PHÂN LẬP VÀ ĐÁNH GIÁ HOẠT TÍNH ENZYME NGOẠI BÀO CÁC CHỦNG NẤM KÝ SINH RỆP SÁP TRÊN DỨA

Nguyễn Thị Ngọc Trúc [1], Nguyễn Duy Khiêm [2], Trần Ngọc Phú Tịnh[1], Phan Thị Mỹ Dung[1], Trương Thanh Xuân Liên [1]

[1] Viện Cây ăn quả miền Nam
[2] Sở Nông Nghiệp và PTNT Tiền Giang

ABSTRACT

There were 8 fungal strains isolated from aphids with parasitic fungi collected from pineapple fields at Tan Phuoc district, Tien Giang province. They were species of Penicillum, Paecilomyces, Aspergillus, symbolized from TG1 to TG8. Extracellular enzymes activity of these fungal strains were tested on 4 different substrates, included: cellulose (enzyme cellulase), Tween 80 (enzyme lipase), glucose (enzyme glucanase) and shrimp shell (enzyme chitinase). Results showed that strains TG3, TG4, TG5, TG6 have the highest hydrolysis activity on all 4 substrates, with hydrolysis diameter from 12 to 24mm. The molecular biology identification for strains TG6, TG3, TG4, TG5 were Paecilomyces parvisporus, Penicillium sp., Penicillium citrinum, Aspergillus ustus respectively.

Từ khóa: *Nấm ký sinh, rệp sáp, enzyme ngoại bào.*

I. GIỚI THIỆU

Cây dứa còn gọi là cây khóm hay cây thơm có tên khoa học *Ananas comosus* (Merr) thuộc họ Bromeliaceae, có tên khoa học là *Ananas comosus* (L) Merr, thuộc phân họ Bromelicideae, chi *Ananas*, loài *comosus*, là một loại quả nhiệt đới. Ở nước ta, dứa là một trong ba loại cây ăn quả hàng đầu gồm: chuối, dứa, cam quýt (Trần Thế Tục và Vũ Mạnh Hải, 2000). Tổng diện tích trồng dứa ở Việt Nam khoảng 36 nghìn ha với tổng sản lượng gần 620 nghìn tấn (FAO, 2017). Các tỉnh có diện tích canh tác dứa lớn đáng kể như Tiền Giang, Kiên Giang, Long An và Hậu Giang chiếm 70 - 80% sản lượng dứa của cả nước. Cây dứa với ưu điểm chịu phèn vì thế là loại cây trồng không thể thiếu trong cơ cấu cây trồng nông hộ ở vùng đất phèn ĐBSCL. Tỉnh Tiền Giang chiếm gần 50% diện tích trồng dứa của toàn vùng với sản lượng hằng năm khoảng 260 nghìn tấn (Viện Qui hoạch và Thiết kế nông nghiệp, 2008). Rệp sáp hại dứa (*Dysmicoccus brevipes*) là một loại côn trùng gây hại

Người phản biện: TS. Trịnh Thị Xuân.

chủ yếu trên cây dứa. *Dysmicoccus brevipes* là một yếu tố ảnh hưởng đáng kể trong trồng dứa vì nó hạn chế việc mở rộng diện tích canh tác và giảm sản lượng cây trồng (Santa - Cecília *và ctv.*, 2004). Rệp sáp hại dứa có rất nhiều thiên địch trong tự nhiên, cả ký sinh trùng và côn trùng. Một số phương pháp phòng trừ sinh học đã được đưa ra tại Hawai để kiểm soát dịch hại trên dứa. Trong đó, một số loài nấm gây bệnh cho rệp sáp (*Dysmicoccus* spp.) gồm nấm *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Paecilomyces*, *Aschersonia* sp..

II. PHƯƠNG TIỆN VÀ PHƯƠNG PHÁP

Đề tài được thực hiện từ tháng 06/2019 đến tháng 12/2019 tại Phòng Thí nghiệm Vi sinh, Bộ môn Nông học, Viện Cây ăn quả miền Nam (SOFRI). Các mẫu rệp sáp bị nấm ký sinh thu thập ở vùng trồng dứa tại tỉnh Tiền Giang. Môi trường dùng trong nghiên cứu: PDA, N1, Citrat photphat (Phạm Văn Nhạ, 2013).

Phương pháp thu mẫu: Xác định các mẫu rệp sáp bị nấm ký sinh từ mẫu ban đầu bằng phương pháp quan sát các mẫu vật theo triệu chứng của nấm ký sinh côn trùng. Mẫu được thu 01 lần, điểm thu mẫu trên mỗi ruộng được lấy tại 05 điểm ngẫu nhiên nằm trên đường chéo của khu vực thu mẫu. Mẫu vật thu thập được bảo quản riêng trong các túi nilong đã được khử trùng sau đó đem về phòng thí nghiệm bảo quản sau đó lựa chọn và phân lập nấm theo phương pháp của Barnett và Hunter (1972).

Đánh giá khả năng tiết các enzyme ngoại bào của các mẫu phân lập: Sau các ngày nuôi cấy N1, tiến hành thu dịch thể nấm chứa enzyme ngoại bào. Sử dụng môi trường đệm Citrat photphat để thử khả năng hình thành một số enzyme ngoại bào của nấm. Bổ sung 0,1% cơ chất (Tween 80, cellulose, vỏ tôm, glucoza) vào môi trường. Khoan thạch môi trường có bổ sung cơ chất và nhỏ dịch nuôi vi nấm (dịch enzym thử) vào các lỗ khoan. Ủ ở nhiệt độ phòng trong 48 giờ, sử dụng thuốc thử Lugol để đánh giá vòng phân giải.

Vòng phân giải được tính toán theo công thức: Vòng phân giải = (D - d) mm.

Trong đó: D: Đường kính vòng phân giải. d: Đường kính lỗ khoan.

Các chủng nấm sau khi đánh giá khả năng tiết enzyme ngoại bào, chọn ra các chủng có khả năng tiết enzyme ngoại bào cao. Mẫu sau đó được gửi giải trình tự 28S rRNA. Kết quả giải trình tự được Blast trên website NCBI để xác định loài.

Số liệu ở các thí nghiệm được ghi nhận và xử lý thống kê theo phương pháp phân tích phương sai ANOVA và trắc nghiệm phân hạng Ducan bằng phần mềm Statgraphics.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Thu thập, phân lập các chủng nấm ký sinh

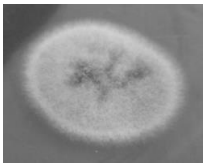
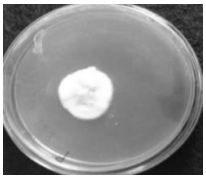
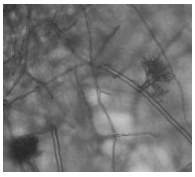
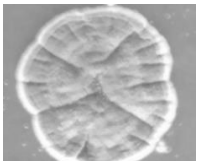
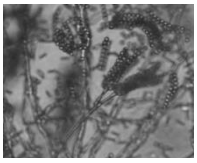
Điều tra thu thập nguồn rệp sáp bị nấm ký sinh tại 6 xã trồng dứa của tỉnh Tiền Giang bao gồm: Tân Hoà Đông, Tân Lập 2, Thạnh Tân, Thạnh Mỹ, Mỹ Phước, Thạnh Hoà. Sau khi lựa chọn các mẫu điển hình để đem về phòng thí nghiệm tiến hành phân lập và giám định loài bằng phương pháp hình thái học.

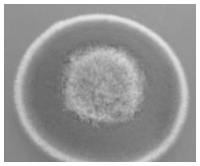
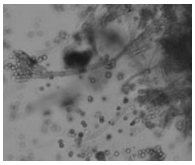
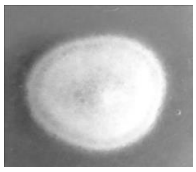
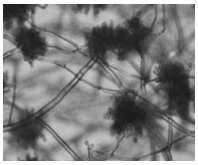
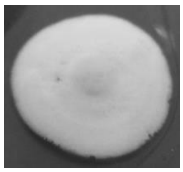
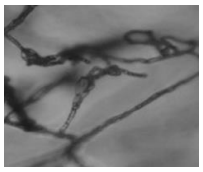
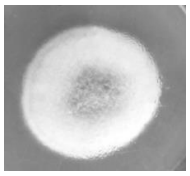
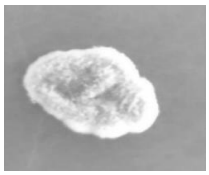
Hình 1. Thu thập mẫu nấm ký sinh rệp sáp

3.2. Định danh nấm theo đặc điểm hình thái

Sau 5 ngày nuôi cấy trên môi trường PDA, quan sát màu sắc, đặc điểm của hệ sợi nấm kết hợp với quan sát hình dạng và kích thước của bào tử dưới kính hiển vi. Kết quả phân lập và giám định như sau:

Bảng 1. Kết quả mô tả hình thái đại thể và vi thể các mẫu nấm phân lập từ rệp sáp trên dứa

TT	Ký hiệu	Mô tả	Hình đại thể	Hình vi thể	Tên nấm
1	TG1	Tản nấm có màu trắng sau chuyển màu nâu. Khối bào tử trần đỉnh bọng hình cầu. Cuống bào tử trần nhẵn không có vách ngăn ngang. Giá bào tử trần không phân nhánh, sợi nấm màu trắng ngà.			*Aspergillus*
2	TG2	Tản nấm phát triển tròn, mặt trên màu trắng, tản nấm có các rãnh. Bào tử đính kết chuỗi dài đính vào đầu sợi nấm bằng đầu bào tử đính phân nhánh.			*Penicillum*
3	TG3	Tản nấm phát triển tròn, mặt trên màu xanh lục rìa màu trắng, tản nấm có các rãnh nhỏ. Bào tử đính kết chuỗi dài đính vào đầu sợi nấm bằng đầu bào tử đính phân nhánh.			*Penicillum*

4	TG4	Tản nấm phát triển tròn, mặt trên xanh lục rìa màu trắng. Bào tử đính kết chuỗi dài đính vào đầu sợi nấm bằng đầu bào tử đính phân nhánh.			*Penicillum*
5	TG5	Tản nấm có màu trắng, chuyển thành vàng nâu, cuối cùng chuyển màu nâu. Khuẩn ty phân nhánh, có vách ngăn. Giá bào tử trần không phân nhánh, có phần đỉnh phình ra thành bọng. Khối bào tử trần dạng hình tia tỏa tròn.			*Aspergillus*
6	TG6	Màu sắc tảng nấm ban đầu có màu trắng sau chuyển sang màu kem. Sợi nấm dạng lông nhung mịn. Cuống bào tử đính dạng đơn, phân nhánh. Bào tử đính có dạng hình thoi.			*Paecilomyces*
7	TG7	Tản nấm có màu trắng, chuyển thành vàng nâu, cuối cùng chuyển màu nâu. Khuẩn ty phân nhánh, có vách ngăn. Giá bào tử trần không phân nhánh. Khối bào tử trần dạng hình tia tỏa tròn.			*Aspergillus*
8	TG8	Tản nấm ban đầu có màu trắng, sau từ từ chuyển thành vàng nâu. Khuẩn ty phân nhánh, có vách ngăn. Giá bào tử trần không phân nhánh. Khối bào tử trần dạng hình tia tỏa tròn.			*Aspergillus*

3.3. Đánh giá khả năng tiết các enzyme ngoại bào của các mẫu phân lập

Đánh giá độc lực của các mẫu nấm bằng enzyme ngoại bào. Để tuyển chọn mẫu phân lập có độc lực cao, đề tài đã tiến hành đánh giá khả năng phân giải enzyme ngoại bào của các chủng nấm với các cơ chất khác nhau, kết quả thu được thể hiện trong các bảng sau:

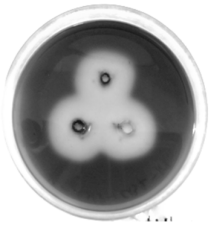
Bảng 2. Khả năng phân giải một số cơ chất của Enzyme ngoại bào 8 mẫu phân lập sau 10 ngày nuôi cấy trên môi trường N1

Chủng	Đường kính vòng phân giải trên các cơ chất (mm)			
	Chitin	Glucose	Lipid	Cellulose
TG1	12,54^{e}	6,6^{e}	11,2^{e}	8,58^{e}
TG2	15,68^{d}	6,34^{e}	9,35^{f}	5,01^{f}
TG3	24,35^{a}	17,34^{b}	15,69^{d}	16,35^{b}
TG4	23,35^{b}	21,34^{a}	19,35^{b}	15,35^{c}
TG5	24,35^{a}	12,01^{d}	14,69^{d}	13,35^{d}
TG6	23,68^{ab}	14,68^{c}	20,69^{a}	18,35^{a}
TG7	20,02^{c}	12,34^{d}	17,69^{c}	16,01^{bc}
TG8	15,68^{d}	11,68^{d}	15,69^{d}	14,01^{d}
Mức ý nghĩa	**	**	**	**
CV (%)	*3,9*	*4,9*	*4,2*	*3,9*

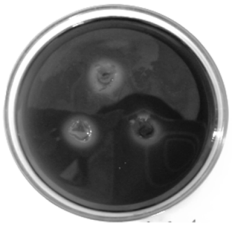
Ghi chú: Trong cùng một cột số có ít nhất một chữ cái theo sau giống nhau thì khác biệt không ý nghĩa thống kê qua kiểm định LSD, (**) khác biệt ở mức ý nghĩa 1. Giá trị trong bảng là trung bình của các lần lặp lại.

Đối với cơ chất bổ sung Chitin (vỏ tôm) mẫu phân lập TG3, TG5 và TG6 cho kết quả cao nhất lần lượt là 24,35 mm, 24,35 mm và 23,68 mm. Mẫu phân lập TG1 cho kết quả thấp nhất 12,54 mm. Mẫu phân lập TG6 không có sự khác biệt với mẫu phân lập TG4.

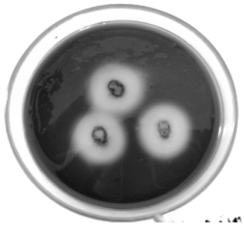
Hình 2. Chủng nấm TG1 trên môi trường bổ sung chitin



Hình 3. Chủng nấm TG5 trên môi trường bổ sung chitin



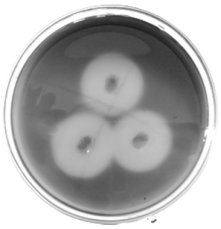
Hình 4. Chủng nấm TG1 trên môi trường bổ sung glucose



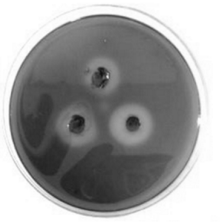
Hình 5. Chủng nấm TG4 trên môi trường bổ sung glucose

Đối với cơ chất bổ sung Glucose mẫu phân lập TG4 cho kết quả cao nhất 21,34 mm kế đến là mẫu phân lập TG3 với kích thước vòng phân giải 17,34 mm. Kết quả thí nghiệm cũng cho thấy vòng phân giải thấp nhất ở mẫu phân lập TG2, TG1 lần lượt đạt 6,34 mm và 6,6 mm.

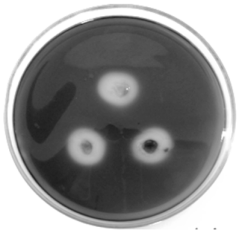
Trên môi trường bổ sung lipid (Tween 80) mẫu phân lập TG6 cho kết quả cao nhất so với các nghiệm thức còn lại đạt vòng phân giải 20,69 mm và mẫu phân lập TG4 cho kết quả vòng phân giải đạt 19,35 mm. Các mẫu phân lập TG1 và TG2 vẫn cho kết quả thấp nhất với đường kính vòng phân giải lần lượt là 11,2 mm và 9,35 mm.



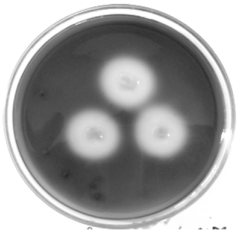
Hình 6. Chủng nấm TG6 trên môi trường bổ sung lipid



Hình 7. Chủng nấm TG1 trên môi trường bổ sung lipid



Hình 8. Chủng nấm TG2 trên môi trường bổ sung cellulose



Hình 9. chủng nấm TG3 trên môi trường bổ sung cellulose

Đối với môi trường bổ sung cellulose vẫn cho kết quả cao ở mẫu phân lập TG6 với đường kính vòng phân giải đạt 18,35 mm tiếp theo là mẫu phân lập TG3 (đạt 16,35 mm). Kết quả thí nghiệm vẫn thấp nhất ở 2 mẫu phân lập TG1, TG2 với đường kính vòng phân giải đạt 8,58 mm và 5,01 mm.

Trêm 4 loại môi trường được bổ sung cơ chất để đánh giá khả năng phân giải cơ chất của một số eyme ngoại bào cho thấy các mẫu phân lập TG3, TG4, TG5, TG6 bước đầu được đánh giá khá tốt.

3.4. Định danh các mẫu phân lập bằng kỹ thuật sinh học phân tử

Sử dụng chương trình BLAST N và BioEdit để so sánh trình tự các đoạn DNA của 4 mẫu phân lập với trình tự DNA của bộ gen ở các loài nấm có trong Ngân hàng Gen (NCBI).

Bảng 3. So sánh trình tự gene của các mẫu nấm đã phân lập trên NCBI

Mẫu nấm	Loài xác định	Độ tương đồng (%)	Mã Genbank	Tác giả và năm công bố*	Quốc gia
TG3	*Penicillium* sp.	100	MK817609.1	Jiang, 2019	Trung Quốc
TG4	*Penicillium citrinum*	99,81	KJ173539.1	Zhang và Qi, 2014	Trung Quốc
TG5	*Aspergillus ustus*	89,1	KY203997.1	Prameela, Tyagi và Kamil, 2016	Ấn Độ
TG6	*Paecilomyces parvisporus*	99,27	JQ776543.1	Raja, Subhashini và Thangaradjou, 2012	Ấn Độ

Ghi chú: * Nguồn trích dẫn bởi NCBI (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast).

IV. KẾT LUẬN

Đề tài đã phân lập được 8 chủng nấm thuộc các loài *Penicillum, Paecilomyces, Aspergillus*. Kết quả thử nghiệm hoạt tính enzyme ngoại bào cho thấy các chủng nấm TG3, TG4, TG5, TG6 có hoạt tính thủy phân cao nhất trên cả 4 loại cơ chất tween, cellulose, glucose và vỏ tôm, với đường kính thủy phân từ 12 - 24 mm. Kết quả định danh sinh học phân tử cho kết quả chủng TG6 - *Paecilomyces parvisporus*, TG3 - *Penicillium* sp., TG4 - *Penicillium citrinum*, TG5 - *Aspergillus ustus*, *Aspergillus pseudodeflectus*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Barnett, H. L. and Hunter, B.B. (1972). Illustrated Genera of Imperfect Fungi. 3rd Edition, Burgess Publishing Co., Minneapolis, 241 p.
2. FAOSTAT - Food and Agriculture Organization of the United Nations (2018). http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC
3. Phạm Văn Nhạ, Hồ Thị Thu Giang, Phạm Thị Vượng, Đồng Thị Thanh, Trần Thị Tuyết, Đặng Thanh Thúy, Phạm Duy Trọng (2011). Giám định một số chủng nấm ký sinh rệp sáp hại cà phê bằng phương pháp DNA. *Tạp chí Khoa học và Phát triển*, 9: 713 - 718.
4. Santa - Cecília, L. V. C., Bueno, V. H. P., Prado, E. (2004). *Desenvolvimento de Dysmicoccus brevipes (Cockerell) (Hemiptera: Pseudococcidae) em duas cultivares de abacaxi.* Ciência e Agrotecnologia, v. 28, n. 5, p. 1015 - 1020.
5. Trần Thế Tục và Vũ Mạnh Hải (2000). *Kỹ thuật trồng dứa*. Nhà xuất bản Nông nghiệp, Hà Nội, tr. 3 - 47.
6. Viện Quy hoạch và Thiết kế nông nghiệp (2008). Điều tra, khảo sát, nghiên cứu xác định vùng trồng rừng Tân Phước - tỉnh Tiền Giang, Tiền Giang, tháng 8/2008.