thêm khuyến cáo có ích cho sản xuất.

Một số bệnh hại chính do virus trên cà chua

Cà chua được sử dụng như loài tham chiếu cho chi *Solanum* và là cây mô hình hai lá mầm điển hình trong các nghiên cứu tương tác giữa cây trồng và tác nhân gây bệnh [3]. Điều này xuất phát từ thực tế, mặc dù là một trong những cây rau quan trọng hàng đầu thế giới nhưng sản xuất cà chua hiện nay đang bị ảnh hưởng

nghiêm trọng bởi hàng loạt tác nhân gây bệnh [4]. Bên cạnh các tác nhân như nấm và vi khuẩn, rất nhiều loại virus gây bệnh đã được ghi nhận trên cây cà chua ở vùng nhiệt đới và cận nhiệt đới. Cụ thể, có khoảng 136 loài virus đã được xác định trên cây cà chua, con số này cao hơn rất nhiều so với các loại cây rau khác, như hạt tiêu (*Piper nigrum*, 62 loài), khoai tây (*Solanum tuberosum*, 57 loài), xà lách (*Lactuca sativa*, 53 loài) [5]. Một số đối tượng gây bệnh trên cà chua điển hình có thể nhắc đến như virus khảm dưa chuột (*Cucumber mosaic virus* - CMV), virus khảm thuốc lá (*Tobacco mosaic virus* - TMV), virus đốm héo cà chua (*Tomato spotted wilt virus* - TSWV), bên cạnh một số virus thường gặp khác như khảm Y khoai tây (*Potato virus Y*), khảm cà chua (*Tomato mosaic virus* - ToMV), héo vàng lá cà chua (*Tomato yellow leaf curl virus* - TYLCV), *Pepino mosaic virus* (PepMV) và *Tomato torrado virus* (ToTV)... Hình ảnh mô tả triệu chứng của một số bệnh virus cà chua được thể hiện trên hình 1.

CMV là một trong những virus phổ biến nhất, gây hậu quả nghiêm trọng cho nhiều loại rau quả khác nhau, như cà rốt, dưa chuột, rau diếp, hạt tiêu và một số cây cảnh. CMV có dạng hình cầu, hạt virus không có vỏ, chứa khoảng 18% vật chất di truyền. Sự phong phú về số lượng loài cây chủ được coi là một nguồn lây lan CMV chủ yếu cho cây cà chua. Các triệu chứng bệnh do CMV trên cà chua có thể khác nhau tùy thuộc mức độ nghiêm trọng và thời gian nhiễm bệnh nhưng thường gặp các triệu chứng điển hình như: cây còi cọc và úa vàng hoặc lốm đốm lá. Đặc điểm đặc trưng nhất của bệnh này là trên lá xuất hiện các nếp nhăn nổi lên giống như dây giấy.

Virus TMV và ToMV là 2 loài rất gần gũi với nhau bởi chúng đều gây ra các triệu chứng tương tự ở các đối tượng cây chủ. Đây

*Tác giả liên hệ: Email: research@letindung.info

Molecular methods for detection of viral diseases in tomato (*Solanum lycopersicum*)

Tuan Nam Vu^{1,2}, Duc Ha Chu³, Tien Dung Le^{4*}

¹Center for Food and Bioconvergence, Seoul National University, South Korea

²Institute of Genome Research, VAST, Vietnam

³Faculty of Agricultural Technology, University of Engineering and Technology, Vietnam National University, Hanoi

⁴Faculty of Biotechnology, Nguyen Tat Thanh University, Vietnam

Received 14 May 2021; accepted 22 June 2021

Abstract:

The viral disease is one of the biggest challenges in tomato (*Solanum lycopersicum*) production. Although disease management is highlighted and seriously controlled in whole production areas, there are still many difficulties due to the lack of understanding of the symptoms, pathogens, and detection methods to control the viral disease at early stages. In this review, the authors summarised some major viral diseases in tomato plants with a brief of virus characteristics and their specific symptoms. Then the authors discussed the application of the molecular techniques, with a focus on loop-mediated isothermal amplification (LAMP), for the detection of tomato viral diseases in the early stages of infection, thereby providing a solid foundation for further improvement of virus-free tomato production.

Keywords: diagnosis, disease, LAMP, tomato, virus.

Classification number: 4.1



Hình 1. Một số triệu chứng của cà chua bị nhiễm bệnh gây bởi virus. (A) Các đốm hoại tử ở gốc lá do virus ToTV gây ra; (B) Lá biến dạng, chuyển màu vàng và còi cọc do virus TYLCV; (C) Quả cà chua bị nhiễm bệnh gây ra bởi virus PepMV; (D) Các vòng bất thường xuất hiện trên lá bị nhiễm bệnh gây bởi Pelargonium zonate spot virus; (E) Quả bị hoại tử do Tomato marchitez virus; (F) Hiện tượng bạc lá gây ra bởi Tomato chlorosis virus; (G) Đốm hoại tử ở lá gây ra bởi Tomato necrotic spot virus.

là nhóm virus phổ biến cho dạng lây nhiễm do tiếp xúc. Virus TMV có dạng thẳng, khá tương đồng với ToMV, đều không có vỏ và phần nucleocapsid có hình gậy thẳng. Những virus này được coi là phổ biến, có phổ ảnh hưởng rộng, gây bệnh trên một số loại hoa, cỏ dại và các loại rau (như cà chua, hạt tiêu, cà tím). Cây cà chua bị nhiễm bệnh có các đặc trưng: xuất hiện một số đốm sáng màu xanh lá cây và màu xanh đậm trên lá, một số lá có thể bị cuộn tròn. Các triệu chứng khác có thể bao gồm cây còi cọc, quả chín không đều và giảm khả năng tạo quả, dẫn đến năng suất giảm. Những triệu chứng này có thể thay đổi tùy thuộc vào chủng virus, giống cà chua, thời gian lây nhiễm và điều kiện môi trường [6].

Virus TSWV, giống như các loại virus phổ biến khác, có thể lây nhiễm bệnh trên một số lượng lớn cây cảnh, cỏ dại và rau, trong đó cà chua chịu ảnh hưởng rất nghiêm trọng với đặc điểm đốm vàng ở lá non, các vết tối trên thân và nâu ở ngọn [7]. Quả non thường xuất hiện đốm và phát triển thành các vòng màu vàng, quả trưởng thành thường có các đốm lớn màu trắng hoặc vàng, làm cho chúng khó có thể bán được, gây thiệt hại kinh tế cho người trồng [2]. Ngoài cà chua, virus này còn được coi là tác nhân gây bệnh cho hàng loạt cây trồng khác như đậu, lạc, rau diếp, thuốc lá, khoai tây và hạt tiêu [7].

Pepino mosaic virus, còn được gọi là PepMV, thuộc chi *Potexvirus*, họ *Flexiviridae*, được biết đến như tác nhân gây bệnh khảm xoắn lá phổ biến nhất trên cây cà chua. Cấu trúc điển hình của PepMV là có dạng sợi trần, thường được tìm thấy trong tế bào chất ở các mẫu tế bào lá. Triệu chứng của bệnh xoắn lá do PepMV gây ra là sự xuất hiện các vết khảm, đốm màu vàng, làm lá bị xoắn lại, sau đó thân cây, đôi khi cả cánh hoa xuất hiện các mảng màu nâu, đặc biệt quả chín thường xuất hiện đốm khảm với kích thước khác nhau. Mức độ biểu hiện của PepMV phụ thuộc rất nhiều vào thời tiết do virus này ưa thích điều kiện nhiệt độ và ánh sáng trong nhà kính. Hơn nữa, PepMV có thể tồn tại trong thời gian dài trong hạt và quả, đây được xem như nguyên nhân chính mà bệnh khảm xoắn lá dễ dàng phát tán trên các cây non.

Một số loài virus mới thuộc lớp Torradovirus, đặc trưng bởi các triệu chứng lá bị hoại tử nghiêm trọng [2] cũng đã được ghi nhận. Triệu chứng bệnh ban đầu là các đốm hoại tử được bao quanh bởi một khu vực màu xanh lá cây hoặc màu vàng nhạt xuất hiện ở cuống lá, sau đó lớn dần lên và trở nên rõ ràng hơn dưới dạng các vết bóng hình 1A). Trong giai đoạn sau, lá và quả bị hoại tử, sinh trưởng của cây bị ngừng trệ dẫn đến thiệt hại kinh tế nghiêm trọng [8]. Tên ToTV đã được đề xuất như một loài mới, dựa trên mô tả về triệu chứng đặc trưng như vết bóng trên lá, quả của cây cà chua bị nhiễm bệnh [8]. Từ năm 2003, một bệnh gây ra các triệu chứng hoại tử rất giống nhau ở lá, thân và quả đã được quan sát thấy ở cây cà chua Mexico, với tên gọi địa phương là bệnh héo úa. Nguyên nhân ban đầu được cho là do TSWV thuộc chi *Tospovirus*, mặc dù virus này không thể được phát hiện trong các cây có triệu chứng. Tuy nhiên, khi soi dưới kính hiển vi điện tử, người ta quan sát thấy sự hiện diện của một loài virus khác với các virus được mô tả trước đó và được đề xuất đặt tên là *Tomato apex necrosis virus* (ToANV) [2]. Bên cạnh đó, trong những thập kỷ qua, các loài virus thuộc chi *Crinillin* spp. trở thành vấn đề nghiêm trọng trong sản xuất cà chua, điển hình là *Tomato chlorosis virus* (ToCV) [9] và *Tomato*

infectious chlorosis virus (TICV) [10]. TICV lần đầu tiên được xác định trên các cây cà chua bị bệnh vàng lá trồng tại ruộng vào năm 1993 ở California, với thiệt hại ước tính 2 triệu USD trong năm đó [11]. Ban đầu bệnh được gọi là rối loạn lá vàng do rối loạn dinh dưỡng hoặc nhiễm độc tế bào do thuốc trừ sâu gây nên bởi các phân tích ban đầu không phát hiện sự hiện diện của virus.

Tác nhân virus gây bệnh mới được phát hiện ở cây cà chua

Các tác nhân virus gây bệnh mới trên cây trồng trong đó có cà chua thường xuất hiện do sự thay đổi môi trường, vector, vật chủ hoặc cấu trúc hệ gen của virus. Bên cạnh đó, sự phát triển về giao lưu thương mại quốc tế và biến đổi khí hậu cũng được coi là những tác nhân quan trọng. Gần đây, một loại virus gây bệnh mới xuất hiện có thể dẫn đến sự lây lan rộng hơn trong các nhà kính và tại các vườn đã được ghi nhận và mô tả từ các nước Jordan, Israel, Mexico, Hoa Kỳ, Đức, Ý, Palestine, Thổ Nhĩ Kỳ và Trung Quốc là *Tomato brown rugose fruit virus* (ToBRFV) thuộc giống Tobamovirus [12-22]. Salem và cs (2016) [13] là người đầu tiên báo cáo sự bùng phát của ToBRFV trên cây cà chua trong nhà kính vào năm 2015 từ Jordan. Tuy nhiên, sự xuất hiện đột ngột của bệnh này ở các nước hiện đang có bệnh vẫn chưa được hiểu rõ, có thể các triệu chứng thể hiện còn xa lạ. Cây cà chua là vật chủ chính của ToBRFV vì một số nông dân ưa thích các giống cà chua trồng ở miền bắc Palestine [20] có khả năng chứa loại virus này và cũng có thể chúng truyền qua con đường hạt giống khi trồng trong nhà kính ở các nước Bắc Âu. Tuy nhiên, các công bố hiện tại cho thấy căn bệnh mới này có khả năng lây truyền cơ học theo nhựa cây bị nhiễm bệnh thông qua nhiều con đường như bấm dính vào cơ thể con người, quần áo, chậu, bao bì, vật liệu vận chuyển cũng như các dụng cụ làm việc và dung dịch dinh dưỡng [23].

Bên cạnh đó, 2 loại virus mới được phân lập từ cà chua trồng ở miền bắc Brazil (*Solanum lycopersicum*) cũng đã được đề xuất đặt tên là *Hibiscus golden mosaic virus* (HGMV) và *Tomato chlorotic leaf curl virus* (ToCLCV) thuộc giống Begomovirus (họ Geminiviridae), một nhóm tác nhân gây ra các bệnh nghiêm trọng trên một số loại cây trồng có tầm quan trọng về kinh tế trên toàn thế giới [24].

Tóm lại, biểu hiện bệnh do virus rất phức tạp và khó có thể phân biệt, nhất là ở giai đoạn ủ bệnh. Việc kiểm soát sự phát tán của virus không đơn giản, do chúng có khả năng tồn tại cao và dễ dàng tạo ra các biến chủng mới. Vấn đề này thách thức các nhà khoa học tạo ra giống cà chua kháng bệnh virus, cũng như phát triển các kỹ thuật chẩn đoán bệnh ở giai đoạn sớm. Thực tế cho thấy, công tác kiểm soát dịch bệnh do virus bằng các biện pháp kỹ thuật truyền thống đang gặp rất nhiều khó khăn. Vì thế, những ưu việt của phương pháp sinh học phân tử hiện đại mang lại đã cho phép việc chẩn đoán được chính xác hơn, ở giai đoạn sớm hơn, nhờ đó kiểm soát được mức độ lây lan của bệnh hại cà chua do virus gây ra.

Chẩn đoán bệnh virus trên cà chua bằng phương pháp sinh học phân tử

Triệu chứng bên ngoài của bệnh do virus rất khó phát hiện, đặc biệt là chúng có thể lây lan trong hệ thống nhà kính cũng như qua hạt của cây bị nhiễm bệnh. Chẩn đoán sớm được xem là nền tảng

cơ bản cho công tác quản lý dịch bệnh cũng như đưa ra những dự báo chính xác về thiệt hại do bệnh gây ra. Mặt khác, khi bệnh virus đã xuất hiện và lây lan trên đồng ruộng, các biện pháp xử lý thông thường rất ít có hiệu quả nên việc kiểm soát tác nhân virus luôn được ưu tiên hàng đầu. Đã có nhiều phương pháp chẩn đoán bệnh áp dụng trên đối tượng cà chua như sử dụng cây chỉ thị, chỉ thị màu, dựa vào triệu chứng, nhưng nhìn chung những kỹ thuật này tỏ ra kém hiệu quả với tác nhân gây bệnh virus. Gần đây, có hai cách tiếp cận phổ biến để giải bài toán chẩn đoán bệnh virus một cách chính xác là phương pháp kháng huyết thanh (serological method) và phân tử (molecular method) [25].

Dựa trên nguyên lý sử dụng kháng thể đặc hiệu để nhận biết kháng nguyên, một số kỹ thuật chẩn đoán đã được ghi nhận như phương pháp miễn dịch liên kết enzyme (Enzyme-linked immunosorbent assay - ELISA), phân tích miễn dịch học mô mẫu (Tissue blot immunoassay - TBIA), cảm biến miễn dịch tinh thể thạch anh (Quartz crystal microbalance immunosensor - QCM), trong đó, phương pháp ELISA tỏ ra hiệu quả do thao tác khá đơn giản, nhanh chóng, tiện lợi, có thể thương mại hóa thành bộ kit [25]. Theo đó, một số virus gây bệnh chính trên cà chua, như PepMV, CMV, TMV, ToMV, PVY và PVMV [26-30] đã được phát hiện và xác định trên các mẫu lá, hạt bằng kỹ thuật ELISA (bảng 1). Tương tự, TBIA cũng sử dụng kháng thể chống lại virus, nhờ vào mẫu dò đã được đánh dấu để phát hiện sự có mặt của virus. Phương pháp TBIA cũng có các ưu điểm nhanh, nhạy, đơn giản (không cần dịch chiết của virus) và cũng có thể phát triển thành bộ kit [25]. Gần đây, kỹ thuật mới QCM cũng đã được phát triển với mục tiêu giảm bớt thời gian thao tác nhằm phát hiện bệnh virus một cách chính xác với độ nhạy rất cao. Mặc dù các phương pháp này rất thông dụng nhưng độ chính xác lại phụ thuộc khá lớn vào lớn yếu tố, như chất lượng kháng thể, mẫu, thời gian lây bệnh và hóa chất.

Bảng 1. Tóm lược thành tựu trong chẩn đoán một số virus gây bệnh chính trên cà chua bằng kỹ thuật ELISA và LAMP.

TT	Tên virus	Kỹ thuật chẩn đoán		Nguồn
		ELISA	LAMP	
1	PepMV	+	+	[26]
2	CMV	+	+	[27, 31]
3	TMV	+	+	[28, 32]
4	ToMV	+	+	[6, 28]
5	PVY	+	+	[29, 33]
6	PVMV	+	-	[30]

Bên cạnh đó, chẩn đoán bệnh thông qua việc phát hiện vật chất di truyền đặc trưng của virus (DNA hoặc RNA) bằng kỹ thuật sinh học phân tử cũng đã thu được nhiều kết quả tích cực trong việc phát hiện sớm sự có mặt của virus trên mẫu cà chua. Đại diện cho nhóm phương pháp chẩn đoán bệnh virus cà chua theo hướng này có thể kể đến như PCR với chỉ thị RFLP truyền thống, PCR lồng (Nested PCR), RT-PCR (Reverse-transcription PCR). Nhìn chung, các kỹ thuật này cũng gặp phải một số vấn đề như chi phí cao, đòi hỏi trang thiết bị hiện đại, trong khi sự tạp nhiễm có thể dẫn đến kết quả dương tính giả [34]. Vì thế, một trong những mối quan tâm hàng đầu hiện nay là việc chẩn đoán bệnh hại cây cà chua nói riêng

và cây trồng nói chung bằng các kỹ thuật sinh học phân tử hiện đại với tiêu chí chẩn đoán nhanh, dễ thao tác, giá thành thấp nhưng vẫn phải đạt độ chính xác cao.

Kỹ thuật đầu tiên được đề cập là khuếch đại vòng tròn cuộn (Rolling circle amplification - RCA) để nhân các trình tự DNA mạch vòng trên nguyên lý chung là dùng enzyme DNA polymerase của thực khuẩn thể $\phi 29$ và mỗi hexamer để nhân các phân tử DNA mạch vòng thành các multimer mạch thẳng, mang nhiều đoạn DNA sợi đơn (single-stranded DNA - ssDNA) của virus. Sản phẩm RCA sau đó được cắt bằng enzym cắt giới hạn thích hợp trong điều kiện không triệt để tạo thành nhiều phân mảnh chứa trình tự 1 bộ gen (monomer), 2 bộ gen (dimer) và nhiều bộ gen (multimer) của virus. Bằng cách này, RCA tỏ ra ưu việt hơn so với phương pháp PCR truyền thống. Năm 2006, các nhà khoa học đã thành công trong việc phát hiện một số virus gây bệnh, trong đó có *Tomato golden mosaic virus*, *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) ở nồng độ chỉ từ 1 đến 50 pg trong 50 ng mẫu DNA. Gần đây, một số nhóm nghiên cứu khác cũng đã xây dựng hoàn chỉnh phương pháp RCA để xác định sự có mặt của TYLCV [35].

Tiếp theo, kỹ thuật RT-PCR cũng được sử dụng nhiều ở quy mô phòng thí nghiệm nhằm tổng hợp DNA trên khuôn mẫu RNA virus. Kỹ thuật RT-PCR không chỉ giúp ích cho việc chẩn đoán bệnh virus mà sản phẩm khuếch đại của RT-PCR cũng được sử dụng để giải trình tự, từ đó có thể nghiên cứu sâu hơn về các dòng virus gây bệnh. RT-PCR được ứng dụng trong việc phát hiện *Southern tomato virus* (STV), một loại virus RNA sợi kép (dsRNA) thuộc giống Amalgavirus (họ *Amalgamaviridae*) trên cây cà chua với độ nhạy từ 10^4 đến 10^{11} bản sao của STV trên mỗi nanogram RNA tổng số. STV được phát hiện trong các mô cây cà chua khác nhau, cũng như trong vỏ và phôi hạt với nồng độ virus không thay đổi theo thời gian trong các mô lá. Kỹ thuật RT-qPCR có thể được sử dụng trong các chương trình vệ sinh để hạn chế sự lây lan của virus và trong nghiên cứu ảnh hưởng của STV ở các bệnh nhiễm trùng hỗn hợp hoặc các điều kiện căng thẳng phi sinh học [36]. Phương pháp RT-PCR cũng tỏ ra cực kỳ hiệu quả trong khả năng nhận dạng và xác định ToBRFV. Hầu hết các điểm bùng phát ToBRFV tại Mexico, Hoa Kỳ, Đức, Italya, Palestine, Thổ Nhĩ Kỳ và Trung Quốc (được nêu ở phần trên) đều có thể được xác định bằng kỹ thuật RT-PCR [15-22].

Với ưu điểm trội so với PCR truyền thống, kỹ thuật tổng hợp DNA vòng, còn gọi là LAMP (Loop-mediated isothermal amplification) được sử dụng rộng rãi trong chẩn đoán tác nhân gây bệnh trên cây trồng nói chung. Cho đến nay, khoảng 20% tác nhân gây bệnh đã được xác định thông qua kỹ thuật LAMP, trong đó có ít nhất 50 loại virus thực vật. Nguyên tắc chung của LAMP là sử dụng 4 mỗi khác nhau, bao gồm FIP (Forward inner primer), F3 (Forward outer primer), BIP (Backward inner primer) và B3 (Backward outer primer) được thiết kế đặc hiệu để nhận biết 6 trình tự riêng biệt trên gen đích. Quá trình khuếch đại gen có thể được thực hiện trong một bước bằng cách ủ hỗn hợp mẫu DNA, mỗi, *Bst* DNA polymerase ở nhiệt độ thích hợp [37]. Ưu điểm của phương pháp này là hiệu quả khuếch đại gen rất cao (10^9 - 10^{10} lần) trong khi thời gian phản ứng ngắn (45-60 phút), và nhiệt

độ phản ứng chỉ dao động trong khoảng 60-65°C. Điều này cho phép kỹ thuật LAMP có thể được tiến hành ngay trong điều kiện ruộng thí nghiệm với một số thiết bị gia nhiệt cần thiết. Cho đến nay, các nhà khoa học đã thành công trong việc xác định một loạt virus gây bệnh trên cà chua bằng kỹ thuật LAMP và RT-LAMP (reverse-transcription LAMP), như CMV, TMV [31, 32]. Gần đây, các bệnh hại *Tomato back ring virus* [38], *Tomato chlorosis virus* [10], *Tomato torrado virus* [39], *Southern tomato virus* [40], *Chrysanthemum stem necrosis virus* [41] cùng nhiều bệnh virus cà chua khác cũng đã được phát hiện bằng kỹ thuật này (bảng 1). Các chỉ thị phân tử được sử dụng để phát hiện các tác nhân virus gây bệnh phổ biến trên cây cà chua được tóm tắt ở bảng 2.

Bảng 2. Các đoạn mỗi phân tử được sử dụng để nhận biết các tác nhân gây bệnh trên cà chua.

Tên mỗi	Trình tự mỗi	Mục tiêu	Phương pháp	Nguồn
TMV330F	TCAACACARCAAGC	ToMV, TMV, Pepper mild mottle virus (PMMoV)	RT-PCR	[28]
TMV685R	AGGTCCARACCMCCAG			
ToMV5723F	CTCCATCGCAATTGTG			
ToMV6153R	CCCAGACATCTTTC			
PMMoV5543F	GGTCAGTGCCGAACAAG			
PMMoV6012R	CGTCTACTCTACGAGTAGC	CMV subgroup II		
CMV II (F)	CTACGTTTATCTTCC			
CMV II (R)	AACCGGTGATTACCATCGC			
CMV I (F)	GCCACCAAAAATAGACCG	CMV subgroup I		
CMV I (R)	ATCTGTGGCGTGGATTCT			
TMV (F)	CGATGATGATTCGAGGC	TMV	Multiplex RT-PCR	[42]
TMV (R)	GAGGTCCARACCAAMCCAG			
ToMV (F)	CATCTGTATGGGCTGAC	ToMV		
ToMV (R)	GAGGTCCARACCAAMCCAG			
F3	GATGATCTCTAGAATTGTATTGG	Chrysanthemum stem necrosis virus (CSNV)	RT-LAMP	[41]
B3	GTTGGCAGCAGTTTCTG			
FIP	GCATGTTGGATCTACAGTGC GT CTGCCCTACTATTCCG			
BIP	TTGAAAGGTCAAGGCACTATAACA GTGTATTCAITTTTGGTATAGACC			
F-loop	GCCATCAATTTGCCAGTTGG			
B-loop	GATCTATCTGTTTGTGT	Chrysanthemum stem necrosis virus (CSNV)	RT-PCR	[43]
CSNV-N5	GAGCGACTGCGGAATACTCT			
CSNV-N3	GACACACTTAAATCTTTAACACACC			
FIP	TGGTGAGGACAATACCCAGTGTAACAATCTCTACTTCACTC	PepMV	one-step RT-LAMP	[44]
BIP	TCAATCAGTGCCAGGTCATCATTAAGAATCTCGG TGTG			
Loop F	GTATGAGGACATTAAGCTTGTITCC			
Loop B	GACGGTGACCCATAGTIA			
F3	TCAAGACGGAATAAGAAG			
B3	AACTTAACCCGTTCCAAG	Tomato chlorosis virus	RT-LAMP, RT-PCR	[10]
ToCVF3	CTGCCTCATCTCATTTGATG			
ToCVB3	GTTTCACTAGTCCGGTCT			
ToCVFIP	GTTCTGTGCAAAAATTGCATCC G TCAACGATTATTATGTCAGTGG			
ToCVBIP	ACCTGTTGAGAAGATGGTCCTTGCCAAGAATTTTCGAGACA			

PA	TAATATTACCKGWKGVCCSC	Tomato yellow leaf curl virus	PCR	[45]
PB	TGGACYTTRCAWGBCCCTTCACA			
F3	ATACGACATAGGAGAACTGA	Potato virus Y	RT-LAMP RT-PCR	[46]
B3	ACGCTTCTGCAACATCTGAG			
FIP	GTTTGGCGAGGTTCCATTTTCTG TGATGAATGGGCTTATGGT			
BIP	TGAAACCAATCGTTGAGAATGA TGTGCCATGATTGCTTAAG			
Y3S	ACGTCCAAAATGAGAATGCC			
Y4A	TGGTGTTCGTGATGTGACCT			
PVY 1F	AAATGACACAATTGATGCAGGAG	Potato virus Y	RT-PCR, SSCP	[29]
PVY 1R	TAAAGTAGTACAGGAAAAGCCA			
PVY 2F	ACGTMAAAATGAGAATGCC			
PVY 2R	CATTGWATGTGCGCTTCC			
F3_Vp35	ACCAACCCATATCTCCC	Tomato torrado virus	RT-LAMP	[39]
B3_Vp35	CCTTACAGCTTCATTGGCA			
FIP_Vp35	GCCTGCTCTTTGCCACATTGAT TGTTATGATGGCTTAACG			
BIP_Vp35	GTGGCCAACTAGTGTGGAAT TCATGCTATCCACACTGC			
LoopF_Vp35	CTCTAGTCACTGCGAACTT			
LoopB_Vp35	ATACATCCACCTCATTGCG			
F3-CP	GAGACTCAGAGGAATGACATG			
B3-CP	CCTCCTTGACTGTGCTTCC			
FIP-CP	TTGGTTGCGATCAAGTCTCTC GAGGAGGAGATCGCTGAT	Southern tomato virus	RT-LAMP	[40]
BIP-CP	GAGCCTGTAGCCGGTATGTGG GGTGAAGTCTGGTAAA			
LoopF-CP	CGCTTGACAATCTACGCTG			
LoopR-CP	TGAGTGACTACGAGTTGAACG			
CPF	GCCTGTCTCTCTCGCAATG			
CPR	AAGGAG CCAAATGAAATG			
FIP	GGTTCTGGTGCTAGG GGTGC ACGGCAAATTTGGGGA	Tomato black ring virus	RT-LAMP RT-PCR	[38]
BIP	ACATATCCATGGTATAAGGCCAA G-CCAA GCAAATGCTGGTTA			
F3	ACTCTGCAAAATACAGTCTCC			
B3	TGTATCGAGATGCTCAAGC			
F3 SF371	TGCAGTCCGTTGAGGAAAC	Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV)	LAMP PCR	[47]
B3 SF372	CCTGTACGTCCATGATCGTC			
FIP SF373	AGTCACGGCCCTTACAAACGCC CAATACATTGGGCCACG			
BIP SF374	CTCGAAGGTTCCGCCAAGGCCA CAATGGGGACAGCAGC			
F3 SF448	GAGCCTCTGACTTACTGCC			
B3 SF449	CATCCAAACATTCAGGGAGC			
FIP SF450	GACGGACGATCTGCACGTGGAG TTAAGAGCTCGGCGCTA			
BIP SF451	GAAACTCACCCAGTCGACGG ATCCAGTTACAGCTCAAGT			
F3 SF432	GCATGTTGAAATGAATCGGTG			
B3 SF433	CATCTGTGTAACCCCTCGTG			
FIP SF434	ACCAAATAGCCATTAGGTGCCA ATCCCTCAAAGCTCTATGGCAAT			
BIP SF435	CAAATCATTAAGCGGCCATCCG TCCACATAAAGGAAAGGCG			
SF301	GTCTTATGAGCAACGGGATG			
SF303	GAACATGACCTGATTAGTGTG			

Kết luận

Hiện có hơn 136 loài virus gây bệnh trên cây cà chua cùng với các triệu chứng điển hình đã được phát hiện và mô tả chi tiết, nhưng việc nhận dạng và phân biệt chúng bằng mắt thường tương đối khó, nhất là ở giai đoạn ủ bệnh. Việc ứng dụng các kỹ thuật sinh học phân tử để chẩn đoán bệnh chính xác ở giai đoạn sớm kết hợp chọn tạo các giống kháng để quản lý dịch hại, giảm thiểu khả năng lây lan vốn rất mạnh của virus, do vậy có tính cấp thiết rõ rệt.

Trong lĩnh vực chẩn đoán bệnh hại trên cây trồng nói chung, cây cà chua nói riêng, các phương pháp PCR truyền thống, RT-PCR hiện đại và LAMP đã thu được những thành công nhất định với tiêu chí ưu tiên là phát hiện sớm, chi phí thấp, dễ thao tác ngoài thực tế, độ chính xác cao và không đòi hỏi máy móc phức tạp.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] E. Elbadrawy, A. Sello (2016), "Evaluation of nutritional value and antioxidant activity of tomato peel extracts", *Arab. J. Chem.*, **9**, pp.1010-1018.
- [2] K.B. Scholthof, et al. (2011), "Top 10 plant viruses in molecular plant pathology", *Mol. Plant Pathol.*, **12**, pp.938-954.
- [3] C. Gebhardt (2016), "The historical role of species from the *Solanaceae* plant family in genetic research", *Theor. Appl. Genet.*, **129**, pp.2281-2294.
- [4] V.K. Singh, et al. (2017), "Disease management of tomato through PGPB: current trends and future perspective", *3 Biotech*, **7**, DOI: 10.1007/s13205-017-0896-1.
- [5] C. Xu, et al. (2017), "Diversity, distribution, and evolution of tomato viruses in China uncovered by small RNA sequencing", *J. Virol.*, **91**, DOI: 10.1128/JVI.00173-17.
- [6] T. Watanabe, M. Furukawa (2008), "An assay for detection of *Tobacco mosaic virus* and *Tomato mosaic virus* from their infected tomato (*Lycopersicon esculentum*) leaves by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP)", *Bulletin of the Fukui Agricul. Exp. Stat.*, **48**, pp.43-47.
- [7] R. Gupta, et al. (2018), "An insight into the Tomato spotted wilt virus (TSWV), tomato and thrips interaction", *Plant Biotech. Rep.*, **12**, pp.157-163.
- [8] M. Verbeek, et al. (2007), "Identification and characterisation of *tomato torrado virus*, a new plant picorna-like virus from tomato", *Arch. Virol.*, **152**, pp.881-890.
- [9] E. Fiallo-Olivé, J. Navas-Castillo (2019), "Tomato chlorosis virus, an emergent plant virus still expanding its geographical and host ranges", *Mol. Plant Pathol.*, **20**, pp.1307-1320.
- [10] R.N. Zhao, et al. (2013), "First report of *Tomato chlorosis virus* in China", *Plant Disease*, **97**, DOI: 10.1094/PDIS-12-12-1163-PDN.
- [11] J. Duffus, et al. (1994), "Lettuce chlorosis virus - a new whitefly-transmitted closterovirus in the southwest", *Phytopathology*, **84**, pp.591-596.
- [12] J.O. Oladokun, et al. (2019), "Tomato brown rugose fruit disease: current distribution, knowledge and future prospects", *Plant Pathol.*, **68**, pp.1579-1586.
- [13] N. Salem, et al. (2016), "A new tobamovirus infecting tomato crops in Jordan", *Arch. Virol.*, **161**, pp.503-506.
- [14] N. Luria, et al. (2017), "A new Israeli tobamovirus isolate infects tomato plants harboring *Tm-2²* resistance genes", *PLOS ONE*, **12**, p.0170429.

- [15] J.M. Cambrón Crisantos, et al. (2018), "First report of *Tomato brown rugose fruit virus* (ToBRFV) in Michoacan, Mexico", *Revista Mexicana De Fitopatologia*, **37**, pp.185-192.
- [16] <https://blogs.cdfa.ca.gov/Section3162/?p=5843>.
- [17] K.S. Ling, et al. (2019), "First report of Tomato brown rugose fruit virus infecting greenhouse tomato in the US", *Plant Disease*, **103**, DOI: 10.1094/PDIS-01-20-0212-PDN.
- [18] W. Menzel, et al. (2019), "First report of Tomato brown rugose fruit virus infecting tomato in Germany", *New Disease Reports*, **39**, DOI: 10.5197/j.2044-0588.2019.039.001.
- [19] S. Panno, et al. (2019), "First report of tomato brown rugose fruit virus on tomato crops in Italy", *Plant Disease*, **103**, DOI: 10.1094/PDIS-12-18-2254-PDN.
- [20] R. Alkowni, et al. (2019), "Molecular identification of tomato brown rugose fruit virus in tomato in Palestine", *J. Plant Pathol.*, **101**, pp.719-723.
- [21] <https://www.hortidaily.com/article/9109530/first-report-of-tomato-brown-rugose-fruit-virus-on-tomato-in-turkey/#:~:text=USD%3A%201.2142-,First%20report%20of%20Tomato%20brown%20rugose%20fruit%20virus%20on%20tomato,their%20magazine%20New%20Disease%20Reports>.
- [22] Z.Y. Yan, et al. (2019), "First report of tomato brown rugose fruit virus infecting tomato in China", *Plant Disease*, **103**, DOI: 10.1094/PDIS-05-19-1045-PDN.
- [23] A. Wilstermann, H. Ziebell (2019), "Tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV)", *JKI Data Sheets - Plant Diseases and Diagnosis*, **2019**, pp.1-4.
- [24] A.F.F. Quadros, et al. (2019), "Two new begomoviruses infecting tomato and *Hibiscus* sp. in the Amazon region of Brazil", *Arch. Virol.*, **164**, pp.1897-1901.
- [25] J.J. Jeong, H.J. Noh (2014), "A review of detection methods for the plant viruses", *Res. Plant Disease*, **20**, pp.173-181.
- [26] A. Salomone, P. Roggero (2002), "Host range, seed transmission and detection by ELISA and lateral flow on an Italian isolate of *pepino mosaic virus*", *J. Plant Pathol.*, **84**, pp.65-68.
- [27] H. Eryigit (2006), "Identification of *Cucumber mosaic virus* in tomato (*Lycopersicon esculentum*) growing areas in the north-west Mediterranean region of Turkey AU - Yardimci", *NZ J. Crop. Hortic. Sci.*, **34**, pp.173-175.
- [28] J.E.M. Almeida, et al. (2018), "Procedure for detecting tobamovirus in tomato and pepper seeds decreases the cost analysis", *Bragantia*, **77**, pp.590-598.
- [29] J. Aramburu, et al. (2006), "Characterization of potato virus Y isolates from tomato crops in northeast Spain", *Eur. J. Plant Pathol.*, **115**, pp.247-258.
- [30] A. Ahmad, M. Ashfaq (2016), "First report of Chilli veinal mottle virus in tomato in Pakistan", *J. Plant Pathol.*, **99**, pp.1-13.
- [31] A.I. Bhat, et al. (2013), "Rapid detection of *Piper yellow mottle virus* and *Cucumber mosaic virus* infecting black pepper (*Piper nigrum*) by loop-mediated isothermal amplification (LAMP)", *J. Virol. Methods*, **193**, pp.190-196.
- [32] Y. Liu, et al. (2010), "Rapid detection of *Tobacco mosaic virus* using the reverse transcription loop-mediated isothermal amplification method", *Arch. Virol.*, **155**, pp.1681-1685.
- [33] K. Treder, et al. (2017), "Detection of *Potato virus Y* (PVY) by reverse-transcription loop-mediated nucleic acid amplification (RT-LAMP)", *Plant Breed Seed Sci.*, **75**, pp.77-85.
- [34] D.T. Le, N.T. Vu (2017), "Progress of loop-mediated isothermal amplification technique in molecular diagnosis of plant diseases", *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.*, **60**, pp.169-180.
- [35] B. Bang, et al. (2014), "A rapid and efficient method for construction of an infectious clone of *Tomato yellow leaf curl virus*", *Plant Pathol. J.*, **30**, pp.310-315.
- [36] L. Elvira-Gonzalez, et al. (2018), "A sensitive real-time RT-PCR reveals a high incidence of Southern tomato virus (STV) in Spanish tomato crops", *Span. J. Agric. Res.*, **16(3)**, DOI: 10.5424/sjar/2018163-12961.
- [37] K. Nagamine, et al. (2002), "Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers", *Mol. Cellul. Probes.*, **16**, pp.223-229.
- [38] B. Hasiow-Jaroszewska, et al. (2015), "Rapid detection of genetically diverse *Tomato black ring virus* isolates using reverse transcription loop-mediated isothermal amplification", *Arch. Virol.*, **160**, pp.3075-3078.
- [39] M. Budziszewska, et al. (2016), "One-step reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) for detection of *Tomato torrado virus*", *Arch. Virol.*, **161**, pp.1359-1364.
- [40] L. Elvira-Gonzalez, et al. (2016), "Fast detection of *Southern tomato virus* by one-step transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP)", *J. Virol. Methods*, **241**, pp.11-14.
- [41] R. Suzuki, et al. (2016), "Development of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay as a simple detection method of *chrysanthemum stem necrosis virus* in chrysanthemum and tomato", *J. Virol. Methods*, **236**, pp.29-34.
- [42] S. Chen, et al. (2011), "Multiplex RT-PCR detection of *Cucumber mosaic virus* subgroups and Tobamoviruses infecting Tomato using 18S rRNA as an internal control", *Acta Biochim. Biophys. Sin.*, **43**, pp.465-471.
- [43] M. Takeshita, et al. (2011), "Molecular and biological characterization of *Chrysanthemum stem necrosis virus* isolates from distinct regions in Japan", *Eur. J. Plant. Pathol.*, **131**, pp.9-14.
- [44] B. Hasiow-Jaroszewska, N. Borodynko (2013), "Detection of *Pepino mosaic virus* isolates from tomato by one-step reverse transcription loop-mediated isothermal amplification", *Arch. Virol.*, **158**, pp.2153-2156.
- [45] Y. Xie, et al. (2013), "Highly sensitive serological methods for detecting *Tomato yellow leaf curl virus* in tomato plants and whiteflies", *Virol. J.*, **10**, p.142.
- [46] X. Nie, R.P. Singh (2001), "A novel usage of random primers for multiplex RT-PCR detection of virus and viroid in aphids, leaves, and tubers", *J. Virol. Methods*, **91**, pp.37-49.
- [47] S. Fukuta, et al. (2003), "Detection of *Tomato yellow leaf curl virus* by loop-mediated isothermal amplification reaction", *J. Virol. Methods*, **112**, pp.35-40.