

# NGHIÊN CỨU CHẤT CÓ HOẠT TÍNH DIỆT RỆP TỪ CHỦNG NẤM KÍ SINH CÔN TRÙNG

## TỔNG QUAN

Rệp muội thường làm yếu cây trồng bằng cách hút cạn nguồn dinh dưỡng và gây ảnh hưởng nghiêm trọng cho sự phát triển của cây. Chúng tiết ra chất đường mật không chỉ làm đóng khí khổng của lá mà còn góp phần tăng sự phát triển của mốc đen, làm ngăn cản ánh sáng đến các mô quang hợp, ảnh hưởng nghiêm trọng tới năng suất cây trồng. Các loài rệp còn là phương tiện góp phần lây lan virus từ những cây bệnh sang cây khỏe mạnh. Vì vậy, rệp thường làm giảm mạnh năng suất của cây trồng, gây thiệt hại lớn cho nền nông nghiệp.

Trong những năm gần đây, việc sử dụng biện pháp sinh học phòng chống sâu hại cây trồng như sử dụng ký sinh, thiên địch mới được đi sâu nghiên cứu. Các chế phẩm sinh học từ nấm ra đời để diệt trừ các loại sâu như nhện, sâu tơ, sâu xanh, bọ trĩ, bọ cánh phấn. Các chế phẩm từ nhóm nấm còn có nấm đối kháng *Trichoderma* vừa có tác dụng đề kháng một số nấm bệnh gây hại trên bộ rễ cây trồng như bệnh thối rễ do nấm *Phytophthora palmivora* gây ra. Tuy nhiên, việc sử dụng biện pháp vi nấm kí sinh đối với rệp muội là một vấn đề đang còn mới mẻ trong nông nghiệp. Cùng với sự phát triển kinh tế - xã hội, con người ngày càng có nhu cầu sử dụng các sản phẩm rau quả sạch, hạn chế mức thấp nhất việc sử dụng thuốc trừ sâu hóa học dùng trong sản xuất rau, củ quả. Việc sử dụng các loài thiên địch như nấm kí sinh côn trùng gây hại cây trồng là xu hướng tất yếu vì chúng phát tán rất nhanh và chỉ gây hại trên côn trùng có hại, không gây hại tới nguồn nước môi trường sinh thái và sức khỏe con người, vật nuôi.

Năm 1969, Hamil và cs đã xác định được độc tố diệt côn trùng của nấm bạch cương *Beaveria bassiana* và đặt tên độc tố này là *Beavericin*, độc tố này đã làm cho nhiều loài côn trùng bị chết. Theo Bidochka và Khachatourians thì sản phẩm của *B. bassiana* là hai acid hữu cơ oxalic và citric khi nuôi trên môi trường chứa chitin, chúng tham gia vào hòa tan các protein biểu bì của côn trùng.

Khi nghiên cứu về nấm kí sinh côn trùng *Lecanicillium muscarium* để chống lại ruồi trắng khoai lang (được coi là một vector truyền virus từ các loài thực vật) ở phòng thí nghiệm và nhà kính, Cuthbertson (2009) đã tách chiết được 5 chất hóa học có khả năng diệt ruồi trắng. Roditakis và cs (2007) nhận thấy chủng *Lecanicillium longisporum* kiểm soát rệp xanh *Myzus persicae* trên cây đào. Nấm *L. longisporum* tác động lên đầu rệp, nảy mầm và xâm lược vào lớp biểu bì của rệp.

Năm 2002, Liu và cs nhận thấy 2 chủng *B. bassiana* và *M. anisoplise* rất nhạy cảm với ấu trùng con trưởng thành của quần thể rệp cây *Lygus lineolaris*. Migiro và cs (2010) cho thấy 2 chủng này có khả năng diệt ruồi *Liriomyza huidobrensis* và kiểm soát dịch do loài này gây ra rất cao.

Ở Việt Nam, trong điều kiện phòng thí nghiệm nấm *M. anisoplise* có hiệu lực cao đối với rệp sáp giả *Dysmicoccus* sp. hại na. Bào tử nấm được phun ở nồng độ 9.108/ml kiểm soát được 82,2% rệp sáp giả sau 5 ngày xử lý. Cả 4 nồng độ bào tử 1.108, 5.108, 7.108, 9.108/ml đều diệt được 100% sau 21 ngày phun. Tuy nhiên, kết quả diệt rệp sáp giả của nấm *M. anisoplise* trên cây na ở điều kiện ngoài đồng ruộng thấp hơn so với ở phòng thí nghiệm, nhưng cũng đạt 56-78% (Võ Thị Thu Oanh và cs, 2008).

Năm 1998, Phạm Văn Mạnh (Viện KH Lâm nghiệp) đã nghiên cứu và sản xuất chế phẩm thuốc trừ sâu sinh học 2B có nguồn gốc từ nấm *B. bassiana* và đã thử nghiệm trên đối tượng rầy nâu hại lúa. Thuốc 2B diệt rầy nâu sau 5 ngày bắt đầu thấy hiệu lực, sau 12 ngày diệt được 50% rầy nâu. Số lượng rầy nâu giảm mạnh sau 15 ngày. Với cách trừ rầy bằng thuốc 2B chi phí rẻ hơn thuốc

trừ sâu hóa học, thuốc không gây độc cho người và sinh vật khác.

Nấm kí sinh côn trùng thường tác động đến những loại mô nhất định như tuyến mỡ và các mô khác bị hòa tan là do các enzyme (chitinase, protease, lipase) của nấm. Chúng lây lan từ con ốm sang con khỏe mạnh thông qua tiếp xúc trực tiếp hay qua nguồn thức ăn có chứa mầm bệnh. Nấm gây bệnh theo con đường chính là bào tử nảy mầm phát triển thành hệ sợi ăn sâu vào khoang bụng, qua đường tiêu hóa, thông qua các khí quản và chúng phủ kín các lỗ khí côn trùng làm chúng chết. Nấm còn gây bệnh cho côn trùng bằng cách tiết độc tố và các enzyme thủy phân. Do vậy việc dùng bào tử nấm này, rồi sản xuất hàng loạt, dùng trong nông nghiệp bảo vệ cây trồng là rất hiệu quả (Madelin 1963; Feng và cs 1954).

Trong quá trình tác động lên côn trùng, việc tiết ra các enzyme càng mạnh thì tốc độ hủy hoại và tiêu diệt côn trùng gây bệnh càng nhanh, tiết kiệm được thời gian. Dựa vào đặc tính này của nấm, việc nghiên cứu tạo ra một lượng lớn enzyme bổ sung vào chế phẩm sinh học là rất cần thiết. Chitinase là enzyme thủy phân chitin thành các đơn phân N-acetylglucosamine, chitobiose hay chitotriose qua việc xúc tác sự thủy giải liên kết -1,4-glucoside giữa C1 và C4 của 2 phân tử N-acetylglucosamine liên tiếp nhau trong chitin. Chitinase thương phẩm có giá rất đắt, đặc biệt là chitinase đã tinh sạch. Xuất phát từ thực tế trên, chúng tôi tiến hành nghiên cứu đặc tính chitinase và qui trình tạo ra chitinase cao góp phần làm tăng hiệu quả diệt rệp của chế phẩm bào tử nấm và hạ giá thành của nó.

## **MỤC TIÊU**

Nghiên cứu biểu hiện gene mã hóa chitinase trong E. coli hoặc nấm men nhằm nâng cao khả năng tạo chitinase trên cơ sở đó tiến hành tinh sạch, đánh giá tính chất hóa lí của chitinase cũng như vai trò của chitinase trong quá trình diệt rệp

## **NỘI DUNG**

Đề tài được tiến hành theo 3 chương:

Chương 1. Tổng quan tài liệu

- 1.1. Định nghĩa về chitinase
- 1.2. Nguồn gốc và phân loại chitinase
- 1.3. Cấu trúc của chitinase
- 1.4. Cơ chế xúc tác của chitinase
- 1.5. Khái quát về L. lecanii
- 1.6. Ứng dụng của chitinase
- 1.7. Ảnh hưởng của môi trường đến khả năng sinh tổng hợp chitinase
- 1.8. Tính chất lí hóa của chitinase

Chương 2. Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

- 2.1. Nguyên liệu và hóa chất
- 2.2. Phương pháp
  - 2.2.1. Nuôi cấy sinh tổng hợp chitinase
  - 2.2.2. Định tính và xác định hoạt tính chitinase
  - 2.2.3. Nghiên cứu ảnh hưởng của một số yếu tố môi trường lên khả năng sinh tổng hợp chitinase
  - 2.2.4. Tinh sạch sơ bộ và xác định tính chất lí hóa của chitinase
  - 2.2.5. Phương pháp sinh học phân tử

Chương 3. Kết quả nghiên cứu

- 3.1. Sàng lọc chủng nấm kí sinh côn trùng sinh tổng hợp chitinase
- 3.2. Phân loại chủng nấm L. Lecanii dựa vào đoạn gene 28S rRNA

- 3.3. Tối ưu các điều kiện sinh tổng hợp chitinase
  - 3.3.1. Khả năng sinh chitinase theo thời gian
  - 3.3.2. Ảnh hưởng của nồng độ cơ chất cảm ứng
  - 3.3.3. Ảnh hưởng của nguồn cacbon
  - 3.3.4. Ảnh hưởng của nguồn nitrogen
  - 3.3.5. Nhiệt độ nuôi cấy
  - 3.3.6. Ảnh hưởng của pH nuôi cấy
- 3.4. Tinh sạch sơ bộ chitinase
- 3.5. Tính chất lí hóa của chitinase
  - 3.5.1. Nhiệt độ phản ứng tối ưu
  - 3.5.2. pH phản ứng tối ưu
  - 3.5.3. Ảnh hưởng của dung môi hữu cơ
  - 3.5.4. Ảnh hưởng của ion kim loại
  - 3.5.5. Ảnh hưởng của một số chất tẩy rửa
- 3.6. Nhân dòng và xác định trình tự gene mã hóa chitinase
- 3.7. Thu nhận và xác định đặc tính của chitinase tái tổ hợp

### **PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**

- Tuyển chọn các chủng nấm diệt rệp cải hiệu quả (theo công thức của Abbott, 1925)
- Xác định hoạt tính chitinase của chủng nấm diệt côn trùng (theo Miller, 1959).
- Tinh sạch chitinase và đánh giá tính chất của chitinase.
- Nhóm phương pháp sinh học phân tử:
  - + Tách chiết và tinh sạch acid nucleic
  - + Khuếch đại gene mã hóa chitinase bằng phản ứng PCR sử dụng cặp mồi đặc hiệu.
  - + Giải trình tự DNA.
  - + Biến nạp plasmid hóa học.
  - + Biểu hiện gene mã hóa chitinase.
- Phương pháp xử lý số liệu: Sử dụng các phần mềm DNASTar, Blast và Excel.

### **HIỆU QUẢ KTXH**

### **ĐƠN VỊ SỬ DỤNG**