



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẢNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0028190

(51)⁷ A01N 63/00

(13) B

(21) 1-2017-01371

(22) 13/04/2017

(45) 25/05/2021 398

(43) 25/10/2018 367A

(73) Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (VN)

18 Hoàng Quốc Việt, phường Nghĩa Đô, quận Cầu Giấy, thành phố Hà Nội

(72) Nguyễn Ngọc Châu (VN); Đỗ Tuấn Anh (VN); Nguyễn Hữu Tiền (VN).

(54) PHƯƠNG PHÁP PHÒNG TRỪ VE SÀU HẠI CÀ PHÊ BẰNG CHẾ PHẨM SINH HỌC CHỨA TUYẾN TRÙNG *STEINERNEMA PHUQUOCENSE* N. SP. S-PQ16

(57) Sáng chế mô tả chủng tuyến trùng *Steinernema phuquocense* n. sp. S - PQ16. Ngoài ra, sáng chế cũng đề cập đến phương pháp phòng trừ ve sấu hại cà phê bằng chế phẩm sinh học chứa tuyến trùng *Steinernema phuquocense* n. sp. S - PQ16. Trong đó, tuyến trùng S - PQ16 này là chủng tuyến trùng do Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật phân lập và lưu giữ.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế thuộc lĩnh vực bảo vệ thực vật, cụ thể, sáng chế đề cập đến chế phẩm sinh học phòng trừ ve sầu hại cà phê và quy trình sản xuất chế phẩm này. Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp phòng trừ ve sầu hại cà phê bằng chế phẩm sinh học chứa tuyến trùng *Steinernema phuquocense* n. sp. S-PQ16. Trong đó, tuyến trùng S-PQ16 này là chủng tuyến trùng do Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật phân lập và lưu giữ.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Tình hình ve sầu hại cà phê ở Tây Nguyên

Trong những năm gần đây, ve sầu phát triển mạnh, gây hại nghiêm trọng nhiều vùng sản xuất cà phê thuộc các tỉnh Tây Nguyên làm giảm đáng kể năng suất, sản lượng cà phê. Các chuyên gia đã xác định được 6 loài ve sầu gây hại trên cà phê ở Tây Nguyên, bao gồm ve sầu phấn trắng (*Dundubianagarasagna*), ve sầu lưng vằn (*Haphsa bindusara*), ve sầu Đắc Lắc (*Poponia daklakensis*), ve sầu 4 chấm (*Haphsa opercularis*), ve sầu nâu đỏ (*Purana samia*) và ve sầu nhỏ (*Purana pigmentata*), trong đó loài ve sầu phấn trắng chiếm tỷ lệ cao nhất.

Về hình thái và tập tính sinh học thì các loài ve sầu ở cà phê có những đặc điểm chung như sau: Ấu trùng đến kỳ vũ hóa bò lên khỏi mặt đất vào ban đêm, chúng leo lên cành, lá cây để chuẩn bị lột xác lần cuối thành con trưởng thành. Ve sầu trưởng thành chỉ sống 2-4 tuần.

Loài ve sầu phần trắng có thời gian đẻ trứng tương đối dài 35-41 ngày, một ve sầu cái có khả năng đẻ 382-402 trứng và tỷ lệ nở đạt 86-94%. Khi trứng nở, sâu chui xuống đất và sống trong đất, giai đoạn sâu kéo dài từ 275-287 ngày, vòng đời của ve sầu từ 330-333 ngày. Số lượng ấu trùng ve sầu trong đất đạt đỉnh cao vào khoảng từ cuối tháng 4 đến giữa tháng 5, giảm dần từ cuối tháng 5 và lại tăng trở lại vào đầu tháng 9. Sự phát sinh và gây hại của ve sầu bị ảnh hưởng bởi rất nhiều yếu tố như giống, tuổi cây cà phê, cây che bóng, thiên địch, các biện pháp canh tác.

Về mức độ gây hại: ve sầu đã xuất hiện và gây hại cây cà phê ở hầu khắp các tỉnh Tây Nguyên. Ấu trùng ve sầu chích rỗ non để hút nhựa của cây cà phê gây ảnh hưởng đến sự sinh trưởng của cà phê và tạo điều kiện cho một số bệnh khác như rỉ sắt, khô cành phát triển. Ve sầu gây thiệt hại cho cây cà phê cả trên cành lẫn dưới đất. Chúng đẻ trứng trên các cành nhỏ làm suy kiệt hoặc chết cành. Ấu trùng chích hút rỗ làm cây chậm phát triển, còi cọc, lá vàng héo, trái rụng, nếu bị nặng cây có thể chết.

Để phòng ngừa ve sầu hại cà phê, người ta đã áp dụng nhiều biện pháp để phòng trừ ve sầu như:

i) *Biện pháp che phủ nylon*: Dùng nylon phủ kín dưới gốc cà phê vào giai đoạn ve sầu trưởng thành bò lên vũ hóa, bị vướng vào nylon và chết.

ii) *Biện pháp sử dụng vôi bột*: Sử dụng dung dịch vôi bột 2% làm cho ấu trùng ve sầu ngoi lên khỏi mặt đất để thu bắt ve sầu làm thức ăn cho gà, hoặc thả gà, vịt để bắt ve sầu.

iii) *Biện pháp phòng trừ bằng thuốc bảo vệ thực vật*: Hầu hết đều có hiệu quả thấp đối với phòng trừ ấu trùng ve sầu hại cà phê.

iv) *Biện pháp phòng trừ bằng kỹ thuật bón phân chăm sóc*: Bón phân cân đối, không bón thừa đạm, vì đạm sẽ làm rễ và thân cành non mềm dễ bị ve sầu và dịch hại tấn công. Dùng loại phân kích thích ra rễ cho cà phê.

v) *Biện pháp nuôi thiên địch của ve sầu*: Trong các loài thiên địch thì kiến là quan trọng nhất. Kiến tiêu diệt trứng và ấu trùng mới nở của ve sầu trước khi chui xuống đất.

vi) *Biện pháp dùng keo dính* (tương tự keo dính chuột) có pha thuốc sâu, quét quanh gốc cà phê để ngăn chặn, bắt và diệt ấu trùng bò lên cây vũ hóa.

vii) *Biện pháp sử dụng chế phẩm sinh học* nấm *Metarhizium anisopliae* để phòng trừ ve sầu đạt hiệu lực phòng trừ ve sầu 56,23% - 60,03%. Tuy nhiên thí nghiệm đã không nói rõ diệt ve sầu ở giai đoạn nào (diệt ve sầu trưởng thành trên cây hay diệt ấu trùng ve sầu hại rễ cà phê trong đất).

Khả năng của tuyến trùng ký sinh gây bệnh côn trùng trong phòng trừ sinh học sâu hại

Do các loại hoá chất bảo vệ thực vật gây ô nhiễm môi trường và ảnh hưởng tới sức khoẻ con người nên nhiều nước trên thế giới, trong đó có Việt Nam, đang chuyển dần sang sử dụng các biện pháp sinh học trong bảo vệ thực vật. Một trong các phương pháp đó là sử dụng tuyến trùng ký sinh gây bệnh côn trùng (Entomopathogenic Nematodes – viết tắt là EPN).

Trong số hàng trăm nghìn loài tuyến trùng ký sinh ở côn trùng chỉ có một số loài thuộc 2 giống *Steinernema* và *Heterorhabditis* là những loài có khả năng vừa ký sinh vừa gây bệnh cho côn trùng, do vậy được gọi là tuyến trùng ký sinh gây bệnh côn trùng (Entomopathogenic nematodes - EPN). Mặc dù đây là những loài ký sinh bắt buộc ở côn trùng, nhưng chúng lại có một giai đoạn chuyên hóa tồn tại bên ngoài vật chủ côn trùng, thường là môi trường đất. Đó là ấu trùng tuổi 3, còn gọi là ấu trùng xâm nhiễm (infective juveniles-IJ), là giai đoạn đặc biệt

trong vòng đời phát triển của nhóm tuyến trùng này. Ở giai đoạn này IJ không cần dinh dưỡng nhưng chúng lại có khả năng tồn tại lâu dài trong môi trường đất khi chưa gặp vật chủ. Thực chất đây là giai đoạn ấu trùng nằm chờ trong đất và sẵn sàng xâm nhập vào vật chủ thích hợp để ký sinh, gây bệnh.

Mỗi IJ mang trong ruột của chúng một loài vi khuẩn cộng sinh (VKCS) chuyên hóa. Đối với các loài tuyến trùng giống *Steinernema* thì VKCS thuộc giống *Xenorhabdus*, còn với các loài giống *Heterorhabditis* thì VKCS thuộc giống *Photorhabdus*. Ở IJ của các loài *Steinernema* spp., VKCS nằm trong một cái bọc ở phần trước của ruột, phía sau thực quản. Còn ở IJ của các loài tuyến trùng *Heterorhabditis* spp. thì VKCS không tập trung trong cái bọc ở phần trước ruột mà chúng nằm rải rác theo chiều dài của ruột, nhưng chủ yếu vẫn là ở nửa trước của ống ruột. Các VKCS này thường có dạng que hoặc dạng ovan dài trông như cái lạp sườn. Kích thước rộng 1-2 μm và dài 3-5 μm , vì vậy có thể quan sát chúng khá rõ dưới kính hiển vi quang học với độ phóng đại 1500 lần. Bình thường cả lỗ miệng và hậu môn của IJ ở dạng đóng kín, còn VKCS trong ống tiêu hóa của tuyến trùng cũng nằm trong bọc và ở dạng bất hoạt. Sự cộng sinh giữa tuyến trùng và vi khuẩn tạo nên các tổ hợp ký sinh và gây bệnh cho côn trùng (*nematode-bacterium*). Đây là một hiện tượng cộng sinh bắt buộc, cả tuyến trùng và vi khuẩn không thể sống độc lập với nhau trong tự nhiên.

Khi tìm được vật chủ (sâu hại), ấu trùng cảm nhiễm này sẽ thâm nhập vào xoang máu qua các lỗ mở tự nhiên hoặc trực tiếp qua lớp vỏ kitin mỏng ở khớp chân. Khi vào xoang máu, tuyến trùng sẽ giải phóng vi khuẩn cộng sinh, và vi khuẩn sẽ sinh sôi, tiết protein độc, giết chết vật chủ trong vòng 24 - 48 giờ. Do vậy, những tuyến trùng này được sử dụng làm tác nhân sinh học để sản xuất thuốc sinh học tuyến trùng. Một chu kỳ phát triển của tuyến trùng EPN bắt đầu từ pha IJ (tồn tại ở trong đất) đến pha xâm nhập ký sinh và phát triển bên trong cơ thể côn trùng và sau khi kết thúc pha ký sinh và phát triển chúng sẽ phát tán

khỏi xác chết côn trùng trở về pha IJ bên ngoài côn trùng vật chủ. Như vậy từ một vài ấu trùng cảm nhiễm sau một chu kỳ ký sinh và phát triển trong côn trùng, tuyến trùng EPN có thể tạo ra hàng trăm ngàn IJ. Đây là khả năng tái sinh chỉ có ở các loài tuyến trùng EPN.

Những công bố và sáng chế về tuyến trùng EPN phòng trừ sâu hại

Đã có nhiều công bố và sáng chế/phát minh về vật liệu sinh học tuyến trùng EPN để phòng trừ sinh học các loại côn trùng khác nhau. Bằng sáng chế Mỹ số 4.178.366 (Bedding, 1979) về thuốc sinh học diệt côn trùng là ấu trùng cảm nhiễm (IJ) của loài tuyến trùng *Neoaplectana carpocapsae* (chủng Agriotos) để phòng trừ một loạt các loài côn trùng như bướm tuyết (*Cyaza pomonella*), bọ cánh cứng phía Nam (*Dendroctonus frontalis*), ấu trùng ong cần lá đường tùng (*Pristophora erichsonil*), bọ cánh cứng khoai tây (*Leptinotarsa decemlineata*), sâu xanh bướm trắng (*Pieris rapae*), sâu khoang (*Perseclania ewingi* và *Euromessoria* sp.), ong cần lá bạch đàn (*Perga affinis* và *Pterygophorus*), các loài sâu bướm cốc (*Doratifera* sp.), sâu bướm hại cây keo (*Mnesampela privata*) và một số bọ ăn lá (*Chrysophtharta nobilitata*, *C. decolorala*, *C. aureous*, *Paropsistema nucea*, *Paropsis lulea* và *P. Charybdis*). Bằng sáng chế Mỹ số 4,615,883 (Nelsen và Mannion, 1986) đã sử dụng tuyến trùng trong bao nang nước để phòng trừ sâu hại). Bằng sáng chế Mỹ số 5,165,930 (Smart, Nguyen et Fowler, 1992) về biện pháp phòng trừ sinh học dế chũi (*Scapteriscus* sp.). Bằng sáng chế Mỹ số 5,466,448 (Smart et Nguyen, 1995) về biện pháp phòng trừ sinh học côn trùng hại hại bộ Orthoptera. Bằng sáng chế Mỹ số 7,014,859 B1 (Ducan et Nguyen, 2006) về sử dụng tuyến trùng EPN để phòng trừ côn trùng hại.

Ngoài một số sáng chế trên, có nhiều công bố nghiên cứu sử dụng tuyến trùng EPN cho PTSH sâu hại. Ví dụ: năm 1978, Serczynska công bố dùng chế phẩm tribunil và tuyến trùng *Neoaplectana carpocapsae* (Weiser) để phòng trừ bọ cánh cứng Colorado. Năm 1982, Burrnan đã công bố về độc tố diệt côn trùng

được sản xuất bằng tuyến trùng *Neoplectana carpocapsae*. Năm 1989, Fowler et al. đã công bố biện pháp phòng trừ dế chũi bằng loài tuyến trùng *Steinerema feltiae*.

Thương mại hóa thuốc sinh học tuyến trùng EPN

Tại các nước phát triển như Mỹ, Australia và châu Âu đã có hàng chục công ty sản xuất tuyến trùng EPN và đã thương mại hoá nhiều chế phẩm sinh học tuyến trùng. Tại Đông Nam Á, Malaysia và Thái Lan cũng đang nghiên cứu theo hướng này, trong đó Thái Lan đã thương mại hoá một số chế phẩm. Đặc biệt là Trung Quốc đã thương mại hoá các chế phẩm sinh học tuyến trùng diệt sâu đục thân hại táo, lê, đào, bộ hung hại mía và sâu đục thân hại cây bóng râm ở nhiều thành phố. Hiện Trung Quốc có các nhà máy sản xuất lớn chế phẩm sinh học tuyến trùng ở Quảng Đông và Bắc Kinh.

Ở Việt Nam, Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật là đơn vị đầu tiên nghiên cứu và sử dụng tuyến trùng EPN để phòng trừ sâu hại trong nông nghiệp. Trong những năm qua, sau khi thử nghiệm trong phòng thí nghiệm và ngoài đồng ruộng tại một số địa phương cho kết quả tốt, Viện đã bắt đầu chuyển giao công nghệ sản xuất cho một số đơn vị.

Cho tới nay, Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật đã phân lập được 65 chủng tuyến trùng EPN, trong đó đã định loại được 16 loài, tất cả đều có tác dụng phòng trừ sinh học và không độc hại đối với con người. Trong 16 loài này thì đã công bố 11 loài mới đối với khoa học thế giới, 5 loài còn lại về mặt cơ sở phân tử cũng là những loài mới và sẽ tiếp tục thu thập dẫn liệu hình thái để công bố trong thời gian tới.

Việc sử dụng nhiều thuốc hoá học ở Việt Nam đã dẫn tới suy giảm, mất cân bằng các hệ sinh thái nông nghiệp ở Việt Nam, do thuốc hóa học tiêu diệt cả các côn trùng thiên địch và sinh vật có lợi khác trong nông nghiệp. Cũng chính vì vậy, theo kết quả điều tra phân lập tuyến trùng của Viện Sinh thái và Tài nguyên

sinh vật hầu như không thể tìm thấy tuyến trùng EPN trong đất nông nghiệp mà chủ yếu được tìm thấy trong hệ sinh thái tự nhiên, rừng nguyên sinh, bãi cát ven biển, những nơi chưa bị tác động của con người.

Bên cạnh điều tra phân lập và đánh giá tuyển chọn tuyến trùng EPN, từ năm 1999, Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật đã bắt đầu sản xuất chế phẩm sinh học tuyến trùng ở quy mô pilot. Cho tới nay, Viện đã sản xuất được 7 loại chế phẩm trong đó 1 chế phẩm được sản xuất từ tuyến trùng nhập ngoại và 6 chế phẩm tuyến trùng bản địa của Việt Nam do Viện phân lập và tuyển chọn. Các chế phẩm này có thể diệt được gần 30 loài sâu hại quan trọng.

Để sản xuất các chế phẩm sinh học tuyến trùng phòng trừ sâu hại, Viện đã áp dụng hai loại công nghệ là *in vivo* - dùng côn trùng sống, thường là ấu trùng tuổi 5 của bướm sếp lớn (tên khoa học là *Galleria mellonella*) để nhân nuôi tuyến trùng EPN và công nghệ *in vitro* - dùng môi trường nhân tạo và thiết bị nhân nuôi để sản xuất tuyến trùng EPN. Công nghệ *in vivo* đơn giản hơn nhưng mất nhiều thời gian và công lao động, trong khi đó, công nghệ *in vitro* cho phép sản xuất quy mô lớn, mỗi pilot có thể sản xuất 45 kg chế phẩm sinh học tuyến trùng mỗi tháng.

Nếu sử dụng hai loại công nghệ này thì khó có thể thương mại được do tốc độ nhân nuôi chậm, giá thành cao. Chẳng hạn phải tốn 1,1 triệu đồng/ha để phòng trừ bọ hung đen hại mía, so với 750.000 đồng đối với việc sử dụng thuốc hoá học. Do đó, một hướng đi trong thời gian tới là áp dụng công nghệ cao, dùng thiết bị lên men tự động (bioreactor) để nhân nuôi tuyến trùng cho phép sản xuất lớn chế phẩm sinh học tuyến trùng và giảm giá thành sản xuất.

Kết quả thử nghiệm phòng trừ sâu hại trên quy mô 1-2 ha cho thấy các chế phẩm diệt được sâu keo da láng hại nho ở Ninh Thuận (tỷ lệ sâu chết là 70%), sâu xám hại thuốc lá ở Ba Vì (85-90%), bọ hung đen hại mía ở Thanh Hoá (50-65%). Các chế phẩm sinh học tuyến trùng rất thích hợp cho việc phòng trừ sâu

hại trong đất, mà 85 % các loài côn trùng có ít nhất một giai đoạn tồn tại, phát triển trong đất. Tuy nhiên, khả năng diệt sâu hại sống trên lá vẫn còn hạn chế. Chẳng hạn như để diệt sâu keo da láng hại nho ở Ninh Thuận, phải phối chế tuyến trùng với giẻ đường để tạo độ ẩm và bám dính cho tuyến trùng tồn tại và diệt sâu hại. Cho đến nay chưa có loại chế phẩm sinh học tuyến trùng nào được sản xuất mà có khả năng phòng trừ hữu hiệu ve sầu hại cây cà phê.

Do đó, vẫn có nhu cầu về chế phẩm và phương pháp hiệu quả và thân thiện môi trường có khả năng phòng trừ hữu hiệu ve sầu hại cây cà phê.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là khắc phục những nhược điểm nêu trên bằng chủng tuyến trùng mới S-PQ16.

Để đạt được mục đích đó, theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề xuất chế phẩm sinh học phòng trừ ve sầu hại cà phê bằng chủng tuyến trùng mới được ký hiệu là S-PQ16 và được định loại là tuyến trùng mới có tên khoa học là *Steinernema phuquocense* n. sp. Mã đăng nhập đoạn gen đặc trưng của loài mới tại Ngân hàng Gen quốc tế (GenBank) là KX405172 (vùng ITS-rADN) và KX405173 (vùng 28S). Chế phẩm này có khả năng tiêu diệt ve sầu hại cà phê và một số sâu hại khác.

Chế phẩm sinh học tuyến trùng S-PQ16 được tạo ra bằng dung dịch chứa ấu trùng cảm nhiễm (tuổi 3) của chủng tuyến trùng S-PQ16 với thành phần sau đây:

- + Nước sạch trung tính: 1000 mL (một lít)
- + Ấu trùng cảm nhiễm: 20.000.000 (hai mươi triệu đơn vị IJ)
- + Chất phụ gia bôi trơn: 1mL Triton X-100
- + Chất phụ gia kháng khuẩn: 1 mL formalin

Có thể áp dụng công nghệ *in vivo* dùng ấu trùng bướm sáp lớn (*Galleria mellonella*) hoặc dế nhà (*Acheta domesticus*) hoặc công nghệ *in vitro* dùng môi trường nhân tạo là chicken offal để sản xuất ra chế phẩm sinh học tuyến trùng S-PQ16 phục vụ cho phòng trừ sinh học ở quy mô khác nhau.

Quy trình sản xuất chế phẩm sinh học tuyến trùng phòng trừ ve sầu hại cà phê bao gồm các bước sau:

Bước 1: Chuẩn bị nguyên liệu và thiết bị sản xuất, bao gồm: Chủng tuyến trùng S-PQ16 (*Steinernema phuquocense* n. sp.) giai đoạn ấu trùng cảm nhiễm (Infective juveniles - IJ); Bướm sáp lớn – BSL (*Galleria mellonella*) được nhân nuôi bằng thức ăn nhân tạo; Môi trường đặc Chicken Offal để nhân nuôi tuyến trùng; Môi trường Laura Broth để nuôi cấy vi khuẩn cộng sinh; Bọt xốp vô trùng; Các dung dịch Ringer và Formol để khử trùng, và các dụng cụ, thiết bị khác;

Bước 2: Phân lập vi khuẩn cộng sinh (VKCS) qua 2 bước: (i) Phân lập VKCS và nhân nuôi sơ cấp, và (ii) Nhân nuôi thứ cấp VKCS;

Bước 3: Sản xuất môi trường Chicken Offal;

Bước 4: Chuẩn bị dụng cụ nhân nuôi tuyến trùng;

Bước 5: Nhân nuôi tuyến trùng thông qua 3 bước: (i) Gây nhiễm VKCS vào môi trường chicken offal, (ii) Nhiễm tuyến trùng để nhân nuôi tổ hợp ; và (iii) Thu hoạch tuyến trùng ở dạng IJ;

Bước 6: Phối chế và bảo quản chế phẩm tuyến trùng.

Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế đề xuất phương pháp phòng trừ ve sầu hại cà phê bằng chế phẩm sinh học chứa tuyến trùng S-PQ16 này.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả một cách chi tiết.

1. Phân lập chủng tuyến trùng S-PQ16

Phân lập và tuyển chọn chủng tuyến trùng theo 5 bước sau đây:

Bước 1: Thu mẫu đất, phân lập tuyến trùng từ đất theo kỹ thuật côn trùng bẫy (insect baiting trap) của Bedding & Akhurst (1974). A simple technique for the detection of insect parasitic nematodes in soil. *Nematologica* 21: 109-110

Bước 2: Nhân nuôi tinh sạch tuyến trùng

Bước 3: Định danh tên khoa học trên cơ sở đặc trưng hình thái, hình thái lượng và phân tử, đồng thời tiến hành lai chéo để xác định loài sinh học

Bước 4: Xác định độc lực (nồng độ gây chết 50% = LC50); Khả năng sinh sản của chủng tuyến trùng; Tỷ lệ gây chết; Hiệu lực gây chết của chủng tuyến trùng (Theo quy trình Nguyễn Ngọc Châu và Đỗ Tuấn Anh, 2017).

Bước 5: Bảo quản động lạnh nguồn tuyến trùng theo Quy trình của Nguyễn Ngọc Châu và Đỗ Tuấn Anh (2017).

Chủng tuyến trùng phân lập và tuyển chọn được được xác định là chủng tuyến trùng *Steinernema phuquocense* n. sp. (được đặt tên *Steinernema phuquocense* n. sp. S-PQ16, trong phạm vi bản mô tả này còn được gọi là S-PQ16). Chủng S-PQ16 được phân lập bằng kỹ thuật côn trùng bẫy từ mẫu đất cát thu từ một bãi biển ở đảo Phú Quốc thuộc tỉnh Kiên Giang của Việt Nam. Kết quả phân tích giám định hình thái, phân tử và lai chéo đều cho thấy *Steinernema phuquocense* n. sp. (S-PQ16) thuộc loài tuyến trùng mới cho khoa học.

1.1. Đặc điểm hình thái của tuyến trùng:

Con cái thế hệ 1: Kích thước cơ thể lớn và cong dạng xoắn ốc về phía bụng khi xử lý bằng nhiệt. Lớp vỏ cutin nhẵn. Xoang miệng ngắn và rộng, hình phễu, vách xoang miệng được kitin hóa tương đối mạnh, lỗ miệng hình tam giác. Thực quản rõ ràng, phần trước thực quản thường có dạng hình trụ, điều giữa thực quản hơi phồng, phần eo thắt không điển hình, phần gốc thực quản hình quả lê. Vòng thần kinh rõ và nằm ở phần eo thắt thực quản. Lỗ bài tiết kitin hóa trung bình, nằm trước vòng thần kinh. Âm hộ (vulva) dạng khe ngang không có epyptigma. Đuôi ngắn với mấu đuôi dạng núp lớn.

Con cái thế hệ 2: Hình thái tương tự với con cái thế hệ 1 nhưng nhỏ hơn. Cơ thể hơi cong dạng chữ C khi xử lý nhiệt, đuôi dạng chóp nhọn.

Con đực thế hệ 1: Kích thước cơ thể nhỏ hơn con cái. Cơ thể cong về phía bụng hình chữ C khi xử lý nhiệt. Điều giữa phình to, vòng thần kinh nằm ngay trên điều giữa ở phần eo thắt của thực quản. Lỗ bài tiết kitin hóa trung bình nằm trên vòng thần kinh. Tinh hoàn gấp khúc về phía bụng. Có một đôi gai giao cấu và gai đệm. Có 11 cặp nhú sinh dục và 1 nhú đơn: 5 đôi trước huyết, 2 đôi sát lỗ huyết, 2 đôi chóp đuôi mặt bụng, 1 đôi chóp đuôi mặt lưng và một đôi nhú bên giữa gai giao cấu và gai đệm. Tận cùng đuôi không có mucro.

Con đực thế hệ 2: Đặc điểm hình thái tương tự như con đực thế hệ 1 nhưng kích thước nhỏ hơn và cơ thể có dạng chữ J khi xử lý nhiệt. Tận cùng đuôi có mucro nhọn.

Ấu trùng cảm nhiễm: Cơ thể thẳng hoặc hơi cong về phía bụng sau khi cố định nhiệt, thon nhỏ về phía đầu và đuôi. Lỗ miệng khép lại. Thực quản thuần dài, hơi phình rộng ở phần giữa, gốc thực quản hơi lệch về phía lưng. Lỗ bài tiết rõ ràng nằm trước vòng thần kinh. Vòng thần kinh nằm ở phần trên eo thắt của thực quản. Có 9 đường bên rõ ràng. Đuôi dạng chop nhọn, phần hyaline chiếm ít hơn một nửa chiều dài đuôi.

1.2. Hình thái lượng của loài tuyến trùng *Steinernema phuquocense* n. sp.

Hình thái lượng của loài tuyến trùng *Steinernema phuquocense* n. sp. sẽ được mô tả một cách chi tiết trong Bảng 1 dưới đây.

Bảng 1- Hình thái lượng của loài tuyến trùng *Steinernema phuquocense* n. sp.

Các chỉ số đo	Con cái TH1 (n=30)	Con đực TH1 (n=30)	Con cái TH2 (n=30)	Con đực TH2 (n=30)	IJ (n=30)
Chiều dài cơ thể (L) μm	6005 ± 190 (4287-9626)	1293 ± 152 (1086-1835)	3055 ± 391 (2472-3708)	1146 ± 120 (952-1375)	898 ± 62 (765-1006)
Vị trí vulva (V) %	52 ± 1 (51-54)		50 ± 2 (44-54)		
Từ đầu đến lỗ bài tiết (EP) μm	147 ± 44 (67-200)	106 ± 8 (94-129)	119 ± 15 (94-152)	109 ± 11 (80-124)	72 ± 5 (60 -84)
Chiều dài thực quản (ES) μm	204 ± 48 (111-246)	140 ± 5 (130-153)	177 ± 10 (160-193)	158 ± 15 (125-176)	129 ± 8 (109-139)
Từ đầu đến vòng thần kinh (NR) μm	159 ± 40 (86-204)	115 ± 6 (106-126)	120 ± 13 (102-152)	128 ± 14,4 (97-148)	106 ± 8 (86-114)
Chiều dài đuôi (T) μm	54 ± 8 (45-66)	32 ± 4 (25-39)	65 ± 15 (49-114)	36 ± 4 (26-46)	69 ± 6 (55-77)
Chiều dài gai giao cấu (SPL) μm		69 ± 3 (61-74)		70 ± 4 (65-80)	
Chiều rộng gai giao cấu (SPW) μm		11 ± 1 (8-14)		11 ± 0.9 (8-13)	
Chiều dài gai đệm (GU) μm		45 ± 4 (39-53)		49 ± 4 (34-56)	
Chiều rộng gai đệm (GUW) μm		8 ± 0.8 (7-10)		9 ± 0.7 (7-10)	
a = L/MBW	34 ± 24 (21-83)	19 ± 3 (16-30)	20,6 ± 1,4 (17,7-23,1)	17,6 ± 1,5 (15,4-20,7)	20,8 ± 1,8 (15,7-24,2)

b = L/ES	34 ± 26 (20-87)	9 ± 1 (8-13)	17,3 ± 2,2 (13,8-21,6)	7,3 ± 0.5 (6,3-8,5)	7 ± 0,4 (6-7,7)
c = L/T	114 ± 37 (65-168)	41 ± 7 (31-61)	48,8 ± 8,7 (25,1-61,3)	32.4 ± 2.6 (27,4-37)	13,2 ± 1,2 (11.3-15.5)
D (%) = EP/ES	71 ± 7 (60-81)	76 ± 4 (70-88)	68 ± 9 (49-89)	69 ± 4 (63-79)	56 ± 4 (50-66)
SW (%)		184 ± 15 (145-215)		190 ± 19 (162-248)	
GS (%)		65 ± 6 (56-77)		70 ± 6 (52-78)	

Ghi chú: n là số lượng tuyến trùng sử dụng để kiểm tra và xác định các chỉ số hình thái; TH1: viết tắt của thể hệ 1; TH2: viết tắt của thể hệ 2; a = L/MBW: Tỷ lệ giữa chiều dài cơ thể / chiều rộng lớn nhất của cơ thể; b = L/ES: Tỷ lệ giữa chiều dài cơ thể / chiều dài thực quản; c = L/T: Tỷ lệ giữa chiều dài cơ thể / chiều dài đuôi; EP/ES: Tỷ lệ giữa chiều dài từ đầu cơ thể đến lỗ bài tiết / chiều dài thực quản; EP/T: Tỷ lệ giữa chiều dài từ đầu đến vị trí lỗ bài tiết / chiều dài của đuôi; SW: chiều dài gai giao cấu / chiều rộng cơ thể tại hậu môn; GS: Tỷ lệ chiều dài gai đệm / chiều dài gai giao cấu.

1.3. Chẩn loại hình thái loài tuyến trùng mới:

Loài mới *S. phuquocensae* n. sp. có thể được phân biệt với các loài khác của *Steinernema* bởi kích thước của ấu trùng cảm nhiễm, cấu trúc vulva đuôi của con cái, số lượng và vị trí nhú sinh dục ở con đực. Theo đó, chiều dài trung bình của ấu trùng cảm nhiễm là 898 ± 62 (765-1006) so với 985 ± 45 (896-1072) của *S. loci*. Vulva ở con cái có cấu trúc epyptigma, đuôi con cái dạng nùm tròn không có mucro. Con đực có 11 cặp nhú và 1 nhú đơn trong đó có 1 cặp nhú bên nằm ở vị trí giữa gai giao cấu và gai đệm, trong khi ở loài *S. loci* có có 11 cặp nhú và 1 nhú đơn mà không có nhú bên ở vị trí giữa gai giao cấu và gai đệm; còn ở loài *S. thanh* có có 13 cặp nhú sinh dục và 1 nhú đơn trong đó có 3 cặp nhú bên ở vị trí giữa gai giao cấu và gai đệm.

1.4. Đặc trưng phân tử của loài tuyến trùng mới:

Các vùng gen đặc trưng của loài mới tại Ngân hàng Gen quốc tế (GenBank) là KX405172 (vùng ITS-rADN) và KX405173 (vùng 28S). Vùng gen ITS-rADN của loài tuyến trùng *Steinernema phuquocense* n. sp. có chiều dài gần 900bp, có sự tương đồng 95-98 % so với các loài tuyến trùng *S. loci* và *S. thanhhi*. Khoảng cách di truyền của loài mới từ 0.02-0.05 so với các loài gần trên GenBank và từ 0.10- 0.26 so với các loài xa hơn. Vùng gen ITS-rADN của loài mới có 726 vị trí mang thông tin parsimony, 75 vị trí có biến đổi riêng và 29 vị trí nucleotit biến đổi đặc trưng so với chủng S. GQ497740.1 của loài *S. loci*.

1.5. Kết quả thí nghiệm lai chéo xác nhận loài sinh học:

(i) Lai chéo được tiến hành giữa con đực của *S. phuquocensae* n. sp. (S-PQ16) với con cái của 4 loài khác, bao gồm loài *S. loci* (chủng S.TK10); loài *S. thanhhi* (chủng TG10), loài *S. loci* (chủng S.KT3987) và loài *S. siamkayai* (chủng S-DL13). Quy trình lai chéo được thực hiện theo Nguyễn Ngọc Châu (2008) bằng việc sử dụng huyết tương của ấu trùng bướm sáp lớn – BSL (*Galleria mellonella*) làm môi trường nhân nuôi. Dùng xy ranh nhỏ đã vô trùng chọc vào xoang máu của BSL trích lấy 0,1mL huyết tương cho vào một lam lốm vô trùng, sau đó lần lượt thả vào giọt huyết tương 5 con đực của S-PQ16 và 5 con cái của một trong 4 loài trên. Đặt lam lốm bằng một lamén và để vào hộp tối, sau 7 ngày kiểm tra kết quả lai chéo.

(ii) Lai chéo được tiến hành giữa con cái của S-PQ16 với con đực của 4 loài khác, là *S. loci* (chủng S.TK10); loài *S. thanhhi* (chủng TG10), loài *S. loci* (chủng S.KT3987) và loài *S. siamkayai* (chủng S-DL13). Quy trình tương tự như trên, trên một giọt huyết tương cho 5 con cái của S-PQ16 với 5 con đực của một trong số các loài sử dụng cho thí nghiệm lai chéo.

Kết quả thí nghiệm đã không có thế hệ mới được sinh ra, có nghĩa là không có sự giao phối giữa con đực của S-PQ16 và cái của 3 loài trên. Như vậy, có thể

kết luận: chủng S-PQ16 (loài *Steinernema phuquocense* n. sp.) là loài sinh học mới, riêng biệt.

2. Quy trình sản xuất chế phẩm sinh học chứa tuyến trùng *Steinernema phuquocense* n. sp. S-PQ16 phòng trừ ve sầu hại cà phê

Quy trình sản xuất chế phẩm sinh học chứa tuyến trùng *Steinernema phuquocense* n.sp S-PQ16 phòng trừ ve sầu hại cà phê bao gồm các bước:

Bước 1: Chuẩn bị nguyên liệu và thiết bị sản xuất, bao gồm:

+ Chủng tuyến trùng S-PQ16 (*Steinernema phuquocense* n. sp.) giai đoạn ấu trùng cảm nhiễm (Infective juveniles - IJ) được bảo quản trong nước cất, nồng độ 20.000 IJ/mL;

+ Bướm sáp lớn – BSL (*Galleria mellonella*) được nhân nuôi bằng thức ăn nhân tạo (gồm bột đậu tương trộn mật ong, hoặc tốt nhất bằng tổ ong loại thải sau khi đã quay vắt mật);

+ Môi trường đặc Chicken Offal được chế biến từ lòng gia cầm (hoặc lòng gia súc) để nhân nuôi tuyến trùng;

+ Môi trường Laura Broth để nuôi cấy vi khuẩn cộng sinh;

+ Bột xốp vô trùng để làm cơ chất trộn với Chicken Offal;

+ Các dung dịch Triton X-100, Formalin 0,1%, Ringer để sử dụng trong bảo quản tuyến trùng ở dạng IJ, và

+ Các loại dụng cụ nhân nuôi tuyến trùng, bao gồm: các bình tam giác 1000 mL hoặc hộp nhựa 2000 mL hoặc túi nilong chịu nhiệt 2000 mL (số lượng tùy thuộc quy mô nhân nuôi);

+ Các dụng cụ nuôi cấy vi khuẩn, bao gồm: các ống nghiệm thủy tinh 100 mL có nắp nhôm hoặc inox, bông, giấy bạc để nút, xy lanh nhỏ để chích hút huyết tương BSL, que cấy vi khuẩn để phân lập và nhân nuôi vi khuẩn cộng sinh,

pipet các loại;

+ Các thiết bị, bao gồm: tủ cấy vô trùng, nồi hấp tiệt trùng (Autoclave), tủ định ôn (Incubator), máy lắc trong tủ định ôn (shaker in incubator) để phân lập và nhân nuôi tạo sinh khối vi khuẩn cộng sinh; tủ lạnh mát để bảo quản chế phẩm tuyến trùng EPN.

Bước 2: Phân lập vi khuẩn cộng sinh (VKCS)

- Phân lập VKCS và nhân nuôi sơ cấp bằng cách sau:

Chuyển 10 ấu trùng BSL vào một đĩa petri 90mm có lót sẵn giấy lọc giấy lọc Whatman No1 (cỡ 90 mm). Dùng pipet hút 2mL nước chứa 1000 IJ vào (tỷ lệ nhiễm 100 IJ/BSL).

Sau 24-48 giờ sau khi ấu trùng BSL chết, chúng được chuyển vào một cốc thủy tinh lõm và rửa bằng cồn 70% trong 5-10 phút.

Mở xác chết bằng một kéo hoặc kim nhọn sắc đã được khử trùng và lấy 1 giọt huyết tương (haemolymph) nhỏ lên đĩa petri 90mm chứa sẵn môi trường NBTA (hoặc McConkey), sử dụng que cấy platin dạng vòng để tạo vết cấy trên bề mặt môi trường.

Bọc kín đĩa petri bằng giấy bọc paraffin, sau đó đặt đĩa môi trường nhân nuôi trong buồng tối ở nhiệt độ 25°C.

Chú ý: Khi thao tác mở và lấy mẫu huyết tương không làm vỡ ruột ấu trùng BSL để tránh nhiễm bẩn.

- Nhân nuôi thứ cấp VKCS bằng cách sau:

Chọn một khuẩn lạc đơn sơ cấp và cho nhiễm trở lại vào môi trường NBTA Agar hoặc YS-Broth trong các ống tuyp 50mL và để ủ trong buồng tối, ở nhiệt độ 25°C trong 48 giờ, hoặc tốt nhất đặt trên máy lắc 200 vòng phút trong 24 giờ;

Sau đó bổ sung thêm 10mL glyxerol 15% vào dịch nhân nuôi, trộn lắc đều

và sau đó dùng pipet lấy 2mL vào các ống tuýp eppendorft 5mL đã khử trùng để bảo quản sử dụng cho nhân nuôi tuyến trùng;

Để bảo quản lâu dài VKCS, chuyển ngay các ống tuýp lưu giữ ở nhiệt độ - 80°C, khi dùng chỉ cần đưa các ống tuýp eppendorft ra giải đông ở nhiệt độ phòng (20-25°C) trong 12 giờ

Bước 3: Sản xuất môi trường Chicken Offal

Các nội quan như tim, gan, ruột, v.v. của gia cầm (hoặc gia súc) đều có thể sử dụng để sản xuất môi trường nhân nuôi EPN. Loại bỏ túi mật (vì các muối mật có hại cho sự phát triển của tuyến trùng). Cho vật liệu lòng vào nồi áp suất để hấp ở 121°C trong 20-25 phút. Xay nghiền cho nhuyễn vật liệu trong 2-3 phút, sau khi xay xong phối chế thêm nước theo tỷ lệ 8 phần bột xay/2 phần nước thu được môi trường Chicken Offal. Cho môi trường Chicken Offal vào các bình / hộp nhân nuôi tuyến trùng và bảo quản trong tủ lạnh.

Bước 4: Chuẩn bị môi trường nhân nuôi tuyến trùng

Tiến hành cắt xỏp thành những miếng nhỏ (kích thước 1cm) sau đó trộn với môi trường chicken offal đã chuẩn bị sẵn ở Bước 3 nêu trên với tỷ lệ môi trường nhân nuôi/trọng lượng xỏp (tính theo trọng lượng) là 12,5/1.

Định lượng 200g môi trường Chicken Offal đã trộn với xỏp trong một túi nilon để dễ dàng chuyển vào bình tam giác 1000mL (lượng môi trường như vậy chiếm 500-600mL). Sau khi cho môi trường, lau sạch và bịt kín miệng bình tam giác bằng nút bông bọc vải thưa và hấp khử trùng bằng nồi hấp khử trùng (autoclave) ở 121°C trong 20 phút.

Trong suốt quá trình thao tác cần tiến hành trong phòng vô trùng và mang găng tay cao su để tránh nhiễm trùng cho môi trường nhân nuôi.

Dụng cụ nhân nuôi bằng bình tam giác 1000mL là dụng cụ chuẩn, dễ dàng xử lý trùng, tuy nhiên có thể dùng túi nylon chịu nhiệt hoặc hộp nhựa chịu nhiệt

để nhân nuôi EPN có thể tiết kiệm chi phí nhân nuôi. Ngoài ra, có thể chuyển trực tiếp các túi nhân nuôi ra đồng ruộng để phun rải mà không cần qua khâu tách lọc vừa mất nhiều thời gian vừa có thể bị hao hụt trong quá trình lọc tuyến trùng.

Bước 5: Nhân nuôi tuyến trùng

- Gây nhiễm VKCS vào môi trường chicken offal bằng cách

Dịch nhân nuôi vi khuẩn sơ cấp được ủ trước một ngày trước khi bình nuôi tuyến trùng được chuẩn bị. Dịch vi khuẩn được cấy chuyển vào các ống nghiệm (tốt nhất nhân nuôi vi khuẩn trong một ống tuýp 50mL cho một bình nhân nuôi 1000 mL). Cần ủ các ống tuýp qua đêm trên máy lắc hoặc lắc đều ống tuýp trước khi ủ.

Mỗi bình nhân nuôi 1000mL rót 2ml dịch vi khuẩn. Lắc đều để trộn lẫn dịch vi khuẩn với môi trường trong chất xộp nền. Ủ 48 giờ ở 25°C để vi khuẩn phát triển trong môi trường nhân nuôi tuyến trùng.

- Nhiễm tuyến trùng để nhân nuôi tổ hợp bằng cách

Sau 48 giờ ủ vi khuẩn cộng sinh đã phát triển trong môi trường chicken offal, tiến hành phân chia môi trường đã cấy VKCS bằng cách mỗi bình nhân nuôi vi khuẩn ban đầu được chia thành 7 bình mới. Sau đó, dùng pipet hút 6ml nước chứa tuyến trùng (nồng độ 2.000 IJ/mL) bơm vào từng bình tại 3-5 điểm. Sau khi đã nhiễm tuyến trùng, cần tránh rung lắc mạnh bình đang nhân nuôi tuyến trùng. Để các bình nhân ủ trong phòng tối ở nhiệt độ 25-28°C, ẩm độ 75-80% trong thời gian 10-14 ngày cho đến khi thấy tuyến trùng sinh sôi nhiều và IJ bám đầy trên thành bình có thể thu hoạch.

- Thu hoạch tuyến trùng ở dạng IJ

Để tách lọc lấy IJ từ bọt xộp, cho xộp vào một rây lọc kích thước lỗ 1-2mm. Đặt rây vào một chậu và cho nước vừa ngập xộp, để yên tĩnh trong thời gian từ

2-6 giờ hoặc nếu cần có thể để lâu đến 12 giờ, nhưng không nên để lâu quá 24 giờ vì thời gian lâu hơn sẽ không có lợi cho tuyển trùng. Không được rót nước lên trên xốp vì sẽ rửa mất một phần chất dinh dưỡng (để nuôi tuyển trùng). Thông thường trong vòng 2 giờ đầu sẽ có khoảng 95% IJ di chuyển qua đáy rây lọc xuống chậu nước.

Làm lắng tuyển trùng và rửa tuyển trùng để loại bỏ các phần khác và IJ không hoạt động. Có thể dùng rây lọc kích thước lỗ 0,5mm để lọc và loại bỏ các phần không cần thiết. Đối với các chủng *Steinernema* có thể sử dụng dung dịch Hyamine® để giết các dạng không phải IJ trước khi lọc qua rây. Cần phải rửa tuyển trùng nhiều lần tới khi nước sạch. Trong trường hợp cần thiết có thể dùng sục khí để phá vỡ những phần nhỏ của dung dịch sau khi rửa IJ.

Để tránh ô nhiễm các bình hoặc hộp nhân nuôi cần hết sức chú ý bất kỳ thao tác nào trong quá trình nhân nuôi. Chỉ cần 1 giọt nước nhỏ trong khi sản xuất cũng có thể gây ra ô nhiễm, hoặc một sự thay đổi đột ngột cũng có thể tạo ra pha thứ cấp của VKCS. Thậm chí khi nhiệt độ nhân ủ không thích hợp, ẩm độ không phù hợp vì nhiều nguyên nhân hoặc yếu tố khác. Sự ô nhiễm có thể được nhận biết dễ dàng khi xuất hiện các màu sắc hoặc mùi vị không bình thường hoặc chất rò rỉ khác lạ từ sinh khối do vi khuẩn và nấm gây ra. Trong bất kỳ trường hợp nào cũng nên được kiểm tra bằng cách gây nhiễm trên môi trường NBTA hoặc MacConkey agar.

Nhiệt độ và độ ẩm của môi trường nhân nuôi là 2 yếu tố quan trọng nhất trong nhân nuôi tuyển trùng (trong đó nhiệt độ tối ưu là 25-28°C, độ ẩm tối ưu là 80-85%). Độ ẩm có thể được điều chỉnh bằng cách thêm vào hay bớt đi một lượng chất lỏng nhất định trong các bước khác nhau của quy trình sản xuất. Nếu môi trường quá lỏng khi nhiễm IJ, tuyển trùng có thể bị giữ lại ở chỗ nhiễm và chết. Nếu môi trường là quá khô có thể hạn chế sản lượng tuyển trùng được sản xuất ra. Vì vậy, duy trì ẩm độ cao 80-85% ở nơi đặt các bình tam giác để nhân ủ

là rất tốt.

Cần tính toán thời gian phù hợp với nhu cầu phun rải ngoài đồng để nhân nuôi, sản xuất IJ. Tốt nhất sản xuất IJ chỉ nên được tiến hành 4-6 tháng trước khi sử dụng để tránh làm giảm độc tố của tuyến trùng.

Bước 6: Phối chế và bảo quản chế phẩm tuyến trùng

Sau khi thu hoạch và làm sạch, tuyến trùng có thể được chứa trong nước cất với 1 giọt Triton X-100 (tác nhân làm ẩm và ngăn chặn tuyến trùng dính vào bên trong cốc) hoặc 0,1% formalin (chỉ sử dụng khi sự ô nhiễm trở thành một vấn đề quan trọng). Nếu bảo quản trong điều kiện không có sục khí thì nồng độ IJ 20.000 IJ/ml và độ sâu của nước ở mức 1cm hoặc ít hơn. Các hộp nhựa dung tích 200mL chứa 50mL dịch tuyến trùng nồng độ 20.000 IJ/mL là dụng cụ lý tưởng bảo quản tuyến trùng trong tủ mát 12-14 °C. Với điều kiện trên đây, chế phẩm tuyến trùng có thể bảo quản được 12 tháng. Đây là chế phẩm ở dạng đậm đặc - Khi sử dụng pha loãng ít nhất 10 lần tùy liều lượng phun rải được chỉ định.

Chế phẩm sinh học tuyến trùng S-PQ16 không chỉ có hiệu lực phòng trừ tốt đối với ve sầu và sùng trắng mà còn có khả năng tái sinh trong môi trường đất. Cụ thể: (i) Độc lực : $LC_{50} = 150$ IJ ; ii) Tỷ lệ gây chết ấu trùng ve sầu = 94,4% ở (nồng độ 600 IJ); iii) Hiệu lực gây chết = 93,5-100 %; iv) Hiệu lực phòng trừ = 84-88%; v) Khả năng sinh sản của chủng S-PQ16 trong xác chết ấu trùng ve sầu = 66.000 IJ/ve (nồng độ 500 IJ) ; vi) Khả năng tái sinh trong môi trường đất = $5.020 \pm 0,34$ IJ/250 mL.

3. Phương pháp phòng trừ ve sầu hại cà phê bằng chế phẩm sinh học chứa tuyến trùng *Steinernema phuquocense* n. sp. S-PQ16

Phương pháp phòng trừ ve sầu hại cà phê bằng chế phẩm sinh học chứa tuyến trùng *Steinernema phuquocense* n. sp. S-PQ16 này cũng được đề cập. Phương pháp phòng trừ ve sầu hại cà phê bằng chế phẩm sinh học chứa tuyến

trùng *Steinernema phuquocense* n. sp. S-PQ16 (S-PQ16) bao gồm bước sử dụng chế phẩm sinh học chứa tuyến trùng S-PQ16 lên vùng đất trồng cà phê nhiễm ve sầu, trong đó chế phẩm sinh học chứa tuyến trùng S-PQ16 được sản xuất theo quy trình như nêu trên.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Chủng tuyến trùng *Steinernema phuquocense* n. sp. S-PQ16 được đánh giá độc lực học đối với ve sầu và 5 loại sâu hại khác.

Kết quả đánh giá độc lực học của chủng tuyến trùng S-PQ16 theo quy trình chuẩn của Cabanillas, H.E. & Raulston, J.R. (1994). Đã xác định hiệu lực chết (HLGC) và độc lực (LC_{50}) của chủng tuyến trùng S-PQ16 đối với ve sầu và 5 loại sâu hại khác như Bảng 2 dưới đây.

Bảng 2 – Kết quả xác định hiệu lực chết (HLGC) và độc lực (LC_{50}) của chủng tuyến trùng S-PQ16 đối với ve sầu và 5 loại sâu hại khác

Tên sâu hại	HLGC cao nhất (%)	NĐGN (IJ)	LC_{50} (IJ)
Ve sầu (<i>D. nigrasigna</i>)	94,4	600	150
Sùng trắng (<i>A. impressicollis</i>)	93,3	5000	1696
Sâu đục thân ngô (<i>O. furnacalis</i>)	100,0	100	21
Sâu quy (<i>Zophobas morio</i>)	88,8	280	103
Dế nhà (<i>A. domesticus</i>)	100,0	200	75
Bướm sáp lớn (<i>G. mellonella</i>)	93,0	80	21

Sản xuất chế phẩm sinh học tuyến trùng S-PQ16 theo các bước sau:

Bước 1: Chuẩn bị nguyên liệu và thiết bị sản xuất

Nguồn tuyển trùng S-PQ16 được phân lập và lưu giữ tại Phòng thí nghiệm EPN, Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật.

Nguồn ấu trùng bướm sáo lớn (BSL) được nhân nuôi và có sẵn tại Phòng Thí nghiệm EPN, Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật.

Thiết bị nhân nuôi có sẵn tại Phòng Thí nghiệm EPN, Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật, bao gồm: Tủ cấy vô trùng SANYO, tủ lạnh, tủ mát, tủ định ôn, máy lắc, tủ hấp vô trùng.

Dụng cụ nhân nuôi có sẵn tại Phòng thí nghiệm EPN, Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật, bao gồm: bình tam giác 1000 mL, đĩa petri 90 mm, ống nghiệm 50 và 100 mL, que cấy vi khuẩn xy ranh thí nghiệm, pipettman các loại.

Vật tư, hóa chất: Bông, giấy bạc, giấy bọc parafilm, bột xốp, YS-broth, NBTA agar, cồn Etanol, dung dịch Hyamine.

Bước 2: Phân lập vi khuẩn cộng sinh

- Chuyển 10 ấu trùng BSL vào một đĩa petri 90 mm có lót sẵn giấy lọc Whatmann No1. Dùng pipet hút 2mL nước chứa 1000 IJ vào (tỷ lệ nhiễm 100 IJ/BSL).

- Sau khi ấu trùng BSL chết (24-48 giờ), chúng được chuyển vào một cốc thủy tinh lồi và rửa bằng cồn 70% trong 5 phút.

- Mổ xác chết BSL bằng một kim nhọn sắc đã được khử trùng và lấy 1 giọt huyết tương (haemolymph) nhỏ lên đĩa petri 90 mm chứa sẵn môi trường NBTA, sử dụng que cấy platin tạo vết cấy trên bề mặt môi trường, bọc đĩa petri bằng giấy parafilm, sau đó đặt đĩa môi trường nhân nuôi trong buồng tối ở nhiệt độ 25°C.

- Chọn một khuẩn lạc đơn sơ cấp và cho nhiễm trở lại vào 10mL môi trường NBTA agar trong ống tuyp 50 mL và đặt trên máy lắc 200 vòng phút trong 24 giờ.

- Bổ sung thêm 10mL glyxerol 15% vào dịch nhân nuôi, trộn lắc đều và sau

đó dùng pipet lấy 2mL vào 10 ống tuýp eppendorft 5 mL đã khử trùng để sử dụng cho nhân nuôi tuyến trùng.

Bước 3: Sản xuất môi trường Chicken Offal:

Các nội quan như tim, gan, ruột, v.v. của gia cầm và gia súc đều có thể sử dụng để sản xuất môi trường nhân nuôi EPN. Loại bỏ túi mật (vì các muối mật có hại cho sự phát triển của tuyến trùng). Cho vật liệu lòng vào nồi áp suất để hấp ở 121°C trong 20-25 phút. Xay nghiền cho nhuyễn vật liệu trong 2-3 phút, sau khi xay xong phối chế thêm nước theo tỷ lệ 8 phần bột xay/2 phần nước thu được môi trường Chicken Offal.

Bước 4: Chuẩn bị dụng cụ nhân nuôi tuyến trùng:

Tiến hành cắt xốp thành những miếng nhỏ (kích thước 1cm) sau đó trộn với môi trường chicken offal đã chuẩn bị sẵn ở Bước 3 nêu trên với tỷ lệ môi trường nhân nuôi / trọng lượng xốp (tính theo trọng lượng) là 12,5/1.

Định lượng 200g môi trường Chicken Offal đã trộn với xốp trong một túi nilon để chuyển vào bình tam giác 1000 mL (lượng môi trường như vậy chiếm 500-600mL). Sau khi cho môi trường, lau sạch và bịt kín miệng bình tam giác bằng nút bông bọc vải thưa và hấp khử trùng bằng nồi hấp khử trùng (autoclave) ở 121°C trong 20 phút.

Trong suốt quá trình thao tác cần tiến hành trong phòng vô trùng và mang găng tay cao su để tránh nhiễm trùng cho môi trường nhân nuôi.

Dụng cụ nhân nuôi bằng bình tam giác 1000 mL là dụng cụ chuẩn, dễ dàng xử lý trùng, tuy nhiên có thể dùng túi nylon chịu nhiệt hoặc hộp nhựa chịu nhiệt để nhân nuôi EPN có thể tiết kiệm chi phí nhân nuôi. Ngoài ra, có thể chuyển trực tiếp các túi nhân nuôi ra đồng ruộng để phun rải mà không cần qua khâu tách lọc vừa mất nhiều thời gian vừa có thể bị hao hụt trong quá trình lọc tuyến trùng.

Bước 5: Nhân nuôi tuyến trùng thông qua 3 bước:

- Nhiễm VKCS vào môi trường Chicken Offal

Chuẩn bị sẵn 5 bình nhân nuôi 1000 mL, mỗi bình chứa môi trường chicken offal. Cho vào mỗi bình 2mL dịch vi khuẩn đã chuẩn bị sẵn, lắc đều để trộn lẫn dịch vi khuẩn với môi trường trong chất xốp nền. Ủ 48 giờ ở 25°C để vi khuẩn phát triển trong môi trường nhân nuôi tuyến trùng.

- Nhiễm tuyến trùng để nhân nuôi tổ hợp

Sau 48 giờ ủ vi khuẩn cộng sinh đã phát triển trong môi trường chicken offal, tiến hành phân chia môi trường đã cấy VKCS, mỗi bình nhân nuôi vi khuẩn ở trên được chia thành 7 bình mới, như vậy từ 5 bình nhân nuôi vi khuẩn được san ra thành 35 bình mới.

Dùng pipet hút 6 ml nước chứa tuyến trùng (nồng độ 2000 IJ/mL) bơm vào mỗi bình (nhỏ đều tại 3-5 điểm). Sau khi đã nhiễm tuyến trùng để các bình nhân ủ trong phòng tối ở nhiệt độ 28°C, ẩm độ 80% trong thời gian 12 ngày khi thấy tuyến trùng IJ xuất hiện bám đầy trên thành bình có thể thu hoạch.

- Thu hoạch tuyến trùng

Đổ toàn bộ môi trường nhân nuôi vào rây lọc đường kính 20cm, kích thước mắt lưới 1mm và đặt rây vào một chậu và cho nước vừa ngập toàn bộ môi trường xốp, để yên tĩnh trong thời gian từ 2-6 giờ để thu tuyến trùng thoát ra từ môi trường. Thu tuyến trùng trong chậu đợt 1 sau 2 giờ và đợt 2 sau 6 giờ.

Dùng rây lọc kích thước lỗ 0,5 mm để lọc lại và loại bỏ vụn bẩn. Sau đó gạn vài lần bằng nước sạch cho tới khi thấy dịch tuyến trùng trong và sạch.

Định lượng tuyến trùng thu được bằng khuấy đều dung dịch thu được hút 1 mL pha loãng 100 lần cho vào hộp đếm kiểm tra dưới kính hiển vi soi nổi.

Bước 6: Phối chế và bảo quản chế phẩm tuyến trùng:

Sau khi thu hoạch và làm sạch, tuyến trùng có thể được chứa trong nước cất với 1 giọt Triton X-100 (tác nhân làm ẩm và ngăn chặn tuyến trùng dính vào bên trong cốc) hoặc 0,1% formalin (chỉ sử dụng khi sự ô nhiễm trở thành một vấn đề quan trọng). Nếu bảo quản trong điều kiện không có sự ô nhiễm thì nồng độ IJ 20.000 IJ/ml và độ sâu của nước ở mức 1 cm hoặc ít hơn. Các hộp nhựa dung tích 200mL chứa 50mL dịch tuyến trùng nồng độ 20.000 IJ/mL là dụng cụ lý tưởng bảo quản tuyến trùng trong tủ mát 12-14 °C. Với điều kiện trên đây, chế phẩm tuyến trùng có thể bảo quản được trong 12-18 tháng.

Chế phẩm sinh học chứa tuyến trùng S-PQ16 có thành phần tính trên 1000 mL nước sạch trung tính chứa 20.000.000 ấu trùng cảm nhiễm (IJ), 1 mL chất phụ gia bôi trơn Triton X-100 và 1 mL chất kháng khuẩn formalin.

Phương pháp phòng trừ ve sầu hại cà phê bằng chế phẩm sinh học chứa tuyến trùng *Steinernema phuquocense* n. sp. S-PQ16 bao gồm bước sử dụng chế phẩm thu được từ quy trình nêu trên lên đất trồng cà phê nhiễm ve sầu hại cà phê.

Thử nghiệm phun rải chế phẩm sinh học chứa tuyến trùng *Steinernema phuquocense* n. sp. S-PQ16 thu được từ quy trình sản xuất nêu trên trong đất nhiễm ve sầu để xác định hiệu lực phòng trừ đã được triển khai trong thùng xốp (mô hình chậu vại - *in pot*) mô phỏng các điều kiện ngoài đồng ruộng. Thùng đôi chứng chỉ tưới nước sạch.

Các kết quả thử nghiệm như sau:

- + Tỷ lệ gây chết ấu trùng ve sầu = 94,4 % ở (nồng độ 600 IJ);
- + Hiệu lực gây chết = 93,5-100 %;
- + Hiệu lực phòng trừ = 84-88 %;

+ Khả năng sinh sản của chủng S-PQ16 trong xác chết ấu trùng ve sầu = $66,0 \times 10^3$ IJ/ve (nồng độ 500 IJ).

Trong đó, ở thùng đối chứng (chỉ tưới nước sạch) thì không có ve sầu chết.

Tuyến trùng S-PQ16 không chỉ có khả năng tiêu diệt ve sầu mà còn có khả năng tái sinh trong môi trường đất. Cụ thể, mật độ tuyến trùng trong môi trường đất tăng từ 50, 723 và 810 IJ/250mL đất sau 10, 20 và 30 ngày phun rải.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp phòng trừ ve sầu hại cà phê bằng chế phẩm sinh học chứa tuyến trùng *Steinernema phuquocense* n. sp. S-PQ16 (S-PQ16) bao gồm bước sử dụng chế phẩm sinh học chứa tuyến trùng S-PQ16 lên vùng đất trồng cà phê nhiễm ve sầu, trong đó:

chủng tuyến trùng S-PQ16 được phân lập bằng kỹ thuật côn trùng bẫy từ mẫu đất cát thu từ một bãi biển ở đảo Phú Quốc thuộc tỉnh Kiên Giang, Việt Nam và có trình tự vùng ITS-rADN được đăng ký tại GenBank với số hiệu KX405172 và vùng 28S được đăng ký GenBank với số hiệu KX405173;

chế phẩm sinh học chứa tuyến trùng S-PQ16 có thành phần tính trên 1000 mL nước sạch trung tính chứa 20.000.000 ấu trùng cảm nhiễm (IJ), 1 mL chất phụ gia bôi trơn Triton X-100 và 1 mL chất kháng khuẩn formalin; và

hiệu lực phòng trừ là 84-88 %.