

PHÂN TÍCH TRÌNH TỰ PHÂN ĐOẠN S10 CỦA CÁC CHỦNG VIRUS GÂY BỆNH LÚA LÙN SỌC ĐEN Ở VIỆT NAM

Nguyễn Hoàng Quang, Đỗ Thị Hạnh,
Phạm Thị Vân, Trần Thị Như Hoa,
Hà Viết Cường, Phạm Xuân Hội

SUMMARY

Sequence analysis of S10 segment of virus isolates causing black-streaked dwarf disease on rice in Vietnam

A total of 13 typical black-streaked dwarf rice disease samples representing ecological zones in Vietnam were subjected for viral total dsRNA isolation using cellulose CF11 column. Analysis of extracted dsRNAs revealed 7 linear segments, which were similar to the electrophoretic profile of Southern black-streaked dwarf virus (SRBSDV). RT-PCR using primer pairs matched to both 3' and 5' ends sequence of S10 segment of China isolates (EU523360, EU784840) resulted in amplification of S10 segment cDNA products. RT-PCR products were cloned into pJET1.2 vector using CloneJET™ PCR Cloning Kit and the complete nucleotide sequence of S10 segments were obtained by automatic sequencer. Blast searches indicated that these S10 segments shares 98 - 99% nucleotide identities with S10 sequence of SRBSDV in Genebank (EU784840.1). Using BioEdit, Blast, Clustal2.1, MEGA5.1 softwares for phylogenetic trees based on Vietnam and China S10 nucleotide sequences showed that the viral isolates of Vietnam and China are divided at least into three distinct groups with bootstrap value of 99%. Among Vietnamese isolates, group 1 consists of 4 samples collected in the Red River Delta (Nam Dinh, Ninh Binh, Thai Binh) and 2 samples collected in the northern mountainous provinces (Son La, Lao Cai); group 2 consists of 4 samples collected in central region (Quang Tri, Hue), 1 sample collected in Son La and 1 sample collected in the Thai Binh; Group 3 consists of only one sample collected in Nghe An.

Keywords: Identities, nucleotide sequences, S10 segment, SRBSDV, Vietnam.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Virus lùn sọc đen phương Nam (LSĐPN) được phát hiện lần đầu tiên vào năm 2008 tại các vùng trồng lúa thuộc tỉnh Quảng Đông và đảo Hải Nam, phía Nam Trung Quốc (Zhang *et al.*, 2008). Tại Việt Nam, virus này đã gây dịch bệnh lúa lùn sọc đen tại Nghệ An và các tỉnh phía Bắc trong vụ Mùa 2009 với tổng diện tích nhiễm bệnh lên tới trên 13.000ha, trong đó hơn 8.000ha bị bệnh rất nặng và có khả năng mất trắng (Hà Viết Cường *et al.*, 2009; Ngô Vĩnh Viễn *et al.*, 2009). Tính đến vụ Mùa năm 2010, bệnh lùn sọc đen đã và vẫn phát sinh gây hại trên 5 vùng sinh thái trồng lúa tại 28 tỉnh/thành từ miền Trung trở ra với tổng diện tích bị nhiễm là 24.000ha, trong đó diện tích phải nhổ tỉa là 9.000ha và phải tiêu hủy là 1.700ha.

Virus LSĐPN có tên khoa học là *Southern rice black-streaked dwarf virus*, SRBSD), là 1 thành viên mới của chi *Fijivirus* (nhóm 2), họ *Reoviridae*. Hệ gen virus có kích thước ~29kb, gồm 10 phân đoạn RNA sợi đôi có kích thước từ 1,8 đến 4,5kb và được đặt tên theo thứ tự từ S1 đến S10 theo kích thước tăng dần (Zhang *et al.*, 2008; Zhou *et al.*, 2008), trong đó phân đoạn S10 mang gen mã hóa protein vỏ của virus.

Nghiên cứu này nhằm mục tiêu đánh giá đặc điểm phân tử/di truyền/đa dạng của phân đoạn S10 của virus LSĐPN tại Việt Nam. Phân đoạn S10, kích thước khoảng 1,8 kb, mang gen mã hóa cho 1 protein hình thành lớp vỏ bên ngoài của phân tử virus (Milne *et al.*, 2005). Protein lớp vỏ ngoài quy định tính đặc hiệu vector như đã được chứng minh đối với Rice dwarf virus (RDV, một reovirus) (Hogenhout *et al.*, 2008).

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Vật liệu nghiên cứu

Các mẫu lúa có triệu chứng nhiễm bệnh LSD điển hình được thu thập tại các tỉnh phía Bắc như: Thái Bình, Nam Định, Ninh Bình, Sơn La, Lào Cai... và các tỉnh Bắc Trung bộ, duyên hải miền Trung như: Thanh Hóa, Nghệ An, Hà Tĩnh, Quảng Bình, Quảng Trị, Huế...

Các kit nhân dòng, các kit tinh sạch DNA, các kit tổng hợp cDNA, các hóa chất và dụng cụ tiêu hao... phục vụ nghiên cứu.

2. Phương pháp nghiên cứu

Tách chiết genome của virus: Sử dụng phương pháp tách dsRNA của Dodds et al., (1984) có cải tiến.

Tổng hợp cDNA: Phản ứng tổng hợp cDNA phân đoạn S10 được thực hiện theo hướng dẫn của bộ kit Reverse Transcriptase: Kit Super Script III (Invitrogen).

Hai cặp mồi sử dụng cho phản ứng tổng hợp nhân toàn bộ phân đoạn S10 có trình tự như bảng 1.

Bảng 1. Trình tự mồi sử dụng để nhân phân đoạn gen S10 của virus LSDPN

Cặp mồi	Tên mồi	Trình tự mồi (5'-3')
1	S10-Fw	AAGTTTTTTTCCTCATCCATAATGG
	S10-Rv	GACAATAGCTGAATTTCCCCCTAG
2	SR-S10-F3	AAGTTTTTTTCCTCATCCATAATGGCTGAC
	SR-S10-R3	GACATCAGCTGCTTTCCCCCTA

Phản ứng PCR: Phản ứng PCR nhân phân đoạn S10 được tiến hành trên máy chu kỳ nhiệt GeneAmp® PCR System 9700, sử dụng cặp mồi đặc hiệu. Phản ứng được thực hiện với chu trình nhiệt như sau: 94°C - 5 phút; (94°C/30s; 55°C/30s; 72°C/30s) × 30 chu kỳ; 72°C/7 phút.

Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1%, sau đó được tinh sạch bằng bộ kit GenJET™ Gel Extraction và được giữ ở -20°C phục vụ cho các thí nghiệm tiếp theo.

Nhân dòng và xác định trình tự: Sản phẩm PCR được gắn vào vector nhân dòng pJET1.2 hoặc pTZ57 nhờ bộ kit nhân dòng CloneJET™ PCR Cloning Kit và InsTAclone PCR Cloning Kit (Thermo Scientific). Các mẫu plasmid tái tổ hợp thu được sau đó được gửi đi giải trình tự gen.

Phân tích trình tự: Sử dụng các phần mềm BioEdit, Blast, Clustal2.1, MEGA5.1 để so sánh và phân tích trình tự gen của các phân đoạn S10 thu được.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Phân lập hệ gen của virus LSDPN

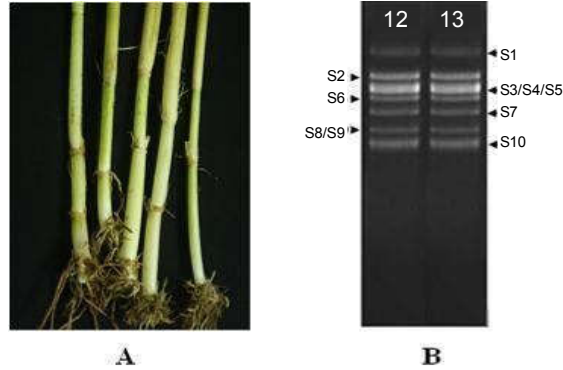
Các mẫu lúa bệnh đại diện cho các vùng sinh thái khác nhau được sử dụng để phân lập hệ gen của virus SRBSDV.

Từ 45 mẫu lúa thu thập đã phân lập được 13 hệ genom (được ký hiệu lần lượt là: 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 11; 12; 13; 15; 16). Các mẫu phân lập được genome của SRBSDV đều có những triệu chứng đặc trưng của bệnh LSD như: Cây lùn, lá xanh đậm, xoắn đầu lá, rách mép lá và đặc biệt có những u sấp màu trắng đến đen chạy dọc các đường gân ở mặt sau lá, bẹ lá hoặc các đốt thân. Để kiểm tra sản phẩm tinh sạch genome của virus, tiến hành điện di mẫu trên gel agarose 1%

Kết quả điện di (mẫu 12; 13) kiểm tra sản phẩm RNA sợi đôi tinh sạch trên gel agarose 1% trong hình 1B cho thấy, hệ gen của các mẫu virus thu được gồm 7 băng, trong đó băng thứ 3 (tính theo kích thước giảm dần) bao gồm ba phân đoạn S3, S4, S5 có kích thước tương đương nhau (lần lượt là 3618bp,

3618bp và 3167bp) và băng thứ 6 bao gồm hai phân đoạn S8 và S9 (1928bp và 1900bp) (hình 1B). So sánh với hình ảnh điện di genome SRBSDV trên agarose của Zhou *et al.* (2008) cho thấy đã phân lập thành công hệ

gen của SRBSDV. Đây chính là nguyên liệu ban đầu cho các nghiên cứu tiếp theo. Các mẫu RNA sợi đôi được bảo quản ở -20°C để sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo.



Hình 1: Cây lúa nhiễm bệnh (A: -mẫu 13- Lào Cai) và ảnh điện di agarose 1% bộ gen tinh chiết của virus LSDPN (B: 12-Thái Bình 2; 13: Lào Cai)

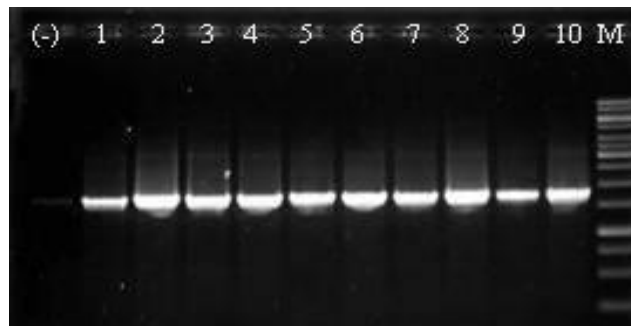
2. Phân lập phân đoạn S10 của virus LSDPN

Sau khi thu được hệ gen RNA sợi đôi của các chủng virus LSDPN, đã tiến hành thực hiện phản ứng RT-PCR, sử dụng các cặp mồi đặc hiệu nhằm phân lập toàn bộ phân đoạn S10 của các chủng virus.

Kết quả điện di đã thu được 1 băng DNA đặc hiệu có kích thước khoảng

1800bp, tương ứng với kích thước lí thuyết của phân đoạn S10 (hình 2). Kết quả này chứng tỏ đã phân lập thành công phân đoạn S10 của SRBSDV từ các mẫu lúa bị bệnh LSD thu thập từ các vùng sinh thái khác nhau.

Phân đoạn S10 tinh sạch được bảo quản ở -20°C để sử dụng cho nghiên cứu đồng hóa sau này.



Hình 2: Điện di kiểm tra phản ứng PCR nhân đoạn S10. (-): Đối chứng âm, M: Marker 1kb (Fermentas), 1-10: Phân đoạn S10 của các chủng virus LSDPN (1: Huế 1; 2: Ninh Bình 1; 3: Ninh Bình 2; 4: Sơn La 1; 5: Sơn La 2; 6: Thái Bình 1; 7: Thái Bình 2; 8: Lào Cai; 9: Nghệ An; 10: Nam Định)

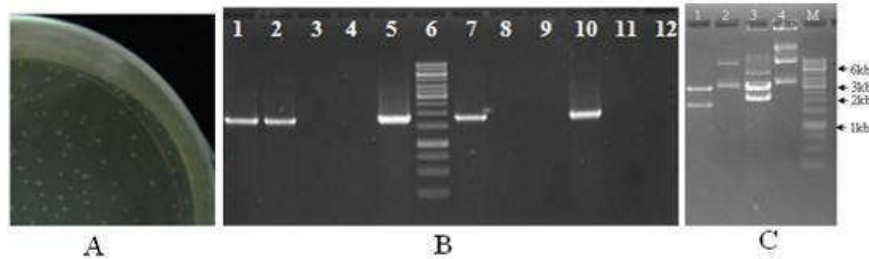
3. Dòng hóa phân đoạn S10 của virus LSDPN ở một số vùng của Việt Nam

Các phân đoạn S10 sau khi phân lập được dòng hóa vào vector nhân dòng pJET1.2 hoặc pTZ57. Các dòng vi khuẩn

biến nạp (*E.coli* chủng DH5 α hoặc XL1 Blue) được kiểm tra sự có mặt của các vector tái tổ hợp đúng bằng colony-PCR dùng môi vector hoặc môi đặc hiệu virus. Tiếp theo, các dòng vi khuẩn biến nạp mang vector đúng được tinh chiết. Các vector tái tổ hợp tinh chiết được kiểm tra lại bằng enzyme cắt giới hạn (Bgl II đối với pJetT1.2 và EcoRI/BamHI đối với pTZ57). Đối với vector pJetT1.2 tái tổ hợp, cắt bằng enzyme giới hạn Bgl II tạo hai sản phẩm, một sản phẩm có kích thước xấp xỉ 3kb (tương

đương với kích thước của vector pJET1.2 (2974bp)) và một sản phẩm có kích thước khoảng 1,8 kb, tương đương với phân đoạn S10 của virus LSDPN (Hình 3). Kiểm tra bằng EcoRI/BamHI đối với vector tái tổ hợp pTZ57 cũng cho kết quả tương tự.

Kết quả dòng hóa đã thu được các vector tái tổ hợp mang toàn bộ phân đoạn S10 của 13 chủng virus thu thập tại các vùng sinh thái của Việt Nam.



Hình 3: Kết quả dòng hóa phân đoạn S10 vào vector nhân dòng pJET1.

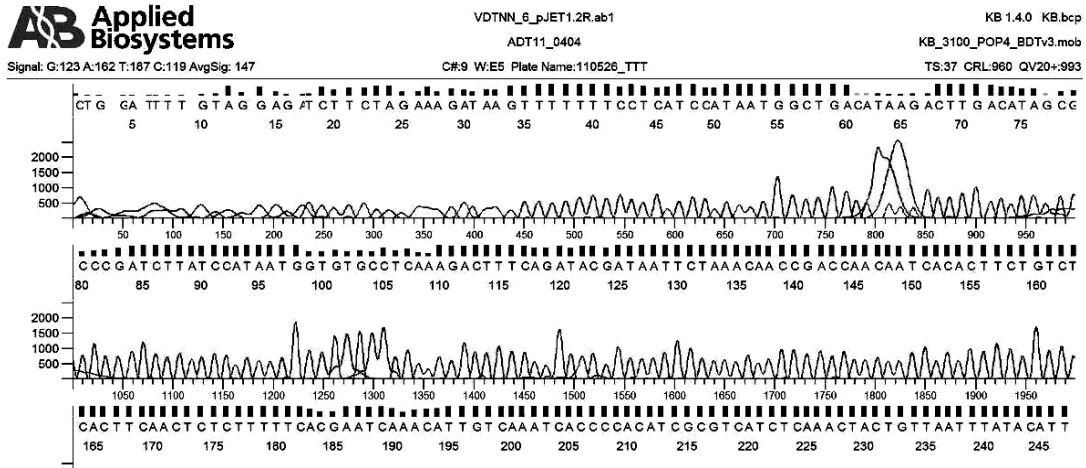
A) Khuẩn lạc vi khuẩn DH5 α trên môi trường LB/Ampicillin.

B) Kiểm tra sản phẩm colony-PCR: giếng 12, đối chứng âm; giếng 6, Marker 1kb (Fermentas); giếng 1- 5 và 7- 11, colony-PCR các khuẩn lạc.

C) Kiểm tra vector tái tổ hợp bằng enzyme cắt giới hạn Bgl II: 1, Vector tái tổ hợp pJET1.2-S10 được cắt giới hạn với enzyme Bgl II; 2, Vector tái tổ hợp pJET1.2-S10 (không cắt giới hạn); 3, Vector đối chứng được cắt giới hạn với enzyme Bgl II; 4, Vector đối chứng (không cắt giới hạn); M, Marker 1kb (Fermentas)

4. Giải trình tự phân đoạn S10

Mẫu plasmid tái tổ hợp sau khi tinh sạch được mang giải trình tự



Hình 4: Sản phẩm giải trình tự phân đoạn S10 của virus LSDPN (mẫu 8)

Kết quả cho thấy đã giải trình tự thành công phân đoạn S10 chủng virus LSDPN phân lập từ mẫu lúa số 8 (hình 4) và các mẫu khác thu thập tại các vùng sinh thái khác nhau ở Việt Nam. Sử dụng công cụ tìm kiếm trực tuyến BLAST trên NCBI để tìm các trình tự S10 của chủng virus trong

ngân hàng gen có quan hệ tương đồng với trình tự phân đoạn S10 các chủng virus LSDPN Việt Nam. Kết quả cho thấy cả 13 trình tự đều trùng khớp với phân đoạn S10 của chủng virus LSDPN sẵn có trên GenBank (EU784840.1) với mức đồng nhất nucleotide xấp xỉ 98-99% (bảng 2).

Bảng 2. Kết quả so sánh trình tự phân đoạn S10 của 13 mẫu virus Việt Nam với mẫu Trung Quốc đã công bố trên GeneBank (EU784840.1)

Ký hiệu mẫu	Vùng lấy mẫu	Số Nu giải được	Mức độ sai khác so với trình tự công bố trên GeneBank (EU784840.1) (%)
1	Quảng Trị 1	1797	1,67
2	Quảng Trị 2	1797	1,56
3	Huế 1	1797	1,95
4	Huế 2	1797	1,73
5	Ninh Bình 1	1798	0,44
6	Ninh Bình 2	1798	1,00
7	Sơn La 1	1798	0,56
8	Sơn La 2	1798	1,89
11	Thái Bình 1	1797	2,00
12	Thái Bình 2	1798	0,61
13	Lào Cai	1798	0,90
15	Nghệ An	1798	0,90
16	Nam Định	1798	0,50

Phân tích phả hệ

Vì hiện nay virus LSDPN mới chỉ phát hiện tại Việt Nam và Trung Quốc nên đã phân tích mối quan hệ của các mẫu virus

Việt Nam với các mẫu virus Trung Quốc. Một cây phả hệ đã được xây dựng dựa trên toàn bộ trình tự phân đoạn S10 của 13 mẫu virus Việt Nam trong nghiên cứu này và 8

mẫu virus Trung Quốc sẵn có trên GenBank (Hình 5).

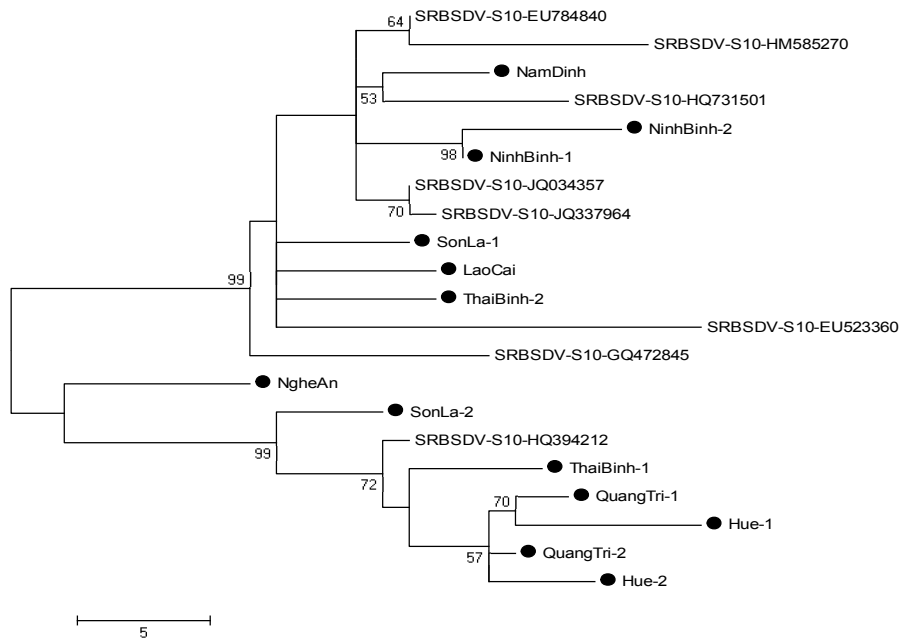
Phân tích phả hệ cho thấy các mẫu Việt Nam, cùng với các mẫu Trung Quốc đã hình thành 3 nhóm rõ rệt với giá trị thống kê bootstrap rất cao (99%). Xét các mẫu Việt Nam, nhóm 1 gồm 4 mẫu thu thập tại đồng bằng sông Hồng (Nam Định, Ninh Bình, Thái Bình) và 2 mẫu thu tại miền núi phía Bắc (Sơn La, Lào Cai). Nhóm 2 gồm 4 mẫu thu tại miền Trung (Quảng Trị, Huế), 1 mẫu thu tại Sơn La và 1 mẫu thu tại Thái Bình. Riêng một mẫu thu tại Nghệ An hình thành một nhánh riêng biệt.

Mối quan hệ của các mẫu virus trên cây cũng như so sánh độ dài cành cho thấy các

phân đoạn S10 của Việt Nam cũng như của Trung Quốc không hoàn toàn đồng nhất, phản ánh đúng kết quả so sánh trình tự như trình bày ở Bảng 2.

Mặc dù gồm ít nhất 3 cụm phả hệ nhưng sự xuất hiện xen kẽ của các mẫu Việt Nam và Trung Quốc trên cây cho thấy chúng là một quần thể virus duy nhất, phản ánh sự xuất hiện bệnh trong cùng khu vực địa lý, thường tại cùng thời điểm, do sự di cư của vector rầy lưng trắng từ miền Bắc và miền Trung Việt Nam sang Trung Quốc và ngược lại.

Kết quả so sánh trình tự và phân tích phả hệ cũng cho thấy mỗi chẩn đoán virus LSDPN cần phải được thiết kế cẩn thận, được chọn lựa trên các vùng bảo thủ cao của phân đoạn S10.



Hình 5: Cây phả hệ dựa trên toàn bộ phân đoạn S10 cho thấy mối quan hệ của các mẫu virus phân lập từ Việt Nam và Trung Quốc.

Cây được xây dựng bằng phương pháp MP (maximum parsimony) dùng phần mềm MEGA5. Các số trên mỗi nút là giá trị bootstrap tính theo % (1000 lần lặp) và chỉ trình bày các giá trị > 50%. Mẫu Việt Nam

được chỉ rõ bằng chấm đen. Thanh bar là số thay thế nucleotide.

IV. KẾT LUẬN

1. Đã phân lập thành công bộ gen của 13 mẫu virus LSDPN thu thập tại miền Bắc

và miền Trung Việt Nam. Đây là vật liệu ban đầu quan trọng cho các nghiên cứu sinh học phân tử của virus này.

2. Đã phân lập, dòng hóa và giải trình tự toàn bộ phân đoạn S10 của 13 mẫu virus LSĐPN thu tại miền Bắc và miền Trung Việt Nam.

3. So sánh trình tự và phân tích phá hệ cho thấy phân đoạn S10 của các mẫu virus Việt Nam có mức độ đồng nhất trình tự nucleotide từ 98-99% so với nhau và với mẫu virus của Trung Quốc.

4. Dựa trên phân đoạn S10, mặc dù các mẫu virus Việt Nam và Trung Quốc phân thành ít nhất 3 nhóm phân biệt, song sự xuất hiện xen kẽ của các mẫu giữa Việt Nam và Trung Quốc cho thấy chúng là một quần thể virus duy nhất trong cùng một khu vực địa lý.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Hà Viết Cường, Nguyễn Việt Hải, Vũ Triệu Mân (2009). *Xác định nguyên nhân lúa lùn sọc đen (lùn lụi) trên lúa mùa năm 2009 tại miền Bắc*. Tạp chí BVTV, 6: 24-31.
2. Ngô Vĩnh Viễn, Phạm Thị Vượng, Nguyễn Như Cường, Tạ Hoàng Anh,

Nguyễn Thị Me, Phan Bích Thu, Phạm Hồng Hiền, Hà Viết Cường và nnk (2009), *Kết quả chẩn đoán bệnh virus lúa lùn sọc đen ở một số tỉnh miền Bắc Việt Nam*. Tạp chí BVTV, 6: 8-18.

3. Dodds, J.A., Morris, T.J., Jordan, R.L. (1984) *Plant viral double-strand RNA*. Annual Review of Phytopathology, **22**:151-168.
4. Hogenhout, S.A., Ammar, E.D., Whitfield, A.E. and Redinbaugh, M.G. (2008). *Insect Vector Interactions with Persistently Transmitted Viruses*. Annual Review of Phytopathology, 46:327-59.
5. Milne, R.G., del Vas M., Harding, R.M., Marzachi, R. and Mertens, P.P.C. (2005). Genus Fijivirus. In: Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberger, U. and Ball, L.A. (eds). *Virus taxonomy. Eighth report of the international committee on taxonomy of viruses*. Elsevier Academic Press, San Diego, pp 534-542.

Ngày nhận bài: 22/4/2013

Người phản biện: PGS. TS. Nguyễn Văn Tuất,
ngày 12/5/2013

Ngày duyệt đăng: 3/6/2013

ĐÁNH GIÁ TÍNH KHÁNG NHIỄM ĐẠO ÔN CỦA MỘT SỐ GIỐNG LÚA VỚI CÁC DÒNG (ISOLATE) NẤM ĐẠO ÔN PHÂN LẬP Ở VIỆT NAM

Nguyễn Thị Thanh Nga, Nguyễn Văn Bích,
Nguyễn Văn Bôn, Giang Thị Mai,
Nguyễn Công Công, Nguyễn Bảo Quốc.

SUMMARY

Evaluate the resistance and susceptibility of the blast with some rice blast fungus strains isolated in Vietnam

Based on characteristics of *Pyricularia* caused the blast disease on the rice, we had collected and isolated 12 strains of *Pyricularia* in the main rice-growing areas of the country. Results determined resistance and infectivity with several strains of *Pyricularia* blast on some rice cultivars varieties