

# ỨNG DỤNG SINH HỌC PHÂN TỬ TRONG ĐỊNH DANH TÁC NHÂN VI RÚT GÂY BỆNH ĐEN THÂN TRÊN CÁ RỒ ĐỒNG (*ANABAS TESTUDINEUS*)

Đặng Thị Lụa<sup>1</sup> và Phan Thị Văn<sup>1</sup>

## TÓM TẮT

Bệnh đen thân trên cá rô đồng thường gây tỷ lệ chết cho cá từ 40% đến 100% nên bệnh đã và đang là một trong những nguyên nhân chính ảnh hưởng đến nghề nuôi thâm canh đối tượng cá này ở nước ta. Trong nghiên cứu trước, bằng việc ứng dụng kỹ thuật kính hiển vi điện tử, tác nhân gây bệnh đã được xác định là vi rút có dạng hình cầu đối xứng với lớp vỏ capsid (vỏ protein - lớp vỏ protein bên ngoài của vi rút) bao quanh và đường kính khoảng 150-160 nm, ký sinh trong tế bào chất của tế bào ký chủ. Trong nghiên cứu này, với việc thiết kế cặp mồi (primer) có trình tự nucleotit tương tự cặp mồi đặc hiệu đối với gen MCP (Major Capsid Protein) của RSIV (Red seabream *iridovirus*), sản phẩm PCR cho kết quả dương tính với các mẫu ADN tách triết từ gan và thận của cá rô đồng bị bệnh đen thân nhiễm ngoài thực địa và cá rô đồng nhiễm bệnh đen thân trong gây bệnh thực nghiệm. Bằng việc xây dựng cây hệ phát sinh loài dựa trên trình tự nucleotit của gen MCP, đã xác định vị trí phân loại vi rút gây bệnh đen thân thuộc giống *Megalocytivirus*, họ *Iridoviridae* và được đặt tên là ATTIV (*Anabas testudineus iridovirus*). Kết quả nghiên cứu cũng cho thấy gan và thận của cá rô đồng là hai cơ quan chủ yếu để thu mẫu chẩn đoán nhanh bệnh đen thân sử dụng kỹ thuật PCR như được miêu tả trong bài báo này.

Từ khóa: Bệnh đen thân, cá rô đồng, *Anabas testudineus*, *Iridovirus*, *Megalocytivirus*, *Iridoviridae*.

## 1. MỞ ĐẦU

Cá rô đồng *Anabas testudineus* (Bloch, 1792) đã và đang được nuôi thâm canh ở một số tỉnh phía Bắc như Hải Dương, Bắc Giang và một số tỉnh/thành phía Nam như Hậu Giang, Đồng Tháp, Bạc Liêu và Cần Thơ. Cũng như một số đối tượng cá nuôi khác, cá rô đồng nuôi theo mô hình thâm canh có sử dụng thức ăn công nghiệp và nuôi với mật độ dày nên việc phát sinh bệnh là không thể tránh khỏi. Bệnh đen thân là một hiện tượng bệnh được cho là nghiêm trọng ở cá rô đồng nuôi thâm canh do có thể gây chết rất nhiều cá trong ao. Cá bị bệnh có biểu hiện đen thân nổi lên mặt nước 1-2 ngày sau thì chết, vì thế nên người nuôi gọi là bệnh đen thân. Bệnh xảy ra không mang tính chất mùa vụ, xảy ra quanh năm thường ở giai đoạn đầu của chu kỳ nuôi, trong khoảng thời gian cao từ 30 đến khoảng 60 ngày tuổi. Tỷ lệ thiệt hại do bệnh đen thân gây ra 40% - 100% (Đặng Thị Lụa et al., 2013a, 2013b).

Với việc ứng dụng kỹ thuật kính hiển vi điện tử và gây nhiễm thực nghiệm cho cá rô đồng khỏe bằng dịch lọc gan và dịch lọc thận thu từ cá bệnh, bệnh đen thân được xác định do tác nhân vi rút gây ra. Vi rút gây bệnh đen thân có dạng hình cầu đối xứng, đường kính khoảng 150-160 nm với lớp vỏ capsid (vỏ

protein) bao ngoài và ký sinh trong tế bào gan và tế bào thận của tế bào ký chủ (Đặng Thị Lụa et al., 2013b). Trong nghiên cứu này kỹ thuật sinh học phân tử được ứng dụng để khẳng định sự có mặt của vi rút trong tổ chức gan và thận cá bệnh đen thân, đồng thời định danh vi rút gây bệnh dựa trên phương pháp xây dựng cây hệ phát sinh loài.

## 2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Vật liệu nghiên cứu

Vật liệu dùng trong nghiên cứu sinh học phân tử là ADN được tách triết từ các cơ quan gan, thận và não của cá rô đồng. Gan, thận và não được thu từ cá rô đồng bị bệnh đen thân và cá rô đồng đối chứng khỏe không có dấu hiệu bất thường thu tại các vùng nuôi cá rô đồng thâm canh thuộc khu vực miền Bắc (Hải Dương, Bắc Giang) và khu vực miền Nam (Hậu Giang, Đồng Tháp và Bạc Liêu) trong hai năm 2012, 2013 và có định trong cồn 99° để làm vật liệu cho kỹ thuật PCR. Đồng thời, các cơ quan gan, thận và não cũng được thu từ cá rô đồng có biểu hiện đen thân trong các thí nghiệm gây nhiễm thực nghiệm trong phòng thí nghiệm bằng dịch lọc tách triết từ gan và thận của cá rô đồng bị bệnh đen thân thu ngoài thực địa.

### 2.2. Thiết kế mồi primer cho kỹ thuật PCR

Ba (3) cặp mồi primer được thiết kế và sử dụng trong nghiên cứu này (bảng 1). Cặp mồi thứ nhất,

<sup>1</sup> Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản I

MCP1, được thiết kế tương tự cấp mỗi đã được thiết kế bởi Dang et al. (2008) khuếch đại đặc hiệu đoạn gen MCP (Major Capsid Protein) 429 bp của RSIV (Red seabream *iridovirus*). Cấp mỗi thứ hai, MCP2, được

thiết kế dựa trên chiều dài gen MCP 1362 bp của RSIV từ vị trí nucleotit 91 đến vị trí nucleotit thứ 1076. Cấp mỗi thứ 3,  $\beta$ -actin, được thiết kế khuếch đại đoạn gen 200 bp của gen Housekeeping (gen  $\beta$ -actin).

Bảng 1. Các cấp mỗi sử dụng trong nghiên cứu

Mỗi	Trình tự cấp mỗi	Sản phẩm PCR	Nguồn
MCP1	F 5'-CCCTATCAAAAACAGACTGGC-3'	429 bp	Dang et al., 2008
	R 5'-TCATTGTACGGCAGAGACAC-3'		
MCP2	F 5'-AATGCCGTGACCTACTTTGC-3'	986 bp	Thiết kế trong nghiên cứu này
	R 5'-TCGACAGATGTGAAGTAGTCTA-3'		
B-actin	F 5'-TTTCCCTCCATTGTTGGTTCG-3'	200 bp	Dang et al., 2008
	R 5'-GCGACTCTCAGCTCGTTGTA-3'		

Cấp mỗi MCP1 được sử dụng với mục đích nhận biết sự có mặt của vi rút trong các mẫu cá bị bệnh đen thân. Cấp mỗi MCP2 được sử dụng với mục đích khuếch đại đoạn gen MCP 986 bp để dùng trong việc xây dựng cây phả hệ phát sinh loài của vi rút gây bệnh đen thân. Cấp mỗi  $\beta$ -actin được sử dụng với mục đích đối chứng để đảm bảo vật liệu ADN dùng trong phản ứng PCR được tách triết từ cá.

### 2.3. Kỹ thuật PCR

ADN được tách chiết từ mẫu gan, thận và não cá đã cố định trong cồn như miêu tả trong mục 2.1 theo phương pháp của Green và Sambrook (2012) và dùng làm vật liệu cho phản ứng PCR sử dụng các cấp mỗi MCP1, MCP2 và enzym xúc tác Ex Taq ADN polymeraza (Takara, Nhật Bản). Chu kỳ nhiệt của phản ứng PCR được áp dụng như sau: giai đoạn tiền biến tính ở 95°C trong 5 phút, theo sau với 35 chu kỳ nhiệt gồm giai đoạn biến tính trong 1 phút ở 95°C, giai đoạn bắt cặp trong 30 giây ở 55°C và giai đoạn tổng hợp trong 30 giây ở 72°C, và kết thúc với một giai đoạn kéo dài trong 5 phút ở 72°C. Sản phẩm PCR được điện di trên thạch agarosa 1% trong dung dịch 1X TAE và đọc kết quả dưới ánh sáng đèn UV. Ngoài ra, ADN tách triết từ lách của cá tráp đỏ (*Pangrus major*) nhiễm RSIV được dùng trong phân tích PCR như mẫu đối chứng dương. Phản ứng PCR sử dụng cấp mỗi  $\beta$ -actin cũng được tiến hành song song để khuếch đại đoạn gen 200 bp của gen nội chuẩn  $\beta$ -actin nhằm mục đích đánh giá chất lượng của ADN dùng làm vật liệu phân tích PCR.

### 2.4. Giải trình tự gen so sánh

Sản phẩm PCR dương tính từ phản ứng PCR sử dụng cấp mỗi MCP1 (gọi MCP1 ADN) và phản ứng PCR sử dụng cấp mỗi MCP2 (gọi MCP2 ADN) được

gắn vào pGEM-T easy vector (Promega, Madison, USA) và biến nạp vào component cells (cá tế bào cấu thành) (*E.coli* MJ 109. Plasmid có chứa MCP1 ADN hoặc MCP2 ADN trong vector T được giải trình tự bằng máy sequencer sử dụng Big Bye Terminator. Trình tự nucleotit của đoạn gen MCP1 ADN và MCP2 ADN được Blast trên ngân hàng gen NCBI sử dụng Blastx trong chương trình BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) để so sánh với các trình tự nucleotit đã được đăng ký trên ngân hàng gen. Trình tự nucleotit của MCP2 ADN (986 bp) được đăng ký trên ngân hàng dữ liệu ADN của Nhật Bản DDBJ (DNA Data Bank of Japan) và được sử dụng để xây dựng cây phả hệ phát sinh loài của vi rút gây bệnh đen thân.

### 2.5. Xây dựng cây phả hệ phát sinh loài

Cây phả hệ phát sinh loài được xây dựng dựa trên việc so sánh trình tự đoạn gen MCP 986 bp của vi rút gây bệnh đen thân (ATIV, *Anabas testudineus iridovirus*) với gen MCP của 10 loài vi rút gây bệnh khác thuộc 5 giống của họ *Iridoviridae* theo phương pháp Neighbour Joining trong phần mềm MEGA 6 với độ tin cậy phân nhánh thu được với 1000 lần lặp lại (bootstrap 1000X). Mã số Genbank của các gen MCP của 10 vi rút dùng trong xây dựng cây phả hệ phát sinh loài là: FV3 (Frog virus 3, FJ459783.1), GIV (Grouper *iridovirus*, JF264365.1), IIV-9 (Invertebrate iridescent virus 9, AF025774.1), IIV-31 (Invertebrate iridescent virus 31, AB686463.1), IIV-3 (Invertebrate iridescent virus 3, NC008187.1), LCDV1-RC (*Lymphocystis disease virus 1*, China strain, EF103188.1), LCDV1 (AY823414.1), DGIV (Dwarf gourami *iridovirus*, AB109369.1), RBIV (Rock bream *iridovirus*, HQ105005.1) và RSIV (AB109371.1).

**2. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

**3.1. PCR xác định sự có mặt của vi rút gây bệnh đen thân trên cá rô đồng**

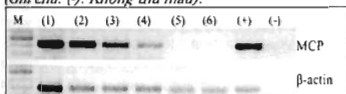
Với việc sử dụng cặp mồi MCP1 để xác định sự có mặt của vi rút trong mẫu bệnh phẩm, sản phẩm PCR duy nhất với kích thước trên 400 bp (429 bp

theo thiết kế) đã quan sát thấy ở những mẫu sử dụng ADN tách chiết từ gan và thận của cá rô đồng bị bệnh đen thân trong khi đó kết quả PCR âm tính đối với các mẫu sử dụng ADN tách chiết từ não của cá bị bệnh đen thân hoặc từ ADN tách chiết từ mô cá khỏe đối chứng (Bảng 2 và hình 1).

**Bảng 2. Kết quả PCR xác định sự có mặt của vi rút gây bệnh đen thân trên cá rô đồng**

Địa điểm (năm) thu mẫu	Mẫu cá	Gan		Thận		Não	
		N	PCR (+)	N	PCR (+)	N	PCR (+)
Hải Dương (2012)	Cá đen thân	12	10/12			12	0/12
Hải Dương (2012)	Cá đen thân	15	11/15	-	-	15	0/15
Hải Dương (2012)	Cá đen thân	15	5/15	15	5/15		
Hải Dương (2012)	Cá đen thân	19	4/19			-	-
Bắc Giang (2012)	Cá đen thân	18	13/18		-	18	0/18
Bắc Giang (2012)	Cá đen thân	18	6/18	-	-	18	0/18
Hậu Giang (2012)	Cá đen thân	5	5/5				
Hậu Giang (2012)	Cá đen thân	5	2/5	-	-	-	-
Hậu Giang (2012)	Cá đen thân	5	3/5	-	-	-	-
Hậu Giang (2013)	Cá đen thân	7	3/7	7	4/7	7	0/7
Hậu Giang (2013)	Cá đen thân	7	2/7	7	3/7	7	0/7
Bạc Liêu (2012)	Cá đen thân	9	3/9	9	3/9	9	0/9
Đồng Tháp (2012)	Cá đen thân	20	8/20	20	8/20	20	0/20
Đồng Tháp (2013)	Cá đen thân	5	3/5	5	3/5	-	-
Đối chứng	Cá bình thường	15	0/15	15	0/15	15	0/15

(Ghi chú: (-): Không thu mẫu).

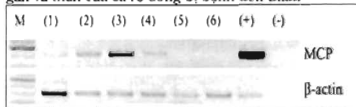


**Hình 1. Kết quả phân tích PCR của gen MCP của vi rút gây bệnh đen thân trên cá rô đồng.**

(1) và (2): ADN tách chiết từ gan cá bị bệnh đen thân; (3) và (4): ADN tách chiết từ thận cá rô đồng bị bệnh đen thân; (5) ADN tách chiết từ gan cá khỏe đối chứng; (6) ADN tách chiết từ thận cá khỏe đối chứng; (+) ADN tách chiết từ lách cá trap đó nhiễm RSIV (Đối chứng dương); (-) Nước cất (không ADN).

Phân tích PCR đối với các ADN tách chiết từ gan và thận cá rô đồng bị bệnh đen thân thu ngoài thực địa đã cho kết quả dương tính ở tất cả các đợt thu mẫu cá bệnh đen thân tại khu vực miền Bắc cũng như khu vực miền Nam, thậm chí có trường hợp PCR cho kết quả dương tính với 100% mẫu kiểm tra (Bảng 2). Phân tích PCR đối với ADN tách chiết từ gan và thận cá rô đồng bị bệnh đen thân do gây nhiễm thực nghiệm cũng cho kết quả dương tính (Hình 2). Kết quả dương tính với các mẫu PCR sử dụng cặp mồi β-

actin đã khẳng định kỹ thuật tách chiết đảm bảo ADN được tách chiết từ các tổ chức mô của cá (Hình 1 và 2). Như vậy, kết quả PCR với cặp mồi MCP1 đã khẳng định sự có mặt của ADN vi rút trong tổ chức gan và thận của cá rô đồng bị bệnh đen thân.



**Hình 2. Kết quả phân tích PCR của gen MCP của vi rút gây bệnh đen thân trên cá rô đồng bị bệnh đen thân trong gây nhiễm thực nghiệm.**

(1) và (2): ADN tách chiết từ gan cá bị bệnh đen thân gây nhiễm thực nghiệm; (3) và (4): ADN tách chiết từ thận cá rô đồng bị bệnh đen thân gây nhiễm thực nghiệm; (5) ADN tách chiết từ gan cá khỏe nhiễm thực đối chứng trong gây nhiễm thực nghiệm; (6) ADN tách chiết từ thận cá rô đồng khỏe nhiễm thực đối chứng trong gây nhiễm thực nghiệm; (+) ADN tách chiết từ lách cá trap đó nhiễm RSIV (Đối chứng dương); (-) Nước cất (không ADN)

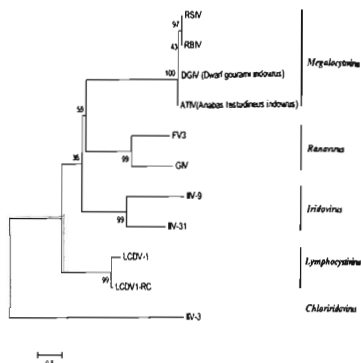
MCP là một protein vỏ, chiếm khoảng 45% tổng số protein của các hạt vi rút thuộc họ *Iridoviridae* và đây là một protein quan trọng tham gia vào quá trình phân chia và sắp xếp vật chất di truyền ADN của vi rút để tạo thành hạt vi rút hoàn chỉnh (Williams, 1996). MCP đã và đang được ứng dụng rộng rãi trong việc xác định và nhận biết vi rút thuộc họ *Iridoviridae* (Caipang et al., 2003; Dang et al., 2007; Dang et al., 2008). Trong nghiên cứu này, với việc sử dụng cặp mới MCP1 có trình tự nucleotit được thiết kế tương tự trình tự nucleotit của cặp mới khuếch đại đặc hiệu đoạn gen MCP của RSIV (Dang et al., 2008), sản phẩm PCR dương tính đã thu được từ các mẫu ADN tách triết từ gan và thận của cá rô đồng bị bệnh đen thân thu ngoài thực địa cũng như trong gây nhiễm thực nghiệm (Hình 1 và hình 2). Theo Đặng Thị Lua et al. (2013b), bệnh đen thân trên cá rô đồng được xác định là do vi rút gây ra và vi rút ký sinh trong tế bào chất của tế bào gan và thận của ký chủ. Ở nghiên cứu này, kết quả phân tích PCR đã khẳng định sự có mặt của ADN vi rút trong tổ chức gan và thận của cá rô đồng bị bệnh đen thân. Như vậy, có thể kết luận vi rút gây bệnh đen thân là ADN vi rút có chứa gen MCP của vi rút thuộc họ *Iridoviridae* và trong nghiên cứu này vi rút được đặt tên là ATTIV (*Anabas testudineus iridovirus*). Cũng từ kết quả phân tích này có thể rút ra kết luận gan cá và thận cá là hai cơ quan phù hợp để thu mẫu chẩn đoán bệnh đen thân sử dụng kỹ thuật PCR như được miêu tả trong nghiên cứu này.

### 3.2. So sánh trình tự gen của vi rút gây bệnh đen thân với ngân hàng Genbank

Kết quả so sánh trình tự gen đã cho thấy đoạn ADN tách triết từ gan và thận cá rô đồng bị bệnh đen thân đã tương đồng với gen MCP của vi rút thuộc họ *Iridoviridae*, điển hình từ kết quả Blast là sự tương đồng 99-100% với RSIV, RBIV, và DGIV. Trình tự nucleotit của đoạn ADN tách triết bằng cặp mới MCP2 (986 bp) đã được đăng ký trên ngân hàng dữ liệu ADN của Nhật Bản DDBJ (DNA Data Bank of Japan) với số đăng ký Accession No. là AB930172 (EntryID: 535710d1d25b2c5e920000bf.MCP). Như vậy kết quả so sánh trình tự gen MCP của ATTIV khẳng định vi rút gây bệnh đen thân tương đồng với một số vi rút gây bệnh khác thuộc họ *Iridoviridae*.

### 3.3. Cây phả hệ phát sinh loài của vi rút gây bệnh đen thân ATTIV

Đoạn gen MCP 986 bp của ATTIV (Accession No.: AB930172) được sử dụng để xây dựng cây phả hệ phát sinh loài (Hình 3).



Hình 3. Cây phả hệ phát sinh loài của vi rút ATTIV gây bệnh đen thân trên cá rô đồng

Theo Williams et al. (2005), họ *Iridoviridae* được phân loại bao gồm có 5 giống vi rút dựa trên hình dạng, kích thước vi rút, ký chủ ký sinh, sự có mặt của gen ADN methyltransferaza, tỷ lệ GC trong hệ gen, sự tương đồng của gen MCP, dấu hiệu bệnh lý và sự ký sinh của vi rút trong tế bào chất của tế bào ký chủ. Trong số 5 giống vi rút này, 2 giống *Iridovirus* và *Chloriridovirus* thường ký sinh và gây bệnh trên động vật không xương sống (như côn trùng) trong khi 3 giống còn lại bao gồm *Ranavirus*, *Megalocytivirus* và *Lymphocystivirus* thường ký sinh và gây bệnh trên động vật có xương sống máu lạnh trong đó có lưỡng cư và cá (Williams et al., 2005). Trình tự nối tiếp (sequence) của gen MCP cũng thường được ứng dụng trong xây dựng cây phả hệ phát sinh loài của vi rút thuộc họ *Iridoviridae* (Huang et al., 2009; Imajoh et al., 2007; Kvitt et al., 2008). Thực tế, trong nghiên cứu này, dựa trên sự tương đồng của gen MCP, cây phát sinh loài (Hình 3) cũng đã nhóm các vi rút gây bệnh thuộc họ *Iridoviridae* thành 5 nhóm tương ứng với 5 giống. Nhóm thứ nhất bao gồm vi rút IIV-3, đây là những vi rút được phân loại thuộc giống *Chloriridovirus* (Delhon et al., 2006). Nhóm thứ hai bao gồm vi rút IIV-9 và IIV-31, đây là vi rút được phân loại thuộc giống *Iridovirus* (Wong et al., 2011; Chinchar et al., 2005). Nhóm thứ

3 bao gồm vi rút LCDV-1 và LCDV1-RC, đây là những vi rút được phân loại thuộc giống *Lymphocystivirus* (Tidona và Darai, 1997; Zhang et al., 2004). Nhóm thứ tư bao gồm FV3 và GIF, đây là những vi rút được phân loại thuộc giống *Ranavirus* (Tan et al., 2004; Tsai et al., 2005). Nhóm thứ năm bao gồm những vi rút thuộc giống *Megalocytivirus* như RSIV, RBIV, DGIV và ATTV đã được nhóm vào nhóm này. Cũng từ cây phả hệ phát sinh loài cho thấy, nhóm thứ 5 giống như được phân làm 2 nhánh nhỏ (sub-genus), trong đó một nhánh gồm RSIV với RBIV và một nhánh gồm DGIV với ATTV. Trong nhánh thứ nhất, RSIV gây bệnh trên cá tráp đỏ (*Pangrus major*) nuôi biển (Kurita et al., 2002), còn RBIV gây bệnh trên cá tráp đá (*Oplegnathus fasciatus*) nuôi biển (Do et al., 2004). Trong nhánh thứ hai, DGIV gây bệnh trên cá sặc gấm (*Colisa lalia*) (Go et al., 2006), còn ATTV được xác định là tác nhân gây bệnh trên cá rô đồng trong nghiên cứu này. Như vậy, cây phả hệ phát sinh loài dựa trên sự tương đồng trình tự nucleotit của gen MCP đã nhóm vi rút gây bệnh đen thân trên cá rô đồng, ATTV, vào giống *Megalocytivirus* trong họ *Iridoviridae*.

#### 4. KẾT LUẬN

Với việc ứng dụng kỹ thuật sinh học phân tử, vi rút gây bệnh đen thân trên cá rô đồng ATTV được phân loại thuộc giống *Megalocytivirus*, họ *Iridoviridae*. ATTV có thể được chẩn đoán nhanh và sớm bằng kỹ thuật PCR sử dụng cặp mồi khuếch đại 429 bp của gen MCP được trình bày trong nghiên cứu này, đồng thời gan cá và thận cá là hai cơ quan thích hợp để thu mẫu cho chẩn đoán bằng kỹ thuật PCR.

#### LỜI CẢM ƠN

Các nội dung nghiên cứu trong báo cáo này được thực hiện từ nguồn kinh phí của đề tài cấp Bộ: "Nghiên cứu bệnh đen thân trên cá rô đồng (*Anabas testudineus*) nuôi thâm canh và biện pháp phòng trị" do Tổng cục Thủy sản, Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn quản lý. Nhóm tác giả xin trân trọng cảm ơn tập thể cán bộ Trung tâm Nghiên cứu quan trắc, Cảnh báo Môi trường và Phòng ngừa Dịch bệnh Thủy sản khu vực miền Bắc, Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản 1 trong việc thực hiện thu và phân tích mẫu. Trân trọng cảm ơn GS.TS. Ikuo Hirono; PGS.TS. Hidehiro Kondo, Trường Đại học Khoa học Công nghệ biển Tokyo, Nhật Bản trong việc tư vấn và góp ý liên quan lĩnh vực sinh học phân tử.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Đặng Thị Lua, Phan Thị Vân, Nguyễn Thị Minh Thúy và Nguyễn Thu Thủy, 2013a. Kết quả nghiên cứu sự biến đổi cấu trúc mô học và siêu cấu trúc của bệnh đen thân trên cá rô đồng (*Anabas testudineus*) nuôi thâm canh. Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn, 15 (2013): 80-86.
- Đặng Thị Lua, Phan Thị Vân, Phạm Thế Việt, và Ngô Thị Ngọc Thủy, 2013b. Tác nhân gây bệnh đen thân trên cá rô đồng (*Anabas testudineus*) nuôi thâm canh. Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn, tháng 10/2013: 31-37.
- Caipang C. M., Hirono I. and Aoki T., 2003. Development of a real-time PCR assay for the detection and quantification of red sea bream *Iridovirus* (RSIV). Fish Pathology 38: 1-7.
- Chinchar V. G., Essbaues S., He J. G., Hyatt A., Miyazaki T., Seligy V. and Williams T., 2005. *Iridoviridae*. In "Virus Taxonomy: 8th Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses" (Fauquet C. M., Mayo M. A., Maniloff J. Desselberger U., Ball L. A., eds). Elsevier, London: 163-175.
- Dang L. T., Kondo H., Hirono I., and Aoki T., 2008. Inhibition of red seabream *iridovirus* (RSIV) replication by small interfering RNA (siRNA) in a cell culture system. Antiviral Research 77: 142-149.
- Dang L. T., Yasuike M., Hirono I., Kondo H. and Aoki T., 2007. Transcriptional profile of red seabream *iridovirus* in a fish model as revealed by viral DNA microarrays. Virus Genes 35: 449-461.
- Delhon G., Tulman E. R., Afonso C. L., Lu Z., Becnel J. J., Moser B. A., Kutish G. F. and Rock D. L., 2006. Genome of Invertebrate Iridescent virus type 3 (Mosquito Iridescent virus). Journal of Virology 80(17): 8439-8449.
- Do J. W., Moon C. H., Kim H. J., Ko M. S., Kim S. B., Son J. H., Kim J. S., An E. J., Kim M. K., Lee S. K., Han M. S., Cha S. J., Park M. S., Park M. A., Kim Y. C., Kim J. W., and Park J. W., 2004. Complete genomic DNA sequence of rock bream *iridovirus*. Virology 325: 351-363.
- Go J., Lancaster M., Deece K., Dhungyel O. and Whittington R., 2006. The molecular epidemiology of *iridovirus* in Murray cod (*Maccullochella peelii peelii*) and dwarf gourami (*Colisa lalia*) from distant biogeographical regions suggests a link between trade

in ornamental fish and emerging iridoviral diseases. *Mol Cell Probes* 20:212-222.

10. Green M. R. and Sambrook J., 2012. *Molecular Cloning: A laboratory manual*. Fourth edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

11. Huang Y., Huang X., Liu H., Gong J., Ouyang Z., Cui H., Cao J., Zhao Y., Wang X., Jiang Y., Qin Q., 2009. Complete sequence determination of a novel reptile *Iridovirus* isolated from soft-shelled turtle and evolutionary analysis of *Iridoviridae*. *BMC Genomics* 2009, 10: 224.

12. Imajoh M., Ikawa T., and Oshima S., 2007. Characterization of a new fibroblast cell line from a tail fin of red sea bream, *Pagrus major*, and phylogenetic relationships of a recent RSIV isolate in Japan. *Virus Research* 126: 45-52.

13. Kurita J., Nakajima K., Hirono I., and Aoki T., 2002. Complete genome sequencing of red sea bream *Iridovirus* (RSIV). *Fisheries Science* 68 (Suppl. ID): 1113-1115.

14. Kvit H., Heinisch G., and Diamant A., 2008. Detection and phylogeny of *Lymphocystivirus* in sea bream *Sparus aurata* based on the DNA polymerase

and major capsid protein sequences. *Aquaculture* 275: 58-63.

15. Tan W. G., Barkman T. J., Chinchar V. G. and Essani K., 2004. Comparative genomic analysis of forg virus 3, type species of the genus *Ranavirus* (family *Iridoviridae*). *Virology* 323: 70-84.

16. Tidona C. A., and Darai G., 1997. The complete DNA sequence of lymphocystis disease virus. *Virology* 230: 207-216.

17. Tsai C. T. et al., 2005. Complete genome sequence of the grouper iridovirus and comparison of genomic organization with those of other iridoviruses. *Journal of Virology* 79: 2010-2023.

18. Williams T., 1996. The *iridoviruses*. *Advance Virus Research* 46:347-412.

19. Williams T., Barbosa-Solomieu V., and Chinchar V. G., 2005. A decade of advances in *iridovirus* research. *Advance Virus Research* 65: 173-248.

20. Wong C. K., Young V. L., Kleffmann T., and Ward V. K., 2011. Genomic and proteomic analysis of Invertebrate iridovirus type 9. *Journal of Virology*, 85(15); 7900-7911.

## APPLICATION OF MOLECULAR TECHNIQUES FOR CLASSIFICATION OF A VIRUS CAUSED DARK BODY DISEASE IN CLIMBING PERCH (*ANABAS TESTUDINEUS*)

Dang Thi Lua and Phan Thi Van

### Summary

Dark body disease has been causing a serious problem for Climbing perch, *Anabas testudineus*, cultured in freshwater intensive farming system recently. The disease outbreaks usually occur with prevalent from 40% to 100%. In a previous study, the causative agent of the dark body disease was identified as a virus parasited in the cytoplasmic location of host cells. The virus has symmetric shape structure with the size of about 150 - 160 nm and is surrounded by a capsid layer. In this study, by utilizing a primer set designed with sequences same as sequences of the primer set specific for major capsid protein (MCP) gene of RSIV (Red seabream *iridovirus*), positive PCR products were observed in samples using DNA templates extracted from both naturally and experimentally infected fish. A phylogenetic analysis based on the partial MCP sequence revealed that the virus caused the dark body disease in Climbing perch was clustered in the genus *Megalocytivirus* of the family *Iridoviridae* and was referred as ATTV (*Anabas testudineus iridovirus*). These results also suggested that livers and kidneys should be suitable organs for rapid diagnosis of ATTV disease using PCR techniques as described in this study.

**Key words:** *Dark body disease, climbing perch, Anabas testudineus, Iridovirus, Megalocytivirus, Iridoviridae.*

Người phản biện: PGS.TS. Nguyễn Việt Không

Ngày nhận bài: 25/4/2014

Ngày thông qua phản biện: 26/5/2014

Ngày duyệt đăng: 02/6/2014