

ĐẠI HỌC HUẾ
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM

TRẦN THỊ HUẾ

NGHIÊN CỨU ỨNG DỤNG NẤM KÍ SINH TRONG PHÒNG
TRỪ SINH HỌC RỆP SÁP (*Formicococcus* sp.) HẠI RỄ CÂY
HỒ TIÊU TẠI TỈNH ĐẮK LẮK

Chuyên ngành: BẢO VỆ THỰC VẬT

Mã số : 9620112

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ NÔNG NGHIỆP

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC

PGS. TS. TRẦN THỊ THU HÀ

TS. NGUYỄN THỊ THU THỦY

HUẾ - 2024

MỞ ĐẦU

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây hồ tiêu (*Piper nigrum* L.) được mệnh danh là vua của các loại gia vị và được trồng phổ biến ở một số nước nhiệt đới trên thế giới. Hồ tiêu được xác định là loại cây trồng chủ lực góp phần phát triển kinh tế của tỉnh Đắk Lắk. Trong giai đoạn 2014 – 2019, do giá trị sản phẩm hồ tiêu tăng cao diện tích hồ tiêu tăng nhanh, thâm canh quá mức dẫn đến tình hình dịch hại phát sinh phát triển gần như không kiểm soát được.

Rệp sáp hại rễ là một trong những đối tượng dịch hại gây ảnh hưởng lớn đến sản xuất hồ tiêu ở nhiều nước trên thế giới. Rệp gây hại cây hồ tiêu ở tất cả các giai đoạn từ giai đoạn vườn ươm, kiến thiết cơ bản đến giai đoạn kinh doanh. Cây hồ tiêu bị rệp sáp hại rễ gây hại nếu không có biện pháp phòng trừ kịp thời sẽ kiệt sức dần và chết. Ngoài ra, rệp chích hút sẽ tạo ra vết thương cơ giới làm cây hồ tiêu dễ bị nhiễm các loài dịch bệnh nguy hiểm phát sinh từ đất như *Phytophthora* sp., *Fusarium* sp., và *Meloidogyne incognita*. Phòng trừ rệp sáp hại rễ hồ tiêu bằng biện pháp sử dụng thuốc trừ sâu hóa học thường có hiệu quả kém do rệp sống trong khối u do kết hợp với 1 loại nấm đất và cơ thể của rệp sáp có lớp sáp bột bao phủ bảo vệ. Hơn nữa, thuốc hóa học ảnh hưởng tiêu cực đến đến sự đa dạng sinh học, cân bằng sinh thái trong vườn tiêu dẫn đến tình hình dịch hại trên vườn tiêu ngày càng diễn biến phức tạp.

Biện pháp sinh học sử dụng những loài thiên địch trong phòng trừ dịch hại cây trồng đang được khẳng định là xu hướng cho nền sản xuất nông nghiệp bền vững. Những nghiên cứu sử dụng nấm ký sinh côn trùng trong phòng trừ sâu hại cây trồng đã đạt được những thành tựu to lớn ở khắp nơi trên thế giới. Tuy nhiên, để phát huy tối đa hiệu quả của nấm nhóm thiên địch này thì thu thập, tuyển chọn các mẫu nấm ký sinh côn trùng bản địa có hiệu quả cao, xác định các điều kiện thích hợp nhất cho sự phát triển, nhân nuôi và ứng dụng chúng để kiểm soát rệp sáp hại rễ hồ tiêu tại tỉnh Đắk Lắk là rất cần thiết. Xuất phát từ thực tế trên, đề tài “**Nghiên cứu ứng dụng nấm ký sinh trong phòng trừ sinh học rệp sáp hại rễ cây hồ tiêu (*Formicococcus* sp.) tại tỉnh Đắk Lắk**” đã được thực hiện.

2. MỤC TIÊU CỦA ĐỀ TÀI

Phân lập, tuyển chọn và định danh được mẫu nấm ký sinh có

hiệu lực kiểm soát cao đối với rệp sáp hại rễ hồ tiêu. Đồng thời xác định được các yếu tố ảnh hưởng tích cực khi nhân nuôi, nhân sinh khối và hiệu quả kiểm soát rệp sáp hại rễ cây hồ tiêu của mẫu nấm đã tuyển chọn tại tỉnh Đắk Lắk.

3. Ý NGHĨA KHOA HỌC VÀ THỰC TIỄN

a. Ý nghĩa khoa học

- Kết quả nghiên cứu của đề tài khẳng định vai trò của nấm ký sinh côn trùng trong quản lý rệp sáp hại rễ cây hồ tiêu.

- Kết quả nghiên cứu của đề tài là tài liệu tham khảo cho những nghiên cứu sâu hơn về biện pháp sinh học ứng dụng nấm ký sinh côn trùng trong quản lý các loài rệp sáp hại rễ cây trồng.

b. Ý nghĩa thực tiễn

Kết quả của nghiên cứu là cơ sở cho việc lựa chọn các mẫu nấm ký sinh côn trùng để kiểm soát rệp sáp hại rễ hồ tiêu từ đó giảm lượng thuốc trừ sâu hóa học. Nghiên cứu cũng góp phần thúc đẩy tính đa dạng của các loài sinh vật có ích, đảm bảo sức khỏe của con người và vật nuôi, tăng năng suất nhưng vẫn đảm bảo chất lượng hạt hồ tiêu. Từ đó, góp phần phát triển một nền nông nghiệp bền vững và thân thiện với môi trường.

4. NHỮNG ĐÓNG GÓP MỚI CỦA LUẬN ÁN

Luận án đã phân lập được 154 mẫu nấm và cũng đã tuyển chọn, định danh được 2 mẫu nấm có tiềm năng trong phòng trừ sinh học loài rệp sáp hại rễ cây hồ tiêu tại Đắk Lắk là mẫu nấm tím (*Purpureocillium lilacinum* PB1) và mẫu nấm trắng (*Beauveria bassiana* BB1).

Luận án đã khảo sát được vườn hồ tiêu trồng xen hồ tiêu với cà phê, sử dụng trụ sống, bón phân hữu cơ và không sử dụng thuốc diệt nấm có tác động tích cực hơn đến mật độ *Metarhizium* spp., *Beauveria* spp. và *Purpureocillium* spp. so với các ruộng khác trồng thuần hồ tiêu, sử dụng trụ chết, bón phân hóa học và sử dụng thuốc trừ nấm.

Luận án đã xác định được môi trường PDA, nhiệt độ 25 - 27°C, pH = 4,5 - 7,5 là điều kiện thích hợp cho khả năng nảy mầm, sinh trưởng, sinh bào tử và kí sinh rệp sáp hại rễ hồ tiêu của nấm tím *P. lilacinum* PB1 và nấm trắng *B. bassiana* BB1.

Luận án đã xác định điều kiện tối ưu để nhân sinh khối mẫu nấm tím *P. lilacinum* PB1 là giá thể hạt gạo với độ ẩm 45%, mẫu nấm trắng *B. bassiana* BB1 là giá thể hạt gạo với độ ẩm 45 - 50%.

Luận án đã xác định được hiệu lực phòng trừ rệp sáp hại rễ hồ tiêu của mẫu nấm tím *P. lilacinum* PB1 và mẫu nấm trắng *B. bassiana* BB1 với nồng độ 1×10^9 bào tử/ml đạt khoảng 100% ở điều kiện phòng thí nghiệm và vườn ươm, khoảng 70% ở điều kiện đồng ruộng.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU

1.1. TÌNH HÌNH SẢN XUẤT VÀ DỊCH HẠI HỒ TIÊU

Cây hồ tiêu (*Piper nigrum* L.) thuộc họ Piperaceae là loại cây lấy hạt làm gia vị, được sử dụng rộng rãi trên toàn thế giới [3]. Việt Nam là quốc gia có diện tích và sản lượng hồ tiêu lớn nhất thế giới [27]. Đắk Lắk là một trong 3 tỉnh thuộc Tây Nguyên được quy hoạch thuộc vùng trọng điểm cho sản xuất hồ tiêu của cả nước. Đến năm 2022, diện tích hồ tiêu toàn tỉnh còn 32.820 ha với 29.120 ha cho sản phẩm, năng suất đạt 29,07 tạ/ha và tổng sản lượng 84.640 tấn [1].

Dịch hại là một nhân tố ảnh hưởng nghiêm trọng đến sản xuất hồ tiêu trên toàn thế giới [50]. Các loại bệnh hại nguy hiểm hại cây hồ tiêu do *Phytophthora* sp. *Fusarium* sp. thường xuyên xuất hiện ở tất cả các vùng trồng tiêu trên thế giới. Các loài côn trùng gây hại phổ biến trên cây hồ tiêu như rệp sáp, bọ phấn, rệp vảy, bọ xít lưới [2].

1.2. NGHIÊN CỨU VỀ RỆP SÁP HẠI CÂY TRỒNG VÀ RỆP SÁP HẠI RỄ CÂY HỒ TIÊU

Rệp sáp hại cây trồng thuộc tổng họ rệp sáp giả Pseudococcidae (Homoptera: Coccoidea) gồm khoảng 250 giống với hơn 2.000 loài đã được công bố trên toàn thế giới [16]. Trước đây, hầu hết các loài rệp sáp chỉ là loài sâu hại thứ yếu nhưng ngày nay nhiều loài đã trở thành những loài dịch hại chủ yếu của nhiều loài cây trồng nông nghiệp do tác động của sự biến đổi khí hậu và tác động của con người [34].

Trong những năm gần đây, rệp sáp hại rễ đã trở thành dịch hại nghiêm trọng ảnh hưởng sản xuất hồ tiêu ở Việt Nam [2, 4], ở Ấn Độ [52]. Rệp sáp hại rễ gây hại cây hồ tiêu ở cả giai đoạn kiến thiết cơ bản và giai đoạn kinh doanh [4].

1.3. NGHIÊN CỨU VỀ NẤM KÝ SINH CÔN TRÙNG

1.3.1. Khái niệm về nấm ký sinh côn trùng

Nấm ký sinh côn trùng (entomopathogenic fungi) được hiểu

là nấm gây bệnh côn trùng (“*entomon*” = côn trùng, “*pathogenic*” = gây bệnh, “*fungi*” = nấm). Có nhiều thuật ngữ được sử dụng để chỉ nấm gây bệnh và giết chết côn trùng như entomogenous fungi, entomopathogenic fungi, insect-pathogenic fungi, entomophthorous fungi, insect-pathogenic fungi và fungal entomopathogens [54].

1.3.2. Lịch sử nghiên cứu ứng dụng nấm ký sinh côn trùng

Agostino Bassi (1773–1856) đã chứng minh rằng nấm *Beauveria bassiana* (*Botrytis bassiana*) gây bệnh tằm vôi (muscadine) trên loài tằm. Năm 1874, Pasteur và LeConte đều cho rằng nấm có thể được sử dụng diệt trừ côn trùng [53]. Đến nay, thế giới có khoảng 171 chế phẩm nấm ký sinh côn trùng được phát triển, trong đó chế phẩm được phát triển từ *B. bassiana* và *M. anisopliae* chiếm tỷ lệ chủ yếu [28].

1.3.3. Phân loại nấm ký sinh côn trùng

Các loài nấm ký sinh côn trùng thuộc các ngành Ascomycota, Zygomycota, Chytridiomycota và Basidiomycota [13]. Hầu các nghiên cứu định danh, phân loại nấm ký sinh côn trùng hiện nay đều thực hiện bằng các kết hợp giữa phương pháp quan sát đặc điểm hình thái và phương pháp sinh học phân tử [25].

1.3.4. Sự đa dạng của nấm ký sinh côn trùng và các yếu tố ảnh hưởng

Nấm ký sinh côn trùng rất phong phú, đa dạng, chúng phân bố ở khắp nơi trên thế giới [12, 23]. Ước tính có khoảng 1000 loài nấm gây bệnh côn trùng thuộc 100 chi nấm [55]. Số lượng loài nấm ký sinh côn trùng nhiều nhất thuộc họ Entomophthoraceae nhưng những loài nổi tiếng và được ứng dụng trong sản xuất thuốc trừ sâu sinh học lại thuộc họ Clavicipitaceae [13, 42]

1.3.5. Tuyển chọn nấm ký sinh côn trùng

Để ứng dụng nấm ký sinh côn trùng như một loại thuốc trừ sâu sinh học cần phải sàng lọc độc lực của chúng đối với côn trùng gây hại mục tiêu [15]. Việc tuyển chọn các mẫu nấm ký sinh côn trùng đã và vẫn đang tiếp tục được thực hiện ở khắp các địa phương, các quốc gia trên thế giới. Bởi vì, các mẫu nấm ký sinh côn trùng đã được thương mại hóa trở thành tác nhân kiểm soát sinh học có hiệu quả đối với dịch hại ở địa phương này có thể lại không hiệu quả đối với một số loài dịch hại ở địa phương khác [26].

1.3.6. Ảnh hưởng của yếu tố sinh thái đến sự sinh trưởng, phát triển và khả năng kiểm soát dịch hại của nấm ký sinh côn trùng

- Ảnh hưởng của nhiệt độ và ẩm độ

Nói chung, nhiệt độ cao ảnh hưởng tiêu cực đến sức sống và khả năng nảy mầm của bào tử, độc tính của nấm ký sinh côn trùng [56]. Tuy nhiên, mỗi mẫu nấm có yêu cầu khoảng nhiệt độ và ẩm độ tối ưu để khả năng sinh trưởng, sinh bào tử và tính độc tốt nhất [6].

- Ảnh hưởng của thuốc trừ dịch hại

Ở các hệ sinh thái không sử dụng thuốc hóa học ảnh hưởng tích cực đến sự xuất hiện của nấm gây bệnh côn trùng [51]. Tùy thuộc vào nồng độ, loại thuốc và mẫu nấm mà mức độ ảnh hưởng đến khả năng nảy mầm, sinh trưởng, khả năng sản xuất bào tử của các loài nấm ký sinh côn trùng là khác nhau [17, 21].

- Ảnh hưởng của nguồn dinh dưỡng

Môi trường nuôi cấy là yếu tố quan trọng nhất cho nấm ký sinh côn trùng sinh trưởng và phát triển trong điều kiện nhân tạo [36]. Khả năng sinh trưởng của sợi nấm và sinh bào tử trên môi trường nhân tạo phụ thuộc vào mẫu nấm và các thành phần được sử dụng trong môi trường nuôi cấy [36]. Mẫu *B. bassiana* BP1.1 khả năng sinh trưởng đạt cao nhất khi nuôi cấy trên môi trường SDA, [18]. Mẫu *B. bassiana* (JAB 6, JAB 7, AM 9, IBCB 7, IBCB 66) đều đạt giá trị cao khi nuôi cấy ở PDA, PDAY, SDAY và CM [22].

- Ảnh hưởng của pH

Nói chung, pH trung tính có ảnh hưởng tích cực đến nấm ký sinh côn trùng [24]. Tuy nhiên, mỗi mẫu nấm ký sinh côn trùng có những yêu cầu cụ thể với mức pH nhất định [47]. Hầu hết các mẫu nấm phân lập từ rệp sáp trên cây cà phê tại Krông Ana tỉnh Đắk Lắk đều sinh trưởng và sinh bào tử tốt nhất ở pH = 5,5 và pH = 6 [5].

1.3.7. Nhân sinh khối nấm ký sinh côn trùng

Có rất nhiều kỹ thuật nhân sinh khối nấm ký sinh côn trùng được thử nghiệm và áp dụng [31]. Trong đó, kỹ thuật nhân sinh khối phổ biến nhất được áp dụng ở phổ biến nhất là sử dụng giá thể ở dạng rấn để sản xuất bào tử nấm ký sinh côn trùng [10, 32, 35, 37, 41]. *B. bassiana* có thể cho số lượng bào tử cao nhất khi sản xuất bằng hạt gạo với ẩm độ 40–70% [14, 40, 44].

1.3.8. Hiệu quả của nấm ký sinh côn trùng

Hiệu quả của các mẫu nấm ký sinh côn trùng đã được nghiên cứu và công bố đối với nhiều loài động vật Chân đốt gây hại ở hầu hết các loài thuộc lớp côn trùng và một số loài thuộc lớp Nhện. Mẫu *B.*

bassiana Bba5653 gây chết 94% sâu tơ ở giai đoạn ấu trùng, mẫu *B. bassiana* TST05 với mức mật độ $2,5 \times 10^8$ bào tử/ml để phun lên lớp đất bề mặt có chứa ấu trùng sâu đục trái *Atrijuglans hetaohei* đã làm tỷ lệ ấu trùng *A. hetaohei* từ vong đã lên tới 100% sau 14 ngày xử lý [57].

1.3.9. Nghiên cứu nấm ký sinh côn trùng phòng trừ rệp sáp hại cây trồng

Phương thức hoạt động của các loài nấm *B. bassiana* trên rệp sáp *Paracoccus marginatus* gồm các giai đoạn: (i) bào tử bám vào lớp biểu bì của rệp (ii) bào tử nảy mầm (iii) sợi nấm xâm nhập hoặc ống mầm xâm chiếm bề mặt của lớp biểu bì của rệp (iv) lớp sáp bao phủ rệp bị thay thế bởi hệ nấm do tác động của enzyme phân hủy của nấm (v) hệ sợi nấm bao phủ toàn bộ lớp biểu bì của rệp (vi) nấm tiếp tục phát triển và sản sinh bào tử ở ngoài cơ thể xác rệp đã chết [9].

1.3.10. Nghiên cứu nấm ký sinh côn trùng phòng trừ rệp sáp hại cây hồ tiêu

Một số nghiên cứu trên thế giới đã nghiên cứu sử dụng nấm kí sinh để quản lý rệp sáp hại rễ hồ tiêu như *Nomurae rileyii*, *Verticillium lecanii*, *Metarrhizium anisopliae* và *Aspergillus* sp. Tuy nhiên, hiệu quả kiểm soát rệp sáp hại rễ hồ tiêu của các loài nấm này tương đối thấp.

CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. PHẠM VI VÀ ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

2.1.1. Phạm vi nghiên cứu

Địa điểm nghiên cứu: thu mẫu tại thành phố Buôn Ma Thuột, huyện Cư Kuin, huyện Lắk, huyện Cư M'gar, huyện Krông Năng, tỉnh Đắk Lắk. Các thí nghiệm in vitro, vườn ươm thực hiện tại trường Đại học Tây Nguyên. Các thí nghiệm đồng ruộng thực hiện tại Xã Eaкао, thành phố Buôn Ma Thuột tỉnh Đắk Lắk.

Thời gian nghiên cứu từ: 11/2019 đến 11/2023.

2.1.2. Đối tượng nghiên cứu

Cây hồ tiêu (*Piper nigrum* L.) tại tỉnh Đắk Lắk.

Các mẫu nấm ký sinh đã được phân lập và tuyển chọn từ vườn cây hồ tiêu tại Đắk Lắk.

Loài rệp sáp hại rễ hồ tiêu (*Formicococcus* sp.) được thu thập tại vườn cây hồ tiêu tại Đắk Lắk và đã được định danh bằng

phân tích hình thái và phân tích gen do sự hỗ trợ của TS. Đào Thị Hằng, Bộ môn Côn trùng và Tuyến trùng, Viện Bảo vệ thực vật, Hà Nội.

2.2. NỘI DUNG NGHIÊN CỨU

Thu thập và phân lập thành phần mẫu nấm ký sinh côn trùng có khả năng ký sinh rệp sáp hại rễ cây hồ tiêu.

Nghiên cứu ảnh hưởng của một số yếu tố sinh thái đến nấm ký sinh rệp sáp hại rễ cây hồ tiêu.

Nghiên cứu nhân sinh khối mẫu nấm có tiềm năng lớn trong kiểm soát rệp sáp hại rễ cây hồ tiêu.

Nghiên cứu ảnh hưởng nồng độ, liều lượng của mẫu nấm đã tuyển chọn đến hiệu quả của kiểm soát rệp sáp hại hồ tiêu ở điều kiện phòng thí nghiệm, vườn ươm và đồng ruộng.

2.3. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.3.1 Phương pháp xác định thành phần, tuyển chọn và định danh mẫu nấm có khả năng ký sinh mạnh rệp sáp hại rễ cây hồ tiêu.

Phân lập nấm ký sinh côn trùng từ xác rệp sáp bị kí sinh bằng phương pháp cấy trải trên môi trường PGA có bổ sung cloramphenicol. Phân lập nấm ký sinh côn trùng từ mẫu đất: bằng phương pháp cấy trên môi trường chọn lọc SDA-D50 (để phân lập các mẫu nấm xanh và nấm trắng) [46], PGA bổ sung NaCl để phân lập nấm tím [11].

Tuyển chọn mẫu nấm ký sinh côn trùng có khả năng ký sinh mạnh rệp sáp hại rễ hồ tiêu với 2 bước. *Bước 1*: thực hiện thí nghiệm theo kiểu khối ngẫu nhiên đầy đủ để đánh giá khả năng ký sinh rệp sáp hại rễ hồ tiêu trong phòng thí nghiệm ở 2 giai đoạn ấu trùng và trưởng thành. *Bước 2*: tiếp tục tuyển chọn mẫu nấm có hiệu quả nhất trong những mẫu đã tuyển chọn ở bước 1 thông qua đánh giá khả năng kiểm soát rệp sáp hại rễ hồ tiêu và ảnh hưởng của chúng đến sinh trưởng của cây hồ tiêu ở điều kiện vườn ươm.

Định danh các mẫu nấm ký sinh côn trùng đã tuyển chọn bằng 2 phương pháp: (1) Định danh bằng hình thái: dựa vào phương pháp quan sát một số đặc điểm hình thái như khuẩn lạc phát triển trên môi trường PGA, đặc điểm cành sinh bào tử, hình dạng bào tử và so sánh với một số nghiên cứu [7, 19, 25, 49]. (2) Định danh bằng sinh học phân tử: thực hiện phản ứng PCR với cặp mồi ITS1 và ITS4. Xác định vị trí phân loại của các mẫu phân lập bằng phương

pháp so sánh trình tự của gen với trình tự đã được công bố trong cơ sở dữ liệu DDBJ/Genbank/EMBL sử dụng BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Về cây phát sinh loài bằng phần mềm Mega phiên bản 6.0.

2.3.2 Phương pháp nghiên cứu ảnh hưởng của một số yếu tố sinh thái đến nấm ký sinh rệp sáp hại rễ cây hồ tiêu

Khảo sát ảnh hưởng của một số kỹ thuật canh tác đến mật độ nấm ký sinh côn trùng trong đất vùng rễ cây hồ tiêu: bằng cách lấy mẫu đất, cây trải dung dịch đất trên môi trường chọn lọc SDA-D50 để xác định mật độ *Beauveria* spp., và *Metarhizium* spp., môi trường PGA bổ sung NaCl để xác định mật độ *Purpureocillium* spp.

Đánh giá ảnh hưởng của các (nhiệt độ, môi trường nuôi cấy, pH và một số thuốc hóa học thương phẩm) đến khả năng nảy mầm, sinh trưởng, sinh bào tử và ký sinh rệp sáp hại rễ hồ tiêu của mẫu nấm đã tuyển bằng thí nghiệm theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên.

2.3.3 Phương pháp nghiên cứu nhân sinh khối mẫu nấm ký sinh đã tuyển chọn

Xác định loại giá thể, ẩm độ giá thể phù hợp để nhân sinh khối mẫu nấm đã tuyển chọn bằng thí nghiệm theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên.

2.3.4 Phương pháp đánh giá ảnh hưởng của nồng độ, liều lượng mẫu nấm đã tuyển chọn đến hiệu quả phòng trừ rệp sáp hại rễ hồ tiêu

Đánh giá ảnh hưởng của nồng độ, liều lượng mẫu nấm đã tuyển chọn đến hiệu quả phòng trừ rệp sáp hại hồ tiêu ở phòng thí nghiệm, vườn ươm và đồng ruộng bằng thí nghiệm theo kiểu khối đầy đủ ngẫu nhiên.

2.4. PHƯƠNG PHÁP XỬ LÝ SỐ LIỆU

Các số chỉ tiêu theo dõi được tổng hợp trong phần mềm excel 2010 xử lý thống kê phân tích phương sai (ANOVA) theo phép kiểm định Duncan để so sánh sự sai khác giữa các nghiệm thức bằng phần mềm SPSS 20.

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. THÀNH PHẦN, TUYỂN CHỌN VÀ ĐỊNH DANH MẪU NẤM KÝ SINH CÔN TRÙNG CÓ KHẢ NĂNG KÝ SINH MẠNH ĐỐI VỚI RỆP SÁP HẠI RỄ HỒ TIÊU

3.1.1. Thành phần nấm ký sinh côn trùng trong vườn hồ tiêu tại Đắk Lắk

Kết quả nghiên cứu đã thu thập được 154 mẫu nấm ký sinh côn trùng. Trong đó, huyện Cư Kuin có số mẫu thu thập được cao nhất (46 mẫu), sau đó là thành phố Buôn Ma Thuột (31 mẫu), huyện Krông Năng (27 mẫu), Cư M'gar (26 mẫu) và huyện Lắk (24 mẫu).

Các mẫu thuộc chi nấm tím *Purpureocillium* (*Paecilomyces*): rệp sáp hại rễ hồ tiêu bị các mẫu nấm tím *Purpureocillium* kí sinh có cơ thể bị bao phủ bởi sợi nấm mọc vươn ra với quả thể màu tím. Đặc điểm khuẩn lạc khi cấy trên môi trường PGA: khuẩn lạc của chúng có thể có màu tím ở trung tâm, có màu trắng ở mép hoặc có màu trắng toàn bộ khuẩn lạc. Các mẫu thuộc chi nấm trắng *Beauveria*: rệp sáp hại rễ hồ tiêu bị các mẫu nấm trắng *Beauveria* kí sinh cơ thể thường bị bao phủ bởi hệ sợi nấm mọc vươn ra với quả thể dạng hình cầu, màu trắng. Đặc điểm khuẩn lạc khi cấy trên môi trường PGA: khuẩn lạc có màu trắng hoặc màu vàng nhạt. Cành sinh bào tử mọc thành cụm, thể bình có phần đáy phình to có phần đỉnh thon nhỏ lại, bào tử dạng hình cầu. Các mẫu thuộc chi nấm xanh *Metarhizium*: rệp sáp hại rễ hồ tiêu bị các mẫu nấm xanh *Metarhizium* kí sinh cơ thể thường bị bao phủ bởi lớp bột màu trắng hoặc màu xanh. Khuẩn lạc khi cấy trên môi trường PGA có màu xanh hoặc xung quanh màu trắng phần tâm màu xanh. Đặc điểm hình thái của cả 3 chi nấm đều phù hợp với mô tả trong khóa phân loại của Humber (2012) [25]

3.1.2. Tuyển chọn các mẫu nấm ký sinh côn trùng có khả năng ký sinh mạnh rệp sáp hại rễ cây hồ tiêu tại Đắk Lắk

Đã tuyển chọn được 2 mẫu nấm kí sinh có khả năng kí ký sinh mạnh rệp sáp hại rễ cây hồ tiêu tại Đắk Lắk bao gồm mẫu nấm tím PB1 và mẫu nấm trắng BB1

Trong phòng thí nghiệm, tỷ lệ rệp sáp hại rễ hồ tiêu chết bị chết khi xử lý với mẫu nấm PB1 lên đến 100% ở giai đoạn ấu trùng và 98,89% ở giai đoạn trưởng thành tại 21 ngày sau xử lý. Ở vườn ươm, mẫu nấm PB1 cho hiệu lực kiểm soát rệp sáp hại rễ hồ tiêu đạt 100% sau 6 tháng xử lý.

Trong phòng thí nghiệm, tỷ lệ rệp sáp hại rễ hồ tiêu chết bị chết khi xử lý với mẫu nấm BB1 lên đến 100% ở cả 2 giai đoạn ấu trùng và giai đoạn trưởng thành tại 21 ngày sau xử lý. Ở vườn ươm, mẫu nấm BB1 cho hiệu lực kiểm soát rệp sáp hại rễ hồ tiêu đạt 99,18% sau 6 tháng xử lý.

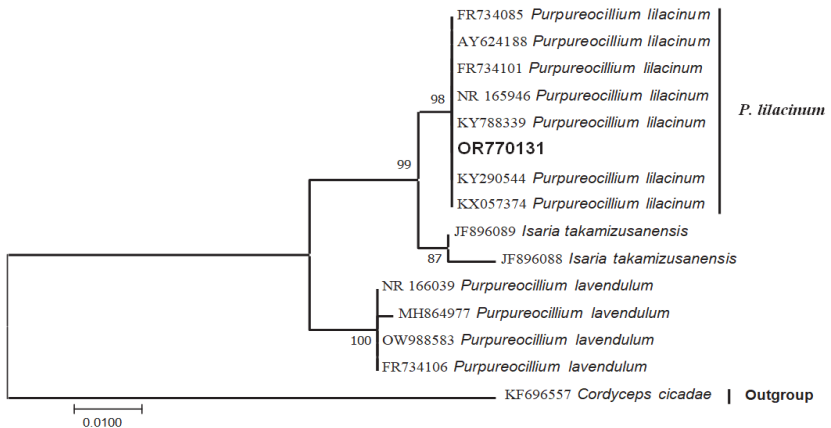
3.1.3. Định danh một số mẫu nấm có tiềm năng đã được tuyển chọn trong phòng trừ rệp sáp hại rễ cây hồ tiêu

- Định danh bằng hình thái:

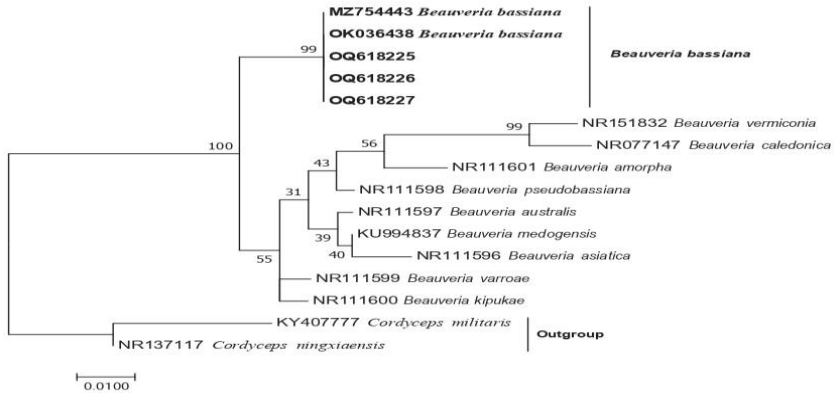
Khuẩn lạc mẫu PB1 trên môi trường PGA có màu tím. Cành sinh bào tử có dạng hình trụ thon dần về phía đỉnh với bào tử. Bào tử hình trứng, dính liền với nhau thành dạng chuỗi. So sánh với một số nghiên cứu [49] xác định PB1 thuộc loài *Purpureocillium lilacinum*.

Dựa vào một số đặc điểm hình thái của mẫu nấm BB1: khuẩn lạc phát triển trên môi trường PGA có màu trắng. Bào tử hình cầu, cành sinh bào tử có dạng zic zắc ở phần đỉnh. So sánh với khóa phân loại của Humber (2012) [25] và mô tả của Affandi và cs (2013) [7] bước đầu ghi nhận mẫu này thuộc loài *Beauveria bassiana*.

- Định danh sinh học phân tử: khi đối chiếu với dữ liệu của GenBank (NCBI) cho thấy đoạn gen của mẫu PB1 tương đồng và độ bao phủ rất cao (100%) với loài *Purpureocillium lilacinum*, mẫu nấm BB1 tương đồng và độ bao phủ rất cao (100%) với loài *Beauveria bassiana*.



Hình 3.1. Cây phân loại thể hiện mối liên quan giữa mẫu nấm PB1 (OR770131) với các loài gần gũi dựa trên trình tự gen ITS1-5.8S-ITS4 rRNA.



Hình 3.2. Cây phân loại thể hiện mối liên quan giữa mẫu nấm *BB1* (*OQ618225*) với các loài gần gũi dựa trên trình tự gen *ITS1-5.8S-ITS4 rRNA*.

3.2. ẢNH HƯỞNG CỦA MỘT SỐ YẾU TỐ SINH THÁI ĐẾN NẤM KÝ SINH RỆP SÁP HẠI RỄ CÂY HỒ TIÊU

3.2.1. Ảnh hưởng của một số kỹ thuật canh tác hồ tiêu đến mật độ nấm ký sinh côn trùng trong đất vùng rễ cây hồ tiêu ở điều kiện đồng ruộng

Mật độ nấm *Metarhizium* spp., *Beauveria* spp. và *Purpureocillium* spp. có trong đất vùng rễ tại vườn hồ tiêu xen canh với cà phê, sử dụng trụ cây sống, phân bón hữu cơ và không sử dụng thuốc hóa học trừ nấm bệnh cao hơn so với vườn hồ tiêu trồng thuần, sử dụng loại trụ chết, phân bón vô cơ và sử dụng thuốc hóa học trừ nấm bệnh tại cả 3 địa điểm nghiên cứu bao gồm thành phố Buôn Ma Thuột, huyện Krông Năng và huyện Cư Kuin. Kết quả này phù hợp với khẳng

3.2.2. Ảnh hưởng của các yếu tố sinh thái đến mẫu nấm ký sinh rệp sáp hồ tiêu đã tuyển chọn trong điều kiện phòng thí nghiệm

3.2.2.1. Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến mẫu nấm ký sinh rệp sáp hại rễ hồ tiêu đã tuyển chọn

* Ảnh hưởng của yếu tố môi trường nuôi cấy đến khả năng nảy mầm của mẫu nấm ký sinh rệp sáp hại rễ hồ tiêu đã tuyển chọn

Tỷ lệ nảy mầm của bào tử mẫu PB1 cao nhất trên PDA và môi trường SDAY+K, tiếp theo là môi trường SDAY3 và thấp nhất trên môi trường CDA. Kết quả nghiên cứu này tương đương với nghiên cứu của Kiewnick (2006) khẳng định mẫu *Paecilomyces lilacinus* 251 cho tỷ lệ

nảy mầm trên môi trường PDA cao hơn so với SDA.

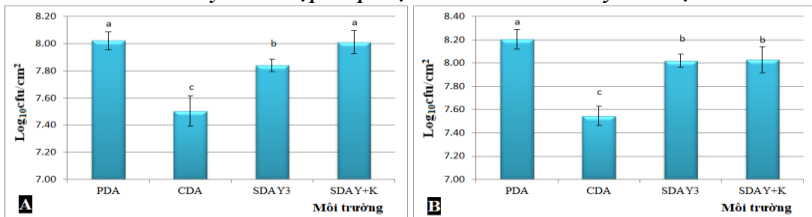
Tỷ lệ nảy mầm của bào tử mẫu BB1 đạt giá trị cao nhất trên PDA và môi trường SDAY+K, tiếp theo là môi trường SDAY3 và thấp nhất trên môi trường CDA. Kết quả nghiên cứu của Ahmad và cs (2016) [8] khẳng định mẫu *B. bassiana* B2 và *B. bassiana* B4 cho tỷ lệ nảy mầm cao nhất trên môi trường PDA so với các môi trường PSA, bột bắp, bột gạo, bột mì.

* Ảnh hưởng của yếu tố môi trường nuôi cấy đến khả năng tăng trưởng của mẫu nấm ký sinh rệp sáp hại rễ hồ tiêu đã tuyển chọn

Mẫu PB1 có tốc độ tăng trưởng cao nhất ở cả hai môi trường PDA và SDAY+K, sau đó trên môi trường SDAY3 và thấp nhất trên môi trường CDA.

Mẫu BB1 tăng trưởng mạnh nhất trên môi trường PDA, tiếp đến trên 2 môi trường SDAY3 và SDAY+K, yếu nhất trên môi trường CDA. Kết quả nghiên cứu này tương đương với mẫu *B. bassiana* B2 trong nghiên cứu của Ahmad và cs (2016) [8], *B. bassiana* BR3 trong nghiên cứu của Sabbour và cs (2018) [43] đều tăng trưởng mạnh nhất trên môi trường PDA.

* Ảnh hưởng của yếu tố môi trường nuôi cấy đến khả năng sinh bào tử của mẫu nấm ký sinh rệp sáp hại rễ hồ tiêu đã tuyển chọn



Hình 3.3. Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến khả năng sinh bào tử của mẫu nấm tím PB1 (A) và mẫu nấm trắng BB1 (B)

Hình 3.10 cho thấy mẫu *P. lilacinum* PB1 sinh bào tử cao nhất trên cả 2 môi trường PDA và SDAY+K, cao thứ 2 trên môi trường SDAY3 và thấp nhất trên môi trường CDA. Mẫu *B. bassiana* BB1 sinh bào tử cao nhất trên môi trường PDA, cao thứ 2 trên môi trường SDAY3 và SDAY+K, thấp nhất trên môi trường CDA. Kết quả nghiên cứu này tương đồng với nghiên cứu của Ahmad và cs (2016) [8] khẳng định môi trường PDA là môi trường cho khả năng sinh bào tử của *B. bassiana* B2 và *B. bassiana* B4 đạt giá trị cao nhất.

* Ảnh hưởng của yếu tố môi trường nuôi cấy đến khả năng ký sinh rệp sáp hại rễ hồ tiêu đã tuyển chọn

Tỷ lệ rệp sáp chết sau 14 ngày lây nhiễm gây ra bởi dịch bào từ mẫu nấm PB1 đạt giá trị cao nhất khi nuôi cấy trên môi trường PDA và SDAY+K cao hơn có ý nghĩa thống kê từ môi trường SDAY3, đạt giá trị thấp nhất khi sử dụng bào tử PB1 nuôi cấy trên môi trường CDA.

Tỷ lệ rệp chết tại thời điểm 14 ngày sau xử lý bởi dịch bào từ BB1 thu từ môi trường PDA đạt 98,89%, từ môi trường SDAY+K đạt 84,44%, từ môi trường SDAY3 đạt 77,78% và từ môi trường CDA chỉ đạt 65,56%.

3.2.2.2 Ảnh hưởng của yếu tố nhiệt độ đến mẫu nấm ký sinh rệp sáp hại rễ cây hồ tiêu đã tuyển chọn

* Ảnh hưởng của yếu tố nhiệt độ đến khả năng nảy mầm của mẫu nấm ký sinh rệp sáp hại rễ hồ tiêu đã tuyển chọn

Tỷ lệ nảy mầm đạt cao ở cả 4 mức nhiệt độ 25, 27, 30 và 32°C, tiếp đến ở mức nhiệt độ 35°C rồi đến mức nhiệt độ 22°C. Ở mức 20°C, tỷ lệ bào tử nảy mầm thấp. Kết quả nghiên cứu này khá tương đồng với nghiên cứu của Kiewnick (2006) [29] khẳng định trên môi trường PDA ở mức nhiệt độ 28°C và 33°C tỷ lệ nảy mầm của mẫu *P. lilacinum* 251 đạt giá trị cao nhất.

Tỷ lệ nảy mầm của BB1 cao ở mức nhiệt độ 25°C và 27°C, tiếp theo ở nhiệt độ 30°C rồi đến 22°C. Ở nhiệt độ 20°C và 32°C, khả năng nảy mầm của BB1 thấp nhất, ở nhiệt độ 35 °C BB1 không nảy mầm. Kết quả nghiên cứu của Parveen và Jeyarani (2023) [39] khẳng định cả 4 mẫu *B. bassiana* (BB111), *B. bassiana* (BB112), *B. bassiana* (BB113) và *B. bassiana* (BB114) đều cho tỷ lệ nảy mầm cao nhất tại mức nhiệt độ 25°C.

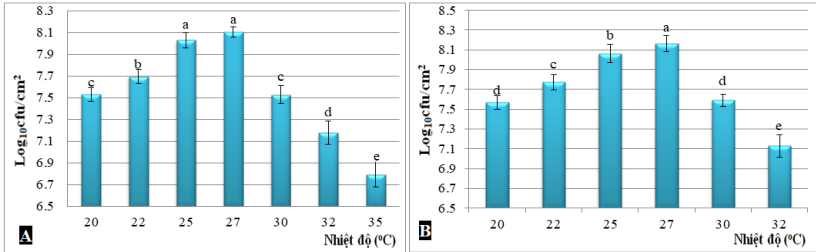
* Ảnh hưởng của yếu tố nhiệt độ đến khả năng sinh trưởng của mẫu nấm ký sinh rệp sáp hại rễ hồ tiêu đã tuyển chọn

Mẫu PB1 sinh trưởng nhanh nhất tại nhiệt độ 27°C và 30°C, tiếp đến tại mức nhiệt độ 32°C, sau đó tại mức nhiệt độ 35°C và 25°C, thấp nhất tại 20°C và 22°C. Kết quả làm chặt chẽ hơn khẳng định loài *P. lilacinum* có thể phát triển ở dải nhiệt độ rộng từ 8°C - 38°C và tăng trưởng tối ưu trong khoảng 26–30°C (dẫn theo Senthilkumar và cs, 2020) [45].

Mẫu BB1 có khả năng sinh trưởng nhanh nhất tại nhiệt độ 25°C và 27°C, tại mức nhiệt độ 22°C, cao thứ 2, tại mức nhiệt độ

20°C cao thứ 3, tại nhiệt độ 22°C cao thứ 4 và thấp nhất ở mức nhiệt độ 32°C. Kết quả này tương đồng với nghiên cứu của Dhar và cs (2016) [20], Ahmad và cs (2016) [8], Acheampong và cs (2020) [6].

** Ảnh hưởng của yếu tố nhiệt độ đến khả năng sinh bào tử của mẫu nấm ký sinh rệp sáp hại rễ hồ tiêu đã tuyển chọn*



Hình 3.4. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến khả năng sinh bào tử của mẫu nấm tím PB1 (A) và mẫu nấm trắng BB1 (B)

Hình 3.11 cho thấy mẫu PB1 có khả năng sinh bào tử cao nhất ở cả 2 mức nhiệt độ 25°C và 27°C (\log_{10} cfu/cm² tương ứng đạt 8,03 và 8,11); mẫu BB1 có khả năng sinh bào tử cao nhất ở nhiệt độ 27°C (\log_{10} cfu/cm² = 8,17). Kết quả này tương đồng với kết quả nghiên cứu của Moldovan và cs (2022) [33].

** Ảnh hưởng của yếu tố nhiệt độ đến khả năng ký sinh rệp sáp hại rễ hồ tiêu của các mẫu nấm đã tuyển chọn*

Sử dụng nguồn bào tử của cả 2 mẫu nấm PB1 và BB1 khi nuôi cây trên các mức nhiệt độ thí nghiệm không ảnh hưởng có ý nghĩa thống kê đến khả năng gây chết rệp sáp hại rễ hồ tiêu. Sau 14 ngày, tỷ lệ rệp chết đều đạt xấp xỉ 100% khi sử dụng nguồn bào tử nuôi cây từ các mức nhiệt độ khác nhau.

3.3.1.3 Ảnh hưởng của pH môi trường đến mẫu nấm ký sinh rệp sáp hồ tiêu đã tuyển chọn

** Ảnh hưởng của PH môi trường nuôi cấy đến khả năng nảy mầm của mẫu nấm ký sinh rệp sáp hại rễ hồ tiêu đã tuyển chọn*

Tỷ lệ nảy mầm của PB1 và BB1 khác biệt không có ý nghĩa thống kê khi nuôi cấy ở các mức pH khác nhau. Tỷ lệ nảy mầm đạt mức tối đa sau 48 giờ ở mức PH từ 4,5 – 7,5 của mẫu PB1 đạt từ 96,70% đến 98,50%, của mẫu BB1 đạt từ 93,50% đến 96,90%. Kết quả này tương đồng với nghiên cứu của Padmavathi và cs (2003) [38] khẳng định tỷ lệ nảy mầm của một số mẫu *B. bassiana* đều đạt

tỷ lệ cao > 95% ở PH từ 3-14.

* *Ảnh hưởng của pH môi trường nuôi cấy đến khả năng sinh trưởng của mẫu nấm ký sinh rệp sáp hại rễ cây hồ tiêu đã tuyển chọn*

pH không ảnh hưởng có ý nghĩa thống kê đến sinh trưởng của cả 2 mẫu PB1 và BB1. Ở các mức pH thí nghiệm, tăng trưởng trung bình của đạt từ 2,06 mm đến 2,10 mm/ngày, của mẫu *B. bassiana* BB1 từ 1,98 mm đến 2,05 mm/ngày. Kết quả nghiên cứu làm rõ hơn khẳng định của Padmavathi và cs (2003) [38] tùy thuộc vào mẫu nấm mà sinh trưởng chịu ảnh hưởng hay không bởi các mức pH khác nhau.

* *Ảnh hưởng của pH môi trường nuôi cấy đến khả năng sinh bào tử của mẫu nấm ký sinh rệp sáp hại rễ cây hồ tiêu đã tuyển chọn*

pH thích hợp nhất cho khả năng sinh bào tử của cả 2 mẫu nấm đã tuyển chọn từ 5,5 đến 7,0. Chỉ số $\log_{10}cfu/cm^2$ tương ứng với 4 mức pH (5,5; 6,0; 6,5 và 7,0) của mẫu *P. lilacinum* PB1 tương ứng đạt 8,29; 8,35; 8,35 và 8,30, của mẫu *B. bassiana* BB1 tương ứng đạt 8,35; 8,39; 8,40 và 8,36. Kết quả này khác biệt so với nghiên cứu của Souza và cs (2022) [48] khẳng định không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về khả năng sinh bào tử của mẫu *B. bassiana* ESALQ171 và *M. anisopliae* ESALQ935 trong khoảng pH = 4 - 9.

* *Ảnh hưởng của pH môi trường nuôi cấy đến khả năng ký sinh rệp sáp hại rễ hồ tiêu của mẫu nấm đã tuyển chọn*

Tỷ lệ rệp sáp hại rễ hồ tiêu chết sau 14 ngày xử lý bằng dịch bào tử 2 mẫu nấm PB1 và BB1 ở tất cả các mức pH từ 4,5 – 5,5 của 2 đều đạt khoảng 100%.

3.2.2.4. *Ảnh hưởng của độc chất đến mẫu nấm ký sinh rệp sáp hại rễ cây hồ tiêu đã tuyển chọn*

* *Ảnh hưởng của độc chất đến khả năng nảy mầm của mẫu nấm ký sinh rệp sáp hại rễ hồ tiêu đã tuyển chọn*

Tỷ lệ ức chế khả năng nảy mầm của PB1 và BB1 bởi 4 loại thuốc trừ nấm (Agri - Fos 400, Ridomil 68WG, Mancozeb 80WP, Aliette 800WG) đều xấp xỉ 100% ở tất cả các thời điểm theo dõi. Tỷ lệ ức chế khả năng nảy mầm của PB1 và BB1 bởi 2 loại thuốc trừ sâu (Tervigo 20SC và Sovigo 108SC) tại 12 giờ sau cấy đạt khoảng 50% và đến 72 giờ sau cấy còn khoảng 30%. Kết quả nghiên cứu Ramos và cs (2022) [58] khẳng định mẫu *B. bassiana* Bb-18 và *M. anisopliae* Ma-30 cũng bị các sản phẩm thuốc trừ nấm ức chế 100% khả năng nảy mầm; thuốc trừ sâu ức chế đến khoảng 50%.

* Ảnh hưởng của độc chất đến khả năng sinh trưởng của mẫu nấm ký sinh rệp sáp hại rễ cây hồ tiêu đã tuyển chọn

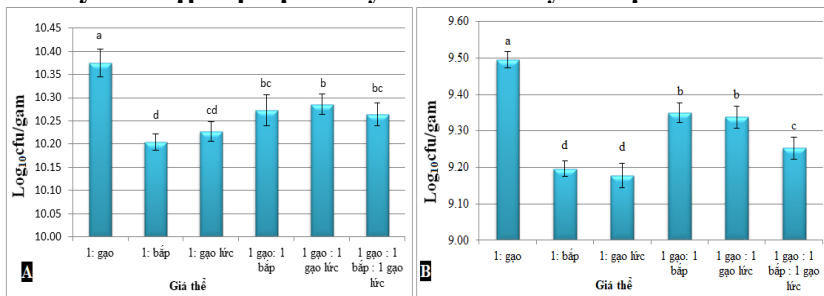
Cả 4 loại thuốc trừ nấm (Agri - Fos 400, Ridomil 68WG, Mancozeb 80WP, Aliette 800WG) đều ức chế mạnh hơn đến khả năng sinh trưởng của cả mẫu nấm PB1 và BB1 so với 2 sản phẩm Tervigo 20SC và Sovigo 108SC. Tại thời điểm 20 ngày sau cấy, tỷ lệ ức chế đến khả năng sinh trưởng của PB1 và BB1 gây ra bởi 4 sản phẩm trừ nấm đều khoảng 94% tiếp đó là do sản phẩm Tervigo 20SC và Sovigo 108SC đều khoảng 85%.

* Ảnh hưởng của độc chất đến khả năng sinh bào tử của mẫu nấm ký sinh rệp sáp hại rễ cây hồ tiêu đã tuyển chọn

Cả 4 loại thuốc trừ nấm (Agri - Fos 400, Ridomil 68WG, Mancozeb 80WP, Aliette 800WG) đều ức chế 100% khả năng sinh bào tử của cả PB1 và BB1. Tervigo 20SC ức chế khả năng sinh bào tử của PB1 90,95% và BB1 95,58% cao hơn có ý nghĩa thống kê so với Sovigo 108SC ức chế khả năng sinh bào tử của PB1 88,61% và BB1 93,57%.

3.3. NHÂN SINH KHỐI CÁC MẪU NẤM KÝ SINH CÔN TRÙNG ĐÃ TUYỂN CHỌN

3.3.1. Ảnh hưởng của yếu tố giá thể đến nhân sinh khối các mẫu nấm ký sinh rệp sáp hại rễ cây hồ tiêu đã tuyển chọn

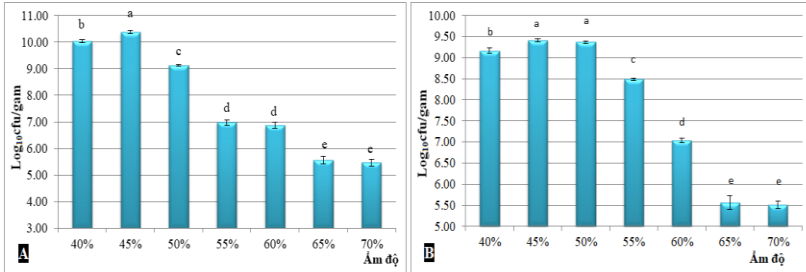


Hình 3.5. Ảnh hưởng của loại giá thể đến khả năng nhân sinh khối của mẫu nấm tím PB1 (A) và mẫu nấm trắng BB1 (B)

Hình 3.13 cho thấy giá thể thể hạt gạo cho hiệu quả cao nhất khi nhân sinh mẫu PB1 và BB1. Trong đó, số lượng bào tử của mẫu PB1 đạt cao nhất khi sử dụng giá thể từ gạo đạt đến $2,38 \times 10^{10}$ (bào tử/gam), của mẫu BB1 đạt $3,13 \times 10^9$ bào tử/gam.

3.3.2. Ảnh hưởng của ẩm độ đến nhân sinh khối các mẫu nấm ký

sinh rệp sáp hại rễ cây hồ tiêu đã tuyển chọn



Hình 3.6. Ảnh hưởng của ẩm độ đến khả năng nhân sinh khối của mẫu nấm tím PB1 (A) và mẫu nấm trắng BB1 (B)

Hình 3.14 cho thấy, sau 14 ngày nuôi cấy, mẫu nấm PB1 có khả năng sinh bào tử cao nhất ($2,42 \times 10^{10}$ bào tử/gam) ở mức ẩm độ 45%, mẫu nấm BB1 nhân sinh khối cao nhất ở 2 mức ẩm độ là 45% và 50% ($2,58 \times 10^9$ bào tử/gam và $2,35 \times 10^9$ bào tử/gam). Kết quả tương ứng với nghiên cứu của Camara và cs (2022) [14] khẳng định ẩm độ 51,5% tối ưu để nhân sinh khối mẫu *B. bassiana* phân lập từ bọ xít *Nysius* spp khi sử dụng gạo làm giá thể.

3.4 ẢNH HƯỞNG NỒNG ĐỘ, LIỀU LƯỢNG CỦA MẪU NẤM ĐÃ TUYỂN CHỌN ĐẾN HIỆU LỰC PHÒNG TRỪ RỆP SÁP HẠI RỄ HỒ TIÊU

3.4.1. Ảnh hưởng của nồng độ mẫu nấm đã tuyển chọn đến hiệu lực phòng trừ rệp sáp hại rễ hồ tiêu ở điều kiện phòng thí nghiệm

3.4.1.1. Ảnh hưởng của nồng độ mẫu nấm PB1 đến hiệu lực phòng trừ rệp sáp hại rễ hồ tiêu ở điều kiện phòng thí nghiệm

Hiệu lực trừ ấu trùng rệp sáp hại rễ hồ tiêu sau 15 ngày xử lý của mẫu nấm PB1 ở nồng độ 10^8 và 10^9 (bào tử/ml) đều đạt 100%, ở nồng độ 10^7 (bào tử/ml) đạt khoảng 93%, ở nồng độ 10^5 và 10^6 (bào tử/ml) chỉ tương ứng khoảng 50% và 59%, hiệu lực trừ trưởng thành rệp sáp hại rễ hồ tiêu của mẫu nấm PB1 ở nồng độ 10^8 và 10^9 (bào tử/ml) đều gần đạt 100%, ở nồng độ 10^7 (bào tử/ml) đạt khoảng 90%, ở nồng độ 10^5 và 10^6 (bào tử/ml) chỉ tương ứng khoảng 51% và 60%.

3.4.1.2. Ảnh hưởng của nồng độ mẫu nấm BB1 đến hiệu lực phòng trừ rệp sáp hại rễ hồ tiêu ở điều kiện phòng thí nghiệm

Hiệu lực trừ ấu trùng rệp sáp hại rễ hồ tiêu sau 15 ngày xử lý của mẫu nấm BB1 ở nồng độ 1×10^9 (bào tử/ml) đã đạt 100%, ở nồng độ 1×10^5 (bào tử/ml) chỉ đạt 36,56%. Hiệu lực trừ trưởng thành rệp

sáp hại rễ hồ tiêu của mẫu nấm BB1 đạt 1×10^9 (bào tử/ml) đã đạt 100%, ở nồng độ 1×10^5 (bào tử/ml) chỉ đạt 31,98%.

3.4.2. Ảnh hưởng của liều lượng mẫu nấm đã tuyển chọn đến hiệu lực phòng trừ rệp sáp hại rễ hồ tiêu ở điều kiện vườn ươm

Hiệu lực phòng trừ rệp sáp hại rễ hồ tiêu ở vườn ươm khi xử lý bằng dịch mẫu nấm PB1 với các mức liều lượng khác nhau 75, 100 và 125 ml/bầu đều đạt cao > 92% (cao hơn có ý nghĩa thống kê so với công thức xử lý với lượng 50 ml/bầu chỉ đạt 80,07%).

Hiệu lực phòng trừ rệp sáp hại rễ hồ tiêu ở giai đoạn vườn ươm khi xử lý với dịch mẫu nấm BB1 đều đạt cao với liều lượng 100 và 125 ml/bầu (đạt >98%), ở liều lượng 75 ml/bầu đạt 82,97% và ở liều lượng 50 ml/bầu chỉ đạt 71,04%. Kết quả này tương đương với kết quả nghiên cứu của Lemawork và cs (2011) [30] khi xử lý rệp hại rễ chuỗi *Cataenococcus ensete* bằng 100 ml dịch ở nồng độ $4,0 \times 10^9$ bào tử/ml với các mẫu nấm ký sinh côn trùng cho hiệu lực phòng trừ *C. ensete* trong điều kiện vườn ươm sau 120 ngày xử lý với mẫu *B. bassiana* PPRC-56 đạt 96,8%; *B. bassiana* FF 94,5%; *M. anisopliae* PPRC-6 95,8%; *M. anisopliae* Mm 83,3%.

3.4.3. Ảnh hưởng của liều lượng mẫu nấm đã tuyển chọn đến hiệu lực phòng trừ rệp sáp hại rễ hồ tiêu ở điều kiện đồng ruộng

3.4.3.1. Ảnh hưởng của liều lượng mẫu nấm PB1 đến hiệu lực phòng trừ rệp sáp hại rễ hồ tiêu ở điều kiện đồng ruộng

Các công thức xử lý dịch mẫu nấm PB1 với lượng 200, 250 và 300 ml/gốc hồ tiêu đều cho hiệu lực phòng trừ rệp cao hơn có ý nghĩa thống kê (từ 69,80% đến 76,78%), ở công thức xử lý với lượng 150 ml/gốc hồ tiêu cho hiệu lực trừ rệp đạt giá trị thấp nhất (chỉ đạt 57,76%) tại thời điểm theo dõi 180 ngày sau xử lý.

3.4.3.2. Ảnh hưởng của liều lượng mẫu nấm BB1 đến hiệu lực phòng trừ rệp sáp hại rễ hồ tiêu ở điều kiện đồng ruộng

Hiệu lực phòng trừ rệp sáp hại rễ hồ tiêu ở đồng ruộng khi xử lý bằng mẫu nấm BB1 với lượng dịch bào tử 250 và 300 ml/gốc hồ tiêu đạt giá trị tương ứng 69,6% và 74,0% cao hơn khác biệt có ý nghĩa thống kê so với 2 mức lượng dịch bào tử 200 và 150 ml/gốc hồ tiêu chỉ đạt tương ứng 53,0% và 45,5% tại 180 ngày theo dõi sau xử lý.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

1. Kết luận

Nghiên cứu đã phân lập được 154 mẫu nấm có khả năng ký

sinh rệp sáp hại rễ cây hồ tiêu tại Đắk Lắk. Đồng thời, nghiên cứu cũng đã tuyển chọn và định danh được 2 mẫu nấm có khả năng kiểm soát mạnh rệp sáp hại rễ cây hồ tiêu bao gồm 1 mẫu nấm tím *Purpureocillium lilacinum* PB1 và 1 mẫu nấm trắng *Beauveria bassiana* BB1.

Vườn hồ tiêu áp dụng phương thức trồng xen hồ tiêu với cà phê, sử dụng cây sống làm trụ hồ tiêu, áp dụng phân bón hữu cơ và không dùng thuốc trừ nấm bệnh có mật độ nấm *Metarhizium* spp., *Beauveria* spp. và *Purpureocillium* spp. cao hơn so với những vườn hồ tiêu trồng thuần, sử dụng trụ chết, không bón phân hữu cơ sử dụng thuốc trừ nấm bệnh.

Môi trường PDA, nhiệt độ 25 - 27°C, PH = 4,5 - 7,5 là điều kiện phù hợp cho sự nảy mầm, sinh trưởng, sinh bào tử và phát huy tính độc với rệp sáp hại rễ hồ tiêu của nấm tím *P. lilacinum* PB1 và nấm trắng *B. bassiana* BB1.

Điều kiện thích hợp để nhân sinh khối nấm tím *P. lilacinum* PB1 là sử dụng giá thể bằng hạt gạo với ẩm độ 45%. Điều kiện thích hợp để nhân sinh khối nấm trắng *B. bassiana* BB1 là giá thể hạt gạo với ẩm độ 45 - 50%

Hiệu lực phòng trừ rệp sáp hại rễ hồ tiêu của dịch bào tử nấm *P. lilacinum* PB1 (1×10^9 bào tử/ml) đạt giá trị cao khi sử dụng với lượng 75, 100 và 150 ml/bầu hồ tiêu ở điều kiện vườn ươm, với lượng 200, 250 và 300 ml/gốc hồ tiêu ở điều kiện đồng ruộng. Hiệu lực phòng trừ rệp sáp hại rễ hồ tiêu của dịch bào tử nấm *B. bassiana* BB1 (1×10^9 bào tử/ml) đạt giá trị cao với lượng 100 và 150 ml/bầu hồ tiêu ở điều kiện vườn ươm, với lượng 250 và 300 ml/gốc hồ tiêu ở điều kiện đồng ruộng.

2. Kiến nghị

Cần đánh giá hiệu quả của các mẫu nấm ký sinh côn trùng đã tuyển chọn đến một số loài dịch hại trong đất vùng rễ cây hồ tiêu ngoài rệp sáp như tuyến trùng, các loài nấm gây bệnh hồ tiêu.

Cần đánh giá ảnh hưởng của các mẫu nấm ký sinh côn trùng đã tuyển chọn đến các loài sinh vật có ích trong hệ sinh thái vùng rễ cây hồ tiêu như các loài côn trùng bắt mồi, giun đất...

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tiếng Anh: 251

DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

1. **Trần Thị Huế**, Nguyễn Thị Thu Thủy, Trần Thị Thu Hà..Phân lập, tuyển chọn và đánh giá hiệu quả phòng trừ loài rệp sáp hại rễ cây hồ tiêu (Pseudococcidae) của một số chủng nấm ký sinh trên côn trùng. *Tạp chí Khoa học Đại học Huế: Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn*, 131 (3B): 17–30.
2. **Tran Thi Hue**, Nguyen Thi Thu Thuy, Nguyen Thi Huong Cam, Tran Thi Le Tra, Tran Thi Thu Hien, Tran Thi Thu Ha. Effect of agricultural practices on entomopathogenic fungi (*Metarhizium* sp. and *Beauveria* sp.) density in the rhizosphere soil of black pepper field in Viet Nam's Dak Lak province. *International Conference of the Agricultural Science 2022 in Can Tho, Viet Nam*
3. **Tran Thi Hue**, Nguyen Thi Thu Thuy, Tran Dang Khanh, Nguyen Anh Thu, Tran Xuan Hung, Tran Thi Thu Ha, Nguyen Phuong Dai Nguyen (2023). The Potential of *Beauveria* against Root Mealybugs *Formicoccus* sp. (Homoptera: Pseudococcidae) Black Pepper in Dak Lak Province of Vietnam. *Journal of Advanced Zoology* 44(2), 2622:2636
<http://jazindia.com/index.php/jaz/article/view/1386/1018>
4. Trần Thị Huế, Nguyễn Thị Thu Thủy , Trần Thị Thu Hà. Hiệu lực của nấm kí sinh côn trùng *Purpureocillium lilacinum* và *Beauveria bassiana* kiểm soát rệp sáp hại rễ cây hồ tiêu ở vườn ương và đồng ruộng tại tỉnh Đắk Lắk. *Tạp chí BVTV số 6/2023*.

HUE UNIVERSITY
UNIVERSITY OF AGRICULTURE AND FORESTRY

TRAN THI HUE

**RESEARCH ON THE APPLICATION OF
ENTOMOPHATHOGENIC FUNGI IN BIOCONTROL OF
MEALYBUGS (*Formicococcus* sp.) ON ROOTS OF BLACK
PEPPER IN DAK LAK PROVINCE**

DISCIPLINE: PLANT PROTECTION

Code: 9620112

SUMMARY OF DOCTORAL THESIS IN AGRICULTURE

SUPERVISORS:

- 1. PROF. DR. TRAN THI THU HA**
- 2. DR. NGUYEN THI THU THUY**

HUE - 2024

PREAMBLE

1. INTRODUCTION

Black pepper plant (*Piper nigrum* L.) is known as the king of spices and is commonly grown in some tropical countries around the world. Black pepper is identified as a key crop contributing to the economic development of Dak Lak province. During the period 2014 - 2019, due to the high value of black pepper products, pepper acreage increased rapidly and over-intensive farming led to an almost uncontrollable development of pests.

Root mealybug is one of the pests that greatly affects black pepper production in many countries around the world. They damage black pepper plants at all stages from the nursery stage, basic construction to the business stage. Black pepper plants damaged by root mealybugs will gradually become exhausted and die if they do not take timely control measures.

In addition, when root mealybug suck sap, they create wounds that make black pepper plants susceptible to dangerous soil-borne diseases such as *Phytophthora* sp., *Fusarium* sp., and *Meloidogyne incognita*. Controlling black pepper root mealybugs by chemical pesticides is often ineffective because they live in tumors formed by their association with soil fungi and the mealybug's body is covered with a protective layer of powdered wax. Furthermore, chemical pesticides negatively affect biodiversity and ecological balance leading to an increasingly complicated pest situation in black pepper fields.

Using natural enemies in biocontrol of crop pest are being confirmed as a sustainable agriculture trend. Research on the use of entomopathogenic fungi in biocontrol has achieved great achievements all over the world. However, to maximize the effectiveness of this natural enemy, it is necessary to collect and select highly effective samples of indigenous entomopathogenic fungi, and determine the most suitable conditions for growth and mass production and applying them to control black pepper root mealybugs in Dak Lak province is very significant. Therefore, “Research on the application of entomopathogenic fungi in

biocontrol of mealybugs (*Formicococcus* sp.) on roots of black pepper in Dak Lak province” was implemented.

2. OBJECTIVES OF THE THESIS

Objectives of this study aimed to isolate, select and identify entomopathogenic fungi strains were high effective against black pepper root mealybugs and determine positive influencing factors on mass production and the effectiveness of controlling black pepper root mealybugs selected isolates in Dak Lak province.

3. SCIENTIFIC AND PRACTICAL SIGNIFICANCE

a. Scientific significance

- The results of thesis confirm the role of entomopathogenic fungi in managing black pepper root mealybugs.

- The results of thesis are a reference for further research on biocontrol applying entomopathogenic fungi in the management of root mealybugs.

b. Practical significance

The results of thesis are the basis for selecting entomopathogenic fungi strains to control black pepper root mealybugs, thereby reducing the amount of chemical pesticides. Thesis also contributes to promoting the diversity of beneficial organisms, ensuring the health of humans and animals, increasing productivity while still ensuring the quality of peppercorn. Therefore, thesis will contribute to the development of a sustainable and environmentally friendly agriculture.

4. NEW CONTRIBUTIONS OF THE DISSERTATION

The thesis isolated 154 entomopathogenic fungi samples and also selected, identified 2 samples with high potential biocontrol of mealybugs on roots of black pepper in Dak Lak province: purple fungus sample (*Purpureocillium lilacinum* PB1) and white fungus sample (*Beauveria bassiana* BB1).

The thesis surveyed that black pepper fields (intercropping black pepper with coffee, using living pillars, applying organic fertilizers and not using fungicides) have a more positive effect on the density of *Metarhizium* spp., *Beauveria* spp. and *Purpureocillium* spp. compared to other fields (monoculturing black pepper, using dead pillars, chemical fertilizers, and using fungicides).

The thesis determined that the PDA culture, temperature 25 - 27°C, pH = 4,5 – 7,5 was the appropriate condition for germination, growth and sporulation and pathogenicity of purple fungus sample *P. lilacinum* PB1 and white fungus sample *B. bassiana* BB1.

The thesis determined that optimal substrate for mass production purple fungus sample *P. lilacinum* PB1 was rice grains with moisture content of 45%, for mass production white fungus sample *B. bassiana* BB1 was rice grain with moisture content of 45 - 50%.

The effectiveness of purple fungus sample *P. lilacinum* PB1 and white fungus sample *B. bassiana* BB1 at a concentration of 1×10^9 spores/ml reached about 100% in laboratory and nurseries conditions, 70% in field conditions.

CHAPTER 1. LITERATURE REVIEW

1.1. BLACK PEPPER PRODUCTION AND PEST SITUATION

Black pepper (*Piper nigrum* L.) belongs to the Piperaceae family, which is a spice crop widely used worldwide [3]. Vietnam is the biggest area and output of black pepper in the world [25]. Dak Lak is one of three provinces in the Central Highlands planned to be a key region for black pepper production in Viet Nam. In 2022, the black pepper cultivation area of Dak Lak province were about 32.820 hectares with yield of 29,07 tons/ha and total production of 84.640 tons [1].

Pests are a factor seriously affecting pepper production worldwide [50]. The most serious disease on black pepper caused by *Phytophthora* sp. *Fusarium* sp. frequently appears in all pepper cultivation regions of the world. Common insect pests on black pepper plants include mealybugs, whiteflies, scale bugs, and lace bug [2].

1.2. MEALYBUG ON CROP AND BLACK PEPPER

Mealybugs belong to the Pseudococcidae (Homoptera: Coccoidea), which includes about 250 genera with more than 2,000 described species worldwide [16]. In the past, most mealybug species were only minor pests, but in the current decade many mealybug species have become major pests in many agricultural

crops due to the impact of climate change [34].

In recent years, the root mealybugs have emerged as one of the most significant insect pests impeding black pepper production in Vietnam [2, 4], India [48]. Root mealybugs damage black pepper plants in both nursery and field conditions [4].

1.3. ENTOMOPHATHOGENIC FUNGI

1.3.1. Identification

Entomopathogenic fungi are known as fungi that infect and kill insects. There are many terms used to refer to fungi that cause disease and kill insects such as entomogenous fungi, entomopathogenic fungi, insect-pathogenic fungi, entomophthorous fungi, insect-pathogenic fungi and fungal entomopathogens [49].

1.3.2. History of research and application

Agostino Bassi (1773–1856) demonstrated that *Beauveria bassiana* (*Botrytis bassiana*) causes white muscadine disease in silkworms. In 1874, Pasteur and LeConte both suggested that it could be used to kill insects [50]. To date, the world has about 171 mycoinsecticides were based on entomopathogenic fungi, of which *B. bassiana* and *M. anisopliae* products account for the majority [26].

1.3.3. Classification

Entomopathogenic fungi belong to the phyla Ascomycota, Zygomycota, Chytridiomycota and Basidiomycota [13]. Most current studies on the identification and classification of entomopathogenic fungi are carried out using a combination of morphology and molecular methods [23].

1.3.4. Abundance of and influencing factors

Entomopathogenic fungi are very abundant and diverse, and distributed all over the world [12, 21]. It is estimated that there are about 1000 species belonging to 100 fungal genera [50]. The largest

number species are in the family Entomophthoraceae, but the well-known species are the family Clavicipitaceae [13, 39]

1.3.5. Selection

To apply entomopathogenic fungi as bioinsecticides, it is necessary to screen their virulence against target insect pests [15]. The selection of entomopathogenic fungi samples has been and continues to be carried out in all localities and countries around the world. Because commercial products based on entomopathogenic fungi that may be high effective in controlling insect pests in this locality may not be effective against some pests in that locality [24].

1.3.6. The influence of ecological factors

- Influence of emperature and humidity

In general, high temperatures negatively affect on the vitality and germination ability of spores and the toxicity of entomopathogenic fungi [51]. However, each sample requires an optimal temperature and humidity range for growth, spore production and phathogenicity [6].

- Influence of pesticides

In organic ecosystems positively affects on the occurrence of entomopathogenic fungi [47]. Germination, growth and sporulation and phathogenicity of entomopathogenic fungi depend on the concentration and kind of pesticides and the fungal samples [16, 19].

- Influence of nutrition

The cultural media is the most important factor for entomopathogenic fungi to grow and develop in artificial conditions [33]. The ability of fungal mycelium to grow and produce spores on artificial media depends on the fungal sample and the components of nutrition used in the culture medium [33]. *B. bassiana* BP1.1 sample has the highest growth ability when cultured on SDA [17]. *B. bassiana* samples (JAB 6, JAB 7, AM 9, IBCB 7, IBCB 66) all achieved high sporulation when cultured in PDA, PDAY, SDAY and CM [20].

- Influence of pH

[23]. [45]. in Krong Ana, Dak Lak province [5].

In general, neutral pH has a positive effect on entomoparasitic fungi [22]. However, each entomoparasitic fungi sample has specific requirements with a certain pH level [44]. In Krong Ana district, Dak Lak province, most fungal samples isolated in coffee fields grow and produce spores best at pH = 5.5 and pH = 6 [5].

1.3.7. Mass production

There are many techniques for mass production the entomoparasitic fungi that have been researched and applied [29]. Among them, the most commonly applied mass production technique is using solid substrates [10, 30, 32, 34, 38]. *B. bassiana* can produce the highest number of spores when used rice grains with a moisture content of 40–70% [14, 37, 41].

1.3.8. Potential

The potential of entomoparasitic fungi has been studied and published for many harmful arthropod species in the insect and arachnid class.

1.3.9. Management mealybug insectpest

The mode of action of *B. bassiana* on the mealybug *Paracoccus marginatus* include: (i) spores attach to the cuticle (ii) the spores germinate (iii) the mycelium penetrates or germ tube invades the surface of cuticle (iv) the waxy layer is replaced by fungi (v) the fungal mycelium covers the entire cuticle (vi) the fungus continues to grow and produce spores outside the cadaver of mealybug [9].

1.3.10. Management black pepper root mealybug

A number of studies around the world have studied the use of entomoparasitic fungi to manage black pepper root mealybug such as *Nomurae rileyii*, *Verticillium lecanii*, *Metarrhizium anisopliae* and *Aspergillus* sp. However, the effectiveness of these fungi in controlling black pepper root mealybug is relatively low.

CHAPTER 2. CONTENTS, MATERIALS AND METHODS

2.1. Location, time and materials

2.1.1. Location and time

Location: Samples were collected in Buon Ma Thuot city, Cu Kuin district, Lak district, Cu M'gar district, Krong Nang district. In vitro and nursery experiments were conducted at Tay Nguyen University. Field experiments were conducted in Eakao Commune, Buon Ma Thuot City, Dak Lak Province.

Time: from 11/2019 to 11/2023.

2.1.2. Materials

Black pepper (*Piper nigrum* L.) plantations in Dak Lak province.

Entomoparasitic fungi samples were isolated and selected from black pepper fields in Dak Lak.

The black pepper root mealybug (*Formicococcus* sp.) was collected in black pepper fields in Dak Lak and was identified by morphology and molecular methods with the assistance of Dr. Dao Thi Hang, Department of Entomology and Nematodes, Plant Protection Institute, Hanoi.

2.2. Contents

Collecting and isolating entomoparasitic fungi samples that infected and killed black pepper root mealybug.

Studying the effects of some ecological factors on entomoparasitic fungi against black pepper root mealybug.

Studying mass production of fungal samples that has great potential in controlling black pepper root mealybug.

Studying the effects of concentration and dosage of selected fungal samples on the effectiveness of controlling black pepper root mealybug in laboratory, nursery and field conditions.

2.3. Methods

2.3.1 Determining the composition, selection and

identification of fungal samples with the high pathogenicity against black pepper root mealybug.

Isolation of entomoparasitic fungi samples from cadaver of mealybug used method that spread on PGA medium.

Isolation of of entomoparasitic fungi samples from soil samples used method that spread on selective medium SDA-D50 (for *Metarhizium and Beauveria*) [43], PGA-NaCl (for *Purpureocillium*) [11].

Selection of entomoparasitic fungi samples based on experiments in the laboratory and nethouse.

Identification of selected entomoparasitic fungi samples using 2 methods: (1) Identification by morphology: based on the method of observing some morphological characteristics such as characteristics of colonies on PGA medium, spore, conidiospore to compare with some studies [7, 19, 25, 49]. (2) Molecular identification based on universal primers ITS1 and ITS4. The nucleotide sequences of the genes were compared to the published sequences in the DDBJ/Genbank/EMBL databases using BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). The Mega software version 6.0 was used to generate the phylogenetic tree with multiple data alignments

2.3.2 Effects of some ecological factors on entomoparasitic fungi

Investigating the effects of some farming techniques on the density of entomoparasitic fungi in the rhizosphere of black pepper plants based on collecting soil samples and spreading the soil solution on selective SDA-D50 medium to determine the density. *Beauveria* spp., and *Metarhizium* spp., on PGA - NaCl to determine the density of *Purpureocillium* spp.

Evaluating the effects of (temperature, culture media, pH and some commercial chemicals) on germination, growth, sporulation and pathogenicity against black pepper root mealybug of selected fungal samples by CRD experiment.

2.3.3 Mass production of the selected fungul sample

Determining the type of substrate and suitable humidity to mass production of the selected fungul sample based on RCD experiment.

2.3.4 Effects of the concentration and dosage on effectiveness of selected fungal samples against black pepper root mealybug

Evaluating the effects of the concentration and dosage on effectiveness of selected fungal samples against black pepper root mealybug based on RCBD experiment in laboratory, nursery and field condition.

2.4. Data analysis

Data were calculated by using Excel 2010 software. The significance of differences among the mean values was compared by Duncan's multiple-range test using Statistical Package for the Social Sciences 20 (SPSS 20) software.

CHAPTER 3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. COMPOSITION, SELECTION AND IDENTIFICATION OF ENTOMOPHATHOGENIC FUNGI SAMPLES WITH HIGH PHATHOGENCITY AGAINST BLACK PEPPER ROOT MEALYBUG

3.1.1. Composition of entomophathogenic fungi in black pepper field in Dak Lak province

Research have collected 154 samples of entomophathogenic fungi. Among them, Cu Kuin district has the highest number of collected samples (46 samples), followed by Buon Ma Thuot city (31 samples), Krong Nang district (27 samples), Cu M'gar (26 samples), Cu Kuin district (26 samples) and Lak district (24 acres).

Purple fungi *Purpureocillium* (*Paecilomyces*) samples: black pepper root mealybugs parasitized by purple fungi sample have bodies covered by purple mycelium and conidiophore. Colony on PGA medium can be purple in the center, white at the edges or cover the entire. White fungi *Beauveria* samples: black pepper root mealybugs parasitized by white fungus sample have bodies are often covered by white mycelium and conidiophore. Colony on PGA is white or light yellow. Conidiophore has a swollen bottom and a tapered top with the spherical spores. Green samples *Metarhizium* samples: black pepper root mealybugs parasitized by green fungus *Metarhizium* have bodies are often covered with a layer of white or blue powder. Colonies on PGA medium are blue or white around the blue center. The morphological characteristics of all three fungi genera are consistent with the description in the classification key of Humber (2012) [23]

3.1.2. Selection of entomopathogenic fungi samples with high pathogenicity against black pepper root mealybug

The study selected two entomopathogenic fungi samples with high pathogenicity against black pepper root mealybug in Dak Lak province including purple fungi sample (PB1) and white fungi sample (BB1).

In the laboratory, root mealybug mortality treated with the PB1 sample was up to 100% for instar nymphs and 98,89% for adult at 21 days after treatment. In the nursery, the PB1 sample showed 100% effectiveness in controlling black pepper root mealybug after 6 months of treatment.

In the laboratory, root mealybug mortality treated with the BB1 sample was up to 100% in both instar nymphs and adult stages at 21 days after treatment. In the nursery, the BB1 sample showed 99,18% effectiveness in controlling black pepper root mealybug after 6 months of treatment.

3.1.3. Identification of selected entomopathogenic

fungi samples with high pathogenicity against black pepper root mealybug

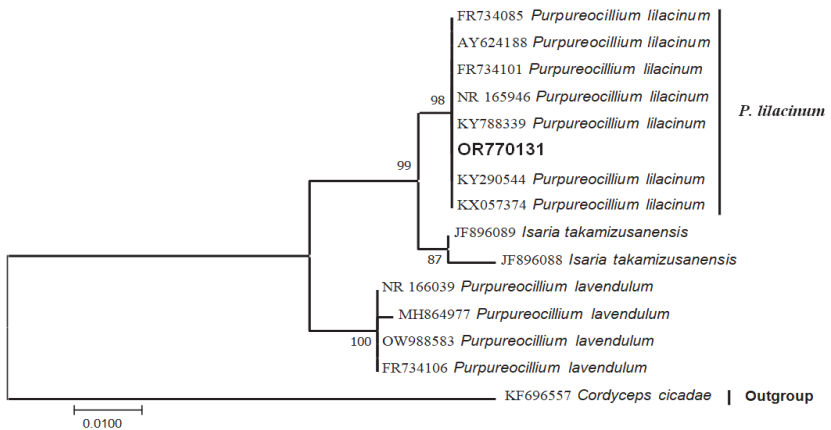
- Identification by morphology:

Colony of PB1 sample on PGA medium is purple. The Conidiogenous cell has a cylindrical shape that gradually tapers towards the side where the spore attaches. Conidia are egg-shaped and forming chain. Comparison with some studies [46]] determined that PB1 belongs to the species *Purpureocillium lilacinum*.

Colony of BB1 sample on PGA medium is white. Conidiogenous cell with an extended, denticulate apex. Conidia are globose, each conidia formed singly on separate denticles. Comparing with the taxonomy key of Humber (2012) [23] and the description of Affandi et al (2013) [7] initially recognized this sample as belonging to the species *Beauveria bassiana*.

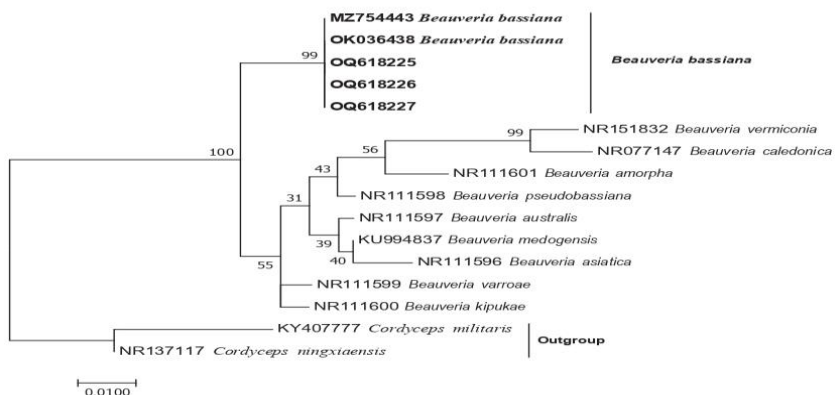
- Molecular identification:

Comparison with GenBank (NCBI) data shows that the gene segment of PB1 sample is similar and has very high coverage (100%) with *Purpureocillium lilacinum* species, BB1sample is similar and has very high coverage (100%) with species *Beauveria bassiana*.



Hình 3.7. Phylogenetic analysis showing the relationship between PB1 sample (OR770131) and related species based on gene

sequence based on the *ITS1-5.8S-ITS2* rRNA gene sequences.



Hình 3.8. Phylogenetic analysis showing the relationship between BB1 sample (OQ618225) and related species based on gene sequence based on the *ITS1-5.8S-ITS2* rRNA gene sequences.

3.2. EFFECTS OF SOME ECOLOGICAL FACTORS ON ENTOMOPATHOGENIC FUNGI

3.2.1. Effects of some agricultural techniques on the density of entomopathogenic fungi in the rhizosphere soil of black pepper tree in field conditions

The density of *Metarhizium* spp., *Beauveria* spp. and *Purpureocillium* spp. in the rhizosphere soil in fields intercropping black pepper with coffee, using living supports, using organic fertilizers and non-apply chemical fungicides are higher than in black pepper monoculture fields, using non-living supports, using chemical fertilizer and fungicides at all 3 research locations including Buon Ma Thuot city, Krong Nang district and Cu Kuin district.

3.2.2. Effects of ecological factors on selected entomopathogenic fungi samples in laboratory

conditions

3.2.2.1. Effect of culture medium on selected entomopathogenic fungi samples

* Effect of culture medium on germination

The germination rate of PB1 sample was highest on PDA and SDAY+K, followed by SDAY3 and lowest on CDA medium. The results of this study are equivalent to Kiewnick's (2006) confirmed that *Paecilomyces lilacinus* 251 had a higher germination rate on PDA than on SDA.

The germination rate of sample BB1 reached the highest value on PDA and SDAY+K, followed by SDAY3 and the lowest on CDA. Research results of Ahmad et al (2016) [8] confirmed that *B. bassiana* B2 and *B. bassiana* B4 samples had the highest germination rate on PDA medium compared to PSA, corns, rice, flour.

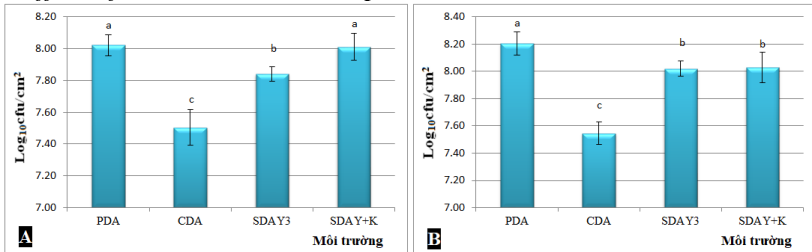
* Effect of culture medium on the growth

PB1 had the highest growth in both PDA and SDAY+K, followed on SDAY3 medium and the lowest on CDA.

BB1 grew the fastest on PDA, followed by SDAY3 and SDAY+K, and slowest on CDA. The results of this study are equivalent to *B. bassiana* B2 in the study of Ahmad et al. (2016) [8],.

BB1 grew the fastest on PDA, followed by SDAY3 and SDAY+K, and slowest on CDA. The results of this study are equivalent to *B. bassiana* B2 in the study of Ahmad et al, (2016) [8], *B. bassiana* BR3 in the study of Sabbour et al., (2018) [40] both grew the fastest on PDA.

* Effect of culture medium on sporulation



Hình 3.9. Effect of culture medium on sporulation of

purple fungus PB1 sample (A) and white fungus BB1 sample (B)

Figure 3.10 shown that *P. lilacinum* PB1 sample had the highest sporulation on both PDA and SDAY+K, the second highest on SDAY3 and the lowest on CDA. *B. bassiana* BB1 sample had the highest sporulation on PDA, the second highest on SDAY3 and SDAY+K, and the lowest on CDA. The results of this study are similar to the study of Ahmad et al (2016) [8] confirming that PDA is the optimal medium for the sporulation ability of *B. bassiana* B2 and *B. bassiana* B4.

** Effect of culture medium on pathogenicity against black pepper root mealybug*

The root mealybugs mortality 14 days after inoculation by PB1 conidial suspensions cultured on PDA and SDAY+K reached the highest value that was statistically significantly higher than SDAY3. The root mealybugs mortality by PB1 conidial suspensions collected from CDA medium was the lowest value.

The root mealybugs mortality 14 days after inoculation by BB1 conidial suspensions cultured on PDA reached 98,89%, on SDAY+K reached 84,44%, on SDAY3 reached 77,78% and on CDA only reached 65,56%.

3.2.2.2 Effect of temperature on selected entomopathogenic fungi samples

** Effect of temperature on germination*

The germination rates were high at all four temperature levels of 25, 27, 30 and 32°C, followed by 35°C 35°C and then at 22°C. At 20°C, The germination rate was low. The results of this study are quite similar to Kiewnick's study (2006) [27] which confirmed that on PDA and 28°C and 33°C levels, the germination rate of *P. lilacinum* 251 reached the highest value.

The germination rate of BB1 was high at 25°C and 27°C, followed by 30°C and then 22°C. At temperatures of 20°C and 32°C, the germination ability of BB1 is lowest, at 35°C BB1 does not germinate. The results of Parveen and Jeyarani (2023) [36] confirmed

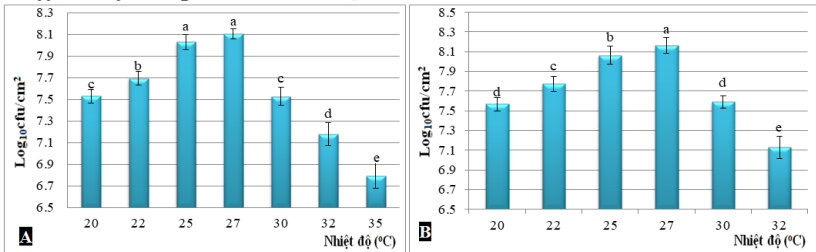
that all *B. bassiana* (BB111), *B. bassiana* (BB112), *B. bassiana* (BB113) and *B. bassiana* (BB114) exhibited the highest germination rate at 25°C.

** Effect of temperature on the growth*

PB1 sample grew fastest at temperatures of 27°C and 30°C, followed by 32°C, 35°C and 25°C, lowest at 20°C and 22°C. The results strengthen the conclusion that *P. lilacinum* can grow in a wide temperature range from 8°C - 38°C and optimal growth is in the range of 26–30°C (following Senthilkumar et al, 2020) [42].

The growth of BB1 has the highest at 25°C and 27°C, the 2nd highest at 22°C, the 3rd highest at 20°C, the 4th highest at 22°C and lowest at 32°C. This result is similar to the research of Dhar et al (2016) [18], Ahmad et al (2016) [8], Acheampong et al (2020) [6].

** Effect of temperature on sporulation*



Hình 3.10. *Effect of temperature on sporulation of purple fungus PB1 sample (A) and white fungus BB1 sample (B)*

Figure 3.11 shows that PB1 has the highest sporulation at both temperatures 25°C and 27°C ($\log_{10}\text{cfu}/\text{cm}^2 = 8,03$ and $8,11$, respectively); BB1 has the highest sporulation at 27°C ($\log_{10}\text{cfu}/\text{cm}^2 = 8,17$). This result is similar to the research results of Moldovan et al (2022) [31].

** Effect of temperature on pathogenicity against black pepper root mealybug*

Using conidial suspensions of both PB1 and BB1 cultured at experimental temperature levels did not have a statistically significant effect on the pathogenicity against black pepper root mealybug. The root mealybug mortality 14 days after inoculation

reached approximately 100% when treating by conidial suspensions cultured from different temperature levels.

3.3.1.3 *Effect of pH on selected entomopathogenic fungi samples*

** Effect of pH on germination*

The germination rates of PB1 and BB1 were not statistically different at different pH levels. The germination rate reached highest after 48 hours at a PH level of 4,5 – 7,5 (PB1 sample) from 96,70% to 98,50%, for sample BB1 from 93,50% to 96,90%. This result is similar to the study of Padmavathi et al (2003) [35] which confirmed that the germination rate of some *B. bassiana* samples reached a high rate of > 95% at PH from 3-14.

** Effect of pH on the growth*

The different pH levels did not statistically significant effect on the growth of PB1 and BB1. At the experimental pH levels, the average growth of PB1 sample was from 2,06 mm to 2,10 mm/day, BB1 sample from 1,98 mm to 2,05 mm/day. The research results further clarify the report of Padmavathi et al (2003) [35] that depending on each sample, the growth is affected or not by different pH levels.

** Effect of pH on sporulation*

The most suitable pH for sporulation of both selected fungi samples is from 5,5 to 7,0. The $\log_{10}\text{cfu}/\text{cm}^2$ index corresponding to four pH levels (5,5; 6,0; 6,5 and 7,0) of *P. lilacinum* PB1 sample reached 8,29; 8,35; 8,35 and 8,30, of BB1 sample reached 8,35, respectively; 8,39; 8,40 and 8,36. This result was different from the study of Souza et al, (2022) [45] which confirmed there was no statistically significant difference in the sporulation of *B. bassiana* ESALQ171 and *M. anisopliae* ESALQ935 in the range pH = 4 - 9.

**Effect of pH on pathogenicity against black pepper root mealybug*

The root mealybug mortality after 14 days of treatment with spore solution of two fungal samples PB1 and BB1 at all pH levels from 4,5 to 5,5 reached about 100%.

3.2.2.4. *Effect of chemical pesticide on selected entomopathogenic fungi samples*

** Effect of chemical pesticide on germination*

The germination inhibition rate of PB1 and BB1 by 4 fungicides (Agri - Fos 400, Ridomil 68WG, Mancozeb 80WP, Aliette 800WG) was approximately 100% at all times. The germination inhibition rate of PB1 and BB1 by two insecticides (Tervigo 20SC and Sovigo 108SC) at 12 hours after cultured reached about 50%, 72 hours after cultured was about 30%. Ramos et al (2022) [52] confirmed that *B. bassiana* Bb-18 and *M. anisopliae* Ma-30 were also 100% inhibited by chemical fungicides, pesticide inhibition to about 50%.

** Effect of chemical pesticide on the growth*

All four types of fungicides (Agri - Fos 400, Ridomil 68WG, Mancozeb 80WP, Aliette 800WG) inhibited the growth of both PB1 and BB1 fungal samples more strongly than the two insecticides (Tervigo 20SC and Sovigo 108SC). At 20 days after cultured, the growth inhibition rate of PB1 and BB1 caused by 4 fungicides was about 94%, followed by Tervigo 20SC and Sovigo 108SC insecticides were about 85%.

** Effect of chemical pesticide on sporulation*

All four types of fungicides (Agri - Fos 400, Ridomil 68WG, Mancozeb 80WP, Aliette 800WG) inhibited 100% of the sporulation of PB1 and BB1. Tervigo 20SC inhibited the sporulation of PB1 90,95% and BB1 95,58%, statistically significantly higher than Sovigo 108SC inhibited the sporulation of PB1 88,61% and BB1 93.57 %.

3.3. MASS PRODUCT SELECTED ENTOMOPHATHOGENIC FUNGI SAMPLES

3.3.1. Effect of substrate types

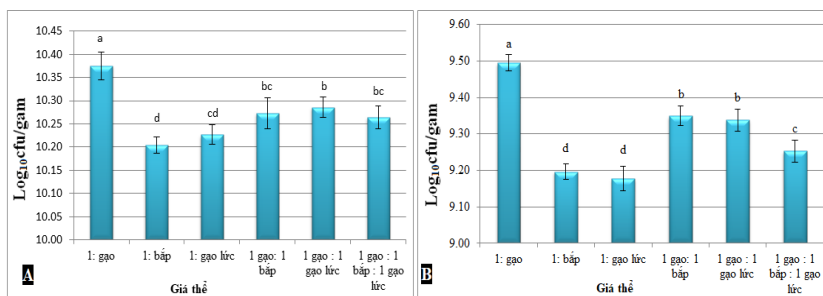
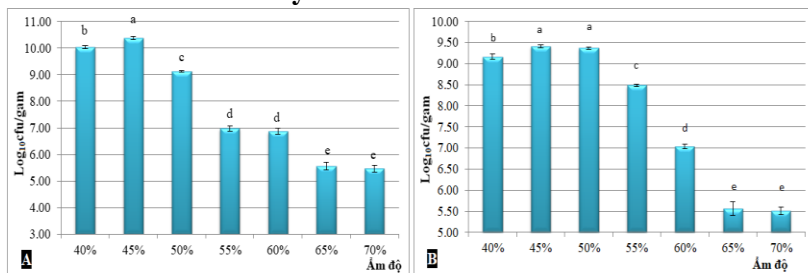


Figure 3.13. Effect of substrate types on mass production of purple fungus PB1 (A) and white fungus BB1 (B)

Figure 3.13 shown that the rice substrate was the best for mass production PB1 and BB1. In particular, the number of spores of PB1 sample reached the highest on rice substrate with $2,38 \times 10^{10}$ (spores/gram), BB1 sample reached $3,13 \times 10^9$ spores/gram.

3.3.2. Effect of humidity



Hình 3.11. Effect of humidity on mass production of purple fungus PB1 (A) and white fungus BB1 (B)

Figure 3.14 shows that the highest efficiency in mass production of PB1 was ($2,42 \times 10^{10}$ spores/gram) at 45% humidity, BB1 was ($2,58 \times 10^9$ spores/gram and $2,35 \times 10^9$ spores/gram) at 45% and 50% humidity. These results correspond to the study of Camara et al, (2022) [14] confirming the optimal humidity for mass production of *B. bassiana* isolated from *Nysius* spp. on rice substrate was 51,5%

3.4 EFFECT OF CONCENTRATION AND DOSAGE OF SELECTED FUNGI SAMPLES AGAINST BLACK PEPPER ROOT MEALYBUG

3.4.1. Effect of concentration and dosage of selected fungi samples

3.4.1.1. Effect of PB1 concentration in laboratory

After 15 days treatment, the effectiveness of PB1 at 10^8 and 10^9 (spores/ml) in controlling mealybug instar nymph reached 100%, at 10^7 (spores/ml) reached about 93%, at 10^5 and 10^6 (spores/ml) were only about 50% and 59%, respectively. The effectiveness of PB1 at 10^8 and 10^9 (spores/ml) in controlling mealybug adult were approximately 100%, at 10^7 (spores/ml) was about 90%, at 10^5 and 10^6 (spores/ml) were about 51% and 60% respectively.

3.4.1.2. Effect of BB1 concentration in laboratory

After 15 days treatment, the effectiveness of BB1 at 1×10^9 (spores/ml) in controlling mealybug instar nymph reached reached 100% after 15 days treatment, at 1×10^5 (spores/ml) only reached 36,56%. The effectiveness of the BB1 at 1×10^9 (spores/ml) in controlling mealybug instar nymph reached reached 100%, at 1×10^5 (spores/ml) only reached 31,98%.

3.4.2. Effect of dosage of selected fungi samples in nursery

The effectiveness of PB1 in controlling black pepper root mealybug in nursery reached above 92% with 75, 100 and 125 (ml/pot). These were statistically significant higher than treating with 50 ml/pot which only reached 80,07%.

The effectiveness of BB1 in controlling black pepper root mealybug in nursery reached above 98% with 100 and 125 ml/pot, at reached 82,97% with 75 ml/pot, reached 71,04% and at with 50 ml/pot. This result is equivalent to the results of Lemawork et al (2011) [28] support that the efficiency in controlling *C. ensete* with *B. bassiana* PPRC-56 reached 96,8%; *B. bassiana* FF reached 94,5%; *M. anisopliae* PPRC-6 reached 95,8%; *M. anisopliae* Mm reached 83,3% after 120 days treatment in nursery conditions.

3.4.3. Effect of dosage of selected fungi samples in the field

3.4.3.1. Effect of dosage of PB1 in the field

Efficacy of PB1 with amounts of 200, 250 and 300 ml/tree showed statistically significant higher effectiveness in controlling mealybugs (from 69,80% to 76,78%). Treatment with an amount of 150 ml/tree had the lowest effectiveness in controlling mealybugs

(only 57,76%) at 180 days after treatment.

3.4.3.2. Effect of dosage of BB1 in the field

Efficacy of BB1 with 250 and 300 ml/tree reached 69,6% and 74,0% which were statistically significant higher than 2 levels of dosage 200 and 150 ml/tree (only 53,0% and 45,5% respectively) at 180 days after treatment.

CONCLUSIONS AND RECOMMENDATIONS

1. Conclusions

The thesis isolated 154 entomopathogenic fungi samples and also selected, identified 2 samples with high potential biocontrol of mealybugs on roots of black pepper in Dak Lak province: purple fungus sample (*Purpureocillium lilacinum* PB1) and white fungus sample (*Beauveria bassiana* BB1).

The thesis surveyed that black pepper fields (intercropping black pepper with coffee, using living pillars, applying organic fertilizers and not using fungicides) have a more positive effect on the density of *Metarhizium* spp., *Beauveria* spp. and *Purpureocillium* spp. compared to other fields (monoculturing black pepper, using dead pillars, chemical fertilizers, and using fungicides).

The thesis determined that the PDA culture, temperature 25 - 27°C, pH = 4,5 - 7,5 was the appropriate condition for germination, growth and sporulation and pathogenicity of purple fungus sample *P. lilacinum* PB1 and white fungus sample *B. bassiana* BB1.

The thesis determined that optimal substrate for mass production purple fungus sample *P. lilacinum* PB1 was rice grains with moisture content of 45%, for mass production white fungus sample *B. bassiana* BB1 was rice grain with moisture content of 45 - 50%.

The effectiveness of purple fungus sample *P. lilacinum* PB1 and white fungus sample *B. bassiana* BB1 at a concentration of 1×10^9 spores/ml reached about 100% in laboratory and nurseries conditions, 70% in field conditions.

2. Recommendations

It is necessary to evaluate the effectiveness of selected fungal samples in controlling other pests in the rhizosphere soil of

black pepper field such as nematode and fungal diseases.

It is necessary to evaluate the impact of selected samples on beneficial organisms in the rhizosphere ecosystem of black pepper field such as predatory insects, earthworms...

REFERENCES

Vietnamese references: 28

English references: 251

LIST OF PUBLISHED WORKS RELATED TO THE THESIS

- 1. Tran Thi Hue, Nguyen Thi Thu Thuy, Tran Thi Thu Ha.** Isolation, selection, and evaluation of the effectiveness of some entomopathogenic fungi strains on the control of root mealybugs (Pseudococcidae) attacking black pepper. Hue University Science Magazine: Agriculture and Rural Development, 131 (3B): 17–30.
- 2. Tran Thi Hue, Nguyen Thi Thu Thuy, Nguyen Thi Huong Cam, Tran Thi Le Tra, Tran Thi Thu Hien, Tran Thi Thu Ha.** Effect of agricultural practices on entomopathogenic fungi (*Metarhizium* sp. and *Beauveria* sp.) density in the rhizosphere soil of black pepper field in Viet Nam's dak lak province. International Conference of the Agricultural Science 2022 in Can Tho, Vietnam
- 3. Tran Thi Hue, Nguyen Thi Thu Thuy, Tran Dang Khanh, Nguyen Anh Thu, Tran Xuan Hung, Tran Thi Thu Ha, Nguyen Phuong Dai Nguyen** (2023). The Potential of *Beauveria* against Root Mealybugs *Formicoccus* sp. (Homoptera: Pseudococcidae) Black Pepper in Dak Lak Province of Vietnam. Journal of Advanced Zoology 44(2), 2622:2636.
<http://jazindia.com/index.php/jaz/article/view/1386/1018>
- 4. Tran Thi Hue, Nguyen Thi Thu Thuy, Tran Thi Thu Ha.** Efficacy of Entomopathogenic Fungi *Purpureocillium lilacinum* and *Beauveria bassiana* Against Root Mealybugs on Black Pepper in Nursery and Field Conditions in Dak Lak Province. Plant Protection Magazine No. 6/2023.