PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN MỘT SỐ CHỦNG NẤM SỢI CÓ KHẢ NĂNG ĐỐI KHÁNG SÂU TƠ *(Plutella xylostella)* HẠI RAU MÀU TẠI HUYỆN CHÂU THÀNH, TỈNH KIÊN GIANG

Nguyễn Văn Lẹ[1*], Hà Ngọc Bằng[2],
Nguyễn Minh Khoa[1], Bùi Xuân Khanh[2]

TÓM TẮT

Nấm sợi có khả năng tổng hợp enzyme chitinase để tiêu diệt sâu tơ (*Plutella xylostella*) bằng cách phá hủy lớp vỏ chitin và cũng có thể sử dụng nấm sợi như một tác nhân sinh học an toàn thay thế cho thuốc trừ sâu hóa học. Nghiên cứu nhằm xác định và khảo sát khả năng gây bệnh các dòng nấm sợi có khả năng đối kháng sâu tơ phân lập tại huyện Châu Thành, tỉnh Kiên Giang. Các thí nghiệm khảo sát khả năng tổng hợp enzyme chitinase và khả năng đối kháng sâu tơ của các dòng nấm sợi phân lập được bố trí trong điều kiện phòng thí nghiệm theo thể thức hoàn toàn ngẫu nhiên với 3 lần lặp lại. Định danh nấm sợi dựa vào đặc điểm hình thái và phương pháp sinh học phân tử là giải trình tự gen. Trong số các mẫu sâu tơ thu thập ngoài đồng ruộng chọn được 6 mẫu sâu tơ có nhiễm nấm sợi và phân lập được 5 chủng nấm sợi có đặc điểm hình thái khác nhau. Kết quả nghiên cứu xác định được khả năng phân giải chitin của 5 chủng nấm sợi được phân lập. Trong đó, hai chủng nấm sợi L1.3 và L2.1 có hiệu lực cao nhất với vòng phân giải chitin lần lượt là 32,0 mm và 32,3 mm và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các chủng còn lại. Đồng thời, đã định danh được chủng nấm L1.3 thuộc loài *Aspergillus sydowii* và L2.1 thuộc loài *Aspergillus protuberus*. Đánh giá được hiệu lực diệt sâu tơ của 2 chủng nấm sợi ở thời điểm 5 ngày sau xử lý đều đạt hiệu quả cao, trong đó cao nhất là chủng nấm *Aspergillus protuberus* L2.1 đạt 96,6%.

Từ khóa: *Đối kháng, enzyme chitinase, nấm sợi, sâu tơ, rau cải.*

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Việt Nam là một trong các nước sản xuất nông nghiệp với khí hậu nhiệt đới phù hợp cho sự sinh trưởng và phát triển của cây trồng. Tuy nhiên, với điều kiện này đã thuận lợi cho sâu, bệnh hại cây trồng phát triển. Trong đó, trên rau màu, sâu tơ *(Plutella xylostella)* là đối tượng sâu hại phổ biến và có khả năng kháng thuốc. Sâu tơ có ảnh hưởng rất lớn đến năng suất đây là một trong những loài sâu gây hại lớn nhất đối với rau màu nên việc phòng trừ và tiêu diệt chúng được xem là giải pháp hàng đầu. Để ứng phó với sâu tơ, nông dân thường sử dụng giải pháp sử dụng thuốc trừ sâu hóa học và đây là một trong các tác nhân ảnh hưởng đến sức khỏe con người [8]. Thuốc trừ sâu hóa học ảnh hưởng lớn đến môi trường đất, nước, không khí, sinh vật và sức khỏe của con người. Theo nghiên cứu của Phạm Minh Tuấn và *cs* (2016) thuốc trừ sâu có thể làm cho đất bị thoái hóa, bạc màu, gây chết các loài động vật xung quanh,… [9] đây cũng là tác nhân ảnh hưởng đến sức khỏe con người như gây ung thư, các bệnh về đường hô hấp, rối loạn thần kinh hoặc ngộ độc thực phẩm nếu sử dụng phải thực phẩm có tồn dư thuốc bảo vệ thực vật hóa học với hàm lượng vượt ngưỡng an toàn. Để khắc phục hạn chế trên, phương pháp tối ưu là sử dụng chế phẩm sinh học để kiểm soát sâu, bệnh trên cây trồng, biện pháp này ngày càng phổ biến hơn nhờ những ưu điểm như: hiệu quả cao, chi phí thấp và không tác động đến môi trường cũng như sức khỏe của con người.

Nấm côn trùng được nhiều nhà khoa học quan tâm và phát hiện từ rất sớm cách đây hơn 150 năm và đã xác định được nhiều loài hữu ích. Trong tự nhiên có rất nhiều loài nấm có khả năng đối kháng sâu gây hại [13]. Trong đó, nấm sợi là loài nấm đối kháng hiện đang được quan tâm nhiều trong lĩnh vực sản xuất thuốc bảo vệ thực vật trong nông nghiệp [2]. Nấm sợi có thể tổng hợp enzyme chitinase có khả năng phân hủy lớp vỏ chitin của sâu tơ. Khi côn trùng chết, nấm phát triển trong ký chủ, gặp điều kiện thích hợp tạo thành từng lớp bào tử ở bề mặt cơ thể vật chủ và phóng thích sang cá thể sâu tơ khác. Có thể sử dụng nấm như một tác nhân điều chỉnh sinh học an toàn và dễ phân hủy thay cho thuốc trừ sâu hóa học bằng cách cho bào tử nấm tiếp xúc trực tiếp với côn trùng hay sâu gây hại [5].

[1] Trường Đại học Kiên Giang
[*]Email: nvle@vnkgu.edu.vn
[2] Trường Trung cấp Việt - Hàn

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Các mẫu nấm sợi được thu thập từ sâu tơ từ cây cải ngọt, cải xanh tại huyện Châu Thành, Kiên Giang.

Các môi trường (MT) được sử dụng trong nghiên cứu gồm:

- MT1 (PGA): Khoai tây 250 g; glucose 20 g; agar 15 g; nước cất 1.000 mL.

- MT2 (PDA): Potato extract 4,0 g; glucose 20,0 g; bacteriological agar 15,0 g; pH = 6,5; nước cất 1.000 mL.

- MT3 (PGA không bổ sung agar): Khoai tây 250 g; glucose 20 g; nước cất 1.000 mL.

- MT4: $NaNO_3$ 3,5 g; K_2HPO_4 1,5 g; $MgSO_4.7H_2O$ 0,5 g; KCl 0,5 g; $FeSO_4.7H_2O$ 0,01 g; bột kitin 10 g; agar 20 g; nước 1.000 mL; pH = 6,5.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Khảo sát và thu mẫu sâu tơ nhiễm nấm sợi

Trước khi tiến hành thu mẫu ngoài thực địa, chuẩn bị dụng cụ thu mẫu như: kẹp inox, túi nylon, thùng xốp, nước đá, bút lông,...đảm bảo điều kiện vô trùng và chọn địa điểm thu mẫu. Địa điểm thu mẫu sâu tơ phải là nơi có diện tích đất trồng rau màu nhiều như: Giục Tượng, Mong Thọ A, Mong Thọ B. Cách thu mẫu sâu nhiễm nấm [4]: Sau khi xác định được địa điểm thu mẫu nấm sợi, tiến hành thu khoảng 2 - 5 mẫu sâu tơ bị nhiễm nấm ở mỗi khu vực. Dùng kẹp inox đã được khử trùng chuyển các mẫu sâu nhiễm nấm sợi ngoài tự nhiên (sâu bị nhiễm nấm sẽ xuất hiện khuẩn ty trên cơ thể) vào trong túi nylon vô trùng, ghi nhận khu vực lấy mẫu, buộc kín, đánh số thứ tự, thời gian thu mẫu, địa điểm thu mẫu, ngày, tháng thu mẫu được trữ lạnh trong thùng xốp và chuyển về phòng thí nghiệm.

2.2.2. Phân lập và tuyển chọn nấm sợi có khả năng tổng hợp enzyme chitinase

2.2.2.1. Phân lập nấm sợi

Chuẩn bị môi trường PGA: Cân 250 g khoai tây sau đó gọt vỏ, rửa sạch, thái nhỏ thêm 1.000 mL nước, đun sôi với nhiệt độ 100°C trong 30 phút, tiếp đến dùng giấy lọc lọc lấy dịch trong cho vào chai thủy tinh cùng với các thành phần còn lại của MT1, sau đó hấp khử trùng ở 121°C trong 15 phút. Bổ sung khoảng 20 mL môi trường đã tiệt trùng vào các đĩa petri vô trùng và để nguội, sau 1 - 2 ngày để kiểm tra tạp nhiễm.

Cấy nấm sợi: Mẫu sâu tơ thu về được trữ trong đĩa petri có lót giấy thấm và bông gòn để tạo ẩm độ cho nấm phát triển. Quan sát bằng mắt thường thấy tơ nấm xuất hiện thì dùng que cấy chuyền một ít tơ nấm lên môi trường PGA trong đĩa petri sau đó đem ủ ở nhiệt độ phòng, quan sát sự phát triển của nấm sợi hàng ngày. Sau vài ngày thì cấy chuyền liên tục cho đến khi có các mẫu nấm sợi thuần.

2.2.2.2. Tuyển chọn nấm sợi có khả năng tổng hợp enzyme chitinase cao

Nhân sinh khối: Giống gốc được nhân sinh khối với môi trường PDA, ủ ở nhiệt độ 30°C trong 24 giờ, theo dõi sự phát triển của khuẩn ty và thu sinh khối khi bào tử hình thành.

Thu dịch enzyme: Sau khi nấm sợi hình thành bào tử thì tiến hành thu lớp bào tử trên mặt môi trường cho vào bình tam giác có chứa môi trường PGA lỏng và lắc trên máy lắc ổn nhiệt trong 24 giờ, nhiệt độ 30°C, tốc độ lắc là 250 vòng/phút, sau 24 giờ lắc tiến hành lọc qua giấy lọc, thu dịch lọc, li tâm dịch lọc với tốc độ 5.000 vòng/phút trong 10 phút và chuyển phần dịch ly tâm cho vào các bình vô trùng.

Chuẩn bị môi trường cảm ứng tổng hợp enzyme chitinase trong các chai thủy tinh, hấp khử trùng ở 121°C trong 30 phút. Sau đó bổ sung môi trường đã tiệt trùng vào các đĩa petri với thể tích khoảng 20 mL, để nguội, ủ với thời gian 1 - 2 ngày để kiểm tra tạp nhiễm. Sử dụng pipet pasteur (d = 0,9 cm) vô trùng khoan lỗ thạch trên môi trường nuôi cấy nấm sợi ở các đĩa petri, sau đó hút 100 µl dung dịch enzyme chitinase chủng vào các giếng. Ủ ở nhiệt độ phòng (28°C - 30°C) trong 2 - 3 ngày và nhuộm với thuốc thử Lugol để quan sát vòng phân giải chikin.

Chỉ tiêu theo dõi: Thời gian phân giải sau khi chủng dung dịch có chứa enzyme chitinase, đường kính vòng phân giải. Sau đó chọn chủng nấm sợi có đường kính phân enzyme chitinase từ 20 mm trở lên để tiến hành định danh theo phương pháp của Phạm Thị Lịch (2013) [10]: i) đường kính D - d ≥ 25 mm: hoạt tính enzyme mạnh; ii) D - d ≥ 20 mm: hoạt tính enzyme khá mạnh; iii) D - d ≥ 15 mm: hoạt tính enzyme trung bình; iv) D - d ≤ 10 mm: hoạt tính enzyme yếu.

Phương pháp quan sát đặc điểm hình thái nấm sợi của Nguyễn Lân Dũng và cs, (2000) [6], kết hợp với phương pháp sinh học phân tử và khóa phân loại của Robert A. Samson và cs (2004) [11] để so sánh mức độ tương đồng và xác định tên loài.

2.2.3. Khảo sát khả năng gây bệnh của các chủng nấm sợi đến sâu tơ trong phòng thí nghiệm

2.2.3.1. Tạo quần thể sâu tơ