

XÁC ĐỊNH NGUỒN GỐC TIỀN HÓA CỦA VIRUS GÂY BỆNH THỐI ĐEN MŨ CHÚA TRÊN ONG MẬT Ở VIỆT NAM

Mai Thùy Linh, Hà Thị Thu, Nguyễn Đình Duy, Đồng Văn Quyền*

Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm KH & CN Việt Nam, *dvquyen@gmail.com

TÓM TẮT: Virus thối đen mũ chúa (Black Queen cell virus-BQCV) là virus gây bệnh và giết chết ấu trùng ong chúa cũng như các ấu trùng ong thợ, làm giảm số lượng và chất lượng đàn ong, gây tổn thất lớn cho ngành nuôi ong. Trong nghiên cứu này, nhằm xác định nguồn gốc của BQCV hiện đang tồn tại và gây bệnh cho các đàn ong mật ở Việt Nam, chúng tôi sử dụng phương pháp RT-PCR với cặp mồi đặc hiệu gen mã hóa helicase. Nghiên cứu được tiến hành với virus gây bệnh trên 3 đàn ong nội (*Apis cerana*) được thu thập ở Hưng Yên, Bắc Giang và Tiền Giang; và ba đàn ong ngoại (*Apis mellifera*) thu thập ở Điện Biên, Đồng Nai và Bình Phước. Sản phẩm PCR gen mã hóa helicase được tách dòng, giải trình tự và phân tích bằng phần mềm MEGA 6.1. Kết quả phân tích cho thấy, trình tự nucleotide gen *helicase* giữa các chủng BQCV phân lập ở Việt Nam có độ tương đồng rất cao (97-100%). Điều này gợi ý rằng các chủng BQCV hiện nay ở Việt Nam có cùng nguồn gốc. Tuy nhiên, chúng có độ tương đồng thấp, dao động từ 88-93%, so với trình tự gen *helicase* của BQCV phân lập từ Ba Lan, Hungary, Áo và Hàn Quốc. Phân tích tiếp bằng cây phát sinh chủng loại chúng tôi nhận thấy, các chủng BQCV của Việt Nam nằm cùng nhánh với các chủng BQCV từ Ba Lan, Hungary và Áo, trong khi đó, các chủng BQCV từ Hàn Quốc lập thành một nhánh riêng biệt. Nghiên cứu của chúng tôi chỉ ra rằng, các chủng BQCV hiện nay ở Việt Nam có thể có nguồn gốc từ các nước châu Âu.

Từ khóa: Bệnh virus gây thối đen mũ chúa, gen helicase, ong mật, RT-PCR.

MỞ ĐẦU

Ong mật (honey bees) đóng một vai trò quan trọng trong nền nông nghiệp trên toàn thế giới. Không chỉ là nguồn cung cấp mật ong cho con người, ong mật còn là các loài thụ phấn hữu hiệu cho cây trồng. Theo số liệu ước tính của Gallai et al. (2009) [10], giá trị kinh tế mà côn trùng thụ phấn cho cây trồng tạo ra đạt tới 153 tỷ euro trong tổng giá trị cây trồng trên thế giới, trong đó hoạt động thụ phấn của côn trùng cho hoa màu đã mang lại 14,6 tỷ USD/năm cho Hoa Kỳ và 440 triệu bảng/năm cho Vương quốc Anh. Hơn 2/3 cây trồng trên thế giới, bao gồm các cây có hạt, lấy quả phụ thuộc vào các loài động vật thụ phấn trong đó ong thực hiện phần lớn công việc này.

Sức khỏe của các đàn ong mật thường bị ảnh hưởng bởi nhiều yếu tố khác nhau, cụ thể như nguồn thức ăn, thuốc trừ sâu, ký sinh trùng, vi khuẩn, virus [7, 8, 18]. Trong đó, các nhà khoa học chú ý đến các bệnh do các loại virus gây ra với tỷ lệ tăng lên một cách đáng kể trong những năm gần đây. Ong mật là vật chủ của hơn 20 virus RNA khác nhau, chủ yếu thuộc họ Dicistroviridae và Iflavrividae [21]. Virus trên

ong gây ảnh hưởng đến hình thái, sinh lý và hành vi của ong và có liên quan đến việc giảm sức khỏe và chết dần của các đàn ong [11, 24].

Virus thối đen mũ chúa (BQCV) lần đầu tiên được phân lập từ nhộng và ấu trùng ong chúa chết trong lỗ tổ. Tên của virus này được đặt dựa vào vùng tối trên thành của lỗ tổ chứa ấu trùng bị bệnh, đặc biệt vào mùa xuân và đầu mùa hè [4, 16]. BQCV là virus phổ biến ở ong và chủ yếu gây chết ở ấu trùng ong chúa ở Ôxtrâyliya và Ba Lan [4, 22]. Theo các nghiên cứu ở Pháp và Áo, tỷ lệ nhiễm virus này trên ong thợ là 86 và 30% [7, 22]. Ong thợ bị nhiễm virus này tuy không có biểu hiện của bệnh nhưng được cho là nguyên nhân truyền virus cho ấu trùng ong, đặc biệt là ấu trùng ong chúa, trong khi tiết thức ăn [2]. Trong nghiên cứu trước, chúng tôi tiến hành điều tra sự nhiễm của BQCV trên các đàn ong mật tại 10 tỉnh trong cả nước, kết quả cho thấy, tỷ lệ nhiễm BQCV trung bình ở 10 tỉnh là 11% [4]. Hạt BQCV có kích thước 30 nm chứa một sợi RNA genome đơn dài 8550 nucleotide. Trình tự hệ gen chứa hai vùng đọc mở lớn (ORF): ORF đầu 5' (ORF1) mã hóa cho polyprotein sao chép giả định và ORF đầu 3' (ORF2) mã hóa cho một polyprotein capsid

[17]. ORF1 nằm trong vùng từ nucleotide 658 đến 5625, mã hóa cho helicase, protease 3C giống cysteine và một RNA polyme phụ thuộc RNA. ORF2 nằm giữa vị trí nucleotide 5834 và 8395, mã hóa cho bốn protein capsid với khối lượng phân tử lần lượt là 34, 32, 29 và 6 kDa [17].

Helicase đóng vai trò quan trọng cho sự sao chép hệ gen của virus cũng như sự phiên mã và dịch mã [4, 11]. Việc so sánh trình tự gen mã hóa enzyme này cho phép các nhà khoa học trên thế giới có thể xác định được mối quan hệ di truyền giữa các loài và các chủng khác nhau trong một loài [1, 4, 9, 14, 24]. Trong một số nghiên cứu gần đây, các nhà nghiên cứu của Hàn Quốc và Áo cũng sử dụng các trình tự mã hóa helicase của BQCV và virus DWV gây bệnh xoắn cánh trên ong nhằm xác định mối quan hệ di truyền giữa các chủng virus này trên thế giới [19, 1921]. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm phân tích mối quan hệ phát sinh loài của các chủng BQCV đang gây bệnh cho các đàn ong mật ở Việt Nam.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Ong nhiễm BQCV được thu thập từ 3 đàn ong nội (*Apis cerana*- AC) tại 3 tỉnh Bắc Giang, Hưng Yên và Tiền Giang và từ 3 đàn ong ngoại (*Apis mellifera*-AM) tại 3 tỉnh Điện Biên, Bình Phước và Đồng Nai. Mỗi đàn lấy ngẫu nhiên 50 ong trưởng thành, khoảng cách giữa các đàn ít nhất 10 m. Các mẫu ong được ký hiệu theo tên viết tắt của các tỉnh như sau: BG.T1 (Bắc Giang), BP.T2 (Bình Phước), ĐB.T3 (Điện Biên), ĐN.T4 (Đồng Nai), HY.T5 (Hưng Yên), TG.T6 (Tiền Giang). Các mẫu được bảo quản trong ethanol 100% và giữ ở -20°C cho đến khi sử dụng.

Bộ sinh phẩm tách chiết RNA (RNeasy Mini Kit 250) mua từ QIAgen (Hoa Kỳ), bộ sinh phẩm tổng hợp cDNA (SuperScript™ First - StrDNA synthesis system for RT-PCR) và bộ sinh phẩm để chạy PCR được mua từ Invitrogen (Hoa Kỳ).

Phương pháp tách chiết RNA từ ấu trùng và ong trưởng thành

Ong nhiễm BQCV được rửa bằng nước khử ion bổ sung chất ức chế enzyme phân giải RNA, diethylpyrocarbonate (DEPC). Nghiền mẫu trong

nitơ lỏng cho tới khi mẫu tan thành dạng bột mịn. Sau đó, sử dụng bộ *RNeasy Mini Kit 250* của hãng Invitrogen để tách RNA theo hướng dẫn của nhà cung cấp. RNA tổng số sau khi tách chiết được bảo quản ở -80°C. Chỉ chọn các RNA có nồng độ trên 50 µg/µl với độ hấp phụ ở bước sóng 260 nm/280 nm nằm trong khoảng từ 1,8 đến 2,0 để dùng cho việc tạo cDNA.

Tổng hợp cDNA và khuếch đại gen helicase bằng RT-PCR

RNA tổng số sau khi tách chiết được dùng làm khuôn để tổng hợp cDNA sử dụng hệ thống phiên mã ngược theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Invitrogen, Hoa Kỳ). Chuẩn bị ống số 1 với 30-50 ng RNA tổng số sau đó thêm vào 1 µl primer (mỗi) ngẫu nhiên (50 ng/µl), hỗn hợp được trộn đều bằng pipet, ủ ở 65°C trong 5 phút và đặt trên đá 1 phút. Ống 2 chứa 4 µl dung dịch đệm 5X Reverse Transcriptase, 2 µl hỗn hợp dNTP 10 mM, 1 µl RNase inhibitor, 1 µl reverse transcriptase, 2 µl DTT 0,1 mM. Bổ sung 10 µl hỗn hợp ở ống 2 vào ống 1. Phản ứng RT-PCR được tiến hành với chu trình nhiệt như sau: (1) 25°C trong 5 phút, (2) 42°C trong 60 phút, (3) 70°C trong 5 phút, và (4) mẫu được giữ ở 4°C sau khi phản ứng hoàn thành. cDNA được sử dụng làm khuôn để tổng hợp đoạn DNA gen helicase của BQCV bằng cặp mồi: mồi xuôi (BQCV-helF) 5'-GGTGTAGCTA TATGCGACACC-3'; mồi ngược (BCQV-helR) 5'-TCCTTCCTGGAAGTACATGGC-3'. Chu trình nhiệt của phản ứng được thực hiện như sau: 94°C trong 3 phút, sau đó là 35 chu kỳ: 94°C trong 40 giây, 55°C trong 40 giây, 72°C trong 50 giây, tiếp theo 1 chu kỳ 72°C trong 8 phút. Cuối cùng mẫu được giữ ở 4°C sau khi phản ứng hoàn thành.

Điện di kiểm tra sản phẩm PCR trên gel agarose

7 µl sản phẩm RT-PCR được điện di trên gel agarose 1% dưới điện trường có hiệu điện thế 110V trong 30 phút. Gel được nhuộm bằng ethidium bromide sau đó quan sát dưới đèn tử ngoại tại bước sóng 254 nm.

Độc trình tự và xử lý chuỗi nucleotide sản phẩm PCR

Sản phẩm PCR được gửi đến công ty Macrogen (Hàn Quốc) để độc trình tự. Các trình

tự thu được được xử lý bằng phần mềm BioEdit Version theo mô tả trong nghiên cứu trước đó [15].

Xây dựng cây phát sinh loài

Để xác định nguồn gốc tiến hóa của BQCV trên ong mật ở Việt Nam, chúng tôi tiến hành xây dựng cây phát sinh loài dựa trên trình tự gen mã hóa helicase của BQCV (*Hel-BQC*). Cây phát sinh loài được xây dựng trên cơ sở trình tự gen *Hel-BQC* trong nghiên cứu này cùng với các trình tự gen *Hel-BQC* của BQCV đã được công bố trên Ngân hàng gen, bao gồm: 2 trình tự từ BQCV gây bệnh trên ong mật ở Ba Lan, 2 trình tự từ Hungary, 2 trình tự từ Áo và 5 trình tự từ Hàn Quốc. Các phần mềm xây dựng cây phát sinh loài mà chúng tôi sử dụng ở đây là Bioedit (version 7.2) và MEGA (version 6.1) với hệ số bootstrap lặp lại 1.000 lần.

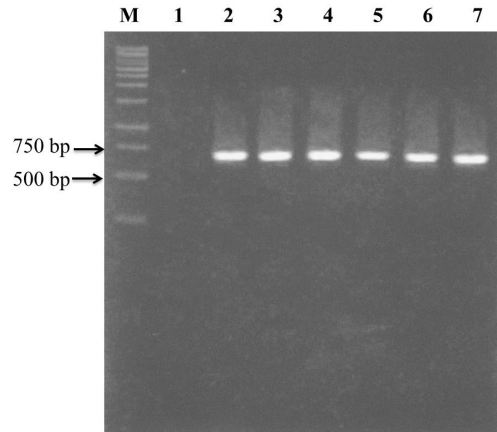
KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Kết quả nhân gen *Hel-BQC* bằng kỹ thuật RT-PCR

Do BQCV có hệ gen là RNA, sau khi tách chiết RNA tổng số, chúng tôi tiến hành phản ứng RT-PCR nhân gen *Hel-BQC*. Trên cơ sở tham khảo các công trình đã công bố và trình tự hệ gen của BQCV trên Ngân hàng gen quốc tế (Genbank), chúng tôi thiết kế cặp mồi đặc hiệu cho gen mã hóa helicase của virus này. Theo thiết kế, sản phẩm phản ứng RT-PCR thu được có kích thước là 729 bp. Quá trình được thực hiện như mô tả ở phần phương pháp nghiên cứu. Sản phẩm của phản ứng RT-PCR sau đó được điện di kiểm tra trên gel agarose 1%. Trong tổng số 150 mẫu ong nội và 150 mẫu ong ngoại, chúng tôi phát hiện được 24 mẫu ong nội và 37 mẫu ong ngoại cho kết quả dương tính với BQCV. Kết quả điện di phân tích của một số mẫu đại diện được trình bày ở hình 1. Các mẫu cho kết quả dương tính là mẫu xuất hiện băng DNA có kích thước ~730 bp, phù hợp với kích thước đoạn gen *helicase* của BQCV theo thiết kế, mẫu âm tính với BQCV không xuất hiện băng này.

Từ kết quả này có thể kết luận cặp mồi *Hel-BQC* do chúng tôi thiết kế đã khuếch đại thành công đoạn gen *helicase* của BQCV gây bệnh trên ong mật ở Việt Nam. Để khẳng định chắc

chắn sản phẩm RT-PCR chính là đoạn gen mã hóa helicase của BQCV, chúng tôi tách dòng gen sản phẩm RT-PCR vào vector pCR2.1, giải trình tự DNA và so sánh với trình tự DNA của BQCV đã được công bố trên Genbank bằng chương trình BLAST.



Hình 1. Kết quả điện di sản phẩm PCR gen *helicase* của BQCV gây bệnh trên các đàn ong mật của Việt Nam

M: Marker DNA 1kb, 1: đối chứng âm, ong âm tính với BQCV, ĐC 2-7: các mẫu ong dương tính với BQCV theo thứ tự lần lượt là BG.T1, BP.T2, ĐB.T3, ĐN.T4, HY.T5, TG.T6.

Kết quả giải trình tự đoạn DNA đặc hiệu BQCV

Phản ứng giải trình tự DNA được tiến hành trên máy xác định trình tự DNA tự động ABI prism 3100 Sequencer (Applied Biosystems) với bộ kit xác định trình tự BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit của hãng Applied Biosystems. Trình tự DNA thu được được phân tích bằng các phần mềm tin sinh Bioedit và BLAST (hình 2).

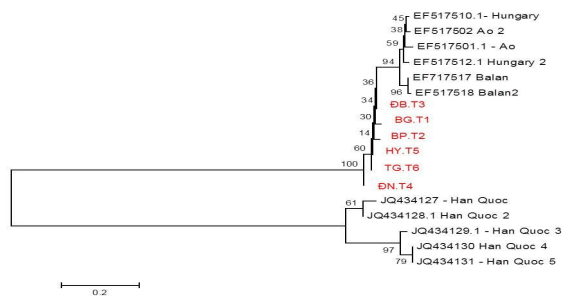
Tổng số base: 729; Adenine (A): 233; Thymine (T): 218; Guanine (G): 140; Cytosine: 138; tỷ lệ G~C: 31,8%.

Tiếp theo chúng tôi sử dụng phần mềm BLAST để so sánh đoạn trình tự thu được với trình tự gen của BQCV đã được công bố trên Genbank. Kết quả phân tích cho thấy, sản phẩm RT-PCR chính là gen mã hóa helicase, có độ tương đồng cao với các trình tự gen *Hel-BQC* của BQCV đã được công bố trên Genbank (kết quả không nêu ở đây).

1 GGTGTTAGCT ATATGCGACA CCCACTATAT AAACCCCATC AGCGAATTAT CTCTGAAATA
 61 TTGAACCAGT TACTTAGATT TGCCGATAAA ATAAAGAAGA AGGTGGGTAC GGATGCCTCT
 121 GTCCGGAACC CACCAGTTAC TCTATACTTG TATGGAGAAA CAGGAGTTGG TAAGTCTACT
 181 CTCACATACC CACTGTGTGC TACCCTTCTT AAAGCCATCT TTACAAAAGA AGGAAATACA
 241 GTGATGCTTG ATTCCCTTAA ACAACATTAT AAGGAGATGA TATATGTGAG AGCTGCTGAA
 301 CAAGAATTTT GGGACGGTTA CACACAACAA CTAGTCACCG TATTTGATGA TTTCAATCAA
 361 CAAGTTGATT CTTCGGCTAA TCCAAGTTTG GAGTTGTTTG AGATTATCAG GAGTTCCAAT
 421 ATCTTTCTTT ACCCGTTACA CATGGCGTCA ATAGAAGAGA AGGCGAACAC TGTTTTCCAA
 481 TCTAAAGTAA TTTTGTGCTC ATCGAACAA AAGACCCCAA AAAGTGAATC ATTAAATTAT
 541 CCAAAAGCTT TATTGAGAAG GTTTGCGAAA TTTGTTGAGG TAAAGAGAGC TCCTTCTGAA
 601 AATGGTACGT TCTCTACTGA TTGTTACTT TTTGTGCAAT ATGATCCATT CGATCATTGT
 661 AACATTGTTA AGTCAATGTC TTTCAATGAA TTGATAGATG AAGTAGTTGC CATGTACTTC
 721 CAGGAAGGA

Hình 2. Trình tự sản phẩm RT-PCR gen *helicase* gắn trong vector pCR2.1

Xác định nguồn gốc của BQCV trên ong mật ở Việt Nam



Hình 3. Cây phát sinh loài BQCV dựa trên trình tự gen mã hóa *helicase*. Các chủng BQCV của Việt Nam nằm cùng nhánh với các chủng BQCV của Balan, Hungary, Áo

Bên cạnh việc phát hiện sự lây nhiễm và sự phân bố của BQCV trên các đàn ong mật ở Việt Nam, việc xác định được nguồn gốc tiến hóa, đặc điểm phân tử của virus này có ý nghĩa hết sức quan trọng, cung cấp các cơ sở khoa học trong công tác dự phòng và khoanh vùng dịch bệnh. Trong khuôn khổ của nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành chọn mỗi đàn 1 mẫu dương tính với BQCV để giải trình tự đoạn gen *helicase* và tiến hành phân tích với các trình tự đã công bố trên Genbank. Khi so sánh các trình tự gen *helicase* từ BQCV phân lập từ ong mật ở Việt Nam, chúng tôi nhận thấy chúng có độ tương đồng rất cao (97-100%), trong đó 2 trình tự DB.T3 và HY.T5 có độ tương đồng 100%. Các virus này thu thập ở các đàn ong khác nhau và ở các tỉnh khác nhau, tuy nhiên đều có trình tự tương đồng rất cao. Điều này gợi ý rằng các

chủng BQCV hiện nay trên ong mật ở Việt Nam có cùng nguồn gốc và 6 mẫu virus trên có thể là đại diện cho các chủng virus đang gây bệnh trên các đàn ong của Việt Nam. Tuy nhiên, khi so sánh các trình tự này với các trình tự gen *Hel-BQC* công bố trên Genbank chúng tôi nhận thấy chúng có độ tương đồng thấp, dao động từ 88-93% với trình tự gen *helicase* của BQCV từ Ba Lan, Hungary, Áo và Hàn Quốc.

Để tìm hiểu rõ hơn về sự sai khác giữa các chủng BQCV tồn tại ở Việt Nam với các chủng BQCV trên thế giới, chúng tôi tiến hành xây dựng cây phát sinh loài trên cơ sở so sánh các trình nucleotide gen *Hel-BQC*. Cây phát sinh loài được xây dựng bao gồm 6 trình tự gen *Hel-BQC* ở Việt Nam mà chúng tôi phân lập được và 11 trình tự *helicase* từ BQCV ở các quốc gia khác (Ba Lan, Hungary, Áo và Hàn Quốc) bằng phần mềm MEGA (version 6.1). Thuật toán được chúng tôi sử dụng ở đây là neighbor joining với hệ số bootstrap lặp lại 1000 lần. Kết quả được thể hiện ở hình 3. Kết quả cho thấy, cây phát sinh loài chia ra làm 2 nhánh chính. Trong đó các chủng BQCV của Việt Nam và các nước Ba Lan, Hungary, Áo lập thành nhánh thứ nhất còn các chủng BQCV từ Hàn Quốc lập thành một nhánh riêng biệt thứ 2. Qua đó thấy rằng, BQCV lưu hành ở Việt Nam có thể có nguồn gốc từ các nước châu Âu mà không phải có nguồn gốc từ châu Á (Hàn Quốc). Nguyên nhân của điều này có thể là do người nuôi ong nhập khẩu ong chúa từ các nước châu Âu dẫn đến mang theo mầm bệnh BQCV xâm nhập vào các loài ong bản địa. Theo tác giả Nguyễn Duy

Hoan và nnk. (2008) [2], từ những năm 1960, các đàn ong Ý bắt đầu được nhập vào Việt Nam để nuôi. Tuy nhiên, trong nhánh thứ nhất, các chủng BQCV của Việt Nam cũng tạo thành một phân nhánh riêng biệt. Điều đó chứng tỏ rằng BQCV ở Việt Nam đã có những biến đổi đáng kể so với các chủng có nguồn gốc từ châu Âu. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng cho thấy cần có thêm những nghiên cứu về độc lực như khả năng lây nhiễm của các chủng BQCV đang tồn tại ở Việt Nam so với các chủng BQCV gây bệnh cho ong mật trên thế giới để từ đó có biện pháp phòng trừ hiệu quả.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ Phát triển khoa học và công nghệ Quốc gia (NAFOSTED) đề tài mã số: 106-NN.02-2014.24.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Adrian Gibbs J., Charles Calisher H., Fernando García-Arenal., 1997. Molecular Basis of Virus Evolution, 2583-2590.
- Allen M., Ball B., 1996. The incidence and world distribution of honey bee viruses. *Bee World*, 77: 141-162.
- Anderson D. L., 1993. Pathogens and queen bees. *Australasian Beekeeper*, 94(7): 292-296.
- Bailey L., Woods R. D., 1977. Three previously undescribed viruses from honey bee. *J. Gen. Virol.*, 25(2): 175-186.
- Berényi O., Bakonyi T., Derakhshifar I., Koglbberger H., Nowotny N., 2006. Occurrence of six honeybee viruses in diseased Austrian apiaries. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72(4): 2414-2420.
- Bùi Thị Thùy Dương, Hà Thị Thu, Mai Thùy Linh, Phạm Hồng Thái, Hà Thị Quyên, Đồng Văn Quyên, 2015. Điều tra sự phân bố tình trạng nhiễm virus Black Queen cell gây bệnh thối đen mũ chúa trên các đàn ong mật tại Việt Nam. *Tạp chí Công nghệ sinh học*, 13(2A): 37-42.
- Elize T., Sean D., Neil L., Mongi B., 2005. Detection of three honeybee viruses simultaneously by a single Multiplex Reverse Transcriptase PCR. *Afr. J. of Biotech.*, 4(7): 763-767.
- Freiberg M., De Jong D., Message D., Cox-Foster D., 2012. First report of sacbrood virus in honey bee (*Apis mellifera*) colonies in Brazil. *Genet. Mol. Res.*, 11(3): 3310-3314.
- Frick D. N., Lam A. M. I., 2006. Understanding Helicases as a Means of Virus Control. *Curr Pharm Des.*, 12(11): 1315-1338.
- Gallai N., Salles J. M., Settele J., Vaissière B. E., 2009. Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. *Ecol. Econ.*, 68(3): 810-821.
- Genersch E., Aubert M., 2001. Emerging and re-emerging viruses of the honey bee (*Apis mellifera* L.). *Vet. Res.*, 41-54.
- Hall T. A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.*, 41: 95-98.
- Nguyễn Duy Hoan, Phùng Đức Hoàn, Ngô Nhật Thăng, 2008. *Giáo trình kỹ thuật nuôi ong mật*. Nxb. Nông nghiệp, Hà Nội, 14.
- Kadare G., Haenni A. L., 1997. Virus-encoded RNA helicases. *Journal of Virology*, 71(4): 2583-2590.
- Kwong A. D., Rao B. G., Jeang K. T., 2005. Viral and cellular RNA helicase as antiviral target. *Nat Rev Drug Discov.*, 4(10): 845-853.
- Leat N., Ball B., Govan V., Davison S., 2000. Analysis of the complete genome sequence of black queen cell virus, a picorna-like virus of honey bees. *J. Gen. Virol.*, 81(8): 2111-2119.
- Nielsen S. L., Nicolaisen M., Kryger P., 2008. Incidence of acute bee paralysis virus, black queen cell virus, chronic bee paralysis virus, deformed wing virus, Kashmir bee virus and sacbrood virus in honeybees (*Apis mellifera*) in Denmark. *Apid.*, 39(21): 310.
- Olga Berényi, Tamás Bakonyi, Irmgard Derakhshifar, Hemma Köglberger, Grażyna Topolska, Wolfgang Ritter, Hermann Pechhacker, Norbert Nowotny, 2007. Phylogenetic analysis of Deformed Wing

- virus genotypes from diverse geographic origins indicates recent global distribution of the virus. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73(11): 3605-3611.
19. Reddy K. E., Choe S. E., Yoo M. S., Doan T. T. H., Kweon C. H., Ramya M., Yoon B. S., Nguyen T. K. L., Nguyen T. D. T., Quyen D. V., Jung S. C., Chang K. W., Kang S. W., 2013. Phylogenetic analysis of black queen cell virus genotypes in South Korea. *Virus Genes.*, 47(1): 126-132.
 20. Runckel C., Flenniken M. L., Engel J. C., Ruby J. G., Ganem D., Andino R., DeRisi J. L., 2011. Temporal analysis of the honey bee microbiome reveals four novel viruses and seasonal prevalence of known viruses, *Nosema*, and *Crithidia*. *PLoS ONE*, 6(6): e20656.
 21. Tentcheva D., Gauthier L., Jouve S., Canabady-Rochelle L., Dainat B., Cousserans F., Colin M. E., Ball B. V., Bergoin M., 2004. Polymerase chain reaction detection of deformed wing virus (DWW) in *Apis mellifera* L. and *Varroa destructor*. *Apidologie*, 35: 431-439.
 22. Tentcheva D., Gauthier L., Zappulla N., Dainat B., Cousserans F., Colin M. E., Bergoin M., 2004. Prevalence and seasonal variations of six bee viruses in *Apis mellifera* L. and *Varroa destructor* mite populations in France. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70: 7185-7191.
 23. van Engelsdorp D., Evans J. D., Saegerman C., Mullin C., Haubruge E., Nguyen B. K., Frazier M., Frazier J. D., Cox-Foster, Chen Y., Underwood R., Tarpay D. R., Pettis J. S., 2009. Colony Collapse Disorder: A Descriptive Study. *PLoS ONE*, 4(8): e6481.
 24. Yue C., Genersch E., 2005. RT-PCR analysis of Deformed wing virus (DWW) in bees (*Apis mellifera*) and mites (*Varroa destructor*). *J. Gen. Virol.*, 86(12): 3419-3424.
 25. Xu Guang Xi, 2007. Helicases as antiviral and anticancer drug targets. *Curr. Med. Chem.*, 14(8): 883-915.

EVOLUTION ORIGINS AND DIVERSIFICATION OF BLACK QUEEN CELL VIRUSES IN VIETNAM

Mai Thuy Linh, Ha Thi Thu, Nguyen Dinh Duy, Dong Van Quyen

Institute of Biotechnology, VAST. 18 Hoang Quoc Viet, Cau Giay, Hanoi, Vietnam.

SUMMARY

Black queen cell virus (BQCV), a picorna-like honeybee virus, is one of the most common viral infections in honey bees. However, little is known about this virus infection in Vietnam. In this study, a partial *helicase* enzyme coding region (ORF1) was PCR amplified from three *Apis cerana* and three *Apis mellifera* BQCV strains collected from honeybee colonies in different provinces of Vietnam, viz. Hung Yen, Bac Giang, Tien Giang, Dien Bien, Dong Nai, and Binh Phuoc. The PCR products were cloned into pCR2.1 vector and sequenced. The sequence analysis showed that the Vietnamese BQCV genomes were highly conserved and showed 97-100% identity. This suggests that the BQCV strains circulating in Vietnam are the same strains; however, they showed low (88-93%) similarity with BQCV strains in other countries. A phylogenetic tree based on the ORF1 region of 6 Vietnamese BQCVs was constructed, which were also compared with previously reported BQCV sequences derived from different countries. The result indicated that the Vietnamese BQCV strains and BQCV strains derived from Poland, Hungary, Austria formed one cluster, while all Korean isolates formed a separate cluster, suggesting that BQCV strains in Vietnam may be originated from the European countries.

Keywords: Black Queen cell virus (BQCV), helicase, honeybees, RT-PCR.

Ngày nhận bài: 21-6-2015