

#### IV. KẾT LUẬN

1. Trong số 22 chỉ thị SSR được sử dụng trong nghiên cứu đa dạng di truyền trên 33 mẫu giống thu thập từ Lào có 10 chỉ thị cho kết quả đa hình và thu được 57 alen. Giá trị hệ số đa dạng gen (PIC) thay đổi trong khoảng từ 0 đến 0,96 với giá trị trung bình là 0,29 trên mỗi chỉ thị phân tử.

2. Mẫu giống có ký hiệu VL27 và VL33 (trong tổng số mẫu giống lúa của Lào thu thập được) có hệ số tương đồng di truyền 0,97 nên được xem xét để tránh trùng lặp dựa trên các chỉ tiêu theo dõi thêm về kiểu hình.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. DeWoody J. A., R. L. Honeycutt, L. C. Skow (1995). *Microsatellite markers in white-tailed deer*. J. Hered 86, 317 - 319.
2. Doyle JJ, Doyle JL (1987): *A rapid DNA isolation procedure for small*

*quantities of fresh leaf tissue*. Phytochem Bull 19: 11-15

3. Garris J, Amanda, Thomas H, Tai, Jason Cburn, Steve Kresovich and Susan McCouch (2005), *Genetic Structure and Diversity in Oryza sativa* L. Genetics (169), pp. 1631-1638.
4. Giarrocco LE, Marassib MA and Salerno GL (2007), *Assessment of the Genetic Diversity in Argentine Rice Cultivars with SSR Markers*, Crop Science, (47), pp. 853-858.
5. Jalaluddin M, Nakai H and Yamamoto T (2007), *Genetic diversity and DNA fingerprinting of some modern Indica and Japonica rice*, Breed and Genet. SABRAO 39 (1), pp. 43-52.

Ngày nhận bài: 10/4/2013

Người phản biện: GS. TSKH. Trần Duy Quý,  
ngày 15/4/2013

Ngày duyệt đăng: 5/7/2013

### NGHIÊN CỨU ĐA DẠNG DI TRUYỀN NGUỒN GEN VIRUS GÂY BỆNH VÀNG LÙN (RGSV) VÀ LÙN XOẮN LÁ (RRSV) HẠI LÚA Ở VIỆT NAM

Tạ Hoàng Anh, Ngô Vĩnh Viễn,  
Nguyễn Doãn Phương, Trần Thị Thu Huyền,  
Nguyễn Văn Chung, Nguyễn Thanh Đức,  
Sandrine Cause, Eugénie Ébrard.

#### SUMMARY

#### Molecular diversity of Rice grassy stunt virus and *Rice ragged stunt virus* in Vietnam

Totally 68 and 55 partial sequences of target genes (P3, Pc3, P5 and Pc5 for RGSV; P1, P3 and P9 for RRSV) from 17 and 21 isolates of *Rice grassy stunt virus* and *Rice ragged stunt virus*, respectively, were selected and analyzed for their genetic diversities. The diversities of both RGSV and RRSV are very low though different genes diverse at different levels. Phylogenetic trees reconstructed from different genes on the same RNA segment of RGSV are similar in clustering structures while they are different on different RNA segments. The too low genetic diversities of all

RRSV genes lead to the unwell structured of their phylogenic trees. The structures of RGSV phylogenic trees all prove that there is no link between the genetic diversity of virus isolates and their geographic origins.

**Keywords:** Virus, Ragged stunt virus, grassy stunt virus; Rice, Molecular diversity.

## I. ĐẶT VẤN ĐỀ

*Rice grassy stunt virus* (RGSV) và *Rice ragged stunt virus* (RRSV) là hai đối tượng quan trọng nhất trong tổng số 5 loại virus gây bệnh trên lúa ở Việt Nam. Cả hai virus cùng với môi giới truyền bệnh chung - rầy nâu (*Nilaparvata lugens* Stal), đã bùng phát dịch giữ dôi và gây hại nghiêm trọng cho sản xuất lúa trên 24 tỉnh/thành phố thuộc đồng bằng sông Cửu Long và miền Đông Nam Bộ những năm 2006 - 2008. Thiệt hại do dịch bệnh gây ra ước tính hàng trăm nghìn tỷ đồng, đe dọa an ninh lương thực Quốc gia và đã làm gián đoạn việc xuất khẩu gạo (Anh và CTV, 2009).

Sự ra đời của quy trình phòng trừ tổng hợp rầy nâu, bệnh vàng lùn và lùn xoắn lá do Viện Bảo vệ Thực vật đề xuất đã góp phần chặn đứng sự tàn phá mang tính hủy diệt của trận dịch. Tuy nhiên, mục tiêu chính của quy trình mới nhằm vào việc loại bỏ tàn dư cây bệnh và tiêu diệt triệt để rầy môi giới, trong đó thuốc hóa học vẫn đóng vai trò chủ đạo (Viễn và CTV, 2011). Để việc phòng trừ bệnh virus mang tính chủ động, có hiệu quả lâu dài, thân thiện với môi trường, giống kháng vẫn là giải pháp rẻ tiền nhất và dễ áp dụng nhất ở mọi thời đại (Hibino, 1996).

Sự ra đời và phát triển của công nghệ gen trong vài thập kỷ trở lại đây đã đẩy nhanh tốc độ của nhiều thành tựu mới trong chọn tạo giống kháng virus bằng các kỹ thuật di truyền hiện đại, trong đó có phương pháp chuyển gen. Để thực hiện việc này,

nhiệm vụ đầu tiên cần được tiến hành là đánh giá đa dạng nguồn gen của virus. Cho đến nay mới chỉ có duy nhất kết quả nghiên cứu của Miranda so sánh trình tự bộ gen hoàn chỉnh của 2 isolate RGSV ở Philippines, Laguna và Cotabato (Miranda et al., 2000), ngoài ra chưa có ghi nhận nào về đa dạng di truyền của RGSV và RRSV.

Nghiên cứu này sẽ đánh giá đa dạng di truyền của 2 virus gây bệnh vàng lùn và lùn xoắn lá dựa trên các đoạn gen P3, Pc3, P5 và Pc5 của RGSV cũng như các đoạn gen P1, P3 và P9 của RRSV. Những thông tin đưa ra sẽ rất hữu ích cho công tác nghiên cứu tiếp theo nhằm chọn và tạo giống kháng bằng các kỹ thuật di truyền.

## II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 1. Vật liệu nghiên cứu

Cây lúa nhiễm bệnh thu thập ngoài đồng ruộng tại các tỉnh miền Đông Nam Bộ và đồng bằng sông Cửu Long năm 2009 khi dịch bệnh diễn ra và năm 2011. Các cặp mẫu đặc hiệu thiết kế dựa trên các trình tự có sẵn trên GenBank (bảng 1) và các loại hóa chất phân tích.

Bảng 1. Danh sách và trình tự các cặp mồi đặc hiệu đã sử dụng

TT	Tên mồi	Trình tự (5' → 3')	Kích thước (nt)	Vị trí mồi trên gene	Mã gen GenBank	Sản phẩm (bp)
1	FP3RGSV	AGAATTTTATGTCACTTAG	19	152-170	NC_002325	732
2	RP3RGSV	TATCCAGATTTGAGGTGC	18	883-866		
3	RP3bisRGSV	CACTAACATTATTGGGAG <sup>(*)</sup>	18	613-596		
4	FPC3RGSV	TTTCACATTAAGTATACCCATCAA	24	1988-2011		1058
5	RPC3RGSV	ACTATATTATTCTCACTCTTCTCT	24	3045-3022		
6	FP5RGSV	AATTATAGCAAAACAACACCTTCT	24	17-40	NC_002327	885
7	RP5RGSV	TGTTGCTTATTTACTACTTACCTA	24	901-878		1330
8	FPC5RGSV	AAGAACATATTAECTACTCACAC	23	1318-1340		
9	RPC5RGSV	TCATCATACATTAAGAAAACC	21	2647-2627		
10	F1RRSV	GATAAATCTTCCGAGCTAAA	20	1-20	NC_003749	1140
11	R1RRSV	AGCCTAGCCCTAGCTAATCG	20	1121-1140	NC_003751	825
10	F3RRSV	GTAAGTGGTTCTGCCCGCC	20	152-171		
11	R3RRSV	TCGCATTAAGAATTGCCCTC	21	956-976		
10	F9RRSV	GCCTTTGCCAGAGATCCTTTTACA	24	23-46	NC_003757	1110
11	R9RRSV	GCACCATGGTCTCGCAGTTTTC	22	1111-1132		

Ghi chú: (\*): mồi này chỉ dùng để đọc trình tự

## 2. Phương pháp nghiên cứu

*Điều tra, thu thập nguồn gen:* Theo phương pháp của Viện Bảo vệ Thực vật (BVTV), tại các tỉnh thuộc đồng bằng sông Cửu Long và miền Đông Nam Bộ. Mẫu bệnh với triệu chứng điển hình được ép khô bằng giấy bản rồi bảo quản -20°C với hạt chống ẩm (Anh và CTV., 2009).

*Xác định trình tự gen:* RNA tổng số được tách chiết và tinh sạch bằng Trizol. Các đoạn gen mục tiêu được khuếch đại bằng one-step RT-PCR (Anh và CTV, 2009) sử dụng các cặp mồi đặc hiệu (bảng 1). Sản phẩm PCR được gửi đọc trình tự trực tiếp tại Công ty MilleGen® (Pháp). Trong một số trường hợp, xuất hiện trình tự kép tại nhiều hơn 1 vị trí trên trình tự thu được, việc tách dòng và chuyển nạp gen sử dụng PGM-T (Invitrogen) sẽ được tiến hành trước khi gửi đọc trình tự lại.

Phân tích trình tự gen: Sử dụng phần mềm MEGA5 với mô hình Maximum-Likelihood.

## III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 1. Virus gây bệnh vàng lùn (RGSV)

Trong số các trình tự gen thu được, đã lựa chọn tổng số 68 trình tự hoàn thiện của 4 đoạn gen mục tiêu P3, Pc3, P5 và Pc5 từ 17 isolate của RGSV. Các trình tự này đã được đăng ký trên GenBank với các mã số truy cập tương ứng từ HE963224 - HE963291.

Kết quả phân tích về “khoảng cách di truyền” cho thấy trong 4 đoạn gen của RGSV thì Pc3 đa dạng nhất, tuy nhiên tối đa cũng chỉ 8,7% và bình quân là 4,7%, các đoạn gen khác có khoảng cách di truyền dưới 4% (bảng 2). Kết quả này

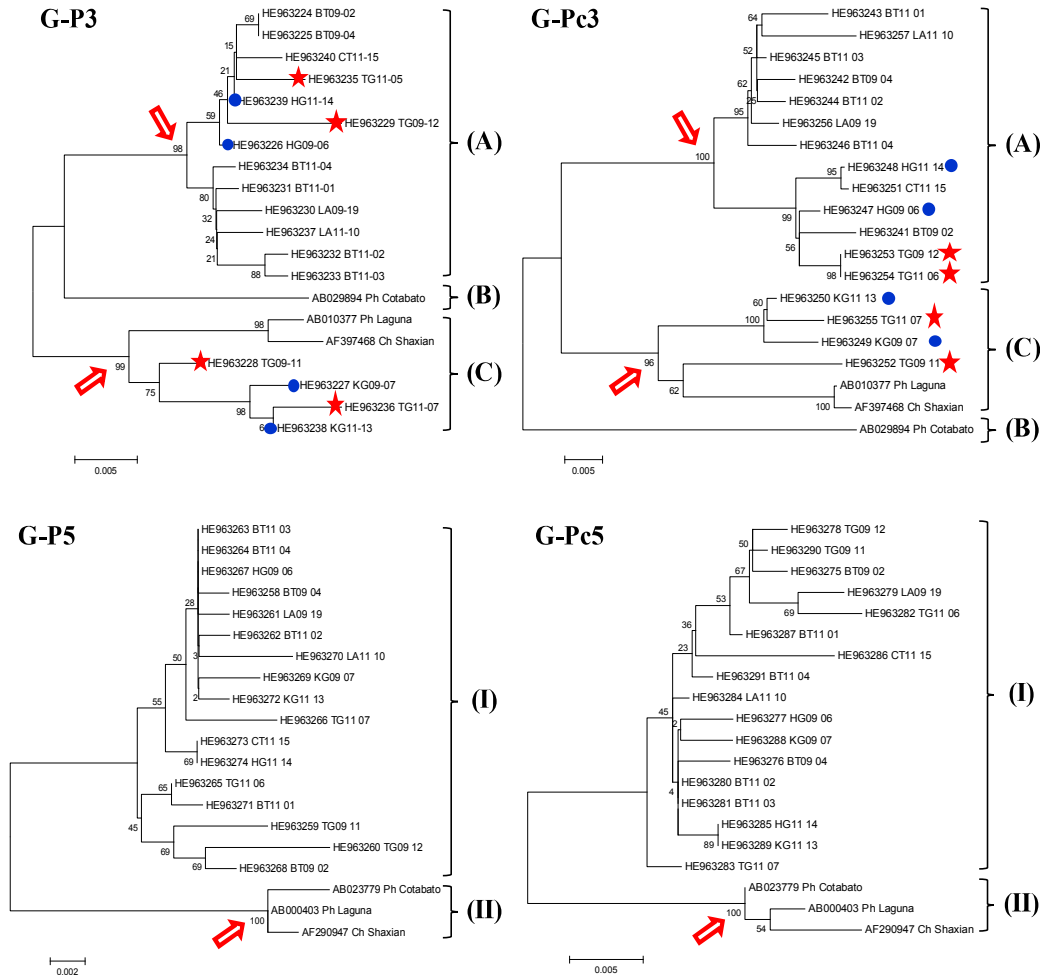
cũng phù hợp với ghi nhận của Miranda năm 2000 khi so sánh 2 isolate của Philippines (Laguna và Cotabato) rằng RNA3 có độ đa dạng cao nhất và RNA5 và RNA6 có độ đa dạng thấp nhất (Miranda et al., 2000).

Bảng 2. Khoảng cách di truyền giữa các đoạn gen của RGSV (Viện BVTV, 2011-2012)

TT	Gene	Khoảng cách di truyền <sup>(*)</sup>		
		Giá trị cao nhất	Giá trị thấp nhất	Giá trị trung bình
1	P3-RGSV	0,036	0	0,020
2	Pc3-RGSV	0,087	0	0,047
3	P5-RGSV	0,037	0	0,013
4	Pc5-RGSV	0,028	0	0,011

Ghi chú: <sup>(\*)</sup> Tính toán dựa trên “số thay thế tại mỗi vị trí” bằng phần mềm MEGA5.

Kết quả phân tích “gia phả” cho thấy các đoạn gen trên cùng 1 RNA có cấu trúc giống nhau nhưng các RNA khác nhau tạo nên cây phả hệ có cấu trúc khác nhau (hình 1).



Hình 1: Cây phả hệ xây dựng bằng phần mềm MEGA5 (Phương pháp Maximum-Likelihood; mô hình Kimura 2 tham số, Bootstrap 10.000) dựa trên trình tự các đoạn gen P3, Pc3, P5 và Pc3 của 17 isolate RGSV của Việt Nam và các đoạn trình tự tương ứng của lưu giữ trên GenBank. Mũi tên chỉ giá trị bootstrap cao tại gốc phân nhánh. Các dấu “sao” và “chấm tròn” đánh dấu các isolate thu thập trong phạm vi cùng 1 tỉnh. Thanh tỷ lệ thể hiện số thay thế tại mỗi vị trí nucleotide.

Hai cây phả hệ P3 và Pc3 đều phân làm 3 nhánh chính, trong đó phần lớn các isolate của Việt Nam gập thành 1 nhóm (13/17), isolate Cotabato (Nam Philippines) đứng riêng 1 nhóm, 2 isolate Kiên Giang và 2 isolate Tiền Giang thu thập năm 2011 nằm cùng nhóm với isolate Laguna (Bắc Philippines) và isolate

Shaxian của Trung Quốc. Sự phân nhóm này rất chặt chẽ với giá trị bootstrap 96-100%. Mặt khác, trên hai cây phả hệ của đoạn gen P5 và Pc5 tất cả 17 isolate của Việt Nam cùng nằm 1 nhánh riêng biệt, trong khi 3 isolate tham khảo của Philippines và Trung Quốc cùng tạo nên 1 nhánh riêng biệt.

Mặt khác, quan sát trên cấu trúc chi tiết tới vị trí của các isolate trong cây phả hệ xây dựng từ trình tự đoạn gen P3 và Pc3 và vị trí địa lý nơi thu thập mẫu cũng dễ dàng nhận thấy sự phân nhánh của các isolate, hay nói 1 cách khác là sự tiến hóa của RGSV, không có tương quan với phân bố địa lý của virus. Cụ thể:

Trên cây Pc3, TG09-11 và TG09-12 là 2 isolate thu tại 2 huyện Tân Phước và Cái Bè tỉnh Tiền Giang chỉ cách nhau khoảng 30 km, hay các các isolate thuộc Hậu Giang (HG09-06 và HG11-14) và Kiên Giang (KG09-07 và KG11-13) cách nhau khoảng 50km theo đường chim bay đều nằm ở 2 nhánh khác nhau (A và C). Ngược lại, trong nhánh (C) các isolate của Việt Nam so với Shaxian (Trung Quốc) cách nhau khoảng 3.000 km và cách Laguna (Philippines) khoảng 2.000 km đường chim bay lại cùng nằm trong 1 nhánh. Thậm chí, 2 isolate Laguna và Shaxian cách nhau khoảng 2.000 km và là gần cách bởi đại dương nhưng có quan hệ rất gần gũi về mặt di truyền. Điều này phần

nào đã phản ánh khả năng di chuyển rất mạnh của rầy nâu, môi giới truyền bệnh, dẫn tới hiện thực tồn tại sự hiện diện của nhiều isolate ở các vị trí địa lý rất xa nhau, hàng trăm đến hàng nghìn km, trên phạm vi cùng 1 huyện hay cùng 1 tỉnh.

Trên cây P3, sự phân bố của các isolate hoàn toàn tương tự như ở cây Pc3. Đồng thời, số lượng cũng như thành phần các isolate tại mỗi nhánh trên cây cũng hoàn toàn giống nhau.

Xét về thời gian thu mẫu thì các isolate Laguna, Cotabato và Shaxian được xác định năm 1997, 2000 và 2001 tỏ ra có quan hệ mật thiết hơn. Điều này đúng với trường hợp các cây P5 và Pc5.

**2. Virus gây bệnh lùn xoắn lá (RRSV)**

Trong số các trình tự gen thu được đã lựa chọn 16, 18 và 21 trình tự hoàn thiện của 3 đoạn gen P1, P3 và P9 của RRSV. Kết quả phân tích về “khoảng cách di truyền” cho thấy sự đa dạng của RRSV nhìn chung rất thấp, thấp hơn nhiều so với RGSV (bảng 3).

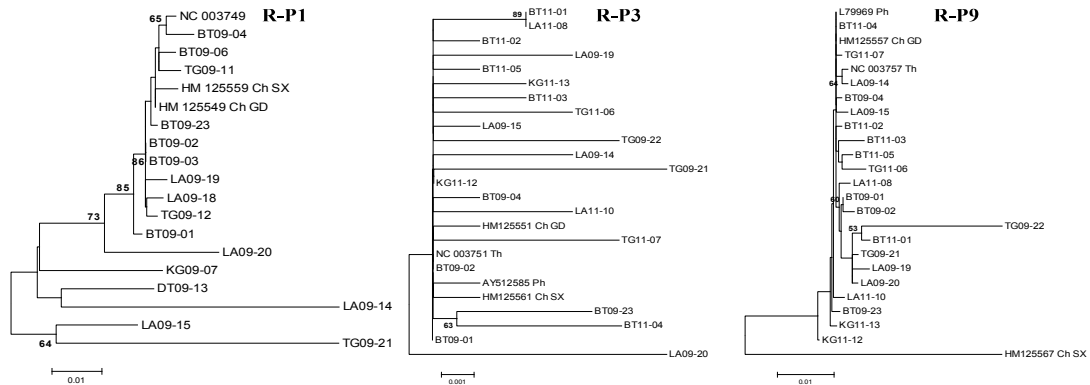
Bảng 3. Khoảng cách di truyền giữa các đoạn gen của RRSV (Viện BTVT, 2011-2012)

TT	Gene	Khoảng cách di truyền <sup>(*)</sup>		
		Giá trị cao nhất	Giá trị thấp nhất	Giá trị trung bình
1	P1-RRSV	0,069	0	0,025
2	P3-RRSV	0,016	0	0,006
3	P9-RRSV	0,089	0	0,011

*Ghi chú:* <sup>(\*)</sup> Tính toán dựa trên “số thay thế tại mỗi vị trí” bằng phần mềm MEGA5.

Giá trị “P-distance” quá thấp cũng thường dẫn đến việc phân nhánh trên cây phả hệ sẽ không rõ ràng, giá trị bootstrap tại các gốc phân cành thấp, đồng nghĩa với độ

tin cậy thấp (Fargette et al., 2004). Điều này đã thể hiện khá rõ trên cấu trúc cây phả hệ được xây dựng dựa trên trình tự của các đoạn gen P1, P3 và P9 của RRSV (hình 2).



Hình 2: Cây phả hệ xây dựng bằng phần mềm MEGA5 (Phương pháp Maximum-Likelihood; mô hình Kimura 2 tham số, Bootstrap 10.000) dựa trên trình tự đoạn gen P1, P3 và P9 của 21 isolate RRSV của Việt Nam và các đoạn trình tự tương ứng của các isolate lưu giữ trên GenBank. Giá trị bootstrap dưới 50% được để ẩn. Thanh tỷ lệ thể hiện số thay thế tại mỗi vị trí nucleotide.

#### IV. KẾT LUẬN

Đã xác định và đăng ký trên GenBank 68 trình tự gen của RGSV, 55 trình tự gen của RRSV thu thập ở Việt Nam và xây dựng được 7 cây phả hệ tương ứng với mỗi đoạn gen.

Mức độ đa dạng di truyền của RGSV và RRSV đều rất thấp. Giá trị bình quân về khoảng cách di truyền dao động từ 1,1 - 4,7% với RGSV và từ 0,6 - 2,5% với RRSV, tùy từng đoạn gen khác nhau.

Cấu trúc các cây phả hệ trên cùng RNA3 (P3 và Pc3) hay RNA5 (P5 và Pc5) hoàn toàn giống nhau nhưng khác nhau giữa các cây phả hệ trên RNA3 so với trên RNA5.

Không có sự liên quan giữa đa dạng di truyền nguồn gen virus RGSV với sự phân bố địa lý của các isolate. Các cây phả hệ của RRSV phân nhánh không rõ ràng do mức độ đa dạng quá thấp.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Tạ Hoàng Anh, Ngô Vĩnh Viễn, Nguyễn Tuấn Anh, Nguyễn Thu Huyền, Nguyễn Văn Chung, Nguyễn Doãn Phương, 2009. *Nghiên cứu ứng dụng kỹ thuật one-step RT-PCR chẩn đoán nhanh virus gây bệnh vàng lùn và lùn xoắn lá hại lúa*. Tạp chí Bảo vệ Thực vật, 5: 21-26.

2. Ngô Vĩnh Viễn, Tạ Hoàng Anh, Nguyễn Thị Me, Phạm Hồng Hiền, Nguyễn Lan Anh, 2011. Báo cáo tổng kết đề tài “*Nghiên cứu nguyên nhân và biện pháp phòng chống bệnh lùn lụi hại lúa ở miền Bắc*”.
3. Fargette D., Pinel A., Abubakar Z., Traoré O., Brugidou C., Fatogoma S., Hébrard E., Choisy M., Sée Y., Fauquet C. and Konate G., 2004. *Inferring the evolutionary history of Rice yellow mottle virus from genomic, phylogenetic, and phylogeographic studies*. Journal of Virology, 78(7): 3252-3261
4. Hibino H., 1996. *Biology and Epidemiology of rice viruses*. Annu. Rev. Phytopathol., 34:249-74.
5. Miranda Gilda J., Azzam Ossmat, and Shirako Yukio, 2000. *Comparison of Nucleotide Sequences between Northern and Southern Philippine Isolates of Rice Grassy Stunt Virus Indicates Occurrence of Natural Genetic Reassortment*. Virology, 266: 26-32.

Ngày nhận bài: 6/3/2013

Người phản biện: PGS. TS. Nguyễn Văn Viết,  
ngày 10/3/2013

Ngày duyệt đăng: 5/7/2013