

XÁC ĐỊNH BỘ PHẬN *BEMISIA TABACI* (GENNADIUS) BIOTYPE B (HEMIPTERA: ALEYRODIDAE) TRÊN CÂY ĐẬU TƯƠNG Ở VÙNG HÀ NỘI

Đàm Ngọc Hân¹, Nguyễn Huy Hoàng²

¹Cục Bảo vệ thực vật

²Viện Công nghệ sinh học

TÓM TẮT

Bộ phận *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) gây hại trên nhiều loại cây trồng vùng Hà Nội và có tính kháng thuốc cao. Bằng các kỹ thuật sinh học phân tử, *B. tabaci* được chứng minh là tập hợp loài với nhiều biotype khác nhau. Trong đó biotype B có phân bố rộng ở nhiều nước trên thế giới. Bộ phận *B. tabaci* biotype B ngoài chích hút làm cây còi cọc còn là vector truyền hơn 100 loại virus thực vật gây thiệt hại về năng suất cây trồng từ 20 đến 100%. Ở khu vực Đông Á, *B. tabaci* biotype B và Q được phát hiện ở Trung Quốc, *B. tabaci* biotype B ở Hàn Quốc, Nhật Bản, *B. tabaci* biotype Nauru có phân bố ở Đài Loan. Trong năm 2010, chúng tôi đã tiến hành thu mẫu và phân loại bộ phận *B. tabaci* gây hại trên cây đậu tương vùng Hà Nội theo phương pháp truyền thống dựa vào quan sát đặc điểm hình thái của ấu trùng tuổi 4 (nhộng giả) trên tiêu bản lam. Sau đó gen cytochrome oxidase subunit I (COI) của trưởng thành bộ phận *B. tabaci* có độ dài khoảng 0,8 kb được nhân và phân tích trình tự. Trình tự gen COI có độ tương đồng tới 100% so với trình tự gen COI của bộ phận *B. tabaci* biotype B trong Genbank. Đoạn gen COI của bộ phận *B. tabaci* biotype B thu được trên cây ký chủ đậu tương ở Hà Nội đã được đăng ký trên GenBank với mã số HQ703595

Từ khóa: Bộ phận, *Bemisia tabaci* biotype B, cytochrome oxidase subunit I (COI), đặc điểm hình thái, nhộng giả

MỞ ĐẦU

Bộ phận (Hemiptera: Aleyrodidae) là những côn trùng nhỏ bé được phát hiện lần đầu tiên năm 1736, cho đến nay số loài bộ phận trên thế giới vào khoảng 1500 loài (Martin, Mound, 2007). Trong số đó, *Bemisia tabaci* gây hại trên 500 loại cây trồng và có phân bố rộng khắp trên toàn thế giới. *B. tabaci* không chỉ gây hại trực tiếp bằng cách chích hút cây ký chủ mà còn là vector truyền 111 loài virus thực vật thuộc các chi *Begomovirus* (*Geminiviridae*), *Crimivirus* (*Closteroviridae*) và *Carlavirus* hay *Ipomovirus* (*Polyviridae*) (Jones, 2003). Trong các loại virus này thì *Begomovirus* là nguy hiểm nhất, có thể gây thiệt hại về năng suất cây trồng từ 20 - 100% (Brown, Bird, 1992).

Bộ phận hoàn thành vòng đời qua 3 pha phát dục: Trùng, ấu trùng, trưởng thành. Ấu trùng có 4 tuổi, trong đó ấu trùng tuổi 4 còn được gọi là nhộng giả và được sử dụng trong phân loại bộ phận *B. tabaci*. Tuy nhiên, các biotype của *B. tabaci* không thể phân biệt được bằng giám định đặc điểm hình thái (Viscaret *et al.*, 2003). Hiện nay, các phân tích bằng sinh học phân tử cho thấy *B. tabaci* là một tập hợp loài với nhiều biotype (Brown *et al.*, 1995, Frohlich *et al.*, 1999). Một số biotype của *B. tabaci* chi phân bố ở các vị trí địa lý nhất định (Frohlich *et*

al., 1999, Perring, 2001). Biotype A phân bố ở Mỹ, biotype Q phân bố ở khu vực Địa Trung Hải, các biotype trên sản phân bố ở châu Phi, biotype An phân bố ở Úc, biotype Ms phân bố ở các đảo thuộc Đông và Tây Ấn Độ Dương, biotype Nauru phân bố ở khu vực châu Á Thái Bình Dương, biotype B phân bố rộng khắp ở nhiều nước trên thế giới (Frohlich *et al.*, 1999; Perring, 2001; Delatte, 2005). Ở khu vực Đông Á: Trung Quốc có xuất hiện biotype B và Q, ở Hàn Quốc và Nhật Bản có xuất hiện biotype B, (Perring, 2001, Zhang *et al.*, 2005), ở Đài Loan có xuất hiện biotype Nauru (De Barro *et al.*, 2005).

Việc xác định dùng biotype của bộ phận *B. tabaci* có ý nghĩa quan trọng trong công tác phòng trừ dịch hại. Mỗi biotype khác nhau có mức độ kháng khác nhau với thuốc trừ sâu hoá học (Khasdan *et al.*, 2005). Thêm vào đó, nếu biết được sự khác nhau giữa các biotype của bộ phận *B. tabaci* và phân bố địa lý của chúng có thể giúp chọn lọc được các loại thiên địch thích hợp sử dụng trong phòng trừ (Kirk *et al.*, 2000). Sử dụng kỹ thuật đọc và phân tích trình tự gen cytochrome oxidase subunit I (COI) để xác định biotype của bộ phận đã trở nên phổ biến trên nhiều phòng thí nghiệm trên thế giới (De Barro, Driver, 1997, Frohlich *et al.*, 1999, Hsieh *et al.*, 2006). Ở vùng Hà Nội, bộ phận *B. tabaci* gây hại phổ biến trên các loại đậu đỗ, cà chua, cà tím và rau

họ thập tự (bắp cải, su hào, súp lơ,...) và rất khó khăn trong công tác phòng trừ. Tuy nhiên ở Việt Nam bộ phận mới chỉ được quan sát đặc điểm hình thái bên ngoài, chưa có những nghiên cứu về phân loại phân tử cũng như chẩn đoán sớm. Trong bài báo này, chúng tôi trình bày các quan sát về đặc điểm hình thái của bộ phận *B. tabaci* và phân loại phân tử bộ phận bằng xác định và phân tích trình tự gen cytochrome oxidase subunit I (COI).

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu

Mẫu trứng, ấu trùng và trưởng thành của bộ phận được thu trên cây đậu tương ở giai đoạn ra hoa tại xã Đa Tốn, huyện Gia Lâm, Hà Nội.

Cặp mồi được sử dụng trong nghiên cứu là C1-J-2195 (5'-TTGATTTTTGGTCATCCAGAAGT-3') và L2-N-3014 (5'-TCCAATGCACTAATCTGCCATATTA-3'), dựa theo các tài liệu công bố trước đây (Frohlich *et al.*, 1999; Hsieh *et al.*, 2006).

Các hoá chất sử dụng cho nghiên cứu của các hãng Merck/BHD Chemicals, Sigma, Fermentas,...

Phương pháp nghiên cứu

Mẫu bộ phận trên cây đậu tương tại Hà Nội được thu từ tháng 3/2009 đến tháng 4/2010 theo phương pháp của Viện Bảo vệ thực vật (Viện BVTV, 1997). Lá đậu tương được đựng trong hộp nhựa và mang về phòng thí nghiệm để thu trứng, ấu trùng, trưởng thành. Trưởng thành mới vũ hoá được bảo quản trong cồn 80%.

Ấu trùng tuổi 4 (nhộng già) của bộ phận được làm tiêu bản lam dựa vào phương pháp của Watson (2007) có cải tiến: Ấu trùng ngâm trong KOH 10% và đun ở nhiệt độ 60 - 80°C trong 10 phút. Loại bỏ KOH, rửa lại bằng nước cất và nhuộm màu bằng acid Fuchsin trong 2 - 10 phút, rửa bằng cồn tuyệt đối 1 hoặc 2 lần. Cố định mẫu trên lam kính bằng cách nhỏ 1 giọt keo Canada, sau đó đặt 1 - 2 ấu trùng lên trên, đặt lamen lại giữ ở từ ẩm 50 - 70°C trong 10 phút. Tiêu bản lam được làm khô ở 35°C sau đó giám định dựa trên các tài liệu của Watson (2007).

Tách chiết DNA tổng số được cải tiến dựa theo phương pháp của De Barro and Driver (1997): Rửa mẫu trưởng thành bộ phận đã ngâm trong cồn 80% bằng nước sạch. Cho 10 - 15 trưởng thành bộ phận vào ống effendorf 1,5 ml. Thêm 25 µl dung dịch đệm

để phá vỡ tế bào (50 mM KCl, 10 mM Tris pH 8,4, 0,45% Tween 20, 0,2% gelatin, 60 µg/ml proteinase K). Mẫu giữ ở 65°C trong 30 phút sau đó được đun nóng ở 80 - 90°C trong 10 phút để làm mất hoạt tính của proteinase K. Thêm 25 µl nước cất, bảo quản ở -20°C.

Phản ứng chuỗi (polymerase chain reaction - PCR) nhằm nhân đoạn gen mã hóa COI được tiến hành với tổng thể tích 50 µl bao gồm: 1X PCR Buffer, 20 pmol mồi mỗi loại, 1 đơn vị *Taq* polymerase, 1 mM dNTPs, 30 ng DNA tổng số. Phản ứng PCR được tiến hành trên máy GenAmp PCR System 9700 (ABI, Mỹ) với chu trình nhiệt 95°C : 3 phút, 30 chu kỳ (95°C : 1 phút, 55°C : 1 phút, 72°C : 55 giây), 72°C : 10 phút, kết thúc ở 4°C. Sản phẩm PCR được phân tách trên gel agarose 1% và tinh sạch bằng kit Wizard[®] SV Gel and PCR clean-up system (Promega).

Trình tự đoạn gen mã hóa COI được xác định dựa trên máy phân tích trình tự DNA tự động ABI PRISM[®] 3100 Genetic Analyzer. Dữ liệu được xử lý bằng phần mềm DNA Club, Chromas và BioEdit v.7.0.9.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Đặc điểm hình thái các pha phát dục của bộ phận *B. tabaci*

Chúng tôi đã tiến hành điều tra thu mẫu, đo kích thước và làm tiêu bản các pha phát dục của bộ phận *B. tabaci* trên đậu tương vùng Hà Nội. Kết quả được trình bày trong Bảng 1

Trứng bộ phận *B. tabaci* có hình oval kéo dài, nhọn dần về phía đỉnh. Trứng được cắm vào mặt sau của lá bằng cuống trứng hình que ngắn, kích thước 0,19 x 0,1 mm.

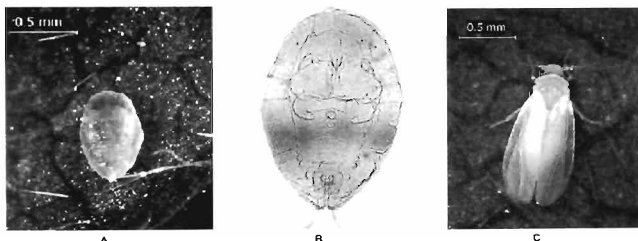
Ấu trùng bộ phận có 4 tuổi. Ấu trùng mới nở có mắt kép màu đen nhìn thấy rõ, có thể di chuyển khá nhanh để tìm vị trí sinh trưởng thích hợp. Chân và râu đầu dài, nhọn hình tam giác. Ấu trùng tuổi 2 kích thước 0,34 x 0,2 mm, chân thoái hóa không di chuyển được nữa, nằm cố định sát với mặt lá. Ấu trùng tuổi 3 hình oval, màu vàng đục dần. Kích thước 0,43 x 0,25 mm. Ấu trùng tuổi 4 (nhộng già) có kích thước 0,68 x 0,48 mm, khi mới lột xác ấu trùng vẫn chích hút và sinh trưởng bình thường nhưng sau đó ngừng chích hút và bắt đầu quá trình biến đổi, mắt kép màu đỏ có thể nhìn thấy rõ (Hình 1A). Quan sát đặc điểm của nhộng già trên tiêu bản

lạm cho thấy đốt bụng thứ 7 ngắn hơn $\frac{1}{2}$ đốt bụng thứ 6, có một đôi lông đuôi dài, đường khớp ngang không kéo dài tới mép. Lỗ bài tiết hình tam giác, bên cạnh có một cặp lông gai nhỏ, chiều dài nắp chiếm $\frac{1}{2}$ chiều dài lỗ bài tiết, đầu lưỡi có hình tam giác kéo dài, có một cặp lông ở đầu, lưỡi không vượt quá lỗ bài tiết (Hình 1B).

Trưởng thành bộ phận *B. tabaci* có thân màu vàng nhạt, hai đôi cánh dài bằng nhau, khi đậu cánh sau xếp gọn dưới cánh trước và không nhô ra khỏi cánh trước (Hình 1C). Mắt kép đỏ sẫm có một rãnh ngang chia hai phần giống hình số 8. Râu đầu 7 đốt, bụng có 9 đốt, đốt thứ nhất thót lại làm cơ thể có dạng hình ong. Con đực bé hơn con cái, đốt bụng cuối có dạng hình kẹp

Bảng 1. Kích thước các pha phát dục của bộ phận *B. tabaci* trên đậu tương vùng Hà Nội (mm) (n = 30).

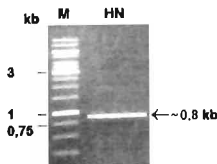
Pha phát dục		Chiều dài	Chiều rộng	Sải cánh
Ấu trùng	Trùng	0,19 ± 0,001	0,10 ± 0,001	
	Tuổi 1	0,26 ± 0,001	0,16 ± 0,001	
	Tuổi 2	0,34 ± 0,002	0,20 ± 0,001	
	Tuổi 3	0,43 ± 0,002	0,25 ± 0,002	
	Tuổi 4	0,68 ± 0,016	0,48 ± 0,011	
Trưởng Thành	Con đực	0,82 ± 0,002	0,26 ± 0,001	1,79 ± 0,002
	Con cái	0,95 ± 0,001	0,28 ± 0,001	2,08 ± 0,002



Hình 1. A. Ấu trùng tuổi 4 (nhộng giả) của bộ phận *B. tabaci* trên đậu tương. B. Tiêu bản ấu trùng tuổi 4 (nhộng giả) của bộ phận *B. tabaci*; C. Bộ phận trưởng thành *B. tabaci* trên cây đậu tương

Nhân và phân tích trình tự gen COI của bộ phận *B. tabaci*

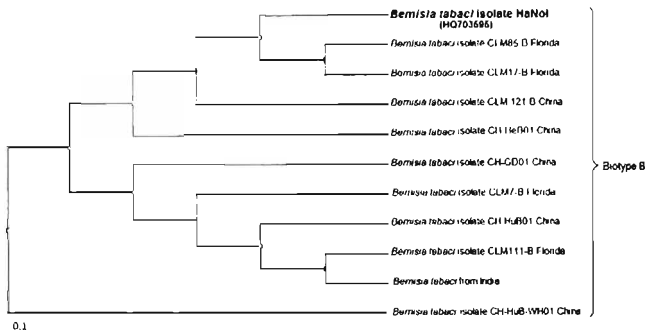
DNA tổng số của bộ phận được tách chiết và được sử dụng làm khuôn để nhân đoạn gen COI bằng kỹ thuật PCR. Kết quả sản phẩm PCR được phân tích trên gel agarose 1% có một băng duy nhất với kích thước khoảng 0,8 kb so với marker chuẩn 1kb (Hình 2). Kết quả này hoàn toàn phù hợp với tính toán theo lý thuyết và các nghiên cứu của 2 nhóm tác giả Frohlich và đồng tác giả (1999) Hsieh và đồng tác giả (2006). Đoạn gen này được tinh sạch và tiến hành đọc trình tự trực tiếp từ 2 đầu của gen có sử dụng mồi C1-J-2195 và L2-N-3014.



Hình 2. Sản phẩm PCR đoạn gen COI của bộ phận *B. tabaci* trên gel agarose 1%. M: Thang chuẩn DNA kích thước 1kb, HN: đoạn gen COI của bộ phận *B. tabaci* ở Hà Nội.

Kết quả giải và phân tích trình tự gen COI của bộ phận *B. tabaci* được thu trên cây đậu tương ở Hà Nội có kích thước là 822 bp và được đăng ký trong ngân hàng Genbank với mã số HQ703595. So sánh trình tự đoạn gen HQ703595 với trình tự gen đã công bố trong Genbank cho thấy, trình tự gen COI của bộ phận *B. tabaci* thu được ở Hà Nội có độ tương đồng cao từ 98 - 100% so với các bộ phận *B. tabaci* thuộc biotype B (Hình 3). Cụ thể như: *B.*

tabaci ở Hà Nội có độ tương đồng tới 100% so với bộ phận *B. tabaci* type B CLM85 thu nhận từ cây trạng nguyên tại Florida của Mỹ, 100% so với bộ phận *B. tabaci* type B CLM121 thu nhận trên cây cà chua của Trung Quốc. Từ đó có thể kết luận bộ phận *B. tabaci* được thu nhận từ cây đậu tương ở Hà Nội là bộ phận *B. tabaci* thuộc biotype B. Các kết quả nghiên cứu này hoàn toàn phù hợp với dự đoán của về phân loại *B. tabaci* biotype B ở khu vực Đông Á.



Hình 3. Cây phát sinh chủng loại của bộ phận *Bemisia tabaci* biotype B

KẾT LUẬN

Dựa vào quan sát đặc điểm hình thái nhộng giả trên tiêu bản lam, bộ phận hại đậu tương được xác định là *Bemisia tabaci*. Bộ phận *B. tabaci* thu nhận từ cây đậu tương ở Hà Nội là Biotype B qua sự phân tích trình tự gen COI và trình tự này được đăng ký trong GenBank với mã số HQ703595.

Lời cảm ơn: Chúng tôi xin chân thành cảm ơn Phòng Vi sinh vật đất, Phòng thí nghiệm trọng điểm Công nghệ gen, Viện Công nghệ sinh học đã tạo điều kiện cho chúng tôi được tiến hành thí nghiệm. Chúng tôi cũng xin cảm ơn cử nhân Nguyễn Thu Hiền đã vẽ cây phát sinh chủng loại.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Brown JK, Bird JR (1992) Whitefly-transmitted

geminiviruses and associated disorders in the Americas and the Caribbean Basin. *Plant Dis* 76: 220-225.

Brown JK, Fröhlich DR, Rosell RC (1995) The sweet potato or silverleaf whiteflies: biotypes of *Bemisia tabaci* or a species complex? *Annu Rev Entomol* 40: 511-534.

De Barro PJ, Driver F (1997) Use of RAPD to distinguish the B biotype from other biotypes of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Aust J Entomol* 36: 149-152.

De Barro PJ, Rucman JWH, Fröhlich DR (2005) *Bemisia argentifolii* is a race of *B. tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae): the molecular genetic differentiation of *B. tabaci* populations around the world. *Bull Entomol Res* 95: 193-203.

Delatte H (2005) Study of the pathosystem begomovirus/*Bemisia tabaci*/tomato on the south west islands of the Indian Ocean. *Ph. D. Thesis* Wageningen University, the Netherlands.

Fröhlich DR, Torres-Jerez I, Bedford ID, Markham PG, Brown JK (1999) A phylogeographic analysis of the

Bemisia tabaci species complex based on mitochondrial DNA markers. *Mol Ecol* 8: 1683-1691

Hsieh CH, Wang CH, Ko CC (2006) Analysis of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) Species Complex and Distribution in Eastern Asia Based on Mitochondrial DNA Markers. *Ann Entomol Soc Am* 99(5): 768-775.

Jones DR (2003) Plant viruses transmitted by whiteflies. *Eur J Plant Pathol* 109: 197-221.

Khasdan V, Levin I, Rosner A, Morin S, Kotsedalov S, Maslennik L, Horowitz AR (2005) DNA markers for identifying biotypes B and Q of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) and studying population dynamics. *Bull Entomol Res* 95: 605 - 613.

Kirk AA, Lacey LA, Brown JK, Ciomperlik MA, Goolsby JA, Vacek DC, Wendel LE, Napompeth B (2000) Variation in the *Bemisia tabaci* species complex (Hemiptera: Aleyrodidae) and its natural enemies leading to successful biological control of *Bemisia* biotype B in the USA. *Bull Entomol Res* 90: 317-327.

Martin JH, Mound LA (2007) An annotated check list of

the world's whiteflies (Insecta: Hemiptera: Aleyrodidae). *Zootaxa*, 1492: 1-84.

Perring TM (2001) The *Bemisia tabaci* species complex. *Crop Protection* 20: 725-737.

Viscarri MM, Torres-Jerez I, Manco EA, Lopez SN, Botto EE, Brown JK (2003) Mitochondrial DNA evidence for a distinct New World group of *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) indigenous to Argentina and Bolivia and presence of the old world B biotype in Argentina. *Ann Entomol Soc Am* 96: 65-72.

Viện Bảo vệ thực vật (1997) Phương pháp nghiên cứu BVTV. Phương pháp điều tra cơ bản dịch hại nông nghiệp và thiên địch của chúng. Nhà xuất bản Nông nghiệp, 99.

Watson GW (2007) Identification of whiteflies (Hemiptera: Aleyrodidae). 64 http://en.wikipedia.org/wiki/DNA_barcoding

Zhang LP, Zhang YJ, Zhang WJ, Wu QJ, Xu BY, Chu D (2005) Analysis of genetic diversity among different geographical populations and determination of biotypes of *Bemisia tabaci* in China. *J Appl Entomol* 129: 121-128.

IDENTIFICATION OF *BEMISIA TABACI* (GENNADIUS) BIOTYPE B (HEMIPTERA: ALEYRODIDAE) ON SOYBEAN IN HANOI

Dam Ngoc Han¹, Nguyen Huy Hoang^{2,*}

¹Plant Protection Department

²Institute of Biotechnology

SUMMARY

Bemisia tabaci (Hemiptera: Aleyrodidae) is a pesticide resistant species and has been reported on variety of plants in Hanoi. Molecular biology techniques have proved that *B. tabaci* is a series of biotypes, of which biotype B is now widely distributed throughout the world. *B. tabaci* feeds by sucking the plant sap and may cause stunt plant growth, besides, this pest plays a role as a vector of more than 100 viruses, it causes yield loss 20 to 100%. In eastern Asia, *B. tabaci* biotypes B and Q distributed in China, *B. tabaci* biotype B distributed in Korea and Japan; *B. tabaci* biotype Nauru distributed in Taiwan. For the first time, identification of *Bemisia tabaci* was performed by using molecular biology techniques and morphology in Vietnam. We have collected pupae of *B. tabaci* which were harmful on soybean in Hanoi in 2010. The morphology of pupae of *B. tabaci* (4 stages) was identified by specimen slides. And then, cytochrome oxidase subunit I (COI) gene from adult of *B. tabaci* about 0.8 kb in length was amplified by Tag DNA polymerase. The sequence of COI gene was analyzed by using Bioedit program and compared with other COI gene by using BLAST (NCBI). Results indicated that COI gene similarity between *B. tabaci* in Hanoi and *B. tabaci* biotype B in GenBank is 100% COI gene of *B. tabaci* biotype B on soybean in Hanoi was submitted to GenBank with HQ703595 accession number.

Keywords: *Bemisia tabaci* biotype B, cytochrome oxidase subunit I (COI), morphology, specimen slide, whitefly

* Author for correspondence: Tel: +84-4-37565633; Fax: +84-4-38363144; E-mail: nhhoang@ibt.ac.vn