

TÀI LIỆU TẬP HUẤN

GIÁM ĐỊNH VI-RÚT TRÊN CÀ CHUA

Training Document for Virus Detection on Tomatoes

HÀ NỘI, NGÀY 20 - 22 THÁNG 03 NĂM 2023



Quét mã QR để tải tài liệu

Scan QR Code for document download



TUYÊN BỐ MIỄN TRỪ TRÁCH NHIỆM/ DISCLAIMER

Ấn phẩm này được xuất bản với sự tài trợ của Liên minh châu Âu. Mọi nội dung trong ấn phẩm này thuộc trách nhiệm duy nhất của các diễn giả trình bày và không nhất thiết phản ánh quan điểm của Liên minh châu Âu.

This publication was funded by the European Union. Its contents are the sole responsibility of authors and do not necessarily reflect the views of the European Union

Tổng quan dự án

Tên dự án:	Hỗ trợ kỹ thuật cho chương trình ARISE+ tại Việt Nam
Mã dự án:	EuropeAid/139560/DH/SER/VN
Mã hợp đồng:	ACA/2019/414-304
Trụ sở Đơn vị thực hiện:	DAI Global Austria Lothringer Strasse 16, A-1030 Wien, Vienna
Mã hoạt động:	SPS 6
Tên báo cáo:	Kỹ thuật chẩn đoán vi-rút trên cây cà chua
Tác giả:	PGS. TS. Hà Viết Cường
Kiểm soát chất lượng:	TS. Eduardo Austin, Chuyên gia Hợp phần 1 – SPS

Mục lục

Danh mục bảng	v
Danh mục hình ảnh	vi
Danh mục chữ viết tắt	viii
Kết cấu tài liệu	ix
1. ĐẠI CƯƠNG	10
1.1. LỊCH SỬ NGHIÊN CỨU VÀ BẢN CHẤT VIRUS	10
Lịch sử nghiên cứu virus	10
Định nghĩa virus	10
Nguồn gốc virus	11
1.2. PHÂN LOẠI VÀ DANH PHÁP VIRUS	12
1.3. HÌNH THÁI VÀ CẤU TRÚC VIRUS	17
Một số thuật ngữ	17
Hình thái virus	18
Virus trần và virus có vỏ bọc	18
Cấu trúc phân tử virus	19
Thành phần cấu tạo của phân tử virus	21
So sánh cấu trúc các nhóm virus	21
1.4. TÁI SINH VIRUS (REPLICATION)	22
Khái niệm	22
Đặc điểm tái sinh virus	22
Tái sinh của các virus có bộ gen RNA sợi (+)	22
Tổng hợp protein virus	22
Hình thành phức hợp tái sinh VRC (viral replication complex)	23
Tái sinh bộ gen virus	23
Lắp ráp thành phân tử virion mới	23
Tái sinh của các virus có bộ gen RNA sợi (-)	25
Tái sinh của virus RNA sợi kép	26
Tái sinh của virus RNA qua phiên mã ngược (retrovirus)	27
Quá trình tái sinh của retrovirus	28
Tái sinh của virus DNA sợi vòng đơn	29
Tái sinh của virus DNA sợi vòng kép phiên mã ngược (pararetrovirus)	30
1.5. SỰ DI CHUYỂN CỦA VIRUS TRONG CÂY	32
Di chuyển giữa các tế bào	32
Di chuyển hệ thống qua khoảng cách xa	34
1.6. CƠ CHẾ GÂY BỆNH CỦA VIRUS THỰC VẬT	35
Triệu chứng bệnh virus	35
Biến màu	35
Biến dạng	35
Vết đốm	36
Hai mô hình giải thích cơ chế gây bệnh của virus	36
Các cơ chế gây bệnh của virus	37
Virus gây mất cân bằng phytohormone	37

	Protein của virus khởi động lại chu kỳ tế bào	38
1.7.	LAN TRUYỀN CỦA VIRUS THỰC VẬT	39
	Giới thiệu.....	39
	Lan truyền qua tiếp xúc cơ học.....	39
	Lan truyền qua nhân giống vô tính	39
	Truyền qua hạt giống	40
	Lan truyền qua môi giới	41
	Cơ chế truyền virus nhờ vector côn trùng	41
	Lan truyền virus theo kiểu không bền vững.....	43
	Lan truyền virus theo kiểu BỀN bền vững	43
	Lan truyền virus theo kiểu BỀN VỮNG TUẦN HOÀN	44
	Truyền theo kiểu bền vững tái sinh.....	44
1.8.	CHẨN ĐOÁN BỆNH VIRUS THỰC VẬT	45
	Giới thiệu.....	45
	Chẩn đoán dựa vào triệu chứng	45
	Chẩn đoán dựa vào cây chỉ thị	45
	Kỹ thuật hiển vi điện tử	46
	Kỹ thuật chẩn đoán dựa vào thể vùi	46
	Ví dụ một số loại thể vùi.....	47
	Kỹ thuật PCR và RT-PCR.....	48
	Chẩn đoán dựa vào RNA sợi kép	51
	Chẩn đoán dựa vào huyết thanh học.....	51
	Các kỹ thuật dot blot	56
2.	CHUYÊN KHOA.....	56
2.1.	CÁC VIRUS THỰC VẬT Ở VIỆT NAM	56
	Các virus được phát hiện ở Việt Nam	56
	VIRUS DNA SỢI ĐƠN: CHI BEGOMOVIRUS	58
	VIRUS RNA SỢI ĐƠN CỰC DƯƠNG: CHI TOBAMOVIRUS	64
	VIRUS RNA SỢI ĐƠN CỰC DƯƠNG: CHI POTEXVIRUS.....	71
	VIRUS RNA SỢI ĐƠN CỰC DƯƠNG: CHI POTYVIRUS	76
	VIRUS RNA SỢI ĐƠN CỰC ÂM: ORTHOTOSPOVIRUS	79
3.	THỰC HÀNH.....	84
	BÀI 1. ĐIỀU TRA ĐỒNG RUỘNG BỆNH VIRUS	84
	BÀI 2. PHÁT HIỆN BEGOMOVIRUS BẰNG PCR	84
	BÀI 3. PHÁT HIỆN CÁC TOBAMOVIRUS, POTEXVIRUS VÀ TOSPOVIRUS BẰNG RT-PCR	84

Danh mục bảng

Bảng 1-1 Hệ thống phân loại virus theo Baltimore	17
Bảng 1-2. So sánh một số đặc điểm hình thái – cấu trúc của các nhóm virus	21
Bảng 1-3 Thành phần vector của virus thực vật tính đến 2007 (Hogenhout et al., 2008)	41
Bảng 1-4. Bốn phương thức truyền virus thực vật của côn trùng môi giới	41
Bảng 1-5 Mã suy biến trong thiết kế mồi chung.....	50
Bảng 2-1 Các begomovirus hại cây trồng được phát hiện cho tới nay tại Việt Nam	64
Bảng 2-2 Các loài virus thuộc chi <i>Tobamovirus</i> (ICTV, 2021)	64
Bảng 2-3 Các loài virus thuộc chi <i>Potexvirus</i> (ICTV, 2021)	72
Bảng 2-4 Các loài virus thuộc chi <i>Orthotospovirus</i> (ICTV, 2021)	79

Danh mục hình ảnh

Hình 1-1 Minh họa phân loại các chi, họ virus thực vật theo báo cáo lần thứ 8 (2005) của ICTV	16
Hình 1-2 Sơ đồ phân loại virus theo Baltimore (http://expasy.org/viralzone/all_by_protein/230.html)	17
Hình 1-3. Minh họa virus trần (hàng trên) và virus có vỏ bọc (hàng dưới).....	18
Hình 1-4 Sơ đồ cấu trúc phân tử của các bunyavirus.....	19
Hình 1-5 Cấu trúc đối xứng đa diện icosahedron cơ bản của virus (T=1, số tiểu phần = 60).....	19
Hình 1-6. Hai hình tam giác đều với số tam giác phụ T = 4 (trái) và T = 9 (phải)	19
Hình 1-7 Cấu trúc đối xứng xoắn của TMV	20
Hình 1-8 Cấu trúc dạng nòng nọc của thực khuẩn thể T4 (Viralzone, 2009).....	20
Hình 1-9 Cấu trúc phức tạp của virus đậu mùa.....	21
Hình 1-10 Sơ đồ tái sinh virus RNA sợi đơn, cực (+).....	24
Hình 1-11 Sơ đồ tái sinh của rhabdovirus	25
Hình 1-12 Sơ đồ tái sinh virus RNA sợi kép	27
Hình 1-13 Tổ chức bộ gen của 1 retrovirus động vật (HIV) và của 1 retrovirus thực vật (GmaSIREV)	28
Hình 1-14 Sơ đồ tái sinh của retrovirus động vật	29
Hình 1-15 Tái sinh của retrovirus thực vật	29
Hình 1-16 Sơ đồ tái sinh của begomovirus	30
Hình 1-17 Sơ đồ tái sinh của các caulimovirus.....	31
Hình 1-18 Cấu tạo sợi liên bào. A và B là mô hình sợi liên bào, trong đó A là tiết diện dọc và B là tiết diện ngang. C là ảnh hiển vi điện tử của sợi liên bào (Lucas, 2006).	32
Hình 1-19 Chiến lược tạo ống của virus thực vật để di chuyển giữa các tế bào (Hull, 2002).....	33
Hình 1-20 Mô hình di chuyển giữa các tế bào của TMV	34
Hình 1-21 Hướng và tốc độ di chuyển hệ thống của virus trong cây (Agrios, 2005).....	35
Hình 1-22 Thí nghiệm chứng minh protein P2 của RDP đã can thiệp vào đường hướng tổng hợp gibberellin của cây lúa (Wang et al., 2005)	38
Hình 1-23 Tương tác giữa protein Rep của begomovirus với pRBR của tế bào cho phép khởi động lại chu kỳ tế bào	39
Hình 1-24. Giải phẫu chung côn trùng chích hút và phân bố virus	42
Hình 1-25 Lây nhiễm nhân tạo trên cây chỉ thị thuốc lá và rau muối (ảnh trái, giữa). Triệu chứng đốm chết hoại do Citrus psorosis virus (CPsV) trên cây rau muối <i>C. amaranticolor</i> (http://www.DPWeb.net)	46
Hình 1-26 Sơ đồ (trái) và ảnh chụp hiển vi điện tử (phải) của thể vùi tế bào chất của potyvirus	47
Hình 1-27 Dụng cụ và vật liệu dùng để kiểm tra thể vùi virus thực vật bằng kính hiển vi quang học (http://plantpath.ifas.ufl.edu/pdc/Inclusionpage/Florvirus.html).....	48
Hình 1-28 Phát hiện bộ gen dsRNA của virus lùn sọc đen phương Nam (Zhou et al., 2008).....	51
Hình 1-29 Cấu trúc kháng thể (Hull, 2002)	53
Hình 1-30 Kỹ thuật Outerlony chẩn đoán virus. Các mẫu A, C, E, F là các mẫu dương	54
Hình 1-31 Các kỹ thuật ELISA khác nhau.....	55
Hình 1-32 Phát hiện virus bằng kỹ thuật dot blot miễn dịch (western blot, trái, Hull, 2002) và dot blot lai DNA (southern blot, phải, Hsu et al., 2005).....	56
 Hình 2-1 Hình thái phân tử geminiviruses. A, Phân tử Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV), bar = 100 nm (Gafni, 2003). B, Mô hình phân tử Maize streak virus (MSV) (Zhang et al., 2001).	59
Hình 2-2 Tổ chức bộ gen của begomovirus và DNA vệ tinh (Hà Viết Cường, 2008).....	61
Hình 2-3 Triệu chứng bệnh xoắn vàng lá cà chua.....	63
Hình 2-4 Sơ đồ cấu trúc phân tử của các tobamovirus (Viralzone, 2009)	66
Hình 2-5 Hình thái virion và cấu trúc của TMV	67
Hình 2-6 Tinh thể virus TMV hình thành trong tế bào thuốc lá	67

Hình 2-7 Tổ chức bộ gen chính và 2 phân tử phụ genome của TMV.....	68
Hình 2-8 Triệu chứng do TMV gây ra trên thuốc lá (trái), ớt (giữa) và cà chua (phải).....	69
Hình 2-9 Triệu chứng do ToBRFV gây ra trên cà chua (García-Estrada et al. 2022).....	70
Hình 2-10 Triệu chứng do ToMMV gây ra trên cà chua (Webster et al., 2014; Maudarbaccus et al. 2021).....	71
Hình 2-11 Sơ đồ cấu trúc phân tử của các potexvirus (Viralzone, 2009).....	73
Hình 2-12 Sơ đồ tổ chức bộ gen của các potexvirus (Viralzone, 2009).....	73
Hình 2-13 Tổ chức bộ gen của PepMV	74
Hình 2-14 Triệu chứng do PepMV trên cà chua	75
Hình 2-15 Hình thái virion và thể vùi của potyvirus. Ảnh trái: phân tử PVY, bar = 100 nm (Shukla et al., 1998). Hình phải: thể vùi tế bào chất của PVY trong tế bào thuốc lá (Arbatova et al. 1998).	76
Hình 2-16 Tổ chức bộ gen của các potyvirus (Shukla et al., 1998).	77
Hình 2-17 Các triệu chứng khảm, khảm nhãn, lùn, chết hoại lá và đốm vòng chết hoại trên khoai tây do PVY (Kerlan, 2006; Hà Viết Cường, 2005)	78
Hình 2-18 Hình thái và cấu trúc phân tử TSWV	81
Hình 2-19 Sơ đồ quá trình tái sinh của TSWV.....	82
Hình 2-20 Một số bệnh do TSWV gây ra trên cà chua, thuốc lá và lạc	83

Danh mục chữ viết tắt

bp	Base pair	Cặp bazơ
CP	Coat protein	Protein vỏ
CTAB	Cetyl trimethylammonium bromide	
DAS-ELISA	Double antibody sandwich - ELISA	Kỹ thuật ELISA kẹp kép kháng thể
DdRp	DNA-dependent DNA polymerase	Men tổng hợp AND trên khuôn ADN
dsDNA	Double-stranded DNA	AND sợi kép
dsRNA	Double-stranded RNA	ARN sợi đơn
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay	Thử nghiệm miễn dịch liên kết men
EM	Electron microscope	Kính hiển vi điện tử
g	Gravity	Trọng lực
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses	Ủy ban quốc tế về phân loại và danh pháp virus
IgG	Immunoglobulin gamma	Globulin miễn dịch lớp gamma
kb	Kilobase	
LIV	Longevity in vitro	Thời gian tồn tại (của virus) trong dịch cây
Mab	Monoclonal antibody	Kháng thể đơn dòng
MP	Movement protein	Protein vận chuyển (di chuyển)
NPP	Nitrophenyl phosphate	
NTP	Nucleotide triphosphate	
ORF	Open reading frame	Khung đọc mở (khung dịch mã)
Pab	Polyclonal antibody	Kháng thể đa dòng
PCR	Polymerase Chain Reaction	Phản ứng trùng hợp chuỗi
pRBR	Plant retinoblastoma-related protein	Một loại protein kiểm soát chu kỳ tế bào thực vật
PTA-ELISA	Plate trapped antigen - ELISA	Kỹ thuật ELISA bắt kháng nguyên trước
PTGS	Post-transcriptional gene silencing	Câm gen hậu dịch mã
RdRp	RNA-dependent RNA polymerase	Men tổng hợp ARN trên khuôn ARN
Rep	Replication	Tái sinh (tái bản)
RF	Replicative form	Dạng tái bản
RI	Replicative intermediate	Dạng tái bản trung gian
RT	Reverse Transcriptase	Men phiên mã ngược
RT-PCR	Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction	Phản ứng trùng hợp chuỗi – phiên mã ngược
SEL	Size exclusion limit	Giới hạn ngăn chặn kích thước (của sợi liên bào)
ssDNA	Single-stranded DNA	AND sợi đơn
ssRNA	Single-stranded RNA	ARN sợi đơn
TDP	Thermal death point	Ngưỡng nhiệt độ mất hoạt tính (của virus trong dịch cây)
UTR	Untranslated region	Vùng không dịch mã
VRC	Viral replication complex	Phức hợp tái sinh virus

Kết cấu tài liệu

Tài liệu được biên soạn gồm 3 phần:

Phần đại cương. Phần đại cương giới thiệu các khái niệm cơ bản của virus thực vật học liên quan đến bản chất của virus. Phần này cũng giới thiệu các kỹ thuật chẩn đoán hiện đang được sử dụng phổ biến trên thế giới và Việt Nam

Phần chuyên khoa. Phần chuyên khoa giới thiệu các virus thuộc đối tượng của dự án và một số nhóm virus không thuộc đối tượng dự án nhưng có mặt tại Việt Nam.

Phần thực hành. Phần thực hành giúp cán bộ củng cố khả năng đánh giá bệnh virus ngoài thực tiễn cũng như thành thạo các kỹ thuật chẩn đoán, chủ yếu dựa trên PCR/RT-PCR, các virus thực vật, đặc biệt các virus thuộc đối tượng dự án.

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. LỊCH SỬ NGHIÊN CỨU VÀ BẢN CHẤT VIRUS

Lịch sử nghiên cứu virus

Cho tới cuối thế kỷ 19, khoa học vẫn chưa biết tới virus. Tuy nhiên, văn học đã mô tả nhiều triệu chứng giống bệnh virus trên thực vật. Tài liệu cổ nhất là một bài thơ tiếng Nhật thời hoàng đế Koken (năm 752 sau Công nguyên) mô tả hiện tượng vàng lá trên một cây cỏ dại, sau này được xác định là cây bội lan (*Eupatorium lindleyanum*). Ngày nay, các nhà khoa học biết rằng cây này mắc cảm với nhiều virus thực vật thuộc chi *Begomovirus* (chẳng hạn Eupatorium yellow vein virus, EYVV). Các begomovirus gây hiện tượng vàng gân và cuối cùng vàng lá trên cây bội lan.

Ở Tây Âu, vào những năm 1600 -1660, nhiều tác phẩm nghệ thuật đã thể hiện bông hoa tulip với triệu chứng khảm sọc rất đẹp. Một củ hoa tulip với triệu chứng khảm sọc rất có giá thời đó; chẳng hạn củ của một giống hiếm như *Semper Augustus* có thể bán được 3000 guine (tiền Hà Lan). Để so sánh, giá một con bò là 120 guine và một con tàu là 500 guine. Hiện tượng khảm sọc hoa tulip ngày nay đã được chứng minh là do một số virus thực vật, điển hình là Tulip breaking virus (TBV) gây ra.

Vào cuối thế kỷ 19, kiến thức về bệnh vi khuẩn đã tích lũy khá nhiều và một thiết bị lọc vi khuẩn đã được Chamberland (một trợ lý của Louis Pasteur) chế tạo. Thiết bị lọc này – cấu tạo bằng sứ, có hình nón – được gọi là nệm lọc Chamberland không cho phép các vi sinh vật có kích thước vi khuẩn đi qua. Năm 1882, Adolph Mayer đã mô tả một bệnh bí ẩn trên cây thuốc lá mà ông gọi là bệnh khảm. Năm 1886, Mayer đã chứng tỏ rằng bệnh khảm thuốc lá có thể lan truyền qua dịch cây và ông cho rằng tác nhân gây bệnh có lẽ là vi khuẩn. Năm 1892, Ivanovski đã chứng minh rằng tác nhân gây bệnh khảm thuốc lá có thể truyền qua nệm lọc vi khuẩn và ông giả thiết rằng tác nhân gây bệnh có thể là chất độc do vi khuẩn tiết ra hoặc một loại vi khuẩn có kích thước rất nhỏ để có thể qua lọc. Độc lập với Ivanovski, năm 1898, Beijerinck đã công bố kết quả nghiên cứu thí nghiệm qua lọc với dịch cây thuốc lá bị khảm lá. Do không phát hiện thấy bất cứ vi sinh vật nào, ông đã gọi tác nhân gây bệnh là *contagium vivum fluidum*, tiếng Latin nghĩa là “dịch sống truyền nhiễm” để phân biệt với các thực thể gây bệnh dạng hạt khác. Đóng góp quan trọng của Beijerinck ở chỗ ông là người đầu tiên chứng minh sự tồn tại của một loại tác nhân gây bệnh mới, không phải vi khuẩn, có khả năng qua lọc, sống (nhân lên trong cây bệnh) và hòa tan. Công trình của ông được xem là khai sinh ngành virus học và ông được cộng đồng các nhà virus học công nhận là “cha đẻ” của virus học.

Ngày nay, chúng ta biết rõ rằng tác nhân gây bệnh khảm thuốc lá là Tobacco mosaic virus (TMV). Đây là một virus có ý nghĩa lịch sử lớn, cả trong virus học cũng như sinh học. Nhiều phát minh quan trọng trong sinh học đều dựa trên virus này.

Định nghĩa virus

Nhờ các nghiên cứu cơ bản trong lĩnh vực sinh hóa, sinh học phân tử, di truyền, ngày nay, bản chất virus đã được hiểu rất rõ. Có vô số khái niệm, định nghĩa nhằm giải thích thế nào là một virus. Một trong các định nghĩa phản ánh đầy đủ bản chất virus được trình bày trong cuốn *Matthew's Plant Virology* (Hull, 2002) là:

“Virus là các tác nhân gây bệnh không có cấu tạo tế bào, có bộ gen là acid nucleic thường được bao bọc bởi các protein vỏ, chỉ có thể tái sinh bên trong tế bào ký chủ. Quá trình tái sinh của virus (i) phụ thuộc hoàn toàn vào bộ máy tổng hợp protein của ký chủ, (ii) tổng hợp riêng rẽ các thành phần của virus để lắp ráp nên phân tử virus (virion) mới”.

Mặc dù các nhà virus học đồng ý rằng virus là một thực thể sinh học (và do đó thuộc đối tượng nghiên cứu của sinh học) vì chúng có bộ gen, có thể tái sinh, có thể đột biến và tiến hóa để thích nghi với điều kiện sống khác nhau thì vẫn chưa có sự thống nhất xem liệu virus có thể được coi là một sinh vật (organism) thực sự hay không. Hiện có 2 quan điểm khác nhau khi xét bản chất sống của virus.

Quan điểm thứ nhất, cũng là quan điểm của Ủy ban Phân loại Virus Quốc tế (ICTV), cho rằng virus, mặc dù có một số thuộc tính của sự sống, nhưng không phải là một sinh vật thực sự vì chúng vẫn thiếu một số thuộc tính cơ bản của một sinh vật sống như:

Virus không có khả năng thu nhận và lưu trữ năng lượng tự do.

Virus không có chức năng sống khi ở bên ngoài tế bào ký chủ. Virus chỉ thể hiện đặc tính của sự sống khi bộ gen của nó ở bên trong tế bào ký chủ thích hợp.

Virus không tăng trưởng.

Virus không có bộ máy tổng hợp protein.

Quan điểm thứ nhất này dựa trên cơ sở cho rằng hệ thống sống đơn giản nhất là tế bào, do vậy chỉ các sinh vật/vi sinh vật đơn bào hoặc đa bào mới có các đặc tính của sự sống còn các cơ quan tử của nó thì không.

Quan điểm thứ hai coi virus là một sinh vật (chính xác là sinh vật không có cấu tạo tế bào) dựa trên một số lập luận sau:

Virus có thể tái sinh.

Bộ gen của virus có thể bị đột biến.

Virus tiến hóa độc lập đối với ký chủ của chúng và có khả năng thích ứng với các ổ sinh thái khác nhau.

Mặc dù virus phụ thuộc tế bào ký chủ để tái sinh (ký sinh chuyên tính) nhưng nhiều loại tác nhân gây bệnh khác cũng chỉ có thể sống được trong tế bào ký chủ.

Mặc dù virus thiếu ty thể nhưng một số protozoa cũng thiếu.

Mặc dù kích thước phân tử virus nhỏ nhưng một số virus, chẳng hạn các virus thuộc nhóm “nucleocytoplasmic large DNA viruses” như virus đậu mùa (pox virus) có kích thước lớn hơn vi khuẩn Chlamydia (gây bệnh viêm đường tiết niệu).

Mặc dù virus có kích thước bộ gen nhỏ nhưng các virus thuộc nhóm “nucleocytoplasmic large DNA viruses” có kích thước rất lớn. Ví dụ Acanthamoeba polyphaga mimivirus (APMV), một virus mới được khám phá gần đây, có bộ gen lớn tới 1.2 Mb, lớn hơn bộ gen của nhiều loài phytoplasma, riketsia và chlamydia.

Mặc dù virus không có hệ thống tái tạo năng lượng nhưng vi khuẩn chlamydia cũng thiếu.

Lập luận chủ chốt nhất của quan điểm thứ hai là *dựa vào đặc tính tái sinh* của virus.

Nguồn gốc virus

Vì đặc điểm bộ gen của virus rất đa dạng nên virus được xem là đa nguồn gốc (polythetic) và virus DNA thì tiến hóa độc lập với virus RNA. Tuy nhiên vì chúng có một đặc điểm rất chung là bộ gen lại được bao bọc bởi các protein vỏ nên hiện vẫn không có một quan điểm thống nhất về nguồn gốc virus. Cho tới nay, đã có 3 giả thuyết về nguồn gốc virus.

Thuyết virus có trước. Theo thuyết này, virus chính là dạng tồn tại hay là hóa thạch sống của các dạng sống tiền tế bào.

Thuyết này đã bị loại bỏ từ lâu vì tất cả các virus đều là các ký sinh chuyên tính cao độ và chỉ có thể tái sinh trong một tế bào ký chủ đang sống.

Thuyết suy thoái. Theo thuyết này, virus là dạng suy thoái của các sinh vật đơn bào. Thuyết này cũng thường bị phản bác vì 2 lý do:

(i) Khoa học chưa từng khám phá ra bất kỳ một dạng trung gian nào giữa tế bào và virus.

(ii) Đối với một số dạng suy thoái từ tế bào như Mycoplasma/Phytoplasma là dạng suy thoái của vi khuẩn, hay Microsporidia là dạng suy thoái của tế bào Eukaryote, hay Nanoarchaea là dạng suy thoái của Archaea, thì tất cả chúng đều vẫn giữ được một số đặc trưng của tế bào như có ribosome cũng như bộ máy tổng hợp protein và năng lượng.

Thuyết trốn thoát (escape). Virus là các mảnh vật liệu di truyền của tế bào và bằng cách nào đó thoát khỏi sự kiểm soát của tế bào và tiến hóa để trở thành các thực thể ký sinh độc lập với bộ gen tế bào.

Thuyết này đã và đang trở nên phổ biến vì có nhiều bằng chứng ủng hộ như:

- (i) Bộ gen virus có cả dạng DNA và RNA.
- (ii) Một số virus có thể tổng hợp gen ký chủ vào bộ gen của nó (ví dụ begomovirus/thuốc lá).
- (iii) Một số virus có thể tổng hợp vào bộ gen ký chủ (ví dụ các retrovirus, pararetrovirus).
- (iv) Một số virus có đặc điểm bộ gen giống ký chủ (ví dụ geminivirus/plasmid, potyvirus/mRNA...).

Tuy nhiên một số ý kiến khác không đồng ý khi cho rằng:

- (i) Cơ chế nucleic acid của virus tiếp nhận và lắp ráp với protein vỏ vẫn không rõ.
- (ii) Nếu theo thuyết này, thực khuẩn thể phải có nguồn gốc từ vi khuẩn và virus của eukaryote phải có nguồn gốc từ eukaryote. Tuy nhiên người ta đã chứng minh một số gen thực khuẩn thể T4 lại giống với gen của eukaryote hơn so với của vi khuẩn.
- (iii) Cho tới nay, rất nhiều bộ gen của cả prokaryote lẫn eukaryote đã được giải trình tự nhưng phần lớn các gen virus lại chẳng giống chút nào với các gen ký chủ tương ứng.

1.2. PHÂN LOẠI VÀ DANH PHÁP VIRUS

Phân loại và danh pháp

Phân loại học (Taxonomy =systematics): là khoa học phân loại gồm 2 nhánh là *phân loại* “classification” và *danh pháp* “nomenclature”.

Phân loại là sắp xếp các đơn vị phân loại “taxon” vào các nhóm khác nhau theo mối quan hệ của chúng dựa theo các tiêu chí xác định.

Danh pháp là đặt tên các đơn vị phân loại theo 1 qui tắc xác định.

Cả phân loại và danh pháp gắn liền với nhau và nhằm mục tiêu:

Tạo ra một sự sắp xếp có trật tự các virus sao cho con người có thể hiểu thấu đáo được chúng.

Giúp con người có thể giao tiếp được với nhau về đối tượng virus nghiên cứu.

Giúp tiên đoán các đặc tính của một virus mới.

Bộ lộ mối quan hệ tiến hóa của các virus.

Ủy ban Phân loại Virus quốc tế (ICTV)

Năm 1966 tại Hội nghị Vi sinh vật học Quốc tế tổ chức tại Moscow, một Ủy ban Danh pháp Virus Quốc tế (International Committee for the Nomenclature of Viruses) đã được thành lập với nhiệm vụ phát triển một hệ thống phân loại và danh pháp được chấp nhận về mặt quốc tế và thống nhất cho tất cả các loại virus.

Vào năm 1973, Ủy ban này đổi tên thành Ủy ban Phân loại Virus Quốc tế (International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV).

Về mặt tổ chức, hiện nay, ICTV gồm khoảng 500 nhà virus hàng đầu trên thế giới, chia thành 5 “tiểu ban” (subcommittee) chuyên môn (hình 2-1) là:

Virus hại động vật có xương sống.

Virus hại động vật không xương sống.

Virus hại thực vật.

Virus nhiễm vi khuẩn (thực khuẩn thể).

Virus hại nấm.

Một tiểu ban cơ sở dữ liệu.

Các tiểu ban chuyên môn lại bao gồm các “nhóm nghiên cứu” (study-group), mỗi nhóm chịu trách nhiệm đối với 1 họ virus hoặc 1 nhóm virus chưa phân loại.

Cho tới nay, ICTV đã công bố 9 báo cáo trình bày hệ thống phân loại và danh pháp của tất cả các đối tượng virus trên thế giới vào các năm 1971, 1976, 1979, 1982, 1991, 1995, 2000, 2005 và 2011.

Báo cáo lần thứ 7 (năm 2000) đã chính thức đưa ra khái niệm “loài” virus và qui định cách viết tên loài. Báo cáo cũng liệt kê 1550 loài, 233 chi và 56 họ.

Báo cáo lần thứ 8 (năm 2005) đã phê chuẩn 3 bộ, 73 họ, 287 chi và hơn 5450 virus thuộc > 1950 loài.

Báo cáo lần thứ 9 (năm 2011) đã phê chuẩn 6 bộ, 87 họ, 349 chi và 2285 loài.

Năm 2018, ICTV bắt đầu đưa các khái niệm trên bộ gồm: Vực (Realm = Domain), Giới (Kingdom), Ngành (Phylum) và Lớp (Class)

Việc bổ sung và sửa đổi các vị trí phân loại được thực hiện thường xuyên tại ICTV. ICTV chỉ chịu trách nhiệm phân loại ở mức loài trở lên.

ICTV không có trách nhiệm trong phân loại và định tên các mức phân loại dưới loài như serotype, genotype, strain, variant và isolate. Việc phân loại ở mức dưới loài là do các tác giả nghiên cứu tự quyết định. ICTV cũng không có trách nhiệm phân loại và định tên các virus được tạo ra bằng con đường nhân tạo. Cần phải hiểu rõ rằng trong sinh học, đơn vị phân loại cơ bản chính thức thấp nhất là loài (species) còn các mức phân loại dưới loài như serotype, genotype, strain, variant và isolate là các đơn vị phân loại không chính thức và không tương đương nhau giữa các đối tượng nghiên cứu.

Danh pháp virus hiện tại theo ICTV

Tên virus (common name). Tên virus thường do các tác giả đặt theo trật tự sau: tên ký chủ đầu tiên virus được phát hiện + triệu chứng điển hình + từ virus.

Cần chú ý là tên virus chính là tên thông thường (common name) nên hiển nhiên là khác nhau giữa các nước. Tuy nhiên chúng ta thường quen với tên thông thường tiếng Anh, chẳng hạn như tobacco mosaic virus. Do vậy, các tác giả phát hiện virus thường đặt tên tiếng Anh cho virus.

Mặc dù ICTV không chính thức can thiệp vào việc đặt tên nhưng trong một số trường hợp đặc biệt khi có rất nhiều virus thuộc các loài khác nhau cùng được phát hiện đầu tiên trên một cây ký chủ với triệu chứng giống nhau thì các “nhóm nghiên cứu” có thể hướng dẫn cách đặt tên, chẳng hạn thêm tên địa phương vào tên virus.

Ví dụ: Tomato yellow leaf curl Vietnam virus (TYLCVNV), tomato leaf curl Vietnam virus (ToLCVV). Đây là 2 virus thuộc chi *Begomovirus* và gây bệnh xoắn vàng lá cà chua ở Việt Nam.

Tên loài virus (scientific name). Tên loài virus là tên virus tiếng Anh được viết (in) nghiêng. Ký tự đầu tiên của tên loài phải viết hoa (không kể chữ hoa chỉ danh từ riêng nếu có trong tên loài). Tên loài không chứa tên tác giả hoặc tên người. Danh pháp tên loài virus là danh pháp tên đơn “monomial”.

Ví dụ cách đặt tên loài virus:

Tên virus tiếng Anh là tobacco mosaic virus => tên loài là *Tobacco mosaic virus*

Tên virus tiếng Anh là tomato leaf curl Vietnam virus => tên loài là *Tomato leaf curl Vietnam virus*

Một số điểm chú ý về tên loài

Mặc dù tên loài là tên đơn nhưng thường gồm nhiều từ, ví dụ *Tobacco mosaic virus*.

Vì tên loài virus là tên virus tiếng Anh được viết (in) nghiêng nên dễ gây nhầm lẫn và đặc biệt là không có sự khác nhau trong cách đọc. Để tạo ra sự khác nhau giữa tên virus và tên loài virus, danh pháp “tên kép” (binomial) tiếng Anh đã được đề xuất, chẳng hạn *Tobacco mosaic tobamovirus* (trong đó từ tobamovirus là tên chi). Một ưu điểm nữa của danh pháp này là thông tin về chi đã được thêm vào tên loài (giống như tên loài của các đối tượng sinh vật khác). Danh pháp tên kép đã được sự ủng hộ và sử dụng rộng rãi trong cộng đồng các nhà virus thực vật. Một đề xuất chính thức đã được gửi lên ICTV vào năm 1998. Tuy nhiên ICTV đã không chính thức công nhận danh pháp này vì 3 lý do: (1) nhiều nhà

virus động vật không ủng hộ do khi áp dụng danh pháp tên kép sang virus động vật đã tạo ra nhiều tên loài rất dài và chứa nhiều từ trùng lặp chẳng hạn *Human varicella-zoster varicellovirus* hay *Influenza A influenzavirus A*, (2) một số nhà virus học, những người cho rằng virus không phải là sinh vật thực sự, phản đối vì theo họ danh pháp tên kép phải dùng tên La tinh, và (3) tại thời điểm đó, việc thay đổi vị trí phân loại ở mức chi đã xảy ra khá phổ biến đối với nhiều virus. Mới đây, vào năm 2002, ICTV đã tổ chức thăm dò ý kiến 250 nhà virus học hàng đầu thế giới. Kết quả cho thấy 85 % đã ủng hộ cách sử dụng danh pháp tên kép tiếng Anh. Hiện nay, ICTV đang xây dựng các qui định để chuyển sang sử dụng hệ thống danh pháp này.

Trong văn bản khoa học (luận văn, bài báo), tên loài chỉ xuất hiện một lần. Các thứ bậc phân loại chính thức phải được viết (in) nghiêng và ký tự đầu tiên phải viết hoa, ví dụ: loài *Tobacco mosaic virus*, chi *Tobamovirus*.

Về viết tắt. Vì tên virus thường dài nên trong quá trình viết và nói, người ta hay dùng tên viết tắt của virus, chẳng hạn TMV (tobacco mosaic virus), CMV (cucumber mosaic virus). Tên loài virus thường không cần viết tắt vì tên loài đầy đủ thường chỉ xuất hiện 1 lần trong văn bản khoa học (luận văn, bài báo).

Phân biệt virus và loài virus

Virus là thực thể cụ thể (tồn tại trong không gian và thời gian) => có thể thao tác với virus, chẳng hạn tinh chiết, lây nhiễm... một virus.

Loài virus là khái niệm trừu tượng (chỉ tồn tại trong trí óc con người) => không thể thao tác với “loài virus”.

Như vậy có thể thấy chỉ virus mới gây ra bệnh còn loài virus thì không gây bệnh.

Các chỉ tiêu phân loại virus

Việc chấp nhận khái niệm loài virus bởi các nhà virus học quốc tế là một bước quan trọng nhằm thiết lập một hệ thống phân loại virus thống nhất nhưng khái niệm này ít có giá trị trong việc phân biệt liệu một mẫu virus cụ thể nào đó có là thành viên của một loài virus được xác định trước hay không. Lý do là người ta có thể định nghĩa các khái niệm trừu tượng như loài nhưng không thể định nghĩa một mẫu virus cụ thể. Một mẫu virus chỉ có thể được đặt tên và xác định bằng các đặc điểm chẩn đoán. Vì loài là một lớp đa hình, việc xác định này được dựa trên một số các tiêu chí khác nhau qui định mức độ quan hệ của một mẫu virus với một loài đã được xác định trước (các đặc điểm chẩn đoán), thay vì chỉ dựa vào một chỉ tiêu đơn lẻ.

Để phân biệt ở mức loài, không cần thiết dùng các đặc điểm có mặt ở tất cả các thành viên của chi hoặc họ, chẳng hạn như hình thái virion, tổ chức bộ gen, phương thức tái sinh, số lượng và kích thước các protein cấu trúc và phi cấu trúc. Các chỉ tiêu dưới đây (mà tầm quan trọng thay đổi theo chi) thường được áp dụng để phân biệt các mẫu virus ở mức loài.

1. Đặc điểm virion

Đặc điểm hình thái (hình dạng; kích thước; có hoặc không có vỏ bọc; cấu trúc các đơn vị hình thái (capsomer)

Đặc tính vật lý (khối lượng phân tử; tỷ trọng; hệ số sa lắng; tính ổn định đối với pH, nhiệt độ, cation, dung môi, bức xạ)

Đặc điểm bộ gen (loại acid nucleic (DNA hay RNA); loại sợi (đơn hay kép, mạch thẳng hay mạch vòng); loại cực (âm, dương hay lưỡng cực); số phân đoạn (phân tử) của bộ gen; đặc điểm đầu 5' và đầu 3'; so sánh trình tự.

Đặc điểm protein (số lượng; kích thước; chức năng; so sánh chuỗi)

Đặc điểm lipid (có hay không có; bản chất)

Đặc điểm carbohydrate (có hay không có; bản chất)

2. Tổ chức bộ gen và phương thức tái sinh

Tổ chức bộ gen.

Phương thức tái sinh.

Đặc điểm phiên mã.

Đặc điểm dịch mã và xử lý hậu dịch mã.

Vị trí tích lũy protein virus, lắp ráp virion, thành thực và giải phóng virion.

Tế bào học, hình thành thể vùi.

3. Đặc điểm kháng nguyên

Quan hệ huyết thanh.

Bản đồ epitope.

4. Đặc điểm sinh học

Phạm vi ký chủ (tự nhiên và thực nghiệm).

Tính gây bệnh.

Tính hướng mô, bệnh học, mô học.

Phương thức lan truyền ngoài tự nhiên.

Quan hệ vector.

Phân bố địa lý.

Ngay khi một loài đã được thiết lập trên cơ sở một tổ hợp các đặc điểm, người ta có thể xác định một mẫu virus có là thành viên của loài đó không bằng cách đánh giá chỉ một vài đặc điểm chẩn đoán. Ví dụ, nếu chuỗi gen của một mẫu là 99,9 % đồng nhất với một thành viên đã biết của một loài thì mẫu đó là thành viên của loài đó.

Hệ thống phân loại virus hiện tại theo ICTV

Hệ thống phân loại virus hiện nay là một hệ thống phân loại sinh học, được tổ chức thành các thứ bậc phân loại khác nhau với các hậu tố qui định như sau:

Vực (-viria)

Giới (-virae)

Ngành (-viricota)

Lớp (-viricetes)

Bộ (-virales)

Họ (-viridae)

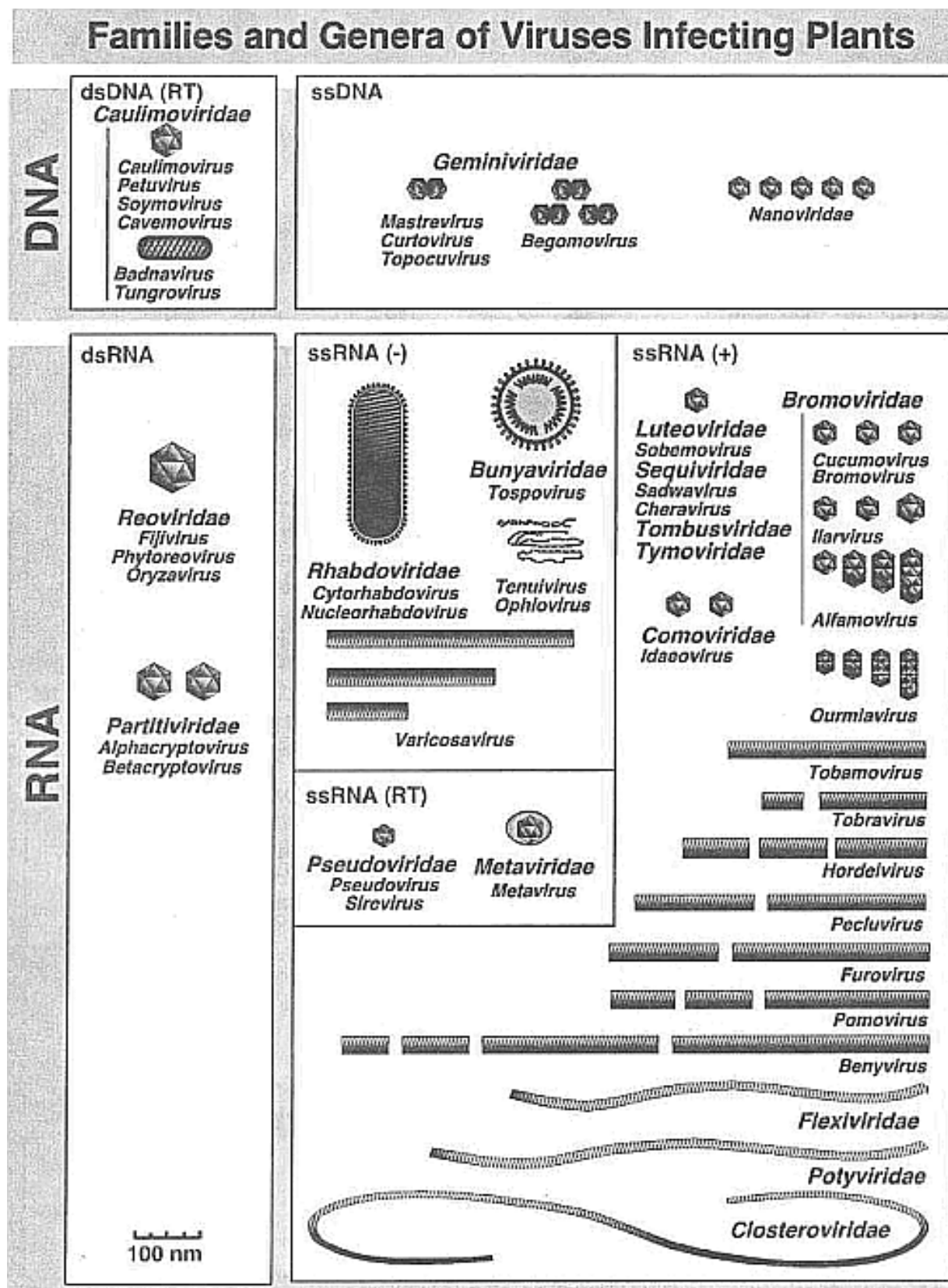
Chi (-virus)

Loài (-virus)

Hiện nay (2022), ICTV đã phê chuẩn: 6 Vực, 10 Giới, 17 Ngành, 39 Lớp, 65 Bộ, 223 Họ, 2606 Chi và **10434** Loài virus. Cần chú ý không phải tất cả các loài virus đã được phân loại tới các thứ bậc cao hơn.

Trong tổng số loài được phê chuẩn, có **1744** gây bệnh thực vật, trong đó khoảng 67 % là các virus RNA.

Tham khảo website của ICTV (<http://www.ictvonline.org>) và Viralzone (<http://expasy.org/viralzone>) để cập nhật hệ thống phân loại virus.



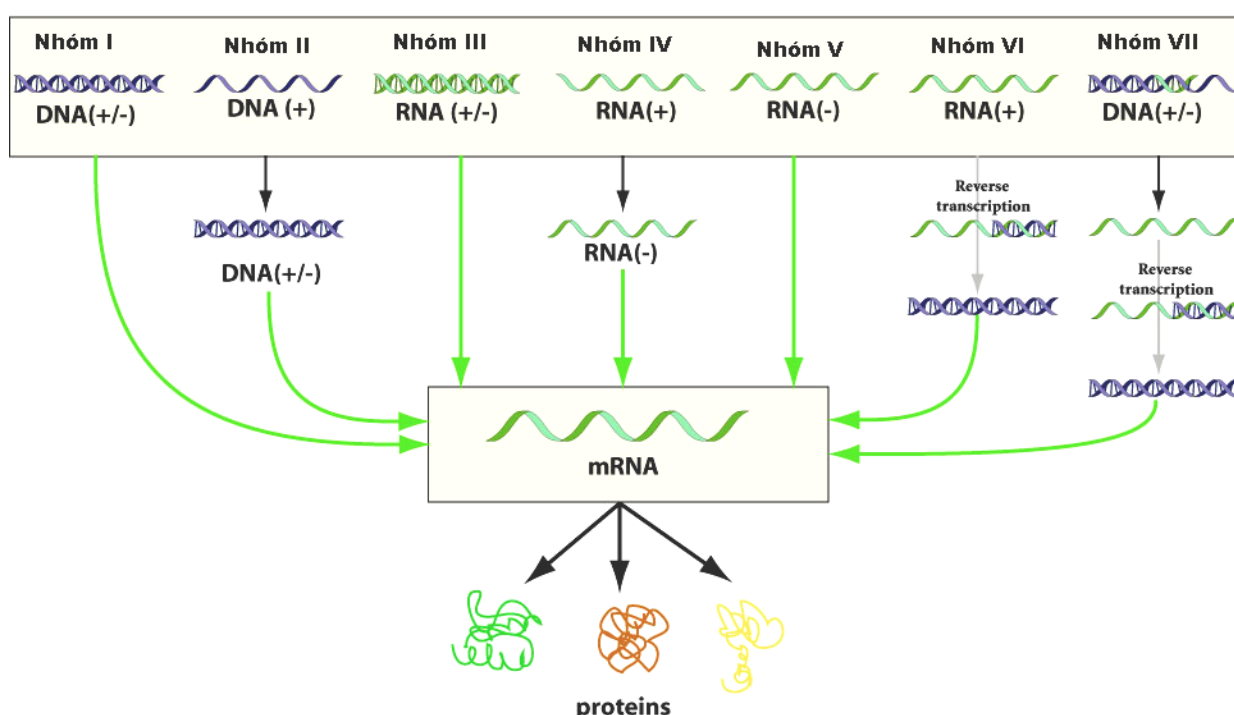
Hình 1-1 Minh họa phân loại các chi, họ virus thực vật theo báo cáo lần thứ 8 (2005) của ICTV
 Hệ thống phân loại virus theo Baltimore

Để đơn giản hóa phân loại virus, một hệ thống phân loại virus khác cũng thường được sử dụng gọi là hệ thống phân loại Baltimore. Hệ thống này do David Baltimore (giải Nobel 1975) đề xuất năm 1974.

Baltimore phân loại các virus thành 7 nhóm dựa trên **đặc điểm bộ gen** và **cơ chế tái sinh** (Bảng 2-1, Hình 2-2).

Bảng 1-1 Hệ thống phân loại virus theo Baltimore

Nhóm	Đặc điểm bộ gen	Ví dụ virus thực vật
I	DNA, sợi kép	Piper yellow mottle virus
II	DNA, sợi đơn	Banana bunchy top virus, các begomovirus
III	RNA, sợi kép	Rice ragged stunt virus
IV	RNA, sợi đơn, cực (+)	Papaya ring spot virus
V	RNA, sợi đơn, cực (-)	Rice yellow stunt virus
VI	RNA, sợi đơn, cực (+), tái sinh qua trung gian DNA (Retrovirus)	Glycine max SIRE1 virus
VII	DNA, sợi kép, tái sinh qua trung gian RNA (Pararetrovirus)	Rice tungro bacilliform virus



Hình 1-2 Sơ đồ phân loại virus theo Baltimore
(http://expasy.org/viralzone/all_by_protein/230.html)

1.3. HÌNH THÁI VÀ CẤU TRÚC VIRUS

Một số thuật ngữ

Tiểu phần (subunit): Là một protein đơn lẻ, được mã hóa bởi bộ gen virus, ở trạng thái cấu trúc không gian, cấu tạo nên vỏ protein của virus

Đơn vị hình thái (capsomer): Là đơn vị cấu trúc bề mặt thấy được dưới kính hiển vi điện tử. Một đơn vị hình thái có thể được cấu tạo bởi 1 hoặc nhiều tiểu phần và được gọi là monomer, dimer, trimer, tetramer, pentamer, hexamer ... tùy theo số lượng tiểu phần hợp thành.

Vỏ protein (capsid): Vỏ protein bao quanh bộ gen virus.

Vỏ bọc (envelope): Gồm 2 phần: (i) một lớp màng kép lipid, thường có nguồn gốc từ màng tế bào hoặc màng cơ quan tử của tế bào ký chủ; (ii) các phân tử glycoprotein (thường có nguồn gốc từ virus) nhô lên trên bề mặt.

Phân tử virus (virion): Là cấu trúc hình thái đầy đủ của virus. Phân tử virus cũng được gọi là hạt virus.

Hình thái virus

Phân tử virus thực vật có kích thước cực kỳ nhỏ, phần lớn trong phạm vi hàng chục tới hàng trăm nm (10^{-9} m), nên chỉ có thể quan sát được bằng kính hiển vi điện tử (KHVĐT). Khi được quan sát dưới KHVĐT, phân tử virus thực vật thường có hình thái ở các dạng sau:

Hình cầu (thực chất là hình cầu đa diện đối xứng): rất nhiều, ví dụ nanovirus, cucumovirus, reovirus.

Hình cầu kép: chỉ có các geminivirus có hình dạng này.

Hình giống vi khuẩn: chỉ badnavirus, tungrovirus, iflavirus, alfamovirus.

Hình viên đạn: chỉ rhabdovirus.

Hình gậy: rất nhiều, ví dụ potexvirus, tobamovirus.

Hình sợi mềm: chỉ potyvirus, flexivirus, closterovirus.

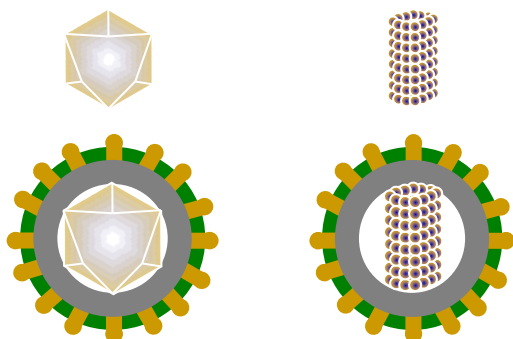
Hình tràng hạt: chỉ tenuivirus.

Virus trần và virus có vỏ bọc

Virus nói chung được chia làm 2 nhóm: virus trần (naked capsid virus) và virus có vỏ bọc (enveloped virus) (Hình 3-1).

Đa số virus thực vật và thực khuẩn thể thuộc nhóm virus trần. Phân tử virus chỉ được cấu tạo bởi lõi acid nucleic và vỏ protein. Cấu trúc acid nucleic + protein vỏ còn được gọi là nucleocapsid.

Một số virus thực vật thuộc nhóm bền vững tái sinh (nhân lên trong tế bào vector; ví dụ như tospovirus, reovirus và nucleo/cytorhabdovirus) và nhiều virus động vật có một vỏ bọc bên ngoài. Bên trong vỏ bọc là nucleocapsid gồm bộ gen virus được bao bọc bởi lớp vỏ pretein. Vỏ bọc được cấu tạo bởi (i) một lớp màng kép lipid, thường có nguồn gốc từ màng tế bào hoặc màng cơ quan tử của tế bào ký chủ; (ii) các phân tử glycoprotein (thường có nguồn gốc từ virus) nhô lên trên bề mặt.



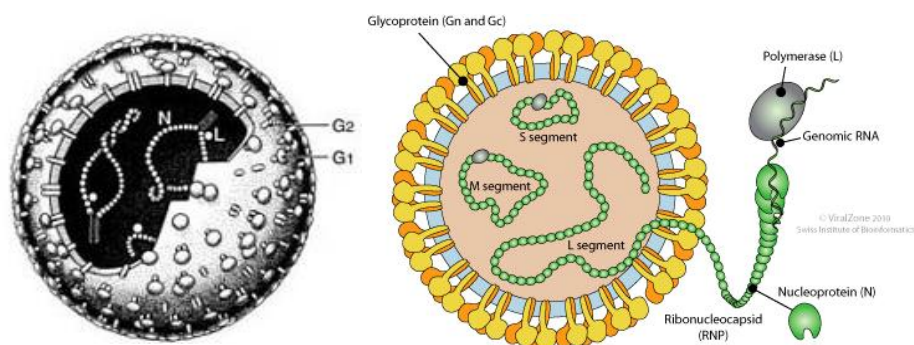
Hình 1-3. Minh họa virus trần (hàng trên) và virus có vỏ bọc (hàng dưới)

Một ví dụ cho nhóm các virus có vỏ bọc là các virus thuộc họ *Bunyaviridae*. Phần lớn bunyavirus gây bệnh trên động vật (ví dụ hantavirus, nairovirus và phlebovirus) nhưng một số hại thực vật như các virus thuộc chi *Tospovirus*, điển hình là Tomato spotted wilt virus (TSWV). Các bunyavirus có cấu trúc phân tử (virion) giống nhau (Hình 3-2). Phân tử virus có hình cầu, kích thước 80 – 120 nm và có lớp vỏ bọc cấu tạo bởi:

Một lớp màng kép lipid dày ~ 5 nm, có nguồn gốc từ màng tế bào ký chủ.

Hai loại gai (mấu) nhỏ cấu tạo bằng glycoprotein nhô trên bề mặt với phần cuống gai nằm chìm trong lớp màng kép lipid. Độ dày của lớp gai ~ 5-10 nm. Hai loại gai này là 2 loại phân tử glycoprotein, ký hiệu là Gn và Gc (còn được ký hiệu là G1 và G2).

Bên trong vỏ bọc là 3 phân tử nucleoprotein cấu tạo bởi RNA genome liên kết với các phân tử protein (các phân tử protein này được gọi là các nucleoprotein) và một số enzyme phiên mã transcriptase.



Hình 1-4 Sơ đồ cấu trúc phân tử của các bunyavirus

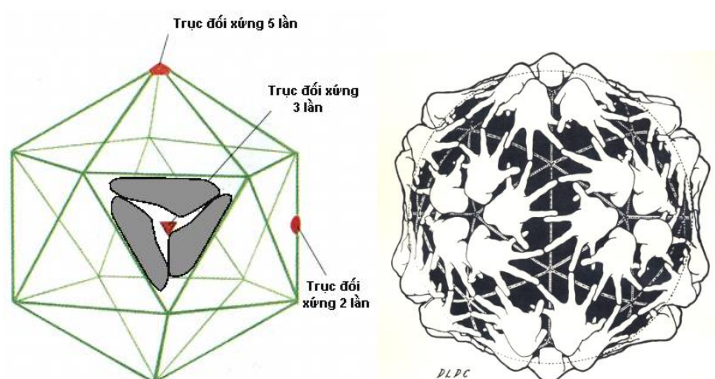
Cấu trúc phân tử virus

Về cấu trúc, các phân tử virus thực vật (và cả các virus ký sinh động vật, nấm, vi khuẩn) gồm 2 nhóm chính: (i) cấu trúc khối đa diện đối xứng dạng icosahedron và (ii) đối xứng xoắn. Ngoài ra, một số virus động vật và thực khuẩn thể có cấu trúc phân tử phức tạp và được xếp vào nhóm (iii) gọi là nhóm không đối xứng.

Cấu trúc dạng khối đa diện đối xứng (icosahedron)

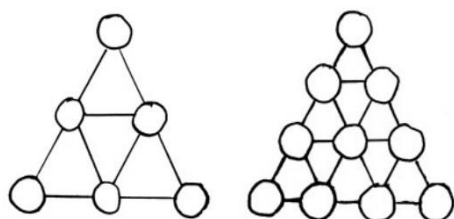
Các virus thực vật có cấu trúc phân tử loại icosahedron rất phổ biến. Icosahedron là một hình đa diện cấu tạo bởi 20 tam giác đều, và do đó có 12 đỉnh và 30 cạnh. Cấu trúc này dẫn tới icosahedron có 3 trục đối xứng. Trục đối xứng 3 lần là trục xuyên tâm tam giác; trục đối xứng 5 lần là trục xuyên đỉnh và trục đối xứng 2 lần là trục xuyên trung điểm của cạnh. Cấu trúc khối đa diện đối xứng bắt gặp ở các virus có hình thái phân tử dạng hình cầu, hình cầu kép, hình giống vi khuẩn và hình viên đạn.

Vì phải cần tối thiểu 3 tiểu phần để tạo thành một tam giác nên một hình icosahedron sẽ phải cần tối thiểu $3 \times 20 = 60$ tiểu phần. Chỉ một vài loại virus có số lượng tiểu phần = 60 (ví dụ như các nepovirus hại thực vật). Ngoài ra, tại mỗi đỉnh, các tiểu phần thường lắp ráp với nhau thành các pentamer (5 tiểu phần) nhô lên rõ rệt (Hình 3-3).



Hình 1-5 Cấu trúc đối xứng đa diện icosahedron cơ bản của virus ($T=1$, số tiểu phần = 60)

Để biểu diễn số lượng và cách sắp xếp của các tiểu phần protein, người ta sử dụng số T dựa theo lý thuyết “gần đồng đều – quasi-equivalence” do Caspar và Klug đề xuất năm 1962. Lý thuyết cho rằng khi số tiểu phần = 60 thì các tiểu phần sẽ sắp xếp và chiếm các vị trí đồng đều (dạng cơ bản). Tuy nhiên, khi số tiểu phần >60 thì các tiểu phần sẽ sắp xếp và chiếm các vị trí gần đồng đều. Số T là số tam giác phụ trên tam giác chính của hình icosahedron (Hình 3-4).



Hình 1-6. Hai hình tam giác đều với số tam giác phụ $T = 4$ (trái) và $T = 9$ (phải)

Số T được tính theo công thức $T = h^2 + hk + k^2$ (h và k là các số nguyên không âm và không có nhân tử chung).

Cấu trúc dạng đối xứng xoắn

Cấu trúc đối xứng xoắn là cấu trúc của các virus có dạng hình gậy hoặc hình sợi (phần đuôi của nhiều thực khuẩn thể cũng có cấu trúc tương tự). Trong cấu trúc đối xứng xoắn, các tiểu phần protein sắp xếp theo đường xoắn xung quanh 1 trục. Nhìn chung, cấu trúc này giúp phân tử virus có năng lượng tự do phù hợp dẫn tới phân tử có thể mềm dẻo chẳng hạn ở dạng sợi mềm hoặc gấp lại nhưng không bị đứt gãy.

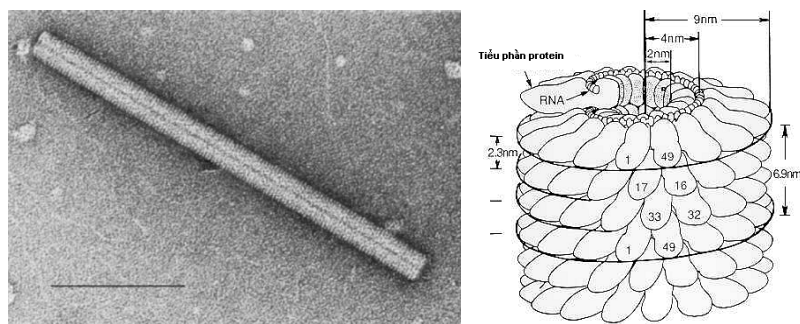
Một virus điển hình được nghiên cứu đầy đủ nhất về cấu trúc đối xứng xoắn là TMV. Một phân tử TMV chỉ chứa một phân tử RNA (~ 6.4 kb) được bao bọc bởi một lớp vỏ gồm 2123 tiểu phần protein (mỗi tiểu phần là một phân tử protein có kích thước 158 amino acid (17.3 kD). Các tiểu phần protein lắp ráp với RNA virus theo cấu trúc xoắn (Hình 3-5) với chi tiết như sau:

Ba nucleotide trên phân tử RNA liên kết với 1 tiểu phần protein.

Một đơn vị lặp hoàn hảo gồm 49 tiểu phần / 3 vòng xoắn và tạo ra độ dài 6.9 nm (tổng độ dài phân tử ~ 300 nm).

Đường kính phân tử là 18 nm còn đường kính lõi rỗng là 4 nm.

Cần chú ý là TMV có thể tự lắp ráp thành phân tử hoàn chỉnh từ 1 hỗn hợp các tiểu phần protein + acid nucleic trong ống nghiệm.

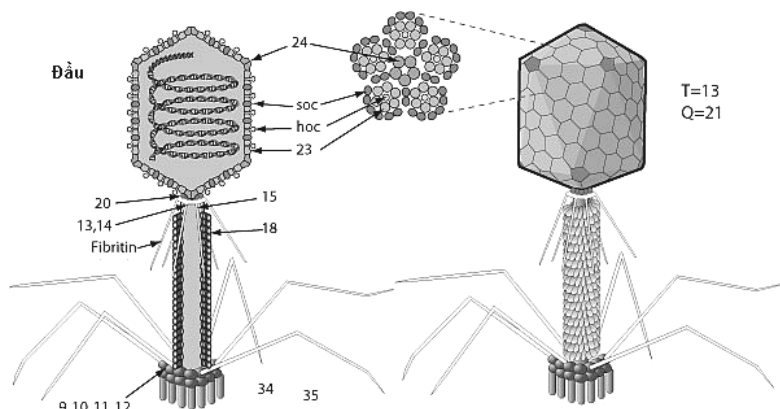


Hình 1-7 Cấu trúc đối xứng xoắn của TMV

Cấu trúc không đối xứng

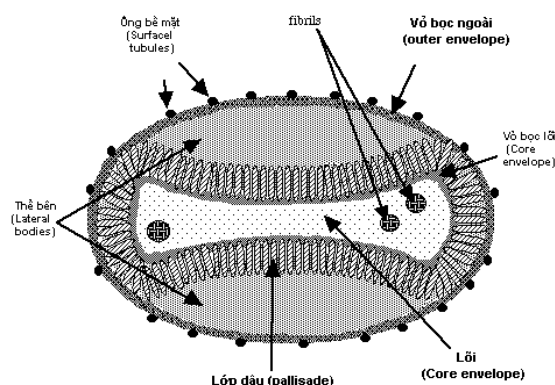
Cấu trúc không đối xứng lại gồm 2 nhóm phụ là (i) dạng nòng nọc và (ii) dạng có cấu trúc giống tế bào. Dạng cấu trúc phức tạp này không có ở virus thực vật.

Dạng nòng nọc. Dạng này chỉ gồm các thực khuẩn thể có đuôi (ví dụ T4, T7, lamda). Thực chất, phần đầu của thực khuẩn thể có cấu tạo khối đối xứng nhưng phần đuôi lại là cấu trúc đối xứng xoắn. Ngoài ra chúng còn có đĩa bám ở cuối đuôi và lông bám (Hình 3-6).



Hình 1-8 Cấu trúc dạng nòng nọc của thực khuẩn thể T4 (Viralzone, 2009)

Dạng cấu trúc giống tế bào. Một số virus có kích thước rất lớn như virus đậu mùa (poxvirus). Virus có kích thước ~200 – 400 nm và cấu trúc rất phức tạp giống như tế bào. Virion của chúng chứa tới ~100 protein khác nhau, có nhiều lớp màng (Hình 3-7).



Hình 1-9 Cấu trúc phức tạp của virus đậu mùa

Thành phần cấu tạo của phân tử virus

Acid nucleic

Bộ gen có trong phân tử virus gồm DNA hoặc RNA, nhưng không bao giờ có cả 2 loại. Đa số virus thực vật (khoảng 80%) có bộ gen RNA. Bộ gen của virus có các đặc điểm sau:

Sợi đơn hoặc sợi kép

Mạch thẳng hoặc mạch vòng

Cực âm hoặc cực dương hoặc lưỡng cực

Phân đoạn hoặc không phân đoạn. Cần chú ý rằng tùy loại virus mà các phân đoạn được lắp trong cùng một virion hay lắp ráp riêng biệt.

Phần lớn các virus thực vật có bộ gen RNA sợi đơn, cực (+)

Protein

Protein của virus nhìn chung được chia làm 2 loại: Protein cấu trúc (có mặt trong phân tử virus) và protein phi cấu trúc (hình thành trong tế bào ký chủ trong quá trình gây bệnh). Các protein cấu trúc chính của virus gồm các loại sau:

Protein vỏ (coat protein, CP): Có thể gồm 1 hay nhiều loại

Enzymes: Đối với các virus RNA thực vật, enzyme chủ yếu có mặt trên phân tử virus là enzyme sao mã RNA (RdRp). Đối với các virus động vật, còn có thêm các enzyme cần cho quá trình xâm nhập và nhân biết ký chủ (ví dụ neuramidase của virus cúm gia cầm). Đối với thực khuẩn thể, virion của chúng còn có lysozim để giúp xâm nhập tế bào vi khuẩn.

Glycoproteins: Đây là các protein liên kết đường, dạng protein xuyên màng, có vai trò quan trọng đối với virus động vật và virus thực vật truyền qua vectơ theo kiểu bền vững tái sinh.

Lipid

Đối với các virus có vỏ bọc (một số virus thực vật, chẳng hạn các virus truyền qua vectơ theo kiểu bền vững tái sinh và nhiều virus động vật) thì vỏ bọc của chúng được cấu tạo bởi lớp màng kép phospholipid do lớp màng này có nguồn gốc từ màng tế bào hoặc màng cơ quan tử của tế bào ký chủ.

So sánh cấu trúc các nhóm virus

Bảng 1-2. So sánh một số đặc điểm hình thái – cấu trúc của các nhóm virus

Đặc điểm	Thực vật	Động vật	Vi khuẩn	Nấm	Protozoa
Kích thước bộ gen RNA (kb)	0.3-28	5 – 30	5 – 8	2.5 – 28	5 – 10
Kích thước bộ gen DNA (kb)	3 – 10	3 – 350	10 - 200	Không	180 – 1200
Số virus có vỏ bọc	Ít	Nhiều	Ít	Ít	Tất cả
Mức độ phức tạp của bộ gen	Ít	Thay đổi	Thay đổi	Ít	Thay đổi
Mức độ phức tạp về hình thái	Ít	Thay đổi	Thay đổi	Ít	Thay đổi
Số virus có bộ gen phân mảnh	Nhiều	Một số	Ít	Một số	Không

1.4. TÁI SINH VIRUS (REPLICATION)

Khái niệm

Sự tái sinh (replication) hay sinh sản là sự hình thành phân tử virus mới từ phân tử virus ban đầu. Sau khi xâm nhập vào tế bào ký chủ, sự tái sinh virus trải qua 4 giai đoạn chính:

- Tháo vỏ để giải phóng bộ gen virus
- Tổng hợp protein virus
- Tổng hợp bộ gen virus mới
- Lắp ráp phân tử virus

Đặc điểm tái sinh virus

Sự tái sinh virus, mặc dù khác nhau tùy nhóm, nhưng đều có đặc điểm chung sau:

Virus sử dụng vật liệu của tế bào ký chủ (amino acid, nucleotide) để tổng hợp protein và acid nucleic của chính virus.

Virus sử dụng năng lượng của tế bào ký chủ (chủ yếu dưới dạng các hợp chất cao năng như ATP) để tổng hợp protein và acid nucleic của chính virus.

Virus sử dụng bộ máy tổng hợp protein của tế bào ký chủ (ribosome, tRNA và các enzyme liên quan) để tổng hợp protein của virus. Quá trình tổng hợp sẽ dựa trên khuôn mRNA của virus. Trong nhiều trường hợp (đối với các virus RNA cực dương) thì bản thân bộ gen virus đóng vai trò như mRNA. Tất cả virus thực vật sử dụng ribosome 80S của tế bào ký chủ.

Hầu hết các virus thực vật tổng hợp 1 hoặc 1 số enzyme cần thiết cho quá trình tổng hợp bộ gen virus. Ví dụ:

Tất cả các virus RNA mã hóa RdRp (RNA-dependent RNA polymerase). RdRp là một enzyme polymer hóa và có chức năng tổng hợp RNA trên khuôn RNA.

Các geminivirus (có bộ gen DNA sợi vòng đơn) mã hóa Rep (replication) protein. Rep không phải là một enzyme có chức năng polyme hóa nhưng có chức năng cắt và nối các phân tử DNA virus trong quá trình tổng hợp sợi DNA virus.

Tóm lại, sự tái sinh virus phụ thuộc hoàn toàn vào bộ máy tổng hợp protein và acid nucleic của tế bào ký chủ. Sở dĩ như vậy là do virus nói chung và virus thực vật nói riêng chỉ mã hóa một số ít gen; ví dụ các begomovirus chỉ mã hóa 5 – 8 gen, các potyvirus chỉ mã hóa 10 gen.

Tái sinh của các virus có bộ gen RNA sợi (+)

Phần lớn virus thực vật có bộ gen RNA sợi dương (xem phần phân loại). Các bước chủ chốt của sự tái sinh của tất cả các virus thuộc nhóm này (Hình 4-1) bao gồm:

Tổng hợp protein virus

Bộ gen RNA sợi (+) đóng vai trò như là mRNA. Vì virus không có các gen mã hóa các yếu tố cần cho quá trình dịch mã và ribosome, chúng phải sử dụng bộ máy dịch mã của ký chủ để hoàn thành bước này. Trong số các protein virus được tổng hợp, một số có vai trò quan trọng trong quá trình tái sinh bao gồm:

RNA-dependent RNA polymerase (RdRp). RdRp xúc tác sự tổng hợp sợi RNA mới trên khuôn RNA.

Helicase. Enzyme này có chức năng tháo xoắn (tách sợi RNA kép thành sợi RNA đơn) trong quá trình tái sinh bằng cách phá vỡ liên kết hydro. Tháo xoắn là quá trình cần năng lượng nên các helicase cũng có chức năng thủy phân adenosine triphosphate (ATP).

Methyl transferase (MT). Enzym này có chức năng tạo mũ cho đầu 5' của bộ gene RNA của một số virus giống như ở mRNA của ký chủ. Chỉ các virus yêu cầu một mũ Cap đầu 5' (m^7G5') như furovirus và pecluvirus mới cần chức năng này.

Hình thành phức hợp tái sinh VRC (viral replication complex)

Phức hợp tái sinh bao gồm RNA virus, các protein virus hình thành ở bước 1 và các protein ký chủ cần thiết cho quá trình tái sinh. Vì RNA virus đóng vai trò như mRNA cho quá trình dịch mã và là khuôn cho quá trình tái sinh nên cả 2 quá trình này thường liên quan chặt chẽ với nhau. Do vậy, cần phải có một cơ chế điều hòa để cho phép chuyển từ chế độ dịch mã sang chế độ tái sinh và để tránh sự xung đột của các ribosome, di chuyển từ đầu 5' sang đầu 3', và RdRp, di chuyển theo chiều ngược lại.

Phức hợp tái sinh luôn liên quan tới các cấu trúc màng của tế bào ký chủ bao gồm: màng lưới nội chất, màng ngoài lục lạp, màng không bào, màng proxisome, màng ty thể và màng nhân. Các màng này biến đổi, hình thành các cấu trúc dạng **cầu rỗng**, bên trong chứa phức hợp tái sinh. Sự gắn kết giữa phức hợp tái sinh và màng được thực hiện nhờ một hoặc nhiều protein có nguồn gốc virus hoặc ký chủ, được gọi là các protein mỏ neo. Các protein mỏ neo thường tổng hợp vào màng, có khả năng biến đổi màng và liên kết với phức hợp tái sinh thông qua các protein cần cho sự tái sinh nhờ tương tác protein – protein. Loại màng của cấu trúc tế bào tham gia lắp ráp phức hợp tái sinh khác nhau tùy virus, chẳng hạn đối với TMV là màng lưới nội chất, đối với CMV là màng không bào...

Tái sinh bộ gen virus

Đầu tiên, RNA (+) tức sợi virus sẽ được dùng làm khuôn để tổng hợp sợi (-). Sự tổng hợp sợi (-) được bắt đầu từ đầu 3' của sợi (+). Các virus RNA có cấu trúc rất đa dạng về đầu 3' gồm 3 loại:

- Chứa 1 vùng không dịch mã 3'UTR + 1 đuôi polyA (ví dụ các potyvirus, potexvirus)
- Chứa 1 vùng không dịch mã 3'UTR có cấu trúc giống tRNA (ví dụ tymovirus, cucumovirus, tobamovirus)
- Chứa 1 vùng không dịch mã 3'UTR và không có đuôi polyA (ví dụ closterovirus, luteovirus)

Tất cả các vùng không dịch mã 3'UTR đều có cấu trúc thứ cấp và các dấu hiệu cho phép RdRp và các protein cần thiết tiếp cận để tổng hợp sợi (-).

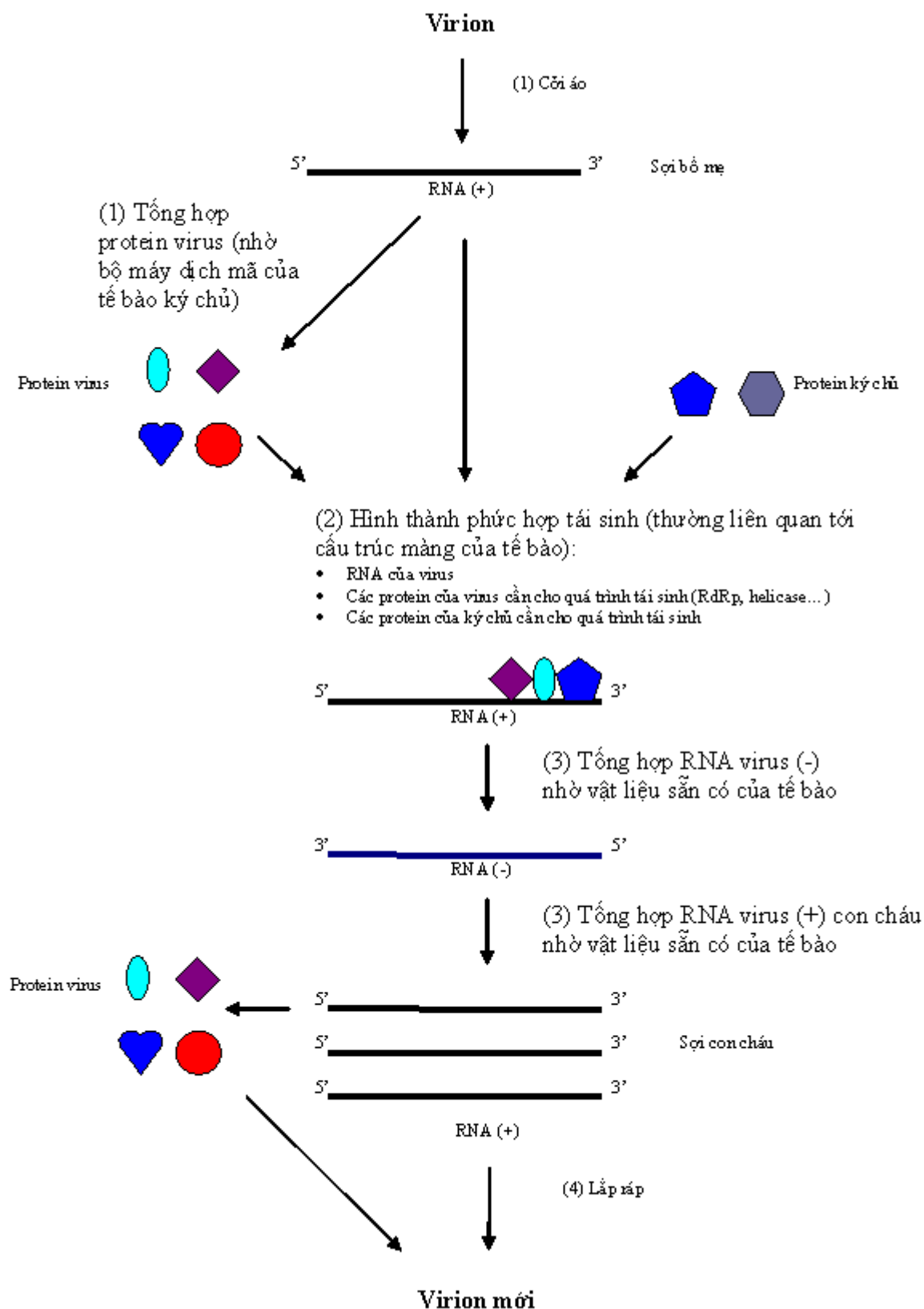
Trên khuôn sợi (-), quá trình tái bản sợi (+) tức bộ gen virus bắt đầu được thực hiện. Cần chú ý rằng một khuôn sợi (-) được sử dụng để tổng hợp nhiều sợi (+).

Quá trình tái bản sẽ hình thành 2 loại phân tử RNA:

- Loại tái bản RF (replicative form): là 1 phân tử RNA sợi kép hoàn hảo hình thành khi tổng hợp sợi (-) trên khuôn sợi (+).
- Loại trung gian tái bản RI (replicative intermediate): là các phân tử RNA sợi kép trung gian hình thành trong quá trình tái bản sợi (+). Ở dạng RI, nhiều phân tử RNA sợi (+) sẽ gắn trên 1 phân tử RNA sợi (-).

Lắp ráp thành phân tử virion mới

Khi có đủ RNA sợi (+) và protein cấu trúc, chủ yếu là CP, các phân tử này tiến hành lắp ráp tạo virion mới. Quá trình lắp ráp này cũng được thực hiện trong phức hợp tái sinh.



Hình 1-10 Sơ đồ tái sinh virus RNA sợi đơn, cực (+)

Tái sinh của các virus có bộ gen RNA sợi (-)

Điểm khác biệt cơ bản là sợi RNA genome của virus không được sử dụng để dịch mã. Về cơ bản quá trình tái sinh của virus RNA sợi đơn cực (-) khá giống với các virus RNA sợi đơn cực (+). Tuy nhiên có một số điểm khác biệt về trình tự, tóm tắt như sau (Hình 4-2):

Xâm nhập => tháo vỏ để giải phóng bộ gen virus sợi (-).

Sợi (-) được dùng làm khuôn để “phiên mã” thành các mRNA của các gen virus và tiếp theo tổng hợp các protein virus.

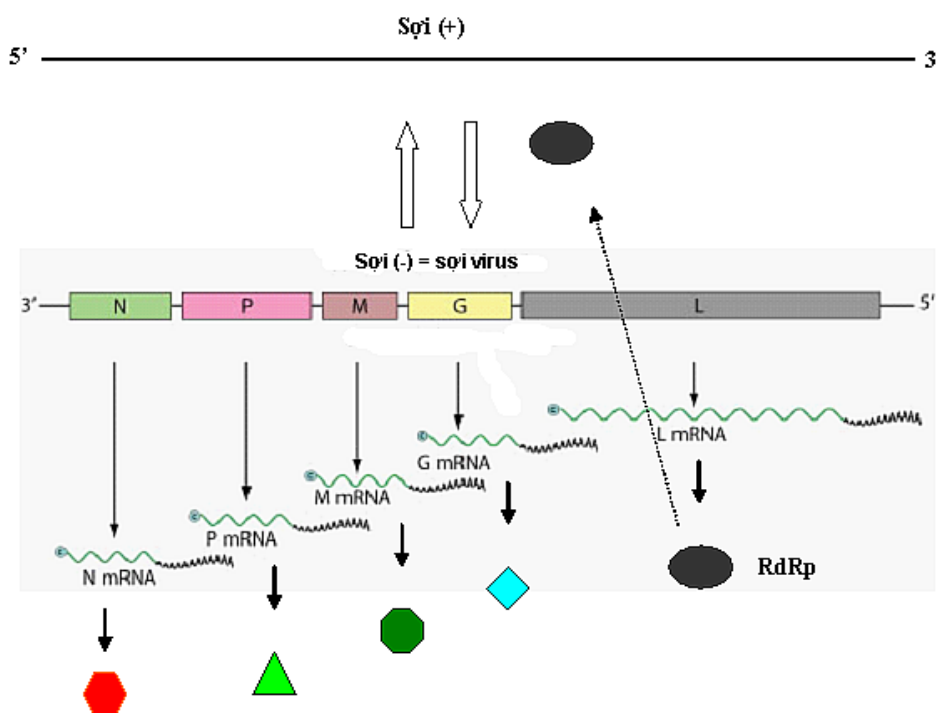
Sợi (-) được dùng làm khuôn để tổng hợp sợi (+) có kích thước bằng sợi (-). Sợi (+) này sẽ giữ vai trò làm khuôn để tổng hợp (-) sợi virus. Trên khuôn sợi (-) mới, các mRNA lại tiếp tục được tổng hợp để tạo protein virus

Lắp ráp virion mới.

Cần chú ý 2 điểm khác biệt liên quan đến tái sinh các virus RNA sợi (-)

Mặc dù được ký hiệu là sợi (+) nhưng sợi này không được sử dụng trực tiếp để dịch mã

Đối với tất cả các virus RNA sợi âm thì trong thành phần virion của chúng bao giờ cũng có RdRp để đảm bảo khi xâm nhập vào tế bào ký chủ, bộ gen phải được “phiên mã” ngay sang mRNA.



Hình 1-11 Sơ đồ tái sinh của rhabdovirus

Một số các họ virus quan trọng có bộ gen RNA sợi đơn, cực âm bao gồm:

- Họ *Rhabdoviridae*. Đây là một họ lớn. Các rhabdovirus phần lớn gây hại động vật (ví dụ Rabies virus, gây bệnh dại). Các rhabdovirus hại thực vật chỉ thuộc 2 chi là *Nucleorhabdovirus* (ví dụ Rice yellow stunt virus (RYSV) gây bệnh vàng lụi lúa) và *Cytorhabdovirus*. Ngoại trừ các cytorhabdovirus tái sinh trong tế bào chất thì tất cả các rhabdovirus khác đều tái sinh trong nhân tế bào ký chủ (Hình 4-4).
- Họ *Bunyaviridae* (ví dụ Hantavirus gây bệnh sốt, TSWV gây bệnh đốm héo cà chua).
- Ngoài ra, một số các virus thuộc chi *Tenuivirus* (ví dụ RGSV gây bệnh vàng lùn lúa).

Tái sinh của virus RNA sợi kép

Trong số 9 họ virus có bộ gen dsRNA (Birnaviridae, Cystoviridae, Chrysoviridae, Endornaviridae, Hypoviridae, Partitiviridae, Picobirnaviridae, Reoviridae, Totiviridae) thì họ Reoviridae là họ được nghiên cứu nhiều nhất.

Reoviridae là một họ lớn, đa dạng, gồm các virus gây hại cả động vật và thực vật. Tất cả các virus hại thực vật đều truyền qua vector rầy và lan truyền theo kiểu bền vững tái sinh. Các reovirus có bộ gen phân đoạn gồm trên dưới 10 phân tử dsRNA sợi kép đều được lắp ráp trong 1 phân tử virus hình khối đa diện với 2 lớp vỏ. Phân tử virus bị loại bỏ lớp vỏ ngoài được gọi là “lõi virus, core”.

Quá trình tái sinh của reovirus diễn ra trong tế bào chất và có thể được tóm tắt như sau (Hình 4-3):

Virus xâm nhập tế bào ký chủ, loại bỏ lớp vỏ ngoài (do protease của tế bào ký chủ) để tạo thành phân tử “lõi” virus. RdRp của virus (là một protein cấu trúc có mặt trong phần lõi) thực hiện phiên mã trên khuôn RNA sợi (-) để tạo thành các phân tử mRNA, đây là các phân tử mRNA monocistronic của virus được mũ hóa nhưng không tạo đuôi poly A. Các phân tử mRNA này thoát khỏi lõi vào tế bào chất.

Trong tế bào chất, các protein virus được dịch mã trên khuôn mRNA của virus.

Lắp ráp các mRNA tức là các phân tử RNA sợi (+) của virus và các protein virus tạo thành phân tử virus “lõi” mới.

Trong phân tử “lõi” mới, sợi RNA (+) của virus được phiên mã thành phân tử RNA sợi (-) để tạo thành phân tử RNA sợi kép.

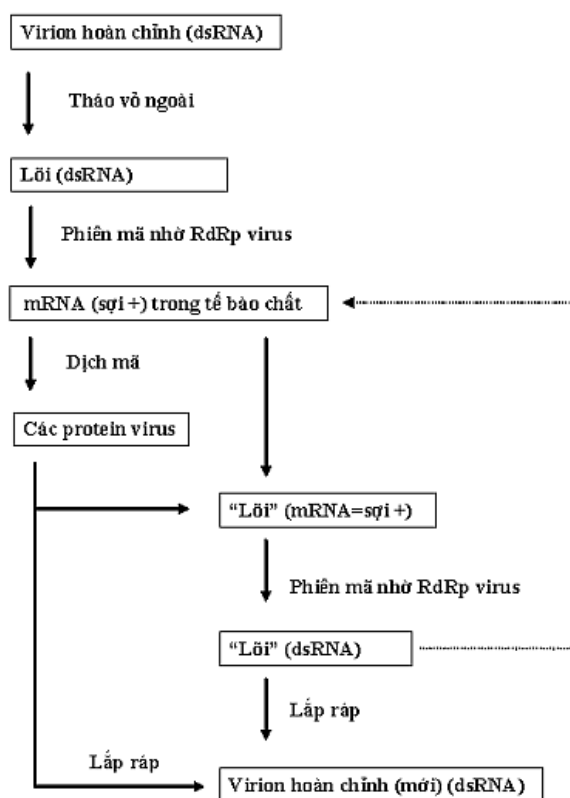
Trong phân tử “lõi” mới, quá trình phiên mã mới trên khuôn sợi RNA (-) lại tiếp tục để tạo các phân tử tạo mRNA (sợi +) mới.

Các phân tử “lõi” tiếp tục lắp ráp với các protein cấu trúc khác để tạo phân tử virion hoàn chỉnh

Như vậy có thể thấy 2 điểm khác biệt của quá trình tái sinh phân tử virus RNA sợi kép:

Quá trình tạo mRNA không phải bên ngoài tế bào chất mà được thực hiện trong phân tử “lõi” của virus.

Khi bắt đầu lắp ráp, virus không phải lắp ráp các phân tử RNA sợi kép mà là các phân tử RNA sợi đơn cực (-). Trong quá trình “chín”, các phân tử RNA sợi kép mới tiếp tục được hoàn thiện.



Hình 1-12 Sơ đồ tái sinh virus RNA sợi kép

Tái sinh của virus RNA qua phiên mã ngược (retrovirus)

Các khái niệm

Transposons: là các chuỗi DNA trong bộ gen có thể tự di chuyển (transpose) từ vị trí này sang vị trí khác trên bộ gen. Transposons là một trong nhiều loại yếu tố di động của bộ gen. Người phát hiện ra transposons đầu tiên là Barbara McClintock (giải Nobel năm 1948 cho công trình phát hiện transposon trên cây ngô). Transposons được chia thành 2 nhóm:

DNA transposons: quá trình thay đổi vị trí được thực hiện theo hình thức “cắt – chèn”.

Retrotransposons: quá trình thay đổi vị trí theo hình thức “copy - chèn” và được thực hiện qua 2 giai đoạn: (i) DNA phiên mã thành RNA => (ii) phiên mã ngược lại thành DNA. Các phiên bản copy DNA mới này được chèn vào các vị trí khác trên bộ gen.

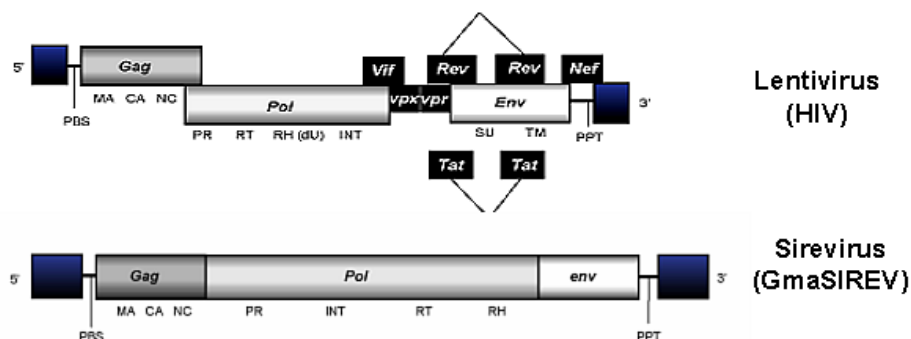
Retrovirus: là các virus RNA có đặc điểm tái sinh bộ gen thông qua phiên mã ngược nhờ enzyme phiên mã ngược Reverse transcriptase. Đối với các retrovirus, luôn có pha tổng hợp bộ gen virus vào bộ gen ký chủ.

Các retrovirus động vật, ví dụ như các virus thuộc chi *Lentivirus*, họ *Retrovirus* như Human immunodeficiency virus (HIV) có bộ gen RNA sợi đơn, cực +, kích thước khoảng 8-9 kb, được bao quanh bởi 2 chuỗi LTR 0,2-1 Kb, có các gen như *gag*, *pol*, *env*. Ngoài ra các lentivirus cũng chứa nhiều gen bổ trợ.

Reverse transcriptases (RTs) từ 2 retrovirus hại động vật là Avian myeloblastosis virus (AMV) và Moloney murine leukemia virus (MMLV) hiện đang được sử dụng phổ biến để thực hiện các phản ứng RT-PCR

Các **retrovirus thực vật** (ví dụ các virus thuộc chi *Sirevirus*, họ *Pseudoviridae* như Glycine max SIRE1 virus (GmaSIREV) cũng có đặc điểm giống các retrovirus động vật như: có bộ gen RNA sợi đơn, cực +, kích thước 9-10 kb, được bao quanh bởi 2 chuỗi lặp dài khoảng 0.5 - 1.2 kb ở đầu (LTR, Long Terminal Repeats), có 3 ORF mã hóa cho gen *gag*, *pol* và *env* (Hình 4-4). Các sirevirus phát hiện thấy ở nhiều loài cây 1 lá mầm và 2 lá mầm.

Một số điểm chú ý về retrovirus thực vật: (i) cơ chế gây bệnh vẫn chưa được hiểu rõ; (ii) chúng được xem là các endovirus, có nghĩa bộ gen của chúng được tổng hợp trong bộ gen của cây ký chủ và được lan truyền theo chiều dọc cùng với bộ gen của cây ký chủ qua các thế hệ sau; (ii) virion chỉ hình thành trong quá trình tái sinh virus (phần lớn vẫn chưa được nghiên cứu).



Hình 1-13 Tổ chức bộ gen của 1 retrovirus động vật (HIV) và của 1 retrovirus thực vật (GmaSIREV)

LTR (Long Terminal Repeats) là các chuỗi đóng vai trò quan trọng trong quá trình dịch chuyển vị trí của các retrovirus (và các yếu tố di động retroelements khác). Điển hình, một chuỗi LTR thường gồm 3 phần:

- Một vùng U3 khoảng 200-1.200 nucleotide chứa promoter.
- Một vùng lặp R.
- Một vùng U5 khoảng 75-250 nucleotides chứa phần đầu tiên của bộ gen.

Ngoài ra, liền kề phía hạ lưu chuỗi LRT đầu 5' có một chuỗi PBS (Primer Binding Site) khoảng 18 nucleotide là vị trí gắn mỗi tRNA trong quá trình phiên mã ngược; và liền kề phía thượng lưu chuỗi LRT đầu 3' có một chuỗi nhỏ ~10 A/G gọi là PPT (Polypurine Tract) là vị trí bắt đầu tổng hợp sợi DNA (-).

Các retrovirus có một số các ORF mã hóa cho các protein đặc trưng sau:

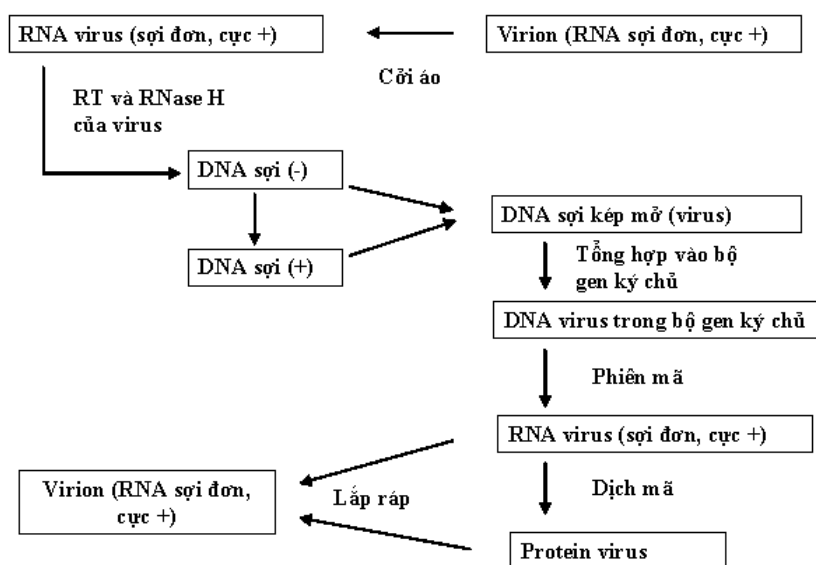
- Gen *gag* mã hóa một polyprotein và tiếp theo được xử lý thành một số protein cấu trúc của virus
- Gen *pol* mã hóa một polyprotein và được xử lý sau dịch mã thành các protein chức năng là PR (protease) chịu trách nhiệm phân cắt các protein khỏi polyprotein; RT (Reverse Transcriptase) là enzyme phiên mã ngược, RH (RNase H) phân hủy nửa RNA trên từ heteroduplex RNA:DNA, INT (Integrase) tổng hợp bộ gen DNA virus vào bộ gen ký chủ.
- Gen *env* (envelope): tất cả các retrovirus động vật và một số retrovirus thực vật có gen này. Gen *env* mã hóa cho các protein liên quan đến vỏ bọc của virus và do đó đặc biệt quan trọng đối với các virus động vật.

Đối với các retrovirus động vật còn có các ORF phụ mã hóa cho các protein điều hòa phiên mã như *tat*, *rev*, *vif* và *nef*.

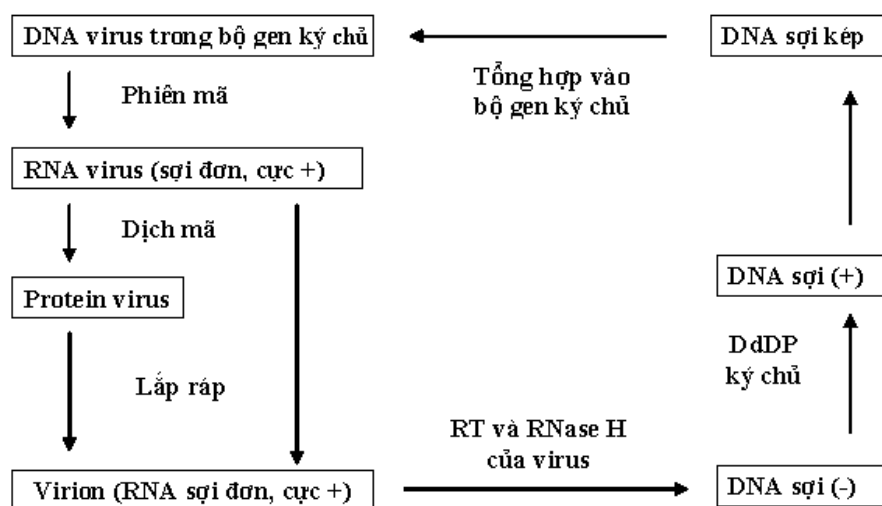
Quá trình tái sinh của retrovirus

Bộ gen của các retrovirus được xem là cực (+) nhưng không được dịch mã trực tiếp ngay. Trong tế bào, bộ gen RNA của virus được phiên mã ngược nhờ Reverse transcriptase thành DNA sợi đơn cực (-), tiếp theo, được tổng hợp thành phân tử DNA sợi kép. Phân tử DNA sợi kép của virus này được tổng hợp vào bộ gen của ký chủ. Bộ gen DNA virus được phiên mã thành RNA sợi (+). Các phân tử RNA sợi (+) này được dịch mã giống như gen ký chủ để tạo ra các protein. Protein virus và các phân tử RNA (sợi +) này được lắp ráp thành virion (Hình 4-5 và Hình 4-6).

Cần chú ý đối với retrovirus thực vật thì bộ gen DNA virus luôn nằm trong bộ gen ký chủ. Virion chỉ hình thành trong quá trình tái sinh.



Hình 1-14 Sơ đồ tái sinh của retrovirus động vật



Hình 1-15 Tái sinh của retrovirus thực vật

Tái sinh của virus DNA sợi vòng đơn

Đối với virus thực vật, chỉ có các virus thuộc hai họ *Geminiviridae* và *Nanoviridae* là có bộ gen DNA sợi vòng đơn. Một số các virus động vật thuộc họ *Circoviridae* (ví dụ Porcine circoviral virus type 2 (PCV2) gây bệnh còi cọc lợn sữa), họ *Anelloviridae* (một nhóm virus mới phát hiện trên người) cũng có bộ gen DNA sợi vòng đơn. Các virus này đều tái sinh theo cơ chế vòng lăn (rolling circular mechanism). Cơ chế vòng lăn có thể được chia làm 2 pha và được thực hiện trong nhân tế bào ký chủ.

Các geminivirus và nanovirus đều mã hóa một protein gọi là Rep (đối với geminivirus) hoặc Master Rep (đối với nanovirus). Các protein này không có chức năng polymerase nhưng có chức năng cắt và nối phân tử DNA ở một vị trí đặc biệt trên bộ gen virus. Vị trí này là một chuỗi bảo thủ cao (TAATATTAC đối với geminivirus và TA(T/G)TATTAC đối với nanovirus). Vị trí TA (gạch chân) chính là vị trí mà protein Rep/MasterRep cắt và nối phân tử DNA của virus. Chuỗi bảo thủ này nằm trên vùng gọi là “nguồn gốc tái bản” (*ori*, origin of replication). *Ori* bao gồm một cấu trúc thân-thòng lọng (Stem-loop), chuỗi bảo thủ ở trên và các trình tự lặp đảo ngắn (khoảng 4-5 nucleotid) gọi là interon cần thiết cho Rep nhận biết và bám vào sợi DNA của virus để bắt đầu tái bản.

Quá trình tái sinh của geminivirus và nanovirus (Hình 4-7) diễn ra như sau:

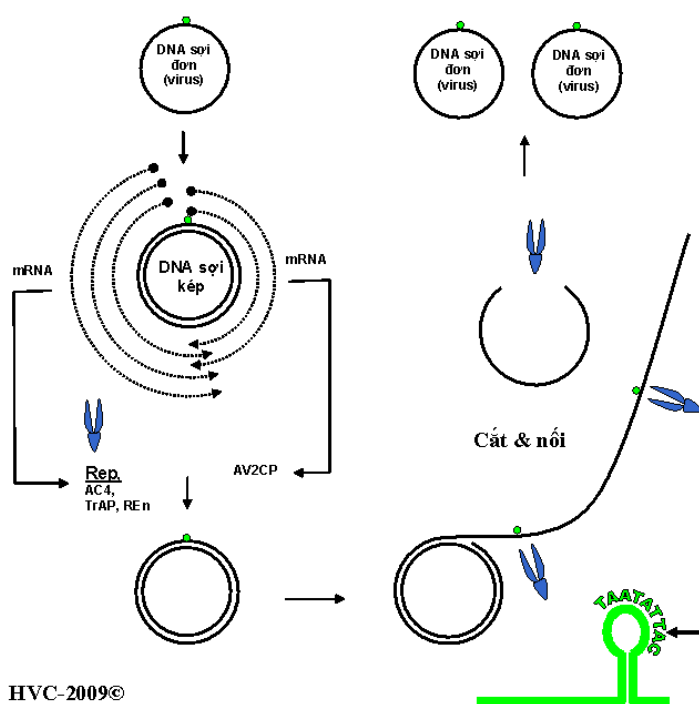
Virus xâm nhập vào tế bào và cởi áo giải phóng bộ gen DNA virus.

Bộ gen được vận chuyển vào nhân. Trong nhân, quá trình tái sinh xảy ra theo 2 pha:

Pha 1 (pha tổng hợp sợi kép). Trong nhân, phân tử DNA sợi vòng đơn (bộ gen có mặt trong phân tử virus) được tổng hợp thành phân tử DNA vòng kép. Quá trình khởi đầu tổng hợp sợi kép vẫn chưa được hiểu rõ. Như vậy sợi kép sẽ gồm một sợi virus và một sợi đối virus. Trên sợi kép này, các gen được phiên mã (trên cả 2 sợi đối với geminivirus) để tạo các mRNA. Các mRNA được vận chuyển ra tế bào chất và dịch mã để tạo ra các protein virus, trong đó có Rep/Master Rep. Như vậy, quá trình phiên mã và dịch mã của virus hoàn toàn dựa vào bộ máy phiên mã và dịch mã của tế bào ký chủ. Rep/Master Rep lại quay trở lại nhân để tham gia tổng hợp bộ gen virus.

Pha 2 (pha vòng lăn). Tiếp theo là pha tái sinh theo cơ chế vòng lăn: Protein Rep/Master Rep sẽ cắt sợi virus tại chuỗi bảo toàn. Nhờ vật liệu cũng như enzyme DNA polymerase của tế bào, sợi virus được tổng hợp liên tục trên sợi tương đồng virus. Protein Rep/Master Rep lại tiếp tục cắt sợi virus mới được tổng hợp tại chuỗi bảo toàn (cũng vừa mới được tổng hợp) thành một sợi virus hoàn chỉnh dưới dạng sợi đơn mạch thẳng. Protein Rep/Master Rep sau đó sẽ nối 2 đầu của mạch thẳng để tạo ra bộ gen virus sợi đơn mạch vòng hoàn chỉnh.

Bộ gen virus tiếp theo được vận chuyển ra tế bào chất và lắp ráp với CP để tạo các phân tử virus mới.



HVC-2009©

Hình 1-16 Sơ đồ tái sinh của begomovirus

Tái sinh của virus DNA sợi vòng kép phiên mã ngược (pararetrovirus)

Đây là kiểu tái sinh của virus DNA qua trung gian RNA nhờ enzyme phiên mã ngược Reverse Transcriptase. Chỉ có các virus thuộc 2 họ là *Caulimoviridae* (hại thực vật, ví dụ CaMV, RTBV) và họ *Hepadnaviridae* (hại động vật, ví dụ Hepatitis B virus gây bệnh viêm gan B) có kiểu tái sinh này.

Đối với các virus họ *Caulimoviridae*, bộ gen virus có đặc điểm sau:

Chỉ gồm một phân tử DNA genome sợi vòng kép (dsDNA), có kích thước từ ~ 8 kb.

DNA genome không liên tục: trên một sợi có một điểm rời, còn trên sợi còn lại có từ 1 đến 3 điểm rời tùy theo chi. Các điểm rời này là điểm gắn mồi trong quá trình tái sinh virus.

Bộ gen virus có từ 1 đến 7 ORF tùy thuộc chi. Các protein có chức năng chung cho tất cả họ là CP, aspartate protease, RT (reverse transcriptase) và RNase H.

Quá trình tái sinh virus (Hình 4-8) có đặc điểm là: (i) qua trung gian RNA; (ii) diễn ra trong cả nhân và tế bào chất. Có thể tóm tắt quá trình tái sinh virus như sau:

Virus xâm nhập vào tế bào (nhờ vectơ), cởi áo giải phóng bộ gen DNA sợi kép.

DNA sợi kép (dạng vòng mở) được vận chuyển vào nhân.

Trong nhân, các điểm rời được bịt kín và phân tử trở thành dạng vòng kín.

Trong nhân, RNA pol II của ký chủ (DdRp) phiên mã thành 1 phân tử RNA có kích thước > bộ gen virus gọi là RNA 35S (hoặc 34S). Ở một số virus như CaMV và RTBV, một số phân tử RNA này được cắt thành RNA nhỏ hơn (ví dụ RNA 19S).

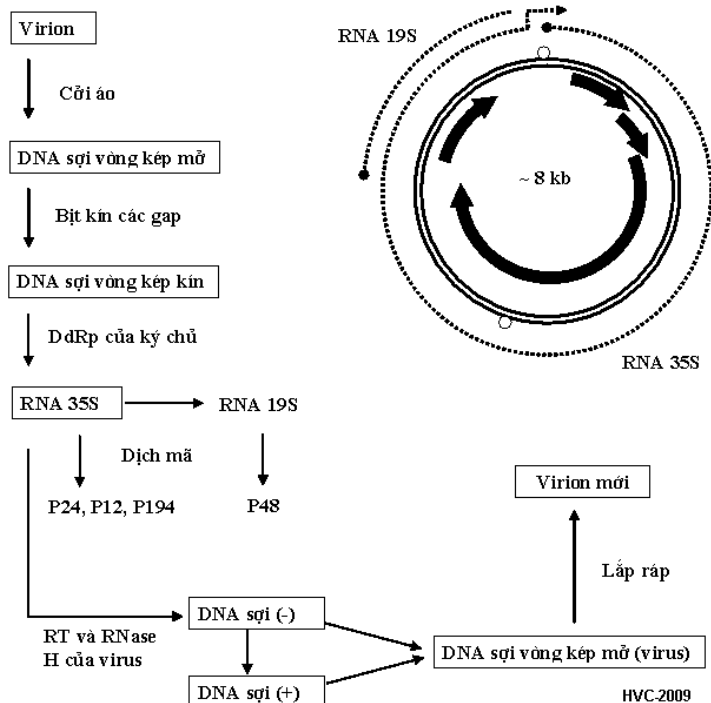
RNA 35S (và cả các phân tử RNA nhỏ) được vận chuyển ra tế bào chất

Tại tế bào chất, các ORF được dịch mã trên khuôn RNA lớn (và RNA nhỏ) thành các protein chức năng (trong đó có Reverse transcriptase và RNase H).

Tại tế bào chất, phân tử RNA lớn sẽ được dùng làm khuôn để tổng hợp DNA sợi (-). RNase H sẽ loại bỏ phần RNA của phân tử heteroduplex RNA:DNA để giải phóng phân tử DNA sợi đơn cực (-). Phân tử DNA này sẽ được dùng làm khuôn để tổng hợp thành phân tử DNA genome sợi vòng kép mở.

Tại tế bào chất các phân tử DNA sợi kép lắp ráp với các protein CP để tạo thành virion.

*Chú ý: Các virus đều thuộc nhóm pararetrovirus nên có khả năng tổng hợp gen của nó vào bộ gen ký chủ. Cơ chế chi tiết của quá trình tổng hợp của các virus chưa được hiểu rõ nhưng nhiều ký chủ của các virus thuộc chi *Caulimoviridae* có chứa các đoạn DNA giống của virus (ví dụ chuối / banana streak virus; RTBV/lúa).



Hình 1-17 Sơ đồ tái sinh của các caulimovirus

1.5. SỰ DI CHUYỂN CỦA VIRUS TRONG CÂY

Di chuyển giữa các tế bào

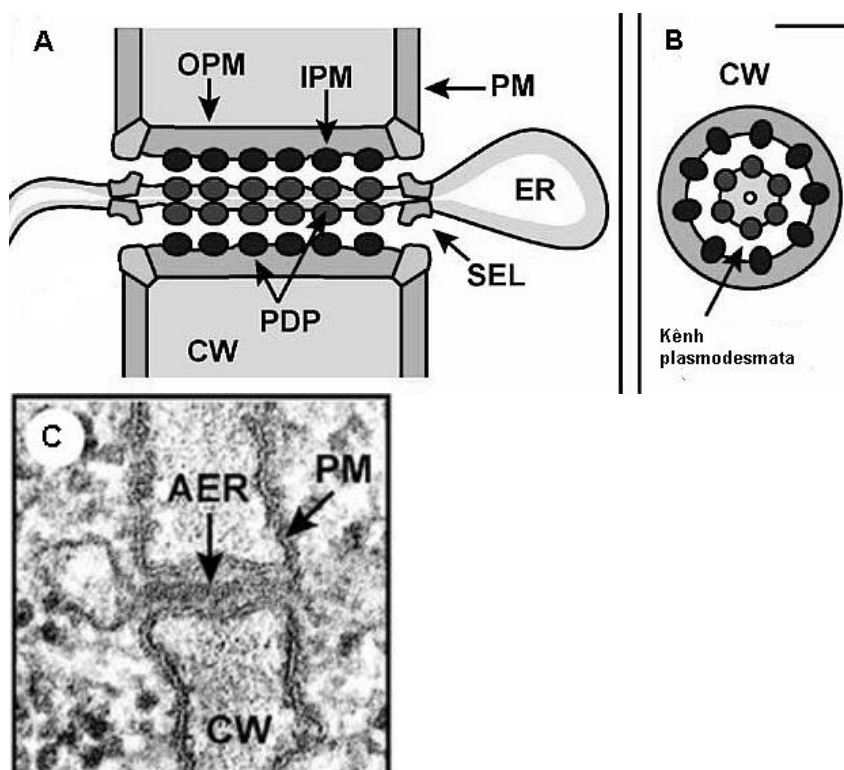
Cấu tạo sợi liên bào

Sợi liên bào (plasmodesmata) là kênh giao tiếp giữa các tế bào và có cấu trúc phức tạp gắn liền với màng tế bào và lưới nội chất. Cấu tạo cơ bản của sợi liên bào gồm 2 ống trụ cấu tạo bởi màng và lồng vào nhau (Hình 5-1).

Ống trụ ngoài là màng plasma (PM, plasma membrane) bao gồm màng plasma ngoài (OPM, outer plasma membrane) hướng về vách tế bào (CW, cell wall) và màng plasma trong (IPM, inner plasma membrane) hướng vào ống trụ trong.

Ống trụ trong cấu tạo bởi màng lưới nội chất (ER, endoplasmic reticulum). Ống trụ trong chính là màng lưới nội chất bị ép chặt lại nên thường được ký hiệu là AER (appressed endoplasmic reticulum). Phần ống trụ trong cũng còn được gọi là desmotubule.

Trên bề mặt trong của ống trụ ngoài và bề mặt ngoài của ống trụ trong có các protein của ký chủ gọi là các protein sợi liên bào (PDP, plasmodesmal proteins) gắn vào. Khoảng không giữa ống trụ ngoài và ống trụ trong là kênh hay lỗ sợi liên bào (kênh plasmodesmata). Dịch tế bào chất giữa các tế bào liên tục với nhau qua kênh này. Nhìn chung kích thước kênh sợi liên bào chỉ khoảng 2.5 nm. Do kích thước kênh rất nhỏ, lại có rào cản là các protein sợi liên bào nên không phải tất cả các loại phân tử đều có thể tự do di chuyển qua kênh. Khả năng sợi liên bào không cho phép các loại phân tử sinh học đạt kích thước nào đó di chuyển qua gọi là **giới hạn ngăn chặn kích thước (SEL, size exclusion limit)** của sợi liên bào và thường được biểu diễn dưới dạng khối lượng phân tử kDa. Nhìn chung SEL chỉ cho phép các phân tử có khối lượng tối đa khoảng 1 – 10 kDa đi qua, tùy loại mô và cây.



Hình 1-18 Cấu tạo sợi liên bào. A và B là mô hình sợi liên bào, trong đó A là tiết diện dọc và B là tiết diện ngang. C là ảnh hiển vi điện tử của sợi liên bào (Lucas, 2006).

Sự di chuyển của virus thực vật giữa các tế bào

Do đặc điểm cấu tạo của tế bào và mô thực vật, nhìn chung quá trình di chuyển từ tế bào này sang tế bào khác của virus không dễ dàng. Các tế bào thực vật liên hệ với nhau bởi sợi liên bào (plasmodesmata) có cấu tạo phức tạp. Kích thước của kênh (lỗ) sợi liên bào cũng như SEL quá nhỏ không cho phép virion của virus nhỏ nhất, thậm chí chỉ bộ gen virus có thể qua lại tự do được.

Để khắc phục trở ngại này, các virus thực vật đều mã hóa một hoặc một vài protein đặc biệt gọi là protein vận chuyển (MP, movement protein). Sử dụng protein MP, kết hợp với sự tham gia của các protein khác (của cả virus và ký chủ), phân tử virus (virion) hoặc bộ gen virus mới có thể di chuyển từ tế bào nhiễm sang tế bào khỏe bên cạnh. Virus sử dụng 2 chiến lược để di chuyển từ tế bào này sang tế bào khác thông qua sợi liên bào.

Ước lượng thời gian cho thấy virus nhìn chung di chuyển từ tế bào nhiễm sang tế bào khỏe trong khoảng 2 – 20 giờ, phụ thuộc nhiệt độ, tổ hợp virus và cây.

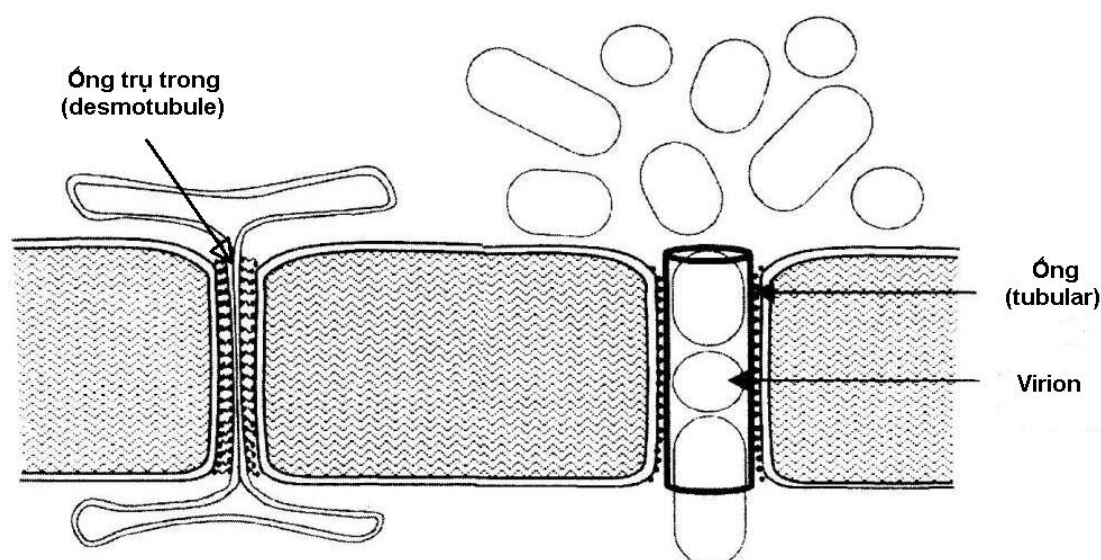
Chiến lược tạo ống (tubular)

Ít nhất các virus thuộc các họ *Bromoviridae*, *Comoviridae*, *Caulimoviridae*, *Nepoviridae* và các chi *Tospovirus*, *Trichovirus* sử dụng chiến lược tạo ống để di chuyển giữa các tế bào. Quá trình di chuyển bao gồm các bước chính sau (Hình 5-2):

Protein MP của virus tiếp cận sợi liên bào và loại bỏ ống trụ trong (desmotubule) của sợi liên bào).

Tiếp theo các protein MP của virus lắp ráp lại thành một ống ngang qua sợi liên bào.

Cuối cùng, phân tử virus (virion), thông qua tương tác với protein MP của virus được vận chuyển qua ống sang tế bào bên cạnh.

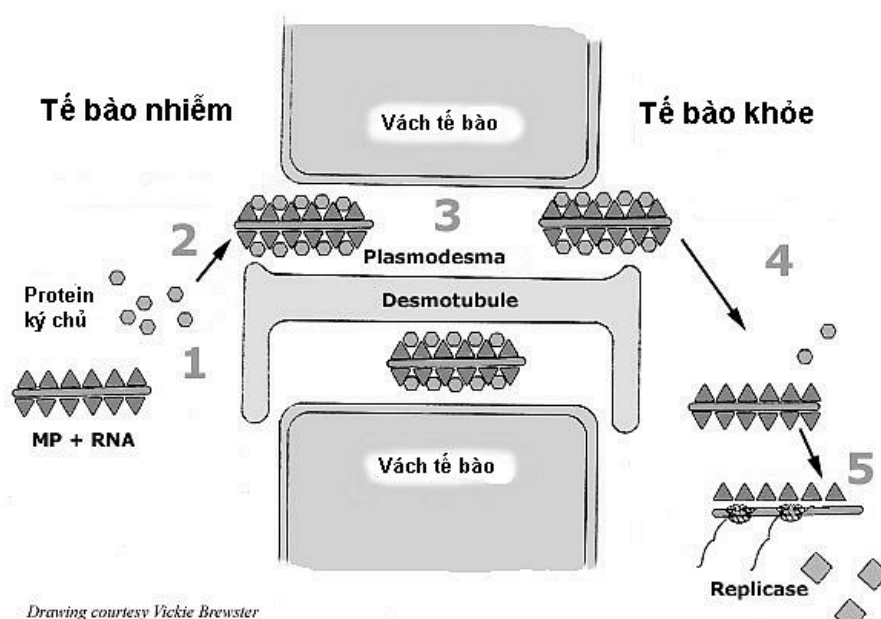


Hình 1-19 Chiến lược tạo ống của virus thực vật để di chuyển giữa các tế bào (Hull, 2002)

Chiến lược nucleoprotein

Đây là chiến lược phổ biến nhất đối với virus thực vật. Protein MP của virus liên kết với nucleic acid của virus tạo thành phức hợp nucleoprotein. Protein MP của virus cùng với protein ký chủ sẽ biến đổi sợi liên bào và làm tăng giới hạn ngăn chặn kích thước SEL của sợi liên bào lên nhiều lần. Tiếp theo, phức hợp nucleoprotein có thể di chuyển từ tế bào nhiễm ban đầu qua sợi liên bào đã được biến đổi để sang tế bào khỏe bên cạnh. Tại tế bào khỏe, virus lại thực hiện tiếp quá trình tái bản bộ gen và dịch mã các protein chức năng.

Chiến lược này đã được chứng minh chi tiết đối với TMV (Hình 5-3). Protein MP của TMV có thể tăng kích thước SEL từ 7 kDa tới 94 kDa.



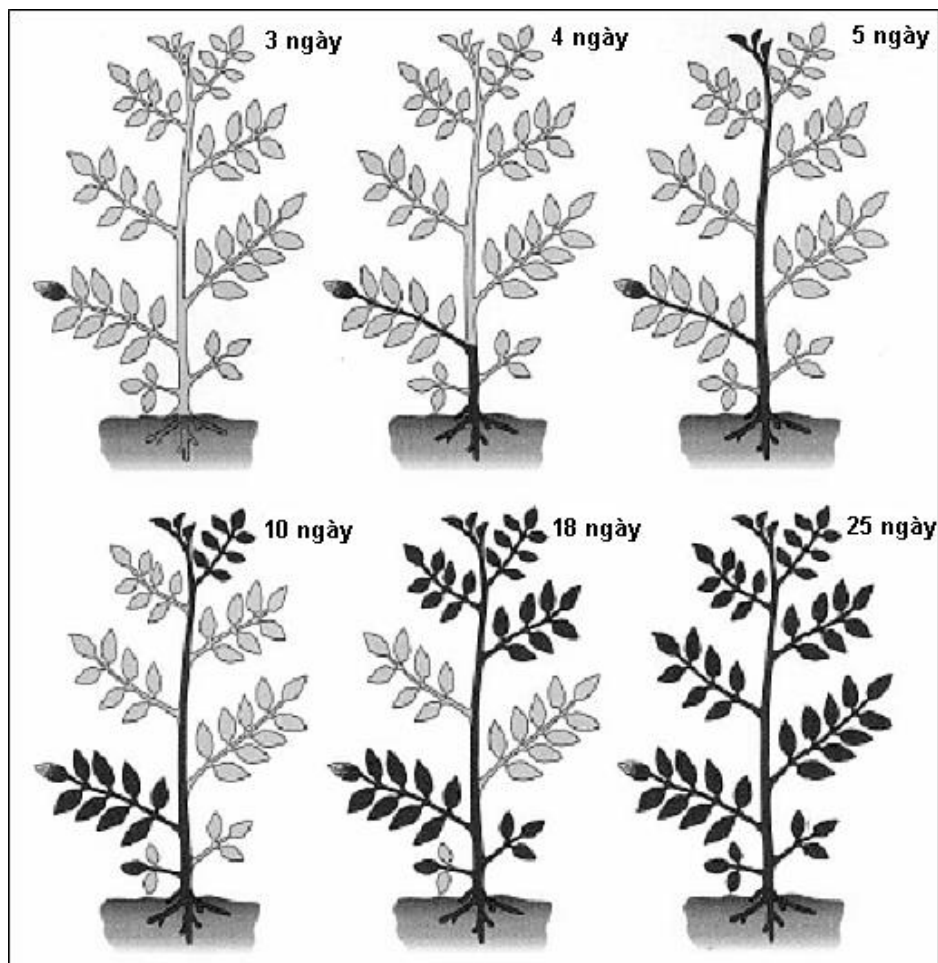
Hình 1-20 Mô hình di chuyển giữa các tế bào của TMV

Di chuyển hệ thống qua khoảng cách xa

Về cơ bản, kiểu di chuyển này tương đối tự do đối với virus. Ngoại trừ một số ít virus như các sobemovirus di chuyển theo mạch xylem thì phần lớn virus di chuyển theo mạch phloem. Sau khi đạt tới mạch phloem, virus có thể di chuyển hệ thống khắp cây.

Thời gian virus phát tán từ vị trí xâm nhiễm ban đầu tới khắp cả cây phụ thuộc rất nhiều yếu tố như tổ hợp cây và virus, loại cây, loại và tuổi cây, loại virus, kiểu xâm nhiễm và nhiệt độ. Nhìn chung virus di chuyển trong cây rất chậm (Hình 5-4).

Hướng di chuyển của virus trong cây theo mạch phloem nhìn chung là từ mô nguồn “source” tới mô tiêu thụ “sink”. Mô nguồn là nơi carbohydrates được tạo ra (trên lá thành thực) hoặc được giải phóng từ mô dự trữ (rễ, thân). Mô tiêu thụ là nơi carbohydrates được sử dụng để tăng trưởng và dự trữ (Hình 5-4).



Hình 1-21 Hướng và tốc độ di chuyển hệ thống của virus trong cây (Agrios, 2005)

1.6. CƠ CHẾ GÂY BỆNH CỦA VIRUS THỰC VẬT

Triệu chứng bệnh virus

Triệu chứng là biểu hiện phản ứng của cây đối với sự tấn công của virus. Một cây bị bệnh và biểu hiện triệu chứng khi các chức năng sinh lý của nó bị ảnh hưởng. Một virus “thông minh” khi nó tấn công tế bào, sinh sản mạnh mẽ qua các thể hệ mà không gây bệnh cho cây.

Triệu chứng bệnh virus trên cây trồng có thể chia là 3 nhóm: (i) biến màu, (ii) biến dạng và (iii) vết đốm. Ngoài ra, bệnh do virus gây ra cũng có thể được xếp vào 2 nhóm là (i) bệnh hệ thống và (ii) bệnh cục bộ. Nhìn chung, phần lớn bệnh virus thuộc nhóm bệnh hệ thống. Các nhóm triệu chứng và triệu chứng bệnh virus có thể tóm tắt như sau:

Biến màu

- Khảm lá (mosaic). Đây có thể được xem là triệu chứng phổ biến nhất của bệnh virus
- Đốm biến vàng (mottling)
- Biến vàng (yellowing)
- Sáng gân (vein clearing)
- Vàng gân (vein yellowing)
- Dải gân (vein banding)

Biến dạng

- Xoăn lá (curling)
- Cuốn lá (rolling)

- Lùn (dwarfing)
- Còi cọc (stunting)
- Phồng gân (enation)

Vết đốm

- Đốm chết hoại (necrotic spot)
- Đốm vòng (ringspot)

Hai mô hình giải thích cơ chế gây bệnh của virus

Mô hình cạnh tranh tài nguyên

Theo mô hình này, khi virus xâm nhiễm vào tế bào, quá trình tái sinh của virus sẽ sử dụng các tài nguyên của tế bào như amino acid, nucleotide để cấu tạo nên phân tử virus mới. Việc chiếm đoạt quá mức tài nguyên cũng như trung dụng bộ máy phiên mã và dịch mã của tế bào ký chủ sẽ dẫn tới biểu hiện triệu chứng bệnh.

Người ta đã chứng minh rằng hàm lượng protein và acid nucleic của TMV có thể chiếm tới 1% tổng số khối lượng vật chất của cây thuốc lá nhiễm bệnh nhưng khi virus dịch mã, nó có thể huy động tới hơn 50% tổng số protein của cây.

Người ta cũng quan sát thấy tại vị trí xâm nhiễm, nhiều gen của cây bị suy giảm mức độ phiên mã và dịch mã. Sự suy giảm này giúp virus dễ dàng tiếp cận với tài nguyên của tế bào hơn. Ngoài ra trên bộ gen của nhiều virus có chứa các cấu trúc đặc biệt như các vị trí lắp ráp ribosome, các chuỗi tăng cường dịch mã “translation enhancer” làm cho mRNA của virus có lợi thế cạnh tranh hơn so với mRNA của tế bào ký chủ trong quá trình tiếp cận bộ máy dịch mã của tế bào.

Tuy nhiên, cơ chế gây bệnh của virus theo mô hình cạnh tranh không phải là chủ yếu vì:

Ở nhiều bệnh virus, mức độ dữ dội của triệu chứng không tỷ lệ thuận với mức độ tích lũy virus.

Trong tế bào, vòng đời của virus rất ngắn, quá trình tái sinh của virus xảy ra rất nhanh, khoảng vài giờ, sau đó suy giảm do đó quá trình cạnh tranh tài nguyên tế bào của virus cũng diễn ra rất nhanh. Ngoài ra, ngay sau khi virus ngừng tái sinh thì tế bào thường phục hồi tài nguyên của nó dễ dàng

Mô hình tương tác

Theo mô hình này, virus gây bệnh cho cây thông qua sự tương tác giữa các thành phần của virus, thường là các protein, với các thành phần của tế bào ký chủ, qua đó ảnh hưởng đến các đường hướng sinh hóa của tế bào.

Mô hình này phức tạp hơn nhưng hiện thực và đã được chứng minh trong nhiều trường hợp (xem các phần sau). Một trong các đặc điểm quan trọng nhất của mối tương tác này là tính **đặc hiệu**. Điều này giải thích tại sao triệu chứng bệnh có thể rất khác nhau khi các virus có quan hệ gần gũi tấn công cùng loại cây hoặc cùng một virus tấn công các cây khác nhau

Dựa vào hậu quả của sự tương tác đến các chức năng sinh lý của cây, người ta chia các tương tác giữa virus và cây thành 2 nhóm:

- Tương tác gây hậu quả đến ký chủ

Các tương tác nhóm này cần thiết cho các chức năng sống của virus và cũng ảnh hưởng trực tiếp đến các chức năng sinh lý của cây dẫn tới triệu chứng bệnh. Có rất nhiều ví dụ về các tương tác nhóm này (xem các phần sau).

- Tương tác không gây hậu quả đến ký chủ

Các tương tác này cần thiết cho các chức năng sống của virus nhưng không hoặc rất ít ảnh hưởng đến các chức năng sinh lý của cây và hậu quả là cây không bị bệnh. Ví dụ điển hình cho các tương tác này là các virus ẩn (cryptic virus). Ví dụ tương tự là tương tác của protein replicase của TMV với 2 protein xuyên màng (TOM1 và TOM3) của tế bào thuốc lá. Tương tác này cần thiết cho sự tái sinh của TMV và không ảnh hưởng đến cây. Khi gây bất hoạt 2 gen này (silencing) thì mức độ tái sinh của virus giảm nhưng không ảnh hưởng đến sinh trưởng của cây.

Cần chú ý là việc phân nhóm này không bất biến vì hậu quả của các tương tác bị ảnh hưởng bởi nhiều yếu tố như môi trường, trạng thái sinh lý của cây.

Các cơ chế gây bệnh của virus

Virus gây mất cân bằng phytohormone

Nhiều triệu chứng của bệnh virus nhóm biến dạng chẳng hạn như cây lùn, còi cọc, xoắn cuộn lá thường liên quan đến mất cân bằng phytohormone trong cây.

Auxin

Auxin là một phytohormone chủ yếu của cây, điều khiển nhiều đường hướng sinh hóa liên quan đến sinh trưởng của cây.

Ví dụ: Thí nghiệm trên cây *Arabidopsis* với TMV đã xác định được tương tác của protein replicase của virus với 1 nhóm các protein của ký chủ gọi là các protein Aux/IAA. Các protein Aux/IAA là các protein hoạt động trong nhân với chức năng kìm hãm các protein là yếu tố phiên mã điều khiển sự phiên mã các gen ký chủ được kích hoạt bằng auxin (ký hiệu là ARFs = auxin-responsive transcription factors).

Khi không có mặt auxin, protein Aux/IAA liên kết với protein ARF => các gen ký chủ liên quan đến đường hướng auxin không được hoạt hóa.

Khi có mặt auxin, protein Aux/IAA bị phân hủy và giải phóng protein ARF => hoạt hóa các gen ký chủ liên quan đến đường hướng auxin.

Khi tế bào nhiễm TMV, protein replicase của virus tương tác với protein Aux/IAA và không cho nó di chuyển vào trong nhân => protein ARF hoạt động một cách không kiểm soát => tạo triệu chứng bệnh.

Khi nhiễm TMV mang đột biến trên gen replicase làm mất chức năng tương tác với protein Aux/IAA của nó => cây biểu hiện triệu chứng nhẹ hơn rất nhiều mặc dù mức độ tái sinh và di chuyển hệ thống của virus vẫn tương tự như của virus TMV dạng hoang dại.

Khi gây bất hoạt gen mã hóa protein Aux/IAA của cây *Arabidopsis* thì cây biểu hiện kiểu hình giống như bị nhiễm TMV.

Gibberellin

Ví dụ. Cây lúa nhiễm một số virus họ *Reoviridae* như RRSV, SRBSDV, RGDV thường biểu hiện triệu chứng lùn, bộ lá xanh đậm. Triệu chứng này giống với hiện tượng cây lúa bị đột biến mất khả năng tổng hợp gibberellin. Ảnh hưởng của sự nhiễm bệnh virus đến cân bằng gibberellin đã được chứng minh đối với 1 virus tương tự thuộc họ này là RDV (Rice dwarf virus).

RDV mã hóa 1 protein gọi là P2. Đây là protein tạo vỏ của virus, qui định tính đặc hiệu vector và qui định triệu chứng lùn + bộ lá xanh đậm trên cây lúa.

P2 tương tác với 1 protein ký chủ là ent-kaurene oxidase. Ent-Kaurene oxidases là một protein chủ chốt trong đường hướng sinh tổng hợp GA (gibberellic acid) trong cây. Cây lúa nhiễm RDV bị lùn. Khi xử lý cây bệnh với GA3 dẫn tới biến mất triệu chứng trên cây bệnh trong khi xử lý IAA thì vẫn bị lùn giống với đối chứng nhiễm (Hình 6-1).



Hình 1-22 Thí nghiệm chứng minh protein P2 của RDP đã can thiệp vào đường hướng tổng hợp gibberellin của cây lúa (Wang et al., 2005)

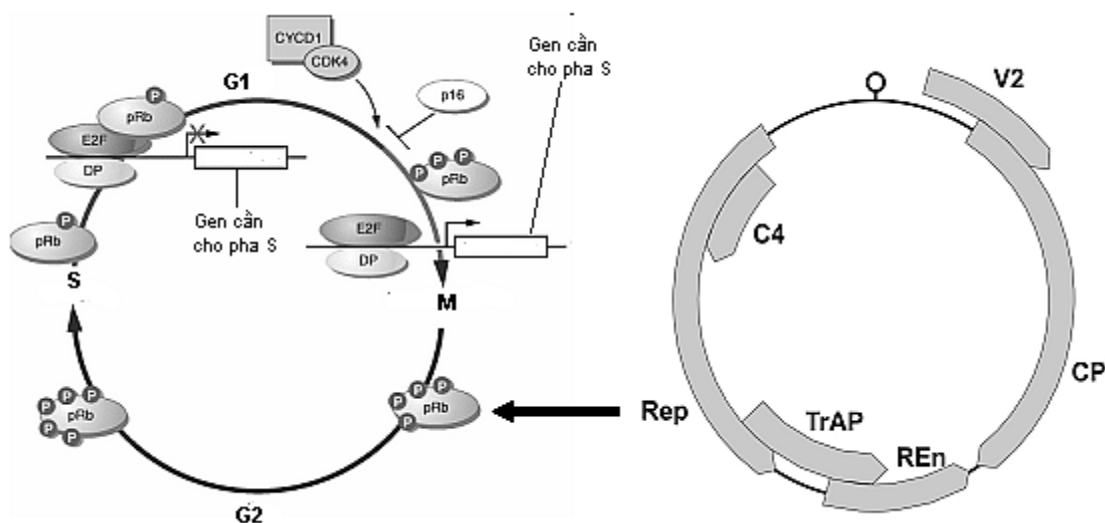
Ethylen

Ethylen là một phytohormone tham gia điều khiển quá trình già hóa và phòng thủ của cây. Khi cây bị nhiễm virus, hàm lượng ethylen thường tăng. Ethylen đã được chứng minh có liên quan tới triệu chứng biến vàng và chết hoại của cây bị bệnh virus.

Ví dụ. Cây chuyển gen P6 của virus CaMV biểu hiện triệu chứng giống hệt bị nhiễm virus như biến vàng, còi cọc và dài gân.

Protein của virus khởi động lại chu kỳ tế bào

Một ví dụ điển hình cho cơ chế này là các begomovirus. Quá trình tái bản của begomovirus xảy ra trong nhân tế bào, kể cả ở các tế bào không phân chia. Do vậy, sau khi nhiễm vào tế bào, begomovirus phải khởi động bộ máy tái sinh của tế bào. Một trong các protein của tế bào ký chủ thực vật điều khiển chu kỳ tế bào là pRBR (plant retinoblastoma-related protein) - chịu trách nhiệm chuyển chu kỳ tế bào từ pha G1 sang pha S (pha tổng hợp). Protein Rep của TYLCV đã được chứng minh tương tác với pRBR của tế bào ký chủ. Hậu quả là chu kỳ tế bào được khởi động lại, tạo các enzym cần thiết cho sự tái bản DNA của virus (Hình 6-2).



Hình 1-23 Tương tác giữa protein Rep của begomovirus với pRB của tế bào cho phép khởi động lại chu kỳ tế bào

1.7. LAN TRUYỀN CỦA VIRUS THỰC VẬT

Giới thiệu

Virus thực vật lan truyền ngoài tự nhiên theo không gian (từ cây này sang cây khác, từ ruộng này sang ruộng khác, từ nước này sang nước khác...) và theo thời gian (trong một vụ trồng hoặc từ vụ này sang vụ khác...) nhờ các phương thức sau:

- Tiếp xúc cơ học
- Nhân giống vô tính
- Hạt giống/phấn hoa
- Môi giới (vector)

Cần chú ý là một virus có thể có nhiều phương thức lan truyền khác nhau.

Lan truyền qua tiếp xúc cơ học

Lan truyền qua tiếp xúc cơ học là lan truyền nhờ các tổn thương cơ học như tiếp xúc, cọ xát, va chạm, chằm sóc, vun xới, tỉa cành lá.

Đây là phương thức lan truyền **không phổ biến ngoài tự nhiên** mặc dù trong điều kiện thí nghiệm, nhiều virus vẫn có khả năng này. Các virus có khả năng lan truyền qua tiếp xúc cơ học phải là các virus có thể tái sinh được ở tế bào biểu bì, tế bào nhu mô của cây.

Ngoài tự nhiên, chỉ một vài nhóm có khả năng truyền dễ dàng qua tiếp xúc cơ học là các virus thuộc chi *Tobamovirus* (ví dụ TMV), chi *Potexvirus* (ví dụ PVX).

Lan truyền qua nhân giống vô tính

Đây là con đường lan truyền rất quan trọng của nhiều bệnh virus vì nhìn chung các bệnh virus phần lớn là bệnh hệ thống. Một khi cây đã nhiễm virus thì các bộ phận dùng làm giống như củ giống, hom giống, thân ngầm cũng mang virus.

Các ví dụ về virus truyền qua nhân giống vô tính đã phát hiện thấy ở Việt Nam gồm:

- BBTV (banana bunchy top virus). Virus gây bệnh chùn ngọn chuối, có thể truyền dễ dàng từ cây mẹ sang cây con qua thân ngầm.
- Các potyvirus gây hại hành tỏi như OYDV, SYSV và LYSV.
- Các potyvirus gây hại trên mía như SCMV, SrMV (hai virus này cùng gây bệnh trên ngô nhưng không truyền qua hạt ngô).

- Các virus hại khoai tây như PVY, PVX

Truyền qua hạt giống

Phân biệt 2 khái niệm

Virus tồn tại trong/trên hạt giống (Seed-borne): virus tồn tại trong/trên hạt nhưng chưa chắc truyền bệnh sang cây con.

Virus truyền qua hạt giống (Seed transmissible): virus tồn tại trên/trong hạt và truyền bệnh sang cây con.

Phát hiện thấy virus trên hạt nhưng chưa chắc cây con mọc ra đã bị bệnh.

Tầm quan trọng

Truyền qua hạt giống là một trong các phương thức lan truyền virus thực vật quan trọng. Virus có thể tồn tại lâu dài trong hạt dẫn tới tăng khả năng phát tán cao cả theo không gian và thời gian.

Khoảng 20 % virus thực vật truyền qua hạt giống. Một số các chi virus có virus truyền qua hạt giống quan trọng là:

- Alfamovirus (1/1)
- Comovirus (6/15)
- Cucumovirus (3/3)
- Ilarvirus (8/17)
- Nepovirus (17/40)
- Potyvirus (16/179)
- Sobemovirus (4/14)
- Tobamovirus (7/17)
- Tobravirus (3/3)

Khả năng truyền virus qua hạt giống khác nhau theo loại cây. Khoảng 2/3 virus truyền qua hạt giống nhiễm trên cây họ đậu nhưng rất ít virus nhiễm trên cây hòa thảo truyền qua hạt giống.

Đặc điểm của virus truyền qua hạt giống

Các virus truyền qua hạt giống chủ yếu tồn tại trong phôi hạt (embryo). Nhìn chung phần lớn các virus thực vật có thể nhiễm vào các bộ phận khác nhau của hạt (ví dụ vỏ hạt, nội nhũ). Tuy nhiên trong quá trình chín của hạt, các virus tồn tại bên ngoài phôi hạt thường bị bất hoạt. Chỉ một số ít các virus có thể tồn tại bên ngoài phôi hạt là các tobamovirus như TMV, ToMV, Cucumber green mottle mosaic virus (CGMMV) và một sobemovirus là Southern bean mosaic virus (SBMV).

Không phải tất cả các virus tồn tại trong hạt đều nhiễm sang cây con. Nhiều virus nhiễm vào phôi nhưng cũng tồn tại dưới dạng bất hoạt ở các bộ phận khác của hạt. Ví dụ, trong một thí nghiệm, 50% hạt đậu có phản ứng ELISA dương với Pea seed borne mosaic virus (PSbMV) nhưng chỉ có 2—3 % có mang virus có sức sống (có khả năng truyền virus sang cây con).

Khả năng truyền qua hạt nhờ noãn phụ thuộc khả năng nhiễm sớm vào hoa của virus.

Hai yếu tố chính qui định tỷ lệ nhiễm qua hạt giống của một virus là (i) tương tác ký sinh ký chủ và (ii) thời điểm nhiễm.

Virus truyền qua hạt giống có khả năng truyền qua tiếp xúc cơ học và thường nhiễm tế bào nhu mô. Các virus giới hạn phloem nhìn chung không truyền qua hạt giống.

Hạt nhiễm virus có thể hình thành trên cây khỏe do hạt được thụ phấn từ hạt phấn mang virus. Tỷ lệ truyền virus sang cây con qua hạt phấn thấp hơn nhiều so với truyền qua noãn.

Các ví dụ về virus truyền qua hạt giống ở Việt Nam

- TMV/ToMV tồn tại trên vỏ hạt thuốc lá, cà chua,
- ZYMV tồn tại trong phôi hạt cây bầu bí, BCMV tồn tại trong phôi hạt cây họ đậu.

Lan truyền qua môi giới

Truyền qua môi giới là con đường lan truyền quan trọng nhất của virus ngoài tự nhiên. Phần lớn các bệnh virus thực vật lan truyền ngoài tự nhiên nhờ môi giới. Các môi giới của virus là côn trùng, nhện hại cây, tuyến trùng, nấm, tơ hồng. Môi giới còn được gọi là vector truyền bệnh.

Nhóm môi giới quan trọng nhất của virus thực vật là côn trùng, trong đó, nhóm côn trùng chích hút **bộ Hemiptera** như rệp muội, bọ rầy, bọ phấn là các nhóm chịu trách nhiệm truyền nhiều virus có ý nghĩa kinh tế. Khoảng 75 % virus thực vật lan truyền nhờ vector côn trùng (Bảng 7-1).

Bảng 1-3 Thành phần vector của virus thực vật tính đến 2007 (Hogenhout et al., 2008)

Bộ	Nhóm vector	Nhóm virus				Tổng	%
		RNA, Cầu đa diện	RNA, Gây, sợi	DNA	RNA, vỏ bọc		
Hemiptera	Rệp muội (aphids)	26	153	13	5	197	28
	Bọ phấn (whiteflies)	-	13	115	-	128	18
	Rầy lá (Leafhoppers)	8	-	15	3	26	4
	Rầy thân (planthoppers)	10	4	-	4	18	3
	Khác	-	8	5	-	13	2
Thysanoptera	Bọ trĩ (thrips)	2	-	-	14	16	2
Coleoptera	Bọ cánh cứng (beetles)	50	1	-	-	51	7
Acari	Nhện (mites)	10	9	-	-	10	1
Nematoda	Tuyến trùng	45	3	-	-	48	7
Mycota	Nấm	8	16	-	-	24	3
	Vector chưa xác định	84	60	19	3	166	24
	Tổng	133	268	167	30	697	
	%	33	39	24			

Cơ chế truyền virus nhờ vector côn trùng

Các kiểu truyền

Virus thực lan truyền nhờ vector côn trùng theo 4 kiểu bao gồm:

- Không bền vững (non-persistence)
- Bán bền vững (semi-persistence)
- Bền vững tuần hoàn (circulative persistence)
- Bền vững tái sinh (propagative persistence)

Bốn kiểu truyền phản ánh đặc điểm quan hệ của virus với vector và được trình bày tóm tắt ở Bảng 7-2 và Hình 7-1.

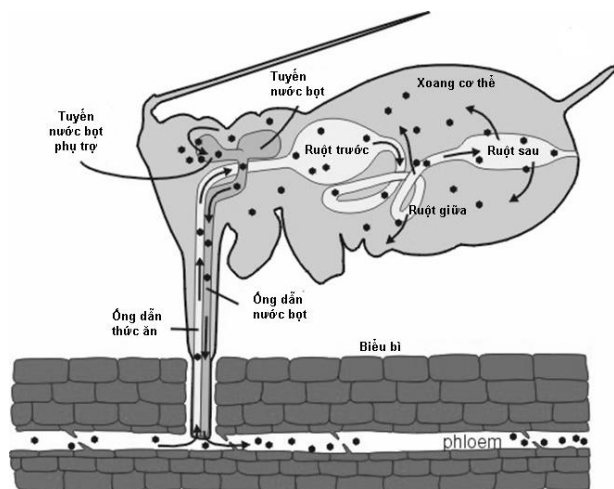
Bảng 1-4. Bốn phương thức truyền virus thực vật của côn trùng môi giới

Kiểu truyền	Vị trí trong côn trùng	Thời gian chích nạp	Thời gian ẩn	Thời gian tồn tại khả nhiễm	Nhân lên trong côn trùng	Truyền qua trứng
Không bền vững	Vòi	Nhiều giây	không	Tối đa vài giờ	không	không
Bán bền vững	Ruột trước	Nhiều phút	không	Vài ngày	không	không
Bền vững tuần hoàn	Xoang cơ thể	Nhiều giờ	Nhiều giờ	Nhiều ngày tới vài tuần	không	không
Bền vững tái sinh	Xoang cơ thể	Nhiều giờ	Nhiều ngày	Liên tục, thường cả đời	có	có

Các thuật ngữ

- **Thời gian chích nạp (acquisition feeding time):** thời gian côn trùng chích hút trên cây bệnh và nạp đủ lượng virus có thể truyền bệnh.
- **Thời gian chích truyền (innoculation feeding time):** thời gian côn trùng chích hút trên cây khỏe và truyền thành công virus vào cây khỏe.
- **Thời gian ẩn (latent period):** thời gian côn trùng đã nạp đủ lượng virus nhưng không thể truyền virus

- **Thời gian tồn tại khả nhiễm (retention time):** thời gian côn trùng duy trì virus trong cơ thể và truyền thành công virus sang cây khỏe (= thời gian virus có thể tồn tại trong cơ thể côn trùng).



Hình 1-24. Giải phẫu chung côn trùng chích hút và phân bố virus

Ví dụ 4 kiểu truyền

- **Không bền vững:** rệp đào truyền Papaya ringspot virus (PRSV) gây bệnh đốm hình nhẫn đu đủ có thời gian chích nạp = 10 – 60 giây, thời gian tồn tại khả nhiễm tới 60 phút.
- **Bán bền vững:** rầy xanh đuôi đen truyền Rice tungro bacilliform virus (RTBV) gây bệnh tungro trên lúa có thời gian chích nạp = 30 phút, thời gian tồn tại khả nhiễm tới 4 ngày.
- **Bền vững tuần hoàn:** bọ phấn truyền African cassava mosaic virus (ACMV) gây bệnh khảm lá sắn có thời gian chích nạp tối thiểu 3,5 giờ, thời kỳ ẩn = 8 giờ, thời gian tồn tại khả nhiễm khoảng 9 giờ.
- **Bền vững tái sinh:** rầy nâu truyền Rice grassy stunt virus (RGSV) gây bệnh lúa cỏ có thời gian chích nạp = 1 giờ, thời kỳ ẩn = 3-28 ngày, thời gian tồn tại khả nhiễm cả đời.

Hành vi chích hút của côn trùng bộ Hemiptera

Các côn trùng chích hút bộ *Hemiptera* (gọi chung là hemipterans) có cấu trúc phần miệng thích hợp cho quá trình chích hút dịch cây và được gọi **ngồi chích** (stylets). Đối với nhóm truyền virus theo kiểu không bền vững và bán bền vững thì phần miệng cũng chính là nơi bám dính của virus. Ngồi chích của chúng có cấu trúc đủ để xuyên qua vách tế bào mà không làm tổn thương tế bào. Hành vi chích hút của các hemipterans tương tự nhau, nhưng chỉ có aphid có khả năng truyền virus theo kiểu không bền vững (xem phần cơ chế và tính đặc hiệu)

Khi bay, hemipterans không thể phân biệt được đâu là ký chủ thích hợp, nơi chúng có thể hút dịch cây, sinh sản, phát triển thành quần thể. Ngay khi hạ cánh trên một cây (chú ý hemipteran có xu hướng với màu vàng nên cây có lá biến vàng dễ hấp dẫn chúng), việc đầu tiên là hemipteran thực hiện các cú chích hút thăm dò (probing). Khi chích hút, chúng tiết 1 giọt nước **bọt dạng keo dính** và nhanh chóng chọc ngòi vào tế bào biểu bì để thử thức ăn. Các cú chích hút thăm dò này thường nông (có nghĩa trên lớp tế bào biểu bì) và thường kéo dài ≤ 1 phút. Sau khi thăm dò trên tế bào biểu bì, và thấy thức ăn phù hợp, chúng tiếp tục chọc ngòi sâu hơn, thường len lỏi giữa các tế bào, cho tới tận ống rây của mạch phloem. Quá trình này có thể mất nhiều phút tới nhiều giờ. Giọt nước bọt dạng keo dính này sẽ hình thành 1 lớp bao ngòi chích (style sheath) của vector. Tuy nhiên, khi chọc ngòi vào tới mạch phloem, chúng lại bơm một loại nước bọt thứ 2, dạng nước, chứa nhiều enzyme vào ống rây. Khi rút ngòi ra, loại nước bọt thứ 2 này sẽ bịt kín lớp bao ngòi chích.

Hành vi chích hút của vector cho thấy quá trình chích hút thăm dò sẽ thích hợp để truyền các virus thuộc nhóm không bền vững hoặc bán bền vững vì các virus này có mặt ở khắp mọi nơi, kể cả lớp tế bào biểu bì. Trái lại chỉ khi ngòi chích của vector đạt tới mạch phloem, chúng mới có khả năng truyền các virus nhóm bền vững vì các virus này thường giới hạn ở mạch phloem.

Lan truyền virus theo kiểu không bền vững

Lan truyền virus thực vật của rệp muội (họ Aphididae)

Trong số côn trùng, rệp muội (aphid) là nhóm tiến hóa nhất về khả năng sử dụng thức ăn là thực vật. Do vậy có thể xem rệp muội là nhóm vector quan trọng nhất của virus thực vật. Rệp muội truyền khoảng 50 % số virus thực vật truyền qua vector côn trùng. Rệp muội có một số lợi thế để trở thành một vector hiệu quả của virus thực vật:

Nhiều loài rệp muội là đa thực (polyphagous). Ví dụ rệp đào (*Myzus persicae*) có phổ ký chủ rất rộng tới 50 họ thực vật.

Chúng có thể sinh sản theo kiểu trinh sinh (parthenogenesis), do đó mật độ quần thể có thể gia tăng nhanh chóng.

Có cấu tạo ngòi chích và hành vi chích hút thích hợp với lan truyền virus, đặc biệt đối với các virus tồn tại ở biểu bì (phần lớn các virus).

Truyền virus bằng rệp muội theo kiểu không bền vững

Trong số các virus truyền qua rệp muội thì phần lớn được truyền theo kiểu không bền vững (132/201 = 66 % số virus). Cần chú ý rằng: Chỉ rệp muội mới có thể truyền được virus theo kiểu không bền vững.

Đặc điểm truyền theo kiểu không bền vững

Thời gian chích nạp ngắn, thường chỉ cần vài giây. Các nghiên cứu cho thấy hiệu quả truyền virus nhóm không bền vững của rệp muội tỷ lệ thuận với số cú chích hút thăm dò ở lớp tế bào biểu bì và ngay khi chúng chọc ngòi xuống phía dưới lớp tế bào biểu bì tới các tế bào nhu mô hoặc bó mạch thì hiệu quả truyền bệnh sẽ suy giảm nhanh chóng. Các nghiên cứu cũng cho thấy nếu bỏ đói rệp thì hiệu quả truyền virus cũng tăng vì làm tăng các cú chích hút thăm dò.

Quá trình chích nạp và chích truyền diễn ra tại tế bào biểu bì. Các virus truyền theo kiểu này thường không đặc hiệu mô và có mặt ở tế bào biểu bì của cây.

Virus chỉ tồn tại ở tầng cuticle ở phần ngòi mà tầng này sẽ bị tách bỏ sau mỗi lần lột xác => virus sẽ mất sau mỗi lần lột xác => vector trở nên sạch virus => virus không thể truyền qua giao phối cũng như qua thế hệ sau.

Virus có thời gian tồn tại khả nhiễm ngắn, tối đa vài giờ. Nhìn chung, khả năng truyền virus của rệp giảm ngay lập tức sau khi chích nạp. Tốc độ mất khả năng truyền virus phụ thuộc nhiều yếu tố nhưng có lẽ chủ yếu do virus chỉ tồn tại ở phần ngòi chích của rệp muội.

Virus không có thời gian ẩn có nghĩa sau khi chích nạp, rệp có thể truyền ngay virus.

Việc giải phóng virus từ vector trong quá trình chích truyền chưa được hiểu rõ nhưng vì virus tồn tại ở phần ngòi nên 2 cơ chế đã được đề xuất: “chỉ do hành vi bơm nước bọt”, (ii) kết hợp giữa “bơm nước bọt và chớ (regurgitation) thức ăn”.

Lan truyền virus theo kiểu BÁN bền vững

Đặc điểm

Nhiều nhóm côn trùng khác nhau có kiểu truyền bán bền vững.

Trái với kiểu truyền không bền vững, ở kiểu truyền bán bền vững, quá trình chích nạp cũng như chích truyền phần lớn xảy ra ở mạch phloem. Điều này giải thích ở kiểu truyền bán bền vững, thời gian chích nạp dài hơn (tới nhiều phút) và nhiều virus truyền theo kiểu bán bền vững thường khó truyền bằng tiếp xúc cơ học.

Virus chỉ tồn tại ở tầng cuticle phần ruột trước (foregut) => tầng này sẽ bị tách bỏ sau mỗi lần lột xác => giống như ở nhóm không bền vững, virus sẽ mất sau mỗi lần lột xác => vector trở nên sạch virus => virus không thể truyền qua giao phối cũng như qua thế hệ sau.

Virus có thời gian tồn tại khả nhiễm dài hơn so với nhóm không bền vững, có thể tới vài ngày.

Virus không có thời gian ẩn có nghĩa sau khi chích nạp, vector có thể truyền ngay virus.

Việc giải phóng virus từ vector trong quá trình chích truyền chưa được hiểu rõ nhưng có lẽ do hành vi chó thức ăn (regurgitation) vì virus tồn tại ở ruột trước.

Lan truyền virus theo kiểu BỀN VỮNG TUẦN HOÀN

Các virus truyền theo kiểu bền vững tuần hoàn gồm các virus thuộc họ *Luteoviridae*, *Geminiviridae* và *Nanoviridae*. Tất cả các virus này đều có phân tử dạng hình cầu đa diện đối xứng. Các virus họ *Luteoviridae* và *Nanoviridae* chỉ truyền bằng rệp muỗi còn các virus họ *Geminiviridae* thì phần lớn được truyền nhờ bộ phận như các begomovirus hoặc bằng rầy như các topocuvirus và mastrevirus.

Đặc điểm

Quá trình chích nạp cũng như chích truyền phần lớn xảy ra ở mạch phloem => thời gian chích nạp và chích truyền khá lâu và phần lớn virus có kiểu truyền này thì rất khó hoặc không thể truyền được bằng tiếp xúc cơ học vì virus thường chỉ giới hạn ở mạch phloem.

Virus tồn tại trong xoang cơ thể nhưng nhìn chung không tồn tại ở cơ quan sinh sản. Điều này dẫn tới:

- (i) Virus sẽ không bị mất sau mỗi lần vector lột xác.
- (ii) Virus nhìn chung không truyền qua giao phối cũng như qua thế hệ sau.

Tuyến luân chuyển của virus: cây bệnh => ngòi chích => ruột trước => ruột giữa, ruột sau => xoang cơ thể => tuyến nước bọt => cây. Như vậy trong cơ thể côn trùng, virus nhóm bền vững tuần hoàn phải vượt qua ít nhất 2 rào cản:

- (i) Từ ruột vào xoang cơ thể
- (ii) Từ xoang cơ thể vào tuyến nước bọt

Virus có thời gian tồn tại khả năng dài, thường nhiều ngày tới nhiều tuần.

Virus có thời gian ẩn khá dài vì phải vượt qua nhiều rào cản tế bào.

Việc giải phóng virus từ vector trong quá trình chích truyền là do hành vi bơm nước bọt mang virus vào phloem của cây.

Truyền theo kiểu bền vững tái sinh

Tất cả các virus thực vật có vỏ bọc đều truyền theo kiểu bền vững tái sinh. Các virus thực vật có vỏ bọc chỉ thuộc 2 họ là *Bunyaviridae* (đều truyền bằng bọ trĩ) và *Rhabdoviridae* (phần lớn truyền bằng rầy).

Một số virus có vỏ bọc có ý nghĩa kinh tế là:

- Virus héo đốm cà chua (TSWV, Tomato spotted wilt virus, họ *Buniaviridae*) gây bệnh trên nhiều cây trồng và phân bố khắp thế giới, truyền bằng bọ trĩ.
- Virus vàng lụi lúa (RYSV, Rice yellow stunt virus, họ *Rhabdoviridae*), truyền bằng rầy xanh đuôi đen.

Các virus thực vật không có vỏ bọc mà truyền theo phương thức bền vững tái sinh đều truyền qua rầy. Các virus này thuộc 2 họ là *Reoviridae*, *Tymoviridae* và các virus thuộc chi *Tenuivirus*. Một số virus thuộc nhóm này là các virus có ý nghĩa ở Việt Nam như:

- Virus lùn sọc đen phương Nam (SRBSDV, họ *Reoviridae*), truyền bằng rầy lưng trắng, rầy nâu nhỏ.
- Virus lùn xoắn lá (RRSV, họ *Reoviridae*), truyền bằng rầy nâu.
- Virus lúa cỏ (RGSV, chi *Tenuivirus*), truyền bằng rầy nâu.

Đặc điểm

Nhìn chung virus nhóm này có nhiều đặc điểm chung với virus nhóm bền vững tuần hoàn.

Quá trình chích nạp cũng như chích truyền phần lớn xảy ra ở mạch phloem => thời gian chích nạp và chích truyền rất lâu và các virus có kiểu truyền này thì rất khó hoặc không thể truyền được bằng tiếp xúc cơ học vì virus thường chỉ giới hạn ở mạch phloem.

Virus tồn tại trong xoang cơ thể và nhiều trường hợp ở cả cơ quan sinh sản. Điều này dẫn tới:

- (i) Virus sẽ không bị mất sau mỗi lần côn trùng lột xác.
- (ii) Virus nhìn chung có truyền qua giao phối cũng như qua thế hệ sau.

Tuyến luân chuyển của virus: cây bệnh => ngòi chích => ruột trước => ruột giữa, ruột sau => xoang cơ thể => tuyến nước bọt/cơ quan sinh sản => cây. Như vậy trong cơ thể côn trùng, virus nhóm bền vững tái sinh phải vượt qua ít nhất 3 rào cản:

- (i) Từ ruột vào xoang cơ thể
- (ii) Từ xoang cơ thể vào tuyến nước bọt
- (iii) Từ xoang cơ thể vào cơ quan sinh sản như buồng trứng.

Virus nhân lên trong cơ thể côn trùng. Điều này dẫn tới virus có nhiều đặc điểm chung với các virus động vật về đặc tính xâm nhập tế bào, sinh sản và lắp ráp phân tử.

Virus có thời gian tồn tại khả nhiễm dài, thường cả đời.

Virus có thời gian ẩn khá dài vì cần thời gian cho virus nhân lên trong côn trùng.

Việc giải phóng virus từ vectơ trong quá trình chích truyền do hành vi bơm nước bọt đưa virus vào phloem.

1.8. CHẨN ĐOÁN BỆNH VIRUS THỰC VẬT

Giới thiệu

Chẩn đoán là xác định chính xác tác nhân gây bệnh. Nhiều phương pháp đã được sử dụng để chẩn đoán virus thực vật dựa vào:

- Đặc trưng sinh học: Triệu chứng, cây chỉ thị
- Đặc trưng hình thái: Kính hiển vi điện tử, thể vùi
- Đặc trưng phân tử (mức protein): Khuếch tán trong gel, ELISA, dot blot miễn dịch
- Đặc trưng phân tử (mức acid nucleic): PCR, RT-PCR, dot blot (lai DNA), dsRNA, giải trình tự

Hiện nay, kỹ thuật chẩn đoán bệnh virus phổ biến nhất, đơn giản và tương đối rẻ là kỹ thuật ELISA. Ngoài ra, cùng với sự phát triển của công nghệ sinh học thì các kỹ thuật liên quan đến PCR, RT-PCR và giải trình tự cũng đang trở nên thông dụng.

Chẩn đoán dựa vào triệu chứng

Hiển nhiên, chẩn đoán bằng triệu chứng phụ thuộc lớn vào kinh nghiệm của người nghiên cứu.

- **Ưu điểm:** là kỹ thuật chẩn đoán nhanh chóng, rẻ nhất và trong nhiều trường hợp khá chính xác.
- **Nhược điểm:** nhìn chung, chẩn đoán dựa vào triệu chứng bệnh virus rất khó và trong nhiều trường hợp là không thể vì một số lý do sau:

Mức độ biến động triệu chứng quá lớn, phụ thuộc nhiều vào điều kiện ngoại cảnh và trạng thái sinh lý của cây.

Một virus có thể tạo rất nhiều triệu chứng khác nhau trên cùng một cây, trên các giống cây khác nhau.

Nhiều virus khác nhau, thậm chí thuộc các đơn vị phân loại khác nhau có thể tạo triệu chứng giống nhau.

Trên một cây có thể nhiễm 2 hay nhiều virus khác nhau. Tương tác của các virus có thể rất phức tạp.

Chẩn đoán dựa vào cây chỉ thị

Cây chỉ thị là các cây tạo ra các triệu chứng khá đặc trưng cho 1 virus. Đây là kỹ thuật chẩn đoán được thực hiện nhiều trước giai đoạn phát triển của công nghệ sinh học.

Nhiều cây chỉ thị thông dụng cho virus thực vật thuộc các chi *Chenopodium*, *Nicotiana*, *Cucumis*, *Phaseolus*, *Solanum*, *Vicia*, *Vigna* và *Brassica*. Các cây chỉ thị có thể tạo vết bệnh cục bộ hay nhiễm bệnh hệ thống (Hình 8-1).

Một số cây chỉ thị như rau muối (*Chenopodium amaranticolor*, *C. quinoa*), thuốc lá cảnh (*N. benthamiana*) phản ứng với rất nhiều virus khác nhau.

- **Ưu điểm.** Vì là một thử nghiệm sinh học nên phản ứng trên cây chỉ thị cho phép xác định chính xác bản chất virus của tác nhân gây bệnh. Trong nhiều trường hợp, sử dụng cây chỉ thị thích hợp cho phép phân biệt được các chủng của virus.
- **Nhược điểm.** Đắt (tốn công lao động, đòi hỏi phương tiện chăm sóc như nhà lưới, nhà kính chuẩn).

Nhiều trường hợp không thể phân biệt được mức loài. Một số cây chỉ thị như thuốc lá phản ứng với rất nhiều virus.

Tốn thời gian: để phản ứng có thể đánh giá được thường mất nhiều ngày, nhiều tuần, thậm chí nhiều tháng.



Hình 1-25 Lây nhiễm nhân tạo trên cây chỉ thị thuốc lá và rau muối (ảnh trái, giữa). Triệu chứng đốm chết hoại do Citrus psorosis virus (CPsV) trên cây rau muối *C. amaranticolor* (<http://www.DPWeb.net>)

Kỹ thuật hiển vi điện tử

Quan sát mẫu virus dưới kính hiển vi điện tử EM (Electron microscope) là một kỹ thuật quan trọng trong phát hiện và chẩn đoán virus. Có 2 loại kính hiển vi điện tử chính được sử dụng là kính hiển vi xuyên TEM (Transmission EM) và kính hiển vi quét SEM (Scanning EM). Kính hiển vi điện tử sử dụng sóng điện tử (có bước sóng > sóng ánh sáng 100.000x) để khuếch đại hình ảnh nên có thể phóng đại hình ảnh tới đa 2.000.000x

Mẫu virus quan sát có thể từ phân tử virus đã tinh chiết hoặc trực tiếp trong mô (dùng kỹ thuật lát cắt siêu mỏng)

- **Ưu:** Phát hiện trực tiếp virus trong mô; Cho phép dự đoán tới chi
- **Nhược:** đắt, phức tạp

Kỹ thuật chẩn đoán dựa vào thể vùi

Loại thể vùi

Thể vùi (inclusion body) là sự kết tụ của:

- Các phân tử virus (tất cả các nhóm virus),
- Các protein vỏ virus (ví dụ tymovirus),
- Các protein không phải protein vỏ virus (ví dụ tenuivirus, potyvirus),

- Các cấu tử tế bào bị biến đổi do sự nhiễm bệnh (ví dụ chloroplasts của tế bào cây bị nhiễm tymovirus).

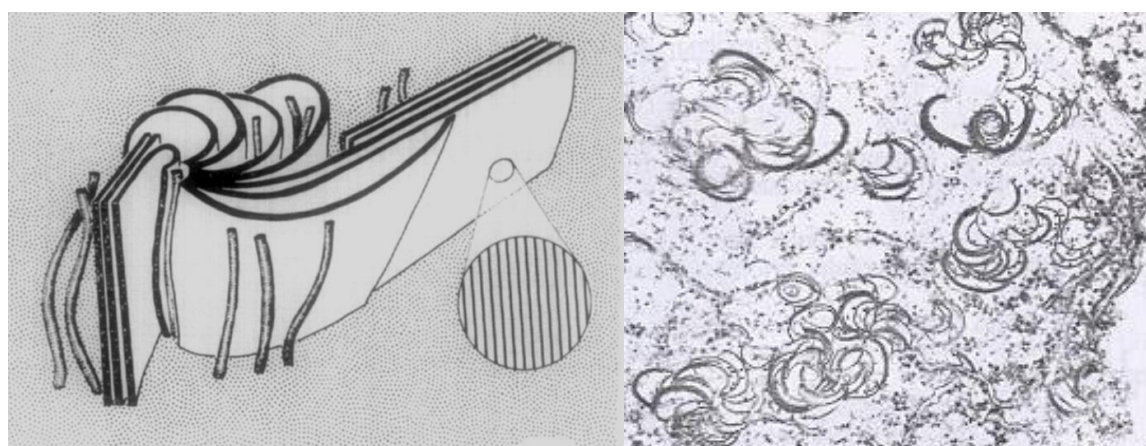
Vị trí hình thành thể vùi trong tế bào

- Trong tế bào chất (ví dụ thể vùi hình trụ của potyvirus)
- Trong nhân (ví dụ thể vùi trong nhân của geminivirus)
- Trong cả tế bào chất và nhân (ví dụ thể vùi tinh thể của potyvirus)
- Trong không bào và tế bào chất (ví dụ thể vùi tinh thể của cucumovirus).

Ví dụ một số loại thể vùi

Thể vùi trong tế bào chất của potyvirus.

Được cấu tạo từ các phân tử protein CI (cytoplasm inclusion), phân tử protein xếp xếp thành các phiến protein. Các phiến này lại lắp ráp thành các dạng như dạng vòng bánh xe, dạng cuộn, dạng phiến. Hình thái thể vùi đặc trưng cho các potyvirus và có giá trị chẩn đoán (Hình 8-2).



Hình 1-26 Sơ đồ (trái) và ảnh chụp hiển vi điện tử (phải) của thể vùi tế bào chất của potyvirus

Thể vùi của TMV

Các phân tử virus hình gậy xếp thành hàng. Các hàng lại chồng lớp lên nhau thành phiến tinh thể hình lục giác. Thể vùi của TMV hình thành trong tế bào chất và không bào.

Ưu điểm của chẩn đoán bằng thể vùi.

Một trong các ưu điểm của thể vùi là rất đơn giản và có thể chẩn đoán bằng kính hiển vi quang học. Qui trình kiểm tra thể vùi virus có thể tóm tắt như sau (Hình 8-3):

Tước 1 mảnh biểu bì hoặc cắt một mảnh mô mỏng.

Làm trong mô bằng dung dịch Triton X-100 5 % trong khoảng 10-15 phút.

Nhuộm thể vùi bằng thuốc nhuộm (10-15 phút). Một số thuốc nhuộm phổ biến là (i) Calcomine orange / 2-methoxyethanol, (ii) Brilliant green / 2-methoxyethanol và (iii) Azure A / 2-methoxyethanol + 0.2 M Na₂HPO₄.

Xử lý mô bằng dung dịch rửa (70 % 2-methoxyethyl acetate + 30% ethanol).

Kiểm tra dưới kính hiển vi quang học



Hình 1-27 Dụng cụ và vật liệu dùng để kiểm tra thể vùi virus thực vật bằng kính hiển vi quang học (<http://plantpath.ifas.ufl.edu/pdc/Inclusionpage/Florvirus.html>)

Kỹ thuật PCR và RT-PCR

Giới thiệu và nguyên lý

PCR là một trong các phát minh quan trọng nhất của thế kỷ 20 trong sinh học phân tử. PCR là một kỹ thuật đơn giản nhưng được sử dụng trong hầu hết các nghiên cứu CNSH. Có vô số tài liệu tiếng Việt và tiếng Anh về kỹ thuật PCR. Dưới đây là tóm tắt kỹ thuật.

Tùy thuộc khuôn là DNA hay RNA mà có tên phản ứng là PCR hay RT-PCR:

Khuôn là DNA => PCR (polymerase chain reaction).

Khuôn là RNA => RT-PCR (Reverse transcription – PCR).

Các bước cơ bản trong 1 phản ứng PCR gồm 3 bước :

Biến tính. Hỗn hợp phản ứng được đặt ở nhiệt độ cao (92 – 94 °C) trong thời gian ngắn (khoảng 20 – 60 giây). Ở nhiệt độ này, khuôn DNA dạng sợi kép tách thành sợi đơn.

Gắn mồi. Hỗn hợp phản ứng được đặt ở nhiệt độ gắn mồi (Ta, annealing temperature) trong thời gian ngắn. Ta được tính toán tùy thuộc đặc điểm mồi, thường trong khoảng 40 – 60 °C). Ở nhiệt độ này, mồi gắn vào khuôn sợi đơn ở vị trí đặc hiệu.

Tổng hợp sản phẩm PCR. Hỗn hợp phản ứng được tăng tới nhiệt độ tối ưu cho phản ứng tổng hợp chuỗi (72 hoặc 68 °C tùy DNA polymerase chịu nhiệt).

Trong trường hợp RT-PCR, trước khi thực hiện PCR, cần phải có thêm một bước chuyển khuôn RNA thành cDNA bằng enzyme phiên mã ngược (reverse transcriptase). Hai bước RT và PCR có thể được thực hiện riêng rẽ hay trong cùng một tube phản ứng.

Các bước trong chẩn đoán virus thực vật bằng PCR/RT-PCR :

Thiết kế mồi (primer).

Chiết acid nucleic tổng số (DNA hoặc RNA) từ mô cây dùng các kỹ thuật chiết thông thường (rẻ) hoặc kit chiết thương mại (đắt).

Chạy PCR hoặc RT-PCR trên máy PCR

Kiểm tra và đánh giá kết quả bằng điện di agarose.

Thiết kế và lựa chọn môi (primer)

Môi là một chuỗi oligonucleotide sợi đơn ngắn (kích thước thường từ 18 – 24 nucleotides). Có hai loại môi được sử dụng cho chẩn đoán bệnh cây:

Môi chung (universal/degenerate primers): được thiết kế trên các vùng bảo thủ cao, có khả năng phát hiện các đối tượng khác hẳn nhau (thường các đối tượng của một chi, một họ).

Môi đặc hiệu (specific primers): được thiết kế trên các vùng có thể phân biệt được loài, thậm chí dưới loài như chủng/nòi/type sinh học.

Có được các môi tốt là bước quan trọng nhất trong chẩn đoán bệnh cây. Có 2 cách để có thể nhận được các môi tốt.

- Tham khảo và lựa chọn từ các nghiên cứu đã được công bố.
- Tự thiết kế môi.

Tự thiết kế môi

Để tự thiết kế môi dựa trên các chuỗi gen sẵn có trên Genbank, người ta cần sử dụng một phần mềm có khả năng căn trình tự đa chuỗi (multiple sequence alignment), chẳng hạn ClustalX, Bioedit. Ngay sau khi các chuỗi DNA đã được căn trình tự, chúng ta có thể thiết kế các môi chung hay môi đặc hiệu tùy theo yêu cầu.

Các chú ý khi thiết kế môi:

Độ dài môi. Nên nằm trong khoảng 18-22 nucleotides. Độ dài này đủ dài để đảm bảo tính đặc hiệu và đủ ngắn để môi gắn dễ dàng vào khuôn.

Nhiệt độ tách chuỗi (T_m = melting temperature). T_m là nhiệt độ mà tại đó 1/2 số sợi DNA kép tách thành sợi đơn. T_m của môi nên nằm trong khoảng 52-58 °C.

Nhiệt độ gắn môi (T_a = annealing temperature). T_a được tính dựa trên T_m . T_a quá cao làm môi khó gắn vào khuôn dẫn tới năng suất PCR thấp. T_a quá thấp làm môi dễ gắn không đặc hiệu vào khuôn dẫn tới tạo các sản phẩm không đặc hiệu. T_a của 2 môi xuôi và ngược dòng nên tương đương. Có nhiều cách tính T_a , dưới đây là một công thức:

$$T_a = 0.3 \times T_m(\text{môi}) + 0.7 T_m(\text{sản phẩm}) - 14.9$$

Hàm lượng GC. Số các gốc G và C nên nằm trong khoảng 40-60%.

Chuỗi GC đầu 3'. Đầu tận cùng 3' nên là G hoặc C hoặc GC hoặc CG. Đầu 3' không nên có nhiều hơn 3 gốc liên tục G/C.

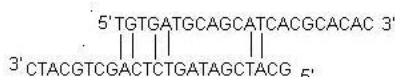
Cấu trúc thứ cấp. Cấu trúc thứ cấp có thể hình thành trong cùng một môi hoặc giữa 2 môi. Môi chứa cấu trúc thứ cấp xấu thường dẫn tới năng suất PCR bị giảm, thậm chí không có sản phẩm. Tính ổn định của cấu trúc thứ cấp được đo bằng ΔG (là năng lượng cần để phá vỡ cấu trúc thứ cấp, được tính từ các phần mềm thiết kế môi). Các loại cấu trúc thứ cấp là:

Hairpins. Là cấu trúc thứ cấp hình thành trong nội bộ môi. Giá trị ΔG của các hairpin đầu 3' không nên <-2 kcal/mol và của các hairpin ở giữa không nên <-3 kcal/mol.



Tự môi (Self Dimer). Là cấu trúc hình thành giữa các phân tử của cùng loại môi. Giá trị ΔG của các hairpin đầu 3' không nên <-5 kcal/mol và của các hairpin ở giữa không nên <-6 kcal/mol.

Tự môi chéo (Cross Dimer). Là cấu trúc hình thành giữa các phân tử của 2 môi khác nhau (cặp môi trong phản ứng PCR). Giá trị ΔG của các hairpin đầu 3' không nên <-5 kcal/mol và của các hairpin ở giữa không nên <-6 kcal/mol.



Các chuỗi lặp. Mỗi không nên chứa nhiều chuỗi lặp kép (ví dụ TATATATA) hoặc chuỗi lặp đơn (ví dụ TTTT) vì có thể gây ra hiện tượng bắt cặp nhầm (misprime). Trong một môi, chỉ nên có tối đa 4 chuỗi lặp. Các chuỗi lặp cũng không nên xuất hiện nhiều lần trong 1 môi.

Độ ổn định đầu 3'. Tận cùng đầu 3' (khoảng 5 nucleotides) không nên chứa toàn gốc G hoặc C vì có giá trị ΔG cao dễ dẫn tới bắt cặp không đặc hiệu vào khuôn. Trái lại nếu đầu 3' chứa quá nhiều gốc T hoặc A sẽ khó bắt cặp.

Vùng thiết kế môi của khuôn. Vùng thiết kế môi của khuôn không nên chứa quá nhiều cấu trúc thứ cấp. Nếu các cấu trúc thứ cấp này ổn định ở nhiệt độ gắn môi thì môi sẽ không thể bắt cặp được.

Thiết kế môi chung (degenerate primer)

Môi chung là một môi được thiết kế trên vùng bảo thủ. Nếu vùng bảo thủ là đồng nhất thì môi chung sẽ chỉ là một chuỗi môi duy nhất. Nếu vùng bảo thủ chứa các vị trí sai khác thì môi chung thực chất là một hỗn hợp các môi, mỗi môi tương ứng với một sai khác nucleotide.

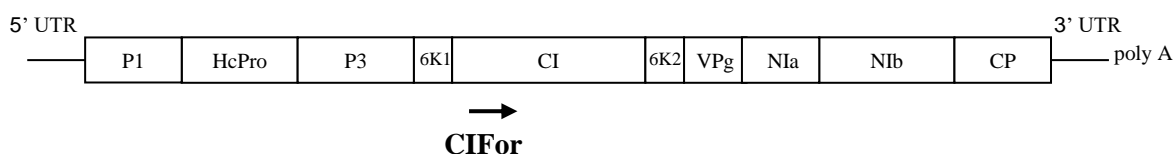
Trong thiết kế môi chung, người ta sử dụng các mã suy biến tại các vị trí sai khác, ví dụ R là A hoặc G (số suy biến = 2); Y là C hoặc T (số suy biến bằng 2); N là A hoặc T hoặc G hoặc C (số suy biến bằng 4). Số sai khác nucleotide tại mỗi vị trí của môi được gọi là các số suy biến. Tổng số môi trong hỗn hợp sẽ bằng tích của tất cả các số suy biến tại mỗi vị trí. Để làm giảm số lượng môi trong hỗn hợp, người ta thường sử dụng một nucleotide đặc biệt là inosine. Inosine có thể ghép cặp với bất kỳ nucleotide nào trong số 4 nucleotide A, T, G, C (Bảng 8-1).

Bảng 1-5 Mã suy biến trong thiết kế môi chung

Viết tắt	Nucleotide tương ứng	Số suy biến
R	A hoặc G	2
Y	C hoặc T	2
M	A hoặc C	2
K	G hoặc T	2
W	A hoặc T	2
S	C hoặc G	2
B	C hoặc G hoặc T	3
D	A hoặc G hoặc T	3
H	A hoặc C hoặc T	3
V	A hoặc C hoặc G	3
N	A hoặc C hoặc G hoặc T	4
i	Inosine	1

Ví dụ môi chung

Một ví dụ môi chung là môi CIFor được thiết kế trên vùng bảo thủ của gen CI của các potyvirus. Môi này có trình tự là: 5'-GGiVViGTiGGiWSiGGiAARTCiAC-3'. Môi CIFor có khả năng phát hiện hầu hết các virus thuộc chi *Potyvirus*. Hình dưới minh họa vị trí môi trên bộ gen virus, trình tự môi cũng như trình tự chuỗi gen CI của một số virus đại diện tại vị trí môi. Môi này đã sử dụng inosine tại các vị trí có số suy biến bằng 4, do vậy đã giảm số lượng môi đơn trong hỗn hợp môi từ 524288 xuống còn 54 môi.



Virus	Trình tự nucleotide								
Môi CIFor (5' – 3')	GGi	VVi	GTi	GGi	WSi	GGi	AAR	TCi	AC
Zucchini yellow mosaic virus	GGA	GCA	GTG	GGT	TCT	GGA	AAA	TCA	AC
Dasheen mosaic virus	GGT	GCT	GTC	GGG	TCT	GGT	AAG	TCG	AC
Potato virus A	GGA	GCA	GTT	GGT	TCT	GGC	AAA	TCA	AC
Clover yellow vein virus	GGG	GCT	GTT	GGA	TCA	GGA	AAA	TCG	AC

Lily mottle virus	GGT	GCT	GTT	GGA	TCT	GGA	AAG	TCG	AC
Papaya ringspot virus	GGA	GCT	GTT	GGT	AGT	GGT	AAA	TCA	AC
Lettuce mosaic virus	GGT	GGT	GTC	GGC	TCC	GGC	AAG	TCT	AC
Potato virus Y	GGA	GCT	GTT	GGG	TCT	GGA	AAG	TCA	AC
Maize dwarf mosaic virus	GGA	GCA	GTC	GGT	TCG	GGA	AAA	TCA	AC
Sugarcane mosaic virus	GGA	GCT	GTT	GGA	TCA	GGA	AAA	TGC	AC
Johnsongrass mosaic virus	GGC	AAC	GTA	GGA	TCT	GGG	AAA	TCA	AC
Cocksfoot streak virus	GGA	CCG	GTC	GGT	TCC	GGT	AAA	TCG	TC
Số suy biến		3 3			2 2		2		
Tổng số môi trong hỗn hợp môi (dùng inosine)	$3 \times 3 \times 2 \times 2 \times 2 = 54$								
Tổng số môi trong hỗn hợp môi (nếu không dùng inosine)	$4 \times 2 \times 2 \times 4 \times 4 \times 4 \times 2 \times 2 \times 4 \times 2 \times 4 = 524288$								

Chẩn đoán dựa vào RNA sợi kép

Nhiều virus thực vật có bộ gen RNA. Các virus RNA sợi kép thường có bộ gen phân đoạn, trong đó số lượng và kích thước các phân đoạn có thể có giá trị chẩn đoán vì đặc trưng cho chi (ví dụ như các reovirus). Các virus có bộ gen RNA sợi đơn cũng có thể chẩn đoán bằng kỹ thuật này vì chúng hình thành các phân tử dsRNA là dạng trung gian trong quá trình tái bản. Ngoài ra, nhiều virus hình thành các phân tử phụ genome (subgenome) và các phân tử này cũng tạo các phân tử dsRNA có kích thước đặc trưng.

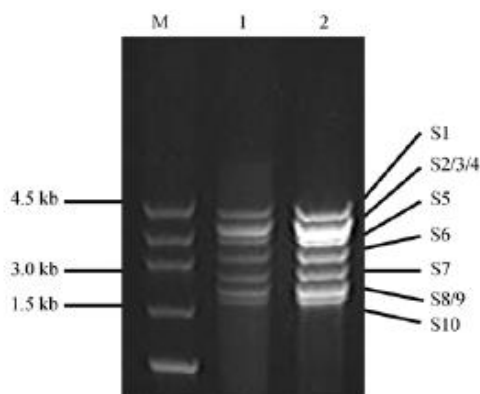
Về mặt kỹ thuật, chẩn đoán dsRNA của mẫu virus được thực hiện qua các bước sau:

Chiết RNA hoặc acid nucleic tổng số từ mô cây

Tinh chiết dsRNA bằng cách cho dịch RNA hoặc acid nucleic tổng số vào cột chứa bột cellulose (loại CF11, Whatman) với điều kiện nồng độ ethanol = 16.5%. Ở nồng độ ethanol này, chỉ các phân tử dsRNA liên kết vào hạt cellulose. Tiếp theo, các loại acid nucleic khác (ssRNA, DNA) bị loại bỏ khỏi cột bằng rửa với đệm chứa ethanol 16.5 %. Cuối cùng, dsRNA được giải hấp thụ bằng đệm không chứa ethanol.

Phân tích kết quả bằng điện di polyacrylamid hoặc agarose

Kỹ thuật này phổ biến trong những năm 1990 nhằm chẩn đoán nhiều virus, đặc biệt các virus trên cây có múi như CTV. Hiện nay, do kỹ thuật quá tốn công sức nên hầu như không được sử dụng, ngoại trừ để phát hiện và xác định các virus mới (Hình 8-4).



Hình 1-28 Phát hiện bộ gen dsRNA của virus lùn sọc đen phương Nam (Zhou et al., 2008)

Chẩn đoán dựa vào huyết thanh học

Các khái niệm

Cơ sở của phương pháp huyết thanh học là dựa vào sự tương tác đặc hiệu giữa kháng nguyên và kháng thể đặc hiệu với kháng nguyên đó

a. Kháng nguyên (antigen)

Kháng nguyên thường là các đại phân tử chứa protein hoặc polysaccharide. Kháng nguyên phải có hai đặc tính quan trọng: (1) **hoạt tính sinh miễn dịch** tức khả năng kích thích động vật mấu nóng hình thành kháng thể đặc hiệu và (2) **tính đặc hiệu** tức khả năng liên kết với kháng thể đặc hiệu tương ứng. Một số chất có trọng lượng phân tử thấp như các amino acid, một số loại polysaccharide... không có hoạt tính sinh miễn dịch nhưng lại có khả năng liên kết với kháng thể đặc hiệu với kháng nguyên có chứa các chất này. Các chất đó được gọi là bán kháng nguyên (hapten).

b. Nhóm quyết định kháng nguyên (epitope)

Trên bề mặt kháng nguyên có các vùng đặc biệt có chức năng cảm ứng hình thành kháng thể và là vị trí liên kết kháng thể. Các vùng này được gọi là các **nhóm quyết định kháng nguyên** (epitope).

Một nhóm quyết định kháng nguyên chỉ kích thích hệ miễn dịch của động vật mấu nóng hình thành một dòng phân tử kháng thể. Kháng nguyên chứa một nhóm quyết định kháng nguyên gọi là kháng nguyên đơn giá, chứa nhiều nhóm quyết định kháng nguyên gọi là kháng nguyên đa giá. Các epitope có thể được chia thành:

Epitope trình tự: chỉ phụ thuộc trình tự amino acid.

Epitope hình thái: phụ thuộc vào cả cấu trúc không gian.

Epitope liên tục: là một chuỗi amino acid liên tục.

Epitope không liên tục: là các amino acid không liền nhau (trên chuỗi cấp 1) nhưng do sự gấp của protein nên xếp gần nhau dẫn tới cùng nhau tạo thành 1 epitope.

c. Kháng nguyên của virus

Đối với virus, nhìn chung bất kỳ một protein nào của virus cũng có thể được sử dụng làm kháng nguyên. Tuy nhiên, loại kháng nguyên phổ biến nhất là protein vỏ virus. Kháng nguyên vỏ protein virus có thể được tạo ra bằng: (i) tinh chiết phân tử virus từ cây nhiễm bệnh hoặc (ii) biểu hiện vỏ protein trong tế bào vi khuẩn dùng công nghệ sinh học.

d. Kháng thể (antibody)

Sự hình thành kháng thể: Hệ thống miễn dịch của cơ thể động vật mấu nóng bao gồm các cơ quan có thẩm quyền miễn dịch và các tế bào có thẩm quyền miễn dịch. Các cơ quan có thẩm quyền miễn dịch (tuyến ức, lách, tủy...) là nơi sản sinh, duy trì, biệt hoá và điều khiển sự hoạt động của các tế bào có thẩm quyền miễn dịch. Các tế bào có thẩm quyền miễn dịch (chủ yếu gồm 2 loại là lympho bào B và lympho bào T) tham gia vào quá trình đáp ứng miễn dịch của cơ thể nhằm chống lại các tác nhân lạ xâm nhập. Có 2 kiểu đáp ứng miễn dịch:

Kiểu đáp ứng miễn dịch dịch thể: Khi kháng nguyên xâm nhập vào cơ thể, bị đại thực bào vây bắt, xử lý và trình diện cho lympho bào B. Lympho bào B được biệt hoá thành tế bào plasma sản xuất ra kháng thể dịch thể. Kháng thể dịch thể tồn tại trong dịch cơ thể (huyết tương) và sẽ kết hợp đặc hiệu với kháng nguyên.

Kiểu đáp ứng miễn dịch tế bào: Khi kháng nguyên xâm nhập vào cơ thể, bị đại thực bào vây bắt, xử lý và trình diện cho lympho bào T. Lympho bào T được biệt hoá thành lympho bào T mẫn cảm kháng nguyên và chính bản thân chúng là kháng thể tế bào. Kháng thể tế bào tồn tại trên bề mặt tế bào và cũng kết hợp đặc hiệu với kháng nguyên.

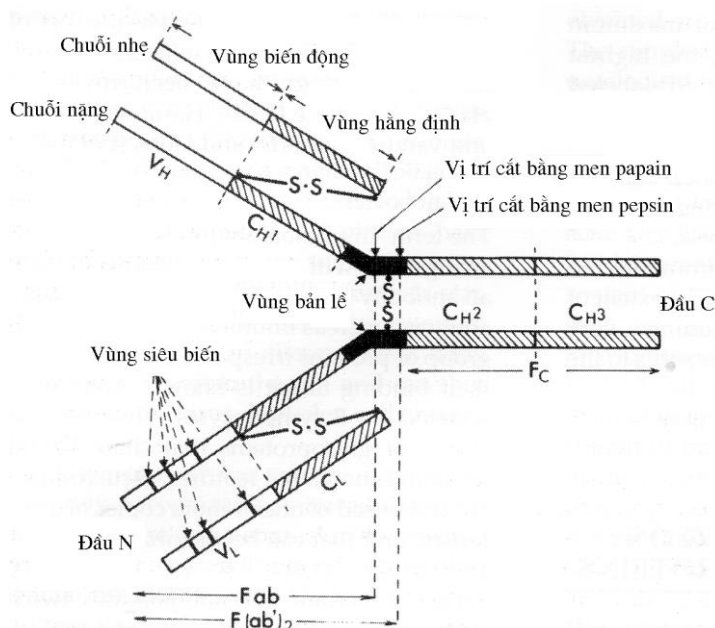
Như vậy, theo nghĩa rộng, **kháng thể là bất kỳ phân tử nào có khả năng liên kết đặc hiệu với kháng nguyên**. Tuy nhiên, kháng thể sử dụng trong chẩn đoán bằng kỹ thuật huyết thanh học chính là các kháng thể dịch thể

Kháng thể dịch thể là các globulin miễn dịch (Immunoglobulin, Ig). Có 5 lớp Ig là IgG, IgM, IgA, IgD và IgE nhưng trong chẩn đoán huyết thanh học, thường chỉ sử dụng IgG.

Cấu tạo của IgG (Hình 8-5) gồm 4 phân tử polypeptid (2 chuỗi nặng, 2 chuỗi nhẹ) liên kết với nhau bằng các cầu nối disulfide. Phân tử IgG có 3 vùng chức năng chính (có thể tách được bằng một protease là papain)

Hai mảnh Fab (antigen binding fragment) giống nhau về cấu trúc và mang tính chất kháng thể do chứa vị trí liên kết với kháng nguyên. Các mảnh Fab, khi được tách ra bằng papain, sẽ vẫn giữ nguyên hoạt tính kháng thể nhưng không thể tạo ra phản ứng kết tủa hoặc phản ứng ngưng kết.

Một mảnh Fc (crystallizable fragment) không có hoạt tính kháng thể nhưng chứa nhóm quyết định kháng nguyên của phân tử IgG. Do vậy khi tiêm phân tử IgG nguyên vẹn hoặc chỉ cần mảnh Fc từ 1 loài (chẳng hạn thỏ) sang 1 loài khác (chẳng hạn dê) thì loài thứ 2 sẽ vẫn tạo ra kháng thể đặc hiệu kháng thể của loài thứ nhất (anti-antibody). Đây là cơ sở cho các kiểu ELISA gián tiếp.



Hình 1-29 Cấu trúc kháng thể (Hull, 2002)

e. Kháng thể đơn dòng và kháng thể đa dòng

Kháng thể đơn dòng (Monoclonal antibody, MAb):

Là kháng thể được hình thành chỉ từ một dòng lympho bào B.

Nhận biết và liên kết với chỉ 1 epitope.

Sản xuất phức tạp.

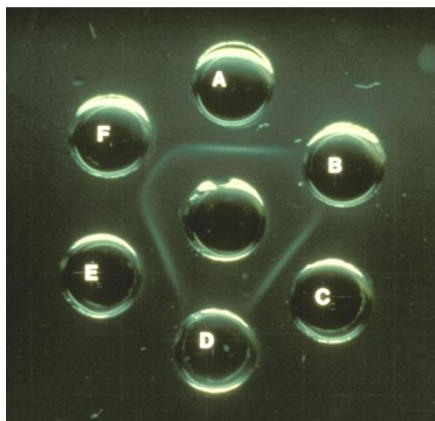
Kháng thể đa dòng (Polyclonal antibody, PAb):

Là một hỗn hợp của các kháng thể đơn dòng.

Sản xuất đơn giản. Việc sản xuất bao gồm tiêm kháng nguyên (phân tử virus, protein virus, protein vi khuẩn, nấm...) vào động vật máu nóng (như thỏ, dê, chuột...) và thu kháng huyết thanh. Kháng huyết thanh sẽ chứa một hỗn hợp nhiều dòng kháng thể, mỗi dòng đặc hiệu cho 1 epitope.

Kỹ thuật chẩn đoán Ouchterlony

Kỹ thuật Ouchterlony còn được gọi là kỹ thuật “Khuếch tán miễn dịch kép trong gel”. Đây là một trong các kỹ thuật huyết thanh học được sử dụng phổ biến trước khi áp dụng kỹ thuật ELISA. Nguyên lý của kỹ thuật rất đơn giản: người ta chế tạo các đĩa gel với các giếng gel. Ở giếng giữa là kháng huyết thanh chứa kháng thể virus. Các giếng xung quanh sẽ nhỏ các mẫu cần kiểm tra. Virus và IgG sẽ khuếch tán ra xung quanh giếng. Nếu kháng thể và virus là đồng dạng của nhau thì chúng sẽ kết hợp tạo thành một vạch mờ (Hình 8-6).



Hình 1-30 Kỹ thuật Outerlony chẩn đoán virus. Các mẫu A, C, E, F là các mẫu dương
Kỹ thuật chẩn đoán bằng ELISA

ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) là một kỹ thuật chẩn đoán quan trọng và phổ biến nhất hiện nay so với các kỹ thuật huyết thanh học khác. Trong bệnh cây, ELISA được sử dụng chủ yếu để chẩn đoán virus và một số vi khuẩn. Một trong số các hãng nổi tiếng có bán các kit ELISA chẩn đoán bệnh cây là Agdia (<http://www.agdia.com/>).

Vật liệu chính cho ELISA

- **Bản ELISA**: bằng nhựa (polystyrene), 96 giếng, liên kết không đặc hiệu các loại protein
- **Các loại dung dịch đệm**: Đệm nghiền mẫu, đệm pha kháng thể, đệm rửa, đệm pha chất nền (cơ chất).
- **Kháng thể các loại**
- **Chất nền**: nhiều loại, tùy thuộc enzyme, phổ biến nhất là NPP (nitrophenyl phosphate)
- **Enzyme**: nhiều loại, cần cơ chất tương ứng, phổ biến nhất là alkaline phosphatase (cơ chất tương ứng là NPP)
- **Máy đọc ELISA**: là một loại thiết bị so màu vi phần nhằm lượng hóa màu phản ứng.
- **Dụng cụ nghiền, chiết mẫu cây**: chày, cối sứ...

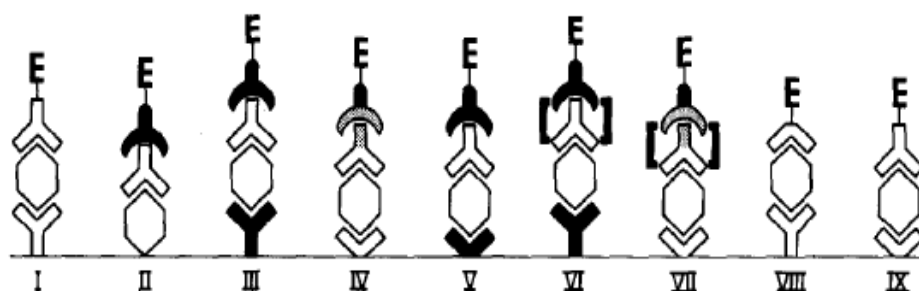
Các kỹ thuật ELISA

Có rất nhiều kỹ thuật ELISA khác nhau. Dựa vào quan hệ của kháng thể liên kết enzyme với kháng nguyên, ELISA có thể được chia làm 2 nhóm (Hình 8-7) là:

- **Nhóm trực tiếp** (direct ELISA): Kháng thể liên kết enzyme là kháng thể phát hiện kháng nguyên (ví dụ các kỹ thuật I, VIII và IX trong sơ đồ).
- **Nhóm gián tiếp** (indirect ELISA): Kháng thể liên kết enzyme không phải là kháng thể phát hiện kháng nguyên (ví dụ các kỹ thuật II, III, IV, V, VI, VII trong sơ đồ).

ELISA cũng gồm rất nhiều kiểu khác nhau. Hai kiểu đang được sử dụng là:

- **Kẹp kép kháng thể** (double antibody sandwich = DAS): tất cả các kỹ thuật ngoài trừ kỹ thuật II trong sơ đồ.
- **Bẫy kháng nguyên trước** (plate-trapped antigen = PTA): như kỹ thuật II trong sơ đồ.



Hình 1-31 Các kỹ thuật ELISA khác nhau

Quy trình thử 2 kiểu phản ứng ELISA đại diện cho mỗi nhóm

a. Kỹ thuật ELISA trực tiếp kiểu kẹp kép kháng thể (DAS-ELISA)

- **Cố định IgG đặc hiệu virus vào bản ELISA:** IgG được hoà trong dung dịch đệm phủ (thường là đệm carbonate) và được cho vào giếng với lượng 100 µl/giếng. Bản ELISA được ủ trong hộp ẩm ở 37 °C khoảng 2-4 giờ. Bản ELISA, thường cấu tạo bằng polystyrene có khả năng liên kết không đặc hiệu với protein do vậy sẽ liên kết với các phân tử IgG (là protein miễn dịch). Sau khi ủ, giếng được rửa bằng đệm rửa và nước.
- **Cố định dịch cây vào bản ELISA:** Nghiền mẫu cây trong đệm chiết mẫu thành dịch cây. Dịch cây được cho vào giếng với lượng 100 µl/giếng. Bản ELISA được ủ ở 37 °C khoảng 2-4 giờ hoặc qua đêm ở 4-6 °C. Nếu trong dịch cây có chứa virus thì virus sẽ liên kết đặc hiệu với IgG có sẵn trong giếng còn protein của cây hoặc các virus khác sẽ không liên kết. Sau khi ủ, bản ELISA được rửa như bước 1.
- **Cố định IgG liên kết enzyme:** Hoà IgG liên kết enzyme (IgG-E) trong đệm liên kết và cho vào giếng với lượng 100 µl/giếng. IgG này giống như IgG của bước 1 nhưng chỉ khác là nó được liên kết từ trước với 1 enzyme là Alkaline Phosphatase (AP). Bản ELISA được ủ và rửa như bước 1.
- **Cố định chất nền và đánh giá kết quả:** Hoà chất nền trong đệm chất nền theo tỷ lệ 0.6 mg/ml) và cho giếng với lượng 100 µl/giếng. Chất nền ở đây là Nitrophenyl phosphate (NPP). Bản ELISA được ủ ở nhiệt độ phòng trong hộp ẩm trong tối 60 phút. Phản ứng hoá học ở đây là NPP sẽ bị thủy phân thành Nitrophenol phosphate dưới sự xúc tác của enzyme AP. Nitrophenol phosphate là chất có màu vàng, do vậy có thể nhận biết được bằng mắt hoặc bằng máy đọc ELISA (máy so màu). Hiện nhiên, do nồng độ NPP đều giống nhau ở các giếng nên giếng nào có màu vàng càng đậm chứng tỏ nồng độ enzyme càng cao tức nồng độ virus trong mẫu thử càng cao. Có thể ngừng phản ứng thủy phân bằng cách bổ sung dung dịch NaOH 3M với lượng 25-50 µl/giếng.

b. Phản ứng ELISA gián tiếp kiểu bắt kháng nguyên trước (PTA-ELISA)

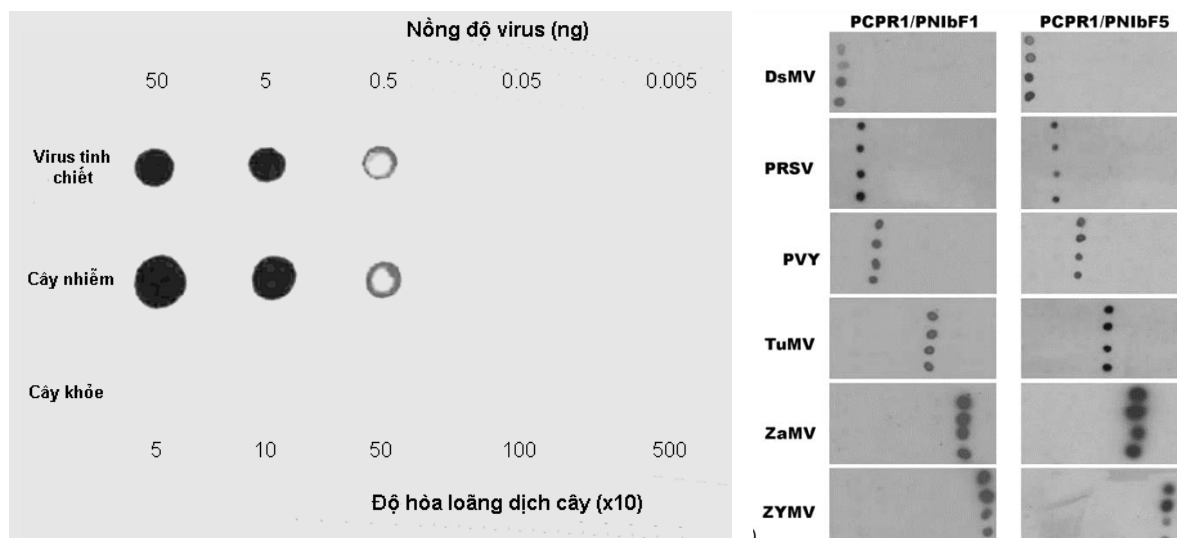
- **Cố định dịch cây vào bản ELISA:** Nghiền mẫu cây trong đệm phủ và cho 100µl/giếng. ủ bản ELISA qua đêm ở 4-6°C trong hộp ẩm. Sáng hôm sau, rửa 3 lần bằng đệm rửa. Protein của cây và virus trong dịch cây (nếu có) sẽ liên kết không đặc hiệu vào thành giếng.
- **Cố định IgG đặc hiệu virus vào bản ELISA:** Hoà IgG đặc hiệu virus trong đệm huyết thanh và cho 100µl/giếng. Ủ bản ELISA ở 37 °C 1-2 giờ trong hộp ẩm. Rửa bản ELISA như bước 1.
- **Cố định IgG đặc hiệu IgG thả liên kết AP vào bản ELISA:** Hoà IgG đặc hiệu IgG thả liên kết AP trong đệm liên kết và cho 100 µl/giếng. Ủ bản ở 37 °C 1-2 giờ. IgG liên kết AP thứ 2 này là IgG được tạo ra khi tiêm IgG của thỏ vào 1 loài động vật khác thỏ (chẳng hạn dê) nên không liên kết với virus mà liên kết với IgG thả đặc hiệu virus ở bước 2. Sau khi ủ, rửa bản như bước 1.
- **Cố định chất nền vào bản ELISA:** Thực hiện tương tự như ở DAS-ELISA.

Các kỹ thuật dot blot

Nhiều kiểu dot blot đã được sử dụng để phát hiện virus. Các kỹ thuật này thực chất là các dạng đơn giản hóa của western blot (lai protein) hoặc southern blot (lai DNA). Như vậy dựa vào bản chất lai hóa, dot blot có thể gồm 2 nhóm (Hình 8-8):

Dựa trên western blot: Dịch cây chứa virus hoặc protein được cố định lên màng mà không cần tách bằng điện di polyacrylamid. Các bước phát hiện tiếp theo về cơ bản giống ELISA hoặc western blot.

Dựa trên southern blot: Dịch chiết DNA, sản phẩm cDNA, PCR/ RT-PCR được cố định lên màng mà không cần tách trước bằng điện di agarose. Các bước phát hiện tiếp theo về cơ bản giống như southern blot.



Hình 1-32 Phát hiện virus bằng kỹ thuật dot blot miễn dịch (western blot, trái, Hull, 2002) và dot blot lai DNA (southern blot, phải, Hsu et al., 2005)

2. CHUYÊN KHOA

2.1. CÁC VIRUS THỰC VẬT Ở VIỆT NAM

Các virus được phát hiện ở Việt Nam

Bệnh virus được ghi nhận sớm nhất tại Việt Nam là bệnh chùn ngọn chuối, được phát hiện ở Tây Nguyên trong những năm 60 (Vakili, 1969). Hiện nay, bệnh này đã được biết là do Banana bunchy top virus (BBTV) gây ra.

Trong những năm 60-70, ở miền Bắc, đặc biệt ở các tỉnh trung du và miền núi, đã xuất hiện một bệnh trên lúa gọi là bệnh vàng lùn với triệu chứng điển hình là cây lúa bị biến vàng, lùn, có thể chết. Mặc dù tác nhân gây bệnh không thể được xác định tại thời điểm đó nhưng bệnh đã được cho là do virus gây ra vì bệnh có thể truyền qua rầy xanh đuôi đen (*Nephotettix virescens*) (Hà Minh Trung, 1984).

Trong những năm 80, hai virus là Potato virus X (PVX) và Potato virus Y (PVY) nhiễm trên khoai tây đã được xác định ở miền Bắc bằng kính hiển vi điện tử và ELISA (Vũ Triệu Mân, 1984). Các bệnh giống như bị nhiễm geminivirus (xoăn vàng lá/ngọn) cũng được quan sát thấy trên một số cây trồng như khoai tây, thuốc lá và đặc biệt là cà chua. Các thí nghiệm lan truyền cho thấy tác nhân gây bệnh truyền qua bọ phấn (*Bemisia tabaci*) và qua ghép (Nguyễn Thơ, 1984).

Từ khoảng nửa cuối những năm 90 trở lại đây, do tăng cường hợp tác nghiên cứu với các phòng thí nghiệm virus trên thế giới, sự phát triển của công nghệ sinh học cũng như điều kiện nghiên cứu được tăng cường, nhiều virus thực vật đã được phát hiện và xác định ở Việt Nam.

Cho tới nay (2011), 52 virus thực vật thuộc 52 loài đã được xác định ở Việt Nam (Bảng 10-1), phần lớn đã được giải trình tự. Trong số này, đa số là các virus thuộc 2 chi *Begomovirus* (22 virus) và *Potyvirus* (18 virus). Đây cũng là 2 chi virus thực vật lớn nhất với mỗi chi chiếm khoảng 20 % tổng số virus thực vật toàn thế giới. Ngoài ra, nhiều virus có ý nghĩa kinh tế, chẳng hạn các virus gây bệnh trên lúa như bệnh lùn xoắn lá (Rice ragged stunt virus, RRSV), bệnh lúa cỏ hay còn gọi là bệnh vàng lùn (Rice

grassy stunt virus), bệnh lúa lùn sọc đen (Southern rice black streaked dwarf virus, SRBSDV), bệnh vàng lùn (Rice yellow stunt virus) cũng mới được xác định chính xác.

Cần phải thấy rằng, số virus được phát hiện này chiếm một tỷ lệ nhỏ so với khoảng hơn 1000 virus thực vật được ghi nhận trên thế giới hiện nay. Trong khi đó, Việt Nam đã được chứng minh là thuộc một trong các trung tâm đa dạng của nhiều virus, nhóm virus thực vật, chẳng hạn như các begomovirus, một số potyvirus.

Do chẩn đoán bệnh virus dựa vào triệu chứng thường khó, nhiều khi không thể nêu trong bảng 1, chỉ 52 virus được liệt kê do danh tính của chúng đã được xác định rõ với nguồn tham khảo tin cậy. Chắc chắn rằng còn nhiều virus thực vật nữa hiện đang có mặt ở Việt Nam và chờ được khám phá.

Bảng 2.1. Thành phần các virus thực vật được phát hiện tại Việt Nam tới 2010

TT	Virus	Viết tắt	Chi	Họ	Ký chủ	Tham khảo/mức xác định*
1	Banana bunchy top virus	BBTV	<i>Babuvirus</i>	<i>Nanoviridae</i>	Chuối	Bell et al., 2002; Karan et al., 1994
2	Piper yellow mottle virus	PYMoV	<i>Badnavirus</i>	<i>Caulimoviridae</i>	Hồ tiêu, lá nốt	Giải trình tự?
3	Banana streak virus strain acuminata Vietnam	BSAcVNV	<i>Badnavirus</i>	<i>Caulimoviridae</i>	Chuối	Lheureux et al., 2007
4	Luffa yellow mosaic virus	LYMV	<i>Begomovirus</i>	<i>Geminiviridae</i>	Mướp	Revil et al., 2003
5	Squash leaf curl China virus	SLCCNV	<i>Begomovirus</i>	<i>Geminiviridae</i>	Bí ngô, bầu bí	Revil et al., 2004
6	Corchorus yellow vein virus	CoYVV	<i>Begomovirus</i>	<i>Geminiviridae</i>	Rau đay	Ha et al., 2006
7	Corchorus golden mosaic virus	CoGMV	<i>Begomovirus</i>	<i>Geminiviridae</i>	Rau đay	Ha et al., 2008a
8	Kudzu mosaic virus	KuMV	<i>Begomovirus</i>	<i>Geminiviridae</i>	Sắn dây, đậu tương?	Ha et al., 2008a
9	Clerodendrum golden mosaic virus	CIGMV	<i>Begomovirus</i>	<i>Geminiviridae</i>	Mò	Ha et al., 2008a
10	Spilanthes yellow vein virus	SpYVV	<i>Begomovirus</i>	<i>Geminiviridae</i>	Cúc nút áo	Ha et al., 2008a
11	Mimosa yellow leaf curl virus	MiYLCV	<i>Begomovirus</i>	<i>Geminiviridae</i>	Mimosa	Ha et al., 2008a
12	Sida yellow vein Vietnam virus	SiYVVNV	<i>Begomovirus</i>	<i>Geminiviridae</i>	Ké hoa vàng	Ha et al., 2008a
13	Erectites yellow mosaic virus	ErYMV	<i>Begomovirus</i>	<i>Geminiviridae</i>	Rau tàu bay	Ha et al., 2008a
14	Ludwigia yellow vein Vietnam virus	LuYVVNV	<i>Begomovirus</i>	<i>Geminiviridae</i>	Rau mương	Ha et al., 2008a
15	Ludwigia yellow vein virus	LuYVV	<i>Begomovirus</i>	<i>Geminiviridae</i>	Rau mương	Ha et al., 2008a
16	Papaya leaf curl China virus	PaLCuCNV	<i>Begomovirus</i>	<i>Geminiviridae</i>	Thuốc lá, cà chua	Ha et al., 2008a
17	Lindernia anagallis yellow vein virus	LaYVV	<i>Begomovirus</i>	<i>Geminiviridae</i>	Lữ đẳng	Ha et al., 2008a
18	Alternanthera yellow vein virus	AIYVV	<i>Begomovirus</i>	<i>Geminiviridae</i>	Cúc (Zinha), nhọ nôi	Ha et al., 2008a
19	Tomato yellow leaf curl Kanchanaburi virus	TYLCKaV	<i>Begomovirus</i>	<i>Geminiviridae</i>	Cà chua, cà pháo	Ha et al., 2008a; DQ169054
20	Tomato leaf curl Vietnam virus	ToLCVV	<i>Begomovirus</i>	<i>Geminiviridae</i>	Cà chua	Ha et al., 2008a; Green et al., 2001
21	Tomato yellow leaf curl Vietnam virus	TYLCVNV	<i>Begomovirus</i>	<i>Geminiviridae</i>	Cà chua	Ha et al., 2008a
22	Tomato leaf curl Dan Xa virus	ToLCDXV	<i>Begomovirus</i>	<i>Geminiviridae</i>	Cà chua	Badwil et al., 2008
23	Tomato leaf curl Hainan virus	ToLCHV	<i>Begomovirus</i>	<i>Geminiviridae</i>	Cà chua, đu đủ	Giải trình tự
24	Tomato leaf curl Hanoi virus	ToLCHaV	<i>Begomovirus</i>	<i>Geminiviridae</i>	Cà chua	Giải trình tự

Bảng 2.1. Thành phần các virus thực vật được phát hiện tại Việt Nam tới 2010

25	Sida leaf curl virus	SiLCV	<i>Begomovirus</i>	<i>Geminiviridae</i>	Cối xay	Ha et al., 2008a
26	Citrus tristeza virus	CTV	<i>Closterovirus</i>	<i>Closteroviridae</i>	Cây có múi	Kiritani & Su, 1999
27	Cucumber mosaic virus	CMV	<i>Cucumovirus</i>	<i>Bromoviridae</i>	Bầu bí, cà chua	Revil et al., 2004
28	Southern rice black streaked dwarf virus	SRBSDV	<i>Fijivirus</i>	<i>Reoviridae</i>	Lúa, ngô	Giải trình tự
29	Rice yellow stunt virus (Rice transitory yellowing virus)	RYSV (RTYV)	<i>Nucleorhabdovirus</i>	<i>Rhabdoviridae</i>	Lúa	Giải trình tự
30	Rice ragged stunt virus	RRSV	<i>Oryzavirus</i>	<i>Reoviridae</i>	Lúa	Giải trình tự
31	Banana bract mosaic virus	BBrMV	<i>Potyvirus</i>	<i>Potyviridae</i>	Chuối	Rodoni et al., 1999
32	Bean common mosaic virus	BCMV	<i>Potyvirus</i>	<i>Potyviridae</i>	Đậu đỗ	Ha et al., 2008c; Hao et al., 2003
33	Chilli veinal mottle virus	ChiVMoV	<i>Potyvirus</i>	<i>Potyviridae</i>	Ớt	Ha et al., 2008c
34	Chilli ringspot virus	ChiRSV	<i>Potyvirus</i>	<i>Potyviridae</i>	Ớt	Ha et al., 2008c
35	Dasheen mosaic virus	DsMV	<i>Potyvirus</i>	<i>Potyviridae</i>	Khoai sọ, bán hạ 3 thùy	Ha et al., 2008c
36	Shallot yellow stripe virus	SYSV	<i>Potyvirus</i>	<i>Potyviridae</i>	Hành ta, tỏi tây	Ha et al., 2008c
37	Leek yellow stripe virus	LYSV	<i>Potyvirus</i>	<i>Potyviridae</i>	Hành ta, tỏi tây	Ha et al., 2008c
38	Onion yellow dwarf virus	OYDV	<i>Potyvirus</i>	<i>Potyviridae</i>	Tỏi tây	Ha et al., 2008c
39	Papaya ringspot virus	PRSV	<i>Potyvirus</i>	<i>Potyviridae</i>	Đu đủ, bầu bí	Bateson et al., 2002
40	Potato virus Y	PVY	<i>Potyvirus</i>	<i>Potyviridae</i>	Khoai tây, ớt	Ha et al., 2008c
41	Sorghum mosaic virus	SrMV	<i>Potyvirus</i>	<i>Potyviridae</i>	Mía	Ha et al., 2008c
42	Sugarcane mosaic virus	SCMV	<i>Potyvirus</i>	<i>Potyviridae</i>	Ngô, mía	Ha et al., 2008c
43	Sweet potato feathery mottle virus	SPFMV	<i>Potyvirus</i>	<i>Potyviridae</i>	Khoai lang	Ha et al., 2008c
44	Turnip mosaic virus	TuMV	<i>Potyvirus</i>	<i>Potyviridae</i>	Cải củ, cải bẹ	Ha et al., 2008c
45	Zucchini yellow mosaic virus	ZYMV	<i>Potyvirus</i>	<i>Potyviridae</i>	Bầu bí	Ha et al., 2008c
46	Telosma mosaic virus	TeIMV	<i>Potyvirus</i>	<i>Potyviridae</i>	Hoa thiên lý	Ha et al., 2008b
47	Basella rugose mosaic virus (Peace lily mosaic virus)	BaRMV (PeLMV)	<i>Potyvirus</i>	<i>Potyviridae</i>	Hoa lan ý, mỏng toi	Ha et al., 2008b
48	Wild tomato mosaic virus	WTMV	<i>Potyvirus</i>	<i>Potyviridae</i>	Cà độc dược	Ha et al., 2008b
49	Rice grassy stunt virus	RGSV	<i>Tenuivirus</i>		Lúa	Giải trình tự
50	Tobacco mosaic virus	TMV	<i>Tobamovirus</i>	<i>Virgaviridae</i>	Cà chua, thuốc lá, ớt	ELISA
51	Rice tungro bacilliform virus	RTBV	<i>Tungrovirus</i>	<i>Caulimoviridae</i>	Lúa	Azzam et al., 2000
52	Rice tungro spherical virus	RTSV	<i>Waikavirus</i>		Lúa	ELISA

VIRUS DNA SỢI ĐƠN: CHI BEGOMOVIRUS

CHI BEGOMOVIRUS

Phân loại

Vực: *Monodnaviria*

Giới: *Shotokuvirae*

Ngành: *Cressnaviricota*

Lớp: *Repensiviricetes*

Bộ: *Geplafuvirales*

Họ: *Geminiviridae*

Chi: *Begomovirus*

Tên chi *Begomovirus* từ tên loài đại diện là *Bean golden mosaic virus*

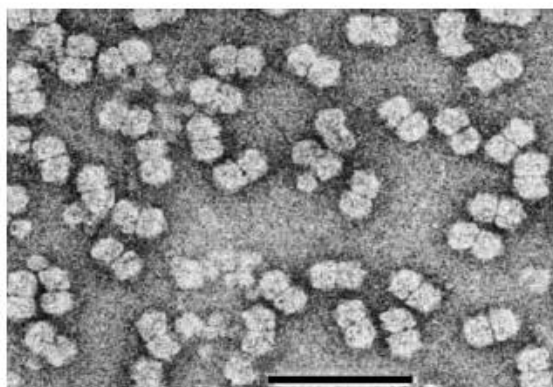
Begomovirus là chi lớn nhất của họ *Geminiviridae* với tổng số loài được công nhận bởi ICTV năm 2021 là **445 loài** (25% virus thực vật). Đông Nam Á, đặc biệt Việt Nam, và Nam Trung Quốc là trung tâm đa dạng nhất của begomovirus.

Do số lượng virus rất nhiều, lại thường gây bệnh với triệu chứng giống nhau trên một cây ký chủ nên tên virus gây bệnh thường thêm tên địa danh (nước, tỉnh), ví dụ như Tomato leaf curl Vietnam virus.

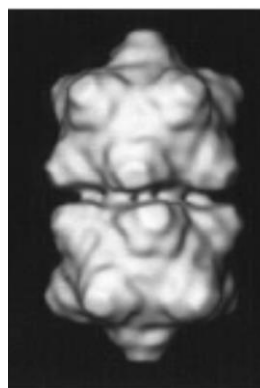
Hình thái phân tử

Hình thái phân tử (virion) của begomovirus giống như của các geminivirus khác, đều có hình cầu kép. Phân tử virus thực chất là 2 hình cầu 20 mặt (icosahedron), mỗi mặt là 1 tam giác đều với số đơn vị tam giác (T) trên mỗi mặt = 1, nối với nhau để tạo ra phân tử hình cầu đa diện kép (gemini). Do nối với nhau nên 2 hình cầu này không hoàn thiện dẫn tới trên mỗi hình cầu chỉ có 55 tiểu phần protein (protein vỏ) được sắp xếp thành 11 đơn vị hình thái, mỗi đơn vị gồm 5 tiểu phần protein (pentameric capsomer). Kết quả là toàn bộ phân tử có 110 tiểu phần và 22 đơn vị hình thái (Hình 10-1).

Cần chú ý là đối với các begomovirus có bộ gen kép thì mỗi phân tử chỉ chứa 1 phân tử DNA genome.



A



B

Hình 2-1 Hình thái phân tử geminiviruses. A, Phân tử Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV), bar = 100 nm (Gafni, 2003). B, Mô hình phân tử Maize streak virus (MSV) (Zhang et al., 2001).

Đặc điểm bộ gen

Các begomovirus là các virus thực vật có bộ gen DNA sợi vòng đơn có kích thước khoảng 2.6 – 2.8 kb. Chúng hoặc có bộ gen kép (bipartite) gồm 2 phân tử DNA gọi là DNA-A và DNA-B hoặc có bộ gen đơn (monopartite) tương đương DNA-A (Hình 12-2).

Đối với các virus có bộ gen đơn thì DNA của chúng chứa 6 gen được tổ chức theo 2 chiều ngược nhau.

Trên chiều kim đồng hồ (chiều virus) có 2 ORF là (i) V1 mã hóa vỏ protein (CP) có chức năng chính là tạo vỏ phân tử virus, lan truyền qua vector, vận chuyển bộ gen virus vào và ra khỏi nhân tế bào ký chủ và vận chuyển bộ gen virus giữa các tế bào; và (ii) V2 mã hóa protein V2 có chức năng liên quan đến vận chuyển virus giữa các tế bào.

Trên chiều ngược kim đồng hồ (chiều sợi tương đồng virus) có 4 ORF là (i) C1 mã hóa protein tái sinh hay còn gọi là protein Rep có chức năng chính là cắt - nối bộ gen virus tại một vị trí đặc biệt ở vùng nguồn gốc tái sinh và tương tác với protein ký chủ để tạo điều kiện thuận lợi cho tái sinh virus, (ii) C2 mã hóa 1 protein hoạt hóa phiên mã (TrAP, transcriptional activator protein), (iii) C3 mã hóa 1 protein tăng cường tái sinh (REn, replication enhancer) và (iv) C4 mã hóa protein C4 với chức năng liên quan đến phổ ký chủ và phát triển triệu chứng, ức chế hoạt động cầm gen của tế bào ký chủ.

Giữa 2 vùng gen mã hóa ngược chiều nhau ở trên là một vùng liên gen không mã hóa IR (intergenic region). Vùng IR chứa nguồn gốc tái sinh (*ori* = origin of replication) gồm (i) các chuỗi lặp đảo

(iteron) cần thiết cho sự nhận biết và gắn kết của protein Rep và (ii) một cấu trúc kẹp tóc (hairpin) hay còn gọi là thân – thòng lọng (stem – loop), trong đó chuỗi TAATATTAC trên vùng thòng lọng là giống nhau ở tất cả các begomovirus. Vị trí T⁷-C⁸ của chuỗi này là nơi protein Rep cắt và nối bộ gen begomovirus trong quá trình tái sinh.

Đối với các begomovirus có bộ gen kép thì DNA-A có tổ chức bộ gen và chức năng các gen tương tự như DNA-A của các begomovirus có bộ gen đơn (tên các ORF được thêm ký tự A vào đằng trước thành AV1, AV2, AC1, AC2, AC3 và AC4). Cần chú ý là tất cả các begomovirus ở Tân thế giới (châu Mỹ) đều thiếu ORF AV2.

Phần tử DNA-B của chúng chỉ chứa 2 ORF được sắp xếp theo 2 chiều ngược nhau. Trên chiều kim đồng hồ có ORF BV1 mã hóa protein con thoi (NSP, nuclear shuttle protein) có chức năng chính là vận chuyển bộ gen virus vào và ra khỏi nhân tế bào. Trên chiều ngược kim đồng hồ có ORF BC1 mã hóa protein vận chuyển (MP, movement protein) có chức năng vận chuyển bộ gen virus giữa các tế bào ký chủ.

Ở vùng IR của DNA-A và DNA-B của các begomovirus có bộ gen kép có một chuỗi bảo thủ cao (khoảng 150 nucleotide) giữa 2 phần tử gọi là vùng chung CR (common region). Vùng CR chứa chuỗi ori. Sở dĩ có vùng chung này vì DNA-B không thể tự tái sinh mà phải cần sự nhận biết và cắt – nối của protein Rep mã hóa trên DNA-A để tái sinh được trong tế bào ký chủ.

DNA vệ tinh của begomovirus

Có 2 loại phân tử DNA vệ tinh thường được phát hiện có liên quan đến các begomovirus có bộ gen đơn tại Cựu thế giới (Châu Á, Châu Phi, Châu Âu và Châu Úc). Các phân tử này đều có bộ gen DNA sợi vòng đơn với kích thước xấp xỉ ½ kích thước bộ gen virus chủ. Các phân tử này gồm 2 loại (Hình 10-2) là:

Alphasatellite (trước đây gọi là DNA-1). Loại phân tử vệ tinh này có đặc điểm cấu trúc giống như DNA-1 của nanovirus như DNA sợi vòng đơn, kích thước khoảng 1.2 kb, chứa 1 vùng *ori*, mã hóa 1 protein tái sinh (Rep) theo chiều kim đồng hồ và 1 vùng giàu adenine. Alphasatellite có thể tự tái sinh trong tế bào cây, được lắp ráp trong phân tử virus và nhờ virus để phát tán qua bộ phận. Tuy nhiên vệ tinh này không có vai trò trong tính gây bệnh của virus.

Betasatellite (trước đây gọi là DNA-β). Loại phân tử vệ tinh này đã thu hút sự chú ý kể từ khi Saunders *et al.* (2000) và Briddon *et al.* (2001) chứng minh rằng triệu chứng điển hình trên cây ageratum (bệnh vàng gân cây ageratum) và cây bông (bệnh cuộn lá bông) chỉ có thể hình thành khi Ageratum yellow vein virus (AYVV) và Cotton leaf curl virus (CLCV) cùng được lây nhiễm với 1 phân tử DNA-β tương ứng. Tuy nhiên vai trò của phân tử vệ tinh này đối với sự biểu hiện triệu chứng bệnh không thống nhất. Nhiều begomovirus bộ gen đơn đã được chứng minh là có thể tạo ra triệu chứng điển hình mà không cần sự có mặt của phân tử betasatellite chẳng hạn như đối với Tobacco yellow leaf curl Yunnan virus (TYLCYNV).

Betasatellite có bộ gen DNA sợi vòng đơn, có kích thước bằng 1 nửa của begomovirus (phần lớn là 1350 nucleotides) và mã hóa trên sợi tương đồng 1 protein là betaC1 (βC1) có kích thước điển hình 118 amino acids. Phân tử chứa 1 vùng giàu adenin và 1 vùng bảo thủ cao giữa các phân tử betasatellite khác nhau gọi là vùng SCR (satellite conserve region). Trên vùng SCR có một trình tự bảo thủ TAATATTAC giống như của begomovirus. Betasatellite được lắp ráp trong phân tử virus, chỉ có thể tái sinh nhờ virus. Betasatellite có thể ức chế phản ứng phòng thủ của cây và do đó có vai trò quan trọng trong tính gây bệnh của nhiều begomovirus có bộ gen đơn.

Tái sinh của begomovirus

Begomovirus, giống như các geminivirus khác, tái sinh trong tế bào thực vật theo cơ chế vòng lăn (rolling circular mechanism). Cơ chế vòng lăn có thể được chia làm 2 pha và được thực hiện trong nhân tế bào ký chủ (Hình 4-9, phần đại cương).

Pha tổng hợp sợi DNA vòng đơn (bộ gen có mặt trong phân tử virus) thành sợi DNA vòng kép khi bộ gen virus được chuyển vào nhân tế bào. Như vậy sợi kép sẽ gồm một sợi virus và một sợi tương đồng virus. Pha này vẫn chưa được hiểu rõ.

Pha tái sinh theo cơ chế vòng lăn: Protein Rep (sau khi được tổng hợp) sẽ cắt sợi virus tại chuỗi bảo toàn TATATTAC. Nhờ vật liệu cũng như enzyme DNA polymerase của tế bào, sợi virus được tổng hợp liên tục trên sợi tương đồng virus. Protein Rep lại tiếp tục cắt sợi virus mới được tổng hợp tại chuỗi TATATTAC (cũng vừa mới được tổng hợp) thành một sợi virus hoàn chỉnh dưới dạng sợi đơn mạch

thẳng. Protein Rep sau đó sẽ nối 2 đầu của mạch thẳng để tạo ra bộ gen virus sợi đơn mạch vòng hoàn chỉnh.

Ngoài cơ chế vòng lẩn, gần đây người ta còn phát hiện begomovirus thường tái sinh theo cơ chế gọi là “tái sinh phụ thuộc tái tổ hợp” (Recombination dependent replication (RDR)). Cách tái sinh này cho phép virus có thể tái tổ hợp dễ dàng khi nhiễm hỗn hợp trên một cây ký chủ.

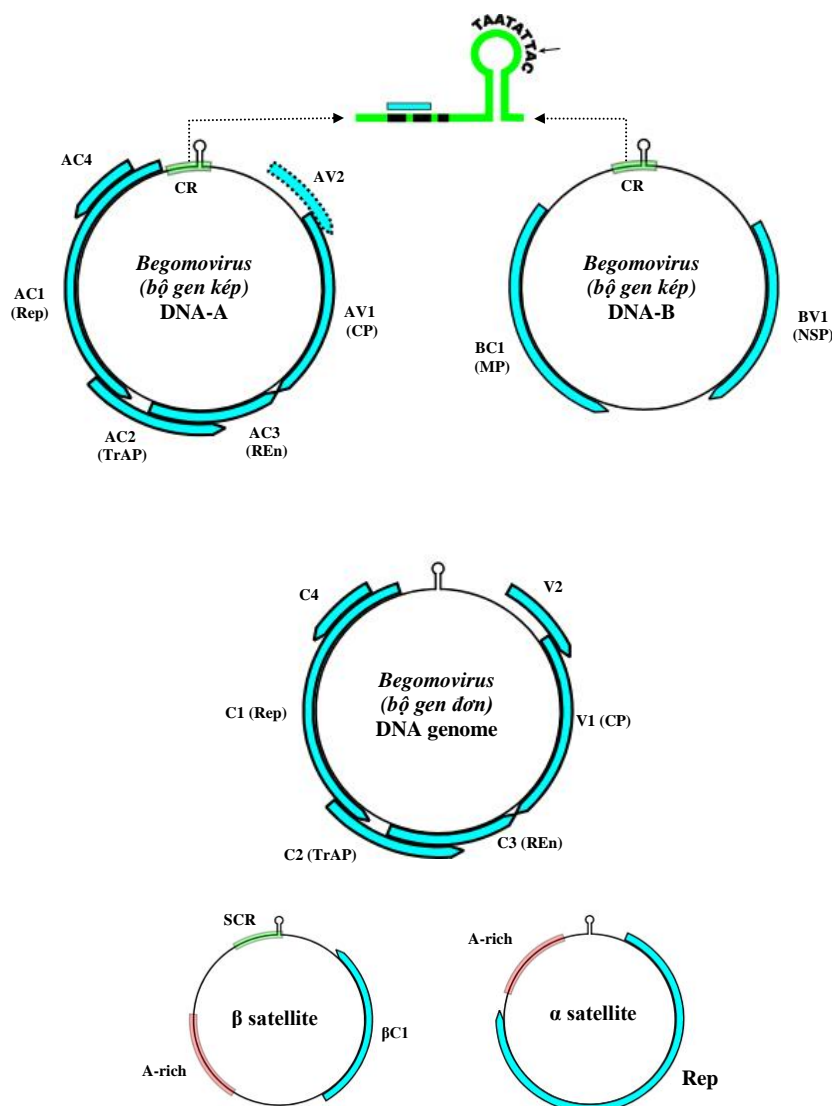
Cơ chế gây bệnh của begomovirus

Tương tác với các yếu tố ký chủ liên quan đến bộ máy tái bản. Quá trình tái bản của begomovirus xảy ra trong nhân tế bào, kể cả ở các tế bào không phân chia. Do vậy, sau khi nhiễm vào tế bào, begomovirus phải khởi động bộ máy tái sinh của tế bào. Một trong các protein của tế bào ký chủ thực vật điều khiển chu kỳ tế bào là pRBR (plant retinoblastoma-related protein) - chịu trách nhiệm chuyển chu kỳ tế bào từ pha G1 sang pha S (pha tổng hợp). Protein Rep của begomovirus đã được chứng minh tương tác với pRBR của tế bào ký chủ, cho phép khởi động lại chu kỳ tế bào để tạo điều kiện cho virus tái sinh.

Lan truyền của begomovirus

Tất cả các begomovirus lan truyền ngoài tự nhiên nhờ bọ phấn (*B. tabaci*) theo kiểu bền vững tuần hoàn. Chưa có bằng chứng chứng minh begomovirus nhân lên trong cơ thể bọ phấn.

Begomovirus không truyền qua hạt giống.



Hình 2-2 Tổ chức bộ gen của begomovirus và DNA vệ tinh (Hà Viết Cường, 2008)

Phòng trừ begomovirus

Phòng trừ begomovirus chủ yếu dựa vào 2 chiến lược chính là (i) phòng chống vector và (ii) tạo cây kháng bệnh.

Phòng chống vector. Có nhiều kỹ thuật phòng trừ bọ phấn nhưng được áp dụng tùy điều kiện:

Dùng giống kháng bọ phấn

Dùng thuốc hóa học.

Trồng cây trong nhà lưới, nhà kính

Dùng bẫy hấp dẫn màu vàng hoặc bề mặt phản xạ (chỉ áp dụng có hiệu quả trong điều kiện nhà lưới).

Tạo giống kháng virus. Tính kháng begomovirus có thể được tạo ra nhờ 2 cơ chế: Tính kháng từ cây và tính kháng từ tác nhân gây bệnh (PRD).

Trên cây cà chua, người ta chưa phát hiện thấy gen kháng R chống lại begomovirus trên cây cà chua trồng (*Lycopersicon esculentum*) nhưng một số gen kháng chống lại begomovirus đã được phát hiện thấy trên một số giống cà chua dại (gọi là các gen Ty). Ví dụ Ty1 gen được phân lập từ cây cà chua dại (*Lycopersicon chilense*) và là một gen kháng trội không hoàn toàn. Ty-1 dường như tương tác với các protein chịu trách nhiệm di chuyển của virus để tạo tính kháng. Ty-1 đã được chuyển vào cà chua trồng để tạo giống cà chua kháng. Hiện nay, nhiều giống cà chua kháng begomovirus là các giống kháng chuyển gen dùng gen kháng từ cây.

Gần đây nhiều giống cây (cà chua, bông, sắn) đang được thử nghiệm tạo tính kháng thông qua cơ chế RNAi. Các gen thường được sử dụng để tạo cấu trúc chuyển gen là CP hoặc Rep.

Bệnh do begomovirus

Begomovirus gây nhiều bệnh quan trọng trên cây trồng. Các triệu chứng điển hình do begomovirus gây ra bao gồm: Vàng gân, khảm biến vàng (kèm theo biến dạng lá), biến vàng lá, lùn cây, xoắn lá. Một đặc điểm quan trọng là nhiều bệnh có thể do các begomovirus thuộc các loài khác nhau gây ra. Một số ví dụ gồm:

Bệnh khảm lá sắn: do SLCMV và nhiều begomovirus khác, đều là các begomovirus có bộ gen kép)

Bệnh cuốn lá bông: do ít nhất 5 begomovirus có bộ gen đơn và đều cần một phân tử betasatellite nhiễm kèm để tạo triệu chứng.

Bệnh khảm vàng bầu bí (chủ yếu bí ngô): ở Việt Nam do ít nhất 3 begomovirus có bộ gen kép.

Bệnh xoắn vàng lá cà chua

Bệnh xoắn vàng lá cà chua

Tầm quan trọng

Bệnh xoắn vàng lá cà chua được ghi nhận đầu tiên trên thế giới từ cuối những năm 40 của thế kỷ 20 tại Israel. Hiện nay, bệnh xoắn vàng lá đã trở thành bệnh virus quan trọng nhất trên cây cà chua khắp thế giới. Tại Việt Nam, bệnh xoắn vàng lá là bệnh virus nguy hiểm nhất trên cà chua.

Triệu chứng bệnh

Bệnh xoắn vàng lá xuất hiện triệu chứng trong vòng 2-4 tuần sau khi nhiễm bệnh và phát triển đầy đủ triệu chứng trong vòng 2 tháng. Triệu chứng có thể thay đổi theo điều kiện môi trường, giai đoạn sinh trưởng và điều kiện sinh lý của cây tại thời điểm nhiễm bệnh.

Triệu chứng sớm nhất là lá cong xuống dưới vào phía bên trong. Về sau, lá không có hình dạng, nhỏ hẹp, biến vàng từ mép và chót lá lan vào giữa gân; *lá cuốn cong lên phía trên thành hình thuyền; lá non biến vàng mạnh, giòn và nhỏ hẹp*. Triệu chứng biến vàng đặc biệt rõ ở các lá non. Cuống lá có thể xoắn vặn. Cây lùn còi cọc, mọc nhiều cành nhánh nhỏ, đốt thân ngắn. Cây nhiễm sớm thường không ra quả do hoa bị rụng.

Chú ý quan trọng: Triệu chứng do các begomovirus khác nhau gây ra trên cà chua thường tương tự nhau.



Hình 2-3 Triệu chứng bệnh xoắn vàng lá cà chua

Tác nhân gây bệnh là một phức hợp nhiều virus

Trước những năm 1990, tác nhân gây bệnh xoắn vàng lá cà chua đã được xác định do các begomovirus. Các begomovirus gây bệnh thường được đặt tên theo cây ký chủ (tomato) và triệu chứng, chủ yếu dưới 2 dạng xoắn lá (leaf curl) và biến vàng (yellow), nên tên virus gây bệnh là “Tomato yellow leaf curl virus” và tên các isolate virus gây bệnh thường được kèm theo 1 từ chỉ địa phương nơi bệnh xuất hiện; ví dụ:

Tomato yellow leaf curl virus- Is (TYLCV-Is) phân lập từ Israel,

Tomato yellow leaf curl virus – Sar (TYLCV-Sar) phân lập từ đảo Sardinia (Ý)

Tomato yellow leaf curl virus – Th (TYLCV-Th) phân lập từ Thái Lan

Do có ít lựa chọn trong việc đặt tên, các tác giả cũng có xu hướng lấy chỉ triệu chứng xoắn lá “leaf curl” để đặt tên virus mặc dù các virus này đều tạo triệu chứng biến vàng trên cà chua; chẳng hạn:

Tomato leaf curl virus-Au (ToLCV-Au) phân lập từ Úc

Tomato leaf curl Gujarat virus (ToLCGV) phân lập từ tỉnh Gujarat (Pakistans)

Từ những năm 90 trở lại đây, sự tiến bộ của công nghệ sinh học đã cho phép giải trình tự toàn bộ bộ gen virus và xác định danh tính virus một cách dễ dàng. Dựa vào các phân tích phân tử, Ủy ban Phân loại Virus Quốc tế (ICTV) đã xác định ngưỡng phân biệt loài begomovirus là 89 % mức đồng nhất trình tự nucleotide của phân tử DNA-A. Chỉ tiêu này đã cho phép tách được nhiều begomovirus, vốn được xem là các isolate khác nhau của cùng một virus gây bệnh xoắn vàng lá cà chua, thành các virus phân biệt; ví dụ:

TYLCV-Sar trở thành Tomato yellow leaf curl Sardinia virus (TYLCSV)

TYLCV-Ch trở thành Tomato yellow leaf curl China virus (TYLCCNV)

TYLCV-Th trở thành Tomato yellow leaf curl Thailand virus (TYLCTHV).

TYLCV-Is phân lập từ Israel, do quyền ưu tiên, được công nhận là Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV).

Như vậy, tác nhân gây bệnh xoắn vàng lá cà chua được xem là một phức hợp nhiều begomovirus khác nhau. Hiện nay, có khoảng 60 begomovirus gây bệnh xoắn vàng lá cà chua khắp thế giới. Hậu quả là, dựa trên triệu chứng quan sát, bệnh không thể được gán cho một loài begomovirus cụ thể trừ phi danh tính của virus đã được xác định.

Nhiều begomovirus gây bệnh xoắn vàng lá cà chua ở Cựu thế giới (Châu Á, Âu, Phi, Đại Dương) là các begomovirus có bộ gen đơn và thường được phát hiện kèm với các phân tử DNA vệ tinh là alphasatellite và betasatellite.

Lan truyền

Tất cả các begomovirus lan truyền ngoài tự nhiên nhờ bộ phận theo kiểu bền vững tuần hoàn. Bộ phận dùng ngồi chọc vào mô mạch dẫn để hút dịch cây từ mạch phloem. Virus được hút qua vòi, tới điều, thấm qua màng ruột vào xoang cơ thể, đạt tới tuyến nước bọt và cuối cùng vào ống nước bọt.

Nghiên cứu với TYLCV tại Israel cho thấy thời gian chích nạp và chích truyền tối thiểu của bộ phận là khoảng 15 – 20 phút. Kể từ khi bắt đầu chích nạp, virus được phát hiện có mặt ở phần đầu sau khoảng 10 phút, ở ruột giữa sau khoảng 50 phút, ở xoang cơ thể sau khoảng 90 phút và ở tuyến nước bọt sau khoảng 7 giờ. Thời gian từ khi virus được phát hiện thấy ở tuyến nước bọt tới khi bộ phận có thể truyền được bệnh là khoảng 1 giờ. Như vậy thời kỳ ẩn của TYLCV trong cơ thể bộ phận là khoảng 8 giờ.

Thí nghiệm với TYLCV cũng cho thấy, số lượng virus được tích lũy đạt cực đại (khoảng 600 triệu phân tử virus) nếu để bộ phận chích nạp trên cây bệnh 12 giờ. Thời gian này đối với TYLCV là 24 giờ.

Sau thời gian chích nạp khoảng 1-2 ngày, virus có thể được duy trì trong cơ thể bộ phận nhiều tuần (3 tuần đối với TYLCV) hoặc cả đời như đối với TYLCV.

Kiểu truyền của TYLCV là ngoại lệ trong nhóm virus truyền theo kiểu bền vững tuần hoàn vì virus có thể truyền qua giao phối từ bộ phận đực sang bộ phận cái và ngược lại. Đã có bằng chứng cho thấy TYLCV có thể truyền qua trứng mặc dù tỷ lệ truyền bệnh của bộ phận trưởng thành phát triển từ trứng mang virus là rất nhỏ. Trái lại, thí nghiệm với Tomato mottle virus (ToMoV) cho thấy bộ phận không truyền virus này qua trứng.

Một cá thể bộ phận có thể truyền bệnh sau khi chích nạp 24 giờ mặc dù tỷ lệ truyền bệnh không cao; tỷ lệ truyền bệnh đạt 100 % nếu sử dụng 5 – 15 bộ phận. Bộ phận cái truyền virus hiệu quả hơn bộ phận đực và hiệu quả truyền tốt nhất khi bộ phận trưởng thành ở 1 -2 tuần tuổi và giảm dần theo thời gian sinh trưởng của bộ phận. Hiệu quả truyền virus giảm theo tuổi là do lượng virus được chích nạp giảm.

Các begomovirus hại cà chua ở Việt Nam

Việt Nam là một trong các trung tâm đa dạng chính của begomovirus. Tuy nhiên, hiện nay mới chỉ xác định được một số begomovirus sau gây bệnh trên cà chua (Bảng 10-1).

Bảng 2-1 Các begomovirus hại cây trồng được phát hiện cho tới nay tại Việt Nam

TT	Virus	Khu vực
1	Tomato leaf curl Vietnam virus (ToLCVV)	Cả nước
2	Tomato yellow leaf curl Vietnam virus (TYLCVNV)	Miền Bắc
3	Tomato yellow leaf curl Kanchanaburi virus (TYLCKaV)	Miền Trung, miền Nam
4	Tomato leaf curl Dan Xa virus (ToLCDXV)*	Miền Bắc
5	Tomato leaf curl Hainan virus (ToLCHV)	Miền Bắc
6	Tomato leaf curl Hanoi virus (ToLCHaV)	Miền Bắc

Ghi chú * ToLCDXV mới được ICTV phân loại lại, còn trong công bố ban đầu, virus này đã được các tác giả phân loại không chính xác là Tomato yellow leaf curl Vietnam virus-DX1.

VIRUS RNA SỢI ĐƠN CỰC DƯƠNG: CHI TOBAMOVIRUS

Chi Tobamovirus

Phân loại

Vực: Riboviria

Giới: Orthornavirae

Ngành: Kitrinoviricota

Lớp: Alsuviricetes

Bộ: Martellivirales

Họ: Virgaviridae

Chi: Tobamovirus

Tên chi *Tobamovirus* được lấy từ tên loài điển hình *Tobacco mosaic virus*. Là chi lớn nhất với 37 thành viên (Bảng 11.1). Tobacco mosaic virus (TMV), thành viên điển hình của chi, là một virus có ý nghĩa rất lớn trong lịch sử virus học và sinh học.

Bảng 2-2 Các loài virus thuộc chi Tobamovirus (ICTV, 2021)

TT	Loài	Tên virus	Viết tắt
1	<i>Bell pepper mottle virus</i>	bell pepper mottle virus	BPMV
2	<i>Brugmansia mild mottle virus</i>	Brugmansia mild mottle virus	BrMMV
3	<i>Cactus mild mottle virus</i>	cactus mild mottle virus	CMMoV
4	<i>Clitoria yellow mottle virus</i>	Clitoria yellow mottle virus	CliYMV
5	<i>Cucumber fruit mottle mosaic virus</i>	cucumber fruit mottle mosaic virus	CFMMV
6	<i>Cucumber green mottle mosaic virus</i>	cucumber green mottle mosaic virus	CGMMV
7	<i>Cucumber mottle virus</i>	cucumber mottle virus	CMoV
8	<i>Frangipani mosaic virus</i>	Frangipani mosaic virus	FrMV
9	<i>Hibiscus latent Fort Pierce virus</i>	Hibiscus latent Fort Pierce virus	HLFPV
10	<i>Hibiscus latent Singapore virus</i>	Hibiscus latent Singapore virus	HLSV
11	<i>Kyuri green mottle mosaic virus</i>	Kyuri green mottle mosaic virus	KGMMV
12	<i>Maracuja mosaic virus</i>	maracuja mosaic virus	MarMV
13	<i>Obuda pepper virus</i>	Obuda pepper virus	ObPV
14	<i>Odontoglossum ringspot virus</i>	Odontoglossum ringspot virus	ORSV
15	<i>Opuntia chlorotic ringspot virus</i>	Sammons's Opuntia virus	SOV
16	<i>Paprika mild mottle virus</i>	paprika mild mottle virus	PaMMV
17	<i>Passion fruit mosaic virus</i>	passion fruit mosaic virus	PFMV
18	<i>Pepper mild mottle virus</i>	pepper mild mottle virus	PMMoV
19	<i>Plumeria mosaic virus</i>	Plumeria mosaic virus	PluMV
20	<i>Rattail cactus necrosis-associated virus</i>	rattail cactus necrosis-associated virus	RCNaV
21	<i>Rehmannia mosaic virus</i>	Rehmannia mosaic virus	RheMV
22	<i>Ribgrass mosaic virus</i>	ribgrass mosaic virus	RMV
23	<i>Streptocarpus flower break virus</i>	Streptocarpus flower break virus	SFBV
24	<i>Sunn-hemp mosaic virus</i>	sunh-hemp mosaic virus	SHMV
25	<i>Tobacco latent virus</i>	tobacco latent virus; Nigerian tobacco latent virus	TLV1
26	<i>Tobacco mild green mosaic virus</i>	tobacco mild green mosaic virus	TMGMV
27	<i>Tobacco mosaic virus</i>	tobacco mosaic virus	TMV
28	<i>Tomato brown rugose fruit virus</i>	tomato brown rugose fruit virus	TBRFV
29	<i>Tomato mosaic virus</i>	tomato mosaic virus	ToMV
30	<i>Tomato mottle mosaic virus</i>	tomato mottle mosaic virus	ToMMV
31	<i>Tropical soda apple mosaic virus</i>	tropical soda apple mosaic virus	TSAMV
32	<i>Turnip vein-clearing virus</i>	turnip vein-clearing virus	TVCV
33	<i>Ullucus mild mottle virus</i>	Ullucus mild mottle virus	UMMV
34	<i>Wasabi mottle virus</i>	wasabi mottle virus	WMoV
35	<i>Yellow tailflower mild mottle virus</i>	yellow tailflower mild mottle virus	YTMMV
36	<i>Youcai mosaic virus</i>	youcai mosaic virus; oil-seed rape mosaic virus	YoMV

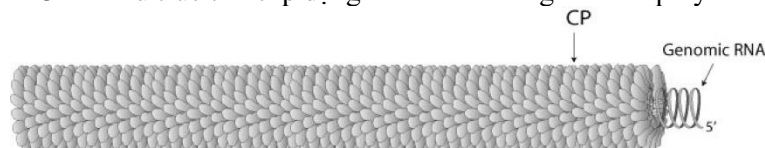
TT	Loài	Tên virus	Viết tắt
37	<i>Zucchini green mottle mosaic virus</i>	zucchini green mottle mosaic virus	ZGMMV

Đặc điểm phân tử virus

Các tobamovirus đều là các virus RNA có bộ gen gồm 1 phân tử RNA sợi đơn, cực (+), có mũ Cap đầu 5' nhưng không có đuôi polyA.

Các tobamovirus đều có dạng hình gậy cứng, không có vỏ bọc, có cấu trúc đối xứng xoắn. Phân tử virus chỉ có vỏ protein bao quanh lõi RNA genome.

Phân tử virus hình gậy, kích thước 300-310 nm x 18 nm. Các tobamovirus có bộ gen RNA sợi đơn, cực (+), không phân đoạn, kích thước ~ 6.3-6.5 kb. Trong quá trình tái sinh, các tobamovirus tạo 2 phân tử phụ genome. Phân tử RNA genome và 2 phân tử phụ genome đều có đầu 5' được mũ hóa, còn đầu 3' có cấu trúc thứ cấp dạng tRNA và không có đuôi poly A.



Hình 2-4 Sơ đồ cấu trúc phân tử của các tobamovirus (Viralzone, 2009)

Tobacco mosaic virus (TMV)

Tầm quan trọng TMV

TMV (virus khảm lá thuốc lá) thuộc chi *Tobamovirus*.

TMV là một virus có ý nghĩa lịch sử lớn trong sinh học và trong ngành virus học.

TMV là một trong các virus thực vật phân bố khắp thế giới, có phổ ký chủ rất rộng, có thể nhiễm trên 200 loài cây thuộc 30 họ thực vật khác nhau. Các cây ký chủ quan trọng nhất của TMV thuộc các họ: *Solanaceae* (họ cà)), *Scrophulariaceae*, *Labiatae*, *Leguminosae* (họ đậu), *Cucurbitaceae* (họ bầu bí) và *Alliaceae*.

Tại Việt Nam, TMV là virus quan trọng nhất trên thuốc lá.

Virus TMV

Hình thái phân tử TMV

Phân tử TMV có hình gậy, kích thước ~300 x 18 nm. Phân tử virus gồm 1 phân tử RNA genome kích thước ~ 6.4 kb được bao bọc bởi một lớp vỏ gồm ~ 2300 tiểu phần protein (mỗi tiểu phần là một phân tử protein có kích thước 158 amino acid (17.3 kD)).

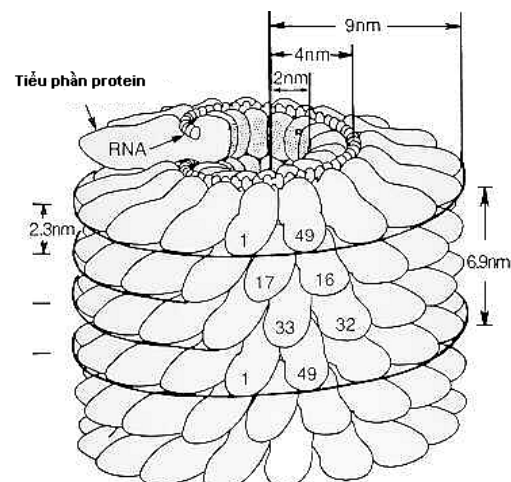
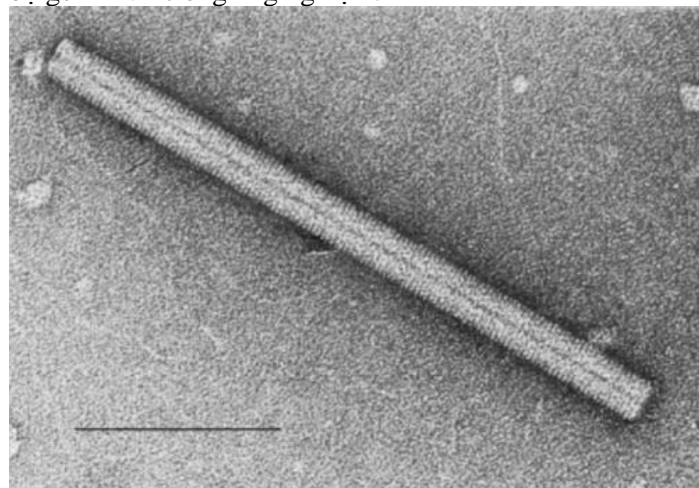
Giống như các virus hình gậy khác, phân tử TMV có cấu trúc đối xứng xoắn như sau (Hình 11-2):

Ba nucleotide trên phân tử RNA liên kết với 1 tiểu phần protein.

Một đơn vị lặp hoàn hảo gồm 49 tiểu phần protein / 3 vòng xoắn và tạo ra độ dài 6.9 nm (tổng độ dài phân tử ~ 300 nm)

Đường kính phân tử là 18 nm còn đường kính lõi rỗng là 4 nm

Cần chú ý là TMV có thể tự lắp ráp thành phân tử hoàn chỉnh từ 1 hỗn hợp các tiểu phần protein và bộ gen RNA trong ống nghiệm.



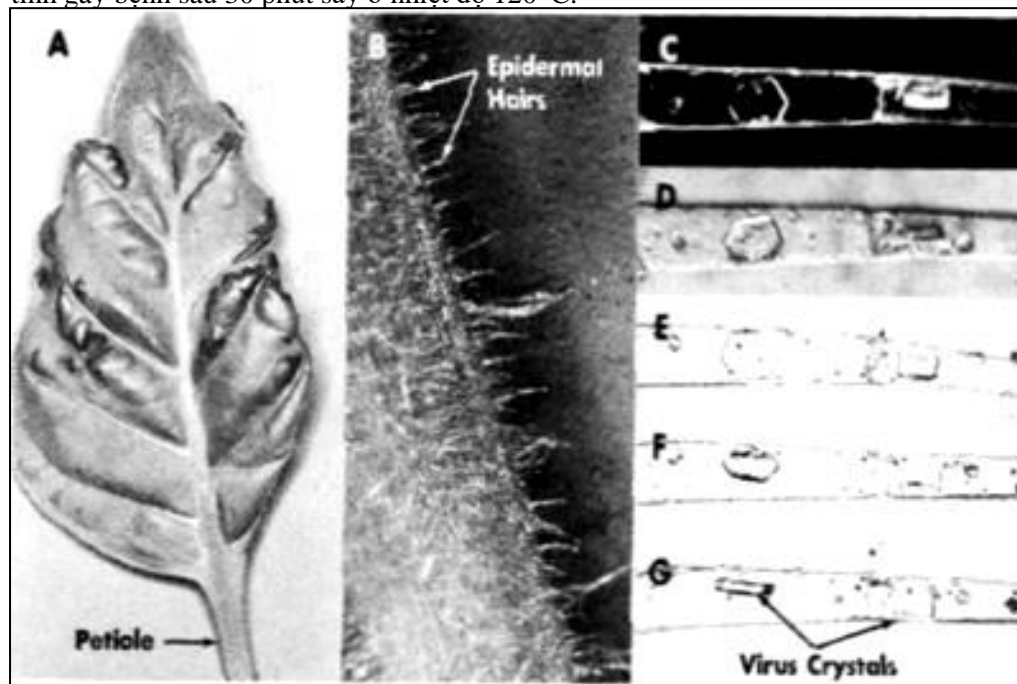
Hình 2-5 Hình thái virion và cấu trúc của TMV

Đặc điểm vật lý virus TMV

TMV có ngưỡng pha loãng giới hạn là 10^{-6} - 10^{-7} , khả năng tồn tại trong chiết dịch cây bệnh của virus là khoảng 1 tháng, nhiệt độ mất hoạt tính Q_{10} là 93°C . Virus có khả năng tích lũy trong dịch cây bệnh với nồng độ rất cao (2 g/l). Virus rất mẫn cảm với tia Ronghen và dễ dàng bị phân huỷ ở ngưỡng $\text{pH} < 1$ và $\text{pH} > 11$.

Trong tế bào cây ký chủ, đặc biệt là tế bào lông lá, TMV có thể hình thành nên thể vùi dạng tinh thể lục giác cấu tạo bởi các phân tử virus xếp thành hàng, thành phiến (Hình 11-3).

TMV là virus thực vật bền nhất. Virus tinh chiết (bảo quản ở 40°C) vẫn duy trì khả năng nhiễm bệnh sau 50 năm; virus tồn tại lâu dài trong tàn dư và thuốc lá chế biến; virus trong mô giữ được hoạt tính gây bệnh sau 30 phút sấy ở nhiệt độ 120°C .



Hình 2-6 Tinh thể virus TMV hình thành trong tế bào thuốc lá

Tổ chức bộ gen và tái sinh TMV

TMV và các tobamovirus khác có bộ gen RNA sợi đơn, cực +, không phân đoạn, kích thước ~ 6.4 kb. Tổ chức bộ gen của TMV và các tobamovirus khác tương tự nhau (Hình 11-4). Tính từ trái qua phải, bộ gen của TMV được tổ chức như sau:

Một chuỗi không dịch mã đầu 5' (untranslated leader).

Bốn ORF là:

ORF1 mã hóa protein MET-Hel (126 kDa) có chức năng tạo mũ (methyltransferase) đầu 5' phân tử RNA và tháo xoắn (helicase) trong quá trình tái sinh virus.

ORF2 là 1 ORF lồng của ORF1. ORF 1 cùng với ORF2 được dịch mã theo cơ chế “readthrough” để tạo 1 protein lớn là RdRp (183 kDa)

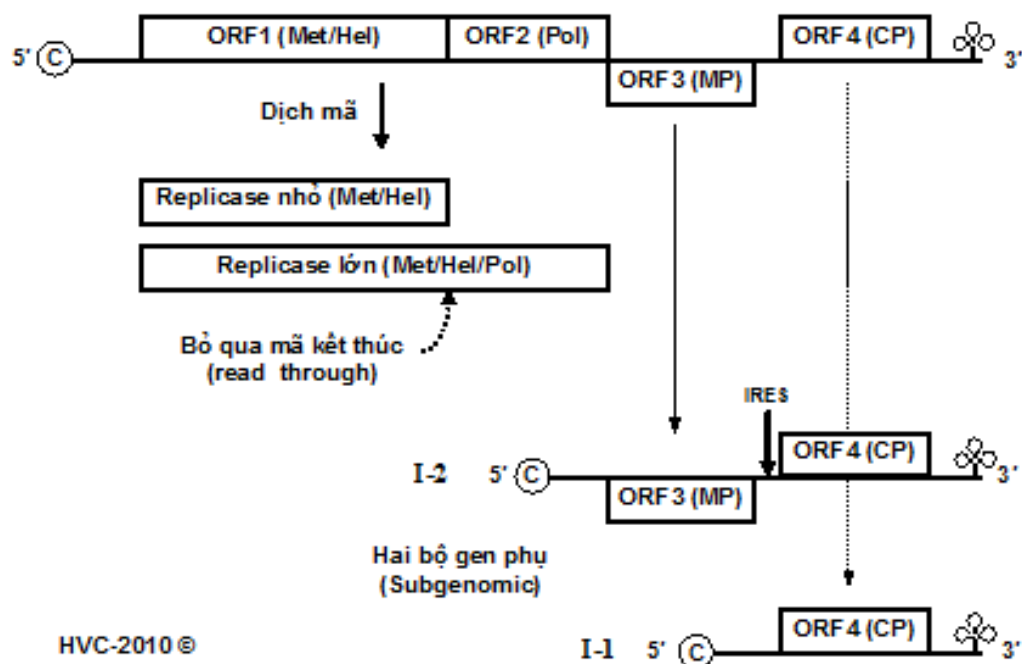
ORF3 mã hóa protein vận chuyển MP (30 kDa)

ORF4 mã hóa CP (17.5 kDa)

Một chuỗi không dịch mã đầu 3' có cấu trúc thứ cấp giống tRNA.

Trong quá trình tái sinh, TMV tạo 2 phân tử RNA phụ genome có chung đầu 3' với phân tử RNA genome nhưng có kích thước ngắn hơn, tương ứng gen MP và CP.

Phân tử RNA genome và 2 phân tử phụ genome đều được mũ hóa $m^7G5'ppp5'Gp$ (Cap) ở đầu 5' nhưng không có đuôi polyA.



Hình 2-7 Tổ chức bộ gen chính và 2 phân tử phụ genome của TMV

Quá trình tái sinh của TMV đã được nghiên cứu kỹ và trải qua các bước sau:

Phân tử virus xâm nhập vào tế bào chất nhờ tổn thương cơ học.

Cởi áo một phần protein vỏ ở đầu 5' của phân tử virus.

Ribosome của tế bào ký chủ tiếp cận đầu 5' của RNA genome và tiến hành dịch mã 2 protein tái sinh là Met-Hel và RdRp. Trong quá trình dịch mã thì quá trình cởi áo cũng được tiếp tục. Đây là cơ chế “cởi áo cùng dịch mã” (co-translational disassembly)

Hai protein MET-Hel và RdRp sử dụng sợi RNA genome (sợi +) để sao mã sợi RNA (-).

Tiếp theo, sợi RNA (-) này lại được dùng làm khuôn để tổng hợp sợi (+) và các phân tử RNA phụ genome (có thể xem là các mRNA của protein MP và CP). Trên các phân tử phụ genome này, các protein MP và CP được dịch mã.

MP kết hợp với sợi RNA (+) để di chuyển sang tế bào khác qua sợi liên bào theo cơ chế nucleoprotein.

Các phân tử RNA sợi (+) và CP khi tích lũy đủ kích hoạt quá trình lắp ráp phân tử virus mới.

Các phân tử virus cũng kết tụ lại để tạo các thể vùi (tinh thể) dạng lục giác trong tế bào chất.

Triệu chứng TMV

Triệu chứng do TMV gây ra thay đổi theo chủng virus, cây ký chủ (Hình 14-5).

Trên cây thuốc lá, cây bệnh nhiễm hệ thống với triệu chứng điển hình là lá bị khảm rõ rệt giống như da ếch. Triệu chứng đầu tiên xuất hiện trên lá non gồm các vùng xanh đậm, xanh nhạt, vàng xen kẽ nhau. Lá phát triển kém, phiến lá nhỏ hẹp, mặt lá gồ ghề. Cây nhỏ chỉ bằng 1/2 - 1/4 lần so với cây khỏe.

Trên cây ớt, virus TMV nhiễm hệ thống gây hiện tượng khảm lá, lùn cây. Đôi khi cây bệnh xuất hiện các vết chết hoại ở phần cuống lá.

Trên cây cà chua: virus TMV gây hiện tượng đốm biến vàng, khảm lá; lá ít biến dạng hơn.



Hình 2-8 Triệu chứng do TMV gây ra trên thuốc lá (trái), ớt (giữa) và cà chua (phải)

Lan truyền TMV

TMV là một trong các virus có khả năng lan truyền rất cao

Virus xâm nhập và lan truyền rất dễ dàng qua tiếp xúc cơ học (cọ xát lá, cắt tỉa, tiếp xúc của rễ trong đất). Virus có thể lan truyền qua côn trùng miệng nhai (theo kiểu cơ học).

Thời kì tiềm dục của bệnh phụ thuộc vào điều kiện nhiệt độ. Ở nhiệt độ 30°C là ~5 ngày, ở nhiệt độ thấp hơn là 2 tháng, trung bình là 8 - 10 ngày.

TMV là một loại virus truyền qua hạt của nhiều loại cây (ví dụ hạt cà chua, thuốc lá). Tuy nhiên, virus không tồn tại bên trong hạt giống mà bám ở bề mặt vỏ hạt.

TMV (và các tobamovirus khác) là virus thực vật cực kỳ bền vững (có thể được xem là ngoại lệ duy nhất trong số các virus thực vật). TMV có thể tồn tại rất lâu dài (hàng tháng tới hàng năm) trên tàn dư cây bệnh trong đất. Thậm chí thuốc lá đã qua chế biến vẫn có thể truyền bệnh (virus giữ được hoạt tính gây bệnh sau 30 phút sấy ở nhiệt độ 120°C).

Biện pháp phòng trừ TMV

Sử dụng giống chống bệnh dựa trên tính kháng gen đối gen (như gen N trên thuốc lá, gen L trên ớt), dựa trên tính kháng từ tác nhân gây bệnh PDR (ví dụ cây thuốc lá chuyển gen CP có thể kháng rất tốt virus).

Sử dụng giống sạch bệnh: Chọn giống từ những ruộng không bị nhiễm bệnh; thu hoạch riêng cây bệnh, cây khỏe.

Sử lý hạt giống. Vì TMV có thể tồn tại ở vỏ hạt nên có thể hạn chế virus bằng xử lý hạt giống với hóa chất. Ví dụ ngâm hạt trong dung dịch Na_3PO_4 10% trong 2 giờ; hoặc ngâm hạt trong dung dịch Na_3PO_4 1% trong 15 phút, sau đó ngâm trong dung dịch NaOCl 0.53% trong 30 phút. Xử lý hạt với dung dịch HCl 20% cũng cho kết quả tốt.

Khử trùng dụng cụ thu hái bằng Formalin 4 %, rửa tay và dụng cụ bằng xà phòng, sữa.

Nhổ bỏ cây bệnh trên đồng ruộng, dọn sạch tàn dư cây bệnh và diệt côn trùng môi giới là sâu ăn lá (truyền kiểu cơ giới).

Tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV)

ToBRFV là một tobamovirus mới được xác định năm 2014 tại Israel, 2015 tại Jordan và hiện đã lan sang nhiều nước gồm China, Mexico, USA và nhiều nước châu Âu.

Virus hiện đang gây quan ngại lớn cho sản xuất cà chua và nhiều cây Capsicum khác **vì nhiễm trên các giống cà chua kháng TMV và ToMV**.

ToBRFV giống với TMV và các tobamovirus về đặc điểm hình thái, sinh học, dịch tễ, phòng chống và chẩn đoán.

Đặc điểm triệu chứng trên cà chua (Hình 11-6)

ToBRFV gây một loạt triệu chứng từ dữ dội – nhẹ - ảm (không triệu chứng).

Lá:

Thường xuất hiện sớm nhất ở ngọn.

Khảm, biến vàng, đốm biến vàng

Phồng lá

Héo lá => biến vàng => cây chết

Nhăn, giòn hoặc biến dạng

Lá nhỏ hẹp đôi khi xuất hiện

Cuống, thân, đài hoa

Vết chết hoại nâu

Quả

Đốm biến vàng, có vân cẩm thạch

Đốm chết hoại màu tối trên quả xanh

Quả non biến dạng và chín không đều (có các sọc xanh, mảng xanh)

Quả một số giống (VD Juanita ở Đức) chỉ chuyển màu cam mà không thể chín đỏ.

Các mảng nhăn (rugose) trên quả khá hiếm gặp.

Số lượng quả giảm.



Hình 2-9 Triệu chứng do ToBRFV gây ra trên cà chua (García-Estrada et al. 2022)

Tomato mottle mosaic tobamovirus (ToMMV)

ToMMV được phát hiện đầu tiên tại Mexico năm 2013 và tiếp theo được phát hiện thấy tại Americas, Asia và Europe. ToMMV nhiễm trên cà chua và capsicum.

Giống như ToBRFV, ToMMV đang là đối tượng được quan tâm nhiều vì cũng **nhiễm trên các giống cà chua kháng TMV và ToMV**.

ToMMV chưa phát hiện thấy tại Việt Nam, nhưng tại Trung Quốc, virus được phát hiện thấy tại nhiều tỉnh trong đó có các tỉnh lân cận Việt Nam như Vân Nam, đảo Hải Nam.

ToMMV đặc biệt giống với ToMV về đặc điểm điểm virus (nhiều mẫu trước kia là ToMV nhưng có thể là ToMMV).

ToMMV giống với các tobamovirus về đặc điểm hình thái, sinh học, dịch tễ, phòng chống và chẩn đoán.

Triệu chứng do ToMMV trên cà chua rất giống với triệu chứng do các tobamovirus khác gồm: biến vàng lá và ngọn, khảm lá, đốm biến vàng, đốm chết hoại trên quả và lá, quả chín không đều, biến dạng lá (Hình 11-7)



Hình 2-10 Triệu chứng do ToMMV gây ra trên cà chua (Webster et al., 2014; Maudarbaccus et al. 2021)

VIRUS RNA SỢI ĐƠN CỰC DƯƠNG: CHI POTEXVIRUS

Chi POTEXVIRUS

Phân loại potexvirus

Vực: *Riboviria*

Giới: *Orthornavirae*

Ngành: *Kitrinoviricota*

Lớp: *Alsuviricetes*

Bộ: *Tymovirales*

Họ: *Alphaflexiviridae*

Chi: *Potexvirus*

Tên chi *Potexvirus* được lấy từ tên loài điển hình *Potato virus X*. Là chi lớn với 48 thành viên (Bảng 12-1).

Bảng 2-3 Các loài virus thuộc chi *Potexvirus* (ICTV, 2021)

TT	Loài	Tên virus	Viết tắt
1	<i>Citrus yellow mottle-associated virus</i>	citrus yellow mottle-associated virus	CiYMaV
2	<i>Citrus yellow vein clearing virus</i>	citrus yellow vein clearing virus	CYVCV
3	<i>Indian citrus ringspot virus</i>	Indian citrus ringspot virus	ICRSV
4	<i>Allium virus X</i>	allium virus X	AVX
5	<i>Alstroemeria virus X</i>	alstroemeria virus X	AlsVX
6	<i>Alternanthera mosaic virus</i>	alternanthera mosaic virus	AltMV
7	<i>Ambrosia asymptomatic virus 1</i>	Ambrosia asymptomatic virus 1	AAV1
8	<i>Asparagus virus 3</i>	asparagus virus 3	AV3
9	<i>Babaco mosaic virus</i>	Babaco mosaic virus	BabMV
10	<i>Bamboo mosaic virus</i>	bamboo mosaic virus	BaMV
11	<i>Cactus virus X</i>	cactus virus X	CVX
12	<i>Cassava Colombian symptomless virus</i>	Cassava Colombian symptomless virus	CsCSV
13	<i>Cassava common mosaic virus</i>	cassava common mosaic virus	CsCMV
14	<i>Cassava virus X</i>	cassava virus X	CsVX
15	<i>Clover yellow mosaic virus</i>	clover yellow mosaic virus	CIYMV
16	<i>Cnidium virus X</i>	Cnidium virus X	CnVX
17	<i>Cymbidium mosaic virus</i>	cymbidium mosaic virus	CymMV
18	<i>Euonymus yellow mottle associated virus</i>	Euonymus yellow mottle associated virus	EYMaV
19	<i>Euonymus yellow vein virus</i>	Euonymus yellow vein virus	EYVV
20	<i>Foxtail mosaic virus</i>	foxtail mosaic virus	FoMV
21	<i>Hosta virus X</i>	hosta virus X	HVX
22	<i>Hydrangea ringspot virus</i>	hydrangea ringspot virus	HdRSV
23	<i>Lagenaria mild mosaic virus</i>	lagenaria mild mosaic virus	LMMV
24	<i>Lettuce virus X</i>	lettuce virus X	LeVX
25	<i>Lily virus X</i>	lily virus X	LVX
26	<i>Malva mosaic virus</i>	malva mosaic virus	MalMV
27	<i>Mint virus X</i>	mint virus X	MVX
28	<i>Narcissus mosaic virus</i>	narcissus mosaic virus	NMV
29	<i>Nerine virus X</i>	nerine virus X	NVX
30	<i>Opuntia virus X</i>	opuntia virus X	OpVX
31	<i>Papaya mosaic virus</i>	papaya mosaic virus	PapMV
32	<i>Pepino mosaic virus</i>	pepino mosaic virus	PepMV
33	<i>Phaius virus X</i>	phaius virus X	PhVX
34	<i>Pitaya virus X</i>	Pitaya virus X	PiVX
35	<i>Plantago asiatica mosaic virus</i>	plantago asiatica mosaic virus	PIAMV

TT	Loài	Tên virus	Viết tắt
36	<i>Plantain virus X</i>	plantain virus X	PIVX
37	<i>Potato aucuba mosaic virus</i>	potato aucuba mosaic virus	PAMV
38	<i>Potato virus X</i>	potato virus X	PVX
39	<i>Schlumbergera virus X</i>	schlumbergera virus X	SchVX
40	<i>Senna mosaic virus</i>	Senna mosaic virus	SenMV
41	<i>Strawberry mild yellow edge virus</i>	strawberry mild yellow edge virus	SMYEV
42	<i>Tamus red mosaic virus</i>	tamus red mosaic virus	TRMV
43	<i>Tulip virus X</i>	tulip virus X	TVX
44	<i>Turtle grass virus X</i>	Turtle grass virus X	TGVX
45	<i>Vanilla virus X</i>	Vanilla virus X	VaVX
46	<i>White clover mosaic virus</i>	white clover mosaic virus	WCIMV
47	<i>Yam virus X</i>	yam virus X	YVX
48	<i>Zygocactus virus X</i>	zygocactus virus X	ZyVX

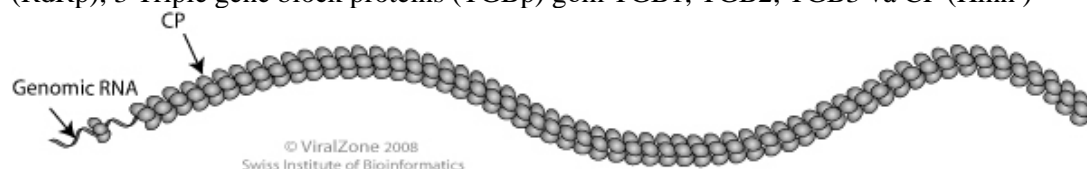
Đặc điểm phân tử và bộ gen potexvirus

Các potexvirus đều là các virus RNA có bộ gen gồm 1 phân tử RNA sợi đơn, cực (+), có mũ Cap đầu 5' và có đuôi polyA.

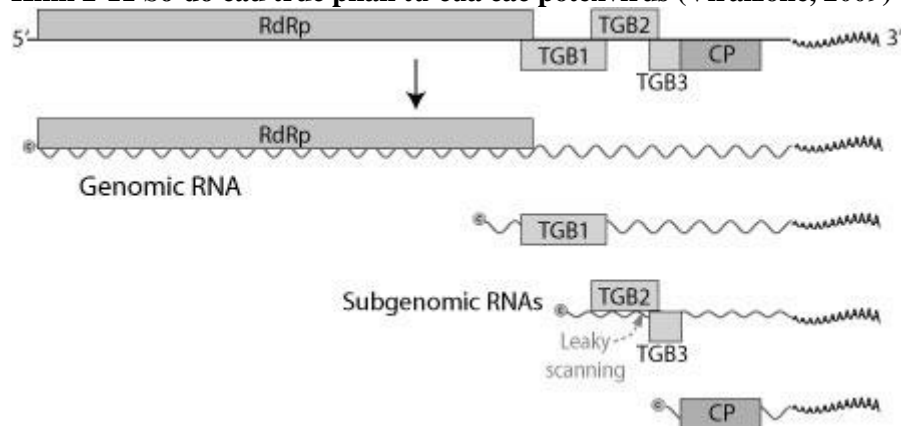
Các potexvirus đều có dạng hình sợi mềm, không có vỏ bọc, có cấu trúc đối xứng xoắn. Phân tử virus chỉ có vỏ protein bao quanh lõi RNA genome.

Phân tử virus hình sợi mềm, kích thước 470-1000 nm x 12-13 nm. Các potexvirus có bộ gen RNA sợi đơn, cực (+), không phân đoạn, kích thước ~ 5.9-7 kb. Trong quá trình tái sinh, các potexvirus tạo 3 phân tử phụ genome (subgenomic RNA). Phân tử RNA genome và 3 phân tử phụ genome đều có đầu 5' được mũ hóa, còn đầu 3' có đuôi poly A.

Bộ gen các potexvirus mã hóa có 5 ORF mã hóa 5 proteins là RNA-dependent RNA polymerase (RdRp), 3 Triple gene block proteins (TGBp) gồm TGB1, TGB2, TGB3 và CP (Hình)



Hình 2-11 Sơ đồ cấu trúc phân tử của các potexvirus (Viralzone, 2009)



Hình 2-12 Sơ đồ tổ chức bộ gen của các potexvirus (Viralzone, 2009)

Pepino mosaic virus (PepMV)

Phân bố và tầm quan trọng PepMV

PepMV được phát hiện thấy đầu tiên trên cây dưa pepino tại Peru năm 1980. Được gọi là dưa nhưng cây pepino là cây học cà (*Solanum muricatum*). Các nghiên cứu phổ ký chủ cho thấy virus có phổ ký chủ khá rộng nhưng không nhiễm trên cây họ bầu bí và cây họ đậu, chủ yếu nhiễm trên cây họ cà, trong đó cà chua và dưa pepino là 2 ký chủ quan trọng.

Hiện nay (2021), PepMV đã phân bố rộng tại châu Mỹ, châu Âu và châu Phi. Tại châu Á, virus mới chỉ được công bố tại Israel, Syri và Trung Quốc (Thượng Hải). Tại châu Đại Dương, PaMV mới chỉ xuất hiện tại NewZealand.

Hiện còn tranh luận về tầm quan trọng kinh tế của PepMV trên cây cà chua. Thiệt hại kinh tế chủ yếu do xuất hiện triệu chứng trên quả (giảm giá trị thương phẩm). Khá nhiều isolates PepMV tạo triệu chứng nhẹ hoặc ẩn triệu chứng, thậm chí có thể được ứng dụng để tạo phản ứng chéo nhằm chống bệnh. Do PepMV đã phân bố rộng tại châu Âu và ý nghĩa kinh tế không cao nên virus không được xếp và đối tượng KDTV tại khu vực này. Tuy nhiên do virus lan truyền qua hạt giống và biện pháp kiểm soát có thể tốn kém nên virus vẫn được một số quốc gia châu Âu xếp vào nhóm đối tượng KDTV có kiểm soát.

Hình thái phân tử và bộ gen PepMV

Phân tử PepMV hình sợi mềm, kích thước ~450-580 x 138 nm thuộc nhóm virus trần. Phân tử virus gồm 1 phân tử RNA genome kích thước ~ 6.4 kb được bao bọc bởi một lớp vỏ protein.

PepMV có bộ gen RNA sợi đơn, cực +, không phân đoạn. Tổ chức bộ gen của PepMV (Hình 12-3) gồm:

Một chuỗi không dịch mã đầu 5' (untranslated leader).

Năm ORF là:

ORF1 mã hóa protein MET-Hel-RdRp (126 kDa) có chức năng tạo mũ (methyltransferase) đầu 5' phân tử RNA, tháo xoắn (helicase) và tổng hợp RNA (RdRp) trong quá trình tái sinh.

ORF2, ORF3, ORF4 mã hóa khối 3 protein (triple gene block) là TGB1, TGB2 và TGB3. Khối 3 protein này đóng vai trò là MP protein của virus.

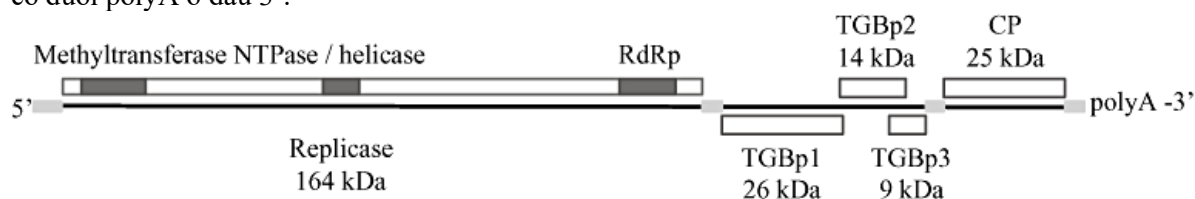
ORF5 mã hóa CP (25 kDa)

Một chuỗi không dịch mã đầu 3'

Đuôi poly A

Trong quá trình tái sinh, PepMV tạo 3 phân tử RNA phụ genome có chung đầu 3' với phân tử RNA genome nhưng có kích thước ngắn hơn.

Phân tử RNA genome và 3 phân tử phụ genome đều được mũ hóa m⁷G5'ppp5'Gp (Cap) ở đầu 5' và có đuôi polyA ở đầu 3'.



Hình 2-13 Tổ chức bộ gen của PepMV

Triệu chứng PepMV

PepMV gồm 5 chủng, được xác định dựa trên đặc điểm sinh học (triệu chứng, phổ ký chủ tự nhiên và lây nhiễm nhận tạo) và so sánh trình tự, bao gồm:

Chủng pepino Peru (LP)

Chủng cà chua châu Âu (EU)

Chủng Chile-2 (CH2)

Chủng US1 (US1)

Chủng PES (xác định từ cà chua dại tại Peru)

Mức độ biểu hiện triệu chứng không phụ thuộc chủng virus vì mỗi chủng có cả các isolate tạo triệu chứng dữ dội và triệu chứng nhẹ.

Trên cà chua, triệu chứng do PepMV khá biến động, từ triệu chứng ẩn tới triệu chứng rất dữ dội. Nhìn chung, triệu chứng của PepMV phụ thuộc tổ hợp isolate virus – giống cà chua, tuổi cây tại thời điểm nhiễm và điều kiện ngoại cảnh (nhiệt độ và ánh sáng thấp thuận lợi cho triệu chứng biểu hiện).

Đặc điểm triệu chứng của PepMV trên cà chua (Hình 12-4)

Lá:

Khảm vàng, khảm xanh vàng

Đốm biến vàng

Lá ngọn có thể nhỏ hẹp, cong nhẹ

Quả

Đốm biến vàng

Biến màu dạng vân cẩm thạch, dạng ngọn lửa

Quả biến dạng và chín không đều (có các sọc xanh, mảng xanh)

Triệu chứng nhẹ trên quả có thể chỉ có các dạng đốm biến vàng.



**Hình 2-14 Triệu chứng do PepMV trên cà chua
Lan truyền**

Giống như các potexvirus khác, PepMV xâm nhập và lan truyền dễ dàng qua tiếp xúc cơ học (cọ xát lá, cắt tỉa). Đáng chú ý, virus có thể lan truyền qua ong thụ phấn.

PepMV truyền qua hạt cà chua với tỷ lệ hạt nhiễm 0.005% - 0.057%. Tuy nhiên, virus không tồn tại bên trong hạt giống mà bám ở vỏ hạt. Quả cà chua không có triệu chứng vẫn có thể chứa hàm lượng virus cao.

Phân tử PepMV và các potexvirus khác khá bền vững về mặt vật lý. PepMV có thể tồn tại và duy trì khả năng xâm nhiễm nhiều tuần trong tàn dư cây và trên bề mặt các vật dụng chăm sóc, thu hái...

VIRUS RNA SỢI ĐƠN CỰC DƯƠNG: CHI POTYVIRUS

CHI POTYVIRUS

Giới thiệu

Vực: *Riboviria*

Giới: *Orthornavirae*

Ngành: *Pisuviricota*

Lớp: *Stelpaviricetes*

Bộ: *Martellivirales*

Họ: *Potyviridae*

Chi: *Potyvirus*

Chi *Potyvirus* là chi lớn nhất trong họ *Potyviridae* với khoảng 200 loài. Như vậy, cùng với chi *Begomovirus* (họ *Geminiviridae*), *Potyvirus* là chi virus thực vật lớn nhất, chiếm khoảng 20% tổng số virus thực vật.

Nhiều potyvirus là các tác nhân gây bệnh cây có ý nghĩa kinh tế. Ví dụ:

Papaya ringspot virus (PRSV) gây bệnh virus quan trọng nhất trên đu đủ và bầu bí.

Turnip mosaic virus (TuMV) hại cây rau họ thập tự và được xem là virus quan trọng thứ 2 trên cây rau khắp thế giới.

Bean common mosaic virus (BCMV) trên cây họ đậu.

Potato virus Y (PVY) trên cây khoai tây và các cây họ cà khác.

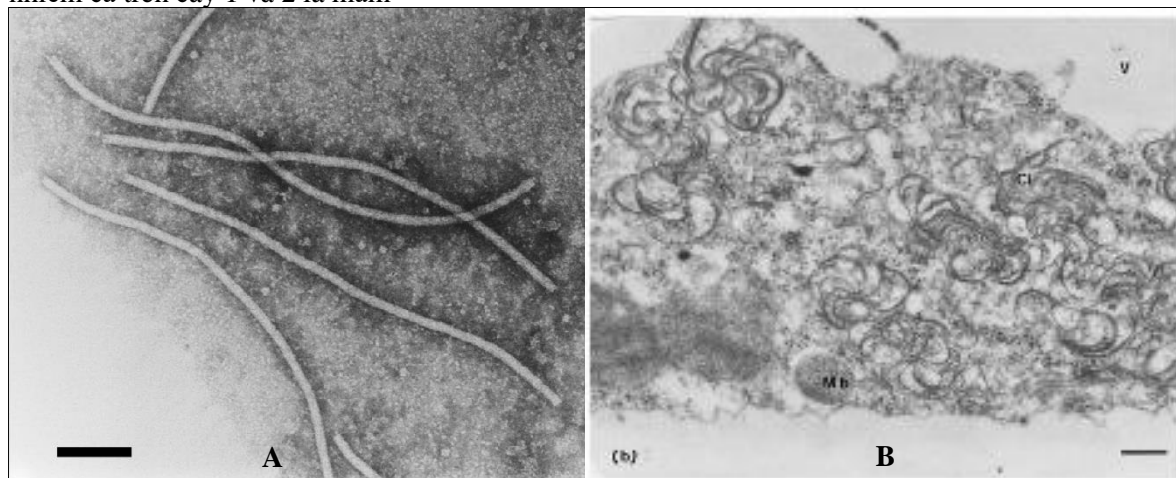
Plum pox virus (PPV) là virus quan trọng nhất trên cây quả hạch như đào, táo, lê, mận.

Trong tế bào cây, potyvirus thường tạo các thể vùi đặc trưng. Tất cả các potyvirus đều hình thành thể vùi hình trụ trong tế bào chất (Hình 15-1). Thể vùi tế bào chất hình thành từ protein CI

(cytoplasmic inclusions (CI)). Các thể vùi CI này có hình dạng đặc trưng (hình vòng bánh xe, hình phiến...) cho potyvirus và do đó có giá trị chẩn đoán. Một số virus lại hình thành thể vùi trong nhân gọi là thể vùi nhân (nuclear inclusion, NI). Thể vùi nhân được cấu tạo bởi 2 protein là NIb và NIa.

Một số virus cũng hình thành thể vùi trong nhân nhưng hình dạng thể vùi không xác định gọi là thể vùi vô định hình (amorphous inclusions, AI) được cấu tạo bởi protein HcPro.

Phần lớn virus trong họ có phổ ký chủ hẹp hoặc rất hẹp nhưng một số ít lại có phổ ký chủ rất rộng, nhiễm cả trên cây 1 và 2 lá mầm



Hình 2-15 Hình thái virion và thể vùi của potyvirus. Ảnh trái: phân tử PVY, bar = 100 nm (Shukla et al., 1998). Hình phải: thể vùi tế bào chất của PVY trong tế bào thuốc lá (Arbatova et al. 1998).

Đặc điểm virion

Các potyvirus có phân tử hình sợi mềm đường kính 11-15 nm và dài 650 – 950 nm. Mỗi phân tử virion được cấu tạo từ 1700-2000 tiểu phần protein xếp theo kiểu xoắn đối xứng xung quanh phân tử RNA genome. Ngoài ra, phân tử virus còn có 1 protein gắn ở đầu 5' là VPg (genome-linked protein, VPg). Thành phần phân tử bao gồm 95 % protein và 5% RNA.

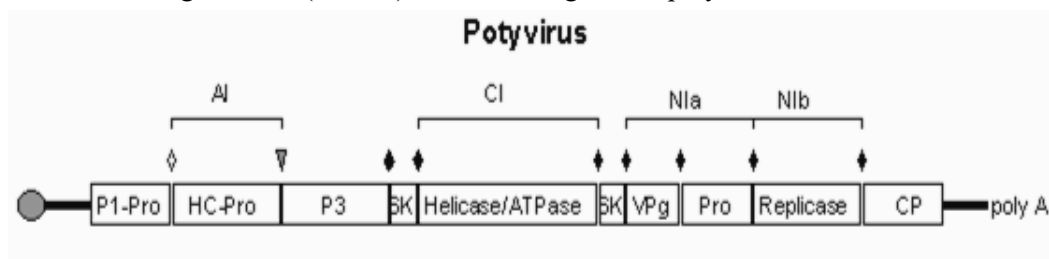
Tổ chức bộ gen

Tất cả các potyvirus có bộ gen là một phân tử RNA sợi đơn, cực dương, kích thước ~ 10 kb. Tổ chức bộ gen của các potyvirus giống nhau (Hình 13-2), tính từ trái sang phải là:

Một vùng 5' không dịch mã (5'UTR)

Một ORF đơn, lớn gọi là ORF chính (major ORF).

Một đầu 3' không dịch mã (3'UTR), kết thúc bằng 1 đuôi poly-A.



Hình 2-16 Tổ chức bộ gen của các potyvirus (Shukla et al., 1998).

ORF chính mã hóa 1 polyprotein, sau khi dịch mã sẽ được xử lý thành khoảng 10 protein chức năng:

Protein P1

Protein hỗ trợ (Helper component protein, HC-Pro)

Protein P3,

Protein 6K1,

Protein thể vùi tế bào chất (CI)

Protein 6K2

Protein VPg (genome-linked protein)

Protein NIa-Pro (major protease of small nuclear inclusion protein -NIa)

Protein NIb (large nuclear inclusion protein)

Protein vỏ (coat protein, CP)

Đối với các virus thuộc chi *Bymovirus* thì RNA-1 mã hóa các protein tương tự P3, 6K1, CI, 6K2, NIa, NIb và CP, còn RNA-2 mã hóa 2 protein P1 và P2, trong đó P1 tương tự HC-Pr còn P2 tương tự protein “read through” của các furovirus và cần thiết để virus có thể truyền được qua môi giới là nấm.

Potato virus Y (PVY)

Tầm quan trọng

PVY là một virus thuộc chi *Potyvirus*, được ghi nhận đầu tiên trên khoai tây từ 1931 và là một trong các virus thực vật được nghiên cứu nhiều và đầy đủ nhất. PVY có phổ ký chủ rộng, đặc biệt nguy hiểm trên cây họ cà. PVY được xem là virus quan trọng nhất trên khoai tây và trong nhiều trường hợp trên thuốc lá, ớt và cà chua.

Virus

PVY là loài chuẩn của chi *Potyvirus*, và giống như các potyvirus khác, có phân tử hình sợi mềm, kích thước 730-740 x 11-12 nm với ~ 6 % nucleic acid.

PVY là một trong các virus rất đa dạng về di truyền và tính gây bệnh. Về mặt lịch sử, dựa trên phản ứng đối với cây ký chủ và cây chỉ thị (*Nicotiana tabacum* cv Samsun, *Solanum tuberosum* và *Physalis floridana*), PVY được chia thành 3 chủng chính là PVY^O, PVY^N và PVY^C.

Chủng PVY^O xuất hiện khắp thế giới, tạo phản ứng siêu nhạy trên cây khoai tây mang gen kháng Ny.

Chủng PVY^C phân bố ở Úc, Ấn Độ và châu Âu, tạo phản ứng siêu nhạy trên cây khoai tây mang gen kháng Nc.

Chủng PVY^N phân bố ở châu Âu, châu Phi và Nam Mỹ, gây chết hoại gân trên thuốc lá. Gần đây, một số chủng mới gần gũi với chủng PVY^N cũng được mô tả. Chẳng hạn, chủng PVY^N-Wilga có nguồn gốc

từ chủng PVY^N phân lập từ khoai tây Ba Lan nhưng tạo triệu chứng nhẹ hơn; chủng PVY^{NTN} tạo vết đốm vòng chết hoại trên củ khoai tây.

Nhìn chung việc phân chia chủng PVY khá phức tạp vì các chủng thường hay tái tổ hợp với nhau. Mới đây (1998), dựa trên phân tích phân tử, các isolate PVY trên thế giới được chia thành 3 cụm phả hệ (Hình 15-4) là:

PVY^N bao gồm các mẫu virus khoai tây thuộc chủng PVY^N và PVY^{NTN},

PVY^O bao gồm các mẫu virus khoai tây tương ứng với chủng PVY^O

PVY^{NP} bao gồm các mẫu virus không phải phân lập từ khoai tây (NP là viết tắt của non-potato). Phần lớn các mẫu thuộc chủng PVY^C.

PVY tại Việt Nam

Một nghiên cứu dựa vào trình tự gen CP của 3 mẫu PVY Việt Nam (thu trên khoai tây và ớt) năm 2008 cho thấy cả 3 mẫu này phân nhóm vào 3 cụm khác nhau ở trên, trong đó mẫu virus phân lập từ cây ớt tại Đà Lạt phân nhóm vào cụm PVY^{NP}. Kết quả này chứng tỏ virus PVY tại Việt Nam khá đa dạng và có thể đã xâm nhập vào Việt Nam bằng nhiều đường khác nhau.

Triệu chứng

Trên khoai tây, PVY thường gây bệnh khảm hoặc khảm nhẫn (Hình 13-3). Triệu chứng rất biến động phụ thuộc chủng virus, giống cây, điều kiện thời tiết và cách nhiễm bệnh (bằng rệp hay từ củ). Các triệu chứng thường bắt gặp trên khoai tây bao gồm khảm, khảm nhẫn, lùn, lá giòn, đốm chết hoại gân (thường ở lá phía dưới), đốm vòng chết hoại trên củ.

Trên thuốc lá, ớt, cà chua, PVY thường gây các triệu chứng đốm biến vàng, khảm, hoặc đốm chết hoại trên gân. Nhìn chung lá cây bệnh ít bị biến dạng hơn so với khoai tây.



Hình 2-17 Các triệu chứng khảm, khảm nhẫn, lùn, chết hoại lá và đốm vòng chết hoại trên khoai tây do PVY (Kerlan, 2006; Hà Viết Cường, 2005)

Lan truyền

PVY truyền dễ dàng qua củ khoai tây nhưng không truyền qua hạt (hạt khoai tây, cà chua, thuốc lá).

Củ bệnh là một trong các nguồn bệnh quan trọng nhất trên khoai tây.

Khoảng 50 loài rệp muỗi có thể truyền PVY theo kiểu không bền vững. Trong số các loài rệp này, rệp đào *M. persicae* là vectơ hiệu quả nhất.

Ngoài ra, nhiều cây ký chủ dại họ cà (thuộc các chi *Datura*, *Solanum*, *Physalis*) là nguồn bệnh quan trọng đối với PVY.

Phòng chống

Đối với khoai tây

Dùng củ giống sạch bệnh: trồng khoai tây từ hạt, nuôi cây đỉnh sinh trưởng, trồng ruộng giống tại các khu vực biệt lập, điều tra và vệ sinh đồng ruộng (nhổ bỏ cây bệnh, ký chủ dại).

Phòng trừ vector: Mặc dù kém hiệu quả nhưng có thể làm giảm mật độ vector.

Tạo giống kháng với gen kháng có nguồn gốc từ cây. Ba loại tính kháng trên khoai tây đã được áp dụng là (i) kháng ngang, (ii) tạo phản ứng siêu nhạy và (iii) cực kháng. Tính kháng ngang là tính kháng đa gen. Tính kháng tạo phản ứng siêu nhạy do một gen kháng chủ, trội là *Ny* qui định. Dạng cực kháng cũng do một gen kháng chủ, trội là *Ry* qui định. Các gen qui định khả năng cực kháng đều lấy từ khoai tây dại như *Ry_{sto}* từ *S. stoloniferum* và *Ry_{adg}* từ *S. andigena*.

Tạo giống kháng kiểu PDR. Tạo các giống mang gen của PVY (như CP, P1, NIb) cũng đã được nghiên cứu. Cây chuyển gen CP thường tạo ra kiểu hình dạng cực kháng. Ngoài ra, tạo giống kháng thông qua cơ chế RNAi cũng đã và đang được nghiên cứu từ khoảng 10 năm trở lại đây. Một số giống khoai tây chuyển gen kháng PVY đã được thương mại hóa như giống Russett Burbank và Shepody tại Mỹ.

Đối với thuốc lá

Trên thuốc lá, tạo giống kháng dùng cả gen kháng từ cây và từ virus là biện pháp chính để chống lại PVY. Tuy nhiên giống mang gen kháng từ cây (ví dụ gen *va*) thường bị giảm năng suất và chất lượng thuốc. Vì vậy, tính kháng thông qua PDR thường được chú ý hơn.

Đối với cà chua và ớt

Tạo giống kháng dựa vào gen kháng của cây. Nhiều gen kháng chủ (cả trội và lặn) chống PVY đã được phát hiện trên cà chua và ớt. Ví dụ gen lặn *pot-1* từ cây *L. hirsutum*, các gen lặn *pvr1*, *pvr2*, *pvr4* và *pvr5* từ *Capsicum annuum*; các gen kháng trội *Pvr4* từ *C. annuum* và *Pvr7* từ *C. chinense*. Các gen kháng lặn đặc biệt *pvr2* đã được đưa vào nhiều giống ớt ở châu Âu và Mỹ. Gen kháng trội *Pvr4* kháng được tất cả các chủng PVY cũng được đưa vào giống các giống ớt lai ở châu Âu.

Ngoài ra, các kỹ thuật canh tác như dùng bẫy dính màu vàng hoặc nhà lưới đã được áp dụng thành công trong một số trường hợp đặc biệt (nơi áp lực bệnh không cao, mô hình canh tác kiểu công nghiệp) như ở Israel để chống phát tán bệnh trên ruộng.

VIRUS RNA SỢI ĐƠN CỰC ÂM: ORTHOTOSPOVIRUS

Chi ORTHOTOSPOVIRUS

Phân loại

Vực: *Riboviria*

Giới: *Orthornavirae*

Ngành: *Negarnaviricota*

Lớp: *Ellioviricetes*

Bộ: *Bunyavirales*

Họ: *Tospoviridae*

Chi: *Orthotospovirus*

Hiện có khoảng 26 orthotospovirus hại thực vật đã được ghi nhận (Bảng 14-1), trong đó virus điển hình và có ý nghĩa kinh tế là Tomato spotted wilt virus (TSWV).

Có ít nhất 3 orthotospovirus là TSWV, CaCV và TNRV đã được phát hiện trên cà chua Việt Nam.

Bảng 2-4 Các loài virus thuộc chi *Orthotospovirus* (ICTV, 2021)

TT	Loài	Tên virus	Viết tắt
1	<i>Alstroemeria necrotic streak orthotospovirus</i>	Alstroemeria necrotic streak virus	ANSV
2	<i>Alstroemeria yellow spot orthotospovirus</i>	Alstroemeria yellow spot virus	AYSV
3	<i>Bean necrotic mosaic orthotospovirus</i>	bean necrotic mosaic virus	BeNMV
4	<i>Calla lily chlorotic spot orthotospovirus</i>	calla lily chlorotic spot virus	CCSV

TT	Loài	Tên virus	Viết tắt
5	<i>Capsicum chlorosis orthospovirus</i>	Capsicum chlorosis virus	CaCV
6	<i>Chrysanthemum stem necrosis orthospovirus</i>	chrysanthemum stem necrosis virus	CSNV
7	<i>Groundnut bud necrosis orthospovirus</i>	groundnut bud necrosis virus	GBNV
8	<i>Groundnut chlorotic fan spot orthospovirus</i>	groundnut chlorotic fan-spot virus	GCFSV
9	<i>Groundnut ringspot orthospovirus</i>	groundnut ringspot virus	GRSV
10	<i>Groundnut yellow spot orthospovirus</i>	groundnut yellow spot virus	GRSV
11	<i>Hippeastrum chlorotic ringspot orthospovirus</i>	Hippeastrum chlorotic spot virus	HCRV
12	<i>Impatiens necrotic spot orthospovirus</i>	impatiens necrotic spot virus	INSV
13	<i>Iris yellow spot orthospovirus</i>	iris yellow spot virus	IYSV
14	<i>Melon severe mosaic orthospovirus</i>	melon severe mosaic virus	MSMV
15	<i>Melon yellow spot orthospovirus</i>	melon yellow spot virus	MYSV
16	<i>Mulberry vein banding associated orthospovirus</i>	mulberry vein banding-associated virus	MVBaV
17	<i>Pepper chlorotic spot orthospovirus</i>	pepper chlorotic spot virus	PCSV
18	<i>Polygonum ringspot orthospovirus</i>	polygonum ringspot virus	PolRSV
19	<i>Soybean vein necrosis orthospovirus</i>	soybean vein necrosis virus	SVNV
20	<i>Tomato chlorotic spot orthospovirus</i>	tomato chlorotic spot virus	TCSV
21	<i>Tomato spotted wilt orthospovirus</i>	tomato spotted wilt virus	TSWV
22	<i>Tomato yellow ring orthospovirus</i>	tomato yellow ring virus	TYRV
23	<i>Tomato zonate spot orthospovirus</i>	tomato zonate spot virus	TZSV
24	<i>Watermelon bud necrosis orthospovirus</i>	watermelon bud necrosis virus	WBNV
25	<i>Watermelon silver mottle orthospovirus</i>	watermelon silver mottle virus	WSMoV
26	<i>Zucchini lethal chlorosis orthospovirus</i>	zucchini lethal chlorosis virus	ZLC
27	<i>Tomato necrotic ringspot orthospovirus</i>	tomato necrotic ringspot virus	TNRV

Đặc điểm

Các orthospovirus hại thực vật có hình thái phân tử và tổ chức bộ gen giống các bunyavirus khác hại động vật. Chúng có phân tử hình cầu (khối đa diện), kích thước từ 80 – 120 nm. Phân tử virus có vỏ bọc, vỏ có mấu nhỏ cấu tạo bằng glycoprotein nhô lên trên bề mặt. Tất cả các orthospovirus có bộ gen phân mảnh gồm 3 phân tử RNA sợi đơn cực (-) hoặc lưỡng cực ký hiệu là L (large), M (medium) và S (small) có tổng kích thước từ 11 – 19 kb. Tất cả 3 phân tử đều được lắp ráp trong 1 phân tử virus.

Các tospovirus đều không ruyền qua hạt giống, lan truyền ngoài tự nhiên nhờ bọ trĩ theo kiểu bền vững tái sinh.

Tomato spotted wilt virus (TSWV)

Tầm quan trọng

TSWV (virus đốm héo cà chua) là virus quan trọng nhất của chi *Orthospovirus*.

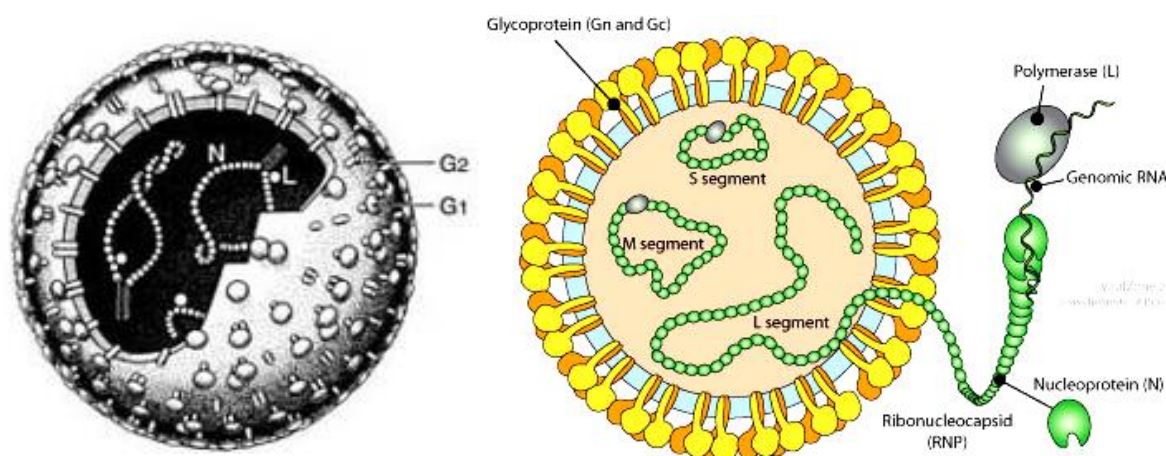
TSWV phân bố khắp thế giới và là virus thực vật có phổ ký chủ lớn nhất, nhiễm hơn 940 loài cây thuộc 8 họ cây một lá mầm và 90 họ cây hai lá mầm.

TSWV gây thiệt hại đáng kể trên một loạt các cây trồng quan trọng như lạc, đậu đỗ, khoai lang, thuốc lá, đu đủ, cà chua, ớt và nhiều cây cảnh.

Virus

Hình thái

Virion có hình khối đa diện (hình cầu), kích thước từ 80 – 120 nm. Phân tử có vỏ bọc. Vỏ có mấu nhỏ cấu tạo bằng glycoprotein (kích thước 5-10 nm), phần cuống mấu nằm chìm trong một lớp màng kép lipid (dày khoảng 5 nm) có nguồn gốc từ màng tế bào ký chủ (vector hoặc cây). Bên trong lớp vỏ là lõi virus gồm 3 phân tử RNA dạng mạch vòng giả do 2 đầu của mỗi phân tử có thể tự bắt cặp. Các phân tử RNA genome này liên kết với các phân tử protein N (nucleoprotein). Các phân tử RNA genome liên kết protein N này được gọi là các phân tử RNP (Ribonucleocapsid). Ngoài ra phần lõi phân tử virus cũng chứa một số lượng nhỏ protein L (là RdRp của virus) (Hình 14-1). Cần chú ý là các phân tử ribonucleocapsid này có khả năng xâm nhiễm nếu được đưa vào tế bào. Trái lại chỉ các phân tử virion nguyên vẹn (có vỏ bọc và mấu) mới có khả năng truyền qua vector bọ trĩ. Phân tử virus chứa khoảng 65% protein, 20% lipid, 7% carbohydrate và 5% RNA.



Hình 2-18 Hình thái và cấu trúc phân tử TSWV

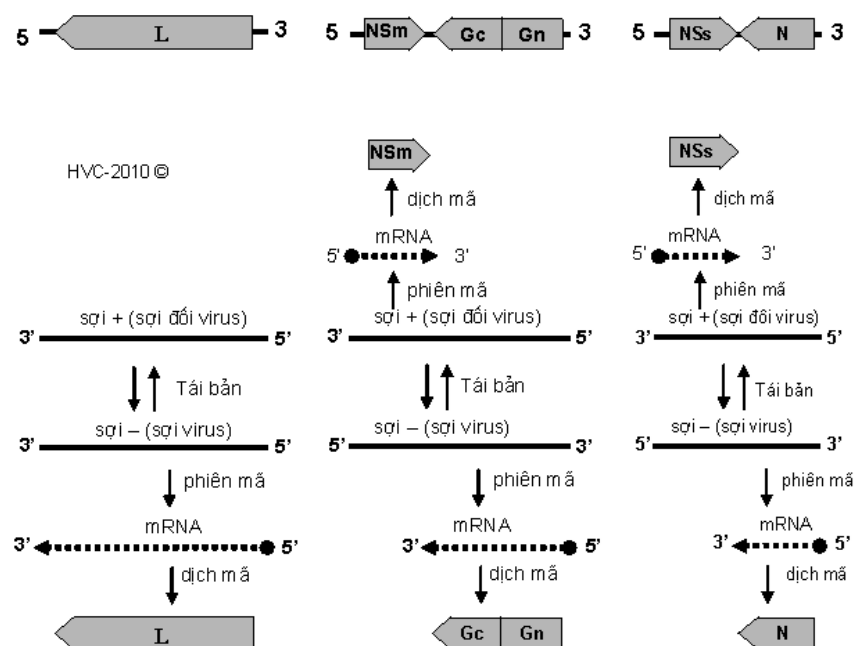
Tổ chức bộ gen và tái sinh

Tổ chức bộ gen của TSWV giống như của các tospovirus khác gồm 3 phân tử RNA sợi đơn cực (-) hoặc lưỡng cực ký hiệu là L (large), M (medium) và S (small) có tổng kích thước ~ 17 kb (Hình 14-2), cụ thể là:

- + Sợi L: 8897 nucleotides, có cực (-), chứa 1 ORF lớn, mã hóa protein L trên sợi đối virus
- + Sợi M: 4821 nucleotides, lưỡng cực, chứa 2 ORF mã hóa 3 protein là NSm trên sợi virus và Gc (G2) và Gn (G1) trên sợi đối virus. NSm là viết tắt của “Non-structural protein on M segment” có nghĩa là protein phi cấu trúc được mã hóa trên sợi M.
- + Sợi S: 2916 nucleotides, lưỡng cực, chứa 2 ORF mã hóa 2 protein là NSs trên sợi virus và N trên sợi đối virus. NSs là viết tắt của “Non-structural protein on S segment” có nghĩa là protein phi cấu trúc được mã hóa trên sợi S.

Tất cả 3 phân tử RNA genome đều được lắp ráp trong 1 phân tử virus.

Hai đầu của mỗi phân tử RNA genome có trình tự bổ sung khoảng 65 – 70 nucleotides dẫn tới chúng có thể tự bắt cặp từ đầu mút 5' và 3' trông giống “cán chèo”. Hậu quả mặc dù các phân tử genome là mạch thẳng nhưng chúng tạo cấu trúc dạng “vòng giả”. Tám nucleotides ở đầu mút 5' và 3' của trình tự bổ sung này bảo thủ ở cả 3 phân tử. Đây là một đặc điểm giống nhau của các virus có bộ gen RNA sợi đơn, phân đoạn, cùng được lắp ráp trong 1 virion như tenuivirus.



Hình 2-19 Sơ đồ quá trình tái sinh của TSWV

Triệu chứng

TSWV gây ra nhiều triệu chứng khác nhau. Các triệu chứng này thay đổi theo giống cây ký chủ, trạng thái sinh lý cây ký chủ (tuổi, điều kiện dinh dưỡng và môi trường). Các chủng virus không khác nhau nhiều về đặc tính gây bệnh mà chủ yếu khác nhau về đặc trưng phân tử và huyết thanh học. Nhìn chung, triệu chứng ít có giá trị chẩn đoán bệnh do TSWV và các tospovirus khác gây ra.

Trên cà chua. Các triệu chứng chính là: các đốm hoặc sọc chết hoại trên lá, cuống lá, thân, đỉnh sinh trưởng; lá nhăn, hóa màu nâu đồng thau; cây nhỏ và còi cọc. Trên quả, hàm lượng carotene và sắc tố giảm; quả chín có các đốm màu vàng hoặc đỏ nhạt (đốm ma). Đôi khi, triệu chứng chỉ thấy trên quả (Hình 14-3).

Trên ớt (ngot). Triệu chứng chủ yếu là cây còi cọc và biến vàng. Lá có thể có đốm chết hoại, đốm vòng, hoặc khảm. Trên thân có các sọc chết hoại kéo tới chồi đỉnh. Trên quả chín có các đốm vòng đồng tâm hoặc các sọc chết hoại.



Hình 2-20 Một số bệnh do TSWV gây ra trên cà chua, thuốc lá và lạc
Lan truyền

TSWV lan truyền ngoài tự nhiên bằng nhiều loài bọ trĩ thuộc 2 chi *Frankliniella* và *Thrips* (họ *Thripidae*, bộ *Thysanoptera*) theo kiểu bền vững tái sinh. Tám loài bọ trĩ được biết là vector của TSWV bao gồm *Frankliniella occidentalis*, *F. fusca* (bọ trĩ thuốc lá), *F. intonsa* (bọ trĩ hoa), *F. schultzei* (bọ trĩ bông), *F. bispinosa*, *Thrips palmi* (bọ trĩ dưa), *Thrips tabaci* (bọ trĩ hành) và *T. setosus*. Trong số các loài này, *F. occidentalis* có thể được coi là vector quan trọng nhất. Từ năm 1980, sự phát tán nhanh chóng của loài bọ trĩ này khắp thế giới đã tạo điều kiện để virus phân bố rộng hơn. TSWV truyền bằng bọ trĩ theo kiểu bền vững tái sinh khá đặc biệt. Chỉ bọ trĩ non tuổi 1 và tuổi 2 mới có thể chích nạp virus và chỉ giai đoạn tuổi 2 và trưởng thành mới có khả năng truyền virus. Đối với *F. occidentalis*, thời gian chích nạp và chích truyền khoảng 60 phút và thời gian ủ trung bình 3 – 7 ngày. Virus duy trì khả năng lây nhiễm cả đời nhưng chưa có bằng chứng cho thấy virus truyền qua trứng.

Cả 2 loại protein bề mặt là Gn và Gc đều cần cho sự lan truyền của virus qua vector, trong đó Gc giúp virus bám vào thành ruột trong quá trình chích nạp.

TSWV không truyền qua hạt giống.

Phòng chống

Biện pháp phòng chống TSWV hiện nay là kết hợp 3 biện pháp:

Phòng chống vector bọ trĩ. Tuy nhiên vì bọ trĩ hiện đã kháng hầu hết các loại thuốc trừ sâu đã sử dụng nên việc phòng chống vector bọ trĩ cực kỳ khó.

Phòng chống cỏ dại. Do TSWV có phổ ký chủ cực kỳ lớn nên cỏ dại cũng là nguồn bệnh rất quan trọng.

Sử dụng giống kháng. Hiện nay, chỉ có một số ít gen kháng TSWV đã được xác định, ví dụ gen SW5. Ngoài ra, dùng giống kháng mang gen kháng từ virus như vùng mã hóa và không mã hóa của gen N và NSm cũng đang được thử nghiệm.

3. THỰC HÀNH

BÀI 1. ĐIỀU TRA ĐỒNG RUỘNG BỆNH VIRUS

Nội dung

Điều tra đồng ruộng

Phân biệt các triệu chứng bệnh virus trên đồng ruộng

Xác định mức độ nhiễm bệnh (theo triệu chứng)

Thời gian/địa điểm: ?

Thu thập mẫu

Các mẫu lá và quả được thu thập theo triệu chứng. Chú ý: đơn vị mẫu là cây. Mẫu thu thập được bảo quản trong hộp âm, túi âm để đảm bảo mẫu vẫn còn tươi khi mang đến phòng thí nghiệm. Mẫu cây nhỏ sẽ được trồng lại trong cốc/chậu nhựa.

Xử lý mẫu

Mẫu sau khi thu thập được bảo quản tươi trong ngăn mát tủ lạnh (tối đa 3 ngày).

Mẫu cũng được xử lý khô bằng silicagel/CaCl₂ để bảo quản lâu dài (**Qui trình thu thập và bảo quản mẫu virus**)

Vật liệu

Silicagel tự chỉ thị, giấy thấm, lọ có nắp hoặc ống falcon loại 50 mL.

Túi giấy/nilon đựng mẫu

Yêu cầu cụ thể đối với NGƯỜI THAM GIA

Về điều tra bệnh:

Tên bệnh, tên cây ký chủ (giống nếu có), giai đoạn sinh trưởng, địa điểm, ngày điều tra, thu mẫu.

Tỷ lệ bệnh (%), cần kèm dung lượng mẫu

Mô tả triệu chứng điển hình (kèm ảnh minh họa)

Nhận xét chung về tình hình bệnh

Tham khảo 2-3 tài liệu để mô tả khoảng 1/2 trang về virus gây bệnh (hình thái, phân loại, đặc điểm bộ gen, bệnh gây ra trên cây, quan hệ vector).

Về thu thập mẫu bệnh:

Lập bảng ghi tên mẫu bệnh thu thập gồm cây, tên bệnh và tên virus (dự đoán). Đối chiếu với hướng dẫn

BÀI 2. PHÁT HIỆN BEGOMOVIRUS BẰNG PCR

Nội dung

Chiết DNA tổng số từ mẫu cây (**Qui trình chiết DNA từ thực vật**)

Thực hiện phản ứng PCR (**Qui trình thực hiện phản ứng PCR**)

Kiểm tra kết quả phản ứng bằng điện di agarose (**Qui trình điện di agarose**)

BÀI 3. PHÁT HIỆN CÁC TOBAMOVIRUS, POTEXVIRUS VÀ TOSPOVIRUS BẰNG RT-PCR

Nội dung

Chiết RNA tổng số từ mẫu cây cà chua (**Qui trình chiết RNA từ mô thực vật**)

Chiết RNA tổng số từ mẫu hạt cà chua (**Qui trình chiết RNA từ hạt cây họ cà**)

Thực hiện phản ứng RT-PCR (**Qui trình phản ứng RT-PCR 1 bước, 2 bước**)

Kiểm tra kết quả phản ứng bằng điện di agarose (**Quy trình điện di agarose**)





Dự án Hỗ trợ kỹ thuật cho Chương trình ARISE+ tại Việt Nam



Phòng 03B, Tầng 7, Horizon Tower, 40, phố Cát Linh, Q. Đống Đa, Hà Nội



0243. 202. 8082



ariseplusvietnam@dai.com



ariseplusvietnam.com

ARISE+ Việt Nam là dự án Hỗ trợ kỹ thuật do Liên minh châu Âu (EU) tài trợ, góp phần thúc đẩy kinh tế Việt Nam hội nhập sâu rộng vào chuỗi sản xuất toàn cầu thông qua các hỗ trợ có mục tiêu cho cả hai khu vực công – tư. Mục tiêu của dự án nhằm hỗ trợ Chính phủ Việt Nam tận dụng những lợi ích từ các cam kết thương mại song phương và khu vực, với trọng tâm thúc đẩy thực thi hiệu quả Hiệp định Thương mại tự do giữa EU và Việt Nam (EVFTA).

Dự án thuộc cấu phần Việt Nam trong khuôn khổ Chương trình ARISE+ do Liên minh châu Âu tài trợ nhằm thúc đẩy hội nhập kinh tế khu vực ASEAN. Tại Việt Nam, dự án được thực hiện bởi công ty DAI Global Austria, liên danh với Hiệp hội doanh nghiệp Châu Âu tại Việt Nam (EuroCham), Liên đoàn Thương mại và Công nghiệp Việt Nam (VCCI) và GOPA, dưới sự giám sát của Phái đoàn Liên minh châu Âu tại Việt Nam. Đối tác chính của dự án bao gồm Bộ Công Thương, Bộ Khoa học & Công nghệ và Bộ Nông nghiệp & Phát triển Nông thôn.