

## NÂNG CAO ĐỘ LỰC DIỆT RỆP ĐÀO CỦA CHỦNG NẤM KÍ SINH CÔN TRÙNG LECANICILLIUM BẰNG ĐỘT BIẾN TIA CỰC TÍM (UV) VÀ N-METHYL-N'-NITRO-N-NITROSOGUANIDINE (NTG) NHẪM SẢN XUẤT THUỐC TRỪ SÂU SINH HỌC

Vũ Văn Hạnh<sup>1</sup>, Lê Thị Thùy Dương<sup>1</sup>, Quyền Đình Thi<sup>1,\*</sup>, Nguyễn Thị Thu Thủy<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Viện Công nghệ sinh học, Viện KHCNVN, Số 18 Đường Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội

<sup>2</sup>Đại học Mở Hà Nội

\*E-mail: quyen@ibt.ac.vn

Đến Tòa soạn: 30/3/2012; Chấp nhận đăng: 16/5/2012

### TÓM TẮT

Nấm thuộc chi *Lecanicillium* là loài kí sinh gây bệnh quan trọng đối với côn trùng phá hại cây và một vài chủng nấm thuộc chi này đã được phát triển thành thuốc trừ sâu sinh học thương mại. Trong số các chủng nghiên cứu, chủng nấm kí sinh côn trùng L43 có độc tính rất mạnh đối với rệp đào (*Myzus persicae*), diệt 100 % rệp sau 5 ngày phun bào tử, ở 23 – 27 °C và 75 – 85 % độ ẩm không khí. Chủng L43 được định tên thuộc chi *Lecanicillium* bằng đọc trình tự đoạn gene 28S rRNA, có độ tương đồng 99,5 % so với trình tự đã công bố trên GenBank. Để nâng cao độ lực diệt rệp của nấm, tế bào trần của chủng *Lecanicillium* sp. L43 được gây đột biến bằng tia cực tím (UV) và hóa chất N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. Trong số 42 dòng nấm đột biến đã sàng lọc, 2 thể đột biến UV (UV10.4 và UV60.3) và 3 thể đột biến NTG (NTG30.2, NTG50.2 và NTG60.4) diệt 100 % rệp muội sau 4 đến 5 ngày phun. Độ lực của các thể đột biến tăng từ 10 đến 20 % so với kiểu dại, ở 25 – 29 °C và 75 – 85 % độ ẩm không khí. Những kết quả thu được cho thấy, các thể đột biến chọn lọc này của chủng *Lecanicillium* sp. L43 là nguồn nguyên liệu quý để nghiên cứu tiếp và có tiềm năng để phát triển thành chế phẩm vi sinh dùng trong kiểm soát sinh học dịch hại cây trồng.

**Từ khóa:** đột biến, tế bào trần, *Lecanicillium*, rệp đào *Myzus persicae*, rệp bông *Aphis gossypii*, tia cực tím, N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine.

### 1. MỞ ĐẦU

Nấm *Lecanicillium* có thể sợi màu trắng, tốc độ tăng trưởng của thể sợi 3 - 4 mm/ngày. Bào tử đính có hình elip 4 - 5,6 × 1,6 - 2,4 µm [1]. Trong tự nhiên, *Lecanicillium* thường gây dịch bệnh trên quần thể rệp muội, cánh trắng [2] và có độc tính rất mạnh đối với một số loài rệp muội như: rệp bông (*A. Gossypii*) và rệp đào (*M. Persicae*), khả năng diệt rệp bông mạnh hơn rệp đào [3, 4, 5, 6, 7, 8]. Nấm *Lecanicillium* cũng kí sinh trên nhiều loại côn trùng bao gồm bộ cánh đều, bộ cánh cứng, cánh thẳng và bướm [9, 10, 11].

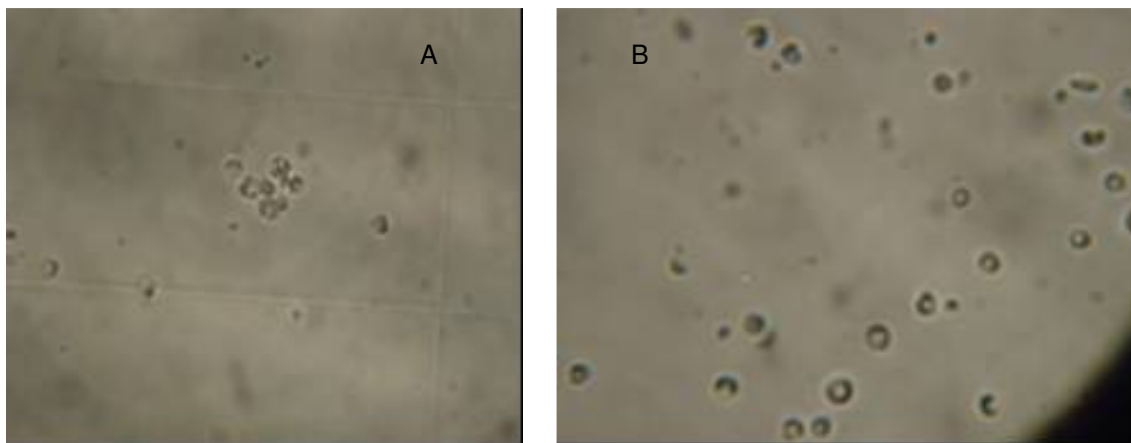
Bào tử nấm *Lecanicillium* đã và đang rất được quan tâm để kiểm soát côn trùng và sâu hại cây [12, 13]. Bào tử *Lecanicillium* có thể được sử dụng với hỗn hợp của một số thuốc trừ sâu hay thuốc diệt nấm trong các chương trình kiểm soát dịch hại cây trồng thích hợp để có được một hiệu ứng cao hơn [14]. *Lecanicillium lecanii* ảnh hưởng đến khả năng sinh sản của rệp bông và làm giảm sức sống của rệp [15]. Trong phòng thí nghiệm, *L. muscarium* diệt bọ dừa *Thripspalmi* [16], *L. indicum* và *L. lecanii* thể hiện độc tính rất mạnh đối với mối *Cryptotermes brevis*, khả năng gây chết mối bởi hai loài nấm này cao hơn so với nấm *Metarhizium. anisopliae* [17].

Ở nước ta, nấm *M. anisopliae* và *Beauveria bassiana* đã được các nhà khoa học trong nước nghiên cứu vì khả năng kí sinh trên một số loại côn trùng như tằm, rệp muội và bọ. Theo nghiên cứu của một số tác giả, bào tử nấm *M. anisopliae* dùng để kiểm soát rệp sáp giả [18]; chế phẩm bào tử nấm *B. bassiana* diệt rầy nâu hại lúa [19]. Việc sử dụng chế phẩm bào tử nấm kí sinh côn trùng để bảo vệ cây trồng đang dần được người nông dân quan tâm sử dụng. Tuy nhiên, *Lecanicillium* chưa được nghiên cứu để sử dụng trong kiểm soát côn trùng hại cây.

Mục đích của nghiên cứu này nhằm nâng cao độc tính diệt rệp muội của nấm *Lecanicillium*, tia cực tím (UV, ultra violet) và hóa chất (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine) được dùng để gây đột biến tế bào trần của chủng nấm. Sau đó chọn lọc các biến thể có độc tính mạnh đối với rệp muội dùng để nghiên cứu tiếp. Việc nghiên cứu, sản xuất các chế phẩm sinh học từ nấm kí sinh để kiểm soát rệp muội và côn trùng hại cây giúp phần làm giảm dần lượng thuốc trừ sâu hóa học sử dụng trong nông nghiệp, góp phần duy trì và phát triển nền nông nghiệp bền vững, thân thiện với môi trường, không gây ảnh hưởng tiêu cực đến sức khỏe của con người, vật nuôi là cần thiết và cấp bách hiện nay.

## 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### 2.1. Tạo tế bào trần



Hình 1. Tế bào trần chủng nấm L43 sau 1 giờ (A) và 5 giờ ủ (B) với hỗn hợp dung dịch enzyme dưới kính hiển vi quang học, độ phóng đại 640 lần

Quan sát dưới kính hiển vi quang học với độ phóng đại 640 lần cho thấy, sau 1 giờ ủ với các enzyme thủy phân thành tế bào chưa bị tách rõ rệt ra khỏi màng sinh chất và tạo thành các chùm tế bào tập trung gần nhau (hình 1A). Sau 5 giờ ủ, thành của tế bào đã bị phân hủy và tách hoàn toàn khỏi màng sinh chất, tạo ra các tế bào trần không có thành, tách rời riêng biệt (hình 1B). Màng sinh chất của tế bào mỏng, yếu ớt, dễ bị tổn thương bởi chất hóa học và yếu tố vật lý. Do vậy khi sử dụng tia UV hoặc xử lý với hóa chất NTG để gây đột biến đối với tế bào trần sẽ cho hiệu quả cao hơn.

## 2.2. Tác nhân gây đột biến

### 2.2.1. Tạo đột biến đối với tế bào trần bằng tia cực tím

Tia UV có thể tạo ra đột biến giữa 2 vòng pyrimidine (cytosine hoặc thymine) để tạo nên 2 liên kết dimer giữa chúng. Tia cực tím tạo ra cầu nối dimer giữa các nhóm cytosine ở gần nhau. Việc dimer cytosine có thể tạo ra adenine (thay vì guanine) được bổ sung vào các sợi mới. Quá trình sao chép ADN, CC (thể đại) → TT (đột biến). Mặc dù, các đột biến điểm dimer cytosine trên ADN có thể được sửa bởi hệ thống của tế bào nhưng không thể hết. Kết quả là cặp GC, GC (tự nhiên) → AT, AT (đột biến) sau khi bị chiếu tia cực tím.

### 2.2.2. Cách tiến hành đột biến với tia UV

500 µl dung dịch tế bào trần được cho vào 1 đĩa petri nhựa (9 cm × 1,5 cm), chuẩn bị 2 đĩa, nghiêng đĩa để tế bào phân bố đều, bật tia UV (50 Wát), khoảng cách từ nguồn UV đến đĩa là 30 cm. Sau 10, 20, 30, 40, 50, 60 và 80 phút chiếu UV, 100 µl dịch đã chiếu được hút cho vào ống eppendorf để ở nhiệt độ phòng. 100 µl dịch pha loãng từ  $10^{-1}$  đến  $10^{-7}$  được trang lên đĩa PDA, ủ 4 - 6 ngày ở 25 °C. Khi nấm đã mọc, đếm số lượng khuẩn lạc trên đĩa thí nghiệm và đối chứng (không xử lý đột biến) để dựng đồ thị sống sót của bào tử sau chiếu UV. Từ các đĩa nấm đã mọc, nhặt ngẫu nhiên 5 khuẩn lạc/ liều UV đã xử lý (bảng 1), cấy trên đĩa PDA, ủ ở 25 °C, sau 10 ngày thu bào tử để thử độc tính diệt rệp đào.

Bảng 1. Số lượng khuẩn lạc được nhặt ngẫu nhiên của chủng nấm L43 sau khi chiếu tia UV

| Thời gian chiếu tia UV (phút) | Số lượng khuẩn lạc | Kí hiệu của các thể đột biến           |
|-------------------------------|--------------------|----------------------------------------|
| 10                            | 5                  | uv10.1; uv10.2; uv10.3; uv10.4; uv10.5 |
| 20                            | 5                  | uv20.1; uv20.2; uv20.3; uv20.4; uv20.5 |
| 30                            | 5                  | uv30.1; uv30.2; uv30.3; uv30.4; uv30.5 |
| 40                            | 5                  | uv40.1; uv40.2; uv40.3; uv40.4; uv40.5 |
| 50                            | 5                  | uv50.1; uv50.2; uv50.3; uv50.4; uv50.5 |
| 60                            | 5                  | uv60.1; uv60.2; uv60.3; uv60.4; uv60.5 |
| 80                            | 4                  | uv80.1; uv80.2; uv80.3; uv80.4         |

### 2.2.3. Tạo đột biến tế bào trần bằng NTG (*N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine)

NTG là một trong những hóa chất gây đột biến được sử dụng phổ biến trong nghiên cứu hiện nay, có công thức phân tử  $C_2H_5N_5O_3$ . NTG gây đột biến mạnh thuộc lớp alkyl hóa. Dạng alkyl hóa gây đột biến bằng cách thêm nhóm methyl hoặc nhóm ethyl trên các bazơ, ở đó tạo sự thay đổi khi kết cặp của các bazơ trên sợi DNA. Cơ chế của sự đột biến này là đột biến điểm, làm biến đổi bazơ gây ra sự kết cặp sai. NTG là tác nhân gây đột biến hiệu quả cao nhất đối với vi sinh vật. Khoảng 90 % các đột biến do NTG gây ra là các đột biến điểm, thay thế cặp GC bằng cặp AT, một số rất ít các trường hợp dẫn đến dịch chuyển khung đọc hoặc mất đoạn.

### 2.2.4. Cách tiến hành đột biến với NTG

Sau 5 ngày nuôi chủng nấm L43 trong môi trường PDB, 2 ml dịch bào tử ( $10^8$  bào tử/ml) được li tâm 10 phút với 5000 rpm ở 4 °C. Bào tử được hòa vào 1,5 µl dung dịch NTG, 100 mg NTG/1 ml đệm 0,2 M citrate, pH 5) và lắc kĩ. Sau thời gian ủ 10, 20, 30, 40, 50, 60 và 80 phút, 50 µl dịch bào tử được hòa vào 45 ml dung dịch 0,9 % NaCl (bảng 2). Hỗn hợp được li tâm 10 phút với 4000 rpm ở 4 °C để loại hóa chất và thu bào tử, lặp lại quá trình này 3 lần. Sau đó, dịch bào tử được pha loãng ở các nồng độ  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  rồi cấy trải trên các đĩa thạch PDA bổ sung ampicillin (100 mg/l) và ủ 3 - 5 ngày ở 25 °C rồi đếm số khuẩn lạc mọc.

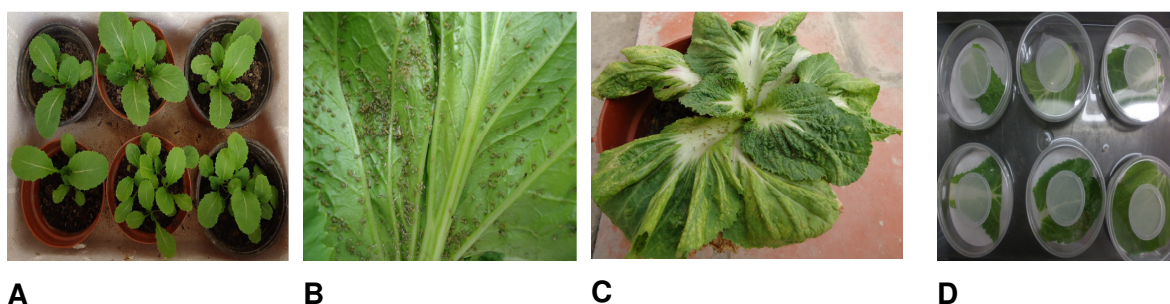
Bảng 2. Số lượng khuẩn lạc được nhặt ngẫu nhiên sau xử lí chủng nấm L43 với NTG

| Thời gian xử lí (phút) | Số khuẩn lạc | Kí hiệu của các dòng đột biến                |
|------------------------|--------------|----------------------------------------------|
| 10                     | 5            | NTG10.1; NTG10.2; NTG10.3; NTG10.4; NTG 10.5 |
| 20                     | 5            | NTG20.1; NTG20.2; NTG20.3; NTG20.4; NTG 20.5 |
| 30                     | 5            | NTG30.1; NTG30.2; NTG30.3; NTG30.4; NTG 30.5 |
| 40                     | 5            | NTG40.1; NTG40.2; NTG40.3; NTG40.4; NTG 40.5 |
| 50                     | 5            | NTG50.1; NTG50.2; NTG50.3; NTG50.4; NTG 50.5 |
| 60                     | 5            | NTG60.1; NTG60.2; NTG60.3; NTG60.4; NTG 60.5 |

### 2.3. Nuôi rệp, phun dịch bào tử trên rệp hại cây

Rệp đào *Myzus persicae* khoảng 2 - 3 ngày tuổi lấy từ đồng ruộng được nuôi trên lá cải thảo mua ngoài chợ đặt trong hộp ( $40 \times 30 \times 20 \text{ cm}^3$ ) ở 24 - 27 °C và độ ẩm 80 - 85 % (hình 2A-C). 15 ml dịch bào tử nấm ( $10^8$  bào tử/ml) trong 0,05 % Tween 80 được phun ở dạng sương với khoảng cách 30 cm lên lá cải đã có sẵn rệp. Lô đối chứng (ĐC) chỉ phun 0,05 % Tween 80, đặt lá cải đã phun vào trong hộp (hình 2D). Hàng ngày theo dõi số lượng rệp chết bởi nấm, quan sát trong 7 ngày, để đánh giá độc tính diệt rệp. Công thức tính % rệp chết theo Abbott, trong đó a: tỉ lệ (%) số rệp sống sót trên lô thí nghiệm, b: tỉ lệ (%) số rệp sống sót trên lô đối chứng [20].

$$\text{Tỉ lệ rệp chết (\%)} = \left(1 - \frac{a}{b}\right) \times 100.$$



Hình 2. A, Cải xanh được trồng trong chậu để nuôi rệp đào *Myzus persicae* dùng cho thí nghiệm;  
B, Rệp đào *M. persicae* được nuôi thuần chủng trên cải xanh, để thu rệp thử độc tính của nấm;  
C, Rệp đào chích hút nhựa cây sau 5 ngày làm cây héo cạn dinh dưỡng và chết;  
D, Rệp được đưa vào lá cải xanh để phun bào tử và làm ĐC

### 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. Sàng lọc chủng nấm có độc tính diệt rệp đào *Myzus persicae*

Sau 5 ngày phun bào tử, các chủng nấm 185, 485, 8514, L43 và Le85 đều diệt được 100 % rệp (bảng 3). Hai chủng nấm 1039 và 1035 ở cùng điều kiện chỉ diệt được 69 và 77 % rệp (bảng 3). Thời gian gây chết một nửa số rệp thí nghiệm  $LT_{50}$  của chủng L43 là 3 ngày, thấp hơn các chủng còn lại. Do vậy, chủng nấm L43 được chọn để gây đột biến nhằm tạo ra những biến thể mới có độc tính diệt rệp tăng.

Bảng 3. Độc tính diệt rệp đào của các chủng nấm ở 25 – 28 °C, độ ẩm 75 – 85 %

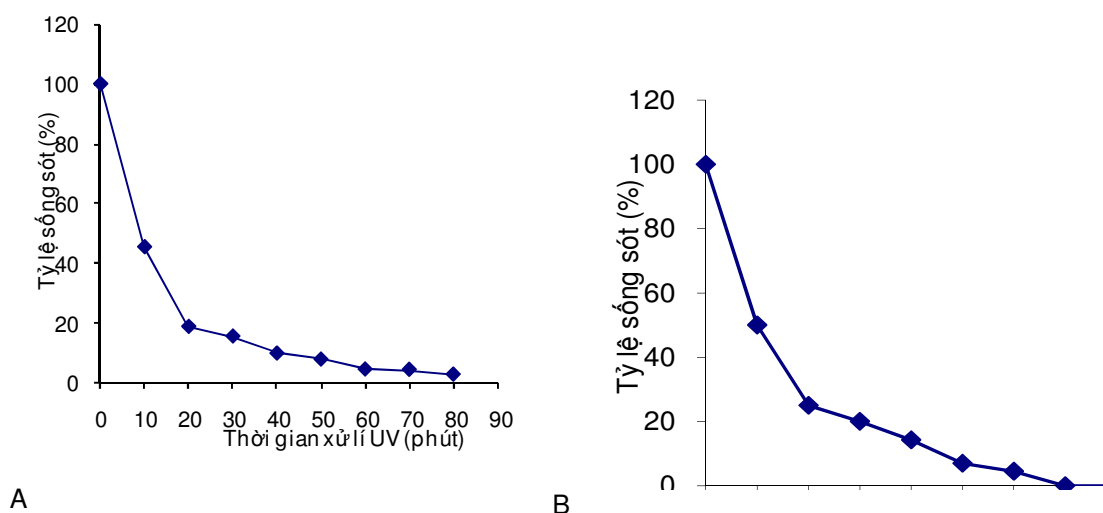
| Các chủng  | Phần trăm rệp đào chết sau thời gian (ngày) xử lí với các chủng nấm |    |    |           |            |            |            |
|------------|---------------------------------------------------------------------|----|----|-----------|------------|------------|------------|
|            | 1                                                                   | 2  | 3  | 4         | 5          | 6          | 7          |
| 185        | 0                                                                   | 0  | 50 | 79        | <b>100</b> | <b>100</b> | <b>100</b> |
| 485        | 5                                                                   | 16 | 50 | 86        | <b>100</b> | <b>100</b> | <b>100</b> |
| 1039       | 0                                                                   | 5  | 25 | 43        | 69         | 77         | 77         |
| 1035       | 0                                                                   | 11 | 38 | 64        | 77         | 77         | 85         |
| 8514       | 0                                                                   | 11 | 75 | 79        | <b>100</b> | <b>100</b> | <b>100</b> |
| 85K        | 5                                                                   | 11 | 25 | 57        | 85         | 100        | 100        |
| <b>L43</b> | 0                                                                   | 16 | 56 | <b>93</b> | <b>100</b> | <b>100</b> | <b>100</b> |
| Le85       | 0                                                                   | 4  | 48 | 68        | <b>100</b> | <b>100</b> | <b>100</b> |
| ĐC         | 0                                                                   | 0  | 0  | 0         | 0          | 0          | 0          |

Nấm thuộc chi *Lecanicillium* kí sinh gây bệnh mạnh đối với côn trùng và một vài chủng nấm thuộc chi này đã được phát triển thành sản phẩm thương mại diệt côn trùng hại cây. Trong số các chủng nấm đã thí nghiệm, chủng *Lecanicillium* sp. L43 có độc tính mạnh diệt rệp đào, được chọn để nghiên cứu tiếp.

### 3.2. Độc tính của các thể đột biến

#### 3.2.1. Ảnh hưởng của tia UV, NTG đến khả năng sống sót của tế bào trần

Tia UV, NTG có ảnh hưởng rõ rệt đến khả năng sống sót của tế bào. Thời gian chiếu UV, hoặc xử lí NTG càng lâu thì khả năng sống sót của tế bào càng giảm. Tia UV, NTG đã tác dụng lên tế bào nấm, tạo nên các đột biến gây chết, làm giảm số lượng tế bào sống sót (hình 3A, 3B).



Hình 3. Tỉ lệ (%) sống sót của tế bào trần L43 sau thời gian 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 và 80 phút xử lí bởi tia cực tím UV (A); bởi NTG (B)

Tỉ lệ (%) sống sót của tế bào trần giảm mạnh khi xử lí UV sau 20 phút (18,56 %), sau 60 phút (4,23 %), sau 80 phút (2,5 %). Tương tự, tỉ lệ (%) sống sót của tế bào trần sau xử lí NTG cũng giảm mạnh, sau 20 phút (25 %), sau 60 phút (11 %), sau 80 phút (4 %) (hình 3A, 3B). Vì tia UV, hóa chất NTG có khả năng tạo đột biến ngẫu nhiên trên vật liệu di truyền của tế bào trần, tạo nguyên liệu biến đổi di truyền quan trọng để chọn lọc. Nên các khuẩn lạc sau xử lí ở các khoảng thời gian khác nhau được nhặt ngẫu nhiên để nghiên cứu.

#### 3.2.2. Độc tính diệt rệp của các thể đột biến bằng UV

Ở liều chiếu 10 phút tia UV, các đột biến UV10.1 và UV10.4 có độc tính diệt rệp đào mạnh nhất, diệt 100 % rệp sau 5 ngày phun, cao hơn 5 % so với chủng gốc L43 (bảng 4). Các đột biến còn lại diệt 63 đến 88 % rệp sau 5 ngày phun. Tiếp theo, đột biến UV60.3 (60 phút chiếu UV) diệt 100 % rệp đào sau 4 ngày phun, cao hơn hẳn so với chủng gốc L43 và các dòng đột biến còn lại chỉ diệt được 10 đến gần 70 %.

Sau thời gian chiếu UV 80 phút, các khuẩn lạc đột biến được kiểm tra về khả năng diệt rệp không cao sau 6 ngày diệt 75 % rệp bởi UV80.1, diệt 25 % bởi UV 80.2, diệt 42 % bởi UV80.3 và diệt 67 % bởi UV80.4. Như vậy, sau khi chiếu tia UV với thời gian khác nhau, ba đột biến UV10.1, UV10.4 và UV60.3 diệt rệp mạnh hơn so với chủng gốc L43 từ 6 đến 12 % sau 4 ngày phun được chọn để nghiên cứu tiếp.

Bảng 4. Độ tính diệt rệp đào của các dòng đột biến L43 bằng tia UV, ở 25 – 28 °C, độ ẩm 75 – 85 %

| Dòng đột biến  | Phần trăm rệp đào chết sau thời gian (ngày) xử lí với các dòng đột biến |    |    |            |            |            |            |
|----------------|-------------------------------------------------------------------------|----|----|------------|------------|------------|------------|
|                | 1                                                                       | 2  | 3  | 4          | 5          | 6          | 7          |
| <b>uv 10.1</b> | 20                                                                      | 50 | 63 | <b>94</b>  | <b>100</b> | <b>100</b> | <b>100</b> |
| uv 10.2        | 15                                                                      | 35 | 56 | 69         | 88         | 94         | 100        |
| uv 10.3        | 35                                                                      | 45 | 56 | 69         | 75         | 88         | 94         |
| <b>uv 10.4</b> | 15                                                                      | 25 | 38 | <b>94</b>  | <b>100</b> | <b>100</b> | <b>100</b> |
| uv 20.1        | 30                                                                      | 50 | 44 | 63         | 75         | 75         | 94         |
| uv 20.2        | 10                                                                      | 45 | 56 | 63         | 63         | 100        | 100        |
| uv 20.3        | 40                                                                      | 45 | 38 | 56         | 94         | 94         | 100        |
| L43            | 5                                                                       | 30 | 31 | 88         | 88         | 88         | 94         |
| uv20.5         | 20                                                                      | 28 | 39 | 44         | 42         | 50         | 92         |
| uv40.1         | 10                                                                      | 22 | 61 | 81         | 75         | 100        | 100        |
| uv40.2         | 15                                                                      | 50 | 67 | 81         | 75         | 100        | 100        |
| uv40.3         | 15                                                                      | 22 | 44 | 44         | 25         | 58         | 100        |
| uv40.4         | 15                                                                      | 22 | 56 | 69         | 67         | 67         | 100        |
| uv60.1         | 15                                                                      | 22 | 39 | 44         | 25         | 33         | 92         |
| uv60.2         | 30                                                                      | 33 | 61 | 56         | 58         | 67         | 100        |
| L43            | 15                                                                      | 17 | 56 | 69         | 75         | 100        | 100        |
| <b>uv60.3</b>  | 10                                                                      | 39 | 83 | <b>100</b> | <b>100</b> | <b>100</b> | <b>100</b> |
| uv60.4         | 0                                                                       | 0  | 17 | 6          | 8          | 25         | 75         |
| uv60.5         | 5                                                                       | 6  | 22 | 38         | 58         | 83         | 100        |
| uv80.1         | 30                                                                      | 33 | 44 | 44         | 42         | 75         | 100        |
| uv80.2         | 20                                                                      | 17 | 33 | 38         | 25         | 25         | 92         |
| uv80.3         | 30                                                                      | 28 | 44 | 38         | 33         | 42         | 75         |
| uv80.4         | 20                                                                      | 28 | 33 | 44         | 42         | 67         | 100        |
| L43            | 15                                                                      | 17 | 50 | 63         | 67         | 92         | 92         |
| ĐC             | 0                                                                       | 0  | 0  | 0          | 0          | 0          | 0          |

### 3.2.3. Độ tính diệt rệp của các thể đột biến bằng NTG

Qua thử nghiệm độ tính diệt rệp đào của 21 thể đột biến bằng NTG (bảng 5), 4 dòng đột biến NTG30.2, NTG50.1, NTG50.2, NTG60.4 diệt 100 % rệp sau 4 ngày phun, trong khi đó chủng gốc L43 diệt 100 % rệp sau 6 ngày phun (bảng 5). Sau khi sàng lọc từ 42 đột biến (21

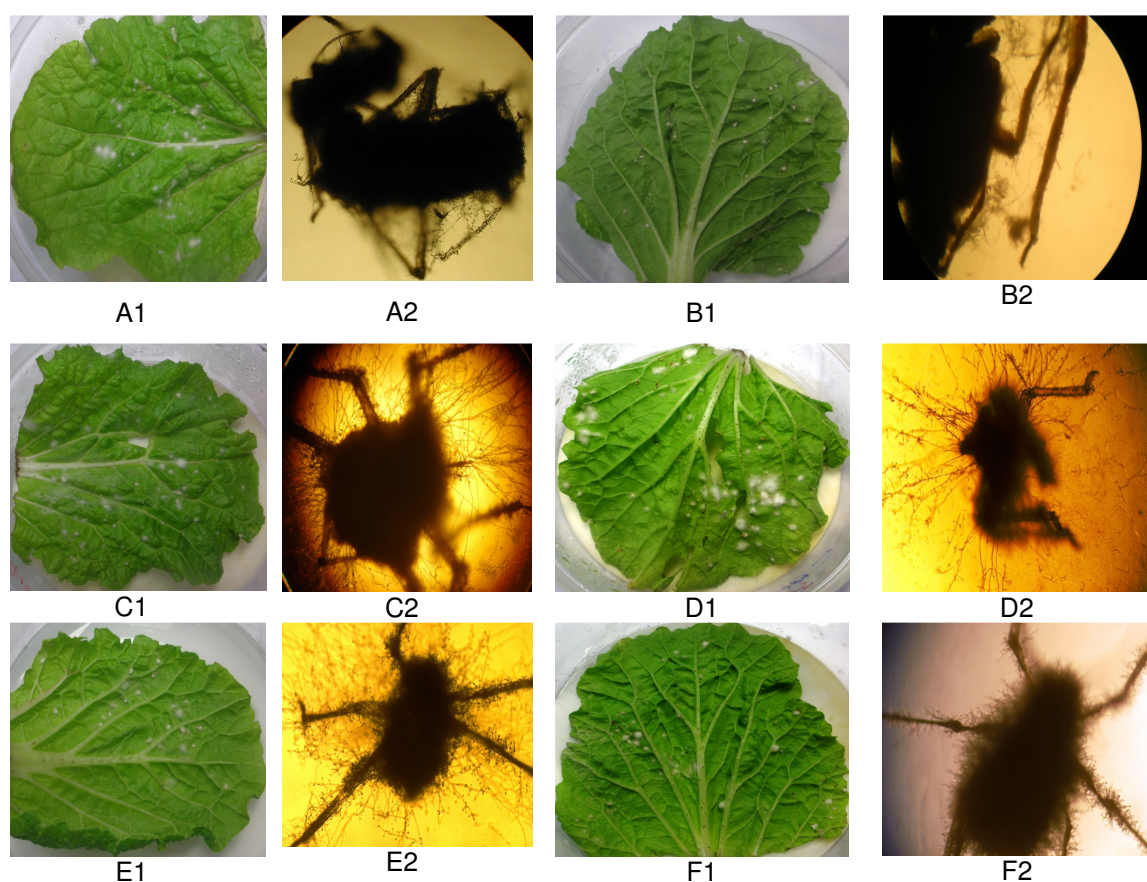
dòng bằng UV và 21 dòng bằng NTG), kết quả độc tính diệt rệp cho thấy, các dòng đột biến UV10.1, UV10.4, UV60.3, NTG30.2, NTG50.1, NTG50.2 và NTG60.4 có khả năng diệt rệp mạnh hơn so với chủng gốc L43 từ 6 đến 28 % sau 4 đến 5 ngày phun.

*Bảng 5. Độc tính diệt rệp đào của các dòng đột biến L43 bằng NTG, ở 25 – 28 °C, độ ẩm 75 – 85 %*

| Dòng đột biến  | Phần trăm rệp đào chết sau thời gian (ngày) xử lí với các dòng đột biến |    |    |            |            |            |            |
|----------------|-------------------------------------------------------------------------|----|----|------------|------------|------------|------------|
|                | 1                                                                       | 2  | 3  | 4          | 5          | 6          | 7          |
| NTG10.1        | 10                                                                      | 19 | 19 | 81         | 81         | 100        | 100        |
| NTG10.3        | 15                                                                      | 19 | 56 | 75         | 94         | 100        | 100        |
| NTG10.4        | 5                                                                       | 0  | 25 | 56         | 63         | 93         | 100        |
| NTG20.2        | 0                                                                       | 6  | 44 | 56         | 69         | 93         | 100        |
| NTG20.5        | 20                                                                      | 13 | 25 | 69         | 94         | 100        | 100        |
| NTG30.1        | 0                                                                       | 0  | 19 | 75         | 88         | 100        | 100        |
| <b>NTG30.2</b> | 10                                                                      | 0  | 13 | <b>100</b> | <b>100</b> | <b>100</b> | <b>100</b> |
| NTG30.3        | 20                                                                      | 0  | 50 | 75         | 100        | 100        | 100        |
| L43            | 15                                                                      | 6  | 25 | 56         | 81         | 93         | 100        |
| NTG40.1        | 5                                                                       | 15 | 44 | 72         | 94         | 94         | 100        |
| NTG40.5        | 0                                                                       | 10 | 39 | 67         | 75         | 94         | 100        |
| <b>NTG50.1</b> | 0                                                                       | 10 | 83 | <b>100</b> | <b>100</b> | <b>100</b> | <b>100</b> |
| NTG60.1        | 5                                                                       | 5  | 50 | 94         | 100        | 100        | 100        |
| NTG60.3        | 5                                                                       | 5  | 22 | 83         | 88         | 88         | 100        |
| L43            | 0                                                                       | 5  | 17 | 45         | 70         | 100        | 100        |
| NTG40.2        | 5                                                                       | 0  | 57 | 92         | 90         | 100        | 100        |
| NTG40.3        | 5                                                                       | 19 | 64 | 75         | 80         | 90         | 100        |
| <b>NTG50.2</b> | 5                                                                       | 0  | 71 | <b>100</b> | <b>100</b> | <b>100</b> | <b>100</b> |
| NTG50.3        | 5                                                                       | 13 | 43 | 92         | 90         | 90         | 90         |
| NTG50.4        | 0                                                                       | 0  | 50 | 92         | 100        | 100        | 100        |
| NTG50.5        | 10                                                                      | 0  | 64 | 83         | 100        | 100        | 100        |
| <b>NTG60.4</b> | 5                                                                       | 0  | 93 | <b>100</b> | <b>100</b> | <b>100</b> | <b>100</b> |
| NTG60.5        | 15                                                                      | 13 | 57 | 92         | 100        | 100        | 100        |
| L43            | 5                                                                       | 0  | 14 | 42         | 100        | 100        | 100        |
| ĐC             | 0                                                                       | 0  | 0  | 0          | 0          | 0          | 0          |

Việc tạo đột biến ở chủng vi sinh vật đã làm tăng những đặc tính mong muốn cho việc sử dụng chủng giống đó [21]: tăng sinh tổng hợp cellulase ở *F. oxysporum* bằng tia UV và NTG [22] và ở nấm sợi bằng NTG + ethidium bromide + UV hoặc NTG + ethidium bromide [23]; tăng sinh tổng hợp men thủy phân tinh bột sống ( $\alpha$ -amylase và  $\alpha$ -glucoamylase) và cellulase ở *Aspergillus* sp. bằng tia Rontghen và NTG [24, 25]; tăng sản xuất cồn ở *Saccharomyces diastaticus* (ATCC 28339) và *Saccharomyces* spp., sau khi được xử lý với NTG, xung điện hoặc kết hợp cả hai nhân tố này [26]; tăng sinh tổng hợp avermectin ở *S. avermitilis* ATCC 53567 bằng NTG [27].

Để tăng sinh tổng hợp kháng sinh ở *Acremonium chrysogenum* AC880, Hồ Tuyên và cs (2010) đã sử dụng tia UV và NTG gây đột biến trên bào tử trần của chủng này. Dòng đột biến chọn lọc sản xuất kháng sinh tăng 70 % so với chủng tự nhiên [28]. Chủng *Bacillus* spp. được xử lý với NTG tạo ra thể đột biến sinh tổng hợp protease ngoại bào tăng gấp 1,5 - 2,0 lần so với chủng gốc [29].



Hình 4. Rệp đào bị diệt bởi các dòng nấm đột biến (A1) UV10.1; (B1) UV10.4; (C1) UV60.3; (D1) NTG30.2; (E1) NTG50.2 và (F1) NTG60.2. Sợi nấm và bào tử của các dòng đột biến phát triển trên thân rệp đào: (A2) UV10.1; (B2) UV10.4; (C2) UV60.3; (D2) NTG30.2; (E2) NTG50.2 và (F2) NTG60.4, sau 6 ngày phun bào tử nấm

Cho tới nay, chưa có công trình nào công bố về việc sử dụng tác nhân gây đột biến để tạo đột biến trên nấm kí sinh côn trùng, nhằm tăng hiệu lực diệt côn trùng hại cây. Trong nghiên cứu này, sau khi tế bào trần của chủng L43 xử lý bằng tia UV với các khoảng thời gian khác nhau, đã chọn được các dòng đột biến UV10.1, UV10.4 và UV60.3 có hoạt lực diệt rệp tăng 6 – 12 % so với chủng tự nhiên. Hơn nữa, tế bào chủng L43 sau khi xử lý với NTG, đã tạo ra một số dòng đột biến (NTG30.2, NTG50.1, NTG50.2 và NTG60.4) có hoạt lực diệt rệp tăng 28 – 58 % so với chủng tự nhiên. Khả năng kí sinh và phát triển thể sợi của các thể đột biến trên rệp đào (hình 4) sau 6 ngày phun.

#### 4. KẾT LUẬN

Chủng nấm *Lecanicillium* sp. L43 có độc tính diệt rệp đào *Myzus persicae* mạnh hơn các chủng khác và diệt 100 % rệp sau 5 ngày phun bào tử ở 23 – 27 °C, độ ẩm không khí 75 – 85 %. Từ 42 thể đột biến được tạo bằng tia cực tím (UV) và hóa chất đột biến (NTG) đã chọn lọc được các biến thể UV10.1, UV10.4, UV60.3, NTG30.2, NTG50.2 và NTG60.4 diệt 100% rệp đào sau 4 đến 5 ngày phun, diệt rệp mạnh hơn từ 6 đến 58 % so với chủng gốc *Lecanicillium* sp. L43 ở cùng điều kiện 25 – 29 °C và độ ẩm 75 – 85 %. Các thể đột biến chọn lọc là nguồn nguyên liệu quý để nghiên cứu tiếp và làm chế phẩm bào tử nấm kiểm soát rệp muội hại cây trồng.

**Lời cảm ơn:** Nghiên cứu này được sự hỗ trợ bởi Chương trình trọng điểm phát triển và ứng dụng công nghệ sinh học trong lĩnh vực nông nghiệp và PTNN đến năm 2020, đề tài: “Nghiên cứu sản xuất và sử dụng chế phẩm từ nấm *Lecanicillium* spp. để diệt rệp muội (Aphididae) gây hại cây trồng” Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn, 2010-2013.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Carrión G. and Rico-Gray V. - Mycoparasites on the coffee rust in Mexico, *Fungal Divers* **11** (2002) 49-60.
2. Milner R. J. - Prospects for biopesticides for aphid control. *Entomophaga* **42** (1997) 227-239.
3. Kim J. J., Lee M. H., Yoon C. S., Kim H. S., Yoo J. K., and Kim K. C. - Control of cotton aphid and greenhouse whitefly with a fungal pathogen. In: *Biological control of greenhouse pests*, Food & Fertilizer Technology Center Extension Bulletin 502. Food & Fertilizer Technology Center, Taipei, Taiwan, 2001, pp. 8-15.
4. Alavo T. B. C., Sermann H. and Bochow H. - Virulence of strains of the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii* to aphids: strain improvement, *Phytopath Pflanz* **34** (2001) 379-398.
5. Askary H., Carrière Y., Bélanger R. R. and Brodeur J. - Pathogenicity of the fungus *Verticillium lecanii* to aphids and powdery mildew. *Biocontrol Sci Technol* **8** (1998) 23-32.
6. Vu V. H., Hong S., and Kim K. - Selection of entomopathogenic fungi for aphid control. *J Biosci Bioeng* **106** (2007) 498-505.
7. Vu V. H., Kim K. and Hong S. I. - Selection of entomopathogenic fungus with high pathogenicity to aphid at broad range of temperature and relative humidity. *International*

- Symposium & Annual Meeting: Systemetic Innovation for Microbial Biotechnology, June 18-20, BEXCO Convention Hall, Busan, Korea, 2006, p. 411.
8. Loureiro E. D. S. and Moino J. R. A. - Pathogenicity of hyphomycet fungi to aphids *Aphis gossypii* Glover and *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae), Neotrop Entomol **35** (2006) 660-665.
  9. Hall R. A. and Burges H. D. - Control of aphids in glasshouses with the fungus, *Verticillium lecanii*. Ann Appl Biol **93** (1979) 235-236.
  10. Jackson C. W., Heale J. B. and Hall R. A. - Traits associated with virulence to the aphid *Macrosiphoniella sanborni* in eighteen isolates of *Verticillium lecanii*, Ann Appl Biol **106** (1985) 39-48.
  11. Milner R. J. and Lutton G. G. - Dependence of *Verticillium lecanii* (Fungi: Hyphomycetes) on high humidities for infection and sporulation using *Myzus persicae* (Homoptera: Aphididae) as host. Environ Entomol **15** (1986) 380-382.
  12. Meyer S. L. F., Johnson G., Dimock M., Fahey J. W. and Huettel R. N. - Field efficacy of *Verticillium lecanii*, sex pheromone, and pheromone analogs as potential management agents for soybean cyst nematode, J. Nematol **29** (3) (1997) 282-288.
  13. Verhaar M. A., Hijwegen T. and Zadoks J. C. - Glasshouse experiments on biocontrol of cucumber powdery mildew (*Sphaerotheca fuliginea*) by the mycoparasites *Verticillium lecanii* and *Sporothrix rugulosa*. Biol Control **6**(3) (1996) 353-360.
  14. Hall R. A. - Synergistic inhibitory action of preparations of iprodione and carbaryl on germination of conidia of *Verticillium lecanii*. J Invert Pathol **42** (1983) 384-386.
  15. Kim J. J. - Influence of *Lecanicillium attenuatum* on the development and reproduction of the cotton aphid, *Aphis gossypii*, BioControl **52** (2006) 789-799.
  16. North J. P., Cuthbertson A. G. S. and Waters K. - The efficacy of two entomopathogenic biocontrol agents against adult *Thrips palmi* (Thysanoptera: Thripidae), J. Invertebr Pathol **92** (2006) 89-92.
  17. Nasr F. N. N. and Moein S. I. M. - New trend of the use of *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sokorin and *Verticillium indicum* (Petch) Gams as entomopathogens to the termite *Cryptotermes brevis* (Walker) (Isoptera: Kalotermitidae), Anz Schadlingskd Pfl **70** (1997) 13-16.
  18. Võ Thị Thu Oanh, Lê Đình Đôn, Nguyễn Thị Chắt và Bùi Cách Tuyến - Khả năng gây bệnh của nấm *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin đối với rệp sáp giả (*Dysmicoccus* sp.) trên cây na (*Annona squamosa* L.), Tạp chí Bảo vệ thực vật **3** (2008) 17-24.
  19. Phạm Văn Mạch - Kết quả thử nghiệm bước đầu thuốc trừ sâu sinh học 2B trên rầy nâu hại lúa, Tạp chí Lâm nghiệp **10** (1998) 29-30.
  20. Abbott W. S. - A method of computing the effectiveness of an insecticide, J. Econ Entomol **18** (1925) 265.
  21. Stanbury P. F., Whitaker A., and Hall S. J. - Fermentation economics. Principles of fermentation technology, 2nd Ed, Pergamon Press, Oxford, 1995, pp. 331-341.
  22. Kuhad R. C., Kumar M. and Singh A. - Hypercellulolytic mutant of *Fusarium oxysporum*, Lett. Appl. Microbiol **19** (1994) 397-400.

23. Chand P., Aruna A., Maqsood A. M. and Rao L. V. - Novel mutation method for increased cellulase production, J. Appl. Microbiol **98** (2005) 318-323.
24. Vu V. H., Pham T. A. and Kim K. - Fungal strain improvement for cellulase production using repeated and sequential mutagenesis, J. Mycobiol **37** (2009) 267-271.
25. Vu V. H., Pham T. A. and Kim K. - Improvement of fungal strain by repeated and sequential mutagenesis and optimization of solid state fermentation for the hyper-production of raw-starch-digesting enzyme, J. Microbiol Biotechnol **20** (2010) 708-716.
26. Kim K. and Jae Y. L. - Strain improvement of yeast for ethanol production using a combined treatment of electric and chemical mutagen N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, J. Microbiol Biotechnol **8** (1998) 119-123.
27. Hafner E. W., Holley B. W., Holdon D. S., Lee S. E., Wax R. G., Beck D., McArthur A. I. and Wernau W. C. - Brached-chain fatty acid requirement for avermectin production by a mutant of *Streptomyces avermitilis* lacking branched-chain 2-oxo acid dehydrogenase activity, J. Antibiot **44** (1991) 349-356.
28. Hồ Tuyên, Nguyễn Thị Hồng Liên, and Lê Gia Hy - Nghiên cứu tối ưu môi trường lên men sinh tổng hợp cephalosporin C của biến chủng *Acremonium chrysogenum* AC 880-33, Tạp chí CNSH (2010).
29. Nguyễn Quỳnh Uyên, Nguyễn Xuân Trường, Phan Thị Hà, Nguyễn Huỳnh Minh Quyên, và Trần Quốc Việt - Nghiên cứu một số tính chất và sử dụng hoá chất gây đột biến NTG để nâng cao hoạt độ phân giải protein của protease ngoại bào của vi khuẩn *Bacillus* sp Tạp chí Khoa học ĐHQGHN, Khoa học Tự nhiên và Công nghệ **26** (2010) 121-128.

## ABSTRACT

### ENHANCING THE VIRULENCE OF THE ENTOMOPATHOGENIC FUNGUS LECANICILLIUM AGAINST APHIDS BY MUTATION USING ULTRAVIOLET AND N-METHYL-N'-NITRO-N-NITROSOGUANIDINE FOR BIOPESTICIDE PRODUCTION

Vũ Văn Hạnh<sup>1</sup>, Lê Thị Thùy Dương<sup>1</sup>, Quyền Đình Thi<sup>1,\*</sup>, Nguyễn Thị Thu Thủy<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Biotechnology, VAST, 18 Hoang Quoc Viet Str., Cau Giay Dist., Hanoi, Vietnam*

<sup>2</sup>*Hanoi Open University*

\* E-mail: [quyen@ibt.ac.vn](mailto:quyen@ibt.ac.vn)

Fungi in the genus *Lecanicillium* are important pathogens of insects and some have been developed as commercial biopesticides due to its parasitic virulence. Among tested fungal strains, an entomopathogenic fungal strain L43 is highly virulent against peach aphids (*Myzus persicae*) that caused 100 % aphid' mortality after 5 days conidia spraying, at 23 - 27°C and 75 – 85 % of relative humidity. The fungal strain L43 was identified as a strain belonging to genus *Lecanicillium* and its 28S rRNA sequence showed 99.5 % of identities in comparison to those from *Lecanicillium* strains deposited on GenBank. For improvement of virulence against aphids, protoplasts of *Lecanicillium* sp. L43 were exposed to UV-irradiation (ultraviolet) and

NTG (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine) to generate mutants. Among 42 mutants were screened, UV10.1, UV10.4 and UV60.3 (created by UV treatment), NTG30.2, NTG50.1, NTG50.2 and NTG60.2 (created by NTG treatment) showed 100 % mortality against *M. persicae* after 4 to 5 days of conidia spraying. The virulence of selected mutants was increased by 6 to 58 % compared to that of the wide type L43, at 25 - 29 °C và 75 - 85 % of relative humidity. These results suggested that mutants of *Lecanicillium* sp. L43 are precious resource for futher study and may have potential for development of an effective microbial control agent against insects.

**Keyword:** mutation, protoplasts, *Lecanicillium*, *Myzus persicae*, ultraviolet, N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine.