

NGHIÊN CỨU XÂY DỰNG QUI TRÌNH CHẨN ĐOÁN VIRUS GÂY BỆNH LÙN SỌC ĐEN Ở VIỆT NAM BẰNG KỸ THUẬT SINH HỌC PHÂN TỬ

PGS.TS. Phạm Xuân Hội
Viện Di truyền Nông nghiệp

SUMMARY

Study on diagnostic protocol of virus causing rice black streaked dwarf disease in Vietnam by molecular techniques

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). S7, S9 and S10 segments corresponding to the 2.2, 1.8 and 1.75 kb fragments respectively from 1% agarose gel were excised and passed through gel extraction column. RT-PCR using primer pairs matched to both 3' and 5' ends sequence of S7, S9 and S10 segments of China isolates (EU523360, EU784840) resulted in amplification of S7, S9 and S10 segment cDNA products. RT-PCR products were cloned into pJET1.2 vector using CloneJET™ PCR Cloning Kit and the complete nucleotide sequence of S7, S9 and 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 Genbank (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. S9 segments shares 98.5 - 99.6 % nucleotide identities, while S7 segments shares 98.8 - 99.7 % nucleotide identities. These sequences of S7 and S9 segments are being for sequencing analysis.

Keywords: Identities, nucleotide sequences, S7 segment, S9 segment, S10 segment, SRBSDV, Vietnam.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ*

Virus LSDPN có tên khoa học là *Southern rice black-streaked dwarf virus*, SRBSDV, 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 có kích thước khoảng 1.8 kb mang gen mã hóa protein lớp vỏ ngoài qui định tính đặc hiệu vector của virus (Hogenhout *et al.*, 2008). Virus LSDPN lan truyền nhờ rầy lưng trắng và rầy nâu nhỏ, gây bệnh trên lúa với triệu chứng đặc trưng là cây lùn, lá xanh đậm, xoắn đầu lá, rách mép lá và đặc biệt có những u sập màu trắng đến đen chạy dọc các đường gân ở mặt sau lá, bẹ lá hoặc các đốt thân (Zhang *et al.*, 2008).

Virus LSDPN được phát hiện lần đầu tiên vào năm 2001 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 nghìn ha, trong đó hơn 8 nghìn ha bị bệnh rất nặng và có khả năng mất trắng (Hà Việt 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 nghìn ha, trong đó diện tích phải nhổ tỉa là 9.000ha và phải tiêu hủy là 1.700ha.

Mặc dầu nguyên nhân gây bệnh lúa lùn sọc đen đã được xác định và quy trình chẩn đoán bằng RT-PCR đã bước đầu được thiết lập ở các cơ sở nghiên cứu như Cục Bảo vệ thực vật, viện Bảo vệ thực vật và Trường Đại học nông nghiệp I. Tuy nhiên công tác chẩn đoán vẫn còn lúng túng và phụ

Người phản biện: PGS.TS. Nguyễn Văn Việt.

thuộc quá nhiều vào nghiên cứu của nước ngoài nên kết quả chẩn đoán không nhạy và nhiều khi không thống nhất giữa các cơ sở nghiên cứu. Với tình hình thực tế trên, Phòng Bệnh học Phân tử, Viện Di truyền Nông nghiệp đã được chương trình trọng điểm phát triển và ứng dụng Công nghệ sinh học trong lĩnh vực Nông nghiệp-Bộ NN&PTNN giao nhiệm vụ thực hiện đề tài “Nghiên cứu xây dựng qui trình chẩn đoán virus gây bệnh lùn sọc đen ở Việt nam bằng kỹ thuật sinh học phân tử”. Đề tài thực hiện trong thời gian 36 tháng, từ tháng 9/2011 đến tháng 8/2014, với tổng kinh phí được cấp là 3,6 tỷ đồng. Mục tiêu chung của đề tài là xây dựng thành công quy trình chẩn đoán chính xác virus gây bệnh lùn sọc đen ở Việt Nam bằng kỹ thuật RT-PCR và thăm dò khả năng chẩn đoán bằng kỹ thuật kháng nguyên kháng thể.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Các mẫu lúa có triệu chứng nhiễm bệnh LSD 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 và duyên hải miền Trung như: Thanh Hóa, Nghệ An, Hà Tĩnh, Quảng Bình, Quảng Trị, Huế...

Các kit dòng hóa như CloneJET™ PCR Cloning Kit, InstAclone PCR Cloning Kit (Thermo Scientific); các kit tinh chiết RNA từ thực vật như TriPure (Roche); các kit tinh sạch DNA như GenJET™ Gel Extraction (Thermo Scientific), PureLink™ Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen); các enzyme như Dream Taq DNA polymerase (Thermo Scientific), Reverse Transcriptase: Kit Super Script III (Invitrogen).

Các hóa chất và dụng cụ tiêu hao: bột cellulose CF11, SDS, Phenol, bản ELISA, ống PCR 0,2 ml, đầu tip 2, 20, 200 và 1000 µl, chày cối sứ...

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Tách chiết dsRNA tổng số của virus

dsRNA tổng số của virus được tách từ mẫu bệnh theo phương pháp của Dodds *et al.*, 1984. Ngoài ra, dsRNA tổng số của virus từ RNA tổng số cây nhiễm bệnh cũng được tinh chiết dùng kit TriPure (Roche) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

2.2.2. Tổng hợp cDNA sợi đơn từ RNA sợi đôi

- Theo hướng dẫn của nhà sản xuất kit

2.2.3. Nhân bản các phân đoạn S7, S9 và S10 bằng kỹ thuật PCR

Phản ứng PCR nhân các phân đoạn S7, S9 và S10 sử dụng sợi khuôn là sản phẩm phản ứng sinh tổng hợp cDNA từ RNA sợi đôi virus và cặp môi được thiết kế từ trình tự virus LSDPN ở Trung quốc đã công bố trên GenBank (EU523360, EU784840).

Phản ứng PCR được tiến hành với chu kỳ nhiệt: 94°C/5 phút, 30 chu kỳ (94°C/30 giây, 55°C/45 giây, 72°C/120 giây) và kéo dài 72°C/7 phút.

2.2.4. Điện di DNA trên gel agarose 1%.

Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1% trong đệm TAE 1X, nhuộm gel trong dung dịch ethidium bromide.

2.2.5. Tinh sạch DNA/dsRNA từ gel agarose bằng bộ kit Fermentas.

DNA/dsRNA từ gel agarose được tinh sạch bằng Bộ kit GenJET™ Gel Extraction, quá trình tinh sạch theo quy trình của nhà sản xuất kit.

2.2.6. Nhân dòng sản phẩm PCR bằng bộ kit CloneJET™ PCR cloning/pGEMT-Easy cloning

2.2.6.1. Phản ứng gắn sản phẩm PCR vào vector pJET 1.2/pGEMT.

Sản phẩm PCR là các phân đoạn S7, S9 và S10 của các chủng viuss gây bệnh lúa lùn sọc đen từ các vùng sinh thái khác nhau được gắn vào các vector pJET 1.2 và pGEMT theo quy trình của nhà sản xuất kit.

2.2.6.2. Biến nạp DNA vào tế bào khả biến *E.coli* chủng DH5α.

Tế bào khả biến *E.coli* DH5α (bảo quản trong tủ lạnh sâu -80°C) được làm tan trên đá trong 10 phút. Tiếp đó, 10 µl hỗn hợp phản ứng gắn sản phẩm PCR vào vector pJET 1.2 được bổ sung vào dung dịch tế bào đã rã đông và ủ trên đá 20 phút để tạo điều kiện cho vector bám vào thành tế bào. Tế bào được sốc nhiệt bằng cách chuyển sang bể ổn nhiệt 42°C trong 45 giây, sau đó được chuyển lại ủ trên đá trong 2 phút. Tiếp theo, 450µl LB lỏng được bổ sung vào hỗn hợp biến nạp và ủ ở nhiệt độ 37°C trong vòng 20 phút trước khi được nuôi lắc với tốc độ 220 vòng/phút trong thời gian 30 phút. Hỗn hợp tế bào biến nạp được cấy trải trên đĩa môi trường LB đặc có bổ sung ampicillin 100 µg/ml và ủ ở 37°C qua đêm.

2.2.7. Tinh sạch plasmid từ vi khuẩn *E.coli* bằng bộ kit GenJET™ Plasmid Miniprep.

DNA tái tổ hợp được tinh sạch từ tế bào vi khuẩn *E. coli* bằng bộ kit GenJET™ Plasmid Miniprep (Fermentas). Plasmid được tinh sạch theo quy trình nhà sản xuất kit.

2.2.8. Giải và Phân tích trình tự

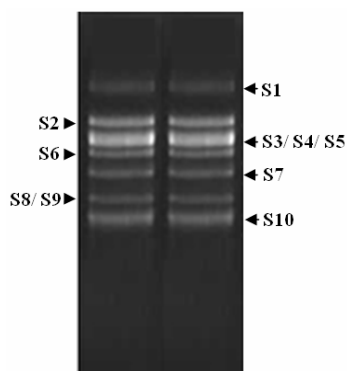
Các phân đoạn S7, S9 và S10 trong các plasmid được giải trình tự bằng máy tự động và trình tự được phân tích bằng các phần mềm BioEdit, Blast, Clustal2.1, MEGA5.1.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân lập ba phân đoạn S7, S9, S10 của SRBSDV

3.1.1. Phân lập hệ gen của SRBSDV

13 mẫu lúa bệnh thu được từ các vùng dịch đại diện cho các vùng sinh thái, sau khi sàng lọc để chọn ra các mẫu dương tính với SRBSDV, được sử dụng để phân lập hệ gen của SRBSDV.



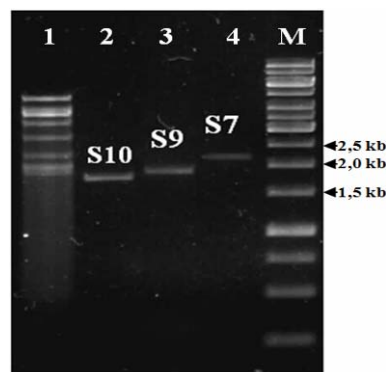
Hình 1. Kết quả điện di genome của SRBSDV phân lập ở các tỉnh Bắc Trung bộ

Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm RNA sợi đôi tinh sạch trên gel agarose 1% (chạy 100V trong 1 giờ phút) trong hình 1 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 1). So sánh với hình ảnh điện di genome SRBSDV di trên agarose của Zhou *et al.* (2008) có thể thấy hệ gen của SRBSDV đã phân lập thành công.

3.1.2. Phân lập ba phân đoạn S10, S9 và S7 của SRBSDV thu thập từ mẫu lúa bệnh

Hệ genome SRBSDV được điện di trên gel agarose 1% để phân tách hoàn toàn các phân đoạn RNA của virus. Các băng RNA có kích thước

1800, 1900 và 2176 bp, tương ứng với kích thước lý thuyết của các phân đoạn S10, S9, S7 được cắt chính xác và tinh sạch bằng bộ kit Gel Extraction Kit (Fermentas). Sản phẩm RNA tinh sạch được tiếp tục điện di kiểm tra trên gel agarose 1%.



Hình 2. Kết quả điện di 3 phân đoạn S10, S9 và S7 phân lập được của SRBSDV thu thập ở Bắc Trung bộ trên gel agarose 1%. Giếng 1: Genome SRBSDV; Giếng 2: Phân đoạn S10; Giếng 3: Phân đoạn S9; Giếng 4: Phân đoạn S7

Kết quả thu được trên hình 2 cho thấy 3 băng RNA có kích thước khoảng 1800, 1900 và 2176 bp, tương ứng với kích thước lý thuyết của 3 phân đoạn S10, S9 và S7 (hình 2, giếng 2-4). Kết quả này chứng tỏ 3 phân đoạn S10, S9 và S7 của SRBSDV đã được phân lập thành công từ các mẫu lúa dương tính với bệnh lùn sọc đen phương Nam thu thập từ các vùng dịch.

3.2. Thiết kế các cặp mồi đặc hiệu cho phản ứng RT-PCR nhân bản 3 phân đoạn S7, S9, S10

Dựa trên các trình tự của các phân đoạn S7, S9 và S10 của virus LSD đã công bố trên Genebank để phân tích mức độ tương đồng, so sánh và chọn lựa vùng bảo thủ trong hệ genome của virus LSD, từ đó thiết kế các cặp mồi đặc hiệu cho phép nhân bản toàn bộ các phân đoạn (bao gồm cả khung đọc mở và vùng không dịch mã). Các cặp oligo có kích thước 25 Nucleotit, nằm trên vùng bảo thủ của các phân đoạn S7, S9 và S10, có hàm lượng GC cao được sinh tổng hợp tại công ty Sigma. Trình tự của các cặp oligo được trình bày trong bảng 2.

3.3. Dòng hóa ba phân đoạn S7, S9 và S10 của virus SRBSDV tại Việt Nam

3.3.1. Tổng hợp cDNA sợi đơn các phân đoạn S10, S9 và S7 của virus SRBSDV

Sử dụng các cặp oligo đã thiết kế đặc hiệu cho từng phân đoạn (bảng 2), cDNAsợi 1 được

tổng hợp từ RNA sợi đôi của các phân đoạn S7, S9 và S10 đã phân lập được trước đó từ hệ gen của virus LSD. Quy trình phản ứng tổng hợp DNAc được sử dụng chung cho cả 3 phân đoạn S7, S9 và S10 được mô tả như ở mục 5.2.2. Sản phẩm phản ứng được sử dụng trực tiếp để làm khuôn cho phản ứng PCR khuếch đại các đoạn trình tự đặc hiệu.

Bảng 1. Trình tự các cặp mồi đặc hiệu nhân bản 3 phân đoạn S7, S9, S10

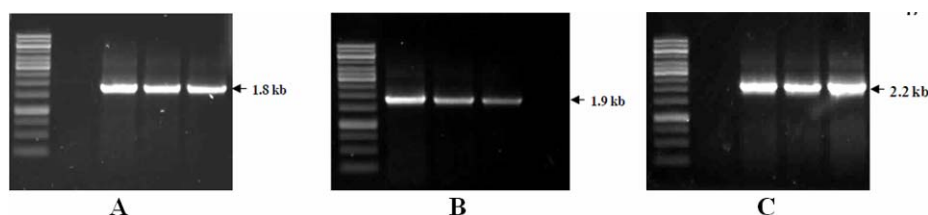
Tên mồi	Trình tự
S7-Fw	AAGTTTTTTTCGACCTGTCTGGACC
S7-Rv	GTCAAGGTCGAAATGCAGCTGATGTC
S9-Fw	AAGTTTTTAAGCCTGGAAGTACGACAC
S9-Rv	CTCAAGCCGGCTTACAGCTGATGTC
S10-Fw	AAGTTTTTTTCCTCATCCATAATGG
S10-Rv	GCTAGGGGGAAAGCAGCTGATGTC

3.3.2. Nhân bản các phân đoạn S10, S9 và S7 virus SRBSDV

Sử dụng sản phẩm của phản ứng tổng hợp sợi 1 DNAc, các phân đoạn S10, S9 và S7 được nhân bản bằng phản ứng PCR với các cặp mồi đặc hiệu cho từng phân đoạn (bảng 1). Phản ứng PCR được thực hiện với chu trình nhiệt và thành phần phản ứng mô tả như ở mục 5.2.2.

Sản phẩm PCR sau đó được điện di trên gel agarose 1%, kết quả đã thu được các băng DNA có kích thước 1,8 kb (hình 3A), 1,9 kb (hình 3B) và 2,2 kb (hình 3C) - tương ứng với kích thước lí thuyết của các phân đoạn S10, S9 và S7.

Kết quả thu được này chứng tỏ đã nhân bản thành công 3 phân đoạn S10, S9 và S7 của virus LSD tách chiết từ các mẫu lúa nghi nhiễm bệnh thu được tại vùng dịch bằng phản ứng RT-PCR với cặp mồi đặc hiệu đã thiết kế cho từng phân đoạn.

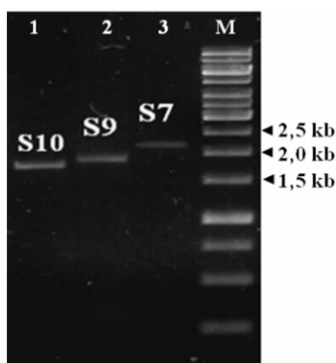


Hình 3. Kết quả điện di sản phẩm PCR nhân bản các phân đoạn S10, S9 và S7 từ các mẫu lúa khác nhau. A: phân đoạn S10; B: phân đoạn S9 và C: phân đoạn S7

3.3.3. Tinh sạch sản phẩm PCR nhân bản phân đoạn S7, S9, S10 của SRBSDV bằng bộ kit Fermentas

Sản phẩm PCR nhân bản 3 phân đoạn S7, S9 và S10 trên gel agarose 1%, tương ứng với các băng DNA có kích thước 1,8 kb, 1,9 kb và 2,2 kb được cắt chính xác khỏi bản gel agarose và tinh sạch bằng bộ kit GenJET™ Gel Extraction

(Fermentas) theo quy trình của nhà sản xuất nhằm loại bỏ toàn bộ các thành phần dư thừa của phản ứng PCR. Sản phẩm DNA tinh sạch tiếp tục được điện di kiểm tra trên gel agarose 1%. Kết quả thu được trên hình 4 cho thấy đã thu được sản phẩm DNA hoàn toàn tinh sạch, có kích thước đúng với kích thước tính toán lí thuyết của các phân đoạn S10, S9 và S7.



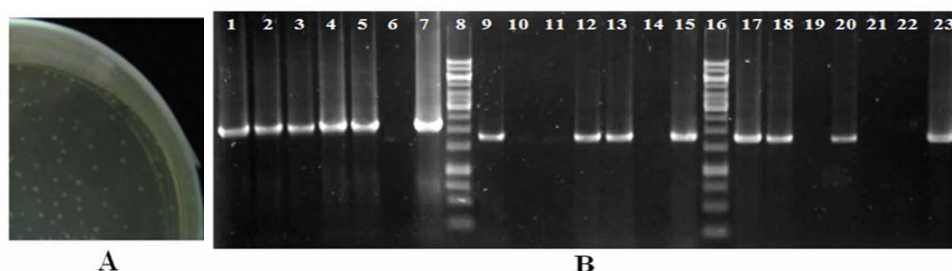
Hình 4. Kết quả điện di mẫu tinh sạch sản phẩm PCR nhân bản 3 phân đoạn S10, S9 và S7 của SRBSDV thu thập ở các tỉnh miền núi phía Bắc trên gel agarose 1%.

3.3.4. Nhân dòng các phân đoạn S10, S9 và S7 vào vector nhân dòng và biến nạp vào tế bào *E. coli* chủng DH5α

Trong thí nghiệm này, 3 phân đoạn S10, S9 và S7 được dòng hóa vào 2 hệ vector nhân dòng pGEMT (phân đoạn S9 và S7) và pJET1.2 (phân đoạn S10). Các vector nhân dòng này được thiết kế có chứa điểm khởi đầu sao chép nên có khả năng sao chép độc lập với hệ gen của tế bào chủ *E. coli*, đồng thời chứa gen chỉ thị kháng kháng sinh Ampicillin, cho phép chọn lọc các thể biến nạp mang vector này trên môi trường nuôi cấy có Ampicillin.

Ngoài ra, vector nhân dòng còn chứa gen chọn lọc giúp phân biệt các thể biến nạp mang plasmid tái tổ hợp và plasmid tự đóng vòng.

Phản ứng gắn sản phẩm PCR vào vector nhân dòng được thực hiện theo quy trình kèm theo của nhà sản xuất. Hỗn hợp phản ứng gắn được biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* chủng DH5α bằng phương pháp sốc nhiệt. Kết quả biến nạp sản phẩm PCR vào tế bào *E. coli* trên hình 5A cho thấy có nhiều khuẩn lạc (có khả năng mang vector tái tổ hợp) xuất hiện trên môi trường chọn lọc có bổ sung ampiciline 100 µg/ml.



Hình 5. Kết quả biến nạp sản phẩm phản ứng gắn vào *E. coli*. A: Kết quả biến nạp sản phẩm gắn vào vi khuẩn *E. coli* và cấy trải trên môi trường nuôi cấy có bổ sung ampicillin 100 µg/ml. B: Kết quả điện di sản phẩm PCR từ các khuẩn lạc với cặp mồi đặc hiệu của từng phân đoạn. Giếng 1-5 khuẩn lạc mang phân đoạn S7; giếng 9-13: Khuẩn lạc mang phân đoạn S9; giếng 17-21: Khuẩn lạc mang phân đoạn S10. Giếng 6, 14 và 22: đối chứng âm (không có DNA khuôn); giếng 7, 15 và 23: đối chứng dương (khuôn là cDNA).

Để kiểm tra các khuẩn lạc có mang plasmid tái tổ hợp chứa các phân đoạn S7, S9 và S10 hay không, một số khuẩn lạc trên đĩa thạch nuôi cấy được chọn ngẫu nhiên để tiến hành PCR với cặp mồi đặc hiệu của từng phân đoạn. Kết quả điện di sản phẩm PCR trên gel agarose 1% cho thấy, với cả các phản ứng sử dụng khuôn là khuẩn lạc đã cho các băng DNA có kích thước khoảng 2,2 kb (hình 5B, giếng 2-5), 1,9 kb (hình 5B, giếng 9, 12 và 13) và 1,8 kb (hình 5B, giếng 17, 18 và 20), tương tự như kích thước băng DNA trên đường chạy điện di sản phẩm của phản ứng đối chứng dương sử dụng cDNA làm khuôn (hình 5B, giếng 7, 15 và 23). Ngược lại, với sản phẩm của phản ứng đối chứng âm không sử dụng DNA khuôn (hình 5B, giếng 6, 14 và 22) không cho băng DNA nào. Kết quả này cho phép bước đầu kết luận đã thu nhận được các khuẩn lạc dương tính mang plasmid tái tổ hợp có chứa các phân đoạn S7, S9 và S10.

3.4. Tinh sạch plasmid tái tổ hợp mang trình tự của phân đoạn S9, S10 và S7

3.4.1. Tinh sạch plasmid tái tổ hợp từ tế bào *E. coli* bằng bộ kit Fermentas

Các dòng khuẩn lạc dương tính được nuôi cấy và tách chiết plasmid theo quy trình của bộ kit GenJET™ Plasmid Miniprep (mục 5.2.7). Plasmid tinh sạch sau khi được điện di kiểm tra trên gel agarose 1%, kết quả chứng tỏ đã thu được plasmid hoàn toàn tinh sạch, không bị lẫn RNA.

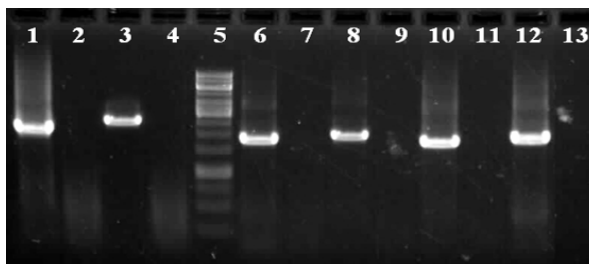
3.4.2. Kiểm tra sự có mặt của mỗi phân đoạn trong plasmid tái tổ hợp

Để tiếp tục khẳng định sự có mặt của các phân đoạn S7, S9 và S10 trong các vector nhân dòng, plasmid tinh sạch được kiểm tra bằng phản ứng PCR và phản ứng cắt enzyme giới hạn.

3.4.2.1. Kiểm tra sự có mặt các phân đoạn trong plasmid tái tổ hợp bằng PCR

Sản phẩm plasmid tinh sạch được sử dụng làm khuôn cho phản ứng PCR với hai cặp mồi

khác nhau: cặp mồi đặc hiệu của từng phân đoạn và cặp mồi đặc hiệu của vector. Trong đó, cặp mồi vector là hai trình tự nằm trên vector nhân dòng, có khoảng cách khoảng 100 bp.

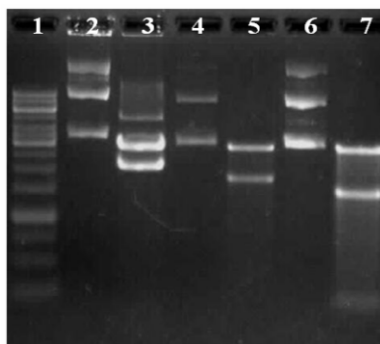


Hình 6. Kết quả điện di sản phẩm PCR kiểm tra plasmid tái tổ hợp mang các phân đoạn S7 (giếng 1-4), S9 (giếng 6-9) và S10 (giếng 10-13). Giếng 1, 2, 6, 7, 10 và 11: PCR với cặp mồi đặc hiệu của từng phân đoạn S7, S9 và S10. Giếng 3, 4, 8, 9, 12 và 13: PCR với cặp mồi vector. Giếng 1, 3, 6, 8, 10 và 12: Khuôn là plasmid tái tổ hợp. Giếng 2, 4, 7, 9, 11, và 13: đối chứng âm không sử dụng DNA khuôn

Kết quả điện di sản phẩm PCR trên gel agarose 1% ở hình 6 cho thấy sản phẩm PCR với cặp mồi đặc hiệu của từng phân đoạn cho một băng DNA có kích thước khoảng 2,2 kb, 1,9 kb và 1,8 kb (hình 6, giếng 1, 6 và 10), tương ứng với kích thước tính toán lý thuyết của các phân đoạn S7, S9 và S10. Sản phẩm PCR với cặp mồi vector khi điện di trên gel agarose 1% cho một băng DNA có kích thước khoảng 2,3 kb, 2,0 kb và 1,9 kb (hình 6, giếng 3, 8 và 12), kích thước này phù hợp với kích thước đoạn DNA theo tính toán lý thuyết cộng với 100 bp của plasmid. Đối với các phản ứng đối chứng âm không sử dụng DNA khuôn không cho băng DNA nào (hình 6, giếng 2, 4, 7, 9, 11 và 13). Kết quả này cho phép khẳng định plasmid tinh sạch được là plasmid tái tổ hợp mang các phân đoạn S7, S9 và S10 phân lập được từ genome của SRBSDV.

b/Kiểm tra sự có mặt các phân đoạn S7, S9 và S10 trong plasmid tái tổ hợp bằng cách xử lý với enzyme cắt giới hạn 3.4.2.2.

Để khẳng định chắc chắn đoạn DNA đã được chèn vào vector nhân dòng là các phân đoạn S7, S9 và S10, thí nghiệm cắt giới hạn plasmid tái tổ hợp tinh sạch từ khuẩn lạc dương tính tiếp tục được thực hiện. Theo lý thuyết, trên vector pJET1.2 có hai vị trí cắt giới hạn của *Bgl*II và vector pGEMT có hai vị trí cắt giới hạn của *Eco*RI nằm trong vùng đa điểm cắt. Như vậy, khi được xử lý bằng *Bgl*II (vector pJET1.2) hay *Eco*RI (vector pGEMT), vector tái tổ hợp sẽ bị cắt thành 2 đoạn DNA, 1 đoạn chính là phân đoạn S7, S9 được chèn vào và 1 đoạn là bộ khung vector có kích thước 3 kb. Với phân đoạn S10, do trong trình tự có mang 1 vị trí nhận biết của enzyme *Eco*RI tại vị trí 1548 nên khi xử lý vector tái tổ hợp mang phân đoạn S10 bằng *Eco*RI, vector tái tổ hợp sẽ bị cắt thành 3 đoạn DNA có kích thước lần lượt là 3 kb, 1,55 kb và 0,25 kb.



Hình 7. Kết quả điện di sản phẩm cắt giới hạn vector tái tổ hợp mang các phân đoạn S7 (giếng 2, 3), S9 (giếng 4, 5) và S10 (giếng 6, 7) bằng enzyme *Bgl*II (pJET1.2) hoặc *Eco*RI (pGEMT). Giếng 1: Thang DNA chuẩn 1 kb; giếng 2, 4, 6: vector tái tổ hợp nguyên bản; giếng 3, 5, 7: sản phẩm cắt giới hạn.

Sản phẩm phản ứng cắt giới hạn được điện di kiểm tra trên gel agarose 1%. Kết quả thu được trên hình 8 cho thấy sản phẩm cắt vector tái tổ hợp mang phân đoạn S7 và S9 xuất hiện 2 băng DNA (hình 7, giếng 3 và 5): Trong đó băng DNA 3 kb là bộ khung nguyên bản của vector, và đoạn DNA kích thước 2,2 kb hay 1,9 kb là kích thước tương ứng của phân đoạn S7 hay S9. Đối với sản phẩm cắt vector tái tổ hợp mang phân đoạn S10 bằng *EcoRI* (hình 7, giếng 7) đã cho chính xác 3 băng DNA có kích thước 3 kb, 1,55 kb và 0,25 kb theo tính toán lý thuyết. Kết quả thu được ở trên cho phép khẳng định chắc chắn hơn việc nhân dòng thành công các phân đoạn S7, S9 và S10 phân lập được từ genome SRBSDV có trong 13 mẫu lúa bệnh thu thập từ các vùng dịch của bệnh lùn sọc đen phương Nam.

3.5. Giải trình tự phân đoạn S10

Mẫu plasmid tái tổ hợp tinh sạch mang trình tự của phân đoạn S10 phân lập từ 13 mẫu lúa bệnh

được giải trình tự với các cặp môi thiết kế dành riêng cho giải trình tự (3 cặp môi). Kết quả đã thu được 78 trình tự có kết quả đọc gộp nhau. Sau khi phân tích và lắp ghép các trình tự giải được đã thu được 13 trình tự đầy đủ của phân đoạn S10 của 13 mẫu virus thu thập từ 5 vùng sinh thái khác nhau. Kết so sánh với các trình tự đã công bố trên Ngân hàng gen thế giới bằng phần mềm Genetyx 4.1 được trình bày trong bảng 4.

3.6. Phân tích phả hệ phân đoạn S10

Vì hiện nay, virus LSĐPN mới chỉ phát hiện tại Việt Nam và Trung Quốc nên cần phải 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 NC này và 8 mẫu virus Trung Quốc sẵn có trên GenBank (hình 8).

Bảng 2. Kết quả so sánh trình tự phân đoạn S10 phân lập từ các vùng sinh thái

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

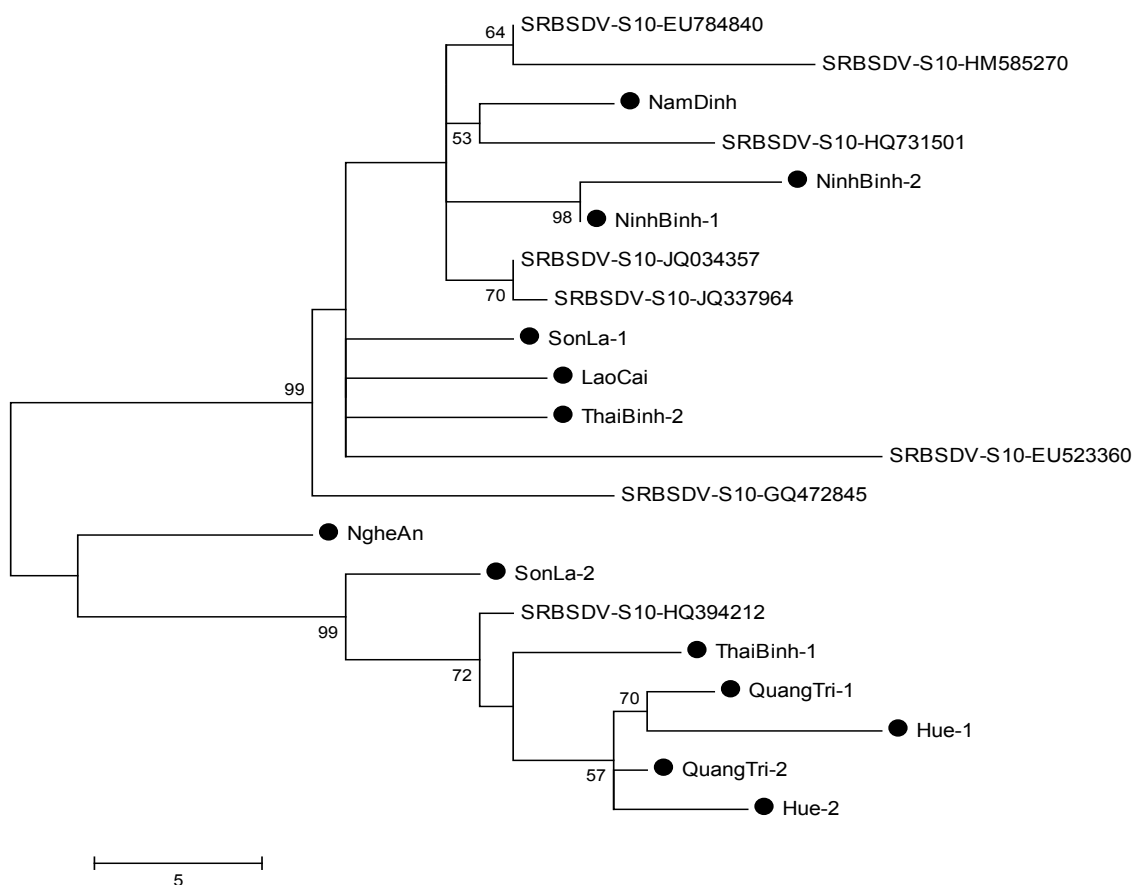
Phân tích phả hệ cho thấy các mẫu Việt Nam, cùng với các mẫu Trung Quốc đã hình thành 3 nhóm rõ rệt với giá trị thống kê bootstrap rất cao (99 %). Xét các mẫu Việt Nam, nhóm 1 gồm 4 mẫu thu thập tại Đồng bằng Sông Hồng (Nam Định, Ninh Bình, Thái Bình) và 2 mẫu thu tại miền núi phía Bắc (Sơn La, Lào Cai). 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 4.

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 VN sang Trung Quốc và ngược lại.

Kết quả so sánh trình tự và phân tích phả hệ cũng cho thấy mỗi chẩn đoán virus LSĐPN cần phải được thiết kế dựa trên các vùng bảo thủ cao của gen *S10*.



Hình 8. 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 nốt 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.

3.7. Giải trình tự phân đoạn S9

Các plasmid tái tổ hợp mang phân đoạn S9 tinh sạch được giải trình tự sử dụng cặp mỗi vector và 2 cặp mỗi nằm trong gen được thiết kế phục vụ cho việc giải trình tự phân đoạn S9. Kết quả giải trình tự gen đã thu được các trình tự gộp nhau của các plasmid mang phân đoạn S9. Sau khi tiến hành xử lý và lắp ghép, kết quả đã thu được 13 trình tự hoàn chỉnh của phân đoạn S9 từ 13 mẫu lúa thu được từ các vùng sinh thái khác nhau. Tiến hành so sánh các trình tự thu được với trình tự đã công bố trên Genbank, sử dụng phần mềm Genetyx 4.1. Kết quả so sánh được trình bày trên bảng 5.

Bảng 3. Kết quả so sánh trình tự phân đoạn S9 phân lập từ các vùng sinh thái

TT	Vùng lấy mẫu	Mức độ sai khác so với trình tự công bố trên Genebank (EU784843.1) (%)
1	Quảng Trị	0.4
2	Quảng Trị	0.4
3	Huế	0.5
4	Huế	1.5
5	Ninh Bình	0.6
6	Ninh Bình	0.4
7	Sơn La	0.8
8	Sơn La	0.5
11	Thái Bình	0.8
12	Thái Bình	0.6
13	Lào Cai	0.4
15	Nghệ An	0.4
16	Nam Định	1.0

3.8. Giải trình tự phân đoạn S7

Các phân đoạn S7 sau khi được dòng hoá vào vector nhân dòng, được đem giải trình tự. Với cặp mỗi được thiết kế cho mục đích giải trình tự hoàn chỉnh phân đoạn S7, đã thu được 48 trình tự gộp nhau của 8 mẫu S7. Tiến hành xử lý và lắp ghép 48

trình tự này, kết quả cho ra 8 trình tự S7 hoàn chỉnh. Các trình tự S7 hoàn chỉnh này được so sánh với trình tự S7 đã được công bố trên Genbank. Kết quả so sánh được thể hiện trên bảng 6.

Bảng 4. Kết quả so sánh trình tự phân đoạn S7 phân lập từ các vùng sinh thái

TT	Vùng lấy mẫu	Mức độ sai khác so với trình tự công bố trên Genbank (EU784841.1) (%)
1	Quảng Trị	0.4
2	Quảng Trị	0.3
3	Huế	0.8
4	Huế	0.9
5	Ninh Bình	1.0
6	Ninh Bình	1.2
13	Lào Cai	1.0
15	Nghệ An	1.2

IV. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

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.

Đã phân lập, dòng hóa và giải trình tự toàn bộ phân đoạn S7, S9 và S10 của 13 mẫu virus LSDPN thu tại miền Bắc và miền Trung Việt Nam. Đây là kết quả quan trọng để nghiên cứu xác định tính đa dạng di truyền, nguy cơ phát sinh chủng mới, các phương pháp chẩn đoán phân tử và tạo giống kháng virus bằng công nghệ gen.

So sánh trình tự và phân tích hệ thống cho thấy phân đoạn S7, S9 và S10 của các mẫu virus Việt Nam có mức độ đồng nhất trình tự tương ứng là từ 98.8 - 99.7%, 98.5 - 99.6% và 88-99% so với nhau và với mẫu virus của Trung Quốc.

Dựa trên phân đoạn S10, các mẫu virus Việt Nam và Trung Quốc gồm 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

- Bos L. (1992). New plant virus problems in developing countries: a corollary of agricultural modernization. *Adv. Virus Res.*, 41:349-407
- Dodds, J.A., Morris, T.J., Jordan, R.L. (1984). Plan viral double-strand RNA *Annual Review of Phytopathology*, 22:151-168
- Heng-Mu Zhang, Jian Yang, Jian-Ping Chen, M. J. Adams (2008). A black-streaked dwarf disease on rice in China is caused by a novel fijivirus. *Arch Virol*, 153:1893-1898.

- Hibino, H. (1996) Biology and epidemiology of rice viruses. *Annual Review of Phytopathology*, (34): 249-274.
- Jones RA (2009). Plant virus emergence and evolution: Origins, new encounter scenarios, factors driving emergence, effects of changing world conditions, and prospects for control. *Virus Res* 141(2): 113-130
- Iwasaki M, Nakano M, Shinkai A. (1985). Detection of rice grassy stunt virus in planthopper vectors and rice plants by ELISA. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.*, 51:450-458
- 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
- Roossinck, M. J. (2003). Plant RNA virus evolution. *Current Opinion in Microbiology*, 6 (4): 406-409
- Shikata E. (1974) *Rice black-streaked dwarf virus*. CMI/AAB Descr. Plant Viruses No. 125
- Wang Q, Yang J, Zhou GD, Zhang HM, Chen JP and Adams MJ, (2010). The complete genome sequence of two isolates of a new rice-infecting fijivirus from China. *Journal of Phytopathology*,
- Xie LH. (1986). Research on rice virus diseases in China. *Proc. Symp. Trop. Agric. Res. Trop. Agric. Res. Ser.*, 19: 45-58
- Zhang, H.M., Yang, E.J., Chen, J.P. and Adams, M.J. (2008). A black-streaked dwarf disease on rice in China is caused by a novel fijivirus. *Archives of Virology*, 153: 1893-1898
- Zhou GuoHui, Wen JingJung, Cai DeJiang, LI Peng, Xu DongLin & Zhang Shu Guang (2008). Southern rice black-streaked dwarf virus: A new proposed Fijivirus species in the family Reoviridae. *Chinese Sciences Bulletin*, 53(23): 3677-3685.
- Báo Nông nghiệp Việt Nam (7/9/2009). Chuyện khẩn cấp ở Nghệ An: Trên 5.500 ha lúa HT bị VL - LXL. Tác giả Sao Mai.
- Báo Nông nghiệp Việt Nam (24/9/2009). “Bắt bệnh” lúa lùn: Chưa ngã ngũ nguyên nhân. Tác giả Lê Bền.
- Hà Viết Cường, Nguyễn Viết 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.
- Ngô Vĩnh Viễn, Phạm Thị Vượng, Nguyễn Như Cường, Tạ Hoàng Anh, Nguyễn Thị Me, Phan Bích Thu, Phạm Hồng Hiến, 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
- Tạ Hoàng Anh, Ngô Vĩnh Viễn, Nguyễn Tuấn Anh, Trần Thị 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 BVTV*.