

THÀNH PHẦN NẤM KÝ SINH TRÊN RỆP SÁP VÀ VE SẼU GÂY HẠI RỄ CÀ PHÊ TẠI ĐẮK LẮK

Đào Thị Lan Hoa^{1*}, Trần Thị Thường¹, Mai Thị Hạnh¹, Nguyễn Văn Phương¹,
Nguyễn Văn Nam², Đỗ Thị Kiều An², Trần Thị Huế²

¹*Viện Khoa học Kỹ thuật Nông Lâm nghiệp Tây Nguyên (WASI)*

²*Trường Đại học Tây Nguyên (TNU)*

Email*: lanhoavtn@gmail.com

Ngày gửi bài: 10.05.2015

Ngày chấp nhận: 22.06.2016

TÓM TẮT

Trong tự nhiên, nấm ký sinh xuất hiện trên rệp sáp và ve sầu đã góp phần làm giảm sự gây hại của các loại dịch hại này. Việc thu thập, phân lập và xác định tên các chủng nấm ký sinh trên rệp sáp, ve sầu được thực hiện. Với mục đích tạo vật liệu ban đầu để nghiên cứu và chọn lọc các chủng nấm ký sinh côn trùng có hoạt tính tốt, sản xuất chế phẩm sinh học phòng trừ rệp sáp, ve sầu gây hại rễ cà phê. Trong năm 2013, tổng số mẫu rệp sáp và ve sầu hại rễ cà phê bị nấm ký sinh được thu thập tại các vùng trồng cà phê của tỉnh Đắk Lắk là 421 mẫu. Kết quả đã phân lập được 156 mẫu nấm thuộc 4 chi là *Beauveria*, *Cordyceps*, *Metarhizium*, *Paecilomyces*. Từ kết quả định danh bằng hình thái đã chọn 18 mẫu đi giải trình tự gen tại Thành phố Hồ Chí Minh. Kết quả đã định danh được 7 loài: *Beauveria bassiana*, *Cordyceps bassiana*, *Cordyceps cicadae*, *Cordyceps takaomontana*, *Metarhizium cylindrospora*, *Paecilomyces lilacinus*, *Paecilomyces hepiali*. Đây là các loài mới lần đầu tiên được công bố tại Việt Nam trên đối tượng rệp sáp và ve sầu hại rễ cà phê bằng phương pháp giải trình tự gen.

Từ khóa: Giải trình tự gen, nấm ký sinh côn trùng, rệp sáp hại rễ cà phê, ve sầu hại rễ cà phê.

Composition of Parasitic Fungi on Coffee Root Mealybugs and Cicadas in DakLak Province

ABSTRACT

A study was conducted to isolate parasitic fungi on mealybugs and cicadas attacking coffee roots, making materials available for research and selection of entomopathogenic fungi with high activity to produce biopesticides for controlling mealybugs and cicadas damaging on coffee roots. In 2013, 421 samples of coffee root-infested mealybugs and cicadas parasitized by fungi were collected from coffee plantations in Dak Lak province. A total of 156 isolates of entomopathogenic fungi belonging to 4 genera were isolated, including *Beauveria*, *Cordyceps*, *Metarhizium* and *Paecilomyces*. Based on morphological identification, 18 samples were selected for DNA sequencing and 7 species were genetically identified, i.e. *Beauveria bassiana*, *Cordyceps bassiana*, *Cordyceps cicadae*, *Cordyceps takaomontana*, *Metarhizium cylindrospora*, *Paecilomyces lilacinus* and *Paecilomyces hepiali*. These are new species parasitized on coffee root mealybugs and cicadas and are identified for the first time in Viet Nam by DNA sequencing.

Keywords: Cicadas, coffee roots, DNA sequencing, mealybugs, pathogenic fungi.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Rệp sáp, ve sầu hại rễ là các đối tượng dịch hại nguy hiểm trên cây cà phê đã được các quốc

gia trên thế giới ghi nhận như: Kenia, Nigeria, Tanzania, Uganda, Zimbabwe, Việt Nam...

Hiện nay, nhiều nước trên thế giới đã đi sâu nghiên cứu, ứng dụng nấm ký sinh trong việc

kiểm soát con trùng gây hại thực vật và đạt được kết quả tốt. Việc sản xuất chế phẩm sinh học để phòng trừ dịch hại hoặc phân bón vi sinh từ một hoặc nhiều chủng nấm ký sinh từ các chi nấm *Beauveria*, *Metarhizium*, *Paecilomyces*... đã phát triển rất nhanh, thay thế dần thuốc hóa học đang có nguy cơ gây ô nhiễm môi trường. Copping and Menn (2000) thống kê có trên 750 loài nấm được ghi nhận ký sinh trên côn trùng, tuy nhiên chỉ một vài dòng phân lập được phát triển thành sản phẩm thương mại. Trong đó, một số nấm đang được sử dụng phổ biến là: *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, *B. brongniari* (Sacc) Petch, *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin, *Metarhizium flavoviride* Gams & Rozsypal, *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) Brown & Smith, *Verticillium lecanii* (Zimmerman).

Balakrishnan *et al.* (2012) đã phân lập được nấm ký sinh *Metarhizium cylindrospora* trên ve sầu trưởng thành tại trang trại trồng cà phê ở quận Chikmagalur, Karnataka, Ấn Độ. Nấm *Cephalosporium lecanii* có hiệu quả trong việc phòng trừ rệp sáp hại rễ cà phê (Rutherford and Phiri, 2006).

Thực tế sản xuất cà phê ở Đắk Lắk cho thấy ve sầu, rệp sáp gây hại rễ cà phê sống ở trong đất nên việc phát hiện và phòng trừ gặp khó khăn. Trong quá trình trồng cà phê, các loài dịch hại này có xu hướng gia tăng theo thời gian. Đặc biệt, khi gặp điều kiện thuận lợi về nhiệt độ, độ ẩm, pH đất... chúng có thể phát sinh thành dịch và gây hại cho cây cà phê. Hàng năm, các loại côn trùng này gây hại trên diện tích hàng chục ngàn hecta cà phê, trong đó rệp sáp gây hại nặng hơn. Hầu như các vùng trồng cà phê của tỉnh Đắk Lắk đều bị rệp sáp gây hại. Trên cây cà phê, việc tuyển chọn các loại nấm ký sinh côn trùng đã được các đơn vị thực hiện như Viện Bảo vệ Thực vật nhưng các mẫu nấm này được thu thập từ rệp sáp hại quả cà phê (Phạm Văn Nhạ và cs., 2012a; 2012b). Việc nghiên cứu, tuyển chọn các chủng nấm ký sinh côn trùng để sản xuất chế phẩm phòng trừ côn trùng trong đất trồng cà phê (rệp sáp, ve sầu) còn ít, chỉ mới được thực hiện trên ve sầu, còn trên rệp sáp hại rễ chưa thấy công bố.

Đắk Lắk là vùng có ẩm độ thích hợp cho sự phát triển các loài nấm ký sinh côn trùng. Hiện tại trong các vườn cà phê xuất hiện nhiều chủng nấm ký sinh trên côn trùng sống trong đất như rệp sáp, ve sầu đã góp phần làm giảm sự gây hại của các loại dịch hại này. Chính vì vậy, việc thu thập các loại nấm ký sinh trên đối tượng sâu hại trong đất gây hại rễ cây cà phê (rệp sáp, ve sầu) tại vùng trồng cà phê để xác định tên và nghiên cứu nâng cao hiệu lực của các chủng nấm ký sinh được thu thập, đánh giá đặc tính sinh học và chọn lọc các chủng nấm ký sinh côn trùng có hoạt tính tốt để sản xuất chế phẩm sinh học phòng trừ rệp sáp, ve sầu gây hại rễ cà phê là rất cần thiết.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Các mẫu côn trùng bị nấm ký sinh tại các vùng trồng cà phê chính của tỉnh Đắk Lắk.

Đối tượng nghiên cứu: các loài nấm ký sinh côn trùng trong đất (rệp sáp, ve sầu) thuộc các chi *Beauveria*, *Cordyceps*, *Metarhizium*, *Paecilomyces*.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Thu thập, phân lập các chủng nấm ký sinh côn trùng trong đất gây hại rễ cà phê (rệp sáp, ve sầu)

- Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Thời gian nghiên cứu: 2013 - 2014

Địa điểm thu thập mẫu nấm ký sinh côn trùng: thu thập chủ yếu tại các vùng trồng cà phê chính của tỉnh Đắk Lắk: thành phố Buôn Ma Thuột (Ea Kao, Hòa Thuận), huyện Cư Kuin, huyện Cư M'gar, huyện Krông Păk, huyện Krông Ana, huyện Krông Năng. Thu thập mẫu bổ sung ở Hòa Thắng (Buôn Ma Thuột) và thị xã Buôn Hồ.

Địa điểm phân lập và nuôi cấy nấm ký sinh côn trùng: Phòng thí nghiệm của Bộ môn Bảo vệ Thực vật, Viện Khoa học Kỹ thuật Nông Lâm Nghiệp Tây Nguyên (WASI) và Phòng thí nghiệm của Bộ môn Bảo vệ Thực vật, Trường Đại học Tây Nguyên (TNU).

- Phương pháp thu thập mẫu: Tiến hành thu thập mẫu ve sầu và rệp sáp bị nhiễm nấm có trong tự nhiên cả trên cây và dưới đất trồng cà phê. Thu thập mẫu ve sầu trưởng thành ở trên cây hoặc trên bề mặt đất đối với các ve sầu trưởng thành khi vũ hóa lên bị nấm ký sinh tấn công. Đối với ve sầu và rệp sáp hại rễ ở dưới mặt đất tiến hành đào đất ở vùng rễ cây cà phê, quan sát và thu thập các mẫu ve sầu, rệp sáp bị nhiễm nấm. Đặt các mẫu côn trùng bị nấm ký sinh thu thập được vào các lọ đã được khử trùng, giữ điều kiện khô tự nhiên để tránh nhiễm nấm tạp, ghi nhãn địa điểm, thời gian thu thập đem về phòng thí nghiệm để phân lập, làm thuần, định danh.

- Phương pháp phân lập: Nấm được phân lập theo phương pháp của các tác giả: Chase (1986), Lê Tấn Hưng và cs. (2010): Cấy trực tiếp trên môi trường có bổ sung kháng sinh, phân lập theo phương pháp bào tử, phương pháp giải phẫu mô bệnh. Môi trường nuôi cấy nấm ký sinh côn trùng: PDA có bổ sung kháng sinh, môi trường chọn lọc nấm *Metarhizium*, môi trường SDAY3...

2.2.2. Định danh các chủng nấm ký sinh côn trùng được chọn lọc bằng kỹ thuật công nghệ sinh học

- Địa điểm nghiên cứu: Mẫu sau khi làm thuần tại WASI và TNU được gửi đi định danh tại Phòng xét nghiệm NK-BIOTEK, địa chỉ 793/58 Trần Xuân Soạn, phường Tân Hưng, quận 7, Thành phố Hồ Chí Minh.

- Phương pháp định danh: Định danh bằng phương pháp giải trình tự gen 28S. Các bước thực hiện như sau: Mẫu nấm sau khi nuôi cấy được đem ly trích DNA. Đo nồng độ DNA (25-500 ng/reaction) bằng máy Biophotometer. Lấy 5 μ l mẫu cho vào phản ứng PCR để khuếch đại đặc hiệu đoạn DNA trên vùng gen 28S rRNA của vi nấm bằng hệ thống máy PCR Thermal Cycler của Bio-Rad => sản phẩm PCR có kích thước 800 - 1.200bp. Điện di sản phẩm PCR trên gel agarose 2%, chụp hình bằng hệ thống máy Gel Doc của Bio - Rad. Tinh sạch sản phẩm

PCR bằng bộ QIA quick PCR Purification Kit của QIAGEN. Điện di sản phẩm đã tinh sạch bằng máy hệ thống máy Agilent 2100 Bioanalyzer. PCR SEQ sản phẩm đã tinh sạch trước khi giải trình tự trên hệ thống máy ABI 3130XL. Phân tích kết quả bằng phần mềm sequencing analysis 5.3 và so với kết quả trên ngân hàng gen trên cơ sở dữ liệu của NCBI (National Center for Biotechnology Information). Các mẫu nấm định danh đều được giải trình tự bằng môi trên vùng 28S do Phòng xét nghiệm NK-BIOTEK thiết kế. Tên cặp môi sử dụng trong phân loại: 28S-F và 28S-R.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Thu thập, phân lập, chọn lọc và định danh các chủng nấm ký sinh côn trùng trong đất gây hại rễ cà phê (rệp sáp, ve sầu) có trong tự nhiên

3.1.1. Thu thập, phân lập các chủng nấm ký sinh côn trùng trong đất gây hại rễ cà phê (rệp sáp, ve sầu)

Thu thập mẫu nấm ký sinh côn trùng tại 7 địa điểm trồng cà phê chính của tỉnh Đắk Lắk. Đối tượng chính thu mẫu là rệp sáp và ve sầu hại rễ cà phê. Tổng số lượng mẫu thu thập được trong năm 2013 là 421 mẫu (Bảng 1). Với cùng số lần và thời gian thu thập mẫu nhưng Thành phố Buôn Ma Thuột là địa phương thu được nhiều nhất mẫu nấm ký sinh côn trùng hại rễ (128 mẫu), kế đến là Cư M'gar (83 mẫu). Theo quan sát và đánh giá của chúng tôi, ở các vùng này vườn cà phê được trồng cây đai rừng chắn gió, điều kiện chăm sóc tốt... do vậy đã tạo điều kiện cho nấm ký sinh côn trùng phát triển.

Đặc điểm của ve sầu trưởng thành có giai đoạn vũ hóa, chui ra khỏi gốc cà phê với thời gian sống của ve sầu trưởng thành từ 24 ngày đến 30 ngày (Nguyễn Thị Thủy, 2009). Do vậy, khi bay lên chúng tiếp tục hút dinh dưỡng ở thân cây cà phê và các cây lâu năm khác. Trong quá trình sinh sống trên mặt đất, tỷ lệ ve sầu trưởng thành bị nấm ký sinh khá cao.

Bảng 1. Số lượng và tỷ lệ mẫu côn trùng bị nấm ký sinh thu thập được trên cây và dưới đất tại các địa điểm

Địa điểm	Số lượng mẫu bị nấm ký sinh côn trùng			Tỷ lệ (%)	
	Tổng số mẫu thu thập	Trên mặt đất	Dưới mặt đất	Trên mặt đất	Dưới mặt đất
Buôn Ma Thuột	128	68	60	53,13	46,88
Cư Kuin	53	22	31	41,51	58,49
Cư M'gar	83	49	34	59,04	40,96
Krông Păk	50	37	13	74	26
Buôn Hồ	10	10	0	100	0
Krông Ana	49	44	5	89,8	10,2
Krông Năng	48	40	8	83,33	16,67
Tổng cộng	421	270	151		
Trung bình	21,57	38,57	21,57	71,54	28,46

Bảng 2. Thành phần và số lượng các ký hiệu mẫu nấm ký sinh côn trùng phân lập được tại các địa điểm

Thành phần các chi nấm ký sinh côn trùng	Buôn Ma Thuột	Cư Kuin	Cư M'gar	Krông Păk	Buôn Hồ	Krông Ana	Krông Năng	Tổng cộng
<i>Beauveria</i>	1	1	1	1	0	0	1	5
<i>Cordyceps</i>	23	7	6	12	0	6	7	61
<i>Metarhizium</i>	18	4	7	12	2	16	14	73
<i>Paecilomyces</i>	2	1	1	0	0	5	8	17
Tổng cộng	44	13	15	25	2	27	30	156
Tỷ lệ (%)	28,21	8,33	9,62	16,03	1,28	17,31	19,23	

Lượng mẫu nấm ký sinh trên mặt đất thu thập được nhiều hơn so với dưới mặt đất, có tới 6/7 địa điểm điều tra (chiếm 85,71%) có số lượng nấm ký sinh trên mặt đất cao hơn so với dưới mặt đất. Tỷ lệ mẫu trên mặt đất tại 7 vùng điều tra lên tới 71,54% (270 mẫu), còn lại mẫu dưới mặt đất là 28,46% (151 mẫu) (Bảng 1). Trên đối tượng ve sầu, tỷ lệ bị nấm ký sinh nhiều hơn so với rệp sáp, mẫu ve sầu bị nấm ký sinh dễ nhận biết do nấm hình thành sợi nấm và bào tử. Trên ve sầu trưởng thành, biểu hiện bệnh do nấm ký sinh rõ, ve sầu bị nấm ký sinh hình thành các bọt bào tử màu xanh lá cây, màu trắng và màu xanh nhạt. Đối với ấu trùng ve sầu bị nấm ký sinh chết nằm trong đất, nấm hình thành quả thể, có thể nằm trong đất hoặc phát triển nhô lên khỏi mặt đất, có chiều cao vài cm, màu trắng. Đây là quả thể nấm thuộc lớp nấm túi, bộ

Cordyceps. Đối với nấm ký sinh rệp sáp hại rệp, tỷ lệ mẫu thu được tại các địa điểm rất thấp và khó phát hiện do rệp sáp gây hại rệp và nằm sâu trong đất. Mẫu rệp bị nấm ký sinh thu thập được có các màu sắc: màu trắng, hồng và vàng nhạt.

Thành phần và số lượng các ký hiệu mẫu nấm ký sinh phân lập được ở các địa điểm khá phong phú và đa dạng. Kết quả thể hiện ở bảng 2.

Từ số lượng mẫu thu thập được ở các địa phương của tỉnh Đắk Lắk, chúng tôi chọn ra các mẫu nấm ký sinh côn trùng điển hình để phân lập. Có 4 chi nấm ký sinh côn trùng đã được phân lập và định danh hình thái đến chi là *Beauveria*, *Cordyceps*, *Metarhizium*, *Paecilomyces* với tổng số 156 ký hiệu mẫu nấm được phân lập. Các chi nấm này được đề cập

nhiều khi nói đến nấm ký sinh côn trùng trên các loại cây trồng khác (Phạm Thị Thùy và cs., 2010; Copping and Menn, 2000; Hywel-Jones, 2002; Nguyễn Thị Lộc, 2010; Hà Thị Quyến và cs., 2002; Lê Tấn Hưng và cs., 2010...). Buôn Ma Thuột là địa điểm có số lượng mẫu phân lập nấm ký sinh côn trùng nhiều nhất (44/156 ký hiệu mẫu, tỷ lệ 28,21%). Kế đến là Krông Năng (30/156 ký hiệu mẫu nấm, tỷ lệ 19,23%) và Krông Ana (27/156 ký hiệu mẫu, tỷ lệ 17,31%).

Xét về mức độ phổ biến cho thấy: Chi nấm ký sinh côn trùng phổ biến nhất là *Metarhizium* (73 ký hiệu mẫu nấm), và thấp nhất là *Beauveria* (5 ký hiệu mẫu nấm).

Tại 7 điểm điều tra, các ký hiệu mẫu nấm ký sinh côn trùng thuộc chi *Metarhizium* được phân lập từ ve sầu bám trên cây hoặc ở dưới mặt đất. Khi ve sầu bị nấm này tấn công đa số có màu xanh trắng hoặc xanh đậm, thỉnh thoảng có màu trắng là do bào tử của nấm ở giai đoạn non. Chi nấm *Metarhizium* xuất hiện phổ biến và có mặt tại tất cả các địa điểm thu thập mẫu với tổng số 73 ký hiệu mẫu nấm, trong đó 70 ký hiệu mẫu nấm phân lập được trên ve sầu và chỉ có 3 ký hiệu mẫu nấm được phân lập từ rệp sáp.

Chi nấm *Cordyceps* ký sinh trên cả ve sầu và rệp sáp. Đây là chi nấm được phân lập nhiều thứ 2 (61 ký hiệu mẫu nấm). Tuy nhiên, số lượng mẫu ký sinh trên ve sầu chiếm đa số, chủ yếu thu thập được ở trong đất. Triệu chứng quan sát rõ trên cơ thể ve sầu bị nấm *Cordyceps* sp. ký sinh thường mọc thành quả thể nấm màu trắng. Buôn Ma Thuột là địa điểm có nhiều số lượng mẫu phân lập nấm *Cordyceps* sp. nhất. Riêng Buôn Hồ là điểm thu thập bổ

sung, nên chưa thu thập được các loài nấm thuộc chi *Cordyceps*.

Chi nấm *Paecilomyces* là một trong những chi nấm ký sinh côn trùng quan trọng được ứng dụng trong phòng trừ sinh học. Kết quả phân lập mẫu đã xác định được 15 ký hiệu mẫu nấm có nguồn gốc thu thập được từ ve sầu và 2 ký hiệu mẫu nấm trên rệp sáp hại rễ.

Chi nấm *Beauveria* chỉ phân lập được trên ve sầu. Khi ve sầu bị nhiễm nấm *Beauveria*, cơ thể sẽ có nấm bột màu trắng bao phủ. Nấm này đã được một số tác giả đặt tên là nấm trắng hay nấm bạch cương. Số lượng ký hiệu mẫu nấm thuộc chi *Beauveria* phân lập được rất ít, chỉ có 5 ký hiệu mẫu nấm trên tổng số 7 địa điểm điều tra.

3.1.2. Định danh các chủng nấm ký sinh côn trùng được chọn lọc bằng kỹ thuật công nghệ sinh học

Sau khi phân lập các mẫu nấm ký sinh côn trùng, chúng tôi tiến hành phân loại bằng hình thái theo từng chi nấm, đánh giá khả năng sinh trưởng của mẫu nấm trên các môi trường và chọn ra mẫu nấm có sự khác biệt về hình thái ở các vùng thu thập mẫu để gửi đi định danh bằng công nghệ sinh học.

Kết quả giải trình tự gen và so sánh với ngân hàng gen cho thấy cả hai ký hiệu mẫu nấm thuộc chi *Beauveria* đều thuộc loài *Beauveria bassiana*. Trong đó ký hiệu mẫu BN2 có độ tương đồng 650/650 cặp nucleotide (đạt 100%); Ký hiệu mẫu nấm BC15 có độ tương đồng 942/945 cặp nucleotide (đạt 99%). Loài nấm này cũng đã được tác giả Phạm Văn Nhạ và cs. (2012a, 2012b) công bố vào năm 2012 khi phân lập trên rệp sáp hại quả cà phê.

Bảng 3. Kết quả định danh mẫu bằng phương pháp giải trình tự gen 28 S đối với các mẫu nấm thuộc chi *Beauveria*

Ký hiệu mẫu	Trình tự tham chiếu	Kết quả định danh	Độ tương đồng	Địa điểm phân lập	Ký chủ
BC15	dbj AB027382.1	<i>Beauveria bassiana</i>	942/945 (99 %)	Cư Kuin	Ve sầu
BN2	gb HQ259059.1	<i>Beauveria bassiana</i>	650/650 (100 %)	Krông Năng	Ve sầu

**Bảng 4. Kết quả định danh mẫu bằng phương pháp giải trình tự gen 28 S
đối với các mẫu nấm thuộc chi *Cordyceps***

Ký hiệu mẫu	Trình tự tham chiếu	Kết quả định danh	Độ tương đồng	Địa điểm phân lập	Ký chủ
BB14	dbj AB237657.1	<i>Cordyceps bassiana</i>	655/656 (99%)	Buôn Ma Thuột	Ve sầu
BP13	dbj AB237657.1	<i>Cordyceps bassiana</i>	664/665 (99%)	Krông Păk	Ve sầu
BP12	dbj AB085888.1	<i>Cordyceps cicadae</i>	632/632 (100%)	Krông Păk	Ve sầu
BB31	dbj AB044637.1	<i>Cordyceps takaomontana</i>	932/941 (99%)	Buôn Ma Thuột	Ve sầu
BM4	dbj AB044637.1	<i>Cordyceps takaomontana</i>	911/920 (99%)	Cư M'gar	Ve sầu
BP6	dbj AB044637.1	<i>Cordyceps takaomontana</i>	623/628 (99%)	Krông Păk	Ve sầu
PA3	dbj AB044637.1	<i>Cordyceps takaomontana</i>	668/672 (99%)	Krông Ana	Ve sầu

**Bảng 5. Kết quả định danh mẫu bằng phương pháp giải trình tự gen 28 S
đối với các mẫu nấm thuộc chi *Metarhizium***

Ký hiệu mẫu	Trình tự tham chiếu	Kết quả định danh	Độ tương đồng	Địa điểm phân lập	Ký chủ
MA2	gb HQ165693.1	<i>Metarhizium cylindrospora</i>	551/554 (99%)	Krông Ana	Ve sầu
MB16	gb GU980049.1	<i>Metarhizium cylindrospora</i>	612/619 (99%)	Buôn Ma Thuột	Ve sầu
MC2	gb GU980049.1	<i>Metarhizium cylindrospora</i>	613/619 (99%)	Cư Kuin	Ve sầu
MM4	gb GU980049.1	<i>Metarhizium cylindrospora</i>	612/619 (99%)	Cư M'gar	Ve sầu
MP1	gb GU980049.1	<i>Metarhizium cylindrospora</i>	612/619 (99%)	Krông Păk	Ve sầu

Đối với chi *Cordyceps*, với 7 mẫu định danh thì có 2 mẫu thuộc loài *Cordyceps bassiana*, 1 mẫu thuộc loài *Cordyceps cicadae* và 4 mẫu thuộc loài *Cordyceps takaomontana*. Kết quả giải trình tự gen và so sánh với ngân hàng gen cho thấy ký hiệu mẫu nấm BP12 có độ tương đồng cao nhất, 632/632 cặp nucleotide (đạt 100 %) với nấm *Cordyceps cicadae*; Các ký hiệu mẫu nấm còn lại có độ tương đồng đạt 99 % so với nấm *Cordyceps bassiana* và *Cordyceps takaomontana*. Các loài thuộc chi *Cordyceps* phân lập từ ve sầu khác hẳn so với kết quả của Phạm Văn Nhạ và cs. (2011, 2012b) phân lập trên rệp sáp là loài *Cordyceps nutan*.

Cho đến nay, đây là kết quả nghiên cứu đầu tiên được công bố trên đối tượng nấm ký sinh trên ve sầu hại rệp tại Việt Nam.

Với chi *Metarhizium*, mặc dù được phân lập tại những địa điểm khác nhau tại các vùng trồng cà phê của tỉnh Đắk Lắk nhưng cả 5 ký

hiệu mẫu nấm đều có độ tương đồng là 99 % so với loài *Metarhizium cylindrospora*. Kết quả này cho thấy đây là loài nấm mới được phát hiện ký sinh trên ve sầu tại Tây Nguyên nói riêng và Việt Nam nói chung. Các kết quả nghiên cứu trước đây trên côn trùng hại lúa, rau màu, rệp sáp hại quả cà phê... của các tác giả trên thế giới và Việt Nam thì loài nấm được công bố là *Metarhizium anisopliae* (Phạm Thị Thùy và cs., 2010; Hà Thị Quyến và cs., 2002; Nguyễn Thị Lộc và cs., 2010; Trần Văn Hai và cs., 2009; Võ Thị Thu Oanh và cs., 2007; Phạm Văn Nhạ và cs., 2011; 2012a; 2012b). Kết quả này cùng phù hợp với công bố của Balakrishnan *et al.* (2012) khi phân lập nấm ký sinh trên ve sầu trưởng thành *Terpnosia psecas* Walker tại trang trại của Viện Nghiên cứu Cà phê ở quận Chikmagalur, Karnataka, Ấn Độ cũng xác định là loài *Metarhizium cylindrospora*.

Bảng 6. Kết quả định danh mẫu bằng phương pháp giải trình tự gen 28S đối với các mẫu nấm thuộc chi *Paecilomyces*

Ký hiệu mẫu	Trình tự tham chiếu	Kết quả định danh	Độ tương đồng	Địa điểm phân lập	Ký chủ
PA4	gb GQ229080.1	<i>Paecilomyces lilacinus</i>	962/971 (99%)	Không Ana	Rệp sáp
PB6	gb GQ229080.1	<i>Paecilomyces lilacinus</i>	931/941 (99%)	Buôn Ma Thuột	Ve sầu
PN6	dbj AB103380.1	<i>Paecilomyces lilacinus</i>	665/667 (99%)	Krông Năng	Rệp sáp
PN5	gb EF555097.3	<i>Paecilomyces hepiali</i>	890/905 (98%)	Krông Năng	Rệp sáp

Bốn ký hiệu mẫu nấm thuộc chi *Paecilomyces* được định danh thì có tới 75% số ký hiệu có độ tương đồng 99% với loài *Paecilomyces lilacinus*. Chỉ có 25% số mẫu còn lại có độ tương đồng là 98% so với loài *Paecilomyces hepiali*. Tại Việt Nam, hai loài *Paecilomyces lilacinus*, *Paecilomyces hepiali* lần đầu tiên được công bố trên rệp sáp hại rễ; Loài *Paecilomyces lilacinus* cũng lần đầu tiên công bố phân lập được trên ve sầu. Chưa tìm thấy công bố trên thế giới các loài này trên đối tượng rệp sáp và ve sầu hại rễ cà phê.

4. KẾT LUẬN

- Đã thu thập được 421 mẫu ve sầu và rệp sáp hại rễ cà phê bị nấm ký sinh tại 7 địa điểm trồng cà phê chính của tỉnh Đắk Lắk. Tỷ lệ mẫu trên mặt đất là 71,54%, còn lại mẫu dưới mặt đất là 28,46%. Trong đó, số mẫu thu thập được từ ve sầu chiếm đa số.

- Tổng số mẫu nấm ký sinh côn trùng phân lập là 156 ký hiệu thuộc 4 chi nấm ký sinh côn trùng bao gồm: *Beauveria*, *Cordyceps*, *Metarhizium*, *Paecilomyces*.

- Từ kết quả định danh bằng hình thái đã chọn 18 mẫu đi giải trình tự gen tại Thành phố Hồ Chí Minh. Kết quả đã định danh được 7 loài: *Beauveria bassiana*, *Cordyceps bassiana*, *Cordyceps cicadae*, *Cordyceps takaomontana*, *Metarhizium cylindrospora*, *Paecilomyces lilacinus*, *Paecilomyces hepiali*. Đây là các loài mới lần đầu tiên được công bố tại Việt Nam trên đối tượng rệp sáp và ve sầu hại rễ cà phê bằng phương pháp giải trình tự gen.

LỜI CẢM ƠN

Chúng tôi xin trân trọng cảm ơn Sở Khoa học và Công nghệ tỉnh Đắk Lắk đã cấp kinh phí để thực hiện đề tài: “Chọn lọc, ứng dụng một số chủng nấm ký sinh côn trùng trong đất có khả năng phòng trừ côn trùng hại rễ cây cà phê tại Đắk Lắk”.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Balakrishnan M. M., Manjunatha Reddy G. V. and Vinod Kumar P. K. (2012). Record of *Metarhizium cylindrosporum* (Hypocreales: Clavicipitaceae) on *Terpnosia psecas* from India. *Insect Environment*, 18(1&2), April-September 2012.
- Chase A. R., Osborne L. S. and Ferguson V. M. (1986). Selective isolation of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* from an artificial porting medium. *Florida entomology*, 69: 285 - 292.
- Copping L. G., Menn J. J. (2000). Review Biopesticide: a review of their action applications and efficacy. *Pest Management Science*, 56: 651 - 676.
- Hà Thị Quyên, Tạ Kim Chinh, Hoa Thị Minh Tú, Lại Khánh Linh và Nguyễn Ngọc Quyên (2002). Ảnh hưởng của điều kiện bảo quản giống đến đặc tính sinh học của vi nấm diệt côn trùng *Metarhizium anisopliae* và *Beauveria bassiana*. Báo cáo khoa học, Hội nghị Côn trùng học Toàn quốc lần thứ 4, Hà Nội, 11-12/04/2002, Nhà Xuất bản Nông Nghiệp, tr. 401 - 405.
- Hywel-Jones N. L. (2002). The importance of invertebrate-pathogenic fungi from the tropics. *Trop. Mycol.*, 2: 133-144.
- Lê Tấn Hưng, Võ Thị Hạnh, Lê Thị Bích Phượng, Trần Thanh Phong, Trương Thị Hồng Vân, Somsak Sivichai (2010). Nấm côn trùng tại Vườn Quốc gia Cát Tiên: nguồn tài nguyên quý cho các ứng dụng sinh học. Hội nghị Khoa học kỷ niệm 35 năm Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Hà Nội, ngày 26/10/2010.

- Mike A. Rutherford and Noah Phiri (2006). Pests and Diseases of Coffee in Eastern Africa: A Technical and Advisory Manual. CAB International, 68 pp.
- Nguyễn Thị Lộc (2010). Báo cáo tổng hợp kết quả khoa học công nghệ dự án hoàn thiện quy trình công nghệ sản xuất hai chế phẩm trừ sâu sinh học Ometar và Biovip. Viện Lúa Đồng bằng Sông Cửu Long - Bộ Khoa học và Công nghệ. Dự án sản xuất thử nghiệm độc lập cấp Nhà nước, 72 trang.
- Nguyễn Thị Thủy (2009). Tình hình ve sầu hại cà phê ở Tây Nguyên và biện pháp phòng trừ. Truy cập ngày 10 tháng 5 năm 2012 tại: <http://ppri.org.vn>.
- Phạm Văn Nhạ, Hồ Thị Thu Giang, Phạm Thị Vượng, Đồng Thị Thanh, Trần Thị Tuyết, Đặng Thanh Thúy, Phạm Duy Trọng (2011). Giám định một số chủng nấm ký sinh rệp sáp hại cà phê bằng phương pháp DNA. Tạp chí Khoa học và phát triển, 9(5): 713-718.
- Phạm Văn Nhạ, Hồ Thị Thu Giang, Phạm Thị Vượng, Đồng Thị Thanh, Trần Thị Tuyết, Đặng Thanh Thúy, Phạm Duy Trọng (2012a). Kết quả nghiên cứu một số chủng nấm ký sinh trên rệp sáp hại cà phê tại Tây Nguyên. Tạp chí Khoa học và phát triển, 10(1): 34-40.
- Phạm Văn Nhạ, Nguyễn Văn Hoa, Đồng Thị Thanh, Trần Thị Tuyết, Phạm Duy Trọng, Đặng Thanh Thúy, Nguyễn Thị Dung, Phùng Thị Hoa, Phí Thị Thu Hà, Nguyễn Ngọc Ước, Trần Thị Hoàng Anh, Cù Thị Dân, Đào Thị Lan Hoa, Nguyễn Văn Trung, Hà Văn Lán (2012b). Nghiên cứu tạo chế phẩm sinh học phòng chống rệp sáp và nấm cộng sinh hại cà phê. Chương trình trọng điểm phát triển và ứng dụng công nghệ sinh học trong lĩnh vực nông nghiệp và phát triển nông thôn đến năm 2020.
- Phạm Thị Thùy, Hoàng Thị Thùy Linh, Nguyễn Thị Ngọc Trâm, Hồ Thị Thu Giang, Nguyễn Thị Kim Liên, Hồ Sỹ Quát (2010). Nghiên cứu phát triển các nguồn nấm côn trùng *Beauveria*, *Metarhizium* để ứng dụng phòng trừ sâu hại cây trồng, cây rừng và phát triển nguồn nấm *Cordyceps* sp. làm thực phẩm chức năng cho người. Báo cáo tổng hợp kết quả nghiên cứu khoa học công nghệ. Nhiệm vụ hợp tác khoa học công nghệ theo nghị định thư giữa Việt Nam và Trung Quốc (2008 - 2010). Bộ Khoa học và Công nghệ - Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn - Viện Bảo vệ Thực vật, 77 trang.
- Trần Văn Hai, Trịnh Thị Xuân, Phạm Kim Sơn (2009). Khảo sát đặc tính sinh học của sâu xếp lá đậu phộng *Archips micaceranawalker* và hiệu lực của một số chủng nấm xanh *Metarhizium anisopliae* Sorokin đối với dịch hại này tại Trà Vinh. Tạp chí Khoa học, 11: 54-62.
- 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 Khoa học Kỹ thuật Nông Lâm nghiệp, Đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh, 1&2: 58 - 63.