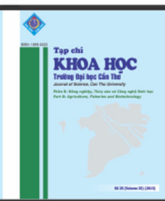




Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ
website: sj.ctu.edu.vn



DOI:10.22144/ctu.jsi.2016.068

XÁC ĐỊNH LOÀI, ĐẶC ĐIỂM SINH HỌC VÀ BƯỚC ĐẦU ĐÁNH GIÁ HIỆU QUẢ TRỪ SÙNG KHOAI LANG (*Cylas formicarius* Fabricius) TRONG ĐIỀU KIỆN PHÒNG THÍ NGHIỆM CỦA CÁC CHỦNG NẤM *BEAUVERIA* KÝ SINH TRÊN CÔN TRÙNG GÂY HẠI PHÂN LẬP TẠI ĐỒNG BẰNG SÔNG CỬU LONG

Huỳnh Hữu Đức và Trần Văn Hai

Khoa Nông nghiệp và Sinh học Ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ

ABSTRACT

The result of the isolation and identification showed that sixteen *Beauveria* isolates parasitic on insects at 7 provinces in the Mekong Delta belong to one entomopathogenic *Beauveria* species, *Beauveria bassiana*. Colonies on PDA medium were normally white or white to pale yellow as mature. These isolates were characterized by conidiophores consisting of whorls and dense clusters of short conidiophorous cells with one-celled spherical ($2.61 - 2.97 \times 2.35 - 2.72 \mu\text{m}$) or ovoid ($2.24 - 2.28 \times 2.23 - 2.24 \mu\text{m}$). Moreover, the result of the sequences of ITS - rDNA region reported that those 16 strains had a significantly considerable similarity (from 96.6% to 99.6%) compared to others on Genbank. The biological characteristics illustrated that 16 *Beauveria bassiana* isolates revealed a high germination rate (90%) at 24 hours after cultivation. High speed of mycelial growth and high density of spores was recorded (about $[3.42 - 11.5 \times 10^7 \text{ spores}] \times \text{cm}^2$) at 14th - 18th day after cultivation. From primary results, 16 *Beauveria bassiana* isolates showed a high efficacy (94% at the 11th day after treatment) in controlling sweet potato weevil (*Cylas formicarius* Fabricius) in in-vitro condition.

TÓM TẮT

Kết quả phân lập và định danh đã xác định 16 chủng nấm *Beauveria* thuộc loài *Beauveria bassiana* ký sinh trên côn trùng gây hại tại 7 tỉnh Đồng bằng sông Cửu Long. Khuẩn lạc của các chủng nấm nuôi cấy trên môi trường PDA thường có màu trắng hoặc màu trắng hơi ửng vàng khi thành thực. Các chủng nấm có đặc điểm chung bởi cuống bào tử đính mọc theo hình vòng xoắn và thành từng cụm dày đặc của cánh bào đài ngắn với một bào tử đơn có dạng hình trứng ($2,61 - 2,97 \times 2,35 - 2,72 \mu\text{m}$) hoặc hình cầu ($2,24 - 2,28 \times 2,23 - 2,24 \mu\text{m}$). Ngoài ra, kết quả so sánh mức độ tương đồng trình tự DNA vùng ITS-rDNA cho thấy các chủng nấm có sự tương đồng cao (96,6% đến 99,6%) so với những trình tự đã công bố trên Genbank. Đặc điểm sinh học của 16 chủng nấm *B. bassiana* cho thấy: tỷ lệ nảy mầm cao trên 94% sau 24 giờ nuôi cấy. Môi trường SDAY₃ cho tốc độ phát triển đường kính khuẩn lạc nhanh và cho mật số bào tử cao (khoảng 3,42 đến 11,5 x 10⁷ bào tử/cm²) sau 14 đến 18 ngày nuôi cấy. Bước đầu đánh giá hiệu quả các chủng nấm trắng *B. bassiana* cho thấy, tất cả 16 chủng nấm đều có hiệu quả trừ sùng khoai lang (*Cylas formicarius* Fabricius) cao, đạt trên 94% tỷ lệ sùng chết sau 11 ngày xử lý trong điều kiện phòng thí nghiệm.

Thông tin chung:

Ngày nhận: 05/08/2016

Ngày chấp nhận: 26/10/2016

Title:

Identification, biological characteristics and evaluation of the effectiveness of entomopathogenic fungus *Beauveria* isolated in the Mekong delta against sweetpotato weevil (*Cylas formicarius* Fabricius) in in-vitro condition

Từ khóa:

Nấm trắng *Beauveria bassiana*, sùng khoai lang (*Cylas formicarius* Fabricius), trình tự DNA vùng ITS-rDNA

Keywords:

Beauveria bassiana, sequences of ITS-rDNA region, sweet potato weevil (*Cylas formicarius* Fabricius)

Trích dẫn: Huỳnh Hữu Đức và Trần Văn Hai, 2016. Xác định loài, đặc điểm sinh học và bước đầu đánh giá hiệu quả trừ sùng khoai lang (*Cylas formicarius* Fabricius) trong điều kiện phòng thí nghiệm của các chủng nấm *Beauveria* ký sinh trên côn trùng gây hại phân lập tại Đồng bằng sông Cửu Long. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. Số chuyên đề: Nông nghiệp (Tập 3): 36-46.

1 MỞ ĐẦU

Nấm *Beauveria* là một trong những tác nhân ký sinh có phổ ký chủ rộng, ký sinh gây bệnh cho nhiều loại côn trùng gây hại trong nông - lâm nghiệp. Nấm ký sinh này đã được nhiều nơi trên thế giới quan tâm nghiên cứu phát triển và ứng dụng như là một loại thuốc sinh học phòng trừ nhiều đối tượng sâu hại cây trồng, khắc phục những nhược điểm của thuốc hóa học gây ra (Nguyễn Thị Loc, 1995; Phạm Thị Thùy, 2004). Việc phân loại định danh nấm ký sinh côn trùng dựa vào đặc điểm hình thái học được xem là nền tảng, là yếu tố ban đầu để nhận biết về loài nấm *Beauveria*. Tuy nhiên, nghiên cứu xác định loài nấm dựa trên đặc điểm hình thái sẽ khó phân biệt được hết các loài khác nhau trong chi *Beauveria*. Hơn nữa, những nghiên cứu về đặc điểm sinh học, khả năng gây bệnh trên sâu hại, mối quan hệ giữa ký sinh và ký chủ cũng như quá trình hình thành bệnh trên sinh vật chủ của những chủng mới phát hiện còn ít dữ liệu hoặc chưa được đầu tư nghiên cứu (Võ Thị Thu Oanh, 2010). Kỹ thuật sinh học phân tử góp phần nâng cao cơ sở khoa học cho việc định danh tới loài đối với nấm ký sinh gây bệnh côn trùng. Việc xác định loài và phân tích sự biến động di truyền của các cá thể trong quần thể *Beauveria* trở nên dễ dàng hơn nhờ sự trợ giúp của kỹ thuật tiên tiến này. Trình tự vùng ITS-rDNA đã được sử dụng để định danh nấm *Beauveria*, hỗ trợ cho định danh ở cấp loài và dưới loài chính xác và nhanh chóng (Glare và Inwood, 1998). Vì vậy, mục tiêu nghiên cứu của thí nghiệm là xác định thành phần loài bằng phương pháp truyền thống và dựa vào trình tự vùng ITS-rDNA, đặc điểm sinh học và bước đầu đánh giá độc tính của nấm *B. bassiana* thu thập được.

2 NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1 Nguyên liệu nghiên cứu

Các mẫu nấm *Beauveria* thu thập từ xác côn trùng ngoài tự nhiên được sử dụng để nghiên cứu. *Môi trường nuôi cấy*: bao gồm môi trường PDA và Sabouraud dextrose agar có bổ sung khoáng chất và một số hóa chất dùng trong nghiên cứu sinh học phân tử.

2.2 Phương pháp nghiên cứu

Thí nghiệm 1: Thu thập mẫu, phân lập và định danh tới loài đối với các chủng nấm thuộc chi *Beauveria* sp. bằng phương pháp truyền thống dựa trên đặc điểm hình thái và kỹ thuật sinh học phân tử

Thu thập mẫu côn trùng bị nấm trắng *Beauveria* ký sinh đã chết ngoài tự nhiên tại 7 tỉnh

thuộc Đồng bằng sông Cửu Long (ĐBSCL) (Bảng 1) về phòng thí nghiệm và phân lập trên môi trường PDA để định danh tới loài đối với các chủng nấm phân lập theo khóa phân loại của Barnett và Barry (1972), Lawrence (1994), De Hoog (1972), Luangsa-Ard *et al.* (2006). Các chỉ tiêu theo dõi để phục vụ công tác định danh bao gồm: đặc điểm khuẩn lạc, đặc điểm cơ quan sinh bào tử, hình dạng bào tử và kích thước bào tử.

Xác định loài của nấm *Beauveria* sp. dựa vào trình tự vùng ITS-rDNA

– Chiết xuất DNA tổng số theo quy trình của Saitoh *et al.* (2006) có cải tiến. Sau khi có lượng DNA sẽ thực hiện phản ứng PCR khuếch đại vùng ITS-rDNA, đọc kết quả và giải trình tự vùng ITS-rDNA.

– Vùng ITS-rDNA được giải trình tự bằng hai primer ITS5 (5'- GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G - 3') và ITS4 (5'- TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC - 3') được sử dụng để khuếch đại vùng ITS - rDNA, bao gồm ITS1 - 5.8S - ITS2. Trình tự DNA sẽ được so sánh với các trình tự vùng ITS-rDNA của các mẫu phân lập *Beauveria* trên thế giới đã biết tên loài từ cơ sở dữ liệu của Genbank, làm cơ sở xác định tên loài của các mẫu nấm *Beauveria* thu thập tại ĐBSCL.

– Sơ đồ phân nhóm xác định loài nấm thuộc chi *Beauveria* sẽ được xử lý, tính toán từ trị số của ma trận với khoảng cách di truyền bằng thuật toán parsimony và phân tích bootstrap với 1.000 lần lặp lại. Sử dụng các chương trình phylogenetic (BioEdit, Clustalx 3.1 và Treeview) để quan sát mối quan hệ di truyền qua cây phả hệ của các loài nấm và tính tỷ lệ tương đồng giữa các DNA của các mẫu nấm thu thập.

Thí nghiệm 2: Nghiên cứu một số đặc điểm sinh học của các chủng nấm *Beauveria* sp.

Thí nghiệm 2.1. Xác định thời gian bào tử nảy mầm của các chủng nấm *Beauveria* sp.

Trải đều 0,1 ml dịch bào tử nấm (10^6 bào tử/ml trong nước cất thanh trùng chứa 0,05% Tween 20) trên lame có phủ một lớp môi trường nuôi cấy, đặt trong buồng tối ở điều kiện nhiệt độ phòng. Mỗi mẫu phân lập thực hiện trên bốn lame tương ứng với bốn lần lặp lại. Tỷ lệ bào tử nảy mầm (%) được đánh giá 2 giờ một lần trong vòng 24 giờ dưới kính hiển vi OLYMPUS DP20 với độ phóng đại 400 lần. Quan sát bốn thị trường/lame. Đếm 25 bào tử/thị trường, tổng số bào tử quan sát là 400 cho mỗi mẫu phân lập.

Thí nghiệm 2.2. Ảnh hưởng của nguồn dinh dưỡng đến sự phát triển của nấm *Beauveria* sp.

Thí nghiệm được bố trí theo hai nhân tố, trong đó nhân tố A là 16 chủng nấm phân lập được và nhân tố B là năm loại môi trường dinh dưỡng khác nhau PDA, CDA, SDAY₁, SDAY₃, SDAY - Chitin với bốn lần lặp lại. Mỗi lần lặp lại sử dụng một đĩa petri chứa 10 ml môi trường cần khảo sát. Cấy một khoanh nấm có đường kính khoảng 10 mm vào giữa đĩa môi trường để úp ngược tiếp xúc trực tiếp môi trường nuôi cấy và đặt ở $27 \pm 2^\circ\text{C}$ trong điều kiện 12 giờ sáng tối. Phương pháp và chỉ tiêu theo dõi:

Thời gian theo dõi: sau 3 ngày nuôi cấy và đo cho đến khi không còn sự khác biệt.

Tốc độ phát triển trung bình (mm/ngày): trung bình của 3 lần đo đường kính khuẩn lạc từ 5 - 7, 7 - 9 và 9 - 11 ngày sau khi cấy.

Mật số bào tử/cm²: được tính ở thời điểm 15 ngày sau khi nuôi cấy theo phương pháp sau:

Tính mật số bào tử theo phương pháp đếm mật số bào tử trực tiếp bằng buồng đếm Thoma

$$\text{Số bào tử/ml} = (4 \times a \times 10^6) / b$$

Trong đó: a: số bào tử có trong thể tích huyền phù ứng với diện tích ô nhỏ ($= 1/400 \text{ mm}^2$) x độ sâu 0,1 mm; b: hệ số pha loãng

Mật số bào tử/cm² = số bào tử (bt/ml)/diện tích khuẩn lạc

Thí nghiệm 2.3. Ảnh hưởng thời gian nuôi cấy đến sự hình thành bào tử của nấm *Beauveria* sp.

Thí nghiệm được thực hiện theo phương pháp của Phạm Thị Thùy và *ctv.* (1995). Các mẫu phân lập của nấm *Beauveria* sp. được nuôi cấy trong đĩa petri trên môi trường tốt nhất được lựa chọn từ thí nghiệm 2.2, ở nhiệt độ $27 \pm 2^\circ\text{C}$, với 4 lần lặp lại cho mỗi mẫu. Phương pháp và chỉ tiêu theo dõi tương tự thí nghiệm 2.3. Thời gian theo dõi: 4, 6, 8, 10, 12... 26, 28 và 30 ngày sau nuôi cấy.

Thí nghiệm 3: Xác định hiệu lực trừ sùng khoai lang (*Cylas formicarius* Fabricius) của các chủng nấm *Beauveria bassiana* trong điều kiện phòng thí nghiệm.

Nguồn nấm: Các chủng nấm *B. bassiana* được nuôi cấy trong môi trường thạch tốt nhất cho sự phát triển và sinh ra một lượng bào tử nhất định. Sau đó tiến hành thu bào tử bằng dung dịch nước cất có chứa chất Tween 20 (0.1%), đếm mật số bào tử và điều chỉnh về mật độ 5×10^8 bào tử/ml.

Nguồn sùng khoai lang (SKL): thu thập mẫu khoai lang bị nhiễm sùng từ những ruộng sau thu hoạch khoai ở huyện Bình Tân, tỉnh Vĩnh Long

đem về phòng thí nghiệm NEDO, Bộ môn Bảo vệ Thực vật, Trường Đại học Cần Thơ. Sùng khoai lang được nuôi trong các hộp nhựa có nắp đậy bằng vải mùng ở điều kiện nhiệt độ $28 \pm 2^\circ\text{C}$ và chế độ chiếu sáng 16 giờ sáng/8 giờ tối trong điều kiện phòng thí nghiệm.

Phương pháp thí nghiệm: Thí nghiệm bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên gồm 16 chủng nấm *B. bassiana* phân lập tương ứng với 16 nghiệm thức và một nghiệm thức đối chứng. Mỗi nghiệm thức có bốn lần lặp lại, mỗi lặp lại gồm 30 thành trùng SKL, mỗi thành trùng được nuôi riêng trong hộp nhựa nhỏ có lót giấy thấm giữ ẩm và có thức ăn là khoai lang. Đối với nghiệm thức xử lý nấm, sử dụng nồng độ huyền phù bào tử nấm 5×10^8 bào tử/ml. Xử lý trực tiếp lên SKL bằng cách sử dụng bình phun thuốc với lượng huyền phù phun 25 – 30 ml cho bốn lần lặp lại/chủng nấm. Đối với nghiệm thức đối chứng pha dung dịch có chất Tween 20 (0.1%) và xử lý SKL cũng giống như các nghiệm thức xử lý nấm.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Thu thập mẫu, phân lập và định danh tới loài đối với các chủng thuộc chi *Beauveria* bằng phương pháp truyền thống dựa trên đặc điểm hình thái và kỹ thuật sinh học phân tử

3.1.1 Định danh loài từ chi nấm *Beauveria* theo phương pháp phân loại truyền thống

Kết quả 16 mẫu nấm trắng ký sinh trên côn trùng gây hại thu thập được, sau khi phân lập và đã định danh được 16 mẫu có đặc điểm thuộc chi nấm *Beauveria* (Bảng 1).

Đặc điểm khuẩn lạc: Khuẩn lạc của 16 chủng nấm trắng *B. bassiana* sau khi được phân lập và nuôi cấy trên môi trường PDA cho thấy, các chủng nấm có đặc điểm hình thái khuẩn lạc hầu như không khác biệt. Khuẩn lạc có màu trắng sau 7 ngày nuôi cấy, một số chủng nấm chuyển sang màu trắng hơi ửng vàng (khi nấm thành thực 20 – 30 NSKC), xốp mịn, khuẩn lạc kết chặt phát triển theo vòng đồng tâm đôi khi có tiết dịch trên bề mặt khuẩn lạc. Đặc điểm khuẩn lạc được mô tả ở trên phù hợp với mô tả của Phạm Thị Thùy (2004) và Võ Thị Thu Oanh (2010) về nấm *B. bassiana*.

Đặc điểm cơ quan sinh bào tử, hình dạng bào tử nấm: Kết quả quan sát trên 16 chủng nấm *B. bassiana* thu thập đã ghi nhận các chủng nấm đều có chung đặc điểm là tế bào sinh bào tử phát triển từ sợi nấm sinh dưỡng mọc thành đám theo hình vòng xoắn. Cuống bào tử dính phồng lên ở phía dưới có dạng hình bình với chiều dài không đều nhau, dạng đơn hoặc phân nhánh. Cuống bào tử dính có thể phát triển thêm để sản sinh bào tử,

kết quả là làm cho chúng có dạng hình zíc zắc hoặc cong gập. Bào tử có dạng đơn bào trong suốt, không có vách ngăn, dạng bào tử đính có hai loại hình cầu hoặc hình trứng với kích thước từ 1,42 - 3,82 x 1,47 - 3,82 μm , bào tử mọc trên cuống sinh

bào tử hướng gốc. Những đặc điểm này đều phù hợp với đặc điểm của loài *B. bassiana* đã được mô tả bởi các tác giả là Barnett and Barry (1972), Phạm Thị Thùy (2004) và Võ Thị Thu Oanh (2010).

Bảng 1: Các chủng nấm *B. bassiana* đã được phân lập và ký hiệu

Ký hiệu	Nguồn phân lập	Địa điểm
Bb ₁ (SKL-CT)	Sùng khoai lang <i>Cylas formicarius</i> Fabricius (Họ: Curculionidae, Bộ: Coleoptera)	Cần Thơ
Bb ₂ (SKL-VL)	Sùng khoai lang <i>Cylas formicarius</i> Fabricius (Họ: Curculionidae, Bộ: Coleoptera)	Vĩnh Long
Bb ₃ (SKL-VL)	Sùng khoai lang <i>Cylas formicarius</i> Fabricius (Họ: Curculionidae, Bộ: Coleoptera)	Vĩnh Long
Bb ₄ (SKL-VL)	Sùng khoai lang <i>Cylas formicarius</i> Fabricius (Họ: Curculionidae, Bộ: Coleoptera)	Vĩnh Long
Bb ₅ (SKL-HG)	Sùng khoai lang <i>Cylas formicarius</i> Fabricius (Họ: Curculionidae, Bộ: Coleoptera)	Hậu Giang
Bb ₆ (SKL-KG)	Sùng khoai lang <i>Cylas formicarius</i> Fabricius (Họ: Curculionidae, Bộ: Coleoptera)	Kiên Giang
Bb ₇ (SKL-AG)	Sùng khoai lang <i>Cylas formicarius</i> Fabricius (Họ: Curculionidae, Bộ: Coleoptera)	An Giang
Bb ₈ (BN-CT)	Bọ nhảy <i>Phyllotreta striolata</i> Fab. (Họ: Chrysomelidae, Bộ: Coleoptera)	Cần Thơ
Bb ₉ (BN-HG)	Bọ nhảy <i>Phyllotreta striolata</i> Fab. (Họ: Chrysomelidae, Bộ: Coleoptera)	Hậu Giang
Bb ₁₀ (BN-ST)	Bọ nhảy <i>Phyllotreta striolata</i> Fab. (Họ: Chrysomelidae, Bộ: Coleoptera)	Sóc Trăng
Bb ₁₁ (SĐ-CT)	Sùng đất <i>Lepidiota cochinchinae</i> Brenske (Họ: Scarabaeidae, Bộ: Coleoptera)	Cần Thơ
Bb ₁₂ (RSG-CT)	Rệp sáp giả <i>Planococcus</i> sp. (Họ: Pseudococcidae, Bộ: Homoptera)	Cần Thơ
Bb ₁₃ (RSG-HG)	Rệp sáp giả <i>Planococcus</i> sp. (Họ: Pseudococcidae, Bộ: Homoptera)	Hậu Giang
Bb ₁₄ (RSG-TV)	Rệp sáp giả <i>Planococcus</i> sp. (Họ: Pseudococcidae, Bộ: Homoptera)	Trà Vinh
Bb ₁₅ (RN-ST)	Rầy nâu <i>Nilaparvata lugens</i> Stal (Họ: Delphacidae, Bộ: Homoptera)	Sóc Trăng
Bb ₁₆ (SAT-VL)	Sâu ăn tạp <i>Spodoptera litura</i> Fabricius (Họ: Noctuidae, Bộ: Lepidoptera)	Vĩnh Long

Kích thước bào tử nấm: Kết quả (Bảng 2) cho thấy hai chủng nấm Bb₄(SKL-VL) và Bb₆(SKL-KG) có dạng bào tử hình cầu và kích thước gần như tương đương nhau (2,24 - 2,28 x 2,23 - 2,24 μm). Mười bốn chủng nấm còn lại có dạng bào tử hình hình trứng, bào tử có kích thước dao động từ (2,61 - 2,97 x 2,35 - 2,72 μm), trong đó Bb₃(SKL-VL) và Bb₁₆(SAT-VL) có kích thước bào tử lớn nhất lần lượt là (2,93 x 2,64 μm) và (2,97 x 2,72 μm).

Quan sát đặc điểm của 16 chủng nấm cho thấy giống với mô tả trong khóa phân loại của Barnett

và Barry (1972). Kết quả nghiên cứu các chủng nấm này tương tự như miêu tả của Nguyen Thi Loc (1995), Glare and Inwood (1998), Luangsa - Ard (2006), Võ Thị Thu Oanh (2010) là bào tử dạng hình cầu và hình trứng kích thước dao động trong khoảng 1,42 - 3,82 x 1,47 - 3,82 μm là loài *B. bassiana* và tỷ lệ dài/rộng nhỏ hơn 2 μm cũng được sử dụng như là sự giới hạn cho sự phân loại loài trong chi *Beauveria*. Tóm lại, từ kết quả quan sát đặc điểm về màu sắc khuẩn lạc, cơ quan sinh bào tử (cành bào đài), hình dạng và kích thước sinh bào tử của 16 chủng nấm *Beauveria* đều thuộc loài *B. Bassiana*.

Bảng 2: Hình dạng và kích thước bào tử của các chủng nấm *B. bassiana*

$T = 27 \pm 2^{\circ}\text{C}$, $RH = 66 \pm 4 \%$

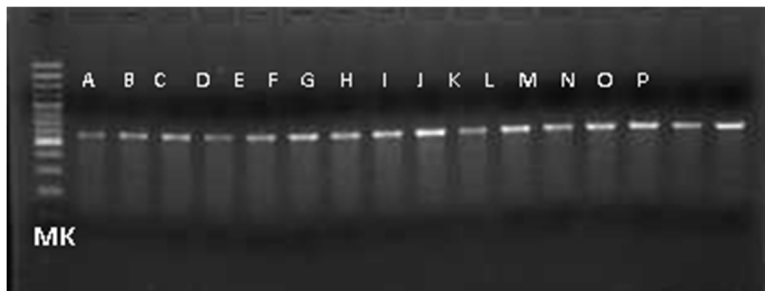
STT	Chủng nấm	Kích thước (dài x rộng) (μm)	Hình dạng bào tử
1	Bb ₁ (SKL-CT)	$2,73 \pm 0,12 \times 2,42 \pm 0,11$	Hình trứng
2	Bb ₂ (SKL-VL)	$2,75 \pm 0,13 \times 2,45 \pm 0,11$	Hình trứng
3	Bb ₃ (SKL-VL)	$2,93 \pm 0,13 \times 2,64 \pm 0,09$	Hình trứng
4	Bb ₄ (SKL-VL)	$2,28 \pm 0,12 \times 2,26 \pm 0,12$	Hình cầu
5	Bb ₅ (SKL-HG)	$2,78 \pm 0,12 \times 2,41 \pm 0,13$	Hình trứng
6	Bb ₆ (SKL-KG)	$2,24 \pm 0,12 \times 2,23 \pm 0,11$	Hình cầu
7	Bb ₇ (SKL-AG)	$2,68 \pm 0,10 \times 2,35 \pm 0,10$	Hình trứng
8	Bb ₈ (BN-CT)	$2,61 \pm 0,10 \times 2,41 \pm 0,13$	Hình trứng
9	Bb ₉ (BN-HG)	$2,66 \pm 0,09 \times 2,35 \pm 0,11$	Hình trứng
10	Bb ₁₀ (BN-ST)	$2,68 \pm 0,12 \times 2,37 \pm 0,11$	Hình trứng
11	Bb ₁₁ (SD-CT)	$2,67 \pm 0,16 \times 2,37 \pm 0,11$	Hình trứng
12	Bb ₁₂ (RSG-CT)	$2,61 \pm 0,09 \times 2,35 \pm 0,09$	Hình trứng
13	Bb ₁₃ (RSG-HG)	$2,69 \pm 0,18 \times 2,38 \pm 0,13$	Hình trứng
14	Bb ₁₄ (RSG-TV)	$2,68 \pm 0,10 \times 2,34 \pm 0,09$	Hình trứng
15	Bb ₁₅ (RN-ST)	$2,64 \pm 0,14 \times 2,43 \pm 0,13$	Hình trứng
16	Bb ₁₆ (SAT-VL)	$2,97 \pm 0,12 \times 2,72 \pm 0,14$	Hình trứng

Ghi chú: Kích thước bào tử được tính theo độ lệch chuẩn trung bình ($TB \pm SD$) của 40 bào tử cho mỗi chủng nấm

3.1.2 Định danh loài và phân tích một số khác biệt di truyền của nấm *Beauveria* dựa trên trình tự DNA vùng ITS – rDNA

Phản ứng PCR được thực hiện với 2 primer ITS4 và ITS5 khuếch đại vùng ITS - rDNA của tất cả 16 chủng phân lập *Beauveria*. Kết quả (Hình 1) cho thấy, sản phẩm sau khi khuếch đại bằng phản ứng PCR của vùng ITS - rDNA trên băng màu xuất hiện 16 vạch đều bằng nhau có chiều dài

nằm trong khoảng 540 - 580 bp khi phân tích điện di trên agarose 1%, với kết quả này một lần nữa khẳng định đã nhận biết được các chủng nấm trắng *Beauveria* ký sinh trên côn trùng gây hại thu thập được là cùng một loài *B. bassiana*. Kết quả nghiên cứu này phù hợp với kết quả của Nguyễn Thị Thu Oanh (2010) khi cho phản ứng PCR vùng ITS - rDNA của 13 chủng nấm *B. bassiana* phân lập được tại các địa phương khác nhau có cùng chiều dài khoảng 580 bp.



Hình 1: Sản phẩm PCR khuếch đại vùng ITS - rDNA của các chủng phân lập *Beauveria*, sử dụng hai primer ITS4 và ITS5 (MK: maker chuẩn, A - P là ký hiệu của 16 chủng nấm)

Kết quả so sánh mức độ tương đồng trình tự DNA trong vùng ITS – rDNA giữa 16 chủng nấm *Beauveria* được phân lập ở ba tỉnh ĐBSCL của Việt Nam với trình tự DNA tương ứng của 10 mẫu *B. bassiana* trên thế giới được thể hiện ở (Bảng 3). Tỷ lệ tương đồng của các chủng nấm *B. bassiana* được phân lập tại Việt Nam so với 10 chủng nấm *B. bassiana* được phân lập tại một số nơi trên thế giới là rất cao, từ 96,6% đến 99,6%. Các chủng nấm *Beauveria* phân lập được tại Việt Nam có

quan hệ di truyền gần gũi với nhau hơn, từ 98,4% đến 100%. Sự tương đồng của trình tự DNA trong vùng ITS - rDNA giữa các chủng phân lập tại Việt Nam cao hơn so với các chủng được phân lập trên thế giới. Kết quả này phù hợp với kết luận nghiên cứu của Glare and Inwood (1998), cho rằng các chủng nấm được phân lập từ một quốc gia thì có sự tương đồng cao hơn so với các chủng nấm được phân lập từ các quốc gia khác.

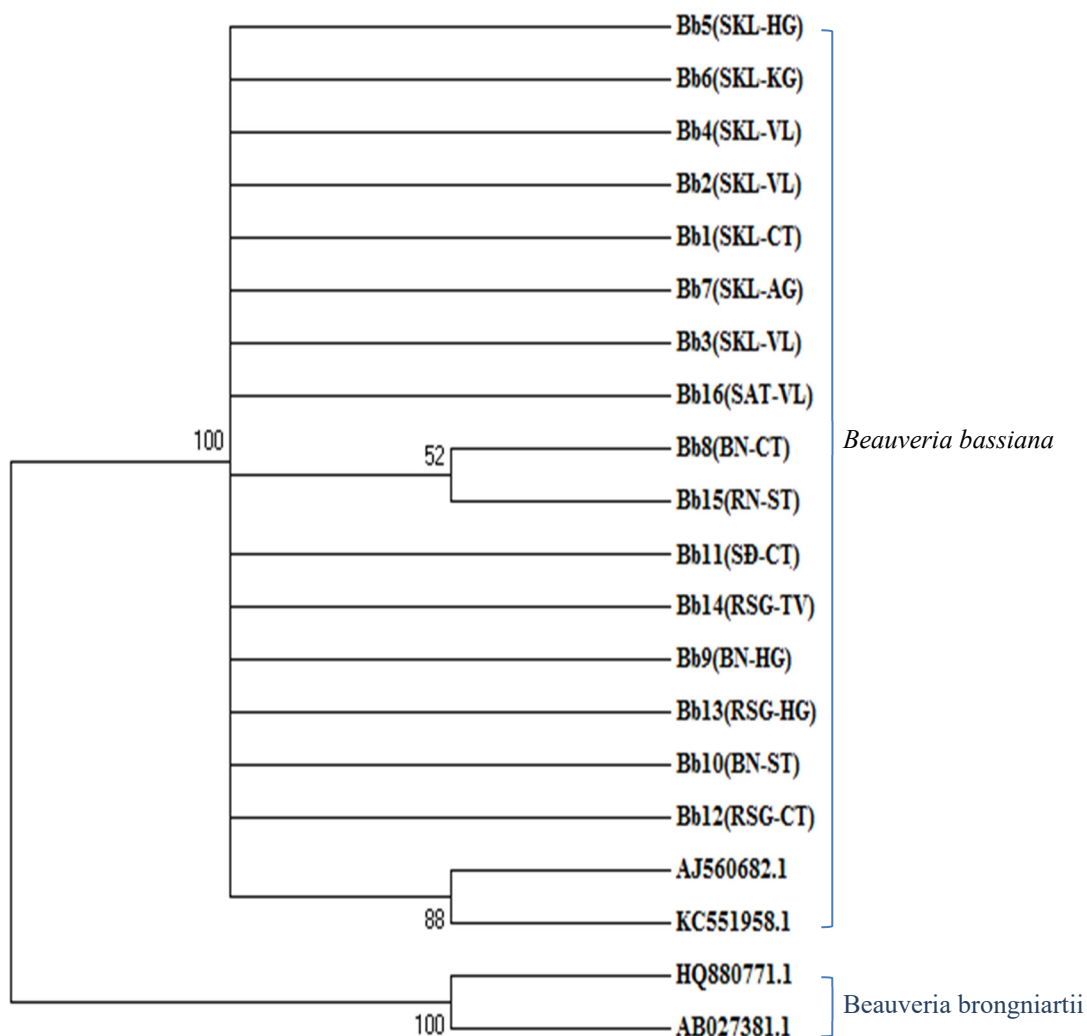
Bảng 3: Tỷ lệ tương đồng (%) về trình tự DNA trong vùng ITS - rDNA giữa 16 chủng nấm *B. bassiana* được phân lập ở bảy tỉnh thành thuộc ĐBSCL và 10 chủng nấm *B. bassiana* của một số nước trên thế giới

Seq->	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	ID																									
B	99,8	ID																								
C	99,6	99,4	ID																							
D	99,4	99,2	99,0	ID																						
E	99,4	99,6	99,0	98,8	ID																					
F	99,8	99,6	99,4	99,2	99,2	ID																				
G	100	99,8	99,6	99,4	99,4	99,8	ID																			
H	98,8	98,6	98,8	98,6	98,2	98,6	98,8	ID																		
I	99,4	99,2	99,4	98,8	98,8	99,2	99,4	99,0	ID																	
J	99,6	99,4	99,6	99,0	99,0	99,4	99,6	99,2	99,8	ID																
K	99,6	99,4	99,6	99,0	99,0	99,4	99,6	98,8	99,4	99,6	ID															
L	99,0	98,8	99,4	98,4	98,4	98,8	99,0	99,0	99,2	99,4	99,4	ID														
M	99,0	98,8	99,4	98,4	98,4	98,8	99,0	99,0	99,2	99,4	99,4	99,6	ID													
N	99,6	99,4	99,6	99,0	99,0	99,4	99,6	98,8	99,4	99,6	100	99,4	99,4	ID												
O	98,8	98,6	98,4	98,6	98,6	98,6	98,8	99,2	98,6	98,8	98,8	98,6	98,6	98,8	ID											
P	99,2	99,0	99,2	98,6	98,6	99,0	99,2	98,4	99,0	99,2	98,8	98,6	98,6	98,8	98,4	ID										
1	99,6	99,4	99,2	99,0	99,0	99,4	99,6	98,4	99,0	99,2	99,2	98,6	98,6	99,2	98,4	98,8	ID									
2	99,4	99,2	99,0	98,8	98,8	99,2	99,4	98,2	98,8	99,0	99,0	98,4	98,4	99,0	98,2	98,6	99,8	ID								
3	99,4	99,2	99,0	98,8	98,8	99,2	99,4	98,2	98,8	99,0	99,0	98,4	98,4	99,0	98,2	98,6	99,8	100	ID							
4	99,4	99,2	99,0	98,8	98,8	99,2	99,4	98,2	98,8	99,0	99,0	98,4	98,4	99,0	98,2	98,6	99,8	100	100	ID						
5	99,2	99,0	98,8	98,6	98,6	99,0	99,2	98,0	98,6	98,8	98,8	98,2	98,2	98,8	98,0	98,4	99,6	99,8	99,8	99,8	ID					
6	99,2	99,0	98,8	98,6	98,6	99,0	99,2	98,0	98,6	98,8	98,8	98,2	98,2	98,8	98,0	98,4	99,6	99,8	99,8	99,8	99,6	ID				
7	99,2	99,0	98,8	98,6	98,6	99,0	99,2	98,0	98,6	98,8	98,8	98,2	98,2	98,8	98,0	98,4	99,6	99,8	99,8	99,8	99,6	99,6	ID			
8	99,2	99,0	98,8	98,6	98,6	99,0	99,2	98,0	98,6	98,8	98,8	98,2	98,2	98,8	98,0	98,4	99,6	99,8	99,8	99,8	99,6	99,6	99,6	ID		
9	97,8	97,6	97,4	97,2	97,2	97,6	97,8	96,6	97,2	97,4	97,4	96,8	96,8	97,4	96,6	97,0	98,2	98,0	98,0	98,0	97,8	98,2	97,8	97,8	ID	
10	99,2	99,0	98,8	98,6	98,6	99,0	99,2	98,0	98,6	98,8	98,8	98,2	98,2	98,8	98,0	98,4	99,6	99,8	99,8	99,8	99,6	99,6	100	97,8	ID	

Ghi chú: Ký tự A – P ((Bb₁(SKL-CT), Bb₂(SKL-VL), Bb₃(SKL-VL), Bb₄(SKL-VL), Bb₅(SKL-HG), Bb₆(SKL-KG), Bb₇(SKL-AG), Bb₈(BN-CT), Bb₉(BN-HG), Bb₁₀(BN-ST), Bb₁₁(SD-CT), Bb₁₂(RSG-CT), Bb₁₃(RSG-HG), Bb₁₄(RSG-TV), Bb₁₅(RN-ST), Bb₁₆(SAT-VL)) là ký hiệu cho 16 chủng nấm *B. bassiana* được phân lập; ký tự 1 – 10 (AJ560682.1, EU573326.1, AF291871.1, JQ266160.1, JX406519.1, KJ489077.1, AY334543.1, HQ444271.1, KC551958.1, JQ266095.1 là ký hiệu cho 10 chủng nấm *B. bassiana* được đăng ký trên ngân hàng gene (Genbank) thế giới NCBI

Sơ đồ phân nhóm loài dựa trên cơ sở so sánh trình tự DNA của 20 mẫu *Beauveria* được trình bày ở (Hình 2) cho thấy, cây phân nhóm loài được chia thành 2 nhánh chính: nhánh 1 gồm 16 chủng nấm được phân lập cùng với hai chủng nấm AJ560682.1 (Anh) và KC551958.1 (Hàn Quốc) đã được định danh và đăng ký là loài *B. bassiana* lấy từ ngân hàng gen (Genbank); nhánh thứ 2 là hai chủng nấm HQ880771.1 (Mỹ) và AB027381.1 (Nhật Bản) được xác định là loài *B. bassiana* đã được đăng ký trên ngân hàng gen (Genbank).

Điều này cho thấy, tất cả 16 chủng nấm *Beauveria* được phân lập xếp cùng nhóm với 2 chủng nấm của thế giới được xác định là loài *B. bassiana* phân lập tại Anh và Hàn Quốc. Hơn nữa, 16 chủng nấm được phân lập có sự tách biệt với các loài *Beauveria* đã được xác định không phải là loài *B. bassiana* mà là loài *B. brongniartii*. Vì vậy, tất cả 16 chủng nấm *Beauveria* được phân lập đều thuộc loài *B. bassiana*. Kết quả nghiên cứu này phù hợp với nhận định của Võ Thị Thu Oanh (2010), cho rằng chỉ có 1 loài *B. bassiana* hiện diện phổ biến trên đồng ruộng nơi thu thập mẫu.



Hình 2: Sơ đồ phân nhóm quan hệ di truyền của 16 chủng nấm *B. bassiana*. Dựa trên tình tự của vùng ITS - rDNA. Phần trăm giá trị bootstrap từ 1.000 lần lặp lại được chỉ trên các nhánh. Các mẫu *B. brongniartii* được xem như một loài lai xa

3.2 Nghiên cứu một số đặc điểm sinh học của nấm *B. bassiana*

3.2.1 Xác định thời gian bào tử nảy mầm

Thời gian nảy mầm của các chủng nấm được thể hiện qua (Bảng 4). Trong khoảng thời gian 4 giờ sau khi cấy (GSKC), tất cả các chủng nấm thu thập được chưa có hiện tượng nảy mầm. Tại thời điểm 8 - 12 GSKC, tất cả 16 chủng nấm đều có tỷ lệ nảy mầm thấp (dưới 30%). Tuy nhiên, tỷ lệ nảy mầm của các chủng nấm ghi nhận ở thời điểm 16 -

20 GSKC khá cao, dao động từ 52,8% - 88,5%, trong đó chủng Bb₄(SKL-VL) luôn cho tỷ lệ nảy mầm cao nhất tại hai thời điểm trên (69,5% - 88,5%). Sau 24 giờ nuôi cấy các chủng nấm đều có tỷ lệ bào tử nảy mầm trên 94%. Trong đó, chủng Bb₄(SKL-VL) (99,1%) có tỷ lệ bào tử nảy mầm cao nhất nhưng không khác biệt thống kê so với các chủng nấm còn lại, ngoại trừ các chủng có tỷ lệ bào tử nảy mầm thấp nhất như là Bb₁(SKL-CT), Bb₂(SKL-VL), Bb₈(BN-CT), Bb₉(BN-HG) và Bb₁₁(SD-CT).

Bảng 4: Tỷ lệ bào tử nảy mầm của các chủng nấm *B. bassiana* qua từng thời điểm quan sát

$T = 27 \pm 2^{\circ}\text{C}$, $RH = 68 \pm 6 \%$

Chủng nấm	Tỷ lệ (%) bào tử nảy mầm qua từng thời điểm quan sát (GSKC)				
	8	12	16	20	24
Bb ₁ (SKL-CT)	4,8 bcd	22,8 a-f	60,8 bc	84,0 ab	95,0 bc
Bb ₂ (SKL-VL)	4,5 cd	20,3 c-f	52,8 f	81,5 ab	94,9 bc
Bb ₃ (SKL-VL)	5,3 bcd	18,3 d-f	53,5 df	77,3 ab	95,8 abc
Bb ₄ (SKL-VL)	9,5 a	28,5 a	69,5 a	88,5 a	99,1 a
Bb ₅ (SKL-HG)	5,3 bcd	24,5 abc	59,5 b-f	86,3 ab	96,5 abc
Bb ₆ (SKL-KG)	7,3 ab	27,3 ab	65,5 ab	87,3 ab	98,0 ab
Bb ₇ (SKL-AG)	6,3 bc	19,8 c-f	59,3 b-f	85,8 ab	96,3 abc
Bb ₈ (BN-CT)	4,3 cd	21,8 b-f	60,5 bcd	83,5 ab	95,3 bc
Bb ₉ (BN-HG)	5,3 bcd	23,5 a-e	53,8 d-f	79,3 ab	94,8 bc
Bb ₁₀ (BN-ST)	5,5 bcd	22,8 a-f	55,8 d-f	83,0 ab	95,8 abc
Bb ₁₁ (SĐ-CT)	5,8 bcd	23,8 a-d	56,0 d-f	82,5 ab	94,5 c
Bb ₁₂ (RSG-CT)	6,5 abc	23,3 a-e	54,3 d-f	81,5 ab	96,8 abc
Bb ₁₃ (RSG-HG)	6,0 bcd	24,5 abc	53,0 ef	82,0 ab	96,5 abc
Bb ₁₄ (RSG-TV)	5,5 bcd	21,3 b-f	57,5 d-f	76,5 b	97,8 abc
Bb ₁₅ (RN-ST)	4,5 cd	17,8 ef	53,0 ef	85,0 ab	97,3 abc
Bb ₁₆ (SAT-VL)	3,8 d	17,3 f	60,0 b-e	84,8 ab	95,8 abc
Mức ý nghĩa	*	*	*	*	*
CV(%)	8,25	5,37	4,91	2,88	0,72

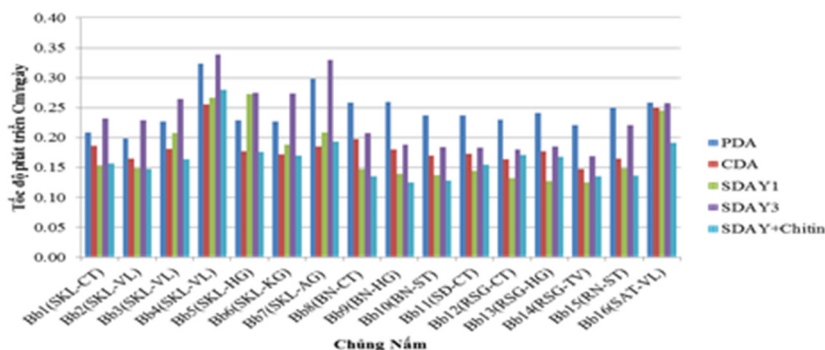
Ghi chú: Trong cùng một cột, các số trung bình có cùng chữ theo sau giống nhau thì không khác biệt nhau qua phép thử TUKEY HSD. GSKC: giờ sau khi cấy. *: Khác biệt có ý nghĩa mức 5%

Như vậy, tỷ lệ bào tử nảy mầm của 16 chủng nấm *B. bassiana* bắt đầu gia tăng sau 16 giờ nuôi cấy (đạt trên 50%) và có tỷ lệ nảy mầm cao (trên 94%) tại thời điểm 24 GSKC ở nhiệt độ $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Kết quả nghiên cứu này phù hợp với kết quả nghiên cứu của Võ Thị Thu Oanh (2010), thời gian ủ bào tử nấm *B. bassiana* nảy mầm trên 90% từ 20 - 24 GSKC.

3.2.2 Ảnh hưởng của nguồn dinh dưỡng đến sự phát triển của nấm *B. Bassiana*

Kết quả (Hình 3) cho thấy, tất cả 16 chủng nấm đều có tốc độ phát triển nhanh trên môi trường

PDA và SDAY3, trong đó hai chủng Bb4(SK-L-VL) và Bb7(SK-L-AG) có tốc độ phát triển nhanh nhất trên môi trường SDAY3 (khoảng 0,3 - 0,33 cm/ngày). Trên môi trường CDA và SDAY1, 16 chủng nấm có tốc độ phát triển khá tốt (0,13 - 0,27 cm/ngày). Ba chủng nấm Bb1(SAT-CT), Bb2(SAT-HG) và Bb3(BX-CT) có tốc độ phát triển trung bình ngang nhau trên cả năm loại môi trường (khoảng 0,15 - 0,2 cm/ngày). Trên môi trường SDAY+Chitin, các chủng thường cho tốc độ phát triển chậm hơn so với các môi trường còn lại.



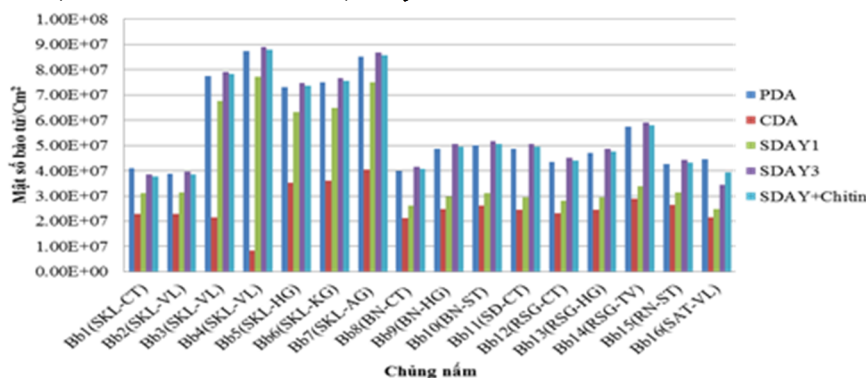
Hình 3: Tốc độ phát triển trung bình của 16 chủng nấm *B. bassiana* trên năm loại môi trường dinh dưỡng

Mật số bào tử của 16 chủng *B. bassiana* trên năm loại môi trường dinh dưỡng tại thời điểm 15 NSKC được trình bày ở (Hình 4) cho thấy, các chủng nấm đều cho mật số bào tử cao trên ba loại

môi trường PDA, SDAY₃ và SDAY+Chitin, trong đó chủng Bb₃(SKL-VL), Bb₄(SKL-VL) Bb₅(SKL-HG), Bb₆(SKL-KG) và Bb₇(SKL-AG) có mật số bào tử cao nhất (trên 7×10^7 bào tử/cm²). Trên môi

trường SDAY₁ các chủng nấm trên từ chủng Bb₃(SKL-VL) đến Bb₇(SKL-AG) đều cho mật số bào tử khá cao (trên 6×10^7 bào tử/cm²). Tuy

nhiên, tất cả 16 chủng nấm cho mật số bào tử thấp trên môi trường CDA.



Hình 4: Mật số bào tử của 16 chủng nấm *B. bassiana* trên năm loại môi trường dinh dưỡng tại thời điểm 15 ngày sau khi cấy

Tóm lại, kết quả nghiên cứu cho thấy, môi trường SDAY₃ và PDA cho tốc độ phát triển đường kính khuẩn lạc nhanh và cho mật số bào tử cao khoảng từ $4 - 10 \times 10^7$ bào tử/cm², môi trường SDAY-Chitin có tốc độ phát triển chậm hơn nhưng cho mật số bào tử cũng khá cao tương đương hai môi trường trên. Kết quả này phù hợp với kết quả nghiên cứu của Phạm Thị Thùy và *ctv.* (1995) và Võ Thị Thu Oanh (2010), nấm *B. bassiana* phát triển tốt trên môi trường Sabouraud bổ sung thêm khoáng chất và môi trường SDAY-Chitin. Theo

Nguyễn Thị Lộc (2006), PDA là môi trường sơ cấp thích hợp để nhân giống nấm *B. bassiana*.

3.2.3 Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến sự hình thành bào tử của nấm *B. bassiana*

Bảng 5 cho thấy, các chủng nấm đều cho mật số bào tử thấp vào thời điểm 7 - 10 ngày sau khi cấy. Mật số bào tử của các chủng nấm đạt cao nhất ở thời điểm 14 - 18 ngày sau khi cấy và bắt đầu có hiện tượng giảm mật số từ thời điểm 22 NSKC về sau.

Bảng 5: Mật số bào tử các chủng nấm *B. bassiana* ở các thời điểm ghi nhận chỉ tiêu

$T = 27 \pm 2^\circ\text{C}$, $RH = 72 \pm 6\%$

Chủng nấm	Mật số bào tử ($\times 10^7/\text{cm}^2$)						
	7	10	14	18	22	26	30
Bb ₁ (SKL-CT)	1,87 d	2,28 e	3,53 e	4,27 e	3,77 e	3,53 f	3,11 f
Bb ₂ (SKL-VL)	1,88 d	2,34 de	3,62 de	4,38 de	3,90 e	3,55 f	3,12 f
Bb ₃ (SKL-VL)	1,73 d	2,23 de	3,42 e	4,18 e	3,72 e	3,46 f	3,04 f
Bb ₄ (SKL-VL)	3,81 a	5,73 a	8,56 a	11,5 a	12,0 a	9,95 a	8,76 a
Bb ₅ (SKL-HG)	3,11 abc	4,68 abc	7,14 abc	8,71 abc	7,68 bc	6,99 abcd	6,18 abdc
Bb ₆ (SKL-KG)	3,19 abc	4,80 abc	7,33 ab	8,94 abc	7,95 abc	7,23 abc	6,40 abc
Bb ₇ (SKL-AG)	3,63 ab	5,48 ab	8,35 a	10,2 ab	9,14 ab	8,10 ab	7,16 ab
Bb ₈ (BN-CT)	1,71 d	2,52 de	3,83 de	4,68 de	4,11 de	3,74 ef	3,33 ef
Bb ₉ (BN-HG)	2,05 cd	3,06 cd	4,71 cde	5,75 cde	5,12 cde	4,71 cdef	4,18 cdef
Bb ₁₀ (BN-ST)	2,19 cd	3,29 cd	4,83 cde	5,93 cde	5,21 cde	4,75 cdef	4,21 cdef
Bb ₁₁ (SĐ-CT)	2,03 cd	3,07 cd	4,71 cde	5,77 cde	5,16 cde	4,70 def	4,17 def
Bb ₁₂ (RSG-CT)	1,89 d	2,68 de	4,17 de	5,10 de	4,48 de	4,12 ef	3,65 ef
Bb ₁₃ (RSG-HG)	2,04 cd	2,89 de	4,53 de	5,52 de	4,86 de	4,42 ef	3,92 ef
Bb ₁₄ (RSG-TV)	2,46 abcd	3,55 bcd	5,58 abcd	6,83 abcd	6,15bcd	5,59 bcde	4,95 bcde
Bb ₁₅ (RN-ST)	2,23 bcd	2,72 de	4,09 de	4,95 de	4,36 de	4,02 ef	3,57 ef
Bb ₁₆ (SAT-VL)	1,74 d	2,07 e	3,11 e	3,95 e	3,48 e	3,35 f	2,98 f
Mức ý nghĩa	*	*	*	*	*	*	*
CV(%)	1,05	1,03	1,01	1,00	0,92	0,92	0,93

Ghi chú: Trong cùng một cột, các số trung bình có cùng chữ theo sau giống nhau thì không khác biệt nhau qua phép thử TUKEY HSD. *: Khác biệt có ý nghĩa mức 5%

Tại thời điểm 14 - 18 NSKC, mật số bào tử của các chủng nấm đạt cao nhất. Trong đó, hai chủng Bb₄(SKL-VL) ($8,56 \times 10^7/\text{cm}^2 - 11,5 \times 10^7/\text{cm}^2$) và Bb₇(SKL-AG) ($8,35 \times 10^7/\text{cm}^2 - 10,2 \times 10^7/\text{cm}^2$) luôn đạt cao nhất và khác biệt trong thống kê ở mức ý nghĩa 5% so với mười một chủng còn lại, nhưng không khác biệt có ý nghĩa thống kê so với ba chủng Bb₅(SKL-HG), Bb₆(SKL-KG) và Bb₁₄(RSG-TV). Thời điểm 22 - 30 NSKC, khả năng sinh bào tử các chủng nấm bắt đầu giảm dần, ngoại trừ chủng Bb₄(SKL-VL) vẫn tăng số lượng bào tử nhưng tốc độ tăng không cao và là chủng có mật số bào tử cao nhất ($12,0 \times 10^7/\text{cm}^2$). Điều này có thể giải thích là do nguồn dinh dưỡng trong môi trường nuôi cấy không còn đủ để cung cấp cho nấm phát triển nên mật số bào tử giảm dần.

Bảng 6: Độ hữu hiệu của các chủng nấm *B. bassiana* đối với thành trùng sùng khoai lang (SKL) trong điều kiện PTN NEDO Bộ môn Bảo vệ Thực vật, Trường Đại học Cần Thơ

$T = 29 \pm 2^\circ\text{C}$, $RH = 72 \pm 4 \%$

Chủng nấm	Độ hữu hiệu (%) ở các ngày sau khi chủng				
	3	5	7	9	11
Bb ₁ (SKL-CT)	6,04	18,21 b	63,71 b-e	89,96 ab	96,83
Bb ₂ (SKL-VL)	6,08	18,17 b	64,63 b-e	88,96 ab	94,65
Bb ₃ (SKL-VL)	5,00	13,13 b	68,67 a-e	87,92 ab	93,57
Bb ₄ (SKL-VL)	10,08	41,50 a	81,83 a	94,96 a	99,00
Bb ₅ (SKL-HG)	7,08	16,17 b	68,67 a-e	91,92 ab	96,87
Bb ₆ (SKL-KG)	7,04	14,08 b	66,67 a-e	92,96 ab	97,87
Bb ₇ (SKL-AG)	6,08	24,21 ab	64,71 b-e	89,96 ab	95,91
Bb ₈ (BN-CT)	8,00	22,21 ab	72,75 a-d	89,96 ab	98,91
Bb ₉ (BN-HG)	6,00	14,08 b	62,50 b-e	85,83 ab	90,39
Bb ₁₀ (BN-ST)	6,08	14,17 b	57,58 cde	82,88 b	91,52
Bb ₁₁ (SĐ-CT)	4,00	12,08 b	55,50 e	80,79 b	91,52
Bb ₁₂ (RSG-CT)	5,04	13,13 b	54,54 de	81,83 b	92,66
Bb ₁₃ (RSG-HG)	5,00	13,08 b	57,50 cde	81,79 b	91,61
Bb ₁₄ (RSG-TV)	5,04	13,13 b	53,54 e	81,83 b	92,66
Bb ₁₅ (RN-ST)	6,04	28,29 ab	76,75 ab	92,96 ab	97,87
Bb ₁₆ (SAT-VL)	3,04	12,13 b	73,67 abc	90,92 ab	95,78
Mức ý nghĩa	ns	*	*	*	ns
CV(%)	36,8	19,4	7,6	6,3	5,5

Ghi chú: ns: không khác biệt thống kê ở mức ý nghĩa 5% qua phép thử TUKEY HSD

*: khác biệt thống kê ở mức ý nghĩa 5% qua phép thử TUKEY HSD

Thời điểm 7 ngày sau khi chủng, đa số các chủng nấm đều cho kết quả diệt SKL khá cao trên 50%. Hai chủng Bb₁₁(SĐ-CT) và Bb₁₄(RSG-TV) cho hiệu quả diệt SKL thấp nhất, lần lượt là 53,54% và 55,50%, khác biệt thống kê so với các chủng Bb₄(SKL-VL), Bb₈(BN-CT), Bb₁₅(RN-ST) và Bb₁₆(SAT-VL), nhưng không khác biệt thống kê so với các chủng còn lại. Tại thời điểm 9 - 11 NSKC, 16 chủng nấm đều cho hiệu lực diệt sùng khá cao từ 80 - 99% và thường không khác biệt về mặt thống kê ở mức ý nghĩa 5%. Đặc biệt là hai chủng Bb₄(SKL-VL) và Bb₈(BN-CT) cho hiệu quả diệt sùng đến 99%.

Khoảng thời điểm từ 26 - 30 ngày sau khi cấy, bốn chủng nấm Bb₄(SKL-VL), Bb₅(SKL-HG), Bb₆(SKL-KG) và Bb₇(SKL-AG) vẫn cho số lượng bào tử cao nhất, đồng thời số lượng bào tử giữa hai nghiệm thức này không khác biệt trong thống kê. Như vậy, thời gian để các chủng nấm cho mật số bào tử cao nhất trên môi trường dinh dưỡng SDAY₃ ở nhiệt độ $27 \pm 2^\circ\text{C}$ và ẩm độ $72 \pm 6\%$ là từ 14 - 18 ngày sau khi cấy. Kết quả thí nghiệm này phù hợp với nghiên cứu của Phạm Thị Thùy và ctv. (1995), Kamp và Bidochka (2002), Võ Thị Thu Oanh (2010).

3.3 Bước đầu đánh giá hiệu lực của nấm *B. bassiana* trừ sùng hại khoai lang (*Cylas formicarius* Fabricius) trong điều kiện phòng thí nghiệm (PTN)

4 KẾT LUẬN

Đã thu thập được 16 chủng nấm *Beauveria* ký sinh, gây bệnh trên nhiều loại côn trùng gây hại cây trồng tại 7 tỉnh thành ở ĐBSCL như Cần Thơ, Vĩnh Long, Hậu Giang, An Giang, Kiên Giang, Sóc Trăng và Trà Vinh. Kết quả quan sát, phân loại dựa trên đặc điểm hình thái và kỹ thuật sinh học phân tử (kỹ thuật PCR) kết hợp giải trình tự DNA trên vùng ITS - rDNA cho thấy, cả 16 chủng nấm đều là nấm trắng thuộc giống *Beauveria* loài *bassiana*. Tất cả 16 chủng nấm *B. bassiana* có tỷ lệ nảy mầm cao trên 94% sau 24 giờ nuôi cấy và cho mật số

bào tử cao khi nuôi cấy trên môi trường SDAY₃ ở thời điểm 14 – 18 NSKC. Tất cả 16 chủng nấm có hiệu quả cao đối với sùng khoai lang từ 53 - 99% ở thời điểm từ 7 đến 11 ngày.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Barnett, H. L., and Barry B. H. (1972). Illustrated genera of imperfect fungi. Burgess Publishing company. Minneapolis Minnesota. 250pp.
- De Hoog, G. S. (1972). The genera *Beauveria*, *Isaria*, *Tritirachium*, and *Acrodonium* gen. nov. Centralbureau voor Schimmelcultures, Baarn. *Studies in Mycology* 1:1-41.
- Glare, T. R. and Inwood A. J. (1998). Morphological characterization of *Beauveria bassiana* From New Zealand. *Mycological Research* 102: 250-256.
- Kamp, A. M., and Bidochka M. J. (2002). Conidium production by insect pathogenic fungi on commercially available agars. *Letters in Applied Microbiology* 35: 4-77.
- Lawrence, L. (1994). Manual of techniques in insect pathology. Chapter 3: Fungi: Hyphomycetes. Marks. G., and Douglas I. *Biological Techniques series*: 335-341.
- Luangsa-Ard, J. J., Kanoksri T., Suchada M., Somsak S. and Nigel, H. J. (2006). Workshop on the Collection Isolation, cultivation and Identification of Insect-Pathogenic Fungi. BIOTEC Thailand and VAST Ho Chi Minh City, Vietnam: 1-13.
- Nguyen Thi Loc (1995). Exploitation of *Beauveria bassiana* as a potential biocontrol agent against leaf-and planthopper in rice. Thesis Doctor of Phylosophy. 140pp.
- Nguyễn Thị Lộc (2006). Nghiên cứu phát triển và ứng dụng chế phẩm sinh học trừ sâu hại cây trồng ở Đồng bằng sông Cửu Long. Kỷ yếu hội nghị khoa học và công nghệ vùng ĐBSCL lần thứ 19, trang 22-28.
- Phạm Thị Thùy (2004). Công nghệ sinh học trong bảo vệ thực vật. Nhà xuất bản Đại học Quốc gia Hà Nội. 335 trang.
- Phạm Thị Thùy, Nguyễn Thị Bắc, Đồng Thanh, Trần Thanh Thập, Hoàng Công Điền và Nguyễn Đậu Toàn (1995). Nghiên cứu công nghệ sản xuất và ứng dụng chế phẩm nấm *Beauveria* và *Metarhizium* để phòng trừ một số sâu hại cây trồng. Tuyển tập công trình nghiên cứu bảo vệ thực vật. Viện Bảo vệ Thực vật, trang 189-200.
- Saitoh, K., Togashi K., Arie T., Teraoka T. (2006). A simple method for a mini-preparation of fungal DNA. *Journal of General Plant Pathology* 72(6): 348-350.
- Võ Thị Thu Oanh (2010). Nghiên cứu các đặc tính sinh học và đánh giá độc tính của các mẫu phân lập nấm *Beauveria* và *Metarhizium* ký sinh trên trùng gây hại. Luận án tiến sĩ Nông nghiệp. Trường Đại học Nông Lâm. Thành phố Hồ Chí Minh.