

## PHÂN LẬP VI RÚT SENPV TỪ SÂU XANH DA LÁNG (*Spodoptera exigua* HÜBER) TẠI ĐỒNG BẰNG SÔNG CỬU LONG

Trịnh Thị Xuân<sup>1</sup>, Trương Thanh Xuân Liên<sup>2</sup>, Dương Thị Thu Nhi<sup>3</sup> và Trần Văn Hai<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Khoa Nông nghiệp và Sinh học Ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ

<sup>2</sup>Chi cục Bảo vệ thực vật An Giang

<sup>3</sup>Phòng Nông nghiệp huyện Châu Phú

### Thông tin chung:

Ngày nhận: 05/08/2016

Ngày chấp nhận: 26/10/2016

### Title:

Isolation of Nucleopolyhedrovirus (NPV) from the Beet armyworm (*Spodoptera exigua* Hüber) in the Mekong Delta

### Từ khóa:

Baculoviridae, nucleopolyhedrovirus, PCR, sâu xanh da láng

### Keywords:

Baculoviridae, nucleopolyhedrovirus, PCR, *Spodoptera exigua*

### ABSTRACT

The experiment was aimed to identify species of the entomopathogenic virus by using a traditional method (observing symptoms and describing characteristics) and the molecular method based on PCR amplification with specific primers PSF002 and PER001 for nucleopolyhedrovirus (NPV). There were 29 samples from the diseased larva of the beet armyworm, *Spodoptera exigua* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) collected in the Mekong Delta. The results from observation and description of the symptoms, as well as the extraction of DNA and PCR amplification with specific primers PER001 and PSF002 indicated that 20 samples had unique fragments approximated 550 bp which was identified nucleopolyhedrovirus belonged to Baculoviridae family. They include seven strains collected in Vinh Long province, five strains in Dong Thap province, three strains in An Giang province and five strains collected in Can Tho city.

### TÓM TẮT

Thí nghiệm được thực hiện nhằm thu thập và định danh vi rút bằng phương pháp truyền thống dựa trên các triệu chứng và kết hợp với việc thực hiện phản ứng PCR với cặp mồi chuyên biệt PSF002 và PER001 để nhận biết vi rút nucleopolyhedrovirus (NPV). Kết quả đã thu thập được 29 mẫu từ xác của ấu trùng sâu xanh da láng *Spodoptera exigua* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) tại Đồng bằng sông Cửu Long. Qua quan sát hình dạng thể vùi, mô tả triệu chứng, kết hợp ly trích DNA và khuếch đại PCR với primer chuyên biệt PER001 và PSF002 cho kết quả có 20 chủng xuất hiện những băng màu có kích thước 550 bp và được xác định là nucleopolyhedrovirus (NPV) thuộc họ Baculoviridae. Trong đó, có bảy chủng vi rút thu thập tại tỉnh Vĩnh Long, năm chủng vi rút thu thập tại tỉnh Đồng Tháp, ba chủng vi rút thu thập tại tỉnh An Giang và năm chủng vi rút thu thập tại thành phố Cần Thơ.

Trích dẫn: Trịnh Thị Xuân, Trương Thanh Xuân Liên, Dương Thị Thu Nhi và Trần Văn Hai, 2016. Phân lập vi rút SENPV từ sâu xanh da láng (*Spodoptera exigua* Hüber) tại Đồng bằng sông Cửu Long. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. Số chuyên đề: Nông nghiệp (Tập 3): 233-240.

### 1 MỞ ĐẦU

Sâu xanh da láng, *Spodoptera exigua* được ghi nhận lần đầu tiên tại Hoa Kỳ năm 1876, sau đó lan

rộng ra khu vực trung và Nam Mỹ. Sâu xanh da láng có thể gây hại trên 200 loài cây trồng, thuộc 40 họ khác nhau đặc biệt là nhóm cây rau màu như cây hành, cây thuộc họ đậu, họ bầu bí, họ thập tự,

họ cà, cây bông vải, cây bắp, cây nho, ... Sâu xanh da láng hiện diện khắp nơi trên thế giới và gây hại phổ biến ở vùng khí hậu ôn đới và nhiệt đới như miền Nam Châu Á và Châu Phi, Nam và Trung Châu Âu, Châu Úc và Nam Châu Mỹ (Nguyễn Thị Thu Cúc, 1999; Nguyễn Văn Huỳnh và Lê Thị Sen, 2004). Tại các bang miền Nam Hoa Kỳ, sâu xanh da láng là dịch hại chính trên cây bông vải và xuất hiện hàng năm tại ở Alabama, Georgia, Mississippi và Texas. Tại Việt Nam, *Spodoptera exigua* xuất hiện từ Bắc đến Nam, tuy nhiên ở vùng nóng phía Nam thì sâu xuất hiện phổ biến và gây hại nghiêm trọng hơn các vùng khác (Lê Thị Sen, 1999).

Virus nhân đa diện Nucleopolyhedrovirus (NPV) gây bệnh côn trùng thuộc nhóm Baculovirus (họ Baculoviridae) đã được các nhà khoa học trên thế giới nghiên cứu và phát hiện hơn 1.000 loài côn trùng bị nhiễm bởi virus này, đây là một tác nhân, được công nhận là một tiềm năng cho việc quản lý côn trùng có hiệu quả nhất và quan trọng là do tính an toàn đối với môi trường và các sinh vật khác (Huter – Fujita *et al.*, 1998). Hiện nay, một số nước tiên tiến trên thế giới đã sử dụng virus NPV để phòng trừ các loại sâu hại cây trồng phổ biến như sâu xanh da láng *Spodoptera exigua*, sâu ăn tạp *Spodoptera litura*, sâu đo *Trichoplusia ni*, sâu xanh bông *Heliothis armigera*, sâu tơ *Plutella xylostella*, sâu cuốn lá trà *Adoxophyes orana*, sâu xếp lá trà *Honoma magnanima* (Kunimi, 2005; Kunimi, 2007; Hughes và Wood, 1981; Hughes *et al.*, 1986; Takatsuka *et al.*, 2005).

## 2 PHƯƠNG TIỆN VÀ PHƯƠNG PHÁP

**Thu thập và định danh vi rút NPV (Nucleopolyhedrovirus) gây bệnh trên sâu xanh da láng *Spodoptera exigua* gây hại tại Đồng bằng sông Cửu Long**

**Nguyên vật liệu và thiết bị:** hộp nhựa, kẹp inox, kính hiển vi tương phản pha, kính hiển vi điện tử, kính hiển vi soi nổi, lam đếm hồng cầu, micropipette, máy ly tâm lạnh siêu tốc, thức ăn nhân tạo dùng cho sâu xanh da láng.

### 2.1 Phương pháp thu mẫu

Tiến hành thu sâu xanh da láng trên các ruộng rau màu tại các địa điểm như An Giang, Vĩnh Long, thành phố Cần Thơ và Đồng Tháp, yêu cầu cho ruộng thu mẫu phải có diện tích từ 500 m<sup>2</sup> trở lên, mỗi ruộng sẽ thu mẫu ngẫu nhiên 5 điểm theo đường chéo góc, mỗi điểm cách nhau tối thiểu 6 m.

Đối với các ruộng trồng hành lá tiến hành thu sâu xanh da láng tại 5 điểm theo đường chéo góc (1 khung/điểm), mỗi khung có diện tích 50 x 50 cm<sup>2</sup>. Thu tất cả lá hành có sự hiện diện của sâu, lá có

triệu chứng bị sâu xanh da láng tấn công và xác sâu chết trong 5 khung.

Đối với ruộng trồng cây ớt, bắp cải, cải bẹ dúng, đậu xanh và đậu nành thì tiến hành thu mẫu 10 cây/điểm, thu mẫu 5 điểm/ruộng theo đường chéo góc. Thu tất cả các lá có sự hiện diện của sâu và xác sâu chết ở các điểm thu mẫu.

### 2.2 Phương pháp quan sát định danh qua hình thái, triệu chứng

Sâu xanh da láng thu thập được mang về phòng thí nghiệm Bộ môn Bảo Vệ Thực vật, Khoa Nông nghiệp và Sinh học Ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ để theo dõi xác định tác nhân gây bệnh. Những cá thể sâu nghi ngờ bị nhiễm vi rút sẽ được ly tâm lạnh với percoll để thu dịch nghi ngờ là vi rút, sau đó làm tiêu bản để quan sát thể vùi dưới kính hiển vi huỳnh quang, kính hiển vi điện tử, định danh theo khóa phân loại của Evans và Shapiro (1997) và định danh thông qua việc thực hiện phản ứng PCR với cặp mồi chuyên biệt dùng cho nhận biết vi rút NPV.

### 2.3 Định danh qua việc thực hiện phản ứng PCR với cặp mồi chuyên biệt dùng cho nhận biết vi rút NPV

*Ly trích DNA và thực hiện phản ứng PCR*

– Cho vào ống eppendorf (1,5 ml) hỗn hợp gồm 200 µl dung dịch vi rút tinh khiết (đã được ly tâm) và 100 µl DAS ( 0,3 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0,5 M NaCl, 0,03 M EDTA, pH 10,5), ủ mẫu ở nhiệt độ 37°C trong 30 phút.

– Ly tâm mẫu ở 1500 vòng/phút, hút cẩn thận lớp trên để chuyển sang ống eppendorf mới, tiếp tục ly tâm ở 20.400 vòng/phút, 4°C, giữ lại phần cô đặc dưới đáy eppendorf và bổ sung thêm TE buffer (10 mM Tris và 1 mM EDTA, pH 8,0), 200 µg/ml proteinase K và 1% (w/v) SDS (sodium dodecyl sulfate) , ủ mẫu ở điều kiện nhiệt độ 50°C trong 3 giờ.

– Sản phẩm sau khi ủ sẽ được thêm 300 µl hợp chất phenol-chloroform-isoamyl (25:24:1) lắc rung bằng máy Voltex khoảng 15 – 20 giây, ly tâm 12.000 g trong 5 phút, 4°C sau đó lấy micropipette hút cẩn thận lớp nước bên trên sau đó chuyển sang ống eppendorf mới.

– Cho 2 V Ethanol 99,9% vào ống vừa loại bỏ tạp chất lắc nhẹ, đem ly tâm 13.000 g, 3 phút, 4°C. Bỏ hết phần nước ở trên, giữ lại phần DNA dưới đáy, sau đó, cho 300 µl Ethanol 70% lắc nhẹ vài lần và ly tâm 13.000 g, 3 phút, 4°C. Làm khô mẫu sau đó thu nhận giữ DNA trong 0,01 x TE buffer ở 4°C.

– Sau khi định lượng được nồng độ DNA bằng máy đo quang phổ Biophotometer sẽ tính toán lượng DNA, Taq DNA polymerase, dNTP,

MgCl<sub>2</sub> và buffer để đưa vào phản ứng PCR (Bảng 1). Đối với mỗi mẫu sử dụng 0,5 µl dung dịch cho một mẫu phản ứng. Sau khi chuẩn bị xong hỗn hợp, tiến hành phản ứng PCR có chu trình nhiệt

như sau: bước 1: 94<sup>o</sup>C 3 phút; bước 2: 94<sup>o</sup>C 30 giây; bước 3: 50<sup>o</sup>C 30 giây; bước 4: 72<sup>o</sup>C 30 giây; bước 5: lặp lại 32 chu kỳ từ bước 1 đến bước 4, giữ nhiệt độ ở 4<sup>o</sup>C.

**Bảng 1: Thể tích hóa chất cần sử dụng cho phản ứng khuếch đại PCR**

Thể tích	Hóa chất	Nồng độ gốc	Nồng độ sử dụng
0,5 µl	DNA mẫu	-	20 ng/20µl
6,5 µl	Nước cất	-	-
0,4 µl	Đoạn môi F	(10 pmol/µl)	0,2 pmol/µl
0,4 µl	Đoạn môi R	(10 pmol/µl)	0,2 pmol/µl
0,1 µl	x 1 dNTP mix	(40 nmol)	0,2 Mm
2,0 µl	x 10 Bufer	x 1	x 1
0,1 µl	Taq polymerase	(5 unit/µl)	0,5 unit/20µl

Đoạn môi được sử dụng trong nghiên cứu là PSF002 (3'-GGTTCCTGGGYAARAAAYCA-5') và PER001 (5'-GGTRCRTCCTGGTGCRAAYTCYTT-3') đây là loại primer đặc hiệu dành cho nhận biết vi rút NPV (Nakai *et al.*, 2001).

- Kết thúc phản ứng sẽ thêm 6 x loading buffer (0,25% bromphenol blue, 40% sucrose) với tỷ lệ 1:6 (1 DNA; 6 loading buffer) để điện di sản phẩm trên gel agarose 0,7%, và ngâm trong

Ethydium Bromide 0,01%, sau đó chụp hình và đọc kết quả.

**3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

**Thu thập và định danh thông qua theo dõi triệu chứng gây bệnh**

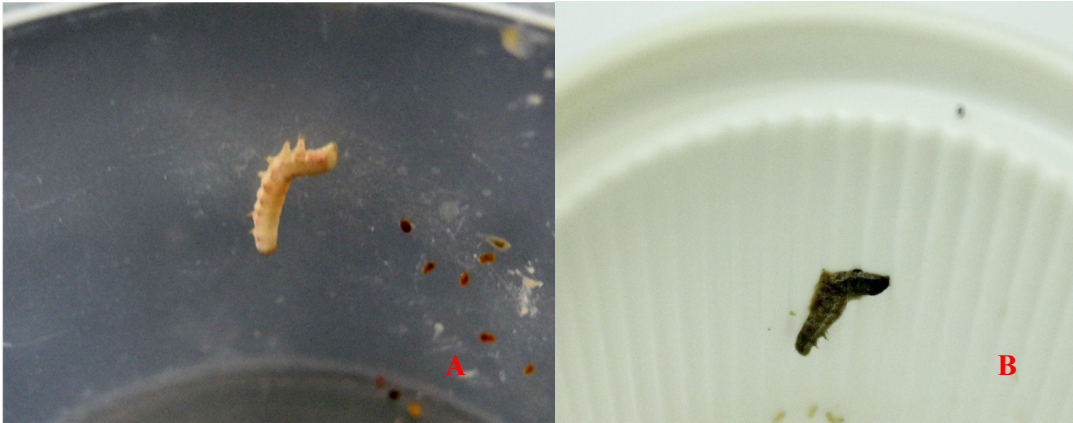
Kết quả đã thu thập được 29 mẫu sâu xanh da láng có triệu chứng nghi ngờ bị nhiễm vi rút tại các tỉnh Vĩnh Long, Đồng Tháp, An Giang và thành phố Cần Thơ trên các loại cây ký chủ như hành lá, đậu xanh, cải bắp, ớt,...

**Bảng 2: Các mẫu sâu xanh da láng *Spodoptera exigua* tại một số tỉnh của Đồng bằng sông Cửu Long**

STT	Ký hiệu mẫu	Cây ký chủ	Địa điểm thu thập (xã, huyện, tỉnh)
1	Mẫu VL <sub>1</sub>	Hành lá	Tân Quới – Bình Tân – Vĩnh Long
2	Mẫu VL <sub>2</sub>	Hành lá	Tân Quới – Bình Tân – Vĩnh Long
3	Mẫu VL <sub>3</sub>	Đậu xanh	Tân Lược – Bình Tân – Vĩnh Long
4	Mẫu VL <sub>4</sub>	Hành lá	Tân Quới – Bình Tân – Vĩnh Long
5	Mẫu VL <sub>5</sub>	Bắp cải	Tân Lược – Bình Tân – Vĩnh Long
6	Mẫu VL <sub>6</sub>	Bắp cải	Tân Bình – Bình Tân – Vĩnh Long
7	Mẫu VL <sub>7</sub>	Đậu xanh	Tân Bình – Bình Tân – Vĩnh Long
8	Mẫu VL <sub>8</sub>	Hành lá	Tân Bình – Bình Tân – Vĩnh Long
9	Mẫu VL <sub>9</sub>	Hành lá	Tân Bình – Bình Tân – Vĩnh Long
10	Mẫu VL <sub>10</sub>	Cây ớt	Tân Bình – Bình Tân – Vĩnh Long
11	Mẫu VL <sub>11</sub>	Bắp cải	Thành Lợi – Bình Tân – Vĩnh Long
12	Mẫu VL <sub>12</sub>	Đậu xanh	Thành Lợi – Bình Tân – Vĩnh Long
13	Mẫu VL <sub>13</sub>	Cải bẹ dúng	Thành Lợi – Bình Tân – Vĩnh Long
14	Mẫu VL <sub>14</sub>	Cây ớt	Thành Lợi – Bình Tân – Vĩnh Long
15	Mẫu VL <sub>15</sub>	Hành lá	Thành Lợi – Bình Tân – Vĩnh Long
16	Mẫu CT <sub>1</sub>	Hành lá	Nhon Nghĩa – Phong Điền – Cần Thơ
17	Mẫu CT <sub>2</sub>	Hành lá	Nhon Nghĩa – Phong Điền – Cần Thơ
18	Mẫu CT <sub>3</sub>	Hành lá	Nhon Nghĩa – Phong Điền – Cần Thơ
19	Mẫu CT <sub>4</sub>	Đậu xanh	Nhon Nghĩa – Phong Điền – Cần Thơ
20	Mẫu CT <sub>5</sub>	Cây ớt	Nhon Nghĩa – Phong Điền – Cần Thơ
21	Mẫu ĐT <sub>1</sub>	Đậu nành	An Phú Thuận – Châu Thành – Đồng Tháp
22	Mẫu ĐT <sub>2</sub>	Hành lá	Long Thuận – Hồng Ngự – Đồng Tháp
23	Mẫu ĐT <sub>3</sub>	Đậu nành	Tân Khánh Đông – Sa Đéc – Đồng Tháp
24	Mẫu ĐT <sub>4</sub>	Đậu xanh	Tân Khánh Đông – Sa Đéc – Đồng Tháp
25	Mẫu ĐT <sub>5</sub>	Hành lá	An Phú Thuận – Châu Thành – Đồng Tháp
26	Mẫu AG <sub>1</sub>	Hành lá	Long Hòa – Phú Tân – An Giang
27	Mẫu AG <sub>2</sub>	Hành lá	Phú Thọ – Phú Tân – An Giang
28	Mẫu AG <sub>3</sub>	Hành lá	Kiến An – Chợ Mới – An Giang
29	Mẫu AG <sub>4</sub>	Hành lá	Long Hòa – Phú Tân – An Giang

Bảng 2 cho thấy nghiên cứu đã thu được 15 mẫu tại Vĩnh Long, 5 mẫu ở Cần Thơ, 5 mẫu Đồng Tháp và 4 mẫu tại An Giang, sau khi thu thập và nuôi tại phòng thí nghiệm với thức ăn nhân tạo, quan sát theo dõi triệu chứng sâu bị chết cho thấy chúng có sự thay đổi về mặt hình thái, sinh lý và ngay cả hành vi cũng thay đổi, biểu hiện như trước khi chết, chúng thường di chuyển về phía trên cao của hộp nuôi sâu và buồng thông cơ thể xuống khi chết (Hình 1), hạ bì rất dễ bị nứt (Hình 2), di

chuyển chậm chạp cho tới khi bất động, sức ăn giảm, nếu bị nhiễm bệnh từ giai đoạn còn nhỏ (tuổi 1 và tuổi 2) sẽ chết rất nhanh. Triệu chứng này tương tự với triệu chứng đã được Steinhaus (1967); Jayarajs (1985) và Miller (1997) mô tả là khi virus vào bên trong cơ thể của sâu sẽ làm thay đổi hành vi của ký chủ. Ấu trùng bị nhiễm bệnh thường có xu hướng di chuyển lên phía trên cao của cây và chết tại đó.



**Hình 1: Triệu chứng thay đổi hành vi của sâu xanh da láng**

Bên cạnh đó, sâu xanh da láng sẽ ăn ít hoặc ngừng ăn và cơ thể phồng to, da ở các đốt thân của côn trùng rất dễ vỡ, sâu lột xác không thành công, hoạt động của sâu cũng bị ảnh hưởng (sự phình to ở các đốt thân trên cơ thể ấu trùng làm cho chúng ít

di chuyển hoặc không di chuyển). Ngoài ra, màu sắc của da bị thay đổi rõ rệt từ bình thường chuyển sang màu hơi trắng, đôi khi trắng đục, các đốt trên thân bắt đầu phình to mọng nước, các đốt chằm đặc trưng trên lưng của sâu ăn tạp bị mờ dần.



**Hình 2: Cơ thể sâu xanh da láng căng phồng, mất màu và hạ bì dễ vỡ.**

Theo O'Reilly và Miller (1991); Wilson *et al.*, (2000); George và Thomas (1984), hiện tượng này là do một loại enzyme và một số gene hình thành nên các biểu hiện của ký chủ khi bị vi rút ký sinh gọi là enzyme *ptp* (protein tyrosine phosphate), gene *egt* (ecdysteroid UDP – glucosyltransferase), gene *chitinase* và gene *cathepsin* đã điều khiển những hành vi của ký chủ, những chất do gene *egt* làm ức chế quá trình lột xác của ấu trùng dẫn đến làm tăng kích thước và trọng lượng. Các hạt vi rút

sẽ bám vào những tế bào dễ mẫn cảm và tiến hành quá trình xâm nhiễm. Ngoài ra, dịch tiêu hóa trong cơ thể ký chủ tạo môi trường kiềm thích hợp cho những thể vùi đa diện nhân hòa tan, nhờ vậy mà các virion được giải phóng và hấp thụ vào màng vi mao của ấu trùng từ đó tiến hành xâm nhập, sinh sản, phá vỡ tế bào, giải phóng các virion, các virion này sẽ thoát ra ngoài và xâm nhập vào tế bào côn trùng, gây bệnh cho côn trùng.

Tất cả triệu chứng này tương thích với mô tả theo khóa phân loại của Evans và Shapiro (1997) như cơ thể thay đổi màu sắc sáng hơn so với màu sắc cơ thể bình thường, phần đốt thân của sâu bao bên ngoài ruột bị ảnh hưởng nhiều nhất và rất dễ vỡ (vì ruột là cơ quan xâm nhiễm chủ yếu của vi rút), ruột ký chủ có màu vàng hoặc trắng thì sâu nhiễm vi rút nhân đa diện NPV. Bên cạnh đó, khóa phân loại của Evans và Shapiro (1997) cho biết rằng khi cơ thể ký chủ có màu hồng nhạt hoặc

trắng hồng, hạ bì dễ nứt, ruột trắng, đốt thân căng phồng, sâu ngừng ăn, chết rất nhanh thì sâu nhiễm vi rút NPV. Ấu trùng bị nhiễm vi rút GV triệu chứng cũng tương tự nhưng điểm phân biệt giữa NPV và GV chính là sâu nhiễm vi rút GV sẽ kéo dài thời gian phát triển, giai đoạn phát triển của sâu không rõ ràng, cơ thể sâu bị nhỏ lại.

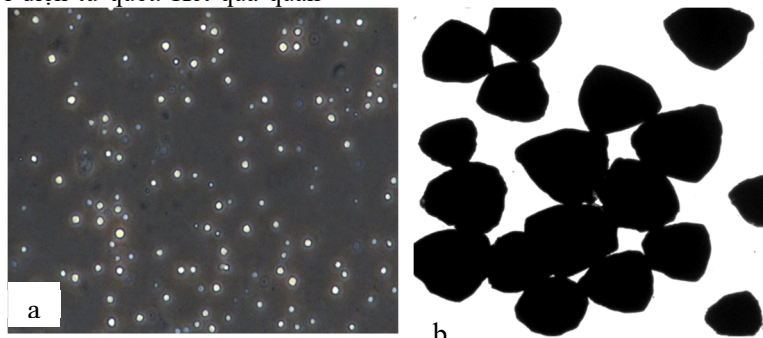
Bên cạnh đó, có một số mẫu cơ thể không chuyển màu trắng, không căng phồng mà xuất hiện hồng nhạt (Hình 3).



**Hình 3: Triệu chứng của ấu trùng sâu xanh da láng có màu hồng**

Những mẫu có nghi ngờ bị nhiễm bệnh do vi rút NPV sẽ được ly tâm để thu dịch tinh khiết và quan sát hình dạng thể vùi dưới kính hiển vi huỳnh quang và kính hiển vi điện tử quét. Kết quả quan

sát thể vùi dưới kính hiển vi huỳnh quang và kính hiển vi điện tử nhận thấy các thể vùi có dạng góc cạnh, hình đa giác.



**Hình 4: a: thể vùi qua kính hiển vi huỳnh quang 60x b: thể vùi qua kính hiển vi điện tử quét độ phóng đại 2000x**

**Kết quả xác định bằng việc thực hiện phản ứng PCR**

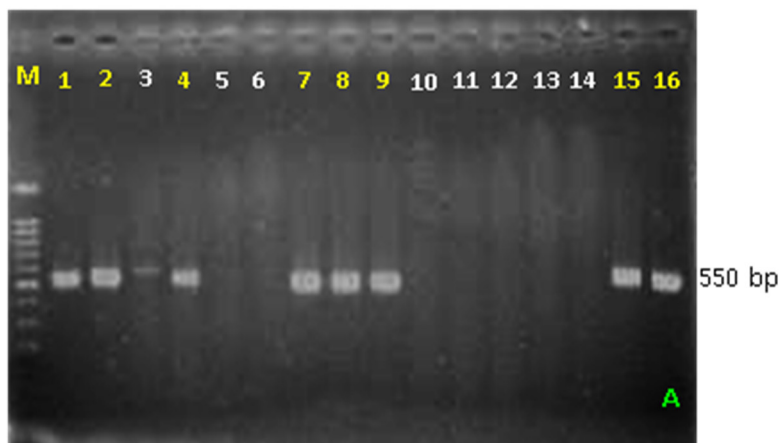
Hiện nay, dựa vào primer chuyên biệt một số tác giả trên thế giới đã sử dụng trong xác định loài, phân loại nhóm loài. Sau khi ly trích DNA của các mẫu thu thập được sẽ tiến hành kiểm tra số lượng và độ tinh khiết tương đối của acid nucleic bằng máy đo quang phổ ở bước sóng 260 và 280 nm và thực hiện phản ứng khuếch đại DNA với primer

chuyên biệt PER001 và PSF002 dành riêng cho vi rút NPV.

Kết quả Bảng 3 cho thấy, 29 mẫu thu thập có nồng độ acid nucleic từ 77,18 – 437,58 ng/μl, tỷ lệ OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> từ 1,43 – 2,32 đủ điều kiện để thực hiện phản ứng PCR vì theo Đái Duy Ban (2006) cho biết nồng độ DNA đủ để tham gia phản ứng PCR là 10 ng/μl.

**Bảng 3: Nồng độ acid nucleic của 29 mẫu thu thập được tại Vĩnh Long, Cần Thơ, Đồng Tháp và An Giang**

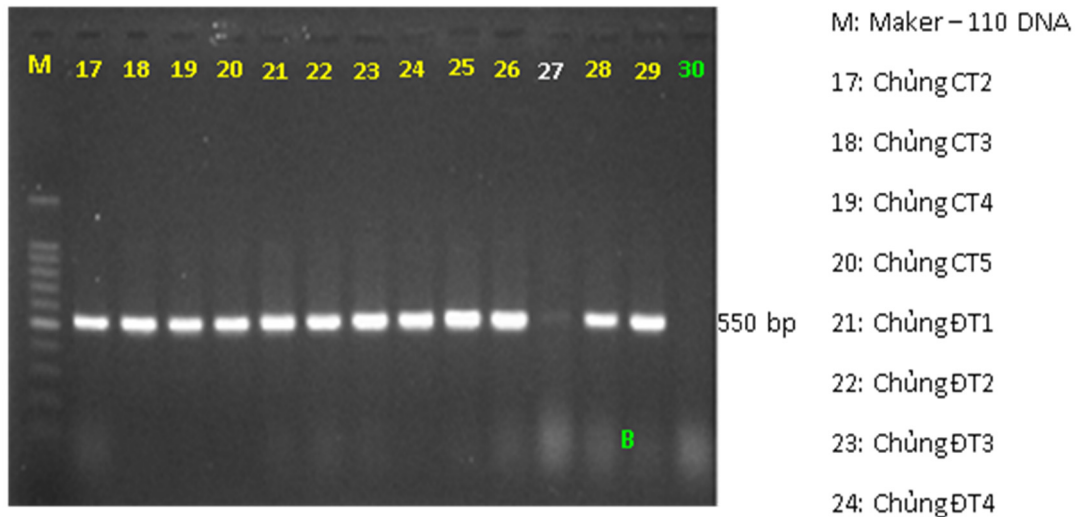
Ký hiệu	Độ hấp thụ 260 nm	Độ hấp thụ 280 nm	Tỷ lệ OD <sub>260</sub> /OD <sub>280</sub>	Nồng độ DNA (ng/μl)*
Mẫu VL <sub>1</sub>	0,35	0,19	1,86	119,34
Mẫu VL <sub>2</sub>	0,77	0,39	1,98	261,12
Mẫu VL <sub>3</sub>	1,13	0,64	1,76	384,88
Mẫu VL <sub>4</sub>	1,02	0,54	1,90	347,48
Mẫu VL <sub>5</sub>	0,68	0,43	1,59	231,20
Mẫu VL <sub>6</sub>	0,87	0,50	1,74	294,44
Mẫu VL <sub>7</sub>	0,61	0,33	1,85	208,42
Mẫu VL <sub>8</sub>	0,39	0,22	1,80	131,24
Mẫu VL <sub>9</sub>	0,60	0,31	1,94	202,98
Mẫu VL <sub>10</sub>	0,95	0,58	1,65	323,00
Mẫu VL <sub>11</sub>	1,55	0,91	1,70	525,30
Mẫu VL <sub>12</sub>	1,56	0,9	1,73	529,72
Mẫu VL <sub>13</sub>	1,08	0,76	1,43	366,86
Mẫu VL <sub>14</sub>	0,95	0,60	1,59	324,36
Mẫu VL <sub>15</sub>	0,90	0,40	2,23	306,68
Mẫu CT <sub>1</sub>	0,41	0,22	1,89	139,74
Mẫu CT <sub>2</sub>	1,29	0,66	1,95	437,58
Mẫu CT <sub>3</sub>	0,37	0,20	1,88	124,44
Mẫu CT <sub>4</sub>	0,74	0,34	2,18	252,28
Mẫu CT <sub>5</sub>	0,28	0,12	2,32	96,22
Mẫu ĐT <sub>1</sub>	0,61	0,31	1,95	207,06
Mẫu ĐT <sub>2</sub>	0,40	0,20	1,97	135,32
Mẫu ĐT <sub>3</sub>	0,33	0,19	1,74	111,86
Mẫu ĐT <sub>4</sub>	0,23	0,13	1,75	77,18
Mẫu ĐT <sub>5</sub>	0,40	0,22	1,85	135,32
Mẫu AG <sub>1</sub>	0,88	0,48	1,82	300,22
Mẫu AG <sub>2</sub>	1,24	0,70	1,77	422,96
Mẫu AG <sub>3</sub>	0,84	0,46	1,85	286,28
Mẫu AG <sub>4</sub>	0,38	0,19	1,94	127,50
Sâu sạch	0,95	0,51	1,86	322,32



M: Maker – 110 DNA

- 1: Chủng VL1
- 2: Chủng VL2
- 3: Chủng VL3
- 4: Chủng VL4
- 5: Chủng VL5
- 6: Chủng VL6
- 7: Chủng VL7
- 8: Chủng VL8
- 9: Chủng VL9

**Hình 6: Sản phẩm PCR của 16 chủng vi rút thu thập tại Vĩnh Long và Cần Thơ trên Agarose 1,0%**



**Hình 7: Sản phẩm PCR của 13 chủng vi rút thu ở Cần Thơ, Đồng Tháp và An Giang trên Agarose 1,0%**

Kết quả Hình 6 và Hình 7 thể hiện sản phẩm khuếch đại PCR của 29 chủng vi rút với primer chuyên biệt là PSF002 (5'-GGIICCIGGYAARAAYCA-3') và PER001 (5'-GGIRCRTCIGGIGCRAAYTCYTT-3') dành riêng cho vi rút NPV (Nakai *et al.*, 2001). Việc kiểm tra trên gel agarose 1% cho thấy có sự xuất hiện của 20 vạch băng màu duy nhất, ngang nhau và có kích thước so với Maker chuẩn là 550 bp tại các vị trí là 1, 2, 4, 7, 8, 9, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 28 và 29. Điều này chứng tỏ trong 29 chủng nghi ngờ nhiễm vi rút NPV thì có 20 chủng vi rút được xác định chính xác là vi rút NPV do đã tương thích khi thực hiện phản ứng PCR với cặp mỗi chuyên biệt gồm có chủng VL1, chủng VL2, chủng VL4, chủng VL7, chủng VL8, chủng VL9, chủng VL15, chủng CT1, chủng CT2, chủng CT3, chủng CT4, chủng CT5, chủng ĐT1, chủng ĐT2, chủng ĐT3, chủng ĐT4, chủng ĐT5, chủng AG1, chủng AG3 và chủng AG4 thuộc vi rút Nucleopolyhedrovirus (NPV) họ Baculoviridae.

Chín chủng còn lại tại các vị trí 3, 5, 6, 10, 11, 12, 13, 14 và 27 không có băng màu xuất hiện có thể do nhiều yếu tố như các chủng này thuộc nhóm vi rút khác mà không phải vi rút NPV.

Như vậy, từ kết quả định danh theo phương pháp truyền thống dựa trên quan sát triệu chứng, quan sát thể vùi và định danh bằng kỹ thuật PCR cho thấy 20 chủng vi rút (chủng VL1, chủng VL2, chủng VL4, chủng VL7, chủng VL8, chủng VL9, chủng VL15, chủng CT1, chủng CT2, chủng CT3, chủng CT4, chủng CT5, chủng ĐT1, chủng ĐT2, chủng ĐT3, chủng ĐT4, chủng ĐT5, chủng AG1, chủng AG3 và chủng AG4) là vi rút Nucleopolyhedrovirus thuộc họ Baculoviridae. Tên

của các chủng vi rút được đặt theo ký tự: Tên ký chủ gây bệnh + tên địa phương thu thập + số thứ tự của các chủng vi rút trong quá trình thu thập, ví dụ vi rút thu thập trên sâu xanh da láng *Spodoptera exigua* thu thập tại Vĩnh Long sẽ được ký hiệu là SeNPV-VL.

#### 4 KẾT LUẬN VÀ ĐỀ XUẤT

Tóm lại, 29 mẫu sâu xanh da láng nghi ngờ bị nhiễm bệnh đã thu thập được tại thành phố Cần Thơ, tỉnh Vĩnh Long, An Giang và Đồng Tháp, qua quan sát triệu chứng, thể vùi và sử dụng mỗi chuyên biệt PER001 và PSF002 đã xác định được 20 mẫu thu thập được thuộc vi rút NPV (Nucleopolyhedrovirus) họ Baculoviridae. Tiếp tục đánh giá độc tính của 20 chủng vi rút đã được định danh đối với sâu xanh da láng.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Đái Duy Ban (2006). Công nghệ gen. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật Hà Nội.
- Evans, H. and M. Shapiro (1997). Viruses. Manual of Techniques in Insect Pathology, Biological Techniques, p 17-53.
- Hughes, P. R., H. A. Wood (1981), In vitro and invitro bioassay methods for baculovirus. In: Granados, R.R., Federici, B.A. (Eds), The Biology of Baculoviruses, Vol. 2. CRC Press, Boca Raton, FL, 1-30.
- Hughes, P. R., R. R. Gettig, W. J. McCarthy (1986), "A synchronous peroral technique for the bioassay on insect virus", Journal of Invertebrate Pathology, 41, 256-261.
- Jayarajs (1985). Symptoms and pathologies of insect diseases in "Microbial control and integrated pest management. Tamil Nadu Agricultural University, Coimbatore, India, pp 30-33.

- Kunimi, Y. (2005), "Current status and prospects on the use of insect pathogens as biocontrol agents", *Agrochemicals Japan*, 86, 2-6.
- Kunimi, Y. (2007), "Current status and prospects on microbial control Japan", *Journal of Invertebrate Pathology*, 95, 181-186.
- Kunimi, Y. and M. Nakai (2001). *Workshops for Microbial Control Faculty of Agriculture. Tokyo University of Agriculture and Technology*. pp. 36.
- Miller L.K (1997). *The Baculoviruses*. Springer Science+Business Media New York Originally published by Plenum Press. ISBN 978-1-4899-1836-9. 447 pp.
- Nakai, M., C. Goto, T. Shiotsuki and Y. Kunimi (2001). Granulovirus prevents pupation and retards development of *Adoxophyes honmai* larvae. *Physiological Entomology* 27, 157-164.
- Nguyễn Thị Thu Cúc (1999). Nghiên cứu sâu xanh da láng (*Spodoptera exigua* Hubner-Noctuidae-Lepidoptera): các đặc điểm hình thái, sinh học, sinh thái, khả năng gây hại và biện pháp phòng trị trên đậu nành (*Glycine max* (L) Merrill). Đề tài tiến sĩ ngành Nông học. Trường đại học Cần Thơ.
- Nguyễn Văn Huỳnh và Lê Thị Sen (2004). Phần B: Côn trùng chính gây hại cây trồng chính ở Đồng bằng sông Cửu Long. Giáo trình côn trùng nông nghiệp. Tủ sách Đại học Cần Thơ.
- Phạm Thị Thùy (2004). Công nghệ sinh học trong bảo vệ thực vật. Nhà xuất bản Đại học Quốc gia Hà Nội.
- Steiner, P. (1936). Beiträge zur Kenntnis der Schädlingfauna Klein-Asiens III. *Laphygma exigua*, ein grossschädling der Zuckerrübe in Anatolien. *Z. Ang. Entomol.* 23: 178-222.
- Wilson, J.U (1932). Notes on the biology of *Laphygma exigua* (Hübner). *Florida Entomologist* 16:33-39.