

## HIỆU LỰC GÂY CHẾT VÀ KHẢ NĂNG SINH SẢN CỦA NĂM CHỦNG TUYẾN TRÙNG EPN TRÊN BỌ HUNG ĐEN (*ALISSONOTUM IMPRESSICOLLE* ARROW) TRONG ĐIỀU KIỆN PHÒNG THÍ NGHIỆM

Đỗ Tuấn Anh, Nguyễn Hữu Tiên, Nguyễn Ngọc Châu<sup>✉</sup>

Viện Sinh thái và tài nguyên sinh vật, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

<sup>✉</sup> Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: chaunguyen@iebr.vast.vn

Ngày nhận bài: 07.9.2016

Ngày nhận đăng: 25.3.2017

### TÓM TẮT

Lần đầu tiên chúng tôi đã sử dụng 5 chủng tuyến trùng EPN, 3 chủng S-PQ16, S-S-CP12 và S-TX1 thuộc giống *Steinernema* và 2 chủng H-KT3987 và H-CB3452 thuộc giống *Heterorhabditis indica* để thăm dò khả năng phòng trừ bọ hung đen (*Alissonotum impressicolle* Arrow) một đối tượng gây hại phổ biến đối với mía và nhiều loại cây trồng ở Lâm Đồng. Kết quả đánh giá 2 chỉ tiêu quan trọng nhất là hiệu lực gây chết và khả năng sinh sản của 5 chủng tuyến trùng EPN bản địa Việt Nam, cho thấy: cả 5 chủng có khả năng gây chết sùng trắng cao, với tỷ lệ bọ chết lần lượt là 93,3 %; 86,7 %; 93,3 %; 86,7 % và 73,3 % ở cùng nồng độ nhiễm 5000 IJs/bọ. Mặc dù, các chủng tuyến trùng thử nghiệm đều có chỉ số gây chết 50 % (LC<sub>50</sub>) khá cao, từ 1362 đến 2725 IJs cả 5 chủng tuyến trùng EPN trong thử nghiệm đều đáp ứng chuẩn của tác nhân sinh học để phòng trừ bọ hung trong đất. Kết quả thí nghiệm cũng cho thấy khả năng sinh sản của các chủng EPN trong sùng trắng khá cao, trong đó sản lượng IJs trung bình thu được trên mỗi sùng trắng là  $31,0 \times 10^3$  IJs đối với chủng S-CP12; tương tự  $59,7 \times 10^3$  IJs đối với chủng S-PQ16 và  $73,5 \times 10^3$  IJs đối với chủng S-TX1. Sản lượng IJs ở 2 chủng *Heterorhabditis indica* đạt mức cao nhất là  $125,1 \times 10^3$  IJs ở chủng H-KT3987 và  $112,6 \times 10^3$  IJs đối với chủng H-CB3452. Với các kết quả như trên cả 5 chủng tuyến trùng EPN bản địa đều có thể đáp ứng tiêu chí về độc lực và sinh sản để sử dụng trong phòng trừ bọ hung đen hại cây trồng.

**Từ khóa:** Bọ hung, *Alissonotum impressicolle*, tuyến trùng EPN, chủng S-PQ16, S-CP12, S-TX1, H-KT3987, H-CB3452, độc lực LC<sub>50</sub>, hiệu lực gây chết, khả năng sinh sản

### GIỚI THIỆU

Các loài tuyến trùng ký sinh gây bệnh côn trùng (entomopathogenic nematodes – EPN) thực chất là các tổ hợp cộng sinh chuyên hóa giữa các loài tuyến trùng ký sinh thuộc 2 giống *Steinernema* (Họ Steinernematidae) và *Heterorhabditis* (Họ Heterorhabditidae) và các loài vi khuẩn gây bệnh thuộc 2 giống *Xenorhabdus* và *Photorhabdus* của Họ Enterobacteriaceae. Các tổ hợp ký sinh gây bệnh cho côn trùng này sở hữu nhiều đặc trưng quý giá như diệt nhiều loài sâu hại, có thể sản xuất và thương mại hóa thành thuốc sinh học tuyến trùng sử dụng trong phòng trừ sinh học sâu hại cây trồng nông nghiệp. Trong số các đối tượng sâu hại cây trồng thì ấu trùng bọ hung (còn gọi là sùng trắng) là một trong những đối tượng gây hại quan trọng ở các vùng trồng mía, ngô, rau màu trên thế giới và ở Việt Nam. Đặc biệt loài bọ hung đen *Alissonotum impressicolle* Arrow, 1908 là đối tượng sâu hại nghiêm trọng nhất cho các

vùng trồng mía ở miền nam Trung Quốc và ở các tỉnh miền trung và Tây Nguyên Việt Nam. Loài côn trùng này ẩn náu trong đất, có vòng đời trên dưới một năm, hại rễ và thân ngầm của các cây trồng dưới mặt đất nên rất khó phòng trừ bằng các thuốc hóa học. Trong khi đó, nhiều nghiên cứu ở Mỹ, Úc, Trung Quốc và Việt Nam đã sử dụng tuyến trùng EPN để phòng trừ sùng trắng trong đất cho kết quả tốt (Klein *et al.*, 2007; Koppenhöfer *et al.*, 1999; Koppenhöfer, Fuzy, 2003; Nguyễn Ngọc Châu, 1998; 2008; Lại Phú Hoàng *et al.*, 2003; Vũ Tú Mỹ *et al.*, 2004). Đặc biệt, theo Klein, Georgis (1992) một số chế phẩm sinh học tuyến trùng EPN đã được sử dụng phòng trừ bọ hung hại mía khá hiệu quả. Thực tế cho thấy, bọ hung là một trong các đối tượng rất mất cảm với tuyến trùng EPN, hơn nữa do bọ hung có vòng đời phát triển từ pha ấu trùng đến trưởng thành chủ yếu trong đất nên đây là đối tượng hấp dẫn của tuyến trùng EPN trong tự nhiên.

Nhằm đánh giá khả năng phòng trừ đối tượng bọ hung hại mía và cây trồng ở Tây Nguyên, chúng tôi đã triển khai các thí nghiệm đánh giá hiệu lực gây chết ấu trùng bọ hung của một số chủng tuyến trùng bản địa trong điều kiện phòng thí nghiệm và qua đó cũng xác định khả năng sinh sản của các chủng tuyến trùng này bên trong ấu trùng bọ hung.

## VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### Vật liệu

*Tuyến trùng*: sử dụng 5 chủng tuyến trùng bản địa, được nhân nuôi và bảo quản tại phòng Tuyến trùng học, Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật. Trong đó, 3 chủng có ký hiệu S-PQ16 (loài *Steinernema* sp.), S-CP12 (loài *Steinernema loci*) và S-TX1 (loài *Steinernema sangi*); và 2 chủng kí hiệu: H-KT3987 và H-CB3452 (loài *Heterorhabditis indica*). Ấu trùng cảm nhiễm (infective juveniles - IJs) của các chủng EPN này được bảo quản trong nước cất ở nhiệt độ 12-14°C.

*Ấu trùng bọ hung đen* (*A. impressicolle* Arrow) còn gọi là sùng trắng tuổi 2, 3 được Chi cục Bảo vệ thực vật Lâm Đồng thu thập tại các vườn sầu riêng, măng cụt và chôm chôm ở xã Đạ Mri, huyện Đạ Huoai, Tỉnh Lâm Đồng. Đây là vùng đất cát pha, có độ cao trung bình 500 m, trước đây trồng mía bị bọ hung đen hại nặng nên sau đó người dân bỏ mía chuyển sang trồng cây ăn quả như sầu riêng, măng cụt và chôm chôm nhưng vẫn bị bọ hung gây hại khá phổ biến. Mẫu sùng trắng thu được từ vùng đất quanh rễ (rhizosphere) của các cây ăn quả có dấu hiệu còi cọc, được bảo quản riêng rẽ từng con trong hộp nhựa nhỏ và đóng thùng xốp gửi máy bay trong ngày ra Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật để thí nghiệm.

*Quy trình thử nghiệm*: Mỗi ấu trùng bọ hung được đặt vào một giếng của hộp thử nghiệm 6 giếng, các giếng được đặt sẵn giấy lọc ẩm có chứa tuyến trùng theo định lượng nồng độ thí nghiệm. Mỗi hộp như vậy triển khai một công thức nồng độ. Mỗi chủng tuyến trùng thí nghiệm 10 công thức nồng độ tuyến trùng gây nhiễm từ 500 IJs đến 5.000 IJs/ sâu và 1 đối chứng, thí nghiệm lặp lại 3 lần. Các hộp thí nghiệm sau khi gây nhiễm được để trong buồng tối ở nhiệt độ  $25 \pm 3^\circ\text{C}$  và ẩm độ  $80 \pm 5\%$ . Hàng ngày kiểm tra, ghi lại số lượng sâu chết. Sâu chết được xác nhận bởi xác chết có màu nâu đen đặc trưng (đối với các chủng *Steinernema*) và màu gạch đỏ (đối với các chủng *Heterorhabditis*), không có mùi thối và có thể quan sát dưới kính hiển vi soi nổi thấy có tuyến

trùng EPN vận động ở bên trong. Trong vòng 7 ngày, các sâu chết được ghi lại và chuyển ra ủ trên giấy lọc ẩm trong vòng 3-5 ngày ấu trùng cảm nhiễm bắt đầu thoát ra khỏi xác chết bọ hung được thu bằng bẫy nước theo White (1927). Số lượng IJs thu hoạch được xác định bằng đĩa đếm dưới kính hiển vi soi nổi OLYMPUS SZH10.

*Xử lý thống kê*: Hiệu lực gây chết ở các nồng độ IJs gây nhiễm khác nhau được xử lý theo quy trình PROBIT để tính trị số  $LC_{50}$ . Tỷ lệ bọ hung chết được phân tích one-way ANOVA theo Tukey's test với  $P = 0.05$  (SPSS, 1999). Giá trị trung bình IJs sinh trên mỗi sùng trắng được xử lý thống kê theo Anon (1988).

## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### Hiệu lực gây chết sùng trắng của 5 chủng tuyến trùng EPN bản địa Việt Nam

Hiệu lực gây chết vật chủ côn trùng (pathogenicity) chính là khả năng gây bệnh và giết chết vật chủ côn trùng của chủng tuyến trùng, đây cũng chính là độc lực (virulence) của chủng tuyến trùng được thể hiện bằng chỉ số  $LC_{50}$  là nồng độ gây chết 50% sâu hại của chủng tuyến trùng. Kết quả thí nghiệm sau 7 ngày gây nhiễm cho thấy: ở nồng độ thấp nhất là 500 IJs đã có 6,7% sâu chết ở chủng H-CB3452 đến 26,7% sâu chết ở chủng H-KT3987 (Bảng 1). Như vậy, 2 chủng của loài *Heterorhabditis indica* thể hiện độc lực sai khác với tỷ lệ sâu chết thấp nhất và cao nhất ở nồng độ gây nhiễm này. Ba chủng khác của giống *Steinernema* là S-PQ16 và S-TX1 đều có tỷ lệ sâu chết là 20%, trong khi S-CP12 là 13,3%. Ở các nồng độ nhiễm cao hơn thì tỷ lệ sâu chết đều tăng và mức độ tăng tương đối đồng đều ở các chủng EPN thí nghiệm. Ở nồng độ 2000 IJs/sâu, chủng S-TX1 có tỷ lệ gây chết cao nhất là 66,7%, tiếp đến chủng S-PQ16 (53,3%), chủng S-CP12 và H-KT3987 (46,7%), còn chủng H-CB3452 chỉ gây chết thấp nhất là 40,0%. Tỷ lệ gây chết đến 80,0% bởi chủng S-PQ16 ở nồng độ nhiễm 4000 IJs; ở chủng S-CP12 và H-KT3987 là 4.500 IJs; chủng S-TX1 thấp nhất là ở 3500 IJs/bọ hung; còn chủng H-CB3452 tỷ lệ chết cao nhất chỉ đạt 73,3%. Ở công thức nồng độ nhiễm cao nhất là 5.000 IJs/bọ hung thì có 2 chủng cho tỷ lệ chết cao nhất 93,3% là S-PQ16 và S-TX1, trong khi đó S-CP12 và H-KT3987 cho tỷ lệ ít hơn là 86,7% còn chủng H-CB3452 chỉ đạt 73,3%. Trong 5 chủng thí nghiệm hiệu lực gây chết của 3 chủng *Steinernema* có phần mạnh hơn 2 chủng *Heterorhabditis*.

Kết quả thí phân tích thống kê (với  $P < 0,05$ ) cũng cho thấy tỷ lệ sâu chết bởi tất cả các chủng tuyến trùng ở 2 công thức nồng độ thấp 500 và 5.000 IJs là sai khác có ý nghĩa. Đối với chủng S-PQ16, sự sai khác giữa nồng độ 500 và 1.000 IJs với 4.000, 4.500 và 5.000 IJs là có ý nghĩa thống kê, trong khi thì ở các nồng độ gây nhiễm từ 1.500 đến 3.500 IJs, thì sự sai khác lại không có ý nghĩa. Chủng S-CP12 thể hiện sự sai khác về tỷ lệ chết của bọ hung là không có ý nghĩa ở 4 nồng độ nhiễm 1.000, 1.500, 2.000 và 2.500 IJs. Sự sai khác về tỷ lệ sâu chết cũng không có ý nghĩa thống kê ở chủng S-TX1 từ công thức 1.500 đến 3.500 IJs, ở chủng H-KT3987 với các nồng độ từ 1.000 đến 3.000 IJs hay 3500 đến 4.000 IJs và ở chủng H-CB3452 với các công thức nồng độ từ 1.000 đến 2.500 IJs hay 3.500, 4.000 và 4.500 IJs/sâu.

Như vậy, mặc dù nồng độ gây nhiễm có ảnh hưởng đến tỷ lệ sâu chết nhưng thực chất cả hai

thông số liên đới là nồng độ gây nhiễm và tỷ lệ gây chết đều phụ thuộc vào độc lực của chủng tuyến trùng. Độc lực của một chủng tuyến trùng được phản ánh bằng chỉ số  $LC_{50}$  là nồng độ gây chết 50% sâu hại của một chủng tuyến trùng EPN, theo đó giá trị  $LC_{50}$  của một chủng EPN càng thấp chứng tỏ chủng EPN có độc lực càng mạnh. Giá trị  $LC_{50}$  của một chủng EPN là một trong những chỉ số quan trọng nhất giúp chọn lựa chủng EPN và liều áp dụng thích hợp cho phòng trừ sâu hại (Grewal *et al.*, 2005).

Số liệu thu được trong thí nghiệm của chúng tôi cho thấy, chủng H-CB3452 có  $LC_{50} = 2.725$  IJs là cao nhất; tiếp đến là chủng S-CP12 có giá trị  $LC_{50}$  là 2059 IJs; hai chủng S-PQ16 và H-KT3987 có  $LC_{50}$  chênh lệch nhau đôi chút, lần lượt là 1696 IJs và 1.773 IJs; còn chủng S-TX1 có  $LC_{50}$  thấp nhất là 1362 IJs là chủng có độc lực mạnh nhất trong số 5 chủng thử nghiệm.

**Bảng 1.** Hiệu lực gây chết ấu trùng bọ hung của 5 chủng EPN ( $T = 25 \pm 3^\circ C$ ;  $H = 80 \pm 5\%$ )\*.

Nồng độ IJs	Hiệu lực gây chết (%) của các chủng EPN **				
	S-PQ16	S-CP12	S-TX1	H-KT3987	H-CB3452
500	20,0 ± 0,0 b	13,3 ± 11,5 d	20,0 ± 20,0 c	26,7 ± 23,1 c	6,7 ± 11,5 c
1000	26,7 ± 11,5 b	20,0 ± 20,0 cd	33,3 ± 11,5 c	33,3 ± 11,5 bc	13,3 ± 11,5 bc
1500	40,0 ± 20,0 ab	40,0 ± 20,0 cd	53,3 ± 11,5 bc	40,0 ± 20,0 bc	33,3 ± 23,1 bc
2000	53,3 ± 23,1 ab	46,7 ± 11,5 cd	66,7 ± 11,5 bc	46,7 ± 11,5 bc	40,0 ± 20,0 bc
2500	60,0 ± 0,0 ab	53,3 ± 11,5 cd	70,0 ± 17,3 bc	53,3 ± 11,5 bc	46,7 ± 11,5 bc
3000	66,7 ± 23,1 ab	60,0 ± 0,0 bc	73,3 ± 11,5 bc	60,0 ± 0,0 bc	53,3 ± 11,5 ab
3500	73,3 ± 11,5 ab	66,7 ± 11,5 bc	80,0 ± 0,0 bc	66,7 ± 11,5 ab	60,0 ± 0,0 ab
4000	80,0 ± 34,6 a	73,3 ± 11,5 ab	86,7 ± 11,5 ab	73,3 ± 11,5 ab	60,0 ± 20,0 ab
4500	86,7 ± 11,5 a	80,0 ± 0,0 ab	90,0 ± 17,3 ab	80,0 ± 20,0 ab	66,7 ± 11,5 ab
5000	<b>93,3 ± 11,5 a</b>	86,7 ± 23,1 a	<b>93,3 ± 11,5 a</b>	86,7 ± 11,5 a	73,3 ± 20,0 a
Đối chứng	0	0	0	0	0
$LC_{50}$	<b>1696</b>	<b>2059</b>	<b>1362</b>	<b>1773</b>	<b>2725</b>

\* Chữ viết tắt trong ngoặc T = nhiệt độ; H = ẩm độ; \*\*chữ cái khác nhau trong cùng một cột thể hiện sai khác có ý nghĩa (xử lý thống kê theo Tukey với  $p \leq 0,05$ )

**Khả năng sinh sản của các chủng EPN trên sùng trắng**

Khác với các tác nhân sinh học khác, tuyến trùng EPN sau khi xâm nhập gây chết côn trùng vật chủ thì tổ hợp tuyến trùng-vi khuẩn cộng sinh cũng bắt đầu quá trình sinh sản và phát triển bên trong xác chết côn trùng. Quá trình sinh sản và phát triển có thể lặp lại 2-3 thế hệ và tạo ra một lượng ấu trùng

tuổi 2, các ấu trùng này sẽ thoát khỏi xác côn trùng ra môi trường thành ấu trùng cảm nhiễm (IJs). Số thế hệ và sản lượng IJs sản sinh ra phụ thuộc vào 3 yếu tố chính: i) sự miễn cảm của côn trùng vật chủ đối với chủng tuyến trùng; ii) kích thước của ấu cảm nhiễm, kích thước IJs là đồng nhất cho mỗi loài và chúng rất khác nhau ở các loài tuyến trùng EPN, ấu trùng cảm nhiễm càng có kích thước nhỏ thì sản lượng IJs sinh ra trong côn trùng vật chủ càng lớn và

ngược lại; iii) Sinh khối của côn trùng vật chủ - côn trùng vật chủ càng có kích thước lớn (sinh khối lớn) càng tạo ra sản lượng IJs lớn (Nguyễn Ngọc Châu, 2008). Theo Kaya, Gaugler (1993) khả năng sinh sản của tuyến trùng EPN trong cơ thể côn trùng vật chủ được coi là một trong các tiêu chí quan trọng để đánh giá tiềm năng phòng trừ sinh học của một chủng tuyến trùng EPN vì khả năng sinh sản và tái nhiễm cũng chính là ưu thế của tuyến trùng EPN khi phun rải trên đồng ruộng. Các ấu trùng cảm nhiễm sau khi được tạo thành trong xác chết côn trùng vật chủ sẽ được phát tán ra môi trường đất và tiếp tục xâm nhập vào côn trùng vật chủ mới. Để đánh giá khả năng sinh sản của 5 chủng EPN trên sùng trắng, chúng tôi đã giữ lại toàn bộ sùng trắng đã chết trong thí nghiệm đánh giá độc lực của 5 chủng tuyến trùng trên, nhằm đánh giá khả năng sinh sản của các chủng EPN trong xác chết sùng trắng. Theo đó, trong vòng 7 ngày, mỗi ngày một lần tiến hành thu IJs của các chủng EPN thoát ra từ xác chết của bọ hung bằng kỹ thuật bẫy nước (White, 1927).

Mặc dù sản lượng IJs trung bình thu được của 5 chủng EPN khác nhau (Bảng 2, Hình 1) nhưng đều quy luật chung là tăng dần theo nồng độ đến một

điểm tối ưu và sau đó giảm dần. Do vậy, sản lượng IJs của mỗi chủng EPN phụ thuộc vào sự miễn cảm của côn trùng vật chủ đối với chủng tuyến trùng EPN, khả năng sinh sản của chủng tuyến trùng và như nồng độ IJs gây nhiễm ban đầu.

Trong thí nghiệm của chúng tôi, sản lượng IJs trung bình cao nhất của chủng S-PQ16 trên một sùng trắng là  $59,7 \times 10^3$  IJs, ứng với nồng độ nhiễm tối ưu là 2.500 IJs/bọ hung. Chủng S-CP12 cho sản lượng IJs trung bình trên một sùng trắng là  $31,0 \times 10^3$  IJs với nồng độ tối ưu 3.000 IJs/bọ hung. Chủng S-TX1 cho sản lượng trung bình là  $73,5 \times 10^3$  IJs/sâu, tương ứng với nồng độ tối ưu là 2.000 IJs, đây là chủng *Steinernema* cho sản lượng IJs cao hơn hẳn với nồng độ gây nhiễm tối ưu thấp hơn 2 chủng *Steinernema* trên (Bảng 2). Sản lượng của các chủng EPN trong xác chết côn trùng vật chủ không chỉ phụ thuộc vào sinh khối của vật chủ mà còn phụ thuộc vào kích thước của ấu trùng cảm nhiễm. Theo đó, IJs của chủng S-TX1 có kích thước nhỏ nhất trong 4 chủng giống *Steinernema* thử nghiệm nên có sản lượng cao nhất; trong khi đó các chủng S-CP12 và S-PQ16 có kích thước IJs lớn hơn nên sản lượng IJs thu được cũng thấp hơn.

**Bảng 2.** Sản lượng IJs của 5 chủng EPN trên sùng trắng (T = 25 ± 3°C; H = 80 ± 5 %)\*.

Nồng độ nhiễm (IJs)	Sản lượng IJs ( $\times 10^3$ )				
	S-PQ16	S-CP12	S-TX1	H-KT3987	H-CB3452
500	19,8 ± 5,3	6,7 ± 4,1	17,3 ± 2,1	66,4 ± 7,6	77,5 ± 5,2
1000	22,6 ± 2,8	14,0 ± 3,3	35,9 ± 2,7	79,7 ± 5,8	93,4 ± 6,3
1500	33,0 ± 2,4	19,4 ± 2,7	59,9 ± 2,9	95,0 ± 3,2	104,9 ± 8,3
2000	46,5 ± 2,1	21,5 ± 2,8	<u>73,5 ± 3,2</u>	108,2 ± 4,4	<u>112,6 ± 3,2</u>
2500	<u>59,7 ± 3,0</u>	24,2 ± 3,8	61,4 ± 2,7	<u>125,1 ± 5,2</u>	98,0 ± 4,2
3000	44,1 ± 2,5	<u>31,0 ± 3,3</u>	49,0 ± 2,5	88,3 ± 3,2	80,4 ± 9,2
3500	38,7 ± 3,6	22,7 ± 2,5	35,2 ± 3,3	67,8 ± 5,2	66,1 ± 2,1
4000	26,9 ± 2,6	12,3 ± 2,6	21,5 ± 3,1	41,5 ± 6,3	52,2 ± 5,2
4500	12,5 ± 3,7	10,5 ± 3,5	12,0 ± 2,5	27,0 ± 4,0	36,5 ± 4,1
5000	9,0 ± 3,5	9,1 ± 3,1	5,7 ± 3,5	13,9 ± 5,3	21,7 ± 5,3
<b>R<sup>2</sup></b>	<b>0,8441</b>	<b>0,8093</b>	<b>0,8124</b>	<b>0,8798</b>	<b>0,9344</b>

\* Chữ viết tắt trong ngoặc T = nhiệt độ; H = ẩm độ.

Khác với các chủng *Steinernema* trên, hai chủng của loài *Heterohabditis indica* là H-KT3987 và H-CB3452 có sản lượng IJs cao hơn nhiều, trong đó chủng H-KT3987 cho sản lượng trung bình cao nhất là  $125,1 \times 10^3$  IJs/sâu ở nồng độ nhiễm 2.500 IJs/sâu; còn chủng H-CB3452 cho sản lượng trung bình

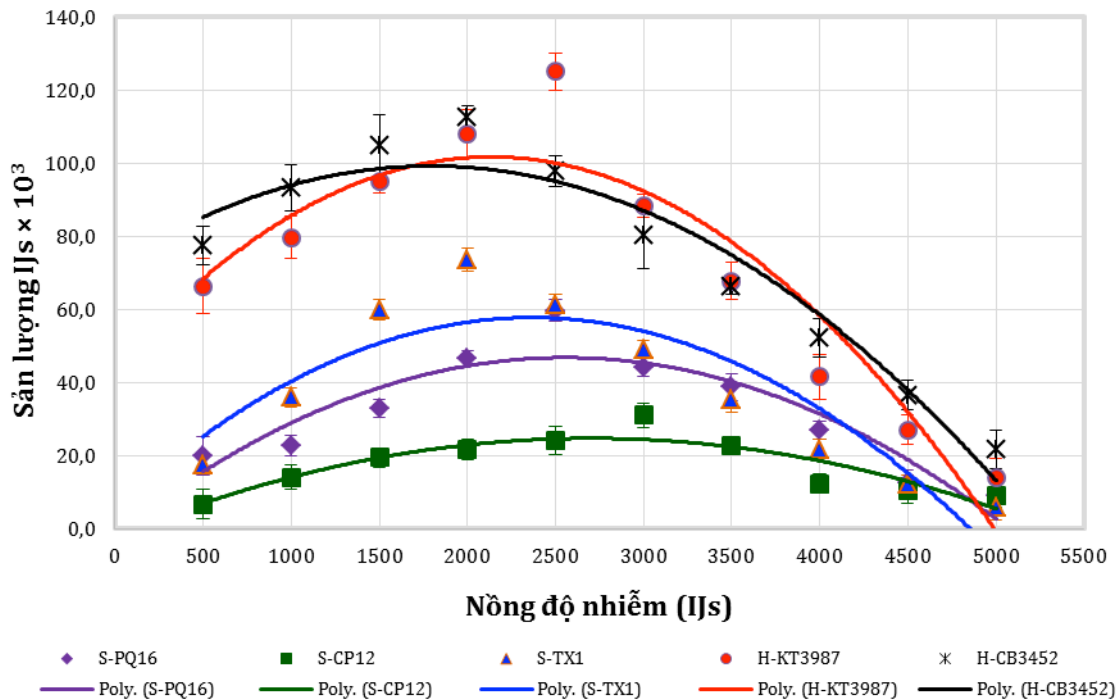
$112,6 \times 10^3$  IJs ở nồng độ nhiễm tối ưu 2.000 IJs/sâu (Bảng 2). Thực tế, kích thước IJs của các chủng *Heterohabditis* thường nhỏ hơn nhiều so với kích thước IJs của các chủng *Steinernema*. Vì vậy cùng một côn trùng vật chủ có sinh khối như nhau các chủng *Heterohabditis* thường tạo ra sản lượng IJs

cao hơn nhiều so với các chủng *Steinernema*.

Hằng số tương quan  $R^2$  của cả 5 chủng đều cao hơn 0.8 (0.8-0.92) cho thấy hầu hết các chủng có mối tương quan giữa nồng độ gây nhiễm và sản lượng IJs là khá chặt chẽ ( $R^2 \geq 0,8$ ) trong đó chủng H-CB3452 có giá trị tương quan cao nhất ( $R^2 = 0,93$ ). Điều này cho thấy sản lượng IJs sinh ra trong côn trùng vật chủ phụ thuộc chặt chẽ vào nồng độ gây nhiễm ban đầu. Khả năng sinh sản của mỗi chủng EPN đều thể hiện bằng một đồ thị hình parabol, trên đó đỉnh đồ thị parabol ứng với sản lượng IJs cao nhất và sản lượng IJs cao nhất cũng ứng với một nồng độ gây nhiễm nhất định gọi là nồng độ tối ưu, ở nồng độ cao hơn hoặc thấp hơn đều cho sản lượng thấp hơn.

Nhìn chung bọ hung là đối tượng khá miễn cảm với nhiều chủng tuyến trùng EPN, trong đó các chủng tuyến trùng EPN không chỉ tiêu diệt được bọ hung ở các giai đoạn ấu trùng kể cả giai đoạn trưởng

thành ấu náu trong môi trường đất. Nghiên cứu trước đây của Lại Phú Hoàng *et al.* (2003) cũng đã sử dụng 4 chủng EPN bản địa Việt Nam gồm S-TK10, S-TX1, H-MP11, H-NT3 để thử nghiệm hiệu lực gây chế đối với bọ hung đen trưởng thành trong môi trường đất đã xác định  $LC_{50}$  của 4 chủng lần lượt là 1.492, 1.286, 1.077, 1.070 IJs. Trong khi cũng với chủng S-TX1 trong thí nghiệm này, mặc dù giá trị  $LC_{50}$  cao hơn một chút (1.362 IJs) nhưng không đáng kể. Về mặt độc lực, mặc dù giá trị  $LC_{50}$  của 5 chủng EPN đều cao hơn 1.000 IJs, thậm chí hơn 2.000 IJs, nhưng kết quả này cũng phù hợp với công bố trước đó ở Wang, Li (1987). Mặc dù nghiên cứu này đã không chỉ ra  $LC_{50}$  nhưng kết quả thử nghiệm với nồng độ gây nhiễm 2.500 IJs/bọ hung thì có 5 trên 9 chủng EPN của Trung Quốc gây chết bọ hung với tỷ lệ 56,5-100 % sau 7 ngày phơi nhiễm. So với kết quả này thì cả 5 chủng EPN của Việt Nam đều có hiệu lực gây chết tương tự và tiềm năng trở thành tác nhân sinh học trong phòng trừ bọ hung đen.



Hình 1. Đồ thị tương quan giữa nồng độ gây nhiễm và sản lượng tuyến trùng trên một bọ hung.

Theo Klein (1993), do sống trong môi trường đất nơi có nhiều tác nhân gây bệnh, ấu trùng bọ hung đã phát triển tập tính tự vệ để chống lại sự xâm nhập của các tác nhân xâm nhập khác, trong đó tuyến trùng EPN và bằng cách tạo ra màng lưới chặn

(sieve-plates) ở những nơi tuyến trùng có thể xâm nhập như lỗ thở, hậu môn. Nhiều loài còn tạo lớp màng bao quanh miệng như chiếc khẩu trang (peritrophic membrane) để ngăn chặn tuyến trùng xâm nhập. Ngoài ra, sùng trắng cũng có xu hướng

giảm thiểu lượng khí CO<sub>2</sub> giải phóng ra ngoài để giảm sự hấp dẫn đối với tuyến trùng EPN. Nghiên cứu Klein (1990) cho thấy sùng trắng cũng thay đổi tập tính bằng cách thường xuyên đi ngoài và lau miệng để loại bỏ tuyến trùng. Mặc dù phát triển nhiều tập tính ngăn chặn xâm nhập của tuyến trùng EPN như trên, nhưng do kích thước lớn, khả năng di chuyển trong đất kém, sùng trắng trong môi trường đất vẫn là đối tượng hấp dẫn đối với tuyến trùng EPN. Chỉ khác là thay bằng lượng IJs nhỏ cần để tấn công và giết chết đối tượng (hàng chục đến hàng trăm IJs) như đối với các loại sâu hại khác, lượng IJs tấn công và gây chết sùng trắng thường lớn hàng ngàn IJs (Klein, 1993; Lại Phú Hoàng *et al.*, 2003).

Nếu xét về tương quan giữa nồng độ IJs gây nhiễm tối ưu và sản lượng IJs được sinh ra lớn nhất thì có sự khác nhau giữa các chủng tuyến trùng trên cùng một côn trùng vật chủ. Chẳng hạn, đối với chủng S-CP12 nồng độ gây nhiễm tối ưu là 3.000 IJs/sâu, thuộc loại cao nhất, trong khi sản lượng IJs thu được là  $31 \times 10^3$  IJs không phải là cao nhất mà thấp nhất trong số 5 chủng tham gia thí nghiệm. Đối với 2 chủng S-PQ16 và H-KT3987 đều có cùng nồng độ gây nhiễm tối ưu là 2.500 IJs nhưng lại cho sản lượng cao nhất khác nhau khá lớn ( $59,7 \times 10^3$  IJs ở S-PQ16 vs.  $125,1 \times 10^3$  IJs ở H-KT3987). Hai chủng S-TX1 và H-CB3452 có nồng độ gây nhiễm tối ưu thấp nhất là 2.000 IJs cũng tạo ra sản lượng IJs cao nhất và cũng có sự khác biệt khá lớn ( $73,5 \times 10^3$  IJs ở S-TX1 và  $112,6 \times 10^3$  IJs ở H-CB3452). Tất nhiên, sự khác biệt về sản lượng IJs của 2 trường hợp sau cũng chính là sự khác biệt giữa các chủng *Steinernerma* và *Heterorhabditis* do ấu trùng cảm nhiễm ở các chủng *Steinernerma* thường có kích thước lớn hơn so với ấu trùng cảm nhiễm ở các chủng *Heterorhabditis* nên trên cùng một côn trùng vật chủ sản lượng ấu trùng cảm nhiễm được tạo ra sẽ thấp hơn. Như vậy, để đánh giá khả năng sinh sản của các chủng EPN khi so sánh sản lượng IJs thu được giữa các chủng trong cùng giống sẽ chuẩn xác hơn. Theo đó, đối với 3 chủng *Steinernerma* thì chủng S-TX1 có khả năng sinh sản tốt nhất, tiếp đến là S-PQ16 và S-CP12. Còn 2 chủng *Heterorhabditis* thì chủng H-KT3987 có khả năng sinh sản tốt hơn chủng H-CB3452, mặc dù sản lượng IJs thu được của 2 chủng này không quá khác biệt.

Mặc dù giá trị LC<sub>50</sub> của các chủng EPN đối với sùng trắng là khá lớn (trên 1.000 IJs, thậm chí trên 2.000 IJs/bọ hung), điều này cũng có nghĩa là để diệt được bọ hung cần liều phun rải cao gấp nhiều lần so với các đối tượng sâu hại khác. Tuy nhiên, do sùng

trắng tồn tại lâu trong đất nên thường gây tác hại lớn cho cây trồng. Đặc biệt sùng trắng là đối tượng rất khó phòng diệt bằng các loại thuốc hóa học và chế phẩm sinh học khác. Vì vậy chế phẩm sinh học tuyến trùng là lựa chọn tối ưu trong phòng trừ sinh học bọ hung. Hơn nữa sau khi giết chết bọ hung, tuyến trùng EPN sẽ tiếp tục sinh sản trong xác chết bọ hung và phát tán thứ cấp trên đồng ruộng, nên không cần phun rải EPN nhiều lần. Do vậy, trong nhiều trường hợp bọ hung hại cây trồng kinh tế thì việc sử dụng tuyến trùng EPN vẫn là giải pháp khả thi để phòng trừ sinh học sùng trắng hại cây trồng.

## KẾT LUẬN

Năm chủng tuyến trùng EPN bản địa của Việt Nam là S-PQ16, S-CP12, S-TX1, H-KT3987 và H-CB3452 đều có khả năng diệt sùng trắng tốt với tỷ lệ gây chết lần lượt là 93,3%; 86,7%; 93,3%; 86,7%; 73,3% ở nồng độ phơi nhiễm 5.000 IJs/bọ hung.

Độc lực của các chủng EPN trên sùng trắng khác nhau, giá trị LC<sub>50</sub> đối với bọ hung, tương ứng là 1.696 IJs, 2.059 IJs, 1362 IJs, 1.773 IJs và 2.725 IJs. Theo đó chủng S-TX1 với LC<sub>50</sub> = 1.362 IJs là chủng có độc lực mạnh nhất và chủng H-CB3452 LC<sub>50</sub> = 2.725 IJs là chủng có độc lực yếu nhất đối với sùng trắng *A. impressicolle*.

Khả năng sinh sản của 5 chủng tuyến trùng EPN trong sùng trắng là khá cao, với sản lượng IJs trung bình là  $59,7 \times 10^3$  IJs;  $31 \times 10^3$  IJs;  $73,5 \times 10^3$  IJs;  $125,1 \times 10^3$  IJs và  $112,6 \times 10^3$  IJs. Trong đó hai chủng thuộc giống *Heterorhabditis* là H-KT3987 và H-CB3452 có khả năng sinh sản cao hơn 2-3,5 lần so với các chủng của giống *Steinernerma*.

Với hiệu lực gây chết cao, độc lực mạnh và khả năng sinh sản tốt cả 5 chủng tuyến trùng EPN bản địa đều đáp ứng chuẩn của tác nhân sinh học, có thể sử dụng trong việc phòng trừ sinh học bọ hung hại cây trồng.

**Lời cảm ơn:** Công trình được hoàn thành trong khuôn khổ đề tài VAST.ĐL 04/13-14 với sự tài trợ của Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

Anon (1988) SAS/STAR User Guide Release 6.03, SAS Institute, Cary, NC, USA: 1028.

Bedding RA (1984) Large scale production, storage and transport of the insect-parasitic nematodes *Neoplectana*

- spp. and *Heterorhabditis* spp. *Annals of Applied Biology* 104: 117–120.
- Cabanillas HE, Raulston JR (1994) Pathogenicity of *Steinernema riobraviss* against corn earworm *Helicoverpa zea* (Boddie). *Fundamental & Applied Nematology* 17: 212–223.
- Grewal PS, Ehlers R-U, Shapiro-Ilan DI (2005) Nematodes as biological control agents. CABI Publishing, Wallingford. 592.
- Kaya HK, Gaugler R (1993) Entomopathogenic nematodes. *Annual Review of Entomology* 38: 181–206.
- Klein MG (1993) Biological control of scarabs with entomopathogenic nematodes. In: Bedding R, Akhurst R and Kaya H (eds.) *Nematodes and the Biological Control of Insect Pests*. CSIRO Publications, East Melbourne: 49–57.
- Klein MG, Grewal PS, Jackson TA & Koppenhöfer AM (2007) Lawn, turf and grassland pests. In: Lacey LA and Kaya HK (eds.), *Field manual of techniques in invertebrate pathology: Application and evaluation of pathogens for control of insects and other invertebrate pests*. Springer, Dordrecht: 655–675.
- Klein MG (1990) Efficacy against soil-inhabiting insect pests. In: R Gaugler and HK Kaya (eds.) *Entomopathogenic nematodes in biological control*. CRC Press, Boca Raton: 195–214.
- Klein MG, Georgis R (1992) Persistence of control of Japan beetle (Coleoptera: Scarabaeidae) larvae with steinernematid and heterorhabditid nematodes. *Journal of Economic Entomology* 85: 727–730.
- Koppenhöfer AM, Choo HY, Kaya HK, Lee DW, Gelernter WD (1999) Increased field and greenhouse efficacy against scarab grubs with a combination of an entomopathogenic nematode and *Bacillus thuringiensis*. *Biological Control* 14: 37–44.
- Koppenhöfer AM, Fuzy EM (2003) *Steinernema scarabaei* for the control of white grubs. *Biological Control* 28: 47–59.
- Koppenhöfer AM, Kaya HK (1997) Additive and synergistic interaction between entomopathogenic nematodes and *Bacillus thuringiensis* for scarab grub control. *Biological Control* 8: 131–137.
- Koppenhöfer AM (2007) Nematodes. In: LA Lacey and Kaya HK (eds.) *Field manual of techniques in invertebrate pathology: Application and evaluation of pathogens for control of insects and other invertebrate pests*. Springer, Dordrecht: 249–264.
- Lại Phú Hoàng, Phạm Hồng Thái, Nguyễn Ngọc Châu, Vũ Tứ Mỹ, Nguyễn Anh Diệp (2003) Hiệu lực gây chết và khả năng sinh sản của tuyến trùng *Steinernema carpocapsae* TL trên bộ hung hại mía (*Alissonotum impressicollae* Arrow). *Tạp chí Khoa học*. ĐHSPT Hà Nội, 1: 100–104.
- Nguyễn Ngọc Châu (1998) Nghiên cứu sử dụng tuyến trùng trong phòng trừ sinh học sâu hại cây trồng ở Việt Nam. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam* 36 (2): 24–29.
- Nguyễn Ngọc Châu (2008) *Tuyến trùng ký sinh gây bệnh côn trùng ở Việt Nam*. Nhà Xuất bản Khoa học Tự nhiên và Công nghệ, Hà Nội, 302 pp.
- SPSS (1999) SPSS for Windows, release 10.0.1. SPSS Inc., Chicago, USA
- Vũ Tứ Mỹ, Nguyễn Ngọc Châu, Lại Phú Hoàng, Cao Quỳnh Nga (2004) Hiệu lực phòng trừ bộ hung đen hại mía (*Alissonotum impressicollae*) của chế phẩm sinh học tuyến trùng BIOSTAR-3 tại Thạch Thành, Thanh Hóa. *Tạp chí Bảo vệ thực vật* 4 (196): 20–24
- Wang JX, Li LY (1987) Entomogenous nematode research in China. *Revue de Nematologie* 10 (4): 483–489.
- White GF (1927) A method for obtaining infective nematode larvae from culture. *Science* 66: 302–303.

## **THE PATHOGENICITY AND REPRODUCTION CAPABILITY OF FIVE EPN STRAINS ON WHITE GRUBS (*ALISSONOTUM IMPRESSICOLLE* ARROW) IN THE LABORATORY CONDITIONS**

**Do Tuan Anh, Nguyen Huu Tien, Nguyen Ngoc Chau**

*Institute of Ecology and Biological Resources, Vietnam Academy of Science and Technology*

### **SUMMARY**

Five entomopathogenic nematode strains, included 3 strains of the genus *Steinernema*, e.g. S-PQ16, SS-CP12 and S-TX1, and two strains of genus *Heterorhabditis indica*, e.g. H-CB3452 and H-KT3987 were evaluated on virulence and reproduction capacity on white grubs of black scarab (*Alissonotum impressicollae* Arrow) a serious pest damaging in the soils of sugarcane and many economic crops in Western Highland,

particular Lam Dong province. The experiments were evaluated the pathogenicity virulence of EPN strains through establishing index as lethal concentration of 50 mortality percentage of host insects ( $LC_{50}$ ). While the reproduction capacity of EPN strains were established yield of infective juveniles (IJs) that produced inside insect cadavers. The bioassays on virulence of S-PQ16, S-CP12, S-TX1, H-CB3452 and H-KT3987 were revealed the mortality of white grubs as 93.3%, 86.7%; 93.3%; 86.7% and 73.3%, respectively, at the highest concentration of 5,000 IJs/insect. The 50% mortality of five indigenous strains was high levels with  $LC_{50}$  values ranged between 1,362 and 2,725 IJs. These values are also similar with our results previously on white grubs with some other EPN indigenous strains. It is also suitable with some evaluation bioassays of EPN on white grubs reported from China and Australia. The IJs yields from the insect cadavers were obtained up to  $31 \times 10^3$  IJs with the strain S-CP12;  $59.7 \times 10^3$  IJs with the S-PQ16 strain and  $73.5 \times 10^3$  IJs with the strain S-TX1. Particularly, the highest yields were obtained from two strains of *Heterorhabditis indica*, viz.  $125.1 \times 10^3$  IJs with H-KT3987 strain and  $112.6 \times 10^3$  IJs with H-CB3452 strains. Respect to high virulence and also high reproduction capacity all these EPN strains should be satisfied the biological agents that can be used for biological control of white grubs of pests are living in the soil environment.

**Keywords:** *Alissonotum impressicolle*, indigenous EPN nematodes, S-CP12, S-TX1, S-PQ16, H-KT3987, H-CB3452,  $LC_{50}$ , pathogenicity, reproduction.