

PHÁT TRIỂN KỸ THUẬT CHẨN ĐOÁN Rice yellow stunt virus GÂY BỆNH VÀNG LỤI LÚA BẰNG KHÁNG HUYẾT THANH THỎ ĐẶC HIỆU PROTEIN N

Hà Viêt Cường, Nguyễn Quang Bằng, Lê Thị Tuyết,
Trần Nguyễn Hà, Nguyễn Đức Huy, Đỗ Tấn Dũng

Khoa Nông học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam
Tác giả liên hệ: hvcuongnh@vnua.edu.vn; 0978056254

ABSTRACT

Development of diagnostic techniques for Rice yellow stunt virus using rabbit antiserum specific to the protein N

The major aim of this work is to develop antibody-based techniques for detection of Rice yellow stunt (RYSV) in rice plant. Using previously produced antiserum that was raised in rabbit immunized with the N protein of RYSV, technical factors of the Plate Trapped Antigen Enzyme Linked Immunosorbent Assay (PTA-ELISA), Dot-Immunobinding Assay (DIBA) and Tissue-Print Immunoassay (TPIA) were evaluated. The experimental results showed that: (i) the suitable antiserum dilution is 1/1000; (ii) the suitable tissues are stem, followed by leaf; (iii) the dried tissues stored at least 2 years can be used in PTA-ELISA; (iv) PTA-ELISA can detect virus from tissue pieces incubated directly in wells; (v) the membranes suitable for DIBA are Nitrocellulose (NC) and Nylon; (vi) DIBA can be done with membrane blocked for 15 minutes, incubated with the antiserum and secondary antibody for 45 minutes each; and (vii) all three assays, PTA-ELISA, DIBA and TPIA, can be used to detect specifically RYSV in rice plant.

Keywords: Rice yellow stunt virus, DIBA, TPIA, ELISA, rice, Vietnam.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Vàng lụi (hay còn gọi vàng lá di động) là bệnh virus hại lúa khắp cả nước, đặc biệt là vụ mùa ở các tỉnh miền Bắc và miền Trung Việt Nam (Hà Viêt Cường *et al.*, 2010; Ta *et al.*, 2012).

Virus gây bệnh vàng lụi là Rice yellow stunt virus (RYSV), có tên cũ là Rice transitory yellowing virus (RTYV).

RYSV là thành viên của chi Nucleorhabdovirus, họ Rhabdoviridae, bộ Mononegavirales (Walker *et al.*, 2018). RYSV có bộ gen RNA, sợi đơn, không phân mảnh, cực âm, kích thước ~ 14 kb, thuộc nhóm gây hại ở bó mạch phloem, lan truyền theo kiểu bền vững tái sinh (virus nhân lên trong vector) bằng 3 loài rầy xanh đuôi đen là *Nephotettix nigropictus*, *N. cincticeps* và *N. virescens*

Người phản biện: GS.TS. Vũ Triệu Mân.

nhưng không truyền qua trứng rầy (Inoue, 1978; Jackson *et al.*, 2005).

Chẩn đoán bệnh vàng lụi dựa vào triệu chứng dễ gây nhầm lẫn vì triệu chứng điển hình của cây bệnh là “biến vàng”, một triệu chứng có thể do cả yếu tố sinh vật và phi sinh vật gây ra. Hơn nữa sự phát triển của dịch bệnh virus trên lúa nói chung và bệnh vàng lụi nói riêng phụ thuộc chủ yếu vào mật độ rầy mang virus (Ou, 1985; Hibino, 1996). Do vậy, việc chẩn đoán sớm và chính xác virus gây bệnh cả trên cây và rầy có ý nghĩa quan trọng trong việc áp dụng hiệu quả các biện pháp phòng chống.

Các kỹ thuật dựa trên kháng thể như thử nghiệm miễn dịch liên kết enzyme (Enzyme Linked Immunosorbent Assay, ELISA), chấm thấm miễn dịch (Dot-Immunobinding Assay, DIBA) và thấm mô miễn dịch (Tissue-Print Immunoassay, TPIA) hiện vẫn được sử dụng phổ biến để chẩn đoán virus thực vật (Lima *et al.*, 2012; Abd El-Aziz, 2019). Gần đây, chúng tôi đã tạo được kháng thể đa dòng thô dùng kháng nguyên là protein N tái tổ hợp của RYSV được biểu hiện trong vi khuẩn *Escheria coli* và đã chứng tỏ kháng thể rất đặc hiệu, có thể phát hiện dễ dàng RYSV trong rầy xanh đuôi đen bằng kỹ thuật PTA-ELISA (Ha *et al.*, 2019).

Trong nghiên cứu này, chúng tôi ứng dụng kháng huyết thanh đa dòng sẵn có đánh giá các yếu tố kỹ thuật để chẩn đoán RYSV bằng các thử nghiệm miễn dịch

gồm PTA-ELISA, DIBA và TPIA. ELISA được phát triển đầu tiên bởi Clark & Adams (1977) và hiện là thử nghiệm miễn dịch phổ biến nhất trong chẩn đoán virus. ELISA có nhiều biến thể, trong đó có kiểu bẫy kháng nguyên trước (Plate Trapped Antigen - ELISA, PTA-ELISA). DIBA được áp dụng đầu tiên để phát hiện Tobacco mosaic virus (TMV) bởi Hibi & Saito (1985) và tiếp theo được áp dụng rộng rãi để chẩn đoán nhiều virus thực vật khác do nhanh, đơn giản, rẻ và nhạy hơn so với ELISA (Abd El-Aziz, 2019). DIBA có cơ chế tương tự như ELISA nhưng các loại màng như Polyvinylidene difluoride (PVDF), Nitrocellulose (NC) và Nylon được sử dụng thay vì bản nhựa ELISA và sản phẩm của phản ứng enzyme ở dạng kết tủa thay vì ở dạng hòa tan. TIBA là một biến thể của DIBA trong đó mô cây được ép trực tiếp lên màng thay vì cố định dịch nghiền cây (Abd El-Aziz, 2019).

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Mẫu cây bệnh

Mẫu cây bệnh vàng lụi thu thập tại Bắc Lý - Bắc Giang, Cẩm Xuyên - Hà Tĩnh. Các mẫu được làm khô bằng silicagel tự chỉ thị và bảo quản ở nhiệt độ phòng hoặc -20°C. Mẫu cây bệnh cũng được trồng duy trì cho tới khi thí nghiệm. Các mẫu cây khỏe là các mẫu cây trồng từ hạt trong nhà lưới vì RYSV không truyền qua hạt giống.

2.2. Kháng huyết thanh

Kháng huyết thanh (KHT) thử được gây miễn dịch với protein N của RYSV sẵn có như mô tả bởi Ha *et al.* (2019).

2.3. Màng

Ba loại màng được sử dụng là Nitrocellulose (lỗ màng 0,45 μm , Sigma), PVDF (lỗ màng 0,45 μm , Sigma) và Nylon tích điện dương (lỗ màng 0,45 μm , Roche). Màng PVDF được hoạt hóa bằng ethanol 100 % trong 1 phút, rửa lại bằng đệm carbonate trước khi thí nghiệm.

2.4. Thử nghiệm chấm thấm miễn dịch DIBA

Màng được cắt thành các mảnh 4×28 mm tương đương 7 ô vuông. Các bước ủ màng (khóa màng, ủ với KHT và ủ với kháng thể thứ cấp) được thực hiện trong ống Eppendorf loại 2 mL với thể tích mỗi loại dịch 500 μL . Phản ứng DIBA được thực hiện trong điều kiện chuẩn như sau. Mô lá được nghiền với đệm Carbonate (Na_2CO_3 15mM, NaHCO_3 35mM, pH 9,6) theo tỉ lệ 1:10 (khối lượng/thể tích). Dịch cây được ly tâm để kết tủa tàn dư. Dịch được nhỏ lên màng với lượng 1 μL /chấm. Màng được khóa với skim milk 5% được chuẩn bị trong đệm TBS (Tris 150 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5) trong một 1 giờ ở 37°C. Màng được rửa 3 lần với đệm TBS-T (TBS chứa Tween 20 0,05%). Màng được ủ 1 giờ ở 37°C với KHT (được hòa trong đệm kháng thể (TBS-T chứa Polyvinylpyrrolidone 2% và skim milk 3%)) và được rửa 3 lần với đệm TBS-T. Màng được ủ 1 giờ ở 37°C

với kháng thể đơn dòng chuột liên kết Alkaline Phosphatase (AP) đặc hiệu kháng thể thử (A2556, Sigma) (được hòa trong đệm kháng thể theo tỉ lệ 1/35000). Màng được rửa 3 lần với đệm TBS-T. Phản ứng được phát hiện bằng dịch cơ chất 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate (BCIP)/nitro blue tetrazolium (NBT) (S3841, Promega).

2.5. Thử nghiệm thấm mô miễn dịch TPIA

Phản ứng TPIA được thực hiện trên màng NC với các bước tương tự như DIBA ngoại trừ ở bước cố định mẫu, gốc thân cây lúa tươi được cắt ngang bằng dao mổ và đầu vết cắt được ép trực tiếp lên màng.

2.6. Thử nghiệm ELISA bẫy kháng nguyên trước PTA-ELISA

Thử nghiệm PTA-ELISA trong điều kiện chuẩn được thực hiện như sau. Mô lá được nghiền với đệm Carbonate theo tỉ lệ 1/10 (khối lượng/thể tích). Dịch cây được nhỏ vào giếng với lượng 100 μL /giếng. Bản ELISA được ủ qua đêm ở 4°C và được rửa 3 lần với đệm PBS-T (Na_2HPO_4 8 mM, NaCl 150 mM, KH_2PO_4 2 mM, KCl 3 mM, Tween 20 0,05%, pH 7,4). KHT được hòa trong đệm kháng thể (đệm PBS-T chứa PVP 2%, ovalbumin 0,2%) và được nhỏ vào giếng với lượng 100 μL /giếng. Bản ELISA được ủ 4 giờ ở 37°C và được rửa 3 lần với đệm PBS-T. Kháng thể đơn dòng chuột liên kết AP đặc hiệu kháng thể thử (A2556, Sigma) được hòa trong

đệm kháng thể theo tỉ lệ 1/5000 và được cho vào giếng với lượng 100 μ l/giếng. Bản ELISA được ủ 4 giờ ở 37°C và được rửa 5 lần với đệm PBS-T. Dịch cơ chất p-nitrophenyl phosphate (SIGMAFAST, Sigma) được cố định vào giếng với lượng 100 μ l/giếng. Bản ELISA được ủ 1 giờ ở 25°C trong tối. Phản ứng được đo bằng máy đọc ELISA ở bước sóng 405 nm.

2.6. Thống kê

Các thống kê t-test và ANOVA một nhân tố được thực hiện bằng phần mềm SPSS ver.20.

III. KẾT QUẢ

3.1 Thử nghiệm PTA-ELISA

3.1.1. Đánh giá độ hòa loãng kháng huyết thanh và dịch cây trong phản ứng PTA-ELISA

Nhằm xác định độ nhạy của KHT, phản ứng PTA-ELISA đã được thực hiện với 6 độ hòa loãng KHT từ 1/200 đến 1/10000 trên các mẫu lúa bị bệnh vàng lụi và mẫu lúa khỏe được nghiền trong đệm carbonate với 3 độ hòa loãng 1/10, 1/20 và 1/30. Kết quả thí nghiệm (Bảng 1) cho thấy ở độ hòa loãng 1/10000, KHT vẫn có thể phát hiện RYSV trong mẫu cây bệnh được nghiền ở độ hòa loãng 1/30.

Bảng 1. PTA-ELISA đánh giá độ hòa loãng kháng huyết thanh và dịch cây

Độ hòa loãng kháng huyết thanh	Giá trị OD (405 nm) sau 1 giờ					
	Độ hòa loãng dịch cây (khối lượng/thể tích)					
	1/10		1/20		1/30	
	Bệnh	Khỏe	Bệnh	Khỏe	Bệnh	Khỏe
1/200	1,938 \pm 0,171	0,178 \pm 0,010	1,819 \pm 0,144	0,179 \pm 0,002	1,875 \pm 0,171	0,182 \pm 0,021
1/500	1,325 \pm 0,153	0,130 \pm 0,007	1,307 \pm 0,135	0,151 \pm 0,020	1,258 \pm 0,127	0,186 \pm 0,097
1/1000	1,127 \pm 0,189	0,128 \pm 0,019	1,101 \pm 0,195	0,136 \pm 0,016	1,041 \pm 0,175	0,143 \pm 0,020
1/2000	0,961 \pm 0,144	0,144 \pm 0,018	0,957 \pm 0,166	0,108 \pm 0,008	0,928 \pm 0,164	0,122 \pm 0,008
1/5000	0,767 \pm 0,154	0,169 \pm 0,008	0,663 \pm 0,121	0,164 \pm 0,005	0,647 \pm 0,081	0,158 \pm 0,018
1/10000	0,408 \pm 0,008	0,147 \pm 0,025	0,442 \pm 0,155	0,138 \pm 0,038	0,421 \pm 0,123	0,150 \pm 0,017

Ghi chú: Giá trị OD trung bình của 3 mẫu \pm độ lệch chuẩn.

3.1.2. Ảnh hưởng của loại mô lúa và cách chuẩn bị mẫu đến phản ứng PTA-ELISA

Để xác định loại mô lúa và phương pháp xử lý mẫu phù hợp, 4 loại mô (lá, bẹ lá, thân rễ) của cây lúa nhiễm bệnh

vàng lụi đã được kiểm tra dùng 2 phương pháp xử lý mẫu là nghiền mẫu và cắt mẫu. Đối với đánh giá phương pháp xử lý mẫu, cùng một mảnh mô được chia đôi, một nửa được nghiền trong đệm carbonate trước khi cố định

vào giếng như mô tả trong phương pháp chuẩn, nửa còn lại được cắt thành các mảnh nhỏ theo chiều ngang của mô với độ dày ~ 0,5 mm và cho vào giếng trước khi cho đệm. Kết quả kiểm tra ELISA được trình bày ở Bảng 2.

Về loại mô: Dựa trên giá trị OD của các mẫu được xử lý theo phương pháp nghiền mẫu trong đệm, hàm lượng virus trong mô thân là cao nhất (OD = 1,081), tiếp theo là mô lá (OD = 0,606), thấp hơn nhiều ở mô bẹ (OD = 0,360) và thấp nhất ở mô rễ (OD = 0,137). Xử lý các mẫu mô theo phương pháp cắt cũng cho kết quả tương tự với giá trị OD lần lượt là 0,745, 0,425, 0,276 và 0,164. Tuy nhiên, kết quả của cả 2 phương pháp xử lý cũng cho thấy mô lá có giá trị OD ổn định hơn so với mô thân. Hệ số biến động của giá trị OD của mô lá là 20,3% (xử lý bằng nghiền) và 44,4% (xử lý bằng cắt), trong

khi giá trị tương ứng của mô thân là 44,5% và 77,1%.

Về phương pháp xử lý mẫu: Kết quả so sánh giá trị OD cho thấy tất cả các loại mô được xử lý theo phương pháp nghiền trong đệm đều cho giá trị OD trung bình cao hơn so với phương pháp cắt. Phân tích thống kê t-test cho thấy giá trị OD trung bình của mô thân không khác nhau có ý nghĩa giữa 2 phương pháp ($P = 0,109$). Mặc dù giá trị OD trung bình của mô lá bệnh khác nhau có ý nghĩa giữa 2 phương pháp ($P = 0,00198$) nhưng ở phương pháp xử lý mẫu bằng cắt mô, giá trị OD của cây bệnh vẫn lớn hơn nhiều so với giá trị OD trung bình của mô lá cây khỏe; và giá trị OD thấp nhất của mẫu cây bệnh (= 0,214) vẫn lớn hơn giá trị ngưỡng (= OD trung bình + 2 độ lệch chuẩn của mẫu cây khỏe = 0,172).

Bảng 2. PTA-ELISA phát hiện RYSV trong các loại mô lúa được chuẩn bị bằng hai phương pháp

Loại mô	Số mẫu	Giá trị OD (405 nm) sau 1 giờ							
		Cắt mô				Nghiền mô			
		Trung bình	SD	Max	Min	Trung bình	SD	Max	Min
Lá cây bệnh	18	0,425	0,189	0,975	0,214	0,606	0,123	0,757	0,401
Bẹ lá cây bệnh	18	0,276	0,344	1,230	0,120	0,360	0,374	1,185	0,157
Thân cây bệnh	9	0,745	0,575	1,465	0,228	1,081	0,481	1,546	0,453
Rễ cây bệnh	9	0,164	0,079	0,361	0,123	0,137	0,006	0,147	0,13
Lá cây khỏe (Đ/C)	3	0,148	0,024	0,176	0,131	0,123	0,004	0,128	0,120

Kiểm định t-test:

Giá trị OD của mô lá giữa 2 phương pháp: $P = 0,00198$

Giá trị OD của mô thân giữa 2 phương pháp: $P = 0,109$

Ghi chú: Độ hòa loãng dịch cây: 1/10 (khối lượng/thể tích). Độ hòa loãng kháng huyết thanh: 1/1000.

3.1.3. Ảnh hưởng của điều kiện bảo quản mẫu đến phản ứng PTA-ELISA

Trong thí nghiệm này, các mẫu lúa bị bệnh được bảo quản ở 7 điều kiện khác nhau đã được sử dụng để kiểm tra PTA-ELISA (Bảng 3). Dựa trên phân tích thống kê giá trị OD, các mẫu có thể được chia là 3 nhóm. Nhóm 1 cho giá trị OD cao nhất (> 1,2) gồm các mẫu bệnh tươi được phân tích ngay sau khi thu

thập và các mẫu khô bảo quản ở -20°C từ 1 đến 2 năm. Nhóm 2 có giá trị OD trung bình ~ 1 gồm các mẫu khô bảo quản 1 năm ở nhiệt độ phòng và các mẫu tươi bảo quản mát trong tủ lạnh 3 và 7 ngày trước khi thử. Nhóm mẫu cuối cùng là mẫu khô bảo quản 2 năm ở nhiệt độ phòng với giá trị OD trung bình vẫn khá cao (0,908).

Bảng 3. PTA-ELISA phát hiện RYSV trong mô lá bệnh được bảo quản ở các điều kiện khác nhau

Công thức	Điều kiện bảo quản	Giá trị OD (405 nm) sau 1 giờ			
		Trung bình	SD	Max	Min
CT1	Lá bệnh khô (2 năm, -20°C)	1,239 ^{abc}	0,093	1,378	1,076
CT2	Lá bệnh khô (2 năm, nhiệt độ phòng)	0,908 ^e	0,110	1,100	0,801
CT3	Lá bệnh khô (1 năm, -20°C)	1,289 ^{ab}	0,106	1,466	1,175
CT4	Lá bệnh khô (1 năm, nhiệt độ phòng)	1,080 ^{cde}	0,087	1,194	0,938
CT5	Lá bệnh tươi (3 ngày 10°C)	1,117 ^{bcd}	0,149	1,334	0,900
CT6	Lá bệnh tươi (7 ngày, 10°C, 7 ngày)	0,969 ^{de}	0,114	1,119	0,765
CT7	Lá bệnh tươi, thử ngay sau khi thu	1,412 ^a	0,193	1,655	1,113
CT8	Lá khỏe tươi, thử ngay sau khi thu (đ/c)	0,167	0,024	0,198	0,132

Thống kê ANOVA (phần mềm SPSS) cho 7 công thức (trừ công thức đ/c) để đảm bảo điều kiện đồng nhất phương sai. Kiểm tra phân bố chuẩn của số liệu trong mỗi công thức (Shapiro-Wilk test): P từ 0.148 đến 0.807). Kiểm tra mức đồng nhất phương sai của 7 công thức (Levene test): $P = 0,281$. Các giá trị OD trong cột trung bình có cùng ký tự thì không khác nhau ở mức ý nghĩa $\alpha = 0,05$ (Turkey's HSD test). Số mẫu mỗi công thức kể cả đối chứng = 9.

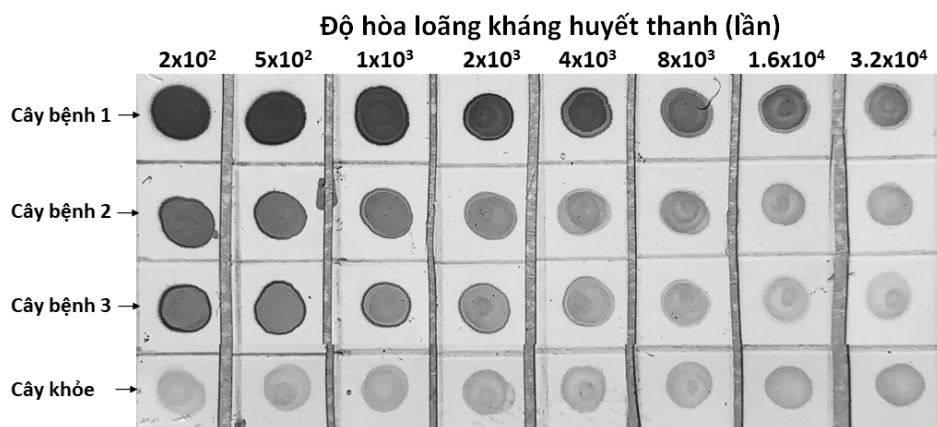
Ghi chú: Độ hòa loãng dịch cây: 1/10 (khối lượng/thể tích). Độ hòa loãng kháng huyết thanh: 1/500.

3.2. Thử nghiệm DIBA và TPIA

3.2.1. Ảnh hưởng của độ hòa loãng kháng huyết thanh đến phản ứng DIBA

Kết quả kiểm tra DIBA với 8 độ hòa loãng KHT 1/200, 1/500, 1/1000, 1/2000, 1/4000, 1/8000, 1/16000 và 1/32000 cho

thấy độ đậm của các ô mẫu bệnh giảm dần theo độ hòa loãng KHT. Mặc dù màu xanh của diệp lục trên các chấm mẫu có ảnh hưởng đến nhận biết phản ứng nhưng KHT ở độ hòa loãng 32,000 lần vẫn tạo phản ứng dương tính phân biệt được bằng mắt thường (Hình 1).



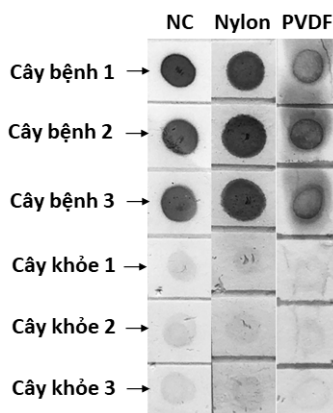
Ghi chú: Cây bệnh 1, 2, 3 là các mẫu lá lúa bị bệnh tươi, thu thập năm 2020. Độ hòa loãng dịch cây 1/10 (khối lượng/thể tích).

Hình 1. Phản ứng DIBA đánh giá độ hòa loãng kháng huyết thanh

3.2.2. Ảnh hưởng của loại màng đến phản ứng DIBA

Kết quả kiểm tra DIBA với 3 loại màng NC, Nylon và PVDF (Hình 2) cho thấy màng NC và nylon có độ đậm của mẫu bệnh, mẫu đối chứng cây khỏe cũng như độ sáng nền (màu trên màng) tương đương nhau. Đối với cả 2 loại màng NC và nylon, vết chấm mẫu đều gọn, màu các

mẫu bệnh tương phản rõ rệt với màu đối chứng cây khỏe và có thể phân biệt dễ dàng bằng mắt thường. Các thí nghiệm lặp lại cho thấy việc cố định mẫu lên màng PVDF khó hơn so với màng NC và nylon. Vết chấm mẫu trên màng PVDF thường loang, không gọn và thời gian để virus và protein N trong dịch cây liên kết hết vào màng lâu hơn.

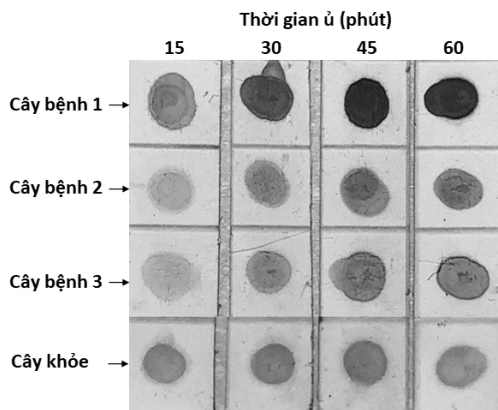


Ghi chú: Cây bệnh 1, 2, 3 là các mẫu lá lúa bị bệnh tươi, thu thập năm 2020. Độ hòa loãng kháng huyết thanh 1/1000. Độ hòa loãng dịch cây 1/10 (khối lượng/thể tích).

Hình 2. Phản ứng DIBA so sánh 3 loại màng

3.2.3. Ảnh hưởng của thời gian ủ màng đến phản ứng DIBA

Kết quả kiểm tra DIBA (Hình 3) với thời gian ủ màng khác nhau ở 3 bước khóa màng, ủ màng với KHT và ủ màng với kháng thể thứ cấp cho thấy độ đậm phản ứng của các mẫu bệnh tăng dần theo thời gian ủ màng. Ủ màng trong 45 phút cho độ đậm phản ứng các mẫu bệnh tương đương với ủ màng trong điều kiện chuẩn 60 phút. Khóa màng trong vòng 15 phút tạo nên phản ứng tương đương khóa màng trong điều kiện chuẩn 60 phút.

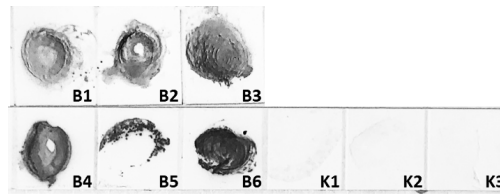


Ghi chú: Cây bệnh 1, 2, 3 là các mẫu lá lúa bị bệnh tươi, thu thập năm 2020. Độ hòa loãng kháng huyết thanh 1/1000. Độ hòa loãng dịch cây 1/10 (khối lượng / thể tích).

Hình 3. Phản ứng DIBA đánh giá ảnh hưởng của thời gian các bước ủ màng (khóa màng, ủ màng với kháng huyết thanh và ủ màng với kháng thể thứ cấp)

3.2.4. Đánh giá khả năng phát hiện virus bằng thử nghiệm TPIA

Chấm trực tiếp mẫu bệnh lên màng còn được gọi là thử nghiệm TPIA. Kết quả kiểm tra TPIA (Hình 4) cho thấy tất cả các mẫu bệnh đều tạo phản ứng đặc hiệu và rõ ràng.



Ghi chú: Từ B1 đến B6 các mẫu thân cây lúa bệnh tươi, thu thập năm 2020. Độ hòa loãng kháng huyết thanh 1/1000.

Hình 4. Phản ứng TPIA phát hiện RYSV trong thân cây lúa

IV. THẢO LUẬN

4.1. Loại mô phù hợp để chẩn đoán RYSV trong cây

Giống như các virus thực vật khác, RYSV nhiễm hệ thống trong cây (Jackson *et al.*, 2005; Hipper *et al.*, 2013). Tuy nhiên, không phải tất cả các bộ phận đều có hàm lượng virus là giống nhau. Mặc dù phân bố của RYSV trong cây chưa được nghiên cứu trên thế giới nhưng đặc điểm lan truyền qua rầy theo kiểu bền vững tái sinh và thuộc nhóm giới hạn mạch phloem cho thấy RYSV tái sinh tốt nhất trong tế bào mạch dẫn (Harper *et al.*, 2014). Các thí nghiệm PTA-ELISA trên 4 bộ phận gồm lá, bẹ lá, thân và rễ của cây lúa nhiễm RYSV cho thấy giá trị OD của mô thân lúa cao nhất, tiếp theo là mô lá lúa và cao hơn đáng kể so với mô rễ. Kết quả này gợi ý hàm lượng RYSV trong mô thân lúa là cao nhất và phù hợp với vị trí tái sinh của virus trong cây. Phát hiện này là quan trọng vì giúp lựa chọn loại mô phù hợp để chuẩn bị mẫu thử. Mô vỏ hoặc gân lá là loại mô thường được lựa chọn để phát hiện các tác nhân gây bệnh giới hạn mạch dẫn (Roistacher, 1991). Sử dụng mô thân để phát hiện RYSV cũng

có ưu điểm là giảm thiểu ảnh hưởng của chlorophyll đến nhận biết kết quả phản ứng DIBA.

4.2. Kháng huyết thanh protein N phát hiện đặc hiệu RYSV trong điều kiện đơn giản hóa phản ứng ELISA và DIBA

KHT protein N của RYSV có hiệu giá rất cao. Độ hòa loãng KHT phát hiện RYSV trong cây ít nhất 32000 lần trong phản ứng DIBA và 10000 lần trong phản ứng PTA-ELISA, phù hợp với các kết luận chung về độ nhạy của 2 kỹ thuật (Abd El-Aziz, 2019). Dựa trên kết quả này, một loạt các thí nghiệm đã được thí nghiệm nhằm tối ưu hóa và đơn giản hóa phản ứng.

Trong chẩn đoán miễn dịch virus thực vật, xử lý mẫu là công đoạn tốn thời gian và công sức, đặc biệt đối với các mẫu khó như lúa và khi phải kiểm tra số lượng mẫu lớn. Trong các thí nghiệm PTA-ELISA, các mảnh mô được cắt nhỏ và ủ trong giếng với đệm carbonate cũng đã chứng tỏ giải phóng phân tử virus và protein N đủ để phản ứng xảy ra và do đó phù hợp khi kiểm tra định tính với số lượng mẫu thử lớn. Phương pháp đặt trực tiếp mảnh mô trong giếng ELISA cũng đã được áp dụng trong chẩn đoán virus thực vật (Roistacher, 1991).

Tương tự, kỹ thuật TPIA, một biến thể của DIBA, trong đó đoạn thân mẫu lúa được chấm trực tiếp lên màng nitrocellulose đã chứng tỏ nhạy tương đương DIBA nhằm phát hiện RYSV trong cây lúa. TPIA là kỹ thuật cũng được sử dụng rộng rãi trong chẩn đoán virus thực vật vì có nhiều ưu điểm như không cần nghiền mẫu, giảm ảnh hưởng của

chlorophyll và mẫu có thể được chấm trên màng ngay trên đồng ruộng (Roistacher, 1991; Lima *et al.*, 2012; Abd El-Aziz, 2019).

Phản ứng DIBA/TIBA có 3 bước quan trọng là khóa màng, ủ màng với kháng huyết thanh và kháng thể thứ cấp. Thí nghiệm về ảnh hưởng của thời gian mỗi bước đến phản ứng DIBA cho thấy màng được khóa hoàn toàn trong vòng 15 phút, ủ màng với KHT và kháng thể thứ cấp trong vòng 45 phút cho mức độ phản ứng tương đương với ủ màng ở điều kiện chuẩn 60 phút. Kết quả này cho phép phản ứng DIBA phát hiện RYSV có thể được thực hiện trong vòng khoảng 3 giờ.

Trong nghiên cứu này, 3 loại màng NC, Nylon và PVDF cho phản ứng DIBA đã được so sánh. Mặc dù màng PVDF là loại màng được sử dụng phổ biến nhất trong phản ứng DIBA vì bền nhưng màng cần phải được hoạt hóa bằng methanol hoặc ethanol trước khi cố định dịch cây. Trong các thí nghiệm lặp lại của chúng tôi, màng PVDF luôn cho kết quả kém nhất vì vết chấm dịch cây không gọn, cần thời gian để khô trước khi khóa màng và nền phản ứng cao hơn so với 2 loại màng còn lại. Trái lại, màng NC và nylon cho kết quả tương đương khi xét về độ nhạy, đặc hiệu và các bước thao tác.

Một trong các nhược điểm chính của kỹ thuật DIBA khi phát hiện virus từ dịch cây là ảnh hưởng của chlorophyll đến nhận biết màu phản ứng. Chen *et al.* (2012) khi nghiên cứu loại bỏ chlorophyll trong phản ứng DIBA phát hiện virus lúa lùn sọc đen phương Nam (Southern rice black-streaked dwarf virus, SRBSDV) kết luận rằng nghiền lá lúa trong đệm chứa

than hoạt tính và xử lý màng PVDF bằng ethanol sau khi cố định dịch cây có hiệu quả cao nhằm giảm thiểu ảnh hưởng của chlorophyll trong phản ứng DIBA. Tuy nhiên, thí nghiệm xử lý dịch nghiền lá lúa bằng than hoạt tính (100 mg/mL) của chúng tôi (không trình bày trong kết quả) cho thấy mặc dù than hoạt tính không hấp thụ RYSV hoặc protein N nhưng không làm giảm đáng kể chlorophyll trong dịch nghiền. Dựa trên kết quả các thí nghiệm, cách tốt nhất để làm giảm ảnh hưởng của chlorophyll trong thử nghiệm DIBA phát hiện RYSV là sử dụng mô thân cây lúa.

Trong nhiều trường hợp, mẫu bệnh thu thập không được kiểm tra ngay và cần phải được bảo quản. Thí nghiệm PTA-ELISA trên các mẫu lúa bị bệnh vàng lụi bảo quản ở các điều kiện khác nhau đã cho thấy phân tử virus RYSV và protein N của virus khá bền vững trong mô lúa và duy trì được hoạt tính kháng nguyên lâu dài. Trong trường hợp không kiểm tra ngay lập tức thì mẫu cây có thể được bảo quản trong ngăn mát tủ lạnh ít nhất 1 tuần mà không ảnh hưởng nhiều tới kết quả phản ứng. Tốt nhất, mẫu nên được làm khô và bảo quản trong tủ lạnh sâu -20°C.

V. KẾT LUẬN

Kháng huyết thanh thô được gây miễn dịch với protein N của RYSV có thể được áp dụng để chẩn đoán virus trong cây bằng ít nhất 3 thử nghiệm miễn dịch là PTA-ELISA, DIBA và TPIA. Loại mô phù hợp nhất để chẩn đoán RYSV là thân cây lúa, tiếp theo là lá. Loại màng phù hợp cho thử nghiệm DIBA và TPIA là Nitrocellulose và nylon tích điện dương. Trong trường hợp phát hiện định tính và

số mẫu thử lớn, thử nghiệm PTA-ELISA có thể được thực hiện với mẫu lúa được cắt nhỏ ủ trực tiếp trong đệm carbonate.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu được hỗ trợ từ các đề tài cấp Bộ (mã số B2013-11-27 và NN-NDT2014/01).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Abd El-Aziz M. H. (2019). Three modern serological methods to detect plant viruses. *Journal of Plant Science and Phytopathology*. 3: 101-106.
2. Chen Z., Liu J., Zeng M., Wang Z., Yu D., Yin C., Jin L., Yang S. & Song B. (2012). Dot immunobinding assay method with chlorophyll removal for the detection of southern rice black-streaked dwarf virus. *Molecules*. 17(6): 6886-6900.
3. Clark M. F. & Adams A. (1977). Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology*. 34(3): 475-483.
4. Ha V. C., Tran N. H., Do T. D., Nguyen D. H., Wei S. F., Qin W. & Lyu R. H. (2019). Production of polyclonal antisera for diagnosis of rice yellow stunt virus (RYSV) in Vietnam. *Journal of Southern Agriculture*. 50(7).
5. Hà Viết Cường, Lê Văn Hải, Nguyễn Viết Hải & Vũ Triệu Mân (2010). Xác định nguyên nhân gây bệnh vàng lá lúa tại tỉnh Bắc Giang vụ mùa năm 2010. *Tạp chí Bảo vệ thực vật*. 228(6): 24 - 31.
6. Harper S., Cowell S., Robertson C. & Dawson W. (2014). Differential tropism in roots and shoots infected by *Citrus tristeza virus*. *Virology*. 460: 91 - 99.
7. Hibi T. & Saito Y. (1985). A dot immunobinding assay for the detection of tobacco mosaic virus in infected tissues. *Journal of General Virology*. 66(5): 1191 - 1194.

8. Hibino H. (1996). Biology and epidemiology of rice viruses. *Annual Review of Phytopathology*. 34: 249 - 274.
9. Hipper C., Brault V., Ziegler-Graff V. & Revers F. (2013). Viral and cellular factors involved in phloem transport of plant viruses. *Frontiers in plant science*. 4: 154.
10. Inoue H. (1978). Transmission efficiency of rice transitory yellowing virus by the green plant hoppers, *Nephotettix* spp. (Hemiptera: Cicadellidae). *Applied Entomology and Zoology*. 14: 123 - 126.
11. Jackson A. O., Dietzgen R. G., Goodin M. M., Bragg J. N. & Deng M. (2005). Biology of plant rhabdoviruses. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43: 623 - 660.
12. Lima J. A. A., Nascimento A. K. Q., Radaelli P. & Purcifull D. E. (2012). Serology applied to plant virology. Serological diagnosis of certain human, animal and plant diseases. Rijeka, Croatia: InTech. 1: 71 - 94.
13. Ou S. H. (1985). Rice yellow stunt virus. *Rice Diseases*. Second Edition, Commonwealth Mycological Institute Publication. Kew, Surrey, UK.: 23 - 25 & 48 - 49.
14. Roistacher C. N. (1991). Graft-transmissible diseases of citrus: Handbook for detection and diagnosis. Food & Agriculture Org. pages pages.
15. Ta H. A., Nguyen D. P., Nguyen V. C., Tran T. T. H., Pham T. L., Hébrard E. & Ngo V. V. (2012). New yellowing syndrome caused by rice transitory yellowing virus on rice in some areas of Mekong Delta. *Journal of Vietnam Agricultural Science and Technology*. 1(1): 12 - 18.
16. Walker P. J., Blasdel K. R., Calisher C. H., Dietzgen R. G., Kondo H., Kurath G., Longdon B., Stone D. M., Tesh R. B. & Tordo N. (2018). ICTV virus taxonomy profile: Rhabdoviridae. *Journal of General Virology*. 99(4): 447 - 448.