

# BƯỚC ĐẦU NGHIÊN CỨU HỆ IZOZYM LIÊN QUAN ĐẾN TÍNH KHÁNG THUỐC PHOSPHINE CỦA MỘT ĐỤC HẠT NHỎ (*Rhyzopertha dominica*, Fab)

## PRELIMINARY STUDY ON ISOZYME SYSTEM OF LESSER GRAIN BORE (*Rhyzopertha dominica* Fab) RESISTANT TO PHOSPHINE

Hoàng Trung<sup>(1)</sup>  
Trịnh Đình Đạt<sup>(2)</sup>, Trần Đức Long,<sup>(2)</sup>  
Nguyễn Quỳnh Hoa<sup>(2)</sup>

### Abstract

The Esterase isozyme of the two phosphine resistance strains of *Rhyzopertha dominica* F and reference susceptible strain was analysed by means of polyacrylamide gel electrophoresis. Esterases content of the worm strains were defined. The result showed that:

- Enzyme Esterase of the *R.dominica* strains is controlled by 3 gene loci. The two phosphine had five codominant alleles and reference susceptible strain has six codominant alleles.

- Est-3<sup>a</sup> allele frequency and esterase content of the two phosphine resistant strains were apparently higher than the susceptible strain.

Keywords: Rodominica, isozym, phosphine.

### 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Một đục hạt nhỏ - *Rhyzopertha dominica* Fab là một trong những loài một phá hoại nghiêm trọng nhất đối với các loại nông sản bảo quản trong kho dự trữ. Loài một này phân bố hầu khắp thế giới ở các vùng nhiệt đới và Châu Á. Tất cả các vùng, miền của nước ta đều có loài một này. Ngoài phá ngũ cốc trong kho, loài một này còn phá các loại thân, củ, rễ và sách báo.

Để phòng trừ các loài một hại kho, hầu hết các kho dự trữ nông sản đều được khử trùng bằng Phosphine (PH<sub>3</sub>). Việc sử dụng Phosphine thường xuyên đã là một trong những nguyên nhân dẫn đến sự hình thành kháng thuốc phosphine của một số loài một gây hại trong kho. Những kết quả nghiên cứu gần đây ở nước ta (Dương Minh Tú, Bùi Công Hiền, 1993 và Hoàng Trung, 1999) đã xác định ở một số địa điểm như Vĩnh Phúc, Hà Nội đã có những dòng của loài một đục hạt nhỏ (*Rhyzoperthe dominica* F.) kháng mạnh với thuốc Phosphine. Điều này

đã gây ra những khó khăn cho công tác phòng trừ và bảo quản hàng hoá trong kho ngày càng cao. Sự hình thành tính kháng phosphine nói riêng và các thuốc trừ sâu nhóm lân hữu cơ nói chung có liên quan đến hệ thống locus gen tổng hợp các izozym chuyên hoá làm mất tác dụng của thuốc khử trùng. Theo nhiều tác giả thì cơ chế chuyển hoá phosphine và các hoá chất nhóm lân hữu cơ nói chung có liên quan đến sự tác động của hệ izozym Esterase. Hệ izozym Esterase chuyên hoá làm biến đổi những thuốc trừ sâu một này từ dạng độc đối với côn trùng, sâu một thành dạng không độc đối với chúng. Do vậy, nhằm góp phần tìm hiểu cơ chế di truyền hiện tượng kháng thuốc phosphine đối với một đục hạt nhỏ và so sánh biểu hiện gen kháng của các dòng một thu thập ở các địa phương khác nhau và góp phần xây dựng biện pháp phòng trừ tổng hợp loài một hại này, chúng tôi tiến hành nghiên cứu hệ izozym Esterase ở một dòng đục hạt nhỏ với các mục đích sau:

- Xác định số locus, số alen của mỗi locus của hệ izozym Esterase ở các dòng một.
- Xác định hoạt độ Esterase tổng số của các

1. Cục Bảo vệ Thực vật

2. Đại học quốc gia Hà Nội

dòng một nghiên cứu.

- Tìm hiểu sự khác nhau về đặc điểm di truyền tính kháng giữa các dòng một.

## 2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Nguyên liệu:

Vật liệu nghiên cứu là loài một có vị trí phân loại như sau:

Lớp côn trùng	: Insecta
Bộ cánh cứng	: Coleoptera
Họ một đục thân nhỏ	: Bostrychidae
Giống	: <i>Rhyzopertha</i>
Loài	: <i>Rhyzopertha dominica</i> (Fab)

Ba dòng một sử dụng để phân tích hệ izozym Esterase đó là:

- Dòng mẫn cảm chuẩn (Mcc) được nhập từ Úc và đã được xác định là dòng không kháng đối với thuốc Phosphine. Dòng một này được nuôi giữ riêng trong phòng thí nghiệm.

- Dòng kháng 1 (K<sub>1</sub>) là dòng một được thu thập từ Kho dự trữ Quốc gia - Hương Canh và Vĩnh Phúc. Dòng một này đã được xác định là dòng kháng phosphine với Ri = 11,09

- Dòng kháng 2 (K<sub>2</sub>) là dòng một được thu thập từ Kho xí nghiệp gà Tam Đảo, Vĩnh Phúc cũng được xác định là dòng kháng phosphine với Ri: 10,24.

Một ở dạng trưởng thành của mỗi dòng được phân tích theo từng cá thể riêng biệt. Mỗi bản gel điện di đều được phân tích đồng thời cả 3 dòng và lặp đi lặp lại nhiều lần

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

Hệ izozym esterase được tách chiết từ mỗi cá thể trưởng thành và được phân tích điện di theo phương pháp của Green CA. (1990) [1] trên gel polyacrylamide 7,5% với hệ đệm TEB pH = 8,5 với U = 150v, I = 100mA trong thời gian 3 giờ ở nhiệt độ 5 °C. Sau điện di, bản gel được thực hiện

Bảng 1. Tần số alen của các locus Esterase ở các dòng một *R. dominica*

Dòng một	Alen	Các locus
----------	------	-----------

phản ứng kết tủa màu với cơ chất là ( $\alpha + \beta$ ) naphthyl acetate, với chất nhuộm màu Fast Garnet GBC salt và đệm nhuộm phosphat natrium pH = 6,45. Sau khi nhuộm, bản gel được rửa sạch, cố định trong dung dịch cố định và tính độ di chuyển tương đối (Rf), phân tích số locus, số alen của mỗi locus Esterase và số liệu được xử lý thống kê.

## 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

### 3.1. Kết quả phân tích điện di izozym Esterase của các dòng một *R. dominica*

Phân tích phổ điện di Esterase của các dòng một có thể chia ra làm 3 vùng:

**Vùng 1:** Gồm các băng chạy nhanh tương ứng với locus est-1. Biểu hiện hình thái băng ở các dòng như sau:

- Dòng Mcc có 3 loại kiểu hình: các cá thể có một băng chạy nhanh tương ứng với kiểu gel Est-1<sup>a</sup>/ Est-1<sup>a</sup>, Est -1<sup>b</sup>/ Est -1<sup>b</sup> và có các thể gồm cả hai băng tương ứng với dạng dị hợp có kiểu gen Est-1<sup>a</sup>/ Est -1<sup>b</sup>.

- Dòng K<sub>1</sub> và K<sub>2</sub> chỉ có một kiểu hình với một loại băng chạy chậm tương ứng với kiểu gen Est -1<sup>b</sup>/ Est -1<sup>b</sup>.

Như vậy vùng 1 do 1 locus gen Est -1 có 2 alen qui định

**Vùng 2:** tương ứng với các nhóm băng chuyển động trung bình.

**Vùng 3:** tương ứng với các nhóm băng chuyển động chậm nhất.

Ở cả vùng 2 và 3 đều xuất hiện 3 kiểu hình trong đó có hai kiểu gen đồng hợp và một kiểu gen dị hợp. Do vậy Vùng 2 do một locus gen Est -2 có 2 alen Est - 2<sup>a</sup> và Est - 2<sup>b</sup> qui định. Vùng 3 do một locus gen Est-3 có 2 alen Est - 3<sup>a</sup> và Est - 3<sup>b</sup> qui định.

Tần số alen của các locus Esterase ở các dòng một được nêu ở Bảng 1.

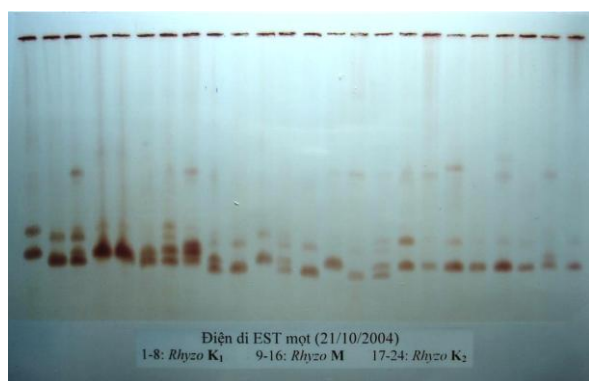
		Est - 1	Est - 2	Est - 3
Mcc	a	0,13	0,72	0,46
N = 50	b	0,87	0,28	0,54

K <sub>1</sub>	a	0,00	0,51	0,76
N = 41	b	1,00	0,49	0,24
K <sub>2</sub>	a	0,00	0,50	0,83
N = 43	b	1,00	0,50	0,17

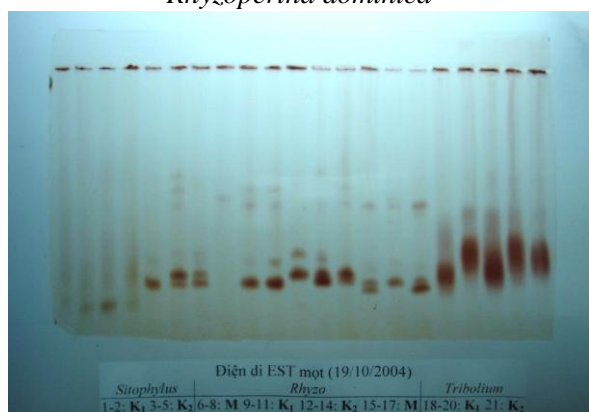
Qua bảng 1 cho thấy dòng Mcc đa hình hơn các dòng kháng K<sub>1</sub> và K<sub>2</sub>. Tần số alen Est - 3<sup>a</sup> của hai dòng kháng K<sub>1</sub> và K<sub>2</sub> cao hơn hẳn so với dòng Mcc. Nhiều công trình nghiên cứu cho thấy ở nhiều loài côn trùng tần số alen Est - 3<sup>a</sup> tăng khi môi trường sống của chúng chịu tác động của chất độc hoá học.

Một trong những kết quả điện di Esterase của các dòng mọt được biểu hiện ở hình 1.

Để so sánh sự biểu hiện về phổ điện di ở các loài mọt khác nhau chúng tôi tiến hành phân tích đồng thời cả ba loài mọt đó là mọt gạo (*Sitophilus oryzae*) mọt đục hạt nhỏ (*R. dominica*) và mọt bột đỏ (*T. castaneum*). Một trong những kết quả điện di Esterase của 3 loài mọt được trình bày ở hình 2.



Hình 1: Phổ điện di Esterase của 3 dòng mọt *Rhyzopertha dominica*



Hình 2: Phổ điện di Esterase của 3 dòng mọt *Rhyzopertha dominica*

Hai loài mọt gạo (*S.oryzae*) và mọt bột đỏ (*T. castaneum*) có các băng điện di chưa được tách biệt rõ ràng.

### 3.2. Hoạt độ tổng số của 3 dòng mọt loài *R. dominica*

Hoạt độ Esterase tổng số của 3 dòng mọt loài *R.dominica* được đo bằng phương pháp của Peiris H và Heminway J., 1990. Kết quả thu được ở bảng 2.

Bảng 2. Hoạt độ Esterase tổng số của 3 dòng mọt loài *R. dominica*

Dòng mọt	N	OD
Mcc	50	0,211
K <sub>1</sub>	44	0,225
K <sub>2</sub>	45	0,218

Qua bảng 2 cho thấy hoạt độ Esterase tổng số (OD) của các loài kháng cao hơn dòng mẫn cảm trong đó dòng kháng K<sub>1</sub> là cao nhất.

**Nhận xét chung:** Phân tích hệ izozym Esterase của các dòng mọt trong đó có hai dòng K<sub>1</sub> và K<sub>2</sub> chịu tác động thường xuyên của phosphine cho thấy các dòng kháng này có xu hướng tăng dần số alen Est - 3<sup>a</sup>, tăng hoạt độ Esterase tổng số. Nhiều công trình nghiên cứu cho thấy khi tác động các loại chất độc hại, nhiều loài côn trùng hệ izozym Esterase có xu hướng biến đổi tương tự (Pasteur và Singre, 1975, Maruyama, 1984; Tào Minh Tuấn, 1991; Trịnh Đình Đạt, 2004.

## 4. KẾT LUẬN

Trên cơ sở phân tích phổ điện di và hoạt độ Esterase tổng số của các dòng mọt đục hạt nhỏ *R.dominica* chúng tôi có thể rút ra một số kết luận như sau:

- Hệ izozym Esterase do ba loại locus qui

định, dòng mẫn cảm có 6 alen xác định còn hai dòng kháng có 5 alen xác định.

- Các dòng mẫn cảm chịu tác động của phosphine

có tần số alen Est -3<sup>a</sup> liên qua đến tính kháng thuốc và hoạt độ Esterase tổng số cao hơn so với dòng mẫn cảm.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Trịnh Đình Đạt, Ngô Thị Hoan, Đinh Nho Thái, Đinh Đoàn Long, 2004. Sự đa hình di truyền của hệ izozym Esterase của hai loài muỗi *M. gilvus* và *M. carbinarius* ở miền Nam Việt Nam. Tạp chí khoa học ĐHKHTN, KHTN & CN TXX SỐ 2 PT: 93-97.
2. Green C.A et.al, 1990. Population genetic evidence for two species in *A.minimus* in Thailand *J.Met.Vet.Ent.* 4: 25-34.
3. Maruyama Y. et.al, 1983. Eletrophoretic analysis of Esterase izozyme in organophosphate resistance moquitoes (*Culex pipiens*) *J.Insect. Bioch.* Vol. 14, N<sup>o</sup>2: 181-188
4. Pasteur N., Singre G., 1975. Esterase polymorphism and sensitivity to Dursban organophosphate insecticide in *Culex pipiens* population *J.Bioch. Gen.* 13: 789-803.
5. Peiris H.T.R., Hemingway J., 1990. Temefos resistance and associated cross-resistance spectrium in strain *Culex quinquefasciatus*, Say (Dipten: Culicidea) from pelyagod Srilanka. *Bull.Ent.Res* Vol. 80. N<sup>o</sup>1: 49-57.
6. Tào Minh Tuấn, 1991. Hiện tượng đa hình di truyền một số enzym ở muỗi *Culex quinquefasciatus*, Say (Dipten: Culicidea). Luận án PTS khoa sinh học, ĐHSPTHN.
7. Hoàng Trung, 1999. Nghiên cứu thành phần côn trùng kho ở 9 tỉnh miền Bắc Việt Nam và mức độ kháng thuốc phosphine, DDVP của 3 loài gây hại chính. *Luận án thạc sỹ khoa học nông nghiệp, Viện Khoa học nông nghiệp Việt Nam.*
8. Hoàng Trung, 2003. Đặc điểm phát triển của dòng mẫn cảm và kháng thuốc Phosphine ở loài mọt đục hạt nhỏ *Rhizopertha dominica*. *Tạp chí bảo vệ thực vật*, số 5/2003 tr 34-37.
9. Dương Minh Tú, 1991. Tính chống chịu thuốc xông hơi Phosphine của mọt đục thân nhỏ (*Rhyzopertha doninica* Fab). *Tạp chí bảo vệ thực vật*, số 2 / 1991 . tr. 18 - 19.
10. Dương Minh Tú và Bùi Công Hiến, 1993. Mức độ kháng thuốc xông hơi phosphine của một số loài côn trùng gây hại chủ yếu trong kho. *Tạp chí bảo vệ thực vật*, số 4/1993 . tr. 1 - 2.