

Nghiên cứu thu nhận bào tử *Paecilomyces* spp. có khả năng diệt sâu khoang (*Spodoptera litura*) phân lập từ đất trồng trọt

- Nguyễn Quốc Linh
- Nguyễn Như Nhứt

Chi nhánh Công ty TNHH Gia Tường tỉnh Bình Dương

(Bài nhận ngày 12 tháng 12 năm 2016, nhận đăng ngày 30 tháng 11 năm 2017)

TÓM TẮT

Paecilomyces được biết đến như một tác nhân kiểm soát côn trùng và sâu hại cây trồng. Tuy nhiên, ở Việt Nam, *Paecilomyces* vẫn chưa được nghiên cứu ứng dụng rộng rãi. Trong nghiên cứu này, các chủng *Paecilomyces* được phân lập từ các loại đất trồng khác nhau và được nhận dạng dựa trên hình thái và giải trình tự gene 28S rDNA. Sau khi định danh, các chủng *Paecilomyces* được xác định hoạt lực sinh học *in vitro* trên sâu khoang (*Spodoptera litura*). Các chủng có hoạt lực sinh học cao được sử dụng để nghiên cứu thu nhận bào tử bằng phương pháp nuôi cấy bán rắn. Kết quả từ 33 mẫu đất đã phân lập được 5 chủng *Paecilomyces* (chủng F01 thuộc *P.*

javanicus, chủng F02 thuộc *Paecilomyces* sp., chủng F03 thuộc *P. lilacinum* và 2 chủng F04 và F05 thuộc *P. lilacinus*). Trong đó, 2 chủng F03 và F04 cho hoạt lực cao trong việc diệt sâu khoang sau 10 ngày gây nhiễm. Thử nghiệm nuôi cấy tăng sinh bán rắn hai chủng F03 và F04 cho thấy chúng tạo nhiều bào tử trên môi trường có thành phần chính là gạo lức, cám mì và trấu với độ ẩm là 55%. Kết quả nghiên cứu cho thấy các chủng *Paecilomyces* bản địa có tiềm năng ứng dụng để tạo sản phẩm sinh học kiểm soát côn trùng dựa trên những nguồn cơ chất rẻ tiền và sẵn có trong nước.

Từ khóa: gạo lức, hoạt lực diệt sâu, kiểm soát côn trùng, *Paecilomyces*, sản xuất bào tử, sâu khoang

MỞ ĐẦU

Nấm *Paecilomyces* là nhóm nấm ký sinh côn trùng có phổ ký chủ rộng và hiện diện phổ biến trong tự nhiên cả ở vùng nhiệt đới và ôn đới. Các loài *Paecilomyces* dễ dàng được tìm thấy ở đất tơi xốp, xác bã hữu cơ, thức ăn, tàn dư thực vật và trong các sản phẩm thực phẩm. *P. lilacinus* hiện diện phổ biến ở các nông trại ở Sarawak bao gồm cả những nông trại có sử dụng thuốc diệt nấm. *P. variotii* được tìm thấy cả trong không khí và thực phẩm. Loài *P. farinosus* phân bố rộng rãi ở nhiều vùng trên thế giới và đã được phân lập từ một số côn trùng thuộc bộ Cánh vẩy (Lepidoptera) và bộ Cánh giồng (Isoptera). Loài *P. carneus* được tìm thấy rộng rãi ở Quebec, Alberta, Anh, Columbia và đã được phân lập từ đất và phần mục nát của cây linh sam [14].

Ngoài ra, các loài *Paecilomyces* khác như *P. amoeneroseus*, *P. breviramisus*, *P. cateniannulatus*, *P. cateniobliquus*, *P. cicadae*, *P. fumosoroseus*... cũng đã được báo cáo là được tìm thấy ở các vùng có khí hậu ôn đới và nhiệt đới và ở ký sinh gây bệnh cho các côn trùng thuộc bộ Cánh cứng (Coleoptera) và bộ Cánh vẩy.

Các loài nấm *Paecilomyces* sp. có khả năng gây bệnh cho các loài côn trùng thuộc bộ Cánh vẩy, sâu đo (*Trichoplusia ni*), sâu xanh (*Spodoptera frugiperda*) và sâu khoang (*S. litura*). Ngoài ra, theo báo cáo của nhiều tác giả vẫn còn nhiều loài *Paecilomyces* sp. có khả năng gây bệnh hiệu quả trên các loài côn trùng khác nhau như loài *P. farinosus* gây bệnh trên các loài côn trùng thuộc bộ Cánh giồng, muỗi *Culex pipiens* (Abdusalom *et al.*, 2010);

P. tenuipes gây nhiễm cho ấu trùng *Plutella xylostella* [1, 15].

Nấm *Paecilomyces* có thể xâm nhiễm vật chủ trực tiếp thông qua lớp biểu bì hoặc qua đường thức ăn và sau đó giết chết côn trùng. Do đó, *Paecilomyces* đã được các nước trên thế giới sử dụng làm tác nhân kiểm soát dịch hại thay cho các loại thuốc bảo vệ thực vật hóa học. Ngoài ra, khi hiện diện trong đất, *Paecilomyces* cũng có thể xâm nhiễm vào tuyến trùng gây hại như *Meloidogyne incognita*, *M. arenaria* và *M. javanica* [12]. Tại Việt Nam, các sản phẩm ứng dụng *Paecilomyces* trong việc kiểm soát, tiêu diệt côn trùng và sâu hại cây trồng vẫn chưa phổ biến và các nghiên cứu chủ yếu chỉ tập trung vào ứng dụng của các loài như *Paecilomyces lilacinus*, *P. tenuipes*. Do đó, trong nghiên cứu này, chúng tôi đã tiến hành phân lập thu nhận *Paecilomyces* có trong đất trồng một số loại cây khác nhau và bước đầu nghiên cứu tạo chế phẩm sinh học ứng dụng trong kiểm soát côn trùng.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Địa điểm và thời gian thu mẫu

Mẫu được thu thập gồm các mẫu đất ngoài tự nhiên nơi có mức độ thâm canh cao của các loại thực vật. Sau khi gạt bỏ lớp đất mặt khoảng 2–3 cm lấy lớp đất phía dưới tùy loại cây trồng canh tác mà độ sâu lấy mẫu khác nhau: đất trồng rau (0–20 cm), cây lấy củ (0–40 cm) và cây ăn quả lâu năm (20–70 cm).

$$M(\%) = \frac{C - T}{C} \times 100$$

Phương pháp nuôi cấy bán rắn thu nhận bào tử *Paecilomyces* sp.

Cấy 1 mL huyền phù bào tử (10^7 bào tử/mL) của *Paecilomyces* sp. vào bình tam giác chứa 50 g môi trường. Sau đó, ủ ở nhiệt độ 28 °C trong 7 ngày. Xác định mật độ bào tử trong canh trường bằng phương pháp đếm trực tiếp bào tử trên buồng đếm hồng cầu [2].

Các mẫu đất được thu thập ở các tỉnh Bình Định, Bình Thuận, Khánh Hòa, Lâm Đồng, Đồng Nai, Bình Dương, Tây Ninh, Trà Vinh và Tiền Giang. Thời gian thu mẫu từ tháng 7 đến cuối tháng 8 năm 2013.

Phân lập và định danh

Paecilomyces được phân lập trên môi trường SDA+ (Sabouraud Dextrose Agar bổ sung kháng sinh) và môi trường CTC (Potato dextrose agar có bổ sung cao nấm men 1 g, Chloramphenicol 0,5 g, Thiabendazole 0,001 g, Cycloheximide 0,25 g trong 1 lít, pH 6,9). Ủ ở nhiệt độ 25 °C khoảng 7 ngày [5, 8]. Việc phân loại và định danh mẫu được thực hiện bằng phương pháp hình thái học dựa trên các đặc điểm về màu sắc khuẩn lạc, hình dạng bào tử và cơ quan phát sinh bào tử... [3] và phương pháp giải trình tự gene 28S rDNA của Hassouna *et al.* (1984) [7].

Xác định hoạt lực sinh học *in vitro* của các chủng *Paecilomyces* sp. trên sâu khoang (*Spodoptera litura*)

Các chủng *Paecilomyces* phân lập được sẽ được thử nghiệm hoạt lực trên sâu khoang. Thí nghiệm được thực hiện bằng cách phun huyền phù bào tử các chủng nấm *Paecilomyces* có mật độ 10^8 bào tử/mL lên thức ăn của sâu. Ghi nhận số sâu chết hàng ngày của mẫu thí nghiệm và mẫu đối chứng chỉ phun nước cất vô trùng. Hoạt lực diệt sâu được tính theo công thức Abbott [15].

M (%): tỷ lệ sâu chết.

C: số sâu sống ở nghiệm thức đối chứng.

T: số sâu sống ở nghiệm thức có xử lý nấm.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Phân lập *Paecilomyces*

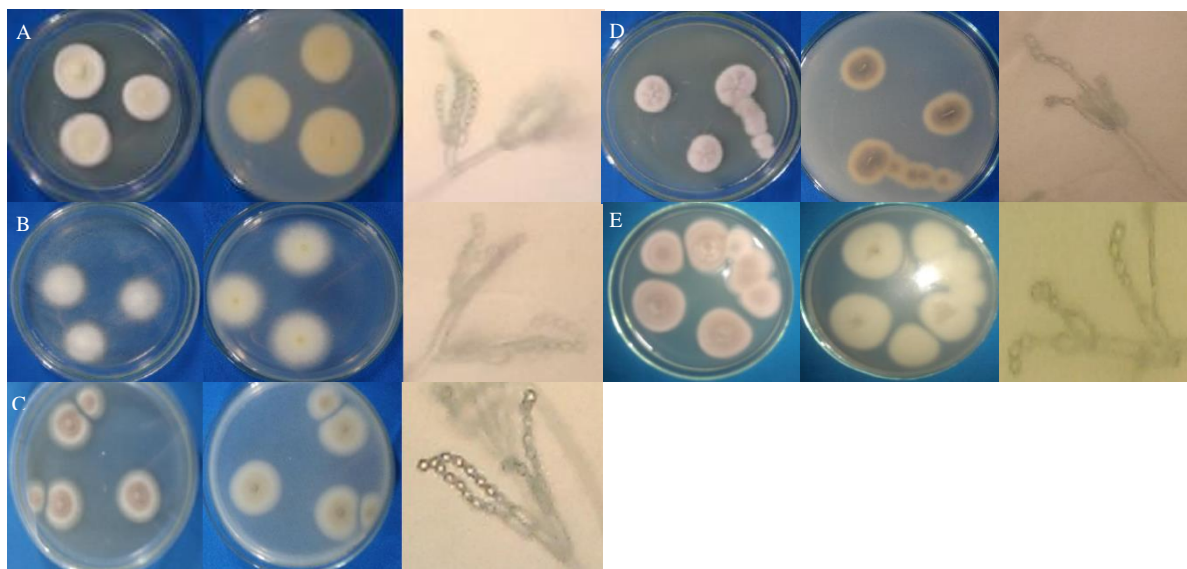
Từ 33 mẫu đất thu được (Bảng 1), sau khi phân lập và tiến hành quan sát các đặc điểm hình thái học như hình dạng, màu sắc của khuẩn lạc, hình dạng bào tử và cơ quan phát sinh bào tử đã thu được 5 chủng nấm có đặc điểm tương tự với *Paecilomyces* theo tài liệu khóa phân loại của Samson *et al.* (1974) [14]. Kết quả được ghi nhận trong Bảng 2.

Bảng 1. Các mẫu đất sử dụng để phân lập *Paecilomyces*

Stt	Ký hiệu	Nơi lấy mẫu	Loại cây trồng
1	MP01	Phước An–Tuy Phước–Bình Định	Bắp
2	MP02	Phước An–Tuy Phước–Bình Định	Khoai mì
3	MP03	Phước An–Tuy Phước–Bình Định	Khoai mì
4	MP04	Phước An–Tuy Phước–Bình Định	Bắp
5	MP05	Phước An–Tuy Phước–Bình Định	Khoai mì
6	MP06	Suối Tiên–Cam Ranh–Khánh Hòa	Dưa leo
7	MP07	Suối Tiên–Cam Ranh–Khánh Hòa	Xà lách
8	MP08	Phường 8–Đà Lạt–Lâm Đồng	Hoa đồng tiền
9	MP09	Xuân Thọ–Đà Lạt–Lâm Đồng	Cà phê
10	MP10	Xuân Thọ–Đà Lạt–Lâm Đồng	Rau cải
11	MP11	Phú Long–Thuận Bắc–Bình Thuận	Thanh long
12	MP12	Trà Tân–Đức Linh–Bình Thuận	Khoai mì
13	MP13	Đông Hà–Đức Linh–Bình Thuận	Khoai môn
14	MP14	Đông Hà–Đức Lin –Bình Thuận	Lúa
15	MP15	Đông Hà–Đức Linh–Bình Thuận	Lúa
16	MP16	Trà Tân–Đức Linh–Bình Thuận	Khoai mì
17	MP17	Trà Tân–Đức Linh–Bình Thuận	Tiêu
18	MP18	Đông Hà–Đức Linh–Bình Thuận	Khoai môn
19	MP19	Trà Tân–Đức Linh–Bình Thuận	Khoai mì
20	MP20	Trà Tân–Đức Linh–Bình Thuận	Lúa
21	MP21	Tân Phú–Đồng Nai	Bắp
22	MP22	Phước Ninh–Dương Minh Châu–Tây Ninh	Hoàn ngọc
23	MP23	Phước Ninh–Dương Minh Châu–Tây Ninh	Mía
24	MP24	Chà Là–Dương Minh Châu–Tây Ninh	Cao su
25	MP25	Thanh An–Dầu Tiếng–Bình Dương	Khoai mì
26	MP25	An Thái Đông–Cái Bè–Tiền Giang	Cóc
27	MP27	An Thái Đông–Cái Bè–Tiền Giang	Sầu riêng
28	MP28	An Thái Đông–Cái Bè–Tiền Giang	Dừa
29	MP29	An Thái Đông–Cái Bè–Tiền Giang	Mận
30	MP30	An Thái Đông–Cái Bè–Tiền Giang	Mít
31	MP31	Tam Bình–Vĩnh Long–Trà Vinh	Khoai mì
32	MP32	Tam Bình–Vĩnh Long–Trà Vinh	Lúa
33	MP33	Tam Bình–Vĩnh Long–Trà Vinh	Khoai mì

Bảng 2. Đặc điểm khuẩn lạc và đặc điểm vi thể của các chủng nấm phân lập được trên môi trường PGA

Chủng nấm	Nguồn mẫu phân lập	Đặc điểm
F01	MP21	Khuẩn lạc ban đầu có màu trắng tuyết. Sau đó, ở tâm bắt đầu xuất hiện vòng tròn nhỏ có màu vàng nhạt khi hình thành bào tử, mặt dưới khuẩn lạc có màu vàng nhạt. Sợi nấm ngắn, mịn và xốp như bông. Mép khuẩn lạc dày, khuẩn lạc nhô cao khoảng 0,3mm. Sợi nấm mảnh, trong suốt, giá bào tử trần dài, trong suốt có các thể bình dài. Bào tử trần trong suốt, có hình tròn đến elip, nổi thành chuỗi dài.
F02	MP22	Khuẩn lạc có màu trắng tuyết, ở tâm khuẩn lạc bắt đầu chuyển thành màu vàng nhạt khi hình thành bào tử. Mặt dưới khuẩn lạc có màu trắng. Khuẩn lạc dạng hình tròn nằm sát mặt thạch, mép khuẩn lạc mỏng. Sợi nấm mịn, nhỏ nằm rời rạc nhau chồng lên nhau. Khuẩn lạc đạt đường kính 20 mm sau 7 ngày nuôi cấy. Sợi nấm mảnh và trong suốt. Giá bào tử trần trong suốt, hình thành các thể bình có cổ hẹp. Bào tử trần trong suốt, có hình elip xếp thành chuỗi.
F03	MP24	Khuẩn lạc ban đầu có màu trắng sau chuyển thành màu hồng cánh sen từ trong tâm ra mép. Khuẩn lạc có dạng hình tròn, mép đều, dày có màu trắng. Tâm khuẩn lạc nhô cao khoảng 0,2 mm. Sợi nấm mịn, ngắn và xốp. Mặt dưới khuẩn lạc có màu vàng nhạt, về sau xuất hiện viền màu trắng khi hình thành bào tử. Khuẩn lạc đạt đường kính khoảng 33 mm sau 7 ngày nuôi cấy. Sợi nấm mảnh và trong suốt. Giá bào tử trần trong suốt, dài và mang các thể bình. Thể bình có hình bình, dài và hẹp ở cổ. Bào tử trần trong suốt, có hình elip và xếp thành chuỗi dài.
F04	MP33	Khuẩn lạc phát triển đạt đường kính khoảng 35 mm sau 7 ngày nuôi cấy. Khuẩn lạc ban đầu có màu hồng, mép khuẩn lạc đều nhưng không tròn, không nhìn rõ viền. Về sau khuẩn lạc dần tròn, vẫn giữ nguyên màu hồng khi tạo bào tử, xuất hiện các đường thẳng từ tâm, viền khuẩn lạc bắt đầu dày. Sợi nấm ngắn và mịn, có xu hướng bám chặt vào nhau. Mặt dưới khuẩn lạc ban đầu màu trắng, sau chuyển dần sang màu đen từ tâm đi ra. Sợi nấm mảnh, trong suốt; giá bào tử trần trong suốt mang các thể bình có cổ hẹp và dài. Bào tử trần có hình elip, trong suốt, xếp thành chuỗi dài.
F05	MP33	Khuẩn lạc màu trắng sau đó chuyển dần sang màu hồng phần từ tâm khuẩn lạc ra và hoàn toàn thành màu hồng khi hình thành bào tử. Khuẩn lạc tròn, dẹt, sợi nấm mịn. Mặt dưới khuẩn lạc có màu trắng. Đường kính khuẩn lạc đạt khoảng 30 mm sau 7 ngày nuôi cấy. Dưới kính hiển vi quang học (X40), sợi nấm mảnh, trong suốt; giá bào tử trần trong suốt mang các thể bình có hình trứng đến elip và xếp thành chuỗi dài. Bào tử hình tròn đến elip, trong suốt, xếp thành chuỗi.



Hình 1. Đặc điểm khuẩn lạc mặt trên (trái), mặt dưới (giữa) và cấu trúc cơ quan sinh bào tử (phải) của các chủng F01(A), chủng F02 (B), chủng F03 (C), chủng F04 (D) và chủng F05 (E).

Bảng 3. Kết quả định danh các chủng nấm *Paecilomyces* sp. phân lập được dựa trên trình tự gene 28S rDNA

Chủng nấm	Tên loài	Mức độ tương đồng
F01	<i>Paecilomyces javanicus</i>	100 %
F02	<i>Paecilomyces</i> sp.	99 %
F03	<i>Paecilomyces lilacinum</i>	100 %
F04	<i>Paecilomyces lilacinus</i>	99 %
F05	<i>Paecilomyces lilacinus</i>	99 %

Kết quả định danh đến loài bằng phương pháp giải trình tự gene 28S rDNA được thể hiện trong Bảng 3. Kết quả thu được cho thấy có 2 chủng thuộc loài *Paecilomyces lilacinus* (F04 và F05), 1 chủng thuộc loài *Paecilomyces javanicus* (F01), 1 chủng thuộc loài *Paecilomyces lilacinum* (F03) và 1 chủng *Paecilomyces* sp. (F02). Các nghiên cứu trước đây cho thấy, *Paecilomyces* hiện diện trên nhiều loại đất trồng các loại cây trồng khác nhau như *P. lilacinus* hiện diện trong đất trồng cà chua, đậu bắp, đậu xanh và đậu đen [17]. *Paecilomyces* hiện diện trong đất trồng cây dưa chuột và ớt [3, 11]. Trong nghiên cứu này cho thấy, *Paecilomyces* còn hiện diện trên đất trồng cây bắp (F01), hoàn ngọc (F02), cao su (F03) và khoai mì (F04 và F05).

Hoạt lực sinh học in vitro của các chủng *Paecilomyces*

Các số liệu thu được cho thấy hoạt lực diệt sâu khoang của 5 chủng phân lập được khác nhau (bảng 4). Hầu hết hoạt lực diệt sâu của các chủng nấm đều tăng dần theo thời gian từ 4 đến 8 ngày sau gây nhiễm và đạt cao nhất ở 10 ngày sau gây nhiễm. Nhìn chung, hoạt lực thấp trong việc diệt sâu khoang của các chủng nghiên cứu ở thời điểm 4, 6 và 8 ngày sau gây nhiễm và không có khác biệt về mật thống kê giữa các chủng. Chỉ có 2 chủng F03 và F04 là hoạt lực tiếp tục tăng cao ở 10 ngày sau gây nhiễm. Hoạt lực của 2 chủng này lần lượt là 42,00 % và 64,29 % và có sự khác biệt về mật thống kê so với các chủng còn lại.

Bảng 4. Hoạt lực diệt sâu của các chủng nấm *Paecilomyces* đối với sâu khoang (*Spodoptera litura*)

Chủng nấm	Hoạt lực diệt sâu (%)			
	4 SGN	6 SGN	8 SGN	10 SGN
F01	4,00 ^{ef}	14,00 ^{df}	22,00 ^{be}	22,00 ^{be}
F02	4,50 ^{ef}	13,00 ^{df}	14,86 ^{df}	14,86 ^{df}
F03	0,00 ^f	10,00 ^{ef}	32,00 ^{bd}	42,00 ^a
F04	10,00 ^{ef}	16,00 ^{df}	38,29 ^{bc}	64,29 ^a
F05	0,00 ^f	15,00 ^{df}	22,11 ^{be}	22,11 ^{be}

Trong cùng một cột và dòng, các số có cùng chữ cái theo sau giống nhau thì không khác biệt ở mức ý nghĩa 5 % (Nhiệt độ = 26,9–29,8 °C, Độ ẩm = 62,8–81,6 %, SGN: sau gây nhiễm)

Kết quả nghiên cứu của Hu *et al.* (2007) báo cáo rằng *P. javanicus* với mật độ $4,75 \times 10^7$ bào tử/mL gây tỷ lệ chết cho sâu khoang là 50 % với thời gian gây nhiễm là 7 ngày [9]. Theo báo cáo của Lê Hữu Phước (2009) thì hoạt lực diệt sâu khoang của hai chủng *Paecilomyces* P3–TG và *Paecilomyces* P2–AG đạt cao nhất ở 10 ngày sau gây nhiễm là 69,2 đến 69,5 % [15]. Điều này cho thấy, tùy theo chủng *Paecilomyces* mà thời gian đạt hoạt lực diệt sâu cao nhất khác nhau. Kết quả nghiên cứu cho thấy, hai chủng F03 và F04 có thời gian để đạt hoạt lực diệt sâu cao nhất lâu hơn chủng *P. javanicus* của Hu và cộng sự nhưng tương đương với hai chủng *Paecilomyces* của Lê Hữu Phước.

Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy lên sự tạo bào tử của các chủng nấm *Paecilomyces*

Sau khi nuôi cấy riêng lẻ 2 chủng nấm F03 và F04 trên 8 loại môi trường bán rắn khác nhau ở độ ẩm 55 %, kết quả cho thấy khi được nuôi cấy trên các môi trường khác nhau thì mật độ bào tử của hai chủng không giống nhau. Trên các môi trường MT1, MT2, MT4, MT5, MT6, MT7 và MT8 (Bảng 5), chủng F03 cho mật độ bào tử thấp và không có khác biệt về mật độ thống kê (Bảng 6). Trong đó, thấp nhất là môi trường MT2 (với cơ chất duy nhất là lúa). Điều này có thể là do môi trường MT2 không cung cấp đầy đủ nguồn dinh dưỡng cho sự phát triển của chủng F03. Trong khi đó, chủng F04 khi được nuôi cấy trên các môi trường thử nghiệm đều đạt mật độ bào tử cao hơn chủng F03 và đạt cao nhất khi nuôi cấy trên môi

trường MT1 (với cơ chất là gạo lức) và có sự khác biệt về mật độ thống kê với các môi trường còn lại. Ngoài ra, đa số những môi trường có chứa cơ chất chính là gạo lức cho mật độ bào tử chủng F03 và F04 cao hơn so với cơ chất chính là lúa. Điển hình là môi trường MT3 (gồm gạo lức, cám mì và trấu) cho mật độ bào tử chủng F03 cao nhất ($9,67 \times 10^8$ bào tử/g) và có sự khác biệt về mật độ thống kê so với các môi trường còn lại. Mật độ bào tử của chủng F04 đạt cao nhất trên môi trường chỉ chứa gạo lức. Hai chủng F03 và F04 cho mật độ bào tử cao trên môi trường có chứa gạo lức có thể là do trong gạo lức có chứa rất nhiều dưỡng chất, đặc biệt là các vitamin và nguyên tố vi lượng. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Shim *et al.* (2003). Các tác giả này đã nghiên cứu ảnh hưởng của lúa mì, gạo lức và ngô lên sự phát triển của *P. fumosoroseus* và kết quả cho thấy gạo lức là cơ chất tốt nhất cho sự phát triển của *P. fumosoroseus* [16]. Ngoài ra, theo nghiên cứu của Amala và cộng sự (2012), *P. lilacinus* phát triển trên cám gạo (MT4) hơn cám mì (MT3) [2], nhưng với nghiên cứu này, chủng F03 (*P. lilacinum*) lại sử dụng cám mì tốt hơn cám gạo và cám ngô. Còn đối với chủng F04 (*P. lilacinus*) thì ảnh hưởng của cám mì (MT3) và cám gạo (MT4) đến sự hình thành bào tử không có sự khác biệt về mật độ thống kê. Điều này cho thấy, có sự khác nhau trong nhu cầu nguồn cơ chất bổ sung giữa các loài *Paecilomyces* và giữa các chủng trong cùng một loài.

Bảng 5. Thành phần các môi trường sử dụng để nuôi cấy thu nhận bào tử *Paecilomyces* sp

Môi trường	Thành phần (g)					
	Gạo lức	Lúa	Cám mì	Trấu	Cám gạo	Cám bắp
MT1	25	0	0	0	0	0
MT2	0	25	0	0	0	0
MT3	15	0	7,5	2,5	0	0
MT4	15	0	0	2,5	7,5	0
MT5	15	0	0	2,5	0	7,5
MT6	0	17,5	7,5	0	0	0
MT7	0	17,5	0	0	7,5	0
MT8	0	17,5	0	0	0	7,5

Bảng 6. Mật độ bào tử của các chủng nấm *Paecilomyces* tạo thành trên các môi trường nuôi cấy khác nhau

Môi trường	Mật độ bào tử ($\times 10^8$ bào tử/g canh trường tươi)	
	Chủng nấm F03	Chủng nấm F04
MT1	4,09 ^{bc}	32,83 ^a
MT2	0,55 ^d	7,43 ^b
MT3	9,67 ^a	15,00 ^b
MT4	4,75 ^b	14,67 ^b
MT5	2,02 ^{cd}	1,78 ^b
MT6	1,17 ^d	8,42 ^b
MT7	4,54 ^{bc}	10,92 ^b
MT8	1,00 ^d	5,09 ^b

Trong cùng một cột, các số có cùng chữ theo sau giống nhau thì không khác biệt ở mức ý nghĩa 5% .

Ảnh hưởng của độ ẩm môi trường bán rắn lên sự hình thành bào tử của các chủng nấm *Paecilomyces*

Kết quả thu được sau khi nuôi cấy riêng lẻ chủng F03 trên môi trường MT3 và F04 trên môi trường MT1 ở các mức độ ẩm khác nhau cho thấy cả hai chủng nấm thử nghiệm đều chịu sự ảnh hưởng đáng kể bởi độ ẩm của môi trường nuôi cấy đến khả năng hình thành bào tử. Mật độ bào tử tăng từ mức độ ẩm 45 % đến 55 % và đạt cực đại ở độ ẩm 55 % ở cả 2 chủng nghiên cứu (Bảng 7). Các báo cáo trước đây chỉ nghiên cứu về ảnh hưởng của độ ẩm môi trường xung quanh đến khả năng sinh trưởng, sự nảy mầm của bào tử cũng như khả năng gây nhiễm lên côn trùng mà chưa có báo cáo về ảnh hưởng của độ ẩm

môi trường nuôi cấy đến khả năng hình thành bào tử của *Paecilomyces*. Theo Kruger *et al.* (2014) thì độ ẩm môi trường thích hợp để nuôi cấy *Metarhizium anisopliae* trong nghiên cứu của họ là 45 % [13]. Kết quả nghiên cứu của Vu *et al.* (2008) cho thấy *Lecanicillium lecanii* 41185 sinh bào tử cao nhất ở độ ẩm môi trường 28,5 % [18]. Nghiên cứu của Vũ Xuân Đạt (2011) báo cáo rằng độ ẩm cơ chất thích hợp cho chủng *L. lecanii* 485 phát triển là 41 % [4]. Theo Flórez (2008) thì độ ẩm môi trường thích hợp để tăng sinh *Beauveria bassiana* là 55 % [6]. Kết quả của các nghiên cứu trên cho thấy độ ẩm môi trường nuôi cấy có ảnh hưởng không giống nhau đến sự phát triển và hình thành bào tử giữa các chủng nấm diệt côn trùng ở các chi khác nhau và giữa các chủng khác nhau

trong cùng một loài. Trong nghiên cứu này, độ ẩm môi trường thích hợp cho hai chủng *Paecilomyces* F03 và F04 phát triển giống với chủng *B. bassiana*

trong nghiên cứu của Flórez và cao hơn so với các chủng *M. anisopliae*, *L. lecanii* 485 và *L. lecanii* 41185 của các tác giả còn lại.

Bảng 7. Mật độ bào tử của 2 chủng nấm *Paecilomyces* tạo thành trên các môi trường nuôi cấy có độ ẩm khác nhau

Độ ẩm (%)	Mật độ bào tử ($\times 10^8$ bào tử/g canh trường tươi)	
	Chủng nấm F03	Chủng nấm F04
45	3,27 ^{de}	2,34 ^b
50	5,38 ^{bd}	4,34 ^b
55	11,47 ^a	21,73 ^a
60	6,75 ^b	5,73 ^b
65	4,00 ^{ce}	5,48 ^b
70	3,04 ^e	4,25 ^b
75	5,91 ^{bc}	4,84 ^b

Trong cùng một cột, các số có cùng chữ theo sau giống nhau thì không khác biệt ở mức ý nghĩa 5%.

Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy lên sự hình thành bào tử

Hai chủng nấm F03 và F04 được nuôi cấy trên các môi trường thích hợp ở độ ẩm 55 % và được xác định mật độ bào tử ở các mốc thời gian 4, 6, 8, 10 và 12 ngày. Kết quả thu được cho thấy mật độ bào tử của 2 chủng tăng theo thời gian nuôi cấy (Bảng 8), mật độ bào tử bắt đầu tăng cao từ ngày thứ 6 và tiếp tục tăng đến ngày thứ 10, đến ngày thứ 12 thì mật độ bào tử không thay đổi về mặt thống kê. Như vậy, thời

gian nuôi cấy thích hợp để thu nhận bào tử của chủng F03 và F04 là 10 ngày, đây cũng là thời gian thích hợp để nuôi cấy *P. fumosoroseus* và chủng *P. lilacinus* [16]. Theo Kruger *et al.* (2014), thời gian thích hợp để tăng sinh *M. anisopliae* trong nghiên cứu của họ là 12 ngày [13]. Theo Vu *et al.* (2008), 12 ngày cũng là thời gian thích hợp để tăng sinh chủng *L. lecanii* 41185 [18]. Kết quả nghiên cứu cho thấy, hai chủng F03 và F04 có thời gian tăng sinh ngắn hơn các chủng *M. anisopliae* và *L. lecanii* 41185.

Bảng 8. Mật độ bào tử của 2 chủng nấm *Paecilomyces* tạo thành ở các mốc thời gian nuôi cấy khác nhau

Thời gian	Mật độ bào tử ($\times 10^8$ bào tử/g canh trường tươi)	
	Chủng nấm F03	Chủng nấm F04
4	2,12 ^c	4,88 ^c
6	4,88 ^d	8,63 ^b
8	6,37 ^b	10,06 ^b
10	10,47 ^a	19,70 ^a
12	11,13 ^a	20,17 ^a

Trong cùng một cột, các số có cùng chữ theo sau giống nhau thì không khác biệt ở mức ý nghĩa 5%.

Hoạt tính của các chủng *Paecilomyces* sau khi tăng sinh

các môi trường MT1 (gạo lức) và MT3 (gạo lức, cám mì và trấu) với độ ẩm môi trường nuôi cấy là 55 %. Sau khi nuôi cấy 10 ngày, thu sinh khối và tiến

hành thử hoạt lực sâu khoang ở các mức nồng độ 10^6 , 10^7 và 10^8 bào tử/mL. Kết quả thu được cho thấy các chủng nấm đạt hoạt lực tiêu diệt sâu khoang cao nhất sau 8–10 ngày gây nhiễm (Bảng 9 và Bảng 10). Chủng F03 có hoạt lực diệt sâu tương đương ở cả 2 nồng độ thử nghiệm là 10^7 và 10^8 bào tử/mL. Với chủng nấm F04 hoạt lực diệt sâu đạt cao nhất ở nồng độ 10^8 bào tử/mL. Hoạt lực diệt sâu của 2 chủng F03 và F04 sau khi tăng sinh ở điều kiện chọn lọc nhìn chung không thay đổi đáng kể về mặt thống kê so với kết quả thử hoạt lực ban đầu. Theo báo cáo của Hu *et*

al. (2007) ở nồng độ $4,75 \times 10^7$ bào tử/mL *P. javanicus* gây tỷ lệ chết cho sâu khoang cao nhất sau 7 ngày gây nhiễm [9]. Nghiên cứu của Lê Hữu Phước (2009) cho kết quả hoạt lực diệt sâu khoang của hai chủng *Paecilomyces* P3–TG và *Paecilomyces* P2–AG đạt cao nhất ở nồng độ 10^8 bào tử/mL sau 10 ngày gây nhiễm [15]. Kết quả nghiên cứu cho thấy, nồng độ gây nhiễm thích hợp của hai chủng F03 và F04 lần lượt tương tự với chủng *P. javanicus* của Hu *et al.* và hai chủng *Paecilomyces* của Lê Hữu Phước.

Bảng 9. Hoạt lực diệt sâu của các chủng F03 đối với sâu khoang

Thời gian (ngày)	Nồng độ dung dịch nấm chủng F03 (bào tử/ml)		
	10^6	10^7	10^8
2	0,00 ^e	0,00 ^e	0,00 ^e
4	3,33 ^{de}	13,33 ^{cde}	3,33 ^{de}
6	17,78 ^{bcde}	33,33 ^{abcd}	40,74 ^{abc}
8	22,00 ^{bcde}	59,26 ^a	59,26 ^a
10	22,00 ^{bcde}	59,26 ^a	59,26 ^a
HLBĐ			42,00 ^{ab}

Trong cùng một cột, các số có cùng chữ theo sau giống nhau thì không khác biệt ở mức ý nghĩa 5%.

HLBĐ : hoạt lực ban đầu.

Bảng 10. Hoạt lực diệt sâu của các chủng F04 đối với sâu khoang

Thời gian (ngày)	Nồng độ dung dịch nấm chủng F04 (bào tử/ml)		
	10^6	10^7	10^8
2	0,00 ^e	0,00 ^e	0,00 ^e
4	0,00 ^e	0,00 ^e	3,33 ^{de}
6	3,70 ^{de}	18,52 ^{de}	14,81 ^{de}
8	22,22 ^{cd}	40,74 ^{bc}	55,56 ^{ab}
10	22,22 ^{cd}	40,74 ^{bc}	55,56 ^{ab}
HLBĐ			64,29 ^a

Trong cùng một cột, các số có cùng chữ theo sau giống nhau thì không khác biệt ở mức ý nghĩa 5%.

KẾT LUẬN

Sự phân bố của *Paecilomyces* sp. trong đất khá đa dạng, không phụ thuộc vào các loại cây trồng nhất định và hoạt tính diệt sâu của các chủng phân lập được không giống nhau. Từ 33 mẫu đất đã phân lập được năm chủng nấm *Paecilomyces*. Trong đó, chủng F01

thuộc *P. javanicus* từ đất trồng cây bắp ở Đồng Nai, chủng F02 thuộc *Paecilomyces* sp. từ đất trồng cây hoàn ngọc ở Tây Ninh, chủng F03 thuộc *P. lilacinum* từ đất trồng cây cao su ở Tây Ninh và hai chủng F04 và F05 thuộc *P. lilacinus* từ đất trồng khoai mì ở Tây Ninh. Trong năm chủng nấm phân lập được có hai

chủng F03 và F04 cho hoạt lực cao trong việc diệt sâu khoang sau 10 ngày gây nhiễm. Các môi trường bán rắn thích hợp để tăng sinh chủng F03 là môi trường gạo lức, cám mì và trấu, còn chủng F05 là môi trường gạo lức. Độ ẩm môi trường nuôi cấy thích hợp cho hai chủng trên là 55 % và thời gian tăng sinh thích

hợp là 10 ngày. Như vậy, với nguồn cơ chất nuôi cấy bán rắn dễ tìm kiếm và rẻ tiền cùng với các điều kiện tăng sinh không phức tạp đã cho thấy triển vọng ứng dụng hai chủng F03 và F04 vào sản xuất chế phẩm vi sinh phục vụ nông nghiệp.

Investigation of the spore production of *Paecilomyces* spp. isolated from several agricultural soils with the biocontrol activity against *Spodoptera litura*

• Nguyen Quoc Linh

• Nguyen Nhu Nhut

Gia Tuong Company Binh Duong

ABSTRACT

Paecilomyces is a fungus that parasites on various insect species. However, *Paecilomyces* has not been widely studied and applied in Vietnam. In this study, *Paecilomyces* spp. were isolated from several agricultural soils and identified based on the morphology and 28S rDNA gene sequencing. Biocontrol activities of *Paecilomyces* were measured in vitro against *Spodoptera litura*. The *Paecilomyces* strains with high biocontrol were studied for the spore acquisition on semi-solid culture. There were five isolated strains belonged to *Paecilomyces* (strain F01 belonged to *P. javanicus*, strain F02 belonged to

Paecilomyces sp., strain F03 belonged to *P. lilacinus* and strains F04 and F05 belonged to *P. lilacinus*) from 33 different samples. In particular, both of F03 and F04 performed high biocontrol activity against *S. litura* after 10 days of inoculation. Optimization of spores production medium showed that F03 and F04 grew well on a defined semi-solid medium whose the main components were unpolished rice, wheat bran and husk of 55% humidity. The results indicated that the native strains of *Paecilomyces* were potential for applications to produce bioproducts for pest management strategies.

Keywords: isolation, *Paecilomyces*, semi-solid, *Spodoptera litura*, spore production, unpolished rice

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. A. Khan, K.L. Williams, H.K.M. Nevelainen, A. Abdusalom and J. Rohila, The possibilities of computed tomography in paecilomycosis of lungs, *Medical and Health Science Journal*, 3, 36-41 (2010).
- [2]. U. Amala, T. Jiji and A. Naseema, Mass multiplication of entomopathogenic fungus, *Paecilomyces lilacinus* with solid substrate, *Journal of biopesticides*, 5, 2, 168 (2012).
- [3]. K.K. Chaudhar, K.R. Ka, Compatibility of *Pasteuria penetrans* with fungal parasite *Paecilomyces lilacinus* against root knot nematode on Chilli (*Capsicum annum* L.),

- Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences*, 1, 1, 36 – 42 (2012).
- [4]. Vũ Xuân Đạt, Nghiên cứu sử dụng nấm *Lecanicillium* kí sinh côn trùng để kiểm soát rệp hại rau, Luận văn thạc sĩ khoa học ĐH Khoa Học Tự Nhiên Hà Nội (2011).
- [5]. K.K. Everton , C.A. Keyser, E. N. Rangel, R.N. Nelson , D. W.Roberts, CTC medium: A novel doine-free selective medium for isolatin entomopathogenic fungi, especially *Metarhizium aacridum*, from soil, *Biological Control*, 54, 197-205 (2010).
- [6]. F.J.P. Flórez, Production of *Beauveria bassiana* fungal spores on rice to control the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei*, in Colombia, *Journal of Insect Science* 8, 1–13 (2008).
- [7]. N. Hassouna, B. Michot, and J. Bachelletre, The complete nucleotide sequence of mouse 28 S rRNA gene, implications for the process of size increase of the large subunit rRNA in higher eukaryotes. *Nucleic Acids Research*, 8, 3563-3583 (1984).
- [8]. G. Hu, J. S. Leger , Field studies using a recombinant mycoinsecticide (*Metarhizium anisopliae*) reveal that it is rhizosphere competent, *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 12, 6383-6387 (2002).
- [9]. Q.B. Hu, S.X. Ren, X.C. An, M.H. Qian, Insecticidal activity influence of destruxins on the pathogenicity of *Paecilomyces javanicus* against *Spodoptera litura*, *Journal of Applied Entomology* 131, 4, 262–268 (2007).
- [10]. H.W. Kan, L. Ming, C. Li, H. Kan, B. Sun, and Y. Liang, Antidepressant effect of bioactive compounds from *Paecilomyces tenuipes* in mice and rats, *Neural Regeneration Research*, 5, 20, 1568 – 1572 (2010).
- [11]. T.A. Khan, B. K. Goswami, C. Bhattacharyza , and R. Paul , Perfomance of pesticide and biopesticide on growth, yield and forskolin content in *Coleus forskohlii* infected with *Meloidogyne incognita*, *Pakista Journal of Nematology*, 30, 1, 49–56 (2012).
- [12]. A. Khan, K.L. Williams, H.K.M. Nevelainen, Infection of plant-parasitic nematodes by *Paecilomyces lilacinus* and *Monacrosporium lysipagum*, *BioControl*, 51, 659–678 (2006).
- [13]. R.D. Kruger, J.B. Posadas, M.A. Lewylle, J. I. Mini, R.E. Lecuona, Solid substrate production and formulation of an isolate of *Metarhizium anisopliae* for biological control of stem bug *Tibraca limbativentris*, *World Applied Sciences Journal*, 32, 7, 1242–1251 (2014).
- [14]. C.G. Pau, C.T.S. Leong, S.K. Wong, L. Eng, M. Jiwan, F.R. Kundat, Z.F.B.A. Aziz, O.H. Ahmed, and N.M. Majid, Isolation of indigenous strains of *Paecilomyces lilacinus* with antagonistic activity against *Meloidogyne incognita*, *International Journal of Agriculture and Biology*, 14, 197-203 (2012).
- [15]. Lê Hữu Phước, Võ Thị Hương Dương, Lê Hòa Lợi, Phân lập và chọn môi trường nhân sinh khối ba loài nấm ký sinh côn trùng *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok, *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill và *Paecilomyces* spp. trên nhóm rau ăn lá ở Đồng bằng sông Cửu Long, Đề tài nghiên cứu khoa học Trường Đại học An Giang (2009).
- [16]. S.M. Shim, K.R. Lee, S.H. Kim, K.H. Im, J. W. Kim, U. Y. Lee, J.O. Shim, M.W. Lee, T.S. Lee, The optimal culture conditions affecting the mycelial growth and fruiting body formation of *Paecilomyces fumosoroseus*, *Mycobiology*, 31, 4, 214–220 (2003).
- [17]. P.Vettrivelkai, M. Sivakumar, I.E. Jonathan, Biocontrol potential of endophytic bacteria on *Meloidogyne incognita* and its effect on plant growth in bhendi, *Journal of Biopesticides* 3, 2, 452–457 (2010).
- [18]. V.H. Vu, S.I. Hong, K. Kim, Production of aerial conidia of *Lecanicillium lecanii* 41185 by solid-state fermentation for use as a mycoinsecticide, *Mycobiology*, 36, 3, 183–189 (2008).