

XÁC ĐỊNH CHỦNG VIRUS GÂY BỆNH KHÂM VÀNG TRÊN CÂY ĐẬU XANH Ở VIỆT NAM

Bùi Thị Thu Huyền¹, Nguyễn Thị Lan Hoa¹, Nguyễn Đức Anh¹, Trần Danh Sứ¹, Hà Việt Cường²

¹ Trung tâm Tài nguyên Thực vật, ² Trường đại học Nông nghiệp Hà Nội

TÓM TẮT

Đậu xanh (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) là cây thực phẩm họ đậu truyền thống được sử dụng theo nhiều cách khác nhau ở Việt Nam. Một trong những mối đe dọa nghiêm trọng đến canh tác đậu xanh, đặc biệt là ở miền duyên hải Nam Trung Bộ là bệnh khảm vàng (*Mungbean Yellow Mosaic Virus*). Để xác định chủng virus nguyên nhân gây bệnh tại Việt Nam, việc thu mẫu bệnh đã được tiến hành tại 17 tỉnh thành trong cả nước và đã thu được 68 mẫu bệnh (57 mẫu đậu xanh, 11 mẫu đậu khác), đã chuẩn đoán xác định virus gây bệnh bằng kỹ thuật PCR với các cặp mồi chung và đặc hiệu. Kết quả đã xác định được 26 mẫu đậu xanh, 11 mẫu đậu khác dương tính với begomovirus và tất cả các begomovirus này đều là MYMV. Kết quả tách dòng và giải trình tự ADN của các mẫu bệnh thu tại Bình Định và Phú Yên cho thấy tất cả các trình tự ADN-A của MYMV phân lập được tương đồng cao nhất với isolate phân lập tại Campuchia (SĐK Genbank: AY271892) và 2 isolate phân lập tại Thái Lan (SĐK Genbank: AB017341 và D14703). Tất cả các trình tự ADN-B của MYMV phân lập được tương đồng cao nhất với isolate phân lập được ở Thái Lan (SĐK Genbank: D14704). Kết quả phân tích cây phát sinh loài cho thấy các MYMV từ Việt Nam, Thái Lan, Campuchia thuộc cùng một chủng là chủng A. Việc xác định được chủng virus gây bệnh rất quan trọng để có các biện pháp phòng ngừa bệnh cũng như cho sự cải tiến giống đậu xanh kháng bệnh tại Việt Nam.

Từ khóa: đậu xanh, bệnh khảm vàng, mẫu bệnh, *Mungbean Yellow Mosaic Virus*, MYMV, phân lập.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Đậu xanh (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) là cây thực phẩm giàu và cân đối protein, thời gian sinh trưởng ngắn, có khả năng chịu hạn, dễ thích ứng với môi trường. Trong điều kiện biến đổi khôn lường của khí hậu hiện nay, đậu xanh là một trong những cây trồng tiềm năng được nhiều nước lựa chọn để nghiên cứu phát triển trong các chương trình ứng biến với thay đổi khí hậu toàn cầu. Ở nước ta, đậu xanh là cây trồng có ý nghĩa trong hệ thống nông nghiệp xen canh, gối vụ và mang lại hiệu quả kinh tế cho các hộ nghèo và sản xuất nhỏ, đặc biệt đối với các tỉnh miền Trung, Nam trung bộ và Tây Nguyên (Phạm Văn Thiều, 2009).

Một trong những bệnh nghiêm trọng nhất gây thiệt hại đến canh tác đậu xanh là bệnh khảm vàng (*Mungbean Yellow Mosaic Virus* - MYMV). Đây là bệnh gây thiệt hại nghiêm trọng làm giảm sản lượng đậu đỗ và đặc biệt là đậu xanh. Bệnh khảm vàng có thể gây thiệt hại năng suất đậu xanh từ 10-100 % tùy thuộc giai đoạn cây bị nhiễm (Khattak và cs., 2000; Varma và Malathi, 2003; Kang và cs., 2005). Bệnh khảm vàng rất phổ biến ở một số nước thuộc khu vực Nam và Đông Nam Á như Ấn Độ, Bangladesh, Sri Lanka và Thái Lan nơi nó cũng tấn công một số loài cây họ đậu khác (Bakar, 1981; Malik, 1991; Bashir và Zubair, 2005). Bệnh có thể làm giảm 62,9% tốc độ sinh trưởng và 83,9 % sản lượng đậu xanh nếu như triệu chứng xuất hiện sau khi gieo hạt 20 ngày (CABI, 2007). Nguyên nhân bệnh là do một hoặc nhiều loài virus thuộc chi *Begomovirus* (họ *Geminivirus* được truyền bởi bọ phấn).

Ở Việt nam, triệu chứng và tác hại của bệnh đã được ghi nhận từ rất lâu và cũng là bệnh nghiêm trọng nhất gây thiệt hại đến canh tác đậu xanh, gây mất năng suất từ 20-70% (Phạm Văn Thiều, 2009). Tuy nhiên, cho đến nay chưa có nghiên cứu nào xác định virus gây bệnh khảm vàng ở đậu xanh được báo cáo. Nghiên cứu này nhằm xác định chính xác virus nguyên nhân gây bệnh và phân tích cây phát sinh loài của chủng virus gây bệnh khảm vàng (MYMV) tại Việt Nam.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

- Các mẫu bệnh trên đậu xanh và các cây họ đậu khác có triệu chứng bệnh khảm vàng được thu trong cả nước

- Virus gây bệnh khảm vàng (MYMV) trên đậu xanh và các cây họ đậu khác

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Điều tra thu mẫu bệnh

- Mẫu bệnh được thu là mẫu lá, ngọn non hoặc quả với các triệu chứng bệnh khảm vàng của cây đậu xanh và các cây họ đậu khác được Nariani (1960) mô tả và được cất giữ trong bao giấy (đảm bảo mẫu thu không bị dính hoặc lây lan dịch từ mẫu đã thu trước đó).

- Các mẫu cây sau khi thu thập được làm khô bằng silicagel tự chỉ thị. Mẫu khô được bảo quản trong lọ mẫu hoặc ống falcon kín chứa silicagen và bảo quản ở 4°C.

2.2.2. Chuẩn đoán virus gây bệnh

Tách chiết ADN tổng số

+ Phương pháp chiết nhanh bằng NaOH (Wang và cs., 1994):

+ Phương pháp chiết ADN bằng dung dịch đệm CTAB (Cetyl Ammonium Bromide) theo mô tả của Doyle & Doyle (1987)

+ Phương pháp chiết ADN bằng dung dịch đệm Dellaporta (Dellaporta, 1983)

Chuẩn đoán virus bằng PCR (Polymerase Chain Reaction) và điện di sản phẩm PCR.

Thành phần cho phản ứng PCR, Điện di

+ Các cặp môi chung phát hiện ADN-A của begomovirus

BegoA-Rev1^a: 5'- ATHCCMDCHATCKTBCTiTGCAATCC^{*}-3'

BegoA-For1^a: 5'- TGYGARGGiCCiTGyAARGTYCARTC^{*}-3'

PALv1978B^b: 5'- GCATCTGCAGGCCACATBGTYTTHCCNGT^{*}-3'

PAR1c715H^b: 5'- GATTTCTGCAGTTDATRTTHTCRTCCATCCA^{*}-3'

+ Các cặp môi chung phát hiện ADN-B của begomovirus là cặp môi Beta1/Beta2 (Bridson R.W. và cs., 2002)

+ Các cặp môi tự thiết kế phát hiện ADN-A của begomovirus (Bảng 1)

Bảng 1: Các môi chuẩn đoán cho ADN-A của begomovirus

TT	Tên môi	Trình tự môi (5'-3') (*)	Số Nu	Tm	Position	Size (bp)
1	LegA-repF1	ATAATGBGGATCRACGTCATC	21	49-53	1846-1866	F1/R1 = 634 F1/R2 = 548
2	LegA-repR1	TCAYCTVCATGTTCTGCTTC	20	43-48	2461-2480	
3	LegA-repR2	CAYATTWCCATCCGAACATTCAG	23	51	2372-2394	
4	LegA-cpF1	GGTCAAGTKTTYAACATGTATGA	23	46-48	770-820	280
5	LegA-cpR1	GCATGAGTACATGCCATATAC	21	49	1000-1050	
6	MYA-For1	CAATTTGAGTGCTGTGTTATCAG	23	52	1773 – 1795	566
7	MYA-Rev1	CTCAATAGTGGATCCAAGTTAC	22	49	2316-2339	

*: Y: C/T, R: G/A, H: A/C/T, M: A/C, B: C/G/T, D: A/G/T, K: G/T; i=inosine.

a: Cặp mồi sử dụng được công bố bởi Ha Viet Cuong và cs., 2006

b: Cặp mồi được cải tiến (Gilbertson và cs., 1991; Tsai và cs., 2011)

+ Các mồi khuếch đại ADN-A và ADN-B hoàn chỉnh của MYMV thu từ Việt Nam (Bảng 2)

Bảng 2: Trình tự của các cặp mồi PCR sử dụng để khuếch đại ADN-A và ADN-B của MYMV thu từ Việt Nam

Tên mồi	Trình tự (5' - 3')	Mục đích
VNMYMV-AFV	ACCGGATCCATTGGTGAACGACT	khuếch đại ADN-A hoàn chỉnh của MYMV
VNMYMV-AFC	CTAGGATCCCACATGGCTGCCA	
VNMYMV-BFV	TCCGAATTCGATTGAGCTTGAGAAAT	khuếch đại ADN-B hoàn chỉnh của MYMV
VNMYMV-BFC	TCAGAATTCAATGAGTCGCAAGGACA	

Chu trình phản ứng PCR

Chuẩn bị 50 µl thành phần phản ứng PCR

Thành phần của mỗi phản ứng PCR

H ₂ O	26,3 µl	Cho thành phần phản ứng vào ống PCR
Buffer phản ứng PCR (Invitrogen)	5,0 µl	(cỡ 0,2 ml)
dNTP _s 10mM (2,5mM mỗi loại)	4,0 µl	Đặt các ống phản ứng vào máy PCR
Mồi F (10 µM)	1,0 µl	Chạy chương trình: 30 chu kỳ
Mồi R (10 µM)	1,0 µl	Biến tính 94°C 1 phút
MgCl ₂ 50mM (Invitrogen)	2,5 µl	Gắn mồi 55°C 2 phút
Taq (5U/ µl, Invitrogen)	0,2 µl	Kéo dài 72°C 2 phút
ADN	10 µl	Sau đó ủ ở 72°C trong 10 phút
Tổng thể tích	50 µl	

Điện di sản phẩm PCR: trên bản gel agarose 1,2% trong đệm TBE 0,5X, với hiệu điện thế 100V trong 40 phút.

2.2.3. Phương pháp tách dòng và giải trình tự ADN của begomovirus

Để phân tích trình tự, các sản phẩm PCR ADN-A 1,5kb được khuếch đại bằng cặp mồi PAL1v1978B/PAR1c715H được tách dòng bằng vectơ pGEM-T Easy theo chỉ dẫn của nhà sản xuất (Promega, WI, USA) và được giải trình tự bằng thiết bị BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit và ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, San Francisco, CA, USA). Các chủng virus được lựa chọn theo cây trồng, vị trí thu thập và trình tự của sản phẩm PCR ADN-A 1,5kb để giải trình tự hoàn chỉnh. Dựa vào việc căn trình tự của các sản phẩm PCR 1,5kb và trình tự nucleotide thu được trên Genbank, thiết kế mồi khuếch đại các đoạn ADN-A và ADN-B hoàn chỉnh của các chủng MYMV từ Việt Nam. Các đoạn ADN-A và ADN-B hoàn chỉnh này sau đó được tách dòng và giải trình tự như trên.

2.2.4. Phân tích trình tự của các ADN begomovirus

Sử dụng BLASTn trên NCBI (National Centre for Biotechnology Information) để tìm kiếm các trình tự của geminivirus trên cơ sở dữ liệu của Genbank tương đồng nhất với trình tự ADN hoàn chỉnh thu được (Altschul và cs., 1990). Phần mềm ClustalX2 2.0 (Larkin và cs., 2007) được sử dụng để căn trình tự và so sánh trình tự. Cây đa dạng di truyền (Phylogenetic tree) của các ADN-A và ADN-B của virus được tạo ra bằng phần mềm MEGA6 (Tamura và cs., 2013). Sử

dụng phương pháp Neighbour-Joining với độ lặp bootstrap là 1000. Khoảng cách tiến hóa được kiểm tra bằng mô hình p -distance.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả thu mẫu bệnh khảm vàng trên cây đậu xanh, cây họ đậu khác tại Việt Nam

Bảng 3: Tổng hợp kết quả thu mẫu bệnh Begomovirus

TT	Địa phương	Đậu Xanh	Đậu khác	Mẫu (+)
1	Bắc Giang	1		0
2	Bắc Ninh	1		0
3	Yên Bái	2	2	2
4	Bắc Cạn		1	1
5	Sơn La	4	3	6
6	Lào Cai	1		0
7	Quảng Ninh		4	4
8	Hà Nội	9	1	1
9	Hung Yên	2		0
10	Thái Bình	7		4
11	Thanh Hóa	2		0
12	Nghệ An	2		0
13	Quảng Trị	1		0
14	Đà Nẵng	4		0
15	Bình Định	3		3
16	Phú Yên	16		16
17	Cần Thơ	2		0
Tổng số		57	11	37

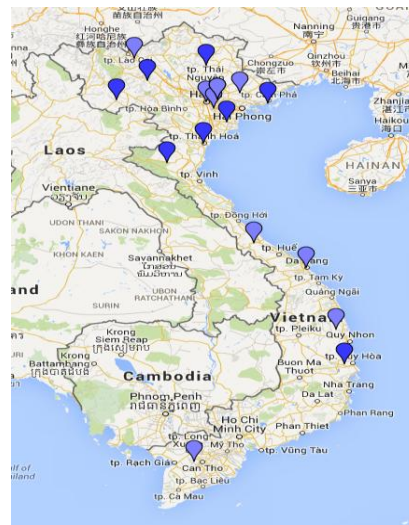
Trong 3 năm từ 2011 đến 2013, chúng tôi đã tiến hành thu thập mẫu bệnh khảm vàng trên đối tượng cây đậu xanh và cây họ đậu khác tại 17 tỉnh, thành phố trong cả nước. Kết quả được tổng hợp trong bảng 3 và được định vị trên bản đồ địa lý Việt Nam tại hình 2, trong đó chúng tôi đã thu được tổng cộng 68 mẫu bệnh, có 57 mẫu bệnh trên đậu xanh và 11 mẫu bệnh trên các cây họ đậu khác.

Trong số 68 mẫu bệnh khảm vàng thu được thì 16 mẫu bệnh chúng tôi thu được tại Phú Yên trên cây đậu xanh, 10 mẫu bệnh thu được tại Hà Nội (9 mẫu bệnh trên đậu xanh, 1 mẫu bệnh trên đậu đen), 7 mẫu bệnh thu được tại Thái Bình trên đậu xanh, còn lại các mẫu bệnh khác thu được rải rác trên các tỉnh thành khác.

Triệu chứng của cây bị bệnh khảm vàng chúng tôi thu mẫu bệnh là: lá bệnh bị khảm vàng, xuất hiện từ lá non trước, những điểm khảm vàng nhỏ xuất hiện dọc theo gân lá và trải rộng dần ra phiến lá; quả đậu mỏng và có dấu hiệu cong sừng trâu. Nếu bệnh xuất hiện sớm, cây có thể vàng cả cây, cây chùn lại và gây chết (Hình 1).



Hình 1: Các triệu chứng khảm vàng ở đậu xanh tại Phú Yên



Hình 2. Định vị các vùng thu mẫu bệnh khảm vàng tại Việt Nam, năm 2011-2013

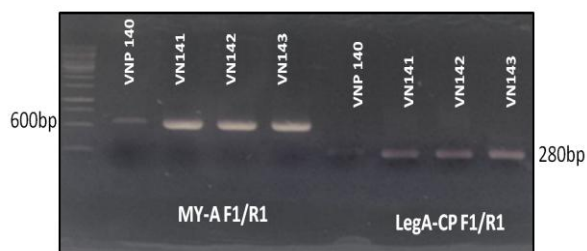
3.3. Kết quả chuẩn đoán bệnh virus trên đậu xanh và cây họ đậu khác

Mẫu đậu xanh và cây họ đậu khác có biểu hiện triệu chứng bệnh khảm vàng như khảm vàng được thu tại các địa phương khác nhau và sau đó các mẫu được chúng tôi tiến hành kiểm tra bằng phản ứng PCR sử dụng cặp mồi chung chuẩn đoán legumovirus phát hiện tất cả các begomovirus hại cây họ đậu và cặp mồi đặc hiệu phát hiện *Mungbean yellow mosaic virus* đã được thiết kế.

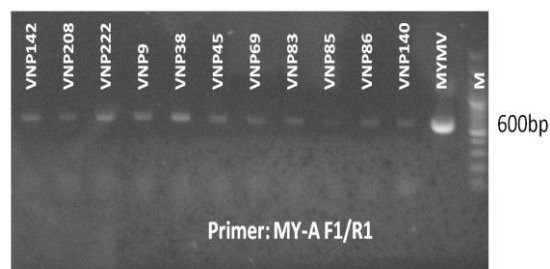
Kết quả chuẩn đoán bằng PCR 68 mẫu bệnh thu được, 11 mẫu bệnh của cây họ đậu khác và 26 trên tổng số 57 mẫu bệnh đậu xanh dương tính với begomovirus (Bảng 3). Như vậy có thể thấy begomovirus có phổ ký chủ gây bệnh rất rộng, nó gây bệnh không chỉ trên đậu xanh mà các cây họ đậu khác. Kết quả chuẩn đoán bằng ELISA để phát hiện potyvirus (BCMV) với 68 mẫu bệnh thu được cho thấy cả 11 mẫu bệnh của cây họ đậu khác đều không nhiễm potyvirus, trong 57 mẫu bệnh đậu xanh thu được có 14 mẫu dương tính với BCMV, các mẫu này âm tính với begomovirus.

Mười lăm mẫu bệnh được thu thập tại Phú Yên và Bình Định năm 2011 (từ MYMV VN1 đến MYMV VN15) được tiến hành chuẩn đoán PCR sử dụng cặp mồi chung Beta1/Beta2 (Bridson và cs., 2002) để phát hiện ADN-B của begomovirus nhưng tất cả các mẫu này đều âm tính với ADN-B của begomovirus.

Kết quả chuẩn đoán bằng PCR và ELISA cho thấy tại Việt Nam phát hiện thấy virus gây bệnh khảm vàng trên đậu xanh là một virus thuộc chi *Begomovirus* có tên là *Mungbean yellow mosaic virus*. Những mẫu bệnh đầu tiên được chúng tôi thu thập nhiễm loại virus này là những mẫu thu thập tại An Nghiệp, Phú Yên sau đó được phát hiện thêm ở nhiều địa điểm khác và trên những cây khác nhau trong đó có nhiều mẫu thu được tại miền Bắc chứng tỏ một điều đây là virus quan trọng bậc nhất gây hại trên đậu xanh và là virus có phổ ký chủ rộng gây hại với các cây họ đậu tại miền Bắc và duyên hải Nam Trung Bộ.



Hình 3: Kiểm tra 4 mẫu đậu xanh tại Phú Yên bằng mồi chung phát hiện legumovirus



Hình 4: Kiểm tra các mẫu đậu xanh bằng mồi đặc hiệu phát hiện MYMV

3.4. Kết quả giải trình tự và phân tích trình tự của ADN-A của begomovirus

Các đoạn ADN-A của begomovirus dài 1,5kb được khuếch đại bằng PCR với cặp mồi PAL1v1978B/PAR1c715H từ 15 mẫu đậu xanh được thu thập tại Bình Định và Phú Yên có ký hiệu từ MYMV VN1 đến MYMV VN15 đã được giải trình tự. Kết quả, tất cả các đoạn ADN-A của begomovirus dài 1,5kb này có độ tương đồng với nhau cao (98,4-99,7%) cho thấy 15 mẫu bệnh này bị nhiễm bệnh từ cùng 1 chủng virus. Khi chạy BLASTn và so sánh các trình tự này với các trình tự công bố trên Genbank, chỉ ra rằng các trình tự này có độ tương đồng trình tự nucleotide cao nhất với chủng MYMV trên đậu xanh thu được từ Campuchia (trình tự có số đăng ký trên Genbank AY271892).

Dựa vào vị trí thu thập mẫu và sự so sánh trình tự của các đoạn ADN-A begomovirus dài 1,5kb để tiếp tục giải trình tự các đoạn ADN-A và ADN-B hoàn chỉnh của chúng. Mỗi cho phản ứng PCR để khuếch đại ADN-A và ADN-B hoàn chỉnh được thiết kế dựa vào việc căn trình tự của các sản phẩm PCR 1,5kb và trình tự nucleotide thu được trên Genbank

Các đoạn ADN-A và ADN-B đã được giải trình tự phát hiện thấy có trình tự nonanucleotide vùng bảo thủ của geminivirus – TATATTAC – trong một vòng lặp của cấu trúc kẹp tóc của vùng không mã hóa (IR-intergenic region). Sáu khung đọc mở (open reading frame-ORF) gồm 2 gen theo chiều kim đồng hồ (chiều xuôi) là AV1 và AV2 và 4 gen theo chiều ngược kim đồng hồ (từ AC1 đến AC4) đã được phát hiện ở tất cả các trình tự ADN-A. Tất cả các trình tự ADN-B đều có một khung đọc mở chiều xuôi (BV1) và một theo chiều bổ sung (BC1). Tất cả các trình tự ADN-A và ADN-B có chiều dài đầy đủ này đã được đăng ký trên cơ sở dữ liệu của Genbank (Bảng 4). Khi so sánh các trình tự có chiều dài đầy đủ này, tất cả 5 chủng của begomovirus có độ tương đồng từ 99,5-100% trong trình tự ADN-A và từ 97,7-99,9% trong trình tự ADN-B. Tất cả các chủng này có độ tương đồng lớn nhất về trình tự nucleotide của ADN-A (98,7-98,9%) với chủng MYMV trên đậu xanh thu thập từ Campuchia (SĐK Genbank: AY271892) và chủng MYMV thu thập tại Thái Lan (SĐK Genbank: AB017341 và D14703). Các trình tự ADN-B của chúng có độ tương đồng về trình tự nucleotide lớn nhất (95,9-96,8%) với chủng MYMV trên đậu xanh được phân lập tại Thái Lan (SĐK Genbank: D14704).

Bảng 4: Các mẫu bệnh được giải trình tự đoạn ADN-A và ADN-B hoàn chỉnh

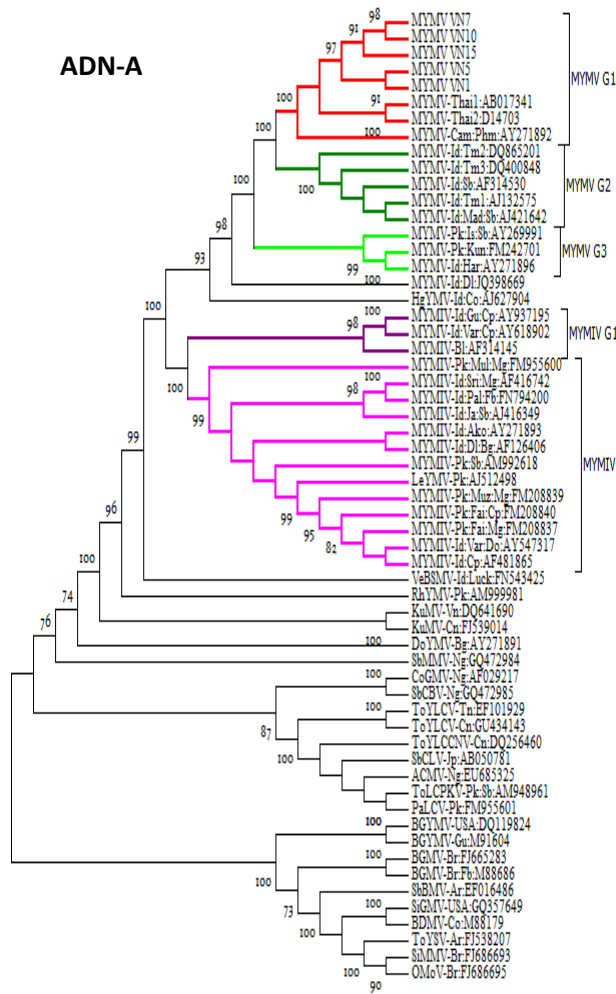
TT	Ký hiệu	Địa điểm thu thập	Thiệt hại do virus	Số đăng ký Genbank		Tổng Nu	
				ADN-A	ADN-B	ADN-A	ADN-B
1	MYMV VN15	Bình Định	40%	JX244176	JX244181	2730	2677
2	MYMV VN1	Phú Yên	50%	JX244172	JX244177	2730	2678
3	MYMV VN7	Phú Yên	50%	JX244174	JX244179	2730	2678
4	MYMV VN5	Phú Yên	60%	JX244173	JX244178	2730	2678
5	MYMV VN10	Phú Yên	60%	JX244175	JX244180	2730	2678

3.5. Kết quả phân tích nguồn gốc phát sinh loài của MYMV phân lập từ Việt Nam

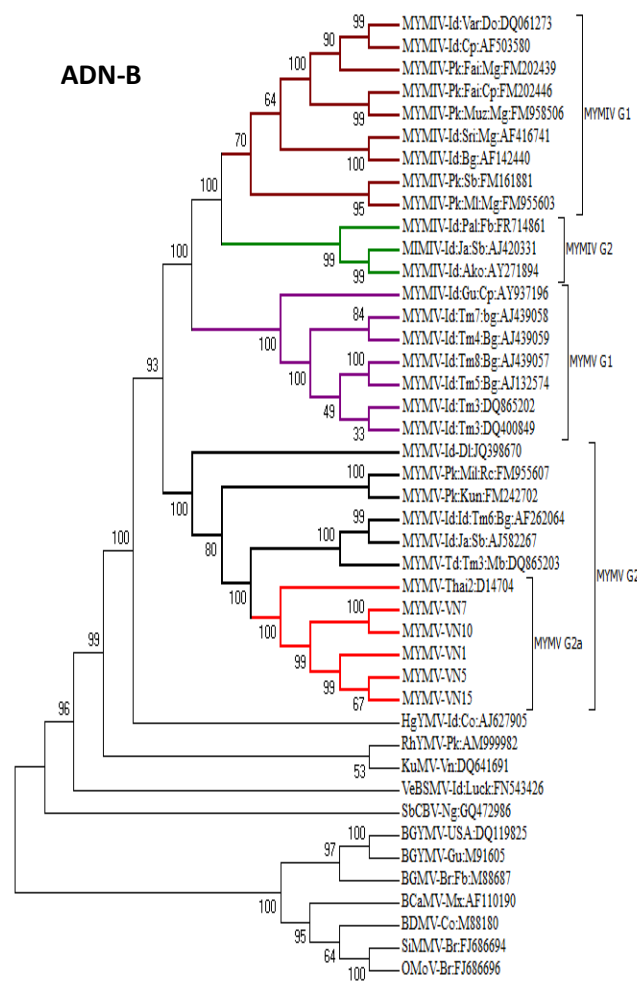
Từ các trình tự ADN-A và ADN-B của các mẫu đậu xanh bị nhiễm bệnh khảm vàng MYMV VN1, MYMV VN5, MYMV VN7, MYMV VN10, MYMV VN15 và các trình tự ADN-A và ADN-B trên Genbank, chúng tôi đã tiến hành căn và so sánh trình tự đa chuỗi sử dụng phần mềm ClustalX2 2.0 (Larkin và cs., 2007). Sau khi căn trình tự đa chuỗi, chúng tôi tiến hành so sánh đặc điểm di truyền của các ADN-A và ADN-B của MYMV thu được với các chủng tham khảo trên Genbank bằng phần mềm MEGA6 (Tamura và cs., 2013) và xây dựng cây phát sinh loài bằng phương pháp Neighbour-Joining (Saitou và Nei, 1987) với trị số Bootstrap là 1000. Theo Felsenstein (1985) thì trị số bootstrap là một công cụ hỗ trợ cho việc xây dựng cây phát sinh loài, chỉ thể hiện giá trị bootstrap lớn hơn 70% theo tiêu chuẩn phân loại nhóm (Hillis và Bull, 1993). Quan sát cây phát sinh loài bằng phần mềm Tree Graph2 (Stöver và Müller, 2010)

Dựa cây phát sinh loài và sự so sánh tương đồng trình tự với cả nhóm ADN-A và ADN-B (hình 5 và hình 6) đã chỉ ra rằng virus gây bệnh khảm vàng ở Việt Nam (các mẫu thu được tại

Nam Trung Bộ) là *Mungbean Yellow mosaic virus* (MYMV). Các chủng MYMV trên thế giới cũng chia làm 3 nhóm phát sinh loài. Nhóm I gồm các chủng có nguồn gốc từ Thái Lan, Campuchia và Việt Nam, nhóm II gồm các chủng được phân lập từ Ấn Độ và nhóm III là các chủng từ Ấn Độ và Pakistan. Dựa vào mức độ tương đồng cao về trình tự nucleotide có thể thấy virus MYMV trong nhóm I và nhóm II cùng một chủng (gọi là chủng A) và virus MYMV trong nhóm III thuộc về một chủng khác (chủng B). Trình tự ADN-B cũng được phân nhóm tương tự như đối với ADN-A, nhóm I được phân lập từ Ấn Độ, nhóm II được phân lập từ Ấn Độ và Thái Lan, nhóm IIa được phân lập từ Thái Lan và Việt Nam, nhóm II và nhóm IIa như vậy cũng phù hợp và tái khẳng định các kết quả nghiên cứu trước đó của các nhà khoa học (Ilyas và cs., 2010, Tsai và cs., 2011). Đã có những báo cáo về begomovirus tấn công cây họ đậu ở Việt Nam (Ha và cs., 2008) nhưng chưa có nghiên cứu chuyên sâu về MYMV. Những kết quả nghiên cứu này là phát hiện đầu tiên về MYMV ở Việt Nam và nguồn gốc phát sinh của nó.



Hình 5: Cây phát sinh loài của begomovirus gây hại cây họ đậu xây dựng dựa trên trình tự nucleotide đầy đủ ADN-A.



Hình 6: Cây phát sinh loài của begomovirus gây hại cây họ đậu xây dựng dựa trên trình tự nucleotide đầy đủ ADN-B.

IV. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

4.1. Kết luận

Đã thu được 68 mẫu bệnh khảm vàng (57 mẫu trên đậu xanh và 11 mẫu trên các cây họ đậu khác) tại 17 tỉnh thành trong cả nước và đã xác định được 26 mẫu đậu xanh dương tính với begomovirus và tất cả các begomovirus này đều là MYMV

Đã tách dòng và giải được trình tự đoạn ADN 1,5kb của 15 mẫu bệnh thu được ở Bình Định và Phú Yên (MYMV VN 1 đến MYMV VN15) và giải trình tự đầy đủ ADN của 5 mẫu (MYMV VN1, VN5, VN7, VN10, VN15).

Kết quả phân tích trình tự các ADN của MYMV cho thấy 5 isolate của begomovirus từ Nam Trung Bộ có độ tương đồng cao với nhau về trình tự ADN-A và ADN-B lần lượt là 99,5-100% và 97,7-99,9%. Tất cả các trình tự ADN-A của MYMV phân lập được tương đồng cao nhất với isolate phân lập tại Campuchia (SĐK Genbank: AY271892) và 2 isolate phân lập tại Thái Lan (SĐK Genbank: AB017341 và D14703). Tất cả các trình tự ADN-B của MYMV phân lập được tương đồng cao nhất với isolate phân lập được ở Thái Lan (SĐK Genbank: D14704)

Kết quả phân tích cây phát sinh loài cho thấy các MYMV trên thế giới chia làm 3 nhóm, trong đó nhóm I từ Việt Nam, Thái Lan, Campuchia, nhóm II từ Ấn Độ, nhóm III từ Ấn Độ và Pakistan. Ba nhóm này thuộc 2 chủng virus MYMV khác nhau dựa vào sự tương đồng trình tự ADN-A nucleotide, chủng A là các isolate thuộc nhóm I và II, chủng B là các isolate thuộc nhóm III.

4.2. Kiến nghị

Tiếp tục nghiên cứu thu thập mẫu bệnh và chuẩn đoán virus gây bệnh trên đậu xanh và các cây họ đậu khác tại miền Bắc và tiến hành tách dòng, giải trình tự để xác định chủng virus gây bệnh tại miền Bắc để có cơ sở chắc chắn là MYMV cũng có mặt tại miền Bắc Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Phạm Văn Thiều, 2009. *Cây đậu xanh : Kỹ thuật trồng và chế biến sản phẩm*. Tái bản lần thứ 6. Nxb. Nông nghiệp, 111 trang.
2. Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers and D. J. Lipman, 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology* **215**(3): 403-410.
3. Bakar A.K., 1981, Pest and disease problems of mungbean in west Malaysia. *Malaysian Journal of Agriculture* **53**: 29-33.
4. Bashir M., Zubair M., 2005. Studies on viral diseases of major pulse crops and identification of resistant sources. *Technical Annual Report* (April, 2004 to June. 2005) of APL Project. Crop sciences Institute, National Agricultural Research Centre, Islamabad. pp: 169.
5. Briddon R.W., Bull S.E., Mansoor S., Amin I., Markham P.G., 2002. Universal primers for the PCR-mediated amplification of DNA beta: a molecule associated with some monopartite begomoviruses. *Molecular Biotechnolology* **20**: 315-318.
6. CABI, 2007b. *Mungbean yellow mosaic virus*, CD Disk, Oxford, United Kingdom
7. Dellapota, S.L., Wood, J. and Hicks, J.B., 1983. A plant DNA mini preparation: Version II. *Plant Molecular Biology Reporter* **1**: 19-21
8. Doyle, J.J. and J.L. Doyle, 1987. A rapid DNA isolation proceducer for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* **19**:11-15.
9. Felsenstein ,1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* **39**: 783-791.
10. Gilbertson R.L., Rojas M.R., Russell D.R., Maxwell D.P., 1991. Use of the asymmetric polymerase chain reaction and DNA sequencing to determine genetic variability of bean golden mosaic geminivirus in the Dominican Republic. *Journal of General Virology* **72**: 2843-2848.

11. Ha C., Coombs S., Revill P., Harding R., Vu M., Dale J., 2008. Molecular characterization of begomoviruses and DNA satellites from Vietnam: additional evidence that the New World geminiviruses were present in the Old World prior to continental separation. *Journal of General Virology* **89**: 312-326.
12. Ha Viet Cuong, Coombs, S., Revill P., Harding R., Vu M. & Dale J., 2006. Corchorus yellow vein virus, a New World geminivirus from the Old World. *Journal of General Virology* **87**: 997-1003.
13. Hillis, D. M. and J. J. Bull, 1993. An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Systematic biology* **42**(2): 182-192.
14. Ilyas M., Qazi J., Mansoor S., Briddon R.W., 2010. Genetic diversity and phylogeography of begomoviruses infecting legumes in Pakistan. *Journal of General Virology* **91**: 2091-2101.
15. Kang, B.C., Yeam, I. and Jahn, M.M., 2005. Genetics of plant virus resistance. *Annual Review of Phytopathology* **43**: 581-621.
16. Khattak, G.S.S., Haq, M.A., Rana, S.A., Abass, G. and Irfag, M., 2000. Effect of mungbean yellow mosaic virus (MYMV) on yields and yield components of mungbean (*Vigna radiata* L. Wilczek). *Kasetsart Journal (Nat. Sci.)* **34**: 12-16.
17. Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG., 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **23**: 2947-2948.
18. Malik I.A. 1991, Breeding for resistance to MYMV and its vector in Pakistan. Mungbean Yellow Mosaic Disease: *Proceedings of an International Workshop*. S.K. Green and D. Kim. (Eds.). Bangkok, Thailand. 2-3 July, 1991. AVRDC, Taiwan. 79p.
19. Nariani, T. (1960). "Yellow mosaic of Mung (*Phaseolus aureus* L.)." *Indian Phytopathology* **13**(1): 24-29.
20. Saitou, N. and M. Nei, 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution* **4**(4): 406-425.
21. Stöver B. C., Müller K. F., 2010. TreeGraph 2: Combining and visualizing evidence from different phylogenetic analyses. *BMC Bioinformatics* **11**:7
22. Varma, A. and Malathi, V.G., 2003. Emerging geminivirus problems: a serious threat to crop production. *Annals of Applied Biology* **142**: 145-164.
23. Tamura, K., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski and S. Kumar , 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution* **30**(12): 2725-2729.
24. Tsai W.S., Shih S.L., Venkatesan S.G., Aquino M.U., Green S.K., Kenyon L., Jan, F.-J., 2011. Distribution and genetic diversity of begomoviruses infecting tomato and pepper plants in the Philippines. *Annals of Applied Biology* **158**: 275-287.
25. Wang J, Huang ZH, Gage DA, Watson JT, 1994. Analysis of amino acids by gas chromatography-flame ionization detection and gas chromatography-mass spectrometry: simultaneous derivatization of functional groups by an aqueous-phase chloroformate-mediated reaction. *Journal of Chromatography A* **663**: 71-78.

IDENTIFICATION OF THE CAUSAL VIRUS OF MUNGBEAN YELLOW MOSAIC DISEASE IN VIETNAM

SUMMARY

Mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) is a traditional legume food crop which is consumed in several different ways in Vietnam. One of the most serious threats to mungbean cultivation, particularly in the arid central and southern parts of Vietnam, is mungbean yellow mosaic disease (*Mungbean Yellow Mosaic Virus*). To identify the virus causing the disease in Vietnam, collecting disease samples was carried out in 17 provinces in Vietnam and obtained 68 samples (57 samples of mungbean, 11 samples of other legume), these samples were diagnosed to identify the virus by PCR with general and specific primers. In results, 26 samples of mungbean, 11 samples of other legume are positive for begomovirus and all begomoviruses are MYMV. Results of cloning and sequencing of DNAs of the samples which were collected in Binh Dinh and Phu Yen showed that all DNA-A sequences of MYMV are highest similarity to isolate from Cambodia (Genbank Accession: AY271892) and 2 isolates from Thailand (Genbank Accession: AB017341 and D14703). All of the DNA-B sequences MYMV are highest similarity to isolate from Thailand (Genbank Accession: D14704). Results of the phylogenetic tree analysis showed that MYMV from Vietnam, Thailand, Cambodia belong to the same species is strain A. The identification of virus strains causing the disease is very important to control the disease as well as improve mungbean varieties resistant to MYMV in Vietnam.

Keywords: mungbean, yellow mosaic disease, samples, *Mungbean Yellow Mosaic Virus*, MYMV, isolate.