

XÁC ĐỊNH SỰ CÓ MẶT CỦA VIRUS TRÊN MỘT SỐ CÂY TRỒNG THU THẬP Ở LÀO BẰNG KỸ THUẬT RT-PCR

Nguyễn Văn Đoài¹, Phạm Thị Văn¹, Lâm Đại Nhân¹, Phạm Bích Ngọc¹, Kosonh Xayphakatsa², Chu Hoàng Hà¹

¹ Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

² Viện Sinh thái và Công nghệ sinh học, Bộ Khoa học và Công nghệ Lào

TÓM TẮT

Virus là một trong những tác nhân gây hại nghiêm trọng nhất trong ngành trồng trọt của bất kì quốc gia nào. Những hiểu biết về đặc điểm phân tử virus thực vật sẽ góp phần đưa ra một chiến lược ngăn chặn khả năng gây bệnh trên cây trồng của virus một cách hợp lý và lâu dài. Trong nghiên cứu này, một số loại cây trồng có biểu hiện bệnh virus đã được thu thập tại các vùng khác nhau ở Lào và kiểm tra nhiễm virus bằng kỹ thuật RT-PCR với cặp mồi đặc hiệu cho từng loại virus gây hại. Kết quả phân tích trình tự đã tìm thấy sự có mặt của 2 loại virus: CTV (Citrus tristeza virus) chúng stem pitting trên mẫu bệnh bưởi (thể phân lập L16) và PRSV (papaya ringspot virus) chúng p trên các mẫu bệnh đu đủ (bao gồm thể phân lập L4, L20, L21 và L36). Phân tích độ tương đồng cho thấy thể phân lập L16 có độ tương đồng cao nhất (99,6%) so với các thể phân lập CTV B408 (với mã số DQ363384 và DQ363385), còn 4 thể phân lập L4, L20, L21 và L36 có độ tương đồng cao nhất (90,3-90,5%) so với thể phân lập PRSV HN-1 (mã số HQ424465) trên Ngân hàng dữ liệu gen.

Từ khóa: virus thực vật, RT-PCR, CTV, PRSV, độ tương đồng trình tự

MỞ ĐẦU

Virus còn được gọi là siêu vi khuẩn hay siêu vi trùng, có kích thước từ 30 - 300 nm. Cấu tạo của virus chỉ gồm acid nucleic DNA hoặc RNA được bao bởi một vỏ bọc (capsid) bằng protein hay lipoprotein có thụ thể để có thể liên kết với tế bào ký chủ chuyên biệt mà chúng ký sinh gây bệnh. Cho tới nay, hơn 4000 virus đã được phát hiện và công nhận, trong đó khoảng 1000 là các virus gây hại thực vật (Gergerich & Dolja, 2006). Có 977 loại virus khác nhau thuộc 70 loài và 14 họ gây bệnh trên thực vật như đốm vòng đu đủ, vàng lùn trên cây có múi.

Cây trồng nhiễm virus biểu hiện những đặc điểm bất thường từ vỏ ngoài của virus gây hại, như thay đổi màu, hình dạng các cơ quan, cả những bất thường trong trao đổi chất. Mặc dù hầu hết các virus thực vật thường không làm chết cây nhưng có ảnh hưởng nghiêm trọng đến sinh trưởng, phát triển của cây, năng suất và chất lượng nông phẩm (Hà Việt Cường, 2010). Trên thế giới, virus thực vật đã gây nên những thiệt hại khổng lồ cho nông nghiệp. Hiện nay, toàn bộ diện tích trồng đu đủ ở nước ta cũng như các vùng khác trên thế giới như Australia, Thailand, Hawaii, Lào... đều bị nhiễm virus đốm vòng đu đủ Papaya ringspot virus, PRSV (Fitch et al., 1990). Đặc biệt vào năm 2006, bệnh vàng lùn và lùn xoắn lá hại lúa đã lây lan ra 21 tỉnh, thành, làm giảm sản lượng 825.000 tấn lúa, ước thiệt hại khoảng 2.000 tỷ đồng (theo Thông tấn xã Việt Nam, 5/11/2006). Do vậy, những hiểu biết về tình hình dịch bệnh và phát hiện sớm để ngăn ngừa và kiểm soát virus gây nhiễm là vấn đề then chốt đặt ra cho các nhà nông cũng như là các nhà nghiên cứu.

Việt Nam và Lào là những nước nông nghiệp có khí hậu nhiệt đới, đời sống của đa phần dân số phụ thuộc vào sản xuất nông nghiệp. Một trong những căn trừ đối với sự phát triển trồng trọt và chăn nuôi là các bệnh do virus gây ra. Như ở Việt Nam chỉ tính riêng vụ hè thu 2008, thiệt hại do virus gây ra trên lúa là khoảng 600.000 tấn, ước tính là 1800 tỷ đồng. Bệnh do virus có tốc độ lan truyền cực nhanh nhờ các vector truyền bệnh như các loại côn trùng, hay do sự vận chuyển cơ học mầm bệnh từ vùng dịch đến các vùng khác. Trong khi đó, toàn bộ đường biên giới Việt Nam-Lào (từ ngã ba biên giới Việt Nam - Lào - Trung Quốc đến ngã ba biên giới Việt Nam - Lào - Campuchia) dài trên 2.000 km nên khả năng lan truyền virus qua biên giới hai nước là rất cao. Để kiểm soát, quản lý và đề ra các biện pháp phòng ngừa các bệnh do virus gây ra một cách hiệu quả cho cả Việt Nam và Lào thì các phương pháp chẩn đoán bệnh có độ nhạy cao và đặc hiệu cho từng loại bệnh là cực kỳ quan trọng. Hiện nay nhiều phương pháp hiện đại dựa trên các kỹ thuật sinh học phân tử đã được ứng dụng trong việc chẩn đoán bệnh do virus gây ra trên cây trồng và vật nuôi. Các phương pháp này đang được áp dụng rất hiệu quả ở Việt Nam. Việc ứng dụng các phương pháp sinh học phân tử này để chẩn đoán và xác định nhanh virus gây bệnh đang là thế mạnh của Viện Công nghệ sinh học, tuy nhiên ở Lào hiện nay còn đang rất hạn chế. Do vậy, Bộ khoa học và Công nghệ Việt Nam đã hỗ trợ kinh phí cho Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam thực hiện đề tài hợp tác giữa hai nước "Đào tạo và chuyển giao công nghệ trong chẩn đoán và xác định bệnh virus trên cây trồng và vật nuôi tại Lào" nhằm hỗ trợ Lào trong việc ứng dụng các kỹ thuật sinh học hiện đại để đối phó với các bệnh do virus gây ra trên vật nuôi và cây trồng.

Nằm trong khuôn khổ đề tài nghiên cứu này, những mẫu cây trồng nhiễm bệnh được thu thập từ các địa điểm khác nhau ở Lào đã được thực hiện sàng lọc kiểm tra sự có mặt virus bằng kỹ thuật RT-PCR. Dưới đây là công bố về kết quả phân lập được sự có mặt của virus PRSV và CTV (Citrus tristeza virus) trên các mẫu bệnh thu thập tại Lào.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu thực vật

Các mẫu lá cây trồng có biểu hiện các triệu chứng phơi nhiễm virus (PRSV và CTV) đặc trưng được thu thập tại các vùng khác nhau của Lào (Bảng 1)

Bảng 1. Bảng danh sách các mẫu bệnh thu thập tại Lào

STT	Kí hiệu mẫu (thể phân lập)	Cây chủ	Địa điểm thu mẫu	Triệu chứng chính	Chẩn đoán
-----	----------------------------	---------	------------------	-------------------	-----------

1	L4	Đu đủ	Paksong, Champasak	Lá đốm hình nhân	PRSV
2	L20	Đu đủ	Phonhoung, Vientaine	Lá đốm hình nhân	PRSV
3	L21	Đu đủ	Phonhoung, Vientaine	Lá đốm hình nhân	PRSV
4	L36	Đu đủ	Xaythany, Vientaine	Lá đốm hình nhân	PRSV
5	L15	Chanh	Phonhoung, Vientaine	Lá khảm vàng, gân lõm	CTV
6	L16	Bưởi	Phonhoung, Vientaine	Lá khảm vàng, thân lõm	CTV
7	L34	Bưởi	Xaythany, Vientaine	Lá khảm vàng, thân lõm	CTV

Ghi chú: CTV (*Citrus tristeza virus*), PRSV (*papaya ringspot virus*). Mục chẩn đoán được thực hiện qua quan sát triệu chứng biểu hiện trên cây bệnh.

Phương pháp nghiên cứu

Tách chiết RNA, RT-PCR, tách dòng và xác định trình tự

RNA tổng số được tách từ lá mẫu bệnh nghi nhiễm bệnh CMV sử dụng kit Trizol[®] Reagents (Invitrogen). 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 1 – 2 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 5µl đệm phản ứng SX; 1 µl chất ức chế ribonuclease (40 U/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 28,6 µl nước; 5 µl đệm PCR 10X; 5 µl MgCl₂ 25 mM; 4 µl dNTPs 2,5 mM; 2 µl của 10 pmol/µl mỗi loại mỗi (Bảng 2); 0,4 µl Taq polymerase 5 U/µl; 4 µl cDNA và theo chu kỳ nhiệt như sau: 01 chu kỳ 94°C trong 3 phút; 25 chu kỳ của (94°C trong 1 phút, 55°C trong 1 phút, 72°C trong 1 phút 20 giây (PRSV) hoặc 30 giây (CTV)); 01 chu kỳ 72°C trong 5 phút; và giữ ở 4°C cho đến khi phân tích.

Bảng 2. Mỗi được sử dụng cho RT-PCR nhân dòng các đoạn gen đặc trưng cho virus

Virus được kiểm tra	Tên mỗi	Trình tự (5' – 3')	Vị trí trên genome (nt)	Vùng phân lập	Kích thước (bp)	Tham khảo
PRSV	PRSD4-F4	ATCTACAAGCCTCATGAAGCTCGG	3146-3168	D4	1072	Chu Hoàng Hà, 2010
	PRSD4-R4	CACCTCTATCCACGCTCGATCATC	4195-4217			
CTV	CP-For	AACGCCCTTCGAGTCTGGGGTAGGA	16515-16539	CP	273	Chu Hoàng Hà, 2010
	CP-Rev	TCAAGGTGTGTTGAATTCCCAAGC	16763-16787			

Ghi chú: F4, For: ký hiệu mỗi cuối, là mỗi bổ sung với sợi âm; R4, Rev: ký hiệu mỗi ngược, là mỗi bổ sung với sợi dương; CP: vùng gen mã hóa protein vỏ của CTV, D4: vùng gen mã hóa protein P3 và 5K1 của PRSV.

Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1% trong đệm 1X TAE (Sambrook *et al.*, 1989). Gel được nhuộm trong dung dịch ethidium bromide với nồng độ 0,1 µg/ml. Sản phẩm PCR được tách khỏi gel, tinh sạch bằng bộ kit của Qiagen và gắn trực tiếp vào vector tách dòng pBT (Phan Trọng Hoàng *et al.*, 2005). Sản phẩm gắn này được biến nạp vào tế bào *E. Coli* DH5α. Chọn lọc các khuẩn lạc dương tính (khuẩn lạc màu trắng) trên môi trường LB có bổ sung 50 mg/l carbenicilin, 30 mg/l X-gal và 0,1 mM IPTG. Sơ đồ của DNA tái tổ hợp được kiểm tra bằng phản ứng PCR, có sử dụng trực tiếp các khuẩn lạc dương tính (colony-PCR) bằng cặp mỗi pUC18-F1 và pUC18-R1.

DNA plasmid được tách chiết theo kit QIAprep Spin Miniprep. Chọn các mẫu DNA plasmid tái tổ hợp có kích thước như mong muốn để tinh sạch và xác định trình tự.

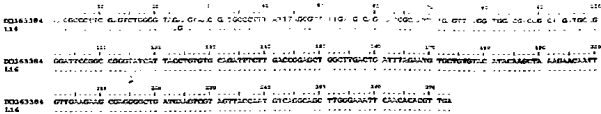
Phân tích trình tự

Trình tự các đoạn gen của các thể phân lập được xác định trên máy đọc trình tự nucleotide tự động ABI PRISM@ 3100 Avant Genetic Analyzer của hãng Applied Biosystems sử dụng kit BigDye Terminator v3.1. Trình tự được phân tích bằng các phần mềm máy tính chuyên dụng (BioEdit 7.0.9.0; DNASTar 7.0...) và BLASTn/NCBI để xác định đoạn gen phân lập thuộc loài nào.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

RT-PCR, tách dòng và xác định trình tự

RNA tổng số sau tách chiết được làm khuôn cho phản ứng RT-PCR với các cặp mỗi đặc hiệu virus. Trong đó, cặp mỗi PRSD4- F4/R4 được sử dụng để kiểm tra sự phơi nhiễm PRSV trên các mẫu bệnh đu đủ còn cặp mỗi CP-For/Rev được sử dụng để kiểm tra sự phơi nhiễm CTV trên các cây họ cam quýt. Kết quả RT-PCR cho thấy có 4/4 mẫu bệnh dương tính PRSV (L4, L20, L21 và L36) và 1/3 mẫu bệnh dương tính CTV (L16) với sự xuất hiện các phân đoạn DNA có kích thước phù hợp tính toán lý thuyết (Hình 1). Nhằm mục đích kiểm tra chính xác cũng như bước đầu định danh virus phơi nhiễm trên các mẫu bệnh thì những phân đoạn này tiếp tục được dòng hóa trong vector pBT và xác định trình tự. Kết quả xác định trình tự của các đoạn gen phân lập bằng cặp mỗi PRSD4-F4/R4 và CP-For/Rev có kích thước tương ứng là 1072 và 273 nucleotide (Hình 2, 3).



Hình 3. Hình ảnh so sánh trình tự vùng CP của thể phân lập CTV L16 với thể phân lập CTV B408 (DQ363384)

Phân tích trình tự nucleotide

Những trình tự nucleotide của các đoạn DNA phân lập được của năm thể phân lập (L4, L16, L20, L21, L36) đã được so sánh với các trình tự trong ngân hàng dữ liệu gen trên NCBI bằng phần mềm BLASTn. Kết quả cho thấy các thể phân lập L4, L20, L21 và L36 có mối quan hệ gần gũi với các thể phân lập PRSV còn thể phân lập L16 có mối quan hệ gần gũi với các thể phân lập CTV. Hầu hết các trình tự so sánh đều có độ tương đồng tương đối cao (trên 90%) (Bảng 3). Điều này đã chứng minh rằng, cả bốn thể phân lập (L4, L20, L21, L36) trên cây đu đủ đều bị nhiễm virus PRSV và thể phân lập L16 trên cây bưởi bị nhiễm virus CTV.

Bảng 3. So sánh độ tương đồng trình tự nucleotide của các đoạn gen phân lập được trong nghiên cứu với trình tự gen trong ngân hàng dữ liệu gen có quan hệ gần nhất

Thể phân lập nghiên cứu	Trình tự trong Ngân hàng dữ liệu gen có mối quan hệ gần nhất	
	Thể phân lập virus (mã số trong Ngân hàng dữ liệu gen)	Độ tương đồng (%)
L4	Papaya ringspot virus P, isolate HN-1 (HQ424465)	90,5
L20	Papaya ringspot virus P, isolate HN-1 (HQ424466)	90,5
L21	Papaya ringspot virus P, isolate HN-1 (HQ424465)	90,5
L36	Papaya ringspot virus P, isolate HN-1 (HQ424466)	90,3
L16	Citrus tristeza virus, isolate B408 (DQ363384, DQ363385)	99,6

PRSV thuộc chi *Potyvirus*, là virus nguy hiểm nhất, gây bệnh đốm vòng trên đu đủ khắp thế giới (Hà Việt Cường, 2010). Dựa vào hình thái phân tử virus, khả năng lan truyền thông qua các loài rệp, mối quan hệ huyết thanh và khả năng tạo thể vùi hình bán hệ trong tế bào kí chủ, PRSV đã được chia thành hai chủng: PRSV-W và PRSV-P (Chiang *et al.*, 1997; Bateson *et al.*, 2002). PRSV-P là virus phổ biến và gây thiệt hại lớn nhất từ đầu đu đủ và một số cây họ bầu bí, còn PRSV-W chỉ ảnh hưởng tới họ bầu bí mà không nhiễm trên cây đu đủ. Nghiên cứu trình tự của các dòng virus từ Thái Lan, Việt Nam, Philippin, Ấn Độ... cho thấy mức độ tương đồng giữa hai dạng PRSV-P và PRSV-W khá cao, sự sai khác có thể do quá trình tiến hóa cũng như sự khác nhau về vùng phân bố. Sự tương đồng giữa hai dạng đặt ra giả thuyết là PRSV-P tiến hoá từ PRSV-W do đột biến (Bateson *et al.*, 2002). Phân tích trình tự nucleotide đoạn gen D4 của bốn thể phân lập PRSV L4, L20, L21 và L36 cho thấy chúng có độ tương đồng dao động từ 89,6% (L20 so với L36) đến 99,7% (L4 so với L20). Trong khi đó, khi so sánh bốn thể phân lập PRSV nghiên cứu với các thể phân lập trên Ngân hàng dữ liệu gen độ tương đồng dao động từ 85,4% (L20 so với HQ475877_PRSV-W phân lập từ Ấn Độ) đến 90,5% (L4, L20, L21 so với HQ424466 PRSV-P thể phân lập HN-1 phân lập từ Trung Quốc). Vì vậy, có thể kết luận bốn mẫu bệnh đu đủ (L4, L20, L21 và L36) nhiễm virus PRSV chủng p. Điều này cũng đồng với nhận định trước đây rằng PRSV-P chỉ gây bệnh trên cây đu đủ và sự đa dạng virus có bị ảnh hưởng bởi điều kiện môi trường và khu vực địa lý.

CTV thuộc họ *Closteroviridae*, chi *Closterovirus* là virus gây bệnh tàn lụi nghiêm trọng nhất cho các vùng trồng cây có múi trên thế giới, ở châu Á theo thống kê có đến 90% cây quả quýt có múi bị nhiễm bệnh tristeza. Các chủng CTV gây bệnh có kiểu triệu chứng và mức độ khác nhau phụ thuộc vào loài cây có múi non nhiễm và sự truyền bệnh của rệp (chủ yếu do 3 loại rệp: *Toxoptera citricidius*, *T. aurantii*, *Aphis gossypii*). Các triệu chứng thường gặp trên các cây bị bệnh tristeza: gân trong đứt đoạn trên lá, gân lồi và cong, lõm thân, vàng lá kết hợp với cây còi cọc, quả nhỏ, chất lượng quả kém. Dựa vào triệu chứng của bệnh, người ta chia CTV thành 5 chủng chính: seedling yellows virus, grapefruit stem pitting virus, grapefruit stunt bush virus, lime die-back virus, Ellendale mandarin decline virus. Các chủng decline (chứng đốm) gây tàn lụi và chết các loại cây cam trên gốc ghép cam chua. Chủng stem pitting (chứng đốm) có biểu hiện lõm thân trên cây cam ngọt hoặc cây bưởi làm cây còi cọc, chất lượng và năng suất quả kém (Marques *et al.*, 2006). Chủng seedling yellow biểu hiện cây còi cọc, gân trong ở cây chanh và một số loại cây khác (Bekolo *et al.*, 2007; Herron, 2003). Trong nghiên cứu này, thể phân lập L16 có mối quan hệ gần nhất (99,6%) với thể phân lập CTV B408 (DQ363384, DQ363385) chủng stem pitting được phân lập từ Mỹ. Các nghiên cứu cho thấy tính bảo thủ trong đoạn gene mã hóa cho protein CP rất cao, có thể sử dụng đoạn trình tự này cho các mục đích phân loại (Sekiya *et al.*, 1991) và cũng cho phép sử dụng gen CP làm nguyên liệu cho tạo cây trồng chuyển gen kháng virus CTV bằng cơ chế bất hoạt RNA (RNA interference). Vì vậy, có thể kết luận thể phân lập L16 nghiên cứu thuộc virus CTV chủng stem pitting. Kết quả này cũng tương thích với những biểu hiện triệu chứng trên cây bưởi thu thập được.

Qua khảo sát thực địa tại Lào, chúng tôi nhận thấy sự biểu hiện bệnh do PRSV trên cây đu đủ ở Lào khá điển hình và gây thiệt hại nặng nề tới năng suất và chất lượng của 100% các vườn đu đủ tại Lào. Trong khi đó, CTV mới chỉ xuất hiện trên cây bưởi với tỷ lệ thấp. Vì vậy, việc phát hiện bệnh virus trên các cây trồng tại Lào là một trong những nghiên cứu quan trọng nhằm góp phần giúp nước bạn sớm có một chiến lược kiểm soát bệnh virus thực vật hợp lý, kịp thời và hiệu quả.

KẾT LUẬN

Sử dụng kỹ thuật RT-PCR đã nhân dòng và xác định trình tự nucleotide đoạn gen D4 (vùng gen mã hóa protein P3 và 6K1) của PRSV có độ dài 1072 bp và đoạn gen CP của virus CTV có độ dài 273 bp tương ứng từ 04 mẫu đu đủ và mẫu bưởi nhiễm bệnh thu thập tại các vùng khác nhau ở Lào.

So sánh các trình tự thu được đã xác định bốn mẫu bệnh đu đủ (L4, L20, L21 và L36) nhiễm virus PRSV chủng P và một mẫu bệnh bưởi (L16) nhiễm virus CTV chủng Stem pitting.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bateson MF, Lines RE, Revill P, Chaleseprom W, Ha CV, Gibbs AJ & Dale JL (2002). On the evolution and molecular epidemiology of the potyvirus Papaya ringspot virus. *J Gen Virol* 83(10): 575-2585.
- Bekolo N, Zachéo A, Lous BM, Baptiste NMJ, Yvette O (2007) Vigour and behaviour of fifteen citrus varieties against tristeza in the forest zone of Cameroon. *African Journal of Biotechnology* 6(12):1403-1409.
- Chiáng CH, Yeh SD (1997). Infectivity assays of in vitro and in vivo transcripts of papaya ringspot potyvirus. *Bol Bull Acad Sin* 38: 153-163
- Chu Hoàng Hà (2010). *Nghiên cứu tạo giống cây ăn quả kháng bệnh virus phổ rộng bằng kỹ thuật chuyển gen đa đoạn*. Tổng kết đề tài KC04 03/09-10.
- Gergeich RC and Dolja VV (2006). Introduction to Plant Viruses, the Invisible Foe. The Plant Health Instructor. DOI: 10.1094/PHI-I-2006-0414-01.
- Hà Việt Cường (2010). "Virus thực vật, phytoplasma và viroid". Bài giảng. Đại học Nông nghiệp I Hà Nội.
- Heiron CM (2003). Citrus Tristeza Virus: Characterization of Texas Isolates, studies on aphid transmission and pathogen-derived control strategies. *PhD Thesis of Plant Pathology*. Texas A and M University, USA.
- Marques NT, Bailey AM, Niblett CL, and Nolasco G (2006). Differentiation of Citrus tristeza virus (CTV) isolates by cleavage fragment length polymorphism (CFLP) analysis of the major coat protein gene. *Phytopathologia Mediterranea* 45: 99-109.
- Fitch MMM, Marshardt RM, Gonsalves D, Slightom JL, Sanford JC (1990). Stable transformation of papaya via microprojectile bombardment. *Plant Cell Rep* 9: 189-194.
- Phan Trọng Hoàng, Nông Văn Hải, Lê Trần Bình, Chu Hoàng Hà (2005). Sử dụng enzyme XcmI để thiết kế T-vector pBT phục vụ tách dòng và đọc trình tự gen. *Tạp chí Công nghệ sinh học* 3(4): 459-463.
- Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T (1989). *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Sekiya ME, Lawrence SD, McCaffery M, Cline K (1991). *Molecular cloning and nucleotide sequencing of the coat protein gene of citrus tristeza virus*. *J Gen Virol* 72(5):1013-20. PubMed PMID: 2033386.

IDENTIFY VIRUS DISEASES ON SOME CROPS COLLECTING FROM LAOS USING RT-PCR

Nguyen Van Doai¹, Pham Thi Van¹, Lam Đại Nhan¹, Pham Bích Ngọc¹, Kosonh Xayphakatsa², Chu Hoàng Hà¹

¹ Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology.

² Biotechnology and Ecology Institute, Ministry of Science and Technology, Laos

SUMMARY

Virus is one of the most important pathogenic agents in agricultural crops of any countries. The knowledge of plant virus molecular characteristics in order to control plant virus diseases sensibly and stably. In this study, some crops expressing virus diseases have collected from different areas in Laos and have detected the present of virus by RT-PCR using virus specific primers. The results of sequence analysis showed that L16 isolate (on grapefruit) infected with Citrus tristeza virus (CTV) - grapefruit stem pitting type and four L4, L20, L21 and L36 isolates (on papaya) infected with Papaya ringspot virus (PRSV)- P type. Sequence comparison revealed that L16 isolate was most closely related to CTV B408 isolate (DQ363384 and DQ363385) in Genbank with 99,6% nucleotide sequence identity, and four L4, L20, L21 and L36 isolates were most closely related to PRSV HN-1 isolate (HQ424465) in Genbank with 90,3-90,5% nucleotide sequence identity.

Key words: Plant virus, RT-PCR, CTV, PRSV, sequence identity

Author for correspondence. Tel: 04 38362599, E-mail: nhan@itit.ac.vn