

ĐÁNH GIÁ ĐA DẠNG DI TRUYỀN CÁC DÒNG VIRUS GÂY BỆNH VÀNG LÙN Ở LÚA TẠI CÁC TỈNH ĐỒNG BẰNG SÔNG CỬU LONG

Nguyễn Trung Nam, Nguyễn Minh Hùng, Chu Hoàng Hà, Hoàng Thị Thu Hằng, Lê Trần Bình

Viện Công nghệ sinh học

TÓM TẮT

Rice Grassy Stunt Virus (RGSV), Rice Ragged Stunt Virus (RRSV) và Rice Tungro Spherical Virus (RTSV) là ba chủng virus thuộc họ *Tenuivirus* gây bệnh vàng lùn ở lúa (*Oryza sativa* L.) với những đặc điểm chung là có cấu tạo dạng sợi; genome gồm các sợi RNA âm, lưỡng tính. Gần đây, dịch bệnh đã lây lan nhanh và phát triển trên diện rộng ở các tỉnh đồng bằng sông Cửu Long (ĐBSCL), làm giảm nghiêm trọng năng suất lúa. Các mẫu lá lúa nhiễm bệnh vàng lùn tại một số tỉnh thuộc khu vực này đã được thu thập phục vụ nghiên cứu tách dòng gen và đánh giá đa dạng di truyền của các virus gây bệnh. Để tách dòng gen mã hóa cho protein vỏ (CP) của virus, các cặp mồi được thiết kế dựa trên trình tự genome của các chủng virus này trong Ngân hàng gen quốc tế (GenBank). Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã tách dòng thành công và xác định trình tự gen NCP của chủng RGSV. Tuy nhiên, gen CP của RRSV và RTSV đã không tách dòng được, một phần có thể do tỷ lệ nhiễm của hai chủng virus này không cao, một phần có thể cặp mồi thiết kế không đặc hiệu cho các dòng virus này. Gen NCP của các dòng RGSV giống nhau từ 97% đến 99,8% ở mức độ nucleotide và từ 91,5% đến 99,7% ở mức độ amino acid. Trên cây phát sinh chủng loại, các mẫu RGSV của Việt Nam và các mẫu virus trong GenBank thuộc về hai nhóm khác nhau. Chúng tôi kết luận rằng chủng RGSV là chủng virus phổ biến nhất gây hại trên cây lúa tại các tỉnh ĐBSCL và đây là chủng virus có mức độ sai khác di truyền thấp.

Từ khóa: Đa dạng di truyền, gen CP, lúa, RT-PCR, virus lùn lúa cỏ

MỞ ĐẦU

Gạo là nguồn lương thực giàu chất dinh dưỡng chủ yếu trên thế giới, đứng thứ ba sau ngô và lúa mì về sản lượng, cung cấp trên 20% calories, 15% protein, các chất khoáng và chất xơ cho con người. Từ 1990 đến nay, Việt Nam đứng thứ 5 trên thế giới về xuất khẩu gạo và tổng sản lượng đạt khoảng 36 triệu tấn/năm (FAO, 2005). Khoảng 52% diện tích lúa được trồng ở đồng bằng sông Cửu Long (ĐBSCL). Tuy nhiên, sản lượng lúa bị giảm sút nghiêm trọng bởi các bệnh virus do rầy nâu (*Nilaparvata lugens* Stal) lây truyền (Miranda *et al.*, 2000), đặc biệt là bệnh vàng lùn xảy ra trong thời gian gần đây. Bệnh này do sự tổ hợp từ một đến ba loại virus thuộc họ *Tenuivirus* sau đây gây ra. Virus lùn lúa cỏ (Rice Grassy Stunt Virus- RGSV), virus lùn xoắn lá (Rice Ragged Stunt Virus- RRSV) và virus Tungro (Rice Tungro Spherical Virus- RTSV) (Jones *et al.*, 1991; Shen *et al.*, 1993; Zhang *et al.*, 1993; Murphy *et al.*, 1995; Mayo *et al.*, 2000). Trong một số trường hợp, cây lúa bị nhiễm cùng một lúc 2 hoặc 3 loại virus này (Nguyễn Văn Đức Tiến, 2007). Bụi lúa bị bệnh ban đầu có màu xanh nhạt, sau ngả sang màu vàng và cam. Lúa hồi xanh

không đều sau khi cấy, lá hẹp, hơi rũ, lá có màu xanh đậm hoặc màu ri sắt. Thời kỳ đẻ nhánh, lúa bệnh đẻ nhiều nhánh, bụi lúa lùn to, sau đó sẽ khô như bị cháy rẫy. Giai đoạn trổ, lúa không trổ được hoặc bông cho hạt lép (Chi cục Bảo vệ thực vật thành phố Hồ Chí Minh, 2006). Đầu vụ hè thu 2007, dịch bệnh lại phát triển rộng ở các tỉnh ĐBSCL với mật độ rầy nâu rất cao. Do ảnh hưởng của dịch bệnh này trên cây lúa, năm 2007 Việt Nam dự kiến sẽ giảm sản lượng xuất khẩu gạo xuống còn 4 triệu tấn, giảm 1 triệu tấn so với năm 2006 (Phạm Văn Dur, 2006; Cục Bảo vệ thực vật, 2007).

Đặc điểm chung của các virus thuộc họ *Tenuivirus* là có cấu tạo dạng sợi xoắn rộng 6 - 8 nm; dài 200 - 2400 nm; genome gồm các sợi RNA âm, lưỡng tính (nghĩa là tổng hợp các protein khác nhau từ sợi RNA âm lẫn sợi RNA dương). Đầu 3' và 5' của mỗi sợi RNA bổ trợ cho nhau, nên có khả năng tạo cấu trúc hình tròn và trình tự của đoạn bổ trợ này tương đối ổn định (Toriyama *et al.*, 1997; Chomchan *et al.*, 2002). Trong số 3 chủng virus nghiên cứu, RGSV là virus có tần số xuất hiện nhiều nhất và gây bệnh trên một diện tích rộng (Phạm Văn Dur, 2006). Genome của RGSV có 6 sợi RNA trong khi các

virus khác trong họ *Tenuivirus* có từ 4 - 5 sợi RNA. Sợi RNA5 và RNA6 của RGSV tương ứng với sợi RNA3 và RNA4 của các virus khác trong họ *Tenuivirus*. Sợi RNA5 của RGSV dài 2704 nucleotide trong đó sợi âm RNA5 mã hóa protein 21,6 kDa và sợi dương RNA5 mã hóa protein 35,9 kDa, cũng chính là protein vỏ (NCP) của virus (Ou, Rivera, 1969).

Do dịch bệnh vàng lùn và lùn xoắn lá đang gây hại nặng nề về sản lượng lúa gạo cho các tỉnh ĐBSCL và thông tin về việc phân loại cũng như cấu trúc phân tử của các chủng virus này còn đang rất thiếu, chúng tôi đã đặt ra nhiệm vụ cấp thiết là thu thập các mẫu lúa nhiễm bệnh vàng lùn và lùn xoắn lá tại các địa phương nằm trong danh sách công bố có dịch tại các tỉnh ĐBSCL, tách dòng và giải mã trình

tự gen mã hóa protein vỏ của 3 loại RGSV, RRSV và RTSV với mục tiêu là đánh giá tính đa dạng di truyền của các dòng virus gây bệnh tại các địa phương khác nhau, từ đó xây dựng chiến lược cho việc phòng trừ các loại virus này.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu thực vật

Vật liệu thực vật sử dụng trong nghiên cứu là 14 mẫu lá lúa nghi nhiễm bệnh vàng lùn được thu từ 7 tỉnh đại diện có tỷ lệ nhiễm bệnh cao ở khu vực ĐBSCL (Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn, 2007). Mỗi tỉnh thu mẫu tại hai địa điểm khác nhau (Bảng 1).

Bảng 1. Thông tin về các mẫu lá lúa nghi nhiễm bệnh vàng lùn.

STT	Tên tỉnh thu mẫu	Ký hiệu	STT	Tên tỉnh thu mẫu	Ký hiệu
1	Bạc Liêu 1	BL1	8	Sóc Trăng 2	ST2
2	Bạc Liêu 2	BL2	9	Tiền Giang 1	TG1
3	Cần Thơ 1	CT1	10	Tiền Giang 2	TG2
4	Cần Thơ 2	CT2	11	Trà Vinh 1	TV1
5	Đồng Tháp 1	ĐT1	12	Trà Vinh 2	TV2
6	Đồng Tháp 2	ĐT2	13	Vĩnh Long 1	VL1
7	Sóc Trăng 1	ST1	14	Vĩnh Long 2	VL2

Hóa chất, thiết bị

Các cặp mồi dùng để tách dòng gen mã hóa protein vỏ được tổng hợp bởi hãng Invitrogen (Mỹ). Các hóa chất sinh học phân tử và các thiết bị đều được các hãng nổi tiếng như Fermentas (Đức), Qiagen (Đức), Invitrogen (Mỹ)... cung cấp.

Phương pháp nghiên cứu

Thiết kế mồi đặc hiệu

Khai thác dữ liệu trong GenBank để tìm ra tất cả các trình tự gen CP của RGSV, RRSV và RTSV. Sử dụng chương trình phần mềm SeqMan/DNAstar để so sánh các trình tự gen CP của các loại virus với nhau và lựa chọn các vùng có độ bảo thủ cao nhất nằm gần hai đầu 5' và 3' của gen để thiết kế mồi.

Tách chiết RNA tổng số

RNA tổng số từ các mẫu lá lúa nghi nhiễm bệnh

vàng lùn được tách chiết theo hướng dẫn sử dụng hóa chất Trizol Reagents (Invitrogen, Mỹ). Lá lúa (~200 g) được nghiền trong nitrogen thành bột mịn. Bổ sung 1 ml Trizol Reagents, đảo nhẹ ở nhiệt độ phòng trong 10 phút, bổ sung 200 ml chloroform : isoamyl (24:1), đảo nhẹ và ly tâm 10.000 vòng trong 10 phút. Hút dịch nổi, kết tủa RNA bằng isopropanol và pha loãng RNA trong nước khử DEPC 0,01%.

Phản ứng RT-PCR

Thành phần phản ứng RT-PCR (one-step) trong thể tích 25 µl: 5 µl đệm RT-PCR 5X; 10 pg - 5 µg RNA tổng số (1 µl); 75 pmol mỗi loại mỗi đặc hiệu (0,75 µl); 1 µl 10 mM dNTP mix (10 mM mỗi loại dATP, dGTP, dTTP và dCTP, ở pH trung tính); 1 µl hỗn hợp enzyme (Reverse transcriptase và *Taq* polymerase); 0,2 µl chất ức chế Ribonuclease tái tổ hợp RNase OUT™ (40 đơn vị/µl); Bổ sung nước khử ion, khử trùng tới thể tích 25 µl. Thực hiện phản ứng RT-PCR theo chu kỳ nhiệt sau: bước 1: 50°C, 30

phút; bước 2: 95°C, 15 phút; bước 3: 94°C, 30 giây; bước 4: 53°C, 30 giây; bước 5: 72°C, 3 phút; từ bước 3 đến bước 5 lặp lại 10 chu kỳ; bước 6: 94°C, 30 giây; bước 7: 55°C, 30 giây; bước 8: 72°C, 5 phút; từ bước 6 đến bước 8 lặp lại 30 chu kỳ; bước 9: 72°C, 10 phút; bước 10: 4°C, bảo quản mẫu. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1% trong đệm 1X TAE (Sambrook, Rusell, 2001), nhuộm gel trong dung dịch Ethidium bromide và thời gen bằng bộ Kit của Qiagen.

Tách dòng và xác định trình tự gen

Sản phẩm PCR được gắn vào trong vector tách dòng pBT (Phan Trọng Hoàng *et al.*, 2006) và biên

nạp vào tế bào khả biến *E. coli* Top10. Chọn lọc các khuẩn lạc xanh/trắng trên môi trường thạch LB có bổ sung 50 mg/l Ampicilin, 0,004% X-gal và 0,1 mM IPTG. Tách chiết plasmid theo hướng dẫn sử dụng của Plasmid Extraction Kit (BioNEER, Hàn Quốc). 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. Sử dụng các phần mềm DNASTar, BioEdit và ClustalX để so sánh các trình tự gen và dựng cây phát sinh chủng loại theo phương pháp tối đa (Maximum Parsimony (MP)) trên cơ sở các số liệu thu được qua so sánh các trình tự gen.

Bảng 2. Trình tự mồi sử dụng để nhân gen CP của các chủng virus.

STT	Tên mồi	Trình tự mồi	Chiều dài gen (bp)
1	RGSV-NCP-F	5'- CTATACACTACGCTAAAGGCTI -3'	1021
2	RGSV-NCP-R	5'- GTGTAAGATGGGTAAAGTGCAI -3'	
3	RRSV-SP-F	5'- GATAAATCTCGCCATGAAGACI -3'	
4	RRSV-SP-R	5'- GGTGAGAAAGTCCTCATTTCAAI -3'	1075
5	RTSV-CP-F1	5'- GCTGGTGAGACAGTCATTGI -3'	
6	RTSV-CP-R2	5'- CCTCAATGGTGTGCGATTTGI -3'	
7	RTSV-CP-F2	5'- CCTCAATGGTGTGCGATTTGI -3'	1174
8	RTSV-CP-R1	5'- GCAGTCGGCTCACAACCAAAI -3'	

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Tách dòng và xác định trình tự gen CP của 3 chủng RGSV, RRSV và RTSV

Hình 1 là kết quả điện di sản phẩm RT-PCR nhân gen mã hóa NCP của RGSV với cặp mồi được thiết kế đặc hiệu RGSV-NCP-F và RGSV-NCP-R (Bảng 2). Các phân đoạn DNA có kích thước như dự đoán 1021 bp đã được nhân bản thành công ở các mẫu từ số 1 đến số 14 tương ứng với các địa phương khác nhau (Bảng 1). Trong nghiên cứu này, chúng tôi cũng đã thiết kế và sử các cặp mồi RRSV-SP-F/RRSV-SP-R để nhân gen CP của RRSV; RTSV-F1/RTSV-R2 và RTSV-F2/RTSV-R1 để nhân gen CP của RTSV. Tuy nhiên, chúng tôi đã không thu được các gen như mong muốn. Nghiên cứu của Tiến sĩ Ossmat, bộ môn Bệnh cây, Viện Nghiên cứu lúa Quốc tế (IRRI), Philippines cho thấy từ tháng 4-1996 đến tháng 1-1997, trong tổng số 163 mẫu, có phản ứng dương tính với 3 loại virus RTBV, RTSV (Tungro) và lùn xoắn lá RRSV với tỷ lệ rất thấp 4

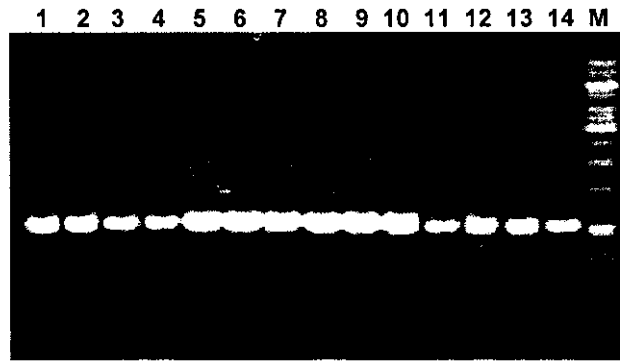
mẫu/140. Tháng 1 - 2005, Tiến sĩ Cabunagan và Choi, 2 nhà virus học của IRRI nghiên cứu cho thấy, trong số 52 mẫu lúa bị bệnh, chỉ có 1 mẫu có phản ứng dương tính với RTSV (tungro), và 7 mẫu với bệnh Lùn lúa cỏ (RGSV). Kết quả phân tích mẫu bệnh vàng lùn thu thập được tại Tiền Giang do Trung tâm Bảo vệ thực vật Phía nam và Cục Bảo vệ thực vật An Giang thực hiện: 2 mẫu/30 có phản ứng với Tungro RTSV, 27/30 mẫu có phản ứng với lùn lúa cỏ, 19/30 mẫu có phản ứng với lùn xoắn lá trên cùng cây lúa bị bệnh (Pham *et al.*, 2005).

Theo thống kê của Phạm Văn Dư (2006) tỷ lệ nhiễm RTSV và RRSV trên lúa là rất thấp: 1/1995 có 1/52 mẫu; 3/2006 có 2/30 mẫu; từ tháng 4/1996 đến tháng 1/1997 có 4/140 mẫu. Do đó, để nghiên cứu tính đa dạng của hai virus này, chúng tôi cần phải tiến hành nghiên cứu với số lượng mẫu nghiên cứu nhiều hơn. Nhưng không thể tiến hành phân tích tất cả các mẫu bằng RT-PCR vì phương pháp này tốn kém và mất nhiều thời gian, do đó cần phải kiểm tra khả năng dương tính của các mẫu nghiên cứu

bằng phương pháp ELISA.

Sau phản ứng RT-PCR, các phân đoạn DNA tương ứng với gen NCP của RGSV đã được tách dòng và đọc trình tự. Các trình tự gen NCP của RGSV Việt Nam được so sánh với các gen đó trong Ngân hàng gen Quốc tế. Kết quả cho thấy, tất cả các gen được xác định trình tự là các gen NCP của RGSV. Các trình tự NCP phân lập từ RGSV của các vùng khác nhau của Việt Nam độ tương đồng với nhau từ 97% đến 99,8% ở mức độ nucleotide và 91,5% đến 99,7% ở

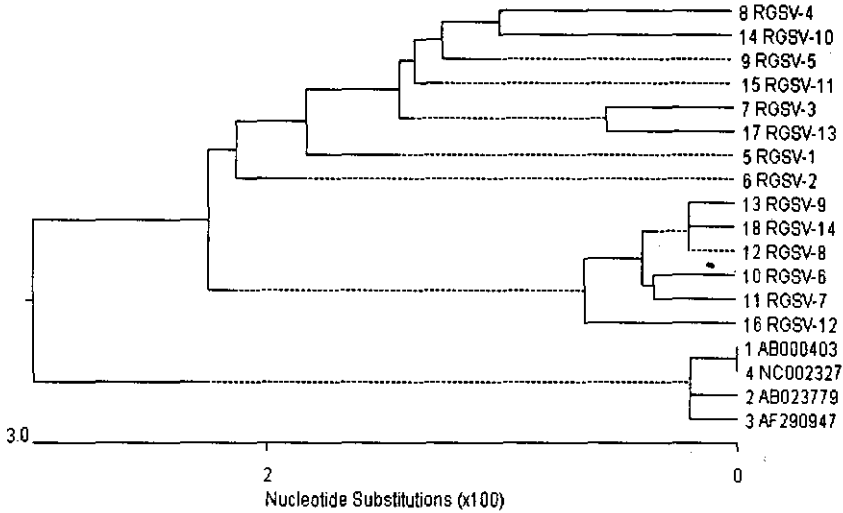
mức độ amino acid. Các trình tự gen NCP của RGSV Việt Nam đã được đăng ký vào Ngân hàng gen Quốc tế (Genbank), với mã số đăng ký như sau: EU076537 (Sóc Trăng 1), EU076538 (Sóc Trăng 2), EU076533 (Cần Thơ 1), EU076534 (Cần Thơ 2), EU076531 (Bạc Liêu 1), EU076532 (Bạc Liêu 2), EU076543 (Vĩnh Long 1), EU076544 (Vĩnh Long 2), EU076535 (Đồng Tháp 1) EU076536 (Đồng Tháp 2), EU076539 (Tiền Giang 1), EU076540 (Tiền Giang 2), EU076541 (Trà Vinh 1), EU076542 (Trà Vinh 2).



Hình 1. Điện di sản phẩm RT-PCR gen CP của RGSV nhiễm trên các mẫu lúa thu thập tại các địa phương khác nhau. 1. ST1; 2. ST2; 3. CT1; 4. CT2; 5. BL1; 6. BL2; 7. VL1; 8. VL2; 9. ĐT1; 10. ĐT2; 11. TG1; 12. TG2; 13. TV1; 14. TV2; M. Thang chuẩn 1 kb. Gel agarose 1%.

		Percent Identity																			
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18		
Divergence	1		99.8	99.4	100.0	97.4	97.6	97.5	96.8	97.5	97.9	97.7	98.2	98.0	97.0	97.7	97.6	97.4	98.0	1	AB000403
	2	0.2		99.6	99.8	97.6	97.8	97.6	97.0	97.6	98.1	97.9	98.4	98.2	97.2	97.9	97.6	97.6	98.2	2	AB023779
	3	0.6	0.4		99.4	97.2	97.5	97.3	96.6	97.3	97.7	97.6	98.0	97.8	96.8	97.6	97.4	97.2	97.8	3	AF290947
	4	0.0	0.2	0.6		97.4	97.6	97.5	96.8	97.5	97.9	97.7	98.2	98.0	97.0	97.7	97.6	97.4	98.0	4	NC002327
	5	2.7	2.5	2.9	2.7		98.7	98.5	98.0	98.9	98.6	98.4	98.9	98.7	98.2	99.0	98.0	98.4	98.7	5	RGSV-1
	6	2.4	2.2	2.6	2.4	1.3		98.6	98.3	98.8	98.9	98.7	99.2	99.0	98.3	99.1	98.3	98.5	99.0	6	RGSV-2
	7	2.6	2.4	2.8	2.6	1.5	1.4		98.3	99.0	98.7	98.5	99.0	98.8	98.3	99.1	98.1	98.9	98.8	7	RGSV-3
	8	3.3	3.1	3.5	3.3	2.0	1.7	1.7		98.5	98.0	97.8	98.3	98.1	98.0	98.6	97.5	98.2	98.2	8	RGSV-4
	9	2.6	2.4	2.8	2.6	1.1	1.2	1.0	1.5		98.7	98.5	99.0	98.8	98.5	99.3	98.1	98.9	98.8	9	RGSV-5
	10	2.1	1.9	2.3	2.1	1.4	1.1	1.3	2.0	1.3		99.3	99.7	99.5	98.2	99.0	98.8	98.6	99.5	10	RGSV-6
	11	2.3	2.1	2.5	2.3	1.6	1.3	1.5	2.2	1.5	0.7		99.4	99.2	98.0	98.6	98.5	98.5	99.2	11	RGSV-7
	12	1.8	1.6	2.0	1.8	1.1	0.8	1.0	1.7	1.0	0.3	0.6		99.8	98.5	99.3	99.1	98.9	99.8	12	RGSV-8
	13	2.0	1.8	2.2	2.0	1.3	1.0	1.2	1.9	1.2	0.5	0.8	0.2		98.3	99.1	98.9	98.7	99.6	13	RGSV-9
	14	3.1	2.9	3.3	3.1	1.8	1.7	1.7	2.0	1.5	1.8	2.0	1.5	1.7		98.8	97.6	98.2	98.3	14	RGSV-10
	15	2.3	2.1	2.5	2.3	1.0	0.9	0.9	1.4	0.7	1.0	1.2	0.7	0.9	1.2		98.4	99.0	99.1	15	RGSV-11
	16	2.5	2.5	2.7	2.5	2.0	1.7	1.9	2.6	1.9	1.2	1.5	0.9	1.1	2.4	1.6		98.2	98.9	16	RGSV-12
	17	2.7	2.5	2.9	2.7	1.6	1.5	1.1	1.8	1.1	1.4	1.5	1.1	1.3	1.8	1.0	1.8		98.7	17	RGSV-13
	18	2.0	1.8	2.2	2.0	1.3	1.0	1.2	1.8	1.2	0.5	0.8	0.2	0.4	1.7	0.9	1.1	1.3		18	RGSV-14
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18		

Hình 2. So sánh trình tự đoạn gen mã hóa NCP của các dòng RGSV phân lập ở Việt Nam và trình tự của các dòng RGSV đã công bố trong Ngân hàng gen Quốc tế. Tên các dòng được viết tắt tương ứng với bảng 1.



Hình 3. Cây phát sinh chủng loại các dòng RGSV phân lập của Việt Nam và trình tự của các dòng RGSV đã công bố trong ngân hàng dữ liệu gen quốc tế dựa vào trình tự gen CP. Tên các dòng được viết tắt tương ứng với bảng 1.

Cây phát sinh chủng loại được xây dựng theo phương pháp tối đa (Maximum Parsimony (MP) và phương pháp Neighbor Joining (NJ) sử dụng kết quả so sánh ClustalX các trình tự NCP Việt Nam và một số trình tự NCP đại diện cho các dòng RGSV khác nhau trên thế giới (Hình 3). Cả hai phương pháp đều cho cây có dạng hình học gần tương đồng (Kết quả không trình bày ở đây), chứng tỏ kết quả phân tích của chúng tôi có độ tin cậy cao.

Trên cây phát sinh chủng loại các dòng RGSV của Việt Nam nằm trong 2 nhóm chính, khác với nhóm của thế giới. Từ các kết quả trên, chúng tôi giả thiết rằng các dòng RGSV có chung nguồn gốc.

KẾT LUẬN

Chúng tôi đã tách dòng và xác định được trình tự gen CP của chủng RGSV ở 14 mẫu lúa thu tại các tỉnh khu vực ĐBSCL. Quy trình RT-PCR và cặp mồi RGSV-NCP-F/ RGSV-NCP-R là thích hợp và đặc hiệu cho gen NCP của RGSV và có thể áp dụng quy trình này cho việc chẩn đoán cây lúa bị nhiễm RGSV.

Gen NCP của các mẫu RGSV nghiên cứu giống nhau từ 97% đến 99,8% ở mức độ nucleotide và từ 91,5% đến 99,7% ở mức độ amino acid và chủng RGSV là một chủng virus có mức độ sai khác di truyền thấp.

Lời cảm ơn: Chúng tôi xin chân thành cảm ơn Phòng thí nghiệm trọng điểm Công nghệ gen, Viện Công nghệ sinh học đã thực hiện việc giải trình tự DNA. Công trình hoàn thành với sự trợ giúp kinh phí của Viện Công nghệ sinh học.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Chi cục bảo vệ thực vật thành phố Hồ Chí Minh (2006) <http://www.mard.gov.vn/ppdhcmc/HTML/Tailieukit/lua-benhvanglun.htm>
 Chomchan P, Miranda GJ, Shirako Y (2002) Detection of rice grassy stunt tenuivirus nonstructural proteins p2, p5 and p6 from infected rice plants and from viruliferous brown planthoppers. *Arch Virol* 147: 2291-2300.
 Cục bảo vệ thực vật (2007) Bệnh vàng lùn và lùn xoắn lá: <http://www.ppd.gov.vn/ttbaochi/lua-sbhai/ttbaochi74.htm>
 FAO (2005) <http://www.fao.org>
 Jones MC, Gough K, Dasgupta I, Rao BL, Cliffe J, Qu R, Shen P, Kaniewska M, Blakebrough M, Davies JW, Beachy RN, Hull R (1991) Rice tungro disease is caused by an RNA and a DNA virus. *J Gen Virol* 72: 757-761.
 Mayo MA, De Miranda JR, Falk BW, Goldbach R, Haenni AL, Toriyama S (2000) *Genus Tenuivirus*. In: van Regenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop DHL,

- Carstens EB, Estes MK, Lemon SM, Maniloff J, Mayo MA, McGeoch DJ, Pringle CR, Wickner RB (eds) Virus taxonomy. Academic Press, New York: 904-908.
- Miranda JG, Azzam O, Shirako Y (2000) Comparison of Nucleotide Sequences between Northern and Southern Philippine Isolates of Rice Grassy Stunt Virus Indicates occurrence of Natural Genetic Reassortment. *Virology* 266: 26-32.
- Murphy FA, Fauquet CM, Bishop DHL, Ghabrial SA, Jarvis AW, Martelli GP, Mayo MA, Summers MD (1995) *Virus Taxonomy. Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, 316±318. Vienna & New York: Springer-Verlag.
- Nguyễn Văn Đức Tiến (2007) Những bệnh nguy hiểm có liên quan đến rầy gây hại trên lúa <http://www.mard.gov.vn/ppdhcmc/HTML/Tin/tin-benhlua.htm>
- Ou SH, Rivera CT (1969) *The Virus Diseases of the Rice Plant*. Johns Hopkins publisher 354.
- Phạm Văn Dư (2006) Bệnh vàng lùn tại đồng bằng sông Cửu Long <http://www.clri.org/benhvanglun/tech/benhvanglun.2006.htm>
- Pham VD, Cabunagan RC, Choi IR (2005) Rice Yellowing Syndrome in Mekong River Delta. *OMonrice* 13: 135-138
- Phan Trọng Hoàng, Nông Văn Hải, Lê Trần Bình, Chu Hoàng Hà (2005) Sử dụng enzyme *XcmI* để thiết kế vector pBT phục vụ tách dòng và đọc trình tự gen. *Tạp chí Công nghệ sinh học* 3: 459-463.
- Sambrook J, Russell D (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Shen P, Kaniewska M, Smith C, Beachy RN (1993) Nucleotide sequence and genomic organization of rice tungro spherical virus. *Virology* 193: 621-630.
- Toriyama S, Kimishima T, Takahashi M, Shimizu T, Minaka N, Akutsu K (1998) The complete nucleotide sequence of the rice grassy stunt virus genome and genomic comparisons with viruses of the genus *Tenuivirus*. *J Gen Virol* 79: 2051-2058.
- Zhang S, Jones MC, Barker P, Davies JW, Hull R (1993) Molecular cloning and sequencing of coat protein encoding cDNA of rice tungro spherical virus - a plant picornavirus. *Virus Genes* 7: 121-132.

GENETIC VARIATIONS IN RICE GRASSY STUNT VIRUS STRAINS ISOLATED FROM CUU LONG RIVER DELTA PROVINCES

Nguyen Trung Nam, Nguyen Minh Hung, Chu Hoang Ha, Hoang Thi Thu Hang, Le Tran Binh*

Institute of Biotechnology

SUMMARY

Rice Grassy Stunt Virus (RGSV), Rice Ragged Stunt Virus (RRSV) and Rice Tungro Spherical Virus (RTSV) are members in the genus *Tenuivirus*, causing destructive disease of rice (*Oryza sativa*, L.). The common properties of the viruses in the genus family are virions filamentous, single-stranded ambisense RNAs in the genome. Recently, the disease has spreaded out and resulted in a drastical decrease of rice yield in Cuu Long river delta (CLRD) provinces. We collected viral-infected rice samples in several CLRD provinces aiming to investigate genetic diversity of the viruses. To amplify gene encoding viral coat protein (CP), primers were designed based on the viral nucleotide sequences in GenBank. In this paper, we cloned and sequenced the CP gene of RGSV but not RRSV and RTSV due to in part the low infection of these viruses. The CP genes of RGSV in various rice samples were similar to each other from 97% to 99.8% at the nucleotide level and from 91.5% to 99.7% at the amino acid level. The phylogenetic tree showed that Vietnamese CP sequences and the others in GenBank belong to two separated groups. Taken together, we conclude that RGSV might be the main destructive factor in rice in CLRD provinces and the CP gene sequences are well conserved among these RGSV strains.

Keywords: CP gen, genetic diversity, rice, rice grasy stunt virus, RT-PCR

* Author for correspondence: Tel: 84-4-7564691; Fax: 84-4-8363144; E-mail: binh@ibt.ac.vn