

## PHÂN LẬP VÀ SO SÁNH TRÌNH TỰ GIEN MÃ HÓA CHO PRÔTÊIN VỎ (CP) CỦA PVY Ở MỘT SỐ TỈNH THUỘC ĐỒNG BẰNG SÔNG HỒNG, VIỆT NAM

PHẠM THỊ VÂN, NGUYỄN MINH HÙNG,  
LÊ TRẦN BÌNH, CHU HOÀNG HÀ

*Viện Công nghệ sinh học*

*Potato virus Y* (PVY) là virút gây bệnh trên cây họ cà như cây tiêu, thuốc lá, cà chua... trong đó mạnh nhất là cây khoai tây. PVY là thành viên chính của chi *Potyvirus*. Đây là chi lớn nhất trong họ lớn nhất của virút thực vật *Potyviridae* [4] bao gồm: chủng phổ biến PVY<sup>O</sup> (chủng O), chủng gây hoại tử gân lá PVY<sup>N</sup> (chủng N), chủng gây loang lỗ lá và củ PVY<sup>C</sup> (chủng C) và chủng hoại tử củ PVY<sup>NTN</sup> (chủng NTN, chủng tái tổ hợp), ngoài ra còn có một số chủng khác [8].

PVY có cấu trúc hình sợi dài 700-750 nm, genome là RNA sợi đơn dương dài khoảng 10.000 nucleôtit [8] mang đầu 5' không dịch mã (5'-UTR), một khung đọc mở và đầu 3'-UTR mang đuôi polyA. Khung đọc mở mã hóa cho một đơn pôlyprôtêin lớn và xử lý sau dịch mã tạo ra ít nhất là 10 prôtêin chức năng [12]. *Potyvirus* được lây truyền chủ yếu thông qua vật chủ trung gian là rệp cây và tuyến trùng hại cây. Virút này phân bố hầu khắp thế giới nhưng chủ yếu là các nước trong khu vực nhiệt đới và cận nhiệt đới.

Nghiên cứu lịch sử tiến hóa của virút ở mức độ phân tử cung cấp thông tin quan trọng về bản chất sinh học của chúng như thay đổi trong đặc tính gây bệnh, khoảng cách địa lý và sự xuất hiện các loài mới để có chiến lược trong việc điều khiển chúng. Những nghiên cứu này rất phức tạp khi liên quan đến việc tìm hiểu sự đa dạng gây ra bởi đột biến, tái tổ hợp, chọn lọc và thích ứng [3, 7].

Prôtêin vỏ là một trong những yếu tố cần thiết trong quá trình xâm nhiễm của virút vào tế bào chủ [6] cũng như hình thành virion hoàn chỉnh của virút. Bất hoạt gien mã hóa cho prôtêin vỏ cũng đồng nghĩa với việc ngăn chặn sự nhân lên của virút. Trong nghiên cứu này,

chúng tôi đã tiến hành thu thập và phân lập gien mã hóa cho prôtêin vỏ của PVY ở một số khu vực thuộc Đồng bằng Sông Hồng nhằm mục đích tìm hiểu ở mức độ phân tử sự đa dạng của chúng, phân loại phân tử và tạo nguyên liệu gien cũng như thiết kế chiến lược cho việc điều khiển virút này thông qua cơ chế bất hoạt gien RNAi.

### I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

#### 1. Thu thập mẫu

Vật liệu thực vật sử dụng trong nghiên cứu là 4 mẫu lá khoai tây nghi nhiễm bệnh gân mạng lưới do PVY gây ra được thu từ 4 tỉnh đại diện có tỷ lệ nhiễm bệnh cao ở khu vực Đồng bằng sông Hồng gồm Hà Nội (HN), Nam Định (ND), Thái Bình (TB) và Bắc Ninh (BN). Các mẫu lá được cất giữ ở trong nito lỏng hoặc trong tủ lạnh -84°C cho tới khi sử dụng.

#### 2. Thiết kế môi đặc hiệu

Khai thác dữ liệu trong GenBank để tìm ra tất cả các trình tự gien CP của PVY. Sử dụng chương trình phần mềm SeqMan/Lasergene 7 để so sánh các trình tự gien CP với nhau và lựa chọn các vùng có độ bảo thủ cao nhất nằm gần hai đầu 5' và 3' của gien để thiết kế môi PVY-F1 (5'-GCYTTCCTGAAATGATGGT-3') và PVY-R1 (5'-GTCTCCTGATTGAAGTTTACA-3').

#### 3. Tách chiết RNA tổng số

RNA tổng số từ các mẫu lá khoai tây nghi nhiễm bệnh gân mạng lưới được tách chiết theo hướng dẫn sử dụng hóa chất Trizol Reagents (Invitrogen, Mỹ). Lá khoai tây (~200 g) được nghiền trong nito lỏng thành bột mịn. Bổ sung 1 ml Trizol Reagents, đảo nhẹ ở nhiệt độ phòng trong 10 phút, bổ sung 200  $\mu$ l Chloroform:

Isoamyl (24:1), đảo nhẹ và ly tâm 10000 vòng trong 10 phút. Hút dịch nổi, kết tủa RNA bằng isopropanol và pha loãng RNA trong nước khử DEPC 0,01%.

#### 4. Phản ứng RT-PCR

Phản ứng RT - PCR được tiến hành trong hai bước. Bước một cDNA được tạo ra theo bộ kit First stand cDNA synthesis (Fermentas) trong 20 µl dung dịch có chứa 10 pg - 5 µg RNA tổng số (2 µl); 200 ng mỗi ngẫu nhiên (1 µl); bổ sung nước khử ion tới thể tích 12 µl. Dung dịch phản ứng này được ủ ở nhiệt độ 70°C trong 5 phút, sau đó giữ ở nhiệt độ 4°C. Tiếp theo bổ sung 5 µl đệm phản ứng 5X; 1 µl chất ức chế ribonuclease (40 đơn vị/µl) và 2 µl dNTPs 10 mM. Hỗn hợp được trộn nhẹ và ủ 25°C sau 5 phút bổ sung 1 µl enzym phiên mã ngược RevertAid™ H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase và thực hiện chu kỳ nhiệt như sau: 25°C trong 10 phút, 42°C trong 60 phút, 70°C trong 10 phút và giữ ở 4°C. Bước hai phản ứng PCR nhân gen đặc hiệu được thực hiện trong dung dịch bao gồm 27,75 µl nước; 5 µl đệm PCR 10X; 5 µl MgCl<sub>2</sub> 25 mM; 4 µl dNTPs 2,5 mM; 2 µl 10 pmol/µl mỗi loại mỗi PVY-F1 và PVY-R1; 0,25 µl Taq polymerase 5 u/µl; 4 µl cDNA và theo chu kỳ nhiệt như sau: 94°C/3 phút; 35 chu kỳ (94°C/1 phút, 52°C/45 giây, 72°C/1 phút 30 giây); 72°C/10 phút và giữ ở 4°C cho đến khi phân tích. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1% trong đệm 1X TAE, nhuộm gel trong dung dịch Ethidium bromide

và thổi gien bằng bộ Kit của Qiagen.

#### 5. Tách dòng gen

Sản phẩm PCR được gắn vào trong vector tách dòng pTZ57R/T (Fermentas) và biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* DH5α. Chọn lọc các khuẩn lạc xanh/trắng trên môi trường thạch LB có bổ sung 50 mg/l Ampicilin, 40 mg/l X-gal và 0,1 mM IPTG. Tách chiết plasmid theo hướng dẫn sử dụng của QIAprep Spin Miniprep (Qiagen). Kiểm tra sự có mặt của DNA tái tổ hợp bằng phương pháp colony-PCR với cặp mồi pUC18-F1 và pUC18-R1. Chọn các mẫu plasmid tái tổ hợp có kích thước như mong muốn để tinh sạch và xác định trình tự tên máy ABI PRIMS® 3100 Avant Genetic Analyzer.

#### 6. Phân tích trình tự

Trình tự 3 đoạn gien của ba thể phân lập sau khi xác định trình tự được đăng ký trong ngân hàng gien (GeneBank). Trong đó gien CP của mỗi thể phân lập được so sánh với một số thể phân lập đại diện chủng PVY<sup>O</sup>, PVY<sup>N</sup>, PVY<sup>NTN</sup> và một số chủng PVY khác không gây bệnh trên khoai tây-ký hiệu là PVY<sup>NP</sup> (NP-non potato) và cũng so sánh với một thể phân lập *Peper mottle virus-pepMoV* [13] như một virút ngoài nhóm (bảng 1).

Sử dụng các phần mềm Lasergene 7 và BioEdit để so sánh các trình tự gien và dựng cây phát sinh chủng loại theo phương pháp clustalW [11].

Bảng 1

Mã số, nguồn gốc đất nước và cây chủ của các thể phân lập/chủng PVY

Chủng	Mã số	Nguồn gốc đất nước	Thể phân lập	Vật chủ	Chủng	Mã số	Nguồn gốc đất nước	Thể phân lập	Vật chủ
O	AF118153	India	EMoV		NTN	AY884982	USA	423-3	
O	AJ223593	Switzerland	0768-O		NTN	DQ925437	Hà Nội, Việt Nam	VN/P2	potato
O	AJ390305	UK	O-Des	potato	NTN	M95491	Hungary	PVY-NTN-H	
O	AY792597	China	SD-TA		NTN	X79305	Austria	GCP	
O	D12539	Japan	PVY-O-Jap	potato	NTN	X92078	Lebanon	LB	
O	DQ157179	USA	OR-1	potato	NTN	AJ890345	Germany	Linda	potato
O	DQ925435	Đà Lạt, Việt Nam	VN/P1	potato	NTN	EF016294	UK	v942490	potato
O	U09509	Canada	PVY-O	potato	NP	AF012027	Germany	C-28	
O	X14136	Argentina	PVY-O-Am	potato	NP	AF012028	Germany	C-30	

O	X68222	USA	PVY-US	potato	NP	AF012029	Germany	C-45	
O	Z70239	Poland	PVY-O-LW	potato	NP	AF237963	Italy	nnp	pepper
N	AB025416	Japan	N-TND6		NP	AF463399	USA	MrNs	tobacco
N	AF255660	Brazil	PVY-NBR	potato	NP	AJ005639	Spain	P21-82	pepper
N	AJ390285	UK	N-RB-N	potato	NP	AJ303093	Italy	Si15	pepper
N	AM268435	New Zealand	PVY-N-NZ	potato	NP	AJ303094	Turkey	Si15	pepper
N	D12570	Japan	PVY-T	potato	NP	AJ303095	Turkey	Tu12.3	pepper
N	U91747	USA	PVY-N27		NP	AJ303096	Spain	PN-82	pepper
N	X97895	Switzerland	PVY-N-605		NP	AJ390307	Portugal	C-O-Tom	tomato
N	Z70237	Poland	PVY-N-Ny	potato	NP	AJ439544	France	Son41	Solanum nigrum
NTN	AJ390293	Slovenia	Slov94		NP	AJ439545	Spain	LYE84.2	tomato
NTN	AJ889866	Poland	12-94	potato	NP	X68224	USA	NsNr	Tobacco
					pepMoV	M96425	USA	California	

## II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

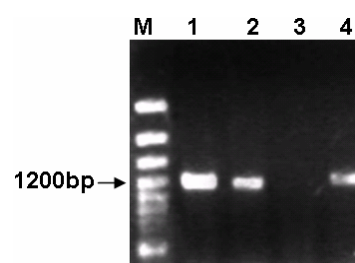
Bảng 2

### 1. Kết quả RT-PCR và xác định trình tự

Hình 1 là kết quả điện di sản phẩm RT-PCR nhân gen mã hóa cho prôtêin vỏ của PVY với cặp mồi được thiết kế đặc hiệu PVY-CP-F1 và PVY-CP-R1. Các phân đoạn DNA có kích thước như dự đoán khoảng 1200 bp đã được nhận bản thành công ở các mẫu số 1, 2 và 4 tương ứng với các địa phương khác nhau. Trong đó, mẫu số 3 (BN) đã không khuếch đại thành công. Các phân đoạn có kích thước mong muốn này được đồng hóa vào tế bào *E. coli* DH5 $\alpha$  bằng cách gắn vào vector tách dòng pTZ57R/T. Những dòng khuẩn lạc dương tính với phản ứng colony-PCR đã được chọn để tách plasmid làm mẫu cho phản ứng đọc trình tự. Trình tự nucleôtit được so sánh trên BLAST/NCBI cho thấy các trình tự này là chứa trình tự gen mã hóa cho prôtêin vỏ của PVY. Vùng mã hóa cho gen CP có kích thước 801 bp và đã được đăng ký vào Ngân hàng gen Quốc tế (NCBI) (bảng 2).

### Kích thước và mã số trong NCBI của các dòng PYV Việt Nam

Mẫu	Kích thước đoạn DNA (bp)	CP (bp)	Mã số trong NCBI
HN	1200	801	AM411504
ND	1200	801	AM411503
TB	1200	801	AM411502



**Hình 1.** Kết quả điện di sản phẩm RT-PCR nhân gen CP của PYV  
M. Thang DNA 100 bp; 1. ND; 2. TB; 3. BN; 4. HN

	10	20	30	40	50	60	70	80
PYV-TB	GCCTTCACTG	AAATGATGGT	CGCATTAGAG	ATGAGTTTGA	ATTTGACTCT	TATGAAGTAT	ACCATCAAGC	AAATGACACA
PYV-ND	..T.....	.....	T..C..G...	...AC...	G..GC..TA..	.....GC	.....G	.....
PYV-HN	.....	.....	T..C..G...	...AC...	G..GC..TA..	.....GC	.....G	.....
	90	100	110	120	130	140	150	160
PYV-TB	ATTCGATGCG	GAGGAAGCAG	CAAGAAAGAT	GCAAGACCAG	AGCAAGGCAG	CATCCAGTCA	AACCCGAACA	AAGGAAAAGA
PYV-ND	.....C	T.....G..A	...A..A..	.....T..	...T..AC..	...T..TC...	..G..A...G..	.....
PYV-HN	.....C	T.....G..A	...A..A..	.....T..	...T..AC..	...T..TC...	..G..A...G..	.....
	170	180	190	200	210	220	230	240
PYV-TB	TAAGGATGTG	AATGCTGGTA	CATCTGGGAC	ACATACTGTG	CCGAGAATCA	AGGCTATCAC	GTCCAAAATG	AGAATGCCCA
PYV-ND	A.....C...	...T...A..	.....A..	T.....	...AC...T..	..A.....	.....	.....
PYV-HN	A.....C...	...T...A..	.....A..	TT.....	...AC...T..	..A.....	.....	.....

	250	260	270	280	290	300	310	320
PYV-TB	AAAGCAAGGG	AGCAACCGTG	CTAAACTTAG	AACTTGTCT	TGAGTATGCT	CCACAACAAA	TTGATATTTT	AAACTACTGG
PYV-ND	.G..T..A..	C...T..A	A...T..G.	.....A..	C.....G	.....G...	....C..C..	.....A
PYV-HN	.G..T..A..	T...T..A	...T..G.	.....A..	C.....G	.....G...	....C..C..	.....A
	330	340	350	360	370	380	390	400
PYV-TB	GCAACTCAAT	CACAGTTTGA	TACGTGGTAT	GAGGCAGTGC	GGATGGCATA	CGACATAGGA	GAAACTGAGA	TGCCAACTGT
PYV-ND	.....	.....	.....	.A..G..A.	AAC..T....	.....	.....A.	.....
PYV-HN	.....	.....	.....	.A..G..A.	AAC..T....	.....	.....A.	.....
	410	420	430	440	450	460	470	480
PYV-TB	GATGAATGGG	CTTATGGTTT	GGTGCATTGA	AAATGGAACC	TCGCCAAATG	TCAACGGAGT	TTGGGTTATG	ATGGATGGGG
PYV-ND	.....	.....	.....	.....	.....CA	.....	.....	.....A.
PYV-HN	.....	.....	.....	.....	.....CA	.....	.....	.....A.
	490	500	510	520	530	540	550	560
PYV-TB	ATGAACAAGT	CGAGTACCCG	TTGAAACCAA	TCGTTGAGAA	TGCAAAACCA	ACCCTTAGGC	AAATTATGGC	ACATTTCTCA
PYV-ND	.....	A.....	C.....	.....	.....	.....	.....	.....A.
PYV-HN	.....	A.....	C.....	.....	.....	.....	.....	.....A.
	570	580	590	600	610	620	630	640
PYV-TB	GATGTTGCAG	AAGCGTATAT	AGAAATGCCG	AACAAAAGG	AACCATATAT	GCCACGATAT	GTTTAAATTC	GAAATCTGCG
PYV-ND	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....G..	.....T....
PYV-HN	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....G..	.....T....
	650	660	670	680	690	700	710	720
PYV-TB	GGATGTGGGT	TTAGCGCGTT	ATGCTTTTGA	CTTTTATGAG	GTCACATCAC	GAACACCAGT	GAGGCTTAGG	GAAGCGCACA
PYV-ND	C...GAA..	.G..T..C.	.....	.....	.....	.....	.....	.....
PYV-HN	C...GAA..	.G..T..C.	.....	.....	.....	.....	.....	.....T.
	730	740	750	760	770	780	790	800
PYV-TB	TTCAAATGAA	GGCCGCAGCA	TTGAAATCAG	CCCAACTTCG	ACTTTTCGGG	TTGGACGGTG	GCATCAGTAC	ACAAGAGGAG
PYV-ND	.....	.....	.....	.....T.....	.....	.....	.....	.....
PYV-HN	.....	.....	.....	.....T.....	.....	.....	.....	.....
	810	820	830	840	850	860	870	880
PYV-TB	AACACAGAGG	GGCACACCAC	CGAGGATGTC	TCTCCAAGTA	TGCATACTCT	ACTTGGAGTT	AAGAACATGT	GATGTAGTGT
PYV-ND	.....	A.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....C
PYV-HN	.....	A.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....C
	890	900	910	920	930	940	950	960
PYV-TB	CTCTCCGGAC	GATATATAAG	TATTTACATA	TGCAGTAAGT	ATTTTGGCTT	TTCCTGTACT	ACTTTTATCA	TAATTAATAA
PYV-ND	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
PYV-HN	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	970	980	990	1000	1010	1020	1030	1040
PYV-TB	TCAGTTTGAA	TATTACTAAT	AGATAGAGGT	GGCAGAGTGA	TTTCGTCAAT	GTGGTGACTC	TATCTTTTAA	TCCGCATTA
PYV-ND	.....	.....	.....	.....G.....	.....	.....	.....	.....
PYV-HN	.....	.....	.....	.....G.....	.....	.....	.....	.....
	1050	1060	1070	1080	1090	1100	1110	1120
PYV-TB	TTAAGTCTTA	GATAAAAGTG	CCGGTGTGTC	GTTGTTGTGG	ATGATTCATC	GATTAGGTGA	TGTTGCGATT	CTGTCTGAGC
PYV-ND	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
PYV-HN	.....	.....	.....	.....T.....	.....	.....	.....	.....
	1130	1140	1150	1160	1170	1180	1190	1200
PYV-TB	AGTGATTATG	TCTGGATCTA	TCTGCTTGGG	TGGTGTGTGG	ATTTTCGTCAT	AACAGTGACT	GTAACCTTCA	ATCAGGAGAC
PYV-ND	.....	C.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
PYV-HN	.....	C.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....

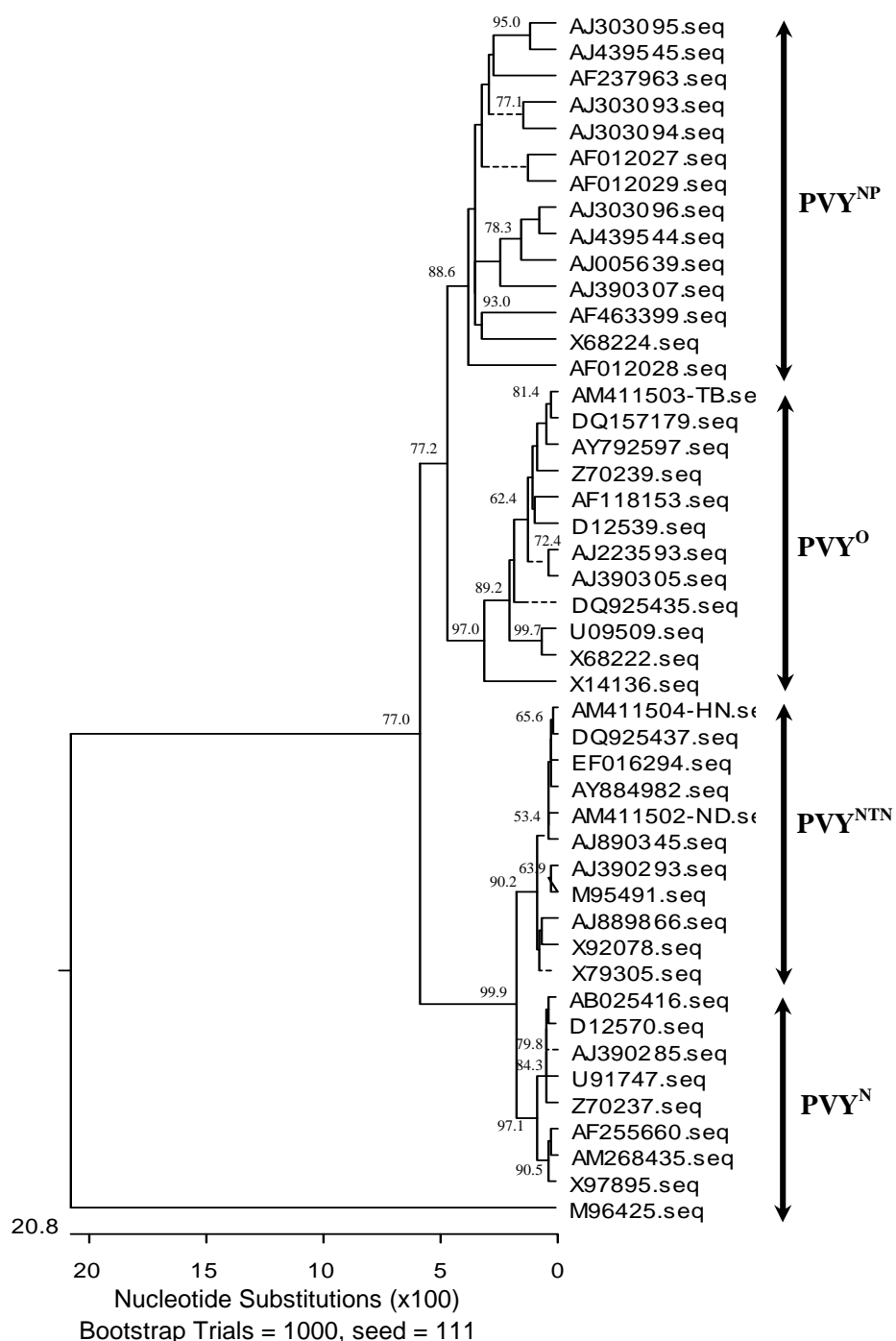
Hình 2. So sánh trình tự đoạn DNA phân lập của 3 dòng PVY Việt Nam (vùng bôi đen là vị trí gen CP)

## 2. Kết quả phân tích trình tự

So sánh 3 thể phân lập PVY HN, ND và TB với các thể phân lập đại diện cho các chủng PVY đã công bố có độ tương đồng khá cao (89,5-99,6% ở mức độ nucleôtit; 91,8-99,6% ở mức độ axit amin) còn so với một thể phân lập pepMoV là rất thấp (63,0-63,7% ở mức độ nucleôtit; 74,9% ở mức độ axit amin). Điều này chứng tỏ, cả ba thể phân lập không phải là

pepMoV mà là PVY.

Trong ba thể phân lập nghiên cứu, PVY HN và ND có độ tương đồng về trình tự gen CP so với nhau rất cao (99,1% ở mức độ nucleôtit và 98,9% ở mức độ axit amin) còn PVY TB có độ tương đồng thấp hơn so với PVY HN và ND (91,3% ở mức độ nucleôtit và 93,6% ở mức độ axit amin). Điều này chứng tỏ, PVY HN và ND đều thuộc một chủng, còn PVY TB thuộc chủng khác.



**Hình 3.** Cây phát sinh chủng loại dựa vào trình tự nuclêôtit gen CP PVY

Ba thể phân lập PVY HN, ND và TB so sánh với các thể phân lập đại diện một số chủng PVY đã công bố trong NCBI (bảng 1). Những giá trị bootstrap lớn hơn 50% mới được biểu diễn trên hình.

Khi so sánh trình tự gen CP PVY của ba thể phân lập với các thể phân lập đại diện cho các chủng PVY đã công bố, cho thấy thể phân lập TB có độ tương đồng ở mức độ nuclêôtit và axit

amin tương ứng từ 93,9-99,5% và 93,3-99,6% so với các thể phân lập đại diện chủng PVY<sup>O</sup>; từ 90,6-91,5% và 92,9-94,0% so với các thể phân lập đại diện chủng NTN; từ 89,5-98,8% và 92,5-

93,3% so với các thể phân lập đại diện chủng N; từ 90,9-93,1% và 92,5-96,6% so với các thể phân lập đại diện chủng khác. Như vậy, PVY TB có độ tương đồng so với các thể phân lập đại diện chủng PVY<sup>O</sup> cao hơn so với các thể phân lập đại diện các chủng PVY khác. Trong đó, PVY TB có độ tương đồng cao nhất (99,5% ở mức độ nucleôtit và 99,6% ở mức độ axit amin) so với thể phân lập PVY OR-1 (mã số DQ157179-USA). Điều này chứng tỏ, PVY TB nghiên cứu thuộc chủng PVY<sup>O</sup>.

Phân tích hai thể phân lập PVY HN và ND cho thấy chúng có độ tương đồng cao so với các thể phân lập đại diện chủng PVY<sup>NTN</sup> trong khi đối với các thể phân lập đại diện cho các chủng PVY khác lại có độ tương đồng thấp hơn. Cụ thể, độ tương đồng ở mức độ nucleôtit và axit amin tương ứng của PVY HN so với các thể phân lập đại diện chủng PVY<sup>NTN</sup> từ 98,5-99,6% và 98,5-99,6%, chủng PVY<sup>N</sup> là 96,8-97,3% và 98,1-98,9%, chủng PVY<sup>O</sup> là 89,5-91,4% và 92,1-94,0% và so với PVY<sup>NP</sup> là từ 88,0-91,0% và 91,8-94,0%; còn độ tương đồng ở mức độ nucleôtit và axit amin tương ứng của PVY ND so với các thể phân lập đại diện chủng PVY<sup>NTN</sup> từ 98,4-99,4% và 98,1-99,3%, chủng PVY<sup>N</sup> là 96,4-97,4% và 98,9-99,3%, chủng PVY<sup>O</sup> là 91,8-93,6% và 89,5-91,4% và so với PVY<sup>NP</sup> là từ 88,5-91,0% và 92,1-93,6%. Trong đó, PVY HN có độ tương đồng cao nhất (99,6%) ở mức độ nucleôtit so với PVY VN/P2 (mã số DQ925435-Việt Nam); còn PVY ND có độ tương đồng cao nhất (99,3%) ở mức độ nucleôtit so với hai thể phân lập thuộc chủng PVY<sup>NTN</sup> là PVY Linda (mã số AJ890345-Germany) và V942490 (mã số EF016294-UK). Điều này chứng tỏ, PVY HN và ND nghiên cứu thuộc chủng PVY<sup>NTN</sup>.

Phân tích độ tương đồng trên cũng tương thích với sự phân tích cây phân loại dựa vào trình tự nucleôtit cũng như trình tự axit amin của gen CP đều cho thấy thể phân lập PVY TB nằm trong một nhánh với các thể phân lập đại diện chủng PVY<sup>O</sup>; còn hai thể phân lập PVY HN và ND nằm trong một nhánh với các thể phân lập đại diện chủng PVY<sup>NTN</sup> (hình 3).

### 3. Thảo luận

PVY là virút gây bệnh trên cây họ cà, trong đó chủ yếu là cây khoai tây. Bằng việc sử dụng kỹ thuật RT-PCR và xác định trình tự gen CP cho thấy virút phân lập được trên cây khoai tây

là PVY.

Đa dạng di truyền ở mức độ phân tử là cần thiết trong một quần thể, giúp các cá thể có thể thích nghi trong những môi trường khác nhau. Dựa vào sự đa dạng này có thể xây dựng được cây phát sinh chủng loại, mối liên hệ giữa các loài và cho biết một loài tiến hóa như thế nào dưới áp lực của môi trường biến đổi [10]. Năm 2008, Hà Việt Cường và cộng sự cũng đã công bố một nghiên cứu về PVY thu thập trên cây khoai tây ở Việt Nam, đó là hai thể phân lập PVY VN/P2 (mã số DQ925437) thu thập tại Hà Nội thuộc chủng PVY<sup>NTN</sup> và PVY VN/P1 (mã số DQ925435) thu thập tại Đà Lạt thuộc chủng PVY<sup>O</sup> [5]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi cũng đã phân lập một cách ngẫu nhiên được ba thể phân lập PVY thuộc đồng bằng Sông Hồng, trong đó, có hai thể phân lập HN và ND đã được xác định thuộc chủng PVY<sup>NTN</sup> còn thể phân lập TB thuộc chủng PVY<sup>O</sup>. Điều này chứng tỏ, kết quả nghiên cứu của chúng tôi không những thêm một lần nữa khẳng định PVY gây bệnh trên cây khoai tây trồng tại Hà Nội thuộc chủng PVY<sup>NTN</sup> mà còn cho thấy sự khác nhau di truyền của các chủng PVY này là hoàn toàn ngẫu nhiên không phụ thuộc vào không gian và thời gian thu mẫu.

Phân tích trình tự cho thấy độ tương đồng của các thể phân lập của Việt Nam mà cùng thuộc một chủng có độ tương đồng so với nhau khá cao, chủng PVY<sup>NTN</sup> là 99,3% (HN) và 99,6% (ND) so với PVY-VN/P1; chủng PVY<sup>O</sup> là 98,4% (TB) so với PVY-VN/P2. Điều này có thể phỏng đoán rằng các thể phân lập PVY thuộc cùng một chủng thu thập ở Việt Nam có chung một nguồn gốc, mặc dù chưa biết chính xác nguồn gốc du nhập của các chủng PVY vào Việt Nam là từ đâu. Đặc biệt, việc tìm thấy độ tương đồng cao ở đầu 3' của gen CP của ba thể phân lập PVY nghiên cứu trên cây khoai tây cũng có nghĩa là vùng gen CP này có thể được sử dụng làm nguyên liệu cho tạo cây khoai tây chuyển gen kháng virút PVY ở Việt Nam.

Gen CP của PVY đóng một vai trò cần thiết trong sự di chuyển virút, vector truyền bệnh và sự phân hóa triệu chứng [1] cũng như là đối tượng của nghiên cứu huyết thanh học của PVY để xác định chủng virút gây bệnh bằng kháng thể đơn dòng [9]. Trong nhiều trường hợp, một vài axit amin trên prôtêin CP của PVY có thể xác định triệu chứng cũng như chủng virút gây bệnh. Theo nghiên cứu của Mohamad Chikh Ali

và cộng sự, vị trí axit amin thứ 29 của gen CP của PVY là Gly<sub>29</sub> bảo thủ cho các chủng PVY<sup>O</sup>, PVY<sup>C</sup>, PVY<sup>NW</sup> và PVY<sup>NP</sup> trong khi Gln<sub>17</sub> và Glu<sub>31</sub> lại bảo thủ trong gen CP của PVY<sup>NNTN</sup> [2]. Nghiên cứu của chúng tôi cũng giống với những nhận định của Chikh Ali rằng Gly<sub>29</sub> chỉ có ở thể phân lập PVY TB (PVY<sup>O</sup>), còn Gln<sub>17</sub> và Glu<sub>31</sub> chỉ có ở hai thể phân lập PVY HN và ND (PVY<sup>NNTN</sup>). Vì vậy, ba thể phân lập của chúng tôi có thể được sử dụng để lập nhóm cho PVY mới khám phá dựa trên dữ liệu trình tự gen cũng như có thể sử dụng gen CP làm nguyên liệu cho xây dựng bộ kit chẩn đoán bệnh virút bằng kỹ thuật ELISA.

### III. KẾT LUẬN

1. Bằng kỹ thuật RT-PCR đã xác định được ba mẫu khoai tây thu tại Hà Nội, Nam Định và Thái Bình nhiễm PVY.

2. Đã tách dòng và xác định thành công trình tự đoạn gen mã hoá cho prôtêin CP của ba thể phân lập PVY ở trên với kích thước 1200 bp. Trình tự gen CP với kích thước 801 bp của ba thể phân lập đã được đăng ký trong GenBank với mã số là AM411504 (Hà Nội), AM411503 (Nam Định) và AM411502 (Thái Bình)

3. Phân tích độ tương đồng về trình tự và cây phân loại gen CP cho biết hai thể phân lập PVY Hà Nội và Nam Định thuộc chủng PVY<sup>NNTN</sup> và PVY Thái Bình thuộc chủng PVY<sup>O</sup>.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Callaway A. et al., 2001: Annu. Rev. Phytopatho., 39: 419-460.
2. Chikh Ali M. et al., 2007: Virus Gense, 35: 359-367.
3. Delatte H. et al., 2005: J. Gen. Varol., 86: 1533-1542.
4. Fauquet C. M. et al., 2005: Virus Taxonomy. Elsevier Academic Press, San Diego, California.
5. Ha C. et al., 2008: Arch. Virol., 153: 45-60.
6. Hofius D. et al., 2007: Virology., 81(21): 11870-11880.
7. Monero D. et al., 2004: Virology, 318: 451-460.
8. Ogawa T. et al., 2008: Virus research, 199-212.
9. Ounouna H. et al., 2002: Plant Pathology, 51: 487-494.
10. Schneider W. L., Roossinck M. J., 2001: J. Virol., 75: 6566-6571 .
11. Thompson J. D. et al., 1994: Nucleic Acids Reasearch, 22: 4673-4680.
12. Urcuqui-Inchima S. et al., 2001: Virus Res, 74: 157-175.
13. Vance V. B. et al., 1992: Virology, 191: 19-30.

## SEQUENCE VARIETIES IN POTATO VIRUS Y ISOLATED FROM SONG HONG RIVER DELTA PROVINCES

PHAM THI VAN, NGUYEN MINH HUNG, LE TRAN BINH, CHU HOANG HA

### SUMMARY

*Potato virus Y* (PVY) is one of the most common and destructive viruses found in potato. The virus is the type-member of the *Potyvirus* genus, which the largest among the plant virus groups. This virus is characterized by flexuous particles containing a 10 kb positive-sense RNA. Characterization of newly emerged recombinant strain variants has included analysis of nucleic acid data, enabling development of new detection assays, often based on RT-PCR techniques. In this work, we used the RT-PCR techniques to analyze genetic diversity of PVY on potato which were collected from Song Hong river delta provinces (Hanoi - HN, Nam Dinh - ND and Thai Binh - TB) by cloning, sequencing and analyzing coat protein (CP) coding gene. Three sequences of the CP gene with the length of 801 bps have been registered in GenBank as accession AM411504 for Hanoi isolate, AM411503 for Nam Dinh isolate and AM411502 for Thai Binh isolate. The identities of three isolates together in nucleotide and amino acid level are 91.3-99.1% and 93.6-98.9%, respectively. On the basis of sequence identity and phylogenetic analysis of nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of CP revealed that HN and ND isolates belong to PVY<sup>NNTN</sup> and TB isolate belongs to PVY<sup>O</sup>.

Ngày nhận bài: 20-3-2008