

QUAN HỆ DI TRUYỀN GIỮA CÁC CHỦNG VIRUS GÂY BỆNH VÀNG LÙN Ở LÚA TẠI CÁC TỈNH NAM TRUNG BỘ

Nguyễn Ngọc Sơn¹, Hoàng Thị Thu Hằng², Đặng Thị Lan Anh³, Nguyễn Như Cường³, Nguyễn Hữu Cường², Chu Hoàng Hà², Lê Trần Bình², Nguyễn Trung Nam²

¹Đại học Thái Nguyên

²Viện Công nghệ sinh học

³Viện Bảo vệ thực vật

TÓM TẮT

Từ năm 2006 - 2008, tình hình nhiễm rầy nâu và virus gây bệnh vàng lùn ở lúa đã trở thành mối nguy hiểm đối với khu vực Đồng bằng sông Cửu Long (ĐBSCL), nơi có sản lượng lúa gạo lớn nhất cả nước. Theo số liệu mới nhất năm 2008, trên vụ lúa Thu Đông tại các tỉnh ĐBSCL, tổng diện tích nhiễm rầy nâu là 25198 ha, trong đó diện tích lúa bị nhiễm bệnh vàng lùn là 3546,8 ha. Bệnh vàng lùn do sự tổ hợp của từ một đến ba loại virus gây ra, bao gồm: Rice Grass Stunt Virus (RGSV) thuộc chi *Tenuivirus*, Rice Ragged Stunt Virus (RRSV) là loài chuẩn của chi *Oryzavirus*, họ *Reoviridae* và Rice Tungro Spherical Virus (RTSV) thuộc chi *Waikavirus*, họ *Sequiviridae*. Năm 2007, sự đa dạng di truyền của các dòng virus gây bệnh vàng lùn tại một số tỉnh ĐBSCL đã bước đầu được nghiên cứu và đánh giá. Trong nghiên cứu này, lần đầu tiên các mẫu lúa nghi nhiễm bệnh vàng lùn tại một số tỉnh Nam Trung Bộ đã được thu thập nhằm kiểm tra và khẳng định sự có mặt của virus tại khu vực này, góp phần vào việc dự báo, cập nhật số liệu và có biện pháp đối phó kịp thời với dịch bệnh đang có chiều hướng lây lan tại khu vực miền Trung. Bằng phản ứng RT-PCR với các cặp mồi đặc hiệu cho các chủng virus RGSV, RRSV và RTSV, chúng tôi đã phát hiện sự có mặt của gen mã hóa protein vỏ (NCP) của RGSV tại 2 tỉnh Ninh Thuận và Bình Thuận trong tổng số 5 tỉnh nghiên cứu. Tuy nhiên, chúng tôi không phát hiện thấy sự có mặt của các chủng RRSV và RTSV tại 5 tỉnh trên. Độ tương đồng về trình tự nucleotide của các chủng RGSV tại 2 tỉnh Ninh Thuận và Bình Thuận rất cao so với các chủng tại ĐBSCL, cho thấy các chủng virus RGSV xuất hiện tại các tỉnh Nam Trung Bộ có thể có nguồn gốc từ các tỉnh ĐBSCL.

Từ khóa: Bệnh vàng lùn ở lúa, đa dạng di truyền, gen mã hóa NCP, RT-PCR

MỞ ĐẦU

Hiện nay, Việt Nam đang ở vị trí thứ hai trên thế giới về xuất khẩu gạo với sản lượng gạo xuất khẩu hàng năm đạt trên 30 triệu tấn. Tuy nhiên, trong thời gian gần đây (2006 - 2008), sản lượng lúa bị giảm sút nghiêm trọng bởi bệnh vàng lùn do virus gây ra thông qua môi giới rầy nâu (*Nilaparvata lugens* Stal) (Miranda *et al.*, 2000). Ở nước ta, bệnh vàng lùn được phát hiện rất sớm so với thế giới, ví dụ tại Mỹ Tho, tỉnh Tiền Giang và tỉnh Long An năm 1963 và tại miền Bắc vào các năm 1964, 1966, 1970 với diện tích khá lớn khoảng 50000 ha. Sau đó, bệnh xuất hiện và gây hại rải rác cho các tỉnh Khánh Hòa, Bình Định, Phú Yên, Bến Tre và Bạc Liêu trong những năm 1999 - 2000. Từ năm 2006, bệnh vàng lùn bùng phát trở lại trên diện tích rộng và gây thiệt hại nặng nề cho các tỉnh ĐBSCL. Ở dịch bệnh tập trung tại các tỉnh An Giang, Vĩnh Long, Đồng Tháp, Trà Vinh...(Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn,

2008). Tính đến tháng 9/2008, trên lúa Thu Đông tại các tỉnh ĐBSCL, tổng diện tích nhiễm rầy nâu là 25198 ha và lúa bị nhiễm bệnh vàng lùn là 3546,8 ha.

Bệnh vàng lùn do sự tổ hợp từ một đến ba loại virus sau: virus lùn lúa cỏ (Rice Grass Stunt Virus- RGSV), virus lùn xoắn lá (Rice Ragged Stunt Virus- RRSV) và virus Tungro (Rice Tungro Spherical Virus- RTSV) (Heydarnejad *et al.*, 2006; Jones *et al.*, 1991; Shen *et al.*, 1993; Zhang *et al.*, 1993; Murphy *et al.*, 1995). RGSV có 6 đoạn RNA khác nhau, cả 6 đoạn RNA của bộ genome virus đều đã được giải mã với tổng chiều dài bộ gen khoảng 25 kb. Cả 6 đoạn RNA đều lưỡng tính, mã hóa protein theo cả 2 chiều dương và chiều bổ sung của phân tử RNA) và đều mang đoạn mã kết thúc dài 17 bp. Protein vỏ (NCP) của RGSV được mã hóa bởi đoạn mã theo chiều bổ sung của RNA 5 (Chomchan *et al.*, 2002; Toriyama *et al.*, 1997; 1998). RRSV có 10 đoạn RNA sợi đôi khác nhau. Cả 10 đoạn RNA của bộ genome virus đều đã

được giải mã (Milne *et al.*, 1982; Ou *et al.*, 1969). RTSV có thể virus hình cầu, đường kính 30 nm, chứa một phân tử RNA sợi đơn có chiều dương và dài khoảng 12 kb, và ba protein cấu tạo vỏ virus là CP1 (22900 kDa), CP2 (22300 kDa) và CP3 (33000 kDa) (Druka *et al.*, 1996; Li *et al.*, 1996; Shen *et al.*, 1993).

Rầy nâu có thể truyền cùng một lúc 2 hoặc 3 loại virus cho cây lúa với thời gian ủ bệnh trung bình là 7 ngày. Trong số 3 chủng virus trên, RGSV là virus có tần số xuất hiện nhiều nhất và gây bệnh trên một diện tích rộng (Phạm Văn Dư, 2006). Cây lúa càng non càng dễ nhiễm bệnh, lúa càng già càng ít mẫn cảm với bệnh. Cây lúa bị bệnh thường lùn, thân nhỏ như bụi cỏ, lá nhỏ màu vàng và trên phiến lá có nhiều vết bản. Lúa thường không trổ được hoặc bông cho hạt lép (Chi cục Bảo vệ thực vật thành phố Hồ Chí Minh, 2006; Nguyễn Văn Đức Tiến, 2007; Ngô Vĩnh Viễn, 2007). Do dịch bệnh vàng lùn đang gây hại nặng nề về sản lượng lúa gạo cho các tỉnh ĐBSCL và có nguy cơ lây lan ra các khu vực lân cận, nên nhiệm vụ cấp bách là phải kiểm tra sự có mặt của các virus gây bệnh tại khu vực Nam Trung Bộ, nơi có diện tích trồng lúa khá lớn và tiếp giáp với ĐBSCL. Đồng thời, đánh giá tính đa dạng di truyền của các dòng virus gây bệnh, góp phần vào việc đề ra những biện pháp đối phó kịp thời với dịch bệnh tại khu vực miền Trung.

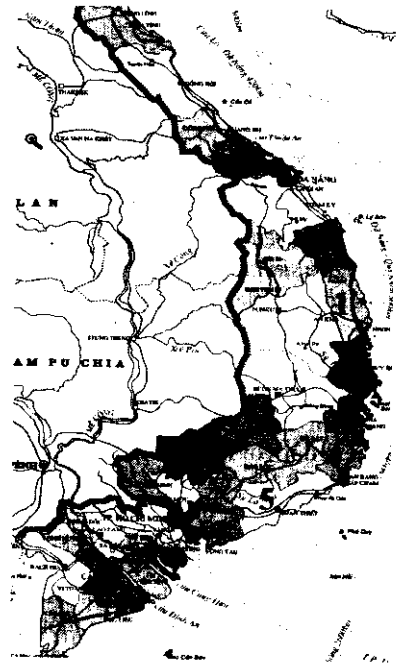
VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu thực vật

Vật liệu thực vật sử dụng trong nghiên cứu là các mẫu lúa nghi nhiễm bệnh vàng lùn được thu từ 5 tỉnh Nam Trung Bộ, mỗi tỉnh thu tại 3 địa điểm khác nhau (Hình 1). Lá lúa được cắt bằng kéo sạch, thu vào ống 50 ml khử trùng, giữ trong đá khô CO₂.

Hóa chất, thiết bị

Vector tách dòng pBT, tế bào khả biến *E. coli* Top10 (Phòng Công nghệ Tế bào thực vật, Viện Công nghệ sinh học); bộ kit SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum® *Taq* High Fidelity (Invitrogen), kit tinh sạch sản phẩm PCR (QIAGEN, Đức), Plasmid Extraction Kit (BioNEER, Hàn Quốc); enzyme *Taq* polymerase (Fermentas, Mỹ). Các máy móc, thiết bị của Phòng Công nghệ Tế bào thực vật và máy xác định trình tự gen của Phòng thí nghiệm trọng điểm Công nghệ gen, Viện Công nghệ sinh học.



Hình 1. Các tỉnh thu mẫu lúa nghi nhiễm bệnh vàng lùn. 1. Bình Định; 2. Phú Yên; 3. Khánh Hòa; 4. Ninh Thuận; 5. Bình Thuận.

Phương pháp nghiên cứu

Thiết kế môi đặc hiệu

Sử dụng chương trình phần mềm DNASTar và dựa vào trình tự gen công bố trên GenBank để thiết kế các cặp môi đặc hiệu tách dòng gen NCP của 3 loại virus RGSV, RRSV và RTSV. Trình tự các đoạn môi và chiều dài đoạn gen dự kiến được trình bày trong bảng 1.

Tách chiết RNA tổng số của virus

Nghiền 100 g mẫu lúa trong nitrogen lỏng thành dạng bột mịn, thu bột mịn vào ống eppendorf 2 ml đã khử trùng bằng nước DEPC 0,01%. Bổ sung 1 ml dung dịch Trizol Reagents vào mỗi ống eppendorf, đảo đều, nhẹ ở nhiệt độ phòng trong 10 phút. Sau đó, bổ sung tiếp 200 ml chloroform: isoamyl (24: 1), đảo nhẹ và ly tâm 10000 vòng/phút trong 10 phút. Hút khoảng 0,6 ml dịch ở pha nổi sang ống eppendorf 1,5 ml sạch đã khử trùng nước DEPC 0,01%. Bổ sung 0,6 ml isopropanol vào mỗi eppendorf để kết tủa RNA, giữ các ống trong tủ -20°C trong 30 phút. Ly tâm các ống 10000 vòng/phút trong 10 phút để thu tủa RNA. Loại bỏ dịch nổi, rửa RNA hai lần bằng

còn 70% và ly tâm 7000 vòng/phút trong 5 phút. Làm khô và hòa tan RNA trong nước khử DEPC 0,01%, bảo quản ở -80°C đến khi sử dụng.

Phản ứng RT-PCR

Thành phần phản ứng RT-PCR: Đệm RT-PCR 5X: 5 µl, RNA tổng số: 50 pg - 25 µg (5 µl), mỗi xuôi: 50 pmol (0,75 µl), mỗi ngược: 50 pmol (0,75 µl), hỗn hợp dNTP: 2 µl, hỗn hợp enzyme (Reverse transcriptase và *Taq* polymerase): 1 µl, Chất ức chế Ribonuclease tái tổ hợp RNase OUT™ (40 đơn vị/µl): 0,2 µl, Nước khử ion, khử trùng: 10,3 µl; Thể tích tổng số: 25 µl. Chu kỳ nhiệt của phản ứng RT-PCR: bước 1: 50°C, 30 phút; bước 2: 95°C, 5 phút; bước 3: 94°C, 30 giây; bước 4: 53°C, 30 giây; bước 5: 72°C, 3 phút; từ bước 3 đến bước 5 lặp lại 10 chu kỳ; bước 6: 94°C, 30 giây; bước 7: 55°C, 30 giây; bước 8: 72°C, 5 phút; từ bước 6 đến bước 8 lặp lại 30 chu kỳ; bước 9: 72°C, 10 phút; bước 10: 4°C, bảo quản mẫu. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose

1% trong đệm 1X TAE, nhuộm gel trong dung dịch ethidium bromide.

Tách dòng và xác định trình tự gen NCP

Sản phẩm PCR được gắn vào trong vector tách dòng pBT (Phan Trọng Hoàng *et al.*, 2006) và biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* Top10. Chọn lọc các khuẩn lạc xanh/trắng trên môi trường thạch LB có bổ sung 50 mg/l ampicilin, 0,004% X-gal và 0,1 mM IPTG. Tách chiết plasmid theo hướng dẫn sử dụng của Plasmid Extraction Kit (BioNEER, Hàn Quốc). Kiểm tra sự có mặt của DNA tái tổ hợp bằng phương pháp colony-PCR với cặp mồi đặc hiệu. Chọn các mẫu plasmid tái tổ hợp có kích thước như mong muốn để tinh sạch và xác định trình tự gen trên máy ABI PRISM® 3100 Avant Genetic Analyzer. Sử dụng các phần mềm DNASTar, BioEdit và ClustalX để so sánh các trình tự gen và xây dựng cây phát sinh chủng loại theo phương pháp tối đa (Maximum Parsimony (MP)) trên cơ sở các số liệu thu được qua so sánh các trình tự gen.

Bảng 1. Trình tự mồi sử dụng để nhân gen NCP của các chủng virus.

STT	Tên mồi	Trình tự mồi	Chiều dài gen dự kiến thu được (bp)
1	RGSV-NCP-F	5'- CTATACACTACGCTAAAGGCTI -3'	1021
2	RGSV-NCP-R	5'- GTGTAAGATGGGTAAAGTGCAI -3'	

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Tách dòng và xác định trình tự gen NCP của 3 chủng RGSV, RRSV và RTSV

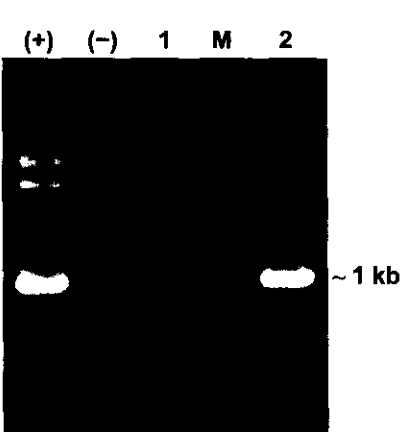
Điện di sản phẩm RT-PCR với cặp mồi đặc hiệu cho gen NCP của RGSV cho thấy xuất hiện đoạn DNA có kích thước như dự đoán khoảng 1021 bp ở các mẫu lúa của tỉnh Ninh Thuận và Bình Thuận. Trong khi tại các tỉnh Bình Định, Phú Yên, Khánh Hòa đều âm tính với RGSV (Hình 2, 3). Trong nghiên cứu này, chúng tôi cũng sử dụng các cặp mồi đặc hiệu để tách dòng gen NCP của RRSV và RTSV. Tuy nhiên, chúng tôi không quan sát thấy các đoạn DNA có kích thước như mong muốn với gen NCP của RRSV và RTSV ở các mẫu lúa của cả 5 tỉnh điều tra. Điều này cho thấy, tỷ lệ lúa nhiễm RGSV là cao hơn rất nhiều so với RRSV và RTSV. Kết quả trên cũng phù hợp với một số công bố trước. Theo Ossmat (Viện

Nghiên cứu Lúa Quốc tế - IRRI) từ 4 - 1996 đến 1 - 1997, trong tổng số 163 mẫu, có phản ứng dương tính với 3 mẫu RTSV và RRSV với tỷ lệ rất thấp 4/140 mẫu. Năm 2005, Cabunagan và Choi cũng chỉ ra rằng trong số 52 mẫu lúa bị bệnh, chỉ có 1 mẫu có phản ứng dương tính với RTSV. Kết quả phân tích mẫu bệnh vàng lùn thu thập được tại Tiền Giang do Trung Tâm Bảo vệ thực vật Phía Nam và Cục Bảo vệ thực vật An Giang thực hiện cho kết quả 2/30 mẫu có phản ứng với RTSV, 27/30 mẫu có phản ứng với RGSV, 19/30 mẫu có phản ứng với RRSV (Phạm *et al.*, 2005). Theo thống kê của Phạm Văn Dư (2006) tỷ lệ nhiễm RTSV và RRSV trên lúa là rất thấp. Trong 14 mẫu lúa nghiên cứu tại 7 tỉnh ĐBSCL đều dương tính với RGSV nhưng không phát hiện thấy RRSV và RTSV (Nguyễn Trung Nam *et al.*, 2007).

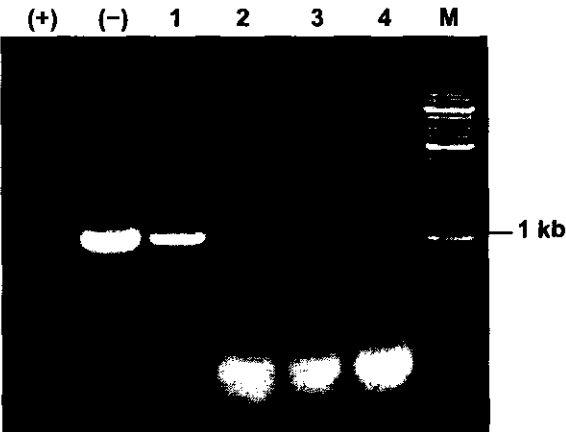
Sau phản ứng RT-PCR, các phân đoạn DNA tương ứng với gen NCP của RGSV được tách dòng

và kiểm tra colony-PCR (Hình 4). Các trình tự gen NCP của RGSV tại 2 tỉnh Ninh Thuận và Bình Thuận được so sánh với các gen trong Genbank. Kết quả cho thấy hai trình tự NCP phân lập từ RGSV của hai tỉnh trên có độ tương đồng với nhau từ 97 -

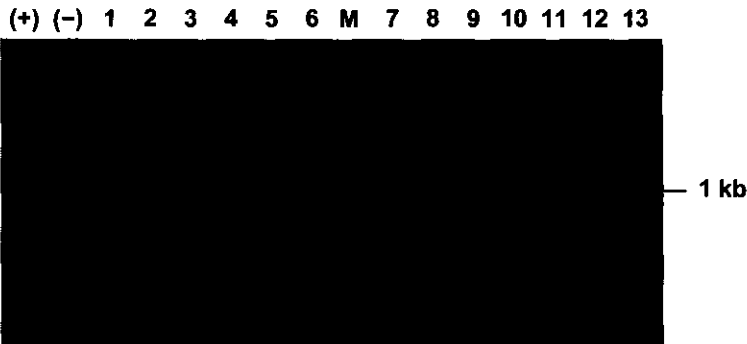
99,8% ở mức độ nucleotide và 91,5 - 99,7% ở mức độ amino acid. Khi so sánh trình tự RGSV của Bình Thuận với Vĩnh Long và của Ninh Thuận với Vĩnh Long, trình tự gen NCP đều có sự tương đồng đến 99% (Hình 5, 6).



Hình 2. RT-PCR với mồi đặc hiệu RGSV-NCP-F và RGSV-NCP-R. 1. Bình Định, 2. Ninh Thuận, (+). Đ/c dương, (-). Đ/c âm.



Hình 3. RT-PCR với mồi đặc hiệu RGSV-NCP-F và RGSV-NCP-R. 1. Bình Thuận, 2. Bình Định, 3. Phú Yên, 4. Khánh Hòa, (+). Đ/c dương, (-). Đ/c âm.



Hình 4. Kết quả colony-PCR các dòng RGSV. 1 - 6: Ninh Thuận; 7 - 13: Bình Thuận, (+). Đ/c dương, (-). Đ/c âm, M. Thang chuẩn 1 kb.

BT1	1	atgggttaaagtgcagtttggagatggtcactgggcaaataacaaggaatgggtctgagttg	60
VL2	1	atgggttaaagtgcagtttggagatggtcactgggcaaataacaaggaatgggtctgagttg	60
BT1	61	ttatcagaaatattttcaaaaatcagagcatccatagatggatttgccaatgctacagct	120
VL2	61	ttatcagaaatattttcaaaaatcagagcatctatagatggatttgccaatgctacagct	120
BT1	121	gatttggctgcaggattggagtatcaggctttcaatcctgaaaagattttgaggaagttg	180
VL2	121	gatttggctgcaggattggagtatcaggctttcaatcctgaaaagattttgaggaagttg	180

```
BT1 181 attgcatcctcaacttcattggatgactttgttaaggatatgcgtgacctcttgggtggcc 240
      |||
VL2 181 attgcatcctcaacttcattggatgactttgttaaggatatgcgtgacctcttgggtggcc 240

BT1 241 aggtacaccagaggaactagcttcttgttcaatgctaaaaactcaattgagaaagcaaag 300
      |||
VL2 241 aggtacaccagaggaactagcttcttgttcaatgctaaaaactcaattgagaaagcaaag 300

BT1 301 gataagaagaaggctgaagctattcaggtactgataaataggtagcggagtaaaaaagaat 360
      |||
VL2 301 gataagaagaaggctgaagctattcaggtactgataaataggtagcggagtaaaaaagaat 360

BT1 361 gctggtgacaatgctgttgatcaagccactttgggaaggataagtcaagtgttggcatat 420
      |||
VL2 361 gctggtgacaatgctgttgatcaagccactttgggaaggataagtcaagtgttggcatat 420

BT1 421 atggccttgagagttgctttacaaatcacagactatcataagccaatcataccattgaga 480
      |||
VL2 421 atggccttgagagttgctttacaaatcacagactatcataagccaatcataccattgaga 480

BT1 481 cccatttagtaccgttgatataaagaatgctatcattgatgttgttccacaattcttatat 540
      |||
VL2 481 cccatttagtaccgttgatataaagaatgctatcattgatgttgttccacaattcttatat 540

BT1 541 cttaaagcagatcaacttgattcaaagaccaactcagaggcagctctgtatgtaatccat 600
      |||
VL2 541 cttaaagcagatcaacttgattcaaagaccaactcagaggcagctctgtatgtaatccat 600

BT1 601 ttgtgttaccaagtctgtgtgtctgaaagaatcatgactaaagctcagaaagataagcac 660
      |||
VL2 601 ttgtgttaccaagtctgtgtgtctgaaagaatcatgactaaagctcagaaagataagcac 660

BT1 661 ggtgttcacactaagtcagcaatgataacacactgcatgggttttgtcaatctggctatg 720
      |||
VL2 661 ggtgttcacactaagtcagcaatgataacacactgcatgggttttgtcaatctggctatg 720

BT1 721 gataattcttcagtagtgtctgatgataagatagctggtagaaggatgatctcaggtcca 780
      |||
VL2 721 gataattcttcagtagtgtctgatgataagatagctggtagaaggatgatctcaggtcca 780

BT1 781 tggggactacaggaaactgctctagatgccacaggctgcgcatgtatcattgatgttgtt 840
      |||
VL2 781 tggggactacaggaaactgctctagatgccacaggctgcgcatgtatcattgatgttgtt 840

BT1 841 gatttctgctgcaggggacacaaagtaacagatgctgtggcgccagttcggtgttcaga 900
      |||
VL2 841 gatttctgctgcaggggacacaaagtaacagatgctgtggcgccagttcggtgttcaga 900

BT1 901 ttagctattgagtgcatataaagacacagctgatctgaaggatgctggagtc aaattgaag 960
      |||
VL2 901 ttagctattgagtgcatataaagacacagctgatctgaaggatgctggagtc aaattgaag 960

BT1 961 actctggttgataagtga 978
      |||
VL2 961 actctggttgataagtga 978
```

Hình 5. Trình tự gen NCP của virus RGSV phân lập tại tỉnh Bình Thuận so sánh với trình tự gen NCP của dòng virus phân lập tại tỉnh Vĩnh Long (VL2, EU076544).

NT1 1 atgggtaaaagtgcagtttggagatgggtcactgggcaaataacaaggaatggtctgagttg 60
 |||
 VL2 1 atgggtaaaagtgcagtttggagatgggtcactgggcaaataacaaggaatggtctgagttg 60
 |||
 NT1 61 ttatcagaaatattttcaaaaatcagagcatctatagatggatttgccaatgctacagct 120
 |||
 VL2 61 ttatcagaaatattttcaaaaatcagagcatctatagatggatttgccaatgctacagct 120
 |||
 NT1 121 gatttggctgcaggattggagtatcaggccttcaatcctgaaaagattttgaggaagttg 180
 |||
 VL2 121 gatttggctgcaggattggagtatcaggccttcaatcctgaaaagattttgaggaagttg 180
 |||
 NT1 181 attgcatcctcaacttcattggatgactttgttaaggatatgcgtgacctcttgggtggcc 240
 |||
 VL2 181 attgcatcctcaacttcattggatgactttgttaaggatatgcgtgacctcttgggtggcc 240
 |||
 NT1 241 aggtacaccagaggaactagcttcttgttcaatgctaaaaactcaattgagaaagcaaag 300
 |||
 VL2 241 aggtacaccagaggaactagcttcttgttcaatgctaaaaactcaattgagaaagcaaag 300
 |||
 NT1 301 gataagaagaaggctgaagctattcaggtactgataaataggtacggagtaaaaaagaat 360
 |||
 VL2 301 gataagaagaaggctgaagctattcaggtactgataaataggtacggagtaaaaaagaat 360
 |||
 NT1 361 gctggtgacaatgctgttgatcaagccactttgggaaggataagtcaagtgttggcatat 420
 |||
 VL2 361 gctggtgacaatgctgttgatcaagccactttgggaaggataagtcaagtgttggcatat 420
 |||
 NT1 421 atggccttgagagttgctttacaaatcacagactatcataagccaatcataccattgaga 480
 |||
 VL2 421 atggccttgagagttgctttacaaatcacagactatcataagccaatcataccattgaga 480
 |||
 NT1 481 cccattagtagcgttgatataaagaatgctatcattgatgttgttccacaattcttatat 540
 |||
 VL2 481 cccattagtagcgttgatataaagaatgctatcattgatgttgttccacaattcttatat 540
 |||
 NT1 541 cttaaagcagatcaacttgattcaaagaccaactcagaggcagccctgtatgtaatccat 600
 |||
 VL2 541 cttaaagcagatcaacttgattcaaagaccaactcagaggcagctctgtatgtaatccat 600
 |||
 NT1 601 ttgtgttaccaagtctgtgtgtctgaaagaatcatgactaaagctcagaaagataagcac 660
 |||
 VL2 601 ttgtgttaccaagtctgtgtgtctgaaagaatcatgactaaagctcagaaagataagcac 660
 |||
 NT1 661 ggtgttcacactaagtcagcaatgataacacactgcatgggttttgtcaatctggctatg 720
 |||
 VL2 661 ggtgttcacactaagtcagcaatgataacacactgcatgggttttgtcaatctggctatg 720
 |||
 NT1 721 gataattcttcagtagtgtctgatgataagatagctggtagaaggatgatctcaggtcca 780
 |||
 VL2 721 gataattcttcagtagtgtctgatgataagatagctggtagaaggatgatctcaggtcca 780
 |||

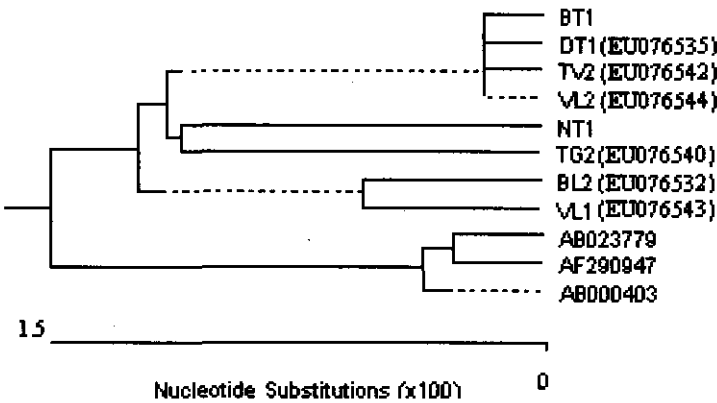
NT1	781	tggggactacaggaaactgctctagatgccacaggctgcgcatgtatcattgatgttggt	840
VL2	781	tggggactacaggaaactgctctagatgccacaggctgcgcatgtatcattgatgttggt	840
NT1	841	gatttctgctgcaggggacacaaagtaacagatgctgtggcgccagttcggctgttcaga	900
VL2	841	gatttctgctgcaggggacacaaagtaacagatgctgtggcgccagttcggctgttcaga	900
NT1	901	ttagctattgagtgcataaaaagacacagctgatctgaaggatgctggaggtcaaattgaag	960
VL2	901	ttagctattgagtgcataaaaagacacagctgatctgaaggatgctggaggtcaaattgaag	960
NT1	961	actctgggttgataagtga	978
VL2	961	actctgggttgataagtga	978

Hình 6. Trình tự gen NCP của virus RGSV phân lập tại tỉnh Ninh Thuận so sánh với trình tự gen NCP của dòng virus phân lập tại tỉnh Vĩnh Long (VL2, EU076544).

So sánh trình tự gen NCP của RGSV với các chủng của Việt Nam và thế giới

Cây phát sinh chủng loại được xây dựng theo phương pháp Maximum Parsimony (MP) sử dụng kết quả so sánh ClustalX các trình tự NCP của hai tỉnh Ninh Thuận, Bình Thuận với một số trình tự NCP đại diện cho các dòng RGSV khác nhau tại Việt Nam và trên thế giới (Hình 7). Trên cây phát

sinh chủng loại, các dòng RGSV của Bình Thuận (BT1) có độ tương đồng cao nhất so với các dòng của Đồng Tháp (DT1), Trà Vinh (TV2) và Vĩnh Long (VL2). Trong khi đó, các dòng RGSV của Ninh Thuận có độ tương đồng cao nhất so với các dòng của Tiền Giang (TG2). Cũng tương tự với các dòng RGSV ở các tỉnh ĐBSCL, các dòng tại Bình Thuận và Ninh Thuận cũng khác với nhóm của các dòng trên thế giới (Hình 7).



Hình 7. Cây phát sinh chủng loại MP (Maximum Parsimony) xây dựng dựa trên việc so sánh 2 trình tự gen NCP của RGSV tại Bình Thuận (BT1) và Ninh Thuận (NT1) với các trình tự của RGSV tại Bạc Liêu (BL2, EU076532); Vĩnh Long (VL1, EU076543 và VL2, EU076544); Đồng Tháp (DT1, EU076535); Tiền Giang (TG2, EU076540); Trà Vinh (TV2, EU076542); và RGSV thế giới (AB000403, AB023779, AF290947) [Nucleotide Substitutions: Tỷ lệ nucleotide khác nhau].

KẾT LUẬN

Bằng kỹ thuật RT-PCR, chúng tôi đã phát hiện gen mã hóa protein vỏ (NCP) của virus gây bệnh vàng lùn (RGSV) ở mẫu lúa thu tại 2 tỉnh Ninh Thuận và Bình Thuận, nhưng không phát hiện được tại Bình Định, Phú Yên và Khánh Hòa. Gen mã hóa NCP của RGSV tại Ninh Thuận và Bình Thuận đã được tách dòng và xác định được trình tự. Độ tương đồng về trình tự nucleotide của các chủng RGSV tại 2 tỉnh Ninh Thuận và Bình Thuận rất cao so với các chủng tại ĐBSCL, cho thấy các chủng virus RGSV xuất hiện tại các tỉnh Nam Trung Bộ có thể có nguồn gốc từ các tỉnh ĐBSCL

Lời cảm ơn: Chúng tôi xin chân thành cảm ơn Phòng Thí nghiệm trọng điểm Công nghệ gen, Viện Công nghệ sinh học đã thực hiện việc giải trình tự DNA. Công trình hoàn thành với kinh phí của đề tài độc lập cấp Nhà nước (2007 - 2010): "Nghiên cứu đặc tính sinh học của virus gây bệnh và môi giới truyền bệnh vàng lùn, lùn xoắn lá và các biện pháp quản lý tổng hợp cây trồng (ICM) trong sản xuất lúa".

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn (2008) *Báo cáo tình hình dịch rầy nâu, bệnh vàng lùn, lùn xoắn lá*. số 124/BNN-BVTV-BCĐ-TB. Tháng 09 năm 2008.
- Chi cục Bảo vệ thực vật thành phố Hồ Chí Minh (2006) <http://www.mard.gov.vn/ppdhcmc/HTML/Tailieukit/lua-benhvanglun.htm>
- Chomchan P, Li SF, Shirako Y (2003) Rice grassy stunt tenuivirus nonstructural protein p5 interacts with itself to form oligomeric complexes *in vitro* and *in vivo*. *J Virol* 77: 769-775.
- Chomchan P, Miranda GJ, Shirako Y (2002) Detection of rice grassy stunt tenuivirus nonstructural proteins p2, p5 and p6 from infected rice plants and from viruliferous brown planthoppers. *Arch Virol* 147: 2291-2300.
- Druka A, Burns T, Zhang S, Hull R (1996) Immunological characterization of rice tungro spherical virus coat proteins and differentiation of isolates from the Philippines and India. *J Gen Virol* 77: 1975-1983.
- Heydarnejad J, Barclay W S, Izadpanah K, Hunter F R (2006) Gooding Molecular characterization of Iranian wheat stripe virus shows its taxonomic position as a distinct species in the genus *Tenuivirus*. *Arch Virol* 151: 217-227.
- Jones MC, Gough K, Dasgupta I, Rao BL, Cliffe J, Qu R, Shen P, Kaniewska M, Blakebrough M, Davies JW, Beachy RN, Hull R (1991) Rice tungro disease is caused by an RNA and a DNA virus. *J Gen Virol* 72: 757-761.
- Li Z, Upadhyaya NM, Koshitratana W (1996) Genome segment 5 of rice ragged stunt virus encodes a virion protein. *J Gen Virol* 77: 3155-3160.
- Milne R, Ling K (1982) Rice ragged stunt virus. CMI/AAB Descr. *Plant Vir* 248: 5.
- Miranda JG, Azzam O, Shirako Y (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.
- Murphy FA, Fauquet CM, Bishop DHL, Ghabrial SA, Jarvis AW, Martelli GP, Mayo MA, Summers MD (1995) *Virus Taxonomy. Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, 316-318. Vienna & New York: Springer-Verlag.
- Ngô Vĩnh Viễn (2007) Kết quả nghiên cứu và xây dựng mô hình phòng chống rầy nâu, bệnh vàng lùn, lùn xoắn lá tại Long An và Bến Tre, vụ Đông Xuân 2006 - 2007. *Hội nghị toàn quốc tổng kết công tác bảo vệ thực vật năm 2006, kế hoạch năm 2007. Hà Nội, tháng 4 năm 2007*.
- Nguyen HM, Nguyen NT, Hoang HTT, Chu HH, Le TB (2007) RGSV NCP gene on Genbank with accession numbers EU076537, EU076538, EU076533, EU076534, EU076531, EU076532, EU076543, EU076544, EU076535, EU076536, EU076539, EU076540, EU076541, EU076542.
- Nguyễn Trung Nam, Nguyễn Minh Hùng, Chu Hoàng Hà, Hoàng Thị Thu Hằng, Lê Trần Bình (2007) Đánh giá đa dạng di truyền các dòng virus gây bệnh lùn lúa cỏ tại các tỉnh Đồng bằng sông Cửu Long. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 5: 479-484.
- Nguyễn Văn Đức Tiến (2007) Những bệnh nguy hiểm có liên quan đến rầy gây hại trên lúa <http://www.mard.gov.vn/ppdhcmc/HTML/Tin/tin-benhlua.htm>
- Ou SH, Rivera CT (1969) *The Virus Diseases of the Rice Plant*. Johns Hopkins Publisher 354.
- Pham VD, Cabunagan RC, Choi IR (2005) Rice Yellowing Syndrome in Mekong River Delta. *OMonrice* 13: 135-138
- Phạm Văn Dư (2006) Bệnh vàng lùn tại đồng bằng sông Cửu Long <http://www.clrri.org/benhvanglun/tech/benhvanglun.2006.htm>
- Phan Trọng Hoàng, Nông Văn Hải, Lê Trần Bình, Chu

Hoàng Hà (2005) Sử dụng enzyme *XcmI* để thiết kế vector pBT phục vụ tách dòng và đọc trình tự gen. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 3: 459-463.

Shen P, Kaniewska M, Smith C, Beachy RN (1993) Nucleotide sequence and genomic organization of rice tungro spherical virus. *Virology* 193: 621-630.

Toriyama S, Kimishima T, Takahashi M (1997) The proteins encoded by rice grassy stunt virus RNA5 and RNA6 are only distantly related to the corresponding proteins of other members of the genus *Tenuivirus*. *J*

Gen Virol 78: 2355-2363.

Toriyama S, Kimishima T, Takahashi M, Shimizu T, Minaka N, Akutsu K (1998) The complete nucleotide sequence of the rice grassy stunt virus genome and genomic comparisons with viruses of the genus *Tenuivirus*. *J Gen Virol* 79: 2051-2058.

Zhang S, Jones MC, Barker P, Davies JW, Hull R (1993) Molecular cloning and sequencing of coat protein encoding cDNA of rice tungro spherical virus - a plant picornavirus. *Virus Genes* 7: 121-132.

GENETIC RELATIONSHIP OF RICE GRASSY STUNT VIRUS STRAINS ISOLATED FROM THE SOUTHERN CENTRAL PROVINCES

Nguyen Ngoc Son¹, Hoang Thi Thu Hang², Dang Thi Lan Anh³, Nguyen Nhu Cuong³, Nguyen Huu Cuong², Chu Hoang Ha², Le Tran Binh², Nguyen Trung Nam^{2,*}

¹Thai Nguyen University

²Institute of Biotechnology

³National Institute of Plant Protection

SUMMARY

From the year 2006 - 2008, the situation of infected pests and viruses causing destruction on rice has become a danger to the Cuu Long River Delta (CLRD), where rice output is the largest nationwide. According to the latest figures in 2008, on the autumn-winter rice in provinces of CLRD, the total pest-infected area are is 25,198 ha, of which the area of virus-infected rice is 3546.8 ha. Viral disease caused by the combination of from one to three types of viruses, including: Rice Grassy Stunt Virus (RGSV) belonging to *Tenuivirus*, Rice Ragged Stunt Virus (RRSV), the standard species of *Oryzavirus*, and Rice Tungro Spherical Virus (RTSV) belonging to *Waikavirus*. In 2007, the genetic variations of some virus strains in CLRD provinces have initially been investigated and evaluated. In this current study, for the first time, the rice samples suspected with viral infection in the provinces of Southern Central area have been collected to test the presence of the virus in this region, contributing to the forecast, updated figures and the strategy coping with this disease that tends to spread in the Southern Central area. Using RT-PCR with specific primers for RGSV, RRSV and RTSV, we have detected the presence of NCP-coding gene of RGSV in 2 provinces Ninh Thuan and Binh Thuan in total 5 investigated provinces. However, we do not see the presence of RRSV and RTSV in this area. The high conservation of nucleotide sequence of RGSV in 2 provinces of Southern Central area compared with virus strains in CLRD showed that RGSV strains appearing in Southern Central area could be originated from the CLRD area.

Keywords: Genetic variation, NCP gene, rice grassy stunt virus disease, RT-PCR

* Author for correspondence: Tel: 84-4-37562368; E-mail: nam@ibt.ac.vn