

**ĐÁNH GIÁ SỰ TÁC ĐỘNG CỦA SÂU TƠ *Plutella xylostella* L.
ĐẾN SỰ TIẾT CÁC HỢP CHẤT BAY HƠI
CỦA CÂY *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh**

TRƯƠNG THỊ DIỆU HIỀN
Trường Đại học Tôn Đức Thắng

FRANCIS FRÉDÉRIC, GEORGES LOGNAY
Đại học Liège, Gembloux Agro-Bio Tech

Trong tự nhiên, môi trường luôn là nhân tố quan trọng đối với quá trình sinh trưởng, phát triển và tồn tại của các loài sinh vật. Các nghiên cứu về hệ sinh thái đã chỉ ra rằng thành phần và tính chất của môi trường rất đa dạng và luôn luôn biến đổi. Do đó, với đặc điểm sinh dưỡng tại chỗ, các loài thực vật phải thường xuyên thích nghi với sự biến đổi của môi trường, phải điều chỉnh hoạt động sống và có những cơ chế đáp ứng riêng của mình cho phù hợp với các biến đổi đó thì mới tồn tại và phát triển được. Một trong những cơ chế đáp ứng hiệu quả của thực vật đối với sự tác động của môi trường là quá trình thải các hợp chất bay hơi mà nhờ đó chúng có thể tác động trực tiếp hoặc gián tiếp đến các tác nhân gây hại (van Poecke, 2007).

Được xem là cây mô hình cho các nghiên cứu về thực vật bậc cao, các thành tựu nghiên cứu về sự tương tác của *Arabidopsis thaliana* Col-0 với môi trường đã và đang mang lại nhiều thông tin quan trọng cho các nghiên cứu về ứng phó với sự biến đổi của hệ sinh thái trong những năm gần đây (Van Poecke, 2007; Louis *et al.*, 2012). Kết quả thực nghiệm đã chỉ ra rằng mặc dù có nguồn gốc ôn đới nhưng *A. thaliana* có thể thích nghi với điều kiện khí hậu của Việt Nam, là đối tượng mô hình tốt cho các nghiên cứu trong sinh học thực vật (Lê Hồng Điệp *et al.*, 2012).

Ở nước ta, sâu tơ (*Plutella xylostella* L.) là loài côn trùng gây hại và ảnh hưởng lớn đến năng suất và chất lượng của cây rau thuộc họ thập tự (su hào, bắp cải...) (<http://quangninh.gov.vn>). Hơn nữa, sâu tơ là loài có khả năng kháng thuốc nhanh (Sarfraz *et al.*, 2006; Silva *et al.*, 2012). Do vậy, việc nghiên cứu cơ chế đáp ứng của cây trồng với côn trùng gây hại này là yếu tố cần thiết để tìm ra biện pháp phòng trừ phù hợp sự phát sinh của chúng trên cây. Một số nghiên cứu đã nhận thấy trên cây cải bắp bị bướm *P. xylostella* tấn công tiết ra nhiều hợp chất bay hơi (Vuorinen *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2012). Trong một nghiên cứu trước, chúng tôi đã nhận thấy rằng sự kết hợp của *P. xylostella* và nhiệt độ đã gây ảnh hưởng lớn thành phần các hợp chất bay hơi của cây *A. thaliana* (Truong *et al.*, 2014). Tuy nhiên, sự ảnh hưởng của mật độ sâu tơ và thời gian gây hại vẫn chưa được quan tâm và đề cập. Do đó, trong bài báo này, chúng tôi trình bày một số kết quả đánh giá về ảnh hưởng của mật độ và thời gian phá hoại của ấu trùng sâu tơ *P. xylostella* lên sự tiết các hợp chất bay hơi của cây *A. thaliana*.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

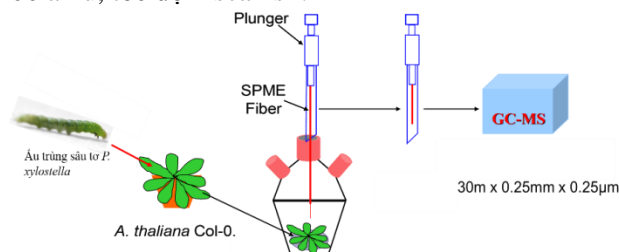
1. Vật liệu nghiên cứu

Thí nghiệm được tiến hành với các cây *A. thaliana* kiểu dại, accession Columbia (Col-0), 5 tuần tuổi. Nguồn mẫu cây trồng thu được từ việc gieo trồng các hạt giống (Công ty Lehle, Đức) trong các chậu nhựa (kích cỡ 3x7) chứa đất tơi xốp và đặt trong phòng nuôi cấy ở nhiệt độ 22°C, dưới ánh sáng đèn neon và thời gian chiếu sáng 17 giờ/ngày, độ ẩm 65%. Ấu trùng sâu tơ (*P. xylostella*; 3rd instar) thu được từ quá trình nuôi các con bướm trưởng thành (nhiệt độ 22 ± 2°C, thời gian chiếu sáng 16 giờ/ngày và độ ẩm 65%) được dùng làm tác nhân gây hại trong thí nghiệm này.

2. Phương pháp nghiên cứu

Xử lý cây trồng: Toàn bộ cây *A. thaliana*, bao gồm cả rễ và lá (0,30-0,40 g/cây) được tách bỏ khỏi chậu, dùng giấy bạc bao phủ toàn bộ phần rễ để tránh sự tiết các hợp chất bay hơi từ rễ trong suốt quá trình thu nhận chất khí. Các thí nghiệm được tiến hành với 3 cây *Arabidopsis* được đặt một cách cẩn thận trong bình thí nghiệm chuyên dụng để thu nhận các hợp chất bay hơi (100 ml, Duran Group, Đức; được làm sạch trước đó bằng methanol, nước mili-Q và giữ ở 180°C trong vòng 24h). Sau đó, các ấu trùng sâu tơ được đặt lên lá của các cây này theo các mật độ khác nhau: 0 (đối chứng), 3 và 9 ấu trùng/cây và quá trình ăn lá cây của ấu trùng kéo dài từ 0-4 và 4-8 giờ. Mỗi thí nghiệm được lặp lại ít nhất 3 lần với các cây *Arabidopsis* và ấu trùng sâu tơ khác nhau.

Thu nhận và phân tích các hợp chất bay hơi: Quá trình thu thập các hợp chất bay hơi được thực hiện bằng hệ thống tĩnh với dụng cụ thu thập là các fiber 65 μm Divinylbenzene/Polydimethylsiloxane (PDMS/DVB) fiber (Supelco; Bellefonte, PA) trên các cây *Arabidopsis* khỏe và bị ấu trùng sâu tơ phá hoại. Trước khi được sử dụng để thu nhận các hợp chất, fiber được làm sạch và loại bỏ các tạp chất ở 225°C trong vòng 30 phút (theo hướng dẫn của nhà sản xuất), sau đó fiber được gắn trên nắp bình thí nghiệm có chứa mẫu và quá trình thu nhận các hợp chất bay hơi được tiến hành trong điều kiện phòng thí nghiệm ở nhiệt độ 22°C và kéo dài trong 4 giờ (Hình 1). Kết thúc quá trình thu nhận, fiber sẽ được rút ra khỏi hệ thống và đặt vào máy sắc ký khí khối phổ (gas chromatography-mass spectrometry, GC/MS; Thermo-Fisher Scientific; Waltham, MA, USA) (dài 30 m; đường kính 0,25 mm; độ dày 0,25 μm , Optima-5-MS, Macherey-Nagel, Düren, Đức). Fiber được giữ lại ở GC injector trong 5' tại 220°C. Chất mang là helium với tốc độ 0,5 ml/phút. Chương trình phân tích như sau: nhiệt độ lò tăng từ 40°C đến 220°C (giữ 1 phút), tốc độ 4°C; sau đó tăng từ 220°C đến 320°C (giữ 10 phút), tốc độ 100 °C/min. Phân tích khối phổ MS được tiến hành bằng cách sử dụng một đầu dò chọn lọc có dòng vận chuyển điện tử là 70 eV với điện áp đa chiều là 275V. Nhiệt độ nguồn của dòng vận chuyển điện tử và ion được duy trì tương ứng ở 230°C và 250°C. Khối quang phổ được scan từ 39 đến 400 amu, tốc độ 1 scan s^{-1} .



Hình 1: Sơ đồ thu nhận các hợp chất bay hơi được hình thành từ cây *A. thaliana* bị ấu trùng sâu tơ *P. xylostella* phá hoại và phân tích bằng sắc ký khí khối phổ GC/MS

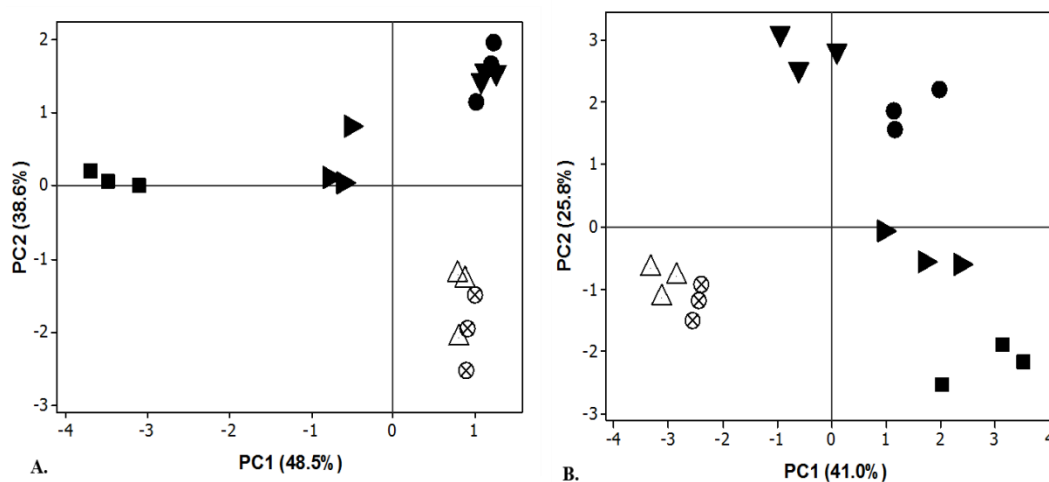
Xác định thành phần các hợp chất bay hơi: Các hợp chất bay hơi được xác định dựa trên kết quả so sánh các dữ liệu quang phổ của các chất khí thu thập được từ nguồn mẫu thí nghiệm với ngân hàng số liệu của Wiley và NIST MS 2.0. Thêm vào đó, thời gian lưu (*retention time*, *RT*) của các chất khí trên phổ khối của nguồn mẫu thí nghiệm và chất chuẩn (cung cấp bởi Sigma-Aldrich, Đức) được so sánh với nhau. Hơn nữa, sự xác định các hợp chất bay hơi cũng được tiến hành bằng cách so sánh thời gian duy trì (*Kovats retention index*, *RI*) của chúng trên phổ khối từ tài liệu tham khảo và từ dữ liệu thí nghiệm tính toán cũng được thực hiện.

Các chất bay hơi tiết ra từ các cây trồng sẽ được xác định bằng cách xây dựng các thí nghiệm đối chứng: các bình thí nghiệm không chứa mẫu (1), bình thí nghiệm chứa ấu trùng (2), và bình thí nghiệm chứa cả cây và ấu trùng (3).

Xử lý số liệu: Tỷ lệ phần trăm của các nhóm và của từng loại hợp chất bay hơi đạt được bằng cách tính tỷ lệ giữa vùng đỉnh (vùng bên trong khoảng cách giữa hai đỉnh) của chúng với tổng vùng đỉnh của tất cả các chất bay hơi thu thập được. Kết quả thí nghiệm được xử lý bằng phần mềm Minitab 16.2.2 (State College, Pennsylvania, Mỹ). Phân tích ANOVA hai nhân tố và phân tích thành phần chính (*principal component analysis, PCA*) được thực hiện để đánh giá tác động của mật độ và thời gian phá hủy của sâu tơ *Plutella* lên sự thải các hợp chất bay hơi của cây *Arabidopsis*.

II. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Các kết quả thí nghiệm thu được đã chỉ ra rằng mật độ và thời gian ăn hại của sâu tơ *P. xylostella* ảnh hưởng mạnh đến thành phần và tỷ lệ các hợp chất bay hơi tiết ra từ các cây *A. thaliana* (Hình 2). Tổng cộng thu nhận được 14 chất bay hơi thuộc 7 nhóm (alcohol, ketone, aldehyde, ester, sulfide, nitrile và terpene) tiết ra từ các cây *Arabidopsis* ở các nghiệm thức khác nhau (Bảng 1). Bằng phương pháp phân tích thành phần chính (PCA) theo tỷ lệ của các hợp chất khí thu được từ các cây *Arabidopsis* ở các nghiệm thức khác nhau (0, 3, và 9 ấu trùng/cây sau 0-4 và 4-8 giờ), chúng tôi nhận thấy rằng: (1) 87,1% khác nhau giữa các cây *Arabidopsis* theo nhóm hợp chất khí, trong đó trục chính thứ nhất (PC1) chiếm 48.5% và trục chính thứ hai (PC2) chiếm 38,6% (Hình 2A); (2) 66.8% sự khác nhau giữa các cây *Arabidopsis* theo từng chất bay hơi riêng lẻ với PC1 41.0% và PC2 28.5% (Hình 2B). Kết quả này tương ứng với nghiên cứu của Cai *et al.* (2014) trên cây trà, sự thải các hợp chất bay hơi của cây trà đã bị thay đổi mạnh dưới sự thay đổi mật độ côn trùng *Ectropis oblique* ăn hại.



Hình 2: Đồ thị phân tích thành phần chính tỷ lệ các hợp chất bay hơi được tiết ra từ các cây *A. thaliana* khỏe và bị phá hoại bởi các ấu trùng sâu tơ *P. xylostella* khác nhau ở mật độ và thời gian

A., các nhóm chất bay hơi; B., các chất bay hơi riêng lẻ. 0-4 giờ: ⊗, cây khỏe; ●, gây hại bởi 3 ấu trùng/cây; ►, 9 ấu trùng/cây. 4-8 giờ: △, cây khỏe; ▼, 3 ấu trùng/cây; ■, 9 ấu trùng/cây.

Ngược lại với sự thải ketone, sự thay đổi mật độ ấu trùng đã dẫn đến sự thay đổi có ý nghĩa của các hợp chất alcohol ($p = 0.002$) và aldehyde ($p = 0.002$) từ cây *Arabidopsis* bị phá hoại so với các cây đối chứng. Quá trình tiết các chất riêng lẻ thuộc hai nhóm này như: 2-ethylhexan-1-ol ($p = 0.002$), 2-ethyl-hexanal ($p = 0.027$) và benzaldehyde ($p = 0.006$) đã thay đổi có ý nghĩa khi so sánh giữa các nghiệm thức với nhau (Bảng 1).

Các kết quả phân tích cho thấy, các hợp chất thuộc nhóm sulfide và nitrile là các chất bay hơi đặc trưng cho các cây *Arabidopsis* bị sâu tơ *Plutella* gây hại. Thật vậy, dữ liệu chỉ ra rằng tỷ lệ thải sulfide (dimethyl disulfide (DMDS); dimethyl trisulfide (DMTS)) và nitrile [4-(methylthio) butanenitrile] tăng nhanh theo sự tăng mật độ và thời gian ăn hại của ấu trùng trên cây *Arabidopsis*. Hơn nữa, những hợp chất này không xuất hiện trong thành phần hợp chất bay hơi của cây khỏe (sulfide; $p < 0.001$; nitrile; $p = 0.010$) (Bảng 1). Điều này tương tự với nghiên cứu của van Poecke (2007), tác giả đã thu nhận được sulfide và nitrile trên các cây *Arabidopsis* bị bướm trắng (*Pieris rapae*) phá hoại. Tuy chỉ xuất hiện với hàm lượng nhỏ, sự tiết methyl salicylate từ các cây bị ấu trùng tấn công đã cho thấy rằng chúng ảnh hưởng lớn đến thành phần các hợp chất bay hơi của các cây *Arabidopsis*.

Để chống lại sự phá hoại của sâu tơ *P. xylostella*, các cây *Arabidopsis* sẽ tiết ra nhiều hợp chất bay hơi nhằm lôi kéo các thiên địch của loài này. Các chứng minh trước đã chỉ ra rằng tỷ lệ thải ester (như methyl salicylate), terpene, hợp chất thơm, sulfide, và nitrile của cây *Arabidopsis* sẽ tăng cao khi ấu trùng phá hoại so với cây khỏe (van Poecke, 2007; Snoeren *et al.*, 2010).

Bảng 1

Ảnh hưởng của số lượng và thời gian gây hại của ấu trùng sâu tơ *P. xylostella* lên sự tiết các hợp chất bay hơi của cây *A. thaliana*

Hợp chất	Số lượng ấu trùng trên 1 cây <i>Arabidopsis</i>					
	0		3		9	
	Thời gian gây hại					
	0-4 h	4-8h	0-4 h	4-8h	0-4 h	4-8h
Alcohols						
1-Pentene-3-ol		nd	nd	nd	trace	trace
2-Ethylhexan-1-ol	23.25 ± 1.69c	22.52 ± 4.35 ^c	44.55 ± 5.09 ^a	36.38 ± 5.98 ^{ab}	26.55 ± 3.81 ^{bc}	4.44 ± 0.39 ^d
Alcohol tổng	23.25 ± 1.69c	22.52 ± 4.35^c	44.55 ± 5.09^a	36.38 ± 5.98^{ab}	26.55 ± 3.81^{bc}	4.44 ± 0.39^d
Ketones						
Heptan-2-one	nd	nd	2.39 ± 1.45a	trace	trace	3.04 ± 1.79 ^a
Cyclohexanone	1.35 ± 0.08 ^a	2.28 ± 0.58 ^a	trace	2.46 ± 1.29 ^a	nd	trace
6-methyl hept-5-en-2-one	1.45 ± 0.33 ^b	1.10 ± 0.25 ^b	nd	nd	3.52 ± 0.50 ^a	1.13 ± 0.27 ^b
Nonan-2-one	nd	nd	2.27 ± 0.18 ^{bc}	4.62 ± 0.87 ^a	2.81 ± 0.22 ^b	1.39 ± 0.59 ^c
Geranyl acetone	17.61 ± 2.21 ^a	10.23 ± 1.96 ^b	4.88 ± 1.18 ^{cd}	1.45 ± 0.22 ^d	7.14 ± 1.99 ^{bc}	2.85 ± 1.19 ^{cd}
Ketone tổng	20.41 ± 1.98^a	13.61 ± 2.70^{ab}	9.54 ± 0.40^{ab}	8.53 ± 1.24^b	13.47 ± 2.32^{ab}	8.42 ± 2.25^b
Aldehydes						
2-Ethylhexanal	1.57 ± 0.64 ^b	1.44 ± 0.69 ^b	13.22 ± 1.96 ^a	10.90 ± 1.71 ^a	8.84 ± 2.41 ^a	2.85 ± 1.58 ^b
Benzaldehyde	6.57 ± 1.51 ^{ab}	6.65 ± 1.16 ^{ab}	3.37 ± 0.76 ^b	8.92 ± 1.86 ^a	4.81 ± 2.95 ^{ab}	2.36 ± 1.39 ^b
Hợp chất	Số lượng ấu trùng trên 1 cây <i>Arabidopsis</i>					
	0		3		9	
	Thời gian gây hại					
	0-4 h	4-8h	0-4 h	4-8h	0-4 h	4-8h

Aldehyde tổng	8.14 ± 2.13^{cd}	8.09 ± 0.48^{cd}	16.60 ± 2.23^{ab}	19.82 ± 3.55^a	13.65 ± 0.83^{bc}	5.21 ± 2.39^d
Ester						
Methyl salicylate	nd	nd	nd	nd	trace	trace
Sulfides						
Dimethyl disulfide	nd	nd	0.77 ± 0.07 ^c	0.77 ± 0.22 ^c	7.74 ± 1.26 ^b	54.71 ± 5.52 ^a
Dimethyl trisulfide	nd	nd	1.75 ± 0.31 ^a	1.76 ± 0.37 ^a	2.77 ± 1.47 ^a	2.22 ± 0.61 ^a
Sulfide tổng			2.51 ± 0.34^c	2.53 ± 0.50^c	10.51 ± 0.25^b	56.93 ± 5.34^a
Nitrile						
4-(methylthio) butanenitrile	nd	nd	nd	trace c	3.99 ± 0.16^a	3.31 ± 0.39^b
Terpenes						
Limonene	4.64 ± 0.55 ^{bc}	8.16 ± 2.71 ^a	2.56 ± 1.03 ^c	5.59 ± 0.84 ^b	3.22 ± 2.72 ^c	3.96 ± 3.85 ^{bc}
Menthol	43.56 ± 1.35 ^a	47.62 ± 0.86 ^a	24.24 ± 5.04 ^{bc}	27.14 ± 2.04 ^b	28.61 ± 1.94 ^b	17.73 ± 3.14 ^c
Terpene tổng	48.20 ± 1.68^a	55.78 ± 3.57^a	26.80 ± 5.61^{bc}	32.74 ± 2.60^b	31.84 ± 4.27^b	21.69 ± 1.27^c

Ghi chú: Số liệu biểu diễn dưới dạng trung bình ± SD (n=3), các chỉ số có cùng ký hiệu chữ cái khác nhau không có ý nghĩa thống kê (p > 0,05, ANOVA hai nhân tố, Tukey's HSD test); nd: không thu nhận được; trace, dạng vết (< 0,05%).

III. KẾT LUẬN

Trong thí nghiệm này, chúng tôi đã chứng minh rằng số lượng ấu trùng *P. xylostella* ảnh hưởng lớn theo thành phần và tỷ lệ tiết hợp chất bay hơi của cây *A. thaliana* (Hình 2 và Bảng 1). Cụ thể, có 7 nhóm chất bay hơi (alcohol, ketone, aldehyde, ester, sulfide, nitrile và terpene) được thu thập trên các cây *Arabidopsis* bị ấu trùng phá hoại, trong khi đó trên các cây khỏe, chỉ có 4 nhóm (alcohol, ketone, aldehyde và terpene). Đặc biệt, sự thải sulfide và nitrile đã tăng cao khi tăng mật độ *Plutella* trên cây trồng. Trong một nghiên cứu trước, van Poecke (2001) đã tìm thấy các gene quy định cho sự tiết các hợp chất bay hơi từ cây *A. thaliana* dưới tác động của ấu trùng bướm trắng (*P. rapae*). Do đó, việc tìm ra các gene, protein liên quan đến sự tiết chất khí của *Arabidopsis* dưới tác động của *Plutella* là một điều cần thiết để giúp các nhà sinh thái hiểu rõ hơn mối tương quan giữa hai loài này trong hệ sinh thái. Từ đó, có thể tìm ra các biện pháp để phòng trừ sự phá hoại của sâu tơ đối với các loài rau cho nông nghiệp Việt Nam.

Lời cảm ơn: Tác giả cảm ơn Bộ Giáo dục và Đào tạo Việt Nam đã tài trợ cho nghiên cứu sinh.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Cai X. M., X. L. Sun, W. X. Dong, G. C. Wang, Z. M. Chen, 2014. *Chemoecology* 24: 1-14.
2. Lê Hồng Điệp, Ngô Thị Trang, 2012. *Arabidopsis* – Thực vật mô hình cho các nghiên cứu thực vật bậc cao. Tạp chí Khoa học ĐHQGHN, Khoa học Tự nhiên và Công nghệ 28:19-27.
3. Louis J., V. Singh, J. Shah, 2012. *American Society of Plant Biologists*, 10: 1-19.
4. Sarfraz M., L. M. Dossall, B. A. Keddie, 2006. *Crop Protection*, 25(7): 625-639.
5. Silva R., M. J. Furlong, 2012. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 143(3): 218-230.

6. **Snoeren T. A., I. F. Kappers, C. Broekgaarden, R. Mumm, M. Dicke H. J. Bouwmeester**, 2010. *Journal of Experimental Botany*, 61(11): 3041–56.
7. **Truong D. H., B. Delory, Y. Brostaux, S. Heuskin, P. Delaplace, F. Francis, G. Lognay**, 2014. *Plant Signaling & Behavior*, 9(11): e973816.
8. **Van Poecke R. M. P.**, 2007. Arabidopsis-Insect Interactions. *The Arabidopsis Book*. The American Society of Plant Biologists 5: e0107.
9. **Van Poecke R. M. P., M. A. Posthumus, M. Dicke**, 2001. *Journal of Chemical Ecology* 27(10): 1911-25.
10. **Vuorinen T., A. M. Nerg, J. K. Holopainen**, 2004. *Environ Pollut*, 131(2): 305-311.

EVALUATION OF THE EFFECT OF *Plutella xylostella* L. INFESTATIONS ON VOLATILE EMISSION IN *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh

TRUONG DIEU HIEN, FRANCIS FREDERIC, GEORGES LOGNAY

SUMMARY

The infestation of chewing insects on plants often induces to release a variety of volatile organic compounds (VOCs). Here, our attention is focused on volatile emission by *Arabidopsis thaliana* Col-0 from healthy plants (as control) and by those infested by different densities of *Plutella xylostella* larvae over two time periods (0-4 h and 4-8 h). Headspace solid microextraction (HS-SPME) coupled with gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) was applied to evaluate *Arabidopsis* VOCs. The analytical results showed that under laboratory conditions, seven volatile classes (i.e., alcohols, ketones, aldehydes, ester, sulfides, nitrile and terpenes) were detected on plants subjected to different densities of larvae infestation, whereas only four volatile classes were observed on healthy plants (with the exception of ester, sulfides and nitrile). The relative emission of most volatiles increased significantly in *Arabidopsis* plants exposed to larvae infestation according to the density and residence duration of pests on shoot organs. Overall, our findings indicated that the stress level (density and time infestation of pests) greatly influenced the relative emission of *Arabidopsis* VOCs. This study provide new insights to understand the correlation between pest infestation and plant responsive defense, particularly in the VOC emission.