

ĐÁNH GIÁ TÍNH ĐA DẠNG DI TRUYỀN CỦA BACULOVIRUS GÂY NHIỄM SÂU HẠI TRÊN RAU Ở MỘT SỐ KHU VỰC MIỀN NAM VIỆT NAM

Nguyễn Thị Phương Thảo^{1*}, Lê Thành Long¹, Văn Thị Hạnh¹,
Nguyễn Thị Hồng Vân¹, Nguyễn Khắc Duy²

¹Viện Sinh học nhiệt đới, Viện Hàn lâm KH & CN Việt Nam, *bbgthao@yahoo.com

²Trường Đại học Quốc tế, Đại học Quốc gia Tp. Hồ Chí Minh

TÓM TẮT: Phương pháp PCR được sử dụng để khuếch đại gene *lef-8* đặc trưng cho baculovirus. Trình tự gene *lef-8* được sử dụng để đánh giá tính đa dạng di truyền và mối quan hệ phát sinh loài của một số nhóm baculovirus của khu vực miền Nam Việt Nam và một số nhóm baculovirus khác trên thế giới. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy, nhóm baculovirus khu vực miền Nam Việt Nam và nhóm Alpha-2 baculovirus có khoảng cách di truyền nhỏ, điều đó chứng tỏ nhóm baculovirus khu vực miền Nam Việt Nam có mối quan hệ di truyền gần gũi với nhóm Alpha-2 baculovirus (0,346±0,069). Việc phân tích mối quan hệ phát sinh loài cùng có cho kết quả phân tích khoảng cách di truyền trên, các nhóm baculovirus của khu vực miền Nam Việt Nam có sự phân bố chung với nhóm Alpha-2 baculovirus với giá trị bootstrap 86% cụ thể là *spodoptera_lutira*_NPV. Các kết quả trên chứng tỏ nhóm *spodoptera_lutira*_NPV có sự phân bố rộng ở khu vực miền Nam Việt Nam.

Từ khóa. Baculovirus, DNA bộ gene, gene *lef-8*, khoảng cách di truyền, quan hệ phát sinh loài.

MỞ ĐẦU

Baculovirus là nhóm virus có vỏ bao, đặc trưng cho nhóm động vật chân đốt, chúng có bộ gene DNA dạng vòng mạch kép và có thể tự nhân lên trong tế bào chủ [3]. Hiện nay, có hơn 600 loài baculovirus được mô tả ở các bộ khác nhau như Lepidoptera, Diptera và Hymenoptera, trong đó, hơn 90% baculovirus được phân lập từ các loài thuộc bộ Lepidoptera [6]. Họ baculovirus được chia thành 4 nhóm khác nhau dựa trên các đặc tính cấu trúc và chức năng: Alphabaculovirus, bao gồm các baculovirus đặc hiệu cho Lepidoptera, được chia thành 2 nhóm là nhóm I và nhóm II dựa vào loại protein dung hợp; betabaculovirus bao gồm các granulovirus đặc trưng cho Lepidoptera, gammabaculovirus bao gồm các baculovirus đặc trưng ở bộ Hymenoptera và deltabaculovirus chỉ gồm CuniNPV và có thể là các baculovirus khác chưa được mô tả đặc hiệu cho Diptera [3, 4]. Dù số lượng các nhóm baculovirus trong tự nhiên rất lớn nhưng chỉ có một vài nhóm đã được nghiên cứu và mô tả kỹ trên thế giới. Các kiến thức về quan hệ di truyền của hầu hết các nhóm baculovirus vẫn còn phần tén chưa thống nhất. Gần đây, các phương pháp dựa trên PCR được sử dụng giúp nhận diện các nhóm virus nhanh và chính xác hơn [4]. Trong

nhieu gene được sử dụng để đánh giá mối quan hệ di truyền của các nhóm baculovirus như nhân tố biểu hiện trễ *lef-8*, *lef-9* và *polyhedron (polh)*. Đây là các gene có tính bảo tồn cao và thường được sử dụng để thiết kế các mồi khuếch đại [5]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng gene *lef-8*, là gene đặc trưng cho baculovirus, để đánh giá độ đa dạng di truyền cũng như mối quan hệ phát sinh loài của một số nhóm baculovirus ở khu vực miền Nam Việt Nam và một số nhóm khác trên thế giới.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Các mẫu sâu bị chết và nghi vấn bị nhiễm baculovirus được thu thập tại các vùng khác nhau được bảo quản lạnh và chuyển về Phòng thí nghiệm Công nghệ sinh học Động vật, Viện Sinh học nhiệt đới. Các mẫu sâu nghi bị nhiễm baculovirus được nghiền trong môi trường nuôi tế bào SF-9 và được bảo quản ở -20°C. Sự phân bố các mẫu được mô tả như bảng 1.

DNA tổng được thu nhận từ mô sâu bị bệnh. Các mẫu mô được phá bằng dung dịch ly giải (10 mM Tris-HCl, 10 mM NaCl, 25 mM EDTA và 1% sodium dodecyl sulfate) với proteinase K (1 mg/ml). DNA sau đó được tách bằng dung dịch phenol:chloroform:isoamylalcohol 25:24:1

(Sigma) và được rửa bằng ethanol (Merck) DNA tổng được huyền phù hoá bằng dung dịch

TE (0,1 mM Tris-HCl và 0,1 mM EDTA) và được bảo quản ở -20°C.

Bảng 1. Khu vực thu mẫu nhiễm virus

STT	Mẫu	Khu vực phân bố
1	VN1, VN2, VN4, VN5, VN6, VN7, VN8, VN10, VN12, VN14, VN20	tỉnh Ninh Thuận
2	VN13	Tp. Hồ Chí Minh
3	VN15	Bình Dương

PCR

Gene *lef-8* đặc trưng cho baculovirus được khuếch đại bằng cặp mồi chuyên biệt gồm mồi xuôi GTAAAACGACGGCCAGTNNACNR CNGARGAYCC và mồi ngược AACAGCTAT GACCATGMMNCCYTTYTGNCCTTG (trong đó: R: A hay G, Y: T hay C; M: A hay C; W: A hay T; N: A, C, G, hay T). vùng trình tự mồi thoái hóa là vùng không được gạch chân. Chu kỳ khuếch đại gồm: 94°C trong 5 phút; 40 chu kỳ: 94°C trong 30 giây, 48°C trong 30 giây, 72°C trong 45 giây; 72°C trong 10 phút, giữ ở 4°C. Sản phẩm khuếch đại có kích thước 450 bp. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1%.

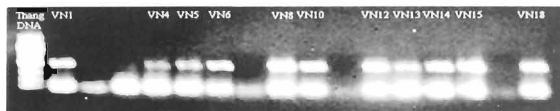
Giải trình tự và phân tích trình tự

Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng ExoSAP-IT PCR Clean up kit và được sử dụng làm khuôn cho giải trình tự các trình tự nucleotide được xác định bằng hệ thống 3730XL DNA Analyzer (Macrogen, Hàn Quốc). Việc so sánh trình tự của vùng gene *lef-8* được thực hiện cho các trình tự virus Việt Nam

và các trình tự khác của các nhóm Alpha, Beta, Delta và Gamma từ Genbank. Quá trình so sánh này được thực hiện bằng phần mềm MEGA5. Trình tự vùng D-loop ty thể được xếp dòng cột bằng chương trình CLUSTAL W. Mô hình Tamura & Nei (1993) [9] được sử dụng để xác định khoảng cách di truyền. Phương pháp Neighbor-joining được sử dụng để xây dựng cây phát sinh loài [7]. Phân tích bootstrap (lập lại 1.000 lần) được sử dụng để đánh giá mức độ tin cậy của các nhánh cây phát sinh loài.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Phương pháp PCR được sử dụng để khuếch đại trình tự gene đặc trưng cho baculovirus. Dữ liệu trình tự gene *lef-8*, baculovirus được chia thành các nhóm alpha-1, alpha-2, beta, delta và gamma. Các mẫu baculovirus được sử dụng trong công trình này biểu hiện vạch đặc hiệu 450 bp của gene *lef-8*. Điều đó cho thấy, cặp mồi với trình tự thoái hoá [1] phù hợp cho việc xác định sự hiện diện của baculovirus gây hại trên sâu bệnh ở khu vực phía nam.



Hình 1. Kết quả PCR của gene *lef-8* từ một số mẫu baculovirus (thang DNA 100bp).

Trình tự gene *lef-8* của nhóm baculovirus của khu vực phía nam và trình tự baculovirus khác bao gồm các nhóm alpha-1 baculovirus, alpha-2 baculovirus, beta baculovirus, delta baculovirus và gamma baculovirus thu nhận từ Genbank được xếp dòng cột và so sánh bằng

Clustal [4]. Việc phân tích các trình tự trên được thực hiện bằng mô hình Tamura-Nei với giá trị bootstrap được lặp lại là 1.000 lần

Khoảng cách di truyền giữa các nhóm được mô tả trong bảng 2. Sự khác biệt giữa các trình

tư được sử dụng để đánh giá so sánh tiến hóa [8]. Kết quả cho thấy, nhóm baculovirus khu vực phía nam có khoảng cách di truyền nhỏ so với nhóm Alpha-1 baculovirus ($0,570 \pm 0,118$) và Alpha-2 baculovirus ($0,346 \pm 0,069$). Trong khi đó, khoảng cách di truyền giữa nhóm baculovirus khu vực phía nam so với các nhóm còn lại đều lớn hơn. Điều này cho thấy, nhóm Baculovirus khu vực phía nam Việt Nam có mối quan hệ di truyền gần gũi với nhóm Alpha Baculovirus.

Khoảng cách di truyền trong từng nhóm

được mô tả trong bảng 3 cho thấy, khoảng cách di truyền trung bình nhóm baculovirus của khu vực phía nam Việt Nam nhỏ ($0,132 \pm 0,019$). Khoảng cách trung bình của các nhóm khác cao hơn nhóm baculovirus Việt Nam (bảng 3). Việc phân tích khoảng cách di truyền giữa các nhóm cho thấy, nhóm baculovirus của khu vực miền Nam Việt Nam có khoảng cách di truyền gần gũi so với nhóm Alpha-2 baculovirus, điều đó chứng tỏ nhóm baculovirus khu vực miền Nam Việt Nam có khả năng thuộc nhóm Alpha-2 baculovirus.

Bảng 2. Khoảng cách di truyền giữa các nhóm. Ma trận tam giác dưới: Khoảng cách di truyền trung bình. Ma trận tam giác trên: sai số chuẩn

Nhóm	Vietnam	Alpha-1	Alpha-2	Beta	Delta	Gamma
Vietnam		0,118	0,069	0,186	0,380	0,360
Alpha-1	0,570		0,050	0,118	0,361	0,349
Alpha-2	0,346	0,204		0,100	0,293	0,339
Beta	0,877	0,526	0,412		0,343	0,197
Delta	1,724	1,864	1,389	1,596		0,749
Gamma	1,556	1,543	1,467	0,808	2,373	

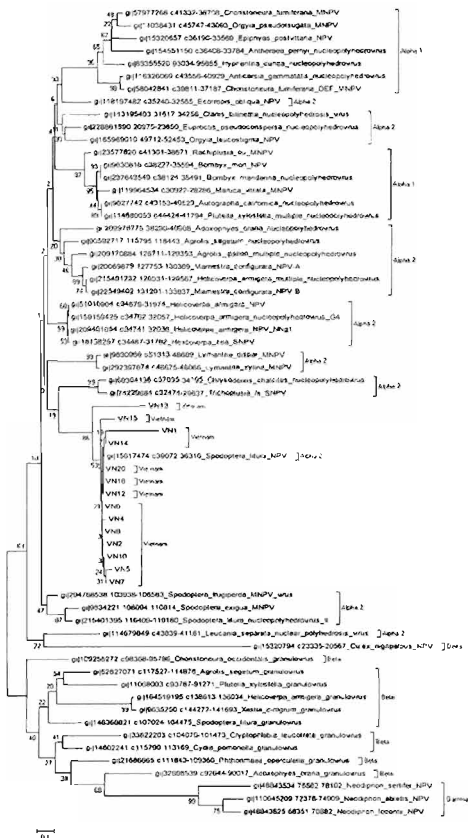
Bảng 3. Khoảng cách di truyền trong từng nhóm Baculovirus

Nhóm	Khoảng cách di truyền	Sai số
Vietnam	0,132	0,019
Alpha-1	0,408	0,057
Alpha-2	0,425	0,048
Beta	0,734	0,084
Delta	n/c ^(*)	n/c ^(*)
Gamma	0,450	0,076

(*) không xác định.

Gene *lef-8* mã hóa cho các tiểu phần của enzyme telomerase RNA của baculovirus, enzyme này khởi phát quá trình phiên mã từ các promoters phiên mã trễ và rất trễ [2]. *Lef-8* được xác định là hiện diện trong tất cả các bộ gene của baculovirus và thường được xem xét đầu tiên trong việc sử dụng là trình tự gene nghiên cứu đánh giá sự phát sinh loài của baculovirus [5]. Trong nghiên cứu này, phương pháp neighbor-joining được sử dụng để xác định mối quan hệ phát sinh loài của các nhóm

baculovirus khu vực miền Nam Việt Nam và các nhóm khác trên thế giới. Bốn nhóm baculovirus chính được phân bố trên cây phát sinh loài bao gồm nhóm Alpha baculovirus với giá trị bootstrap 63%, nhóm Beta baculovirus với giá trị boot 40% và nhóm Gamma baculovirus với giá trị bootstrap 99%. Kết quả phân tích cho thấy, nhóm baculovirus khu vực miền Nam Việt Nam phân bố trong nhóm Alpha-2 baculovirus với giá trị bootstrap 86%. Nhóm baculovirus khu vực miền Nam Việt Nam nằm chung nhóm với *spodoptera_lutira_NPV*. Kết quả phân tích trên cho thấy toàn bộ nhóm baculovirus khu vực miền Nam Việt Nam là nhóm *spodoptera_lutira_NPV*. Chúng *spodoptera_lutira_NPV* nằm chung nhóm với nhóm baculovirus khu vực miền Nam Việt Nam có nguồn gốc từ Trung Quốc [4], chứng tỏ nhóm baculovirus của Việt Nam có mối quan hệ di truyền gần gũi với nhóm baculovirus của Trung Quốc. Kết quả trên còn cho thấy baculovirus nhóm *spodoptera_lutira_NPV* có sự phân bố rộng ở khu vực miền Nam Việt Nam.



Hình 2. Mối quan hệ phát sinh loài của các nhóm baculovirus

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Elisabeth A. H., Julie A. O., David R. O., Jenny S. C., 2004. Ancient coevolution of baculoviruses and their insect hosts. *Journal of Virology*, 78(7): 3244-3251.
2. Guarino L. A., Xu B., Jin J. P., Dong W., 1998. A virus-encoded RNA polymerase purified from baculovirus-infected cells. *J. Virol.* 72(10) 7985-7991.
3. Hermiou E. A., Olszewski J. A., Cory J. S., and O'Reilly D. R., 2003. The genome sequence and evolution of baculoviruses. *Annual Review of Entomology*, 48: 211-234
4. Jehle A., Lange M., Wang H., Hu Z., Wang Y., Hauschild R., 2006. Molecular identification and phylogenetic analysis of baculoviruses from Lepidoptera. *Virology*, 346(1): 180-193.
5. Lange M., Wang H., Zhilong H., Jehle J. A., 2004. Towards a molecular identification and classification system of lepidopteran-specific baculoviruses. *Virology*, 325(1). 36-47.
6. Martignoni M. E., Iwai P. J., 1981. A catalogue of viral diseases of insects, mites and ticks. In: Burges, H. D. (Ed.), *Microbial Control of Pests and Plant Diseases 1970-1980*. Academic Press, London, pp 897-911.
7. Saitou N., Nei M., 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4(4): 406-425
8. Tamura K., Kumar S., 2002. Evolutionary distance estimation under heterogeneous substitution pattern among lineages. *Molecular Biology and Evolution*, 19(10): 1727-1736.
9. Tamura K., Nei M., 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*, 10(3): 512-526.

GENETIC RELATIONSHIP OF BACULOVIRUS INFECTED COMMON PESTS ON VEGETABLES IN THE SOUTHERN OF VIETNAM ACCESSED BY LEF-8 GENE

Nguyen Thi Phuong Thao¹, Le Thanh Long¹, Van Thi Hanh¹,
 Nguyen Thi Hong Van¹, Nguyen Khac Duy¹

¹Institute of Tropical Biology, VAST

²International University, Vietnam National University HCM

SUMMARY

Polymerase chain reaction was applied to amplify baculovirus-specific *lef-8* gene. *Leif-8* gene sequences were used to access genetic distances and phylogenetic relationship of baculovirus derived from Southern Vietnam and other baculovirus from Genbank. The results showed that almost baculovirus from Southern Vietnam expressed 450bp of *lef-8* gene. The genetic distance between baculovirus from Southern Vietnam and Alpha-2 baculovirus was lowest (0.346 ± 0.069), suggesting that they had close genetic relationship. Neighbor-joining method was applied for phylogenetic construction. Bootstrap analyses (using 1000 replications) were used to access the confidence in branching order. Phylogenetic tree demonstrated that baculovirus from Southern Vietnam and Alpha-2 baculovirus, especially *spodoptera_litura*_NPV, located in the same clade with 86% bootstrap value, suggesting that *spodoptera_litura*_NPV has wide distribution in Southern Vietnam.

Keywords: Baculovirus, genetic distance, genomic DNA, *lef-8* gene, phylogenetic relationship.

Ngày nhận bài: 25-6-2013