

PHÁT TRIỂN QUY TRÌNH MULTIPLEX RT-PCR PHÁT HIỆN *Cymbidium Mosaic virus* (*CymMV*) VÀ *Odontoglossum Ringspot virus* (*ORSV*) GÂY BỆNH TRÊN HOA LAN

Phạm Đức Toàn¹, Nguyễn Khánh Ngọc Hà¹, Bùi Cách Tuyến^{2,*}

TÓM TẮT

Virus gây hại trên hoa lan là một trong những yếu tố chính dẫn đến thiệt hại kinh tế cho người trồng lan. Việc phát triển một quy trình để phát hiện sớm các virus gây hại là cần thiết để đưa ra định hướng xử lý ngăn ngừa sự lây lan. Mục đích của nghiên cứu này là phát triển quy trình multiplex RT-PCR để phát hiện nhanh đồng thời 2 virus *CymMV* và *ORSV* gây hại trên cây hoa lan. Kết quả tối ưu hóa quy trình multiplex RT-PCR cho thấy, với 30 chu kỳ lặp lại và nhiệt độ bắt cặp *T_m* của primer là 63°C là điều kiện tối ưu nhất, cho các sản phẩm PCR có chất lượng tốt nhất. Kết quả sử dụng quy trình multiplex RT-PCR trên 30 mẫu lan đã phát hiện 20 mẫu nhiễm *CymMV*, 4 mẫu nhiễm *ORSV*, trong đó có 4 mẫu nhiễm đồng thời *CymMV* và *ORSV*. Kết quả phát hiện virus từ quy trình multiplex RT-PCR tương đồng và hoàn toàn trùng khớp với kết quả phát hiện virus từ quy trình simplex RT-PCR. Quy trình multiplex RT-PCR có thể được sử dụng để phát hiện đồng thời 2 loại virus gây hại trên cây hoa lan, giúp giảm thời gian và chi phí phân tích.

Từ khóa: Dương tính, Hoa lan, primer đặc hiệu, nhiễm virus, virus *CymMV*.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Ngành trồng hoa lan thương mại dạng cắt cành cũng như trồng chậu có lợi tức cao. Tuy vậy, virus lây nhiễm trên cây lan làm giảm sức sống, vẻ đẹp của lá và hoa dẫn đến thiệt hại kinh tế nghiêm trọng cho người trồng ở các nước trồng lan nói chung và Việt Nam nói riêng. Trong đó, *Cymbidium mosaic virus* (*CymMV*; genus *Potexvirus*), *Odontoglossum ringspot virus* (*ORSV*; genus *Tobamovirus*) là 2 loại virus gây hại phổ biến trên hầu hết các loài hoa lan [1]. *CymMV* gây ra các triệu chứng màu vàng mất diệp lục hoặc các vết đốm loét trên lá và hoa lan, hoa nhiễm bệnh bị biến dạng và màu không đẹp. *ORSV* gây ra các triệu chứng sọc hoặc khảm sọc, lốm đốm hoặc đốm tròn trên lá, trên cây bị nhiễm bệnh làm cho hoa bị đốm mất màu và màu không đồng nhất [2]. Cây lan bị nhiễm đồng thời cả 2 loại virus

thường có triệu chứng nặng, không thể phân biệt các triệu chứng riêng biệt cho từng loại virus. Tuy nhiên, có trường hợp cây bị nhiễm virus nhưng đôi khi không có triệu chứng và không thể phân biệt được với những cây lan khỏe mạnh, vì virus mới xâm nhiễm chưa gây hại nghiêm trọng [3]. Do đó, mục tiêu của nghiên cứu này là phát triển quy trình multiplex RT-PCR có thể phát hiện đồng thời cùng lúc 2 virus *CymMV* và *ORSV* gây hại trên lan, từ đó góp phần phát hiện sớm sự xâm nhiễm của virus để có các giải pháp ứng phó hiệu quả.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Tổng số 30 mẫu lan có triệu chứng nghi ngờ nhiễm bệnh virus như đốm lá, sọc lá đã được phát hiện bằng kỹ thuật simplex RT-PCR bởi nghiên cứu của Phạm Đức Toàn và cs (2022) [4] được trình bày ở bảng 1. Các mẫu dương tính với *CymMV*, *ORSV* được chọn để thực hiện xây dựng và đánh giá mức tin cậy của quy trình multiplex RT-PCR phục vụ cho công tác phát hiện đồng thời *CymMV* và *ORSV*.

¹ Khoa Khoa học Sinh học, Trường Đại học Nông Lâm thành phố Hồ Chí Minh

² Khoa Môi trường và Tài nguyên, Trường Đại học Nông Lâm thành phố Hồ Chí Minh

* Email: buicachtuyen@gmail.com

Bảng 1. Danh sách mẫu lan được sử dụng trong nghiên cứu

Số TT mẫu	Mã số mẫu	Tên mẫu	Tên tiếng Việt	Kết quả phát hiện virus bằng simplex RT-PCR [4]	
				<i>CymMV</i>	<i>ORSV</i>
1	666	<i>Cattleya</i> sp.	Cát lan	+	+
2	1000	<i>Dendrobium</i> sp.	Đắng lan	+	-
3	153	<i>Dendrobium</i> sp.	Đắng lan	+	+
4	026	<i>Coelogyne rochussenii</i>	Thanh đạm Indo	+	-
5	2199	Không tên		+	-
6	1247	<i>Cymbidium</i> sp.	Lan kiếm	+	-
7	0012/22	<i>Epidendrum</i> sp.	Lan Epi	+	-
8	1966	<i>Cymbidium</i> sp.	Lan kiếm	+	+
9	505	<i>Cymbidium dayanum</i>	Kiểm Xích ngọc	+	+
10	188	<i>Bulbophyllum</i> sp.	Lan Lọng	-	-
11	D446	<i>Dendrobium</i> sp.	Đắng lan	+	-
12	0028/22	<i>Dendrobium milixae</i>	Đắng lan	-	-
13	1327	<i>Ascocentrum miniatum</i>	Hỏa hoàng	+	-
14	663	<i>Dendrobium anosmum</i> French variety	Giả hạc Pháp	+	-
15	1018	<i>Dendrobium amethystoglossum</i>	Hoàng Thảo lưỡi tím	-	-
16	1887	<i>Dendrobium hancockii</i>	Trúc lan	-	-
17	2046	<i>Oncidium</i> sp.	Vũ nữ vàng	-	-
18	1298	<i>Bulbophyllum</i> sp.	Lan Lọng	-	-
19	1001	<i>Cattleya</i> sp.	Cát lan	+	-
20	362	<i>Coelogyne brachyptera</i>	Thanh đạm	-	-
21	252	<i>Oncidium</i> sp.	Vũ nữ vàng	+	-
22	277	<i>Coelogyne fimbriata</i>	Thanh đạm	+	-
23	2141	<i>Coelogyne</i> sp.	Thanh đạm	-	-
24	192	<i>Zygopetalum</i> sp.	Vũ nữ tím	+	-
25	1208	<i>Grammatophyllum</i> sp.	Vũ nữ Hoàng hậu	-	-
26	1139	<i>Dendrobium crumenatum</i>	Đắng lan Tuyết mai	+	-
27	1557	<i>Rhynchostylis gigantea</i>	Lan Ngọc điểm	+	-
28	1380	<i>Vandopsis</i> sp.	Lan Vanda	+	-
29	1411	<i>Dendrobium</i> sp.	Đắng lan	+	-
30	132	<i>Aerides odorata</i>	Quế lan hương	-	-

2.2. Phương pháp nghiên cứu

RNA của virus gây hại cây hoa lan được li trích bằng bộ kit RNA (Qiagen, Đức) và cDNA được tổng hợp bằng bộ kit Thermo Scientific RevertAid First Strand cDNA Synthesis. Sử dụng cặp primer 18s115-F: GCGCGAAACAAGCTTC TTATC và 18s115-R: GTAGACATCTGTGACGC GA để kiểm tra sự hiện diện của cDNA với kích thước đoạn khuếch đại là 115 bp. Cặp primer đặc hiệu CY348-F, CY348-R được sử dụng để nhận diện virus *CymMV* với kích thước đoạn khuếch đại là 348 bp và cặp primer OR275-F, OR275-R với đoạn khuếch đại là 275 bp để phát hiện *ORSV* [5]. Phản ứng multiplex RT-PCR với tổng thể tích là 12,5 μ l gồm: 1X MasterMix, 0,2 mM mỗi primer, 1 μ l cDNA và nước khử ion. Tối ưu hóa chu trình nhiệt phản ứng multiplex RT-PCR được thực hiện như sau: Biến tính ở 95°C trong 5 phút; tiếp theo là số chu kỳ được thực hiện ở các mức 25, 30, 35 chu kỳ lặp lại của biến tính ở 95°C trong 30 giây, nhiệt độ bắt cặp (T_m) được thực hiện ở 50 - 65°C với mỗi bước nhảy

là 1°C trong 30 giây, giai đoạn kéo dài ở 75°C trong 30 giây; tiếp theo là giai đoạn sau kéo dài ở 75°C trong 10 phút và cuối cùng mẫu được giữ ở nhiệt độ 4°C. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1,5% trong dung dịch đệm TBE 0,5X, điện di trong 30 phút và đọc kết quả trên máy đọc có đèn UV.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Tổng hợp cDNA và đánh giá sự đặc hiệu của các cặp primer trong phản ứng multiplex RT-PCR

Dựa trên thông tin từ kết quả các mẫu lan đã được xác định nhiễm virus [4], với các mẫu nhiễm *CymMV*, *ORSV* được lựa chọn làm vật liệu để đánh giá quy trình multiplex RT-PCR phát hiện đồng thời 2 virus này. RNA virus từ các mẫu hoa lan sau khi li trích được thực hiện phản ứng tổng hợp cDNA. Kết quả cho thấy, cDNA được tổng hợp tốt, tất cả các mẫu đều cho các đoạn khuếch đại sáng rõ trên gel agarose (Hình 1).



Hình 1. Kết quả điện di sản phẩm cDNA-PCR. M: Ladder 100 bp; 1 - 30: tương ứng 30 mẫu theo số thứ tự mẫu ở bảng 1, sản phẩm cDNA-PCR được điện di trên gel 1,5%, trong dung dịch TAE 0,5X, 30 phút ở hiệu điện thế 100 V

Cặp primer CY346-F, CY346-R dùng trong bản vẽ khả năng dùng chung, mức độ đặc hiệu và phát hiện *CymMV* và cặp primer OR257-F, OR257-R phát hiện *ORSV* được kiểm tra các đặc điểm cơ các thông số khác bằng phần mềm Bioedit.

Bảng 2. Đặc điểm cơ bản của các cặp primer dùng trong phản ứng multiplex RT-PCR

Primer	Trình tự 5' – 3'	Số Nucleotide	% GC	T_m	Virus
CY346-F	GCAGATCTTCGTGGCCAACGTCA	23	56%	69°C	<i>CymMV</i>
CY346-R	AGAGCATAGAGAGTGTGGTGGAG	24	50%		
OR257-F	GCTTGGGCTGACCCCAATTCCT	23	56%	68°C	<i>ORSV</i>
OR257-R	GGATTCTGCGGATTTTCTACCTCG	24	50%		

Từ kết quả phân tích cho thấy, các thông số đã đáp ứng đủ các yêu cầu của một cặp primer hoạt động hiệu quả trong phản ứng multiplex RT-PCR, với nhiệt độ bắt cặp của 2 cặp primer không khác biệt nhau nhiều, chỉ 1°C (Bảng 2); số nucleotide của primer tối ưu trong phản ứng multiplex RT-PCR khoảng 10 - 25 (CY346 (R/F), OR275 (R/F) có trình tự primer 23 - 24 nucleotide) và %GC mỗi primer ở 20 - 80% (CY346 (R/F), OR275 (R/F) có %GC từ 50 - 56%). Các cặp primer một lần nữa được

kiểm tra mức độ đặc hiệu bằng công cụ BLAST của Trung tâm Thông tin Công nghệ sinh học Quốc gia Hoa Kỳ (National Center for Biotechnology Information - NCBI) [6]. Chương trình này dò tìm trên cơ sở dữ liệu của các Ngân hàng gen để tìm ra tất cả các vùng trình tự có trình tự tương đồng với kích thước đoạn khuếch đại bởi các cặp primer này. Kết quả BLAST, tham chiếu ở 3 trình tự có độ bao phủ cao nhất cho thấy, các cặp primer có độ đặc hiệu và bao phủ cao 100% (Bảng 3).

Bảng 3. Kết quả phân tích BLAST của 2 cặp primer CY346 (R/F) và OR257 (R/F) dùng để phát hiện *CymMV* và *ORSV* trên ngân hàng dữ liệu NCBI

Primer	Tên trình tự	Tỉ lệ bao phủ (%)	Virus	Mẫu phân lập
CY348 (F/R)	MN057672.1	100	<i>Cymbidium mosaic virus (strain Singapore)</i>	<i>Cymbidium mosaic virus isolate Phal-GP coat protein gene, complete cds</i>
	MK816927.1	100	<i>Cymbidium mosaic virus (strain Singapore)</i>	<i>Cymbidium mosaic virus isolate Malaysia, complete genome</i>
	MG821322.1	100	<i>Cymbidium mosaic virus (strain Singapore)</i>	<i>Cymbidium mosaic virus isolate CymMV: CP: Phalaenopsis coat protein (CP) gene, complete cds</i>
OR257 (F/R)	MN057680.1	100	<i>Odontoglossum ringspot virus (isolate Japan)</i>	<i>Odontoglossum ringspot virus isolate Reichb-GG coat protein gene, complete cds</i>
	MN057679.1	100	<i>Odontoglossum ringspot virus (isolate Korean Cy)</i>	<i>Odontoglossum ringspot virus isolate Phal-GP coat protein gene, complete cds</i>
	MN027919.1	100	<i>Odontoglossum ringspot virus (isolate Singapore 1)</i>	<i>Odontoglossum ringspot virus isolate Sikkim clone 3 coat protein (CP) mRNA, complete cds</i>

Kết quả BLAST phân tích các cặp primer CY348 (F/R), OR257 (F/R) từ ngân hàng dữ liệu NCBI cho thấy, các cặp primer này hoàn toàn đặc hiệu và phù hợp dùng cho phản ứng multiplex RT-PCR trong việc phát hiện cùng lúc *CymMV* và *ORSV* gây hại trên cây hoa lan.

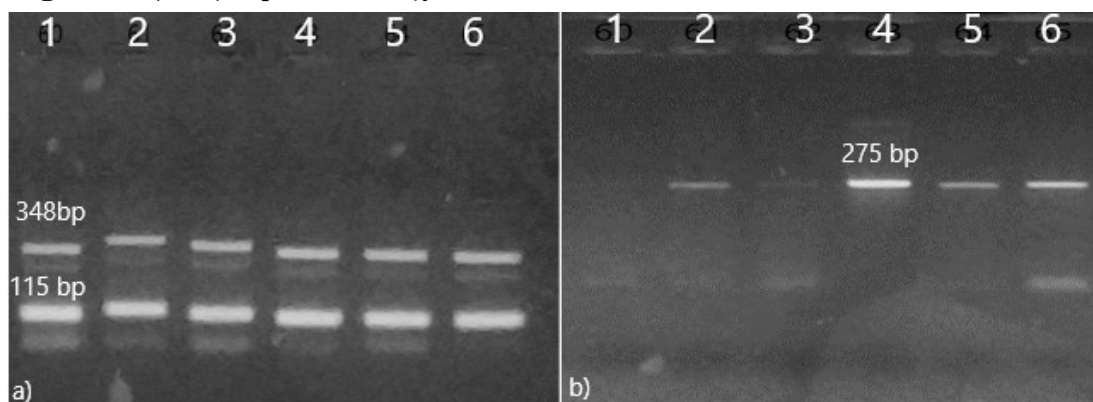
3.2. Khảo sát lựa chọn mức nhiệt độ T_m tối ưu

Mẫu bệnh với kết quả dương tính *CymMV* và *ORSV* đã thực hiện từ quy trình simplex RT-PCR

[4] được dùng làm vật liệu để tối ưu nhiệt độ bắt cặp của primer trong quy trình multiplex RT-PCR. Vì vậy, để xây dựng một quy trình multiplex RT-PCR phát hiện đồng thời cùng lúc 2 virus tin cậy hiệu quả thì cần phải tiến hành khảo sát khả năng khuếch đại của các cặp primer ở các mức nhiệt độ bắt cặp (T_m) khác nhau với các mức nhiệt độ T_m dao động từ 60 - 65°C được khảo sát trên cùng 1 mẫu bệnh dương tính với *CymMV* và *ORSV* (Hình 2). Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Ali và

cs (2014) [3], theo đó nhiệt độ bắt cặp (T_m) của các primer là không hoàn toàn giống nhau, do vậy để phản ứng PCR đạt hiệu quả và tin cậy thì cần

thiết phải tối ưu lựa chọn nhiệt độ bắt cặp T_m thích hợp.

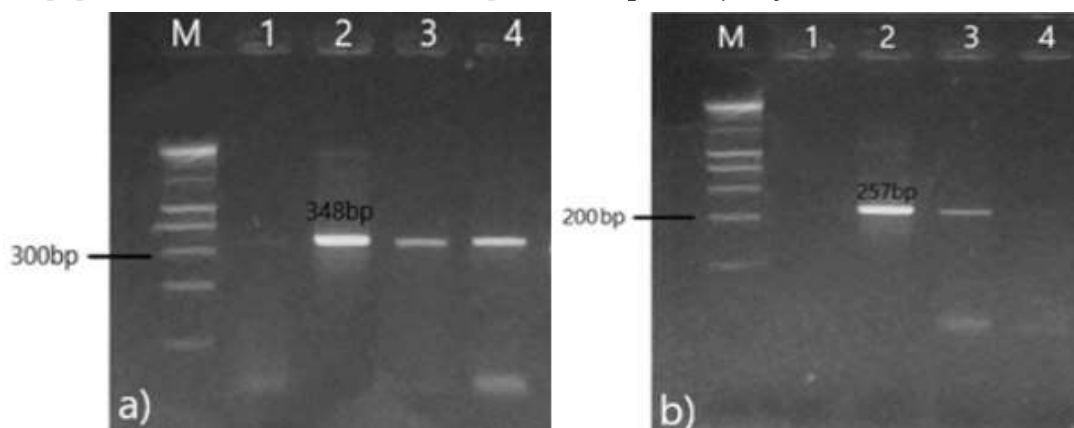


Hình 2. Sản phẩm RT-PCR với 6 mức nhiệt độ bắt cặp (T_m) của primer. a) Kết quả khuếch đại với cặp primer CY348 (R/F) phát hiện *CymMV* với kích thước 348 bp và cặp primer 18S115 (R/F) kích thước khuếch đại 115 bp dùng để kiểm tra cDNA - internal control; b) Kết quả khuếch đại với cặp primer OR257 (R/F) phát hiện *ORSV* có kích thước khuếch đại 275 bp; mẫu số 1 - 6: sản phẩm PCR lần lượt của 6 mức nhiệt độ T_m từ 60 - 65°C, sản phẩm PCR được điện di trên gel 1,5%, trong dung dịch TBE 0,5X, 30 phút ở hiệu điện thế 100 V

Với kết quả điện di sản phẩm PCR từ các mức nhiệt độ T_m có thể nhận thấy, ở các mức nhiệt độ bắt cặp khác nhau của các cặp primer đặc hiệu cho kết quả sản phẩm đoạn khuếch đại có độ sáng rõ khác nhau (Hình 2a). Trong đó, cặp primer CY348 (R/F) cho kết quả đoạn khuếch đại dương tính với virus *CymMV* ở tất cả các mức nhiệt độ từ 60 - 65°C, còn cặp primer OR275 (R/F) cho kết quả

đoạn khuếch đại dương tính ở 4 mức nhiệt độ có band rõ, trong đó rõ đẹp nhất ở 63°C (Hình 2b). Từ kết quả đạt được, chọn mức nhiệt độ 63°C là nhiệt độ bắt cặp (T_m) tối ưu dùng trong phản ứng multiplex RT-PCR để phát hiện virus *CymMV* và *ORSV* gây hại trên cây hoa lan.

3.3. Khảo sát số chu kỳ tối ưu trong phản ứng PCR phát hiện *CymMV* và *ORSV*



Hình 3. Kết quả điện di sản phẩm PCR của 4 mức chu kỳ lặp lại. M: Ladder 100 bp Bioline; a) PCR với cặp primer CY348 (R/F); b) PCR với cặp primer OR257 (R/F); 1: 25 chu kỳ; 2: 30 chu kỳ; 3: 35 chu kỳ; 4: 40 chu kỳ, được điện di trên gel 1,5%, trong dung dịch TBE 0,5X, 30 phút ở hiệu điện thế 100 V

Kết quả điện di cho thấy, cả 2 cặp primer CY348 (R/F) và OR275 (R/F) đều cho kết quả tốt, đoạn khuếch đại rõ sáng nhất ở 30 chu kỳ khuếch đại (Hình 3). Do đó, kết quả khảo sát tối ưu lựa chọn số chu kỳ cho phản ứng PCR là 30 chu kỳ.

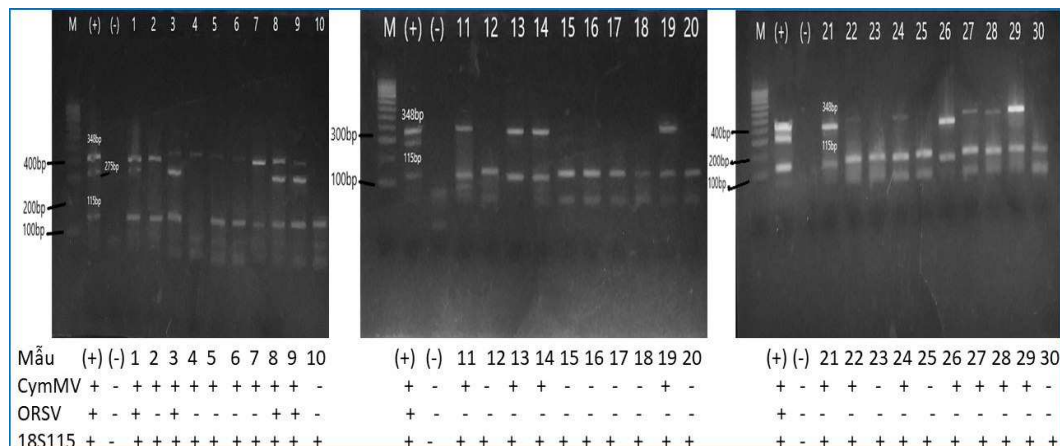
Quy trình multiplex RT-PCR được hoàn thiện để phát hiện đồng thời 2 virus *CymMV* và *ORSV* trong cùng một phản ứng PCR như sau: Biến tính ở 95°C trong 5 phút; tiếp theo là 30 chu kỳ lặp lại của biến tính ở 95°C trong 30 giây, nhiệt độ bắt cặp 63°C trong

thời gian 30 giây, giai đoạn kéo dài ở 75°C trong 30 giây; tiếp theo là giai đoạn sau kéo dài ở 75°C trong 10 phút và cuối cùng mẫu được lưu giữ ở nhiệt độ 4°C.

3.4. Áp dụng quy trình multiplex RT-PCR để kiểm tra các mẫu lan và đánh giá khả năng tin cậy của quy trình

Sử dụng quy trình multiplex RT-PCR đã được hoàn thiện, tiến hành kiểm tra đồng thời *ORSV* và *CymMV* trên 30 mẫu lá lan đã được phát hiện virus

bằng phương pháp simplex RT-PCR [4]. Mẫu được thực hiện phản ứng multiplex RT-PCR với cùng lúc 3 cặp primer gồm: 18s115 (R/F) nhận dạng cDNA của mẫu (đối chứng nội - internal control), CY348 (R/F) nhận dạng *CymMV* và OR257 (R/F) để phát hiện *ORSV*, kết quả sản phẩm PCR được đọc bằng phương pháp điện di trên agarose 1,5%. Kết quả điện di đoạn khuếch đại từ phản ứng multiplex RT-PCR phát hiện đồng thời *CymMV* và *ORSV* được thể hiện ở hình 4.



Hình 4. Kết quả điện di sản phẩm multiplex RT-PCR. M: Ladder 100 bp Bioline; (+): đối chứng dương; (-): đối chứng âm; 1 - 30: 30 mẫu lan theo số thứ tự mẫu (Bảng 1). Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1,5%, trong dung dịch TBE 0,5X, 30 phút ở hiệu điện thế 100 V

Bảng 4. Kết quả phát hiện virus trên 30 mẫu lan bằng multiplex RT-PCR và so sánh với kết quả phát hiện virus từ simplex RT-PCR

Số TT mẫu	Mã số mẫu	Kết quả phát hiện virus bằng simplex RT-PCR [4]		Kết quả phát hiện virus bằng multiplex RT-PCR (Hình 4)	
		<i>CymMV</i>	<i>ORSV</i>	<i>CymMV</i>	<i>ORSV</i>
1	666	+	+	+	+
2	1000	+	-	+	-
3	153	+	+	+	+
4	026	+	-	+	-
5	2199	+	-	+	-
6	1247	+	-	+	-
7	0012/22	+	-	+	-
8	1966	+	+	+	+
9	505	+	+	+	+
10	188	-	-	-	-
11	D446	+	-	+	-
12	0028/22	-	-	-	-

13	1327	+	-	+	-
14	663	+	-	+	-
15	1018	-	-	-	-
16	1887	-	-	-	-
17	2046	-	-	-	-
18	1298	-	-	-	-
19	1001	+	-	+	-
20	362	-	-	-	-
21	252	+	-	+	-
22	277	+	-	+	-
23	2141	-	-	-	-
24	192	+	-	+	-
25	1208	-	-	-	-
26	1139	+	-	+	-
27	1557	+	-	+	-
28	1380	+	-	+	-
29	1411	+	-	+	-
30	132	-	-	-	-

Ghi chú: (+): Dương tính; (-): Âm tính

Kết quả nghiên cứu cho thấy, có tổng số 20 mẫu nhiễm *CymMV* và 4 mẫu nhiễm *ORSV* trong tổng số 30 mẫu được phân tích bằng quy trình multiplex RT-PCR. Trong đó, có 4 mẫu nhiễm đồng thời cả 2 đối tượng virus *CymMV* và *ORSV* là các mẫu số 1, số 3, số 8, số 9 (Hình 4). Khi đối chiếu với kết quả phân tích virus từ quy trình simplex RT-PCR [4] thì kết quả phát hiện từ quy trình multiplex RT-PCR có kết quả tương tự, hoàn toàn trùng khớp về kết quả mẫu dương tính. Theo đó, kết quả simplex RT-PCR được báo cáo tổng số 30 mẫu có sự hiện diện của *CymMV* là 20/30 (chiếm 66,7%), trong đó giống *Dendrobium* là giống nhiễm *CymMV* nhiều nhất, *ORSV* là 4/30 (chiếm 13,3%). Tỷ lệ nhiễm *CymMV* trên các mẫu khá cao trên tổng số mẫu thu được. Kết quả nghiên cứu này đã khẳng định và chứng minh việc phát triển quy trình multiplex RT-PCR thành công trong phát hiện đồng thời virus *CymMV* và *ORSV* gây hại trên cây hoa lan. Multiplex RT-PCR giúp khả năng phát hiện đồng thời cùng lúc 2 hoặc

nhiều virus lây nhiễm trên cây hoa lan với các mức độ triệu chứng gây hại nặng, rõ ràng hoặc mới lây nhiễm chưa biểu hiện triệu chứng [3, 5, 7], đôi khi kết quả khuếch đại đoạn band hơi mờ có thể là do hàm lượng virus trong mẫu thấp [5, 8].

4. KẾT LUẬN

Kết quả phát hiện virus thu nhận được từ quy trình multiplex RT-PCR phù hợp, tương đồng và hoàn toàn trùng khớp với kết quả phát hiện virus trên cùng 30 mẫu từ quy trình simplex RT-PCR. Kết quả này cho thấy, quy trình multiplex RT-PCR thành công trong phát hiện cùng lúc 2 virus *CymMV* và *ORSV* gây hại trên cây hoa lan với chu kỳ cho phản ứng PCR là 30, nhiệt độ bắt cặp *T_m* của primer là 63°C. Kết quả nghiên cứu này là một trong những thông tin hữu ích ứng dụng trong việc phát hiện virus gây hại trên cây hoa lan, đặc biệt là phát hiện đồng thời các virus khác nhau, giúp tiết kiệm thời gian, giảm chi phí phân tích và có thể phát hiện sớm sự lây nhiễm của virus gây hại.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Gibbs A, Mackenzie A, Blanchfield A, Cross P, Wilson C, Kitajima E, Nightingale M, Clements M (2000). *Viruses of Orchids in Australia; their identification, biology and control*. Aust Orch Rev, 65: 10 - 21.
2. Yamane K, Oyama K, Iuchi E, Ogawa H, Suzuki T, Natsuaki T (2008). *RT-PCR detection of Odontoglossum ringspot virus, Cymbidium mosaic virus and Tospoviruses and association of infections with leaf-yellowing symptoms in phalaenopsis*. J Phytopathol, 156: 268 - 273.
3. Ali, R. N., Dann, A. L., Cross, P. A., & Wilson, C. R. (2014). *Multiplex RT-PCR detection of three common viruses infecting orchids*. Archives of virology, 159, 3095 - 3099.
4. Phạm Đức Toàn, Nguyễn Khánh Ngọc Hà, Bùi Cách Tuyến (2022). Phát hiện *Cymbidium Mosaic virus (CymMV)* và *Odontoglossum Ringspot virus (ORSV)* gây bệnh trên hoa lan bằng kỹ thuật PCR. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*, 10 (2): 31 - 38.
5. Su Min Kim, Sun Hee Choi (2015). *Simultaneous detection of Cymbidium mosaic virus and Odontoglossum ringspot virus in orchids using multiplex RT-PCR*. Virus Genes 51: 417 - 422 DOI 10.1007/s11262-015-1258-x.
6. The National Center for Biotechnology Information (NCBI). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>, truy cập ngày 3 tháng 10 năm 2022.
7. Yamane K, Oyama K, Iuchi E, Ogawa H, Suzuki T and Natsuaki T. (2008). *RT-PCR Detection of Odontoglossum ringspot virus, Cymbidium mosaic virus and Tospoviruses and Association of Infections with Leaf - Yellowing symptoms in Phalaenopsis*. Journal of Phytopathology, 156: 268 - 273.
8. Sue Bottom (2014). *Orchid Pests and Diseases Diagnosis, Treatment and Prevention*. American Orchid Society.

DEVELOPMENT OF MULTIPLEX RT-PCR FOR DETECTION OF *Cymbidium Mosaic virus (CymMV)* AND *Odontoglossum Ringspot virus (ORSV)* IN ORCHIDS

Pham Duc Toan¹, Nguyen Ngoc Khanh Ha¹, Bui Cach Tuyen²

¹Faculty of Biological Science - Nong Lam University - Ho Chi Minh city

²Faculty of Environment & Natural Resources - Nong Lam University - Ho Chi Minh city

Summary

Orchid viruses are one of the important problems causing economic loss to orchid growers. Developing a protocol for early identification of orchid viruses is needed. This study aimed to develop a multiplex RT-PCR protocol for rapid and simultaneous detection of *CymMV* and *ORSV*. Optimization of the multiplex RT-PCR showed robust amplification with the PCR assay with 30 cycles and an annealing temperature (T_m) of 63°C. Using multiplex RT-PCR on 30 orchid samples showed that 20 were positive for *CymMV*, four were positive for *ORSV*, and four were simultaneously infected with *CymMV* and *ORSV*. The multiplex RT-PCR could detect two viruses in orchids, reducing time and costs for analysis.

Keywords: Positive, orchid, specific primer, virus infection, *CymMV*.

Người phản biện: PGS.TS. Trịnh Xuân Hoạt

Ngày nhận bài: 20/11/2023

Ngày thông qua phản biện: 15/12/2023

Ngày duyệt đăng: 25/12/2023