

ĐÁNH GIÁ ĐA DẠNG DI TRUYỀN VIRUS GÂY BỆNH KHẸM DƯA CHUỘT (CUCUMBER MOSAIC VIRUS-CMV) TRÊN CÂY THUỐC LÁ THU THẬP TẠI MỘT SỐ TỈNH THÀNH CỦA VIỆT NAM THÔNG QUA TÁCH DÒNG VÀ GIẢI TRÌNH TỰ GEN MÃ HOÁ PROTEIN MP VÀ CP

Phạm Thị Vân*, Phạm Bích Ngọc, Lê Văn Sơn, Chu Hoàng Hà
 Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

TÓM TẮT

Vùng gen mã hóa cho protein di chuyển (MP) và protein vỏ (CP) của virus khảm dưa chuột (*Cucumbers mosaic virus*, CMV) thu thập từ mẫu cây thuốc lá nhiễm bệnh thu tại một số tỉnh thành (Cao Bằng, Hà Nội, Gia Lai, Tiền Giang, Tây Ninh) của Việt Nam đã được nhân dòng, xác định trình tự nucleotide và phân tích bằng kỹ thuật RT-PCR (Reverse transcriptase-polymerase chain reaction). Trình tự các gen MP và CP đã được đăng ký vào Ngân hàng dữ liệu gen với các mã số AM048830 (thể phân lập VN-Caobang), AM048831 (thể phân lập VN-Hatay), HE999616 và HE999617 (thể phân lập VN-Tayninh), HE999618 và HE999619 (thể phân lập VN-Gialai), HE999620 and HE999621 (thể phân lập VN- Tiengiang). Phân tích sự đa dạng di truyền của gen MP và CP CMV tương ứng cho thấy độ tương đồng di truyền ở mức độ nucleotide của các thể phân lập Việt Nam so với nhau dao động từ 91,3-99,8% và 92,5-99,5%. Dựa vào độ tương đồng về trình tự và phân tích cây phát sinh chủng loại, chúng tôi rằng các CMV Việt Nam nghiêng về thuộc subgroup IB

Từ khóa: Virus khảm dưa chuột, CP, MP, RT-PCR, phân tích cây phân loại

MỞ ĐẦU

Virus gây bệnh khảm dưa chuột CMV thuộc loại *Cucumovirus*, họ *Bromoviridae*. Đây là virus thực vật có phổ gây bệnh rộng nhất với khoảng trên 1000 loài cây khác nhau (Palukaitis *et al.*,1992) trong đó có nhiều cây trồng có giá trị kinh tế cao thuộc họ cà, họ bầu bí, họ đậu, chuối, cây hoa và cây cảnh...

Genome của CMV bao gồm 3 sợi RNA đơn dương (RNA1, RNA2 và RNA3) chứa 5 khung đọc mở (ORF). ORF 1a và 2a nằm trên RNA 1 và 2, tách biệt và là những thành phần của enzym sao chép replicase; ORF 2b là một gen nối lên ORF 2a, nằm trên dưới genome RNA4A (Ding *et al.*,1994) và mã hóa một suppressor của quá trình cảm gen sau phiên mã (Brigneti *et al.*,1998). ORF 3a và CP nằm trên RNA3, trong đó ORF 3a mã hóa cho protein 3a-protein di chuyển của virus (MP) còn ORF CP mã hóa cho protein vỏ (CP); CP được biểu hiện từ dưới genome RNA4 (Palukaitis *et al.*,1992). Các chủng CMV đã được phân chia thành hai subgroup I và II dựa vào huyết thanh học (Hu *et al.*,1995), lai acid nucleic (Owens & Palukaitis, 1998), trình tự gen (Owens *et al.*,1990) và RFLP (Sialer *et al.*,1999). Gần đây khi phân tích cây phân loại các chủng CMV dựa trên trình tự gen, subgroup I đã được chia tiếp thành IA và IB (Roossinck, 2002). Các chủng CMV subgroup IA và II xuất hiện hầu như trên khắp thế giới, trong khi các chủng CMV subgroup IB chủ yếu có mặt ở Châu Á (Roossinck, 2002).

Trong ba RNA của CMV, RNA3 xảy ra sự tái tổ hợp thường xuyên hơn RNA1 và 2 (Roossinck, 2002). Vì vậy có rất nhiều nghiên cứu dựa vào RNA3 để đánh giá đa dạng di truyền và xây dựng cây phát sinh chủng loại của CMV (Deyong *et al.*, 2005...). Trong đó, gen CP được ưu tiên nhất bởi CP của CMV đóng một vai trò cần thiết trong sự di chuyển virus, vector truyền bệnh và sự phân hóa triệu chứng (Callaway *et al.*,2001). Vai trò này của gen CP cũng cho phép sử dụng gen CP làm nguyên liệu cho tạo cây trồng chuyển gen kháng virus CMV bằng cơ chế bất hoạt RNA (RNA interference). Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã sử dụng kỹ thuật RT-PCR để nhân dòng hai gen MP và CP nằm trên RNA3 của CMV từ các mẫu thuốc lá có biểu hiện khảm xanh nghi nhiễm CMV được thu tại một số tỉnh thành khác nhau đại diện cho miền Bắc và Nam của Việt Nam. Trên cơ sở phân tích trình tự gen thu được, sự đa dạng di truyền thông qua độ tương đồng về trình tự nucleotide và amino acid và thông qua cây phát sinh chủng loại của các thể phân lập nghiên cứu đã được đánh giá.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu nghiên cứu

Vật liệu nghiên cứu là các thể phân lập thuốc lá nhiễm CMV được thu tại các tỉnh thành khác nhau đại diện cho Miền Bắc và Nam Việt Nam (Bảng 1).

Bảng 1. Bảng danh sách các mẫu bệnh sử dụng trong nghiên cứu

STT	Miền phân lập của đất nước	Thể phân lập	Địa điểm thu mẫu	Mã số trên Ngân hàng dữ liệu gen
1	Miền Bắc	VN-Caobang	Cao Bằng	AM048830 (gen MP và CP)
2		VN-Bavi	Ba Vì, Hà Nội	AM048831 (gen MP và CP)
3	Miền Nam	VN-Tayninh	Tây Ninh	HE999616 (gen MP) và HE999617 (gen CP)
4		VN-Gialai	Gia Lai	HE999618 (gen MP) và HE999619 (gen CP)
5		VN- Tiengiang	Tien Giang	HE999620 (gen MP) và HE999621 (gen CP)

Phương pháp nghiên cứu

Tách chiết ARN, RT – PCR, tách dòng và xác định trình tự

ARN tổng số được tách từ lá thuốc lá nghi nhiễm bệnh CMV sử dụng kit Trizol® Reagent's (Invitrogen). Phản ứng RT – PCR được tiến hành trong hai bước. 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 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 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 CMV-F1 (5'-GCATGGCTTTCCAAGGTACCA-3') và CMV-R1 (5'-GTAAGCTGGATGGACAACCCGT-3'); 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, 57°C trong 45 giây, 72°C trong 45 giây; 01 chu kỳ 72°C trong 5 phút; và giữ ở 4°C cho đến khi phân tích.

Sản phẩm PCR được điện di trên gel agrose 1% trong đệm 1X TAE. Gel được nhuộm trong dung dịch ethidium bromide với nồng độ 0,1µg/ml. Sản phẩm PCR được tách khỏi gel, tinh sạch bằng bộ kit của Qiagen và gắn trực tiếp vào vector cắt đóng 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 ampicillin, 30 mg/l X-gal và 0,1 mM IPTG. Sự có mặt 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 mồi 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 sau khi được khuếch đại sẽ được đăng ký trong Ngân hàng dữ liệu gen. Trình gen MP, CP CMV của mỗi thể phân lập được so sánh với một số chủng CMV đại diện subgroup I (A và B) và II và cũng so sánh với một chủng virus *Peanut stunt virus* (PSV) như một virus ngoài nhóm (Bảng 2).

Sử dụng phần mềm ClustalW của Megalign/DNASTAR để xây dựng bảng hệ số lượng đồng và cây phát sinh chủng loại.

Bảng 2. Mã số, nguồn gốc đất nước và cây chủ của các thể phân lập/chủng CMV trên GenBank được sử dụng trong so sánh

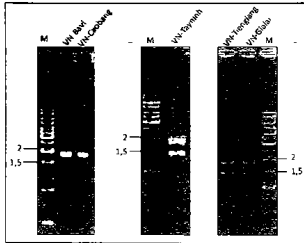
§	Nhóm/Chủng/	Mã số	Vật chủ	Nguồn gốc	S	Nhóm/Chủng/	Mã số	Vật chủ	Nguồn		
Γ	thể	phân		đất nước	T	thể	phân		gốc đất		
Γ	lập				T	lập			nước		
1	IA	D8	AB004781	Japan	18	IB	daserl rose	AB657971	Adenium obesum	Taiwan	
2	IA	Fny	D10538	Nicotiana tabacum	USA	19	IB	GF	DQ302719	Lycopersicon esculentum	China
3	IA	Ly2	AJ296154	Lilium longiflorum	South Korea	20	IB	lxora	U20219	Lycopersicon esculentum	
4	IA	Mf	AJ276481		South Korea	21	IB	K	AF127977		
5	IA	Ns	AJ511950	Nicotiana glauca	Hungary	22	IB	Mgh91	JX025597	Muskmelon	Iran
6	IA	Pepo	AF103991		Japan	23	IB	Nt9	D28780		Taiwan
7	IA	Rs	AJ517802	Raphanus sativus	Hungary	24	IB	SD	AB008777	Nicotiana tabacum	China
8	IA	Y	D12499	Nicotiana tabacum	Japan	25	IB	TA1	GQ228525	Arachis hypogaea L.	China
9	IA	A27	FN552545	Cucumis sativas	Thailand	26	IB	Tfn	Y16926	Lycopersicon esculentum	Italy
0	IB	ap81	AB250962	Abaca	Philippines	27	IB	YN	EF216865	Brassica campestris subsp chinensis (L.) Makino	China
1	IB	Ce	AY429432	Arachis hypogaea L.	China	28	II	Ly	AF198103	Lupine	Australia
2	IB	CC	GU979890	Pepper	China	29	II	M2	AB006813		Japan
3	IB	CLW2	JN054635	Cucumis sativus L.	Malaysia	30	II	Q	M21464		Australia
4	IB	GMV-Ag	EF424775	Ageratum conyzoides	China	31	II	TN	AB178847	Lycopersicon esculentum	Japan
5	IB	GMV-ND2	EU414789	Petunia hybrida	China	32	II	Trk7	L15336		Hungary
6	IB	CS	AY429437	Arachis hypogaea L.	China	33	II	Xb	AF268508	Banana	China
7	IB	CTL	EF213025	Brassica chinensis	China	34		PSV	U15730	Vigna	USA

KẾT QUẢ

RT-PCR và xác định trình tự

Sản phẩm RT-PCR đã thu được các phân đoạn DNA rất đặc hiệu (hình 1), trong đó, các thể phân lập ở Miền Bắc và Nam đều có phân đoạn có kích thước khoảng 2 kb đúng như tính toán lý thuyết, còn các thể phân lập ở miền Nam còn bị lẫn thêm phân đoạn có kích thước khoảng 1,5 kb (phần đoạn này chính là đoạn gen trên RNA1 của CMV không sử dụng để phân tích trong bài báo này). Phần đoạn có kích thước khoảng 2 kb tiếp tục được dùng để tách thành công trong vector pBT. 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. Các trình tự gen thu nhận được sau khi xử lý bằng các phần mềm máy tính chuyên dụng được so sánh trong BLAST/NCBI đã cho thấy các phân đoạn thu được của các thể phân lập nghiên cứu đều thuộc virus

CMV. Trình tự gen mã hóa cho protein MP, CP của của từng thể phân lập được xác định với kích thước tương ứng là 840, 657 bp. Các trình tự này đã được đăng ký trong Ngân hàng dữ liệu gen với mã số được thể hiện trong Bảng 1.



Hình 1. Hình ảnh điện di sản phẩm RT-PCR của các thể phân lập nghiên cứu. M Thang ADN 1kb chuẩn (Fermentas)

Phân tích trình tự

Phân tích trình tự cả ở gen MP và CP, đều cho thấy độ tương đồng về trình tự nucleotide và amino acid khi so sánh các thể phân lập nghiên cứu với các chủng/thể phân lập thuộc CMV là khá cao (71,9-99,8%) và so với một thể phân lập PSV cả ở gen MP và CP là rất thấp (55,2-64,6%). Điều này, chứng tỏ các thể phân lập nghiên cứu không phải là PSV mà là CMV.

Bảng 3. So sánh độ tương đồng trình tự nucleotide gen MP 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			
	Gen MP		Gen CP	
	Thể phân lập virus (mã số trong Ngân hàng dữ liệu gen)	Độ tương đồng (%)	Thể phân lập virus (mã số trong Ngân hàng dữ liệu gen)	Độ tương đồng (%)
VN-Cao bang	CMV-ND2 (EU414789)	97,0	CMV-Ag (EF424775)	96,5
VN-Bavi	Ixora (J20219)	94,5	aP81 (AB250962)	97,3
VN-Tay Ninh	CLW2 (JN054635)	97,7	A27 (FN552545)	98,9
VN-Gialai	CTL (EF213025)	97,5	CTL (EF213025)	97,5
VN- Tiengiang	CLW2 (JN054635)	97,5	A27 (FN552545)	98,8

Cụ thể, phân tích trình tự gen MP của các thể phân lập nghiên cứu cho thấy chúng có độ tương đồng ở mức độ nucleotide từ 91,3 -99,8% so với nhau; từ 90,7-97,7%so với các chủng CMV đại diện subgroup I; từ 77,0-79,5% so với các chủng CMV đại diện subgroup II. Điều này đã chứng tỏ các thể phân lập nghiên cứu thuộc subgroup I. Trong đó, các thể phân lập nghiên cứu có độ tương đồng gần nhất (94,6-97,7%) so với các chủng/thể phân lập thuộc subgroup IB đã công bố trên Ngân hàng dữ liệu gen (Bảng 3). Vì vậy, dựa vào so sánh trình tự gen mã hóa protein MP có thể kết luận các thể phân lập nghiên cứu thuộc subgroup IB

Tương tự, phân tích trình tự gen CP của các thể phân lập nghiên cứu cho thấy chúng có độ tương đồng ở mức độ nucleotide từ 92,5-99,5% so với nhau; từ 90,9-98,9% so với các chủng CMV đại diện subgroup I; từ 76,0-78,0% so với các chủng CMV đại diện subgroup II. Điều này cũng chứng tỏ các thể phân lập nghiên cứu thuộc subgroup I. Trong đó, các thể phân lập nghiên cứu có độ tương đồng gần nhất (96,5-98,9%) so với các chủng/thể phân lập thuộc subgroup IB đã công bố trên Ngân hàng dữ liệu gen (Bảng 3). Như vậy, độ tương đồng cao về trình tự của CMV nghiên cứu so với các chủng CMV subgroup IB đã chứng tỏ chúng có chung một nguồn gốc. Mặc dù, có sự khác nhau về khu vực địa lý và cây chủ nhưng các đoạn gen được phân lập có sự khác nhau không đáng kể.

So sánh trình tự gen MP và CP của các thể phân lập nghiên cứu với nhau cho thấy thể phân lập VN-Gialai có độ tương đồng so với thể phân lập CMV Miền Bắc (93,5-94,2% gen MP và 94,2-95,7% gen CP VN-Bavi và VN-Cao bang) cao hơn thể phân lập CMV subgroup IB đã chứng tỏ chúng có chung một nguồn gốc. Mặc dù chúng ở hai khu vực Bắc và Nam Việt Nam rất khác xa nhau về mặt địa lý.

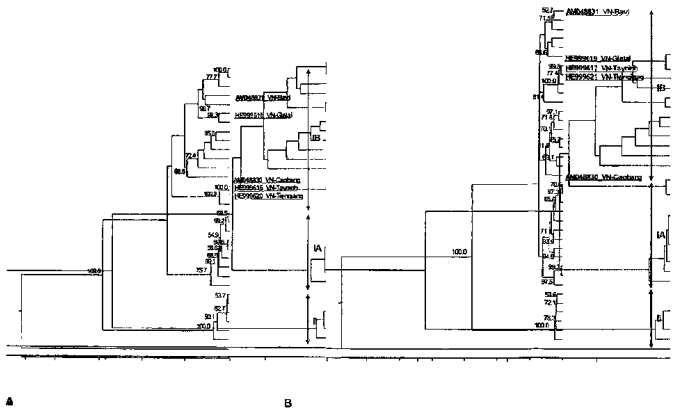
Phân tích độ tương đồng trên cũng tương thích với sự phân tích cây phân loại dựa vào trình tự cũng như trình tự amino acid của gen MP và CP cho thấy các thể phân lập nghiên cứu đều nằm trong một nhánh của nhóm CMV subgroup IB, và khác xa so với PSV (Hình 2A, B).

THẢO LUẬN

Bảng việc sử dụng kỹ thuật RT-PCR và xác định trình tự trên máy đọc tự động, cũng như BLASTn/NCBI đã xác định chính xác virus phân lập được là CMV. Phân tích trình tự ở cả gen MP và CP đều cho thấy các thể phân lập nghiên cứu

thuộc CMV subgroup IB. Điều này cũng đúng với những nghiên cứu khác cho rằng CMV ở Châu Á chủ yếu thuộc nhóm IB (Roossinck, 2002).

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 (Sacristan *et al.*, 2005). Những nghiên cứu về quần thể gần đây của virus thực vật đã cho thấy rằng mức độ biến đổi của chúng phụ thuộc vào sự tương tác giữa vật chủ và virus. Khả năng CMV thích nghi nhanh chóng với môi trường mới và vật chủ mới tỷ lệ với tốc độ tiến hóa. Sự tái tổ hợp và sự sắp xếp đóng một vai trò quan trọng trong sự tiến hóa CMV. Và trong một số trường hợp, sự tái tổ hợp ở RNA3 xảy ra thường xuyên hơn ở RNA1 và 2 (Roossinck, 2002). Trong nghiên cứu này, các thể phân lập CMV Việt Nam tuy có chung nguồn gốc CMV subgroup IB trên cây phân loại, nhưng sự khác nhau di truyền về gen MP và CP là hoàn toàn ngẫu nhiên, không phụ thuộc vào khu vực địa lý, thời gian thu mẫu và cây chủ. Mặc dù vậy, đối với các thể phân lập Miền Nam Việt Nam trong nghiên cứu, sự xuất hiện thêm một phân đoạn 1,5 kb (đoạn gen trên RNA1 của CMV) trong phản ứng RT-PCR bằng cặp mồi CMV-F1/R1 đã chứng tỏ có sự tái tổ hợp giữa RNA1 và RNA3 (Phạm Thị Vân *et al.*, 2013). Sự biến đổi này phải chăng đã giúp cho virus thích nghi được với những điều kiện môi trường khác nhau.



Hình 2. Cây phát sinh chủng loại dựa vào trình tự nucleotide gen MP (A) và CP (B) của CMV. Các thể phân lập nghiên cứu được so sánh với các thể phân lập đại diện một số chủng CMV đã công bố trong Ngân hàng dữ liệu gen (Bảng 2). Những giá trị bootstrap lớn hơn 50% mới được biểu diễn trên hình. IA, IB và II tương ứng là ký hiệu của các CMV subgroup I, IA, IB và II.

Gen CP của CMV đóng một vai trò cần thiết trong sự di chuyển virus, vector truyền bệnh và sự phân hóa triệu chứng (Callaway *et al.*, 2001), trong nhiều trường hợp, một amino acid trên protein CP của CMV có thể xác định triệu chứng trên *Nicotiana glutinosa* (Szilassy *et al.*, 1999) và những vị trí đặc biệt trên gen CP của virus CMV có thể ảnh hưởng tới sự di chuyển của nó trong cây bầu bí (Wong *et al.*, 1999). Gen CP của CMV cũng biểu hiện sự tiến hóa nhanh hơn so với các thành phần của các ORF khác của CMV (Roossinck, 2002). Theo nghiên cứu của Szilassy và cộng sự, sự thay thế amino acid ở vị trí 193 trên protein CP của CMV chủng Trk7 (subgroup II) từ amino acid Lys thành Asn hoặc Ser có thể làm thay đổi triệu chứng bệnh trên cây chủ từ khảm xanh thành còi cọc và ngược lại với chủng R (subgroup II). Trong nghiên cứu này, các thể phân lập nghiên cứu (subgroup IB) có vị trí amino acid 193 trên protein CP là Asn nhưng lại cho kết quả ngược với nghiên cứu của Szilassy, đó là triệu chứng khảm xanh lần còi cọc trên cây thuốc lá *Nicotiana tabacum* L.. Phải chăng sự khác nhau này là do chúng thuộc các subgroup khác nhau. Tuy nhiên, để có kết luận chính xác hơn, cần phải có những nghiên cứu sâu hơn nữa.

Các thể phân lập cucumovirus khác nhau đã được phân loại dựa trên trình tự RNA3, ví dụ CMV (Deyong *et al.*, 2005). Vì vậy, các thể phân lập của chúng tôi có thể được sử dụng để lập nhóm cho cucumovirus mới khám phá dựa trên dữ liệu trình tự gen.

KẾT LUẬN

Sử dụng kỹ thuật RT-PCR đã xác định được năm mẫu thuốc lá thu tại Hà Nội, Cao Bằng, Tây Ninh, Gia Lai và Tiền Giang nhiễm CMV.

Đã tách dòng và xác định thành công trình tự gen mã hoá cho protein MP, CP của các thể phân lập với kích thước song ứng là 840, 857 nucleotide. Các trình tự này đã được đăng ký trong Ngân hàng dữ liệu gen với mã số AM048830

(thể phân lập VN-Caobang), AM048831 (thể phân lập VN-Hatay), HE999616 và HE999617 (thể phân lập VN-Tayninh), HE999618 và HE999619 (thể phân lập VN-Gialai), HE999620 and HE999621 (thể phân lập VN-Tiengiang)

Phân tích cây phát sinh chủng loại và độ tương đồng về trình tự nucleotide gen MP và CP chứng tỏ các thể phân lập nghiên cứu thuộc CMV subgroup IB.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Brigneti GO, Voinnet WX, Li LH, Ji SW, Ding and Baulcombe DC (1996). Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*. *EMBL J* 17: 6739-6746.
- Callaway A, Giesman-Cookmeyer D, Gillok ET, Sit TL, Lommel SA (2001). The multifunctional capsid proteins of plant RNA virus *Ann Rev Phytopathol*. 39:419-460.
- Deyong Z, Willingmann P, Heinze C, Adam G, Pfunder M, Frey B and Frey JE (2005). Differentiation of *Cucumber mosaic virus* isolates by hybridization to oligonucleotides in a microarray format. *J Virol Methods* 123: 101-108
- Ding SW, Anderson BJ, Haase HR and Symons RH (1994). New overlapping gene encoded by the cucumber mosaic virus genome. *Virology* 198(2): 593-601.
- Hu JS, Li HP, Barry K, Wang M and Jordan R (1995) Comparison of dot blot ELISA and RT-PCR assays for detection of two *Cucumber mosaic virus* isolates infecting banana in Hawaii *Plant Dis* 79: 902-206
- Owens J and Palukaitis P (1996). Characterization of *Cucumber mosaic virus* Molecular heterogeneity mapping of RNA 3 in eight CMV strains *Virology* 69: 496-502.
- Owens J, Shintaku M, Aeschelmann P, Tahar SF and Palukaitis P (1990). Nucleotide sequence and evolutionary relationships of *Cucumber mosaic virus* (CMV) strains, *CMV RNA* 3. *J Gen Virol* 71: 2243-2249
- Palukaitis P, Roossinck MJ, Dietzgen RG and Francki RB (1992) *Cucumber mosaic virus*. *Adv Virus Res* 41. 281-348
- Pham Thi Vân, Lê Văn Sơn, Phạm Bích Ngọc, Chu Hoàng Hà (2013). Xác định virus gây bệnh khảm dưa chuột (*Cucumber mosaic virus*) trên cây thuốc lá tại Tây Ninh và Gia Lai thông qua tách dòng và giải trình tự gen mã hóa protein 3a, CP và RdRp thành phần Hội thảo quốc gia Bệnh hại thực vật Việt Nam lần thứ 12 tại Trường Đại học Vinh 20-21/07/2013. *NXB Nông nghiệp* 50-59.
- Phạm Thị Vân, Lê Văn Sơn, Phạm Bích Ngọc, Chu Hoàng Hà (2005). Sử dụng enzyme XcmI để thiết kế 1-vector pB1 phục vụ tách và giải trình tự gen. *Tạp chí Công nghệ sinh học* 3(4): 459-483.
- Roossinck MJ (2002) Evolutionary history of *Cucumber mosaic virus* deduced by phylogenetic analyses. *J Virol* 76(7): 3382-3387
- Sacristan S, Faile A, Malpica J M, Garcia-Arenal F (2005). An analysis of host adaptation and its relationship with virulence in *Cucumber mosaic virus*. *Phytopathology* 95: 827-833.
- Schneider WL and Roossinck MJ (2001). Genetic diversity in RNA viral quaspecies is controlled by host-virus interactions. *J Virol* 75(14) 6566-6571
- Slaier MM, Cillo F, Barbarossa J and Gallitelli D (1999) Differentiation of *Cucumber mosaic virus* subgroups by RT-PCR RFLP. *J Plant Pathol* 81(2): 145-148.
- Szalszy D, Salanki K, Balazs E (1999). Stunting induced by cucumber mosaic cucumovirus-infected *Nicotiana glutinosa* is determined by a single amino acid residue in the coat protein. *Mol Plant Microbe interact* 12(2): 1105-1113
- Wong S-M, Swee-Chin TS, Shintaku MH and Palukaitis P (1999). The rate of cell-to-cell movement in squash of cucumber mosaic virus is affected by sequences of the capsid protein. *Molecular Plant Microbe Interactions* 12(7): 626-632.

GENETIC DIVERSITY OF CUCUMBER MOSAIC VIRUS ON TOBACCO FROM VIETNAM BY CLONING AND SEQUENCING OF GENES ENCODING MP DNA CP PROTEIN

Pham Thi Van*, Pham Bích Ngọc, Lê Văn Sơn, Chu Hoàng Hà
Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology

SUMMARY

DNA fragments containing movement protein (MP) and coat protein (CP) of *Cucumber mosaic virus* (CMV) on tobacco which were collected from some provinces (Caobang, Hanoi, Gialai, Tiengiang and Tayninh) in Vietnam have been cloned, sequenced and analysed by RT-PCR (Reverse transcriptase polymerase chain reaction). The sequences of these two fragments have been registered in GenBank as accessions AM048830 (for VN-Caobang isolate), AM048831 (for VN-Hatay isolate), HE999616 and HE999617 (for VN-Tayninh isolate), HE999618 and HE999619 (for VN-Gialai isolate), HE999620 and HE999621 (for VN-Tiengiang isolate). The identities between these isolates in nucleotide level of MP and CP genes are 91,3-99,8% and 92,5-99,5%, respectively. On the basis of sequence identity and phylogenetic analysis of nucleotide sequence of MP and CP genes revealed that these CMV isolates belong to subgroup IB.

Key words: *Cucumber mosaic virus*, movement protein, coat protein, RT-PCR, Phylogenetic analysis.

*Author for correspondence: pvan_bic@yahoo.com