

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO  
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM TP. HCM

\*\*\*\*\*

VÕ THỊ THU OANH

NGHIÊN CỨU ĐẶC TÍNH SINH HỌC VÀ ĐÁNH GIÁ  
ĐỘ TÍNH CỦA CÁC MẪU PHÂN LẬP NẤM *Beauveria* VÀ  
*Metarhizium* KÝ SINH TRÊN  
CÔN TRÙNG GÂY HẠI

**Chuyên ngành: Bảo vệ Thực vật**

**Mã số : 62 62 10 01**

**TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ NÔNG NGHIỆP**

Tp. Hồ Chí Minh, năm 2010

**Công trình được hoàn thành tại:  
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM TP.HCM**

**Người hướng dẫn khoa học: 1. PGS. TS. Bùi Cách Tuyến  
2. TS. Lê Đình Đôn**

**Phản biện 1: GS.TS. Nguyễn Văn Đĩnh**

**Phản biện 2: GS.TS. Phạm Văn Biên**

**Phản biện 3: PGS.TS. Phạm Văn Dư**

**Luận án được bảo vệ trước Hội đồng chấm luận án cấp nhà nước họp tại  
Trường Đại Học Nông Lâm TP. Hồ Chí Minh  
Vào hồi 8 giờ, ngày 25 tháng 12 năm 2010**

**Có thể tìm hiểu luận án tại:**

**Thư viện Trường Đại Học Nông Lâm TP.HCM**

**Thư viện Quốc gia Hà Nội**

DANH SÁCH CÁC BÀI BÁO CÓ LIÊN QUAN ĐẾN  
LUẬN ÁN ĐÃ CÔNG BỐ

1. Võ Thị Thu Oanh, Lê Đình Đôn, Bùi Cách Tuyến (2005). Xác định trình tự vùng ITS-rDNA của nấm *Beauveria bassiana* Vuille. ký sinh trên côn trùng gây hại. *Tạp chí KHKT Nông Lâm Nghiệp số 2 và 3/2005*, Đại Học Nông Lâm TP.HCM, trang 159-165
2. Vo Thi Thu Oanh, Le Dinh Don, Bui Cach Tuyen (2005). Efficacy of *Beauveria bassiana* strains plus insecticide for controlling of brown planthoppers (*Nilaparvata lugens*) attacking on rice plant. *Journal of Agriculture Science and Technology*. Special Issue, pp. 16 -18
3. Võ Thị Thu Oanh, Lê Đình Đôn, Bùi Cách Tuyến (2007). Đặc điểm sinh học và khả năng gây bệnh của nấm *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin đối với sâu khoang (*Spodoptera litura* F.) hại rau cải xanh (*Brassica juncea* L.). *Tạp chí KHKT Nông Lâm Nghiệp số 1&2/2007*, Đại Học Nông Lâm TP.HCM, trang 58-63.
4. Võ Thị Thu Oanh, Lê Đình Đôn, Bùi Cách Tuyến (2008). Tuyển chọn các dòng nấm *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin để phòng trừ sâu keo da láng (*Spodoptera exigua* H.) trên cây hành lá (*Allium fistulosum* L.). *Hội nghị côn trùng học toàn Quốc lần 6/2008*, Hà Nội, trang 994-999.
5. Võ Thị Thu Oanh, Lê Đình Đôn, Bùi Cách Tuyến (2008). Khả năng gây bệnh của nấm *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin đối với rệp sáp giả (*Dysmicoccus* spp.) trên cây na (*Annona squamosa* L.). *Tạp chí BVTV số 3/2008*, trang 24-28.
6. Võ Thị Thu Oanh, Lê Đình Đôn, Bùi Cách Tuyến (2009). So sánh trình tự vùng ITS-rDNA của nấm *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin gây bệnh trên côn trùng phân lập ở một số tỉnh thành phía Nam Việt Nam. *Tạp chí NN&PTNT số 4/2009*, trang 21-25.

## MỞ ĐẦU

### 1. Tính cấp thiết của đề tài

Nấm *B. bassiana* và *M. anisopliae* là hai loại nấm ký sinh gây chết cho nhiều loại sâu hại cây trồng nông lâm nghiệp, đã và đang được nghiên cứu ứng dụng rộng rãi trên thế giới. Nấm *B. bassiana* gây bệnh trên 700 loài côn trùng, *M. anisopliae* gây bệnh cho hơn 200 loài côn trùng khác nhau. Hai loại nấm này đang được sử dụng phòng trừ nhiều loại sâu hại ở nhiều quốc gia trên thế giới như Nhật Bản, Đài Loan, Hàn Quốc, Úc, New Zealand, Braxin, Trung Quốc và Ấn Độ (Phạm Thị Thùy, 2004; Nguyễn Thị Lộc và cs, 2009).

Ở nước ta, Viện Bảo Vệ Thực Vật nghiên cứu sử dụng nấm *B. bassiana* và *M. anisopliae* để phòng trừ sâu hại cây trồng nông, lâm nghiệp với các chế phẩm Boverit, Muskardin và Mat (Phạm Thị Thùy, 2004). Chế phẩm Metavina sản xuất từ nấm *M. anisopliae* trừ các loại mối hại cây công nghiệp, cây ăn trái và cây cảnh (Tạ Kim Chính, 1995; Trịnh Văn Hạnh và cs, 2005). Viện lúa Đồng Bằng Sông Cửu Long sử dụng chế phẩm Biovip, Ometar trừ sâu hại trên cây lúa, rau, màu, cây ăn trái và đang được ứng dụng rộng rãi tại các tỉnh Vĩnh Long, Cần Thơ, Sóc Trăng, Trà Vinh (Nguyễn Thị Lộc và cs, 2009). Vì vậy, *B. bassiana* và *M. anisopliae* không những là tác nhân kiểm soát sinh học, mà còn là giải pháp an toàn cho môi trường thay thế thuốc trừ sâu hóa học.

Phân loại định danh nấm ký sinh côn trùng dựa vào đặc điểm hình thái được xem là nền tảng, là yếu tố ban đầu để nhận biết về loài nấm *Beauveria* và *Metarhizium*. Gần đây, với sự phát triển của các kỹ thuật sinh học phân tử, trình tự vùng ITS-rDNA đã được sử dụng để định danh nấm *B. bassiana* và *M. anisopliae*, hỗ trợ cho việc định danh loài, là cơ sở để hiểu biết về mối quan hệ giữa gen gây bệnh và quá trình hình thành bệnh côn trùng. Ở nước ta, việc sử dụng các dữ liệu di truyền để định danh loài, phân tích sự khác biệt di truyền ở mức độ phân tử đối với các cá thể trong quần thể ngoài tự nhiên, nghiên cứu đặc điểm sinh học, khả năng gây bệnh của những mẫu nấm mới phát hiện còn ít dữ liệu cơ sở và không nhiều thông tin về di truyền phân tử. Từ những cơ sở trên, đề tài “**Nghiên cứu đặc tính sinh học và đánh giá độc tính của các mẫu phân lập nấm *Beauveria* và *Metarhizium* ký sinh trên côn trùng gây hại**” đã được thực hiện.

### 2. Mục tiêu nghiên cứu

Sử dụng kỹ thuật sinh học phân tử để định danh các loài từ chi nấm *Beauveria* và *Metarhizium*. Nghiên cứu một số đặc điểm sinh học, khả năng gây bệnh, các yếu tố ảnh hưởng đến độc tính của các mẫu nấm *Beauveria* và *Metarhizium* đã định danh được loài nhằm thiết lập cơ sở dữ liệu sinh học cho các mẫu nấm bản địa, cung cấp thông tin cơ bản cho việc chọn mẫu nấm có độc tính cao đối với sâu hại trong nghiên cứu ứng dụng.

### 3. Ý nghĩa khoa học và thực tiễn

- Bên cạnh phương pháp phân loại truyền thống, sử dụng trình tự vùng ITS - rDNA để định danh ở cấp độ loài của chi nấm *Beauveria* và *Metarhizium* là hướng tiếp cận mới,

góp thêm cơ sở khoa học để phát triển phương pháp định danh nấm ký sinh côn trùng ở Việt Nam.

- Trình tự DNA vùng ITS-rDNA của 13 MPL *B. bassiana* và 16 MPL *M. anisopliae* đã được đăng ký trên ngân hàng dữ liệu Genbank cung cấp dữ liệu cơ sở cho các nhà khoa học khai thác sử dụng để nghiên cứu về cấu trúc quần thể, nguồn gốc phân bố địa lý của loài *B. bassiana* và *M. anisopliae*.

- Cung cấp những thông tin cần thiết về đặc điểm sinh học của loài nấm *B. bassiana* và *M. anisopliae* nhằm thiết lập các dữ liệu sinh học cho các mẫu nấm bản địa, góp thêm cơ sở khoa học để bổ sung thêm vào danh sách các mẫu nấm gây bệnh côn trùng có độc tính cao hiện đang có ở nước ta.

#### 4. Những đóng góp mới của luận án

- Sử dụng trình tự DNA trên vùng ITS - rDNA để định danh loài và có thể dưới loài của nấm *Beauveria* và *Metarhizium* là hướng tiếp cận mới, góp thêm cơ sở khoa học để phát triển phương pháp định danh nấm ký sinh côn trùng ở mức độ phân tử.

- Xác định quần thể *B. bassiana* có 3 nhóm di truyền và *M. anisopliae* với 6 nhóm khác nhau dựa trên trình tự DNA vùng ITS-rDNA. Xác định trong quần thể nấm *B. bassiana*, sự biến động trình tự xảy ra trên vùng ITS2-rDNA, và trên vùng ITS1-rDNA của nấm *M. anisopliae*

- Xác định được 10 trong số 16 MPL *M. anisopliae* có sự hiện diện của gen *Pr1*, gen liên quan đến tính gây bệnh của nấm đối với sâu hại. Về phương pháp luận: phương pháp nested-PCR với qui trình thực hiện phù hợp có thể sử dụng để sàng lọc, phát hiện nhanh những mẫu nấm *M. anisopliae* có độc tính gây bệnh cao trong nghiên cứu ứng dụng.

- Xác định được môi trường SDAY+K thích hợp cho sự hình thành bào tử của *B. bassiana* và *M. anisopliae*, có 8 mẫu *B. bassiana* và 9 mẫu *M. anisopliae* phát triển tốt ở nhiệt độ cao 35<sup>0</sup>C, 3 mẫu Bb(RN-LA), Bb(RSM-Q2), Bb(RSM-BC) và 2 mẫu Ma(RN-LA), Ma(RS-Q9) có độc tính không chọn lọc ký chủ, gây bệnh cho cả rầy nâu và sâu xanh da láng. Các MPL *B. bassiana* và *M. anisopliae* đều bị bất hoạt bởi thuốc trừ nấm mancozeb, zineb, carbendazim, benomyl nhưng không tác động bất lợi đến thiên địch trên ruộng lúa.

#### 5. Đối tượng và phạm vi nghiên cứu

\* *Đối tượng nghiên cứu*: các MPL *Beauveria* và *Metarhizium* được phân lập từ nhiều ký chủ sâu hại ở các vùng địa lý khác nhau.

\* *Phạm vi nghiên cứu*: Định danh các mẫu nấm dựa vào đặc điểm hình thái, trình tự DNA vùng ITS-rDNA. Phân tích trình tự DNA vùng ITS-rDNA của nấm *B. bassiana* và *M. anisopliae*. Khảo sát một số đặc điểm sinh học, khả năng gây bệnh trên một số sâu hại trong điều kiện *in vitro*, nhà lưới và đồng ruộng tại Long An và Tân Hạnh, Đồng Nai.

#### 6. Bố cục của luận án

Luận án gồm 166 trang gồm 3 chương với 37 bảng số liệu, 47 hình. Có 223 tài liệu, trong đó có 38 tài liệu tiếng Việt, 182 tài liệu tiếng Anh và 3 website được sử dụng.

## Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

**1.1. Lịch sử nghiên cứu nấm gây bệnh côn trùng:** Năm 1709, Balisneri mô tả về nấm gây bệnh trên côn trùng, mở ra hướng nghiên cứu về bệnh lý côn trùng. Năm 1815, Agrostino Bassi mô tả bệnh nấm trắng muscardin trên tằm. Năm 1944, Steinhaus thành lập phòng thí nghiệm nghiên cứu về bệnh lý, về khả năng ứng dụng phòng trừ sâu hại ngoài đồng ruộng (Nguyễn Thị Lộc, 2009; Phạm Thị Thùy, 2004). Metschnikoff (1845-1916) đã phát hiện và phân lập được nấm *Entomophthora anisopliae* trên sâu non bộ cánh cứng hại lúa mì (*Anisopliae austrinia*), năm 1883, Sorokin N. đặt tên là *Metarhizium anisopliae*. Năm 1976, Tulloch đề nghị tên gọi nấm *M. anisopliae* với hai dạng dưới loài là *M. anisopliae* var. *anisopliae* Sorokin và *M. anisopliae* var. *major* (Johstom).

### 1.2. Triệu chứng côn trùng bị bệnh do vi nấm

- *Hiện tượng chấn thương:* các mô bị tổn thương do nấm gây ra, các lympho máu đọng lại và mô tái sinh được tạo thành bên trên bề mặt phần thân côn trùng bị tổn thương.

- *Hiện tượng nhiễm trùng máu:* do lympho chứa đầy sợi nấm, xảy ra hiện tượng thực bào do các tế bào bao vây nuốt một phần tiểu thể tạo thành những hợp bào và các tế bào khổng lồ làm cho côn trùng chết (Phạm Thị Thùy, 2004)

### 1.3. Đặc điểm nhận biết nấm *Beauveria* và *Metarhizium*

**Chi *Beauveria*,** tế bào sinh bào tử phát sinh từ sợi dinh dưỡng mọc thành đám, cuống phồng lên ở phần dưới, kéo dài cong gập hoặc cong đều ziczắc răng cưa. Bào tử đỉnh đơn bào, không màu trong suốt, hình cầu, kích thước 2,6 -2,8 x 2,2-2,4µm mọc trên cuống sinh bào tử hướng gốc (Phạm Thị Thùy, 2004; Luangsa-Ard, 2006)

**Chi *Metarhizium:*** có 2 loài gây bệnh phổ biến cho côn trùng là *M. anisopliae* (Sorok) Metch. 1883 và *M. flavoviride* Gams, 1973. Nấm *M. anisopliae* phát triển trên bề mặt côn trùng có màu trắng đến hồng, có vách ngăn, cuống sinh bào tử ngắn mọc trên đám sợi nấm dày đặc, hình trụ 6-13 x 2-4µm. Bào tử đỉnh đơn bào, hình trụ, kích thước 6,5-8,9 x 2,2-3,2µm, xếp thành chuỗi dài khá chặt chẽ (Phạm Thị Thùy, 2004, Nguyễn Thị Lộc, 2009)

**1.4. Độc tố và cơ chế tác động của *B. bassiana* và *M. anisopliae*:** Nấm *B. bassiana* tạo ra hỗn hợp độc tố gồm beauvericin, bassianolide và cosporein. Trong đó, độc tố chính gây hại cho côn trùng là beauvericin. Beauvericin tạo phức hợp với ion Na<sup>+</sup> và K<sup>+</sup> dẫn đến làm tăng tính thấm của màng tế bào tự nhiên và nhân tạo.

Độc tố diệt côn trùng của nấm *M. anisopliae* gồm ngoại độc tố destruxin A và destruxin B. Destruxin gây chán ăn, ngộ độc cho côn trùng sau khi hấp thụ vào da, làm tê liệt côn trùng và một số destruxin gây ức chế miễn dịch (Amiri và cs, 1999).

**1.5. Sự phát triển của nấm trong cơ thể côn trùng:** Khi xâm nhiễm vào trong cơ thể côn trùng, nấm tạo độc tố làm suy yếu phản ứng tự vệ của côn trùng. Côn trùng chết là do độc tố của nấm tiết ra. Khi côn trùng chết, nấm phát triển trong ký chủ, gặp điều kiện thích hợp tạo thành từng lớp bào tử ở bề mặt cơ thể vật chủ và phóng thích đi.

## 1.6. Đặc điểm di truyền của nấm *B. bassiana* và *M. anisopliae*

Phương pháp PCR, trình tự DNA được sử dụng để định danh *Beauveria* và *Metarhizium* cho kết quả nhanh và chính xác. Trình tự rDNA đã được sử dụng để định danh loài *Beauveria* và *Metarhizium* từ côn trùng nhờ các primer chuyên biệt (Leger, 1992b; Ricardo và cs, 2004). Các vùng ITS1 và ITS2 được sử dụng để phân biệt loài. Nested-PCR khuếch đại 1 phần gen *Pr1* của *M. anisopliae* xác định những mẫu nấm có độc tính cao, số lượng mẫu lớn, rút ngắn thời gian và độ chính xác cao (Lead và cs, 1997; Wang và cs, 2002). Ở nước ta, sử dụng các kỹ thuật phân tử để định danh loài nấm *Beauveria* và *Metarhizium* dựa trên trình tự DNA vùng ITS-rDNA còn rất ít.

## 1.7. Đặc điểm sinh học của nấm *Beauveria* và *Metarhizium*

\***Ảnh hưởng của môi trường dinh dưỡng:** Sự hình thành bào tử *M. anisopliae* và *B. bassiana* tốt nhất trên môi trường PDA (Kamp và Bidochka, 2002). Nhân nấm trên môi trường có cho thêm urea, acid-aminoacetic, asparagine,  $\text{NaNO}_3$  và  $\text{NH}_4\text{Cl}$  sẽ cho độc tính cao. Môi trường lỏng giàu dinh dưỡng (PDB) tạo nhiều bào tử blastospores (Ibrahim và cs, 2002). Gia tăng lượng sucrose từ 2%-8% sẽ làm giảm sức chống chịu của bào tử (Li và cs, 1995). Môi trường dùng để nhân sinh khối *M. anisopliae* là BH (chứa 3% biomalt, 1% chất chiết thô men) và Adámek (3% bột bắp, 4% chất chiết thô men, 4% glucose và 0,4% Tween 80 (Rombach và cs, 1987).

\***Ảnh hưởng của nhiệt độ và ẩm độ:** nhiệt độ thích hợp cho nấm *B. bassiana* và *M. anisopliae* phát triển trong khoảng từ  $25^{\circ}\text{C}$ - $30^{\circ}\text{C}$ , phát triển kém ở  $10^{\circ}\text{C}$ - $15^{\circ}\text{C}$ , ẩm độ thích hợp 80 - 90%, trên hoặc dưới ngưỡng nhiệt độ, ẩm độ này bào tử sẽ phát triển yếu hoặc chết hoặc không hình thành bào tử (Phạm Thị Thùy, 2004)

\* **Ánh sáng:** Trong điều kiện ánh sáng yếu, một lượng ánh sáng nhỏ trong ngày 6 – 8 giờ là đủ cho nấm phát triển tốt (Phạm Thị Thùy, 2004).

\* **Độ pH của môi trường nuôi cấy:** Trong giới hạn pH 6,0 - 7,0 rất thích hợp cho sự phát triển và tạo bào tử của *M. anisopliae*, pH 4,0 -10,0 không ảnh hưởng nhiều tới sự phát triển và tạo bào tử của *B. bassiana* (Nguyễn Ngọc Tú, 1997). Bổ sung thêm một lượng khoáng chất cần thiết như  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  và  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  để duy trì pH của môi trường (Phạm Thị Thùy, 1996)

\* **Ảnh hưởng của trước hóa học:** Các loại thuốc trừ nấm đều ảnh hưởng đến sự phát triển và hình thành bào tử của *B. bassiana* và *M. anisopliae* kể cả ở nồng độ thấp nhất, fipronil nồng độ 50ppm và 100ppm ảnh hưởng bất lợi đến khả năng sống của bào tử, fenitrothion ức chế hoàn toàn sự nảy mầm của bào tử nấm (Moorehouse và cs, 1992).

## 1.8. Một số kết quả nghiên cứu về khả năng gây bệnh của *B. bassiana* và *M. anisopliae* đối với sâu hại cây trồng

Nấm *B. bassiana* đã được sử dụng trừ sâu róm thông ở Trung Quốc hiệu lực đạt 43-93%, trừ rầy nâu ở Ấn Độ 88,35-91,25%, rầy lưng trắng 86,59-92,44%. Hiệu lực trừ dịch sâu róm ăn lá thông tại Thanh Hóa, Sơn La đạt hiệu quả 70 - 90% và đập tắt được dịch sau

2 -3 tháng phun. Sử dụng nấm *B. bassiana* nồng độ  $9 \times 10^8$  bt/ml để trừ sâu tơ đạt hiệu quả cao 81,25% ở 8 ngày sau khi phun (Phạm Thị Thùy, 1999; Nguyễn Thị Lộc, 2004).

Nấm *M. anisopliae*: trừ bọ cánh cứng hại dứa ở Ô Môn đạt từ 71,6-79,1% ở 14 ngày sau phun nấm. Ở nồng độ  $1,5 \times 10^7$  bt/ml, hiệu lực đối với rầy mềm hại cam quýt 83,2%, rầy bông hại xoài 74,3%, rệp sáp hại dứa 71,6-73,7% (Nguyễn Thị Lộc, 2009). Chế phẩm Mat, *M. anisopliae* có hiệu lực trừ bọ dứa đạt 71,03% ở 10 ngày sau xử lý, 73,34% ở 14 ngày và duy trì hiệu lực đến 21 ngày sau phun 69,19% (Phạm Thị Thùy, 2000; 2002, 2004; Nguyễn Xuân Niệm, 2009)

## Chương 2. NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Các thí nghiệm *in vitro*, nhà lưới: thực hiện tại Trường Đại Học Nông Lâm TP.HCM. Các thí nghiệm ngoài đồng thực hiện tại Đức Hòa, Long An và Tân Hạnh, Biên Hòa Đồng Nai

### 2.2 Nội dung nghiên cứu

1. Phân lập và xác định loài từ chi nấm *Beauveria* và *Metarhizium* ký sinh trên một số sâu hại cây trồng theo phương pháp truyền thống.
2. Phân loại và phân tích sự khác biệt di truyền của nấm *Beauveria* và *Metarhizium* dựa vào trình tự vùng ITS-rDNA.
3. Nghiên cứu một số đặc điểm sinh học của nấm *B. bassiana* và *M. anisopliae* ký sinh trên một số sâu hại cây trồng.
4. Đánh giá độc tính của nấm *B. bassiana* và *M. anisopliae* trên một số sâu hại cây trồng.

**2.3. Vật liệu nghiên cứu:** Các mẫu nấm *Beauveria* và *Metarhizium* ký sinh trên sâu hại. Môi trường phân lập PDA, môi trường nghiên cứu sinh học SDAY+K, SB+KC, Dulmage và Rhodes, Môi trường L-broth, môi trường dịch, các hóa chất chiết xuất DNA, hóa chất chạy PCR, primer giải trình tự, thuốc trừ sâu, trừ nấm.

### 2.4. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.4.1. Phân lập và xác định loài từ chi nấm *Beauveria* và *Metarhizium* theo phương pháp truyền thống.

- Các mẫu nấm được nuôi cấy trên PDA, tạo thuần bằng phương pháp nuôi cấy đơn bào tử trên môi trường chọn lọc (Chase và cs, 1986). Định danh theo Barnett và Barry, 1972; Lawrence, 1994). Ký hiệu mẫu: tên nấm + tên ký chủ + địa điểm thu mẫu (viết tắt bằng chữ cái đầu).

\* **Đặc điểm khuẩn lạc nấm *Beauveria* và *Metarhizium*:** Nấm được nuôi cấy trong các đĩa petri (đường kính 9cm) chứa môi trường PDA, nhiệt độ  $27 \pm 2^\circ\text{C}$ , 12 giờ sáng/12 giờ tối. Cách mọc của sợi nấm, màu sắc khuẩn lạc, sự phân bố và hình thành các vòng bào tử được quan sát vào lúc 10 ngày sau cấy.



\* **Đặc điểm cơ quan sinh bào tử và hình dạng bào tử:** tách đoạn sợi nấm chuyển lên phiến kính trong giọt dung dịch lactophenol, quan sát dưới kính hiển vi quang học độ phóng đại 400 lần, mô tả và ghi nhận các đặc điểm cấu trúc cành và hình dạng bào tử.

\* **Kích thước bào tử *Beauveria* và *Metarhizium*:** Thực hiện theo phương pháp của Reza và cs (2006). Các MPL được nuôi cấy trên các phiến kính phủ một lớp môi trường PDA, nhiệt độ  $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$  trong 10 ngày. Số bào tử được đo là 400. Đường kính trung bình của bào tử được tính dựa trên số đo của 2 đường chéo vuông góc của bào tử.

#### 2.4.2 Phân loại và phân tích sự khác biệt di truyền của nấm *Beauveria* và *Metarhizium* dựa vào trình tự vùng ITS-rDNA.

**Phương pháp chiết xuất DNA tổng số:** theo qui trình của Moller và cs (1992) có sửa đổi, nấm được nuôi cấy trong môi trường L-broth ở  $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , lắc 120-150 vòng/phút. Thu khối sợi nấm sau 4 ngày. Kiểm tra sự có mặt và định lượng DNA bằng cách điện di trên gel agarose 1,5% với DNA chuẩn 100ng.

**Phương pháp khuếch đại vùng ITS-rDNA:** Hai primer ITS5 và ITS4 được sử dụng để khuếch đại vùng ITS-rDNA bao gồm vùng 5.8S. Thể tích phản ứng 25 $\mu\text{l}$ , chu kỳ nhiệt:  $94^{\circ}\text{C}$  trong 5 phút, tiếp theo là 35 chu kỳ với  $94^{\circ}\text{C}$  trong 1 phút,  $55^{\circ}\text{C}$  1,5 phút,  $72^{\circ}\text{C}$  trong 1 phút và  $72^{\circ}\text{C}$  trong 5 phút.

**Phương pháp tinh sạch sản phẩm PCR cho giải trình tự DNA:** Sản phẩm PCR được tinh sạch với GFX PCR DNA và Gel Band Purification Kit của Amersham. Vùng ITS-rDNA được giải trình tự sử dụng primer ITS1 và ITS4

**Phương pháp khuếch đại gen *Pr1* của nấm *Metarhizium*:** theo phương pháp của Lead và cs (1997). Sử dụng các primer METPR1, METPR4, METPR2 và METPR5 để khuếch đại gen *Pr1*, phương pháp nested-PCR với chu kỳ nhiệt, PCR lần 1:  $94^{\circ}\text{C}$  trong 4 phút, tiếp theo là 37 chu kỳ,  $53^{\circ}\text{C}$  1 phút,  $72^{\circ}\text{C}$  2 phút và  $72^{\circ}\text{C}$  6 phút. PCR lần 2:  $94^{\circ}\text{C}$  trong 1 phút, 35 chu kỳ  $58^{\circ}\text{C}$  1 phút,  $72^{\circ}\text{C}$  2 phút và  $72^{\circ}\text{C}$  6 phút. Thể tích phản ứng là 25 $\mu\text{l}$ , sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1,5% với DNA ladder 100bp.

**Giải trình tự vùng ITS-rDNA:** vùng ITS - rDNA được giải trình tự bằng hai primer ITS1 và ITS4 và được so sánh với trình tự của các mẫu *B. bassiana* và *M. anisopliae* trên thế giới từ cơ sở dữ liệu của Genbank

**Giải trình tự gen *Pr1* của nấm *M. anisopliae*:** gen *Pr1* được giải trình tự bằng các primer MTEPr1, METPr4, METPr4 và METPr5 theo qui trình của công ty Macrogen (Seoul, Hàn Quốc).

**Phân nhóm xác định loài và sự khác biệt di truyền của nấm *B. bassiana* và *M. anisopliae* dựa vào trình tự vùng ITS-rDNA:** Sơ đồ phân nhóm loài nấm bằng thuật toán parsimony, phân tích bootstrap với 1000 lần lặp lại bằng chương trình DNADIST, SEQBOOT và CONSENSE trong phần mềm PHYLIP version 3.66 và TREEVIEW.

#### 2.4.3. Nghiên cứu một số đặc điểm sinh học của nấm *B. bassiana* và *M. anisopliae*

**2.4.3.1 Xác định thời gian bào tử nảy mầm:** theo phương pháp của Milner và cs (1991). Trãi đều 0,1ml dịch bào tử ( $10^6$  bào tử/ml trong Tween 80 0,05%) trên các phiến kính có phủ một lớp môi trường PDA, nhiệt độ  $27\pm 2^{\circ}\text{C}$  trong tối. Tỷ lệ bào tử nảy mầm (%) đánh giá ở 24 giờ sau nuôi cấy. Quan sát 4 điểm/phiến kính, 25 bào tử/điểm, tổng số bào tử quan sát là 400 cho mỗi MPL.

**2.4.3.2. Khả năng hình thành bào tử của nấm *B. bassiana* và *M. anisopliae*:** thực hiện theo phương pháp của Houping và cs (2003). Dùng 0,1ml dịch bào tử ( $10^6$ bt/ml) cấy lên môi trường SDAY+K trên các đĩa petri (đường kính 9cm), nhiệt độ  $27\pm 2^{\circ}\text{C}$  trong 10 ngày. Số lượng bào tử /ml của 1  $\text{cm}^2$  thảm nấm được đếm bằng buồng đếm hồng cầu THOMAS, qui đổi theo hệ số pha loãng.

**2.4.3.3 Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến sự hình thành bào tử *B. bassiana* và *M. anisopliae*:** Thực hiện tại phòng thí nghiệm Bệnh cây, Trường Đại Học Nông Lâm TP.HCM, theo phương pháp của Phạm Thị Thùy và cs (1995). Nấm *B. bassiana* và *M. anisopliae* được nuôi cấy trên môi trường SB+KC trong các đĩa petri (đường kính 9 cm), nhiệt độ  $27\pm 2^{\circ}\text{C}$ . Phương pháp và chỉ tiêu theo dõi (mục 2.4.3.2). Thời gian theo dõi: 5, 7, 14, 21, 28 và 35 ngày sau nuôi cấy.

**2.4.3.4. Ảnh hưởng của nguồn dinh dưỡng đến sự phát triển của nấm *B. bassiana* và *M. anisopliae*:** theo phương pháp của Kamp và cs (2002) trên 3 loại môi trường: SDAY+K, SB+KC và Dulmage H.T và Rhodes. Đặt khoanh nấm đường kính 4mm vào giữa đĩa môi trường, nhiệt độ  $27\pm 2^{\circ}\text{C}$ , 12 giờ sáng/12 giờ tối. 5 ngày sau nuôi cấy, đo đường kính khuẩn lạc (cm) bằng cách lấy trung bình đường kính trên 2 trục của khuẩn lạc. Tốc độ phát triển trung bình (mm/ngày) của 3 lần đo 6-8; 8-10 và 10-12 ngày sau nuôi cấy. Số lượng bào tử/ $\text{cm}^2$ : được tính 1 lần ở 14 ngày sau nuôi cấy (mục 2.4.3.2).

**2.4.3.5. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến sự phát triển và hình thành bào tử của nấm *B. bassiana* và *M. anisopliae*:** Thực hiện theo phương pháp của Uma và cs (2005) tại phòng thí nghiệm Bệnh cây, Trường Đại Học Nông Lâm TP.HCM. Cấy khoanh nấm (4mm) lên bề mặt đĩa petri chứa 20ml môi trường SDAY+K, đặt ở các mức nhiệt độ 20, 25, 28, 30,  $35^{\circ}\text{C}$  (đối với *B. bassiana*) và 20, 25, 28, 30,  $35^{\circ}\text{C}$ ,  $37^{\circ}\text{C}$  (*M. anisopliae*) trong tủ định ôn Memmert. Đường kính khuẩn lạc (cm), tốc độ phát triển trung bình (mm/ngày), số lượng bào tử /ml (trình bày ở mục 2.4.3.2); tỷ lệ bào tử nảy mầm (%) (mục 2.4.3.1).

**\* Khả năng nảy mầm của nấm *B. bassiana* và *M. anisopliae* ở các mức nhiệt độ cao:**

Theo phương pháp của Uma và cs (2005). Các nghiệm gồm: nhiệt độ  $25^{\circ}\text{C}$  (đối chứng), nhiệt độ thí nghiệm  $30^{\circ}\text{C}$ ,  $35^{\circ}\text{C}$  và  $38^{\circ}\text{C}$ . Dịch bào tử nấm ( $10^6$  bt/ml) trải trên phiến kính đã khử trùng có phủ một lớp mỏng môi trường SDAY+K. Đặt trong đĩa petri bên trong có lót giấy thấm đã được làm ẩm, cài đặt ở các mức nhiệt độ thí nghiệm (8 giờ), sau đó chuyển qua nhiệt độ đối chứng  $25^{\circ}\text{C}$  (16 giờ). Tỷ lệ bào tử nảy mầm (%) quan sát ở giờ thứ 24 (mục 2.3.4.1).

**2.4.3.6. Ảnh hưởng của ẩm độ đến sự hình thành và nảy mầm của *B. bassiana* và *M. anisopliae*:** Trãi đều 0,1ml dịch bào tử ( $10^6$  bào tử/ml) trên các phiến kính có phủ một lớp môi trường SDAY+K, đặt trong các đĩa petri (đường kính 10cm). Các đĩa petri được dán kín bằng parafin để trong tủ định ôn ở các mức ẩm độ: 75,5%, 85%, 89%, 92%, 94%, 97,5%, 98% và 100%, nhiệt độ 28°C trong 24 giờ. Mức độ bào tử hình thành, tỷ lệ bào tử nảy mầm (%) được đánh giá theo phương pháp nghiên cứu của Nguyen Thi Loc (1995).

**2.4.3.7. Ảnh hưởng của một số hoạt chất trừ sâu, trừ nấm đến sự phát triển và nảy mầm của nấm *B. bassiana* và *M. anisopliae*:** Theo phương pháp của Moorehouse và cs (1992). Tám loại thuốc trừ sâu: thiamethoxam, triazophos, deltamethrin, fipronil, fenitrothion, chlorpyrifos ethyl, carbaryl và azadirachtins và sáu loại thuốc trừ nấm: chlorothalonil, validamycin, mancozeb, zineb, carbendazim và benomyl được pha vào môi trường SDAY+K theo ba nồng độ 125 ppm, 250 ppm và 500 ppm (đối với thuốc trừ sâu) và 50, 125 và 250ppm (đối với thuốc trừ nấm) và được rót vào các đĩa petri (20 ml/1đĩa). Nghiệm thức đối chứng không xử lý thuốc. Tính phần trăm sự phát triển của sợi nấm bị ức chế, số lượng bào tử /cm<sup>2</sup>, tỷ lệ bào tử nảy mầm (%) ở 24 giờ được trình bày ở mục 2.4.3.1 và 2.4.3.2

**2.4.4. Đánh giá độc tính của nấm *B. bassiana* và *M. anisopliae* trên một số sâu hại**

**2.4.4.1. Xác định nồng độ trừ sâu xanh da láng (*S. exigua*) của nấm *B. bassiana* và *M. anisopliae* trong điều kiện *in vitro*:** theo phương pháp của Michael và cs (2005). Nấm *B. bassiana* và *M. anisopliae* được nuôi cấy trên môi trường SDAY+K trong 10 ngày. Dịch bào tử được pha loãng ở các nồng độ  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$  và  $10^8$  bào tử/ml, nghiệm thức đối chứng là nước cất vô trùng. Sáu mươi con sâu xanh da láng 7 ngày tuổi được đặt trong các hộp nhựa (đường kính 13cm). Phun dịch bào tử trực tiếp lên sâu và hành 10ml/hộp nhiệt độ phòng 27°C±2°C. Tỷ lệ sâu chết trung bình (%) tính ở 10 ngày sau khi phun nấm.

**2.4.4.2. Xác định nồng độ trừ rầy nâu của nấm *B. bassiana* và *M. anisopliae* trong điều kiện nhà lưới:** Thí nghiệm gồm 5 nồng độ pha loãng 50 - 700 triệu bào tử/ml. Thả 30 con ấu trùng rầy nâu 5 ngày tuổi vào lồng lưới có trồng 3 bụi lúa Tài nguyên (30 ngày sau gieo). Dịch bào tử được pha loãng với 0,03% Tween 80 phun trực tiếp lên rầy nâu liều lượng 20ml/chậu. Tỷ lệ rầy chết trung bình (%) được tính ở 10 ngày sau khi phun nấm. Hiệu lực hiệu đính theo Abbott

**2.4.4.3. Xác định nồng độ trừ sâu xanh da láng của nấm *B. bassiana* và *M. anisopliae* trong điều kiện nhà lưới:** Hành lá được trồng trong các chậu đất 5 bụi/chậu. Thả 20 con sâu xanh da láng 7 ngày tuổi/chậu hành. Điều kiện thí nghiệm chỉ tiêu theo dõi giống mục 2.4.4.2.

**2.4.4.4. Khả năng gây bệnh của nấm *B. bassiana* và *M. anisopliae* trên một số sâu hại cây trồng trong nhà lưới và ngoài đồng**

**a) Thí nghiệm trong nhà lưới:** Thực hiện trên 2 đối tượng sâu hại là rầy nâu (30 con ấu trùng, 30 thành trùng) và sâu xanh da láng 20 con. Thí nghiệm gồm 13 MPL *B. bassiana*

và 13 MPL *M. anisopliae*, Biovip  $1,5 \times 10^9$ bt/g, Ometar  $1,2 \times 10^9$ bt/g và đối chứng phun nước lã. Nồng độ  $2,5 \times 10^7$ bt/ml + 0,05% chất bám dính Tween 80 được phun trực tiếp trên sâu và rầy với liều lượng 20ml/chậu. Tỷ lệ chết trung bình (%) được tính ở 10 ngày sau khi phun nấm.

#### **b) Thí nghiệm ngoài đồng ở diện tích nhỏ**

\* **Chuẩn bị dịch bào tử nấm sử dụng trong thí nghiệm:** Nấm được nhân sinh khối trên cơ sở môi trường NT của Viện Sinh Học Nhiệt đới có bổ sung. Bào tử nấm thu ở 10 ngày sau cấy, thêm 0,5% dầu thực vật cho vào thùng lên men có chứa 10 lít môi trường 250ml dịch bào tử ( $10^6$ bt/ml)/thùng. Sơ đồ lên men như sau: Nấm nuôi cấy trong đĩa petri 10 ngày,  $t^0 27 \pm 2^0\text{C}$  → Tách và thu dịch bào tử → Lên men trong thùng 20 lít có 10 lít môi trường, sục khí 24/24 giờ,  $t^0: 25-30^0\text{C}$ , 4 ngày → Thu dịch bào tử → Giữ dịch bào tử nấm ở  $t^0 10 \pm 2^0\text{C}$  (pH = 5,5-6,0). Nồng độ bào tử trong dung dịch là  $5 \times 10^8$ bt/ml.

\* **Hiệu lực của nấm *B. bassiana* và *M. anisopliae* kết hợp với thuốc trừ sâu Actara 25WG (thiamethoxam) đối với rầy nâu (*N. lugens*) hại lúa:** Thực hiện tại Đức Hòa, Long An, năm 2005 trên giống lúa OM 1490, bố trí theo kiểu khối đầy đủ ngẫu nhiên, 3 lần lặp lại. Liều lượng sử dụng 12,0 lít/ha, nghiệm thức kết hợp với thuốc trừ sâu sử dụng 1/4 nồng độ khuyến cáo của thuốc và được phun 2 lần (40 và 60 NSS). Các nghiệm thức có đối chứng không phun. Đếm mật số rầy và thiên địch trước khi phun 1 ngày và sau phun 3, 5, 7, 14, 21 ngày theo phương pháp thường qui đối với sâu hại. Hiệu lực hiệu đính theo công thức Henderson-Tilton.

\* **Hiệu lực của nấm *Metarhizium anisopliae* kết hợp với thuốc trừ sâu Hostathion 20EC (triazophos) đối với sâu xanh da láng trên cây hành lá:** Thực hiện tại Tân Hạnh, Đồng Nai, năm 2005, bố trí theo khối đầy đủ ngẫu nhiên, 3 lần lặp lại. Liều lượng sử dụng 12,0 lít/ha, phun 2 lần 15, 45 ngày sau khi trồng. Theo dõi mật số sâu sống/20 bụi hành ở các thời điểm 1 ngày trước phun; 3, 5, 7, 14 và 21 ngày sau khi phun nấm.

#### **c) Thí nghiệm ngoài đồng ở diện tích rộng**

\* **Hiệu lực của nấm *B. bassiana* và *M. anisopliae* đối với rầy nâu hại lúa:** Thí nghiệm diện rộng không lặp lại, bố trí tại xã Lộc Giang, Đức Hòa, Long An vụ hè thu năm 2006 và đông xuân 2006-2007, giống lúa IR50404. Diện tích ruộng phun nấm *B. bassiana* là 0,7 ha (vụ hè thu) và 0,6 ha (vụ đông xuân). Ruộng phun nấm *M. anisopliae* diện tích 0,9 ha và 0,5 ha.

**Ruộng phun nấm *B. bassiana* và *M. anisopliae*:** Liều lượng sử dụng 12,0 lít + 2 lít dầu đậu nành được phun vào lúc 40 và 60 ngày sau sạ.

**Ruộng theo tập quán nông dân:** hỗn hợp thuốc Actara 25WG và Trebon 10EC ở 20, 40 và 60 ngày sau sạ.

**Phương pháp và chỉ tiêu theo dõi:** Điều tra cố định 10 điểm phân bố đều trên 2 đường chéo góc, mỗi điểm điều tra  $1\text{m}^2$ . Đếm mật số rầy nâu và thiên địch trong mỗi điểm điều tra định kỳ 7 ngày/lần vào các thời điểm 21, 27, 35, 42, 49, 56, 63 và 75 ngày sau sạ. Số

liệu được tính toán và qui ra mật số con/m<sup>2</sup>. Tỷ lệ rầy nâu chết (%) bị nấm ký sinh được tính trên 300 xác rầy chết thu ngẫu nhiên trên 10 điểm điều tra.

\* **Hiệu lực của nấm *M. anisopliae* đối với sâu xanh da láng trên hành lá:** Thí nghiệm thực hiện tại Tân Hạnh, Biên Hòa, Đồng Nai trong 3 vụ hành từ tháng 2 đến tháng 12 năm 2006. Diện tích ruộng thí nghiệm 0,12 ha, ruộng nông dân 0,11 ha.

**Ruộng phun nấm *M. anisopliae*** phun 3 lần 15, 33 và 45 ngày sau trồng, 1 lần thuốc vi sinh success 25EC (spinosad) ở 25 ngày sau trồng và 1 lần thuốc Nimbecidine 0,03EC (azadirachtins) 15ml/8lít nước.

**Ruộng theo tập quán nông dân:** Phun 13 lần thuốc trừ sâu Endosol 35EC, Lannat 40SP và Padan 95SP, từ 5 ngày sau trồng đến 70 ngày sau trồng, mỗi lần cách nhau 5 đến 7 ngày. Điều tra 20 điểm cố định (55 bụi hành), theo dõi mật độ sâu hại định kỳ 7 ngày/lần bắt đầu từ 14 ngày sau trồng đến khi thu hoạch. Tính trung bình mật số sâu /m<sup>2</sup>, tỷ lệ (%) bụi hành bị hại và năng suất thương phẩm t/ha.

### Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. Những kết quả nghiên cứu về nấm *Beauveria*

##### 3.1.1 Phân lập, định danh nấm *B. bassiana* theo phương pháp phân loại truyền thống

Dựa trên đặc điểm hình thái, đã phân lập được 13 mẫu có các đặc điểm của loài *B. bassiana*.

\* **Đặc điểm hình thái:** sợi nấm mọc rất nhanh, có màu trắng đến vàng ngà, xốp mịn hoặc kết chặt phát triển theo vòng đồng tâm, có dịch tiết trên bề mặt tản nấm.

\* **Đặc điểm hình thái cơ quan sinh bào tử:** tế bào sinh bào tử phát sinh từ sợi dinh dưỡng mọc thành đám, cuống phồng lên ở phần dưới, kéo dài trên cuống mảnh, cong gập ziczắc răng cưa. Bào tử đính đơn bào, không màu trong suốt, hình cầu, kích thước 2,6 -2,8 x 2,2-2,4µm mọc trên cuống sinh bào tử hướng gốc.

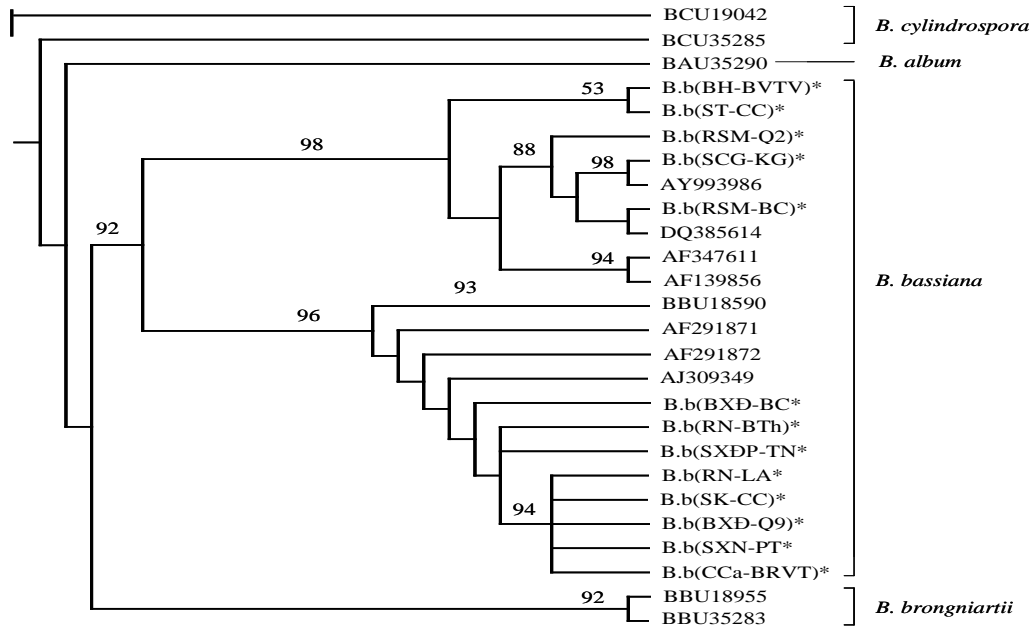
\* **Kích thước bào:** Tám MPL có kích thước bào tử từ 2,61-2,65 x 2,26-2,31µm. Hai MPL Bb(RSM-Q2) và Bb(RSM-BC) có kích thước lớn hơn 2,81-2,83 x 2,37-2,46µm, 3 MPL Bb(RN-BTh), Bb(Cca-BRVT) và Bb(SXĐP-TN) có kích thước biến động từ 2,72-2,75 x 2,36-2,41µm. Như vậy, 13 MPL nghiên cứu này đều thuộc loài *B. bassiana*.

##### 3.1.2. Phân loại và phân tích sự khác biệt di truyền của nấm *B. bassiana* dựa vào trình tự vùng ITS-rDNA

\* **Phân loại nấm *B. bassiana* dựa vào trình tự vùng ITS-rDNA:** Phản ứng PCR được thực hiện với hai primer ITS4 và ITS5 đã khuếch đại vùng ITS-rDNA của 13 MPL có chiều dài khoảng 580bp. Kết quả giải trình tự vùng ITS1-5.8S-ITS2 của các MPL được xác định có chiều dài từ 480 đến 484bp. Trình tự vùng ITS1-5.8S-ITS2 của 13 MPL nghiên cứu đã được đăng ký trực tiếp trên GenBank với mã số đăng ký từ EU530653 đến EU530665.

\* **So sánh trình tự vùng ITS-rDNA của 13 MPL *B. bassiana* nghiên cứu với các mẫu *B. bassiana* trên thế giới:** Sự tương đồng trình tự giữa 13 MPL nghiên cứu với 5 mẫu của

Úc, Hàn Quốc, New Zealand và Trung Quốc từ 99-100%, tương đồng rất cao với mẫu của Đài Loan, Ấn Độ 97-98% và rất thấp với 3 MPL của Đài Loan 83 – 88%. Đây là những mẫu loài *B. brongniartii*. Sơ đồ phân nhóm loài dựa trên trình tự vùng ITS - rDNA ở hình 3.6 cho thấy, 13 MPL *B. bassiana* xếp cùng nhóm loài với 8 mẫu *B. bassiana* của thế giới là 2 mẫu của Hàn Quốc, 2 của Trung Quốc, 1 của Ấn Độ, 1 của Úc, 1 Đài Loan và 1 New Zealand cho thấy 13 MPL trong nghiên cứu đều thuộc loài *B. bassiana*.



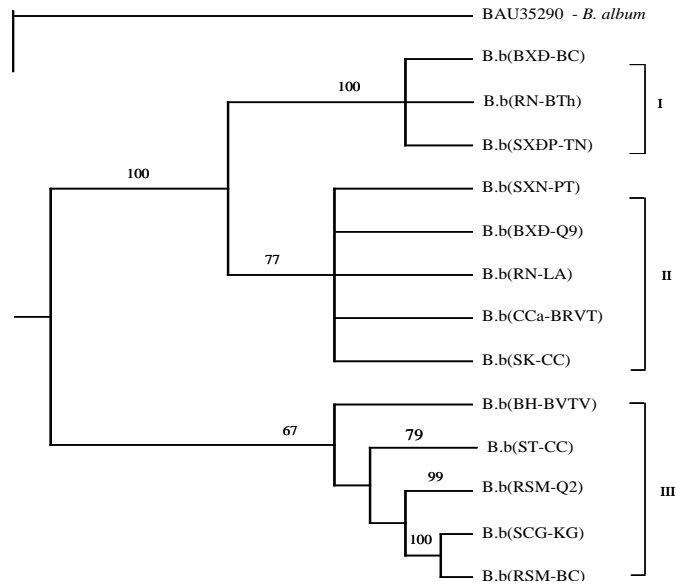
**Hình 3.6.** Sơ đồ phân nhóm loài của 13 MPL *B. bassiana* nghiên cứu (có dấu sao) với 13 mẫu *B. bassiana* của thế giới dựa trên trình tự vùng ITS - rDNA. Phần trăm giá trị bootstrap từ 1000 lần lặp lại được chỉ trên các nhánh. Mẫu BCU19042 (*B. cylindrospora*) được sử dụng như một loài xa.

**\* Phân tích sự khác biệt di truyền của các MPL *Beauveria bassiana* nghiên cứu dựa trên trình tự vùng ITS – rDNA:** trình tự vùng ITS- rDNA của 13 MPL *B. bassiana* nghiên cứu có sự khác biệt nhưng không đáng kể, sự biến động xảy ra trên cả hai vùng ITS1 và ITS2 và phân 13 MPL *B. bassiana* nghiên cứu thành 3 nhóm nhỏ trên sơ đồ phân nhóm (hình 3.7).

### 3.1.3. Nghiên cứu một số đặc điểm sinh học của nấm *B. bassiana* ký sinh trên sâu hại cây trồng

**3.1.3.1. Xác định thời gian bào tử nảy mầm:** Thời gian bào tử *B. bassiana* nảy mầm trên 90% từ 20-24 giờ sau khi cấy và có sự khác biệt về thời gian nảy mầm theo ký chủ và nguồn gốc địa lý vào thời điểm 20 giờ sau cấy. MPL B.b(RSM-BC) và B.b(RSM-Q2) có tỷ lệ bào tử nảy mầm nhanh và sớm nhất.

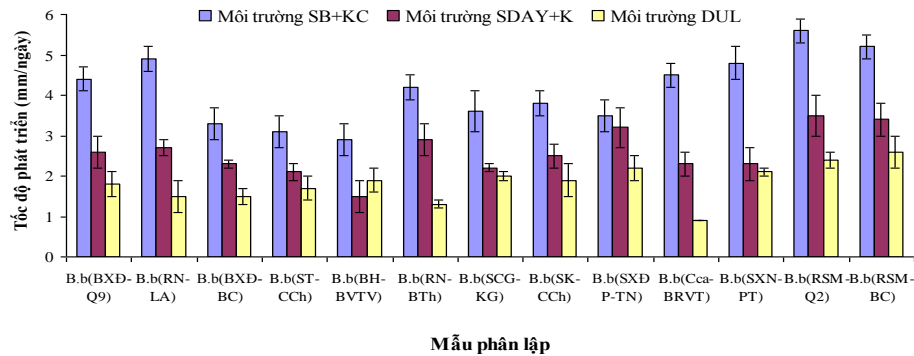
**3.1.3.2. Khả năng hình thành bào tử của nấm *B. bassiana*:** số lượng bào tử của 5 MPL Bb(RN-LA), Bb(SXDP-TN), Bb(RSM-Q2), Bb(RSM-BC) và Bb(SXN-PT) là rất cao từ  $10,1 \times 10^6$  -  $14,5 \times 10^6$  bt/cm<sup>2</sup>, trong đó 2 MPL Bb(RSM-Q2) và Bb(RN-LA) hình thành nhiều bào tử hơn các MPL khác trong cùng nhóm.



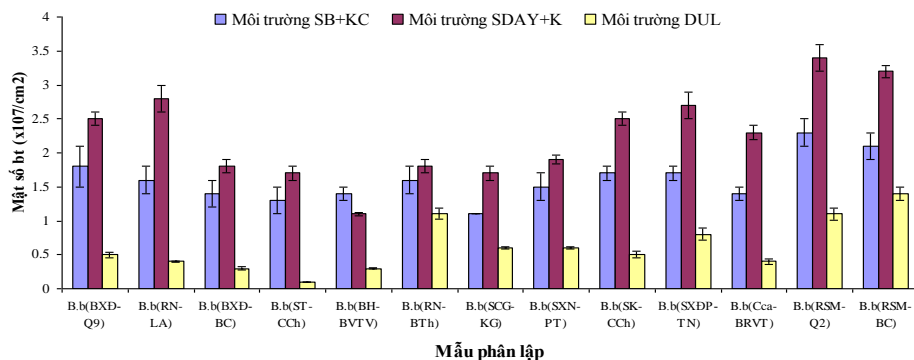
**Hình 3.7** Sơ đồ phân nhóm quan hệ di truyền của 13 MPL *B. bassiana* nghiên cứu, xây dựng theo phương pháp parsimony dựa trên trình tự vùng ITS - rDNA. Phần trăm giá trị bootstrap từ 1000 lần lặp lại được chỉ trên các nhánh. Mẫu BAU35290 (*B. album*) được sử dụng như một loài xa.

**3.1.3.3. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến sự hình thành bào tử của nấm *B. bassiana*:** Số lượng bào tử hình thành cao nhất vào 14 ngày sau nuôi cấy. Đây là cơ sở quan trọng để chọn thời gian nhân nấm thích hợp đạt hiệu suất cao. Số liệu này phù hợp với kết quả nghiên cứu của Phạm Thị Thùy (1995), (2004.)

**3.1.3.4. Ảnh hưởng của nguồn dinh dưỡng đến sự phát triển của nấm *B. bassiana***



**Hình 3.11.** Tốc độ phát triển trung bình của các MPL *B. bassiana* trên các môi trường dinh dưỡng khác nhau. (giá trị trung bình  $\pm$  SD, nhiệt độ  $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$  và 12 giờ sáng/12 giờ tối)



**Hình 3.12.** Khả năng hình thành bào tử của các MPL *B. bassiana* trên các môi trường dinh dưỡng khác nhau ở 14 ngày sau nuôi cấy (Giá trị TB  $\pm$  SD, nhiệt độ  $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$  và 12 giờ sáng/12 giờ tối).

Các MPL đều phát triển tốt trên môi trường SB+KC và SDAY+K (hình 3.11), tuy nhiên số lượng bào tử trên SDAY+K nhiều hơn so với SB+KC và Dulmage và Rhodes (hình 3.12). Như vậy, môi trường SDAY+K có bổ sung thêm kitin thích hợp cho nấm *B. bassiana* tạo bào tử còn sự phát triển của sợi nấm là tốt nhất trên môi trường SB+KC.

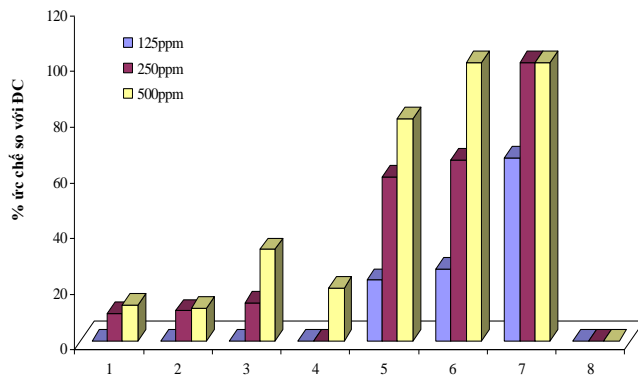
**3.1.3.5. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến sự phát triển và hình thành bào tử của nấm *Beauveria bassiana*:** Các MPL từ sâu hại lúa phát triển trong khoảng 20°C- 28°C, không hình thành bào tử ở 30°C, ngoại trừ MPL B.b(RN-LA) và B.b(BXD-Q9). Các MPL từ sâu hại cây trồng cạn có thể phát triển ở 30°C, tạo nhiều bào tử ở 25-28°C. Nhìn chung, nhiệt độ tối ưu của các MPL nằm trong khoảng 25 -28°C.

\* **Khả năng nảy mầm của nấm *B. bassiana* ở nhiệt độ cao:** Có 8/13 MPL *B. bassiana* nảy mầm ở nhiệt độ 35°C/25°C trong 24 giờ. Trong số 8 MPL chịu nhiệt độ cao ở 35°C/25°C có 3 MPL từ sâu hại lúa và 5 MPL từ sâu hại trên cây trồng cạn. Điều này có thể là do đặc tính chịu nhiệt của từng cá thể.

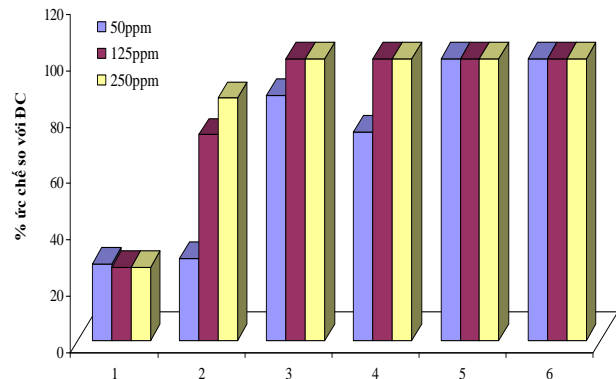
**3.1.3.6. Ảnh hưởng của ẩm độ lên sự hình thành và nảy mầm của nấm *B. bassiana*:** nấm *B. bassiana* không hình thành bào tử ở các mức ẩm độ từ 75,5%, 85% và 89%. Sự hình thành và nảy mầm của bào tử chỉ bắt đầu ở mức ẩm độ 92% và tăng dần đến 100%. Ẩm độ thích hợp cho sự nảy mầm của nấm *B. bassiana* ở khoảng 98%.

**3.1.3.7. Ảnh hưởng của một số thuốc trừ sâu, trừ nấm đến sự phát triển và nảy mầm của bào tử nấm *B. bassiana***

Thiamethoxam, triazophos, deltamethrin và fipronil ít độc với nấm ở nồng độ 125ppm. Fenitrothion và chlorpyrifos ức chế sự phát triển của sợi nấm từ 22-26%, carbaryl ức chế mạnh ngay từ nồng độ thấp 125ppm (66%). Azadirachtins không ảnh hưởng đến sự phát triển của sợi nấm ở cả 3 nồng độ thí nghiệm (hình 3.13).



**Hình 3.13.** Ảnh hưởng của thuốc trừ sâu lên sự phát triển của *B. bassiana* trong thí nghiệm *in vitro*. 1-Thiamethoxam; 2-Triazophos; 3-Deltamethrin; 4-Fipronil; 5-Fenitrothion; 6-Chlorpyrifos; 7-Carbaryl; 8-Azadirachtins.



**Hình 3.14.** Ảnh hưởng của thuốc trừ nấm lên sự phát triển của *B. bassiana* trong thí nghiệm *in vitro*. 1-Chlorothalonil; 2-Validamycin; 3-Mancozeb; 4-Zineb; 5-Carbendazim; 6- Benomyl

Hình 3.14 cho thấy, chlorothalonil ít ảnh hưởng đến sự phát triển của nấm ở cả 3 nồng độ thử nghiệm, validamycin ít độc ở nồng độ 50ppm. Mancozeb, zineb ức chế sự phát triển của nấm 100% ở nồng độ 125 và 250ppm, carbendazim và benomyl ức chế sự phát triển sợi nấm ở cả 3 nồng độ thử nghiệm.



### 3.1.4. Đánh giá độc tính của nấm *Beauveria bassiana* trên một số sâu hại cây trồng

#### 3.1.4.1. Xác định nồng độ trừ sâu xanh da láng (*S. exigua*) của nấm *B. bassiana* trong điều kiện *in vitro*

Tỷ lệ sâu chết thấp ở nồng độ  $10^4 - 10^5$  bt/ml. Ở nồng độ  $10^6 - 10^7$  bt/ml, 2 MPL Bb(SXĐP-TN) và Bb(SXN-PT) gây chết cho sâu từ 56,6% - 60,7% và 81,7% - 84,2%. Ở nồng độ  $10^8$  bt/ml, 6 MPL gây chết cho sâu từ 52,2 - 88,6% ở 10 ngày sau phun nấm. Tỷ lệ sâu chết cao nhất khi sử dụng ở nồng độ  $10^8$  bt/ml.

#### 3.1.4.2. Xác định nồng độ trừ rầy nâu (*N. lugens*) của nấm *B. bassiana* trong điều kiện nhà lưới.

Ở nồng độ bào tử 50 -150 triệu bào tử trở xuống hiệu lực đối với rầy nâu thấp. Ở nồng độ 250 triệu bào tử, hiệu lực của 4 MPL Bb(BXĐ-Q9), Bb(RN-LA), Bb(BXĐ-BC) và Bb(RN-BTh) khá cao 65,5 - 69,6% và tăng cao ở nồng độ 500 triệu bào tử với hiệu lực trên 70%. Ở nồng độ 700 triệu bào tử, hiệu lực đạt trên 80%, MPL Bb(RN-LA) thể hiện khả năng gây bệnh cao nhất 87,8%. Kết quả cũng ghi nhận, 2 MPL từ sâu hại trên cây trồng cận là Bb(RSM-Q2) và Bb(RSM-BC) có hiệu lực khá 75,5 - 76,5%.

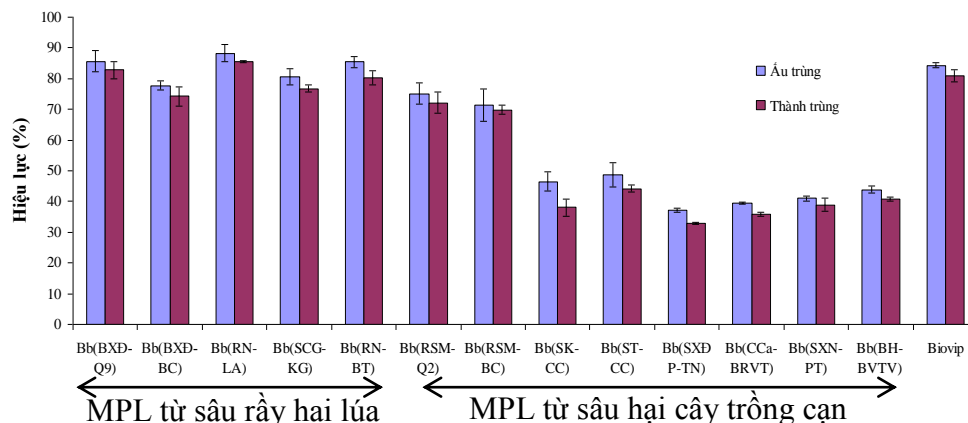
#### 3.1.4.3. Xác định nồng độ trừ sâu xanh da láng (*S. exigua*) của nấm *B. bassiana* trong điều kiện nhà lưới.

Hiệu lực của các MPL *B. bassiana* đối với sâu xanh da láng hại hành lá là rất thấp. Ở nồng độ 250 triệu bào tử chỉ có 1 MPL Bb(SXĐP-TN) có hiệu lực 50%. Ở nồng độ 500 triệu bào tử, hiệu lực của 4 MPL Bb(RN-LA), Bb(RSM-Q2), Bb(SXĐP-TN) và Bb(SXN-PT) biến động từ 50,2 - 55,7% và tăng ở nồng độ 700 triệu bào tử từ 53,6 - 78,0%.

#### 3.1.4.4. Khả năng gây bệnh của nấm *B. bassiana* trên một số sâu hại cây trồng trong điều kiện nhà lưới và ngoài đồng

##### a) Kết quả các thí nghiệm trong nhà lưới

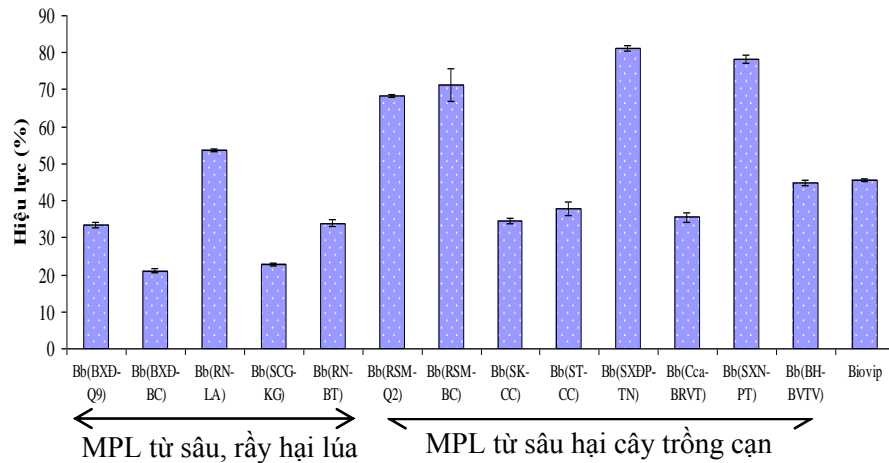
##### \* Đối với rầy nâu hại lúa



**Hình 3.15.** Hiệu lực trừ rầy nâu (%) của nấm *B. bassiana* ( $2,5 \times 10^7$  bt/ml) trong thí nghiệm nhà lưới. (Đại Học Nông Lâm TP.HCM, năm 2005). Nhiệt độ TB  $27,3^{\circ}\text{C}$ , ẩm độ TB 80,5%.

Hình 3.15 cho thấy, hiệu lực của 5 MPL từ sâu, rầy hại lúa rất cao. tỷ lệ ấu trùng rầy nâu chết biến động từ 77,7% đến 88,3%, thành trùng từ 74,2% đến 85,5%. Hiệu lực của 6 MPL từ sâu hại trên cây trồng cạn là rất thấp đối với rầy tỷ lệ rầy chết dưới 50% .

\* **Đối với sâu xanh da láng hại hành lá :** Kết quả hình 3.16 cho thấy, 8/13 MPL *B. bassiana* có hiệu lực thấp với sâu xanh da láng 21,1- 44,8%, MPL Bb(SXĐP-TN) từ sâu xanh da láng hại đậu phộng thể hiện khả năng gây bệnh cao nhất, tỷ lệ sâu chết 81,2%, MPL Bb(SXN-PT) 78,2%.



**Hình 3.16.** Hiệu lực trừ sâu xanh da láng (%) của nấm *B. bassiana* ( $2,5 \times 10^7$  bt/ml) trong thí nghiệm nhà lưới (Đại Học Nông Lâm TP.HCM, năm 2005). Nhiệt độ TB  $27,3^{\circ}\text{C}$ , ẩm độ TB 80,5%.

### b) Khả năng gây bệnh của nấm *B. bassiana* kết hợp với thuốc trừ sâu Actara 25WG đối với rầy nâu ngoài đồng ruộng ở diện tích nhỏ

Ở 5 ngày sau phun, nghiệm thức xử lý thuốc hóa học Actara 25WG hoặc Actara 25WG kết hợp với nấm có hiệu lực đối với rầy nâu cao hơn một cách có ý nghĩa so với các nghiệm thức xử lý nấm đơn. Ở 7 và 17 ngày sau phun, hiệu lực khi xử lý nấm đơn không có sự khác biệt so với hỗn hợp thuốc hóa học và nấm, hiệu lực trên 70%. Năng suất thực thu giữa các nghiệm thức không có sự khác biệt về mặt thống kê.

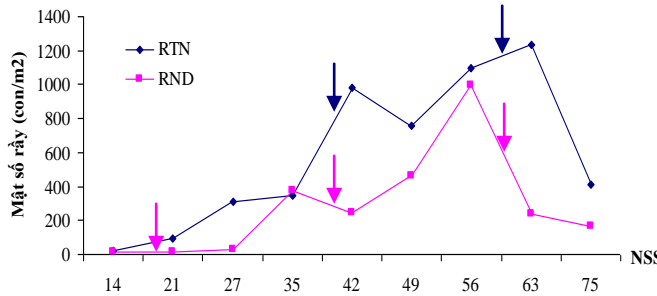
\* **Ảnh hưởng của nấm *B. bassiana* đến mật số bọ xít mù xanh và nhện bắt mồi ăn thịt trên ruộng thí nghiệm:** Quan sát ảnh hưởng của nấm *B. bassiana* đối với thiên địch của rầy nâu là bọ xít mù xanh và nhện bắt mồi ăn thịt cho thấy mật số hầu như không thay đổi nhiều kể từ 3 NSP đến 21 NSP. Ngược lại, ở nghiệm thức phun thuốc Actara 25WG, mật số bọ xít mù xanh và nhện giảm từ 3 ngày sau phun đến 21 ngày sau phun, mật số trung bình từ 19,8 con giảm xuống còn 11,3 con/m<sup>2</sup> ở 21 ngày sau phun.

### c) Khả năng gây bệnh của nấm *B. bassiana* đối với rầy nâu ngoài đồng ruộng ở diện tích rộng

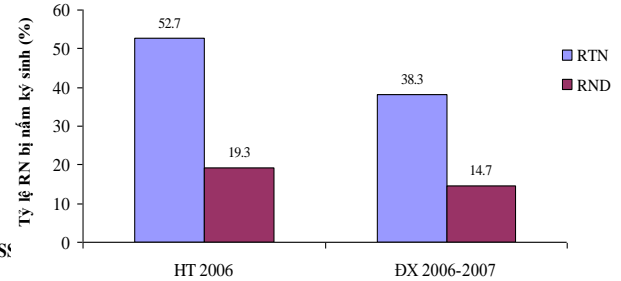
Hình 3.18 cho thấy đã khống chế được mật số rầy nâu trên ruộng đến cuối vụ (75 NSS). Tỷ lệ rầy nâu bị nấm ký sinh cũng cao hơn so với ruộng nông dân phun 3 lần thuốc hóa học Actara 25WG + Trebon 10EC (hình 3.19).

Nhện bắt mồi và bọ xít mù xanh, hiện diện với mật rất cao trong ruộng thí nghiệm ở cả 2 vụ (hình 3.20A-B). Trong thời gian thí nghiệm, mật số rầy nâu cao nhất khoảng

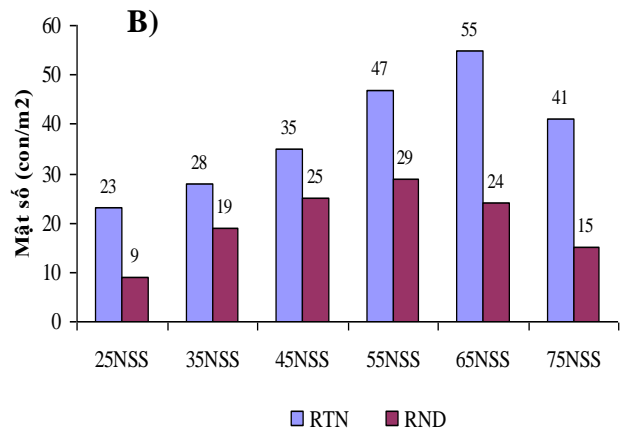
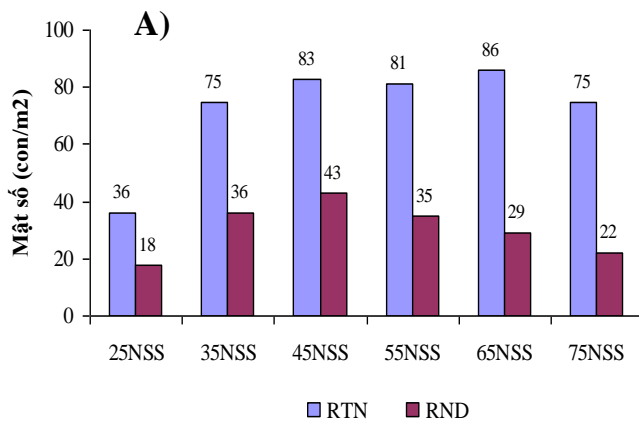
1200con/m<sup>2</sup> vào 40 và 65 NSS, đây là cơ sở để xác định thời điểm và số lần phun nấm cũng như không cần thiết phải kết hợp với thuốc hóa học để bảo vệ thiên địch trong ruộng lúa và môi trường, năng suất trên ruộng phun nấm cao hơn năng suất ở ruộng nông dân phun 3 lần hỗn hợp thuốc hóa học Actara 25WG và Trebon 10EC (hình 3.21).



**Hình 3.18.** Mật số rầy nâu trên ruộng thí nghiệm và ruộng nông dân sau khi phun nấm. Ruộng thí nghiệm phun 2 lần nấm *B.bassiana* (40 và 60 ngày sau sạ); Ruộng nông dân phun 3 lần thuốc hóa học Actara 25WG + Trebon (20, 40 và 60 ngày sau sạ). NSS :ngày sau sạ

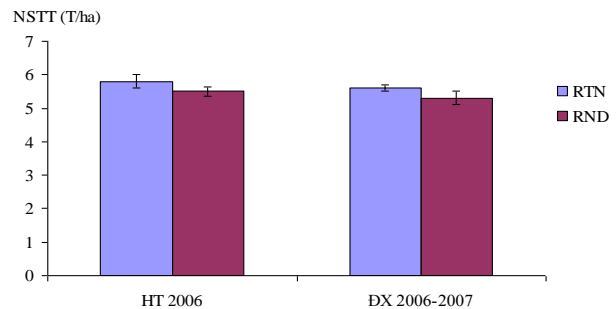


**Hình 3.19.** Tỷ lệ rầy nâu (*Nilaparvata lugens*) (%) bị nhiễm nấm *B. bassiana* sau thí nghiệm tại Đức Hòa, Long An vụ hè thu 2006 và đông xuân 2006-2007.



**Hình 3.20.** Mật số bọ xí mù xanh (*Cyrtorhinus lividipennis*) và nhện bắt mồi ăn thịt (*Lycosa* sp.) trên ruộng thí nghiệm tại Đức Hòa Long An, A) vụ hè thu 2006; B) vụ đông xuân 2006-2007; RTN: ruộng thí nghiệm ;RND:ruộng nông dân ; NSS:ngày sau sạ

**Hình 3.21.** Ảnh hưởng của việc phun nấm *B. bassiana* để trừ rầy nâu đến năng suất lúa (T/ha) vụ hè thu năm 2006 và đông xuân 2006-2007, tại Đức Hòa, Long An; RTN: ruộng thí nghiệm; RND: ruộng nông dân; HT: hè thu; ĐX: đông xuân.



## 3.2. Những kết quả nghiên cứu về nấm *Metarhizium*

### 3.2.1. Phân lập, định danh loài từ chi nấm *Metarhizium* theo phương pháp truyền thống

Từ những mẫu côn trùng bị nấm ký sinh có đặc điểm của chi *Metarhizium*, đã phân lập, xác định được 16 MPL có đặc điểm của loài *M. anisopliae*.

**Đặc điểm hình thái khuẩn lạc nấm *M. anisopliae*:** Trên môi trường nuôi cấy PDA, khuẩn lạc ban đầu có màu trắng khi hình thành bào tử chuyển qua xanh lục tối, hoặc màu xanh vàng. Khuẩn lạc nấm xốp, mịn phân bố tỏa tròn theo vòng đồng tâm hoặc hình tia trên bề mặt môi trường.

**Đặc điểm cơ quan sinh bào tử và hình dạng bào tử:** Sợi nấm có vách ngăn, cuống sinh bào tử ngắn, hình trụ 6-13 x 2-4µm tỏa tròn trên các cành bào tử. Bào tử đính đơn bào, hình trụ, hình hạt đậu có kích thước 6,5 - 8,9 x 2,2 - 3,2µm.

**Kích thước bào tử nấm *M. anisopliae* :** 4 MPL Ma (SXĐP-TN), Ma (BXĐ-TG), Ma (BXĐ-TV) và Ma (RS-Q9) có kích thước bào tử lớn từ 8,1 - 8,9µm chiều dài và 2,7 - 3,2µm chiều rộng. Ba MPL Ma (RN-BC), Ma (BXĐ-Q9) và Ma (SK-BTh) có kích thước nhỏ hơn. Các đặc điểm về màu sắc khuẩn lạc, cách phân bố và hình dạng bào tử tương tự với kết quả đã công bố của các tác giả trong và ngoài nước về đặc điểm hình thái của loài *M. anisopliae*.

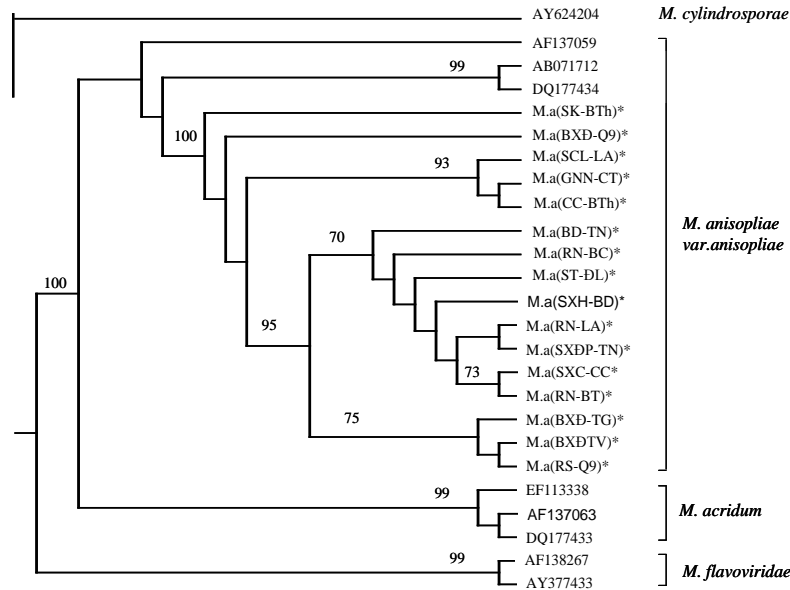
### 3.2.2. Phân loại và phân tích sự khác biệt di truyền của nấm *M. anisopliae* dựa vào trình tự vùng ITS-rDNA

\* **Phân loại nấm *M. anisopliae* dựa vào trình tự vùng ITS-rDNA :** Kết quả PCR cho thấy, vùng ITS-rDNA có cùng chiều dài khoảng 580bp. Sản phẩm PCR đã được giải trình tự trực tiếp với 2 primer ITS1 và ITS4 được xác định có chiều dài từ 469 đến 472bp. Trình tự vùng ITS - rDNA của 16 MPL này đã được đăng ký trực tiếp trên Genbank với mã số đăng ký từ EU530666 đến EU530680. Vùng ITS1-5.8S-ITS2 của 16 MPL *Metarhizium* có chiều dài từ 469 - 472 bp, 11 MPL có chiều dài toàn bộ vùng ITS1-5.8S-ITS2 là 469 bp, 2 MPL dài 470bp và 3 MPL có chiều dài toàn vùng 472bp. Có sự khác biệt trong vùng ITS giữa các mẫu phân lập và hiện tượng mất nucleotide hoặc thêm nucleotide thường xảy ra trong vùng ITS1, còn vùng ITS2 ít xảy ra hơn. Như vậy, vùng ITS2 có tính bảo tồn cao hơn vùng ITS1.

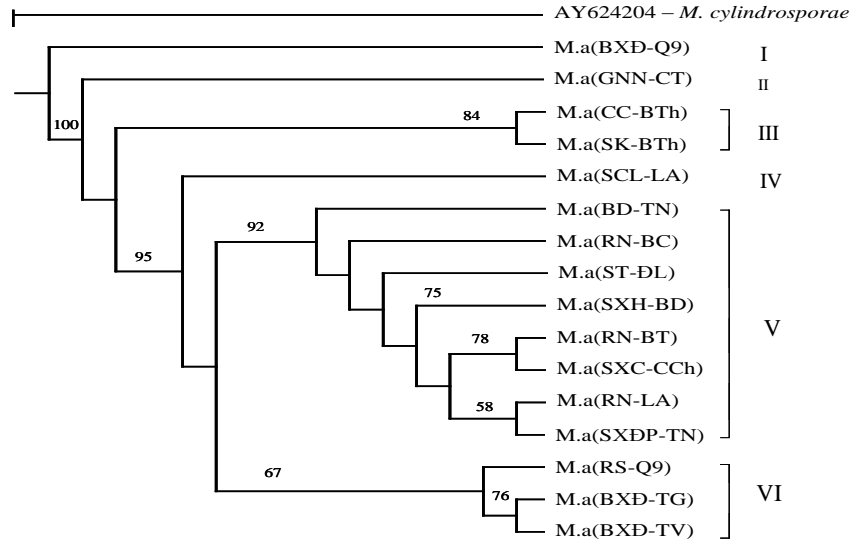
\* **So sánh trình tự vùng ITS-rDNA của 16 MPL *M. anisopliae* nghiên cứu với các mẫu *M. anisopliae* trên thế giới :** 16 MPL *M. anisopliae* với các mẫu của Trung Quốc, Úc và Nhật Bản gần như giống nhau hoàn toàn 99-100%, tương đồng với 2 mẫu của Trung Quốc, 1 mẫu của Úc 92 – 93%. Tương đồng với các mẫu của Thái Lan, Úc và Braxin là rất thấp 74 – 80%, đây là những mẫu đã được xác định không phải là loài *M. anisopliae*. Kết quả này cũng củng cố cho kết luận 16 MPL nghiên cứu đều thuộc loài *M. anisopliae*. Kết quả phân nhóm loài dựa trên trình tự vùng ITS - rDNA ở hình 3.27 cho thấy 16 MPL *M. anisopliae* xếp cùng nhóm với loài *M. anisopliae* var. *anisopliae* của các mẫu so sánh.

\* **Phân tích sự khác biệt di truyền của các MPL *M. anisopliae* nghiên cứu dựa trên trình tự vùng ITS-rDNA :** Kết quả phân nhóm trên vùng ITS-rDNA ở hình 3.28 cho thấy có 6 nhóm di truyền khác biệt nhau. Trong đó, 3 MPL Ma(BXĐ-Q9), Ma(GNN-CT) và Ma(SCL-LA) phân nhóm độc lập, 2 MPL Ma(CC-BTh) và Ma(SK-BTh) phân thành một nhóm, 3 MPL Ma(RS-Q9), Ma(BXĐ-TG) và Ma(BXĐ-TV) một nhóm và 8 MPL còn lại phân thành một nhóm. Kết quả cũng ghi nhận chưa thấy có mối liên hệ giữa các vùng địa lý thu mẫu, nguồn gốc ký chủ với các nhóm di truyền trên sơ đồ phân nhóm. Có sự biến đổi trình tự trên vùng ITS-rDNA, trong đó vùng ITS1 là vùng biến đổi nhanh nhất và có

thể được sử dụng độc lập cho phân tích sự khác biệt di truyền giữa các loài của nấm *M. anisopliae*



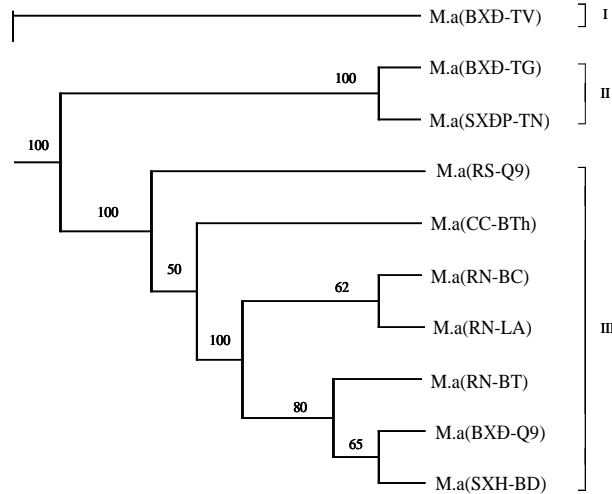
**Hình 3.27.** Sơ đồ phân nhóm loài của 16 MPL *Metarhizium* nghiên cứu (có dấu sao) với các mẫu *Metarhizium* trên thế giới dựa trên trình tự vùng ITS - rDNA. Phần trăm giá trị bootstrap từ 1000 lần lặp lại được chỉ trên các nhánh. Mẫu AY624204 (*M. cylindrospora*) được sử dụng như một loài xa.



**Hình 3.28.** Sơ đồ phân nhóm quan hệ di truyền của 16 MPL *M. anisopliae* nghiên cứu, xây dựng theo phương pháp parsimony dựa trên trình tự vùng ITS-rDNA. Phần trăm giá trị bootstrap từ 1000 lần lặp lại được chỉ trên các nhánh. Mẫu AY624204 (*M. cylindrospora*) được sử dụng như một loài xa.

**Xác định gen *Pr1* của nấm *M. anisopliae* bằng phương pháp nested-PCR:** Đã xác định được 10/16 MPL cho đoạn DNA dài khoảng 1,2 kb sau 2 lần PCR. Kết quả giải trình tự gen *Pr1* có chiều dài từ 798 đến 799 bp. Kết quả này tương tự như kết quả nghiên cứu của Wang và cs (2002) [185], Lead và cs (1997). Như vậy, nested-PCR trên gen *Pr1* có thể sử dụng chọn lọc mẫu nấm trong nghiên cứu ứng dụng.

**Phân tích sự khác biệt di truyền của các MPL *M. anisopliae* dựa vào trình tự gen *Pr1*:** Có sự biến đổi nucleotide trên đoạn gen *Pr1*, nhất là với các mẫu M.a(BXD-TG) và M.a(RS-Q9). Hình 3.32 cho thấy, 10 MPL có gen *Pr1* phân hóa thành 3 nhóm khác biệt nhau. Ba MPL Ma(BXD-TV), Ma(BXD-TG), Ma(RS-Q9) tách thành những nhóm riêng biệt cho thấy sự thay đổi trong cấu trúc *Pr1* xảy ra nhanh hơn vùng ITS – rDNA.



**Hình 3.32.** Sơ đồ phân nhóm di truyền của 10 MPL *M. anisopliae* nghiên cứu, xây dựng theo phương pháp parsimony dựa trên trình tự gen *Pr1*. Phần trăm giá trị bootstrap từ 1000 lần lặp lại được chỉ trên các nhánh.

### 3.2.3. Nghiên cứu đặc điểm sinh học của nấm *M. anisopliae* ký sinh trên sâu hại cây trồng

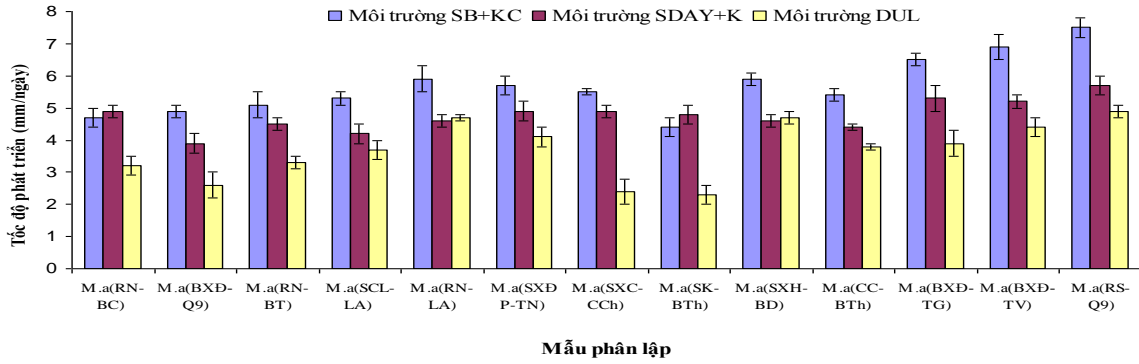
**3.2.3.1 Xác định thời gian bào tử nảy mầm:** thời gian bào tử nảy mầm đạt trên 90% của nấm *M. anisopliae* từ 16 đến 20 giờ sớm hơn so với thời gian nảy mầm của nấm *B. bassiana*.

**3.2.3.2 Khả năng hình thành bào tử của các MPL *M. anisopliae*:** Trên môi trường nuôi cấy SDAY+K, nhiệt độ  $27\pm 2^{\circ}\text{C}$ , ẩm độ 80,5%, 6 MPL Ma(RN-LA), Ma(SXDP-TN), Ma(RS-Q9), Ma(SXH-BD) và Ma(CC-BTh) hình thành bào tử rất nhiều từ  $10,6-18,6 \times 10^6 \text{bt/cm}^2$ , nhất là MPL Ma(RS-Q9) và MPL Ma(SXH-BD).

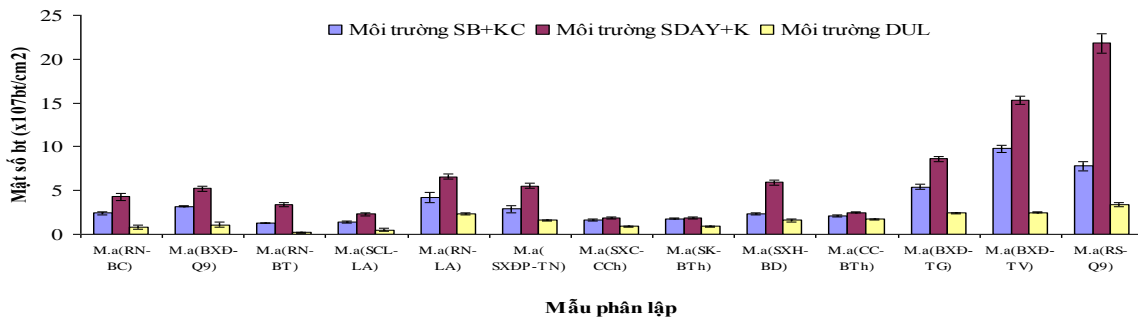
#### 3.2.3.3. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến sự hình thành bào tử của nấm *M. anisopliae*

Sau nuôi cấy 14 ngày ở điều kiện nhiệt độ  $27\pm 2^{\circ}\text{C}$  và ẩm độ trung bình 80,5 %, tất cả 13 MPL đều có số lượng bào tử hình thành tối đa, sau đó giảm dần từ 21 đến 35 ngày. Như vậy, thời gian các MPL *M. anisopliae* hình thành bào tử đạt số lượng tối đa trong khoảng từ 12 đến 14 ngày sau nuôi cấy.

**3.2.3.4. Ảnh hưởng của nguồn dinh dưỡng đến sự phát triển của *M. anisopliae*:** Hình 3.34 cho thấy, nấm *M. anisopliae* phát triển tốt trên môi trường SB+KC và SDAY+K, 3 MPL Ma(BXD-TG), Ma(BXD-TV) và Ma(RS-Q9) có tốc độ phát triển rất nhanh 6,5-7,5mm/ngày. Hình 3.35 cho thấy, môi trường SDAY+K là môi trường tạo nhiều bào tử, kế đến là môi trường SB+KC và thấp nhất là môi trường Dulmage và Rhodes.



**Hình 3.34.** Tốc độ phát triển trung bình của các MPL *M. anisopliae* trên 3 loại môi trường dinh dưỡng khác nhau (giá trị trung bình  $\pm$  SD, nhiệt độ  $27\pm 2^{\circ}\text{C}$  và 12 giờ sáng/12 giờ tối).



**Hình 3.35.** Khả năng hình thành bào tử của các MPL *M. anisopliae* trên 3 loại môi trường dinh dưỡng khác nhau ở 14 ngày sau nuôi cấy (Giá trị TB  $\pm$  SD, nhiệt độ  $27\pm 2^{\circ}\text{C}$  và 12 giờ sáng/12 giờ tối).

**3.2.3.5. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến sự phát triển và hình thành bào tử của các MPL *M. anisopliae*:** Nhiệt độ tối ưu để sợi nấm phát triển và hình thành bào tử  $25^{\circ}\text{C}$ – $28^{\circ}\text{C}$ , chậm ở  $35^{\circ}\text{C}$  và hoàn toàn bị ức chế ở  $37^{\circ}\text{C}$ . Sự hình thành bào tử ở các MPL tăng ở  $25^{\circ}\text{C}$ , đạt tối đa ở  $28^{\circ}\text{C}$  sau đó giảm ở  $30^{\circ}\text{C}$  đến  $35^{\circ}\text{C}$ . MPL Ma(RS-Q9) có số lượng bào tử cao nhất  $61,1 \times 10^8 \text{ bt/cm}^2$ .

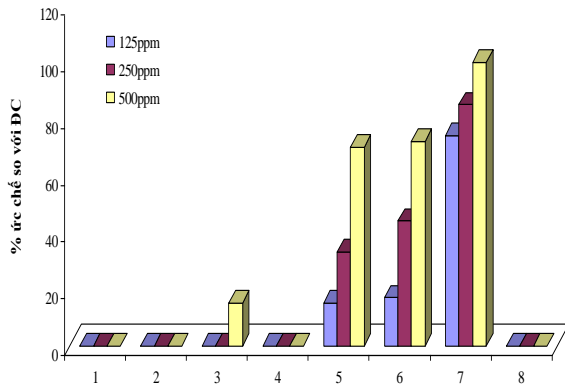
**\* Khả năng nảy mầm của nấm *M. anisopliae* ở nhiệt độ cao:** Ở chu kỳ nhiệt  $35^{\circ}\text{C}/25^{\circ}\text{C}$ , có 9/16 MPL nảy mầm trên 90%. Ở  $38^{\circ}\text{C}/25^{\circ}\text{C}$ , 3 MPL Ma(RN-LA), Ma(SXH-BD) và Ma(BXD-TV) nảy mầm trong khoảng từ 66,9 – 79,3%, 2 MPL nảy mầm trên 80%, MPL M.a(RS-Q9) nảy mầm trên 90% sau 24 giờ.

**3.2.3.6. Ảnh hưởng của ẩm độ lên sự hình thành và nảy mầm của nấm *M. anisopliae*:** Bào tử nấm *M. anisopliae* không hình thành nảy mầm ở các mức ẩm độ 75,5%, 85% và 89%. Bào tử bắt đầu hình thành ở 92% và tăng dần ở 94% đến 100%, ẩm độ thích hợp cho bào tử *M. anisopliae* nảy mầm là ở khoảng 98%.

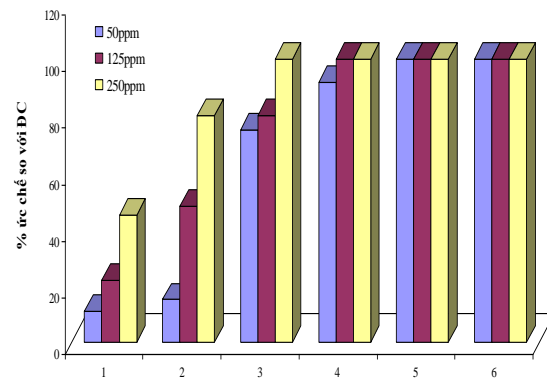
**3.2.3.7. Ảnh hưởng của một số thuốc trừ sâu, trừ nấm đến sự phát triển và khả năng nảy mầm của bào tử nấm *M. anisopliae*:** Hình 3.36 cho thấy, thiamethoxam, triazophos, và fipronil ít độc đối với *M. anisopliae* ở cả 3 nồng độ. Carbaryl ức chế 100% sự phát triển ở nồng độ 500ppm. Azadirachtins không ảnh hưởng đến sự phát triển của *M. anisopliae*. Các hoạt chất trừ nấm chlorothalonil và validamycin ít ảnh hưởng đến phát triển của nấm ở 50ppm. Mancozeb, zineb, carbendazim và benomyl ức chế sự phát triển của sợi nấm ngay từ nồng độ thấp (hình 3.37). Sự nảy mầm của bào tử *M. anisopliae* không bị ảnh hưởng bởi



thiamethoxam, triazophos, deltamethrin và azadirachtins ở cả 3 nồng độ thí nghiệm. Fenitrothion ở nồng độ thấp 125ppm ít ảnh hưởng đến sự nảy mầm của bào tử nhưng ức chế mạnh ở nồng độ cao 250 và 500ppm.



**Hình 3.36.** Ảnh hưởng của thuốc trừ sâu lên sự phát triển của *M. anisopliae* trong thí nghiệm *in vitro*. 1-Thiamethoxam; 2-Triazophos; 3-Deltamethrin; 4-Fipronil; 5-Fenitrothion; 6-Chlorpyrifos; 7- Carbaryl; 8-Azadirachtins.



**Hình 3.37** Ảnh hưởng của thuốc trừ nấm lên sự phát triển của *M. anisopliae* trong thí nghiệm *in vitro*. 1-Chlorothalonil; 2-Validamycin; 3-Mancozeb; 4-Zineb; 5-Carbendazim; 6- Benomyl

### 3.2.4. Đánh giá độc tính của nấm *M. anisopliae* trên một số sâu hại cây trồng

**3.2.4.1. Xác định nồng độ trừ sâu xanh da láng (*S. exigua*) của nấm *M. anisopliae* trong điều kiện *in vitro*:** tỷ lệ sâu chết ở nồng độ  $10^4$  -  $10^5$  bt/ml là rất thấp dưới 40%, tỷ lệ sâu chết tăng dần ở các nồng độ  $10^7$  và  $10^8$ bt/ml. MPL Ma(SXH-BD) và Ma(SXĐP-TN) gây chết cho sâu với tỷ lệ rất cao 81,2- 89,9% ( $10^7$ bt/ml) và 86,6 - 93,1% ( $10^8$ bt/ml). Ở nồng độ  $10^8$ bt/ml, MPL Ma(RS-Q9) gây chết cho sâu khá cao 82,8%.

**3.2.4.2. Xác định nồng độ trừ rầy nâu (*N. lugens*) của nấm *M. anisopliae* trong điều kiện nhà lưới.** Ở nồng độ 250 triệu bào tử/ml trở xuống hiệu lực trừ rầy nâu rất thấp, hiệu lực bắt đầu tăng ở nồng độ 500 triệu bào tử trở lên. Các MPL từ sâu, rầy hại lúa đều có hiệu lực cao 85,0 – 91,6%. MPL Ma(RS-Q9) gây chết cho rầy nâu lên đến 77%, Ma(SXH-BD) 64% và Ma(CC-BTh) 62% ở 10 ngày sau phun.

**3.2.4.3. Xác định nồng độ trừ sâu xanh da láng của nấm *M. anisopliae* trong điều kiện nhà lưới.** Hiệu lực trừ sâu xanh da láng ở nồng độ từ 50- 250 triệu bào tử/ml thấp 50,8 – 57,2%. Hiệu lực tăng dần ở nồng độ 500 -700 triệu bào tử với hiệu lực cao nhất 90,5 – 94,1%.

**3.2.4.4. Khả năng gây bệnh của nấm *M. anisopliae* trên một số sâu hại trong điều kiện nhà lưới và đồng ruộng**

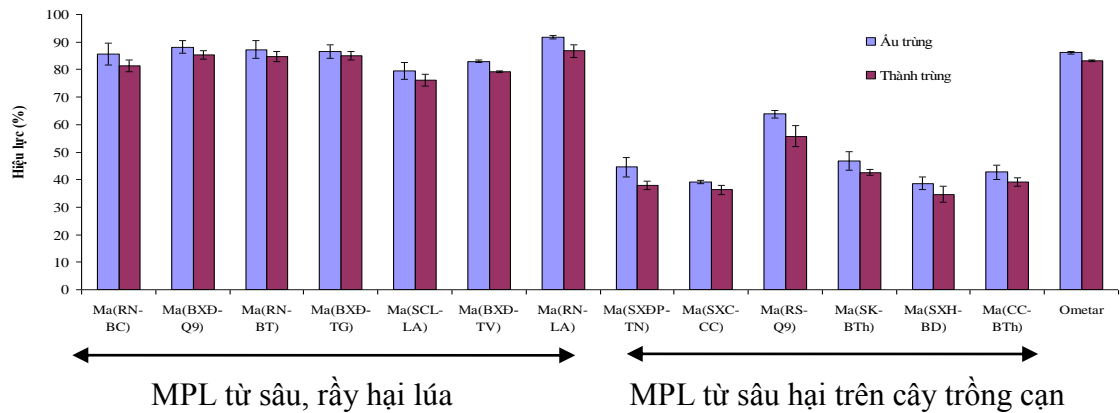
#### a) Kết quả các thí nghiệm trong nhà lưới

\* **Đối với rầy nâu hại lúa (*N. lugens*):** Đa số các MPL từ sâu, rầy hại lúa đều có khả năng gây bệnh rất cao cho cả ấu trùng và thành trùng. MPL Ma(RN-LA) thể hiện khả năng gây bệnh cao nhất, MPL Ma(RS-Q9) gây chết cho ấu trùng rầy nâu 63,8% và 55,8% đối với thành trùng. (hình 3.39).

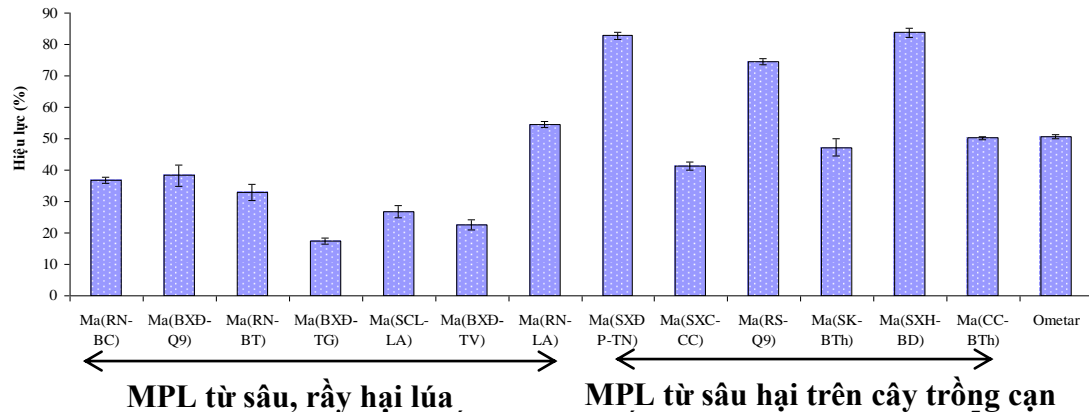
\* **Đối với sâu xanh da láng hại hành lá (*S. exigua*):** Hình 3.40 cho thấy, hiệu lực của các MPL từ sâu, rầy hại lúa đối với sâu xanh da láng là rất thấp. MPL Ma(SXH-BD) gây chết



cho sâu cao nhất với tỷ lệ lên đến 83,8%, MPL Ma(SXĐP-TN) 82,8% và Ma(CC-BTh) 50,2%.



**Hình 3.39.** Hiệu lực trừ rầy nâu (%) của nấm *M. anisopliae* ( $2,5 \times 10^7$  bt/ml) trong thí nghiệm nhà lưới (Đại Học Nông Lâm TP.HCM, năm 2005. Nhiệt độ TB  $27,3^{\circ}\text{C}$ , ẩm độ TB 80,5%. Hiệu lực được hiệu chỉnh theo Abbott, 1925



**Hình 3.40.** Hiệu lực trừ sâu xanh da láng chết (%) của nấm *M. anisopliae* ( $2,5 \times 10^7$  bt/ml) trong thí nghiệm nhà lưới (Đại Học Nông Lâm TP.HCM, năm 2005). Nhiệt độ TB  $27,3^{\circ}\text{C}$ , ẩm độ TB 80,5%. Hiệu lực được hiệu chỉnh theo Abbott, 1925

### b) Kết quả của các thí nghiệm ngoài đồng ở diện tích nhỏ

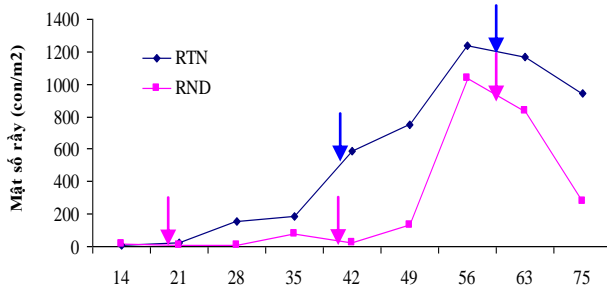
Trong điều kiện kết hợp với thuốc hóa học, hiệu lực của nấm đối với rầy nâu tăng dần từ 7 NSP và kéo dài đến 21 NSP, năng suất không khác biệt và chưa thấy ảnh hưởng của nấm đối với thiên địch trong ruộng lúa. Đối với sâu xanh da láng trên cây hành lá, hiệu lực của nấm *M. anisopliae* xử lý đơn và kết hợp với thuốc Hostathion 20EC kéo dài đến 21 ngày.

### c) Kết quả của các thí nghiệm ngoài đồng ở diện tích rộng

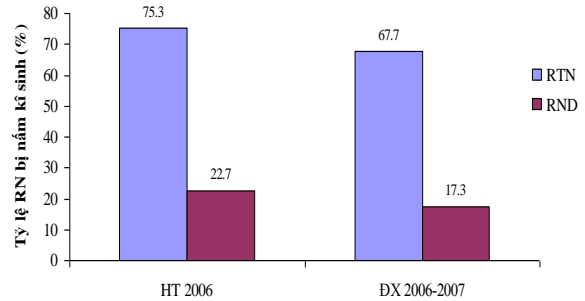
\* **Hiệu lực trừ rầy nâu hại lúa của nấm *M. anisopliae* tại Đức Hòa - Long An, vụ hè thu 2006 và đông xuân 2006-2007.** Đồ thị mật số rầy nâu từ hình 3.41 cho thấy, sử dụng nấm *M. anisopliae* với 2 lần phun (40 và 60 ngày sau sạ) đã khống chế được mật số rầy nâu trên ruộng dưới  $1000 \text{ con/m}^2$  ở 75 ngày sau sạ. Tỷ lệ rầy nâu chết bị nấm ký sinh cao hơn so với ruộng nông dân phun 3 lần thuốc Actara 25WG + Trebon 10EC (hình 3.42). Hình 3.44, năng suất lúa ruộng phun nấm là không khác biệt so với năng suất ở ruộng nông dân phun 3 lần thuốc hóa học Actara 25WG + Trebon 10EC.

\* **Sử dụng nấm *M. anisopliae* trừ sâu xanh da láng (*S. exigua*) trên cây hành lá tại Tân Hạnh, Đồng Nai.** Số liệu từ bảng 3.38 cho thấy, mật số sâu xanh da láng không có sự

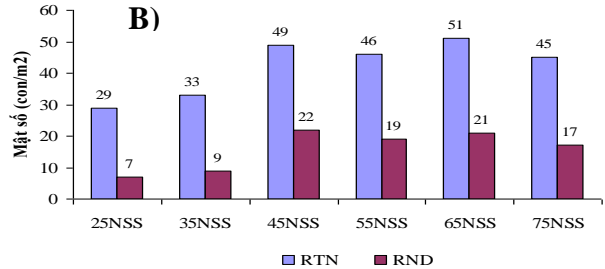
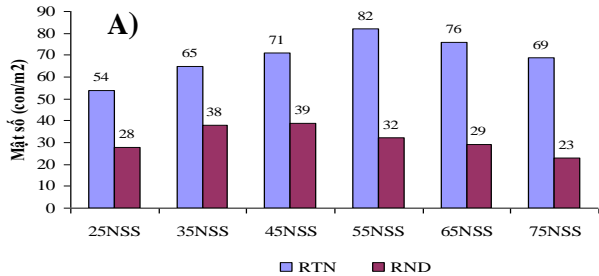
khác biệt so với ruộng nông dân. Tỷ lệ bụi hành bị sâu hại (%) ở cả 2 ruộng không có sự khác biệt có ý nghĩa qua phân tích thống kê T-test. Năng suất hành ở ruộng thí nghiệm không khác biệt so với năng suất ở ruộng của nông dân mặc dù nông dân đã phun tới 13 lần thuốc hóa học.



**Hình 3.41** Mật số rầy nâu trên ruộng thí nghiệm và ruộng nông dân sau khi xử lý *M. anisopliae*. Ruộng thí nghiệm phun 2 lần (40 và 60 ngày sau sạ); Ruộng nông dân phun 3 lần thuốc Actara 25WG + Trebon (20, 40 và 60 ngày sau sạ).

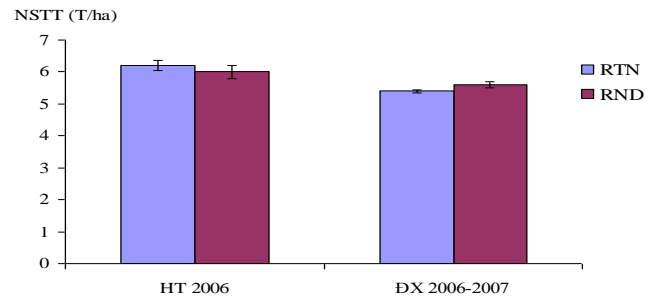


**Hình 3.42.** Tỷ lệ rầy nâu (*Nilaparvata lugens*) (%) bị nhiễm *M. anisopliae* sau thí nghiệm tại Đức Hòa Long An, vụ hè thu 2006 và đông xuân 2006-2007.



**Hình 3.43.** Mật số bọ xít mù xanh và nhện bắt mồi ăn thịt trên ruộng thí nghiệm tại Đức Hòa Long An, vụ hè thu 2006 và đông xuân 2006-2007. A) Mật số nhện bắt mồi ăn thịt và bọ xít mù xanh vụ hè thu. B) Mật số nhện bắt mồi ăn thịt và bọ xít mù xanh, vụ đông xuân.

**Hình 3.44.** Ảnh hưởng của việc phun nấm *M. anisopliae* để trừ rầy nâu đến năng suất lúa (T/ha) vụ hè thu năm 2006 và đông xuân 2006-2007, tại Đức Hòa, Long An



**Bảng 3.38.** Kết quả sử dụng nấm *M. anisopliae* để trừ sâu xanh da láng (*S. exigua*) trên hành lá tại Tân Hạnh, Đồng Nai, năm 2006

Chỉ tiêu theo dõi	Đợt 1			Đợt 2			Đợt 3		
	RTN	RND	T <sub>tính</sub>	RTN	RND	T <sub>tính</sub>	RTN	RND	T <sub>tính</sub>
Mật số sâu (con/m <sup>2</sup> )	36,8	35,2	-1,98 <sup>ns</sup>	26,1	30,7	-2,34 <sup>ns</sup>	34,5	30,2	-1,34 <sup>ns</sup>
Tỷ lệ bụi hành bị hại (%)	24,5	22,9	-0,81 <sup>ns</sup>	16,5	21,2	-2,13 <sup>ns</sup>	22,6	19,3	-0,85 <sup>ns</sup>
Năng suất (t/ha)	19,6	20,7	1,02 <sup>ns</sup>	23,1	22,8	0,19 <sup>ns</sup>	20,7	21,5	0,32 <sup>ns</sup>

RTN: ruộng thí nghiệm; RND: ruộng nông dân. Ruộng thí nghiệm: phun 3 lần nấm *M. anisopliae*, 1 lần thuốc vi sinh success 25EC (Spinosad), 1 lần thuốc thảo mộc Nimbecidin 0,03EC (Azadirachtins). Ruộng nông dân phun 13 lần thuốc trừ sâu hóa học: Endosol 35EC, Lannat 40SP, Padan 95SP.

## KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

### 1. KẾT LUẬN

1. Kết quả định danh theo phương pháp truyền thống đã xác định được 13 MPL *Beauveria* thuộc loài *B. bassiana* và 16 MPL *Metarhizium* thuộc loài *M. anisopliae*

2. Theo phương pháp sinh học phân tử, phân tích trình tự DNA trên vùng ITS-rDNA đã xác định 13 MPL *Beauveria* thuộc loài *B. bassiana* và 16 MPL *Metarhizium* là loài *M. anisopliae*. Sự biến động trình tự DNA trên vùng ITS-rDNA của 13 MPL *B. bassiana* với 3 nhóm di truyền và 6 nhóm di truyền của nấm *M. anisopliae* đã được nhận biết trên vùng ITS-rDNA. Phát hiện 10 trong số 16 MPL *M. anisopliae* có gen *Pr1* bằng phương pháp nested-PCR với 3 nhóm di truyền khác biệt nhau dựa trên phân tích trình tự gen *Pr1*.

3. Kết quả nghiên cứu về đặc điểm sinh học của nấm *B. bassiana* và *M. anisopliae* cho thấy, nấm *M. anisopliae* nảy mầm sớm, hình thành bào tử nhiều hơn, chịu nhiệt cao hơn, khả năng gây bệnh cho sâu hại cao hơn nấm *B. bassiana*. Môi trường SDAY+K thích hợp cho cả 2 nấm tạo nhiều bào tử. Ẩm độ thích hợp cho nấm nảy mầm 98%. Số lượng bào tử cao nhất ở 12-14 ngày sau nuôi cấy. Thiamethoxam, triazophos, deltamethrin và azadirachtins ở nồng độ khuyến cáo không ảnh hưởng đến *B. bassiana* và *M. anisopliae*. Tất cả 6 loại thuốc trừ nấm bệnh đều ảnh hưởng đến sự phát triển ngay cả ở nồng độ thấp.

4. Kết quả đánh giá hiệu lực của nấm *B. bassiana* và *M. anisopliae* trừ rầy nâu và sâu xanh da láng cho thấy:

- **Trong phòng và trong nhà lưới:** Nồng độ  $10^8$ bt/ml, hiệu lực của nấm *B. bassiana* đối với sâu xanh da láng 86,1 và 88,6%. Đối với *M. anisopliae* hiệu lực trừ sâu cao hơn, 86,6% và 93,1%. Ở nồng độ  $2,5 \times 10^7$ bt/ml, hiệu lực của *B. bassiana* đối với ấu trùng rầy nâu từ 85,6% - 88,3%, thành trùng 80,3% - 85,5%. Hiệu lực của *M. anisopliae* đối với ấu trùng 91,8%, thành trùng 86,7%. Ở nồng độ từ  $5 - 7 \times 10^8$ bt/ml, hiệu lực trừ rầy nâu của nấm *B. bassiana* từ 90,6% - 91,6%. Hiệu lực của *M. anisopliae* trừ sâu xanh da láng rất cao từ 90,4% - 94,1% ở 10 ngày sau phun.

- **Ngoài đồng ruộng:** Hiệu lực của nấm *B. bassiana* và *M. anisopliae* đối với rầy nâu ở 14 ngày sau phun đạt từ 59,1-77,5% và 68,7-75,8%. Đối với sâu xanh da láng 61,4 - 72,2% và kéo dài đến 21 ngày sau phun. Sử dụng nấm *B. bassiana* và *M. anisopliae* ở diện tích rộng đã khống chế được mật số sâu rầy vào cuối vụ. Chưa thấy có sự ảnh hưởng bất lợi cho thiên địch của sâu hại trong hệ sinh thái ruộng lúa là nhện bắt mồi ăn thịt (*Lycosa* sp.) và bọ xít mù xanh (*Cyrtorhinus lividipennis*).

### 3.3.2. ĐỀ NGHỊ

1. Tiếp tục thử nghiệm các MPL *B. bassiana* và *M. anisopliae* trong nghiên cứu ở các vùng sinh thái khác nhau, trên các loại sâu hại khác để xác định phổ ký chủ và hiệu lực của nấm. Nghiên cứu các yếu tố ảnh hưởng đến hiệu lực của nấm sau khi phóng thích ra ngoài đồng.

2. Tiếp tục nghiên cứu sự khác biệt di truyền của quần thể nấm *B. bassiana* và *M. anisopliae* đang tồn tại ở nước ta với các marker phân tử khác nhau. Nghiên cứu về nguồn gốc cũng như sự phân bố địa lý của các nhóm trong tự nhiên, mối tương quan giữa quá trình hình thành bệnh của nấm với côn trùng ký chủ và môi trường sống.