

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO  
ĐẠI HỌC NÔNG LÂM TP. HỒ CHÍ MINH  
BỘ MÔN CÔNG NGHỆ SINH HỌC**

....☞ ☜....



## **KHÓA LUẬN TỐT NGHIỆP**

**NGHIÊN CỨU VIRUS (TMV, CMV) GÂY BỆNH TRÊN CÂY  
ỚT TẠI HUYỆN CỬ CHI, TP. HỒ CHÍ MINH BẰNG KỸ  
THUẬT ELISA VÀ XÂY DỰNG QUY TRÌNH PHÁT HIỆN  
CMV BẰNG KỸ THUẬT RT-PCR**

**Ngành học: CÔNG NGHỆ SINH HỌC**

**Niên khóa: 2002 – 2006**

**Sinh viên thực hiện: HUỲNH VĨNH KHANG**

Thành phố Hồ Chí Minh  
Tháng 8/2006

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO  
ĐẠI HỌC NÔNG LÂM TP. HỒ CHÍ MINH  
BỘ MÔN CÔNG NGHỆ SINH HỌC  
...☞ ☼ ☛...**

**NGHIÊN CỨU VIRUS (TMV, CMV) GÂY BỆNH TRÊN CÂY  
ỚT TẠI HUYỆN CỦ CHI, TP. HỒ CHÍ MINH BẰNG KỸ  
THUẬT ELISA VÀ XÂY DỰNG QUY TRÌNH PHÁT HIỆN  
CMV BẰNG KỸ THUẬT RT-PCR**

**Giáo viên hướng dẫn:  
PGS.TS BÙI CÁCH TUYẾN**

**Sinh viên thực hiện:  
HUỠNH VĨNH KHANG**

Thành phố Hồ Chí Minh  
Tháng 8/2006

# LỜI CẢM TẠ

Em vô cùng biết ơn Thầy Bùi Cách Tuyền đã tận tình hướng dẫn và truyền đạt cho em những kinh nghiệm quý báu trong suốt thời gian làm đề tài.

Em xin gửi lời cảm ơn chân thành đến:

Quý thầy cô trường Đại học Nông Lâm TP. Hồ Chí Minh đã tận tâm giảng dạy, truyền đạt cho em nền tảng kiến thức vững chắc sau bốn năm đại học.

Ban giám đốc Trung Tâm Phân Tích Hóa Sinh - Trường Đại Học Nông Lâm TP. Hồ Chí Minh cùng toàn thể các anh chị tại Trung Tâm đã tạo điều kiện thuận lợi tối đa cũng như tận tình giúp đỡ em trong thời gian thực tập tốt nghiệp.

Thầy Bùi Minh Trí, Thầy Huỳnh Văn Biết, Thầy Trần Nhật Phương đã tận tình giúp đỡ, dạy bảo và trang bị cho em những kiến thức bổ ích.

Cảm ơn các bạn lớp Công Nghệ Sinh Học 28 đã luôn đồng hành, chia sẻ vui buồn, động viên và giúp đỡ tôi trong suốt thời gian học tập và làm đề tài.

Thành phố Hồ Chí Minh, tháng 8 năm 2006

**Huỳnh Vĩnh Khang**

# TÓM TẮT KHÓA LUẬN

HUỶNH VĨNH KHANG, Đại học Nông Lâm TP. Hồ Chí Minh. Tháng 8/2006.  
“Nghiên cứu một số virus (TMV, CMV) gây bệnh trên cây Ớt tại huyện Củ Chi, TP. Hồ Chí Minh bằng kỹ thuật ELISA và xây dựng quy trình phát hiện CMV bằng kỹ thuật RT-PCR” được thực hiện từ tháng 03 đến tháng 08/2006 tại Trung tâm Phân tích Hóa Sinh-Trường Đại Học Nông Lâm Tp. Hồ Chí Minh.

## **Đề tài thực hiện các nội dung sau:**

1. Thu mẫu theo triệu chứng bệnh virus, 5-15 mẫu/ruộng.
2. Xác định tỷ lệ nhiễm các loại virus CMV, TMV tại 4 xã Hòa Phú, Nhuận Đức, An Nhơn Tây và Trung Lập Thượng, huyện Củ Chi bằng kỹ thuật ELISA.
3. Bước đầu xây dựng quy trình chẩn đoán CMV bằng kỹ thuật RT-PCR.

## **Kết quả đạt được:**

1. Xác định được tỷ lệ nhiễm các loại virus CMV, TMV tại các xã như sau:
  - Hòa Phú: CMV: 86,7%; TMV: 76,7%.
  - Nhuận Đức: CMV: 93,8%; TMV: 60,0%.
  - An Nhơn Tây: CMV: 83,3%; TMV: 66,7%.
  - Trung Lập Thượng: CMV: 81,3%; TMV: 87,5%.
2. Xây dựng được quy trình RT-PCR để chẩn đoán CMV.

## ABSTRACT

Huynh Vinh Khang, studying at Nong Lam University has finished the thesis for 6 months (3-8/2006). The thesis entitled: “Research on viruses (TMV, CMV) causing diseases on pepper at Cu Chi District, Ho Chi Minh City using ELISA technique. Formulating RT-PCR protocol to detect CMV”. This research was carried out in the laboratory of biotechnology and chemistry of Nong Lam University.

***The objectives of this research are as follows:***

1. Collecting the samples with the virus symptoms, 5-15 samples per field.
2. Determining infected levels of TMV and CMV at Hoa Phu, Nhuan Duc, An Nhon Tay and Trung Lap Thuong Communes, Cu Chi District. Double antibody sandwich-enzyme linked immunosorbent assay (DAS-ELISA) method was standardized for the detection of TMV and CMV infection in pepper plants.
3. Formulating the RT-PCR protocol to detect CMV. CP gene of the virus was amplified.

***The results of this research are as follows:***

1. Infected levels of TMV and CMV were defined:
  - Hoa Phu: CMV: 86.7%; TMV: 76.7%.
  - Nhuan Duc: CMV: 93.8%; TMV: 60.0%.
  - An Nhon Tay: CMV: 83.3%; TMV: 66.7%.
  - Trung Lap Thuong: CMV: 81.3%; TMV: 87.5%.
2. The RT-PCR protocol detects CMV successfully.

## DANH SÁCH CÁC CHỮ VIẾT TẮT

- cDNA: Complementary Deoxyribonucleotide Acid.
- CMV: Cucumber Mosaic Virus.
- CP: capsid protein.
- DAS-ELISA: Double Antibody Sandwich Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay.
- DEPC: Diethyl pyrocarbonate
- dNTP: Deoxyribonucleoside triphosphate.
- M-MLV: Moloney murine leukemia virus.
- MP: movement protein.
- OD: Optical Density.
- ORF: Open Reading Frame.
- PBS-Tween: Phosphate – buffered saline with tween 20.
- p-NPP: p-nitrophenol phosphate.
- PVP: Polyvinylpyrrolidone.
- RNA: Ribonucleic acid.
- RNAbc: RNA binding column.
- RT-PCR: Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction.
- TMV: Tobacco Mosaic Virus.

# MỤC LỤC

PHẦN	TRANG
Trang tựa	
Lời cảm tạ .....	iii
Tóm tắt .....	iv
Tóm tắt bằng tiếng Anh .....	v
Danh sách các chữ viết tắt.....	vi
Mục lục .....	vii
Danh sách các bảng.....	x
Danh sách các hình .....	xi
Danh sách các biểu đồ.....	xi
1. MỞ ĐẦU .....	1
1.1 Đặt vấn đề .....	1
1.2 Mục đích .....	1
1.3 Yêu cầu .....	2
2. TỔNG QUAN TÀI LIỆU.....	3
2.1 Giới thiệu về cây ớt.....	3
2.1.1 Sơ lược về cây ớt.....	3
2.1.2 Đặc điểm thực vật học của cây ớt.....	3
2.1.3 Giá trị dinh dưỡng của ớt.....	4
2.1.4 Giá trị dược liệu của ớt.....	5
2.2 Sơ lược các loại bệnh virus trên ớt .....	6
2.3 Giới thiệu về TMV và CMV.....	9
2.3.1 Tobacco Mosaic Virus (TMV).....	9
2.3.1.1 Nguồn gốc.....	9
2.3.1.2 Phân loại.....	9
2.3.1.3 Cấu trúc .....	9
2.3.1.4 Môi giới truyền bệnh.....	11
2.3.1.5 Triệu chứng .....	11

2.3.1.6	Biện pháp kiểm soát .....	12
2.3.2	Cucumber Mosaic Virus (CMV).....	13
2.3.2.1	Nguồn gốc .....	13
2.3.2.2	Phân loại.....	14
2.3.2.3	Cấu trúc .....	14
2.3.2.4	Môi giới truyền bệnh .....	15
2.3.2.5	Triệu chứng .....	16
2.3.2.6	Biện pháp kiểm soát.....	16
2.4	Các phương pháp chẩn đoán virus gây bệnh thực vật thường sử dụng.....	17
2.4.1	Phương pháp cây chỉ thị.....	17
2.4.2	Phương pháp chẩn đoán bằng chỉ thị màu .....	18
2.4.3	Phương pháp chẩn đoán bằng kính hiển vi điện tử .....	18
2.4.4	Phương pháp ELISA .....	19
2.4.5	Phương pháp RT-PCR .....	20
2.4.5.1	Kỹ thuật PCR .....	20
2.4.5.2	Kỹ thuật RT-PCR.....	21
2.5	Một số kết quả nghiên cứu trong và ngoài nước về bệnh do TMV và CMV gây ra trong thời gian gần đây.....	25
2.5.1	Ở nước ngoài .....	25
2.5.2	Ở Việt Nam .....	25
3.	VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	26
3.1	Thời gian và địa điểm thực hiện .....	26
3.2	Vật liệu .....	26
3.2.1	Dụng cụ .....	26
3.2.2	Hóa chất dùng trong kỹ thuật ELISA phát hiện TMV và CMV .....	26
3.2.3	Hóa chất dùng trong kỹ thuật RT-PCR để phát hiện CMV .....	27
3.2.3.1	Ly trích RNA .....	27
3.2.3.2	Tổng hợp cDNA .....	27
3.2.3.3	Thực hiện phản ứng PCR khuếch đại các phân tử cDNA .....	28
3.3	Phương pháp nghiên cứu .....	28
3.3.1	Nội dung nghiên cứu.....	28



3.3.2 Phương pháp điều tra và lấy mẫu.....	28
3.3.3 Phát hiện TMV và CMV bằng kỹ thuật DAS-ELISA.....	29
3.3.4 Phát hiện CMV bằng RT-PCR.....	31
3.3.4.1 Ly trích RNA theo Aurum <sup>TM</sup> Total RNA Mini Kit (Biorad).....	31
3.3.4.2 Khuếch đại RNA bằng RT – PCR.....	32
3.3.4.3 Điện di trên gel agarose.....	34
4. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....	35
4.1 Đánh giá tình hình nhiễm TMV và CMV bằng ELISA.....	35
4.1.1 Tỷ lệ nhiễm TMV và CMV trên tổng số mẫu điều tra.....	35
4.1.2 Tỷ lệ các mẫu nhiễm hỗn hợp virus TMV và CMV so với các mẫu nhiễm CMV hay TMV.....	36
4.1.3 Tỷ lệ nhiễm TMV và CMV tại các xã.....	37
4.1.4 Tỷ lệ nhiễm TMV và CMV theo từng giống ớt.....	38
4.1.5 Tỷ lệ nhiễm TMV và CMV theo triệu chứng.....	38
4.1.6 Tỷ lệ nhiễm TMV và CMV theo độ tuổi.....	39
4.2 Phát hiện CMV bằng kỹ thuật RT-PCR.....	39
5. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ.....	42
6. TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	43

# DANH SÁCH CÁC BẢNG

	TRANG
Bảng 2.1 Thành phần dinh dưỡng trong ớt xanh .....	4
Bảng 3.1 Số mẫu thu thập từ 4 xã của huyện Củ Chi .....	29
Bảng 3.2 Thành phần hóa chất cho một phản ứng tổng hợp cDNA.....	32
Bảng 3.3 Thành phần phản ứng PCR.....	33
Bảng 4.1 Kết quả ELISA trên tổng số mẫu .....	35
Bảng 4.2 Tỷ lệ các mẫu nhiễm hỗn hợp virus TMV và CMV so với các mẫu nhiễm CMV hay TMV .....	36
Bảng 4.3 Tỷ lệ nhiễm TMV và CMV tại các xã.....	37
Bảng 4.4 Tỷ lệ nhiễm TMV và CMV theo triệu chứng.....	39
Bảng 4.5 Thành phần hóa chất tối ưu của phản ứng tổng hợp cDNA .....	40
Bảng 4.6 Thành phần hóa chất tối ưu của phản ứng PCR .....	40

## DANH SÁCH CÁC HÌNH

	TRANG
Hình 2.1 Cấu trúc phân tử của Capsaicine .....	5
Hình 2.2 Cấu trúc CMV.....	9
Hình 2.3 TMV dưới kính hiển vi điện tử.....	9
Hình 2.4 Sơ đồ di truyền của TMV .....	11
Hình 2.5 Triệu chứng của TMV trên ớt.....	12
Hình 2.6 Cấu trúc CMV .....	14
Hình 2.7 CMV dưới kính hiển vi điện tử .....	14
Hình 2.8 Triệu chứng của CMV trên ớt.....	16
Hình 2.9 Nguyên tắc của phản ứng ELISA .....	20
Hình 2.10 Sơ đồ phản ứng PCR .....	21
Hình 2.11 Sơ đồ phản ứng RT .....	22
Hình 2.11 Sơ đồ phản ứng RT-PCR .....	22
Hình 3.1 Sơ đồ bố trí phản ứng ELISA .....	30
Hình 4.1 Kết quả điện di sản phẩm PCR của CMV .....	41

## DANH SÁCH CÁC BIỂU ĐỒ

Biểu đồ 4.1 Số lượng mẫu dương tính và âm tính với TMV và CMV.....	35
Biểu đồ 4.2 Tỷ lệ nhiễm virus của các mẫu điều tra .....	36
Biểu đồ 4.3 So sánh tỷ lệ nhiễm TMV và CMV tại các xã .....	38

# PHẦN I MỞ ĐẦU

## 1.1. Đặt vấn đề

Cây ớt (*Capsicum annum* L.) là cây trồng quan trọng thứ hai (sau cây cà chua) trong các loại cây vừa là một loại rau vừa là một loại gia vị. Gần đây ớt trở thành một mặt hàng có giá trị kinh tế vì ớt không chỉ được dùng làm gia vị trong công nghiệp chế biến thực phẩm mà còn là dược liệu để bào chế các thuốc trị ngoại khoa như phong thấp, nhức mỏi, cảm lạnh hay nội khoa như thương hàn, cảm phổi, thiên thời...nhờ chất capsaicine chứa trong trái. Nhờ vậy nhu cầu và diện tích ớt ở nhiều nước có chiều hướng gia tăng.

Củ Chi là một huyện ngoại thành của thành phố Hồ Chí Minh, có điều kiện tự nhiên và xã hội thuận lợi cho việc phát triển nhiều chủng loại rau, trong đó cây ớt luôn được chú trọng và được trồng với diện tích ngày càng tăng. Tuy nhiên việc phát triển ớt chuyên canh lại là điều kiện cho nhiều loại mầm bệnh gây hại phát triển mạnh, trong đó các bệnh gây ra bởi virus đã gây khó khăn cho những vùng chuyên sản xuất ớt hiện nay, ảnh hưởng đến kinh tế rất lớn, làm giảm thu nhập của nông dân trong huyện. Chính vì lí do đó mà đề tài “Nghiên cứu virus (TMV, CMV) gây bệnh trên cây ớt tại huyện Củ Chi, Tp. Hồ Chí Minh bằng kỹ thuật ELISA và xây dựng quy trình phát hiện CMV bằng kỹ thuật RT-PCR” được thực hiện nhằm xác định sớm mầm bệnh, từ đó có biện pháp ngăn chặn kịp thời và giảm bớt thiệt hại do mầm bệnh gây ra.

## 1.2. Mục đích – Yêu cầu

### 1.2.1. Mục đích nghiên cứu

- Phát hiện CMV (Cucumber Mosaic Virus), TMV (Tobacco Mosaic Virus) trong mẫu lá nghi ngờ bệnh virus bằng kỹ thuật DAS-ELISA (double antibody sandwich-enzyme linked immuno sorbent assay). Từ đó, đánh giá tình hình bệnh ở khu vực nghiên cứu.

- Xây dựng quy trình RT - PCR để chẩn đoán CMV.

### **1.2.2. Yêu cầu**

- Xác định tỷ lệ bệnh do các virus TMV và CMV gây ra trên đồng ruộng. Từ đó khuyến cáo tác hại và các biện pháp khống chế bệnh do các virus này gây ra.
- Nắm vững nguyên tắc và các bước tiến hành của kỹ thuật ELISA và RT - PCR.

## PHẦN II

# TỔNG QUAN TÀI LIỆU

### 2.1. Giới thiệu về cây ớt

#### 2.1.1. Sơ lược về cây ớt

Ớt là cây trồng thuộc họ cà *Solanaceae*, có nguồn gốc từ Mexico, Trung và Nam Mỹ. Ớt đã được trồng từ khoảng năm 5200-3400 trước Công nguyên (Archana Ghode).

Có nhiều quan điểm khác nhau nhưng theo bảng phân loại mới nhất thì có 5 loài ớt được trồng chính trong tổng số 30 loài ớt: loài *Capsicum annum* L.; loài *C. frutescens* L.; loài *C. chinense* Jacquin; loài *C. pendulum* Willdenow var *pendulum* L. và loài *C. pubescens* Ruiz and Pavon. Các loài ớt trồng chủ yếu được phân biệt bởi cấu trúc hoa và đặc điểm quả. Ớt cay quả to, dài và ớt ngọt thuộc về loài *C. annum*.

#### 2.1.2. Đặc điểm thực vật học của cây ớt

##### 2.1.2.1. Thân

Ớt là cây bụi thân gỗ 2 lá mầm, thân thường mọc thẳng, đôi khi có thể gặp các dạng (giống) có thân bò, nhiều cành, chiều cao trung bình 0,5-1,5m, có thể là cây hàng năm hoặc lâu năm nhưng thường được gieo trồng như cây hàng năm.

##### 2.1.2.2. Rễ

Ban đầu ớt có rễ cọc phát triển mạnh với rất nhiều rễ phụ. Do việc cấy chuyển, rễ cọc chính đứt, một hệ rễ chùm khỏe phát triển, vì thế nhiều khi lầm tưởng ớt có hệ rễ chùm.

##### 2.1.2.3. Lá

Thường ớt có lá đơn mọc xoắn trên thân chính. Lá có nhiều dạng khác nhau, nhưng thường gặp nhất là dạng lá mác, trướng ngược, mép lá ít răng cưa. Lông trên lá phụ thuộc vào các loài khác nhau, một số có mùi thơm. Lá thường mỏng có kích thước trung bình 1,5-12cm x 0,5-7,5cm.

##### 2.1.2.4. Hoa

Các hoa hoàn thiện và quả thường được sinh đơn độc trên từng nách lá, chỉ có loài *C. chinense* thường có 2-5 hoa trên một nách lá. Hoa có thể mọc thẳng đứng hoặc

buông thông. Trên hoa cuống thường không có li tầng. Hoa thường có màu trắng, một số giống có màu sữa, xanh lam và tía (tím). Hoa có 5-7 cánh hoa, có cuống dài khoảng 1,5cm, đài ngắn có dạng chuông 5-7 răng dài khoảng 2mm bọc lấy quả. Nhụy đơn giản có màu trắng hoặc tím, đầu nhụy có dạng hình đầu. Hoa có 5-7 nhị đực với ống phấn màu xanh da trời hoặc tía trong khi ở nhóm *C. frutescens* và *C. chinense* có ống phấn màu trắng xanh, còn có thể phân biệt các nhóm ớt theo màu đốm chấm ở gốc của cánh hoa. Kích thước của hoa cũng phụ thuộc vào các loài khác nhau, nhưng nói chung đường kính cánh hoa từ 8-15mm.

#### 2.1.2.5. Quả

Thuộc loại quả mọng có rất nhiều hạt với thịt quả nhẵn và chia làm 2 ngăn. Các giống khác nhau có kích thước quả, hình dạng, độ nhọn, màu sắc, độ cay và độ mềm của thịt quả rất khác nhau. Quả chưa chín có thể có màu xanh hoặc tím, quả chín có màu đỏ, da cam, vàng, nâu, màu kem hoặc hơi tím.

#### 2.1.2.6. Hạt

Hạt có dạng thận và màu vàng rom, chỉ có hạt của *C. pubescens* có màu đen. Hạt có chiều dài khoảng 3-5mm. Một gam hạt ớt ngọt có khoảng 160 hạt, còn ớt cay khoảng 220 hạt. Để trồng 1 ha ớt cần khoảng 400g hạt.

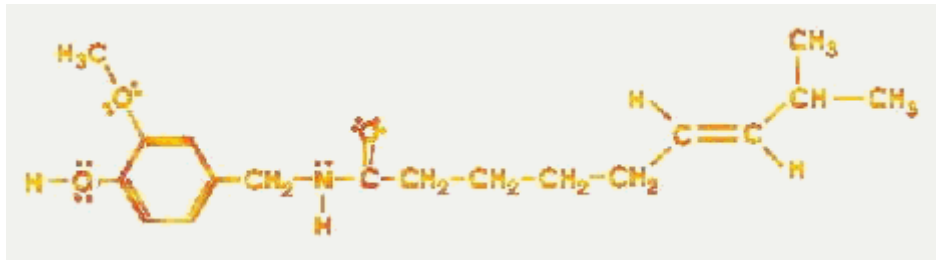
### 2.1.3. Giá trị dinh dưỡng của ớt

**Bảng 2.1. Thành phần dinh dưỡng trong ớt xanh (trong 100g phần ăn được)**  
(Aykroyd,1963)

Thành phần	Hàm lượng	Thành phần	Hàm lượng
Độ ẩm	85,7g	P	80mg
Protein	2,9g	Fe	1,2mg
Chất béo	0,6g	Na	6,5mg
Chất khoáng	1,0g	K	2,7mg
Cacbohydrat	3,0g	S	34mg
Chất xơ	6,8g	Cu	1,55mg
Ca	30mg	Thiamin	0,19mg
Mn	24mg	Vitamin A	292mg
Riboflavin	0,39mg	Vitamin C	111mg
Axit oxalic	67mg		

Trong quả ớt chứa nhiều các loại sinh tố, đặc biệt trong cả hai loại ớt cay và ớt ngọt đều chứa nhiều vitamin C nhất so với tất cả các loại rau, theo một số tài liệu thì hàm lượng vitamin C ở một số giống ớt là 340mg/100g quả tươi. Ngoài ra ớt còn là cây trồng rất giàu các loại vitamin: vitamin A (các tiền vitamin A như  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ -caroten, cryptoxanucleotidehin trong cơ thể người chuyển thành vitamin A), các vitamin nhóm B như B1 (thiamin), B2 (riboflavin), B3 (niacin), vitamin E, vitamin PP.

Trong ớt cay có chứa một lượng Capsaicine ( $C_{18}H_{27}NO_3$ ), là một loại alkaloid có vị cay, gây cảm giác ngon miệng khi ăn, kích thích quá trình tiêu hóa, chất này có nhiều trong thành giá noãn và biểu bì của hạt, trong 1kg chứa tới 1,2g.



**Hình 2.1. Cấu trúc phân tử của Capsaicine**  
(Archana Ghode)

#### 2.1.4. Giá trị dược liệu của ớt

Theo y học cổ truyền, ớt vị cay, nóng, có tác dụng tán hàn, tiêu thực, giảm đau... Dân gian thường dùng nó để chữa đau bụng do lạnh, tiêu hóa kém, đau khớp, đau lưng, trị phong thấp, dùng ngoài chữa rắn rết cắn...

Theo y học hiện đại, quả ớt có rất nhiều ích lợi cho sức khỏe. Chất capsaicine trong ớt kích thích não bộ sản xuất ra chất endorphin, một morphin nội sinh có tác dụng giảm đau, đặc biệt có ích cho người bị viêm khớp mãn tính và ung thư. Ớt cũng giúp ngăn ngừa bệnh tim nhờ một số hoạt chất giúp máu lưu thông tốt, tránh tình trạng đông vón tiểu cầu. Ngoài ra, loại quả này còn giúp ngăn ngừa tình trạng huyết áp tăng cao. Một số nghiên cứu cho thấy, các loại ớt vỏ xanh, trái nhỏ có hàm lượng capsaicin cao hơn.

(Nguồn: <http://www.vietel.net.vn>)



## 2.2. Sơ lược các loại bệnh virus trên ớt

### **Bệnh virus gây khảm cổ linh lăng (Alfalfa)**

Trên tàn lá, bệnh thể hiện một dạng khảm đặc biệt có màu vàng trắng cho đến trắng, đôi khi mất màu ở vùng mô giữa các gân lá. Các triệu chứng này thường được xem như là bệnh khảm calcico. Các dạng sọc vàng và chết hại gân cũng có thể xảy ra. Thông thường, lá không bị biến dạng. Cây nhiễm bệnh có thể hơi lùn và đôi khi trái bị biến dạng.

Virus này được lan truyền bởi rệp.

### **Bệnh virus đốm gân lá ớt**

Triệu chứng đặc trưng nhất của bệnh là lốm đốm trên lá và gân lá có màu xanh lục đậm. Ở một số giống ớt lá bị nhỏ lại và méo mó, trên một vài giống khác có thể thấy các đốm vòng chết hoại. Sự nhiễm bệnh sớm làm cây lùn lại. Trái trên cây nhiễm bệnh nhỏ đi và đôi khi biểu hiện lốm đốm và hơi biến dạng.

Virus này được lan truyền bởi rệp.

### **Bệnh virus gây khảm dưa leo**

Triệu chứng bệnh rất rõ ràng. Một trong số những biểu hiện phổ biến nhất là cây lùn hẳn lại, không phát triển và có tàn lá màu xanh nhạt, đục có vẻ giống như da nhưng không có những dấu vết rõ rệt trên tàn lá. Đôi khi triệu chứng trên tàn lá rất rõ rệt và có thể bao gồm: lá thu hẹp lại, khảm, hóa vàng, có đốm vòng vàng nhạt hoặc chết hoại, biến dạng lá sồi. Trong một số trường hợp, chồi ngọn bị chết hoại. Trên trái có thể xuất hiện những vòng vàng nhạt hoặc chết hoại.

Virus này được lan truyền bởi rệp.

### **Bệnh virus đốm trên ớt**

Các giống mẫn cảm phát triển triệu chứng lốm đốm trầm trọng trên lá và thường đi kèm theo triệu chứng gân xanh và biến dạng lá. Nhiều chủng virus gây biến dạng mạnh trên trái.

Virus này được lan truyền bởi rệp.

### **Bệnh virus gây khảm nặng trên ớt**

Triệu chứng của bệnh là sự xuất hiện các vạch và đốm chết hoại hình thành trên thân, lá và trái sau đó lá rụng. Các lá mới mọc bị khảm rất nặng. Năng suất bị giảm nghiêm trọng.

Virus này được lan truyền bởi rệp.

### **✚ Bệnh virus Y khoai tây**

Những triệu chứng điển hình nhất là khảm và gân xanh đậm. Cũng thường thấy triệu chứng lá nhăn nheo, biến dạng và cây bị lùn. Lá cây ớt giống “Tabasco” hình thành những vạt màu vàng. Một số chủng gây chết hoại mô bào gân lá và đỉnh các nhánh gân ngọn. Trên cây bị bệnh có ít trái và trái nhỏ, đôi khi trái biểu hiện khảm và/hoặc bị biến dạng.

Virus này được lan truyền bởi rệp.

### **✚ Bệnh virus gây vết hằn thuốc lá**

Lá thường thể hiện triệu chứng khảm và những vết xanh đậm rộng dọc theo gân lá. Lá biến dạng, trái biến dạng và cây bị lùn cũng là triệu chứng thường gặp ở những cây bị nhiễm bệnh virus này. Ở hầu hết các giống, năng suất và chất lượng trái bị suy giảm nghiêm trọng. Trong một số thời vụ giống ớt này bị thất thu hoàn toàn.

Virus này được lan truyền bởi rệp.

### **✚ Bệnh virus gây cong ngọn củ cải**

Triệu chứng điển hình gồm có sự cong mép các lá già lên trên và mép lá non hơn cong lên rất mạnh. Cuống lá cong nhiều về phía dưới. Cây bị nhiễm bệnh vào những giai đoạn đầu bị vàng và lùn rõ rệt. Sau khi nhiễm bệnh cây cho rất ít trái, những trái có sẵn nhỏ lại, méo mó và chín ép. Cây bị nhiễm bệnh sớm trong vụ trồng thường không sống được.

Virus này được lan truyền bởi rầy lá.

### **✚ Bệnh virus đốm lá ớt ngọt**

Triệu chứng trên lá gồm có: Trong gân lá, khảm, lốm đốm và hóa vàng. Cây bị nhiễm bệnh trong thời kì đầu có thể bị lùn lại. Khó phân biệt được triệu chứng do virus này gây ra với triệu chứng do các tobamovirus.

Virus này được lan truyền bằng con đường cơ học.

### **✚ Bệnh virus gây đốm nhẹ trên cây ớt (Bệnh khảm ớt hay bệnh khảm ần thuốc lá Samsun)**

Triệu chứng khảm nhẹ phát triển khắp trên mặt lá và đôi khi lá bị nhăn nheo. Trái thường bị thiệt hại nặng với các triệu chứng như vòng, vết trắng, đốm chết hoại và méo mó. Cây bị lùn khi bị nhiễm bệnh sớm vào thời kỳ đầu giai đoạn sinh trưởng.

Virus này được lan truyền bằng con đường cơ học.

### **✚ Bệnh virus khảm thuốc lá – Bệnh virus khảm cà chua**

Triệu chứng tương tự đối với cả hai loại bệnh. Các triệu chứng thay đổi tùy theo giống nhưng đều có biểu hiện lùn, khảm, toàn cây biến vàng và đôi khi có sự chết hoại toàn bộ kèm theo rụng lá.

Virus này được lan truyền bằng con đường cơ học.

### **✚ Bệnh virus gây héo đốm lá cà chua**

Triệu chứng rất thay đổi. Lá có thể bị khảm, lốm đốm vàng, đốm vòng vàng và chết hoại, biến dạng. Ở một số giống, xảy ra chết hoại chồi ngọn và lá rụng, sau đó các lá mới mọc bị khảm toàn bộ và biến dạng mạnh mẽ. Các triệu chứng trên trái bao gồm đốm vàng và chết hoại, khảm, các hình vòng và méo mó. Cây nhiễm bệnh ở thời kỳ đầu bị lùn hẳn và không thể hồi phục, mặc dù một số giống có khả năng phục hồi lại sự sinh trưởng bình thường.

Virus này được lan truyền bởi bọ trĩ.

### **✚ Bệnh virus cong lá ớt**

Triệu chứng điển hình là cây bị lùn thấp và lá bị vàng, cong lên. Cây bị nhiễm bệnh có các lông ngắn và lá bị nhỏ hẳn, mép lá cuộn cong lên tạo thành dáng chiếc xuống. Bia lá biến thành màu xanh nhạt hoặc vàng sáng lan vào đến các vùng thịt lá giữa các gân.

Virus này được lan truyền bởi bọ phấn.

### **✚ Bệnh Tigre'**

Đặc điểm của bệnh Tigre' là lá bị cong và hóa vàng rõ rệt mép lá và vùng thịt lá giữa các gân. Lá bệnh nhỏ hẳn, nhăn nheo, mép lá cuộn ngược lên trên. Cây nhiễm bệnh trong những thời kỳ đầu bị lùn hẳn lại.

Virus này được lan truyền bởi bọ phấn.

### **✚ Bệnh virus gây khảm vàng Serrano**

Sự xâm nhiễm của virus gây ra khảm vàng tàn lá ớt.

Virus này được lan truyền bởi bọ phấn.

### **✚ Bệnh geminivirus trên ớt Texas**

Cây bệnh biểu hiện triệu chứng cong lá và biến dạng. Mép lá có xu hướng cuộn lên trên và xuất hiện các đốm vàng sáng, đôi khi các viền vàng lan vào trong các vùng mô giữa gân lá.

(Bùi Cách Tuyến. Tài liệu hướng dẫn đồng ruộng, Bệnh hại cây ớt)

## 2.3. Giới thiệu về TMV và CMV

### 2.3.1. Tobacco mosaic virus (TMV)

#### 2.3.1.1. Nguồn gốc

Bệnh khảm trên thuốc lá được mô tả chi tiết và thí nghiệm lây nhiễm lần đầu tiên bởi Mayer (1886). Tuy nhiên, bản chất bất thường của tác nhân gây bệnh vẫn không được nhận biết mãi đến những nghiên cứu của Beijerinck (1898), TMV là virus đầu tiên được nhận biết. Từ đó, đã có nhiều khám phá quan trọng về TMV, tác động tích cực đến sự phát triển của ngành virus học.

TMV có thể phân bố rộng khắp thế giới. Người ta đã tìm thấy virus này ở châu Âu, Argentina, châu Úc, Đan Mạch, Pháp, Hungary, Iceland, Ấn Độ, Italy, Nhật Bản, Kenya, Hà Lan, Peru, Tây Ban Nha, Anh, Mỹ. TMV gây bệnh cho ít nhất 199 loài của 30 họ thực vật (Shew & Lucas, 1991), chúng tấn công vào những cây có tầm quan trọng về kinh tế như: cà chua, ớt, cà tím, thuốc lá, cây dã yên (petunia), và cây cúc vạn thọ (marigold).

#### 2.3.1.2. Phân loại

Họ: chưa được xếp vào họ nào.

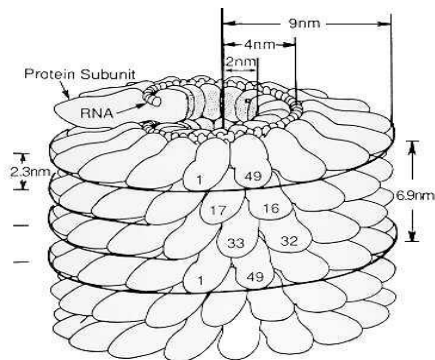
Giống: Tobamovirus.

Loài: Tobacco Mosaic Virus.

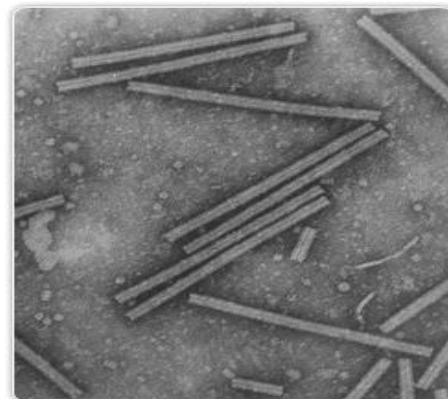
Tên viết tắt: TMV.

#### 2.3.1.3. Cấu trúc

TMV có dạng hình que, kích thước 300 x 18nm với một khoang rỗng ở giữa. Trọng lượng phân tử là  $39,4 \times 10^6$  Da.



**Hình 2.2. Cấu trúc TMV**  
(Trích dẫn bởi Lâm Ngọc Hạnh, 2005)



**Hình 2.3. TMV dưới kính hiển vi điện tử** (Barbara Baker, 2004)

### **Thành phần cấu tạo:**

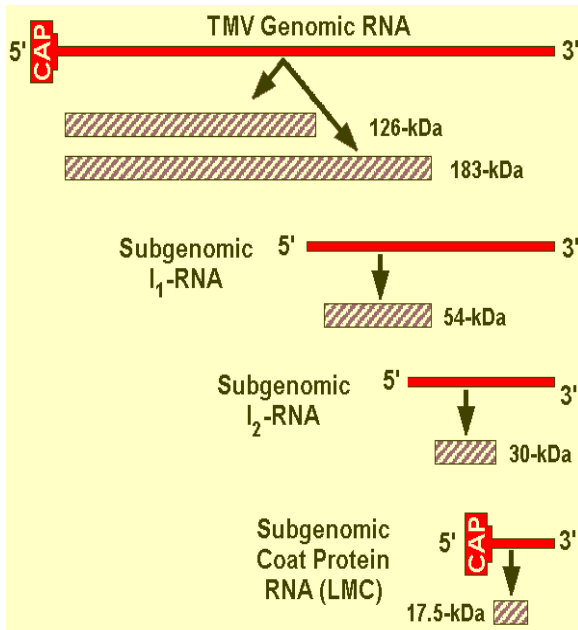
✚ Nucleic acid: Sợi đơn RNA dài 6395 nucleotide, chiếm khoảng 5% trọng lượng phân tử.

✚ Protein: Lớp vỏ protein (CP) chiếm khoảng 95% trọng lượng phân tử, bao gồm 2130 phân tử đồng nhất, 158 amino acid mỗi phân tử. Những amino acid cuối bị acetyl hóa.

Các tiểu đơn vị protein liên kết chặt chẽ tạo thành cấu trúc xoắn (độ khoảng 2,3 nm hay  $16\frac{1}{3}$  tiểu đơn vị/vòng) xung quanh một ống hình trụ có bán kính khoảng 2nm. Một sợi đơn RNA dài 6395 nucleotide, có cấu trúc xoắn tương tự (49 nucleotide/vòng hay 3 nucleotide/tiểu đơn vị) có bán kính khoảng 4nm, và liên kết với bề mặt trong của tiểu đơn vị protein. Virus có thể được phân tách thành nucleic acid và vỏ protein và cũng có thể hợp nhất lại thành dạng virus gây bệnh bền vững.

Vật liệu di truyền của TMV là 1 sợi đơn RNA (+), chứa 4 khung đọc (ORF). Đầu 5' của RNA có gắn 7-methyl guanosine. Những ORF gần đầu 5' mã hóa 2 protein có trọng lượng phân tử 126kDa và 183kDa. Cả 2 loại protein trên được dịch mã trực tiếp từ RNA virus. Lượng protein 126kDa và 183kDa biểu hiện từ RNA virus có tỉ lệ xấp xỉ 10:1. Protein di chuyển (movement protein, MP) 30kDa và protein vỏ (capsid protein, CP) 17,5kDa được biểu hiện từ những mRNA sao mã từ đầu 3' của RNA virus (subgenomic mRNAs, sgRNAs). Một loại sgRNA thứ ba mã hóa protein giả định 54kDa tương ứng với đầu C tận cùng (C-terminus) của protein 183kDa ở trên được nhận thấy có liên kết với polysomes trong lá thuốc lá. Tuy vậy, protein giả định 54 kDa đó chưa được phát hiện trên cây bị nhiễm.

Protein MP cần thiết cho sự di chuyển từ tế bào này sang tế bào khác và di chuyển ở khoảng cách xa, được biểu hiện sớm trong tiến trình nhiễm. Protein CP cần thiết cho sự di chuyển ở khoảng cách xa, được biểu hiện sau tiến trình nhiễm, đạt tích lũy tối đa sau 24-72 h.



**Hình 2.4. Sơ đồ di truyền của TMV**

— : RNA

▨ : Protein

Protein 54kDa không tìm thấy trong nuôi cấy *in vivo* (Milton Zaitlin, 2000).

#### 2.3.1.4. Môi giới truyền bệnh

TMV không có vector truyền bệnh thực sự, thông thường nó được lan truyền bằng cơ học. Bệnh truyền nhiễm dễ dàng qua con đường tiếp xúc cơ học, thông qua các vết thương xây xước. TMV có thể lây lan từ sự tiếp xúc giữa các lá cây với nhau.

Virus không truyền qua hạt hay phấn hoa. Tuy nhiên trong một vài báo cáo thì virus thường hiện diện trong vỏ hạt, nhất là cây cà chua, nó xâm nhiễm vào cây qua vết thương trên phôi trong quá trình nảy mầm.

Có khả năng truyền qua dây tơ hồng (*Cuscuta campestris*, *C. japonica* và *C. subinclusa*). Virus không tái bản bên trong dây tơ hồng.

#### 2.3.1.5. Triệu chứng

Cây bệnh nhiễm hệ thống. Triệu chứng đầu tiên xuất hiện trên lá non gồm các vết đốm xanh, vàng xen kẽ nhau, gân lá nhợt nhạt. Lá ngừng phát triển, phiến lá nhỏ hẹp, mặt lá gò ghề. Cây nhỏ chỉ bằng 1/2 - 1/4 lần so với cây khỏe. Các tế bào biểu bì trên phần sáng của vết bệnh nhỏ hẹp xếp xít nhau, hàm lượng diệp lục và tinh bột ít. Ngược lại, ở phần xanh lam của vết bệnh, tế bào biểu bì lớn hơn, chứa nhiều diệp lục và tinh bột hơn. Cây bị mất triệu chứng khi nhiệt độ xuống dưới 11<sup>0</sup>C và trên 36<sup>0</sup>C. Trên cây thuốc lá dại (*Nicotiana glutinosa*) vết bệnh là các vết đốm cục bộ. Cây bệnh có thể nhiễm đồng thời một số loại virus gây bệnh khác như PVY (Potato virus Y) và triệu chứng bệnh thể hiện rõ hơn.



**Hình 2.5. Triệu chứng của TMV trên ớt (Ray Cerkauskas, 2004)**

Triệu chứng bệnh trên cây ớt: Virus TMV nhiễm hệ thống gây hiện tượng khảm, lùn cây. Đôi khi cây bệnh xuất hiện các vết chết hoại ở phần cuống lá. Virus TMV có thể tồn tại ở vỏ hạt. Có thể loại trừ bệnh bằng cách xử lý hạt trong dung dịch  $\text{Na}_3\text{PO}_4$  10% trong 2 giờ (Lê Lương Tề và Vũ Triệu Mân, 1999).

#### **2.3.1.6. Biện pháp kiểm soát**

- ✚ Chỉ sử dụng hạt khỏe mạnh để sản xuất cây con trong vườn ươm. Bất hoạt TMV dính trên bề mặt trái bằng cách nhúng hạt trong dung dịch HCl 2% trong khoảng 24 giờ hay dung dịch Trisodium phosphate ( $\text{Na}_3\text{PO}_4$ ) 10% trong ít nhất là 15 phút hoặc xử lý hạt ở nhiệt độ cao ( $85^\circ\text{C}$  trong 24 giờ hay  $70^\circ\text{C}$  trong 2 - 4 ngày) trong quá trình thu hạt, sau đó rửa và làm khô hạt để ngăn chặn những tác động có hại cho phôi bởi những hóa chất ăn mòn.

- ✚ Không trồng cây con bị nhiễm. Những cây cà chua nhiễm nên đốt bỏ đi trước khi trồng lại.

- ✚ Suốt quá trình sản xuất cây con và trồng cây, những dụng cụ, trang thiết bị, quần áo có dính nhựa cây nên được làm sạch. Khử trùng dụng cụ chăm sóc bằng Focmalin 1: 25. Rửa tay bằng xà phòng, đặc biệt là sau khi tiếp xúc với cây bệnh. Cấm hút thuốc trong giờ làm việc vì TMV có thể nhiễm qua thuốc lá (những sản phẩm như thuốc điếu, thuốc nhai, xì gà).

- ✚ Cần dọn sạch cỏ vì chúng là kí chủ cho TMV tồn tại. Cà chua không được trồng luân canh với cây họ cà: ớt, khoai tây, thuốc lá và một số hoa như petunia, begonia.

- ✚ Chọn giống chống chịu bệnh, kháng bệnh.

✚ Vệ sinh đồng ruộng: Dọn sạch tàn dư cây bệnh, cỏ dại. Tiêu hủy sớm thân rễ của cây trồng vụ trước.

(Lâm Ngọc Hạnh, 2005)

## 2.3.2. Cucumber mosaic virus (CMV)

### 2.3.2.1. Nguồn gốc

Bệnh khảm trên dưa leo được mô tả lần đầu tiên vào năm 1916, là một trong những bệnh hại thực vật gây ra bởi virus được phát hiện sớm nhất. Trong thời gian đầu, những công cụ để xác định sự tồn tại của virus chuyên biệt rất hạn chế. Sau đó, bệnh cũng được biết là do Cucumber Mosaic Virus (CMV) gây ra. Hiện nay nhiều dòng CMV đã được mô tả. Dữ liệu di truyền hiện nay chứa trình tự của khoảng 60 protein khác nhau, và 15 trình tự genome virus hoàn chỉnh (Lâm Ngọc Hạnh, 2005).

CMV phân bố khắp nơi trên thế giới, phổ biến ở vùng có khí hậu ôn hòa. Người ta tìm thấy CMV ở: châu Âu, châu Úc, Canada, Pháp, Ấn Độ, Nhật Bản, Triều Tiên, Ma - rốc, New Zealand, Phần Lan, Tây Ban Nha và Mỹ.

CMV nhiễm trên 1000 loài kí chủ, bao gồm 85 họ thực vật, là loài virus có phổ kí chủ rộng nhất được biết. CMV là virus có khả năng thích ứng cao, với khả năng tiến hóa lạ thường. Khả năng này làm cho nó trở thành mối đe dọa cho nông nghiệp thế giới.

Một trong số những cây rau cải quan trọng bị ảnh hưởng bởi CMV là ớt (*Capsicum annuum* L.), cà chua (*Lycopersicon esculentum* Mill.), chuối (*Musa* spp L.). Những cây ký chủ khác là: Dưa chuột, bí, cần tây, tiêu, củ cải đường, khoai tây, dưa chuột ri, dưa hấu, dưa gang, thanh yên, cây bầu bí (gourd), đậu lima, đậu tằm, hành, cà tím, cây đại hoàng, cà rốt, cây thì là, cây củ cần, rau mùi tây (parsley), cây mướp, cây atoso.

Ký chủ là cây cảnh gồm: Cây cúc tây (China aster), cúc (chrysanthemum), cây phi yến (delphinium), hoa xô đỏ (salvia), cây phong lữ (geranium), gilia, hoa lai ơn (gladiolus), cây vòi voi (heliotrope), lan dạ hương (hyacinth), lily, cúc vạn thọ (marigold), cây sen cạn (nasturtium), cây dứa cạn (periwinkle), cây thuốc lá cảnh (petunia), cây giáp trúc đào (phlox), hoa mồm chó (snapdragon), tulip và cúc zinnia.



### 2.3.2.2. Phân loại

Họ: Bromoviridae.

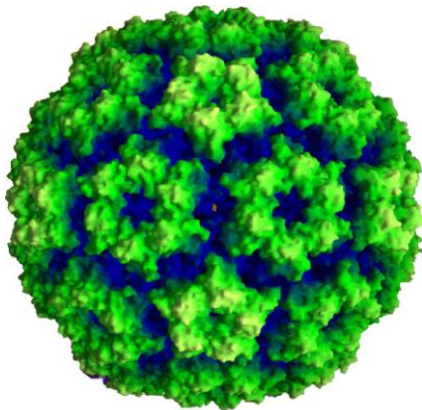
Giống: Cucumovirus.

Loài: Cucumber mosaic virus.

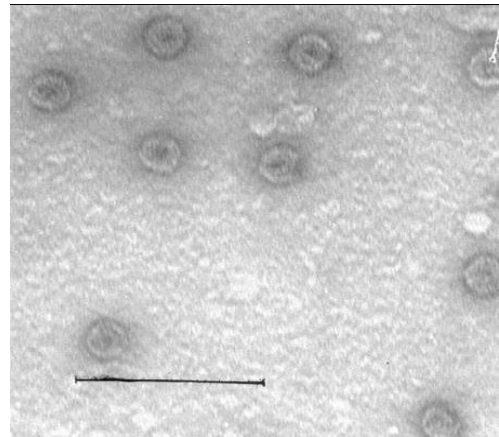
Tên viết tắt: CMV.

### 2.3.2.3. Cấu trúc

Dưới kính hiển vi điện tử CMV có dạng hình cầu, đường kính 28-30nm. Virion của CMV không có vỏ. Có nhiều loại virion nhưng kích thước tương đối giống nhau. Trọng lượng phân tử là  $5,0-6,7.10^6$  Da.



**Hình 2.6. Cấu trúc CMV**  
(Thomas J. Smith và CTV, 2000)



**Hình 2.7. CMV dưới kính hiển vi điện tử** (Bhat A I và CTV, 2005)

### Thành phần cấu tạo:

✚ Acid nucleic: sợi đơn RNA thông tin (mRNA), chiếm khoảng 18% trọng lượng phân tử. Tỷ lệ G: A: C: U khoảng 24: 23: 23: 30. Có 4 loại RNA chính được đặt tên là RNA 1, RNA 2, RNA 3 và RNA 4 chứa tương ứng khoảng 3350, 3050, 2020 và 1030 nucleotide. Chỉ có RNA 1, 2, 3 là cần thiết cho sự xâm nhiễm, RNA 4-có nguồn gốc từ RNA 3 mã hoá cho lớp vỏ protein. Virus cũng có chứa các RNA khác có kích thước nhỏ hơn ở mức độ thấp, đó là RNA 4A, RNA 5 và RNA 6. RNA 4A thu được ở dòng Q, có kích thước 682 nucleotide, có nguồn gốc từ RNA 2, mã hoá cho gen 2b. RNA 5 thu được ở dòng Q, có kích thước 309 nucleotide, có nguồn gốc từ đầu 3' không mã hóa của RNA 2 và RNA 3. RNA 6 có kích thước 70-80 nucleotide có nguồn gốc từ

tRNA của cây và những đoạn RNA của CMV. Mỗi RNA 5, RNA 6 chiếm 1-2% RNA tổng số của virus.

✚ Protein: phần vỏ chứa 180 tiểu đơn vị protein tương đồng, có khối lượng khoảng 24.500. Có thể thu protein vỏ bằng cách phá vỡ hạt virus và kết tủa RNA với LiCl 2M.

✚ Thành phần khác: chưa có báo cáo

Vật liệu di truyền của CMV chứa 3 sợi RNA thông tin được đặt tên là RNA 1, RNA 2, RNA 3. RNA 1 (3357 nucleotide) mã hoá protein 1a (khoảng 111 kDa), RNA 2 (3050 nucleotide) mã hoá trực tiếp protein 2a (97 kDa), RNA 4A (691 nucleotide) có nguồn gốc từ RNA 2 mã hoá cho protein 2b (15 kDa). RNA 3 mã hoá trực tiếp protein di chuyển (30kDa) và RNA 4 (1034 nucleotide) có nguồn gốc từ RNA 3 mã hoá protein vỏ (24,5 kDa). Protein 1a, 2a kết hợp với những protein của kí chủ tạo thành enzyme “replicase” của CMV . Protein 2b liên quan đến sự ức chế đáp ứng kháng nhiễm của kí chủ, sự di chuyển của virus và là một yếu tố quyết định tính độc. Protein 3a là protein di chuyển của virus, protein 3b là protein vỏ và nó chứa những yếu tố quyết sự lan truyền bởi rệp. Cả 2 loại protein 3a và protein vỏ đều cần thiết cho sự di chuyển của virus giữa các tế bào và di chuyển ở khoảng cách dài.

Đầu tận cùng 3' của 4 loại RNA 1-4 có trình tự tương tự nhau và chia sẻ một cấu trúc bậc hai giống như tRNA. Cả 4 loại RNA có thể được gắn với tyrosine ở đầu 3' nhờ aminoacyl tRNA synthetase. Đầu 5' được “gắn mũ” (capped) bằng 7- methyl guanosine.

Virus có thể chứa những phân tử RNA vệ tinh sợi đơn, nhỏ (332-405 nucleotide), nó không cần thiết cho sự sao chép của CMV, nó phụ thuộc vào CMV để có hoạt động sinh học. Đến nay đã xác định được trình tự nucleotide của hơn 40 RNA vệ tinh.

#### **2.3.2.4. Môi giới truyền bệnh**

Virus được lan truyền bởi hơn 80 loài rệp trong 33 giống theo những cách thức không bền vững. *Myzus persicae* và *Aphis gossypii* là 2 trung gian truyền bệnh quan trọng. Lớp vỏ protein của virus quyết định sự lan truyền bởi rệp, những trình tự amino acid quyết định sự lan truyền đã được lập bản đồ.

Virus truyền qua hạt của hơn 20 loài thực vật (Palukaitis và CTV, 1992). Virus hiện diện trong phôi, nội nhũ, vỏ hạt cũng như trong phần hoa.

Virus được truyền qua ít nhất là 10 loài dây tơ hồng, virus có thể tái bản bên trong dây tơ hồng.

#### **2.3.2.5. Triệu chứng**

Vết bệnh đầu tiên là các vết khảm đốm màu vàng nhạt xen kẽ các vết xanh đậm, thùy lá ngừng phát triển, lá nhỏ hẹp, xoắn cong. Cây bệnh kém phát triển, thân mảnh. Quả bị bệnh thường nhỏ, biến dạng, trên vỏ quả có các vết đậm nhạt loang lổ. Trên cây bí xanh, bầu, mướp virus CMV cũng gây triệu chứng khảm tương tự.



**Hình 2.8. Triệu chứng của CMV trên ớt** (Ray Cerkauskas, 2004)

Triệu chứng bệnh trên cây ớt: Cây bệnh thấp lùn, trên lá có các vết đốm vàng sáng và các vết chết hoại. Trên thân cành xuất hiện các vết đen mọng nước có thể nứt vỡ dễ dàng. Hoa bị biến dạng và bất dục. Nếu hình thành quả, quả thường nhỏ, biến dạng, trên bề mặt quả có các đốm vàng sáng và rất dễ thối.

#### **2.3.2.6. Biện pháp kiểm soát**

Trong thời gian gần đây, CMV đã gây thiệt hại nghiêm trọng trên nhiều loại cây trồng như gây hoại tử cà chua ở Italia, Tây Ban Nha và Nhật, gây khảm và thối rữa chuối trên khắp thế giới, khảm dưa hấu ở California, và Tây Ban Nha, gây khảm cây lá thom ở Tây Ban Nha, gây khảm ớt ở Úc và California...Hiệu quả của các biện pháp kiểm soát phụ thuộc nhiều vào điều kiện sinh thái, thường là thấp bởi phạm vi kí chủ rộng của CMV, lan truyền bởi nhiều loại rệp và nó còn được lan truyền hiệu quả qua hạt của các loại rau và cỏ. Thuốc diệt rệp cũng được dùng hạn chế. Sử dụng gen kháng CMV cũng đã được báo cáo trên nhiều loại rau và, nhưng trong hầu hết các trường hợp

chỉ đặc trưng cho giống, và/hoặc khó sử dụng trong các chương trình giống. Dưới đây là một số biện pháp thường được áp dụng:

- ✚ Dùng giống kháng bệnh, giống sạch bệnh.

- ✚ Vì hầu hết sự nhiễm ban đầu đều xuất phát từ những cây cỏ lâu năm nên việc loại bỏ những cây cỏ này sẽ có lợi hơn là phun thuốc diệt côn trùng, có thể làm giảm áp lực lên virus.

- ✚ Loại bỏ cây bệnh.

- ✚ Phun thuốc trừ rệp. Khử trùng phương tiện thu hái. Hạn chế gây vết thương, xây xát trong quá trình chăm sóc.

- ✚ Chăm sóc để cây sinh trưởng phát triển tốt, bảo vệ cây, tránh nhiễm CMV vào giai đoạn cây con.

## **2.4. Các phương pháp chẩn đoán virus gây bệnh thực vật thường sử dụng**

### **2.4.1. Phương pháp cây chỉ thị**

Cây chỉ thị thực chất cũng là cây ký chủ (có thể là cây trồng hay cây dại) nhưng có triệu chứng bệnh rất điển hình và biểu hiện nhanh chóng. Chẩn đoán bằng cây chỉ thị là phương pháp khá chính xác trong nghiên cứu virus thực vật.

Cây chỉ thị được chia làm hai nhóm: các cây nhiễm bệnh cục bộ và các cây nhiễm bệnh hệ thống. Cây nhiễm bệnh cục bộ thường tạo ra các vết chết trên lá, thân,... còn cây nhiễm hệ thống thường tạo ra triệu chứng toàn thân như: khảm lá, biến vàng, lùn cây, và một số triệu chứng khác.

Để thu được cây chỉ thị thì chúng ta phải thực hiện các yêu cầu sau:

- Các điều kiện chuẩn bị để làm thí nghiệm lây bệnh trên cây chỉ thị: đất thí nghiệm, phân bón.
- Phương pháp trồng trọt cây chỉ thị
- Phương pháp tiến hành lây bệnh nhân tạo

(Vũ Triệu Mân, 2003)

### **Cây nhiễm bộ phận**

- Như cây cúc bách nhật (*Gomphrena globosa*) virus X gây vết chết hình nhẫn vòng viền đỏ.
- Cây rau muối (*Chenopodium quinoa*) virus S gây các đốm vàng trên lá.

### **Cây nhiễm hệ thống**

- Cây thuốc lá: *Nicotiana tabacum var xanthi virus Y* gây khảm lá và gân sáng.
- Cây tầm bóp Mỹ: *Physalis floridana* gây hiện tượng vàng lùn cây sau khi truyền bằng rệp.

Các cây chỉ thị được sử dụng trước tiên với mục đích để chẩn đoán bệnh hại: Người ta thường dùng những cây có triệu chứng nhiễm bộ phận để thực hiện thí nghiệm này. Các cây nhiễm hệ thống thường được dùng để giữ nguồn virus phục vụ các thí nghiệm trong phòng.

Cây chỉ thị là cách chẩn đoán quan trọng trong các phòng thí nghiệm virus thực vật vì chúng là cơ sở ban đầu để chẩn đoán. Nhược điểm cơ bản của phương pháp này cần có thời gian lây bệnh và phải chờ cây phát bệnh sau một thời kỳ ủ bệnh.

### **Yêu cầu chung đối với mẫu**

Toàn bộ hoặc một phần của lá đều có thể được dùng làm mẫu phân tích. Nguyên liệu đòi hỏi phải còn tươi, lá lớn và còn non, không sử dụng lá già. Chọn những lá có biểu hiện bệnh để thực hiện thí nghiệm chẩn đoán. Trường hợp cây có sự phân bố không đều mầm bệnh thì phải thu thập những phần mà có biểu hiện bệnh mạnh nhất.

(Theo Lê Lương Tề - Vũ Triệu Mân, 1999).

### **2.4.2. Phương pháp chẩn đoán bằng chỉ thị màu**

Đây là phương pháp chẩn đoán có độ chính xác thấp, thường chỉ đạt 70 - 90%. Chính vì vậy phương pháp này chỉ sử dụng cho việc chẩn đoán ban đầu. Phổ biến là phương pháp nhuộm màu bằng sunfat đồng. Các tế bào của cây họ bầu bí, cà khi bị nhiễm bệnh sẽ bị nhuộm màu nâu đỏ còn tế bào của cây khỏe chỉ có màu nâu hay không nhuộm màu. Người ta thường dùng  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  3% để chẩn đoán cây nhiễm CMV.

### **2.4.3. Phương pháp chẩn đoán bằng kính hiển vi điện tử**

✚ Virus thực vật có những đặc điểm sinh vật sống, chúng tự nhân lên trong cây trồng và di truyền tính gây bệnh, chúng tự phân chia thành các phân tử nhỏ nhưng cũng có thể tạo thành những tinh thể giống nhau chứa đựng những phân tử protein

✚ Chúng ta không thể thấy virus dưới kính hiển vi quang học, nhưng chúng ta có thể quan sát được chúng trên kính hiển vi điện tử với độ phóng đại 500.000 lần.

✚ Phương pháp đơn giản là sử dụng dung dịch chứa virus chiết từ lá cây bệnh hay thông qua làm tinh khiết cố định bằng hóa chất trên lưới đồng để quan sát trên kính hiển vi điện tử. Đây là phương pháp trực tiếp và đơn giản nhất.

✚ Có thể sử dụng kháng huyết thanh khi dùng phương pháp xem trực tiếp để phân biệt trong trường hợp nghi là mẫu bị lẫn virus khác. Phương pháp này giúp ta xác định được hai virus khác nhau trong cùng một mẫu.

✚ Người ta còn dùng lát cắt cực mỏng bằng Ultramicrotom và nhuộm mẫu được cắt, quan sát sự hiện diện của virus trong các tế bào thực vật bị nhiễm bệnh.

(Phạm Đức Toàn, 1996 – 2001)

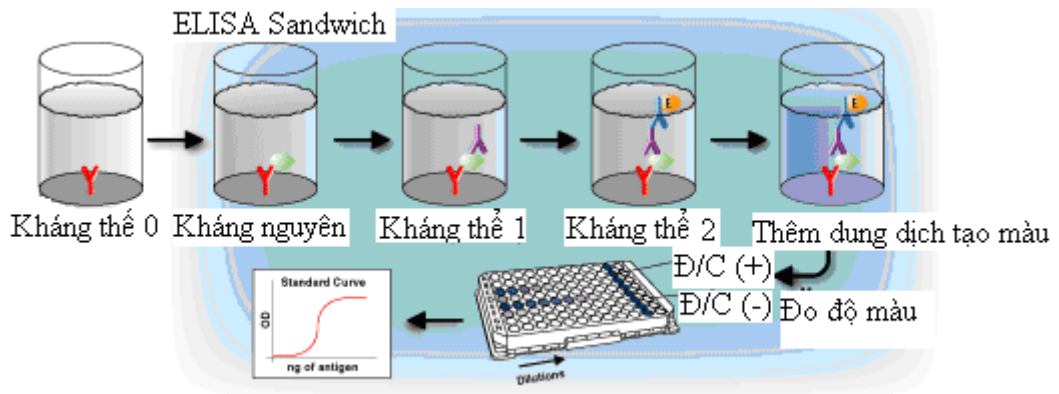
(Nguyễn Văn Tuất, 2002)

#### **2.4.4. Phương pháp ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)**

Đây là kỹ thuật khá nhạy và đơn giản, cho phép xác định kháng nguyên hoặc kháng thể ở nồng độ rất thấp (0,1ng/ml). So với với các kỹ thuật miễn dịch khác thì kỹ thuật này rẻ tiền và an toàn hơn mà vẫn đảm bảo độ chính xác. ELISA được dùng để xác định nhiều tác nhân gây bệnh như virus, vi khuẩn, nấm, kí sinh.

Nguyên tắc của kỹ thuật này dựa trên sự gắn kết đặc hiệu giữa kháng nguyên và kháng thể, trong đó kháng thể được gắn với một enzyme. Khi cho thêm cơ chất thích hợp (thường là p-nitrophenol phosphate) vào phản ứng, enzyme sẽ thủy phân cơ chất thành một chất có màu. Sự xuất hiện màu chứng tỏ đã xảy ra phản ứng đặc hiệu giữa kháng thể với kháng nguyên và thông qua cường độ màu mà biết được nồng độ kháng nguyên hay kháng thể cần phát hiện.

Hai kỹ thuật ELISA được dùng nhiều là kỹ thuật ELISA trực tiếp (direct Double Antibody Sandwich-ELISA) và ELISA gián tiếp (Indirect ELISA). Các enzyme thường dùng là  $\beta$ -galactosidaze, glucosidaze, peroxidaze và phosphataze kiềm (Vũ Triệu Mân, 2003).



**Hình 2.9. Nguyên tắc của phản ứng ELISA**

(Nguồn: Chemicon International)

#### ✚ Phương pháp ELISA trực tiếp kiểu Sandwich

Gồm các bước sau:

Bước 1: Cố định kháng thể đặc hiệu của virus vào đĩa ELISA.

Bước 2: Phủ dịch cây (có chứa virus cần xác định) vào đĩa ELISA.

Bước 3: Phủ kháng thể có gắn enzyme.

Bước 4: Cho cơ chất nền là cơ chất của enzyme vào đĩa ELISA.

Kết quả được đọc trên máy đọc ELISA (ELISA reader) ở bước sóng 405 nm.

Để cố định màu sắc của đĩa ELISA, bảo quản trong tủ lạnh 4°C và cần xem vào khi khác có thể dùng dung dịch NaOH 3M nhỏ vào mỗi giếng 25 – 30 µl.

#### ✚ Phương pháp ELISA gián tiếp (Indirect ELISA)

Kỹ thuật này thường được dùng để định tính và định lượng kháng thể hiện diện trong mẫu cần xác định. Gồm các bước:

Bước 1: Cố định kháng nguyên lên thành giếng.

Bước 2: Cho tiếp kháng huyết thanh (chứa kháng thể cần kiểm tra) vào.

Bước 3: Thêm cộng hợp kháng kháng thể có gắn enzyme vào.

Bước 4: Thêm cơ chất của enzyme vào để đọc kết quả (Vũ Triệu Mân, 2003).

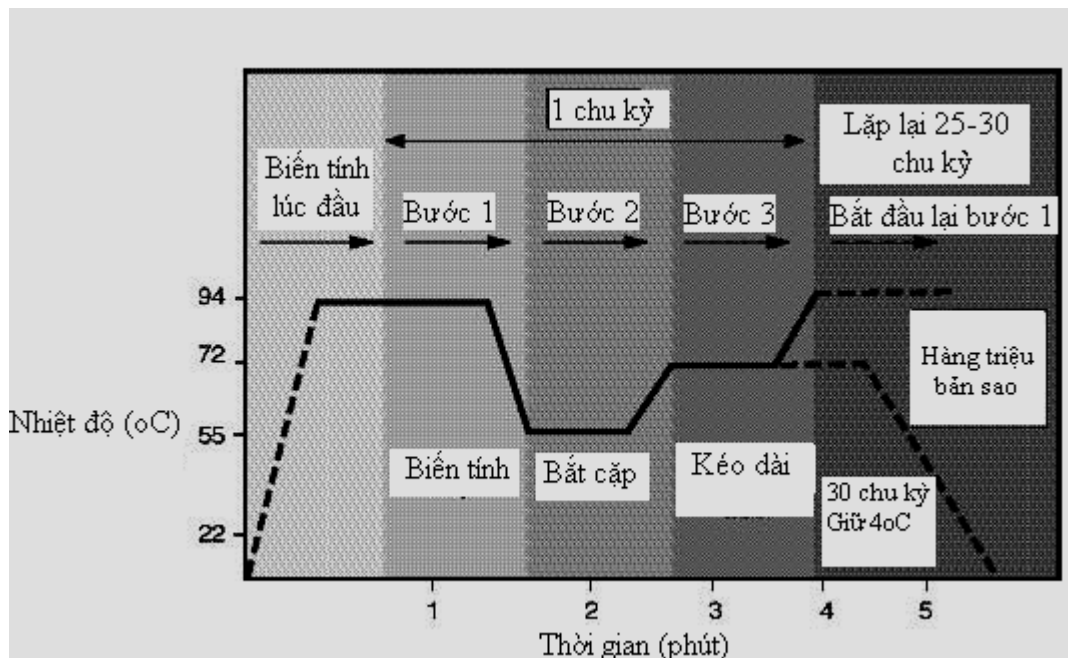
### 2.4.5. Phương pháp RT-PCR (Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction)

#### 2.4.5.1. Kỹ thuật PCR

Được giới thiệu lần đầu tiên bởi Tiến sĩ Kary Mullis vào năm 1985. PCR (Polymerase Chain Reaction) là một công cụ đơn giản và hiệu quả trong việc khuếch

đại DNA in vitro. Phản ứng xảy ra trong một máy luân nhiệt có khả năng lặp lại 3 bước ở các nhiệt độ khác nhau. 3 bước trên gồm:

1. Biến tính (Denaturation): Sợi đôi DNA khuôn bị biến tính bởi nhiệt thành 2 sợi đơn. Nhiệt độ khoảng 94-95<sup>0</sup>C.
2. Bắt cặp (Annealing): Cặp primer bắt cặp bổ sung với đoạn DNA khuôn. Nhiệt độ khoảng 55<sup>0</sup>C.
3. Kéo dài (Extension): Cặp primer được kéo dài bởi DNA polymerase. Nhiệt độ khoảng 72<sup>0</sup>C. Số bản sao của DNA đích tăng gấp đôi sau mỗi chu kỳ, sự khuếch đại theo hệ số mũ và có khả năng tạo ra hàng tỉ bản sao của đoạn DNA ban đầu.



**Hình 2.10. Sơ đồ phản ứng PCR**

Ngày nay kỹ thuật PCR được ứng dụng rộng rãi trong các lĩnh vực: Phân loại học, tiến hóa, y học, sinh thái học, khảo cổ, giám định pháp y...

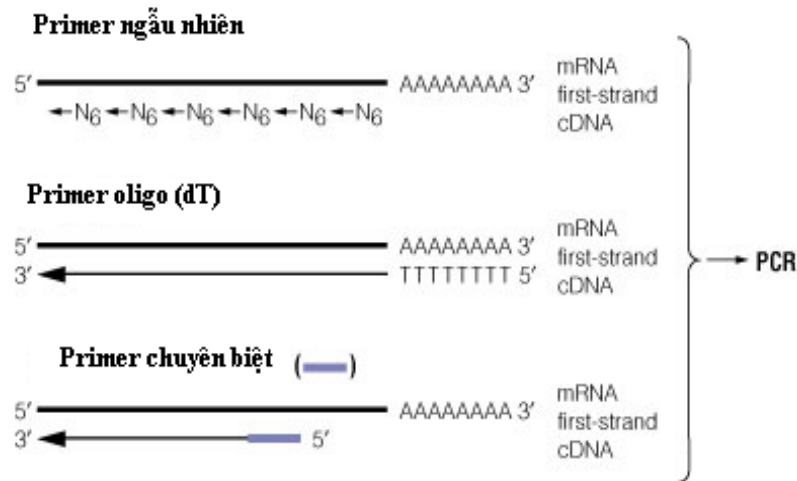
#### **2.4.5.2. Kỹ thuật RT-PCR**

Kỹ thuật RT-PCR gồm sự tổng hợp cDNA từ khuôn RNA và phản ứng PCR, là một phương pháp phân tích biểu hiện gen nhanh chóng và rất nhạy. RT-PCR được sử dụng để phát hiện hay định lượng mRNA, thường từ RNA khuôn có nồng độ thấp.

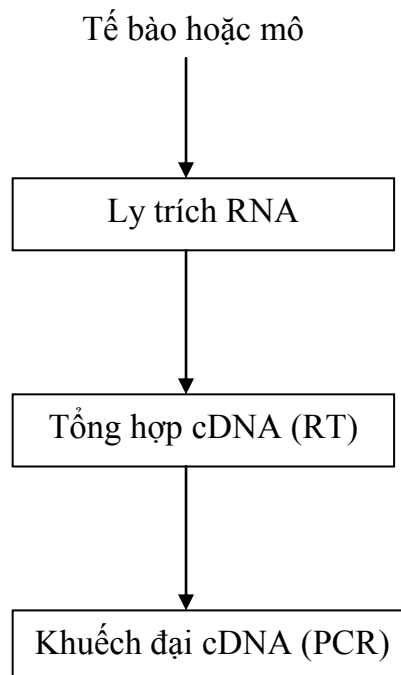
Khuôn mẫu cho RT-PCR có thể là RNA tổng số hoặc RNA có đuôi poly (A). Phản ứng RT có thể thực hiện với primer ngẫu nhiên, oligo (dT) hoặc primer được thiết kế chuyên biệt (GSP) sử dụng enzyme reverse transcriptase. Có hai hình thức của



phản ứng RT-PCR: một bước (one-step) hoặc hai bước (two-step). Phản ứng RT-PCR hai bước, mỗi bước được thực hiện trong những điều kiện tối ưu. Sự tổng hợp cDNA xảy ra đầu tiên trong dung dịch đệm RT và sản phẩm của phản ứng này được dùng cho PCR. Phản ứng RT-PCR một bước, phản ứng RT và PCR xảy ra liên tiếp trong cùng một tube dưới những điều kiện tối ưu cho cả hai.



**Hình 2.11. Sơ đồ phản ứng RT**



**Hình 2.12. Sơ đồ phản ứng RT-PCR**

Hai loại reverse transcriptase thường sử dụng là AMV (Avian Myeloblastosis Virus) Reverse Transcriptase và MMLV (Moloney Murine Leukemia Virus) Reverse Transcriptase. Cả hai loại enzyme này đều cần một primer để khởi đầu việc tổng hợp.

AMV Reverse Transcriptase là một DNA polymerase phụ thuộc RNA (RNA-dependent DNA polymerase), có chức năng tổng hợp sợi DNA bổ sung với RNA khuôn từ một primer. Enzyme này còn có một số những hoạt tính khác như DNA polymerase phụ thuộc DNA (DNA-dependent DNA polymerase), RNase H, tháo xoắn, không có hoạt tính 3'-5' exonuclease. AMV Reverse Transcriptase thích hợp cho phản ứng sao chép ngược những đoạn có cấu trúc bậc 2 do có nhiệt độ hoạt động tối ưu khá cao: 42<sup>0</sup>C. Tuy nhiên mặt hạn chế của nó là hoạt tính RNase H cũng khá cao làm giới hạn kích thước và giảm năng suất tổng hợp cDNA.

MMLV Reverse Transcriptase cũng là một enzyme DNA polymerase phụ thuộc RNA, có chức năng tổng hợp cDNA. Enzyme này còn có những hoạt tính khác như DNA polymerase phụ thuộc DNA và hoạt tính RNase H yếu, không có hoạt tính 3'-5' exonuclease. Nhiệt độ hoạt động tối ưu là 37<sup>0</sup>C. Do hoạt tính RNase H thấp hơn nhiều so với AMV Reverse Transcriptase nên MMLV Reverse Transcriptase được khuyến cáo sử dụng để tổng hợp những cDNA có kích thước lớn.

### **Các vấn đề thường gặp trong kỹ thuật PCR (RT-PCR):**

#### **✚ Có nhiều band tạp trên gel sau khi điện di**

##### **Nguyên nhân:**

- Nồng độ DNA khuôn chưa phù hợp.
- DNA khuôn bị đứt gãy.
- Thời gian biến tính quá ngắn.
- Nhiệt độ biến tính quá thấp.
- Thời gian kéo dài quá thấp.
- Số chu kỳ nhiều.
- Primer không chuyên biệt.
- Nhiễm.
- Nồng độ Mg<sup>2+</sup> chưa phù hợp.
- Vùng khuếch đại chứa nhiều GC hay có nhiều cấu trúc bậc hai.

### ✚ **Năng suất khuếch đại thấp hay không có sản phẩm khuếch đại**

#### **Nguyên nhân:**

- Nồng độ enzyme thấp.
- Thời gian biến tính quá ngắn.
- Nhiệt độ biến tính quá thấp.
- Thời gian kéo dài thấp.
- Số chu kỳ ít.
- Nồng độ DNA khuôn ít.
- Mẫu đứt gãy/nhiễm.
- Enzyme mất hoạt tính.
- dNTPs bị hư.
- Primers không bắt cặp.
- Nhiệt độ bắt cặp quá cao.
- Thời gian bắt cặp ngắn.
- Máy PCR.
- Nồng độ  $Mg^{2+}$  chưa phù hợp.
- Vùng khuếch đại chứa nhiều GC hay có nhiều cấu trúc bậc 2.

### ✚ **Có vết bẩn (smear) trên miếng gel sau khi điện di**

#### **Nguyên nhân :**

- Nồng độ primer cao.
- Primer thiết kế chưa tốt.
- Nồng độ enzyme cao.
- Số chu kỳ cao.
- Nhiệt độ bắt cặp thấp.
- Thời gian kéo dài chưa phù hợp.
- Biến tính không hoàn toàn.
- Có quá nhiều DNA mẫu.
- Nồng độ  $Mg^{2+}$  chưa phù hợp.
- Nhiễm.

(Nguồn: [www.promega.com](http://www.promega.com))

## **2.5. Một số kết quả nghiên cứu trong và ngoài nước về bệnh do CMV, TMV gây ra trong thời gian gần đây**

### **2.5.1. Ở nước ngoài**

- Harald Jockusch, Christiane Wiegand, Birgit Mersch, và Daniela Rajes vào năm 2001 đã cho biết thể đột biến của TMV có protein vỏ nhạy cảm với nhiệt độ cảm ứng phản ứng sốc nhiệt (heat shock) ở lá thuốc lá.

- F. L. Erickson, S. P. Dinesh - Kumar, S. Holzberg, C. V. Ustach, M. Dutton, V. Handley, C. Corr và B. J. Baker đã tìm hiểu về tương tác giữa gen N của thuốc lá và TMV. Gen N của thuốc lá tạo phản ứng siêu nhạy cảm khi TMV xâm nhập vào cây thuốc lá.

- Steve Whitham, Sheila McCormick và Barbara Baker vào năm 1996 đã chuyển gen N của thuốc lá vào cà chua, tạo tính kháng TMV cho cà chua chuyển gen.

- Ki Hyun Ryu, Chung - Ho Kim và Peter Palukaitis vào năm 1998 đã chứng minh rằng protein vỏ của CMV quy định dãy kí chủ của CMV khi nhiễm vào lúa mì.

- Yoshiji Niimi, Dong-Sheng Han, Shiro Mori, Hitoshi Kobayashi vào năm 2002 đã xây dựng quy trình phát hiện CMV gây bệnh trên cây hoa Lili bằng kỹ thuật RT-PCR. Qua đó cho thấy kỹ thuật RT-PCR có độ nhạy cao hơn so với kỹ thuật ELISA trong việc phát hiện virus gây bệnh.

### **2.5.2. Ở Việt Nam**

Các nghiên cứu về bệnh virus còn khá mới, chỉ có một số nghiên cứu của trường Đại học Nông Lâm trong những năm gần đây.

- Nguyễn Ngọc Bích, trường Đại học Nông Lâm TP. HCM vào năm 2003 đã bước đầu nghiên cứu một số bệnh virus chính trên vùng thuốc lá tỉnh Tây Ninh. Dùng DAS - ELISA để chẩn đoán một số virus trên thuốc lá như TSWV, CMV, TMV đồng thời điều tra tình hình bệnh virus trên địa bàn tỉnh Tây Ninh. Kết quả cho thấy các virus này đang phát triển khá mạnh ở vùng thuốc lá tỉnh Tây Ninh.

- Lâm Ngọc Hạnh, trường Đại học Nông Lâm TP.HCM vào năm 2005 đã tiến hành đánh giá tình hình nhiễm bệnh virus TMV, CMV, TSWV trên cà chua ở tỉnh Lâm Đồng, sử dụng kỹ thuật DAS-ELISA và xây dựng quy trình chẩn đoán TMV bằng RT-PCR.

## PHẦN III

# VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 3.1. Thời gian và địa điểm thực hiện

✚ Thời gian thực hiện đề tài từ tháng 03/2006 đến tháng 08/2006.

✚ Mẫu thí nghiệm được lấy ở 4 xã thuộc huyện Củ Chi là: Hòa Phú, An Nhơn Tây, Nhuận Đức, Trung Lập Thượng. Việc chẩn đoán bệnh được tiến hành tại Trung Tâm Phân Tích Thí Nghiệm Hóa Sinh, trường Đại Học Nông Lâm TP. Hồ Chí Minh.

### 3.2. Vật liệu

#### 3.2.1. Dụng cụ

- Dụng cụ thu mẫu và điều tra gồm: Bảng mẫu câu hỏi điều tra, nhãn, bao nylon, máy chụp ảnh, thùng giữ lạnh, đá khô, tủ âm.

- Dụng cụ nghiền mẫu gồm: Cối, chày. Mẫu được nghiền trong nitơ lỏng.

- Dụng cụ, thiết bị dùng cho ELISA, RT - PCR gồm: Đĩa ELISA 96 giếng, máy rửa đĩa ELISA, máy đọc kết quả ELISA, đĩa Petri, máy ly tâm, eppendorf, đầu tip, pipet man, petcher, máy PCR, tủ mát, tủ âm, tủ laminar, bồn ủ nhiệt, tủ ủ nhiệt, tủ sấy, tủ hấp vô trùng (autoclave), máy điện di, bồn nhuộm Ethidium Bromide, máy chụp hình gel, máy in.

#### 3.2.2. Hóa chất dùng trong kỹ thuật ELISA phát hiện CMV, TMV

Bộ kit ELISA với đầy đủ các thành phần:

- Dịch trích mẫu (Tampon De Broyage Extraction buffer 1X).
- Dung dịch đệm để pha kháng thể (Coating buffer).
- Kháng thể.
- Dịch rửa (PBS - Tween).
- Đối chứng dương (Positive control).
- Đối chứng âm (Negative control).
- Dung dịch đệm để pha kháng thể có gắn enzyme (Conjugate buffer).
- Kháng thể gắn enzyme alkaline-phosphatase (Conjugate antibodies).
- Dung dịch đệm để pha chất chỉ thị màu.
- Chất chỉ thị màu p-NPP.

Ngoài ra cần phải chuẩn bị:

- Cồn 70<sup>0</sup>.
- Nước cất hai lần khử ion và hấp khử trùng.

### **3.2.3. Hóa chất dùng trong kỹ thuật RT-PCR phát hiện CMV**

#### **3.2.3.1. Ly trích RNA**

RNA được ly trích theo quy trình của kit ly trích (The Aurum total RNA mini kit ) do Biorad sản xuất.

Những loại hóa chất có sẵn trong kit:

- Dịch trích mẫu (Lysis solution)	50 ml
- Dịch rửa nhẹ 5X (Low stringency wash solution)	20 ml
- Dịch rửa mạnh (High stringency wash solution)	40 ml
- DNase I dạng bột	1 hũ
- Dịch pha loãng DNase I	10 ml
- Dịch hòa tan RNA (Elution solution)	10 ml

Bên cạnh đó ta phải chuẩn bị một số hóa chất sau :

- Polyvinylpyrrolidone (PVP) 2%.
- Tris-base.
- $\beta$ -mercaptoethanol.
- Ethanol 95 - 100%.
- NaOH 0,1 M.
- EDTA 1M.
- DEPC (diethyl pyrocarbonate).

#### **3.2.3.2. Tổng hợp cDNA**

Dùng kit tổng hợp cDNA (iScript cDNA kit) do Bio-Rad cung cấp với thành phần như sau:

- Hỗn hợp phản ứng đã pha sẵn (5X iScript Reaction Mix) 100  $\mu$ l. Hỗn hợp này đã được trộn với primer poly T (oligo dT) và các hexamer ngẫu nhiên, chúng có khả năng bắt cặp với những RNA mục tiêu khác nhau. Hỗn hợp này sẽ cho kết quả tối ưu với những sản phẩm < 1 kb.

- Nước không nhiễm enzyme thủy phân nucleotide (Nuclease free water) 1,5 ml.

- Enzyme phiên mã ngược (iScript Reverse Transcriptase) 25  $\mu$ l, là enzyme MMLV với hoạt tính RNase H<sup>+</sup> có độ nhạy cao hơn những enzyme có hoạt tính RNase H<sup>-</sup>. Enzyme này được bổ sung thêm chất ức chế enzyme phân hủy RNA (RNase). Ta chỉ cần bổ sung thêm RNA và chạy theo chu trình nhiệt của kit.

### 3.2.3.3. Thực hiện phản ứng PCR khuếch đại các phân tử cDNA

Thành phần hóa chất cần thiết:

- cDNA được lấy từ quá trình tổng hợp ở trên.
- Nước không chứa nuclease (Nuclease free water).
- Dung dịch đệm PCR (10X PCR buffer).
- MgCl<sub>2</sub> 50 mM.
- Hỗn hợp dNTP 10 mM.
- iTaq polymerase 5 U /  $\mu$ l.
- Primer với trình tự như sau :

Primer 1: 5'-ATG GAC AAA TCT GAA TCA AC-3'

Primer 2: 5'-TCA AAC TGG GAG CAC CC-3'

Bên cạnh đó cần phải chuẩn bị một số hóa chất khác như:

- Agarose.
- Loading dye.
- Thang chuẩn (ladder) 1000bp, mỗi vạch cách nhau 100bp (Biorad).
- TAE 0,5X.

## 3.3. Phương pháp nghiên cứu

### 3.3.1. Nội dung nghiên cứu

- Điều tra tình hình nhiễm các loại virus TMV, CMV trên ớt tại huyện Củ Chi bằng phản ứng ELISA trên các mẫu thu thập tại các xã.
- Kiểm tra các mẫu có phản ứng ELISA dương tính với CMV bằng kỹ thuật RT-PCR.

### 3.3.2. Phương pháp điều tra và lấy mẫu

- Điều tra tại các hộ nông dân có trồng ớt theo mẫu điều tra đã chuẩn bị sẵn. Khâu lấy mẫu được thực hiện như sau:
  - Tùy theo diện tích có thể lấy từ 5 - 15 mẫu /vườn theo đường chéo, lấy bốn góc và ở giữa, còn lại lấy ngẫu nhiên và có theo phán đoán cá nhân. Lấy lá không non cũng không già lắm, phiến lá lớn. Mẫu được cho vào bao nylon có ghi nhãn cẩn thận về thời

gian, địa điểm, chủ vườn, loại cây, tuổi cây, triệu chứng, điều kiện canh tác. Mẫu được cho vào thùng xốp và được giữ lạnh cho đến khi kết thúc đợt lấy mẫu.

- Mẫu được đem về phòng thí nghiệm trong điều kiện được giữ lạnh và bảo quản trong tủ lạnh -20°C cho đến khi phân tích.

**Bảng 3.1. Số mẫu thu thập từ 4 xã của huyện Củ Chi.**

STT	Xã	Số mẫu
1	Hòa Phú	30
2	An Nhơn Tây	26
3	Nhuận Đức	105
4	Trung Lập Thượng	16
Tổng số mẫu		177

### 3.3.3. Phát hiện TMV và CMV bằng kỹ thuật DAS-ELISA (Double Antibody Sandwich Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)

Thực hiện theo sự hướng dẫn của bộ kit.

#### Giai đoạn ly trích mẫu:

Mẫu khi lấy về trữ ở -20°C, chọn những lá vừa không non cũng không già, phiến lá lớn, cân 0,5g cho vào cối, thêm 2,5ml dịch trích mẫu. Nghiền thật nát thành dạng dung dịch. Sau đó đổ vào eppendorf gần đầy và ghi ký hiệu thật cẩn thận.

Đem ly tâm tốc độ 5000 vòng/phút trong 3 phút ở nhiệt độ 4°C. Trữ ở 4°C.

#### Chẩn đoán ELISA:

☛ Bước 1: Chuẩn bị đĩa và sơ đồ bố trí. Mỗi đĩa được bố trí 2 đối chứng âm và 2 đối chứng dương.

☛ Bước 2: Pha loãng kháng thể 1/100 trong dung dịch đệm (coating buffer). Hút 100µl dung dịch vừa pha vào mỗi giếng, dùng băng keo dán kín lại và đặt vào tủ ủ ở 37°C trong 2 giờ.

☛ Bước 3: Rửa với dung dịch đệm PBS – Tween bằng máy rửa, rửa 3 lần mỗi lần 3 phút.

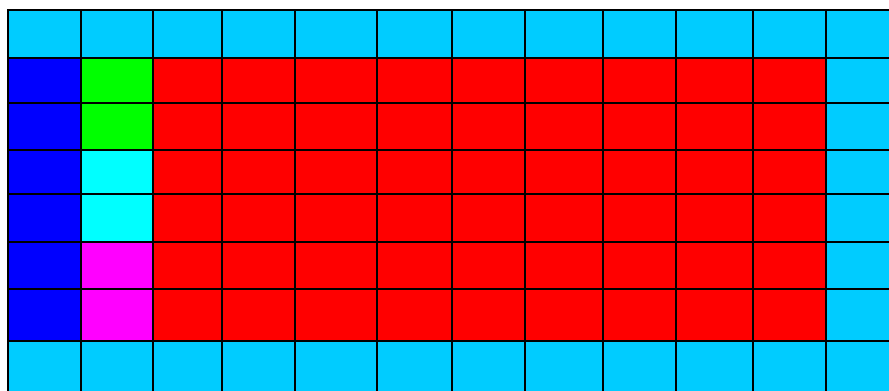
☛ Bước 4: Mỗi đối chứng âm và dương được hòa tan với 1ml nước cất, hút 100µl mỗi loại đối chứng vào các giếng đối chứng, tiếp theo hút 100µl mẫu vào các giếng đã được bố trí. Đem ủ ở 4°C qua đêm.



- ☛ Bước 5: Rửa lại với PBS – Tween 3 lần mỗi lần 3 phút.
- ☛ Bước 6: Pha kháng thể có gắn enzyme vào dung dịch đệm tương tự như pha kháng thể ở bước 2. Hút 100 $\mu$ l dung dịch kháng thể có gắn enzyme đã được pha vào mỗi giếng, dán băng keo lại, sau đó đem ủ ở 37°C trong 2 giờ.
- ☛ Bước 7: Rửa lại với PBS – Tween 3 lần, mỗi lần 3 phút.
- ☛ Bước 8: Hoà tan p-NPP trong dung dịch đệm Subtrate để đạt nồng độ cuối là 1mg/ml của p-NPP.

Cách pha: Nghiền nát thành bột mịn 7 viên p-NPP (mỗi viên 5mg), cho vào 35ml dung dịch đệm Subtrate (không màu), chờ 5 phút để pNPP tan hoàn toàn trong dung dịch đệm. Hút 100 $\mu$ l cho vào mỗi giếng, dán băng keo lại. Ủ ở 37°C trong 30 phút.

- ☛ Bước 9: Đọc kết quả bằng máy đọc OD sau 30 phút, 1 giờ, 2 giờ.
  - Những giếng xuất hiện màu vàng: giếng chứa mẫu bị nhiễm bệnh.
  - Những giếng không màu: giếng chứa mẫu không bị nhiễm bệnh.



- Những ô để trống
- Nước cất
- Buffer
- Đối chứng dương
- Đối chứng âm
- Mẫu ly trích

**Hình 3.1. Sơ đồ bố trí phản ứng ELISA**

### 3.3.4. Chẩn đoán CMV bằng RT – PCR

Các mẫu sau khi được kiểm tra bằng kỹ thuật ELISA sẽ được chọn ra để thực hiện tiếp phản ứng RT-PCR. Trong đề tài này chúng tôi chỉ thực hiện phản ứng RT-PCR trên đối tượng CMV.

Tiêu chuẩn chọn mẫu để thực hiện RT-PCR:

- Dương tính với phản ứng ELISA.
- Triệu chứng được quan sát phải đặc trưng và biểu hiện ra ngoài.
- Mẫu được bảo quản tốt (còn tươi).

Dựa vào những tiêu chí trên, ta chọn ra được 3 mẫu để thực hiện phản ứng RT-PCR: mẫu 30, mẫu 44, mẫu 69.

Kỹ thuật RT-PCR được sử dụng là 2 bước (two steps), gồm giai đoạn tổng hợp cDNA (Reverse) và giai đoạn khuếch đại cDNA (PCR). Virus CMV được phát hiện dựa trên một đoạn gen có kích thước 650 bp, mã hóa cho phân tử protein vỏ. Quá trình thực hiện gồm 2 giai đoạn:

#### 3.3.4.1. Ly trích RNA theo Aurum™ Total RNA Mini Kit (Biorad)

☛ Bước 1: Cân khoảng 60 mg mẫu lá ớt đã qua chẩn đoán ELISA cho kết quả dương tính. Cho mẫu vào cối (đã qua xử lý với NaOH, EDTA, rửa lại bằng nước cất siêu sạch, bọc giấy bạc rồi đem hấp khử trùng ở 121°C trong 20 phút, sấy khô trong một ngày đêm) nghiền thành bột mịn với nitơ lỏng. Thêm nitơ lỏng thường xuyên.

☛ Bước 2: Lấy muỗng cho vào hết trong tube ly tâm 2ml có nắp đậy (không có RNase). Hòa tan mẫu bằng dung dịch ly giải (lysis solution) có bổ sung PVP 2% (hỗn hợp này đã được trộn trước: 14µl PVP 2% + 700µl dung dịch ly giải cho mỗi mẫu).

☛ Bước 3: Cho 700µl dung dịch đã được trộn ở bước trên vào tube chứa mẫu, trộn thật kỹ bằng pipet khoảng 10 lần .

☛ Bước 4: Ly tâm 13000 vòng trong 3 phút. Chuyển toàn bộ dịch nổi vào tube ly tâm 2ml mới.

☛ Bước 5: Thêm 700 µl ethanol 70%, hoà tan bằng pipet cho đến khi không còn sự phân lớp.

☛ Bước 6: Ủ ấm dung dịch hòa tan (elution solution) trong bồn ủ ở 70°C (để chuẩn bị cho bước 15). Đặt RNA binding column (RNAbc) vào tube 2ml không nắp.

☛ Bước 7: Cho 700µl dung dịch ở bước 5 vào RNAbc, ly tâm 12000 vòng trong 60 giây, loại bỏ dịch lọc. Thực hiện tương tự cho đến hết phần dịch còn lại.

- ☛ Bước 8: Dịch rửa low stringency từ 5X pha loãng bằng ethanol 100% xuống còn 1X.
- ☛ Bước 9: Cho 700µl dung dịch low stringency vào RNAbc, ly tâm 12000 vòng trong 30 giây, loại bỏ dịch lọc.
- ☛ Bước 10: Pha DNase I với 250µl Tris 10mM pH 7,5. Hoà tan bằng pipet.
- ☛ Bước 11: Trộn 5µl Dnase I với 75µl dung dịch Dnase dilution trong tube 1.5ml, cho vào RNAbc. Ủ ở nhiệt độ phòng trong 15 phút, ly tâm 30 giây. Loại bỏ dịch lọc.
- ☛ Bước 12: Cho 700µl high stringency vào RNAbc, ly tâm 12000 vòng trong 30 giây, loại bỏ dịch lọc.
- ☛ Bước 13: Thực hiện tương tự như bước 12 nhưng với dung dịch low stringency.
- ☛ Bước 14: Ly tâm 12000 vòng trong 1 phút để loại bỏ hoàn toàn dịch rửa.
- ☛ Bước 15: Chuyển RNAbc vào tube 1.5ml có nắp đậy, cho vào 80µl dung dịch hoà tan ở bước 6. Để 1 phút, ly tâm 12000 vòng trong 2 phút để thu RNA tổng số. Bảo quản ở -20°C.

### 3.3.4.2. Khuếch đại RNA bằng RT – PCR

#### ✚ Bước 1: Tổng hợp cDNA

Tổng hợp cDNA theo hướng dẫn của iScript™ cDNA Synthesis kit (Biorad).

**Bảng 3.2. Thành phần hóa chất cho phản ứng tổng hợp cDNA.**

Thành phần	Thể tích
5X iScript reaction Mix	4 µl
Reverse transcriptase	1 µl
<b>RNA</b>	<b>3-5 µl</b>
Nuclease-free water	thêm vào đủ 20 µl
Tổng thể tích	20 µl

**Chu trình nhiệt:**

- 5 phút ở 25<sup>0</sup>C
- 30 phút ở 42<sup>0</sup>C
- 5 phút ở 85<sup>0</sup>C
- Giữ ở 4<sup>0</sup>C

cDNA được tổng hợp (20  $\mu$ l) có thể đem sử dụng ngay trong phản ứng PCR hoặc trữ ở -20<sup>0</sup>C để chạy PCR sau.

**✚ Bước 2: Khuếch đại cDNA bằng PCR**

Bước này được thực hiện theo nghiên cứu của A. I. Bhat và CTV ở Phân viện bảo vệ thực vật, Viện nghiên cứu về giống, Ấn Độ vào tháng 6/2005.

Chúng tôi đã tiến hành kiểm tra độ đặc hiệu của cặp primer sử dụng trong phản ứng PCR bằng phần mềm BLAST hiện có trên mạng Internet. Các bước thực hiện như sau:

- Bước 1: Truy cập trang chủ NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).
- Bước 2: Chọn thẻ BLAST.
- Bước 3: Nhập trình tự của cả hai primer vào.

Sau khi kiểm tra độ đặc hiệu của primer, chúng tôi xác định thành phần hóa chất cho phản ứng PCR như bảng 3.3.

**Bảng 3.3. Thành phần phản ứng PCR.**

<b>Thành phần</b>	<b>Thể tích</b>	<b>Nồng độ cuối</b>
10X iTaq buffer	5 $\mu$ l	1X
Primer 1	1 $\mu$ l	0,4 $\mu$ M
Primer 2	1 $\mu$ l	0,4 $\mu$ M
dNTP mix 10mM	1 $\mu$ l	0,2mM
MgCl <sub>2</sub> 50mM	1,5 $\mu$ l	1,5mM
<b>cDNA</b>	<b>3-5 <math>\mu</math>l</b>	
iTaq DNA polymerase	0,5 $\mu$ l	2,5U
H <sub>2</sub> O	thêm vào đủ 50 $\mu$ l	
Thể tích tổng	50 $\mu$ l	

**Chu trình nhiệt:**

- 1 chu kỳ 1 phút ở 94<sup>0</sup>C
- 40 chu kỳ 30 giây ở 94<sup>0</sup>C  
1 phút ở 50<sup>0</sup>C  
1 phút ở 72<sup>0</sup>C
- 1 chu kỳ 10 phút ở 72<sup>0</sup>C
- Giữ ở 4<sup>0</sup>C trong 5 phút

**3.3.4.3. Điện di trên gel agarose**

- Bước 1: Chuẩn bị gel agarose 1,5%.
- Bước 2: Làm nguội agarose đã được nấu chín đến 50-60<sup>0</sup>C, sau đó đổ vào khuôn đã được đặt lược vào trước. Chờ cho gel đông.
- Bước 3: Lấy lược ra, cho gel vào dung dịch TAE.
- Bước 4: Hút 2μl loading dye trộn với 4μl mẫu.
- Bước 5: Bơm vào các giếng một cách cẩn thận 4μl mẫu + dung dịch đệm.
- Bước 6: Chạy điện di ở 50V/250mA, cho đến khi thuốc nhuộm cách đầu tận cùng của gel khoảng 1cm.
- Bước 7: Lấy gel ra và ngâm vào dung dịch ethidium bromide trong 20 phút.
- Bước 8: Rửa nhẹ gel với nước.
- Bước 9: Đọc kết quả dưới tia UV, thẩm định kết quả với marker.
- Bước 10: Chụp bản gel để lưu lại kết quả.

## PHẦN IV

### KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 4.1. Đánh giá tình hình nhiễm CMV, TMV bằng ELISA

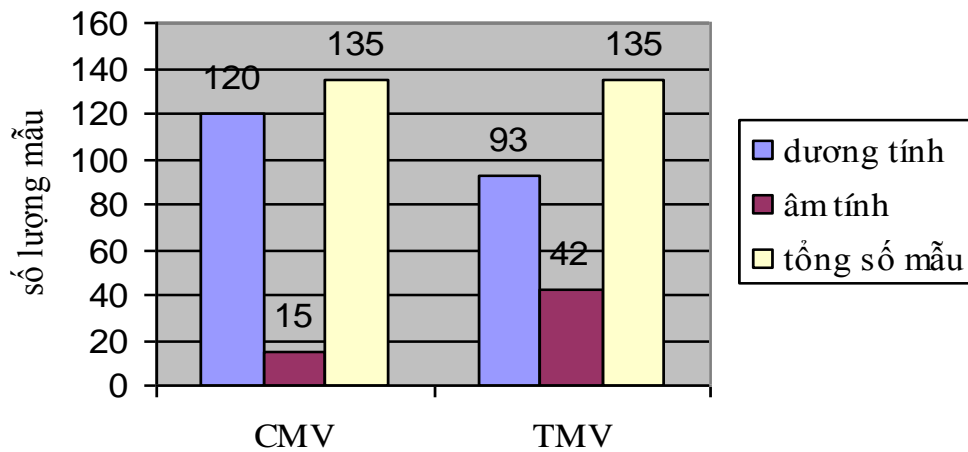
##### 4.1.1. Tỷ lệ nhiễm CMV, TMV trên tổng số mẫu điều tra

Từ tổng số 177 mẫu thu thập ở các xã chúng tôi chọn ra được 135 mẫu để tiến hành kiểm tra bằng ELISA.

Thể hiện qua Biểu đồ 4.1.

**Bảng 4.1. Kết quả ELISA trên tổng số mẫu.**

Tác nhân gây bệnh	Số mẫu dương tính	Số mẫu âm tính	Tổng số mẫu	Tỷ lệ nhiễm (%)
CMV	120	15	135	88,9
TMV	93	42	135	68,9



**Biểu đồ 4.1. Số lượng mẫu dương tính và âm tính với TMV và CMV**

☞ Kết quả trên cho thấy ớt trồng tại các xã của huyện Củ Chi đang bị nhiễm CMV, TMV ở mức độ cao, nhất là CMV lên đến gần 90%. Khi đi thu thập mẫu chúng tôi nhận thấy một số điểm như sau:

- ✚ Các ruộng ớt thường được trồng xen kẽ với hoa màu khác như bầu bí, cà chua, dưa leo, thuốc lá...Sau khi đã thu hoạch hoa màu, phần tàn dư được xếp đồng chờ phân hủy mà không có biện pháp xử lí thích hợp để tiêu diệt mầm bệnh.
- ✚ Bà con nông dân chưa quan tâm đến nguồn gốc của hạt giống, chưa nhận thấy mức độ nguy hiểm của bệnh do virus.
- ✚ Ruộng ớt đã bị nhiễm bệnh nặng vẫn không được đốt bỏ do tâm lí “được trái nào hay trái đấy”.
- ✚ Cỏ dại mọc rất nhiều trong ruộng ớt.
- ✚ Có nhiều vector lan truyền virus.

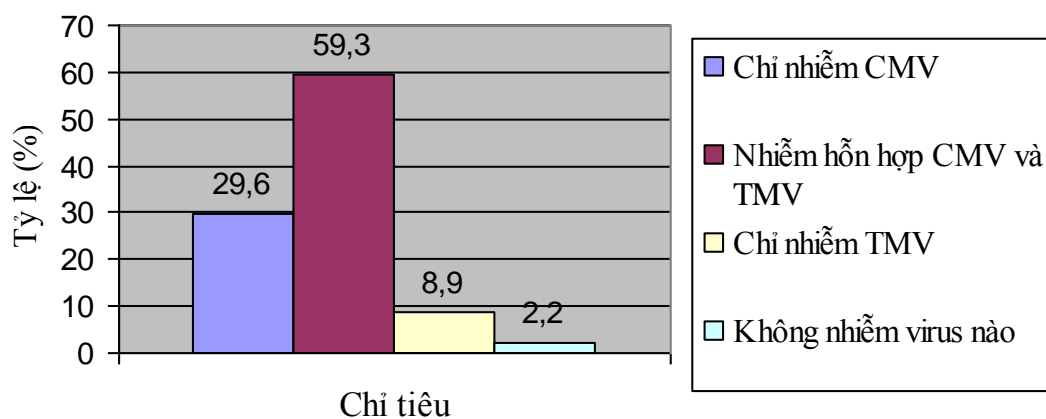
Những nguyên nhân trên đã làm cho CMV, TMV vốn rất bền vững trong tự nhiên lại càng có cơ hội bùng phát mạnh mẽ, làm giảm năng suất ớt canh tác.

#### 4.1.2. Tỷ lệ các mẫu nhiễm hỗn hợp virus TMV và CMV so với các mẫu nhiễm CMV hay TMV

Thể hiện qua Biểu đồ 4.2.

**Bảng 4.2. Tỷ lệ các mẫu nhiễm hỗn hợp virus TMV và CMV so với các mẫu nhiễm CMV hay TMV.**

Chỉ tiêu	Số mẫu	Tổng số mẫu kiểm tra	Tỷ lệ nhiễm (%)
Chỉ nhiễm CMV	40	135	29,6
Nhiễm hỗn hợp TMV và CMV	80		59,3
Chỉ nhiễm TMV	12		8,9
Không nhiễm virus nào	3		2,2



**Biểu đồ 4.2. Tỷ lệ nhiễm virus của các mẫu điều tra**

☞ Qua biểu đồ 4.2 có thể thấy số mẫu nhiễm hỗn hợp TMV và CMV chiếm tỷ lệ cao nhất (59,3%), kế đến là số mẫu nhiễm CMV (29,6 %) và số mẫu nhiễm TMV chiếm tỷ lệ thấp nhất (8,9%); trong tổng số mẫu kiểm tra chỉ có 3 mẫu không nhiễm cả hai loại virus trên (2,2%). Thực tế trên đồng một cây thường bị nhiễm nhiều loại virus do sức đề kháng của cây bị giảm dần, tạo điều kiện cho nhiều virus khác xâm nhập (Marcelo Eiras, 2001). Do vậy kết quả số mẫu nhiễm hỗn hợp cả TMV và CMV chiếm tỷ lệ cao nhất là hợp lí. Tập quán canh tác ớt ở Củ Chi là trồng xen kẽ ớt với bầu bí, dưa leo... là những cây kí chủ chính của CMV, còn thuốc lá thì được trồng thành những diện tích lớn riêng biệt cho nên đa số mẫu thu thập có tỷ lệ nhiễm CMV cao hơn so với TMV. Kết quả cũng cho thấy CMV đang bùng phát mạnh mẽ ở Củ Chi vào thời điểm khảo sát khi tỷ lệ nhiễm bệnh lên đến gần 90%. Chỉ có 2,2 % mẫu là sạch bệnh nhưng cũng có thể là virus mới xâm nhập vào cây, chưa đủ ngưỡng để phát hiện.

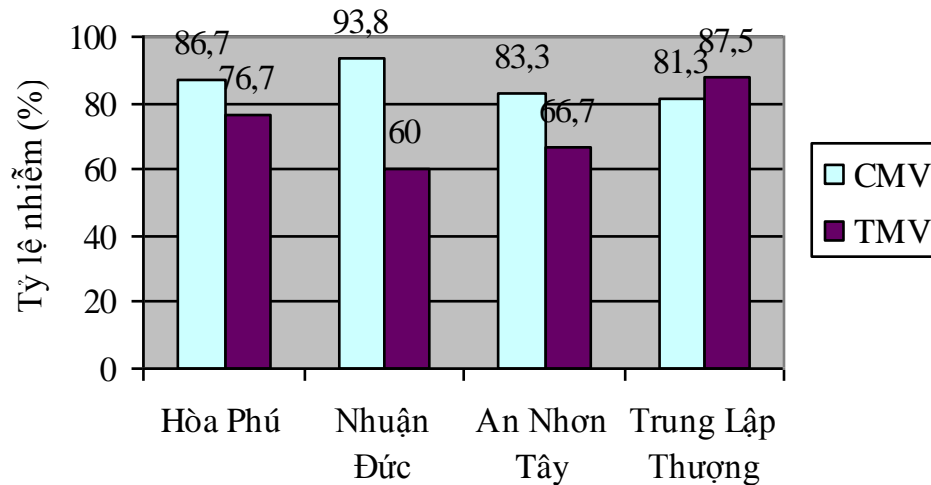
#### 4.1.3. Tỷ lệ nhiễm TMV và CMV tại các xã

Thể hiện qua Biểu đồ 4.3.

**Bảng 4.3. Tỷ lệ nhiễm TMV và CMV tại các xã.**

Xã	CMV			TMV			Tổng số mẫu
	Nhiễm	Không nhiễm	Tỷ lệ nhiễm (%)	Nhiễm	Không nhiễm	Tỷ lệ nhiễm (%)	
Hòa Phú	26	4	86,7	23	7	76,7	30
Nhuận Đức	61	4	93,8	39	26	60,0	65
An Nhơn Tây	20	4	83,3	16	8	66,7	24
Trung Lập Thượng	13	3	81,3	14	2	87,5	16





**Biểu đồ 4.3. So sánh tỷ lệ nhiễm TMV và CMV tại các xã**

☞ Kết quả cho thấy tất cả 4 xã điều tra đều đã bị nhiễm virus TMV và CMV. Trong đó xã Nhuận Đức bị nhiễm CMV nặng nhất (93,8%) nhưng nhiễm TMV thấp nhất (60%); ngược lại xã Trung Lập Thượng bị nhiễm TMV nặng nhất (87,5%) nhưng nhiễm CMV thấp nhất (81,3%). Điều này có thể do sự ức chế lẫn nhau giữa hai loại virus này, khi số lượng CMV phát triển đến mức cao sẽ ức chế sự phát triển của TMV và ngược lại. Biểu đồ 4.3 cho thấy mức độ nhiễm virus ở các xã là đáng báo động, nếu không có biện pháp kịp thời thì thiệt hại về kinh tế cho bà con nông dân sẽ rất lớn.

#### 4.1.4. Tỷ lệ nhiễm TMV và CMV theo từng giống ớt

Khi điều tra, đa số hộ nông dân không nắm được tên giống ớt mà họ đang canh tác. Bà con mua giống từ các đại lí đem về trồng mà chưa quan tâm nhiều đến tên giống. Do vậy trong nghiên cứu này, chúng tôi chưa thể thống kê được tỷ lệ bệnh theo giống ớt.

#### 4.1.5. Tỷ lệ nhiễm TMV và CMV theo triệu chứng

Triệu chứng bệnh virus trên cây ớt khá đa dạng, dưới đây là một số triệu chứng điển hình mà chúng tôi ghi nhận được trong quá trình lấy mẫu:

- ✚ Lá khảm vàng xanh, cong.
- ✚ Lá chấm vàng xanh, nhăn nheo, co lại, dày, giòn.
- ✚ Khảm vàng nhạt trên rìa lá, lá nhỏ.
- ✚ Lá khảm nặng, biến dạng, cây lùn, quả ít

**Bảng 4.4. Tỷ lệ nhiễm TMV và CMV theo triệu chứng.**

Triệu chứng	Số mẫu điều tra	Số mẫu nhiễm	Tỷ lệ nhiễm (%)
Lá xanh nhạt, khảm vàng, cong	27	27	100
Lá chảm vàng xanh, nhẵn nheo, co lại, dày, giòn	15	15	100
Khảm vàng nhạt trên rìa lá, lá nhỏ	37	37	100
Lá khảm nặng, biến dạng, cây lùn, quả ít	9	9	100

☞ Kết quả trên cho thấy chúng ta có thể dựa vào những triệu chứng điển hình bên ngoài để chẩn đoán bệnh virus. Tỷ lệ nhiễm bệnh theo triệu chứng trong nghiên cứu này đều là 100%. Bên cạnh đó có những mẫu lá nhìn bề ngoài không có triệu chứng gì nhưng khi kiểm tra vẫn phát hiện bệnh, điều này có thể lí giải là do virus chỉ mới xâm nhập vào cây nên chưa có biểu hiện ra bên ngoài. Vì vậy ngoài việc dựa vào triệu chứng để chẩn đoán bệnh, còn phải kết hợp nhiều phương pháp chẩn đoán khác như huyết thanh học, sinh học phân tử để đưa ra một kết luận chính xác.

#### 4.1.6. Tỷ lệ nhiễm TMV và CMV theo độ tuổi

Khi tiến hành lấy mẫu thì các ruộng ớt đều bước vào giai đoạn cuối vụ hoặc vừa mới được trồng đợt tiếp theo. Do vậy, chúng tôi chưa thể thống kê được tỷ lệ bệnh theo độ tuổi.

## 4.2. Phát hiện CMV bằng kỹ thuật RT-PCR

Từ kết quả chẩn đoán bằng ELISA, chúng tôi chọn những mẫu có chỉ số dương tính cao và tiến hành phản ứng RT - PCR nhằm xây dựng quy trình chẩn đoán CMV bằng RT-PCR.

☞ Sau khi ly trích RNA theo hướng dẫn của Aurum™ Total RNA Mini Kit (Biorad) thu được 80µl RNA tổng số.

☞ Phản ứng tổng hợp cDNA được thực hiện theo hướng dẫn của iScript™ cDNA Synthesis Kit (Biorad). Sau phản ứng thu được 20µl cDNA. Lượng cDNA này có thể được sử dụng cho phản ứng PCR ngay hoặc trữ ở -20°C.

Trong quá trình thực hiện thí nghiệm, chúng tôi đã tiến hành thay đổi thể tích RNA và cDNA trong các phản ứng (3-5 $\mu$ l). Kết quả chúng tôi đã thu được thành phần hóa chất tối ưu của phản ứng tổng hợp cDNA (Bảng 4.5) và phản ứng PCR (Bảng 4.6).

**Bảng 4.5. Thành phần hóa chất tối ưu của phản ứng tổng hợp cDNA.**

Thành phần hóa chất	Thể tích
5X iScript Reation Mix	4 $\mu$ l
iScript Reverse Transcriptase	1 $\mu$ l
RNA khuôn mẫu	5 $\mu$ l
Nuclease-free water	10 $\mu$ l
Tổng thể tích	20 $\mu$ l

Lượng RNA thích hợp cho phản ứng tổng hợp cDNA là 5  $\mu$ l.

Quy trình nhiệt của phản ứng tổng hợp cDNA có thay đổi so với khuyến cáo của kit (tăng thời gian của giai đoạn 42°C từ 30 phút lên 40 phút).

Chu kỳ nhiệt trong phản ứng tổng hợp cDNA:

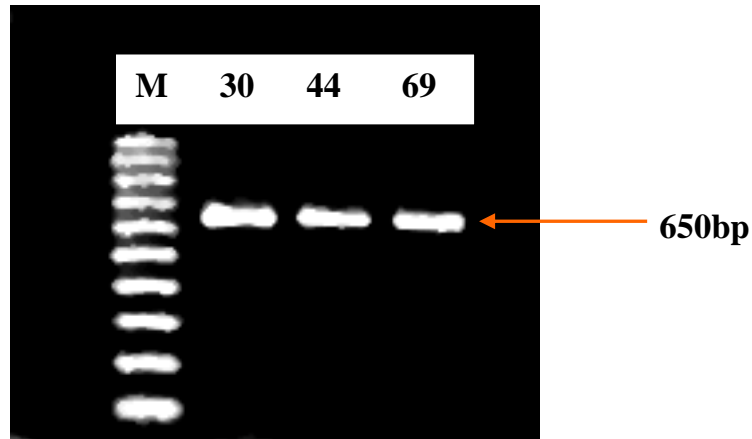
- 25°C trong 5 phút.
- 42°C trong 40 phút.
- 85°C trong 5 phút.
- Giữ ở 4°C.

☞ Lượng cDNA thích hợp cho phản ứng PCR là 5  $\mu$ l.

**Bảng 4.6. Thành phần hóa chất tối ưu của phản ứng PCR.**

Thành phần hóa chất	Thể tích	Nồng độ cuối
Buffer 10X	5 $\mu$ l	1X
MgCl <sub>2</sub> 50mM	1,5 $\mu$ l	1,5mM
iTaq DNA polymerase	0,5 $\mu$ l	2,5U
dNTPs 10mM	1 $\mu$ l	0,2mM
Primer 1	1 $\mu$ l	0,4 $\mu$ M
Primer 2	1 $\mu$ l	0,4 $\mu$ M
cDNA	5 $\mu$ l	
H <sub>2</sub> O	35 $\mu$ l	
Tổng thể tích	50 $\mu$ l	

- ☞ Kết quả kiểm tra độ đặc hiệu của primer:
  - Chỉ có một vị trí bắt cặp của primer trên gen đích.
  - Cặp primer sử dụng chỉ khuếch đại đoạn gen đặc trưng của CMV.
  - Đoạn gen được khuếch đại mã hóa cho protein vỏ của CMV.
- ☞ Chu trình nhiệt sử dụng trong phản ứng PCR là ổn định.
- ☞ Kết quả điện di:



**Hình 4.1. Kết quả điện di sản phẩm PCR của CMV**

M: Thang DNA chuẩn 1000bp.

30, 44, 69: cDNA của mẫu số 30, 44, 69.

☞ Primer là yếu tố quan trọng hàng đầu quyết định thành công của phản ứng PCR, được thiết kế dựa theo những trình tự nucleotide đã biết của virus. Nghiên cứu này sử dụng cặp primer thiết kế dựa vào trình tự đoạn gen mã hóa protein vỏ của virus CMV, khuếch đại sản phẩm có kích thước khoảng 650bp của tác giả A. I. Bhat và CTV ở Phân viện bảo vệ thực vật, Viện nghiên cứu về giống, Ấn Độ.

☞ Cặp primer đã sử dụng có độ đặc hiệu rất cao, chỉ cho đúng 1 band ở vị trí 650bp trên gel điện di.

☞ Hình 4.1 cho thấy phản ứng RT-PCR đã thành công trong việc khuếch đại đoạn gen có kích thước mong muốn (khoảng 650bp). Như vậy chúng tôi đã bước đầu xây dựng được quy trình phát hiện CMV bằng kỹ thuật RT-PCR.

Qua đó cho phép khẳng định các mẫu này đã bị nhiễm virus CMV.

## **PHẦN V**

### **KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ**

#### **5.1. Kết luận**

Từ các kết quả thu được chúng tôi rút ra một số kết luận sau:

- Vào thời điểm nghiên cứu (03/2006), các ruộng ớt của 4 xã trong huyện Củ Chi đều đã bị nhiễm TMV và CMV với mức độ cao. Trong đó CMV đang bùng phát mạnh mẽ, TMV nhiễm với tỷ lệ thấp hơn.
- Xã Nhuận Đức nhiễm CMV nặng nhất, xã Trung Lập Thượng nhiễm TMV nặng nhất.
- Có thể dựa vào triệu chứng bệnh bên ngoài để chẩn đoán sớm bệnh virus, tuy nhiên cần kết hợp với kỹ thuật ELISA và RT-PCR để cho kết quả chính xác nhất.
- Đã phát hiện được virus CMV trên cây ớt nhờ phản ứng RT-PCR khuếch đại đoạn gen mã hóa cho protein vỏ (650bp). Cặp primer đã sử dụng là rất đặc hiệu và chu trình nhiệt ổn định.

#### **5.2. Đề nghị**

- Tiếp tục ứng dụng kỹ thuật ELISA và RT-PCR để phát hiện các virus khác gây bệnh trên cây ớt.
- Tiếp tục nghiên cứu đánh giá ảnh hưởng của giống và tuổi của cây ớt đến mức độ nhiễm các loại virus trên.
- Thực hiện bước giải trình tự sản phẩm PCR để so sánh mức độ tương đồng của chủng virus đang nghiên cứu với các chủng trong ngân hàng gen.
- Có thể ly trích RNA trực tiếp bằng phương pháp siêu ly tâm trong khay nh độ đường sử dụng ống cellulose.
- Cung cấp giống sạch bệnh cho bà con nông dân và tuyên truyền thay đổi tập quán canh tác ớt như hiện nay để giảm mức độ nhiễm virus.

## PHẦN VI

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

#### TIẾNG VIỆT

1. Bùi Cách Tuyến, 1998, Bản dịch tiếng Việt, *Tài liệu hướng dẫn đồng ruộng, Bệnh hại cây ớt*, Nhà xuất bản Nông nghiệp, trang 42-56.
2. Lâm Ngọc Hạnh, 2001-2005, Luận văn tốt nghiệp Ngành Công nghệ sinh học: *Đánh giá tình trạng nhiễm bệnh virus (Cucumber Mosaic Virus, Tobacco Mosaic Virus và Tomato Spotted Wilt Virus) trên cà chua (Solanum lycopersicum) ở tỉnh Lâm Đồng bằng kỹ thuật ELISA và bước đầu xây dựng quy trình chẩn đoán virus Tobacco Mosaic Virus bằng kỹ thuật RT-PCR.*
3. Mai Thị Phương Anh, 1999. *Kỹ thuật trồng một số loại rau cao cấp (ớt, ngô rau, măng tây, sulo xanh, cải bao)*. Nhà xuất bản nông nghiệp Hà Nội, trang 5-11
4. Nguyễn Đình Trường, 2001-2005, Luận văn tốt nghiệp Ngành Công nghệ sinh học: *Nghiên cứu hiện trạng nhiễm bệnh TSWV (Tomato spotted wilt virus) trên cây ớt bằng kỹ thuật ELISA và bước đầu xây dựng phương pháp chẩn đoán bằng kỹ thuật RT-PCR.*
5. Vũ Triệu Mân, Lê Lương Tề, 1999. *Bệnh vi khuẩn và virus hại cây trồng*. Nhà xuất bản Giáo Dục, trang 143.
6. Vương Hồ Vũ, 2001-2005, Luận văn tốt nghiệp Ngành Công nghệ sinh học: *Nghiên cứu một số virus trên khoai tây (PVX, PVY, PLRV) tại Đà Lạt bằng kỹ thuật ELISA, RT-PCR và giải trình tự.*

#### TIẾNG NƯỚC NGOÀI

7. Alfred Nobel Dr. Hercules, CA 94547 USA, Inc, 2000, Aurum Total RNA Mini Kit Instruction Manual Biorad Laboratories, p.26-27.
8. Elisabeth Knapp and Dennis J. Lewandowski, 2001. *Tobacco mosaic virus, not just a single component virus anymore*. Molecular Plant Pathology 2: 117–123. Blackwell Science LTD, USA.

9. H. W. Jung, W. S. Yun, Y. I. Hahm và K.-H. Kim, 2001. *Characterization of Tobacco mosaic virus Isolated from Potato Showing Yellow Leaf Mosaic and Stunting Symptoms in Korea*. Plant Disease, Vol. 86, No. 2. The American Phytopathological Society, USA.

10. Joshiji Niimi, Dong-Sheng Han, Shiro Mori and Hitoshi Kobayashi, 2003. *Detection of cucumber mosaic virus, lily symptomless virus and lily mottle virus in liliium species by RT-PCR technique*. Scientia Horticulturae 97: 57-63. Elsevier Science B.V.

11. Ken Pernezny, Pamela D. Roberts, John F. Murphy and Natalie P. Goldberg, 2003. Compendium of Pepper Diseases. *The American Phytopathological Society*. p23-39.

12. Ray Cerkauskas, Tom Kalb, S.K. Green, L.L.Black and T.A. Zitter, 2004. *Pepper Diseases: Cucumber Mosaic Virus*. AVRDC – The World Vegetable Center, Shanhua, Taiwan.

<[www.avrdc.org](http://www.avrdc.org)>

13. Ray Cerkauskas, Tom Kalb, S.K. Green, L.L.Black and T.A. Zitter, 2004. *Pepper Diseases: Tobacco Mosaic Virus, Tomato Mosaic Virus*. AVRDC – The World Vegetable Center, Shanhua, Taiwan.

<[www.avrdc.org](http://www.avrdc.org)>

14. R. Madhubala, V. Bhadramurthy, A. I. Bhat, P. S. Hareesh, S. T. Retheesh and R. S. Bhai, 2005. *Occurrence of Cucumber mosaic virus on vanilla (Vanilla planifolia Andrews) in India*. J. Biosci 30: 339–350. Indian Academy of Sciences, India.

15. Sambrook and Russell, 2001. *Molecular Cloning-A Laboratory Manual*. 3<sup>rd</sup> edition, volume 2. *Cold spring harbor laboratory press*, New York, USA. p 8.46-8.49.

16. Scott Adkins and Erin N. Roskopf, 2002. *Key West Nightshade, a New Experimental Host for Plant Viruses*. Plant Disease, Vol. 86, No. 12. The American Phytopathological Society, USA.

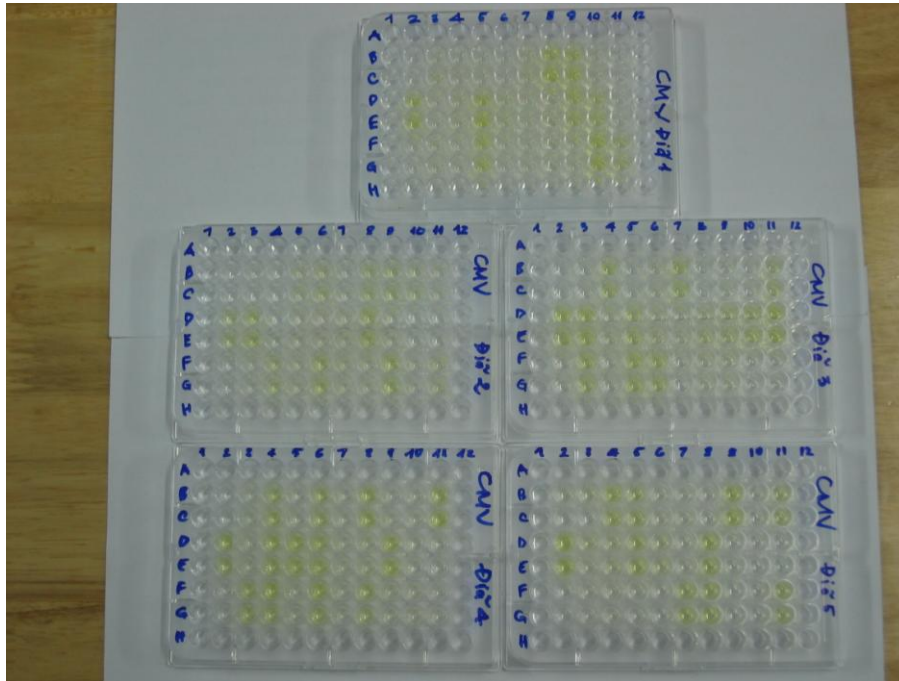
**CÁC WEBSITE**

17. <<http://www.dpvweb.net/dpv/dpvnameidx.php>>
18. <<http://www.virusbank.org>>
19. <<http://www.saigonnews.vn/snc/layout/set/print/content/view/full/9304>>
20. <<http://hsb.iitm.ac.in/~jm/ARCHIVES/Mar-April02/articles/hotstuff.htm>>
21. <<http://www.vietel.net.vn/news.php?news=39365>>
22. <[http://www.courier.bayercropscience.com/bayer/cropscience/cscms.nsf/id/ConEne\\_Agro/\\$file/confidor\\_enemies.pdf](http://www.courier.bayercropscience.com/bayer/cropscience/cscms.nsf/id/ConEne_Agro/$file/confidor_enemies.pdf)>
23. [www.biorad.com](http://www.biorad.com)
24. [www.promega.com](http://www.promega.com)

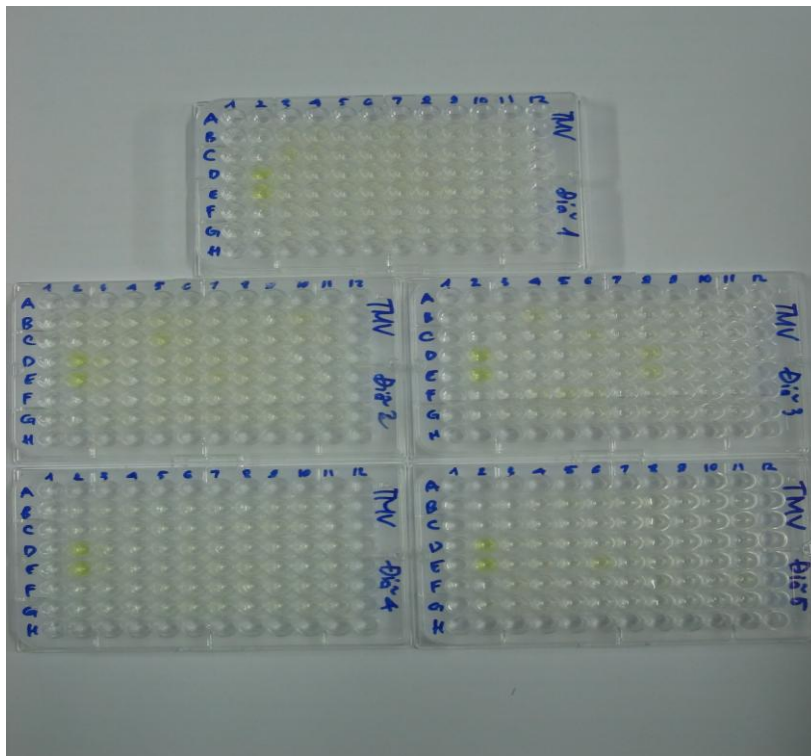


# PHỤ LỤC 1

## HÌNH CHỤP CÁC ĐĨA CHỨA MẪU PHÂN TÍCH BẰNG ELISA



Kết quả kiểm tra CMV bằng ELISA



Kết quả kiểm tra TMV bằng ELISA

PHỤ LỤC 2  
AURUM™ TOTAL RNA MINI KIT



### PHỤ LỤC 3 TRUNG GIAN TRUYỀN BỆNH VIRUS



Một số loài rệp



Một số loài bọ trĩ

**PHỤ LỤC 4**  
**MẪU ĐIỀU TRA**

Mã số .....

Nơi lấy mẫu .....

Chủ hộ .....

Giống cây.....

Tuổi cây .....

Tình trạng vườn .....

Cách trồng .....

Phương pháp trồng .....

Diện tích vườn, năng suất.....

Độ thuận của vườn.....

Có vector truyền bệnh hay không.....

Mùa vụ.....

Bệnh có thường xảy ra không.....

Triệu chứng.....

## PHỤ LỤC 5

### KẾT QUẢ KIỂM TRA PRIMER BẰNG PHẦN MỀM BLAST

- >  gi|77917371|emb|AM114273.1| Cucumber mosaic virus partial 3a gene and partial cp gene for coat protein, genomic RNA, strain Le02 RNA3  
Length=2216  
Score = 40.1 bits (20), Expect = 0.27  
Identities = 20/20 (100%), Gaps = 0/20 (0%)  
Strand=Plus/Plus
  
- >  gi|111154124|gb|AC184073.2| Populus trichocarpa clone Pop1-50D1, complete sequence  
Length=139458  
Score = 40.1 bits (20), Expect = 0.27  
Identities = 20/20 (100%), Gaps = 0/20 (0%)  
Strand=Plus/Plus
  
- >  gi|71467707|emb|AM055602.1| Cucumber mosaic virus CP gene for coat protein, genomic RNA, specific host Musa x paradisiaca (banana)  
Length=657  
Score = 40.1 bits (20), Expect = 0.27  
Identities = 20/20 (100%), Gaps = 0/20 (0%)  
Strand=Plus/Plus
  
- >  gi|68146848|emb|AJ890465.2| Cucumber mosaic virus CP gene for coat protein, genomic RNA, specific host Lilium tigrinum  
Length=944  
Score = 40.1 bits (20), Expect = 0.27  
Identities = 20/20 (100%), Gaps = 0/20 (0%)  
Strand=Plus/Plus
  
- >  gi|68146847|emb|AJ890464.2| Cucumber mosaic virus CP gene for coat protein, genomic RNA, specific host Oriental Lily  
Length=944  
Score = 40.1 bits (20), Expect = 0.27  
Identities = 20/20 (100%), Gaps = 0/20 (0%)  
Strand=Plus/Plus
  
- >  gi|44893903|gb|AY541691.1| Cucumber mosaic virus strain CMV-G10 coat protein gene, complete cds  
Length=657  
Score = 40.1 bits (20), Expect = 0.27  
Identities = 20/20 (100%), Gaps = 0/20 (0%)  
Strand=Plus/Plus

>  gi|38537169|gb|AY450854.1| Cucumber mosaic virus strain CMV-G2 coat protein gene, complete cds  
Length=657  
Score = 40.1 bits (20), Expect = 0.27  
Identities = 20/20 (100%), Gaps = 0/20 (0%)  
Strand=Plus/Plus

>  gi|110564284|gb|DQ767971.1| Cucumber mosaic virus from lily coat protein gene, complete cds  
Length=657  
Score = 40.1 bits (20), Expect = 0.27  
Identities = 20/20 (100%), Gaps = 0/20 (0%)  
Strand=Plus/Plus

>  gi|55740407|gb|AY792596.1| Cucumber mosaic virus coat protein gene, complete cds  
Length=657  
Score = 40.1 bits (20), Expect = 0.27  
Identities = 20/20 (100%), Gaps = 0/20 (0%)  
Strand=Plus/Plus

>  gi|7242509|emb|AJ276481.1|CMO276481 Cucumber mosaic virus (strain Mf), complete RNA3 segment  
Length=2214  
Score = 40.1 bits (20), Expect = 0.27  
Identities = 20/20 (100%), Gaps = 0/20 (0%)  
Strand=Plus/Plus

>  gi|25809284|emb|AJ517802.1|CMO517802 Cucumber mosaic virus 3a gene for movement protein and cp gene for coat protein, genomic RNA  
Length=2216  
Score = 40.1 bits (20), Expect = 0.27  
Identities = 20/20 (100%), Gaps = 0/20 (0%)  
Strand=Plus/Plus

>  gi|25173584|emb|AJ511990.1|CMO511990 Cucumber mosaic virus 3a gene for movement protein and cp gene for coat protein, genomic RNA  
Length=2216  
Score = 40.1 bits (20), Expect = 0.27  
Identities = 20/20 (100%), Gaps = 0/20 (0%)  
Strand=Plus/Plus

>  gi|56684566|gb|AY754359.1| Cucumber mosaic virus isolate Kerala coat protein gene, complete cds  
Length=657  
Score = 40.1 bits (20), Expect = 0.27  
Identities = 20/20 (100%), Gaps = 0/20 (0%)  
Strand=Plus/Plus

>  gi|47156054|gb|AY600989.1| Cucumber mosaic virus isolate Danshen coat protein gene, complete cds  
Length=657  
Score = 40.1 bits (20), Expect = 0.27  
Identities = 20/20 (100%), Gaps = 0/20 (0%)  
Strand=Plus/Plus

>  gi|45331380|gb|AY560556.1| Cucumber mosaic virus isolate SG15 coat protein gene, complete cds  
Length=657  
Score = 40.1 bits (20), Expect = 0.27  
Identities = 20/20 (100%), Gaps = 0/20 (0%)  
Strand=Plus/Plus

>  gi|62177356|gb|AY871071.1| Cucumber mosaic virus isolate B23 capsid protein (CP) gene, complete cds  
Length=841  
Score = 40.1 bits (20), Expect = 0.27  
Identities = 20/20 (100%), Gaps = 0/20 (0%)  
Strand=Plus/Plus

>  gi|62177354|gb|AY871070.1| Cucumber mosaic virus isolate B13 capsid protein (CP) gene, complete cds  
Length=841  
Score = 40.1 bits (20), Expect = 0.27  
Identities = 20/20 (100%), Gaps = 0/20 (0%)  
Strand=Plus/Plus

>  gi|62177352|gb|AY871069.1| Cucumber mosaic virus isolate S337 capsid protein (CP) gene, complete cds  
Length=841  
Score = 40.1 bits (20), Expect = 0.27  
Identities = 20/20 (100%), Gaps = 0/20 (0%)  
Strand=Plus/Plus

>  gi|62177350|gb|AY871068.1| Cucumber mosaic virus isolate SH17 capsid protein (CP) gene, complete cds  
Length=841  
Score = 40.1 bits (20), Expect = 0.27  
Identities = 20/20 (100%), Gaps = 0/20 (0%)  
Strand=Plus/Plus

>  gi|46250517|emb|AJ635302.1| Cucumber mosaic virus partial cp gene for coat protein, genomic RNA  
Length=533  
Score = 40.1 bits (20), Expect = 0.27  
Identities = 20/20 (100%), Gaps = 0/20 (0%)  
Strand=Plus/Plus

>  gi|46250515|emb|AJ635301.1| Cucumber mosaic virus partial cp gene for coat protein, genomic RNA  
Length=533  
Score = 40.1 bits (20), Expect = 0.27  
Identities = 20/20 (100%), Gaps = 0/20 (0%)  
Strand=Plus/Plus

>  gi|46019642|emb|AJ634532.1| Cucumber mosaic virus segment RNA3 partial cp gene for coat protein and partial intergenic region, genomic RNA  
Length=533  
Score = 40.1 bits (20), Expect = 0.27  
Identities = 20/20 (100%), Gaps = 0/20 (0%)  
Strand=Plus/Plus

>  gi|37183419|gb|AY380812.1| Cucumber mosaic virus from Eucharis grandiflora coat protein gene, complete cds  
Length=657  
Score = 40.1 bits (20), Expect = 0.27  
Identities = 20/20 (100%), Gaps = 0/20 (0%)  
Strand=Plus/Plus

>  gi|37181255|gb|AY380533.1| Cucumber mosaic virus coat protein gene, complete cds  
Length=657  
Score = 40.1 bits (20), Expect = 0.27  
Identities = 20/20 (100%), Gaps = 0/20 (0%)  
Strand=Plus/Plus



>  gi|37181253|gb|AY380532.1| Cucumber mosaic virus coat protein gene, complete cds  
Length=657  
Score = 40.1 bits (20), Expect = 0.27  
Identities = 20/20 (100%), Gaps = 0/20 (0%)  
Strand=Plus/Plus

>  gi|34979122|gb|AY377584.1| Cucumber mosaic virus coat protein gene, complete cds  
Length=657  
Score = 40.1 bits (20), Expect = 0.27  
Identities = 20/20 (100%), Gaps = 0/20 (0%)  
Strand=Plus/Plus

>  gi|34978959|gb|AY376840.1| Cucumber mosaic virus coat protein gene, complete cds  
Length=657  
Score = 40.1 bits (20), Expect = 0.27  
Identities = 20/20 (100%), Gaps = 0/20 (0%)  
Strand=Plus/Plus

>  gi|34811731|gb|AY374328.1| Cucumber mosaic virus coat protein gene, complete cds  
Length=657  
Score = 40.1 bits (20), Expect = 0.27  
Identities = 20/20 (100%), Gaps = 0/20 (0%)  
Strand=Plus/Plus

>  gi|34811729|gb|AY374327.1| Cucumber mosaic virus coat protein gene, complete cds  
Length=657  
Score = 40.1 bits (20), Expect = 0.27  
Identities = 20/20 (100%), Gaps = 0/20 (0%)  
Strand=Plus/Plus

>  gi|23345090|gb|AY138992.1| Cucumber mosaic virus clone Q6 coat protein mRNA, complete cds  
Length=988  
Score = 40.1 bits (20), Expect = 0.27  
Identities = 20/20 (100%), Gaps = 0/20 (0%)  
Strand=Plus/Plus

>  gi|72536104|gb|DQ141675.1| Cucumber mosaic virus coat protein gene, complete cds  
Length=657  
Score = 40.1 bits (20), Expect = 0.27  
Identities = 20/20 (100%), Gaps = 0/20 (0%)  
Strand=Plus/Plus

>  gi|33590514|gb|AY345895.1| Cucumber mosaic virus isolation-source Arachis repens capsid protein gene, complete cds  
Length=657  
Score = 40.1 bits (20), Expect = 0.27  
Identities = 20/20 (100%), Gaps = 0/20 (0%)  
Strand=Plus/Plus

>  gi|32395625|gb|AY210438.1| Cucumber mosaic virus coat protein mRNA, complete cds  
Length=713  
Score = 40.1 bits (20), Expect = 0.27  
Identities = 20/20 (100%), Gaps = 0/20 (0%)  
Strand=Plus/Plus

>  gi|32328355|gb|AY125575.1| Cucumber mosaic virus coat protein gene, complete cds  
Length=770  
Score = 40.1 bits (20), Expect = 0.27  
Identities = 20/20 (100%), Gaps = 0/20 (0%)  
Strand=Plus/Plus

>  gi|22506879|gb|AF533968.1| Cucumber mosaic virus clone N6 coat protein mRNA, complete cds  
Length=987  
Score = 40.1 bits (20), Expect = 0.27  
Identities = 20/20 (100%), Gaps = 0/20 (0%)  
Strand=Plus/Plus

>  gi|91984115|gb|DQ459482.1| Cucumber mosaic virus isolate CMV-YN coat protein (cp) gene, complete cds  
Length=657  
Score = 40.1 bits (20), Expect = 0.27  
Identities = 20/20 (100%), Gaps = 0/20 (0%)  
Strand=Plus/Plus

>  gi|91984113|gb|DQ459481.1| Cucumber mosaic virus isolate CMV-HLJ coat protein (cp) gene, complete cds

Length=657

Score = 40.1 bits (20), Expect = 0.27

Identities = 20/20 (100%), Gaps = 0/20 (0%)

Strand=Plus/Plus

>  gi|71648826|gb|DQ028777.2| Cucumber mosaic virus coat protein gene, complete cds

Length=657

Score = 40.1 bits (20), Expect = 0.27

Identities = 20/20 (100%), Gaps = 0/20 (0%)

Strand=Plus/Plus

>  gi|56684564|gb|AY690621.1| Cucumber mosaic virus coat protein gene, complete cds

Length=657

Score = 40.1 bits (20), Expect = 0.27

Identities = 20/20 (100%), Gaps = 0/20 (0%)

Strand=Plus/Plus

>  gi|56684562|gb|AY690620.1| Cucumber mosaic virus coat protein gene, complete cds

Length=657

Score = 40.1 bits (20), Expect = 0.27

Identities = 20/20 (100%), Gaps = 0/20 (0%)

Strand=Plus/Plus

>  gi|89474596|gb|DQ412732.1| Cucumber mosaic virus isolate Phy segment RNA3, complete sequence

Length=2220

Score = 40.1 bits (20), Expect = 0.27

Identities = 20/20 (100%), Gaps = 0/20 (0%)

Strand=Plus/Plus

>  gi|17933277|gb|AF444252.1|AF444252 Banana mosaic virus coat protein mRNA, complete cds

Length=654

Score = 40.1 bits (20), Expect = 0.27

Identities = 20/20 (100%), Gaps = 0/20 (0%)

Strand=Plus/Plus

>  gi|14030604|gb|AF368192.1|AF368192 Cucumber mosaic virus strain Pf coat protein gene, complete cds  
Length=657  
Score = 40.1 bits (20), Expect = 0.27  
Identities = 20/20 (100%), Gaps = 0/20 (0%)  
Strand=Plus/Plus

>  gi|14028598|gb|AF268597.1|AF268597 Cucumber mosaic virus isolate PE segment RNA3, complete sequence  
Length=2216  
Score = 40.1 bits (20), Expect = 0.27  
Identities = 20/20 (100%), Gaps = 0/20 (0%)  
Strand=Plus/Plus

>  gi|13448695|gb|AF350450.1|AF350450 Cucumber mosaic virus coat protein gene, complete cds  
Length=657  
Score = 40.1 bits (20), Expect = 0.27  
Identities = 20/20 (100%), Gaps = 0/20 (0%)  
Strand=Plus/Plus

>  gi|12698657|gb|AF316362.1|AF316362 Cucumber mosaic virus Chrysanthemum boreale coat protein gene, complete cds  
Length=657  
Score = 40.1 bits (20), Expect = 0.27  
Identities = 20/20 (100%), Gaps = 0/20 (0%)  
Strand=Plus/Plus

>  gi|40738314|gb|AY429437.1| Cucumber mosaic virus segment RNA3, complete sequence  
Length=2212  
Score = 40.1 bits (20), Expect = 0.27  
Identities = 20/20 (100%), Gaps = 0/20 (0%)  
Strand=Plus/Plus

>  gi|40738301|gb|AY429432.1| Cucumber mosaic virus segment RNA3, complete sequence  
Length=2219  
Score = 40.1 bits (20), Expect = 0.27  
Identities = 20/20 (100%), Gaps = 0/20 (0%)  
Strand=Plus/Plus

>  gi|10952732|gb|AF268599.1|AF268599 Cucumber mosaic virus 3A protein and coat protein genes, complete cds  
Length=2215  
Score = 40.1 bits (20), Expect = 0.27  
Identities = 20/20 (100%), Gaps = 0/20 (0%)  
Strand=Plus/Plus

>  gi|65994009|gb|DQ018288.1| Cucumber mosaic virus isolate M coat protein gene, complete cds  
Length=895  
Score = 40.1 bits (20), Expect = 0.27  
Identities = 20/20 (100%), Gaps = 0/20 (0%)  
Strand=Plus/Plus

(Nguồn: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast/Blast.cgi>)