

Evaluation of virulence of brown planthopper populations in saline soil regions of the Mekong Delta

Tran Ngoc He, Truong Anh Phuong,
Pham Thi Kim Vang

Abstract

The experiment was conducted under nethouse conditions at the Cuu Long Delta Rice Research Institute (CLRRI) in 2021. The study was carried out on 12 rice varieties carrying different resistance genes with 5 BPH populations. The results showed that 5 BPH populations in saline soil regions collected in Ben Tre, Tra Vinh, Soc Trang, Bac Lieu, Ca Mau did not have any difference in damage levels on the varieties carrying control resistance genes. Among the 11 rice varieties carrying BPH resistance genes, there were 2 varieties carrying multiple resistance genes from resistance to moderate resistance: Ptb33 (*bph2*, *Bph3*, *Bph32*) was resistant to all 5 BPH populations; Rathu heenati (*Bph3* and *Bph17*) were moderately resistant to all 5 BPH populations. Among the 5 BPH populations in the saline soil regions in the Mekong Delta, the brown planthopper population in Soc Trang has the strongest toxicity.

Keywords: Rice, brown planthopper (BPH), virulence, resistance gene

Ngày nhận bài: 07/5/2022

Người phản biện: TS. Nguyễn Thị Thủy

Ngày phản biện: 15/5/2022

Ngày duyệt đăng: 30/5/2022

ĐÁNH GIÁ HIỆU QUẢ GÂY ĐỘC CỦA CHIẾT XUẤT TỪ CÂY CỎ GẤU TRÊN MÔ HÌNH RUỒI GIẤM

Huỳnh Hồng Phiến¹ và Trần Thanh Mến^{1*}

TÓM TẮT

Cỏ gấu (*Cyperus rotundus* L.) còn gọi là cỏ cú, là thực vật hoang dại phân bố rộng khắp từ vùng nhiệt đới, cận nhiệt đới và ôn đới. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm đánh giá khả năng gây độc của dịch chiết từ cỏ gấu trên mô hình ruồi giấm (*Drosophila melanogaster*). Kết quả nghiên cứu bước đầu cho thấy trong thành phần dịch chiết của cỏ gấu có chứa các nhóm hợp chất alkaloid, flavonoid, saponin, phenolic, tanin, terpenoid, cardiac glycoside và steroid triterpenoid. Hàm lượng polyphenol và flavonoid tổng được xác định lần lượt là $93,8 \pm 0,46$ mg GAE/g cao chiết và $198 \pm 3,32$ mg QE/g cao chiết. Cao chiết cỏ gấu thể hiện khả năng gây độc cao đối với ấu trùng ruồi giấm tuổi 2 với giá trị nồng độ gây chết 50% ($LC_{50} = 132$ mg/mL). Bên cạnh đó, dịch chiết cỏ gấu còn gây ảnh hưởng đến quá trình sinh trưởng và phát triển của ruồi giấm. Thành phần dự trữ năng lượng như carbohydrate, protein và lipid của ruồi trưởng thành giảm lần lượt 55,74%; 41,72% và 60,31%, các enzyme thuộc nhóm esterase (AchE, α -carboxyl và β -carboxyl) và phosphatase (AcP và AkP) bị ức chế hoạt động khi ruồi giấm được cho ăn thức ăn có bổ sung cao chiết cỏ gấu. Những kết quả này góp phần chứng minh độc tính của chiết xuất từ *C. rotundus* cũng như tiềm năng sử dụng trong việc phòng trừ và quản lý dịch hại côn trùng.

Từ khóa: Cỏ gấu (*Cyperus rotundus*), ruồi giấm (*Drosophila melanogaster*), dịch chiết, độc tính

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Thuốc trừ sâu sinh học là một loại thuốc trừ sâu có nguồn gốc từ các nguyên liệu tự nhiên như động vật, thực vật, vi khuẩn, virus,... Hiện nay, các sản phẩm thuốc trừ sâu có nguồn gốc từ thực vật ngày

càng phổ biến và được xem là sản phẩm thay thế tốt cho thuốc trừ sâu hóa học để kiểm soát dịch hại côn trùng (Regnault-Roger *et al.*, 2012). Các dịch chiết từ thực vật có chứa các hợp chất có hoạt tính sinh học về cơ bản là các chất chuyển hóa thứ

¹Khoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Cần Thơ

* Tác giả liên hệ: E-mail: ttmen@ctu.edu.vn

cấp, chúng có phổ tác động rộng, có thể trừ được nhiều loại côn trùng gây hại. Cỏ gấu (hay còn gọi là cỏ cú) có tên khoa học là *Cyperus rotundus* L., thuộc họ cà phê (Cyperaceae). Cỏ gấu là một loại thảo dược truyền thống được sử dụng rộng rãi như một loại thuốc giảm đau, an thần, chống co thắt, chống sốt rét, và điều trị rối loạn tiêu hóa. Các nghiên cứu trước đó về các thành phần hóa học của cỏ gấu cho thấy sự hiện diện của alkaloid, flavonoid, glycoside, phenol, tannin, steroid, tinh bột và nhiều sesquiterpenoids mới (Sivapalan and Jeyadevan, 2017). Các hợp chất này được cho là có tác dụng chống ký sinh trùng, diệt côn trùng, kháng khuẩn và nhiều tác dụng khác. Ngoài ra, Soumaya và cộng tác viên (2014) đã chứng minh rằng dịch chiết từ lá cỏ gấu có hoạt tính diệt ấu trùng *Culex quinquefasciatus*.

Mặc dù ruồi giấm (*Drosophila melanogaster*) không phải là dịch hại quan trọng trong nông nghiệp (Anholt, 2020), nhưng nó thường được sử dụng như loài côn trùng mẫu trong các nghiên cứu độc chất học và để thử nghiệm hoạt tính của thuốc trừ sâu (Rodrigues *et al.*, 2021). Xuất phát từ thực tiễn trên, nghiên cứu được tiến hành nhằm mục tiêu đánh giá khả năng gây độc của dịch chiết từ cây cỏ gấu (*C. rotundus* L.) đối với ruồi giấm (*D. melanogaster*) làm nền tảng cho các nghiên cứu tiếp theo để sản xuất thuốc trừ sâu có nguồn gốc tự nhiên, an toàn sinh học và thân thiện với môi trường, góp phần giảm thiểu việc sử dụng thuốc trừ sâu hóa học, đảm bảo an toàn lương thực, sức khỏe con người, phát triển nền nông nghiệp bền vững.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Vật liệu thí nghiệm: Cỏ gấu gồm thân, lá, hoa (trên mặt đất) được thu hái tại thành phố Cần Thơ. Tiến hành loại bỏ các phần bị hư hại, rửa sạch, cắt nhỏ (2 cm), sấy khô ở nhiệt độ 50°C. Sau đó mẫu được nghiền thành bột.

Đối tượng thí nghiệm: Ruồi giấm hoang dại *D. melanogaster* chủng Canton S (CS) được cung cấp từ phòng thí nghiệm Biofunctional Chemistry (Viện Công nghệ Kyoto, Nhật Bản).

Hóa chất: Ethanol 96° (Trung Quốc), nước cất (Việt Nam), gallic acid (Canada), quercetin (Mỹ), Folin-Ciocalteu (Đức), $AlCl_3$ (Trung Quốc), $NaNO_2$ (Trung Quốc), NaOH (Trung Quốc), acid

propionic (Trung Quốc), sodium benzoat (Ấn Độ), acetylcholine chloride (Mỹ), fast blue B salt (Trung Quốc), α -naphthyl acetate 99% (Mỹ), β -naphthyl acetate 95% (Mỹ), p-nitrophenyl phosphate (Đức), 4-nitrophenylphosphoric acid disodium salt 98% (Đức) và một số hóa chất khác.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Điều chế cao chiết

Điều chế cao tổng ethanol: Mẫu sau khi xay được cho vào các túi vải và được ngâm trong lượng ethanol (96°) vừa đủ. Mẫu được ngâm 3 lần, mỗi lần ngâm 24 giờ, dung dịch trong bình ngâm sẽ được lọc qua giấy lọc để loại bỏ phần bột cặn, đem cô quay thu hồi dung môi. Phần dịch chiết được cô quay đuổi dung môi, thu được cao tổng ethanol.

2.2.2. Định tính sơ bộ thành phần hóa học

Các nhóm hợp chất có hoạt tính sinh học như alkaloids, flavonoids, saponins, phenolics, tanins, terpenoids, coumarins, cardiac glycosides và steroids-triterpenoids được định tính bằng phương pháp đo quang phổ UV-Vis theo miêu tả của Riaz và cộng tác viên (2018) và Usta và cộng tác viên (2020).

2.2.3. Định lượng polyphenol và flavonoid tổng

a) Định lượng polyphenol bằng thuốc thử Folin-Ciocalteu

Hàm lượng polyphenol được xác định theo phương pháp của Singleton và cộng tác viên (1999) có hiệu chỉnh. Hỗn hợp phản ứng gồm 250 μ L cao chiết trong 250 μ L nước và 250 μ L thuốc thử Folin-Ciocalteu, lắc đều. Sau đó, thêm vào 250 μ L Na_2CO_3 10% rồi ủ 30 phút ở 40°C trong máy ổn nhiệt. Độ hấp thụ quang phổ của hỗn hợp phản ứng được đo ở bước sóng 765 nm. Acid gallic được sử dụng như chất đối chứng dương để xây dựng phương trình đường chuẩn. Tổng hàm lượng polyphenol của mỗi cao chiết được tính dựa vào phương trình đường chuẩn acid gallic và kết quả được biểu thị bằng miligram tương đương acid gallic (GAE) trên mỗi gram khối lượng cao chiết (mg GAE/g cao chiết).

b) Định lượng flavonoid bằng thuốc thử $AlCl_3$

Hàm lượng flavonoid toàn phần được xác định bằng phương pháp so màu $AlCl_3$ của Bag và cộng tác viên (2015) có hiệu chỉnh. Hỗn hợp phản ứng gồm 200 μ L cao chiết hoặc chất chuẩn ở nồng độ khảo sát được pha trong 200 μ L nước cất cho phản ứng với 40 μ L $NaNO_2$ 5% rồi lắc đều, sau đó để yên

5 phút. Sau 5 phút, tiếp tục thêm vào 40 μL AlCl_3 10% vào hỗn hợp rồi lắc đều. Hỗn hợp phản ứng được ủ 6 phút, sau đó thêm 400 μL NaOH 1 M và nước cất vào hỗn hợp cho đủ 1 mL. Hỗn hợp phản ứng được đo độ hấp thụ quang phổ ở bước sóng 510 nm. Quercetin được sử dụng như chất đối chứng dương. Hàm lượng flavonoid toàn phần trong các mẫu cao chiết được xác định dựa vào phương trình đường chuẩn quercetin.

2.2.4. Khảo sát khả năng gây độc của cỏ gấu trên ấu trùng ruồi giấm tuổi 2

Khảo sát sự ảnh hưởng của cao chiết đến tỉ lệ tử vong của ấu trùng ruồi giấm được thực hiện theo phương pháp của Riaz và cộng tác viên (2018) có hiệu chỉnh. Trong thí nghiệm này, ấu trùng tuổi 2 của ruồi giấm được sử dụng để khảo sát khả năng gây độc của cao chiết xuất từ cây cỏ gấu. Thành phần của môi trường thức ăn tiêu chuẩn (trong 10 mL) cho ruồi giấm gồm 1 g đường glucose, 0,45 g bột bắp, 0,40 g nấm men, 0,08 g agar, 0,01 g sodium benzoate và 30 μL propionic acid. Nghiệm thức thử nghiệm có bổ sung cao chiết ở nồng độ 50; 100; 150; 200; 250 mg/mL thức ăn tiêu chuẩn (cao chiết được pha trong ethanol 96°). Nghiệm thức đối chứng sử dụng môi trường thức ăn tiêu chuẩn có bổ sung lượng ethanol giống như nghiệm thức thử nghiệm. Chọn 30 ấu trùng tuổi 2 cho vào mỗi lọ thức ăn. Mỗi nghiệm thức được lặp lại 5 lần (5 lọ).

2.2.5. Khảo sát ảnh hưởng của cao chiết cỏ gấu đến sự sinh trưởng và phát triển của ruồi giấm

Thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của cao chiết đến khả năng sinh trưởng và phát triển của ruồi giấm dựa trên phương pháp nghiên cứu của Chowański và cộng tác viên (2018) có hiệu chỉnh. Chọn 8 ruồi đực và 5 ruồi cái mới nở trong vòng 2 ngày và chưa giao phối, cho chúng giao phối trong 24 giờ, loại bỏ ruồi bố mẹ, giữ trứng và để chúng phát triển trong môi trường thử nghiệm. Môi trường thức ăn sử dụng cho khảo sát này được sử dụng là môi trường thức ăn tiêu chuẩn có bổ sung thêm cao chiết (20 mg/mL) vào thức ăn. Nghiệm thức đối chứng sử dụng môi trường thức ăn tiêu chuẩn. Mỗi nghiệm thức được lặp lại 5 lần. Chỉ tiêu theo dõi của thí nghiệm này là: tổng số nhộng được hình thành sau 10 ngày và tỉ lệ ruồi giấm sống từ giai đoạn nhộng được ghi nhận sau 14 ngày khảo sát. Ruồi giấm trưởng thành từ khảo sát này được chọn ngẫu nhiên để thực hiện cho các khảo sát đánh giá

thành phần dự trữ năng lượng và hoạt tính ức chế các enzyme thuộc nhóm esterase và phosphatase.

2.2.6. Đánh giá các thành phần dự trữ năng lượng

Chọn ngẫu nhiên mười lăm ruồi giấm cái trưởng thành sau 14 ngày khảo sát của thí nghiệm mục 2.2.5 để xác định hàm lượng các thành phần dự trữ năng lượng cơ bản như carbohydrate, protein và lipid tổng. Các thành phần này đã được chứng minh có vai trò quan trọng liên quan đến sinh lý và sinh sản đối với ruồi giấm (Riaz *et al.*, 2018). Ruồi giấm được nghiền nhuyễn trong 500 μL nước cất để xác định hàm lượng carbohydrate và protein.

Xác định hàm lượng carbohydrate: Carbohydrate được xác định theo phương pháp của Neiselsen (2010), dịch mẫu sau khi nghiền nhuyễn đem ly tâm 10.000 vòng trong 15 phút. Phần dịch phía trên được sử dụng cho xác định protein, phần cặn phía dưới được rửa lại 3 lần với nước cất bằng cách ly tâm 10.000 vòng trong 15 phút. Sau đó, thêm 3,2 mL H_2SO_4 đậm đặc (được làm lạnh). Tiếp theo, thêm 50 μL phenol, lắc đều và để yên trong 30 phút. Độ hấp thụ quang phổ của hỗn hợp phản ứng được đo ở bước sóng 486 nm. Glucose được sử dụng như chất đối chứng dương để xây dựng phương trình đường chuẩn. Hàm lượng carbohydrate trong mẫu được xác định dựa trên phương trình đường chuẩn glucose với các nồng độ khác nhau.

Xác định hàm lượng protein: Xác định protein theo phương pháp của Bradford (1976), hỗn hợp phản ứng gồm 500 μL dung dịch mẫu và 1 mL thuốc thử Bradford, lắc đều và để yên 20 phút ở nhiệt độ phòng. Độ hấp thụ quang phổ của hỗn hợp phản ứng được đo ở bước sóng 595 nm. Albumin được sử dụng như chất đối chứng dương để xây dựng phương trình đường chuẩn.

Xác định hàm lượng lipid: Hàm lượng lipid tổng được xác định theo phương pháp của Parkash and Aggarwal (2012). Ruồi giấm thử nghiệm được cân (m_1) và cho vào ống nghiệm và sấy khô ở 60°C trong 48 giờ (m_2). Ruồi giấm sau khi sấy khô được xác định trọng lượng, rồi tiếp tục thêm vào 1,5 mL diethyl ether và lắc liên tục 200 vòng/phút trong 24 giờ ở nhiệt độ phòng. Sau khi lắc, dung môi được loại bỏ và ruồi giấm một lần nữa được sấy khô ở 60°C trong 24 giờ, trọng lượng cuối cùng được xác định (m_3). Hàm lượng lipid tương đối được tính theo công thức sau:

$$(\%) \text{ lipid} = \frac{(m_2 - m_0) - (m_3 - m_0)}{(m_1 - m_0)}$$

Trong đó: m_0 là trọng lượng ống nghiệm; m_1 là trọng lượng ruồi ban đầu; m_2 là trọng lượng ruồi sau 48 giờ sấy khô; m_3 là trọng lượng ruồi cuối cùng.

2.2.7. Đánh giá hoạt tính ức chế các enzyme thuộc nhóm esterase và phosphatase

Chọn ngẫu nhiên mười làm ruồi giấm cái để tiến hành đánh giá hoạt tính ức chế các enzyme thuộc nhóm esterase và phosphatase. Toàn bộ cơ thể ruồi giấm được nghiền nhuyễn trong dung dịch đệm natri phosphate lạnh (20 mM, pH 7,0). Dịch nghiền được ly tâm 8.000 vòng ở 4°C trong 20 phút, phần dịch lỏng phía trên được sử dụng để đánh giá hoạt tính acetylcholinesterase, carboxylesterase, acid và alkaline phosphatase. Các dung dịch và dụng cụ thủy tinh sử dụng để đồng nhất được giữ ở 4°C trước khi sử dụng và dịch mẫu được giữ lạnh để sử dụng cho các thử nghiệm.

Xác định hoạt tính acetylcholinesterase (AChE): hoạt tính AChE được xác định theo phương pháp của Riaz và cộng tác viên (2018). Hỗn hợp phản ứng gồm 50 µL dịch mẫu, 50 µL acetylcholin (2,6 mM) (cơ chất) và 1.000 µL dung dịch đệm natri phosphate (20 mM, pH 7,0), được ủ ở 25°C trong 5 phút. Sau đó, thêm 400 µL muối Fast blue B (0,3%) vào hỗn hợp để dừng phản ứng. Độ hấp thụ quang phổ của hỗn hợp phản ứng được đo ở bước sóng 405 nm.

Xác định hoạt tính carboxylesterase: hoạt tính α-carboxylesterase (α-carboxyl) và β-carboxylesterase (β-carboxyl) được xác định theo phương pháp của Riaz và cộng tác viên (2018). Hỗn hợp phản ứng gồm 50 µL dịch mẫu, 1.000 µL dung dịch đệm natri phosphate (20 mM, pH 7,0), 50 µL α-naphtyl acetate (cơ chất) và β-naphtyl acetate (cơ chất) được thêm vào riêng biệt để xác định hoạt tính của α-carboxyl và β-carboxyl tương ứng, sau đó được ủ ở 30°C trong 20 phút. Sau khi ủ, thêm 400 µL

Fast blue B 0,3% (pha trong SDS 3,3%) vào hỗn hợp phản ứng để dừng phản ứng enzyme và để yên trong 15 phút ở 20°C. Độ hấp thụ quang phổ của hỗn hợp phản ứng được đo ở bước sóng 430 và 590 nm đối với α-carboxyl và β-carboxyl tương ứng.

Xác định hoạt tính acid và alkaline phosphatase: hoạt tính acid phosphatase (AcP) và alkaline phosphatase (AkP) được xác định theo phương pháp của Riaz (Riaz *et al.*, 2018). Hỗn hợp phản ứng gồm 50 µL dịch mẫu, 50 µL dung dịch đệm natri phosphate (50 mM, pH 7.0) và 50 µL dung dịch đệm Tris HCl (50 mM, pH 9.0) được thêm vào riêng biệt để xác định hoạt tính của AcP và AkP tương ứng. Cả hai hỗn hợp phản ứng được thêm tiếp 100 µL p-nitrophenyl phosphate (cơ chất) và được ủ ở 37°C trong 15 phút trong nồi ổn nhiệt, phản ứng enzyme được dừng lại bằng cách thêm dung dịch NaOH 0,5 N. Độ hấp thụ quang phổ của hỗn hợp phản ứng được đo ở bước sóng 440 nm.

2.2.8. Phân tích và xử lý số liệu

Số liệu thí nghiệm được xử lý bằng Microsoft Excel 2016, phân tích ANOVA và so sánh trung bình bằng chương trình Minitab 16.0.

2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện từ tháng 5 năm 2020 đến tháng 01 năm 2022 tại Bộ môn Sinh học, Khoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Cần Thơ.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả định tính và định lượng thành phần hóa học

3.1.1. Kết quả định tính

Kết quả định tính cho thấy thành phần hóa học của các cao chiết từ cây cỏ gấu đều có sự hiện diện của các hợp chất có hoạt tính sinh học và được trình bày trong bảng 1.

Bảng 1. Kết quả định tính các hợp chất tự nhiên có trong cao chiết xuất từ cỏ gấu

Dịch chiết	Alkaloid	Flavonoid	Tannin	Phenolic	Saponin	Coumarin	Quinone	Terpenoid
Cỏ gấu	+	+	+	+	+	+	+	+

Ghi chú: (+): có hiện diện; (-): không hiện diện.

Kết quả bảng 1 cho thấy: thành phần hóa học của cao chiết từ cỏ gấu có chứa các hợp chất có hoạt tính sinh học như alkaloid, phenolic, flavonoid, tannin, saponin, coumarin, quinone và

terpenoid. Kết quả hoàn toàn phù hợp với nghiên cứu trước đó của Al-Snafi (2016), cỏ gấu chứa các hợp chất như flavonoid, tannin, glycoside, monoterpene, sesquiterpene, sitosterol, saponin,

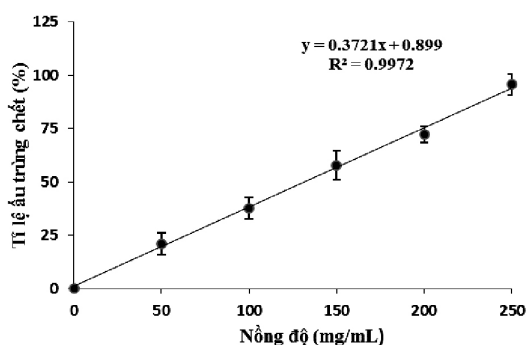
alkaloid, terpenoid và nhiều chất chuyển hóa thứ cấp khác. Một số nghiên cứu trước đây đã báo cáo, các hợp chất gồm alkaloid, coumarin, flavonoid, polyphenol, quinon, saponin, tannin và terpenoid đều có hoạt tính gây độc trên mô hình ruồi giấm (*D. melanogaster*) (Riaz *et al.*, 2018). Các hợp chất này đã được chứng minh là có hiệu quả khi sử dụng để quản lý dịch hại côn trùng (Fürstenberg-Hägg *et al.*, 2013).

3.1.2. Kết quả định lượng

Flavonoid và polyphenol là hai trong những nhóm hợp chất có nhiều hoạt tính sinh học tiềm năng sử dụng trong việc phòng trừ và quản lý dịch hại côn trùng (Gajger and Dar, 2021). Do đó, định lượng flavonoid tổng và polyphenol tổng là hai chỉ tiêu quan trọng nhằm đánh giá khả năng kháng côn trùng từ cây cỏ gấu. Hàm lượng polyphenol và flavonoid có trong cao chiết cỏ gấu đã được xác định dựa vào phương trình hồi quy tuyến tính của chất chuẩn của gallic acid ($y = 0,0778x + 0,0255$, $R^2 = 0,9975$) và quercetin ($y = 0,0046x + 0,0218$, $R^2 = 0,9832$). Kết quả định lượng ghi nhận trong cao chiết từ cây cỏ gấu có sự hiện diện của hai hợp chất polyphenol ($93,8 \pm 0,46$ mg/g cao chiết) và flavonoid ($198 \pm 3,32$ mg/g cao chiết).

3.2. Kết quả khảo sát khả năng gây độc của cao chiết trên ấu trùng ruồi giấm

Kết quả khảo sát khả năng gây độc của cao chiết cỏ gấu được đánh giá thông qua tỉ lệ chết của ấu trùng tuổi 2 sau 10 ngày khảo sát và nồng độ gây chết 50% (LC_{50}) cũng được xác định. Kết quả được trình bày ở hình 1.



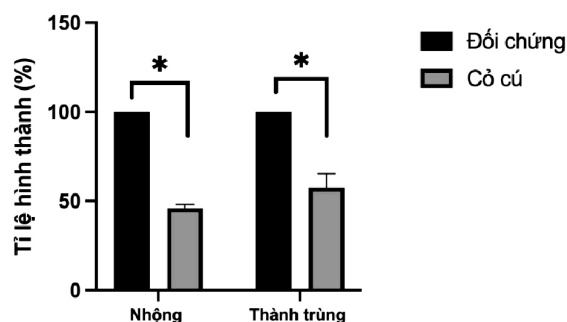
Hình 1. Biểu đồ thể hiện tỉ lệ ấu trùng chết theo dãy nồng độ khảo sát

Sau 10 ngày khảo sát trong điều kiện có bổ sung cao chiết cỏ gấu cho thấy, số % ấu trùng chết khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê so với đối chứng ở

tất cả các nồng độ. Giá trị gây chết 50% (LC_{50}) của cao chiết cỏ gấu được xác định thông qua phương trình hồi quy tuyến tính ($y = 0,3721x + 0,899$; $R^2 = 0,9972$) với giá trị $LC_{50} = 132$ mg/mL. Đáng chú ý, ở nồng độ cao chiết 250 mg/mL có hiệu quả gây độc cao nhất, với số lượng ấu trùng chết sau 10 ngày theo dõi lên đến 95,56% (Hình 1). Điều đó cho thấy cỏ gấu có hiệu quả cao gây ảnh hưởng mạnh đến tỉ lệ tử vong ở ấu trùng giai đoạn hai ruồi giấm (*Drosophila melanogaster*). Năm 2018, Janaki và cộng tác viên (2018) đã chứng minh được tinh dầu của thân rễ cỏ gấu có hoạt tính xua đuổi côn trùng, cụ thể đối với 3 loài gồm *Callosobruchus maculatus* F., *Oryzaephilus surinamensis* L., và *Trogoderma granarium*. Theo kết quả báo cáo, tinh dầu của cỏ gấu có thể được sử dụng như một chất thay thế thích hợp cho thuốc trừ sâu hóa học để quản lý sâu bệnh trên cây trồng. Gần đây, trong nghiên cứu của Elhaj và cộng tác viên (2021) đã chứng minh chiết xuất ethanol của *C. rotundus* (4%, 6%, 8%, 10% và 12%) được sử dụng cho thấy hiệu quả cao gây chết ấu trùng *H. armigera*, ở nồng độ 12% gây ra tỷ lệ tử vong lên đến 90% sau 72 giờ.

3.3. Kết quả khảo sát sự ảnh hưởng của cao chiết đến quá trình sinh trưởng và phát triển của ruồi giấm

Thực vật cũng có thể được sử dụng làm tác nhân kiểm soát dịch hại như một chất điều hòa sinh trưởng hơn là thuốc trừ sâu gây độc trực tiếp vì chúng có liên quan đến việc ức chế quá trình sinh trưởng và phát triển của côn trùng (Pavela, 2008). Chiết xuất từ cỏ gấu được sử dụng với nồng độ 20 mg/mL thức ăn cho thấy cao chiết đã gây ảnh hưởng đến quá trình sinh trưởng và phát triển của ruồi giấm, kết quả được ghi nhận ở hình 2.



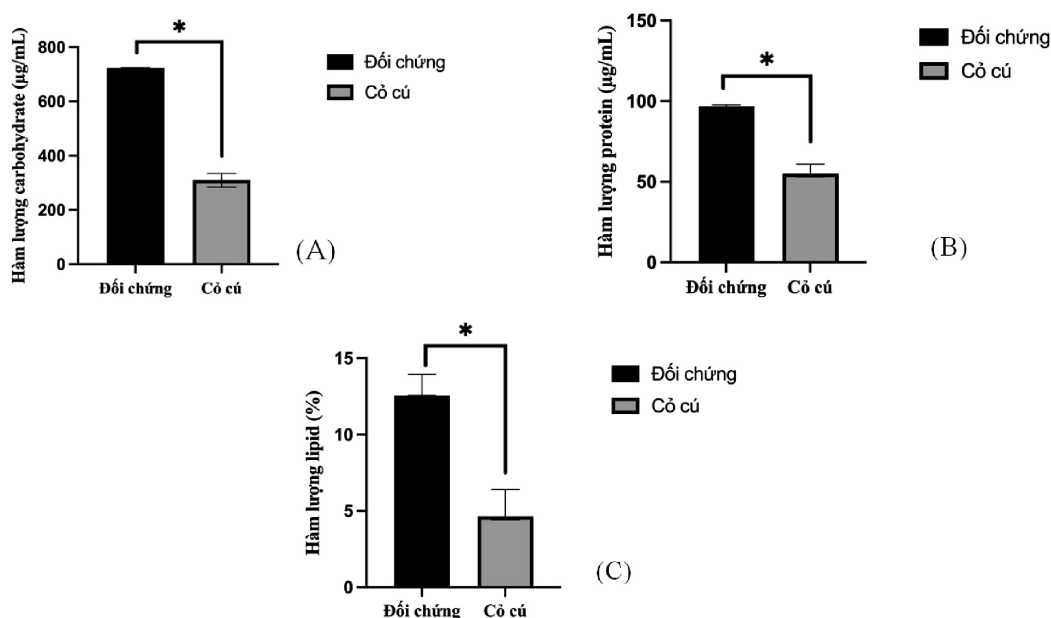
Hình 2. Ảnh hưởng của chiết xuất đến khả năng sinh trưởng và phát triển của ruồi giấm

Ghi chú: Dữ liệu được biểu thị dưới dạng giá trị trung bình \pm độ lệch chuẩn. Ý nghĩa thống kê được kiểm tra với mức ý nghĩa 5% (*, $P < 0,05$) bằng phương pháp T-Test.

Chiết xuất từ cây cỏ gấu gây ảnh hưởng lên quá trình sinh trưởng, phát triển của ấu trùng và nhộng ruồi giấm. Số ấu trùng được hóa nhộng nuôi trong môi trường có bổ sung cao chiết sau 10 ngày khảo sát thấp hơn 2,12 lần so với nghiệm thức đối chứng. Kết quả theo dõi số ruồi con được nở từ ấu trùng cho thấy cao chiết cũng gây ảnh hưởng đến giai đoạn này. Sau 14 ngày khảo sát, có hơn 50% ruồi chết ở giai đoạn nhộng và không thể phát triển lên giai đoạn trưởng thành trong khi tất cả nhộng của ruồi giấm được nuôi giữ trong môi trường thức ăn tiêu chuẩn đều phát triển thành ruồi trưởng thành.

3.4. Kết quả đánh giá thành phần dự trữ năng lượng

Các hợp chất có nguồn gốc từ thực vật có thể ảnh hưởng đến sinh lý của côn trùng mục tiêu theo nhiều cách, trong đó có các chỉ tiêu sinh hóa như thành phần dự trữ năng lượng. Các thành phần dự trữ năng lượng cơ bản trong cơ thể ruồi giấm trưởng thành gồm carbohydrate, lipid và protein được đánh giá sau 14 ngày khảo sát. Hàm lượng carbohydrate và protein được xác định dựa vào phương trình hồi quy tuyến tính lần lượt là $y = 0,0011x + 0,0974$, $R^2 = 0,9803$ và $y = 0,0067x + 0,0738$, $R^2 = 0,9825$ tương ứng.



Hình 3. Ảnh hưởng cao chiết cỏ gấu (cỏ cú) đến thành phần dự trữ năng lượng

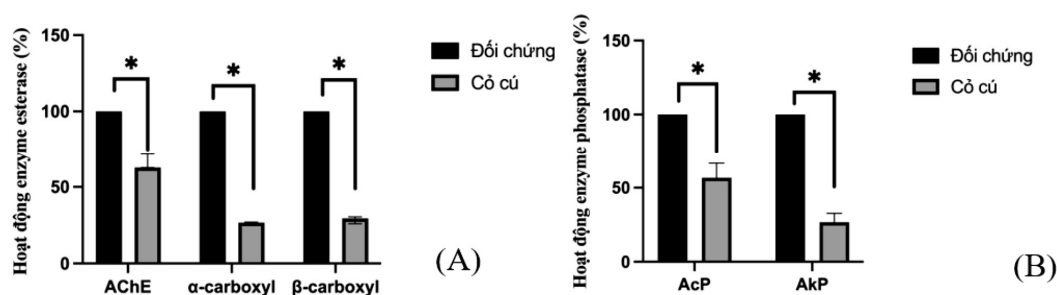
Ghi chú: (A) Carbohydrate; (B) Protein; (C) Lipid. Dữ liệu được biểu thị dưới dạng giá trị trung bình \pm độ lệch chuẩn. Ý nghĩa thống kê được kiểm tra với mức ý nghĩa 5% (*, $P < 0,05$) bằng phương pháp T-Test.

Kết quả thí nghiệm cho thấy, ruồi giấm trưởng thành sau 14 ngày tuổi được nuôi trong điều kiện có cao chiết cỏ gấu đã giảm đáng kể các thành phần dự trữ năng lượng gồm carbohydrate, lipid và protein (Hình 3). Hàm lượng carbohydrate, lipid và protein ở nghiệm thức cao chiết cỏ gấu (20 mg/mL) có giá trị lần lượt là $320 \pm 25,0$ µg/mL; $5,16 \pm 1,08\%$ và $56,3 \pm 4,10$ µg/mL, các giá trị này lần lượt thấp hơn 2,26; 2,52; 1,72 lần so với nghiệm thức đối chứng. Như vậy có thể cho rằng, cao chiết cỏ gấu gây ảnh hưởng đến các thành phần dự trữ năng lượng của ruồi giấm. Ảnh hưởng của chiết xuất methanol từ cây kế sữa *Silybium marianum* L., lên tỷ lệ tử vong,

tăng trưởng, chỉ số cho ăn, hoạt động của enzyme ở loài bướm trắng nhỏ (*Pieris rapae* L.) đã được ghi nhận trong nghiên cứu của Hasheminia và cộng tác viên (2013), kết quả cho thấy hàm lượng glucose và acid uric ở ấu trùng giai đoạn 3 được xử lý bằng cao chiết tăng lên, trong khi tổng lượng protein và cholesterol giảm.

3.5. Kết quả đánh giá hoạt tính ức chế các enzyme thuộc nhóm esterase và phosphatase

Ảnh hưởng của chiết xuất cỏ gấu lên hoạt động của enzyme (AChE, AcP, AkP, α -carboxyl và β -carboxyl) trong cơ thể ruồi giấm trưởng thành đã được đánh giá sau 14 ngày khảo sát.



Hình 4. Hoạt tính ức chế của cao chiết cỏ gấu đến hàm lượng enzyme của ruồi giấm

Ghi chú: (A) Enzyme esterase; (B) Enzyme phosphatase. Dữ liệu được biểu thị dưới dạng giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn. Ý nghĩa thống kê được kiểm tra với mức ý nghĩa 5% (*, $P < 0,05$) bằng phương pháp T-Test.

Kết quả trình bày ở hình 4 cho thấy, ở nồng độ 20 mg/mL cao chiết cỏ gấu đã gây ức chế hoạt động của các enzyme thuộc nhóm esterase và phosphatase. Cao chiết cỏ gấu có khả năng ức chế hoạt động của các enzyme AchE, α -carboxyl, β -carboxyl, AcP và AkP với giá trị lần lượt là $65,7 \pm 5,19\%$; $26,6 \pm 0,55\%$; $28,6 \pm 2,34\%$; $56,9 \pm 9,49\%$ và $22,3 \pm 13,2\%$ tương ứng so với nghiệm thức đối chứng. Trong nghiên cứu của Attaullah và cộng tác viên (2020) về đánh giá hoạt động diệt côn trùng của *P. harmala*, *D. stramonium*, *A. indica*, *T. terrestris* và *C. murale* chống lại ấu trùng giai đoạn 2 của *M. domestica* cũng làm giảm hoạt động của các enzyme ACh, ACP, AKP, α -cacboxyl và β -carboxyl.

IV. KẾT LUẬN

Dịch chiết từ cây cỏ gấu có hoạt tính gây độc đối với ấu trùng tuổi 2 của ruồi giấm *D. melanogaster* với giá trị LC_{50} xác định được là 132 mg/mL. Dịch chiết ảnh hưởng đến sự sinh trưởng và phát triển của ruồi giấm thông qua tác dụng gây chết ở giai đoạn nhộng và làm giảm hơn 40% các thành phần dự trữ năng lượng như carbohydrate, protein và lipid. Bên cạnh đó nghiên cứu còn ghi nhận khả năng ức chế các enzyme thuộc nhóm esterase (AchE, α -carboxyl và β -carboxyl) và phosphatase (AcP và AkP) dao động từ 22,3 đến 65,7%. Từ đó cho thấy, cỏ gấu là loài thực vật tiềm năng có thể sử dụng trong nghiên cứu các hoạt chất ứng dụng trong sản xuất thuốc phòng trừ côn trùng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Al-Snafi, A.E., 2016. A review on *Cyperus rotundus* A potential medicinal plant. *IOSR Journal of Pharmacy (IOSRPHR)*, 6 (7): 32-48.

Anholt, R.R., 2020. Chemosensation and Evolution of *Drosophila* Host Plant Selection. *IScience*, 23 (1): 100799.

Attaullah, Zahoor, M.K., Zahoor, M.A., Mubarik, M.S., Rizvi, H., Majeed, H.N., Zulhussnain, M., Ranian, K., Sultana, K., Imran, M., & Qamer, S., 2020. Insecticidal, biological and biochemical response of *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) to some indigenous weed plant extracts. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27 (1): 106-116.

Bag, G.C., Grihanjali Devi, P. and Bhaigyaba, T., 2015. Assessment of total flavonoid content and antioxidant activity of methanolic rhizome extract of three *Hedychium* species of Manipur valley. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 30 (1): 154-159.

Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72 (1-2): 248-254.

Chowański, S., Chudzińska, E., Lelario, E., Ventrella, E., Marciniak, P., Miądowicz-Kobielska, M., Spochacz, M., Szymczak, M., Scrano, L., Bufo, S.A., Adamski, Z., 2018. Insecticidal properties of *Solanum nigrum* and *Azadirachta indica* extracts on reproduction and development of *Drosophila melanogaster*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 162: 454-463.

Elhaj, W.E., Osman, A.A., & Elawad, L.M.E., 2021. Insecticidal activity of *Cyperus rotundus* L. and *Datura stramonium* L. Co-Administered with sesame oil against African bollworm *Helicoverpa armigera* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Agronomy Research*, 3 (4): 1-8.

Fürstenberg-Hägg, J., Zagrobelny, M. and Bak, S., 2013. Plant defense against insect herbivores. *International Journal of Molecular Sciences*, 14 (5): 10242-10297.

Gajger, I.T., and Dar, S.A., 2021. Plant allelochemicals as sources of insecticides. *Insects*, 12 (3): 189.

- Hasheminia, S.M., Sendi, J.J., Jahromi, K.T., & Moharrampour, S., 2013. Effect of milk thistle, *Silybium marianum*, extract on toxicity, development, nutrition, and enzyme activities of the small white butterfly, *Pieris rapae*. *Journal of insect science*, 13: 146.
- Janaki, S., Zandi-Sohani, N., Ramezani, L. and Szumny, A., 2018. Chemical composition and insecticidal efficacy of *Cyperus rotundus* essential oil against three stored product pests. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 133: 93-98.
- Neiselsen, S.S., 2010. *Food Analysis Laboratory Manual*. Springer New York Dordrecht Heidelberg London: 47-52.
- Parkash, R. and Aggarwal, D.D., 2012. Trade-off of energy metabolites as well as body color phenotypes for starvation and desiccation resistance in montane populations of *Drosophila melanogaster*. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, 161 (2): 102-113.
- Pavela, R., 2008. Insecticidal properties of several essential oils on the house fly (*Musca domestica* L.). *Phytotherapy Research*, 22: 274-278.
- Regnault-Roger, C., Vincent, C. and Arnason, J.T., 2012. Essential oils in insect control: Low-risk products in a high-stakes world. *Annual Review of Entomology*, 57: 405-424.
- Riaz, B., Zahoor, M.K., Zahoor, M.A., Majeed, H.N., Javed, I., Ahmad, A., Jabeen, F., Zulhussnain, M., & Sultana, K., 2018. Toxicity, phytochemical composition and enzyme inhibitory activities of some indigenous weed plant extracts in fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM*, 2325659.
- Rodrigues, G., Maia, M., Cavalcanti, A., Sousa, N.F., Scotti, M.T., & Scotti, L., 2021. In silico studies of lamiaceae diterpenes with bioinsecticide potential against *Aphis gossypii* and *Drosophila melanogaster*. *Molecules*, 26 (3): 766.
- Singleton, V.L., Orthofer, R., and Lamuela-Raventós, R.M., 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*: 152-178.
- Sivapalan, S.R., and Jeyadevan, P., 2017. Physico-chemical and phyto-chemical study of rhizome of *Cyperus rotundus* Linn. *International Journal of Pharmacology and Pharmaceutical Technology*, 1 (2): 42-46.
- Soumaya, K.J., Zied, G., Nouha, N., Mounira, K., Kamel, G., Genviève, F.D.M. and Leila, G.C., 2014. Evaluation of *in vitro* antioxidant and apoptotic activities of *Cyperus rotundus*. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 7 (2): 105-112.
- Usta, A., Güney, İ., Öztürk, M., Selvi, E.K. and Akner, M.M., 2020. Toxicological and behavioural potency of different plant extracts on *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) and their qualitative phytochemical analysis. *International Journal of Mosquito Research*, 7 (5, Part A): 12-18.

Toxicity performance assessment of the purple nutsedge extract on fruit fly model

Huynh Hong Phien and Tran Thanh Men

Abstract

Purple nutsedge (*Cyperus rotundus* L.) is a wild weed widely distributed in tropical, subtropical, and temperate regions. The study aimed to evaluate the toxic ability of the ethanol extract of *C. rotundus* on fruit fly (*Drosophila melanogaster*) model. Preliminary chemical characterization showed that *C. rotundus* has the presence of compounds such as alkaloids, flavonoids, saponins, phenolics, tannins, terpenoids, cardiac glycosides and steroids triterpenoids. The content of total polyphenols and flavonoids was also determined with value of 93.8 ± 0.46 mg GAE/g extract and 198 ± 3.32 mg QE/g extract, respectively. The ethanol extract of *C. rotundus* expressed its high toxicity against 2nd instar larvae of *D. melanogaster* with the LC_{50} value of 132 mg/mL. Besides, *C. rotundus* extract also affected the growth and development of fruit fly. Energy storage components such as carbohydrates, lipids and proteins of adult flies after 14 days decreased by 55.74%; 41.72%; 60.31% respectively, and activities of esterase (AChE, α -carboxyl and β -carboxyl) and phosphatase (AcP and AkP) were inhibited when fruit flies were fed a highly supplemented diet with *C. rotundus* extract. These findings contribute to confirming the toxicity of ethanol extract of *C. rotundus* and their potential use in preventing and controlling pest.

Keywords: Purple nutsedge (*Cyperus rotundus* L.), fruit fly (*Drosophila melanogaster*), extracts, toxicity

Ngày nhận bài: 27/3/2022

Ngày phản biện: 26/4/2022

Người phản biện: GS.TS. Nguyễn Hồng Sơn

Ngày duyệt đăng: 30/5/2022

NGHIÊN CỨU ĐỊNH DANH VÀ THUẦN HÓA LOÀI NẤM THUỘC CHI *Lentinus* THU THẬP TẠI VÙNG THẮT SƠN TỈNH AN GIANG

Hồ Thị Thu Ba^{1*}

TÓM TẮT

Nghiên cứu nhằm định danh và xây dựng quy trình nuôi trồng loài nấm hương hoang dại thuộc chi *Lentinus* (được kí hiệu là Len I) và tìm ra môi trường tối ưu để nấm tạo thể quả với hiệu suất sinh học cao. Kết quả phân tích trình tự gen rRNA vùng ITS của chủng nấm nghiên cứu cho thấy chủng Len I có độ tương đồng 96% so với loài nấm dại *Lentinus squarrosulus*. Kết hợp với quan sát hình thái học của chúng có thể xác định đây có thể là một loài gần gũi nhất với loài *Lentinus squarrosulus*. Len I được thuần hóa trên môi trường nuôi cấy giống cấp I, II và tạo quả thể trong phòng thí nghiệm. Kết quả cho thấy, môi trường tốt nhất để nhân giống cấp I cho nấm Len I là môi trường PDA bổ sung nước dừa, tốc độ lan nhanh nhất, đạt 5,62 cm sau 5 ngày nuôi cấy. Môi trường hạt lúa bổ sung 5% cám là môi trường nhân giống cấp II tối ưu. Môi trường tạo thể quả thích hợp nhất là môi trường với tỉ lệ phối trộn là 90% mùn cưa + 5% bắp + 5% cám, hiệu suất sinh học đạt 10,56 % sau 68,6 ngày nuôi cấy.

Từ khóa: Chi nấm *Lentinus*, môi trường nhân giống, định danh

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Nấm lớn là một loài sinh vật nhân thật không có chất diệp lục, sống dị dưỡng. Trong hệ thống phân loại nấm giới nấm xếp hàng thứ ba, ngang với thực vật và động vật (Trần Văn Mão, 2004). Nấm hương *Lentinus edodes* được biết đến là loài nấm ăn ngon lại có giá trị dược liệu cao được nuôi trồng quy mô lớn, có sản lượng cao nhất thế giới. Riêng nấm dại *Lentinus squarrosulus* là loài nấm cùng chi với nấm hương *Lentinus edodes*. Theo Shuai (2015), nấm *Lentinus squarrosulus* chứa 10,68% acid amin ngọt - có công thức cấu tạo giống bột ngọt, thích hợp trồng đại trà để sản xuất bột ngọt tự nhiên, tuy có giá trị thực phẩm cao, nhưng loài này chưa được nghiên cứu nuôi trồng nhân tạo. Việc khai thác và thuần hóa các giống nấm hoang dại ngoài thiên nhiên tạo các giống nấm ăn thuần chủng có giá trị cần phải được nghiên cứu và phổ biến rộng rãi. Việt Nam có rất nhiều loài nấm có thể phát triển làm thức ăn, đặc biệt vùng miền Nam có khí hậu ôn hòa nên có khá nhiều loài nấm, trong đó có nấm hương *Lentinus squarrosulus* là loài nấm có giá trị thực phẩm cao, tuy nhiên chưa được khai thác hiệu quả và nghiên cứu chọn giống, nuôi trồng nhân tạo. Đặc biệt, đồng bằng sông Cửu Long được thiên nhiên ưu đãi có vùng rừng núi Thất Sơn, vào mùa mưa có rất nhiều loài nấm xuất hiện nhưng chưa được tuyển chọn, đánh giá và nghiên cứu nuôi

trồng. *Lentinus squarrosulus* là loài nấm phổ biến ở An Giang, tuy nhiên chưa có ghi nhận khoa học nào về loài nấm này. Vì vậy, nghiên cứu này công bố một loài nấm có giá trị tại An Giang và kết quả phân lập, định danh loài nấm *Lentinus squarrosulus* bản địa, với mục đích từng bước xây dựng thương hiệu nấm ăn thuần chủng Việt Nam.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Nguồn mẫu: Nấm *Lentinus squarrosulus* thu tại xã An Hảo, Tịnh Biên, An Giang.

Môi trường nhân giống cấp I: PDA bổ sung nước dừa (Nguyễn Lâm Dũng, 2003); 200 g khoai tây, 20 g dextrose, 20 g agar, 1.000 mL nước dừa tươi.

Môi trường nhân giống cấp II: hạt lúa nấu vừa nở bổ sung 5% cám, 1% CaCO₃.

Môi trường ra quả thể trên mùn cưa cao su bổ sung 5% bột bắp + 5% cám + 1% CaCO₃.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp định danh

Phân tích hình thái: Dựa trên đặc điểm hình thái mô tả về *Lentinus squarrosulus* của Trịnh Tam Kiệt (2011).

¹ Khoa Nông nghiệp, Trường Đại học An Giang, Đại học Quốc gia TP.HCM

* E-mail: httba@agu.edu.vn