

## THU THẬP, PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN MỘT SỐ CHỦNG NẤM KÝ SINH RỆP SÁP HẠI CÀ PHÊ TẠI TÂY NGUYÊN

Collect, Isolate and Select Some Strain Mycopathogens on Scale Insect in Centre Highland

Phạm Văn Nhạ<sup>1</sup>, Hồ Thị Thu Giang<sup>2</sup>, Phạm Thị Vượng<sup>3</sup>,  
Phạm Duy Trọng<sup>3</sup>, Đồng Thị Thanh<sup>3</sup>, Trần Thị Tuyết<sup>3</sup>, Đặng Thanh Thúy<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Nghiên cứu sinh Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội

<sup>2</sup>Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội,

<sup>3</sup>Viện Bảo vệ thực vật

Địa chỉ email tác giả liên lạc: [nhanipp@yahoo.com](mailto:nhanipp@yahoo.com)

### TÓM TẮT

360 mẫu rệp sáp (*Pseudococcus* sp) bị nấm bệnh ký sinh điển hình tại 3 tỉnh thuộc Tây Nguyên bao gồm: Đắk Lắk, Đắk Nông và Gia Lai đã được thu thập. Phân lập và giám định trong năm 2010 đã thu thập được 4 chủng nấm *Metarhizium anisopliae* Sorokin ký hiệu từ MR1 đến MR4, 7 chủng *Beauveria bassiana* Vuill ký hiệu từ BR1 đến BR7. Độc lực các chủng nấm được đánh giá bằng phương pháp xác định enzyme ngoại bào, chủng BR5 có đường kính vòng phân giải enzyme đạt 15,33 mm trên cơ chất kitin - T, 16 mm trên cơ chất kitin - C; chủng BR4 đạt tương ứng là 13,33 và 13,83 mm. Đây là 2 chủng BR sinh enzyme có hoạt lực cao nhất. Chủng MR1 sau 7 ngày nuôi cây dịch thể có đường kính vòng phân giải enzyme lớn nhất đạt 15,33 mm trên cơ chất kitin - C và 11,00 mm trên cơ chất kitin - T; chủng MR3 tương ứng đạt 14,33 và 11,33 mm. Kết quả này cho thấy đây là 2 chủng nấm *Metarhizium* cho triển vọng.

Từ khóa: *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, nấm ký sinh, rệp sáp.

### SUMMARY

360 specimens of scale insect (*Pseudococcus* sp) infected with mycopathogens in three Central highland provinces of Dak Lak, Dak Nong, and Gia Lai were collected. The fungal isolation has identified a total of 11 fungal strains, of which 4 strains (MR1 to MR4) belonging to *Metarhizium anisopliae* Sorokin and 7 strains (BR1 to BR7) belonging to *Beauveria bassiana* Vuill. The virulence test by evaluating extra-cellular enzyme activity indicated that the diffusion ring of the strain BR5 on chitin-T substrate was 15.33 mm and on chitin-C 16.00mm. The figures for the strain BR4 was 13.33 mm, and 13.83mm, respectively. Similarly. The strains MR1 and MR3 on these substrates produced a diffusion ring of 11.00 mm, and 15.33 mm and 11.33 mm and 14.33, respectively. These are 4 promising strains that could be utilized for mass production and control scale insect on coffee.

Key words: *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, mycopathogens, scale insect.

### 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây cà phê được trồng ở nước ta tập trung chủ yếu tại các tỉnh Tây Nguyên bao gồm: Đắk Lắk, Đắk Nông, Lâm Đồng, Gia Lai và Kon Tum. Đến nay, tổng diện tích trồng cà phê cả nước đạt trên 500.000 ha với sản lượng trên 90 vạn tấn và Việt Nam đã trở thành nước thứ 2 trên thế giới về sản xuất và xuất khẩu cà phê chỉ sau Brazil (Đoàn Triệu Nhận, 2008).

Tuy nhiên, cùng với sự phát triển vượt bậc, ngành sản xuất cà phê của nước ta cũng đứng trước những thử thách lớn như vấn đề nước tưới, phân bón và các dịch vụ nông nghiệp luôn tăng giá, các loại dịch hại bùng phát thành đại dịch... (Vũ Khắc Nhương, 2008). Để phòng trừ các loại dịch hại, người dân vẫn chủ yếu sử dụng các loại thuốc hóa học để phòng trừ, liều lượng và số lần phun

Rệp sáp hại tất cả các bộ phận của cây cà phê. Khi các vườn nhiễm rệp sáp nặng sẽ làm giảm năng suất nghiêm trọng và đôi khi mất trắng, các vườn bị nhiễm rệp này còn gây ảnh hưởng cho cây cà phê ở các năm tiếp theo (Nguyễn Thị Chất, 2003; Nguyễn Thị Thuỷ và cs., 2007). Đi cùng với rệp sáp, luôn luôn tồn tại các nấm bệnh cộng sinh như nấm muội đen sử dụng chất thải của rệp và tạo nên lớp muội đen làm giảm khả năng quang hợp của cây (Trần Kim Loang, 2002). Các loại thuốc trừ sâu hóa học có hiệu lực phòng trừ rệp sáp không cao bởi trong quá trình sinh trưởng chúng tạo ra một lớp sáp che phủ bên ngoài làm cho khi phun thuốc rất khó tiếp xúc và tiêu diệt được rệp sáp. Các biện pháp khác như tưới pẹp với áp suất cao cũng có hiệu quả làm giảm mật độ rệp sáp, tuy nhiên biện pháp này cũng không hoàn toàn chủ động đối với các vùng bị khô hạn. Việc sử dụng các chế phẩm sinh học phòng trừ rệp sáp hại cà phê cho đến nay trên thị trường trong nước chưa có một chế phẩm sinh học đặc hiệu nào.

Với những vấn đề nêu trên, đứng trước đòi hỏi của nhu cầu sản xuất cần có được chế phẩm sinh học đặc hiệu cho việc phòng trừ rệp sáp hại cà phê. Nghiên cứu đã tiến hành điều tra thu thập, phân lập và tuyển chọn một số chủng nấm ký sinh rệp sáp hại cà phê để làm vật liệu sản xuất chế phẩm sinh học phục vụ cho nhu cầu của sản xuất hiện nay.

## 2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Phương pháp điều tra khảo sát thực địa

Điều tra thu thập nguồn rệp sáp bị nấm ký sinh tại 3 tỉnh thuộc Tây Nguyên bao gồm các huyện và Tp. Buôn Ma Thuột - Đắk Lắk, huyện Đắk Mil - Đắk Nông và huyện Chư Sê - Gia Lai. Mẫu vật thu thập được bảo quản riêng mỗi mẫu trong 1 ống nghiệm có

nút bông đã được khử trùng, sau đó đem về phòng thí nghiệm bảo quản trong tủ lạnh thường cho tới khi tiến hành phân lập. Phân lập các nguồn bệnh ký sinh trên rệp sáp trên môi trường Sabouraud, N1 và Czapek.

### 2.2. Nghiên cứu đánh giá xác định bộ chủng giống nấm có hoạt tính cao trên cơ sở xác định khả năng sinh enzyme ngoại bào

Nấm được nuôi cấy trên môi trường dịch thể, sau đó thu dịch thể có chứa enzym ngoại bào sau 3, 5, 7 ngày nuôi cấy. Sử dụng môi trường đệm citrat photphat để thử khả năng hình thành một số enzym ngoại bào của nấm.

Thành phần	(g/l)
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .12H <sub>2</sub> O	0,615 g
Axit citric	0,25 g
Agar	2 g
Nước cất	100 ml

Bổ sung mỗi loại 0,1 % (Tween 80, giấy lọc, vỏ tôm, vỏ cua, Glucoza) vào từng bình môi trường. Khử trùng 1 atm/30' sau đó đổ ra đĩa petri, để thạch nguội sau đó khoan thạch và nhỏ dịch nuôi nấm (dịch enzym thử) vào các lỗ khoan. Ủ ở 28 - 30°C trong 16 giờ, tráng bằng thuốc thử lugol lên bề mặt thạch để cho tới khi xuất hiện vòng. Đổ thuốc thử đi và đo vòng phân giải.

Vòng phân giải được tính theo công thức

Vòng phân giải = (D - d) mm

D: Đường kính vòng phân giải

d: Đường kính lỗ khoan.

Các chủng sau khi đã lựa chọn có khả năng sinh enzyme cao được đánh giá trên cơ thể rệp sáp bằng phương pháp đánh giá độc lực của các chủng vi sinh vật (Viện BTVT, 1997, 1998).

### 2.3. Bảo quản bộ giống vi sinh vật

Bảo quản bằng phương pháp cấy truyền và lưu giữ trong glycerine ở nhiệt độ 4°C.

## 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1. Điều tra thu thập nguồn nấm ký sinh trên rệp sáp hại cà phê

**Bảng 1. Số lượng mẫu rệp sáp bị nấm ký sinh đã thu thập được năm 2010**

TT	Địa điểm	Số lượng mẫu
1	Đắk Lắk	251
2	Đắk Nông	73
3	Gia Lai	36
	Tổng Số	360

Với kết quả thu thập và lựa chọn 360 mẫu rệp sáp chết có triệu chứng nấm bệnh điển hình (Bảng 1), nghiên cứu tiến hành làm sạch mẫu và bảo quản riêng biệt từng mẫu vật trong tủ lạnh tại Viện Bảo vệ thực vật để phân lập nguồn nấm ký sinh trên rệp sáp ở các bước tiếp theo.

### 3.2. Phân lập, giám định và lưu giữ bảo quản

Với số lượng mẫu rệp sáp bị nấm ký sinh thu được rất phong phú, nghiên cứu tiến hành tuyển chọn các mẫu điển hình để phân lập và giám định loài.

#### 3.2.1. Chủng MR1

- Khuẩn lạc: Màu sắc mặt phải xanh rêu kèm ánh vàng, gần giống màu mai cua, dạng bông xốp, khi già màu trở nên đậm hơn. Trên bề mặt xuất hiện những đám sợi khí sinh màu trắng. Mặt trái khuẩn lạc trắng ngà, khi già ngả sang màu nâu nhạt. Tốc độ mọc nhanh, đạt kích thước 4 - 5 cm sau 4 - 5 ngày nuôi cấy, sau đó lan kín hộp petri tạo



Hình 1. Khuẩn lạc chủng MR1

những rãnh đồng tâm với sự hình thành các đám bào tử và các sợi khí sinh xen kẽ.

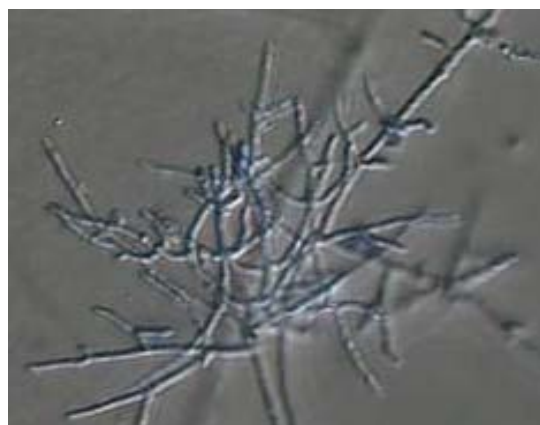
- Cơ quan sinh bào tử: Cuống sinh bào tử không màu, phân nhánh dị thường, tạo thành các cụm cuống sinh bào tử dày đặc. Kích thước đạt tới 200 x 3,5 - 4  $\mu\text{m}$ , các tế bào sinh bào tử dạng chai, kích thước 2 - 2,5 x 8 - 12  $\mu\text{m}$ .

Bào tử dạng phialo, tạo thành lên thành lớp dày đặc, kích thước 3 - 3,5  $\mu\text{m}$ . Đây là hình dạng điển hình của loài *Metarhizium anisopliae* (Hình 1 và Hình 2).

#### 3.2.2. Chủng MR2 - MR4

- Khuẩn lạc: Màu sắc mặt phải xanh rêu đậm, khi già màu trở nên đậm hơn. Trên bề mặt xuất hiện những đám sợi khí sinh màu trắng. Mặt trái khuẩn lạc trắng ngà, khi già ngả sang màu đậm hơn. Tốc độ mọc nhanh, đạt kích thước 3 - 3,5 cm sau 4 - 5 ngày nuôi cấy. Tạo những rãnh đồng tâm với sự hình thành các đám bào tử và các sợi khí sinh xen kẽ.

- Cơ quan sinh bào tử: Cuống sinh bào tử không màu, phân nhánh dị thường, tạo thành các cụm cuống sinh bào tử dày đặc. Kích thước đạt tới 200 x 3,5 - 4  $\mu\text{m}$ , các tế bào sinh bào tử dạng chai, kích thước 2 - 2,5 x 8 - 12  $\mu\text{m}$ . Bào tử dạng phialo, tạo thành lên thành lớp dày đặc, kích thước 3 - 3,5  $\mu\text{m}$ . Đây là hình dạng điển hình của loài *Metarhizium anisopliae* (Hình 3 và Hình 4).



Hình 2. Cuống sinh bào tử chủng MR1



Hình 3. Khuẩn lạc chủng MR2



Hình 4. Bào tử chủng MR2

### 3.2.3. Chủng BR1, BR2

Mô tả: Về hình dạng khuẩn lạc và cơ quan sinh bào tử hai chủng BR1 và BR2 có những đặc điểm phân loại giống nhau hoàn toàn như sau:

- Khuẩn lạc: Mặt phải khuẩn lạc màu trắng hoàn toàn, dạng bông xốp. Mặt trái khuẩn lạc trắng ngà, khi già ngả sang màu đậm hơn. Tốc độ mọc nhanh, đạt kích thước

3 - 3,5 cm sau 4 - 5 ngày nuôi cấy. Tạo những rãnh đồng tâm.

- Cơ quan sinh bào tử: Cống sinh bào tử sinh ra từ sợi khí sinh với các đặc điểm ngắn, phần cống phình to, phần ngọn thót lại, từ đó sinh ra các bào tử nhỏ hình cầu đến hình elip, kích thước 2,5 - 3,5  $\mu\text{m}$ .

Đây là hình dạng điển hình của loài *Beauveria bassiana* (Hình 5, 6, 7, 8).



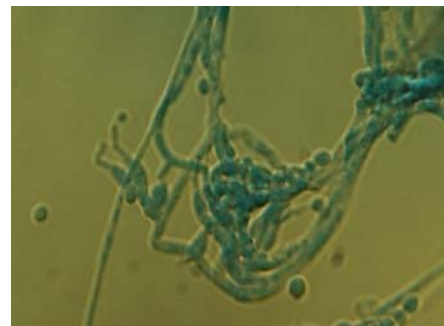
Hình 5. Khuẩn lạc chủng BR2



Hình 6. Cống sinh bào tử và bào tử của chủng BR2



Hình 7. Khuẩn lạc chủng BR1



Hình 8. Cống sinh bào tử và bào tử của chủng BR1

### 3.2.4. Chủng BR3-BR7

- Khuẩn lạc: Mặt phải khuẩn lạc màu trắng hoàn toàn, dạng bông xốp. Mặt trái khuẩn lạc trắng ngà, khi già ngả sang màu đậm hơn. Tốc độ mọc nhanh, đạt kích thước 3 - 3,5 cm sau 4 - 5 ngày nuôi cấy. Tạo những rãnh đồng tâm.

- Cơ quan sinh bào tử: Trên môi trường nuôi cấy, các đám bào tử hình quả bóng được

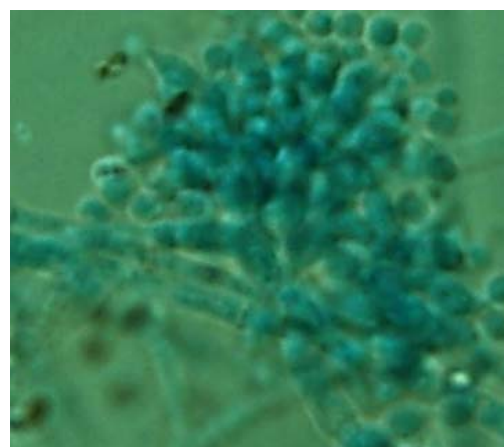
sinh ra dày đặc, trên đó hình thành các cụm cuống sinh bào tử ngắn, phần cuống phình to, phần ngọn thót lại, từ đó sinh ra các bào tử nhỏ hình cầu đến hình elip, kích thước 2,5 - 3,5  $\mu\text{m}$ .

Đây là hình dạng điển hình của loài *Beauveria bassiana* (Hình 9 và 10).

Những kết quả thí nghiệm trên được thống kê trong bảng 2.



Hình 9. Khuẩn lạc chủng BR7



Hình 10. Đám cuống sinh bào tử hình quả cầu của chủng BR7

Bảng 2. Số lượng các chủng nấm ký sinh rệp sáp đã phân lập trong năm 2010

TT	Ký hiệu chủng	Ký chủ	Loài nấm
1	MR1	Rệp sáp	<i>Metarhizium anisopliae</i>
2	MR2	Rệp sáp	<i>Metarhizium anisopliae</i>
3	MR3	Rệp sáp	<i>Metarhizium anisopliae</i>
4	MR4	Rệp sáp	<i>Metarhizium anisopliae</i>
5	BR1	Rệp sáp xanh mềm	<i>Beauveria bassiana</i>
6	BR2	Rệp sáp	<i>Beauveria bassiana</i>
7	BR3	Rệp sáp	<i>Beauveria bassiana</i>
8	BR4	Rệp sáp	<i>Beauveria bassiana</i>
9	BR5	Rệp sáp	<i>Beauveria bassiana</i>
10	BR6	Rệp sáp	<i>Beauveria bassiana</i>
11	BR7	Rệp sáp	<i>Beauveria bassiana</i>

Kết quả nghiên cứu phân lập và giám định trong năm 2010 đã thu thập được 4 chủng nấm *Metarhizium anisopliae*, 7 chủng *Beauveria*

*bassiana*. Các chủng nấm sẽ là nguồn vật liệu phục vụ cho các thí nghiệm đánh giá độc lực và lựa chọn để sản xuất chế phẩm.

### 3.3. Đánh giá độc lực các chủng nấm bằng phương pháp xác định enzyme ngoại bào

#### + Thí nghiệm 1:

Khả năng phân giải một số cơ chất của enzym ngoại bào của các chủng nấm *Beauveria* trên môi trường N1 sau 7 ngày. Bảng 3 cho thấy, chủng BR5 có đường kính vòng phân giải enzyme đạt 15,33 mm trên cơ chất kitin - T, 16 mm trên cơ chất kitin - C; chủng BR4 đạt tương ứng là 13,33 và 13,83 mm. Đây là 2 chủng nấm sinh enzyme

có hoạt lực cao nhất.

#### + Thí nghiệm 2:

Khả năng phân giải một số cơ chất của enzym ngoại bào của các chủng nấm MR trên môi trường N1.

Chủng MR1 sau 7 ngày nuôi cấy dịch thể có đường kính vòng phân giải enzyme lớn nhất đạt 15,33 mm trên cơ chất kitin - C và 11,00 mm trên cơ chất kitin - T; chủng MR3 tương ứng đạt 14,33 và 11,33 mm (Bảng 4). Đây là 2 chủng nấm *Metarhizium* cho triển vọng (Hình 11).

**Bảng 3. Đường kính vòng phân giải (mm) các cơ chất khác nhau của enzyme các chủng BR trên môi trường N1 sau 7 ngày (Viện BVTV - 9/2010)**

Chủng nấm	Cơ chất				
	Kitin - T	Kitin - C	CMC	TW	GLU
BR1	4,00 <sup>qr</sup>	5,00 <sup>mnp</sup>	4,33 <sup>pq</sup>	0,00 <sup>s</sup>	3,33 <sup>r</sup>
BR2	9,33 <sup>gh</sup>	9,67 <sup>fgh</sup>	7,00 <sup>jk</sup>	6,33 <sup>kl</sup>	7,00 <sup>jk</sup>
BR4	13,33 <sup>b</sup>	13,83 <sup>b</sup>	9,00 <sup>h</sup>	12,33 <sup>c</sup>	9,67 <sup>fgh</sup>
BR5	15,33 <sup>a</sup>	16,00 <sup>a</sup>	10,67 <sup>ef</sup>	11,67 <sup>cd</sup>	8,00 <sup>i</sup>
BR6	7,00 <sup>jk</sup>	8,00 <sup>i</sup>	5,67 <sup>lmn</sup>	5,3 <sup>mn</sup>	5,00 <sup>mnp</sup>
BR7	10,00 <sup>fg</sup>	9,00 <sup>h</sup>	8,00 <sup>i</sup>	11,00 <sup>de</sup>	8,00 <sup>i</sup>
LSD5%			0,75		
CV			5,5%		

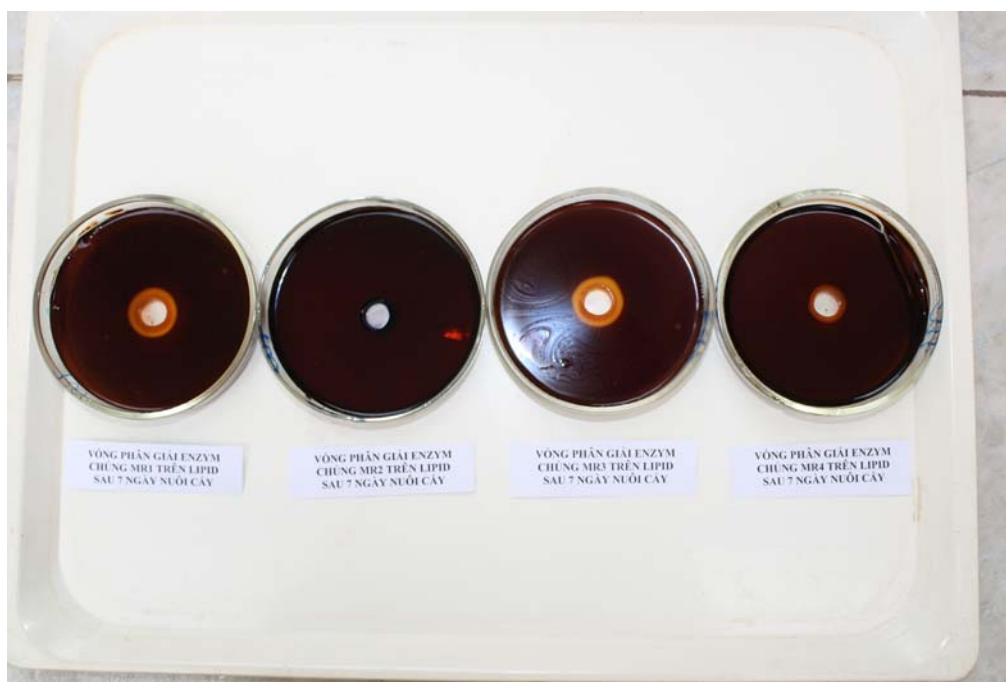
Các chữ a, b, c... chỉ sự sai khác một cách có ý nghĩa ở mức  $P \leq 0,05$

Ghi chú: Kitin - T: Kitin từ vỏ tôm; Kitin - C: Kitin từ vỏ Cua; CMC: Xenllulose từ giấy lọc; TW: Lipid từ tween; GLU: Đường Glucose

**Bảng 4. Đường kính vòng phân giải (mm) các cơ chất khác nhau của enzyme các chủng MR trên môi trường N1 sau 7 ngày**

Chủng nấm	Cơ chất				
	Kitin - T	Kitin - C	CMC	TW	GLU
MR1	11,00 <sup>c</sup>	15,33 <sup>a</sup>	10,33 <sup>de</sup>	10,67 <sup>cd</sup>	10,67 <sup>cd</sup>
MR2	9,00 <sup>f</sup>	9,67 <sup>ef</sup>	10,67 <sup>cd</sup>	4,67 <sup>i</sup>	10,00 <sup>de</sup>
MR3	11,33 <sup>c</sup>	14,33 <sup>b</sup>	10,00 <sup>de</sup>	10,33 <sup>de</sup>	10,00 <sup>de</sup>
MR4	6,00 <sup>i</sup>	7,00 <sup>gh</sup>	6,33 <sup>hi</sup>	7,33 <sup>g</sup>	6,33 <sup>hi</sup>
LSD5%			0,71		
CV			4,5%		

Các chữ a, b, c... chỉ sự sai khác một cách có ý nghĩa ở mức  $P \leq 0,05$



**Hình 11. Vòng phân giải enzyme các chủng nấm MR trên cơ chất lipid sau 7 ngày nuôi cấy**

#### 4. KẾT LUẬN

- Điều tra thu thập nguồn rệp sáp bị nấm ký sinh tại 3 tỉnh thuộc Tây Nguyên bao gồm: Đắk Lắk, Đắk Nông và Gia Lai. Kết quả thu thập được 360 mẫu rệp bị nấm bệnh ký sinh điển hình.

- Kết quả phân lập và giám định trong năm 2010, đã thu thập được 4 chủng nấm *Metarhizium anisopliae* ký hiệu từ MR1 đến MR4, 7 chủng *Beauveria bassiana* ký hiệu từ BR1 đến BR7.

- Đánh giá độc lực các chủng nấm bằng phương pháp xác định enzyme ngoại bào, các chủng BR cho kết quả chủng BR5 có đường kính vòng phân giải enzyme đạt 15,33 mm trên cơ chất kitin – T, 16 mm trên cơ chất kitin – C; chủng BR4 đạt tương ứng là 13,33 và 13,83 mm. Đây là 2 chủng nấm BR sinh enzyme có hoạt lực cao nhất.

- Chủng MR1 sau 7 ngày nuôi cấy dịch thể có đường kính vòng phân giải enzyme lớn

nhất đạt 15,33 mm trên cơ chất kitin – C và 11,00 mm trên cơ chất kitin – T; chủng MR3 tương ứng đạt 14,33 và 11,33 mm. Kết quả này cho thấy đây là 2 chủng nấm *Metarhizium* có nhiều triển vọng.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn (2001). Tuyển tập tiêu chuẩn nông nghiệp Việt Nam, Tiêu chuẩn Bảo vệ thực vật tập II, quyển 1.

Nguyễn Thị Chất (2003). Rệp sáp gây hại cà phê và biện pháp phòng trị chúng trên địa bàn một số tỉnh phía Nam và Tây Nguyên. Kỷ yếu hội nghị khoa học chuyên ngành bảo vệ thực vật.

Tạ Kim Chính (2009). Hoàn thiện công nghệ sản xuất chế phẩm Vimetazimm95 DP & Biobauve5 DP từ hai chủng nấm *Metarhizium anisopliae* Ma5 & *Beauveria bassiana* Bb1 để phòng trừ một số loài côn

- trùng trong đất hại cây công nghiệp. Báo cáo tổng hợp dự án DAĐL-2008/11.
- Trần Kim Loang (2002). Nghiên cứu một số nguyên nhân gây hiện tượng vàng lá, thối rễ trên cà phê vối (*Coffea canephora pierre exfroehner*) tại Đắk Lắk và khả năng phòng trừ. Luận án tiến sĩ nông nghiệp.
- Đoàn Triệu Nhận (2008). Nghề trồng cà phê. NXB. Nông nghiệp.
- Vũ Khắc Nhượng (2008). Cây cà phê và kỹ thuật gieo trồng. NXB. Nông nghiệp.
- Nguyễn Thị Thuý, Phạm Thị Vượng và Lê Xuân Vị (2007). Nghiên cứu một số đặc điểm sinh học và diễn biến quần thể rệp sáp (*Planococcus* sp) hại cà phê tại Đắk Lắk năm 2006. *Tạp chí BVTV* số 1/2007 tr. 15-20.
- Viện Bảo vệ thực vật (1997). Phương pháp nghiên cứu Bảo vệ Thực vật, tập 1. Nhà xuất bản Nông nghiệp.
- Viện Bảo vệ thực vật (2005). Báo cáo tổng kết đề tài khoa học cấp Nhà nước KHCN.02.07B (1996 -2000): Nghiên cứu áp dụng công nghệ vi sinh (vi khuẩn, nấm, virut) để sản xuất chế phẩm sinh học BVTV trong phòng trừ sâu hại cây trồng.