

Xác định đặc điểm di truyền học của Sri Lanka cassava mosaic virus gây bệnh khảm lá sắn tại Việt Nam

Nguyễn Thanh Việt¹, Trần Kiên Cường², Nguyễn Thị Nhã², Thân Văn Thái^{1,*}

¹Viện Kỹ thuật Công nghệ cao Nguyễn Tất Thành, Đại học Nguyễn Tất Thành

²Khoa Công nghệ Sinh học, Đại học Nguyễn Tất Thành

*tvthai@ntt.edu.vn

Tóm tắt

Bệnh khảm lá sắn (Cassava mosaic disease, CMD), do vi-rút thuộc họ *Geminiviridae* gây ra, là một trong 10 bệnh gây thiệt hại mùa màng lớn nhất trên thế giới. Trong nghiên cứu này, các mẫu lá sắn với bệnh tích khảm đặc trưng được thu thập tại Tây Ninh, Ninh Thuận và Củ Chi. Kết quả PCR xác định các mẫu dương tính với Sri Lanka cassava mosaic virus (SLCMV). Phân tích đặc điểm di truyền genome A và B cho thấy các chủng SLCMV nghiên cứu chia sẻ mức độ tương đồng cao về nucleotide và amino acid với nhau và cùng nhóm với các chủng SLCMV phân lập được tại Sri Lanka, Ấn Độ, Campuchia và Trung Quốc; qua đó dự đoán các chủng SLCMV này có chung nguồn gốc. Kết quả trên cũng dự đoán SLCMV lưu hành tại nước ta có thể bắt nguồn từ các quốc gia báo cáo bệnh trước đó, đặc biệt là Campuchia - quốc gia có chung đường biên giới với nước ta. Kết quả nghiên cứu này giúp đánh giá đặc điểm sinh học, di truyền học, nhằm hỗ trợ công tác kiểm soát và dự đoán xu hướng lây nhiễm của SLCMV trên cây sắn tại Việt Nam.

Nhận 09.12.2019
Được duyệt 27.02.2020
Công bố 30.03.2020

Từ khóa

Sri Lanka cassava mosaic virus, genome A, genome B, Việt Nam

© 2020 Journal of Science and Technology - NTTU

1 Giới thiệu

Cây sắn, tên La-tinh *Manihot esculenta*, thuộc họ *Euphorbiaceae*, là một trong 3 loại cây trồng quan trọng nhất cung cấp cho nhu cầu carbohydrates trên toàn thế giới. Bệnh khảm lá sắn (cassava mosaic disease, CMD) do vi-rút thuộc họ *Geminiviridae*, đã gây ra những thiệt hại nghiêm trọng về kinh tế cũng như an ninh lương thực cho các vùng trồng sắn thuộc các quốc gia ở Châu Phi và Ấn Độ, đe dọa trực tiếp tới các vùng trồng sắn khác trên toàn thế giới[1]. Tính đến nay, đã xác định được 5 loài gây bệnh, bao gồm African cassava mosaic virus (ACMV), East African cassava mosaic virus (EACMV), và South African cassava mosaic virus (SACMV) gây bệnh khảm lá sắn tại Châu Phi; Indian cassava mosaic virus (ICMV) gây bệnh khảm lá sắn tại Ấn Độ; và Sri Lanka cassava mosaic virus (SLCMV) gây bệnh khảm lá sắn tại Sri Lanka, Ấn Độ và sau đó lan sang một số nước thuộc khu vực Đông Nam Á bao gồm Singapore, Campuchia, Trung Quốc và Việt Nam[2].

SLCMV thuộc chi *Begomovirus*, họ *Geminiviridae* - một họ vi-rút lớn gây ra các bệnh trên thực vật hai lá mầm. Cũng giống như các *Begomovirus* khác, SLCMV được lây

truyền bởi bộ phận trắng *Bemisia tabaci*. Genome của SLCMV dạng DNA mạch đơn (single strain DNA, ssDNA) gồm hai mạch vòng là DNA-A và DNA-B với chiều dài xấp xỉ 2700bp và vùng dịch mã trên cả hai chiều của chuỗi DNA[2]. DNA-A mã hóa cho 6 loại protein, kí hiệu là AC1-4, AV1 và AV2, trong đó protein AV1 đóng vai trò là protein vỏ có chức năng quan trọng trong quá trình gây nhiễm của vi-rút vào tế bào chủ[3]. DNA-B mã hóa cho 2 protein, BC1 và BV1, liên quan đến chức năng vận chuyển của vi-rút. Các triệu chứng ghi nhận trên cây sắn nhiễm SLCMV bao gồm vàng lá, xoắn lá, teo ngọn, còi cọc dẫn tới giảm năng suất và giảm chất lượng củ.

SLCMV lần đầu được báo cáo gây bệnh khảm lá sắn tại Sri Lanka từ trước năm 2002 và có mối quan hệ với SLCMV gây bệnh khảm lá sắn tại Ấn Độ năm 2005. Năm 2016, Campuchia báo cáo phát hiện SLCMV gây bệnh khảm lá sắn tại tỉnh Ratanakiri thuộc khu vực phía Đông giáp Việt Nam. Năm 2017, sắn trồng tại tỉnh Tây Ninh có biểu hiện triệu chứng của bệnh khảm lá sắn do SLCMV gây ra như lá bị úa vàng và xoắn teo, cây phát triển chậm và còi cọc. Theo số liệu thống kê của Cục Bảo vệ Thực vật, tính tới tháng 02/2019, cả nước có khoảng 26 nghìn ha diện tích



sản trồng đã bị nhiễm SLCMV tại 14 tỉnh, thành phố trên cả nước bao gồm Tây Ninh, Ninh Thuận, Thành phố Hồ Chí Minh, Đồng Nai, Bà Rịa Vũng Tàu, Bình Dương, Bình Phước, Gia Lai, Long An, Đắk Lắk, Khánh Hòa, An Giang, Kon Tum, Bình Thuận... gây thiệt hại kinh tế cho người dân cũng như ảnh hưởng tới nguồn cung cấp nguyên liệu và giống cho nhu cầu trong nước và xuất khẩu[4].

Nghiên cứu này xác định đặc điểm di truyền học của một số chủng SLCMVs trong mẫu bệnh khảm lá sản thu thập được tại các tỉnh có báo cáo lưu hành bệnh bao gồm Tây Ninh, Ninh Thuận và Củ Chi. Kết quả được sử dụng để xác định mối tương quan về mặt di truyền học giữa các chủng SLCMVs đang lưu hành, từ đó xác định được mức độ tác động của SLCMVs cũng như đưa ra những gợi ý trong canh tác cây sản tại nước ta.

2 Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1 Vật liệu nghiên cứu

Mẫu bệnh phẩm là lá cây sản với triệu chứng đặc trưng của bệnh khảm lá do vi-rút như cây bị bệnh còi cọc; lá xuất hiện những vết vàng xen lẫn phần xanh, nhỏ hơn bình thường, bị biến dạng và nhăn nheo (Hình 1). Mẫu lá bệnh được thu thập tại Tây Ninh, Ninh Thuận và Củ Chi. Lá được rửa sạch với nước cất và sát trùng bề mặt ngoài bằng cồn 70° và bảo quản trong -20°C đến khi được sử dụng để tách chiết DNA.



Hình 1 Mẫu lá sản với bệnh tích đặc trưng của bệnh khảm lá

2.2 Tách chiết DNA và thực hiện phản ứng PCR

DNA của SLCMVs được tách chiết bằng bộ kit HI™ DNA Plant Kit (ABT, Việt Nam) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Quy trình tách chiết DNA được tóm tắt như sau: 50mg mẫu lá bệnh được ủ trong ni-tơ lỏng trước khi được nghiền nhỏ bằng cối chày. Tiếp theo mẫu được li giải bằng cách bổ sung hỗn hợp gồm 400µl dung dịch PLS1, 10µl RNase A (ủ tại 65°C trong 30 phút) và 130µl PLS2. Tiếp theo, DNA được gắn trên cột silica, rửa sạch với washing buffer 2 lần. Cuối cùng DNA được tách khỏi cột silica bằng elution buffer. DNA được bảo quản ở -20°C đến khi được sử dụng cho phản ứng PCR.

Phản ứng PCR được thực hiện với thành phần và điều kiện như sau: 5µl DNA tinh sạch, 1µl dNTPs (10mM), 1µl mỗi loại cho mỗi sense (SLMVA-F: 5'-ATGTCGAAGCGACCAGCAGATATCAT-3'), và anti-sense (SLMVA-R: 5'-TTAATTGCTGACCGAATCGTAGAAG-3'),

2µl 10x PCR buffer, 1.25U DNA Polymerase (MyTaq™ DNA Polymerase, Bioline, England) và bổ sung nước cất khử ion đến đủ 25µl. Chu trình nhiệt của phản ứng PCR như sau: 94°C trong 2 phút; 35 chu kỳ ở 94°C trong 30 giây, 53°C trong 30 giây, và 72°C trong 4 phút; và kéo dài chuỗi ở 72°C trong 7 phút. Sản phẩm PCR được kiểm tra trên gel agarose 1,2%.

2.3 Giải trình tự gen, phân tích trình tự gen và xây dựng cây phả hệ

Giải trình tự gen: Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng bộ kit QIAquick PCR Purification (QIAGEN) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Sản phẩm PCR tinh sạch được sử dụng để giải trình tự theo phương pháp Sanger sequencing với cặp mồi đặc hiệu (FirstBase, Malaysia).

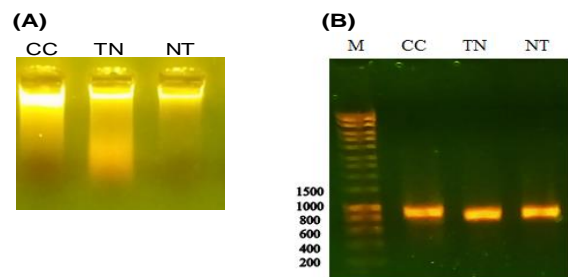
Phân tích trình tự gen: Kết quả giải trình tự gen được phân tích bằng phần mềm DNASTAR Lasergene (DNASTAR®). Trình tự nucleotide (nt) và amino acid (aa) của các chủng SLCMVs và các chủng tham chiếu được phân tích, so sánh bằng phần mềm BioEdit 6.0[5].

Xây dựng và phân tích cây phả hệ: Trình tự di truyền gen SLCMVs của nghiên cứu này được so sánh với các chủng SLCMVs tham chiếu. Trình tự gen được sắp xếp sử dụng chương trình CLUSTAL X alignment[6]. Cây phả hệ được xây dựng dựa vào phần mềm Mega 7.0 với tham số Kimura-2 parameter mô phỏng sự thay đổi nt và Bootstrap re-sampling 1.000 lần[7].

3 Kết quả và thảo luận

3.1 Phát hiện SLCMV trong mẫu lá sản bệnh bằng phản ứng PCR

SLCMVs trong mẫu bệnh phẩm lấy tại 3 tỉnh là Tây Ninh, Ninh Thuận và Củ Chi được chẩn đoán bằng phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu trên vùng genome A. Sản phẩm PCR (kích thước khoảng 800bp) cho kết quả dương tính với SLCMVs (Hình 2). Kết quả PCR khuếch đại đặc hiệu với genome A của SLCMVs trong các mẫu bệnh phẩm cho thấy các triệu chứng xuất hiện trên cây nhiễm bệnh là đặc trưng. Vi-rút có khả năng tồn tại và phát tán nhanh từ vùng nhiễm bệnh sang các vùng lân cận nhờ trung gian truyền bệnh bộ phận trắng và/hoặc các hoạt động giao thương như buôn bán nguyên liệu, giống.



Hình 2 (A) Tổng số DNA SLCMVs trong mẫu thu tách chiết và (B) PCR phát hiện SLCMVs trong mẫu chẩn đoán. CC (Củ Chi), TN (Tây Ninh), NT (Ninh Thuận).

3.2 Phân tích và so sánh trình tự genome

Trình tự của đoạn genome phát hiện được xác định bằng phương pháp giải trình tự Sanger sequencing (FirstBase, Malaysia). Kết quả cho thấy cả ba chủng nghiên cứu chia sẻ mức độ tương đồng với chủng vi-rút được phân lập tại Campuchia năm 2015 và Trung Quốc năm 2018. Trình tự đầy đủ của genome A và B được xác định với kích thước

mỗi genome lần lượt là 2,760 nt và 2,737 nt. Kết quả so sánh trình tự nt của genome A và B cho thấy các chủng phân lập tại Việt Nam chia sẻ mức độ tương đồng là 99,7-100% và 99,5-100%, và với các chủng tham chiếu phân lập từ Sri Lanka, Ấn Độ, Trung Quốc, Campuchia là 93,3-99,8% và 95,4-99,7% cho genome A và B (Bảng 1)[8, 9].

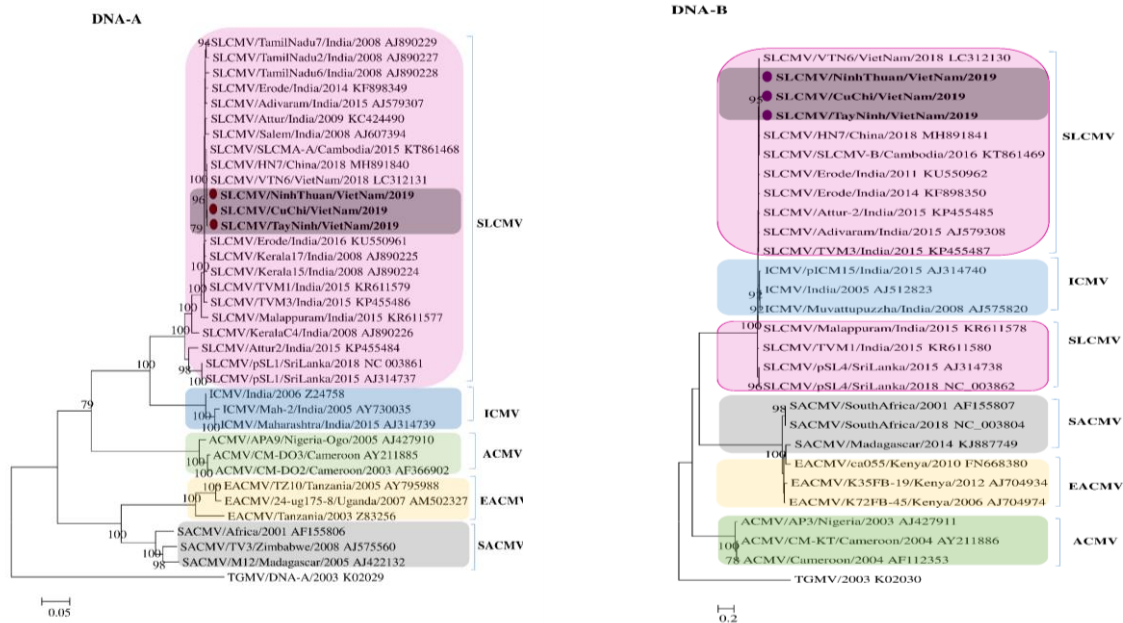
Bảng 1 Mức độ tương đồng nt và aa genome A và B của 3 chủng SLCMVs phân lập tại Tây Ninh, Ninh Thuận và Củ Chi so với các chủng tham chiếu

Chủng	DNA-A	DNA-B	AV1	AV2	AC1	AC2	AC3	AC4	BV1	BC1
Ninh thuận	100	100	100 (100)	100 (100)	100 (100)	100 (100)	100 (100)	100 (100)	100 (100)	100 (100)
Củ Chi	99,7	99,7	99,8 (100)	99,7 (99,1)	99,7 (99,0)	99,0 (97,0)	100 (100)	100 (100)	99,4 (99,2)	100 (100)
Tây Ninh	99,7	99,5	99,7 (100)	99,7 (99,1)	99,9 (99,6)	99,7 (99,2)	100 (100)	100 (100)	99,3 (99,2)	99,7 (99,6)
SLCMA-A/Cambodia	99,8	99,7	100 (100)	94,6 (94,9)	99,9 (99,6)	99,5 (99,2)	100 (100)	100 (100)	99,4 (99,2)	99,8 (99,6)
HN7/China	99,7	99,6	99,8 (100)	94,3 (94,0)	99,8 (99,6)	99,7 (99,2)	100 (100)	100 (100)	99,3 (98,8)	99,7 (99,6)
TVM3/India	98,5	98,2	99,8 (100)	93,8 (93,2)	96,7 (94,7)	99,0 (98,4)	99,0 (99,2)	97,6 (95,0)	98,4 (97,6)	98,2 (97,9)
Malappuram /India	97,7	96,6	99,3 (100)	99,5 (93,2)	96,0 (93,4)	94,8 (93,3)	96,7 (94,0)	98,3 (97,0)	96,5 (93,3)	97,5 (97,2)
PSL4-2018/ Sri lanka-	93,3	95,4	92,3 (96,8)	82,3 (85,5)	95,9 (92,3)	95,8 (95,5)	93,0 (90,2)	98,3 (96,0)	97,5 (94,4)	95,9 (94,7)

3.3 Phân tích cây phả hệ

Cây phả hệ cho genome A và B được xây dựng để phân tích mối quan hệ của trình tự genome A và B của của chủng nghiên cứu với các chủng tham chiếu thu thập trên dữ liệu Genbank-NCBI. Phân tích cây phả hệ cho thấy genome A và B của 3 chủng nghiên cứu thuộc nhóm SLCMVs. Trong đó, genome A nằm cùng nhóm với các chủng phân lập từ Sri Lanka (pSL1), Campuchia, Trung

Quốc (HN7) và Ấn Độ[8-10]. Trong khi đó, genome B của 3 chủng nghiên cứu nằm cùng nhóm với các chủng phân lập từ Campuchia, Trung Quốc và Ấn Độ và tách khỏi phân nhóm bao gồm các chủng phân lập từ Sri Lanka (pSL4) và Ấn Độ (TVM1, Malappuram) (Hình 3). Kết quả này cho thấy có thể tái tổ hợp đã xảy ra ở genome B để hình thành nhóm SLCMVs mới[11].



Hình 3 Cây phả hệ phân tích mối tương quan giữa genome A và B của 3 chủng SLCMVs nghiên cứu với các chủng tham chiếu

Việt Nam là quốc gia có điều kiện khí hậu nhiệt đới gió mùa, nằm ở phía Đông của bán đảo Đông Dương, trong đó, nông nghiệp vẫn đóng vai trò quan trọng cho nền kinh tế quốc gia. Sắn là cây lương thực có vị trí quan trọng thứ năm trên thế giới và thứ ba tại Việt Nam sau lúa và ngô. Việc trồng sắn có nhiều lợi thế hơn các cây lương thực khác như dễ trồng và dễ thích nghi, vốn đầu tư ít... Ngoài chức năng là cây lương thực phục vụ cho con người, đến nay sắn đã được sử dụng vào rất nhiều mục đích như là nguyên liệu cho ngành công nghiệp sinh học, chăn nuôi, thủy sản... Tại nước ta, sắn là cây trồng có sản lượng thu hoạch cao thứ ba (sau cây lúa và cây mía) và được trồng tại một số khu vực chính của nước ta bao gồm Bắc Trung bộ, duyên hải miền Trung, Tây Nguyên, Đông Nam bộ và Trung du miền núi phía Bắc với diện tích khoảng 97% diện tích sắn cả nước. Tuy nhiên, thách thức lớn nhất của ngành trồng sắn tại nước ta là năng suất chưa cao, thị trường không ổn định và tác động của các loại bệnh hại ngày càng tăng, từ đó ảnh hưởng tới năng suất và chất lượng sắn nguyên liệu.

Bệnh khảm lá sắn do vi-rút là bệnh truyền nhiễm đặc biệt nguy hiểm, dễ lây lan và phát triển nhanh, ảnh hưởng nghiêm trọng đến năng suất, chất lượng, kinh tế và an ninh nguyên liệu. SLCMVs có nguồn gốc từ Sri Lanka và sau đó được phát hiện tại các quốc gia như Ấn Độ, Campuchia, Việt Nam và Trung Quốc. Riêng tại nước ta, tính đến tháng 02/2019 bệnh đã xuất hiện tại 14 tỉnh, thành phố với diện

tích trồng sắn bị giảm năng suất hoặc buộc tiêu hủy hoàn toàn khoảng 26 nghìn ha[4].

4 Kết luận và kiến nghị

Trong nghiên cứu này, xác định được yếu tố SLCMVs gây bệnh khảm lá cây sắn tại Tây Ninh, Ninh Thuận và Củ Chi. Phân tích di truyền genome A và B của 3 chủng SLCMVs phân lập được cho thấy các chủng chia sẻ mức độ tương đồng rất cao và do đó, dự đoán chỉ có một loại chủng SLCMV đang lưu hành tại nước ta và có cùng nguồn gốc với các chủng SLCMVs đang lưu hành tại một số quốc gia như Sri Lanka, Campuchia, Ấn Độ và Trung Quốc. Khu vực Đông Nam Á cung cấp nguyên liệu sắn cho thế giới tới hơn 95%. Do đó, việc xuất hiện SLCMVs gây bệnh khảm cây sắn sẽ tác động tiêu cực đến nguồn cung cấp nguyên liệu sắn cho toàn thế giới, ảnh hưởng đến sinh kế của hàng triệu hộ nông dân trồng sắn tại khu vực này. Vì vậy, cần phải tiếp tục thực hiện các biện pháp nhằm ngăn chặn sự lây lan của SLCMVs sang các khu vực chưa nhiễm bệnh bằng nhiều biện pháp khác nhau như chia sẻ kiến thức, cập nhật thông tin, thử nghiệm và sử dụng những giống sắn có đặc tính kháng SLCMVs.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ Phát triển Khoa học và Công nghệ Đại học Nguyễn Tất Thành, đề tài mã số 2019.01.73/HĐ-KHCN.

Tài liệu tham khảo

1. Dutt, N., R.W. Briddon, and I. Dasgupta, Identification of a second begomovirus, Sri Lankan cassava mosaic virus, causing cassava mosaic disease in India. *Arch Virol* (2005) 150:2101-2108.
2. Patil, B.L. and C.M. Fauquet, Cassava mosaic geminiviruses: actual knowledge and perspectives. *Mol Plant Pathol* (2009) 10:685-701.
3. Briddon, R.W., et al., Distinct evolutionary histories of the DNA-A and DNA-B components of bipartite begomoviruses. *BMC Evol Biol* (2010) 10:97.
4. Nguyễn, H.T. and T.N. Phạm, Ảnh hưởng của bệnh khảm lá virus đến năng suất và chất lượng tinh bột của một số giống sắn tại Đông Nam bộ và Tây Nguyên. Kỷ yếu hội thảo quốc gia bệnh hại thực vật Việt Nam lần thứ 18 (2019) 31-36.
5. Hall, T.A., BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* (1999) 41:95-98.
6. Thompson, J.D., et al., The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* (1997) 25:4876-4882.
7. Kumar, S., G. Stecher, and K. Tamura, MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol* (2016) 33:1870-1874.
8. Wang, H.L., et al., First report of Sri Lankan cassava mosaic virus infecting cassava in Cambodia. *Plant Disease* (2016) 100:1029.
9. Wang, D., et al., First Report of Sri Lankan Cassava Mosaic Virus Infected Cassava in China. *Plant Disease* (2018) 103.
10. Saunders, K., et al., Characterisation of Sri Lankan cassava mosaic virus and Indian cassava mosaic virus: evidence for acquisition of a DNA B component by a monopartite begomovirus. *Virology* (2002) 293:63-74.
11. Tiendrebeogo, F., et al., Evolution of African cassava mosaic virus by recombination between bipartite and monopartite begomoviruses. *Virol J* (2012) 9:67.

Genetic characterization of Sri Lanka cassava mosaic virus infecting cassava in Vietnam

Thanh Viet Nguyen¹, Kien Cuong Tran², Thi Nha Nguyen², Van Thai Than^{1,*}

¹NTT Hi-Tech Institute, Nguyen Tat Thanh University

²Department of Biotechnology, Nguyen Tat Thanh University

*tvthai@ntt.edu.vn

Abstract Cassava mosaic disease, caused by *Geminiviridae* family, is one of ten most important plant viral diseases that causes heavy economic loss in crop industry all around the world. In this study, we successfully detected SLCMV from the cassava leaves with typical cassava mosaic disease collected from Tay Ninh, Ninh Thuan, Dong Nai, Ba Ria-Vung Tau, and Ho Chi Minh City. Genetic characterization of the genome A and genome B revealed that the studied SLCMV strains shared the highest nucleotide and amino acid identity each others and shared closely relationship with the SLCMV strains isolated in Sri Lanka, India, Cambodia, and China, suggesting that these strains shared common ancestor. The results also suggested that the circulating SLCMV in Vietnam may be infected from SLCMV isolated in one of those countries, especially Cambodia where sharing the border with Vietnam. These results provided important information on the biological and molecular characterization of the circulating SLCMV in Vietnam, as well as the evidence for control and predict the circulation of SLCMV in future.

Keywords Sri Lanka cassava mosaic virus, genome A, genome B, Vietnam

