

GIẢI MÃ TRÌNH TỰ GENE MÃ HÓA PROTEIN VỎ VI RÚT VÀNG XOĂN LÁ CÀ CHUA (TYLCV) Ở MỘT SỐ TỈNH PHÍA NAM

Nguyễn Ngọc Quỳnh, Lê Thị Thu Hà,
Bùi Thị Thu Ngân, Bùi Chí Bửu
Viện KHKT Nông nghiệp miền Nam

SUMMARY

Coat protein gen sequences of Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) in some Southern provinces of Vietnam

Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) is one of the most devastating viral diseases of cultivated tomato regions in Vietnam in recent years, and it can induce frequent losses of up to 100%. In many regions, TYLCV is the main limiting factor in tomato production. The causal agents are a group of geminivirus species belonging to the genus begomovirus of the family geminiviridae, transmitted by whitefly (*Bemisia tabaci*). Coat protein gene of tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) from tomato leaf samples of Lam Dong and Daklak provinces have been sequenced. The results showed that its coat protein (CP) gene sequences were highly homologous to that of Tomato yellow leaf curl Kanchanaburi virus and Pepper yellow leaf curl Indonesia virus (93%), but it is lowly homologous to that of Tomato yellow leaf curl virus isolates have been found in the provinces of North Vietnam (88%).

Keywords: Coat protein gen, tomato yellow leaf curl virus (TYLCV), Southern.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ*

Bệnh vàng xoăn lá cà chua TYLCV (tomato yellow leaf curl virus) được xem là bệnh nguy hiểm và gây hại phổ biến ở hầu hết các vùng trồng cà chua trên thế giới. Bệnh gây lên bởi vi rút *begomovirus* có cấu trúc DNA sợi vòng đơn, gồm 6 khung đọc mở, kích thước phân tử 2,7-2,8 kb. Cây cà chua bị bệnh này có triệu chứng phát triển chậm, còi cọc, lá xoăn vào trong và hướng lên trên, có thể chuyển vàng, kích thước lá nhỏ lại, số hoa và chùm hoa giảm, trái nhỏ, sượng không chín. Kết quả làm giảm năng suất và chất lượng cà chua rõ rệt. Bệnh TYLCV ở nước ta đã phát hiện từ những năm 1970, tới nay các tỉnh phía Bắc đã phân lập được 3 nòi gây hại trên cà chua là: ToLCCNV (Tomato leaf curl Vietnam virus), TYLCVNV (Tomato yellow leaf curl Vietnam virus) và PaLCCNV (Papaya leaf curl China virus). Đối với các tỉnh phía Nam mấy năm gần đây bệnh này đã phát triển thành dịch, gây hại phổ biến trên cà chua tại các vùng trồng trọng điểm của miền Nam. Tuy nhiên cho tới nay vẫn chưa có nhiều nghiên cứu ở mức phân tử về loại bệnh này. Ở miền Nam, cà chua trồng tập trung chủ yếu ở tỉnh Lâm

Đồng, với diện tích từ 3,5-4,5 ngàn ha (chiếm 30% diện tích cà chua cả nước). Năng suất trái từ 35-40 tấn/ha, vụ Đông xuân đạt 70-80 tấn/ha. Theo chi cục BVTV Lâm Đồng, năm 2003 diện tích cà chua tỉnh Lâm Đồng bị nhiễm 960 ha bệnh TYLCV, trong đó 250 ha bị nhiễm nặng, tỷ lệ bệnh trung bình 12.7%, có vùng tỉ lệ nhiễm bệnh tới 90%. Đề tài nghiên cứu giải mã trình tự đoạn gen mã hóa protein vỏ (CP gen) vi rút *Begomovirus* gây bệnh vàng xoăn lá cà chua trên địa bàn hai tỉnh Lâm Đồng và Đắk Lắk. Nhằm xác định vi rút gây bệnh vàng xoăn lá cà chua ở mức độ phân tử tại vùng nghiên cứu, bổ sung vào ngân hàng gen vi rút gây bệnh trên cà chua trong nước.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Các mẫu lá cà chua có triệu chứng đặc trưng của vi rút *begomovirus* (lá màu vàng, xoăn), thu tại các ruộng cà chua của huyện Đơn Dương; huyện Đức Trọng (tỉnh Lâm Đồng) và huyện Eakar (tỉnh Đắk Lắk). Các mẫu lá được bảo quản trong các túi nylon chứa silicagel và lưu trữ ở nhiệt độ phòng cho đến khi sử dụng.

Ly trích DNA tổng số từ các mẫu lá bằng phương pháp CTAB (Doyle và Doyle, 1987): lấy 100mg lá tươi (20mg lá khô) chuyển vào ống eppendorf 1,5 ml và đồng nhất với 500 μ L

Người phân biện: TS. Nguyễn Công Thành.

buffer chứa: 2 M NaCl, 25 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl, 2% PVP và 2% CTAB bằng chày inox. DNA tổng số được rửa hai lần với chloroform: isoamyl alcohol (24:1). Cặn DNA được rửa 2 lần bằng ethanol 70% và hòa trong 50 uL nước cất 2 lần vô trùng. Dịch chiết DNA giữ ở nhiệt độ -20⁰C.

Thiết kế mỗi đọc vi rút bằng phần mềm FastPCR và Primer 3. Xác định đoạn gen bảo tồn của vi rút bằng phần mềm Clustalx2.0.12. Kiểm tra hairpin, dimer, GC%, Tm và nồng độ phản ứng PCR bằng phần mềm IDT. Kiểm tra khả năng bắt cặp của các môi bằng phần mềm Annyhyb 4.943. Xác định cặp môi đặc hiệu bằng cách chạy thử các cặp môi thiết kế với 3 đối chứng: đối chứng âm TY(-) ly trích DNA từ lá cây cà chua gieo từ hạt *in vitro*; Đối chứng dương TY(+) lấy từ mẫu DNA của TYLCV đã xác định năm 2009 và H₂O nước siêu sạch.

Phản ứng PCR khuếch đại đoạn DNA vi rút bằng các cặp môi đã thiết kế. Thành phần của phản ứng PCR như sau:

Master mix 2X	12,5 µl
Primer (F -R)	2,0 µl
DNA	3,5 µl
H ₂ O	7,0 µl

Chương trình chạy PCR: Chu kỳ 1: 95⁰C trong 5 phút (1 chu kỳ); Chu kỳ 2: 95⁰C, 30[”]; 37⁰C +60⁰C, 30[”]; 72⁰C, 30[”] (35 chu kỳ); Chu kỳ 3: 72⁰C trong 6 phút (1 chu kỳ)

Chu kỳ 4: 4⁰C đến ∞

Tối ưu qui trình xét nghiệm PCR với cặp môi đặc hiệu đọc bệnh TYLCV trên các mẫu lá cà chua của đề tài thiết kế, tiến hành chạy thử các mẫu bệnh với cặp môi Hn-F1/Hn-R1 đọc TYLCV trên cà chua các tỉnh miền Bắc do viện Công nghệ Sinh học Hà Nội thiết kế và cung cấp).

Tinh sạch sản phẩm PCR bằng enzyme của hãng Fermentas: cho vô eppendorf 5 µl PCR mixture, cho hỗn hợp 2 enzyme (0.5µl exonuclease I + 1µl shrimp alkaline phosphatase), trộn đều và ủ ở nhiệt độ 37⁰C trong 15 phút. Để dừng các phản ứng bằng cách hâm nóng hỗn hợp ở nhiệt độ 85⁰C trong 15 phút.

Điện di sản phẩm PCR trên gel agarose 1%, dùng thang chuẩn DNA Ladder₁₀₀. Đối chứng (+): là mẫu nhiễm TYLCV; Đối chứng (-): Mẫu cà chua sạch bệnh (mẫu gieo hạt *in vitro*); Đối chứng H₂O: dùng kiểm tra môi và phản ứng PCR.

Sản phẩm PCR tinh sạch được giải trình tự tại MACROGEN. Phân tích trình tự gen bằng chương trình Seqman DNASTAR. Kiểm tra trình tự bằng chương trình ClustalX (Thompson *et al*, 1997). Nhận dạng trình tự được tính toán bằng chương trình BioEdit version 7.05. Phân định ranh giới của các loài virus dựa trên tổng thể so sánh trình tự, bằng cách sử dụng ngưỡng danh tính 89% trình tự nucleotide (Fauquet *et al*, 2008).

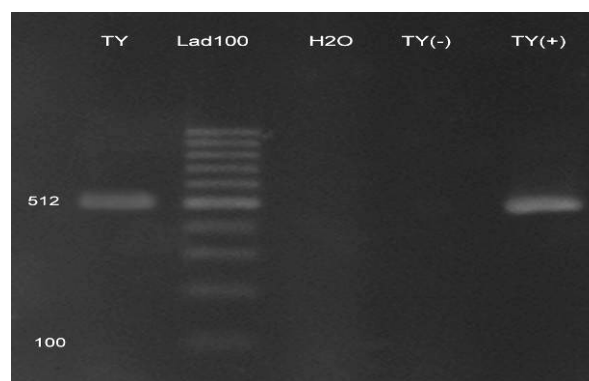
III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Đề tài đã thiết lập và hoàn thiện qui trình xét nghiệm bệnh vi rút gây bệnh vàng xoăn lá cà chua, với 8 cặp môi thiết kế thuộc vùng gen mã hóa protein vỏ với cặp môi đặc hiệu đọc vi rút gây bệnh TYLCV trên lá cà chua của tỉnh Lâm Đồng như sau:

Môi xuôi 5' GGATGTGAAGGCCCATGTAAAG 3' 22 nu
TYLCV-L1:

Môi ngược 5' TATATGGCATGTA CTACTCATGCTTCTA 3' 25 nu
TYLCV-R1:

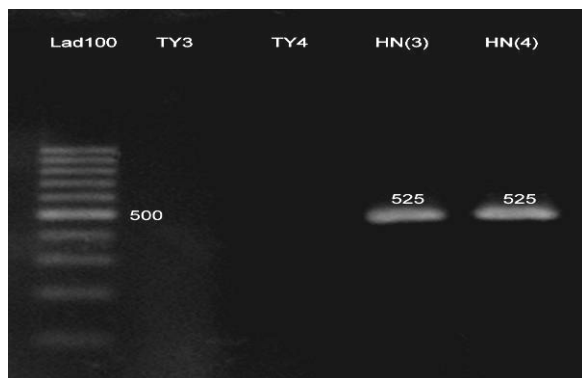
Cặp môi này khuếch đại được đoạn gen có độ dài 512 bp, nằm trọn trong vùng gen CP của vi rút. Kết quả hình 1 cho thấy, vạch băng của mẫu nhiễm TY ở vị trí 512 bp tương ứng với thang chuẩn DNA, chứng tỏ bằng cặp môi TYLCV-L1/TYLCV-R1 phản ứng PCR đã khuếch đại được các đoạn DNA mục tiêu có độ lớn trùng khớp với độ lớn thiết kế (512 bp). Hình 1 cũng cho thấy đối chứng H₂O không xuất hiện vạch băng, chứng tỏ cặp môi sử dụng bắt cặp tốt không có hiện tượng dimer tạo dương tính giả. Điều này cũng thể hiện rõ ở đối chứng chứng âm TY(-) hoàn toàn không xuất hiện vạch băng nào của vi rút.



Hình 1. Kết quả xét nghiệm vi rút TYLCV với cặp môi TYLCV-L1 /TYLCV-R1

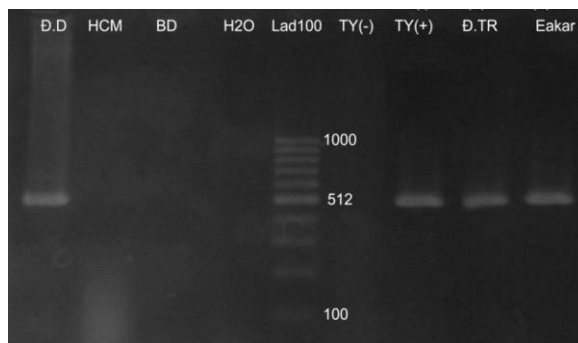
TY- Mẫu cà chua nhiễm vi rút vàng xoăn lá TYLCV; TY(-) - đối chứng âm tính với TYLCV; TY(+) đối chứng dương tính với TYLCV

Kết quả kiểm tra các mẫu bệnh TYLCV lá cà chua ở Lâm Đồng (TY3 và TY4) với cặp mồi Hn-F1/Hn-R1 đọc bệnh TYLCV trên cà chua các tỉnh miền Bắc, hình 2 cho thấy không xuất hiện các vạch băng ở giếng TY3 và TY4. Điều này có thể giả định rằng các nòi vi rút gây bệnh TYLCV trên cà chua ở miền Nam có thể khác với các nòi vi rút gây bệnh TYLCV trên cà chua ở miền Bắc. Tuy nhiên để khẳng định được điều này cần phải so sánh trình tự gen vi rút TYLCV của hai vùng



Hình 2. Kết quả xét nghiệm vi rút TYLCV với cặp mồi Hn-F1 /Hn-R1

TY3 và TY4: các mẫu cà chua nhiễm TYLCV ở miền Nam; HN(3) đối chứng (+) TYLCV nhiễm trên thuốc lá miền Bắc; HN(4) đối chứng (+) TYLCV nhiễm trên cà chua miền Bắc



Hình 3: Kết quả xét nghiệm vi rút TYLCV trên cà chua một số tỉnh miền Nam

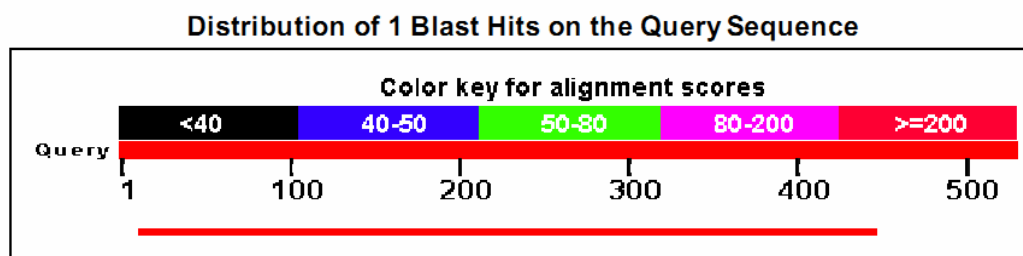
ĐD: Đơn Dương (Lâm Đồng) ; HCM: Củ Chi Tp.HCM; ĐTr.: Đức Trọng (Lâm Đồng); Eakar; H2O: Nước cất; TY(-) đối chứng (-) với TYLCV; TY(+) đối chứng (+) với TYLCV

Kết quả xét nghiệm các mẫu lá cà chua có triệu chứng đặc trưng bệnh vàng xoắn lá tại các vùng miền Đông Nam Bộ (TPHCM, Bình Dương) và Tây Nguyên (Lâm Đồng, Đắk Lắk) cho thấy các mẫu cà chua nhiễm vi rút thu tại huyện Đơn Dương, Đức Trọng tỉnh Lâm Đồng và huyện Eakar tỉnh Đắk Lắk đều nằm trên cùng vạch băng ở vị trí 512 bp. Điều này có thể cả 3 vùng này đều nhiễm một loại vi rút vàng xoắn lá. Trình tự đoạn gen CP giải mã từ sản phẩm PCR của TYLCV trên mẫu cà chua thu tại huyện Đơn Dương tỉnh Lâm Đồng như sau:

```
atgatataaacacacaccggaaggtgttgtgtgtgtctgatgttactagaggcaacggtattac
tcatagaataggtaaaagatttttgcgtcaagtcgtttatgttatgggcaaaatctggatggat
gagaatattaaatgaagaatcacaccaatactgtttatgttttggcttgttctgtgacagaagac
ctgttacaaccccatatggtttcngagagttattcaacatgtatgacaacgagcccagtaactgc
aacagtaaagaacgatctcagagatcgtgtgcaagtgcttcatcgtttctcagcatcattaacc
ggtggtcaatatg ccagcaaggaacaagcagttattaagaaattttttagagttaataattatg
ttgtctataaccaccaagaagctgctaagtatgaaaatcacactga 442
```

Bảng 1. So sánh tính đồng nhất của hai đoạn trình tự phiên mã xuôi /ngược gen CP vi rút gây bệnh TYLCV trên cà chua huyện Đơn Dương tỉnh Lâm Đồng

Graphic Summary



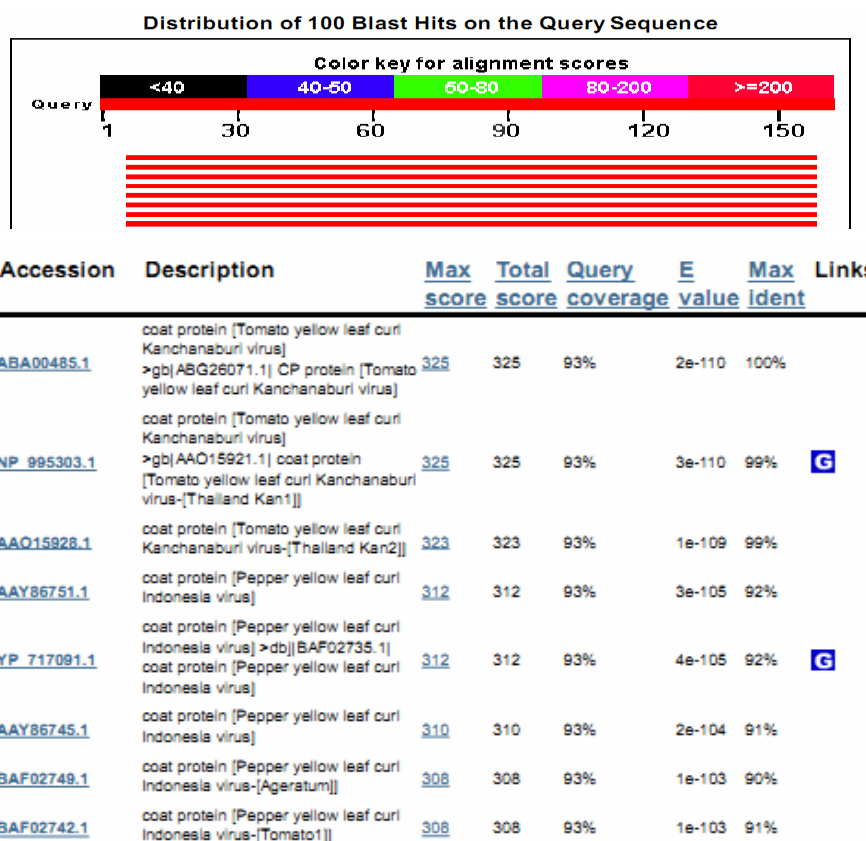
Score = 791 bits (428), Expect = 0.0
Identities = 429/430 (99%), Gaps = 0/430 (0%)

```

Query 1   ATGATATAACACACACCCGGCAAGGTGTTGTGTGTGTCTGATGTTACTAGAGGCAACGGTA   60
          |||
Sbjct 1   ATGATATAACACACACCCGGCAAGGTGTTGTGTGTGTCTGATGTTACTAGAGGCAACGGTA   60
Query 61   TTACTCATAGAATAGGTAAAAGATTTTGCCTCAAGTCTGTTTATGTTATGGGCAAAATCT   120
          |||
Sbjct 61   TTACTCATAGAATAGGTAAAAGATTTTGCCTCAAGTCTGTTTATGTTATGGGCAAAATCT   120
Query 121  GGATGGATGAGAATATTAATTTGAAGAATCACACCAATACTGTTATGTTTGGCTTGTTTC   180
          |||
Sbjct 121  GGATGGATGAGAATATTAATTTGAAGAATCACACCAATACTGTTATGTTTGGCTTGTTTC   180
Query 181  GTGACAGAAGACCTGTTACAACCCCATATGGTTTCNGAGAGTTATTCAACATGTATGACA   240
          |||
Sbjct 181  GTGACAGAAGACCTGTTACAACCCCATATGGTTTCNGAGAGTTATTCAACATGTATGACA   240
Query 241  ACGAGCCCAGTACTGCAACAGTAAAGAACGATCTCAGAGATCGTGTGCAAGTGTCTTCATC   300
          |||
Sbjct 241  ACGAGCCCAGTACTGCAACAGTAAAGAACGATCTCAGAGATCGTGTGCAAGTGTCTTCATC   300
Query 301  GTTCTCAGCATCATTAACCGGTGGTCAATATGCCAGCAAGGAACAAGCAGTTATTAAGA   360
          |||
Sbjct 301  GTTCTCAGCATCATTAACCGGTGGTCAATATGCCAGCAAGGAACAAGCAGTTATTAAGA   360
Query 361  AATTTTTTAGAGTTAATAATTATGTTGTCTATAACCACCAAGAAGCTGCTAAGTATGAAA   420
          |||
Sbjct 361  AATTTTTTAGAGTTAATAATTATGTTGTCTATAACCACCAAGAAGCTGCTAAGTATGAAA   420
Query 421  ATCACACTGA   430
          |||
Sbjct 421  ATCACACTGA   430
    
```

Kết quả phân tích DNA bằng chương trình BLAST (bảng 1) cho thấy tính đồng nhất của hai đoạn trình tự xuôi- ngược của vi rút thu được tại vùng Đôn Dương Lâm Đồng rất cao, độ bao phủ giữa hai mạch 100% trên suốt chiều dài 436 nucleotide. Số kỳ vọng đạt tới.

Bảng 2. Kết quả phân tích protein bằng chương trình ORF-DNA CLUB so sánh với các nòi xuất hiện ở các nước lân cận Việt Nam



Kết quả phân tích protein (bảng 2) cho thấy trình tự giải mã của vi rút trên mẫu cà chua tại Đon Dương tương tự với nòi Tomato yellow leaf curl Kanchabiri virus và Pepper yellow leaf curl Indonesia virus, độ phủ đạt 93% và độ đồng nhất

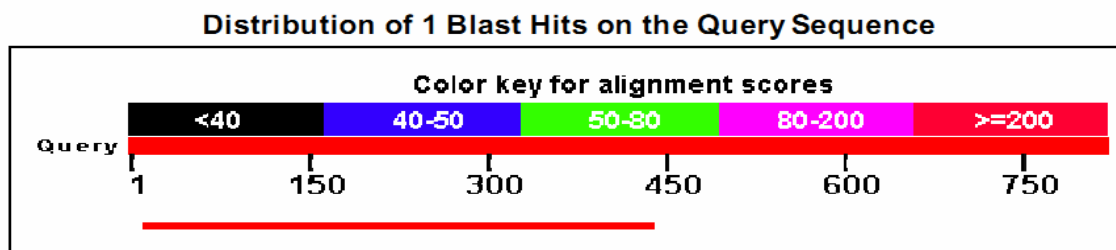
đạt từ 91-100%. Hai nòi này đã được xác nhận trên genbank là NP 995303.1 và YP 717091.1.

Kết quả giải trình tự đoạn gen CP từ sản phẩm PCR tinh sạch mang gen vi rút gây bệnh TYLCV ly trích từ mẫu lá cà chua tại huyện Đức Trọng, tỉnh Lâm Đồng như sau:

```
atgatataacacacaccggcaaggtgttgtgtgtgtctgatggtagtagaggcaacgggtattac
tcatagaataggtaaaagattttgogtcaagtcgtttatgtcatgggcaaaatctggatggat
gagaatattaaattgaagaatcacaccaatactgttatgttttgcttgttctgtgacagaagac
ctgttacaaccccatatgggttcggagagttatcaacatgtatgacaacgagcccagtagctgc
aacagtaagaacgatctcagagatcgtgtgcaagtgcttcatcgtttctcagcatcattaacc
ggtggtcaatatgcccagcaaggaacaagcagttattaagaatttttttagagtttaataattatg
ttgtctataaccaccaagaagctgct
```

Bảng 3. So sánh tính đồng nhất của hai đoạn trình tự phiên mã xuôi /ngược gen CP virus TYLCV gây nhiễm cà chua huyện Đức Trọng, tỉnh Lâm Đồng

Graphic Summary



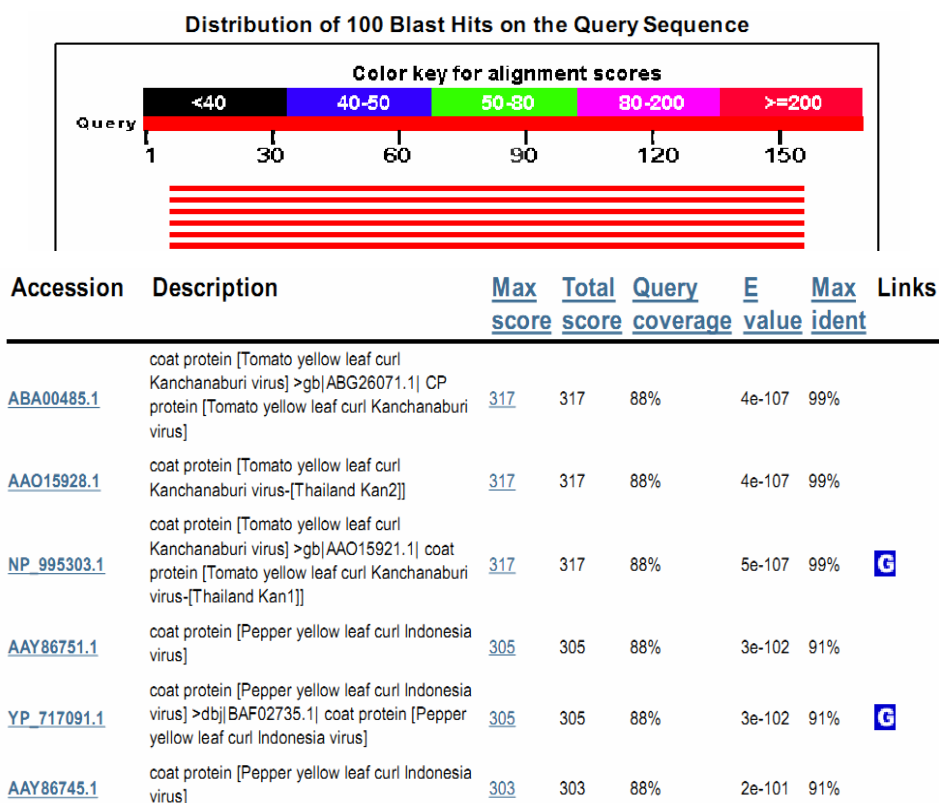
Score = 752 bits (407), Expect = 0.0; Identities = 409/410 (99%), Gaps = 0/410 (0%); Strand=Plus/Plus

```
Query 1 ATGATATAACACACACCCGGCAAGGTGTTGTGTGTGTCTGATGGTACTAGAGGCAACGGTA 60
|||||
Sbjct 1 ATGATATAACACACACCCGGCAAGGTGTTGTGTGTGTCTGATGGTACTAGAGGCAACGGTA 60
Query 61 TTACTCATAGAATAGGTAAAAGATTTTGCCTCAAGTCTGTTTATGTCATGGGCAAAATCT 120
|||||
Sbjct 61 TTACTCATAGAATAGGTAAAAGATTTTGCCTCAAGTCTGTTTATGTCATGGGCAAAATCT 120
Query 121 GGATGGATGAGAATATTAATTAAGAATCACACCAATACTGTTATGTTTTGGCTTGTTTC 180
|||||
Sbjct 121 GGATGGATGAGAATATTAATTAAGAATCACACCAATACTGTTATGTTTTGGCTTGTTTC 180
Query 181 GTGACAGAAGACCTGTTACAACCCCATATGGTTTCGGAGAGTTATTCAACATGTATGACA 240
|||||
Sbjct 181 GTGACAGAAGACCTGTTACAACCCCATATGGTTTCGGAGAGTTATTCAACATGTATGACA 240
Query 241 ACGAGCCCAGTACTGCAACAGTAAAGAACGATCTCAGAGATCGTGTGCAAGTGCTTCATC 300
|||||
Sbjct 241 ACGAGCCCAGTACTGCAACAGTAAAGAACGATCTCAGAGATCGTGTGCAAGTGCTTCATC 300
Query 301 GTTTCTCAGCATCATTAACCGGTGGTCAATATGCCAGCAAGGAACAAGCAGTTATTAAGA 360
|||||
Sbjct 301 GTTTCTCAGCATCATTAACCGGTGGTCAATATGCCAGCAAGGAACAAGCAGTTATTAAGA 360
Query 361 AATTTTTTAGAGTTAATAATTATGTTGTCTATAACCACCAAGAAGCTGCT 410
|||||
Sbjct 361 AATTTTTTAGAGTTAATAATTATGTTGTCTATAACCACCAAGAAGCTGCT 410
```

Kết quả phân tích DNA bằng chương trình BLAST (bảng 3) đối trình tự thu được từ cà chua huyện Đức trọng cho thấy tính đồng nhất của hai đoạn trình tự xuôi và ngược của vi rút

gây bệnh vàng xoắn lá thu được tại vùng Đức trọng cao, độ bao phủ giữa hai mạch 99%, trên suốt chiều dài 430 nucleotide. Số kỳ vọng đạt tới 0.

Bảng 4. Kết quả phân tích protein bằng chương trình ORF-DNA CLUB so sánh với các nòi xuất hiện ở các nước lân cận Việt Nam



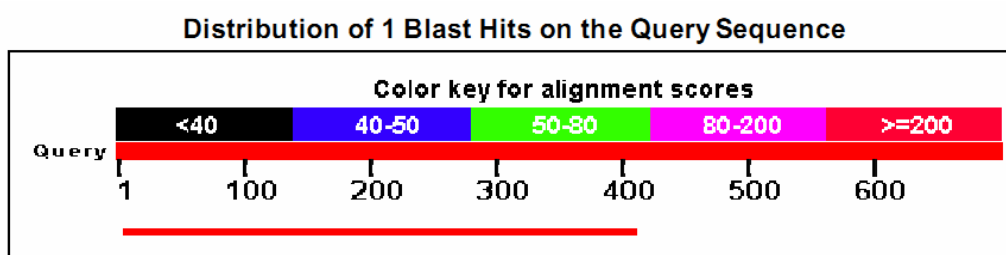
Kết quả phân tích protein (bảng 4) cho thấy trình tự giải mã vi rút của các mẫu cà chua thu tại Đức Trọng tương tự với nòi vi rút trên mẫu lá cà chua thu ở Đơn Dương và tương đương với nòi Tomato yellow leaf curl Kanchanburi virus và nòi Peper yellow leaf curl Indonesia virus. Như vậy có thể nói rằng vi rút gây bệnh vàng xoắn lá cà chua ở Đơn Dương và Đức Trọng tỉnh Lâm

Đồng là cùng một nòi. Thực tế hai huyện nay liền kề nhau, giống nhau về điều kiện sinh thái và địa lý. Chính vì vậy sự di chuyển của môi giới dễ dàng.

Kết quả giải trình tự đoạn gen CP từ sản phẩm PCR mang gen vi rút TYLCV ly trích từ mẫu lá cà chua tại huyện Eakar, Đắk Lắk có trình tự như sau:

```
atgatataacacacaccggcaaggtggtgtgtgtgtctgatgggtactagaggcaacgggtattactcata
gaataggtaaaagatTTTTgcgtcaagtctgtttatgtcatgggcaaaatctggatggatgagaatatta
aattgaagaatcacaccaataactgttatgttttggtctgttcgtgacagaagacctgttacaaccccat
atggtttcggagagttattcaacatgtatgacaacgagcccagttactgcaacagtaaagaacgatctca
gagatcgtgtgcaagtgttcatcgtttctcagcatcattaaccggtgggtcaatatgccagcaaggaac
aagcagttattaagaaatTTTTtagagtttaataattatgttgtctataaccaccaagaagctgct
```

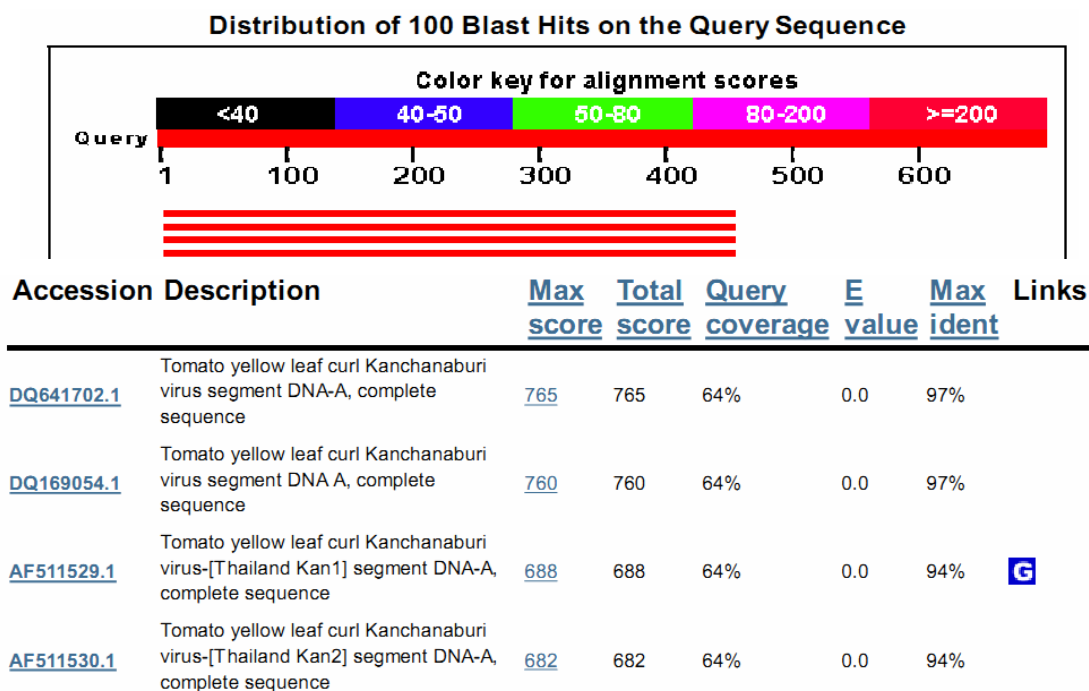
Bảng 4. So sánh tính đồng nhất của hai đoạn trình tự phiên mã xuôi - ngược gen CP virus TYLCV gây nhiễm cà chua huyện Eakar, tỉnh Đắk Lắk



```

Score = 752 bits (407), Expect = 0.0; Identities = 409/410 (99%),
Gaps = 0/410 (0%); Strand=Plus/Plus
Query 1 ATGATATAACACACACCCGGCAAGGTGTTGTGTGTGTCTGATGGTACTAGAGGCAACGGTA 60
      |||
Sbjct 1 ATGATATAACACACACCCGGCAAGGTGTTGTGTGTGTCTGATGGTACTAGAGGCAACGGTA 60
Query 61 TTACTCATAGAATAGGTAAAAGATTTTGCCTCAAGTCTGTTTATGTCATGGGCAAATCT 120
      |||
Sbjct 61 TTACTCATAGAATAGGTAAAAGATTTTGCCTCAAGTCTGTTTATGTCATGGGCAAATCT 120
Query 121 GGATGGATGAGAATATTAATGAAGAATCACACCAATACTGTTATGTTTTGGCTTGTTTC 180
      |||
Sbjct 121 GGATGGATGAGAATATTAATGAAGAATCACACCAATACTGTTATGTTTTGGCTTGTTTC 180
Query 181 GTGACAGAAGACCTGTTACAACCCCATATGGTTTCGGAGAGTTATTCAACATGTATGACA 240
      |||
Sbjct 181 GTGACAGAAGACCTGTTACAACCCCATATGGTTTCGGAGAGTTATTCAACATGTATGACA 240
Query 241 ACGAGCCCAGTACTGCAACAGTAAAGAACGATCTCAGAGATCGTGTGCAAGTGCTTCATC 300
      |||
Sbjct 241 ACGAGCCCAGTACTGCAACAGTAAAGAACGATCTCAGAGATCGTGTGCAAGTGCTTCATC 300
Query 301 GTTTCTCAGCATCATTAACCGGTGGTCAATATGCCAGCAAGGAACAAGCAGTTATTAAGA 360
      |||
Sbjct 301 GTTTCTCAGCATCATTAACCGGTGGTCAATATGCCAGCAAGGAACAAGCAGTTATTAAGA 360
Query 361 AATTTTTTAGAGTTAATAATTATGTTGTCTATAACCACCAAGAAGCTGCT 410
      |||
Sbjct 361 AATTTTTTAGAGTTAATAATTATGTTGTCTATAACCACCAAGAAGCTGCT 410
    
```

Bảng 5. Kết quả phân tích protein bằng chương trình ORF-DNA CLUB so sánh với các nòi xuất hiện ở các nước lân cận Việt Nam



Kết quả phân tích DNA bằng chương trình BLAST (bảng 4) đối với trình tự hai đoạn trình tự xuôi và ngược của vi rút gây bệnh vàng xoắn lá thu được tại vùng Eakar, tỉnh Đắk Lắk cho thấy có độ đồng nhất rất cao (99%). Tuy nhiên kết quả phân tích protein mã hóa (bảng 5) cho thấy trình tự các nucleotide mã hóa CP của vi rút gây bệnh vàng xoắn lá gây trên cà chua vùng

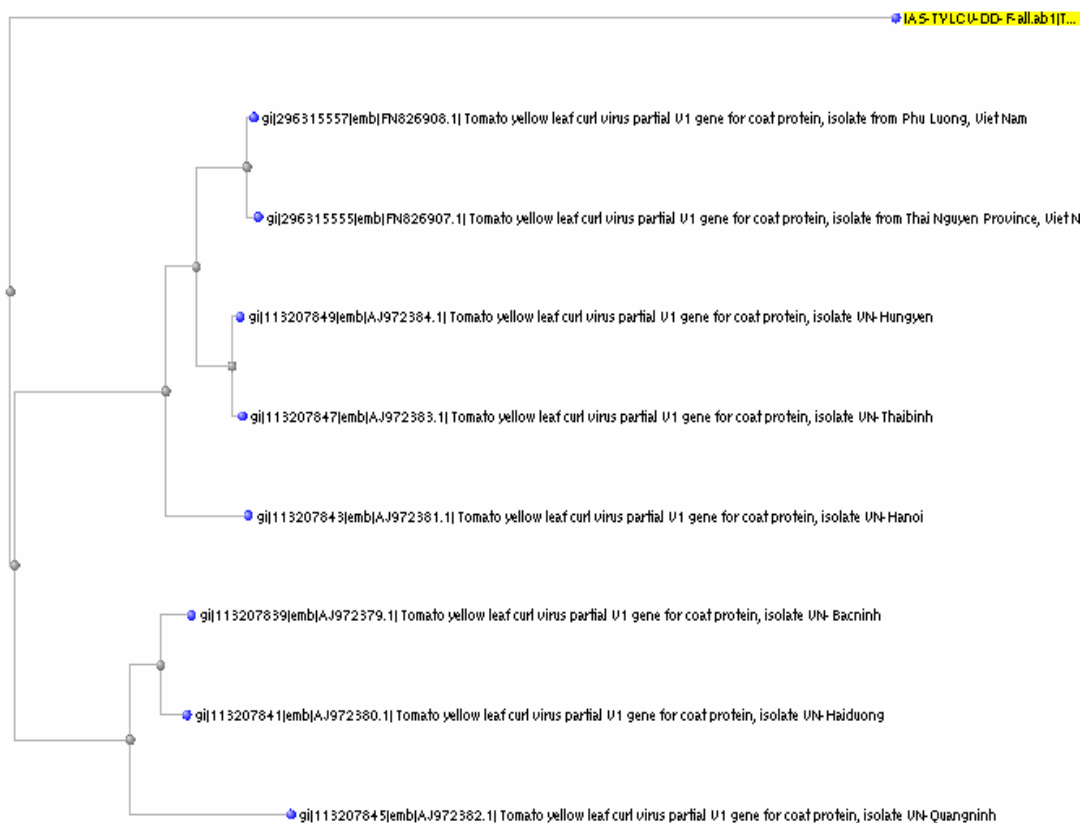
Eakar tỉnh Đắk Lắk có biểu hiện khác so với hai vùng Đơn Dương và Đức Trọng tỉnh Lâm Đồng. So với các nòi Tomato yellow leaf curl Kanchanaburi virus thì độ phủ của các nucleotide trên các đoạn mạch là rất thấp (64%), dẫn đến độ đồng nhất không cao. Điều này có thể nòi vi rút gây vàng xoắn lá của vùng này khác với nòi ở vùng Lâm Đồng.

Bảng 6. So sánh trình tự nucleotide các nòi vi rút gây bệnh TYLCV của tỉnh Lâm Đồng với các nòi vi rút đã phát hiện ở các tỉnh miền Bắc

TT	TYLCV ở miền Bắc Việt Nam	Số điểm Max	Tổng điểm	Độ phủ (%)	Giá trị E	Đồng nhất (%)
1	gi 296315557 emb FN826908.1 Tomato yellow leaf curl virus partial V1 gen for coat protein, isolate VN- Phu Luong	<u>334</u>	334	87%	4e-96	76%
2	gi 296315555 emb FN826907.1 Tomato yellow leaf curl virus partial V1 gen for coat protein, isolate VN-Thai Nguyen	<u>329</u>	329	88%	2e-94	76%
3	gi 113207849 emb AJ972384.1 Tomato yellow leaf curl virus partial V1 gen for coat protein, isolate VN-Hungyen	<u>343</u>	343	87%	8e-99	77%
4	gi 113207847 emb AJ972383.1 Tomato yellow leaf curl virus partial V1 gen for coat protein, isolate VN-Thaibinh	<u>349</u>	349	88%	2e-100	77%
5	gi 113207845 emb AJ972382.1 Tomato yellow leaf curl virus partial V1 gen for coat protein, isolate VN-Quangninh	<u>329</u>	329	85%	2e-94	76%
6	gi 113207843 emb AJ972381.1 Tomato yellow leaf curl virus partial V1 gen for coat protein, isolate VN-Hanoi	<u>340</u>	340	87%	1e-97	76%
7	gi 113207841 emb AJ972380.1 Tomato yellow leaf curl virus partial V1 gen for coat protein, isolate VN-Haiduong	<u>338</u>	338	85%	4e-97	77%
8	gi 113207839 emb AJ972379.1 Tomato yellow leaf curl virus partial V1 gen for coat protein, isolate VN-Bacninh	<u>336</u>	336	86%	1e-96	77%

Kết quả bảng 6 cho thấy so sánh với các vi rút gây bệnh vàng xoắn lá cà chua ở các tỉnh phía Bắc, vi rút gây bệnh vàng xoắn lá cà chua phát hiện tại tỉnh Lâm Đồng có độ đồng nhất thấp hơn rất nhiều so với Tomato leaf curl Kanchanaburi virus gây bệnh vàng xoắn lá cà chua ở Thái Lan

và Pepper yellow leaf curl Indonesia virus gây bệnh vàng xoắn lá tiêu ở Indonesia. Biểu đồ 1 cũng cho thấy vi rút gây bệnh vàng xoắn lá cà chua phát hiện tại tỉnh Lâm Đồng không cùng nòi với vi rút gây bệnh vàng xoắn lá cà chua phát hiện tại các tỉnh thành phía Bắc



Biểu đồ 1. Biểu đồ phân nhóm vi rút vàng xoắn lá cà chua đã phát hiện tại việt Nam

IV. KẾT LUẬN

Nòi vi rút gây bệnh vàng xoắn lá cà chua tại các vùng Đức Trọng, Đơn Dương tỉnh Lâm Đồng tương tự với nòi Tomato leaf curl Kanchanaburi virus gây bệnh vàng xoắn lá cà chua ở Thái Lan và Pepper yellow leaf curl Indonesia virus gây bệnh vàng xoắn lá tiêu ở Indonesia và khác với các nòi vi rút gây bệnh vàng xoắn lá cà chua đã phát hiện ở các tỉnh phía Bắc

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Ngô Thị Xuyên, Nguyễn Văn Đĩnh (2003). Nghiên cứu tình hình bệnh hại cà chua trong nhà lưới và ngoài đồng ruộng năm 2003-2005 tại Hà Nội, Tạp chí Bảo vệ thực vật.
2. Czosnek, H., Navot, N., Laterrot (1990). Geographical distribution of tomato leaf curl virus. *Phytopathologia Mediterranea*
3. Cullings, K.W. (1992). Design and testing of a plant-specific PCR primer for ecological and evolutionary studies. *Molecular Ecology* 1: 233-240.
4. Fauquet, C.M., Briddon, R., Brown, J.K., Moriones, E., Stanley, J., Zerbini, M. & Zhou, X. (2008). Geminivirus strain demarcation and nomenclature. *Archives of Virology*. 153: 783-821
5. Doyle, J.J. and J.L. Doyle (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemistry Bulletin* 19:11-15.
6. Fauquet, C.M., Briddon, R., Brown, J.K., Moriones, E., Stanley, J., Zerbini, M. & Zhou, X. (2008). Geminivirus strain demarcation and nomenclature. *Archives of Virology*. 153: 783-821
7. Makkouk, K.M., and H. Laterrot (1983). Epidemiology and control of tomato yellow leaf curl virus. P. 315 - 321
8. Moriones, E. & Navas-Castillo, J. (2000). Tomato yellow leaf curl virus, an emerging virus complex causing epidemics worldwide. *Virus Research* 71, 123 - 134
9. Pico, B., M.J. Diez, and F. Nunez (1996). Viral diseases causing the greatest economic losses to the tomato crop. II. The tomato yellow leaf curl virus - Avirex. *Scientia Hort.* 67:151-196
10. United Nations, Food and Agriculture Organization, FAOStat database (10/2007).