

## BƯỚC ĐẦU TÌM HIỂU NGUỒN GỐC VÀ PHẢ HỆ CỦA VIRÚT GÂY BỆNH “NHỘNG BỌC” (SACBROOD) Ở ONG MẬT TẠI VIỆT NAM

LÊ THANH HÒA

*Viện Công nghệ sinh học*

PHẠM VIỆT LIÊN

*Trung tâm nghiên cứu ong trung ương*

Sacbrood virút (SBV) là loại virút gây bệnh “ấu trùng ong dạng túi” hay còn gọi là bệnh “nhộng bọc” (sacbrood) được phát hiện lần đầu tiên vào năm 1913 và được mô tả chi tiết vào năm 1917 [10]. Khi bị bệnh, ấu trùng ngừng phát triển, không lột xác, mô bị biến hóa, hình dạng bị thay đổi tạo thành dạng túi, trước có màu vàng, sau chuyển thành nâu và rồi khô đen [1, 2, 4, 5]. SBV thuộc họ Picornaviridae, có dạng hình cầu, đường kính 28 nm; chứa hệ gen là ARN một sợi có độ dài là 8832 nucleotit [7]. Hệ gen của SBV chỉ có duy nhất một gen mã hóa cho 1 protein chung gồm 2858 axit amin, hợp nhất của 4 protein bao gồm: protein cấu trúc, enzym helicaza, enzym proteaza và enzym ARN-polymeraza (GenBank: AF092924) [7].

Chẩn đoán SBV chỉ dựa vào giám định hình thái bằng kính hiển vi điện tử và các phương pháp truyền thống như phản ứng thấm miễn dịch (western blot), phản ứng miễn dịch phóng xạ (radio-immunoassay) và phản ứng hấp phụ miễn dịch enzym (ELISA). Các phương pháp này không nhạy, thiếu chính xác, không đặc hiệu và không xác định được chủng, tít của SBV. Hiện nay chưa có dòng tế bào thích hợp để nuôi cấy SBV, nên cho đến gần đây, việc chẩn đoán phân lập SBV vẫn không thực hiện được trong phòng thí nghiệm [8].

Tại Việt Nam, bệnh do SBV xảy ra nặng nề trên cả nước, gây thiệt hại to lớn về kinh tế. Do hệ gen của SBV chứa ARN, nên trước hết phải dùng enzym sao chép ngược để chuyển đổi thành ADN, sau đó mới dùng phản ứng PCR để nhân vùng cần nghiên cứu, do vậy phản ứng này được gọi là PCR ngược (RT-PCR = reverse transcription PCR). Từ bệnh phẩm phân lập tại

Việt Nam, bằng phản ứng RT-PCR và so sánh đối chiếu với các chủng SBV của châu Á, SBV của Việt Nam đã được giám định bằng phương pháp sinh học phân tử, được đăng ký trong Ngân hàng Gen với số hiệu: AY216794.

Tuy nhiên, SBV có mối quan hệ họ hàng và nguồn gốc như thế nào với các chủng SBV gây bệnh sacbrood trên thế giới vẫn là vấn đề cần xem xét. Trong bài báo này, chúng tôi giới thiệu kết quả bước đầu tìm hiểu nguồn gốc và phả hệ của chủng SBV của Việt Nam và chính thức xác định chủng SBV gây bệnh “ấu trùng ong dạng túi” trên loài ong mật nội (*Apis cearana*) có họ hàng rất gần với chủng SBV của Trung Quốc, gần gũi với một số chủng khác của châu Á, khác xa với nhiều chủng của châu Âu.

### I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

#### 1. Mục đích

Thu nhận và giải trình tự nucleotit và axit amin một vùng gen của chủng SBV của Việt Nam (tương ứng với vị trí 5707-6604 [7]; Ngân hàng Gen: AF092924). Sử dụng chương trình phân tích phả hệ và tiến hóa (MEGA2.1), so sánh đối chiếu các thành phần nucleotit và axit amin của chủng SBV của Việt Nam với các chủng của châu Á và thế giới thu nhận từ Ngân hàng Gen, xác lập phả hệ và tìm hiểu nguồn gốc, quan hệ họ hàng của chúng.

#### 2. Virút cường độc SBV của Việt Nam và tách chiết hệ gen ARN

Bệnh phẩm nghi có chứa SBV là ấu trùng “dạng túi” được thu nhận từ một đàn ong mật bị bệnh sacbrood điển hình do Trung tâm nghiên

cứ ong trung ương cung cấp. Qua kiểm tra lâm sàng, triệu chứng, xem xét bệnh tích, đàn ong được xác định bị bệnh sacbrood. Bệnh phẩm có bệnh tích đặc trưng được cất giữ ở  $-20^{\circ}\text{C}$ , cho đến khi sử dụng.

Hệ gen ARN hay còn gọi là ARN tổng số, được tách chiết bằng phương pháp sử dụng hóa chất trizol (hãng GIBCO/BRL) [6]. ARN tổng số của SBV của Việt Nam được tách chiết trực tiếp từ bệnh phẩm của ấu trùng ong mật bị bệnh. Sau khi tách chiết, ARN tổng số được kiểm tra trên thạch agarosa 0,8%, tính toán hàm lượng ARN cho phản ứng RT-PCR, bảo quản ở  $-20^{\circ}\text{C}$  cho đến khi sử dụng.

### 3. Chọn môi và thực hiện phản ứng RT-PCR

Chúng tôi dùng môi xuôi là SB11F: 5'ATATACGGTGCAGAACTGC3' (vị trí: 5707-5726), môi ngược là SB12R: 5'CTCGGT-AATAACGCCACTGT3' (vị trí: 6585-6604) theo thiết kế của Grabensteiner và cs. (2001) sử dụng cho phản ứng RT-PCR để thu nhận đoạn gen dài khoảng 0,89 kbp. Phản ứng RT-PCR được sử dụng là phản ứng một bước (one-step RT-PCR) của hãng Qiagen (QIAGEN Inc.) bao gồm 2 giai đoạn: giai đoạn chuyển đổi (RT) biến ARN thành ADN trong thời gian 30 phút ở

$50^{\circ}\text{C}$ , và giai đoạn nhân đoạn gen (PCR) thực hiện 1 chu kỳ trong 15 phút ở  $95^{\circ}\text{C}$ ; 35 chu kỳ ( $94^{\circ}\text{C}$ : 20 giây;  $50^{\circ}\text{C}$ : 20 giây;  $72^{\circ}\text{C}$ : 1 phút) và 1 chu kỳ cuối cùng ở  $72^{\circ}\text{C}$  trong 10 phút. Sản phẩm RT-PCR của SBV của Việt Nam được tách dòng bằng vectơ pCR2.1 (Invitrogen Inc.). Plasmid tái tổ hợp được chọn lọc theo quy trình [9]. ADN của plasmid tái tổ hợp được tách chiết bằng bộ hóa chất (kit) của Qiagen (QiaPrep Spin Mini Kit). Độ dài của đoạn gen có trong plasmid tái tổ hợp được kiểm tra trên thạch 0,8%, sau khi xử lý bằng enzym giới hạn *EcoRI*.

### 4. Chọn các chuỗi tương ứng để so sánh đối chiếu

Chúng tôi dùng phương pháp truy cập Ngân hàng Gen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), để tìm kiếm tất cả các chuỗi nucleotit hiện có của tất cả các chủng SBV đã được đăng ký cho đến hiện nay. Chuỗi nucleotit của SBV của Việt Nam được đăng ký trong Ngân hàng gen là AY216794 và của thế giới là các số AF092924 và từ AF284648 đến AF284660, bao gồm các chủng có nguồn gốc từ Anh, Áo, Đức, Ấn Độ, Nepal, Trung Quốc (bảng 1). Các chuỗi nucleotit và axit amin của các chủng SBV của Việt Nam và thế giới được chọn để so sánh đối chiếu và phân tích phả hệ.

Bảng 1

Tên và số đăng ký trong Ngân hàng Gen của các chuỗi nucleotit của các chủng SBV của Việt Nam và thế giới dùng để so sánh trong nghiên cứu phân tích phả hệ

Tên chủng (ký hiệu)	Số đăng ký trong Ngân hàng Gen (GB)	Nguồn gốc	Tài liệu công bố
1	2	3	4
SB(VN)	AY216794	Việt Nam	Lê Thanh Hòa và cs. 2003 (GB)
SB(CN)	AF469603	Trung Quốc	Zhang và cs (Ngân hàng Gen)
SB(UK1)	AF284648	Anh	Grabensteiner và cs. 2001
SB(AU)	AF284649	Áo	Grabensteiner và cs. 2001
SB(GER1)	AF284651	Đức	Grabensteiner và cs. 2001
SB(GER2)	AF284650	Đức	Grabensteiner và cs. 2001
SB(GER3)	AF284652	Đức	Grabensteiner và cs. 2001
SB(GER4)	AF284653	Đức	Grabensteiner và cs. 2001
SB(GER5)	AF284654	Đức	Grabensteiner và cs. 2001

1	2	3	4
SB(GER6)	AF284655	Đức	Grabensteiner và cs. 2001
SB(GER7)	AF284656	Đức	Grabensteiner và cs. 2001
SB(GER8)	AF284657	Đức	Grabensteiner và cs. 2001
SB(NP1)	AF284658	Nêpan	Grabensteiner và cs. 2001
SB(NP3)	AF284659	Nêpan	Grabensteiner và cs. 2001
SB(IN)	AF284660	Ấn Độ	Grabensteiner và cs. 2001
SB(UK2)	AF092924	Anh	Ghosh và cs. 1999

## 5. Các chương trình sử dụng để phân tích quan hệ phả hệ và tiến hóa

Trình tự nucleotit của các chủng SBV của Việt Nam được giải trình trên máy tự động ABI-377 của hãng Perkin-Elmer (Mỹ), sau đó được xử lý bằng chương trình SeqEd1.03 và chương trình AssemblyLIGN 1.9 trong hệ chương trình MacVector 6.5.3 (Oxford Molecular Inc.).

So sánh đối chiếu và xử lý số liệu của tất cả các chuỗi bằng chương trình GENDOC2.5 (Nicholas và Nicholas, 1999). Thành phần axit amin được thu nhận bằng cách sử dụng bộ mã của vi sinh vật bậc thấp (vi khuẩn) trong Ngân hàng Gien (bảng mã di truyền số 11) thông qua chương trình GENDOC 2.5.

Tất cả các chuỗi của 16 chủng SBV trong đó có 1 chủng của Việt Nam được sắp xếp theo xử lý của chương trình GENDOC2.5 và đưa vào phân tích phả hệ bằng chương trình MEGA2.1 về thành phần nucleotit và axit amin, sử dụng hệ số tiến hóa thấp ME (minimum evolution index) (Kumar và cs., 2001).

## 6. Địa điểm nghiên cứu

Công việc giữ giống SBV của Việt Nam, tách chiết hệ gien ARN, thực hiện phản ứng RT-PCR, tách dòng sản phẩm, chọn lọc plasmit tái tổ hợp và một phần phân tích số liệu được thực hiện tại phòng thí nghiệm virút học, thuộc Phòng miễn dịch học, Viện Công nghệ sinh học. Giải trình trình tự nucleotit và một phần phân tích xử lý số liệu được tiến hành tại Viện nghiên cứu Y học Queensland, Ôxtrâyliia.

## II. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

### 1. So sánh đối chiếu thành phần đoạn gien của SBV của Việt Nam và thế giới

Bảng 2 trình bày kết quả so sánh đối chiếu phân đoạn gien có độ dài 818 nucleotit và 272 axit amin của tất cả các chủng SBV của Việt Nam và thế giới. Các chủng SBV của thế giới có nguồn gốc châu Á và châu Âu, thích ứng gây bệnh trên cả hai loài ong *Apis cerana* (chủ yếu được nuôi ở châu Á) và *Apis mellifera* (chủ yếu được nuôi ở châu Âu). Mức độ tương đồng giữa các chủng khác nhau của thế giới về nucleotit là 88-100%, về axit amin là 92-100%. Các chủng có cùng nguồn gốc phân lập (cùng vùng địa lý) có mức độ tương đồng cao, cụ thể giữa các chủng của châu Á bao gồm Việt Nam, Trung Quốc, Ấn Độ, Nêpan 1 là 93-96% (nucleotit) và 95-97% (axit amin); giữa các chủng của châu Âu, bao gồm Áo, Đức, Anh là 92-99% (nucleotit) và 96-99% (axit amin). Riêng chủng SB(NP3) (Nêpan 3) có mức độ tương đồng với các chủng của châu Á thấp hơn (92-93%) so với các chủng của châu Âu (96-97%) do chủng này phân lập từ ong bệnh thuộc loài *A. mellifera*, chứ không phải từ loài ong nội *A. cerana* như chủng SB(NP1). SBV có quan hệ họ hàng liên quan đến loài ong bị nhiễm ở các châu Âu, Á, Phi [8]. Với các chủng phân lập trong một nước, mức độ tương đồng về nucleotit đạt 97-100%, về axit amin đạt 98-100%; đặc biệt có nhiều chủng có mức độ tương đồng đạt tối đa (100%) (bảng 2).

### 2. Phân tích quan hệ nguồn gốc và phả hệ của chủng SBV của Việt Nam

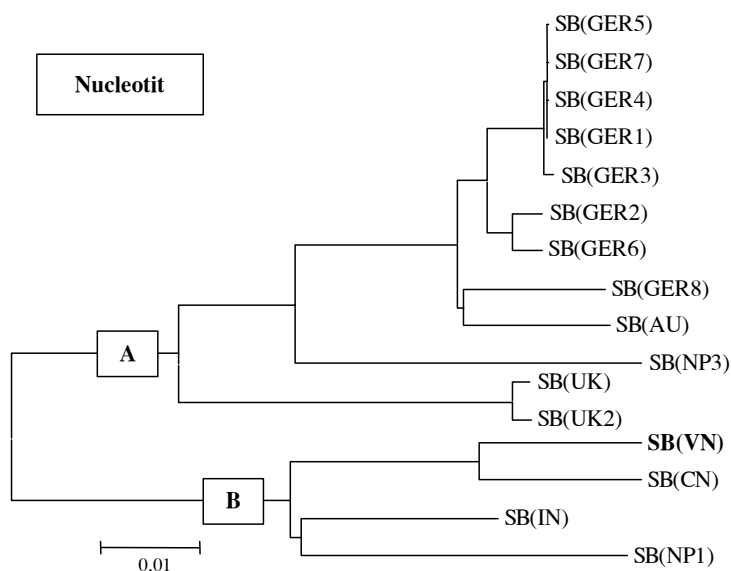
Bằng chương trình MEGA2.1, với thông số tiến hóa thấp (minimum evolution; ME), chủng SBV của Việt Nam và các chủng của thế giới liệt kê ở bảng 1 được so sánh về thành phần nucleotit và axit amin và xem xét quan hệ nguồn

Bảng 2

Mức độ tương đồng (%) về nucleotit (trên đường chéo) và axit amin (dưới đường chéo) khi so sánh một phân đoạn gen của các chủng SBV của Việt Nam

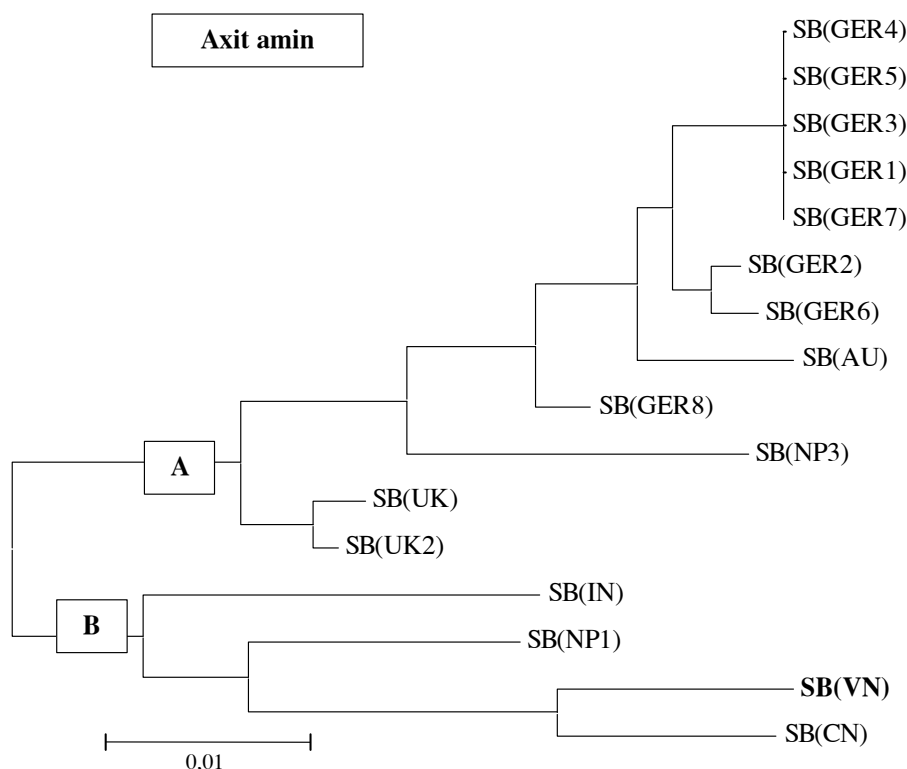
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1		96	94	93	89	89	89	89	89	89	89	89	88	88	89	89
2	97		94	93	88	89	89	89	89	89	89	89	88	88	89	89
3	95	95		94	89	90	90	90	90	90	90	90	89	89	90	90
4	95	96	95		88	89	89	89	89	89	89	89	89	89	89	89
5	93	93	94	93		94	94	94	94	94	94	94	93	93	92	92
6	92	92	93	94	96		98	99	100	100	98	100	97	97	92	93
7	93	93	94	94	96	98		98	98	98	99	98	97	97	93	93
8	92	92	93	94	96	100	98		99	99	99	99	97	97	93	93
9	92	92	93	94	96	100	98	100		100	98	100	97	97	92	93
10	92	92	93	94	96	100	98	100	100		98	100	97	97	92	93
11	92	92	93	94	96	99	99	99	99	99		98	97	97	93	93
12	92	92	93	94	96	100	98	100	100	100	99		97	97	92	93
13	93	93	94	95	97	98	98	98	98	98	98	98		97	92	93
14	92	92	93	94	96	98	98	98	98	98	98	98	98		92	93
15	94	95	96	95	97	96	97	96	96	96	96	96	96	97		99
16	94	94	95	95	97	97	97	97	97	97	97	97	97	97	99	

Ghi chú: 1: SB(VN); 2: SB(CN); 3: SB(IN); 4: SB(NP1); 5: SB(NP3); 6: SB(GER1); 7: SB(GER2); 8: SB(GER3); 9: SB(GER4); 10: SB(GER5); 11: SB(GER6); 12: SB(GER7); 13: SB(GER8); 14: SB(AU); 15: SB(UK); 16: SB(UK2). Ký hiệu và nguồn gốc của các chủng trình bày ở bảng 1. Mức độ tương đồng cao về nucleotit và axit amin giữa các chủng phân lập trong một nước (Đức) (các chủng GER1-8) được đóng khung và bôi đậm để nhận xét (cột 6-13, ngang và dọc).



**Hình 1.** Mối quan hệ họ hàng và nguồn gốc của các chủng SBV của Việt Nam (SB (VN)) và các chủng của thế giới liệt kê ở bảng 1, qua phân tích thành phần nucleotit bằng chương trình MEGA2.1

Ghi chú: Chủng của Việt Nam (SB(VN)) được bôi đậm; Nhóm A: nhóm các chủng của châu Âu; Nhóm B: nhóm các chủng của châu Á. Hệ số tiến hóa được tính là 0,01.



**Hình 2.** Mối quan hệ họ hàng và nguồn gốc của các chủng SBV của Việt Nam (SB (VN)) và các chủng của thế giới liệt kê ở bảng 1, qua phân tích thành phần axit amin bằng chương trình MEGA2.1

*Ghi chú:* Chủng của Việt Nam (SB(VN)) được bôi đậm; Nhóm A: nhóm các chủng của châu Âu; Nhóm B: nhóm các chủng của châu Á. Hệ số tiến hóa được tính là 0,01.

gốc. Sơ đồ mối quan hệ giữa các chủng được thể hiện ở hai hình 1 và 2. Các chủng phân tích phải dựa vào cả 2 thành phần đều cho kết quả như nhau, đó là các chủng được phân bố trong 2 nhóm, trong đó nhóm A bao gồm các chủng có nguồn gốc châu Âu (trừ chủng SB(NP3)); nhóm B bao gồm các chủng có nguồn gốc châu Á, kể cả chủng SB(VN) phân lập tại Việt Nam (hình 1 và 2).

Chủng SBV phân lập tại Việt Nam có thành phần nucleotit và axit amin tương đồng với chủng có nguồn gốc Trung Quốc (bảng 2) và phân tích phải hệ cũng cho thấy chúng có quan hệ họ hàng gần nhau. Tuy cũng nằm trong nhóm B (có nguồn gốc châu Á) nhưng các chủng của Ấn Độ (SB(IN)) và Nepal 1 (SB(NP1)) có xu hướng xa hơn với các chủng của Việt Nam và của Trung Quốc. Tất cả các chủng SBV của châu Á này đều được phân lập từ loài ong *Apis cerana*. Trong nhóm A của các chủng có nguồn gốc châu Âu, 8 chủng phân lập tại Đức đứng gần nhau và các chủng của Anh (UK và UK2)

cũng hợp thành nhóm phụ.

Tuy nhiên, có một chủng của châu Á phân lập tại Nepal (chủng SB(NP3)) lại nhóm hợp cùng với các chủng của châu Âu. Theo Grabensteiner và cs. (2001), chủng này được phân lập trên đàn ong nhập từ châu Âu vào (thuộc loài ong *A. mellifera*). Rõ ràng, tuy phân lập tại cùng vị trí địa lý (Nepal), nhưng chủng SB(NP3) gây bệnh trên loài ong ngoại *A. mellifera* có quan hệ phải hệ với SBV gây bệnh trên ong của châu Âu và hoàn toàn khác về quan hệ họ hàng với chủng SB(NP1) là một chủng SBV gây bệnh trên loài ong nội *A. cerana* ở Nepal.

Hiện nay, ở Việt Nam có nhiều giống ong đang được nuôi, trước hết phải kể đến giống ong nội *A. cerana* rất phổ biến và giống ong ngoại có nguồn gốc từ Italia là *A. mellifera ligustica* được nhập vào Việt Nam từ 30 năm nay. Liệu ở Việt Nam có tồn tại một chủng SBV ngoại như chủng SB(NP3) ở Nepal hay không là một vấn

đề cần nghiên cứu. Chúng tôi đang thu thập và phân tích các chủng SBV phân lập trên đàn ong ngoại nuôi ở Việt Nam để có cứ liệu tìm hiểu về nguồn gốc và quan hệ họ hàng của chúng.

### III. KẾT LUẬN

1. Virút gây bệnh “ấu trùng ong dạng túi” hay còn gọi là bệnh “nhộng bọ” (sacbrood) ở Việt Nam hoàn toàn thuộc nhóm phả hệ cùng với các chủng SBV của châu Á.
2. Phân tích phả hệ trên hai dữ liệu về nucleotit và axit amin đều cho kết quả là chủng SBV của Việt Nam có quan hệ họ hàng gần với chủng của Trung Quốc, Ấn Độ và Nêpan (chủng SB(NP1)).
3. Các chủng SBV của châu Á có quan hệ nguồn gốc và họ hàng hoàn toàn xa với các chủng SBV của châu Âu do các chủng SBV của châu Á là SBV gây bệnh trên loài ong nội (ong châu Á) *A. cerana*, còn các chủng của châu Âu gây bệnh trên loài ong ngoại (ong châu Âu) *A. mellifera*.
4. Cần phân lập thêm nhiều chủng SBV khác, đại diện cho các vùng địa lý trong cả nước, và đại diện các loài ong mật đang được nuôi ở nước ta, nhằm thực sự xác định di truyền

quần thể SBV gây bệnh "nhộng bọ" tại Việt Nam.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Bailey L.**, 1968: Annu. Rev. Entomol., 13: 191-212.
2. **Bailey L.**, 1976: Adv. Virus Res., 20: 271-304.
3. **Bailey L.** and **Fernando E. F. W.**, 1972: Ann. Appl. Biol., 72: 27-35.
4. **Bailey L.**, **Carpenter J. M.** and **Woods R. D.**, 1982: J. Invertebr. Pathol., 39: 264-5.
5. **Bailey L.**, **Gibbs A. J.** and **Woods R. D.**, 1964: Virology, 23: 425-429.
6. **Chomczynski P.** and **Sacchi N.**, 1987: Anal Biochem., 162(1): 156-159.
7. **Ghosh R. C. et al.**, 1999: J. Gen. Virol., 80: 1514-1549.
8. **Grabensteiner E. et al.**, 2001: Clin. Diagn. Lab. Immunol., 8(1): 93-104.
9. **Sambrook J.** and **Russell D.**, 2001: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual. (3rd ed.)* Cold Springs Harbor Press, Cold Springs Harbor N. Y.
10. **White G. F.**, 1917: Sacbrood. U. S. Dep. Agric. Bull. 431: 1-55.

## PRELIMINARY STUDIES ON THE ORIGIN AND THE PHYLOGENETIC RELATEDNESS OF THE SACBROOD VIRUS ISOLATED IN VIETNAM

LE THANH HOA, PHAM VIET LIEN

### SUMMARY

The 818 nucleotides sequence of a sacbrood virus (SBV) strain isolated from Vietnam was obtained by RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction), cloned into a TA-vector (Invitrogen Inc.) and sequenced. This sequence was phylogenetically analyzed with the representative corresponding SBV sequences of asian and european origins. Using MEGA2.1 program (Molecular Evolution Genetics Analysis version 2.1), the phylogenetic relatedness and molecular evolutionary analyses of the SBV strains were established. Both nucleotide and amino acid phylogenetic analysis indicated that all the SBV strains of the asian origin fall into one group being completely separated from the another group of those of the european origin. The vietnamese SBV strain closely clustered with those of the mainland China and India and a SBV strain of Nepal (SB (NP1)). These SBV strains were isolated from the infected *Apis cerana* honeybee. All the european SBV strains performed a distinct group completely different from the asian SBV strains, except one SBV strain isolated from Nepal (SB (NP3)). These are due to the SBV strains isolated from the infected *Apis mellifera* honeybee. Phylogenetic analysis revealed that the vietnamese SBV strain was of geographically asian origin, having close biogeographic relatedness with those of mainland China and the neighbouring countries.

Ngày nhận bài: 23-1-2004