

## TUYỂN CHỌN CÁC CHỦNG *Bacillus thuringiensis* CÓ KHẢ NĂNG DIỆT SÂU TƠ VÀ SÂU XANH

Selection of *Bacillus thuringiensis* strains with insectidal activity against armyworm (*Plutella xylostella*) and diamondback moth (*Heliothis armigera*)

Nguyễn Thị Hoài Hà<sup>1</sup>, Ngô Giang Liên<sup>2</sup>

### SUMMARY

Over 20 species of naturally occurring insect - specific bacteria have been isolated from the soil, insects and plants, but only a few have been studied intensively. Much attention has been given to *Bacillus thuringiensis*, a species that produces microbial insecticide toxic to specific groups of insects. Insecticidal activity of four strains of *Bacillus thuringiensis* from the Museum of the Center of Applied Microbiology has been tested against *Plutella xylostella* and *Heliothis armigera*.

**Keywords:** *Bacillus thuringiensis* strains, insectidal activity, *Plutella xylostella*, *Heliothis armigera*.

### 1. MỞ ĐẦU

*Bacillus thuringiensis* (Bt) là vi khuẩn gram dương, sinh tinh thể diệt côn trùng trong quá trình hình thành bào tử. Tuy là một loại vi khuẩn được phát hiện khá muộn nhưng Bt đã được nghiên cứu rất kỹ ở nhiều quốc gia khác nhau và chế phẩm Bt được sử dụng thành công nhất trong bảo vệ thực vật (Asano, 1996). Các tinh thể độc của Bt có thể diệt được nhiều loại côn trùng thuộc bộ 2 cánh (Diptera) bộ cánh cứng (Coleoptera) và bộ cánh vẩy (Lepidoptera) và một số loại côn trùng khác. Sâu tơ (*Plutella xylostella*) và sâu xanh (*Heliothis armigera* Hubner) là những loài sâu gây hại nghiêm trọng cho các loại rau trồng. Vì vậy trong phạm vi bài báo này chúng tôi đề cập tới khả năng sinh trưởng, tạo thành bào tử cũng như khả năng diệt sâu xanh và sâu tơ của các chủng Bt để chọn ra các chủng Bt có khả năng diệt các loại sâu này.

### 2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

**Vi sinh vật:** Các chủng *Bacillus thuringiensis* được nhận từ Bảo tàng Giống chuẩn vi sinh vật, Trung tâm Công nghệ Sinh học, Đại học Quốc gia Hà Nội. Bốn chủng *Bacillus thuringiensis* ký hiệu là 8-2, AM4, H-H1 và G3

Bốn chủng vi khuẩn này đều chưa có tinh thể hình tháp đôi và được nuôi cấy trên môi trường lên men nêu dưới đây. Ở nhiệt độ 30°C lắc 220 vòng/phút. Thời gian nuôi cấy thích hợp cho từng chủng biến động từ 30 - 40 giờ.

Môi trường lên men (g/l):

Bột đậu tương: 15;

Bột ngô: 10;

Đường kính: 20;

Cao nấm men: 1;

Một số muối khoáng.

pH = 7,0.

Phân tích định lượng protein theo phương pháp Lowry (Lowry và cs, 1951) và phân tích định tính protein theo Laemmili (Laemmili và cs, 1970).

<sup>1</sup> Trung tâm CNSH- ĐH Quốc gia Hà Nội

<sup>2</sup> Khoa Sinh, ĐH Khoa học Tự nhiên- ĐHQG

## TUYỂN CHỌN CÁC CHỦNG *Bacillus Thuringiensis*...

Bảng 1. Khả năng diệt sâu xanh và sâu tơ của các chủng *Bacillus thuringiensis* 8-2, G3, AM4, H-H1 chứa các nhóm gen Cry khác nhau

Chủng giống	LC50 sau 4 ngày xử lý		SDS-PAGE (kDa)	Sản phẩm PCR
	Sâu tơ ( <i>Plutella xylostella</i> )	Sâu xanh ( <i>Heliothis armigera</i> )		
<i>Bacillus thuringiensis</i> 8-2	0,42	1,09	130	CryIA(a), CryIA(b)
<i>Bacillus thuringiensis</i> G3	0,23	2,30	130	CryIA(a), CryIA(b)
<i>Bacillus thuringiensis</i> AM4	0,87	3,44	130	CryIA(a), CryIA(b)
<i>Bacillus thuringiensis</i> H-H1	0,07	4,15	130	CryIA(a), CryIA(b)

Sử dụng kỹ thuật PCR để nhận diện gen Cry của Bt, sử dụng cặp mồi đặc hiệu LepIA, LepIB và LepIIA, LepIIB bằng phương pháp Asano (Asano, 1996).

Thử nghiệm sinh học: do Viện Bảo vệ thực vật thực hiện.

**Đối tượng thí nghiệm:** Sâu xanh và sâu tơ tuổi 2

### 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. Kiểm tra hoạt tính diệt sâu của 4 chủng *Bacillus thuringiensis*

Theo Dulmage (1981) việc sản sinh protein tinh thể độc của *Bacillus thuringiensis* phụ thuộc rất nhiều vào điều kiện nuôi cấy và thành phần môi trường. Vậy 4 chủng *Bacillus thuringiensis* đều chứa tinh thể độc có khả năng diệt sâu như thế nào. Phản ứng (PCR) sẽ xác định được nhanh các chủng nghi ngờ *Bacillus thuringiensis* có hay không có hoạt tính diệt sâu (Asano, 1996; Jackson và cs, 2000).

Sâu xanh (*Heliothis armigera*) và sâu tơ (*Plutella xylostella*) gây hại chủ yếu cho rau thuộc họ cải (Brassicaceae) đặc biệt là cải xanh và trên các rau màu khác. Kết quả ghi ở bảng 1 là hoạt tính diệt sâu xanh (*Heliothis*

*armigera*), sâu tơ (*Plutella xylostella*) của các chủng đã tuyển chọn. Cả 4 chủng đều có LC50 tương ứng là 0,07 - 0,87 đối với sâu tơ, Trong khi đó đối với sâu xanh LC 50 của chúng chỉ đạt từ 1,09 - 4,15, cao nhất là chủng 8-2.

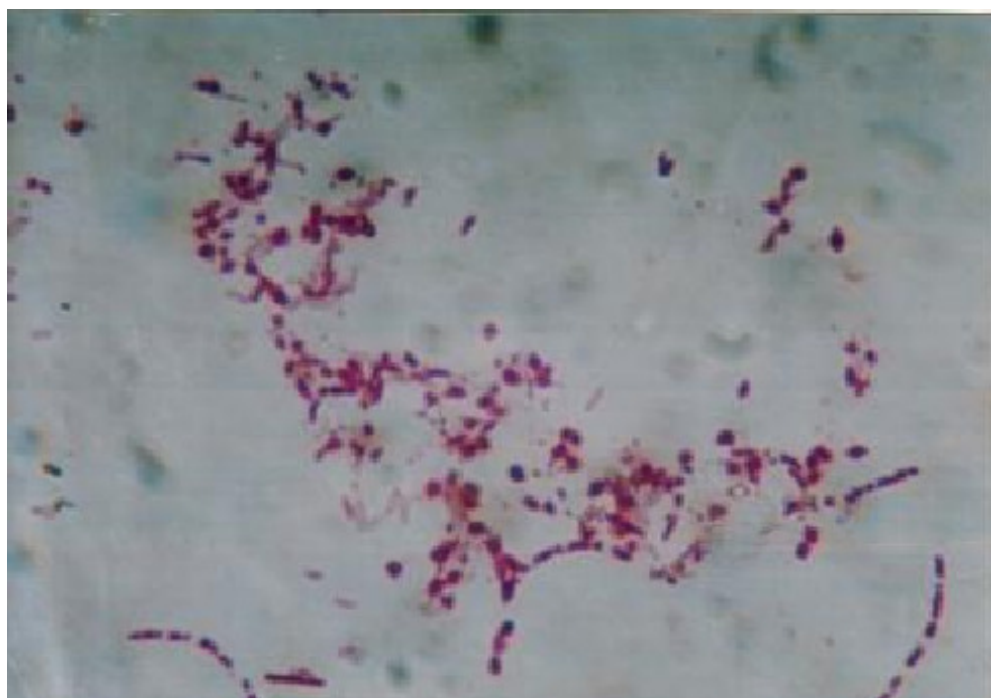
Dùng mồi (primer) chọn lọc nhằm tạo ra sản phẩm mang tính đặc thù của những gen mã hoá (encoding). Các mồi này mang đặc trưng nhóm, được sử dụng để phát hiện các đoạn ADN đặc thù trong chủng *Bacillus thuringiensis*. Kết quả cho thấy 4 chủng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* cho sản phẩm PCR tương ứng với 490 bp, 986 bp sử dụng các gen tinh thể CryIA(a), CryIA(b) tổng hợp protein có trọng lượng phân tử 130kDa. Protein này là tiền độc tố, dưới tác dụng của proteaza và pH kiềm trong ruột ấu trùng sẽ biến thành protein độc 67 KDa gây độc đối với ấu trùng của sâu xanh và sâu tơ (Asano, 1996; Wu và cs; 1985; Yamamodo và cs; 1983).

Kết quả ghi ở bảng 2 cho thấy rằng cả 4 chủng vi khuẩn nói trên đều tạo bào tử sau 34 - 40 giờ nuôi cấy và chủ yếu đạt được khoảng  $0,66 - 0,78 \times 10^9$  bào tử/ml. Chỉ số pH ban đầu

Nguyễn Thị Hoàng Hà, Ngô Giang Liên

Bảng 2. Khả năng sinh trưởng và tạo thành bào tử của các chủng *Bacillus thuringiensis* 8-2, G3, AM4, H-H1 trong nuôi cấy chìm.

Chủng giống	Hình dạng tinh thể	Tổng số bào tử ( $\times 10^9/\text{ml}$ )	Tỷ lệ tách bào tử (%)	pH thời điểm cuối	Hàm lượng protein ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )
<i>Bacillus thuringiensis</i> 8-2	Tháp đôi	0,62	70	8,0/40 giờ	634
<i>Bacillus thuringiensis</i> G3	Tháp đôi	0,74	76	7,8/36 giờ	726
<i>Bacillus thuringiensis</i> AM4	Tháp đôi	0,78	78	8,2/34 giờ	600
<i>Bacillus thuringiensis</i> H-H1	Tháp đôi	0,66	72	7,6/40 giờ	720



Hình 1. Tinh thể độc của chủng *Bacillus thuringiensis* được tuyển chọn chụp dưới kính hiển vi quang học (độ phóng đại 1000 lần)

là 7,0 (pH của thời điểm 0 giờ). pH giảm xuống khi các chủng bước vào pha logarit là 6,0 và pH tăng dần đến 7,6 - 8,2 ở giai đoạn kết thúc sự nuôi cấy. Sự biến đổi pH trong quá trình nuôi cấy các chủng nói trên cũng tương tự như kết quả của nhiều nghiên cứu khác khi trong môi trường có đường, ban đầu chúng

được chuyển hoá thành các sản phẩm trung gian là các axit hữu cơ và các axit amin, sau đó khi các sản phẩm này được tiêu thụ hết thì pH của môi trường tăng dần đến 7,6 - 8,2 ở giai đoạn kết thúc. Sở dĩ pH tăng là do hàm lượng amoniac ( $\text{NH}_3$ ) được tích lũy trong môi trường nuôi cấy. Sử dụng phương pháp nhuộm

## TUYỂN CHỌN CÁC CHỦNG *Bacillus Thuringiensis*...

tiêu bản có thể cho thấy rõ hình ảnh tế bào dưới kính hiển vi quang học: phần lớn là các tế bào hình que, tạo đôi hoặc chuỗi, tạo bào tử và tinh thể.

### 4. KẾT LUẬN

Cả 4 chủng *Bacillus thuringiensis* 8-2, G3, AM4, H-H1 đều có hoạt tính diệt sâu tơ khá cao. Liều lượng gây chết với sâu tơ LC50 tương ứng với 4 chủng trên là 0,42; 0,23; 0,87; 0,07. Trong khi đó các chủng này có hoạt tính diệt sâu xanh thấp hơn (LC50 tương ứng là 1,09; 2,30; 3,44; 4,15).

Cả 4 chủng vi khuẩn nói trên đều tạo bào tử sau 34 - 40 giờ nuôi cấy và đạt được lượng bào tử khoảng  $0,66 - 0,78 \times 10^9$  bào tử/ml.

Các chủng Bt 8-2, Bt G3, Bt AM4 và Bt H-H1 đều có tinh thể hình tháp đôi và chứa các gen CryIA(a), CryIA(b) tổng hợp protein có trọng lượng phân tử 130 kDa.

### Tài liệu tham khảo

Asano, S., 1996. Identification of cry gene from

*Bacillus thuringiensis* by PCR and isolation of unique insecticidal bacteria. *Memories Fac. Agr. Hokkaido Univ.* 19: 529-563.

Jackson. T. A. D. J. Saville., 2000. Bioassay of replicating Bacteria Against Soil-dwelling insect pests. In "Bioassay of entomopathogenic microbes and nematodes" by A. Navon. K. R. S. Ascher. CABI Publishing. page 73-93.

Laemmli U.K., 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)* 277: 680-685.

Lowry O.H., Rosebrough A.L. and Randall R.J., 1992. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275. Padiman, M.

Wu D, and Chang N.F., 1985. synergism in mosquitocidal activity of 26 and 65 kDa proeins from *Bacillus thuringiensis* is subsp, *israentensis* *Crystal FEBS* -190: 232-236

Yamamoto I, Garcia. A., 1983. Immunological properties of the entomocidol proteins of *Bacillus thuringiensis* and its insecticidal activity. *J. Invertebr. Pathol.* 41: 122-130.