

Xác định một số đặc điểm di truyền học của Tomato Spotted Wilt Vi-rút gây bệnh trên hoa cúc tại tỉnh Lâm Đồng

Nguyễn Thanh Việt*, Trần Kiên Cường, Thân Văn Thái

Viện Kỹ thuật Công nghệ cao Nguyễn Tất Thành, Đại học Nguyễn Tất Thành

* ntviet@ntt.edu.vn

Tóm tắt

Tomato Spotted Wilt Vi-rút (TSWV) là tác nhân gây bệnh truyền nhiễm nghiêm trọng trên nhiều loại cây trồng và gây thiệt hại kinh tế nghiêm trọng cho ngành nông nghiệp tại nước ta nói riêng và trên thế giới nói chung. Trong nghiên cứu này, các mẫu bệnh từ cây hoa cúc được thu thập tại tỉnh Lâm Đồng để xác định tác nhân TSWV. Phương pháp RT-PCR được sử dụng để khuếch đại đoạn gen N đặc trưng của TSWV. Kết quả RT-PCR khuếch đại đặc hiệu gen N của TSWV với kích thước 777 bp. Phân tích trình tự nucleotide và cây phát sinh loài của đoạn gen N cho thấy chủng TSWV trong nghiên cứu này chia sẻ mức độ tương đồng cao (96,5%-99,6%) với các chủng TSWV đã được phân lập tại nhiều quốc gia như Ấn Độ, Venezuela, Zimbabwe, New Zealand, Nhật Bản, Hàn Quốc. Kết quả trên cũng dự đoán TSWV lưu hành tại nước ta có thể bắt nguồn từ các quốc gia báo cáo bệnh trước đó. Kết quả nghiên cứu này giúp đánh giá đặc điểm sinh học, di truyền học nhằm hỗ trợ công tác kiểm soát và dự đoán xu hướng lưu hành của TSWV trên cây hoa cúc ở Việt Nam.

Nhận 25.09.2020

Được duyệt 30.09.2020

Công bố 30.10.2020

Từ khóa

Hoa cúc, TSWV,

N gen, RT-PCR

© 2020 Journal of Science and Technology - NTTU

1 Giới thiệu

Cây hoa cúc (*Chrysanthemum sp.*) thuộc họ *Asteraceae*, là một loài cây trồng có giá trị thương mại cao được sử dụng để trang trí sân vườn và trong nhà, được trồng phổ biến trên thế giới. *Tomato spotted wilt vi-rút* (TSWV) thuộc chi *Tospovirus* thuộc họ *Bunyaviridae* là một loại vi-rút gây bệnh nghiêm trọng trên thực vật và gây ra thiệt hại kinh tế cho ngành sản xuất nông nghiệp [1-3]. TSWV có phạm vi kí chủ rộng, nó gây hại hơn 1.000 loài thực vật trong hơn 90 họ thực vật bao gồm cây hoa cúc (*Chrysanthemum sp.*) dẫn đến thiệt hại kinh tế đáng kể, hàng năm ước tính lên đến 1 tỉ đô la Mỹ cho các loại cây trồng quan trọng đối với nền nông nghiệp trên toàn thế giới [4, 5].

Genome của TSWV dạng RNA mạch đơn bao gồm 3 phân đoạn chính bao gồm đoạn Large (L), Medium (M) và Small (S). Đoạn gen L có kích thước 8997 nucleotide (nt) chiều âm và mã hóa cho RNA polymerase phụ thuộc RNA vi-rút (RdRp) hoặc protein L. Đoạn gen M có kích thước 4821 nt có tính phân cực, mã hóa cho protein NSm di chuyển từ tế bào đến tế bào, và sợi RNA bổ sung vi-rút (vcRNA) mã hoá cho tiền chất glycoprotein được cắt sau dịch mã trở thành gai hoặc glycoprotein G1 và G2. Đoạn gen S có kích thước 2916 nt mã hóa cho một protein phi cấu trúc (NSs) trong chuỗi vi-rút (v-senes) và mã hóa cho nucleoprotein (N) ở mạch bổ

sung (vc-senes). Nucleocapsid (N) của TSWV là protein cấu trúc chính đóng vai trò quan trọng trong việc lắp ráp RNA bộ gen thành ribonucleoprotein (RNP), đóng vai trò như một khuôn mẫu cho cả phiên mã gen của vi-rút và sao chép genome. Trình tự gen nucleocapsid (N) đặc hiệu với vector bộ trĩ và phạm vi kí chủ cho phép nhận dạng, phân loại *Tospovirus* ở mức độ loài [6]. Virus TSWV có dạng hình bán cầu, đường kính 80-120 nm và được bao bọc bởi màng kép [7]. Hiện tại, vi-rút này có ít nhất 9 loại bộ trĩ có vai trò là vector trung gian truyền bệnh với *Frankliniella occidentalis* là vector chính [8].

TSWV được phát hiện và mô tả lần đầu tiên ở Úc vào năm 1915, kể từ đó TSWV đã được báo cáo tại hơn 60 quốc gia trên toàn thế giới [9]. Gần đây, TSWV đã được báo cáo là tác nhân quan trọng gây hại trên cây hoa cúc ở nhiều quốc gia trên thế giới bao gồm Serbia [10], Ấn Độ [11], Venezuela [12], Ecuador [13], Bosnia và Herzegovina [14]. Cây hoa cúc nhiễm bệnh có triệu chứng bệnh đặc trưng chính bao gồm lá ngọn nhỏ lại, méo mó, lốm đốm vàng. Phần thân cây bị bệnh có các vết màu nâu đen; lúc mới xuất hiện chỉ là các sọc màu đen, khi bị nặng thâm đen cả đoạn thân cây, khô và thối biểu bì. Ở Việt Nam, từ giữa tháng 04/2017, cây hoa cúc trồng tại Đà Lạt có biểu hiện triệu chứng liên quan đến bệnh do TSWV gây ra làm thiệt hại kinh tế cho người dân cũng như ảnh hưởng tới nguồn cung cấp nguyên

liệu và giống cho nhu cầu trong nước và xuất khẩu. Năm 2019, thống kê của Trung tâm Nông nghiệp, thành phố Đà Lạt có 520 ha nhiễm bệnh do TSWV gây ra trên cây hoa cúc (chiếm 24,7% diện tích canh tác). Trong những năm trở lại đây, do nhu cầu của thị trường tăng nên diện tích trồng hoa của Đà Lạt cũng tăng lên đáng kể trong đó diện tích trồng hoa cúc hàng năm khoảng 2.100 ha chiếm gần 70% diện tích hoa cúc của tỉnh Lâm Đồng. Cây hoa cúc là hoa có giá trị kinh tế cao, nên nông dân trồng hoa không cho thời gian nghỉ đất, không có thời gian luân canh giữa các loại cây trồng khác họ. Đây là yếu tố thuận lợi cho bệnh do TSWV gây ra, làm tổn thất nghiêm trọng việc hoa cúc.

Nghiên cứu này, chúng tôi xác định đặc điểm di truyền học của một số chủng TSWV trong mẫu bệnh trên cây hoa cúc thu thập được tại các vườn chuyên canh hoa có báo cáo lưu hành bệnh thuộc khu vực tỉnh Lâm Đồng.

Kết quả được sử dụng để xác định mối tương quan về mặt di truyền học của chủng TSWV đang lưu hành tại Việt Nam so với các chủng gây bệnh ở hoa cúc trên thế giới, từ đó xác định được mức độ tác động của TSWV cũng như đưa ra những gợi ý trong canh tác cây hoa cúc tại nước ta.

2 Vật liệu và phương pháp

2.1 Vật liệu nghiên cứu

Mẫu được sử dụng trong nghiên cứu này đã được thu thập từ tháng 12/2019-01/2020, tại vườn chuyên canh hoa cúc ở Đà Lạt, tỉnh Lâm Đồng. Mẫu bệnh phẩm là lá cây hoa cúc với triệu chứng đặc trưng của bệnh héo đóm do vi-rút gây ra như: lá ngọn có triệu chứng nhỏ lại, méo mó, lốm đốm vàng. Phần thân cây bị bệnh có các vết màu nâu đen, lúc mới xuất hiện chỉ là các sọc màu đen khi bị nặng thâm đen cả đoạn thân cây, khô và thối biểu bì (Hình 1). Lá được rửa sạch với nước cất và sát trùng bề mặt ngoài bằng cồn 70⁰ và bảo quản trong -20⁰C đến khi được sử dụng để tách chiết RNA.



Hình 1 Mẫu lá cây hoa cúc với bệnh tích đặc trưng của bệnh héo đóm do vi-rút

2.2 Tách chiết RNA

RNA của TSWV được tách chiết bằng thuốc thử Trizol (Invitrogen, California, Mỹ) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Quy trình được tóm tắt như sau: 100 mg mẫu lá bệnh ú trong ni-tơ lỏng trước khi nghiền nhỏ bằng cối chày. Tiếp theo, mẫu được li giải bằng cách bổ sung 1 mL thuốc thử

Trizol, li tâm 5 phút với tốc độ 12.000 vòng/phút thu phần nổi ở trên chuyển sang ống mới. Bổ sung 0,2 mL chloroform (ủ 2-3 phút) li tâm 15 phút với tốc độ 12.000 vòng/phút thu phần nước chứa RNA ở trên chuyển sang ống mới. Thêm 0,5 mL isopropanol (ủ trong 10 phút) li tâm 10 phút với tốc độ 12.000 vòng/phút, loại bỏ phần nổi ở trên giữ lại RNA ở dưới trong 1 mL ethanol 70%. Sau đó, li tâm 5 phút với tốc độ 7.500 vòng/phút loại bỏ phần ở trên và để khô (5-10 phút). Cuối cùng RNA giữ lại trong 20 µl nước không có RNase, 0,1 mM EDTA hoặc dung dịch SDS 0,5%. RNA được bảo quản ở -20⁰C đến khi được sử dụng cho phản ứng RT-PCR.

2.3 Phản ứng tổng hợp chuỗi polymerase sao chép ngược (RT-PCR)

Tổng hợp cDNA được sử dụng bằng cách sử dụng bộ AMV Reverse Transcriptase (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, Mỹ). Quy trình được tóm tắt như sau: lấy 10 µl RNA tinh sạch, 1 µl dNTPs (10 mM), 2 µl mỗi ngược, 2 µl 10X AMV Buffer, 1 µl dNTPs (10 mM), 0,2 µl RNase Inhibitor (40 U/µl) và bổ sung nước cất khử ion đến đủ 20 µl. Hỗn hợp thu được sẽ được ủ ở 42⁰C trong 60 phút, sau đó là bước kết thúc với 5 phút ủ ở 70⁰C. Kết quả thu được cDNA và tiến hành phản ứng PCR.

Phản ứng PCR được thực hiện với thành phần và điều kiện như sau: 3 µl cDNA, 1 µl mỗi loại cho mỗi sense (TSWVN-F: 5'-ATGTGCGAAGCGACCAGCAGATATCAT-3'), và anti-sense (TSWVN-R: 5'-TTAATTGCTGACCGAATCGTAGAAG-3'), 10 µl 10X MyTaq™ Mix (Bioline, Edge Business Centre, Humber Rd, London NW2 6EW, Vương quốc Anh) và bổ sung nước cất khử ion đến đủ 20 µl. Chu trình nhiệt của phản ứng PCR như sau: 95⁰C trong 2 phút; 35 chu kì ở 95⁰C trong 15 giây, 53⁰C trong 30 giây và 72⁰C trong 15 giây; kéo dài chuỗi ở 72⁰C trong 10 phút. Sản phẩm PCR được kiểm tra trên gel agarose 1,2%.

2.4 Giải trình tự gen, phân tích trình tự gen và xây dựng cây phả hệ

Giải trình tự gen: Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng bộ kit QIAquick PCR Purification (QIAGEN, Bodenseelallee 20, 78333 Stockach, Germany) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Sản phẩm PCR tinh sạch được sử dụng để giải trình tự theo phương pháp Sanger sequencing với cặp mỗi đặc hiệu (FirstBase, 7-3, Jalan SP 2/7, Taman Serdang Perdana, 43300 Seri Kembangan, Selangor, Malaysia).

Phân tích trình tự gen: Kết quả giải trình tự gen được phân tích bằng phần mềm DNASTAR Lasergene (DNASTAR®). Trình tự nucleotide (nt) và amino acid (aa) của các chủng TSWV và các chủng tham chiếu được phân tích, so sánh bằng phần mềm BioEdit 6.0 [15].

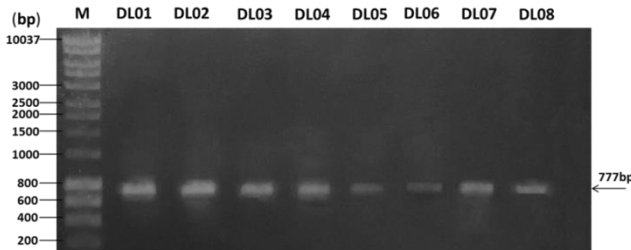
Xây dựng và phân tích cây phả hệ: Trình tự di truyền gen SLCMV của nghiên cứu này được so sánh với các chủng TSWV tham chiếu. Trình tự gen được sắp xếp sử dụng chương trình CLUSTAL X alignment [16]. Cây phả hệ

được xây dựng dựa vào phần mềm MEGA 7.0 với tham số Kimura-2 parameter mô phỏng sự thay đổi nt và Bootstrap re-sampling 1.000 lần [17].

3 Kết quả và thảo luận

3.1 Phát hiện TSWV trong mẫu cây hoa cúc bệnh bằng phản ứng RT-PCR

TSWV trong mẫu bệnh phẩm thu thập tại tỉnh là Lâm Đồng được phát hiện bằng phản ứng RT-PCR với cặp mồi đặc hiệu trên gen N. Sản phẩm RT-PCR (kích thước 777 bp) quan sát trên gel agarose 1,2% cho kết quả dương tính với TSWV (Hình 2). Kết quả PCR khuếch đại đặc hiệu với gen N của TSWV trong các mẫu bệnh phẩm cho thấy các triệu chứng xuất hiện trên cây nhiễm bệnh là đặc trưng và vi-rút có khả năng tồn tại và phát tán nhanh từ vùng nhiễm bệnh sang các vùng lân cận nhờ trung gian truyền bệnh bộ phận trắng và các hoạt động giao thương như buôn bán nguyên liệu, giống.



Hình 2 RT-PCR chẩn đoán phát hiện chủng TSWV trong mẫu hoa cúc nhiễm bệnh.

Mẫu thí nghiệm, lần số thứ tự 1-8; M, DNA marker

3.2 Phân tích và so sánh trình tự gen N

Trình tự hoàn chỉnh gen N của 3 chủng TSWV thu được trong nghiên cứu được xác định và sử dụng để phân tích đối chiếu với 19 chủng tham chiếu tại cơ sở dữ liệu GenBank có vùng địa lí và vật chủ khác nhau trên thế giới (Bảng 1). Kết quả so sánh trình tự nucleotide gen N cho thấy các chủng phân lập từ cây hoa cúc trong nghiên cứu chia sẻ mức độ tương đồng với Ấn Độ (mã số: KJ494928), Venezuela (mã số: KF146700), Zimbabwe (mã số: KX192330), New Zealand (mã số: KC494495, KC494501, KC494501), Nhật Bản (mã số: AB038341), Hàn Quốc (mã số: KC261967, KC261967, KC261952, EF195225), Thổ Nhĩ Kỳ (mã số: KM379142), Italia (mã số: KM096540), Bulgaria (mã số: AJ418779), Montenegro (mã số: GU339508, GU355939), Brazil (mã số: GU369727, DQ915947), Mĩ (mã số: FJ882069, AF064473) với trình tự nucleotide (96,5% - 99,6%) và amino acid (97,2% - 99,6%). Trong đó, chủng nghiên cứu chia sẻ mức tương đồng cao nhất (99,6%) với chủng TSWV phân lập tại Ấn Độ (mã số: KJ494928) [11]. Các chủng TSWV phân lập có mức độ tương đồng về nucleotide và amino acid cao. Các điểm tương đồng cho thấy sự khác biệt nhỏ về mặt tiến hóa giữa các chủng phân lập với các chủng tham chiếu. Tuy nhiên, sự khác biệt nhỏ giữa các chủng là bằng chứng về một số đột biến có thể đã và đang diễn ra.

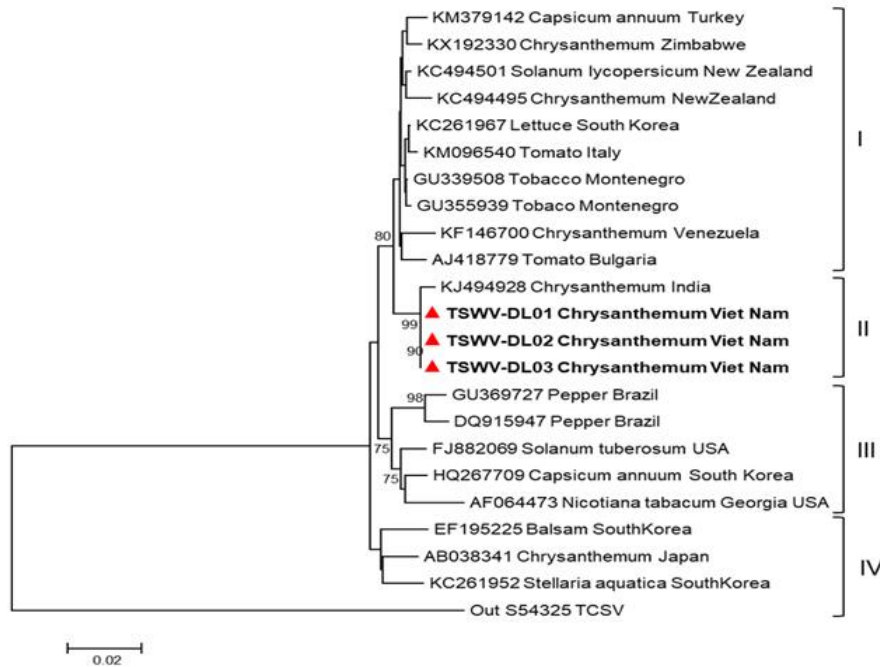
Bảng 1 Mức độ tương đồng về nucleotide/amino acid của đoạn gen N của chủng TSWV nghiên cứu với các chủng tham chiếu trên Genbank NCBI

Tên chủng	Mức độ tương đồng nucleotide (amino acid) (%)		
TSWV-DL01 Chrysanthemum Viet Nam	100 (100)	100 (100)	100(100)
TSWV-DL02 Chrysanthemum Viet Nam	100 (100)	100 (100)	100 (100)
TSWV-DL03 Chrysanthemum Viet Nam	100 (100)	100 (100)	100 (100)
KJ494928 Chrysanthemum India	99,6 (99,6)	99,6 (99,6)	99,6 (99,6)
KF146700 Chrysanthemum Venezuela	98,1 (99,2)	98,1 (99,2)	98,1 (99,2)
KX192330 Chrysanthemum Zimbabwe	98,5 (98,8)	98,5 (98,8)	98,5 (98,8)
KC494495 Chrysanthemum New Zealand	98,1 (98,8)	98,1 (98,8)	98,1 (98,8)
AB038341 Chrysanthemum Japan	97,2 (98,4)	97,2 (98,4)	97,2 (98,4)
KC494501 Solanum lycopersicum New Zealand	9,87 (98,8)	9,87 (98,8)	9,87 (98,8)
KC261967 Lettuce South Korea	98,9 (99,2)	98,9 (99,2)	98,9 (99,2)
HQ267709 Capsicum annuum South Korea	97,6 (99,2)	97,6 (99,2)	97,6 (99,2)
KC261952 Stellaria aquatic South Korea	97,2 (98,8)	97,2 (98,8)	97,2 (98,8)
EF195225 Balsam South Korea	96,9 (98,4)	96,9 (98,4)	96,9 (98,4)
KM379142 Capsicum annuum Turkey	98,1 (98,8)	98,1 (98,8)	98,1 (98,8)
KM096540 Tomato Italy	98,7 (98,8)	98,7 (98,8)	98,7 (98,8)
AJ418779 Tomato Bulgaria	98,4 (98,4)	98,4 (98,4)	98,4 (98,4)
GU339508 Tobacco Montenegro	98,8 (99,2)	98,8 (99,2)	98,8 (99,2)
GU355939 Tobacco Montenegro	98,7 (99,2)	98,7 (99,2)	98,7 (99,2)
GU369727 Pepper Brazil	97 (98,8)	97 (98,8)	97 (98,8)
DQ915947 Pepper Brazil	96,9 (98,4)	96,9 (98,4)	96,9 (98,4)
FJ882069 Solanum tuberosum USA	97,6 (97,6)	97,6 (97,6)	97,6 (97,6)
AF064473 Nicotiana tabacum Georgia USA	96,5 (97,2)	96,5 (97,2)	96,5 (97,2)

3.3 Phân tích cây phả hệ

Cây phả hệ cho gen N được xây dựng để phân tích mối quan hệ của trình tự gen N của các chủng nghiên cứu với các chủng tham chiếu thu thập trên dữ liệu Genbank-NCBI. Phân tích cây phả hệ cho thấy các chủng trong nghiên cứu thuộc chủng TSWV và gần gũi với các chủng TSWV phân lập từ các vật chủ và vùng địa lí khác nhau từ các quốc gia như Ấn Độ, Venezuela, Bulgaria và một số quốc gia châu Âu, châu Á và châu Mĩ (Hình 3). Nhóm I có các chủng phân lập từ Thổ Nhĩ Kỳ, Zimbabwe, New Zealand, Hàn Quốc, Italia, Montenegro, Venezuela. Các chủng phân lập từ hoa cúc tại Việt Nam thuộc nhóm II với chủng phân lập

từ Ấn Độ. Nhóm III có các chủng phân lập từ Brazil, Mĩ, Hàn Quốc. Nhóm IV có các chủng phân lập từ Hàn Quốc và Nhật Bản. Các chủng TSWV phân lập từ hoa cúc tại Việt Nam có mối quan hệ gần gũi với các chủng TSWV phân lập từ hoa cúc Ấn Độ, Venezuela, New Zealand, Zimbabwe, Nhật Bản nhưng lại thuộc các nhóm khác nhau. Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu về sự di truyền quần thể của bộ gen TSWV [1]. Điều này cho thấy có thể là do phạm vi kí chủ của TSWV ngày càng mở rộng và do việc thương mại hóa toàn cầu đối với việc sản xuất cây trồng có giá trị kinh tế cao khiến cho các chủng TSWV lan rộng trên toàn thế giới.



Hình 3 Cây phả hệ phân tích mối tương quan giữa gen (N) của các chủng TSWV nghiên cứu (in đậm) với các chủng TSWV tham chiếu trong GenBank

4 Kết luận và kiến nghị

Nghiên cứu này xác định được yếu tố gây bệnh trên cây hoa cúc tại tỉnh Lâm Đồng là TSWV sử dụng phương pháp RT-PCR đặc hiệu của gen N. Kết quả này tương tự như các kết quả được báo cáo trước đó về TSWV tại các quốc gia như Ấn Độ, Venezuela, Zimbabwe, New Zealand, Nhật Bản, Hàn Quốc. Phân tích đặc điểm di truyền gen N cho thấy mức độ tương đồng cao về trình tự nucleotide của các chủng TSWV trong nghiên cứu này với các chủng TSWV được phân lập tại nhiều quốc gia khác nhau trên thế giới, đặc biệt chia sẻ mức độ tương đồng cao nhất với chủng TSWV phân lập tại Ấn Độ (mã số: KJ494928). TSWV gây

bệnh trên cây hoa cúc tác động rất tiêu cực đến nguồn cung cấp nguyên liệu cũng như ảnh hưởng đến sinh kế của các hộ canh tác loại cây này. Do đó cần phải tiếp tục thực hiện các biện pháp nhằm ngăn chặn sự lây lan của TSWV sang các khu vực chưa nhiễm bệnh bằng nhiều biện pháp khác nhau như chia sẻ kiến thức, cập nhật thông tin, thử nghiệm và sử dụng những giống hoa cúc có khả năng kháng với TSWV.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu được tài trợ bởi Quỹ Phát triển Khoa học và Công nghệ - Đại học Nguyễn Tất Thành, đề tài mã số 2020.01.046/HĐ-KHCN.

Tài liệu tham khảo

1. Tsompana M., Abad J., Purugganan M. & Moyer J. *The molecular population genetics of the Tomato spotted wilt virus (TSWV) genome*. *Molecular Ecology*. 14, 53-66 (2005).
2. Pappu H., Jones R. & Jain R. *Global status of tospovirus epidemics in diverse cropping systems: successes achieved and challenges ahead*. *Virus research*. 141, 219-236 (2009).
3. Scholthof K. B. G., Adkins S., Czosnek H., Palukaitis P., Jacquot E., Hohn T., Hohn B., Saunders K., Candresse T. & Ahlquist P. *Top 10 plant viruses in molecular plant pathology*. *Molecular plant pathology*. 12, 938-954 (2011).
4. Goldbach R. & Peters D. *Possible causes of the emergence of tospovirus diseases*. *Seminars in Virology*. 5, 113-120 (1994).
5. Parrella G., Gognalons P., Gebre-Selassie K., Vovlas C. & Marchoux G. *An update of the host range of Tomato spotted wilt virus*. *Journal of Plant Pathology*. 227-264 (2003).
6. Li J., Feng Z., Wu J., Huang Y., Lu G., Zhu M., Wang B., Mao X. & Tao X. *Structure and function analysis of nucleocapsid protein of tomato spotted wilt virus interacting with RNA using homology modeling*. *Journal of Biological Chemistry*. 290, 3950-3961 (2015).
7. German T. L., Ullman D. E. & Moyer J. W. *Tospoviruses: diagnosis, molecular biology, phylogeny, and vector relationships*. *Annual review of phytopathology*. 30, 315-348 (1992).
8. Rotenberg D., Jacobson A. L., Schneweis D. J. & Whitfield A. E. *Thrips transmission of tospoviruses*. *Current opinion in virology*. 15, 80-89 (2015).
9. Brittlebank C. *Tomato diseases*. *Journal of the Department of Agriculture in Victoria*. 17, 1348-1352 (1919).
10. Stanković I., Bulajić A., Vučurović A., Ristić D., Milojević K., Nikolić D. & Krstić B. *First Report of Tomato spotted wilt virus on Chrysanthemum in Serbia*. *Plant disease*. 97, 150-150 (2013).
11. Renukadevi P., Nagendran K., Nakkeeran S., Karthikeyan G., Jawaharlal M., Alice D., Malathi V. & Pappu H. *First report of Tomato spotted wilt virus infection of chrysanthemum in India*. *Plant Disease*. 99, 1190-1190 (2015).
12. Marys E., Mejías A., Rodríguez-Román E., Avilán D., Hurtado T., Fernández A., Zambrano K., Garrido M. & Brito M. *The first report of Tomato spotted wilt virus on Gerbera and Chrysanthemum in Venezuela*. *Plant disease*. 98, 1161-1161 (2014).
13. Sivaprasad Y., Garrido P., Mendez K., Pachacama S., Garrido A. & Ramos L. *First report of tomato spotted wilt virus infecting Chrysanthemum in Ecuador*. *Journal of Plant Pathology*. 100, 113-113 (2018).
14. Kohnić A., Radulović M. & Delić D. *First report of tomato spotted wilt virus on chrysanthemum in Bosnia and Herzegovina*. *Journal of Plant Pathology*. 101, 421-421 (2019).
15. Hall T. A. *BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT*. *Nucleic acids symposium series*. 41, 95-98 (1999).
16. Thompson J. D., Gibson T. J., Plewniak F., Jeanmougin F. & Higgins D. G. *The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools*. *Nucleic acids research*. 25, 4876-4882 (1997).
17. Kumar S., Stecher G. & Tamura K. *MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets*. *Molecular biology and evolution*. 33, 1870-1874 (2016).

Detection and genetic characterization of Tomato Spotted Wilt Virus (TSWV) infecting chrysanthemum in Lam Dong province

Thanh Viet Nguyen*, Kien Cuong Nguyen, Van Thai Than
 Viện Kỹ thuật Công nghệ cao NTT, Đại học Nguyễn Tất Thành
 *ntviet@ntt.edu.vn

Abstract Tomato Spotted Wilt Virus (TSWV) is an important infectious disease that infects many crops and causes serious economic loss for the agriculture all around the world. In this study, TSWV-suspected chrysanthemum samples were collected from Lam Dong province, Vietnam. RT-PCR was used, successfully amplifying a specific 777 bp N gene segment of the TSWV. Genetic characterization of the N gene revealed that the studied TSWV strains shared highest nucleotide sequence identity (96.5%-99.6%) with the strains isolated from India, Venezuela, Zimbabwe, New Zealand, Japan and Korea, suggesting that these strains shared common ancestor and for that the Vietnamese TSWV may be infected from TSWV strains isolated in one of those countries. These results provided important information on the biological and molecular characterization of the circulating TSWV in Vietnam, as well as the evidence for control and predict the circulation of TSWV in chrysanthemum in future.

Keywords Chrysanthemum, TSWV, N gene, RT-PCR

