

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC CẦN THƠ**

PHẠM KIM SƠN

**NGHIÊN CỨU PHEROMONE GIỚI TÍNH VÀ
NẤM KÝ SINH TRONG PHÒNG TRỊ SÙNG
KHOAI LANG (*CYLAS FORMICARIUS*
FABRICIUS) TẠI ĐỒNG BẰNG
SÔNG CỬU LONG**

**LUẬN ÁN TIẾN SĨ KHOA HỌC
CHUYÊN NGÀNH BẢO VỆ THỰC VẬT
Mã ngành: 62 62 01 12**

2016

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC CẦN THƠ**

PHẠM KIM SƠN

**NGHIÊN CỨU PHEROMONE GIỚI TÍNH VÀ
NẤM KÝ SINH TRONG PHÒNG TRỊ SÙNG
KHOAI LANG (*CYLAS FORMICARIUS*
FABRICIUS) TẠI ĐỒNG BẰNG
SÔNG CỬU LONG**

**LUẬN ÁN TIẾN SĨ KHOA HỌC
CHUYÊN NGÀNH BẢO VỆ THỰC VẬT
Mã ngành: 62 62 01 12**

**CÁN BỘ HƯỚNG DẪN
PGs. Ts. TRẦN VĂN HAI**

2016

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan kết quả của luận án “Nghiên cứu pheromone giới tính và nấm ký sinh trong phòng trị sùng khoai lang (*Cylas formicarius* Fabricius) tại Đồng bằng sông Cửu Long” được hoàn thành dựa trên các kết quả nghiên cứu của tôi. Các số liệu, kết quả của nghiên cứu trình bày trong luận án này là trung thực và chưa được dùng cho bất cứ luận án cùng cấp nào khác.

Tác giả luận án

Phạm Kim Sơn

LỜI CẢM TẠ

Luận án tiến sĩ này là kết quả nghiên cứu khoa học được thực hiện trong nhiều năm (2010-2015) nhờ sự nỗ lực của bản thân cùng với sự giúp đỡ của quý thầy cô, đồng nghiệp và các học viên cao học, sinh viên trong quá trình thực hiện luận văn, cùng với các cơ quan hợp tác và các nông dân trồng khoai lang tham gia thực hiện thí nghiệm ngoài đồng. Tác giả xin trân trọng cảm ơn sự nhiệt tình hợp tác và giúp đỡ của tất cả mọi người.

Xin chân thành gửi lời cảm ơn sâu sắc nhất đến PGs.Ts. Trần Văn Hai và PGs.Ts. Lê Văn Vàng đã tận tình hướng dẫn, định hướng, giúp tôi đạt được nhiều kiến thức mới trong lĩnh vực nghiên cứu của đề tài và tạo mọi điều kiện thuận lợi nhất cho tôi có cơ hội hoàn thành luận án tiến sĩ này.

Xin chân thành cảm ơn Quý thầy cô đã tận tình giảng dạy, truyền đạt những kiến thức quý báu, nhiệt tình hỗ trợ giúp tôi hoàn thành các học phần và các chuyên đề trong chương trình NCS và lớp Anh văn B2.

Xin chân thành cảm ơn Quý thầy cô và các bạn đồng nghiệp thuộc Bộ môn Bảo vệ Thực vật đã luôn ủng hộ, động viên, giúp đỡ và tạo nhiều điều kiện thuận lợi cho tôi trong suốt thời gian công tác và học tập tại Trường.

Xin chân thành cảm ơn Ban Giám hiệu, Khoa Sau đại học, Khoa Nông nghiệp & Sinh học ứng dụng, Phòng quản lý khoa học đã tạo điều kiện thuận lợi cho tôi được hưởng các chế độ theo qui định và hoàn thành khóa học này.

Xin chân thành cảm ơn Sở Khoa học và Công nghệ tỉnh Vĩnh Long đã hỗ trợ kinh phí đề tài cấp tỉnh thực hiện các thí nghiệm ngoài đồng tại Bình Tân.

Xin gửi lời cảm ơn sâu sắc đến các em Quốc Khánh, Ngọc Linh, Trịnh Thị Xuân, Bùi Xuân Hùng, chị Diệu Hương, Cẩm Thu, Tuyết Loan, Quốc Tuấn, Hồng Ứng, Thành Tài, Trung Nguyên, Ngọc Nghĩa, Thúy Liễu, Hữu Quý, Quốc Tuấn, Công Khanh, Kim Quyên, Nhật Minh, Xuân Liên, Vũ Trụ, Quốc Tính, Thúy Kiều, Phương Uyên,... đã nhiệt tình giúp đỡ, đóng góp ý kiến, tạo điều kiện cho tôi trong quá trình thực hiện đề tài và tất cả những người đã từng giúp đỡ mà tôi chưa liệt kê ra hết trên trang cảm tạ này.

Xin chân thành biết ơn Hội đồng bảo vệ luận án và giáo viên phản biện đã đọc và đóng góp nhiều ý kiến quý báu giúp cho luận án hoàn thiện hơn.

Trân trọng biết ơn gia đình đã tạo mọi điều kiện tốt nhất cho tôi học tập và phát triển như hôm nay. Cảm ơn tình cảm tốt đẹp của các em luôn ủng hộ, động viên và giúp tôi trong lúc khó khăn.

Chân thành cảm ơn tất cả mọi người đã giúp đỡ tôi trong thời gian qua.

Phạm Kim Sơn

TÓM TẮT

Sùng khoai lang (*Cylas formicarius*) là đối tượng gây hại nghiêm trọng trên khoai lang ở đồng bằng sông Cửu Long (ĐBSCL). Nhằm tạo cơ sở cho việc ứng dụng pheromone giới tính và nắm ký sinh côn trùng trong việc xây dựng chiến lược quản lý bền vững và hiệu quả đối với sùng khoai lang, đề tài: “Nghiên cứu pheromone giới tính và nắm ký sinh trong phòng trị sùng khoai lang (*Cylas formicarius* Fabricius) tại đồng bằng sông Cửu Long” đã được thực hiện từ năm 2010 đến năm 2014. Kết quả nghiên cứu đạt được như sau:

- Kết quả điều tra 100 hộ nông dân tại 3 xã Thành Đông, Thành Trung và Tân Thành, huyện Bình Tân, tỉnh Vĩnh Long có thâm niên canh tác khoai lang cao, đa số trên 10 năm, với diện tích canh tác từ 0,6-1,0 ha, chủ yếu trồng giống khoai lang Tím Nhật, có lợi nhuận khá cao, trồng 1 vụ/năm, mua giống từ nơi khác. Tất cả nông hộ điều tra đều sử dụng thuốc hóa học để phòng trị các đối tượng gây hại như sùng khoai lang, sâu ăn lá, dế nhũi và bệnh thối dây, nông dân có biết về pheromone giới tính của SKL, đa số chưa qua sử dụng.

- Kết quả khảo sát ngoài đồng trên 9 ruộng khoai lang cho thấy có 19 loài côn trùng và 1 loài nhện hại trên khoai lang. Trong đó, sâu ăn tạp, ruồi đục lòn, rầy phấn trắng và bọ dưa là các đối tượng gây hại xuất hiện thường xuyên và phổ biến. Có 10 loài thiên địch được ghi nhận, trong đó, kiến ba khoang và nhện lùn là 2 loài thiên địch phổ biến nhất và tần suất xuất hiện cao nhất.

- Hợp chất (Z)-3-dodecenyl-(E)-2-butenoate (Z3-12:E2), pheromone giới tính của sùng khoai lang, đã được tổng hợp thành công bằng con đường tổng hợp thông qua phản ứng Wittig với các chất phản ứng ban đầu là 1,3-propanediol, 1-nonanal. Trong đó, phản ứng Wittig được điều chỉnh để tổng hợp chọn lọc cấu hình Z (*cis*) của nối đôi trong phân tử. Quy trình tổng hợp hợp chất (Z)-3-dodecenyl-(E)-2-butenoate thông qua 5 bước, độ tinh khiết trên 99%. Mỗi pheromone giới tính tổng hợp (0,3-1 mg/tuýp) được điều chế từ ống cao su non Việt Nam cho hiệu quả hấp dẫn sùng khoai lang cao tương đương với mỗi được điều chế từ tuýp cao su Aldrich (Đức). Dạng bẫy nước cho hiệu quả bắt giữ sùng đục cao hơn so với dạng bẫy dính. Bẫy được đặt đứng cạnh luống khoai và cửa bẫy ngang tán lá khoai cho hiệu quả hấp dẫn sùng tốt nhất.

- Khảo sát diễn biến mật số SKL bằng bẫy pheromone giới tính tại hai huyện Bình Minh và Bình Tân, tỉnh Vĩnh Long cho thấy mật số SKL không phụ thuộc vào lượng mưa và nhiệt độ môi trường mà phụ thuộc vào thời vụ khoai lang trên đồng ruộng và mật số sùng chủ yếu tăng mạnh vào giai đoạn

gần thu hoạch hoặc các ruộng khoai lang lân cận thu hoạch. Mật số sùng giảm xuống khi nông dân chuyển đổi cơ cấu cây trồng, nhất là luân canh với lúa.

- Kết quả phân lập, định danh theo phương pháp truyền thống và giải trình tự DNA trên vùng ITS-rDNA đã xác định 7 mẫu phân lập nấm *Metarhizium* thu thập ở ĐBSCL chỉ là loài nấm *Metarhizium anisopliae*. Theo phương pháp sinh học phân tử, sử dụng kỹ thuật PCR, giải trình tự DNA trên vùng ITS-rDNA và dựa vào cơ sở dữ liệu ngân hàng gen đã khẳng định 7 mẫu phân lập nấm *Metarhizium* thu ngoài tự nhiên thuộc loài nấm *Metarhizium anisopliae*. Trình tự DNA của các mẫu phân lập nấm *M. anisopliae* có độ tương đồng cao.

- Đánh giá hiệu lực của các mẫu phân lập nấm xanh trong điều kiện PTN cho thấy các chủng nấm xanh *M. anisopliae* có hiệu lực gây chết sùng rất cao, đạt từ 96,5-100% ở thời điểm 5 NSKXL. Hơn nữa, sùng đực bị nhiễm nấm xanh (10^9 bào tử/ml) có khả năng lây lan bệnh và gây chết cho các cá thể khác với độ hữu hiệu trên 90% từ thời điểm 9 ngày sau khi thả sùng tiếp xúc. Hiệu quả của nấm xanh đối với SKL ở dạng chế phẩm nấm tươi là nhanh và cao hơn so với dạng bột nấm khô, xử lý bằng hình thức phun cho hiệu quả cao hơn hình thức rải nấm. Mặt khác, sùng cái khỏe mạnh bắt cặp với sùng đực đã bị lây nhiễm nấm xanh bằng cách cho tiếp xúc với nấm trực tiếp hoặc thông qua môi pheromone giới tính có thời gian sống và số lượng sùng con được sinh ra giảm có ý nghĩa so với sùng cái bắt cặp với sùng đực bình thường.

- Kết quả đánh giá trong điều kiện ngoài đồng ở các huyện Duyên Hải (Trà Vinh), Tri Tôn (An Giang), Cù Lao Dung (Sóc Trăng) và Bình Tân (Vĩnh Long) cho thấy biện pháp đặt 6-12 bẫy pheromone/1.000 m² kết hợp với phun và rải nấm xanh cho hiệu quả làm giảm tỷ lệ gây hại của SKL tương đương (ở Duyên Hải và Bình Tân) hoặc có hiệu quả cao hơn (ở Cù Lao Dung và Tri Tôn) so với biện pháp áp dụng thuốc trừ sâu theo cách nông dân. Tuy nhiên, các khảo sát ngoài đồng chưa thấy thể hiện rõ hiệu quả cộng hưởng của bẫy pheromone giới tính và nấm xanh phòng trị SKL qua diễn biến số lượng sùng vào bẫy và tỉ lệ thiệt hại trên củ do sùng gây hại.

Từ khóa: Cylas formicarius, Metarhizium anisopliae, vùng ITS-rDNA, pheromone giới tính, sùng khoai lang

ABSTRACT

Sweet potato weevils (SPW) cause important damages in the region of sweet potato growing world-wide. To lay the basis for the use of sex pheromone and entomopathogens in developing strategies for sustainable management and controlling SPW, “The study of sex pheromone and entomopathogens in control of the sweet potato weevils (*Cylas formicarius* Fabricius) in Mekong Delta” was conducted from 2010 to 2014. The study results are as follows:

100 farmers in 3 communes (i.e. Thanh Dong, Thanh Trung and Tan Thanh of Binh Tan District, Vinh Long Province) had high seniority (the majority of them more than 10 years) in growing sweet potato on farming areas of 0,6-1 ha. They mainly grew Japanese purple sweet potato with high profits for 1 crop/year. All (100%) of surveyed farmers used chemical pesticides to control sweet potato weevils, leaf-miners, mole crickets, stalk rot. Farmers knew about sex pheromone of sweet potato weevils.

Survey results under field conditions in 9 sweet potato fields identified 19 species of pest insect and 1 species of mite in sweet potato. Among them, armyworm and whitefly appeared to be predominant. Ten (10) species of natural enemy appeared, in which staphylinidae and dwarf spider were the 2 common ones occurring with the highest frequency.

(*Z*)-3-dodecenyl-(*E*)-2-butenate (Z3-12:E2), sex pheromone of SPW was synthesized via Wittig reaction, with 1,3-propanediol, 1-nonanal and Crotonyl chloride, in which, the Wittig reaction was adjusted to select for the *Z* (*cis*) configuration of the double bonds in the molecule. The synthesis of (*Z*)-3-dodecenyl-(*E*)-2-butenate via 5 steps was performed with over 99% purity. Synthetic sex pheromone lures (0,3-1 mg/tube) were prepared from uncured rubber tube of Vietnam and had similar attraction effectiveness as Aldrich (Germany). Water trap had higher effectiveness of capturing weevils than sticky trap. Trap with door position at the leaf canopy had the best effectiveness of attraction.

The survey of the development of SPW's population by using sex pheromone trap at Binh Minh District, and Binh Tan District, Vinh Long showed that SPW's population did not depend on rainfall and temperature. It was related to sweet potato crops. Weevils' population increased at harvesting period and decreased when farmers shifted their cultivating structure, especially the rotation with rice.

Using the traditional method and sequences of DNA in ITS-rDNA region, 7 samples of *Metarhizium anisopliae* were isolated from samples collected in nature. Using PCR techniques, sequences of DNA in ITS-rDNA region and genebank analysis, it was confirmed that the 7 isolated samples were *M. anisopliae*, with high similarity.

The evaluation, in laboratory, of the effectiveness of the isolated samples of *Ma* showed that *M. anisopliae* was highly effective in killing weevils at levels of 96,5-100%, 5 days after treatment. Male weevils infected *Ma* (10^9 spores/mL) can transmit the disease and cause the death to weevils' population up to 90% after 9 days. Fresh powder fungi *Ma* was more effective than fungi under dry powder-form. Moreover, spreading fungi was more effective than spraying fungi. Female weevils and male weevils contacted with sex pheromone and infected *Ma* had shorter lifetime and the number of young weevils was decreased.

The results of the evaluation at Duyen Hai (Tra Vinh), Tri Ton (An Giang), Cu Lao Dung (Soc Trang) and Binh Tan (Vinh Long) showed that 6-12 pheromone traps/1.000 square meters combined with spraying and spreading *Ma* were as effective in controlling weevils (at Duyen Hai and Binh Tan) or higher effectiveness (at Cu Lao Dung and Tri Ton) as when using chemical pesticides. However, in-field surveys did not show resonant effectiveness of sex pheromone traps and *Ma* in controlling SPW through number of weevils captured in traps and the incidence.

Keywords: Cylas formicarius, Metarhizium anisopliae, sex pheromone, sequences of ITS-rDNA region, Sweetpotato weevil

MỤC LỤC

	Trang
DANH SÁCH BẢNG	x
DANH SÁCH HÌNH	xiv
DANH SÁCH TỪ VIẾT TẮT	xvii
Chương 1. GIỚI THIỆU	1
1.1 Tính cấp thiết của luận án	1
1.2 Mục tiêu nghiên cứu	3
1.3 Nội dung nghiên cứu	3
1.4 Đối tượng và phạm vi nghiên cứu	3
1.5 Giới hạn của nghiên cứu	3
1.6 Những điểm mới của luận án	4
1.7 Ý nghĩa khoa học và thực tiễn của luận án	4
Chương 2. TỔNG QUAN TÀI LIỆU	6
2.1 Đặc điểm của sùng khoai lang, <i>Cylas formicarius</i> Fabricius	6
2.1.1 Phân bố và ký chủ	6
2.1.2 Đặc điểm hình thái, sinh học, sinh thái học của sùng khoai lang...	7
2.1.3 Tập quán sinh sống và cách gây hại của sùng khoai lang.....	10
2.1.4 Triệu chứng gây hại của sùng khoai lang	11
2.1.5 Cách phòng trị sùng khoai lang trên đồng ruộng	12
2.2 Nghiên cứu và ứng dụng pheromone giới tính của sùng khoai lang ...	13
2.2.1 Cấu trúc hóa học pheromone giới tính của sùng khoai lang.....	13
2.2.2 Tổng hợp pheromone giới tính của sùng khoai lang.....	13
2.2.3 Một số kết quả nghiên cứu về pheromone giới tính của sùng khoai lang trên thế giới.....	18
2.2.4 Ứng dụng pheromone giới tính phòng trị sùng khoai lang.....	23
2.3 Đặc điểm của nấm ký sinh trên côn trùng.....	25
2.4 Ứng dụng nấm ký sinh trên sùng khoai lang	28
Chương 3. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	33
3.1 Vật liệu nghiên cứu.....	33
3.1.1 Vật liệu.....	33
3.1.2 Hóa chất	33
3.1.3 Kiểu bẫy pheromone	34
3.1.4 Nấm ký sinh sử dụng trong thí nghiệm.....	35
3.1.5 Nguồn sùng khoai lang.....	36
3.1.6 Phiếu điều tra nông dân và khảo sát ngoài đồng.....	36
3.2 Nội dung và phương pháp nghiên cứu.....	36
3.2.1 Điều tra tình hình canh tác khoai lang, khảo sát côn trùng gây hại	

và thiên địch trên ruộng khoai lang tại huyện Bình Tân, Vĩnh Long.....	36
3.2.2 Nghiên cứu về pheromone giới tính tổng hợp của sùng khoai lang.	38
3.2.3 Nghiên cứu về nấm ký sinh trên sùng khoai lang trong phòng thí nghiệm	50
3.2.4. Khảo sát hiệu quả ứng dụng của pheromone giới tính tổng hợp kết hợp với nấm xanh (<i>Ma</i>) phòng trị sùng khoai lang.....	59
3.3 Phương pháp xử lý số liệu	65
Chương 4. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....	66
4.1 Điều tra tình hình canh tác khoai lang, khảo sát côn trùng gây hại và thiên địch trên ruộng khoai lang tại Bình Tân, Vĩnh Long.....	66
4.1.1 Điều tra nông dân về tình hình canh tác khoai lang	66
4.1.2 Khảo sát ngoài đồng về tình hình côn trùng gây hại và thiên địch trên ruộng khoai lang	74
4.2 Nghiên cứu về pheromone giới tính tổng hợp của sùng khoai lang...	77
4.2.1 Tổng hợp hợp chất (Z3-12:E2) pheromone giới tính của sùng khoai lang trong phòng thí nghiệm	77
4.2.2 Ứng dụng của pheromone giới tính tổng hợp ở điều kiện ngoài đồng	86
4.3 Nghiên cứu về nấm ký sinh trên sùng khoai lang trong PTN	112
4.3.1 Phân lập và định danh loài từ chi nấm <i>Metarhizium</i> ký sinh trên côn trùng theo phương pháp phân loại truyền thống	112
4.3.2 Phân loại, xác định loài nấm <i>Metarhizium</i> dựa vào trình tự vùng ITS-rDNA theo phương pháp sinh học phân tử	120
4.3.3 Khảo sát hiệu lực của các mẫu phân lập nấm <i>Metarhizium</i> đối với thành trùng sùng khoai lang trong điều kiện phòng thí nghiệm	125
4.3.4 Khảo sát hiệu lực gây chết của chủng nấm xanh (<i>Ma</i>) ở các mật số bào tử khác nhau đối với thành trùng SKL trong điều kiện PTN	128
4.3.5 Khảo sát khả năng ký sinh của nấm xanh (<i>Ma</i>) trong quần thể SKL qua các hình thức xử lý khác nhau trong PTN	130
4.4 Khảo sát hiệu quả ứng dụng kết hợp pheromone giới tính tổng hợp và nấm xanh (<i>M. anisopliae</i>) đối với sùng khoai lang	133
4.4.1 Khảo sát khả năng lây lan bệnh của sùng đực sau khi tiếp xúc với pheromone giới tính và nấm xanh trong điều kiện phòng thí nghiệm.....	133
4.4.2 Khảo sát ảnh hưởng của pheromone giới tính tổng hợp và nấm xanh (<i>Ma</i>) lên khả năng sinh sản của thành trùng SKL trong PTN	136
4.4.3 Khảo sát hiệu quả của pheromone giới tính tổng hợp kết hợp với nấm xanh (<i>Ma</i>) phòng trị SKL tại huyện Bình Tân, Vĩnh Long.....	140
4.4.4 Khảo sát hiệu quả của pheromone giới tính tổng hợp kết hợp với nấm xanh (<i>Ma</i>) phòng trị SKL tại huyện Cù Lao Dung, Sóc Trăng.....	142

4.4.5 Khảo sát hiệu quả của pheromone giới tính tổng hợp kết hợp với nấm xanh (<i>Ma</i>) phòng trị SKL tại huyện Duyên Hải, Trà Vinh.....	147
4.4.6 Khảo sát hiệu quả của pheromone giới tính tổng hợp kết hợp với nấm xanh (<i>Ma</i>) phòng trị SKL tại huyện Tri Tôn, An Giang	152
Chương 5. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ XUẤT	157
5.1 Kết luận	157
5.2 Đề xuất	158
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	159
PHỤ LỤC.....	170

DANH SÁCH BẢNG

Bảng	Tên Bảng	Trang
3.1	Thông tin các ruộng khoai lang điều tra thành phần côn trùng gây hại	37
3.2	Các nghiệm thức khảo sát hiệu quả hấp dẫn của pheromone giới tính tổng hợp ở các khối lượng/bẫy khác nhau đối với sùng khoai lang ở ngoài đồng, năm 2010.....	43
3.3	Các nghiệm thức khảo sát ảnh hưởng của kiểu tuýp môi lên hiệu quả hấp dẫn của pheromone giới tính đối với sùng khoai lang ở ngoài đồng, năm 2010.....	44
3.4	Các nghiệm thức khảo sát ảnh hưởng của kiểu bẫy lên khả năng hấp dẫn của pheromone giới tính tổng hợp đối với sùng khoai lang ở ngoài đồng, năm 2010.....	44
3.5	Các nghiệm thức khảo sát ảnh hưởng của màu sắc bẫy lên khả năng hấp dẫn của pheromone giới tính tổng hợp đối với sùng khoai lang ở ngoài đồng, 2010.....	45
3.6	Các nghiệm thức khảo sát ảnh hưởng của độ cao đặt bẫy lên khả năng hấp dẫn của pheromone giới tính tổng hợp đối với sùng khoai lang ở ngoài đồng, 2010.....	46
3.7	Thẻ tích các thành phần hóa chất sử dụng trong phản ứng PCR.....	55
3.8	Các nghiệm thức khảo sát hiệu lực gây chết của nấm xanh (<i>Ma</i>) ở các mật số bào tử khác nhau đối với thành trùng SKL trong phòng thí nghiệm, năm 2012.....	58
3.9	Các nghiệm thức khảo sát khả năng ký sinh gây chết của nấm xanh (<i>Ma</i>) qua các hình thức xử lý khác nhau đối với thành trùng SKL trong PTN, năm 2012.....	58
3.10	Các nghiệm thức khảo sát khả năng lây lan bệnh của nấm xanh (<i>Ma</i>) từ sùng đực bị nhiễm nấm trong quần thể SKL ở điều kiện PTN, năm 2012.....	60
3.11	Các nghiệm thức khảo sát ảnh hưởng của pheromone giới tính và nấm xanh (<i>Ma</i>) lên khả năng sinh sản của sùng khoai lang trong PTN, năm 2013.....	61
3.12	Các nghiệm thức khảo sát hiệu quả kết hợp của pheromone giới tính tổng hợp với nấm xanh phòng trị sùng khoai lang tại tỉnh Vĩnh Long, năm 2011.....	62
3.13	Các nghiệm thức khảo sát hiệu quả kết hợp của pheromone giới tính tổng hợp với nấm xanh phòng trị sùng khoai lang tại tỉnh Sóc Trăng, năm 2011.....	63
3.14	Các nghiệm thức khảo sát hiệu quả kết hợp của pheromone giới	

	tính tổng hợp với nấm xanh phòng trị SKL trên ruộng khoai mới canh tác tại huyện Duyên Hải, tỉnh Trà Vinh, năm 2011.....	64
3.15	Các nghiệm thức khảo sát hiệu quả kết hợp của pheromone giới tính tổng hợp với nấm xanh phòng trị SKL trên ruộng khoai canh tác lâu năm tại huyện Duyên Hải, tỉnh Trà Vinh, năm 2011.....	64
4.1	Tỉ lệ nông hộ điều tra theo thâm niên và diện tích canh tác	66
4.2	Tỉ lệ nông hộ điều tra trồng khoai lang đạt lợi nhuận ở vụ khoai trước	67
4.3	Tỉ lệ nông hộ điều tra theo số vụ canh tác, nguồn hom và xử lý hom	69
4.4	Tỉ lệ nông hộ điều tra theo phương pháp xử lý ra củ, xử lý dây nuôi củ, thời gian neo củ và xử lý ruộng sau thu hoạch.....	70
4.5	Tỉ lệ nông hộ điều tra theo biện pháp phòng trừ sâu hại và tỉ lệ củ khoai bị sùng ở vụ trước	73
4.6	Thành phần côn trùng và nhện hại hiện diện trên 9 ruộng khoai lang tại địa bàn khảo sát thuộc huyện Bình Tân, tỉnh Vĩnh Long, năm 2010.....	75
4.7	Thành phần thiên địch hiện diện trên 9 ruộng khoai lang khảo sát tại huyện Bình Tân, tỉnh Vĩnh Long, năm 2010	77
4.8	Hiệu quả hấp dẫn của pheromone giới tính tổng hợp ở các khối lượng sản phẩm khác nhau đối với sùng khoai lang tại xã Thành Lợi, huyện Bình Tân, Vĩnh Long, năm 2010.....	87
4.9	Ảnh hưởng của kiểu tuýp môi lên hiệu lực hấp dẫn của pheromone giới tính tổng hợp đối với sùng khoai lang ở điều kiện ngoài đồng, năm 2010.....	89
4.10	Hiệu quả của kiểu bẫy lên khả năng hấp dẫn của pheromone giới tính đối với thành trùng SKL trên ruộng khoai lang tại huyện Bình Tân, năm 2010.....	90
4.11	Ảnh hưởng của màu sắc bẫy đối với thành trùng sùng khoai lang tại xã Thành Lợi, huyện Bình Tân, tỉnh Vĩnh Long, năm 2010.....	91
4.12	Ảnh hưởng của độ cao đặt bẫy lên khả năng hấp dẫn của bẫy pheromone giới tính đối với SKL tại Bình Minh, năm 2010.....	92
4.13	Thành phần côn trùng gây hại trên các ruộng khoai lang ở vụ 1 tại huyện Bình Tân, Vĩnh Long, từ tháng 12 năm 2009 đến tháng 5 năm 2010	101
4.14	Thành phần côn trùng gây hại trên các ruộng khoai lang ở vụ 2 tại huyện Bình Tân, Vĩnh Long, từ tháng 8 đến 12 năm 2010.....	102
4.15	Thành phần thiên địch ăn thịt trên các ruộng khoai lang ở vụ 1 tại huyện Bình Tân, Vĩnh Long, từ tháng 12 năm 2009 đến tháng 5 năm	

	2010.....	104
4.16	Thành phần thiên địch ăn thịt trên các ruộng khoai lang ở vụ 2 tại huyện Bình Tân, Vĩnh Long, từ tháng 8 đến 12 năm 2010.....	105
4.17	Tỉ lệ củ khoai bị sùng gây hại trên các ruộng khoai lang ở vụ 1 tại huyện Bình Tân, Vĩnh Long, từ tháng 12 năm 2009 đến tháng 5 năm 2010.....	106
4.18	Tỉ lệ củ khoai lang Tím Nhật bị sùng gây hại trên các ruộng thí nghiệm ở vụ 2 tại huyện Bình Tân, Vĩnh Long, từ tháng 8 đến 12 năm 2010.....	110
4.19	Các nguồn nấm <i>Metarhizium</i> đã phân lập, định danh trên một số côn trùng gây hại cây trồng ở một số tỉnh ĐBSCL.....	112
4.20	Các mẫu <i>Metarhizium</i> trên thế giới được sử dụng để xác định loài...	121
4.21	Mức độ tương đồng (%) về trình tự DNA trong vùng ITS-rDNA giữa 7 mẫu phân lập nấm <i>Metarhizium</i> tại một số tỉnh ĐBSCL và 7 mẫu <i>Metarhizium</i> thế giới.....	124
4.22	Hiệu lực gây chết của các mẫu phân lập <i>Metarhizium</i> đối với thành trùng SKL trong điều kiện phòng thí nghiệm, năm 2011.....	125
4.23	Hiệu lực gây chết của các mật số bào tử nấm xanh (<i>Ma</i>) đối với thành trùng sùng khoai lang trong điều kiện phòng thí nghiệm, năm 2012.....	128
4.24	Độ hữu hiệu (%) của các nồng độ bào tử nấm xanh (<i>Ma</i>) đối với thành trùng SKL ở điều kiện nhiệt độ 25°C trong phòng thí nghiệm, năm 2012.....	129
4.25	Khả năng ký sinh của nấm xanh (<i>Ma</i>) đối với sùng khoai lang qua các hình thức xử lý khác nhau trong điều kiện phòng thí nghiệm	132
4.26	Tỉ lệ chết (%) của thành trùng SKL qua sự lây lan bệnh trong quần thể từ sùng đực sau khi tiếp xúc với pheromone giới tính và nấm xanh (<i>Ma</i>) trong điều kiện phòng thí nghiệm, năm 2012.....	135
4.27	Ảnh hưởng của pheromone giới tính và nấm xanh lên số lượng sùng con và thời gian sống của sùng bố mẹ trong điều kiện phòng thí nghiệm, năm 2013.....	138
4.28	Số lượng sùng con thoát ra từ các cặp sùng bố mẹ theo thời gian trong điều kiện phòng thí nghiệm, năm 2013.....	139
4.29	Tỉ lệ củ khoai Tím Nhật bị sùng gây hại ở 3 thời điểm sau khi trồng tại xã Thành Đông, huyện Bình Tân, tỉnh Vĩnh Long, năm 2011.....	141
4.30	Số lượng SKL vào bẫy pheromone trên ruộng khoai Trắng Sừa tại xã An Thạnh Tây, huyện Cù Lao Dung, tỉnh Sóc Trăng, năm 2011	142
4.31	Tỉ lệ củ khoai bị sùng gây hại trên giống khoai Trắng Sừa tại thời	

	điểm 2 tháng và 2,5 tháng tại xã An Thạnh Tây, huyện Cù Lao Dung, tỉnh Sóc Trăng.....	143
4.32	Tỉ lệ gây hại của sùng khoai lang trên củ khoai thu từ ruộng thí nghiệm.....	146
4.33	Số lượng sùng đực vào bẫy pheromone giới tính trên các ruộng khoai lang thí nghiệm sau thu hoạch tại huyện Cù Lao Dung, tỉnh Sóc Trăng, 2013.....	147
4.34	Số lượng sùng khoai lang vào bẫy pheromone tại các ruộng khoai lang mới canh tác thuộc huyện Duyên Hải, tỉnh Trà Vinh.....	148
4.35	Số lượng sùng khoai lang vào bẫy pheromone tại các ruộng khoai lang canh tác lâu năm thuộc huyện Duyên Hải, tỉnh Trà Vinh.....	149
4.36	Tỉ lệ củ bị gây hại do sùng khoai lang trên ruộng khoai lang mới canh tác tại huyện Duyên Hải, tỉnh Trà Vinh.....	150
4.37	Tỉ lệ củ bị gây hại do sùng khoai lang ở ruộng khoai lang canh tác lâu năm tại huyện Duyên Hải, tỉnh Trà Vinh.....	152
4.38	Số lượng sùng khoai lang vào bẫy ở các khu vực của ruộng đặt bẫy pheromone kết hợp với nấm xanh tại huyện Tri Tôn, An Giang.....	153
4.39	Tỉ lệ củ bị hại do SKL ở khu vực ngoại vi trên các ruộng khoai lang Trắng Sữa tại huyện Tri Tôn, tỉnh An Giang.....	155
4.40	Tỉ lệ củ bị hại do SKL gây ra ở khu vực trung tâm trên các ruộng khoai lang Trắng Sữa tại huyện Tri Tôn, tỉnh An Giang.....	156

DANH SÁCH HÌNH

Hình	Tên Hình	Trang
2.1	Thành trùng sùng khoai lang (A) và đặc điểm râu đầu của thành trùng đực (B) và cái (C)	7
2.2	Các giai đoạn phát triển của sùng khoai lang.....	8
2.3	Ấu trùng <i>Cylas formicarius</i>	9
2.4	Sự gây hại của sùng khoai lang trên dây (A, B) và củ (C)	12
2.5	Con đường tổng hợp hợp chất (Z)-3-dodecenyl-(E)-2-butenolate, pheromone giới tính của SKL theo Heath <i>et al.</i> , (1986).....	14
2.6	Con đường tổng hợp hợp chất (Z)-3-dodecenyl-(E)-2-butenolate, pheromone giới tính của sùng khoai lang theo Lo <i>et al.</i> , (1992).....	15
2.7	Con đường tổng hợp hợp chất (Z)-3-dodecenyl-(E)-2-butenolate, pheromone giới tính của SKL theo Sureda <i>et al.</i> , (2006).....	16
2.8	Con đường tổng hợp hợp chất (Z)-3-dodecenyl-(E)-2-butenolate, pheromone giới tính của SKL theo Mithran và Subbaraman (1999)	17
2.9	Con đường tổng hợp hợp chất (Z)-3-dodecenyl-(E)-2-butenolate, pheromone giới tính của SKL theo Nguyen Cong Hao <i>et al.</i> , (1996)	18
2.10	Cơ quan sinh bào tử nấm <i>Metarhizium anisopliae</i>	26
3.1	Bẫy pheromone dạng bẫy dính được đặt trên ruộng khoai lang.....	34
3.2	Bẫy pheromone dạng bẫy nước đặt trên ruộng khoai lang.....	35
3.3	Các dạng nấm xanh: đĩa nấm nguồn (A), chế phẩm sản xuất tại PTN (B) và chế phẩm nấm xanh sản xuất tại nông hộ (C)	35
3.4	Sơ đồ vị trí các điểm điều tra cố định trên ruộng khoai lang, các ô vuông là điểm điều tra cố định ghi nhận côn trùng và thiên địch	37
3.5	Cách tiến hành kỹ thuật sắc ký lớp mỏng	39
3.6	Cách ghi nhận khoảng cách di chuyển của mẫu và dung môi.....	39
3.7	Các bước điều chế môi pheromone giới tính tổng hợp.....	42
3.8	Kiểu tuýp môi sử dụng trong thí nghiệm.....	44
3.9	Bẫy màu xanh và bẫy màu vàng đặt trên ruộng khoai lang.....	45
3.10	Vị trí các điểm thu củ khoai lang trên ruộng thí nghiệm.....	49
3.11	Củ khoai sau khi rửa sạch kiểm tra sùng gây hại bên ngoài vỏ và bên trong củ khoai lang Tím Nhật	50
3.12	Công đoạn chuẩn bị gel agarose thực hiện phản ứng PCR.....	53
3.13	Công đoạn ly trích DNA của các mẫu phân lập nấm thu thập.....	54
3.14	Chu trình nhiệt của nấm <i>Metarhizium</i> với primer ITS ₁ và ITS ₄	55
3.15	Thí nghiệm xử lý nấm <i>Metarhizium</i> trên thành trùng SKL trong điều kiện phòng thí nghiệm, năm 2011	57

3.16	Khảo sát khả năng ký sinh của nấm xanh qua hai hình thức rải và phun nấm đối với quần thể SKL trong các hộp nhựa lớn.....	59
3.17	Bẫy pheromone giới tính hấp dẫn SKL và lây nhiễm nấm xanh (<i>Ma</i>)	60
4.1	Tỉ lệ (%) các loại giống khoai lang tại địa bàn điều tra	67
4.2	Tỉ lệ (%) sâu hại phổ biến trên ruộng khoai tại khu vực điều tra	72
4.3	Tỉ lệ (%) bệnh hại phổ biến trên ruộng khoai tại địa bàn điều tra ...	73
4.4	Quy trình tổng hợp hợp chất (<i>Z</i>)-3-dodecenyl (<i>E</i>)-2-butenolate, pheromone giới tính của sùng khoai lang	80
4.5	Phân tích GC-MS của hợp chất Z3-12:E2 tổng hợp.....	84
4.6	Các bước điều chế mỗi pheromone giới tính tổng hợp của sùng khoai lang.....	86
4.7	Diễn biến mật số quần thể SKL tại 4 xã Đông Bình, Thành Lợi, Tân Quới, Tân Hưng, tỉnh Vĩnh Long từ 05/8/2009 đến 03/9/2010	93
4.8	Diễn biến mật số quần thể SKL tại xã Đông Bình, huyện Bình Minh, tỉnh Vĩnh Long, từ ngày 05/8/2009 đến ngày 03/9/2010	94
4.9	Diễn biến mật số quần thể sùng khoai lang tại huyện Bình Tân, tỉnh Vĩnh Long, từ ngày 05/8/2009 đến ngày 03/9/2010.....	95
4.10	Diễn biến mật số SKL trên 2 ruộng thí nghiệm ở vụ 1.....	98
4.11	Diễn biến mật số SKL trên 2 ruộng thí nghiệm ở vụ 2.....	99
4.12	Số lượng sùng đực vào bẫy trong 3 đêm khảo sát tại 5 ruộng trên địa bàn thí nghiệm ở vụ 1 tại xã Thành Đông, huyện Bình Tân.....	107
4.13	Sơ đồ vị trí 5 ruộng khoai khảo sát đặt bẫy pheromone trong 3 đêm sau khi thu hoạch ở vụ 1 tại xã Thành Đông, huyện Bình Tân.....	108
4.14	Sùng đực vào bẫy pheromone trong 3 đêm sau khi thu hoạch các ruộng khoai thí nghiệm ở vụ 1 tại xã Thành Đông, huyện Bình Tân, Vĩnh Long, 2010.....	109
4.15	Nấm <i>Metarhizium</i> ký sinh một số côn trùng gây hại cây trồng.....	113
4.16	Khuẩn lạc các MPL <i>Metarhizium</i> phát triển trên môi trường PDA...	115
4.17	Khuẩn lạc các MPL <i>Metarhizium</i> phát triển trên môi trường PDA (tt)	116
4.18	Cấu trúc hình dạng cành bào đài của chi nấm <i>Metarhizium</i>	117
4.19	Hình dạng bào tử (trái) và cấu trúc cành bào đài (phải) của các MPL <i>Metarhizium</i> chụp qua KHV điện tử	118
4.20	Hình dạng bào tử (trái) và cấu trúc cành bào đài (phải) của các MPL <i>Metarhizium</i> chụp qua KHV điện tử (tt).....	119
4.21	Hình dạng bào tử (trái) và cấu trúc cành bào đài (phải) của các MPL <i>Metarhizium</i> chụp qua KHV điện tử (tt).....	120
4.22	Sản phẩm PCR khuếch đại vùng ITS-rDNA của các MPL <i>Metarhizium</i> , sử dụng hai primer ITS ₁ và ITS ₄	121

4.23	Sơ đồ phân nhóm loài của 7 MPL <i>Metarhizium</i> nghiên cứu (*) so với các mẫu nấm <i>Metarhizium</i> trên thế giới dựa trên trình tự vùng ITS-rDNA	123
4.24	Các MPL nấm <i>Metarhizium</i> ký sinh gây chết thành trùng SKL trong điều kiện phòng thí nghiệm, năm 2011	126
4.25	Kết quả xử lý nấm <i>Metarhizium</i> trên thành trùng SKL trong điều kiện phòng thí nghiệm, năm 2011	127
4.26	Sùng khoai lang bị nhiễm nấm xanh (<i>Ma</i>) qua các hình thức xử lý	133
4.27	Diễn biến mật số sùng khoai lang trên ruộng thí nghiệm tại huyện Bình Tân, tỉnh Vĩnh Long	140
4.28	Diễn biến số lượng SKL vào bẫy pheromone giới tính trên ruộng khoai lang tại huyện Cù Lao Dung, tỉnh Sóc Trăng, 2013	144
4.29	Diễn biến số lượng sùng khoai lang vào bẫy tại các ruộng khoai lang mới canh tác thuộc huyện Duyên Hải, tỉnh Trà Vinh	148
4.30	Diễn biến số lượng sùng khoai lang vào bẫy tại các ruộng khoai lang canh tác lâu năm thuộc huyện Duyên Hải, tỉnh Trà Vinh.....	150
4.31	Diễn biến mật số sùng vào bẫy ở ruộng khảo sát tại huyện Tri Tôn	154

DANH SÁCH TỪ VIẾT TẮT

Từ viết tắt	Diễn giải từ viết tắt
BNK	Bột nấm khô
DNA	Deoxyribonucleic acid
DDN	Dung dịch nấm
DNT	Dạng nấm tươi
ĐBSCL	Đồng bằng sông Cửu Long
ĐC	Đối chứng
GC-MS	Gas chromatography–mass spectrometry
HPLC	High-performance liquid chromatography
NMR	Nuclear magnetic resonance
NSKC	Ngày sau khi chủng
NSKT	Ngày sau khi trồng
NSKXL	Ngày sau khi xử lý
NT	Nghiệm thức
PTN	Phòng thí nghiệm
PTSH	Phòng trừ sinh học
SKL	Sùng khoai lang
SKT	Sau khi trồng

Chương 1

GIỚI THIỆU

1.1 Tính cấp thiết của luận án

Tại Việt Nam, khoai lang được trồng khắp nơi từ đồng bằng đến cao nguyên, là cây trồng chiến lược giúp phát triển kinh tế (Dương Minh, 1999). Tại ĐBSCL, diện tích trồng khoai lang ngày càng phát triển, diện tích khoai lang ở ĐBSCL là 23.000 ha đạt sản lượng 556.900 tấn, riêng huyện Bình Tân, tỉnh Vĩnh Long trở thành vùng trồng khoai lang lớn nhất, với diện tích năm 2010 (5.673,7 ha) đến năm 2014 (10.671,6 ha), sản lượng năm 2010 (166.016 tấn) đến năm 2014 (307.602 tấn) (Niên giám thống kê tỉnh Vĩnh Long năm 2014). Trong quá trình canh tác khoai lang đã làm cho các loài côn trùng phát triển và gây hại trên khoai lang tăng mạnh (Nguyễn Văn Đĩnh, 2005).

Sùng khoai lang (SKL) (Coleoptera: Curculionidae) là đối tượng gây hại quan trọng trên khoai lang ở khắp các nơi trồng khoai lang trên thế giới (Hwang and Hung, 1991; Capinera, 1998), đặc biệt nghiêm trọng ở các vùng nhiệt đới và cận nhiệt đới (Chalfant *et al.*, 1990). Sự gây hại của sùng có thể xảy ra ở tất cả các mùa trồng khoai trong năm (Bourke, 1985). Ở ĐBSCL, SKL xác định là 1 loài duy nhất có tên khoa học *Cylas formicarius* Fabricius (Nguyễn Văn Huỳnh và Lê Thị Sen, 2011). Sùng gây hại chủ yếu ở giai đoạn ấu trùng, ảnh hưởng chất lượng củ khoai còn tạo điều kiện cho mầm bệnh trong đất tấn công củ (Capinera, 1998; Nguyễn Đức Khiêm, 2006). Sự gây hại có thể làm giảm từ 35-95% năng suất củ (Anonymous, 1978), không chỉ gây hại ở ngoài đồng mà còn gây hại trong thời gian bảo quản củ khoai (Nguyễn Văn Đĩnh, 2005).

Để phòng trị SKL, cho đến nay, giải pháp áp dụng thuốc trừ sâu hóa học vẫn là lựa chọn ưu tiên. Do SKL chủ yếu gây hại trong củ dưới mặt đất, để đạt hiệu quả cao nông dân phải sử dụng lượng lớn thuốc trừ sâu hóa học. Kết quả điều tra tại huyện Bình Tân, Vĩnh Long cho thấy nông dân thường áp dụng phun ngừa định kỳ 7 ngày/lần, trung bình 18 lần thuốc trừ sâu/vụ khoai (Lê Thị Thanh Hiền và *ctv.*, 2014). Điều này làm gia tăng chi phí sản xuất đồng thời ảnh hưởng tiêu cực đến sức khỏe con người và môi trường (Marcano *et al.*, 1999). Để hạn chế lượng thuốc trừ sâu sử dụng nhằm giảm chi phí, ảnh hưởng đến sức khỏe con người và môi trường, đồng thời đảm bảo hiệu quả phòng trị. Cần nghiên cứu và áp dụng các biện pháp sinh học an toàn và thân thiện với môi trường để quản lý sự gây hại của SKL theo hướng hạn chế hoặc thay thế dần việc áp dụng thuốc trừ sâu hóa học độc hại là hết sức cần thiết.

Pheromone giới tính là loại hóa chất tín hiệu được côn trùng tiết ra để hấp dẫn sự bắt cặp của cá thể khác giới cùng loài. Là loại hóa chất sinh thái có

nguồn gốc tự nhiên, tính chuyên biệt cao và hoạt động ở hàm lượng rất thấp, áp dụng pheromone giới tính để quản lý côn trùng gây hại cây trồng xem là giải pháp không độc hại, bền vững, an toàn (Witzgall *et al.*, 2010), là công cụ hữu hiệu của chiến lược quản lý dịch hại tổng hợp (IPM) (Cardé and Minks, 1995; Wakamura, 1992). Hàng năm, ước tính có hàng chục triệu mỗi pheromone được sản xuất để ứng dụng cho việc khảo sát diễn biến mật số quần thể và bẫy tập hợp trên diện tích hơn 10 triệu hecta, hơn 1 triệu hecta được áp dụng kỹ thuật quấy rối sự bắt cặp và bẫy tập hợp (Witzgall *et al.*, 2010).

Pheromone giới tính của SKL do sùng cái tiết ra đã xác định là hợp chất (Z)-3-dodecenyl-(E)-2-butenolate (Z3-12:E2) (Heath *et al.*, 1986). Áp dụng pheromone giới tính tổng hợp quản lý sự gây hại của SKL cho hiệu quả cao tại các nước như Đài Loan (Hwang and Hung, 1991), Nhật Bản (Yasuda, 1995), Ấn Độ (Pillai *et al.*, 1993) và Indonesia (Braun and Van de Fliert, 1999). Tại ĐBSCL, pheromone giới tính của 11 loài côn trùng bộ cánh vẩy và 1 loài bộ cánh cứng đã nghiên cứu ứng dụng (Lê Văn Vàng, 2016). Theo Nguyễn Văn Đĩnh (2005), pheromone giới tính có tác dụng hấp dẫn mạnh sùng đực và phát huy hiệu quả tốt ở bán kính dưới 100 mét.

Những năm gần đây, nấm ký sinh côn trùng đã phát triển ở nhiều nước trên thế giới, xem như tác nhân phòng trừ sinh học côn trùng với hơn 100 sản phẩm đã được thương mại hóa dưới dạng thuốc trừ sâu vi nấm vào năm 2006 (Jaronski, 2010). Nấm trắng *Beauveria bassiana* đã xác định ký sinh trên SKL *C. formicarius* ở các giai đoạn thành trùng, ấu trùng và nhộng (Jansson 1992; Lagnaoui *et al.*, 2000). Nấm *B. bassiana* đã áp dụng phòng trừ SKL cho hiệu quả cao (Su, 1991; Jansson, 1992; Yasuda, 1999). Ngoài ra, nấm xanh *Metarhizium anisopliae* đã xác định ký sinh trên SKL *C. formicarius* (Ames *et al.*, 1997; Phạm Thị Thùy, 2004). Tuy nhiên, hiệu quả của nấm xanh phòng trừ SKL thì ít được nghiên cứu. Hiện nay, tại ĐBSCL, quy trình sản xuất nấm xanh đã thiết lập. Chế phẩm nấm xanh đã có hiệu quả phòng trừ cao đối với một số loài côn trùng, nhất là với rầy nâu hại lúa và có thể thay thế dần việc sử dụng thuốc trừ sâu hóa học (Trần Văn Hai và *ctv.*, 2006 và 2009). Việc nghiên cứu ứng dụng kết hợp pheromone giới tính và nấm xanh để quản lý SKL ở ngoài đồng là giải pháp an toàn cho con người và môi trường sinh thái cần được thực hiện.

Trên cơ sở đó, đề tài “Nghiên cứu pheromone giới tính và nấm ký sinh trong phòng trừ sùng khoai lang (*Cylas formicarius* Fabricius) tại Đồng bằng sông Cửu Long” được thực hiện nhằm giới thiệu biện pháp mới an toàn, thân thiện với môi trường để quản lý sự gây hại của SKL ở ngoài đồng phù hợp với vùng ĐBSCL, góp phần giảm thiểu hoặc thay thế dần thuốc trừ sâu hóa học.

1.2 Mục tiêu nghiên cứu

- Nghiên cứu xây dựng qui trình tổng hợp và điều chế môi pheromone giới tính của SKL theo hướng đơn giản, rẽ tiền, hiệu suất cao, phù hợp với điều kiện phòng thí nghiệm.

- Xác định loài nấm ký sinh có hiệu lực phòng trị SKL cao trong điều kiện phòng thí nghiệm.

- Đánh giá hiệu quả phòng trị của pheromone giới tính tổng hợp và nấm ký sinh đối với SKL ở điều kiện phòng thí nghiệm và ngoài đồng.

1.3 Nội dung nghiên cứu

- Điều tra tình hình canh tác khoai lang và khảo sát côn trùng gây hại và thiên địch trên ruộng khoai lang tại huyện Bình Tân, tỉnh Vĩnh Long.

- Nghiên cứu về pheromone giới tính tổng hợp của sùng khoai lang.

- Nghiên cứu về nấm ký sinh trên sùng khoai lang trong phòng thí nghiệm.

- Khảo sát ứng dụng kết hợp pheromone giới tính tổng hợp và nấm xanh (*Metarhizium anisopliae*) đối với sùng khoai lang.

1.4 Đối tượng và phạm vi nghiên cứu

* *Đối tượng nghiên cứu*

Sùng khoai lang (*C. formicarius*), khoai lang giống Tím Nhật, Trắng sữa.

* *Phạm vi nghiên cứu*

Thực hiện các thí nghiệm trong PTN tại Bộ môn Bảo vệ Thực vật, Khoa Nông nghiệp và Sinh học ứng dụng, Đại học Cần Thơ. Các thí nghiệm ngoài đồng tại một số ruộng khoai của nông dân tại huyện Bình Tân và Bình Minh (Vĩnh Long), Cù Lao Dung (Sóc Trăng), Duyên Hải (Trà Vinh), Tri Tôn (An Giang).

Thời gian nghiên cứu của luận án: từ năm 2010 đến năm 2014.

1.5 Giới hạn của nghiên cứu

- *Về pheromone giới tính:* Chỉ sử dụng pheromone giới tính tổng hợp được tại phòng thí nghiệm Phòng trừ Sinh học thuộc Bộ môn Bảo vệ Thực vật, Khoa Nông nghiệp và Sinh học ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ.

- *Về nấm ký sinh:* Sử dụng các chủng nấm xanh thu thập trên một số ký chủ côn trùng tại vùng ĐBSCL được phân lập trong phòng thí nghiệm.

- *Về đánh giá hiệu quả pheromone giới tính ngoài đồng:* chủ yếu dựa vào diễn biến mật số sùng đục vào bẫy và tỉ lệ thiệt hại củ do sùng gây hại, không có xác định hiệu quả kinh tế do nhiều yếu tố chi phối.

1.6 Những điểm mới của luận án

- Đề tài là công trình nghiên cứu đầu tiên về quy trình tổng hợp, điều chế và áp dụng pheromone giới tính để phòng trị SKL theo hướng đơn giản, rẽ tiền, có hiệu quả cao, phù hợp với điều kiện ĐBSCL, tạo ra sản phẩm có độ tinh khiết cao, các hóa chất sử dụng tổng hợp khá an toàn so với các quy trình trước đây.

- Ứng dụng sinh học phân tử để xác định loài nấm xanh *M. anisopliae* ký sinh trên côn trùng ngoài tự nhiên dựa theo giải trình tự vùng ITS-rDNA so với các mẫu phân lập *Metarhizium* trên thế giới từ cơ sở dữ liệu của ngân hàng gen.

- Khảo sát và đánh giá hiệu quả của pheromone giới tính tổng hợp và nấm xanh trong quản lý sự gây hại của SKL tại vùng ĐBSCL theo hướng an toàn nhằm giảm thiểu hoặc thay thế dần việc sử dụng thuốc trừ sâu hóa học.

1.7 Ý nghĩa khoa học và thực tiễn của luận án

* Ý nghĩa khoa học

- Con đường tổng hợp thông qua phản ứng Wittig sử dụng các hợp chất ban đầu ít độc hại, điều kiện phản ứng đơn giản, dễ thực hiện với chất phản ứng rẽ tiền, có sẵn trên thị trường. Thay đổi chất phản ứng để chọn lọc cấu hình Z (*cis*) của nối đôi trong phân tử, đây là điểm mấu chốt quan trọng của quy trình tổng hợp tạo nên sự khác biệt so với các quy trình trước đây.

- Kiểu tuýp môi làm bằng ống cao su non là vật liệu nền có tác dụng lưu giữ và phóng thích pheromone giới tính tổng hợp từ từ cho hiệu quả cao hấp dẫn sùng đực và không làm ảnh hưởng đến chất lượng của pheromone giới tính ở ngoài đồng.

- Việc tìm ra kiểu tuýp môi được sản xuất ở Việt Nam (ống cao su non) rẽ tiền để thay thế cho kiểu tuýp cao su (Aldrich, Đức) làm môi pheromone là tín hiệu rất tốt, đã mở ra triển vọng lớn cho việc áp dụng hóa chất tín hiệu để quản lý các loài côn trùng gây hại ở Việt Nam.

- Từ kết quả định danh theo phương pháp truyền thống dựa vào đặc điểm hình thái học của nấm và kết quả xác định loài nấm dựa vào trình tự vùng ITS-rDNA đã phân loại 7 MPL *Metarhizium* nghiên cứu cùng 1 nhóm với loài nấm *M. anisopliae*, đã khẳng định kết quả phân loại truyền thống là chính xác. Đây cũng là cơ sở khoa học để kết luận loài nấm *M. anisopliae* phân bố rộng rãi tại một số tỉnh vùng ĐBSCL.

- Vai trò của nấm xanh là tác nhân phòng trừ sinh học rất có ý nghĩa, có thể gây chết côn trùng theo tiêu chí an toàn thay thế dần cho thuốc trừ sâu hóa học, có khả năng lây nhiễm bệnh giữa các cá thể trong cùng quần thể.

** Ý nghĩa thực tiễn*

- Quy trình tổng hợp, điều chế mỗi pheromone giới tính của SKL theo hướng đơn giản, giá thành rẻ, ít tốn chi phí hóa chất, thời gian, độ tinh khiết cao đạt trên 99%, hiệu suất khá cao, góp phần làm giảm giá thành sản xuất mỗi pheromone giới tính phù hợp với điều kiện PTN.

- Với cùng khối lượng pheromone/tuýp mỗi như nhau, giá thành tuýp mỗi phụ thuộc vào vật liệu làm tuýp mỗi. Nếu chọn vật liệu rẻ tiền có sẵn phù hợp sẽ làm giảm giá thành tuýp mỗi một cách đáng kể và có hiệu quả kinh tế.

- Mỗi pheromone (ống cao su non) rẻ tiền hơn rất nhiều, nông dân dễ chấp nhận sử dụng rộng rãi và có hiệu quả kinh tế hơn. Từ đó cho thấy rõ hơn tính ưu việt của sản phẩm mỗi pheromone giới tính của SKL.

- Các mẫu phân lập nấm *Metarhizium* đều cho hiệu quả diệt sùng cao và tương đương nhau, có hiệu lực cao đạt trên 96% sau 5 ngày xử lý.

- Nấm xanh dạng nấm tươi có khả năng ký sinh gây chết SKL cao và nhanh hơn so với dạng bột khô, tỉ lệ sùng chết gia tăng nhanh và đạt 100%, cho thấy dạng nấm tươi có hoạt lực sinh học cao hơn so với dạng bột khô.

- Sử dụng pheromone giới tính hấp dẫn sùng đực vào bẫy kết hợp nấm xanh lây nhiễm với dạng nấm tươi cho hiệu quả gây chết SKL cao.

- Sùng đực chỉ đơn thuần tiếp xúc với pheromone giới tính tổng hợp có thời gian sống của sùng bố mẹ ngắn hơn và số lượng sùng con sinh ra ít hơn so với bình thường. Đây cũng là lợi thế của pheromone giới tính giúp làm giảm thể hệ sùng con sinh ra. Nếu như xét trên quần thể lớn, mật số sùng đông thì sự sụt giảm thể hệ con sinh ra rất có ý nghĩa làm giảm bớt quần thể sùng trong tự nhiên.

- Nấm xanh có thể lan truyền thông qua sự tiếp xúc giữa các cá thể và sự lây nhiễm bằng cách thông qua sự hấp dẫn của mỗi pheromone giới tính và tiếp xúc với nấm xanh đều ảnh hưởng làm giảm thời gian sống của sùng bố mẹ rất nhiều và sự nhiễm bệnh cũng ảnh hưởng tới sức khỏe và khả năng sinh sản của sùng bố mẹ, có thể là nguyên nhân chính dẫn đến sụt giảm số lượng sùng con sinh ra. Cho thấy vai trò của nấm xanh ký sinh gây bệnh côn trùng và là tác nhân phòng trừ sinh học hiệu quả.

- Kết quả nghiên cứu của luận án là cơ sở khuyến cáo nông dân canh tác khoai lang có thể ứng dụng pheromone giới tính tổng hợp và nấm xanh phòng trị SKL ở ngoài đồng theo hướng an toàn nhằm giảm thiểu hoặc thay thế dần việc sử dụng thuốc trừ sâu hóa học theo chương trình IPM.

Chương 2

TỔNG QUAN TÀI LIỆU

2.1. Đặc điểm của sùng khoai lang, *Cylas formicarius* Fabricius

Sùng khoai lang có tên khoa học là *Cylas formicarius* Fabricius, được mô tả bởi Fabricius năm 1789 (Zimmerman, 1994). Theo Nguyễn Viết Tùng (2006), Sorensen (2009) và Nguyễn Thị Thu Cúc (2010), *Cylas formicarius* Fabricius được phân loại thuộc bộ Coleoptera (Cánh cứng); họ Curculionidae (Họ Vòi voi); giống *Cylas*, loài *formicarius*.

2.1.1. Phân bố và ký chủ

Theo Ames *et al.*, (1997) có 3 loài thuộc chi *Cylas* gây hại trên cây khoai lang và chúng thường được gọi là sùng khoai lang. Ba loài côn trùng này là *Cylas formicarius*, *Cylas puncticollis* và *Cylas brunneus*. Trong đó, loài *C. puncticollis* và *C. brunneus* đã được tìm thấy ở Châu Phi, còn loài *C. formicarius* hiện diện ở Châu Á và một phần thuộc Caribbean. Trong đó, loài *C. puncticollis* dễ phân biệt nhất vì cơ thể chỉ toàn màu đen và kích thước lớn hơn so với hai loài kia, còn loài *C. formicarius* thì phần bụng có màu đen hơi xanh và phần ngực có màu nâu đỏ, cơ thể thành trùng *C. puncticollis* thì nhỏ và có màu sắc không đồng nhất. Loài *C. formicarius* có vùng phân bố rất rộng, phát hiện tại nhiều nước ở Châu Á, đặc biệt là vùng Đông Nam Á và nhiều nước thuộc Châu Phi, Châu Mỹ, Châu Âu, Châu Á, Châu Đại Dương và một số vùng Caribbean thuộc Châu Mỹ (Chalfant *et al.*, 1990; Nguyễn Đức Khiêm, 2006; Nguyễn Văn Huỳnh và Lê Thị Sen, 2011).

Tại Việt Nam, SKL xuất hiện và gây hại quan trọng ở hầu hết các vùng trồng khoai lang trên cả nước, chúng thường xuyên gây hại nặng ở những vùng đất đai thường xảy ra khô hạn, nứt nẻ (Hà Quang Hùng, 2005). Ở nước ta, SKL chỉ có một loài duy nhất là *Cylas formicarius* Fabricius (Nguyễn Đức Khiêm, 2006). Tại vùng ĐBSCL, Nguyễn Văn Huỳnh và Lê Thị Sen (2011), cũng xác định SKL hiện diện và gây hại trên khoai lang có tên khoa học là *Cylas formicarius* Fabricius. Ngoài ra, theo Wolfe (1991) và Jansson (1992) khẳng định loài *Cylas formicarius* Fabricius và loài *Cylas formicarius elegantulus* Summers là cùng 1 loài SKL.

Theo Sorensen (2009), loài *C. formicarius* có hơn 30 loài ký chủ hoang dại đã được ghi nhận và hầu hết các loài này thuộc chi *Ipomoea*. Ký chủ chủ

yếu của loài *C. formicarius* là khoai lang *Ipomoea batatas* (Chalfant *et al.*, 1990; Jansson, 1991; Austin *et al.*, 1991). Theo Nguyễn Văn Huỳnh và Lê Thị Sen (2011), đã xác định loài *Cylas formicarius* gây hại chủ yếu trên khoai lang *Ipomoea batatas* Lam. Tuy nhiên, loài này cũng được ghi nhận phá hại trên một số loài cây thuộc họ Bìm bìm (Convolvulaceae) (Sutherland, 1986) như rau muống *Ipomoea aquatica* (Nguyễn Đức Khiêm, 2006) và cỏ *Ipomoea* spp. (Mai Thạch Hoàn, 2001).

2.1.2. Đặc điểm hình thái, sinh học, sinh thái học của sùng khoai lang

2.1.2.1. Thành trùng sùng khoai lang

Cơ thể thành trùng SKL dài từ 5-8 mm, mình thon dài, chân dài, nhìn giống như kiến, đầu có màu đen, miệng dài, mắt kép hình bán cầu hơi lồi ra hai bên đầu và râu đầu gồm 10 đốt. Phần ngực, đốt cuối râu và mắt sùng thường có màu đỏ, phần bụng và cánh có màu xanh đen bóng. Đốt cuối râu của thành trùng sùng đực có hình ống dài, trong khi đó thành trùng sùng cái thì có hình trứng (Hình 2.1). Ngực trước có chiều dài gấp đôi chiều rộng, đốt đuôi nở to. Thành trùng sùng ít khi bay và chủ yếu di chuyển bằng cách bò vào thời điểm chiều mát và ban đêm. Lúc mới vũ hoá, thành trùng sùng có màu trắng và ở bên trong củ khoai lang từ 2-3 ngày, cho đến khi cánh đủ cứng và cơ thể đủ mạnh thì sùng mới chui ra bên ngoài. Đến khoảng 6-8 ngày sau khi vũ hoá, thành trùng bắt đầu bắt cặp và sau 2-3 ngày thì đẻ trứng. Thành trùng sống khoảng 100 ngày và đẻ khoảng 200 trứng (Nguyễn Văn Huỳnh và Lê Thị Sen, 2011).



Hình 2.1: Thành trùng sùng khoai lang (A) và đặc điểm râu đầu của thành trùng đực (B) và cái (C)
(Huỳnh Thị Ngọc Linh, 2010)

Khi được cung cấp đầy đủ thức ăn, thành trùng SKL có thể sống hơn 200 ngày ở 15⁰C hoặc 3 tháng ở 30⁰C trong điều kiện phòng thí nghiệm. Thời gian các giai đoạn phát triển của SKL ở điều kiện nhiệt độ 25⁰C và 30⁰C là 46 ngày và 31 ngày. Nhộng vũ hóa thành trưởng thành rải rác trong ngày. Lúc mới vũ hóa, cơ thể sùng có màu trắng sữa và rất mềm yếu, chúng nằm yên trong đường đục. Sau 3-5 ngày cơ thể sùng cứng dần và có màu sắc đặc trưng, lúc này sùng bắt đầu chui ra bên ngoài để hoạt động (Capinera, 1998).

2.1.2.2. Trứng sùng khoai lang

Thành trùng cái có thể đẻ từ 2-4 trứng trong một ngày hoặc từ 75-90 trứng trong suốt thời gian sống 30 ngày. Thành trùng cái đẻ trứng rải rác trong các lỗ đục nhỏ trên củ khoai lang. Sau khi đẻ trứng xong, sùng lấp lỗ đục lại bằng phân nên trứng rất khó bị phát hiện. Trứng được đẻ ở gần gốc dây khoai lang hoặc thành trùng lặn theo kẽ nứt dưới đất chui xuống đẻ trứng trên củ khoai lang. Trứng nhỏ, bóng, hình bầu dục, chiều dài từ 0,5-0,7 mm (Hình 2.2). Giai đoạn ủ trứng từ 5-6 ngày vào mùa Hè và từ 11-12 ngày vào mùa Đông. Trong điều kiện phòng thí nghiệm, thành trùng cái có thể đẻ từ 50-250 trứng, trung bình là 122 trứng (Capinera, 1998). Lúc mới đẻ, trứng có màu trắng sữa, lúc sắp nở trứng có màu vàng và thời gian ủ trứng từ 5-10 ngày (Nguyễn Văn Huỳnh và Lê Thị Sen, 2011). Trên bề mặt trứng có nhiều chấm lốm nhỏ (Nguyễn Đức Khiêm, 2006).



Hình 2.2: Các giai đoạn phát triển của sùng khoai lang
(A: Trứng, B: ấu trùng và C: nhộng)
(Huỳnh Thị Ngọc Linh, 2010)

2.1.2.3. Ấu trùng sùng khoai lang

Ấu trùng có dạng hình ống dài, hai đầu thon nhỏ. Đầu có màu nâu, thân có màu trắng, không chân, phần bụng chia đốt rõ ràng với chiều dài cơ thể từ 5-8,5 mm (Hình 2.3). Ấu trùng có 5 tuổi, phát triển từ 15-25 ngày (Nguyễn

Văn Huỳnh và Lê Thị Sen, 2011). Nhiệt độ là nhân tố chủ yếu ảnh hưởng đến tốc độ phát triển của ấu trùng. Ở điều kiện nhiệt độ là 30⁰C và 24⁰C thì sự phát triển của ấu trùng diễn ra tương ứng khoảng 10 ngày và 35 ngày (Capinera, 1998). Nếu trứng được đẻ trên dây khoai lang thì sau khi nở, ấu trùng đục vào trong dây và phá hại, làm dây khoai tại vị trí đục bị dị dạng, phình to, chúng ăn chất dinh dưỡng và thải phân ngay trong đó, thời gian sống của ấu trùng có thể kéo dài từ 37-50 ngày (Nguyễn Đức Khiêm, 2006).



Hình 2.3: Ấu trùng *Cylas formicarius* (Ames et al., 1997)

2.1.2.4. Nhộng sùng khoai lang

Nhộng dài trung bình là 6,5 mm, lúc đầu cơ thể nhộng có màu trắng sữa, sau chuyển dần sang màu xám với mắt và chân đen hơn (Capinera, 1998). Vòi cúi gập về phía mặt bụng. Ở mút bụng có một đôi gai lồi, hơi cong (Hình 2.3). Thời gian nhộng phát triển tới vũ hóa từ 4-10 ngày (Nguyễn Văn Huỳnh và Lê Thị Sen, 2011).

2.1.2.5. Đặc điểm sinh thái học của sùng khoai lang

Kết quả nghiên cứu ở nước ta và một số nước thuộc Đông Nam Á cho thấy tình hình phát sinh và phát triển của sùng cũng như khả năng hoạt động của thành trùng có mối liên quan chặt chẽ với điều kiện khí hậu thời tiết, đất đai và chế độ canh tác. Thời tiết khô và nóng là điều kiện thích hợp cho sùng phát triển mạnh (Nguyễn Văn Huỳnh và Lê Thị Sen, 2011). Bên cạnh đó, điều kiện đất đai khô hạn rất thuận lợi cho sùng hoạt động. Thời tiết khô hạn làm cho đất nứt nẻ, thành trùng có thể tìm đến các củ khoai để đẻ trứng một cách dễ dàng. Ngoài ra, vết nứt trên củ được tạo ra trong quá trình phát triển cũng làm tăng sự miễn cảm đối với sùng (Teli and Salunkhe, 1993; Hà Quang Hùng, 2005).

Nếu nhiệt độ xuống thấp khoảng từ 10-15⁰C thì sùng vẫn nằm yên trong đường đục. Sùng hoạt động mạnh nhất ở nhiệt độ khoảng 30⁰C. Những ngày

mưa, sùng thường ngưng hoạt động và khi thời tiết nắng nóng chúng có thể bay một quãng ngắn. Sùng di chuyển chủ yếu bằng hình thức bò, nhiệt độ càng cao sùng bò càng nhanh và nhiều hơn (Nguyễn Đức Khiêm, 2006).

Thành trùng có thể đẻ trứng ở nhiệt độ từ 10-27⁰C (Singh *et al.*, 2001) và chúng phát triển ở nhiệt độ từ 19,2-39,1⁰C (Mullen, 1981; Sutherland, 1986; Chiranjeevi *et al.*, 2003). Nhiệt độ tối ưu cho sự phát triển của sùng là từ 27-30⁰C (Sutherland, 1986), tốt nhất là 27⁰C (Mullen, 1981). Thời gian các giai đoạn phát triển của sùng ở điều kiện nhiệt độ 25⁰C và 30⁰C lần lượt là 46 ngày và 31 ngày (Nguyễn Đức Khiêm, 2006).

2.1.3. Tập quán sinh sống và cách gây hại của sùng khoai lang

Tất cả các giai đoạn sinh trưởng của SKL đều sinh sống trên ký chủ, cả ấu trùng và thành trùng đều gây hại trên củ và dây khoai. Thiệt hại chủ yếu là do ấu trùng sinh trưởng, phát triển bên trong củ khoai và gây thiệt hại tới năng suất củ, có thể thiệt hại lên đến 90% năng suất (Sutherland, 1986).

Nhộng vũ hóa rải rác trong ngày, sau khi vũ hóa từ 6-8 ngày, sùng bước vào thời kỳ bắt cặp và sau 2-3 ngày mới bắt đầu đẻ trứng. Nhiều ấu trùng có thể cùng sống trong một củ khoai, các ấu trùng này không di chuyển sang củ khác trong suốt giai đoạn phát triển. Nhộng được hình thành ngay bên trong đường đục của củ khoai lang (Nguyễn Văn Huỳnh và Lê Thị Sen, 2011).

Thành trùng cũng có hành vi giả chết như nhiều loài bọ cánh cứng khác (Nguyễn Đức Khiêm, 2006). Sự giả chết của thành trùng chịu ảnh hưởng bởi việc thiếu thức ăn. Khi thành trùng SKL không bị đói, tỉ lệ giả chết cao hơn đáng kể so với sùng bị đói ở cả hai giới tính đực và cái. Tuy nhiên, để giảm tỉ lệ giả chết, thành trùng cái cần có giai đoạn thiếu ăn dài hơn con đực. Điều này là do sự khác nhau về khả năng chịu đựng với sự thiếu thức ăn, thành trùng đực sẽ chết sớm hơn so với con cái khi bị đói (Miyatake, 2001).

Thành trùng SKL có xu tính yếu đối với ánh sáng mặt trời, ban ngày chúng thường lẫn trốn các tia nắng trực xạ (Nguyễn Đức Khiêm, 2006). Hoạt động bay và di chuyển của sùng có liên quan đến tuổi của thành trùng, giới tính và sự thiếu thức ăn. Thành trùng đực có khả năng bay cao hơn nhiều so với con cái trong tất cả các độ tuổi từ 1-42 ngày sau khi thoát ra ngoài khỏi củ khoai. Sự di chuyển của thành trùng đực cũng cao hơn nhiều so với con cái từ 1-28 ngày tuổi, nhưng hoạt động bay thì không khác nhau nhiều. Thành trùng cái di chuyển chủ yếu dưới dạng bò vì khả năng bay của chúng cực kỳ thấp (Moriya and Hiroyoshi, 1998).

Sau khi thu hoạch, sùng có thể tiếp tục sinh sống trên tàn dư của cây khoai (thân, củ) ở vụ trước sẽ là nơi cư trú để sùng có thể tiếp tục sinh sống và trở thành nguồn lưu tồn và lây lan cho vụ sau. Chính vì vậy, những ruộng trồng khoai liên tục nhiều năm thường bị sùng gây hại nặng hơn (Talekar, 1983), trong khi đó trên đất mới được trồng khoai vụ đầu, thường bị sùng gây thiệt hại củ ít hơn (Nguyễn Đức Khiêm, 2006).

Khoảng cách phân tán của sùng ở điều kiện ngoài đồng khi không có trồng khoai lang là lớn hơn so với các vùng trồng khoai lang. Khoảng cách di chuyển lớn nhất của sùng ở nơi có trồng khoai lang là 500 m, trong khi đó tại nơi không trồng khoai lang lại lên đến 1.000 m (Miyatake *et al.*, 1995). Sau khi thu hoạch, ấu trùng vẫn tiếp tục tấn công củ khoai tồn trữ do nở từ trứng đã có sẵn trong củ khoai hoặc đôi khi do thành trùng tấn công trong vựa khoai. Ngoài ra, việc sử dụng các hom khoai trồng trên các ruộng bị sùng gây hại vụ trước cũng là nơi có thể lây lan sang vụ sau (Nguyễn Văn Huỳnh và Lê Thị Sen, 2011).

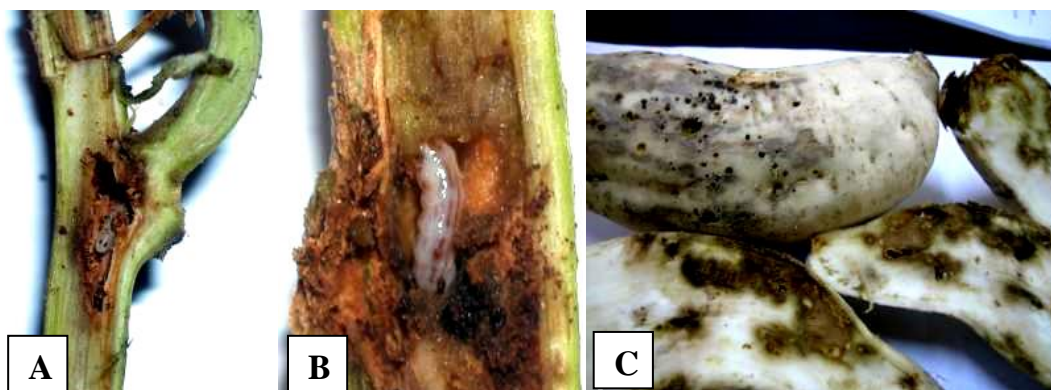
2.1.4. Triệu chứng gây hại của sùng khoai lang

Theo Capinera (1998), có trên 90% ấu trùng được tìm thấy bên trong củ khoai lang. Ở ngoài đồng, sự phân bố của sùng thường theo mùa vụ là chủ yếu. Vào đầu vụ khoai lang, ấu trùng thường được tìm thấy trong thân dây khoai, nhưng đến cuối vụ thì hầu như tìm thấy ấu trùng trong củ khoai. Thành trùng thường hiện diện ở mặt dưới lá, ăn biểu bì thân, lá và bề mặt củ khoai lang tạo nên những lỗ thủng tròn nhỏ. Ấu trùng lớn lên đục thẳng vào bên trong củ tạo thành những đường hầm ngoằn ngoèo (Nguyễn Đức Khiêm, 2006).

Thành trùng có thể ăn gặm phần thân hoặc lá khoai lang non nhưng thích nhất là củ khoai, vì vậy những củ nhô khỏi mặt đất hay lộ qua kẽ đất nứt rất dễ bị thành trùng tấn công. Các vết đẻ trứng của thành trùng sẽ là nơi xâm nhập của nấm và vi khuẩn tiếp theo làm dây khoai bị suy yếu (Nguyễn Văn Huỳnh và Lê Thị Sen, 2011). Còn ấu trùng đục vào bên trong củ thường gây hại chủ yếu trong củ khoai, đồng thời cũng gây hại rãi rác trên dây (Hình 2.4) (Sutherland, 1986). SKL gây hại làm củ sần sùi tạo thành các lỗ đục. Chúng gặm thủng củ và dây tạo thành các lỗ đục to bằng đầu tăm, đẻ trứng vào trong đó. Ấu trùng nở ra đục vào trong củ ăn phần thịt củ và thải phân trong đường đục (Nguyễn Văn Đĩnh, 2005).

Nếu bị sùng tấn công vào giai đoạn củ mới hình thành, củ sẽ không phát triển được, bị lép và giảm năng suất. Nếu bị sùng tấn công vào giai đoạn củ đã lớn, năng suất không giảm nhiều nhưng phẩm chất củ khoai giảm do phần thịt xung quanh đường đục bị chuyển sang màu tím, có mùi hôi và vị đắng

(Nguyễn Văn Huỳnh và Lê Thị Sen, 2011). Củ khoai lang bị sùng tấn công có màu xanh đen, thường bị đắng và có mùi hôi hắc khó chịu do trong quá trình đục củ, sùng đã tiết ra hợp chất terpen (Sato *et al.*, 1982), cùng với sự gia tăng các hợp chất phenolic trong củ (Padmaja and Rajamma, 1982) để phản ứng lại sự gây hại của sùng làm cho củ có vị đắng không ăn được, mặc dù hợp chất terpen thấp và mức độ hư hỏng vật chất trong củ thấp (Mai Thạch Hoàn, 2001).



Hình 2.4: Sự gây hại của sùng khoai lang trên dây (A, B) và củ (C)
(Sutherland, 1986)

2.1.5 Cách phòng trị sùng khoai lang trên đồng ruộng

Theo Nguyễn Văn Huỳnh và Lê Thị Sen (2011) để phòng trị SKL, có thể áp dụng kết hợp một số biện pháp chính sau:

- Tiêu hủy tàn dư của khoai lang sau khi thu hoạch. Nếu có điều kiện nên cho nước vào ngập ruộng từ 1-2 tuần, tàn dư của cây khoai bị thối rửa để tiêu diệt ấu trùng và nhộng SKL còn lẫn bên trong, sùng sẽ chết.

- Trước khi đưa củ khoai vào tồn trữ, bảo quản cần loại bỏ những củ đã bị nhiễm sùng để tránh lây lan sang củ khác. Trong thời gian tồn trữ, thỉnh thoảng đảo lại khoai kết hợp loại bỏ những củ mới bị nhiễm sùng.

- Trước khi trồng cần vệ sinh đồng ruộng sạch sẽ, tiếp tục thu gom dây khoai và củ khoai còn sống sót từ vụ trước đem tiêu hủy.

- Không dùng dây khoai đã nhiễm sùng làm giống cho vụ sau.

- Khi khoai tạo củ cần phải vun luống phủ kín gốc khoai, không để củ lòi ra khỏi mặt đất. Thường xuyên tưới đủ ẩm cho luống khoai để đất không bị nứt nẻ, sùng không chui xuống đẻ trứng.

- Trước khi trồng có thể xử lý hom giống bằng cách ngâm vào dung dịch chứa thuốc trừ sâu trong vòng 30 phút, sẽ giết trứng và nhộng bên trong thân, sau đó vớt hom khoai giống ra để ngoài tự nhiên cho ráo nước rồi đem trồng.

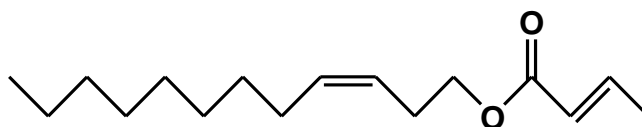
- Nếu ruộng khoai bị sùng gây hại hàng năm, nên điều khiển thời vụ sao cho thời kỳ có củ tránh rơi vào mùa khô. Khoảng một tháng sau khi trồng hoặc từ khi hình thành củ trở đi nếu phát hiện thấy thành trùng sống rải rác trên ruộng khoai lang thì có thể dùng các loại thuốc trừ sâu thông dụng phun xịt định kỳ 10 ngày/lần.

- Nếu có điều kiện thì sau vụ trồng khoai lang nên luân canh với cây trồng khác không phải là thức ăn của sùng, tốt nhất là với cây lúa để tránh tình trạng sùng lây lan sang vụ sau.

2.2 Nghiên cứu và ứng dụng pheromone giới tính của sùng khoai lang

2.2.1 Cấu trúc hóa học pheromone giới tính của sùng khoai lang

Sử dụng các kỹ thuật thu thập các chất bay hơi do thành trùng cái tiết ra bằng chất hấp phụ (chromosorb 102), phân lập các chất thu được bằng sắc ký lỏng cao áp (High Performance Liquid Chromatography, HPLC), trắc nghiệm sinh học đối với các thành phần phân lập và sau cùng là xác định cấu trúc hóa học của thành phần tác động bằng sắc ký khí khối phổ (Gas Chromatography-Mass Spectrometry, GC-MS) và cộng hưởng từ hạt nhân (Nuclear Magnetic Resonance, NMR), theo Heath *et al.*, (1986) đã xác định pheromone giới tính của SKL là hợp chất (Z)-3-dodecenyl-(E)-2-butenolate có cấu trúc hóa học sau:



(Z)-3-dodecenyl-(E)-2-butenolate

Các phân tích EAG (Electroantennogram) và sắc ký khí khối phổ (GC-MS) của mẫu pheromone giới tính ly trích và chất chuẩn tổng hợp của Sureda *et al.*, (2006) cũng cho kết quả tương tự như xác định của Heath *et al.* (1986).

2.2.2 Tổng hợp pheromone giới tính của sùng khoai lang

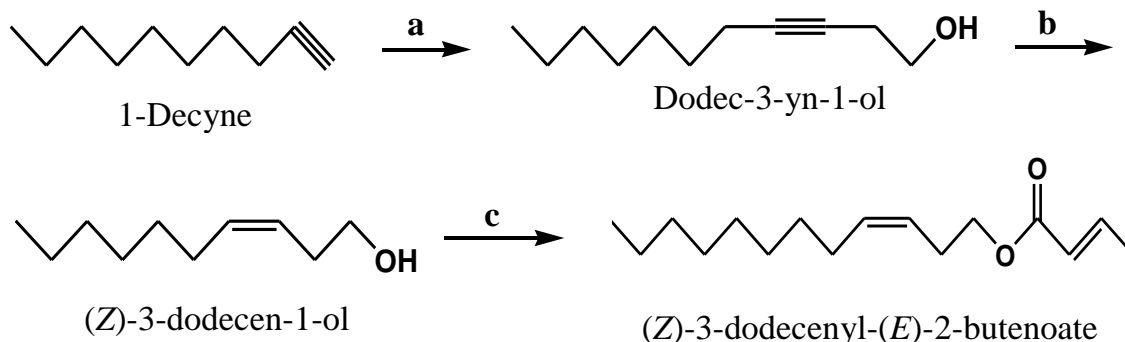
Công bố kết quả phân tích của Heath *et al.* (1986) về pheromone giới tính của sùng khoai lang là hợp chất ester (Z)-3-dodecenyl-(E)-2-butenolate, đã được tổng hợp theo nhiều con đường khác nhau. Trong đó, nhánh acid là hợp chất Crotonyl chloride (Acid chloride), còn nhánh rượu là hợp chất (Z)-3-dodecen-1-ol (Z3-12:OH). Do Crotonyl chloride là hợp chất đã được thương mại hóa, nên hầu hết các con đường tổng hợp tập trung xây dựng cho việc tạo thành hợp chất Z3-12:OH. Cho đến nay đã có ít nhất 4 con đường tổng hợp pheromone giới tính của SKL đã được xây dựng và tất cả đều sử dụng 1 trong 2 phản ứng then chốt, đó là phản ứng bắt cặp và phản ứng Wittig.

2.2.2.1 Tổng hợp pheromone giới tính thông qua phản ứng bắt cặp

Cho đến nay đã có ít nhất ba con đường tổng hợp thành hợp chất (Z)-3-dodeceny-(E)-2-butenolate là pheromone giới tính của SKL được xây dựng thông qua phản ứng bắt cặp như sau:

a) Con đường tổng hợp của Heath et al. (1986)

Sơ đồ trình bày ở Hình 2.5 cho thấy con đường tổng hợp thành hợp chất (Z)-3-dodeceny-(E)-2-butenolate là pheromone giới tính của SKL bởi Heath et al. (1986). Trong con đường này, chất 1-decyne và Ethylene oxide được kết hợp với nhau bằng phản ứng bắt cặp trong dung môi Tetrahydrofuran (THF) và dưới sự xúc tác của chất Hexamethylphosphoramide (HMPA) để tạo thành hợp chất Dodec-3-yn-1-ol. Khử nối ba của hợp chất Dodec-3-yn-1-ol bằng phản ứng khử Lindlar thu được hợp chất (Z)-3-dodecen-1-ol. Tiếp theo sau là sự este hóa giữa hợp chất (Z)-3-dodecen-1-ol và Crotonyl chloride sẽ tạo thành hợp chất (Z)-3-dodeceny-(E)-2-butenolate là pheromone giới tính tổng hợp.



Hình 2.5 Con đường tổng hợp hợp chất (Z)-3-dodeceny-(E)-2-butenolate, pheromone giới tính của sùng khoai lang theo Heath et al. (1986)

a) Butyllithium/Ethylene oxide/HMPA/THF

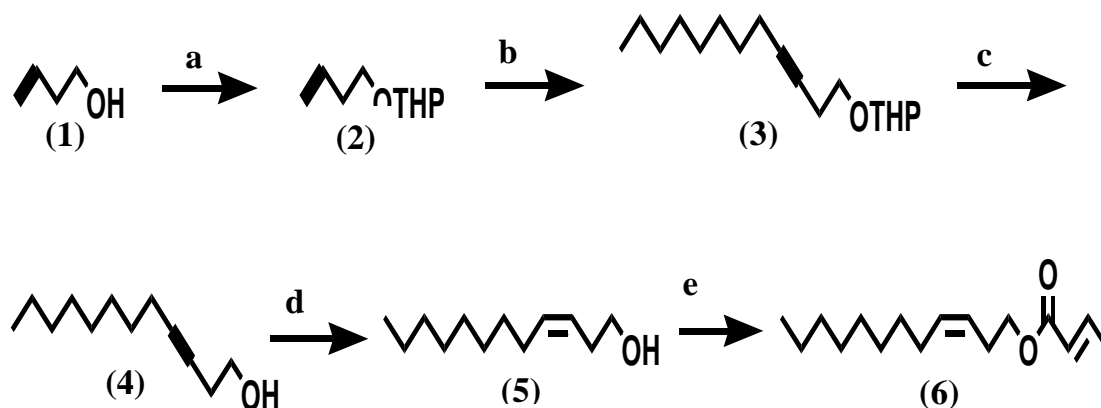
b) Hydrogen/Lindlar catalyst/Quinoline/Hexane

c) Crotonyl chloride/Pyridine/CH₂Cl₂

b) Con đường tổng hợp của Lo et al. (1992)

Lo et al. (1992) đã xây dựng con đường tổng hợp thành hợp chất (Z)-3-dodeceny-(E)-2-butenolate thông qua phản ứng bắt cặp (Hình 2.6), nhưng các hợp chất ban đầu là But-3-yn-1-ol (1) và hợp chất 1-bromooctane. Như vậy, con đường tổng hợp này đã khắc phục được việc sử dụng hợp chất Ethylene oxide, tác nhân gây ung thư ở dạng khí (gas). Sau khi bảo vệ nhóm chức OH của hợp chất But-3-yn-1-ol (1) bằng hợp chất Tetrahydropyranyl (THP) ether (2), hợp chất (THP) ether (2) tạo thành được kết hợp với hợp chất 1-bromooctane thông qua phản ứng bắt cặp trong môi trường kiềm của NH₃ lỏng và chất Sodium amide ở nhiệt độ -50⁰C để tạo thành hợp chất 2-dodec-3-ynyloxy-tetrahydropyran (3). Loại bỏ sự bảo vệ nhóm chức OH của hợp chất (THP) ether (2) để

tạo thành hợp chất Dodec-3-yn-1-ol (4). Khử nối ba của hợp chất Dodec-3-yn-1-ol (4) bằng phản ứng Lindlar thu được hợp chất (Z)-3-dodecen-1-ol (5). Tiếp theo sau là phản ứng ester hóa giữa hợp chất (Z)-3-dodecen-1-ol (5) với Crotonyl chloride dưới sự hiện diện của chất Pyridine thu được hợp chất (Z)-3-dodeceny-(E)-2-butenolate (6) là pheromone giới tính tổng hợp.

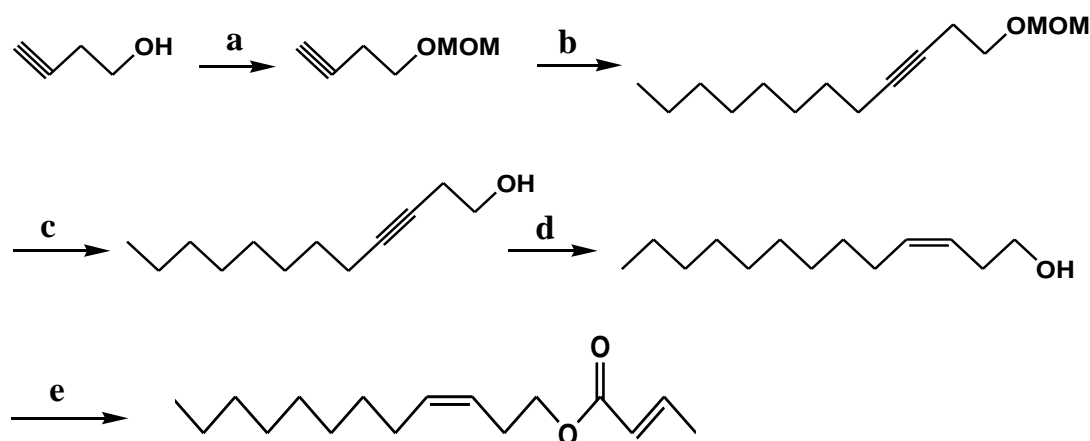


Hình 2.6: Con đường tổng hợp hợp chất (Z)-3-dodeceny-(E)-2-butenolate, pheromone giới tính của sùng khoai lang theo Lo *et al.* (1992)

- a) 3,4-dihydro-2H-pyran/HCl
- b) Liquid NH₃/Sodium amide/1-bromooctane
- c) Methanol/p-TsOH (p-Toluenesulfonic acid)
- d) Hydrogen/Lindlar catalyst/Quinoline/Hexane
- e) Crotonyl chloride/Pyridine/CH₂Cl₂

c) Con đường tổng hợp của Sureda *et al.* (2006)

Sureda *et al.* (2006) đã xây dựng con đường tổng hợp thành hợp chất (Z)-3-dodeceny-(E)-2-butenolate tương tự cách tổng hợp của Lo *et al.* (1992) với các hợp chất ban đầu là But-3-yn-1-ol và hợp chất 1-bromooctane (Hình 2.7). Điểm khác biệt giữa con đường tổng hợp của Sureda *et al.* (2006) và Lo *et al.* (1992) là con đường tổng hợp của Sureda *et al.* (2006) thì nhóm chức OH được bảo vệ bằng hợp chất Methoxymethyl (MOM) ether và phản ứng bắt cặp được tạo môi trường kiềm là hợp chất Lithium diisopropylamide (LDA) ($[(CH_3)_2CH]_2NLi$) với chất xúc tác là 1,3-dimethyl-3,4,5,6-tetrahydro -2-(1H)-pyrimidinone (DMPU) để tạo thành hợp chất Dodec-3-yn-1-ol. Các phản ứng khử nối ba của hợp chất Dodec-3-yn-1-ol bằng phản ứng Lindlar catalyst thu được hợp chất (Z)-3-dodecen-1-ol và phản ứng ester hóa với Crotonyl chloride dưới sự hiện diện của chất Pyridine để tạo thành hợp chất (Z)-3-dodeceny-(E)-2-butenolate là pheromone tổng hợp được thực hiện tương tự như con đường tổng hợp của Heath *et al.* (1986) và Lo *et al.* (1992).



Hình 2.7: Con đường tổng hợp hợp chất (Z)-3-dodeceny-(E)-2-butenol, pheromone giới tính của sùng khoai lang theo Sureda *et al.* (2006)

- a) DMM/LiBr/*p*-TsOH
- b) LAD/BrC₈/DMPU/THF
- c) HCl 12M/MeOH (CH₃OH)
- d) Hydrogen/Lindlar catalyst /Quinoline/Hexane
- e) Crotonyl chloride/Pyridine/CH₂Cl₂

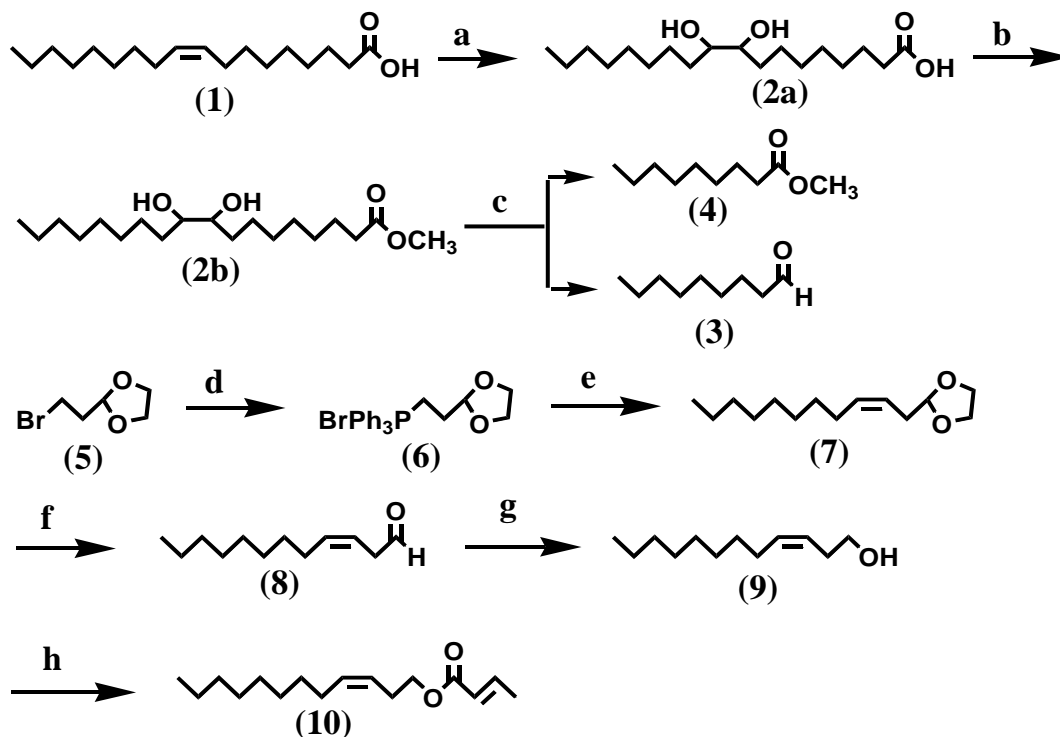
2.2.2.2 Tổng hợp pheromone giới tính thông qua phản ứng Wittig

Con đường tổng hợp thành hợp chất (Z)-3-dodeceny-(E)-2-butenol là pheromone giới tính tổng hợp của SKL được thực hiện thông qua phản ứng Wittig, có ít nhất 2 con đường tổng hợp như sau:

a) Con đường tổng hợp của Mithran và Subbaraman (1999)

Hình 2.8 cho thấy con đường tổng hợp thành hợp chất (Z)-3-dodeceny-(E)-2-butenol là pheromone giới tính tổng hợp được thực hiện thông qua phản ứng Wittig theo Mithran và Subbaraman (1999).

Từ hợp chất ban đầu là một Acid (**1**) được Di-hydroxylate để tạo thành một Diol acid (**2a**). Phản ứng este hóa hợp chất (**2a**) để thu được hợp chất (**2b**). Phân cắt nhóm chức Diol của hợp chất (**2b**) bằng NaIO₄ thu được hỗn hợp gồm hợp chất 1-nonanal (**3**) và hợp chất (**4**). Loại bỏ hợp chất (**4**) bằng sự chưng cất, sau đó hợp chất 1-nonanal (**3**) được kết hợp với muối Phosphonium của hợp chất Bromoacetal (**6**) bằng phản ứng Wittig để thu được hợp chất Olefinic acetal (**7**). Loại bỏ sự bảo vệ nhóm chức của hợp chất (**7**) để thu được hợp chất (Z)-3-dodecenal (**8**), rồi khử nhóm chức Formyl (-CHO) bằng NaBH₄ để tạo thành hợp chất (Z)-3-dodecen-1-ol (**9**). Tiếp theo là phản ứng este hóa giữa hợp chất (Z)-3-dodecen-1-ol (**9**) và Crotonyl chloride dưới sự hiện diện của chất Pyridine để tạo thành hợp chất (Z)-3-dodeceny-(E)-2-butenol (**10**) là pheromone giới tính tổng hợp được thực hiện tương tự như con đường của Heath *et al.* (1986).



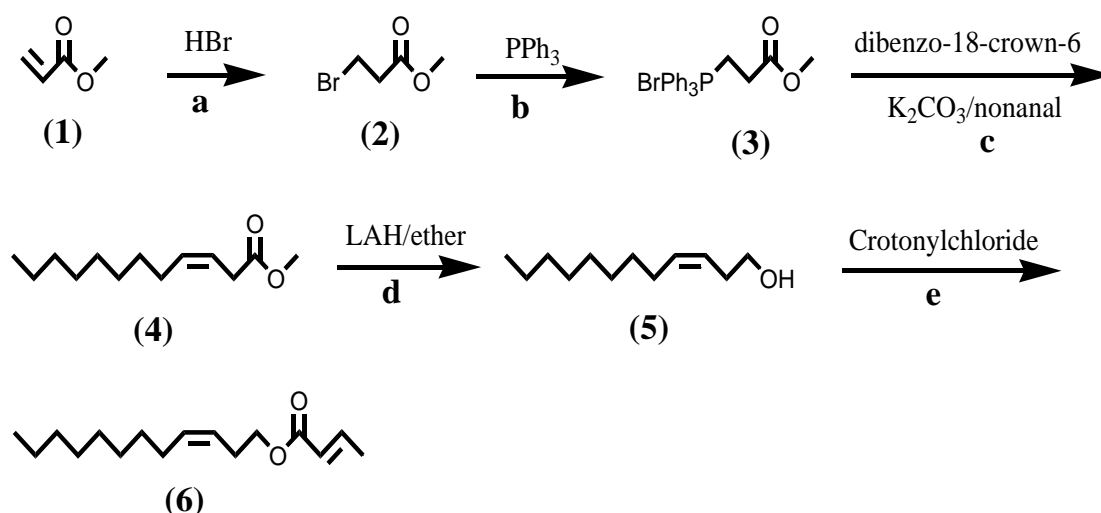
Hình 2.8: Con đường tổng hợp hợp chất (Z)-3-dodeceny-(E)-2-butenate, pheromone giới tính của SKL theo Mithran và Subbaraman (1999)

- a) $\text{HCO}_2\text{H}/\text{KOH}$; b) MeOH/H^+
 c) $\text{NAIO}_4/\text{CH}_3\text{CN}-\text{H}_2\text{O}$
 d) $\text{PPh}_3/\text{CH}_3\text{CN}$; e) Dimethyl ion/ LiAlH_4
 f) $\text{THF}/\text{HOAc}/\text{H}_2\text{O}$; g) $\text{NaBH}_4/\text{MeOH}$
 h) Crotonyl chloride/Pyridine/ CH_2Cl_2

b) Con đường tổng hợp của Nguyen Cong Hao et al. (1996)

Nguyen Cong Hao *et al.* (1996) xây dựng con đường tổng hợp thành hợp chất (Z)-3-dodeceny-(E)-2-butenate thông qua phản ứng Wittig (Hình 2.9).

Trong đó, nhóm chức Alkene của hợp chất Methylacrylate (1) được Brom hóa (HBr) để tạo thành hợp chất Methyl 3-bromopropionate (2), rồi chuyển thành muối của Triphenylphosphonium bằng cách kết hợp với hợp chất Triphenylphosphine (3). Sau đó, hợp chất (3) được kết hợp với hợp chất 1-nonanal trong môi trường của K_2CO_3 và Dibenzo-18-crown-6 để tạo thành hợp chất Methyl (Z)-3-dodecenoate (4). Khử nhóm chức este của hợp chất (4) bằng hợp chất Lithium aluminium hydride (LAH) trong ether thu được hợp chất (Z)-3-dodecen-1-ol (5). Sau đó este hóa giữa hợp chất (Z)-3-dodecen-1-ol (5) và Crotonyl chloride dưới sự hiện diện của chất Pyridine để tạo thành hợp chất (Z)-3-dodeceny-(E)-2-butenate (6) là pheromone giới tính tổng hợp được thực hiện tương tự con đường tổng hợp của Heath *et al.* (1986) (Hình 2.5).



Hình 2.9: Con đường tổng hợp hợp chất (*Z*)-3-dodeceny-(*E*)-2-butenate, pheromone giới tính của SKL theo Nguyen Cong Hao *et al.* (1996)

- a) Brom hóa (HBr); b) Triphenylphosphine (PPh₃)
 c) Dibenzo-18-crown-6/K₂CO₃/nonanal
 d) Lithium aliminium hydride (LAH)/ether
 e) Crotonyl chloride/Pyridine/CH₂Cl₂

2.2.3 Một số kết quả nghiên cứu về pheromone giới tính của sùng khoai lang trên thế giới

Pheromone giới tính của SKL đã được Heath *et al.* (1986) xác định chỉ gồm một thành phần duy nhất là hợp chất (*Z*)-3-dodeceny-(*E*)-2-butenate do thành trùng cái tiết ra để thu hút thành trùng đực và đã được tổng hợp thành công bằng con đường tổng hợp thông qua phản ứng bắt cặp từ hợp chất ban đầu là Ethylene oxide. Sau đó, Mithran và Subbaraman (1999) đã tổng hợp thành công hợp chất (*Z*)-3-dodeceny-(*E*)-2-butenate từ hợp chất ban đầu là Oleic acid với con đường tổng hợp thông qua phản ứng Wittig gồm 8 bước.

Mason và Jansson (1991) cho rằng pheromone giới tính của SKL đã được sử dụng ngoài đồng bằng ba ứng dụng bao gồm (1) theo dõi sự biến động mật số quần thể SKL bằng bẫy pheromone hấp dẫn sùng đực; (2) bẫy tập hợp với việc sử dụng số lượng lớn bẫy pheromone để làm giảm mật số SKL; (3) quấy rối sự bắt cặp với việc sử dụng số lượng lớn pheromone làm tràn ngập một vùng không gian để ngăn cản, quấy rối sự gặp gỡ và bắt cặp giữa hai giới tính đực và cái của thành trùng SKL. Bẫy pheromone cho thấy có triển vọng trong việc khảo sát mật số quần thể thành trùng SKL ở ngoài đồng.

Tại miền Nam Florida, Jansson *et al.* (1989) đã tiến hành nghiên cứu xác định tiềm năng của pheromone giới tính tổng hợp trong việc hấp dẫn sùng đực để theo dõi biến động mật số quần thể SKL *C. formicarius*. Công cụ để xác

định mật số sùng đực là bẫy nhựa dạng hình phễu với mỗi là 10 μg pheromone giới tính tổng hợp được đặt trên những ruộng khác nhau trồng cùng một giống khoai lang trắng *Ipomoea batatas* L. với tên thương mại là Picardo. Số lượng sùng đực bắt được từ 2-5.785 con/bẫy/đêm. Trên các cánh đồng mọc hoang, số lượng sùng đực bắt được trung bình từ 27- 4.413 con/bẫy/đêm, cho thấy sự hiện diện đông đúc của quần thể SKL tại những cánh đồng hoang dại. Bẫy nhựa hình phễu bắt được sùng đực nhiều hơn đáng kể so với dạng bẫy hình quả nang có mái che hình nón (tổng số sùng đực bắt dính vào bẫy từ 90-97% so với 3-10%).

Ngoài ra, Proshold *et al.* (1986) đã nghiên cứu bẫy pheromone để theo dõi sự biến động quần thể SKL bằng cách sử dụng pheromone giới tính tổng hợp hoặc dùng môi là thành trùng cái vừa vũ hóa, chưa bắt cặp cũng được khảo sát ngoài đồng. Kết quả cho thấy số lượng sùng đực bắt được vào bẫy pheromone tổng hợp nhiều hơn so với bẫy dùng môi là thành trùng cái chưa bắt cặp. Bên cạnh đó, nếu đặt bẫy dùng môi là 1 hoặc 3 thành trùng cái thì bắt dính nhiều sùng đực hơn so với các bẫy đèn.

Trong khi đó, nếu đặt bẫy với môi là pheromone giới tính tổng hợp bắt dính sùng đực cả ngày lẫn đêm, còn bẫy đèn và bẫy với môi là thành trùng cái chỉ bắt dính sùng đực vào ban đêm. Một nghiên cứu khác cho thấy khi đặt bẫy pheromone giới tính ngoài đồng với cửa bẫy ngang tán lá khoai lang với môi chứa 10 μg pheromone cho hiệu quả bắt dính sùng đực nhiều hơn so với khi cửa bẫy ở vị trí cao hơn hoặc thấp hơn tán lá khoai. Số lượng sùng đực bắt dính vào bẫy hàng tuần cũng biến động theo đường cong hàm số mũ liên tục trong 22 tuần kể từ sau khi trồng (Proshold *et al.*, 1986).

Pheromone giới tính chứng tỏ được tiềm năng to lớn thông qua ứng dụng quấy rối sự bắt cặp và bẫy tập hợp (Capinera, 1998). Mason và Jansson (1991) đã tiến hành kiểm tra hiệu quả của ứng dụng quấy rối sự bắt cặp đối với SKL *Cylas formicarius* trên giống khoai trắng sữa (Picardo). Kết quả ghi nhận số lượng sùng đực vào bẫy với mỗi 1 μg pheromone giới tính tổng hợp tại nghiệm thức đặt bẫy pheromone (12 môi với 100 μg pheromone) là thấp hơn so với tại nghiệm thức không sử dụng pheromone tổng hợp. Tuy nhiên, hiệu quả ứng dụng pheromone quấy rối sự bắt cặp lên việc làm giảm tỉ lệ bắt cặp của sùng cái với sùng đực và làm giảm mật số sùng *C. formmicarius* và giảm thiệt hại trên củ do sùng khi thu hoạch tại các ruộng có đặt bẫy pheromone tổng hợp thì không xác định được (Mason and Jansson, 1991).

Nghiên cứu khác của nhóm tác giả Downham *et al.* (2001) đã tiến hành thử nghiệm phòng trừ SKL loài *C. brunneus* và *C. puncticollis* ngoài đồng bằng ứng dụng quấy rối sự bắt cặp của thành trùng SKL tại Uganda. Kết quả khảo sát ghi nhận tại nghiệm thức không áp dụng pheromone giới tính thì mỗi chu kỳ hai đêm bắt dính khoảng 30 thành trùng SKL vào bẫy, nghiệm thức áp dụng pheromone quấy rối sự bắt cặp thì bẫy pheromone không bắt dính được thành trùng SKL. Thí nghiệm cho thấy năng suất củ thu được ở cả hai nghiệm thức là tương đương nhau, nhưng tỉ lệ củ khoai bị sùng gây hại ở nghiệm thức có áp dụng pheromone quấy rối sự bắt cặp thì thấp hơn so với nghiệm thức không áp dụng pheromone xảy ra cả 4 lần trong tổng số 5 lần lấy chỉ tiêu tỉ lệ củ khoai bị sùng gây hại (Downham *et al.*, 2001).

Bên cạnh đó, pheromone giới tính tổng hợp được dùng làm bẫy để quấy rối và bẫy tập hợp cũng chứng tỏ được tiềm năng to lớn trong quản lý quần thể SKL (*C. formicarius*) tại Đài Loan (Hwang and Hung, 1991; Hwang, 2000), Ấn Độ (Pillai *et al.*, 1993), Nhật Bản (Yasuda, 1995).

Pheromone giới tính của SKL *C. formicarius* còn được nghiên cứu ở điều kiện ngoài đồng (Heath *et al.*, 1991; Jansson *et al.*, 1991). Jansson *et al.* (1991) cho rằng cá thể sùng đực rất nhạy cảm đối với pheromone giới tính do con cái tiết ra, chỉ cần một hàm lượng nhỏ pheromone có thể bắt dính được số lượng lớn sùng đực trong 1 đêm. Số lượng sùng đực bắt dính càng nhiều khi hàm lượng pheromone giới tính sử dụng càng cao (Jansson *et al.*, 1991; Yasuda *et al.*, 1992). Khi khảo sát các hàm lượng pheromone giới tính thì số lượng sùng đực bắt dính tăng, nhưng không đáng kể (Jansson *et al.*, 1992).

Thời gian bảo quản môi pheromone giới tính trong điều kiện lạnh không ảnh hưởng đến hiệu quả hấp dẫn của tuýp cao su chứa hợp chất pheromone (môi). Tuýp cao su có chứa 10 μg pheromone giới tính tổng hợp được đặt trong lọ kín không khí bảo quản trong tủ lạnh ở điều kiện $5\pm 1^{\circ}\text{C}$ kéo dài tới 22 năm cho hiệu quả hấp dẫn sùng đực cũng tương tự như tuýp cao su (môi) được bảo quản trong cùng điều kiện lạnh chỉ với 90 ngày (Jansson *et al.*, 1993).

Mặt khác, dạng bẫy pheromone dùng để đặt ngoài đồng hấp dẫn sùng khoai lang đã được nghiên cứu. Jansson *et al.* (1992) đã xác định bẫy nhựa có dạng phễu và bẫy kiểu Unitrap (theo dõi và bắt các loài côn trùng biết bay) bắt dính sùng đực nhiều hơn so với kiểu bẫy hình quả nang có mái che hình nón. Đối với 2 dạng bẫy đầu, số lượng sùng đực bắt dính cao trên 60 sùng/bẫy/đêm. Bẫy nhựa dạng phễu có ảnh hưởng hấp dẫn đáng kể so với bẫy Unitrap trong

việc bắt dính sùng đục đã được đánh dấu và phóng thích ra ngoài tự nhiên để hấp dẫn vào bẫy trở lại (tương ứng là 72,8% so với 58%).

Khi so sánh màu sắc bẫy cho thấy sùng ưa thích màu đỏ hơn màu xám, nâu, xanh dương, trắng, vàng, đen; ánh sáng đỏ thì hấp dẫn sùng nhiều hơn so với bẫy màu đỏ. Khi đặt bẫy pheromone ở độ cao 50 cm trên tán lá sẽ bắt dính sùng đục nhiều hơn. Bẫy Unitrap màu đỏ nhạy với mọi pheromone giới tính bắt dính sùng đục nhiều hơn so với bẫy không có môi pheromone, kết quả này cho thấy sùng đục bị ảnh hưởng cả tín hiệu thị giác và khứu giác. Bẫy unitrap màu đỏ nhạy có kích cỡ 13x17,5 cm đặt ở độ cao 50 cm trên tán lá khoai lang cho hiệu quả bắt dính sùng đục cao nhất và có tiềm năng rất lớn sử dụng đặt bẫy pheromone phòng trị SKL (Reddy *et al.*, 2012).

Ngoài ra, kết quả khảo sát đánh giá hiệu quả hấp dẫn của 10 loại bẫy pheromone giới tính để kiểm soát SKL *C. formicarius* của Jackson và Bohac thực hiện tại miền Nam Carolina từ năm 2001-2002 cho thấy loại bẫy chứa nước hỗn hợp với một ít xà phòng đạt hiệu quả cao hơn so với các loại bẫy khác (Jackson and Bohac, 2007). Theo Smit *et al.* (2001) bẫy nước dạng chai tròn cho hiệu quả bắt giữ 2 loài *C. puncticollis* và *C. brunneus* ở Uganda cao hơn so với bẫy dính. Nghiên cứu của Huỳnh Thị Ngọc Linh và *ctv.* (2012) cũng cho thấy bẫy nước chứa dung dịch xà phòng cho hiệu lực giết chết sùng khoai lang tốt nhất trong điều kiện ngoài đồng.

Bên cạnh đó, thời gian hấp dẫn của môi pheromone giới tính tổng hợp của SKL và các yếu tố ảnh hưởng đến nó cũng đã được khảo sát. Heath (1992) đã đánh giá thời gian hấp dẫn của môi pheromone trên ruộng khoai lang tại Okinawa (Nhật Bản), kết quả cho thấy một tuýp cao su (môi) với lượng 1 mg pheromone giới tính tổng hợp cho thời gian hấp dẫn sùng đục kéo dài hơn một tháng. Tuy nhiên, kết quả nghiên cứu của Hwang (2000) cho rằng với lượng 1 mg pheromone giới tính tổng hợp được bơm vào trong một ống nhựa PE (polyethylene) nhỏ cho hiệu quả hấp dẫn sùng đục vào bẫy kéo dài hơn 2 tháng.

Một công thức mới đã được phát triển để làm tăng thời gian phát huy tác dụng của môi pheromone trong việc quản lý SKL trong điều kiện tự nhiên. Công thức đó là sự kết hợp giữa pheromone giới tính là hợp chất (Z)-3-dodecenyl(E)-2-butenoate và một loại thuốc trừ sâu (MEP) được tẩm vào một viên bi tròn màu xanh (đường kính 2 mm) được làm từ đất có nhiều tảo cát. Sùng đục bị hấp dẫn bởi pheromone giới tính tổng hợp sẽ định vị và cố gắng bắt cặp với viên bi tròn này. Vì thế, chúng bị tác động hiệu quả do tiếp xúc với thuốc trừ sâu khá lâu. Công thức này có giá thành áp dụng rất thấp so với công

thức bình thường (liều lượng khuyến cáo sử dụng), do đó chi phí áp dụng theo công thức này sẽ thấp hơn (Yasuda *et al.*, 2004).

Braun và Van De Fliert (1999) đánh giá hiệu lực của bẫy pheromone giới tính tổng hợp đối với SKL và các loại sâu, bệnh khác ở điều kiện ngoài đồng tại Indonesia từ năm 1994-1996 cho thấy sự gây hại của sùng và các loại sâu bệnh khác làm giảm năng suất khoai lang từ 3,3-2,5 kg/m². Về năng suất thực tế thì sự gây hại của SKL và các loại sâu bệnh khác cao hơn trong giai đoạn mùa khô. Tỷ lệ thiệt hại do sùng chiếm 8,2%, trong khi thiệt hại do các loại sâu bệnh khác chiếm 16,3%.

Trong giai đoạn mùa mưa, tỷ lệ gây hại do sùng và các loại sâu bệnh hại khác giảm xuống chỉ còn 2,1% và 12,7%. Sự khác biệt nhau giữa các giống khoai lang đối với sự gây hại của sùng và các loại sâu bệnh khác không đáng kể. Trên cả bốn khu vực bố trí thí nghiệm ngoài đồng, bẫy bắt được nhiều sùng đực có hàm lượng pheromone tổng hợp cao nhất. Việc sử dụng bẫy pheromone giới tính tổng hợp đặt ngoài đồng làm giảm sự gây hại của SKL ngay cả trường hợp sùng gây hại ở mức độ thấp. Kết quả này cho thấy bẫy pheromone giới tính tổng hợp có hiệu quả hấp dẫn cao làm giảm sự gây hại của SKL (Braun and Van De Fliert, 1999).

Một nghiên cứu khác ghi nhận khi sử dụng pheromone với số lượng 4 bẫy/1.000 m² để phòng trị SKL tại Đài Loan làm giảm thiệt hại do sùng gây ra từ 57-65% (Hwang, 2000). Đến năm 2007, Kakizaki (2007) tiếp tục khẳng định pheromone giới tính tổng hợp của SKL cũng là hợp chất (*Z*)-3-dodecenyl (*E*)-2-butenolate với mật độ sử dụng 4-25 bẫy/ha ở xung quanh ruộng khoai lang làm giảm đáng kể mật số sùng đực tại Nhật Bản và Ấn Độ.

Tại Việt Nam, kết quả thí nghiệm ngoài đồng tại tỉnh Thanh Hóa, thành phố Hà Nội, tỉnh Bắc Giang và tỉnh Hà Tây vào năm 2002 cho thấy bẫy pheromone giới tính tổng hợp có khả năng hấp dẫn SKL rất cao, số lượng sùng đực vào bẫy trung bình là 213 con/bẫy/ngày (Nguyễn Văn Đĩnh, 2005). Nghiên cứu cho thấy càng xa vị trí đặt bẫy pheromone, tỷ lệ dây gốc và củ khoai bị sùng gây hại càng tăng, tại vị trí trung tâm của ba bẫy và cách bẫy 25-50 m có tỷ lệ bị sùng gây hại thấp nhất (Nguyễn Văn Đĩnh, 2005). Từ năm 1999-2004, Đỗ Quý Hạo thí điểm sử dụng mồi pheromone giới tính tổng hợp hấp dẫn sùng đực để theo dõi trên ruộng khoai lang tại xã Mỹ Hiệp Sơn, huyện Hòn Đất, tỉnh Kiên Giang bước đầu cho hiệu quả phòng trị sùng khá cao ở ngoài đồng (<http://www.khoailangbahao.com.vn>).

2.2.4 Ứng dụng pheromone giới tính phòng trị sùng khoai lang

SKL *C. formicarius* là đối tượng gây hại khoai lang nghiêm trọng nhất trên thế giới, chúng gây ra thiệt hại ngay cả ngoài đồng và trong kho bảo quản và cũng là đối tượng kiểm dịch thực vật. Giai đoạn ấu trùng sống trong thân và củ khoai, thành trùng hoạt động nhiều về đêm, phòng trị bằng biện pháp hóa học không cho hiệu quả cao. Những nghiên cứu gần đây, khi đánh giá các thông số ảnh hưởng tới bẫy pheromone bắt dính sùng đực, bao gồm kiểu bẫy, kích cỡ, màu sắc, độ cao đặt bẫy. Trong đó, bẫy Unitrap bắt được số lượng sùng đực nhiều hơn các loại bẫy khác như bẫy Ground, bẫy Funnel water, bẫy Delta. Kích thước (cỡ bẫy) trung bình 13x17,5 cm cho hiệu quả bắt dính sùng cao hơn so với loại cỡ bẫy lớn hơn và nhỏ hơn.

Ứng dụng bẫy pheromone giới tính trong việc phòng trị SKL ngoài đồng có thể thực hiện theo nhiều cách khác nhau. Theo Mason và Jansson (1991) cho rằng bẫy pheromone giới tính của SKL được ứng dụng theo ba phương pháp như sau: (1) khảo sát diễn biến mật số quần thể sùng, (2) phòng trị bằng bẫy tập hợp và (3) phòng trị bằng quấy rối sự bắt cặp.

2.2.4.1 Khảo sát diễn biến mật số quần thể sùng khoai lang

Bẫy pheromone giới tính cho thấy triển vọng trong việc khảo sát biến động mật số quần thể SKL suốt vụ. Jansson *et al.* (1989) đã xác định tiềm năng của pheromone giới tính tổng hợp trong việc hấp dẫn sùng đực qua theo dõi diễn biến mật số quần thể SKL tại miền Nam Florida. Công cụ để xác định mật số sùng là bẫy nhựa dạng phiếu với mùi là 10 μ g pheromone đặt trên các ruộng khoai lang trắng sữa *Ipomoea batatas* L. Số lượng sùng đực bắt dính biến động rất lớn từ 2- 5.785 con/bẫy/đêm. Ở những cánh đồng hoang, số lượng sùng đực bắt được biến động từ 27-4.413 con/bẫy/đêm. Kết quả cho thấy SKL hiện diện phổ biến ngoài tự nhiên. Bẫy nhựa dạng phiếu bắt được sùng đực nhiều hơn so với bẫy dạng quả nang có mái che hình nón (tỉ lệ sùng đực bắt được từ 90-97% so với từ 3-10% tương ứng).

2.2.4.2 Phòng trị sùng khoai lang bằng tập hợp

Bẫy tập hợp là phương pháp sử dụng số lượng lớn bẫy pheromone giới tính để thu hút sùng đực làm giảm mật số sùng ngoài tự nhiên. Bẫy pheromone giới tính tập hợp đã áp dụng thành công để quản lý SKL tại Đài Loan (Hwang and Hung, 1991), Đông Phi (Parker *et al.*, 1992), Ấn Độ (Pillai *et al.*, 1993), Nhật Bản (Yasuda, 1995), Cộng Hòa Dominica (Alvarez *et al.*, 1996), Cuba (Alcazar *et al.*, 1997) và Indonesia (Braun and Van De Fliert, 1999).

Bẫy pheromone giới tính tập hợp cho hiệu quả phòng trị SKL khi thử nghiệm ngoài đồng tại Okinawa, Nhật Bản. Kết quả cho thấy các bẫy pheromone bắt được 65.214 sùng đực từ tháng 7/1989-12/1990 (Yasuda, 1995). Ruộng khoai lang có đặt bẫy pheromone giới tính tổng hợp thì tỉ lệ giới tính của quần thể sùng có khuynh hướng nghiêng về phía sùng cái và tỉ lệ bắt cặp của sùng cái cũng giảm dần. Mật số sùng giảm nhiều trên ruộng đặt bẫy, có thể do sùng đực bị tiêu diệt nhiều nên hạn chế sự bắt cặp với sùng cái. Kết quả trên cho thấy bẫy pheromone giới tính tập hợp có nhiều triển vọng trong việc phòng trị SKL ở điều kiện ngoài đồng (Yasuda, 1995).

Tại Việt Nam, thử nghiệm phòng trị SKL trên ruộng khoai lang tại huyện Hóc Môn, Thành phố Hồ Chí Minh từ năm 1994-1995, sử dụng pheromone giới tính (độ tinh khiết 96%) với các nồng độ là 10, 100, 1.000 μg được tổng hợp tại Việt Nam. Kết quả cho thấy số lượng sùng đực vào bẫy gia tăng theo nồng độ pheromone giới tính tổng hợp áp dụng (trung bình từ 124,6-541,2 con/bẫy/đêm), với mật độ 10 bẫy/ha làm giảm thiệt hại sùng là 20% (Nguyen Cong Hao *et al.*, 1996). Kết quả thí nghiệm ngoài đồng tại huyện Cù Lao Dung, tỉnh Sóc Trăng và huyện Bình Tân, tỉnh Vĩnh Long cho thấy sử dụng bẫy pheromone giới tính tổng hợp đã đem lại hiệu quả cao trong việc phòng trị SKL (Huỳnh Thị Ngọc Linh *và ctv.*, 2012). Kết quả nghiên cứu của Nguyễn Quốc Tuấn (2012) cũng cho thấy pheromone giới tính tổng hợp mang lại hiệu quả cao phòng trị SKL ở ngoài đồng tại 2 tỉnh An Giang và Trà Vinh.

2.2.4.3 Phòng trị sùng khoai lang bằng quấy rối sự bắt cặp

Áp dụng pheromone giới tính nhằm giảm bớt hoặc thay thế dần thuốc trừ sâu hóa học, trong đó ứng dụng bẫy pheromone giới tính để quấy rối sự bắt cặp đã áp dụng thành công đối với một số loài côn trùng gây hại (Aono *et al.*, 1989; Snow, 1990; Wakamura, 1992; Matsumoto *et al.*, 2007; Carter and Fraser, 2009).

Downham *et al.* (2001) đã thử nghiệm phòng trị SKL loài *C. brunneus* và *C. puncticollis* bằng ứng dụng bẫy pheromone giới tính để quấy rối sự bắt cặp tại Cộng hòa Uganda (Trung Phi). Kết quả cho thấy nghiệm thức không áp dụng bẫy pheromone để quấy rối sự bắt cặp thì bẫy pheromone bắt dính trung bình 30 sùng đực vào bẫy trong chu kỳ hai đêm, còn tại nghiệm thức áp dụng phương pháp quấy rối sự bắt cặp thì bẫy pheromone giới tính tổng hợp không bắt dính sùng đực. Năng suất củ khoai ở cả 2 nghiệm thức trên là tương đương nhau, nhưng tỉ lệ củ khoai bị sùng gây hại ở nghiệm thức có áp dụng phương pháp quấy rối sự bắt cặp thấp hơn so với nghiệm thức còn lại xảy ra ở 4 lần/tổng số 5 lần lấy chỉ tiêu thí nghiệm.

2.3 Đặc điểm của một số loài nấm ký sinh trên côn trùng

Nấm ký sinh côn trùng còn gọi là nấm gây bệnh côn trùng để chỉ những loài nấm có thể lây nhiễm bệnh lên côn trùng khỏe mạnh, gây bệnh hoặc tiêu diệt ký chủ (Samson *et al.*, 1988). Nhiều loài nấm ký sinh côn trùng được ứng dụng rộng rãi trong đấu tranh sinh học kiểm soát dịch hại, trong đó phổ biến là các loài nấm *Beauveria bassiana* và *Metarhizium anisopliae*. Ngoài ra, các loài nấm ký sinh trên nhện hại hoặc các loài chân khớp khác cũng được xếp vào nhóm nấm ký sinh côn trùng vì cách thức xâm nhập, gây bệnh làm chết ký chủ, khả năng sinh bào tử cũng tương tự nhau (Lê Tấn Hưng và *ctv.*, 2010).

Đặc điểm của nấm xanh *Metarhizium anisopliae*

Nấm xanh *Metarhizium anisopliae* thuộc ngành phụ lớp nấm bất toàn *Deuteromycetes*, giống *Metarhizium* (theo hệ thống phân loại nấm của Anisworth, 1971) (Phạm Thị Thùy, 2004).

Nấm xanh *Metarhizium anisopliae* có bào tử màu xanh lục hoặc xanh lá cây nên còn gọi là nấm lục cương. Nấm *M. anisopliae* được tìm thấy trên khắp các châu lục với hơn 200 loài côn trùng ký chủ khác nhau như rầy lá, rầy mềm, bọ xít đen và nhiều loài sâu hại rau màu (Ferron, 1978).

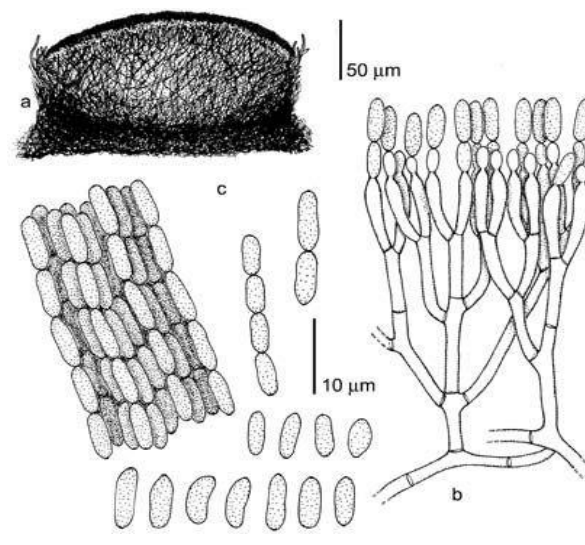
Nấm *M. anisopliae* là loại nấm ký sinh trên côn trùng hiện diện rất phổ biến trong tự nhiên, có thể được phân lập từ trong đất hay trên xác côn trùng chết (Dwayne and George, 1993; Bennasar *et al.*, 1998; Phạm Thị Thùy, 2004).

Đặc điểm hình thái và sinh học của nấm xanh

- Hình thái: Sợi nấm phát triển trên bề mặt côn trùng có màu trắng đến hồng, cuống sinh bào tử ngắn mọc tỏa tròn trên khối sợi nấm dày đặc. Nấm có bào tử hình bầu dục, kích thước 3,5x6,4x7,2 μm , màu lục xám đến oliu-lục (Boucias *et al.*, 1988; Rombach *et al.*, 1986). Bào tử xếp thành chuỗi khá chặt chẽ. Khi quan sát bằng mắt thường, có thể thấy bào tử được hình thành trên bề mặt cơ thể côn trùng một lớp phân khá rõ rệt màu xanh lục. Sợi nấm khi phát triển bên trong côn trùng có chiều rộng 3-4 μm , dài 20 μm , chia thành nhiều tế bào ngắn, trong tế bào có thể thấy rõ các giọt mỡ (Cerenius *et al.*, 1998; Phạm Thị Thùy, 2004).

Nấm *M. anisopliae* có cuống bào tử thẳng, đơn nhánh, phân nhánh hoặc dạng cây, cuống nhỏ, dạng sợi hoặc dạng bình, mọc đơn hoặc vòng là nơi sinh bào tử. Bào tử phân sinh đơn bào, mọc trên đỉnh cuống nhỏ tạo thành chuỗi, các bào tử dính liền với nhau bằng dịch nhầy, bào tử dính hình trứng hoặc bầu dục dài (Hình 2.10), một số loài nấm có cuống bào tử hoặc chất đệm (Trần

Văn Mão, 2002). Loài *M. anisopliae* và *M. flavoviride* được chấp nhận là 2 loài nấm thuộc chi *Metarhizium*. Trong đó, loài *M. anisopliae* được chia thành 2 loại là *var. anisopliae* cho bào tử ngắn và *var. major* cho bào tử dài (Tulloch, 1976).



Hình 2.10: Cơ quan sinh bào tử nấm *Metarhizium anisopliae* (Hoog *et al.*, 2000)
a. để cụm cuống bào tử đỉnh; b. cuống bào tử đỉnh; c. bào tử đỉnh

- Sinh học: Nấm xanh *M. anisopliae* có thể phát triển tốt trên nền cơ chất có kitin, phát triển chậm trên môi trường không có pepton, thích hợp trên môi trường có pepton như trên môi trường Sabouraud nấm phát triển tốt ở nhiệt độ 25⁰C sau 7-10 ngày nuôi cấy thì khuẩn lạc có đường kính 4-6 cm. Chúng sống được ở nhiệt độ thấp (8⁰C), có thể sống tới 445 ngày. Nhiệt độ thích hợp cho sự nảy mầm bào tử là 25-30⁰C và chết ở 49-55⁰C. Nhiệt độ thích hợp nhất cho nấm phát triển là 25⁰C. Ở nhiệt độ dưới 10⁰C và trên 45⁰C thì nấm xanh không hình thành bào tử. Độ pH thích hợp là 6 và dao động từ 3,3-8,5. Nấm xanh có khả năng phân giải tinh bột, xenluloza và kitin (da côn trùng) (Tamerler *et al.*, 1998; Phạm Thị Thùy, 2004).

Cơ chế nấm ký sinh gây bệnh côn trùng

Nấm xanh *M. anisopliae* có khả năng tiết ra độc tố Destruxin gây tê liệt côn trùng (Amiri *et al.*, 1999; Dumas *et al.*, 1996). Một số Destruxin ức chế miễn dịch rất mạnh (Cerenius *et al.*, 1998). Độc tố tiêu diệt côn trùng của nấm xanh gồm ngoại độc tố có tên Destruxin A, B, C, D. Trong dịch nuôi cấy nấm xanh, người ta đã tách được độc tố và xác định bản chất hóa học là peptid vòng. Tính miễn cảm của côn trùng với các loại độc tố Destruxin khác nhau thì cũng khác nhau. Côn trùng thuộc bộ cánh vẩy có thể miễn cảm cao với các loại Destruxin (Kershaw *et al.*, 1999). Độc tố Destruxin thường được tích lũy vào

cuối giai đoạn sinh trưởng của nấm khi các nguồn thức ăn và năng lượng đã cạn dần (Phạm Thị Thùy, 2004).

Khi bào tử nấm xanh *M. anisopliae* dính vào côn trùng, gặp điều kiện nhiệt độ, ẩm độ thích hợp, bào tử nảy mầm và mọc xuyên qua lớp vỏ kitin của côn trùng và hình thành các độc tố trong quá trình phát triển (Phạm Thị Thùy, 2004). Bào tử nấm *M. anisopliae* thường bay trong không khí, khi dính vào côn trùng, bào tử bám chặt vào da và tấn công theo cơ chế bám dính không chuyên biệt thông qua tính kỵ nước của vách tế bào (Boucias *et al.*, 1988).

Khi bào tử nấm tiếp xúc với lớp da côn trùng gặp điều kiện thích hợp sẽ nảy mầm, tạo ra cấu trúc xâm nhiễm như các ống mầm, túi ngoại bào hoặc túi áp suất, từ đó xâm nhiễm vào bên trong cơ thể côn trùng qua lớp kitin. Sự xâm nhập nấm vào bên trong biểu bì là do sự phối hợp của enzyme exoproteases, endoproteases, esterases, lipases, proteases, chitinases, chitobiasases và cơ chế cơ học. Nấm tiết ra các loại men làm mềm vỏ kitin và tạo thành lỗ thủng tại nơi bào tử nảy mầm và xâm nhập vào bên trong cơ thể côn trùng (Boucias and Pendland, 1998; Butt and Copping, 2000). Trong đó, các enzyme ngoại bào được sản sinh ra bởi nấm *M. anisopliae* có liên quan trực tiếp đến hiệu lực diệt côn trùng là proteases và chitinases (Leger *et al.*, 1986; Eguchi, 1992). Sau đó, nấm tiếp tục phân nhánh tạo nên hệ sợi nấm chằng chịt bên trong cơ thể côn trùng. Đồng thời, côn trùng cũng huy động các tế bào bạch huyết để chống đỡ, tuy nhiên nấm *M. anisopliae* đã tiết ra các độc tố Destruxin A, B làm cho các tế bào bạch huyết của côn trùng không chống đỡ nổi nên lần lượt bị tiêu diệt. Khi các tế bào bạch huyết bị độc tố của nấm tiêu diệt hết, là lúc côn trùng chết, cơ thể cứng lại là do các sợi nấm đan xen lại với nhau và chính các độc tố này đã gây chết côn trùng (Amiri *et al.*, 1999; Boucias and Pendland, 1998; Butt and Copping, 2000; Yubak, 2006). Mặt khác, khi bị nấm tấn công thì cơ thể côn trùng bị ngấn lại hoặc bị khô do hệ tiêu hoá bị tổn thương. Khi bị nấm *M. anisopliae* ký sinh thì tuyến mỡ và các mô của côn trùng bị hòa tan do enzyme lipases và proteases của nấm tiết ra (Phạm Thị Thùy, 2004).

Giai đoạn phát triển của nấm từ khi xâm nhiễm vào cơ thể cho đến khi côn trùng chết là giai đoạn sống ký sinh của nấm. Trong giai đoạn này, nấm thường tạo ra rất nhiều sợi nấm ngắn, chúng phân tán khắp cơ thể theo huyết tương. Trước khi nấm phát triển trong dịch máu, nấm thường phải vượt qua phản ứng tự vệ của côn trùng và nấm tiết ra độc tố làm suy yếu phản ứng tự vệ này. Côn trùng có thể phản ứng tự vệ với sự xâm nhập của nấm bằng cách sử dụng enzyme phenoloxidase để chống đỡ (Phạm Thị Thùy, 2004).

Ngoài ra, nấm còn sử dụng lectin, peptide và protein hoặc cơ chế vách tế bào như thực bào hoặc kết nang để chống đỡ. Côn trùng chết là do kết quả của việc làm giảm chất dinh dưỡng, làm tắt nghẽn các quá trình chuyển hóa trong cơ thể hoặc sự xâm nhiễm vào các nội quan và sự tác động của các độc tố do nấm tiết ra. Sau khi côn trùng chết, nấm thường phát triển hoại sinh trong cơ thể côn trùng. Dưới điều kiện thích hợp, nấm mọc thành hệ sợi ra ngoài bề mặt cơ thể ký chủ. Sau đó, các bào tử được hình thành trên lớp sợi nấm này và phóng thích, lây lan sang cá thể khác (Phạm Thị Thùy, 2004).

Theo Phạm Thị Thùy (2004) khi côn trùng bị nhiễm nấm *M. anisopliae* ký sinh, nấm sẽ phát triển tại những vị trí bào tử bám vào, bên trong cơ thể sẽ tạo thành 1 vết đen, không có hình thù nhất định. Nhiệt độ và ẩm độ là hai yếu tố quan trọng cho sự sinh trưởng và phát triển của nấm *M. anisopliae*. Nhiệt độ tối ưu cho nấm *M. anisopliae* phát triển từ 25-30⁰C. Ẩm độ thích hợp trong phạm vi 80-90%. Nếu trên hoặc dưới ngưỡng đó thì nấm phát triển yếu. Nếu nhiệt độ quá cao thì bào tử dễ bị chết hoặc không hình thành. Nghiên cứu của Stathers *et al.*, (1999) đã xác định nấm ký sinh côn trùng thích hợp ở nhiệt độ 28⁰C, điều kiện ẩm độ thích hợp là 80%. Nấm ký sinh côn trùng phát triển tốt trong điều kiện ánh sáng yếu. Hầu hết, các loại nấm ký sinh côn trùng thuộc loại hiếu khí và đòi hỏi hàm lượng nước thích hợp với tỉ lệ từ 30-50%. Loài nấm *M. anisopliae* phát triển thích hợp ở độ pH 5,5-6 (Phạm Thị Thùy, 2004).

Theo Trần Văn Mão (2002) thì nấm *M. anisopliae* có nhiệt độ thích hợp nhất cho sự sinh trưởng là 25-30⁰C, trên 30⁰C sinh trưởng giảm dần, trên 35⁰C nấm ngừng sinh trưởng. Độ ẩm cao có lợi cho bào tử nảy mầm và sinh trưởng của sợi nấm, nhưng độ ẩm thấp lại có lợi cho duy trì sự sống của bào tử nấm. Khi độ ẩm quá cao hay quá thấp thì nấm xanh có khả năng kéo dài sự sống, ở ẩm độ 45% thì nấm có sự sống ngắn nhất. Nấm xanh nảy mầm tốt ở phạm vi pH từ 6,9-7,2. Ánh sáng có tác dụng xúc tiến bào tử nảy mầm và hình thành bào tử, tia tử ngoại có thể giết chết bào tử, nhưng dưới ánh sáng trực xạ thì nấm xanh rất khó nảy mầm.

2.4 Ứng dụng nấm ký sinh trên sùng khoai lang

Trong những năm gần đây, nấm ký sinh côn trùng đã được phát triển ở nhiều quốc gia xem như tác nhân phòng trừ sinh học côn trùng với hơn 100 sản phẩm thuốc trừ sâu vi sinh đã được thương mại hóa vào năm 2006 (Jaronski, 2010). Nấm *B. bassiana* được phân lập và xác định là loài nấm ký sinh trên SKL (*C. formicarius*) ở các giai đoạn thành trùng, ấu trùng và nhộng

(Jansson 1992; Lagnaoui *et al.*, 2000) và được áp dụng phòng trừ SKL mang lại hiệu quả cao (Su, 1991; Jansson 1992; Yasuda, 1999).

Nấm ký sinh côn trùng xem như là tác nhân phòng trừ sinh học bị giới hạn bởi các yếu tố ngoại cảnh về nhiệt độ và ẩm độ (Hedlund and Pass, 1968; Walstad *et al.*, 1970; Yasuda *et al.*, 1997). Điều kiện thời tiết nóng và ẩm của ruộng khoai lang thích hợp cho nấm *B. bassiana* lây nhiễm côn trùng. Tuy nhiên, để sùng bị nhiễm nấm *B. bassiana* thì thành trùng phải tiếp xúc với số lượng lớn bào tử nấm ký sinh, khoảng 2×10^{10} bào tử/cm² (Yasuda *et al.*, 1997). Việc thiếu phương pháp áp dụng sao cho cung cấp đủ số lượng bào tử nấm ký sinh để lây nhiễm lên SKL có hiệu quả cũng là yếu tố giới hạn của tác nhân phòng trừ sinh học này (Yasuda *et al.*, 1997).

Nấm *B. bassiana* ký sinh chiếm ưu thế được phân lập trên *Cylas* spp. (Carruthers and Soper, 1987; Jansson, 1992; Phạm Thị Thùy, 2004) và cho hiệu quả ký sinh SKL ở các giai đoạn ấu trùng, thành trùng và nhộng (Jansson 1992; Lagnaoui *et al.*, 2000). Jansson (1992) cho rằng nấm *B. bassiana* phân lập từ loài *Cylas formicarius* tại nhiều nơi như Bắc Mỹ (Cockerham *et al.*, 1954), Hawaii (Sherman and Tamashiro, 1954), Cuba (Castineiras *et al.*, 1984; Diaz and Grillo, 1986), Đài Loan (Su *et al.*, 1988) và Uganda (Allard *et al.*, 1990).

Jansson (1992) báo cáo có 4 chủng nấm *B. bassiana* là tác nhân gây bệnh trên thành trùng SKL *C. formicarius* được phân lập tại Cuba vào năm 1984. Sau 12 ngày chủng nấm ở nhiệt độ 25⁰C thì tỉ lệ SKL chết của 4 chủng nấm này lần lượt là 49, 48, 47 và 42%. Kết quả nghiên cứu trong phòng thí nghiệm cũng cho thấy tỉ lệ sùng chết cao lên tới 80-90% khi bào tử nấm *B. bassiana* (IG-78) được chủng vào đất (Diaz and Grillo, 1986). Kết quả nghiên cứu của Su *et al.* (1988) cho thấy khả năng ký sinh của nấm *B. bassiana* trên sùng *C. formicarius* rất mạnh. Với mật độ 0, 100 và 1.000 bào tử/g đất thì nấm *B. bassiana* cho tỉ lệ gây chết SKL tương ứng là 0, 30 và 100%.

Ignoffo (1992) và Furlong *et al.* (1995) khảo sát những loài dịch hại chủ yếu bởi nấm ký sinh và khảo sát phương pháp lây nhiễm một cách tự động của việc sử dụng côn trùng tự chúng sẽ phát tán và lây nhiễm nấm ký sinh trên khắp quần thể côn trùng gây hại. Từ đó, có thể xác định tiềm năng hiệu quả của việc áp dụng bẫy pheromone giới tính được thiết kế một cách đặc biệt để hấp dẫn sùng đục ngoài tự nhiên vào bẫy rồi lây nhiễm chúng với số lượng lớn bào tử nấm *B. bassiana* bên trong bẫy và thả chúng trở lại đồng ruộng một cách tự do.

Rombach *et al.* (1988) và Milner *et al.* (1992) cho thấy thuốc vi nấm *B. bassiana* đã được ứng dụng rộng rãi tại nhiều nước trên thế giới như Mỹ, Canada, Anh, Úc, Philippines và Trung Quốc,... được sử dụng phòng trừ nhiều loài sâu hại thuộc bộ cánh vảy (Lepidoptera), cánh cứng (Coleoptera), cánh thẳng (Orthoptera), cánh bọ (Isoptera),... đạt hiệu quả tốt, nhất là những loài sâu hại như sâu róm thông, bọ cánh cứng hại dừa, châu chấu,... (Phạm Thị Thùy, 2004).

Tại Đài Loan, Kao *et al.* (1998) cho thấy nấm *B. bassiana* được phân lập từ đất canh tác bị nhiễm sùng và được sử dụng phòng trị SKL. Thử nghiệm ngoài đồng với việc phun dung dịch nấm *B. bassiana* có mật số $1,6 \times 10^4$ bào tử/ml ở thời điểm trồng hay giai đoạn tạo củ khoai hoặc rễ nấm này (10^9 bào tử/g) ở thời điểm trồng sẽ mang lại hiệu quả phòng trị SKL.

Tại Việt Nam, Nguyễn Văn Đĩnh (2005) ghi nhận nấm *B. bassiana* ký sinh phổ biến trên trưởng thành SKL vào các tháng Xuân Hè trên các ruộng khoai tại 4 tỉnh như Hà Nội, Hà Tây, Bắc Giang và Thanh Hóa. Nấm *B. bassiana* được sử dụng ở nồng độ $3-5 \times 10^6-10^8$ bào tử/ml để phòng trị SKL đạt hiệu quả từ 58,9-75,6% sau 7-10 ngày phun và phần lớn sùng chết đều có sự hiện diện của nấm *B. bassiana* mọc trở lại (Phạm Thị Thùy, 2004). Hiệu quả của nấm *B. bassiana* khi sử dụng kết hợp với pheromone giới tính trong quản lý SKL được nghiên cứu bởi Yasuda (1999) tại Nhật Bản năm 1999, sử dụng hệ thống lây nhiễm tự động gồm hệ thống bẫy pheromone giới tính đã biến đổi và cái chai với các lỗ thoát gần đáy chai chứa bên trong là bào tử nấm *B. bassiana* (mật số $9,4 \times 10^9$ bào tử/g chế phẩm) có thiết kế lỗ thoát ra xung quanh bẫy. Sùng đực bị hấp dẫn bởi pheromone giới tính sẽ bay đến bẫy và rời khỏi bẫy sau khi đã tiếp xúc với nấm. Kết quả cho thấy ruộng khoai lang tại nơi đặt bẫy có tỉ lệ sùng đực chết cao nhất do nhiễm nấm này là 96,2% ở thời điểm 21 NSKXL và sùng cái là 24% (35 NSKXL) và 33% (49 NSKXL). Hệ thống lây nhiễm nấm đặt trên ruộng khoai chỉ 30 ngày nhưng hiệu quả của việc sử dụng vẫn tiếp tục kéo dài thêm ít nhất 4 tuần sau khi di chuyển hệ thống này đi nơi khác. Tỉ lệ sùng đực bị mọc nấm là 57,9%, trong khi đó sùng cái bị mọc nấm là 31,6%. Ở ruộng có xử lý nấm, tỉ lệ giới tính của quần thể sùng bị lệch nhiều về phía con cái. Sùng cái có thể bị nhiễm nấm thông qua sự bắt cặp với sùng đực nhiễm nấm (Yasuda, 1999; Yasuda, 2000).

Thuận lợi của hệ thống lây nhiễm tự động là sùng đực bị hấp dẫn vào bẫy được lây nhiễm tự động một cách hiệu quả với nấm *B. bassiana*, chỉ SKL mới bị nhiễm nấm bởi hệ thống lây nhiễm này, nấm *B. bassiana* tương đối dễ sản xuất số lượng lớn, chi phí sử dụng hệ thống lây nhiễm thấp hơn so với việc

phun thuốc trừ sâu hóa học trên ruộng khoai lang, sùng đực bị hấp dẫn vào bẫy và lây nhiễm nấm, sau đó sùng tự thoát ra khỏi hệ thống lây nhiễm, có thể chúng quay trở lại tự nhiên theo tập quán sinh sống, công đoạn này có tác dụng giúp cho việc phát tán, lan truyền nấm *B. bassiana* mau chóng hơn trên cánh đồng. Pheromone giới tính tổng hợp được sử dụng quản lý SKL tại các nước đang phát triển, nhưng không cho hiệu quả cao khi mật số sùng cao ở ngoài đồng, trường hợp trên, hệ thống lây nhiễm tự động sẽ cho hiệu quả phòng trừ sùng thích hợp hơn (Yasuda, 1999; Yasuda, 2000).

Trong nhóm nấm ký sinh là tác nhân gây bệnh trên côn trùng, nhất là nấm *B. bassiana* qua khảo sát cho thấy có mức độ gây chết sùng cao dưới điều kiện ẩm độ cao và mật độ sùng cao. Tuy nhiên, ở điều kiện ngoài đồng, nấm *B. bassiana* hiếm khi tạo thành dịch bệnh trên SKL (Capinera, 1998), kể cả trường hợp khi chúng số lượng lớn bào tử nấm *B. bassiana* vào trong đất (Jansson, 1992). Ghi nhận này cũng tương tự với kết quả nghiên cứu của Smit (1997) và Stathers *et al.* (1999) tại Uganda, nấm *B. bassiana* cũng kém hiệu quả trong việc khống chế SKL ở mật độ cao.

SKL là một trong những loài côn trùng bị nấm *M. anisopliae* ký sinh và gây bệnh (Ames *et al.*, 1997; Phạm Thị Thùy, 2004). Tiềm năng của nấm *M. anisopliae* trong phòng trị SKL *C. formicarius* ở điều kiện nhà lưới và ngoài đồng được nghiên cứu bởi Villacarlos và Polo (1989) tại Visca, Baybay, Leyte thuộc Philippines. Kết quả ghi nhận tỉ lệ củ khoai không bị nhiễm sùng ở NT xử lý nấm *M. anisopliae* là cao hơn so với đối chứng không xử lý và NT xử lý thuốc trừ sâu Carbofuran. Tỉ lệ sùng bị nhiễm nấm ở NT xử lý nấm ở thời điểm 3 tuần SKT là cao hơn so với các NT còn lại (Villacarlos and Polo, 1989). Khi áp dụng nấm *M. anisopliae* ở ngoài đồng đã làm giảm tỉ lệ củ khoai bị sùng gây hại khoảng 9% ở NT xử lý dung dịch bào tử nấm này vào 4 tuần SKT và NT sử dụng thể sợi nấm trên nền cơ chất vào 3 tuần SKT. Theo tác giả nhận định việc sử dụng nấm này ở ngoài đồng dưới dạng thể sợi trên nền cơ chất thuận lợi hơn so với dạng dung dịch bào tử nấm. Chất nền có vai trò giữ sợi nấm và kéo dài thời gian sống của sợi nấm đến khi tiếp xúc với ký chủ.

Khi cho thành trùng SKL lây nhiễm với nấm *M. anisopliae* ở nồng độ 3×10^7 và 1×10^8 bào tử/ml thì sùng tiêu thụ ít thức ăn hơn đáng kể so với sùng bị lây nhiễm với nấm *B. bassiana* ở cùng nồng độ, ngoại trừ mức nồng độ cao nhất là 1×10^8 bào tử/ml ở thời điểm 14 NSKXL. Mặt khác, đối chứng không xử lý nấm thì sùng cái đẻ trứng nhiều hơn so với NT xử lý nấm. Ở thời điểm 10 NSKXL thì tỉ lệ trứng còn sống cũng khác nhau giữa đối chứng và xử lý nấm ký sinh ở các nồng độ thử nghiệm. Kết quả cho thấy nấm *M. anisopliae*

và *B. bassiana* là 2 tác nhân ký sinh gây bệnh trên SKL và sự xâm nhiễm của nấm vào cơ thể sùng sẽ làm giảm khả năng ăn và sinh sản của thành trùng SKL và tỉ lệ sống của trứng (Ondiaka *et al.*, 2008).

Khảo sát ảnh hưởng xâm nhiễm của nấm *M. anisopliae* lên khả năng sống sót và sinh sản của thành trùng SKL *C. formicarius* đã được xác định trong điều kiện nhà lưới bởi Rana và Vallacarlos (1991). Khi 30% sùng đực được lây nhiễm với nấm *M. anisopliae* thì tỉ lệ sùng chết là cao nhất ở thời điểm 14 NSKXL (đạt 40,3%) với tỉ lệ đực:cái là 1:3. Mặt khác, khi lây nhiễm nấm này với 70% sùng đực thì tỉ lệ sùng chết đạt 48,5% ở cùng thời gian với tỉ lệ đực:cái là 1:1. Tỉ lệ chết phụ thuộc vào sự xâm nhiễm của nấm *M. anisopliae* qua tiếp xúc và bắt cặp với sùng đực. Nhìn chung, khả năng sinh sản của sùng cái không bị ảnh hưởng bởi sự hiện diện của sùng đực bị nhiễm nấm ký sinh. Tuy nhiên, thời gian sống của sùng cái ngắn lại sau khi bị nhiễm nấm, có thể là nguyên nhân gây ảnh hưởng bất lợi lên tổng số sùng con được sinh ra (Rana and Vallacarlos, 1991).

Khảo sát tính độc của 4 chủng nấm *B. bassiana* và 8 chủng nấm *M. anisopliae* lên khả năng sinh sản và sức sống của trứng sùng *C. puncticollis* trong điều kiện PTN được nghiên cứu bởi Ondiaka *et al.* (2008). Phương pháp sử dụng để chủng nấm là phun dung dịch nấm ở nồng độ 1×10^7 bào tử/ml bằng tháp phun Bergerjon. Ở thời điểm 26 NSKXL, tỉ lệ sùng chết từ 77,5-84,2% với các chủng *B. bassiana* và từ 62,5-89,2% với các chủng *M. anisopliae*. Thời gian gây chết 50% cá thể sùng thí nghiệm của 12 chủng nấm này cũng khác nhau (LT_{50} biến động từ 9,7-18,5 ngày). Trong khi đó, chủng nấm *B. bassiana* có hoạt lực sinh học gây chết sùng khá cao trong điều kiện PTN với giá trị LC_{50} là $0,7 \times 10^6$ bào tử/ml.

Burdeos và Villacarlos (1989) khảo sát khả năng phòng trị *C. formicarius* của 5 chủng nấm *M. anisopliae*, 5 chủng nấm *Paecilomyces lilacinus* và 2 chủng nấm *B. bassiana* trong điều kiện PTN. Tất cả 12 chủng nấm trên đã chứng minh được khả năng gây bệnh trên SKL ở các nồng độ khác nhau. Trong đó, nấm *M. anisopliae* có hoạt lực sinh học cao nhất, có giá trị LC_{50} thấp nhất ($LC_{50}=8,42 \times 10^5$ bào tử/ml). Nấm *B. bassiana* có hoạt lực trung bình ($LC_{50}=1,54 \times 10^7$ bào tử/ml), nấm *P. lilacinus* gây ra tỉ lệ chết rất thấp, với mật số bào tử cao, có hoạt lực thấp ($LC_{50}=3,0 \times 10^8$ bào tử/ml). Cả 2 loài nấm *M. anisopliae* và *B. bassiana* ở nồng độ 1×10^8 bào tử/ml đều gây chết 50% cá thể sùng tương ứng ở 3 và 4 ngày.

Chương 3

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

3.1 Vật liệu nghiên cứu

Thời gian thực hiện: từ năm 2010-2014.

Địa điểm thực hiện: các thí nghiệm được thực hiện nghiên cứu tại Bộ môn Bảo vệ Thực vật, Khoa Nông nghiệp & Sinh học ứng dụng, Trường đại học Cần Thơ và một số ruộng khoai lang của nông dân tại vùng ĐBSCL.

3.1.1 Vật liệu

Vật liệu và thiết bị dùng trong nghiên cứu bao gồm:

- Thiết bị: tủ sấy, hệ thống cô quay, máy khuấy từ gia nhiệt,... Máy chạy PCR, máy chạy điện di, máy chụp hình gel, máy giải trình tự, máy cộng hưởng từ hạt nhân, máy sắc ký khí khối phổ máy nghiền, máy lắc, máy ly tâm, tủ cấy, tủ úm, nồi khử trùng áp suất, cân điện tử, kính phóng đại, kính hiển vi quang học, máy đo pH, tủ lạnh 4⁰C, tủ đông -35⁰C,...

- Dụng cụ: bình cầu, bình tam giác, đĩa petri, kim mũi giáo, vợt lược, lọ thủy tinh nhỏ có nắp teflon, beaker, Pasteur pipette, phễu ly trích, micropipette, cột thủy tinh, cột sắc ký mở, nhiệt ẩm kế, giấy sắc ký lớp mỏng. Đĩa petri, đĩa cấy, lame đếm, lame, ống đong nhựa, eppendorf, kẹp inox, kéo, giấy thấm,...

- Vật liệu: tuýp cao su ngoại nhập (0,8 cm OD, rubber septum, Aldrich), ống cao su non (ghép cà chua). Microsyringe (dung tích 25 μ l). Chai nước suối 1,5 lít, băng keo màu, thước dây, giấy nhôm. Mạt cửa rửa sạch và thanh trùng 2 lần ở nhiệt độ 121⁰C trong 30 phút. Tuýp môi là ống cao su non (ghép cà chua) có dạng hình trụ với kích thước dài 2 cm, đường kính ống 3 mm, màu vàng, thành mỏng, rỗng ruột. Tuýp môi cao su ngoại nhập (Aldrich, Đức) có dạng hình chuông với kích thước dài 2 cm, đường kính miệng 1 cm, rỗng bên trong đầu lớn, nhiều màu sắc, cao su dẻo và dày hơn.

3.1.2 Hóa chất

- Các chất phản ứng: 1,3-propanediol, Dimethoxymethane (-MOM), 1-nonanal, Crotonyl chloride, Triphenylphosphine.

- Các chất xúc tác: Pyridine, Sodiumbis(trimethylsilyl)amide,...

- Một số hóa chất khác: Silicagel, Nitrat Bạc, Sodium carbonate hydrogen (NaHCO₃), KMnO₄, Sodiumsulfate (Na₂SO₄),...

- Các dung môi hữu cơ: *n*-Hexane, Methylene chloride, Ethyl acetate, Benzen, Ethanol, Ether,...

- Chiết xuất DNA từ sợi nấm: proteinase K (20 mg/ml), lysis buffer (100 mM Tris HCl, 20 mM EDTA, 5 M NaCl, 1% SDS), PCI (25:24:1): phenol chloroform isosamylalcohol, ethanol 70% và 99,5%, nước tinh khiết (Mili Q), TE buffer (10 nM Tris HCl, 0,5 M EDTA, nước cất).

- Kiểm tra DNA: 6xLoading buffer, marker-110 DNA, agarose tinh khiết, 1 x TAE buffer (40 mM Tris acetate, 1 mM EDTA, pH =8).

- Điện di: gel agarose 1%, dung dịch đệm 1xTAE buffer, dung dịch nhuộm gel Ethidium bromide 0,01.

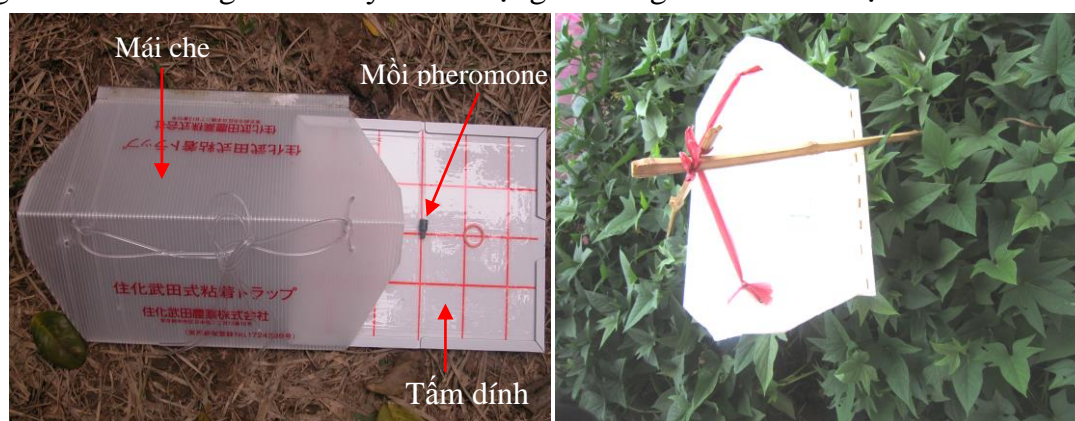
- Phản ứng PCR: mili Q, 10 x buffer, dNTP, primer: ITS₁ (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3'), ITS₄ (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') dùng chung cho các loại nấm, taq DNA Polymerase, DNA mẫu.

- Môi trường PDA (khoai tây 200 g, dextrose 20 g, agar 20 g, nước cất 1.000 ml). Môi trường SDAY₃ (peptose 10 g, glucose 40 g, yeast extract 2 g, NaNO₃ 2 g, KH₂PO₄ 1 g, MgSO₄.7H₂O 0,5 g, agar 20 g, nước cất 1.000 ml).

3.1.3 Kiểu bẫy pheromone

3.1.3.1 Bẫy dính

Bẫy pheromone bao gồm tấm dính (giấy dày cứng có phủ lớp keo dính trong, hình chữ nhật (kích thước 27x30 cm), có nếp gấp ở giữa chiều dài, có thể gấp đôi lại để bảo vệ bề mặt keo dính khi bảo quản, vận chuyển) và mở ra dễ dàng khi sử dụng; mái che bằng nhựa trắng trong, nhẹ nhàng (do Công ty Takeda Chemical Ind., Ltd., Osaka, Nhật Bản sản xuất). Sử dụng môi là tuýp cao su với pheromone tổng hợp đặt ở giữa tấm dính. Dùng 2 thanh tre dài 1 m cắm xuống đất, buột chéo nhau cho vững vàng, rồi treo bẫy pheromone vào giữa 2 thanh tre giữ cho bẫy ít dao động khi có gió như minh họa ở Hình 3.1.

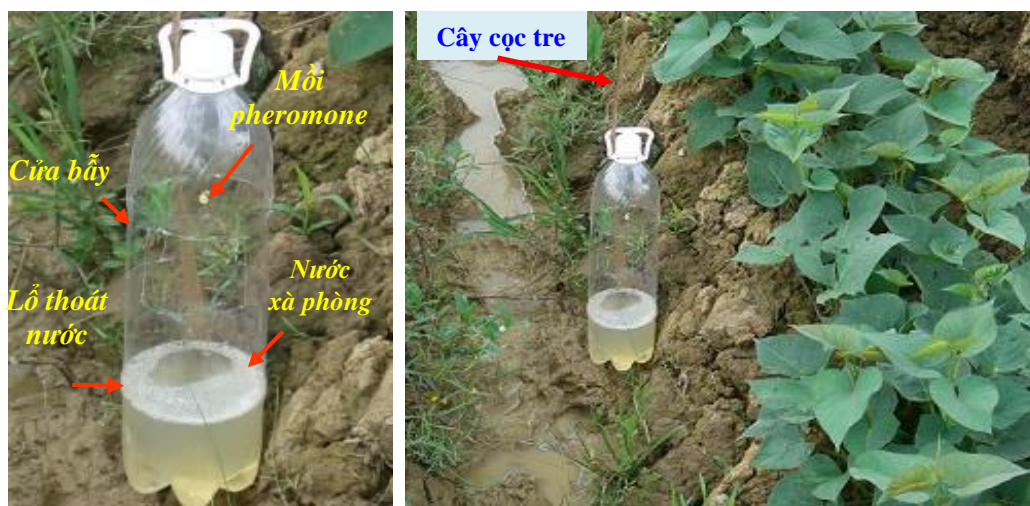


Hình 3.1: Bẫy pheromone dạng bẫy dính được đặt trên ruộng khoai lang

3.1.3.2 Bẫy nước

Bẫy pheromone dạng bẫy nước bao gồm chai nhựa trong (vỏ chai nước giải khát với thể tích 1,5 lít, cách nắp chai khoảng 7 cm cắt 3 ô vuông (kích thước 3x4

cm) chia đều nhau xung quanh thành vỏ chai. Ở vị trí từ đáy chai lên khoảng 8 cm, tiến hành đục 4-5 lỗ nhỏ xung quanh thành vỏ chai để nước thoát ra ngoài khi mực nước trong chai dâng lên lúc gặp mưa nhiều hay nông dân tưới ruộng) và mỗi pheromone được buột vào sợi chỉ treo bên trong chai, ngang phía trên cửa bẫy. Trên ruộng khoai lang, bẫy được đặt cố định cạnh luống khoai bằng thanh tre dài khoảng 1 m cắm đứng giữ bẫy không bị đổ ngã và cho nước vào bên trong bẫy tới vị trí các lỗ nhỏ, thêm ít xà phòng vào khuấy đều như minh họa ở Hình 3.2.



Hình 3.2: Bẫy pheromone dạng bẫy nước đặt trên ruộng khoai lang

3.1.4 Nấm ký sinh sử dụng trong thí nghiệm

Nguồn nấm ký sinh như nấm xanh *M. anisopliae* được phân lập từ các mẫu côn trùng bị nhiễm nấm ngoài tự nhiên, chế phẩm nấm xanh (dạng nấm tươi và bột khô) được thực hiện tại phòng thí nghiệm, Bộ môn Bảo Vệ Thực Vật, khoa Nông Nghiệp và Sinh Học Ứng Dụng, trường Đại học Cần Thơ và chế phẩm nấm xanh (dạng nấm tươi) theo qui trình sản xuất tại nông hộ do Chi cục Bảo vệ Thực vật tỉnh Sóc Trăng cung cấp cho thí nghiệm ngoài đồng.



Hình 3.3: Các dạng nấm xanh: đĩa nấm nguồn (A), chế phẩm nấm tươi sản xuất tại phòng thí nghiệm (B) và chế phẩm nấm xanh sản xuất tại nông hộ (C)

3.1.5 Nguồn sùng khoai lang

Thu thập củ khoai bị nhiễm sùng trên các ruộng khoai thu hoạch tại huyện Bình Tân, tỉnh Vĩnh Long và mang về PTN Phòng trừ Sinh Học, Bộ môn Bảo Vệ Thực Vật, Khoa Nông Nghiệp và Sinh học ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ. Tiến hành để củ khoai bị nhiễm sùng vào trong các hộp nhựa (kích thước 25×25×8 cm) và đậy miệng hộp bằng lớp vải mùng, bảo quản ở điều kiện phòng. Theo dõi đến khi sùng vũ hóa thoát ra ngoài củ thì thu sùng đực và cái tách ra nuôi riêng từng hộp nhựa. Tùy theo bố trí thí nghiệm mà SKL được nuôi riêng từng con trong mỗi lọ thủy tinh nhỏ (thể tích 8 ml) hay nuôi nhiều con chung trong hộp nhựa. Lọ thủy tinh hay hộp nhựa nuôi sùng để cục bông gòn ướt giữ ẩm và cung cấp miếng củ khoai lang tươi làm thức ăn.

3.1.6 Phiếu điều tra nông dân và khảo sát ngoài đồng

Phiếu điều tra được chuẩn bị sẵn để phỏng vấn nông dân trồng khoai lang tại huyện Bình Tân, tỉnh Vĩnh Long bao gồm các thông tin về tình hình canh tác, thành phần sâu bệnh hại trên khoai lang và cách phòng trị, một số thông tin liên quan đến pheromone giới tính của SKL (Phụ lục 1).

Phiếu lấy chỉ tiêu khảo sát ngoài đồng được chuẩn bị sẵn dùng để ghi nhận thành phần côn trùng hại và thiên địch hiện diện trên các ruộng khoai lang tại huyện Bình Tân, tỉnh Vĩnh Long (Phụ lục 1).

3.2 Nội dung và phương pháp nghiên cứu

3.2.1 Điều tra tình hình canh tác khoai lang, khảo sát côn trùng gây hại và thiên địch trên ruộng khoai lang tại huyện Bình Tân, Vĩnh Long

3.2.1.1 Điều tra nông dân về tình hình canh tác khoai lang

Mục tiêu: nhằm tìm hiểu về kỹ thuật canh tác, tình hình dịch hại trên khoai lang và biện pháp phòng trị của nông dân (đặc biệt đối với sùng khoai lang) cũng như sự hiểu biết của nông dân đối với pheromone giới tính và hiệu quả của việc sử dụng pheromone giới tính hấp dẫn sùng khoai lang.

- Thời gian điều tra: tiến hành vào tháng 01/2010.

- Số phiếu điều tra: tổng cộng 100 phiếu tại huyện Bình Tân, Vĩnh Long.

- Điều tra nông dân được thực hiện bằng hình thức phỏng vấn trực tiếp nông dân theo phiếu điều tra đã soạn sẵn (Phụ lục 1) với 100 nông hộ (1 phiếu/hộ) đang canh tác khoai lang tại huyện Bình Tân, tỉnh Vĩnh Long được phân bố như sau: 40 nông hộ tại xã Thành Đông, 30 nông hộ tại xã Thành Trung và 30 nông hộ tại xã Tân Thành thuộc huyện Bình Tân, là 3 xã có diện tích canh tác khoai lang tập trung nhiều trong huyện.

- Thông tin điều tra: hiện trạng canh tác, tình hình dịch hại và các biện pháp phòng trị côn trùng gây hại của nông dân, nhất là sùng khoai lang. Ngoài

ra, điều tra cũng ghi nhận sự hiểu biết của nông dân đối với pheromone giới tính hấp dẫn sùng khoai lang (Phụ lục 1).

- Yêu cầu đối với nông hộ điều tra: chọn ngẫu nhiên các hộ nông dân tại ba xã kể trên có diện tích canh tác khoai lang tối thiểu là 1.000 m².

3.2.1.2 Khảo sát ngoài đồng về tình hình côn trùng gây hại và thiên địch trên ruộng khoai lang

Thời gian khảo sát điều tra: từ tháng 01/2010 đến tháng 05/2010.

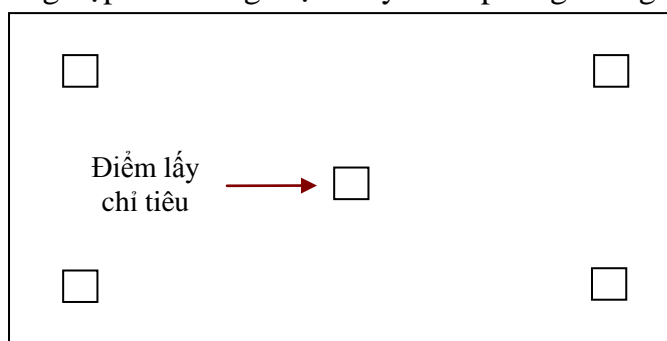
Mục tiêu: nhằm ghi nhận thành phần côn trùng gây hại và thiên địch trên các ruộng khoai lang trong suốt vụ khoai.

Khảo sát điều tra thực tế ngoài đồng thực hiện trên 9 ruộng khoai lang tại xã Thành Đông và xã Thành Trung, huyện Bình Tân, Vĩnh Long (Bảng 3.1).

Bảng 3.1: Thông tin các ruộng khoai lang điều tra thành phần côn trùng gây hại

Ruộng	Diện tích (m ²)	Giống khoai lang	Ngày xuống giống	Địa điểm ruộng điều tra
1	1.500	Tím Nhật	30/12/2009	Áp Thành Tân, xã Thành Đông
2	1.500	Tím Nhật	30/12/2009	Áp Thành Tân, xã Thành Đông
3	3.000	Tím Nhật	30/12/2009	Áp Thành Tân, xã Thành Đông
4	2.000	Tím Nhật	04/01/2010	Áp Thành Hội, xã Thành Đông
5	3.000	Tím Nhật	04/01/2010	Áp Thành Hội, xã Thành Đông
6	1.300	Tím Nhật	31/12/2009	Áp Thành Lợi, xã Thành Trung
7	1.500	Tím Nhật	23/12/2009	Áp Thành Lễ, xã Thành Trung
8	2.000	Bí Đường	27/12/2009	Áp Thành Lễ, xã Thành Trung
9	2.000	Trắng Sữa	02/01/2010	Áp Thành Lễ, xã Thành Trung

Cách tiến hành: trên mỗi ruộng điều tra chọn 5 điểm cố định theo đường chéo góc (Hình 3.4), tại mỗi điểm gồm 1 m chiều dài của luống khoai, ghi nhận thành phần côn trùng và thiên địch hiện diện tại mỗi điểm định kỳ 2 tuần/lần. Những đối tượng không nhận diện được trực tiếp trên ruộng sẽ thu mẫu cho vào từng hộp nhỏ riêng biệt chuyển về phòng thí nghiệm xác định.



Hình 3.4: Sơ đồ vị trí các điểm điều tra cố định trên ruộng khoai lang, các ô vuông là điểm điều tra cố định ghi nhận côn trùng và thiên địch

Chỉ tiêu ghi nhận:

Mức độ phổ biến của một loài được tính theo tần suất xuất hiện của loài đó trên các ruộng khoai lang điều tra, trong đó:

Mức độ +: rất ít xuất hiện, tần suất xuất hiện < 22%.

Mức độ ++: ít xuất hiện, tần suất xuất hiện từ 22 - 50%.

Mức độ +++: xuất hiện thường xuyên, tần suất xuất hiện > 50%.

Tần suất xuất hiện của một loài được tính theo sự hiện diện của loài đó qua các đợt điều tra trên ruộng khảo sát theo công thức sau:

$$\text{Tần suất xuất hiện (\%)} = \frac{\text{Số đợt xuất hiện}}{\text{Tổng số đợt quan sát}} \times 100$$

3.2.2 Nghiên cứu về pheromone giới tính tổng hợp của sùng khoai lang

3.2.2.1 Tổng hợp pheromone giới tính của sùng khoai lang

a) Tổng hợp hợp chất (Z)-3-dodecenyl (E)-2-butenolate (3Z-12:E2)

Con đường tổng hợp thành hợp chất (Z)-3-dodecenyl (E)-2-butenolate (3Z-12:E2) thông qua phản ứng Wittig. Sau khi Brom hóa nhóm chức -OH của hợp chất 1,3-propanediol (1), nhóm chức -OH còn lại được bảo vệ bằng Ether của hợp chất Dimethoxymethane (-MOM) (2). Đun hợp chất (2) với Tri phenylphosphine trong Benzen ở nhiệt độ 110⁰C trong 48 giờ thu được muối Phosphorane (3). Sau đó hợp chất (3) kết hợp với hợp chất 1-nonanal thông qua phản ứng Wittig với Sodiumbis(trimethylsilyl)amide sử dụng làm môi trường bazơ thu được hợp chất MOM-ether của hợp chất (Z)-3-dodecenyl-1-ol (4). Sau khi loại bỏ sự bảo vệ nhóm chức OH của hợp chất MOM-ether, thu được hợp chất (Z)-3-dodecenyl-1-ol (5), sau đó hợp chất (5) kết hợp với hợp chất Crotonyl chloride bằng phản ứng ester hóa trong dung môi CH₂Cl₂ dưới môi trường kiềm của chất xúc tác Pyridine để tạo thành hợp chất (Z)-3-dodecenyl (E)-2-butenolate (6), là pheromone giới tính tổng hợp (3Z-12:E2).

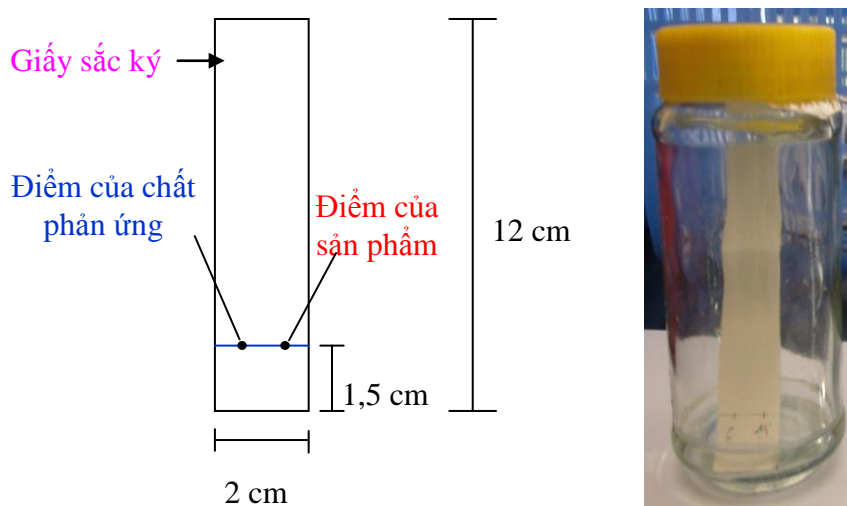
b) Ly trích và tinh lọc hợp chất (Z)-3-dodecenyl (E)-2-butenolate

** Kiểm tra mẫu tổng hợp bằng sắc ký lớp mỏng*

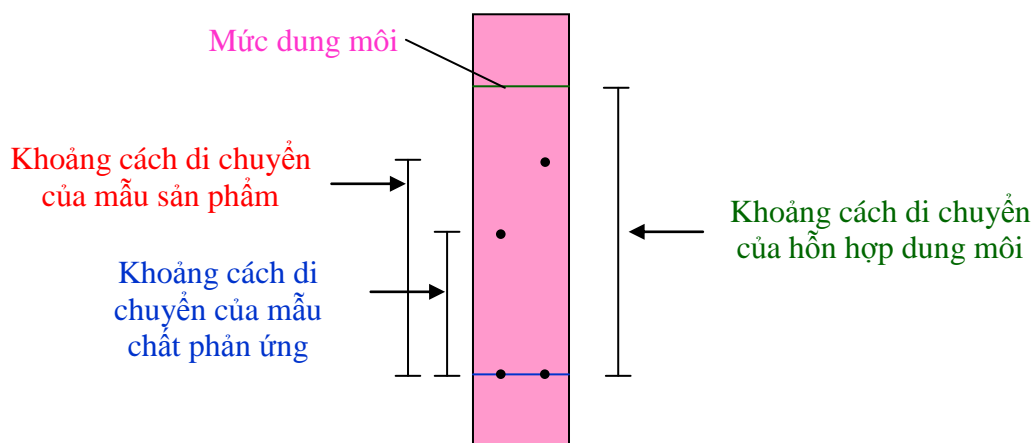
Điểm kết thúc phản ứng ở mỗi giai đoạn tổng hợp được kiểm tra bằng kỹ thuật sắc ký lớp mỏng (Thin Layer Chromatography, TLC) với pha tĩnh (stationary phase) là giấy sắc ký (0,25 mm silicagel; silicagel plate; Merk, Germany) và pha động (mobile phase) là hỗn hợp dung môi của Benzen: Hexane và Benzen:Ethyl acetate với các tỉ lệ hóa chất khác nhau tùy thuộc vào mức độ phân cực của mẫu phân tích.

Hình 3.5 minh họa cách tiến hành kỹ thuật sắc ký lớp mỏng, trong đó giấy sắc ký được cắt thành từng miếng hình chữ nhật (kích thước 2x12 cm).

Dùng bút chì mềm 2B kẻ một đường ngang cách một đầu của miếng giấy sắc ký khoảng 1,5 cm, đánh dấu điểm để chấm mẫu sắc ký lên đường kẻ (thông thường là 2 điểm: 1 điểm của chất phản ứng và 1 điểm của sản phẩm hợp chất tổng hợp). Dùng ống mao dẫn chấm riêng từng mẫu của chất phản ứng và sản phẩm tổng hợp lên điểm đã đánh dấu, sau đó đặt giấy sắc ký này vào lọ dung môi theo phương thẳng đứng với đầu được chấm mẫu ở bên dưới (Hình 3.7).



Hình 3.5: Cách tiến hành kỹ thuật sắc ký lớp mỏng



Hình 3.6: Cách ghi nhận khoảng cách di chuyển của mẫu và dung môi

Theo dõi sự di chuyển lên của dung môi trên giấy sắc ký, khi mực dung môi cách đỉnh của giấy sắc ký khoảng 1,5 cm thì lấy giấy sắc ký ra khỏi lọ, dùng bút chì gạch ngang đánh dấu vị trí của mực dung môi. Đặt giấy sắc ký vào trong tủ hút khoảng 10 phút để bay hơi dung môi, rồi nhuộm màu làm hiện mẫu hợp chất để ghi nhận giá trị R_f (retardation factor: yếu tố chậm lại). Đối với mẫu hợp chất không có chứa nối đôi trong phân tử, mẫu được nhuộm màu làm hiện mẫu bằng cách phun dung dịch H_2SO_4 (30%) rồi hơi nóng; đối

với mẫu hợp chất có chứa nối đôi trong phân tử, mẫu được nhuộm màu làm hiện mẫu bằng cách phun dung dịch KMnO_4 .

Chỉ tiêu ghi nhận là giá trị R_f được tính theo công thức:

$$R_f = \frac{\text{Khoảng cách di chuyển của mẫu}}{\text{Khoảng cách di chuyển của dung môi}}$$

Phản ứng kết thúc khi mẫu sản phẩm không hiện diện đốm (spot) có cùng giá trị R_f với mẫu nhuộm màu hiện diện chất phản ứng trên giấy sắc ký.

*** Ly trích mẫu tổng hợp bằng dung môi**

Trong quá trình tổng hợp pheromone giới tính thì sản phẩm thu được của mỗi phản ứng được ly trích bằng kỹ thuật ly trích pha lỏng (liquid phase extraction) để thu hồi các hợp chất trung gian.

Hỗn hợp phản ứng ở mỗi giai đoạn của qui trình tổng hợp được cho vào một phễu ly trích (extracting funnel) cùng với một thể tích tương đương dung dịch Bicarbonate Natri (NaHCO_3), lắc mạnh phễu ly trích để trộn đều hỗn hợp bên trong, rồi để cho hỗn hợp phân lớp. Sau khi hỗn hợp trong phễu đã phân lớp hoàn toàn thì tách lấy phần dung môi hữu cơ, lọc qua cột thủy tinh chứa Sulfate Natri (Na_2SO_4) vào một bình chứa. Phần nước còn lại trong phễu ly trích sẽ được thêm vào một lượng dung môi tương ứng, lắc đều, tách lấy phần dung môi hữu cơ, lọc qua cột thủy tinh chứa Na_2SO_4 vào bình chứa sản phẩm bên dưới (lặp lại 2 lần).

Dung môi hữu cơ ly trích trong bình chứa sẽ được làm bay hơi bằng hệ thống cô quay chân không (Rotary evaporator RE300; waterbath RE300B; JSR Ref. bath) để thu hồi được sản phẩm thô.

*** Tinh lọc sản phẩm bằng cột sắc ký mở**

Các phản ứng thu được sản phẩm thô ở mỗi giai đoạn trong qui trình tổng hợp pheromone đem tinh lọc bằng phương pháp ly trích pha đặc (solid phase extraction) của cột sắc ký mở (open column chromatography).

Cột sắc ký mở là một ống (cột) thủy tinh với một đầu mở và một đầu có van đóng mở để điều tiết lượng dung môi đi qua. Ở đầu có van điều tiết của cột sắc ký này được nhồi một ít bông gòn và khoảng 2 g bột Sulfate Natri (Na_2SO_4), phần còn lại của cột được nhồi với Silicagel (60N) hoặc 15-20% Nitrat bạc (AgNO_3) trong Silicagel để làm pha tĩnh (stationary phase). Pha động (mobile phase) ở mỗi phân đoạn (fraction) là 200 ml hỗn hợp dung môi của Hexane, Benzen và Ethyl acetate. Tỷ lệ của mẫu cần tinh lọc và pha tĩnh trong cột thủy tinh là 1/20 (1 g mẫu/20 g Silicagel).

*** Phân tích mẫu tổng hợp bằng máy sắc ký lỏng cao áp (HPLC)**

Thiết bị sắc ký lỏng cao áp bao gồm hệ thống bơm (Jasco PU-980 liquid chromatograph, JASCO Corporation, Tokyo, Japan), 1 integrator (Chromatocorder 21J, System Instrument, Tokyo, Japan), 1 đầu dò phổ cực tím (UV spectrometric detector Jasco UV-970) đặt ở bước sóng 240 nm và cột thủy tinh ODS (Grand Pack ODS, 2 cm i.d. 25 cm; Senshukagaku, Tokyo, Japan). Dung môi dùng phân tích mẫu là hỗn hợp 12% nước trong Methanol. Tốc độ di chuyển của dung môi trong cột thủy tinh của hệ thống này là 4 ml/phút.

c) Phân tích và thẩm định cấu trúc hợp chất (Z)-3-dodecenyl (E)-2-butenolate tổng hợp

Mẫu sản phẩm ở mỗi giai đoạn của qui trình tổng hợp pheromone sau khi tinh lọc sẽ được gửi đến phòng thí nghiệm Sinh thái hóa chất, Trường Đại học Nông nghiệp và Công nghệ Tokyo (Nhật Bản) để thẩm định cấu trúc hóa học của sản phẩm tổng hợp bằng các phân tích Cộng hưởng từ hạt nhân (Nuclear Magnetic Resonance, NMR, chỉ phân tích mẫu tổng hợp) và Sắc ký khí khối phổ (Gas chromatography-Mass spectrometry, GC-MS).

*** Phân tích Cộng hưởng từ hạt nhân (NMR)**

Phổ cộng hưởng từ hạt nhân ^1H ($^1\text{HNMR}$ Spectrometry) và ^{13}C (^{13}C NMR Spectrometry) của mẫu tổng hợp được đo bằng máy Jeol Alpha 300 Fourier transform spectrometer (Nihondenshi, Tokyo, Japan) ở tần số là 300,4 MHz và 75,45 MHz, tương ứng. Dung môi sử dụng trong phân tích mẫu là Deuterium chloroform (CDCl_3) với chất Tetramethylsilane (TMS) ($\text{Si}(\text{CH}_3)_4$) dùng làm chất nội chuẩn (internal standard) để phân tích ^1H và ^{13}C .

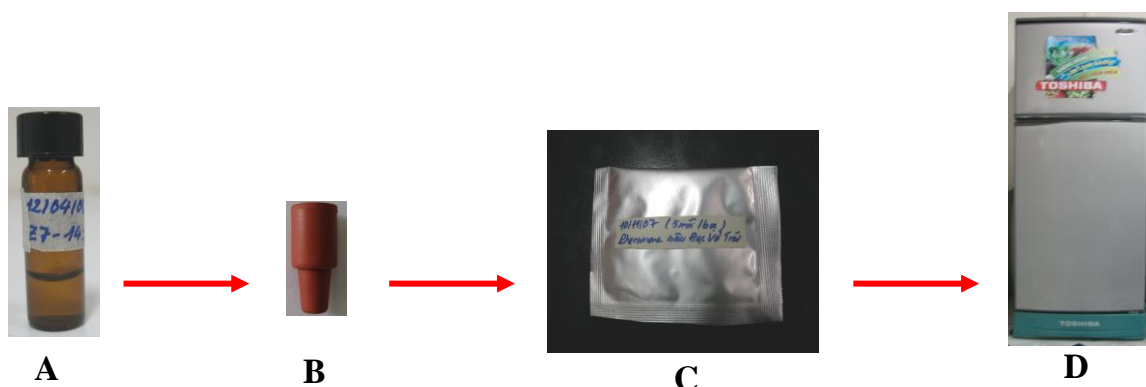
*** Phân tích Sắc ký khí khối phổ (GC-MS)**

Phổ khối lượng của mẫu tổng hợp và pheromone ly trích (dùng để xác định cấu trúc hóa học của pheromone) được ghi nhận bằng máy liên hợp sắc ký (GC) – phổ khối lượng (MS) với GC HP 6.890 series và đầu dò MS (Mass Selective Detector) HP 5.973. Sự ion hóa được thực hiện theo kiểu va chạm ion (Electron Impact, EI mode) ở điện thế 70 eV và nhiệt độ 230°C . Phổ khối lượng được đặt trong khoảng m/z từ 40-500. Cột sắc ký được dùng trong phân tích là cột mao dẫn DB-23 (capillary column, 0,25 mm IDx30 m; J&W Scientific) với chương trình nhiệt độ là 80°C (trong 2 phút), tăng lên 210°C với tốc độ $8^\circ\text{C}/\text{phút}$ và giữ ở 210°C trong 15 phút.

d) Cách điều chế môi pheromone giới tính tổng hợp

Các bước điều chế môi pheromone giới tính tổng hợp hấp dẫn SKL ở ngoài đồng được mô tả theo Hình 3.7.

Sau khi đã tinh lọc hợp chất pheromone giới tính tổng hợp, sản phẩm tổng hợp này được pha loãng trong dung môi *n*-Hexane ở nồng độ 10 mg/ml (tương ứng 10 µg/µl). Sử dụng bơm micro syringe có dung tích 25 và 100 µl để hút dung dịch pha loãng ở các hàm lượng tương ứng, rồi nhồi vào tuýp cao su (0,8 cm OD rubber septum, Aldrich, Đức), kế tiếp đặt các tuýp cao su này vào tủ hút khoảng 10 phút để dung môi bay hơi. Sau đó, tuýp cao su này không thêm bất kỳ chất ổn định hay chất chống oxy hóa nào, được gói lại bằng giấy nhôm, dán nhãn và lưu trữ bảo quản trong điều kiện nhiệt độ lạnh đến khi đưa ra áp dụng ngoài đồng.



Hình 3.7: Các bước điều chế môi pheromone giới tính tổng hợp.
 (A) pheromone tổng hợp hòa tan trong *n*-Hexane (10 mg/ml);
 (B) pheromone tổng hợp được nhồi vào tuýp cao su;
 (C) đóng gói; (D) lưu trữ bảo quản lạnh.

3.2.2.2 Ứng dụng pheromone giới tính tổng hợp ở ngoài đồng

Pheromone giới tính tổng hợp của SKL sau khi đã thẩm định cấu trúc hóa học sẽ được trắc nghiệm sinh học bằng các thí nghiệm ngoài đồng để đánh giá hiệu quả hấp dẫn sùng bằng cách đặt bẫy trên đồng ruộng.

Mục tiêu: nhằm đánh giá hiệu quả hấp dẫn của pheromone giới tính tổng hợp đối với SKL ở điều kiện ngoài đồng tại tỉnh Vĩnh Long, làm cơ sở cho việc ứng dụng phòng trị sùng trên ruộng khoai lang.

a) Khảo sát hiệu quả hấp dẫn của pheromone giới tính tổng hợp đối với sùng khoai lang ở điều kiện ngoài đồng tại huyện Bình Tân, Vĩnh Long

**** Khảo sát hiệu quả hấp dẫn của pheromone giới tính tổng hợp ở các khối lượng/bẫy khác nhau đối với sùng khoai lang ở ngoài đồng***

Mục tiêu: nhằm đánh giá hiệu quả hấp dẫn của pheromone giới tính tổng hợp (3Z-12:E2) ở các mức khối lượng/bẫy đối với sùng khoai lang. Từ đó, xác định được khối lượng/bẫy cho hiệu quả hấp dẫn cao đối với sùng khoai lang ở điều kiện ngoài đồng.

Thời gian: thực hiện năm 2010.

Địa điểm: thí nghiệm được thực hiện trên ruộng khoai lang có diện tích 1.700 m², trồng giống khoai Tím Nhật ở thời điểm 3 tháng sau khi trồng tại xã Thành Lợi, huyện Bình Tân, tỉnh Vĩnh Long.

Thí nghiệm được bố trí theo thể thức khối hoàn toàn ngẫu nhiên gồm 7 NT (Bảng 3.2) với 3 lần lặp lại. Trong đó, NT từ A-1 đến A-6 là dãy khối lượng Z3-12:E2/bẫy và đối chứng là tuýp cao su chỉ bơm dung môi *n*-Hexane.

Bảng 3.2: Các nghiệm thức khảo sát hiệu quả hấp dẫn của pheromone giới tính tổng hợp ở các khối lượng/bẫy khác nhau đối với sùng khoai lang ở ngoài đồng, năm 2010

Thứ tự	Nghiệm thức	Thành phần pheromone giới tính tổng hợp	Khối lượng (mg/bẫy)
1	A-1	Z3-12:E2 tinh khiết	0,1
2	A-2	Z3-12:E2 tinh khiết	0,3
3	A-3	Z3-12:E2 tinh khiết	0,5
4	A-4	Z3-12:E2 tinh khiết	0,7
5	A-5	Z3-12:E2 tinh khiết	1,0
6	A-6	Z3-12:E2 chưa tinh khiết	0,3
7	A-7	<i>n</i> -Hexane (Đối chứng)	0

Ghi chú: từ A-1 tới A-7 là ký hiệu các nghiệm thức tương ứng với khối lượng pheromone giới tính tổng hợp sử dụng cho mỗi bẫy pheromone đã được bơm vào tuýp cao su

Chỉ tiêu ghi nhận: số lượng sùng đục vào bẫy định kỳ mỗi tuần/lần trong thời gian 4 tuần, tính trung bình số lượng sùng đục vào bẫy là con/bẫy/tuần. Tương tự cho các khảo sát sau cùng tiểu mục a.

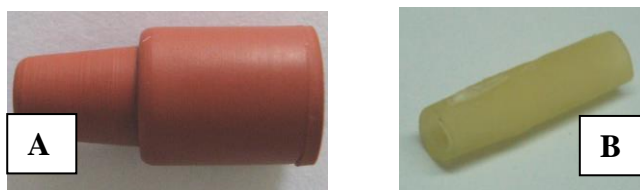
*** Khảo sát ảnh hưởng của kiểu tuýp môi lên hiệu quả hấp dẫn của pheromone giới tính tổng hợp đối với sùng khoai lang ở ngoài đồng**

Mục tiêu: so sánh kiểu tuýp cao su ngoại nhập (0,8 OD, rubber septum, Aldrich, Đức) với ống cao su non (Việt Nam) dùng làm môi để phóng thích pheromone giới tính tổng hợp nhằm tìm ra vật liệu thay thế tuýp cao su ngoại nhập theo hướng đơn giản, rẽ tiền, hiệu quả cao, phù hợp với vùng ĐBSCL.

Thời gian: thực hiện năm 2010.

Địa điểm: thí nghiệm được bố trí trên ruộng khoai lang Tím Nhật ở thời điểm 3 tháng sau khi trồng với diện tích 1.700 m² vào giai đoạn cây khoai đang phát triển củ tại xã Thành Lợi, huyện Bình Tân, tỉnh Vĩnh Long.

Thí nghiệm bố trí theo thể thức hoàn toàn ngẫu nhiên gồm 3 NT (Bảng 3.3) với 3 lần lặp lại, mỗi lần lặp lại tương ứng với 1 bẫy. Trong đó, kiểu tuýp môi của Aldrich là tuýp cao su ngoại nhập (Đức) và kiểu ống cao su non (Việt Nam) (dùng ghép cà chua) chứa pheromone tổng hợp là 0,5 mg/tuýp, đối chứng là bẫy không có môi pheromone. Thí nghiệm sử dụng bẫy dính có mái che (Takeda Chemical Ind., Ltd., Osaka, Nhật Bản) và môi pheromone đặt ở giữa tấm dính. Kiểu tuýp môi của Aldrich và ống cao su non được minh họa ở Hình 3.8.



Hình 3.8: Kiểu tuýp môi sử dụng trong thí nghiệm
(A) tuýp của Aldrich; (B) Tuýp cao su non

Bảng 3.3: Các nghiệm thức khảo sát ảnh hưởng của kiểu tuýp môi lên hiệu quả hấp dẫn của pheromone giới tính đối với sùng khoai lang ở ngoài đồng, năm 2010

Nghiệm thức	Kiểu tuýp môi	Khối lượng (mg/tuýp)
B-1	Tuýp của Aldrich	0,5
B-2	Tuýp cao su non	0,5
B-3	Đối chứng (bẫy không)	-

Ghi chú: từ B-1 và B-2 là ký hiệu các nghiệm thức tương ứng với kiểu tuýp môi pheromone giới tính tổng hợp sử dụng cho mỗi bẫy pheromone trong khảo sát ngoài đồng.

*** Khảo sát ảnh hưởng của kiểu bẫy lên khả năng hấp dẫn của pheromone giới tính tổng hợp đối với sùng khoai lang ở ngoài đồng**

Mục tiêu: nhằm so sánh các kiểu bẫy để chọn ra kiểu bẫy cho hiệu quả hấp dẫn cao đối với sùng đục, làm cơ sở khuyến cáo áp dụng ở ngoài đồng.

Thời gian: thực hiện năm 2010.

Địa điểm: thực hiện trên ruộng khoai Tím Nhật sau khi trồng 3,5 tháng với diện tích 1.200 m² vào giai đoạn cây khoai đang phát triển củ tại xã Thành Lợi, huyện Bình Tân, tỉnh Vĩnh Long.

Thí nghiệm được bố trí theo thể thức khối hoàn toàn ngẫu nhiên gồm 4 NT với 3 lần lặp lại, mỗi lần lặp lại tương ứng với 1 bẫy. Trong đó, có 2 kiểu bẫy (bẫy nước và bẫy dính), mỗi kiểu bẫy gồm 2 NT là môi pheromone (0,3 mg/tuýp) và môi dung môi *n*-Hexane (0,3 ml/tuýp). Cách đặt bẫy ngoài đồng và các kiểu bẫy nước và bẫy dính được mô tả ở tiểu mục 3.1.3 (kiểu bẫy pheromone). Các nghiệm thức bố trí trong thí nghiệm này trình bày ở Bảng 3.4.

Bảng 3.4: Các nghiệm thức khảo sát ảnh hưởng của kiểu bẫy lên khả năng hấp dẫn của pheromone giới tính tổng hợp đối với sùng khoai lang ở ngoài đồng, năm 2010

Nghiệm thức	Thành phần môi (mg/tuýp)	Dạng kiểu bẫy
C-1	Z3-12:E2 (0,3 mg)	bẫy nước (chai 1,5 lít)
C-2	<i>n</i> -Hexane (0,3 ml)	bẫy nước (chai 1,5 lít)
C-3	Z3-12:E2 (0,3 mg)	bẫy dính (Takeda)
C-4	<i>n</i> -Hexane (0,3 ml)	bẫy dính (Takeda)

Ghi chú: từ C-1 tới C-4 là ký hiệu các nghiệm thức tương ứng với các kiểu bẫy pheromone giới tính sử dụng trong khảo sát ngoài đồng.

*** Khảo sát ảnh hưởng của màu sắc bẫy lên khả năng hấp dẫn của pheromone giới tính tổng hợp đối với sùng khoai lang ở ngoài đồng**

Mục tiêu: nhằm khảo sát hiệu lực hấp dẫn của pheromone giới tính tổng hợp kết hợp với màu sắc bên ngoài bẫy đối với sùng đục ở ngoài đồng, làm cơ sở chọn lựa kiểu bẫy cho phù hợp với thực tế.

Thời gian: thực hiện năm 2010.

Địa điểm: bố trí trên ruộng khoai Tráng Sữa sau khi trồng 2 tháng với diện tích 2.000 m² vào giai đoạn cây đang phát triển củ tại xã Đông Bình, huyện Bình Minh, Vĩnh Long.

Thí nghiệm được bố trí theo thể thức khối hoàn toàn ngẫu nhiên gồm 4 NT với 3 lần lặp lại, mỗi lần lặp lại tương ứng với 1 bẫy. Các bẫy pheromone dùng trong thí nghiệm này là dạng bẫy nước như mô tả ở tiểu mục 3.1.3. Trong đó, 1 NT bẫy dán băng keo màu xanh dương, 1 NT bẫy dán băng keo màu vàng, 1 NT đối chứng là bẫy chai bình thường không có dán băng keo. Cả 3 NT đều có treo môi pheromone bên trong bẫy, môi là ống cao su non với pheromone giới tính là 0,5 mg/môi. Đối chứng không sử dụng môi pheromone. Các NT được trình bày ở Bảng 3.5 và màu sắc bẫy dán băng keo được minh họa ở Hình 3.9.

Bảng 3.5: Các nghiệm thức khảo sát ảnh hưởng của màu sắc bẫy lên khả năng hấp dẫn của pheromone giới tính tổng hợp đối với sùng khoai lang ở ngoài đồng, 2010

Nghiệm thức	Thành phần pheromone	Màu sắc bẫy
D-1	Z3-12:E2	Bẫy bình thường
D-2	Z3-12:E2	Bẫy dán keo màu xanh
D-3	Z3-12:E2	Bẫy dán keo màu vàng
D-4	Đối chứng	Bẫy bình thường

Ghi chú: từ D-1 tới D-4 là ký hiệu các nghiệm thức tương ứng với các màu sắc bẫy pheromone giới tính sử dụng trong khảo sát ngoài đồng.



Hình 3.9: Bẫy màu xanh và bẫy màu vàng đặt trên ruộng khoai lang

*** Khảo sát ảnh hưởng của độ cao đặt bẫy lên khả năng hấp dẫn của pheromone giới tính tổng hợp đối với sùng khoai lang ở ngoài đồng**

Mục tiêu: nhằm xác định độ cao đặt bẫy pheromone giới tính phù hợp cho hiệu quả hấp dẫn sùng đực vào bẫy nhiều nhất, làm cơ sở cho việc ứng dụng đặt bẫy pheromone giới tính ở ngoài đồng.

Thời gian: thực hiện năm 2010.

Địa điểm: thực hiện trên ruộng khoai Trắng Sữa sau khi trồng 2 tháng với diện tích 2.000 m² vào giai đoạn cây đang phát triển củ tại xã Đông Bình, huyện Bình Minh, Vĩnh Long.

Thí nghiệm được bố trí theo thể thức khối hoàn toàn ngẫu nhiên gồm 5 NT với 3 lần lặp lại. Mỗi lần lặp lại tương ứng với 1 bẫy. Độ cao đặt bẫy được tính từ tán lá khoai đến cửa bẫy, đặt cạnh luống khoai theo phương thẳng đứng sao cho cửa bẫy ngang tán lá khoai là mức 0 cm và độ cao của bẫy tăng dần lên tương ứng với các NT khảo sát. Mỗi pheromone chứa 0,5 mg/môi. Đối chứng không có môi và đặt cửa bẫy ngang với tán lá khoai (0 cm). Bẫy được giữ cố định bằng thanh tre cắm đứng xuống đất tại mỗi vị trí đặt bẫy. Các NT khảo sát được trình bày như ở Bảng 3.6.

Bảng 3.6: Các nghiệm thức khảo sát ảnh hưởng của độ cao đặt bẫy lên khả năng hấp dẫn của pheromone giới tính tổng hợp đối với sùng khoai lang ở ngoài đồng, 2010

Nghiệm thức	Thành phần pheromone	Độ cao đặt bẫy
E-1	Z3-12:E2	0 cm
E-2	Z3-12:E2	30 cm
E-3	Z3-12:E2	50 cm
E-4	Z3-12:E2	1 m
E-5	Đối chứng	0 cm

b) Khảo sát diễn biến mật số quần thể SKL bằng pheromone giới tính tổng hợp ở ngoài đồng tại tỉnh Vĩnh Long

Mục tiêu: nhằm khảo sát sự biến động mật số quần thể SKL ở ngoài đồng suốt 12 tháng. Từ đó, có thể đánh giá một cách tổng quan biến động mật số quần thể sùng trong suốt năm và qui luật phát sinh của sùng, thời gian xuất hiện cao điểm góp phần quản lý SKL có hiệu quả hơn ở điều kiện ngoài đồng.

Thời gian: thực hiện suốt 12 tháng, với thời gian cụ thể như sau.

Địa điểm: thực hiện tại 4 địa điểm tương ứng với 4 ruộng khoai lang.

- Địa điểm 1 và 2: bố trí từ ngày 21/7/2009 đến ngày 20/8/2010.

- Địa điểm 3 và 4: bố trí từ ngày 20/8/2009 đến ngày 20/8/2010.

- Địa điểm 1: Ruộng khoai lang của cô Nguyễn Thị Sánh tại ấp Đông Thuận, xã Đông Bình, huyện Bình Minh, Vĩnh Long với giống khoai Trắng Sữa, diện tích 4.000 m². Xung quanh ruộng khảo sát có trồng đậu phộng, đậu xanh, khoai mì, còn có nhiều loài cỏ dại. Ruộng xuống giống từ tháng 7/2009 và thu hoạch vào tháng 10/2009, ruộng canh tác bình thường theo tập quán của nông dân tại địa phương, nơi đây chỉ trồng 1 vụ khoai lang trong năm, sau đó chuyển sang luân canh với cây trồng khác.

- Địa điểm 2: Ruộng khoai lang của chú Lê Văn Trung tại ấp Thành Nhân, xã Thành Lợi, huyện Bình Tân, Vĩnh Long, với giống khoai Tím Nhật, diện tích 5.000 m². Xung quanh ruộng khảo sát có trồng các loại cây ngắn ngày như bắp, cải, đậu xanh, hành lá, cây ăn trái như xoài, chuối, mít, nhãn,... Ruộng xuống giống từ tháng 6/2009 và thu hoạch vào tháng 10/2009, vụ sau từ tháng 12/2009 đến tháng 4/2010, ruộng canh tác bình thường theo tập quán của nông dân tại địa phương, nơi đây thường trồng khoai lang 2 vụ trong năm, sau đó chuyển sang luân canh với cây trồng khác.

- Địa điểm 3: Ruộng khoai lang của chú Phạm Minh Tâm tại ấp Tân Thuận, xã Tân Quới, huyện Bình Tân, Vĩnh Long, với giống khoai Tím Nhật, diện tích 12.000 m². Xung quanh ruộng khảo sát là các ruộng lúa và cây ăn trái như xoài, chuối, mít. Ruộng xuống giống từ tháng 5/2009 và thu hoạch vào tháng 9/2009, ruộng canh tác bình thường theo tập quán của nông dân tại địa phương, nơi đây chỉ trồng 1 vụ khoai lang trong năm, sau đó chuyển sang luân canh với cây trồng khác.

- Địa điểm 4: Ruộng khoai lang của chú Nguyễn Văn Huy tại ấp Hưng Lợi, xã Tân Hưng, huyện Bình Tân, Vĩnh Long, với giống khoai Tím Nhật, diện tích 4.000 m². Xung quanh ruộng khảo sát là các ruộng trồng lúa và các loại cây ngắn ngày như dưa hấu, bí đao, cà tím, đậu đũa, mướp,... Ruộng xuống giống từ tháng 5/2009 và thu hoạch vào tháng 9/2009, ruộng canh tác bình thường theo tập quán của nông dân tại địa phương, nơi đây chỉ trồng 1 vụ khoai lang trong năm, sau đó chuyển sang luân canh với cây trồng khác.

Cách tiến hành: khảo sát diễn biến được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên, đặt 3 bẫy nước (0,5 mg Z3-12:E2/bẫy) theo chiều dài trên mỗi ruộng. Khoảng cách giữa các bẫy tương đối đều nhau từ 30-50 m. Mỗi pheromone được thay mới định kỳ 2 tháng/lần liên tiếp trong 12 tháng.

Chỉ tiêu ghi nhận: đếm số lượng sùng đực vào bẫy định kỳ 2 tuần/lần trong 12 tháng. Khi lấy chỉ tiêu là đổ hết nước trong bẫy vào vợt lược, đếm số lượng sùng đực vào bẫy, sau đó thay nước mới có xà phòng vào bẫy.

Xử lý số liệu: kết quả được xử lý bằng chương trình Microsoft Excel dưới dạng đồ thị biểu diễn sự biến động số lượng sùng đực vào bẫy trong 12

tháng. Số liệu khí tượng thời tiết gồm lượng mưa và nhiệt độ trung bình 2 tuần/lần do Trung tâm Khí tượng Thủy văn tỉnh Vĩnh Long cung cấp.

c) Khảo sát hiệu quả phòng trị sùng khoai lang bằng bẫy tập hợp của pheromone giới tính tổng hợp ở ngoài đồng tại huyện Bình Tân, Vĩnh Long

Mục đích: nhằm đánh giá hiệu quả phòng trị của pheromone giới tính tổng hợp đối với SKL ở điều kiện ngoài đồng. Từ đó, làm cơ sở cho việc khuyến cáo ứng dụng thực tế quản lý SKL góp phần giảm thiểu hoặc thay thế dần việc sử dụng thuốc trừ sâu hóa học ảnh hưởng tới môi trường và con người.

Thời gian: thực hiện 2 thí nghiệm tương ứng với 2 vụ khoai lang.

- Vụ 1 (mùa thuận) từ tháng 01 đến tháng 5 năm 2010. Cả 3 NT A, B, C đều có diện tích 2.000 m² tại xã Thành Đông trồng vào ngày 30/12/2009.

- Vụ 2 (mùa nghịch) từ tháng 8 đến tháng 12 năm 2010. NT A (6.000 m²) và NT B (2.000 m²) tại xã Thành Đông trồng vào ngày 12/8/2010. NT C (2.000 m²) tại xã Thành Lợi trồng vào ngày 15/8/2010.

Địa điểm: thực hiện tại khu vực chuyên canh khoai lang Tím Nhật phổ biến tại xã Thành Đông, huyện Bình Tân, tỉnh Vĩnh Long.

Ở mỗi vụ khoai, thí nghiệm gồm 3 NT tương ứng với 3 ruộng khoai khác nhau được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên trên cùng địa bàn. Các khâu kỹ thuật canh tác, chăm sóc, bón phân, tưới nước ở cả 3 NT đều tương đối giống nhau, chỉ khác nhau việc sử dụng thuốc trừ sâu hóa học phòng trị sùng ở đối chứng và hạn chế tối đa việc dùng thuốc trừ sâu ở 2 NT đặt bẫy pheromone.

Bẫy pheromone được bố trí đều trên ruộng khoai lang, bắt đầu đặt bẫy sau khi trồng khoảng 10-15 ngày, sử dụng bẫy nước và mùi pheromone được thay mới 2 tháng/lần, nước có pha ít xà phòng trong bẫy được thay mới định kỳ 2 tuần/lần cùng lúc với lấy chỉ tiêu sùng đực vào bẫy.

Ở mỗi thí nghiệm, trong đó NT A là 6 bẫy/1.000 m², NT B là 12 bẫy/1.000 m² và NT C là đối chứng (áp dụng phòng trị sùng theo tập quán của nông dân) được bố trí ngay từ đầu vụ.

Ở vụ 1, NT A sử dụng thuốc trừ sâu 2 lần trong suốt vụ. Lần đầu, sử dụng thuốc thế hệ mới Regent 0.3G (hoạt chất Fipronil) được rải với liều lượng 1,5 kg/1.000 m² ở thời điểm 12 NSKT. Lần sau, sử dụng thuốc sinh học Map winner 5WG (Emamectin benzoate) được phun với liều lượng 4 g/bình 16 lít, phun 3 bình/1.000 m² ở thời điểm 24 NSKT để phòng trị nhóm sâu ăn lá. Ngoài ra, nông dân còn sử dụng thuốc trừ bệnh trên các ruộng khoai thí nghiệm khoảng 10-12 lần trong suốt vụ.

NT C, nông dân sử dụng thuốc trừ sâu hóa học như SecSaigon 5EC (Cypermethrin), Serpal super 550EC (Chlorpyrifos Ethyl và Cypermethrin) và Cyrin super 250EC (Cypermethrin) được sử dụng luân phiên, định kỳ 7 ngày/lần bắt đầu từ 3 NSKT đến khi thu hoạch. Các loại thuốc trừ bệnh như Validan 3DD (Validamycin A), Anvil 5SC (Hexaconazole) sử dụng luân phiên, định kỳ 10 ngày/lần bắt đầu từ 30 NSKT đến thu hoạch.

Ở vụ 2, NT A và B đã sử dụng 1 lần thuốc trừ cỏ ở thời điểm 30 NSKT, 2 lần thuốc trừ sâu Sherbush 10ND (Cypermethrin) với liều lượng 50 ml/16 lít, phun 3 bình/1.000 m² phòng trị sâu ăn lá ở thời điểm 3 và 60 NSKT. Ngoài ra, nông dân còn sử dụng thuốc trừ bệnh trên các ruộng khoai khoảng 10-12 lần trong suốt vụ.

NT C, nông dân sử dụng thuốc trừ sâu hóa học như Cyrin super 250EC (Cypermethrin) và SecSaigon 5EC (Cypermethrin) hỗn hợp với nhau, phun định kỳ 5-7 ngày/lần trong suốt vụ với liều lượng gấp đôi khuyến cáo. Ngoài ra, nông dân còn sử dụng thuốc trừ bệnh trên ruộng khoai là Jiavin 5SC (Hexaconazole) và Validan 3DD (Validamycin A) phun 10-12 lần trong suốt vụ. Các chỉ tiêu ghi nhận như sau:

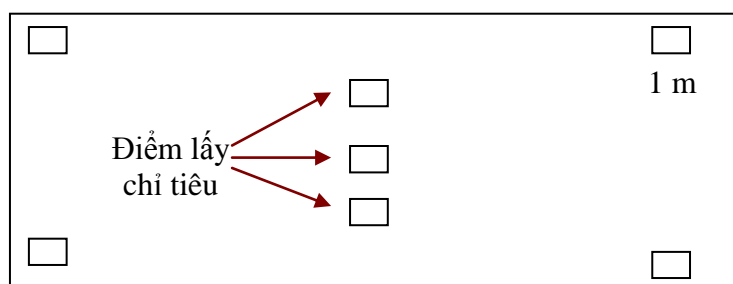
- Điều tra thành phần côn trùng gây hại và thiên địch định kỳ 2 tuần/lần trong suốt vụ từ 15 NSKT đến thu hoạch (tương tự như ở tiểu mục 3.2.1.2), cách chọn điểm lấy chỉ tiêu trên ruộng tương tự như ở Hình 3.4.

- Số lượng sùng đục vào bẫy ở 2 NT A và B định kỳ 2 tuần/lần kết hợp với thay nước trong bẫy, sau 2 tháng đặt bẫy thay mới mới trên 2 NT này.

- Đánh giá chỉ tiêu thiệt hại củ do sùng ở ngoài vỏ, trong củ và trọng lượng củ ghi nhận ở 3 thời điểm 2,5, 3,5, 4,5 tháng SKT. Tại mỗi ruộng chọn 7 điểm cố định ghi nhận chỉ tiêu thiệt hại củ bao gồm 4 điểm xung quanh và 3 điểm ở trung tâm theo sơ đồ như ở Hình 3.10. Tại mỗi điểm, thu toàn bộ số củ trên 1 m chiều dài luống khoai để riêng theo từng điểm thu củ, sau đó chuyển về phòng thí nghiệm, rửa sạch và ghi nhận các chỉ tiêu sau:

- + Tỷ lệ (%) củ bị sùng gây hại ở ngoài vỏ và trong củ (Hình 3.11). Củ khoai không bị hại là hoàn toàn không bị sùng gây hại cả ngoài vỏ và trong củ.

- + Số lượng củ và trọng lượng củ trung bình ở mỗi nghiệm thức.



Hình 3.10: Vị trí các điểm thu củ khoai lang trên ruộng thí nghiệm



Hình 3.11: Củ khoai sau khi rửa sạch kiểm tra sùng gây hại bên ngoài vỏ và trong củ trên giống khoai lang Tím Nhật

*** Theo dõi diễn biến số lượng sùng vào bẫy pheromone sau khi thu hoạch tại các ruộng khoai lang thí nghiệm thuộc huyện Bình Tân, Vĩnh Long.**

Tại các ruộng thí nghiệm ở vụ 1, sau khi thu hoạch khoai lang tiến hành đặt bẫy pheromone với số lượng là 3 bẫy/ruộng. Theo dõi số lượng sùng đực vào bẫy trong vòng 3 ngày để khảo sát thêm sự hiện diện của sùng khoai lang ngoài đồng.

Chỉ tiêu ghi nhận: trung bình số lượng sùng đực vào bẫy/ngày.

3.2.3 Nghiên cứu về nấm ký sinh trên sùng khoai lang trong phòng thí nghiệm

Các khảo sát đều thực hiện tại PTN PTSH, Bộ môn Bảo vệ Thực vật, Khoa Nông Nghiệp và Sinh học ứng dụng, trường Đại Học Cần Thơ.

Thời gian: thực hiện từ năm 2010 đến năm 2012.

Phân lập, nuôi cấy, khảo sát đặc điểm hình thái các mẫu phân lập (MPL) nấm *Metarhizium* thu ngoài tự nhiên tại PTN. Các MPL được gửi quan sát hình dạng bào tử và cơ quan sinh bào tử bằng kính hiển vi điện tử (SEM) tại Phòng thí nghiệm Chuyên sâu, Trường Đại Học Cần Thơ.

Chiết xuất DNA, phản ứng PCR được thực hiện tại PTN PTSH. Sản phẩm PCR của các MPL được gửi giải trình tự DNA tại Trung tâm Công Nghệ Sinh Học Thành phố Hồ Chí Minh.

Các MPL nấm *Metarhizium* thu thập tại các tỉnh vùng ĐBSCL trên côn trùng bị nấm ký sinh ngoài tự nhiên sử dụng cho các nghiên cứu.

3.2.3.1 Phân lập và định danh loài từ chi nấm *Metarhizium* ký sinh trên côn trùng theo phương pháp phân loại truyền thống

Thu thập các mẫu côn trùng bị nấm ký sinh ngoài tự nhiên mang về PTN PTSH để phân lập, xác định loài nấm. Nuôi cấy các MPL trên môi trường PDA và SDAY₃. Định danh nấm dựa theo khóa phân loại của Barnett & Barry (1998), Lawrence (1994) và Luangsa *et al.* (2006).

Các MPL được đặt tên ký hiệu theo ký tự: tên nấm+tên ký chủ+địa điểm thu mẫu, viết tắt bằng chữ cái đầu như Ma_SAT-CT: chủng nấm *Metarhizium* phân lập trên sâu ăn tạp thu mẫu tại Cần Thơ. Các chỉ tiêu theo dõi:

** Đặc điểm khuẩn lạc*

Cách mọc của sợi nấm, màu sắc khuẩn lạc, sự phân bố các vòng bào tử được quan sát bằng mắt thường và ghi nhận 1 lần lúc 10 ngày sau khi cấy nấm vào đĩa petri có môi trường SDAY₃.

** Đặc điểm cơ quan sinh bào tử và hình dạng bào tử*

Các MPL ở thời điểm 4 ngày sau khi cấy được quan sát dưới kính hiển vi điện tử. Mỗi đĩa lấy 1 mẫu, mô tả và ghi nhận các đặc điểm cấu trúc cành bào đài, hình dạng thể bình và bào tử nấm.

3.2.3.2 Phân loại, xác định loài nấm *Metarhizium* dựa vào trình tự vùng ITS-rDNA theo phương pháp sinh học phân tử

a) Chiết xuất DNA tổng số

Mỗi mẫu nấm nuôi cấy trong các đĩa petri (đường kính 9 cm) có môi trường SDAY₃, ủ nấm khoảng 3-5 ngày ở điều kiện nhiệt độ 25-30⁰C. Nấm đã phát triển hệ sợi nấm (khuẩn ty) trên môi trường SDAY₃ thì tiến hành ly trích DNA qua các bước sau:

- Dùng tăm nhọn đã thanh trùng lấy vài sợi nấm (khoảng 5-7 mm²) cho vào ống eppendorf có sẵn 500 µl lysis buffer, nghiền những sợi nấm này và cho 1/100 V proteinase K vào lắc nhẹ vài lần. Sau đó, ủ mẫu nấm trong thời gian 3 giờ ở nhiệt độ 55⁰C.

- Sau đó cho 300 µl dung dịch PCI (25:24:1) vào mẫu, lắc hỗn hợp này bằng máy Voltex khoảng 15-20 giây. Kế tiếp đem hỗn hợp này ly tâm lạnh với tốc độ 12.000 vòng/phút, trong thời gian 5 phút ở nhiệt độ 4⁰C. Kế đến, dùng micropipette hút nhẹ nhàng, cẩn thận lớp dung dịch phía trên, chuyển qua ống eppendorf mới, loại bỏ tạp chất lắng bên dưới (công đoạn này lặp lại 2 lần).

- Cho 2 V ethanol (99,5%) vào ống eppendorf vừa loại bỏ tạp chất, lắc nhẹ và đem ly tâm lạnh với tốc độ 16.000 vòng/phút, trong thời gian 3 phút ở nhiệt độ 4⁰C. Tiếp theo loại bỏ hết phần nước phía trên, chỉ giữ lại phần cô đặc lắng dưới đáy ống eppendorf. Sau đó, cho thêm 300 µl ethanol (70%) vào ống lắc nhẹ vài lần và ly tâm lạnh với tốc độ 16.000 vòng/phút, trong thời gian 3 phút ở nhiệt độ 4⁰C. Sau khi ly tâm xong, tiến hành làm bay hơi dung dịch trong ống eppendorf và giữ mẫu nấm ly trích trong 50 µl MQ (hay TE buffer), rồi ủ mẫu ở nhiệt độ 65⁰C khoảng 1 giờ. Thu nhận được DNA của mẫu nấm ly trích và trữ mẫu ở nhiệt độ 4⁰C, xong công đoạn ly trích mẫu.

b) Kiểm tra DNA bằng kỹ thuật điện di (Agarose gel electrophoresis)

Chuẩn bị gel 1%: cân 1 g agar và 100 ml 1xTAE buffer cho vào cốc nhỏ, đun nóng cho dung dịch gel tan đều không còn tạo bọt trong lò vi sóng với thời gian 3-4 phút. Sau đó lấy cốc ra, để nguội dần tới 50-60⁰C, tiến hành đổ gel vào khuôn đã lắp ráp sẵn, dùng miếng drap nilon phủ đậy lại khoảng 20-30 phút cho gel đông cứng. Các công đoạn chuẩn bị gel agarose 1% để thực hiện phản ứng PCR được minh họa như ở Hình 3.12.

Khi gel đã đông cứng, tiến hành đổ dung dịch đệm 1xTAE buffer vào, từ từ nhấc khuôn lên. Đặt khuôn vào buồng điện di có sẵn dung dịch đệm 1xTAE buffer, sao cho dung dịch đệm chạy cao hơn mặt gel khoảng từ 3-5 mm.

Nạp DNA: hút dung dịch DNA với 6xloading buffer (5:1) chấm vào giấy parafin, hút lên xuống vài lần cho hỗn hợp được trộn đều. Sau đó, dùng micropipette hút hết hỗn hợp cho vào các giếng được khoét sẵn trong miếng gel agar đã chuẩn bị sẵn trước đó. Hỗn hợp hóa chất theo tỉ lệ như ở Bảng 3.7.

Công đoạn tiếp theo là chạy điện di 20 phút với dòng điện là 100 Volt.

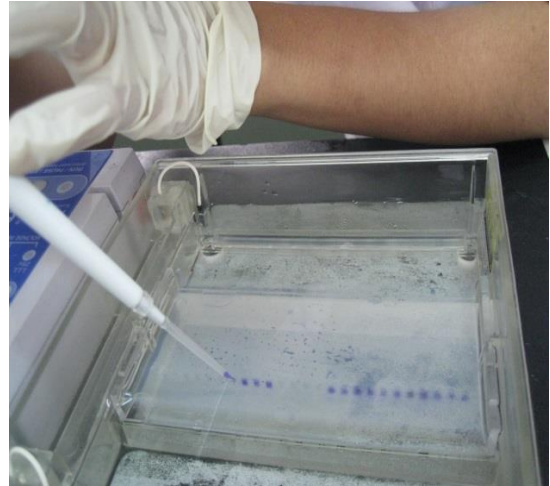
Sau khi chạy điện di xong, tiến hành nhuộm gel trong dung dịch Ethidium bromide (EtBr) với thời gian 30 phút, lấy gel ra và cho vào buồng ánh sáng có tia UV để chụp hình huỳnh quang DNA. Sau khi kiểm tra DNA và phát hiện mẫu có DNA thì tiến hành phản ứng PCR (Hình 3.13).

Thể tích mẫu, loading buffer và marker cho 1 giếng trên gel agarose

Hóa chất	Thể tích (μl)
Mẫu DNA	5
6 x loading buffer	1
Marker 100 bp	3



Chuẩn bị gel agarose 1%



Cho mẫu DNA ly trích vào giếng điện di trên gel agarose 1%

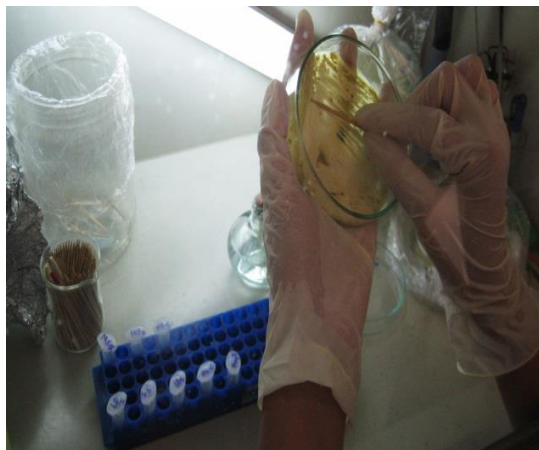


Buồng tối dùng chụp ảnh gel

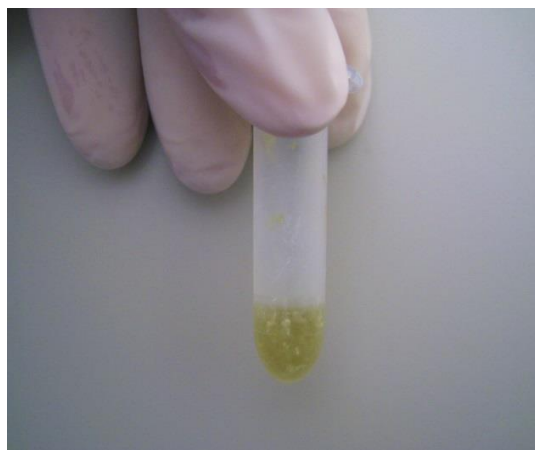


Máy phản ứng PCR hiệu Takara sử dụng để khuếch đại DNA

Hình 3.12: Công đoạn chuẩn bị gel agarose thực hiện phản ứng PCR



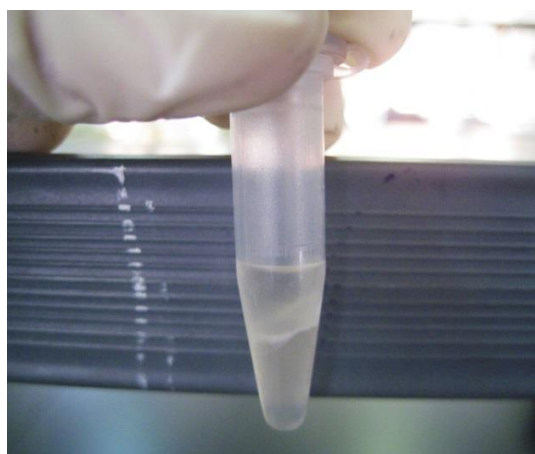
Chuyển sợi nấm phân lập cho vào 500 μ l lysis buffer



Ống eppendorf chứa mẫu nấm ly trích



Máy ly tâm thu dịch trích DNA



Mẫu dịch trích DNA sau ly tâm

Hình 3.13: Công đoạn ly trích DNA của các mẫu phân lập nấm thu thập

c) Phản ứng PCR khuếch đại vùng ITS-rDNA

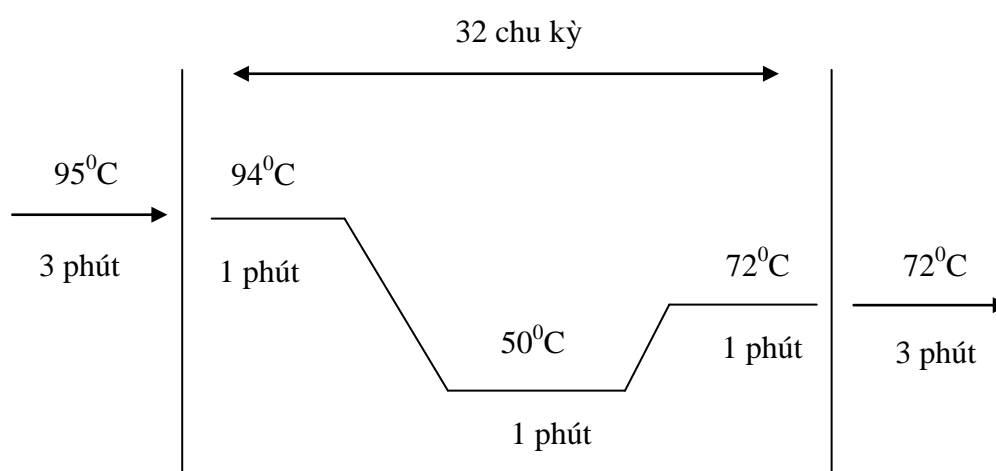
- Sử dụng primer, taq DNA polymerase, dNTP, $MgCl_2$, số chu kỳ nhiệt thích hợp cho phản ứng tùy thuộc vào từng loài nấm, cụ thể cho nấm *Metarhizium* thể hiện ở Hình 3.14.

- Chuẩn bị xong hỗn hợp phản ứng, tiến hành chạy phản ứng PCR trên máy hiệu Takara (Nhật Bản) cho các mẫu DNA đã được ly trích từ các chủng nấm *Metarhizium*. Sử dụng các primer ITS₁ và ITS₄ với chu trình nhiệt 32 chu kỳ và giữ ở nhiệt độ 4⁰C (Hình 3.14). Sau khi thực hiện phản ứng PCR xong, tiến hành kiểm tra sản phẩm trên gel agarose 1%, nồng độ hóa chất sử dụng và các bước thực hiện tương tự như phần kiểm tra DNA bằng sắc ký gel agarose.

- Thê tích các hóa chất sử dụng trong phản ứng PCR (Bảng 3.10):

Bảng 3.7: Thể tích các thành phần hóa chất sử dụng trong phản ứng PCR

Hóa chất	Thể tích (μl)
MQ	15,5
x10 buffer	2,0
x1 dNTP	0,1
primer Forward	0,4
primer Reverse	0,4
MgCl ₂	0,5
Taq polymerase	0,1
DNA mẫu	1,0
Tổng cộng: 20 μl/tube	



Hình 3.14: Chu trình nhiệt của nấm *Metarhizium* với primer ITS₁ và ITS₄

d) Giải trình tự vùng ITS-rDNA

Vùng ITS-rDNA được giải trình tự bằng 2 primer ITS1 và ITS4, trình tự DNA của mẫu ly trích nấm phân lập để so sánh với các trình tự vùng ITS-rDNA của các mẫu nấm *Metarhizium* trên thế giới đã xác định tên loài nấm, từ cơ sở dữ liệu của ngân hàng gen (Genbank) làm cơ sở xác định tên loài nấm của các MPL *Metarhizium* thu thập tại các tỉnh vùng ĐBSCL.

Sau đó, từ các cơ sở dữ liệu thu được qua giải trình tự vùng ITS-rDNA sử dụng chương trình Clustal X 2.1 để so sánh trình tự vùng ITS của các MPL và sử dụng chương trình TreeView để vẽ cây phân nhánh xác định loài nấm.

3.2.3.3 Khảo sát hiệu lực của các mẫu phân lập *Metarhizium* đối với SKL trong điều kiện phòng thí nghiệm

Khảo sát được thực hiện tại PTN PTSH, Bộ môn BVTV, Khoa Nông Nghiệp và Sinh học ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ từ tháng 4-8/2011.

Mục tiêu: nhằm đánh hiệu quả gây chết sùng khoai lang của các mẫu nấm xanh *Metarhizium* thu thập từ ngoài tự nhiên, sử dụng cho các thí nghiệm.

*** Chuẩn bị nguồn sùng khoai lang**

Thu mẫu khoai bị nhiễm sùng từ những ruộng sau thu hoạch tại huyện Bình Tân, tỉnh Vĩnh Long đem về PTN. Mẫu khoai bị sùng được nuôi trong các hộp nhựa có đậy bằng vải mùng ở điều kiện phòng. Sau khi vũ hóa, SKL được nuôi trong hộp nhựa có củ khoai làm thức ăn. Sau đó, tiến hành lựa chọn sùng khỏe mạnh làm thí nghiệm.

*** Chuẩn bị huyền phù dung dịch nấm**

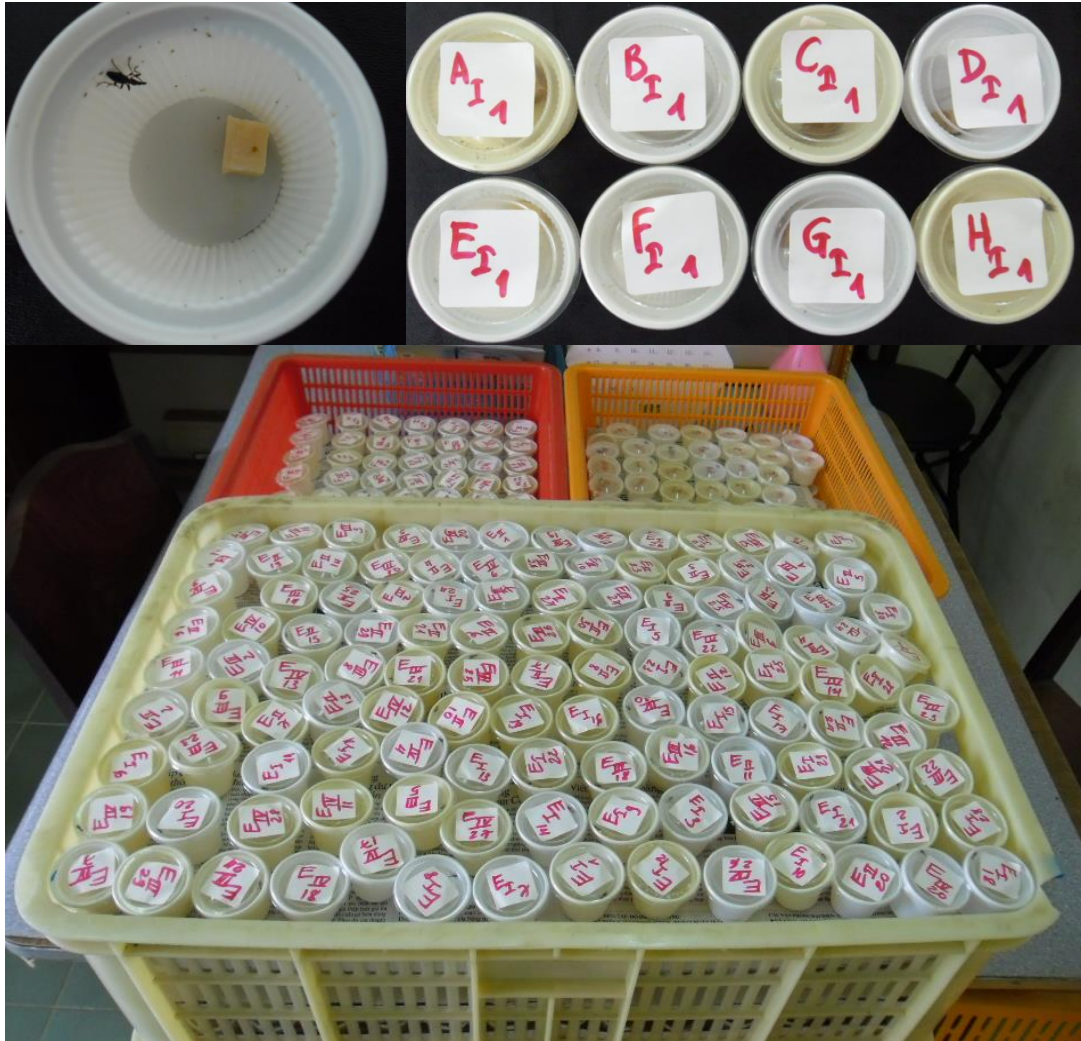
Các MPL nấm *Metarhizium* được nuôi cấy trên môi trường SDAY₃ cho nấm phát triển và sinh ra nhiều bào tử (Trần Văn Hai, 2005). Sau đó, tiến hành cạo nấm trên môi trường nuôi cấy để thu lấy bào tử, đếm mật số và tạo huyền phù bào tử có mật số 10^8 bào tử/ml dùng làm thí nghiệm.

*** Bố trí thí nghiệm**

Tiến hành thí nghiệm sau khi chuẩn bị đủ nguồn SKL và nấm xanh *Metarhizium*. Thí nghiệm bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên gồm 8 NT với 4 lần lặp lại, mỗi lặp lại gồm 30 SKL, mỗi sùng nuôi riêng trong hộp nhựa nhỏ có lót giấy thấm giữ ẩm và có thức ăn là miếng củ khoai lang (Hình 3.15).

Sử dụng huyền phù nấm 5×10^8 bào tử/ml. Dung dịch bào tử nấm được pha loãng ở nồng độ thí nghiệm với 0,05% Tween 20 xử lý trực tiếp lên SKL với liều lượng khoảng 40 ml cho 1 chủng nấm phân lập.

Chỉ tiêu ghi nhận: đếm số lượng sùng chết và tính độ hữu hiệu (%) của ở các thời điểm 2, 3, 4 và 5 NSKXL. Mỗi lần lấy chỉ tiêu ghi nhận nhiệt độ và ẩm độ rồi tính trung bình.



Hình 3.15: Thí nghiệm xử lý nấm *Metarhizium* trên thành trùng SKL trong điều kiện phòng thí nghiệm, năm 2011

3.2.3.4 Khảo sát hiệu lực gây chết của nấm xanh (*M. anisopliae*) ở các mật số bào tử khác nhau đối với sùng khoai lang trong phòng thí nghiệm

Mục tiêu: nhằm xác định mật số bào tử nấm xanh (*Ma*) cho hiệu lực gây chết cao đối với thành trùng SKL trong điều kiện phòng thí nghiệm.

Thí nghiệm được bố trí theo thể thức hoàn toàn ngẫu nhiên gồm 5 NT với 3 lần lặp lại. Mỗi lần lặp lại gồm 30 sùng sau khi thoát ra khỏi củ khoai.

Cách tiến hành: cho số lượng sùng ở mỗi lần lặp lại của 1 NT vào 1 đĩa petri. Ở mỗi đĩa petri tiến hành rót 10 ml dung dịch bào tử nấm xanh (*Ma*) đã được pha loãng ở nồng độ tương ứng và sau 30 giây thì rót dung dịch nấm ra ngoài. Sau đó, sùng được tách riêng từng con cho vào hộp nhựa có chứa sẵn mẫu khoai lang tươi làm thức ăn và miếng bông gòn thấm nước cất tạo độ ẩm. Riêng đối chứng sử dụng nước cất thay cho dung dịch nấm xanh (Bảng 3.11).

Bảng 3.8: Các nghiệm thức khảo sát hiệu lực gây chết của nấm xanh (*Ma*) ở các mật số bào tử khác nhau đối với thành trùng SKL trong phòng thí nghiệm, năm 2012

Nghiệm thức	Thành phần, mật số bào tử/ml
<i>Ma</i> -10 ⁹	Dung dịch nấm xanh (<i>Ma</i>) (10 ⁹ bào tử/ml)
<i>Ma</i> -10 ⁸	Dung dịch nấm xanh (<i>Ma</i>) (10 ⁸ bào tử/ml)
<i>Ma</i> -10 ⁷	Dung dịch nấm xanh (<i>Ma</i>) (10 ⁷ bào tử/ml)
<i>Ma</i> -10 ⁶	Dung dịch nấm xanh (<i>Ma</i>) (10 ⁶ bào tử/ml)
Đối chứng	Nước cất thanh trùng

Cách lấy chỉ tiêu: ghi nhận tỉ lệ sùng chết vào các thời điểm 3, 5, 7, 9, 11, 13 NSKC, nhiệt độ và ẩm độ trong quá trình thí nghiệm, hiệu lực của nấm xanh được tính theo công thức Abbott (1925).

Khảo sát hiệu lực của nấm xanh (*Ma*) ở nhiệt độ 25⁰C:

Khảo sát hiệu lực của nấm xanh tương tự như thí nghiệm trên.

Các NT xử lý nấm xanh pha với tỉ lệ 0,4 µl chất bám dính Thần Hồ/10 ml dung dịch bào tử nấm. NT đối chứng pha nước cất thanh trùng với chất bám dính Thần Hồ (0,4 µl/10 ml nước cất).

Cách tiến hành: tương tự thí nghiệm trên, sau khi thực hiện xong thì các hộp nhựa thả sùng đặt vào phòng lạnh ở điều kiện nhiệt độ 25⁰C.

Chỉ tiêu ghi nhận và tính hiệu lực của nấm tương tự như thí nghiệm trên.

3.2.3.5 Khảo sát khả năng ký sinh của nấm xanh (*Ma*) trong quần thể SKL qua các hình thức xử lý khác nhau trong điều kiện phòng thí nghiệm

Mục tiêu: nhằm khảo sát hiệu lực ký sinh gây chết của nấm xanh (*Ma*) đối với quần thể SKL qua các hình thức xử lý khác nhau trong điều kiện PTN.

Khảo sát được bố trí theo thể thức hoàn toàn ngẫu nhiên với 5 NT và 3 lần lặp lại. Mỗi lần lặp lại gồm 30 SKL cho vào hộp nhựa lớn. Các nghiệm thức của thí nghiệm được trình bày ở Bảng 3.12.

Bảng 3.9: Các nghiệm thức khảo sát khả năng ký sinh gây chết của nấm xanh (*Ma*) qua các hình thức xử lý khác nhau đối với thành trùng SKL trong PTN, năm 2012

Nghiệm thức	Thành phần nghiệm thức áp dụng
Dạng nấm tươi+rãi	Dạng nấm tươi + rãi (2 g/hộp)
Dạng nấm tươi+phun	Dạng nấm tươi hòa với nước+phun (10 ⁸ bào tử/ml, phun 20 giây, tương đương 5 ml)
Nấm bột khô+rãi	Dạng nấm bột khô + rãi (1 g/hộp)
Nấm bột khô+phun	Dạng nấm bột khô hòa vào nước+phun (10 ⁸ bào tử/ml, phun 20 giây, tương đương 5 ml)
Đối chứng	Nước cất thanh trùng + phun



Dạng nấm bột khô rải và phun

Dạng nấm tươi rải và phun

Hình 3.16: Khảo sát khả năng ký sinh của nấm xanh qua hai hình thức rải và phun nấm đối với quần thể SKL trong các hộp nhựa lớn

Cách tiến hành: tùy theo NT tiến hành xử lý bằng cách rải hoặc phun các dạng nấm vào lớp mụn sơ dừa đã thanh trùng bằng Autoclave ở 121°C trong 30 phút được nén chặt dưới đáy hộp nhựa kích thước (15x15x24 cm) nhằm giữ ẩm độ và tạo môi trường như tự nhiên, bên trên để miếng khoai làm thức ăn (Hình 3.16). Cho vào hộp nhựa 30 sùng khỏe mạnh thoát ra từ củ khoai bị nhiễm sùng.

Chỉ tiêu: tỉ lệ sùng chết do bị nhiễm nấm xanh ở các thời điểm 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 và 24 NSKXL, nhiệt độ và ẩm độ khi lấy chỉ tiêu thí nghiệm.

3.2.4. Khảo sát hiệu quả ứng dụng của pheromone giới tính tổng hợp kết hợp với nấm xanh (*Ma*) phòng trị sùng khoai lang

3.2.4.1 Khảo sát khả năng lây lan bệnh của sùng đực sau khi tiếp xúc với pheromone giới tính và nấm xanh (*Ma*) trong điều kiện phòng thí nghiệm

Mục tiêu: nhằm khảo sát khả năng lan bệnh và gây chết sùng của các dạng nấm xanh khi sùng đực tiếp xúc pheromone tổng hợp và nhiễm nấm xanh.

Khảo sát được bố trí theo thể thức hoàn toàn ngẫu nhiên với 4 NT và 3 lần lặp lại. Mỗi lần lặp lại gồm 5 sùng đực đã tiếp xúc pheromone giới tính và nhiễm nấm xanh ở các dạng khác nhau (đối chứng dùng nước cất thanh trùng) và 150 sùng khỏe chia đều vào 5 hộp nhựa (15x15x24 cm). Mỗi hộp nhựa bao gồm thả 1 sùng đực đã tiếp xúc pheromone và nhiễm nấm xanh vào quần thể 30 sùng khỏe mạnh thoát ra từ củ khoai. Các NT được mô tả như ở Bảng 3.13.

Cách thực hiện: tiến hành hấp dẫn sùng đực và lây nhiễm nấm xanh bằng cách thực hiện các bẫy như ở Hình 3.17. Hộp nhựa lớn (12x12x18 cm) được cắt thành 3 cửa bẫy xung quanh hộp, phần đáy hộp để nấm xanh dạng dung dịch, nấm tươi và bột khô hoặc nước cất thanh trùng tùy theo NT. Để bẫy gần rễ khoai lang nuôi sùng, chờ sùng bay vào bẫy tiếp xúc pheromone và rơi xuống đáy hộp tiếp xúc với nấm xanh, sau đó sùng bò ra bên ngoài thì dùng kẹp gấp cho vào hộp nhựa lớn đã chuẩn bị sẵn gồm 30 SKL khỏe mạnh không bị nhiễm nấm và 1 củ khoai lang. Bên dưới đáy hộp rải 1 lớp mụn sơ dừa đã thanh trùng bằng Autoclave ở 121°C trong 30 phút để giữ ẩm và tạo môi trường như tự nhiên.

Bảng 3.10: Các nghiệm thức khảo sát khả năng lây lan bệnh của nấm xanh (*Ma*) từ sùng đực bị nhiễm nấm trong quần thể SKL ở điều kiện PTN, năm 2012

Nghiệm thức	Thành phần nghiệm thức áp dụng
Dung dịch	Pheromone + Dạng dung dịch từ đĩa petri (10^8 bào tử/ml)
Nấm tươi	Pheromone + Dạng nấm tươi (10^8 bào tử/g)
Bột khô	Pheromone + Dạng bột khô (10^8 bào tử/g)
Đối chứng	Pheromone + Nước cất thanh trùng

Cách lấy chỉ tiêu: theo dõi và đánh giá khả năng lây lan của các dạng nấm xanh thể hiện qua tỉ lệ sùng chết theo thời gian vào các ngày 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33 và 36 sau khi thả sùng đực vào hộp. Nhiệt độ và ẩm độ trong quá trình thí nghiệm.



Hình 3.17: Bẫy pheromone giới tính hấp dẫn SKL và lây nhiễm nấm xanh (*Ma*)

3.2.4.2 Khảo sát ảnh hưởng của pheromone giới tính tổng hợp và nấm xanh (*Ma*) lên khả năng sinh sản của sùng khoai lang bố mẹ trong phòng thí nghiệm

Mục tiêu: khảo sát ảnh hưởng của pheromone giới tính tổng hợp kết hợp với nấm xanh (*Ma*) lên khả năng sinh sản, thời gian sống của SKL làm cơ sở cho việc đánh giá hiệu quả của bẫy pheromone kết hợp với xử lý nấm xanh trong quản lý SKL ở ngoài đồng.

Thí nghiệm bố trí theo thể thức hoàn toàn ngẫu nhiên với 7 NT (Bảng 3.14) và 3 lần lặp lại. Mỗi lần lặp lại gồm 10 cặp sùng (1 sùng đực và 1 sùng cái chưa bắt cặp) và củ khoai mới cho sùng đẻ trứng (mỗi NT có 30 cặp sùng bố mẹ). Sùng đực đã qua tiếp xúc với pheromone hoặc nấm xanh hoặc với cả hai, sùng cái khỏe bình thường. Cách tiến hành tương tự như thí nghiệm trên.

Bảng 3.11: Các nghiệm thức khảo sát ảnh hưởng của pheromone giới tính và nấm xanh (*Ma*) lên khả năng sinh sản của sùng khoai lang trong điều kiện phòng thí nghiệm, năm 2013

NT	Diễn giải thành phần của các nghiệm thức thí nghiệm
A	Đối chứng gồm 1 củ khoai + 1 TT đực và 1 TT cái bình thường
B	1 củ khoai + 1 TT cái + 1 TT đực tiếp xúc pheromone
C	1 củ khoai + 1 TT cái + 1 TT đực tiếp xúc pheromone và nấm xanh (dung dịch)
D	1 củ khoai + 1 TT cái + 1 TT đực tiếp xúc pheromone và nấm xanh (nấm tươi)
E	1 củ khoai + 1 TT cái + 1 TT đực tiếp xúc nấm xanh (dung dịch)
F	1 củ khoai + 1 TT cái + 1 TT đực tiếp xúc nấm xanh (nấm tươi)

Ghi chú: NT: nghiệm thức; A, B, C, D, E, F là ký hiệu các nghiệm thức khảo sát.

NT A (đối chứng) thả 1 sùng đực và 1 sùng cái bình thường vào hộp nhựa có chứa củ khoai lang.

NT B sùng đực vào bẫy tiếp xúc với pheromone rồi bắt ra cho vào hộp nhựa có 1 sùng cái và 1 củ khoai lang.

NT C sùng đực vào bẫy tiếp xúc với pheromone rồi rơi xuống dung dịch nấm xanh và bỏ ra bên ngoài dùng kẹp gấp cho vào hộp nhựa đã chuẩn bị sẵn gồm 1 sùng cái và 1 củ khoai lang.

NT D tương tự như NT C, nhưng thay dung dịch nấm xanh bằng dạng nấm tươi.

NT E cho sùng đực vào đĩa petri chứa dung dịch nấm xanh, sau đó dùng kẹp gấp cho vào hộp nhựa chuẩn bị sẵn gồm 1 sùng cái và 1 củ khoai lang.

NT F tương tự như NT E, nhưng thay dung dịch nấm xanh bằng dạng nấm tươi.

Sau 15 ngày lấy củ khoai ra cho vào bọc nylon, có bông gòn để hút ẩm, lấy nút gòn buộc miệng bọc lại cho hơi nước thoát ra dễ dàng, có thể dùng kim đâm bọc nylon tạo độ thông thoáng. Sau đó lấy củ khoai mới đã chuẩn bị sẵn cho vào hộp thí nghiệm để sùng cái để trứng tiếp tục. Công việc tiếp tục sau 15 ngày thay củ khoai mới 1 lần đến khi sùng cái chết.

Chi tiêu ghi nhận: thời gian sống của sùng đực, cái (bố, mẹ) ở các NT đến khi chết. Số lượng và giới tính sùng con thoát ra khỏi củ khoai của từng đợt thay củ mới (15 ngày/lần). Theo dõi các củ khoai 5 ngày/lần cho đến khi sùng thoát ra hết hoàn toàn.

3.2.4.3 Khảo sát hiệu quả ứng dụng của pheromone giới tính tổng hợp kết hợp với nấm xanh (Ma) phòng trị sùng khoai lang ở điều kiện ngoài đồng

Mục tiêu: nhằm đánh giá hiệu quả kết hợp của pheromone giới tính tổng hợp với nấm xanh (Ma) trong việc quản lý sùng khoai lang làm giảm tỉ lệ thiệt hại củ ở điều kiện ngoài đồng.

a) Khảo sát tại huyện Bình Tân, tỉnh Vĩnh Long

Địa điểm: huyện Bình Tân, tỉnh Vĩnh Long.

Thời gian: vụ khoai từ tháng 01/2011 đến tháng 5/2011.

Thí nghiệm thực hiện gồm 3 NT (Bảng 3.15) trên cùng khu vực. Kỹ thuật canh tác tương đối giống nhau trên cả 3 NT, chỉ khác nhau việc sử dụng thuốc trừ sâu ở đối chứng và NT pheromone hoặc pheromone kết hợp với nấm xanh, hạn chế tối đa việc sử dụng thuốc trừ sâu ở 2 NT đặt bẫy pheromone. Trong đó, NT A là 6 bẫy pheromone/1.000 m², NT B là 6 bẫy pheromone/1.000 m² kết hợp với rải và phun nấm xanh, NT C là đối chứng (phòng trị sùng theo cách của nông dân) thực hiện tại xã Thành Đông, huyện Bình Tân.

Bảng 3.12: Các nghiệm thức khảo sát hiệu quả kết hợp của pheromone giới tính tổng hợp với nấm xanh phòng trị sùng khoai lang tại tỉnh Vĩnh Long, năm 2011

Nghiệm thức	Diện tích	Địa điểm	Ngày xuống giống
(A) 6 bẫy/1000m ²	2.000 m ²	Xã Thành Đông	01/01/2011
(B) 6 bẫy/1000m ² + Nấm xanh	2.000 m ²	Xã Thành Đông	01/01/2011
(C) Đối chứng	2.000 m ²	Xã Thành Đông	01/01/2011

Thí nghiệm đặt bẫy pheromone ở 10 NSKT và mỗi thay mới sau 2 tháng. Nấm xanh dùng để rải ở thời điểm 3 NSKT (1 kg/1.000 m²), phun nấm tươi ở thời điểm 50, 70 và 90 NSKT với liều lượng 500 g/4 bình 16 lít+chất bám dính/2.000 m² trên giống khoai lang Tím Nhật.

Tình hình sử dụng thuốc trừ sâu bệnh trên các NT cũng tương tự như thí nghiệm ở vụ 1 tại huyện Bình Tân, Vĩnh Long, năm 2010.

Chỉ tiêu ghi nhận: tương tự như thí nghiệm ở vụ 1 tại huyện Bình Tân, Vĩnh Long.

b) Khảo sát tại huyện Cù Lao Dung, tỉnh Sóc Trăng

Thí nghiệm thực hiện từ tháng 11/2010 đến tháng 2/2011 trên giống khoai Trắng Sữa tại huyện Cù Lao Dung, bẫy pheromone áp dụng với mật độ 6 bẫy/1.000 m² ở thời điểm 10 NSKT tương tự các NT. Mồi được thay mới ở thời điểm 45 ngày sau khi đặt bẫy. Nấm xanh dạng nấm tươi (bọc 500 g) được sản xuất tại nông hộ do Chi Cục Bảo vệ Thực vật Sóc Trăng kết hợp với Bộ môn BVTV, khoa Nông Nghiệp và SHUD, trường Đại học Cần Thơ tập huấn cho nông dân được sử dụng dưới 2 hình thức rải và phun nấm.

+ Hình thức rải nấm: trộn 1 kg nấm tươi với 5 kg phân hữu cơ (gồm trâu và tro trâu trộn với nhau, không có phối trộn với nấm đối kháng khác) và rải vào thời điểm 3 NSKT trên diện tích 1.000 m².

+ Hình thức phun nấm: pha 125 g nấm tươi/16 lít nước và 10 ml chất bám dính Thần Hồ, phun 2 bình 16 lít/1.000 m². Chế phẩm nấm tươi (1-3x10⁸ bào tử/g) được phun 3 lần ở các thời điểm 30, 50 và 70 NSKT.

NT đối chứng: nông dân sử dụng thuốc trừ sâu hóa học phòng trị sùng theo tập quán của họ.

Thí nghiệm gồm 4 NT bố trí trên 4 ruộng khoai Trắng Sữa như ở Bảng 3.13, khoảng cách giữa các ruộng khoai tối thiểu là 100 m.

Bảng 3.13: Các nghiệm thức khảo sát hiệu quả kết hợp của pheromone giới tính tổng hợp với nấm xanh phòng trị sùng khoai lang tại tỉnh Sóc Trăng, năm 2010

Nghiệm thức	Diện tích	Địa điểm	Ngày xuống giống
Pheromone	6.000 m ²	Xã An Thạnh Tây	11/2010
Pheromone+Phun nấm	1.500 m ²	Xã An Thạnh Tây	11/2010
Pheromone+Rải nấm+Phun nấm	3.500 m ²	Xã An Thạnh Tây	11/2010
Đối chứng	2.000 m ²	Xã An Thạnh Tây	11/2010

NT đối chứng được phun 3 lần thuốc trừ sâu hóa học là Punisx 25EC (Cypermethrin) với liều lượng 40 ml/bình 16 lít, 2 bình 16 lít/1.000 m² ở các thời điểm 7, 30, 45 NSKT.

Chỉ tiêu ghi nhận: tỉ lệ sùng gây hại ở ngoài vỏ, trong củ và trọng lượng củ vào 2 thời điểm 70 và 105 NSKT qua khảo sát thiệt hại củ tại 7 điểm cố định trên ruộng.

c) Khảo sát tại huyện Duyên Hải, tỉnh Trà Vinh

Thí nghiệm bố trí theo kiểu đánh giá trên diện rộng tại các ruộng khoai lang ở 2 địa điểm cách nhau 1 km trên các ruộng khoai lang Tím Nhật tại xã Trường Long Hòa, huyện Duyên Hải, tỉnh Trà Vinh.

- Địa điểm 1: là nơi bắt đầu canh tác khoai lang năm đầu tiên, các NT bố trí trên ruộng khoai Tím Nhật trình bày ở Bảng 3.14. Khu vực thí nghiệm cách bờ biển khoảng 500 m. Kỹ thuật trồng và chăm sóc khoai lang áp dụng theo tập quán canh tác của nông dân tại địa phương.

Bảng 3.14: Các nghiệm thức khảo sát hiệu quả kết hợp của pheromone giới tính tổng hợp với nấm xanh phòng trị sùng khoai lang trên ruộng khoai mới canh tác tại huyện Duyên Hải, tỉnh Trà Vinh, năm 2011

Ký hiệu	Nghiệm thức	Diện tích (m ²)	Số bẫy/ruộng	Ngày xuống giống	Ngày thu hoạch	Thời gian (ngày)
D-1	Pheromone	1.700	10	04/5/2011	13/8/2011	102
D-2	Pheromone+Ma	1.400	8	04/5/2011	13/8/2011	102
D-3	Đối chứng	1.500	-	04/5/2011	13/8/2011	102

- Địa điểm 2: là nơi canh tác khoai lang lâu năm (4 năm liên tiếp), trên ruộng khoai Tím Nhật trình bày ở Bảng 3.18. Cách bờ biển 50 m, khoảng cách giữa 2 địa điểm là 1 km. Kỹ thuật trồng và chăm sóc khoai lang tương tự như địa điểm 1.

Bảng 3.15: Các nghiệm thức khảo sát hiệu quả kết hợp của pheromone giới tính tổng hợp với nấm xanh phòng trị sùng khoai lang trên ruộng khoai canh tác lâu năm tại huyện Duyên Hải, tỉnh Trà Vinh, năm 2011

Ký hiệu	Nghiệm thức	Diện tích (m ²)	Số bẫy/ruộng	Ngày xuống giống	Ngày thu hoạch	Thời gian (ngày)
E-1	Pheromone	1.800	10	18/5/2011	02/9/2011	108
E-2	Pheromone+Ma	1.200	7	24/5/2011	02/9/2011	102
E-3	Đối chứng	1.000	-	24/5/2011	02/9/2011	102

Trên mỗi địa điểm, thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên, mỗi NT có diện tích từ 1.000-2.000 m², gồm có 3 NT cụ thể như sau:

- NT D-1 và E-1: đặt bẫy pheromone với 6 bẫy/1.000 m² (0,5 mg/môi) từ thời điểm 3 NSKT, môi được thay mới sau 2 tháng sử dụng.

- NT D-2 và E-2: đặt bẫy tương tự D-1 và kết hợp với nấm xanh, ở thời điểm 3 NSKT bằng cách trộn nấm tươi (1-3x10⁸ bào tử/g) với tro trấu rồi rải dọc theo luống trồng khoai với liều lượng là 1 kg/1.000 m² và phun nấm tươi với liều lượng là 125 g/16 lít nước, pha thêm 10 ml chất bám dính Thần Hồ ở thời điểm 40 NSKT, phun 2 bình 16 lít/1.000 m².

- NT D-3 và E-3: phòng trị sùng theo tập quán của nông dân được xử lý 2 lần, lần đầu rải thuốc Diazol 10H (Diazinon) ở 3 NSKT với liều lượng là 5 kg/1.000 m² và lần sau phun thuốc Cyper Alpha 5ND (Alpha cypermethrin) với liều lượng 20 ml/8 lít ở thời điểm 40 NSKT.

Chỉ tiêu ghi nhận: số lượng sùng đục vào bẫy định kỳ 2 tuần/lần suốt vụ. Số lượng củ, trọng lượng củ, tỉ lệ (%) củ bị sùng gây hại ở ngoài vỏ và trong củ ở thời điểm 60 NSKT và trước khi thu hoạch.

d) Khảo sát tại huyện Tri Tôn, tỉnh An Giang

Thí nghiệm bố trí theo kiểu đánh giá trên diện rộng tại 2 địa điểm trên 2 ruộng khoai Trắng Sữa tại xã Núi Tô, huyện Tri Tôn, tỉnh An Giang. Hai ruộng khoai cách nhau khoảng 1.100 m. Kỹ thuật trồng và chăm sóc khoai lang được áp dụng theo tập quán canh tác của nông dân tại địa phương.

- Ruộng thí nghiệm: diện tích 3.000 m², đặt bẫy pheromone với mật độ là 8 bẫy/1.000 m² (0,5 mg/mồi), từ thời điểm 30 NSKT, kết hợp phun nấm tươi (1-3x10⁸ bào tử/g) ở 2 thời điểm 45 và 65 NSKT, với liều lượng 125 g/16 lít, pha thêm 10 ml chất bám dính Thần Hồ, phun 2 bình 16 lít/1.000 m².

** Ruộng thí nghiệm: Vị trí đặt bẫy pheromone được chia làm 2 khu vực là khu vực ngoại vi (diện tích 2.000 m² gồm 16 bẫy bố trí xung quanh gần ngoài bì ruộng) và khu vực trung tâm (diện tích 1.000 m² gồm 8 bẫy bố trí ở khu vực giữa ruộng).*

- Ruộng đối chứng: diện tích 1.400 m², canh tác theo tập quán của nông dân bao gồm lần đầu phun thuốc trừ sâu Medophos 50EC (Chlorpyrifos Ethyl +Trichlorfon) kết hợp phân bón lá Bom-n flower ở thời điểm 23 NSKT với liều lượng là 60 ml/16 lít, phun 2 bình 16 lít cho 1.000 m² và lần sau phun phân bón lá Annong Grow Siêu To Củ (50 ml/16 lít) và phân đa lượng NPK 10-5-44-TE (40 g/16 lít) ở thời điểm 45 NSKT, phun 2 bình 16 lít/1.000 m².

Chỉ tiêu ghi nhận: số lượng sùng đục vào bẫy định kỳ 10 ngày/lần kể từ thời điểm 30 NSKT đến thời điểm thu hoạch. Chỉ tiêu thiệt hại do sùng trên củ ghi nhận ở 3 thời điểm 60, 75 và 93 NSKT tại 7 điểm cố định gồm 4 điểm ở khu vực ngoại vi và 3 điểm ở khu vực trung tâm của mỗi ruộng.

3.3 Phương pháp xử lý số liệu

- Số liệu điều tra được tổng hợp dưới dạng bảng hoặc đồ thị bằng chương trình Microsoft Excel và phân tích thống kê bằng chương trình SPSS.

- Số liệu khảo sát ngoài đồng trên 9 ruộng khoai lang thì xác định mức độ phổ biến và tần suất xuất hiện của các loài trên các ruộng điều tra.

- Kết quả các khảo sát hiệu lực của pheromone, nấm xanh, pheromone kết hợp với nấm xanh được phân tích thống kê bằng chương trình MSTATC và kiểm định Duncan ở mức ý nghĩa 5%.

Chương 4

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

4.1 Điều tra tình hình canh tác khoai lang, khảo sát côn trùng gây hại và thiên địch trên ruộng khoai lang tại Bình Tân, Vĩnh Long

4.1.1 Điều tra nông dân về tình hình canh tác khoai lang

4.1.1.1 Diện tích, giống khoai và đặc điểm canh tác của nông dân tại địa bàn điều tra

Nhìn chung, hầu hết nông dân tại địa bàn điều tra đều có thâm niên canh tác cao. Tỷ lệ nông dân có tuổi nghề trên 10 năm lên đến 85%. Trong đó, nông dân có tuổi nghề từ 11 đến 20 năm chiếm đa số với tỷ lệ 44%, kể đến là nông dân có tuổi nghề trên 30 năm chiếm tỷ lệ 32% tổng số nông dân điều tra (Bảng 4.1). Kết quả điều tra cho thấy nông dân có độ tuổi khác nhau dẫn tới thâm niên canh tác khác nhau và kinh nghiệm sản xuất cũng khác nhau. Mặt khác, điều kiện sở hữu đất đai cũng thay đổi theo từng nông hộ, thể hiện qua phần diện tích canh tác chủ yếu là trồng khoai lang.

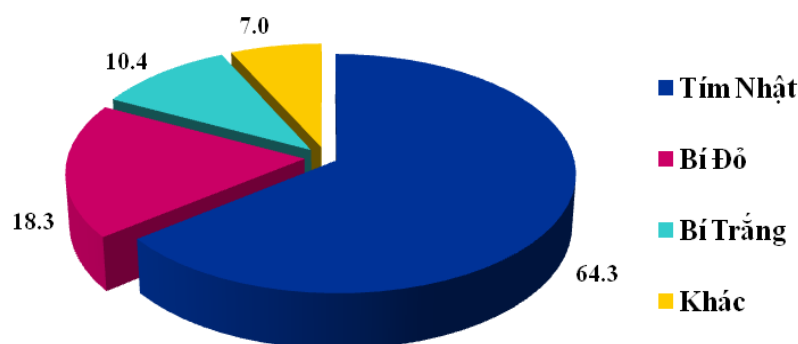
Huyện Bình Tân là vùng chuyên canh khoai lang từ lâu, với diện tích canh tác khoai lang rất lớn khoảng 5.000 ha vào năm 2010, nổi tiếng ở vùng ĐBSCL. Diện tích canh tác của các nông hộ trồng khoai lang trên địa bàn điều tra dao động từ 1.000 đến 20.000m². Trong đó, các nông hộ trồng khoai lang có diện tích từ 6.000 đến 10.000m² chiếm đa số với tỷ lệ 42% tổng số các hộ điều tra (Bảng 4.1).

Bảng 4.1 : Tỷ lệ nông hộ điều tra theo thâm niên và diện tích canh tác

Hạng mục	Khoảng biến động hạng mục điều tra			
Thâm niên canh tác				
Số năm canh tác	1-10	11-20	21-30	Trên 30
Tỷ lệ (%) nông hộ	15	44	9	32
Diện tích canh tác				
Diện tích (1.000 m ²)	1-5	6-10	11-20	Trên 20
Tỷ lệ (%) nông hộ	31	42	23	4

Cũng giống như các cây trồng khác, nông dân tại huyện Bình Tân canh tác khoai lang với nhiều giống khác nhau, phong phú, đa dạng. Kết quả điều tra cho thấy các giống khoai lang được nông dân trồng phổ biến tại địa bàn điều tra là giống khoai Tím Nhật, Bí Đỏ và Bí Trắng. Trong đó, giống khoai

lang Tím Nhật được trồng nhiều nhất, chiếm tỉ lệ 64,3% tổng số nông hộ điều tra, kế đến là giống khoai Bí Đỏ chiếm tỉ lệ 18,3%, các giống còn lại chiếm tỉ lệ thấp hơn (Hình 4.1). Kết quả điều tra cho thấy nông dân ưa chuộng trồng giống khoai Tím Nhật nhiều hơn các giống khác, có thể là do giống khoai này dễ trồng, có thời gian sinh trưởng dài hơn và năng suất cao hơn, dễ bán hơn, phù hợp với nhu cầu thị trường.



Hình 4.1: Tỉ lệ (%) các loại giống khoai lang tại địa bàn điều tra

Khoai lang là một trong những cây lương thực cho hiệu quả kinh tế cao, việc canh tác khoai lang cũng giúp gia tăng thu nhập cho người dân nơi đây. Kết quả điều tra về tình hình lợi nhuận mà nông dân thu được từ vụ khoai lang trồng trước đó ở Bảng 4.2 cho thấy lợi nhuận thu được từ các ruộng khoai trên 5 triệu đồng/công/vụ đạt tỉ lệ 61,3% và lợi nhuận dưới 5 triệu đồng/ công/vụ chiếm 29,6% tổng số nông hộ điều tra. Bên cạnh đó, có khoảng 9,1% nông hộ trên địa bàn điều tra trồng khoai lang cho rằng vụ khoai trước đó không thu được lợi nhuận, là do năng suất tương đối thấp và chi phí đầu tư sản xuất khá cao, cho nên chưa thu được lợi nhuận như mong muốn.

Bảng 4.2: Tỉ lệ nông hộ điều tra trồng khoai lang đạt lợi nhuận ở vụ khoai trước

Lợi nhuận (Triệu đồng/công/vụ)	Tỉ lệ nông hộ (%)
0	9,1
1-3	9,1
3-5	20,5
5-7	25,0
7-9	19,3
Trên 9	17,0

4.1.1.2 Một số kỹ thuật canh tác khoai lang của nông dân

Về cơ cấu mùa vụ: nơi đây cũng thay đổi tùy theo tập quán canh tác của nông dân tại địa phương. Kết quả điều tra ở Bảng 4.3 cho thấy đa số nông dân tại địa bàn điều tra canh tác 1 vụ khoai lang/năm chiếm tỉ lệ 84%, chủ yếu là họ trồng khoai lang luân canh với lúa (1 lúa 1 màu).

Điều này cũng phù hợp với khuyến cáo trong sản xuất khoai lang. Theo Nguyễn Văn Huỳnh và Lê Thị Sen (2011) nếu nông dân có điều kiện thì sau vụ trồng khoai lang nên luân canh với cây trồng khác không phải là thức ăn của sùng, tốt nhất là với cây lúa để tránh tình trạng sùng lây lan sang vụ sau. Các nông hộ còn lại chiếm tỉ lệ 16% canh tác 2 vụ khoai lang trên năm, thường những hộ này chỉ tập trung canh tác khoai lang quanh năm, vì họ cho rằng trồng khoai lang đạt hiệu quả kinh tế cao hơn so với cây lúa.

Nguồn hom giống: nhằm phục vụ sản xuất đại trà, nông dân chủ yếu tìm mua giống khoai từ nơi khác đem về trồng chiếm tỉ lệ khá cao (89%) (Bảng 4.3), nguyên nhân là do đa số họ trồng 1 vụ/năm và sử dụng hết phần diện tích canh tác để sản xuất thương phẩm lấy củ, vì vậy họ không có phần diện tích trồng để nhân giống lấy hom. Do vậy, khi bắt đầu canh tác vụ khoai tiếp theo thì họ tìm mua hom giống từ nơi khác chuyên cung cấp giống. Còn lại một số ít nông hộ chiếm tỉ lệ 11% là tự sản xuất giống phục vụ cho vụ sau, trường hợp này thường xảy ra với những hộ trồng 2 vụ/năm, họ tự sản xuất giống khoai để trồng nhằm tiết kiệm chi phí mua giống, giảm bớt chi phí đầu tư và công việc này cũng thuận tiện dễ dàng với họ.

Xử lý hom: khi bắt đầu vụ khoai mới, sau khi làm đất xong và chuẩn bị đủ hom giống, đa số nông dân đem hom giống ra ruộng trồng ngay, không qua xử lý nào trước khi trồng chiếm tỉ lệ 75% (Bảng 4.3), do họ phải trồng trên diện tích lớn và mất rất nhiều thời gian cho việc xuống giống, di chuyển hom giống tới ruộng, họ tranh thủ thời gian đặt hom giống xuống ruộng để hom khoai không bị héo nhiều, chậm phục hồi sau khi trồng, vì vậy họ ít quan tâm tới khâu xử lý hom giống trước khi trồng.

Những nông hộ còn lại chiếm 25% tổng số hộ điều tra có xử lý hom giống trước khi trồng bằng cách nhúng hom vào nước có pha thuốc trừ sâu, bệnh, do họ có điều kiện, kinh nghiệm, nhân công và quan tâm tới khâu xử lý giống nhằm làm giảm tỉ lệ hao hụt sau khi trồng. Cách làm này cũng phù hợp theo khuyến cáo của Nguyễn Văn Huỳnh và Lê Thị Sen (2011) trong việc phòng ngừa SKL lây lan, trước khi trồng có thể xử lý hom giống bằng cách ngâm vào dung dịch nước chứa thuốc trừ sâu trong 30 phút, sẽ giết trứng và

nhộng SKL sống bên trong thân, sau đó vớt hom giống ra để ngoài tự nhiên cho ráo nước rồi đem trồng ra ruộng sản xuất.

Bảng 4.3: Tỷ lệ nông hộ điều tra theo số vụ canh tác, nguồn hom và xử lý hom

Hạng mục	Kết quả điều tra nông hộ trồng khoai lang	
	1 vụ	2 vụ
Số vụ khoai/năm	1 vụ	2 vụ
Tỷ lệ (%) nông hộ	84	16
Nguồn hom giống	Tự sản xuất	Mua nơi khác
Tỷ lệ (%) nông hộ	11	89
Xử lý hom giống	Có xử lý	Không xử lý
Tỷ lệ (%) nông hộ	25	75

Xử lý ra củ: trong quá trình chăm sóc khoai lang sinh trưởng và phát triển, nông dân thường quan tâm đến việc xử lý ra củ. Đây là khâu khá quan trọng góp phần giúp gia tăng năng suất củ khi thu hoạch. Kết quả trình bày ở Bảng 4.4 cho thấy đa số nông dân đều áp dụng biện pháp xử lý ra củ chiếm tỷ lệ 79,1% nhằm tạo điều kiện giúp cho khoai hình thành củ tập trung, đồng đều, thuận lợi khi thu hoạch, nông dân thường xử lý ra củ bằng nhiều biện pháp khác nhau như xiết nước, ngưng bón phân, cho ngập nước, tưới phân NPK hay cách khác... chủ yếu xử lý ra củ theo kinh nghiệm bản thân qua canh tác nhiều năm tích lũy được. Trong đó, biện pháp xử lý ra củ được áp dụng phổ biến là xiết nước (tỷ lệ 39,2%), các biện pháp còn lại chiếm tỷ lệ thấp hơn.

Xử lý nuôi củ: sau khi xử lý cho khoai lang tạo củ, công đoạn tiếp theo là xử lý dây nuôi củ cũng được nông dân quan tâm thực hiện bằng nhiều cách khác nhau. Kết quả trình bày ở Bảng 4.4 cho thấy nông dân áp dụng biện pháp xử lý dây nuôi củ khá cao đạt tỷ lệ 70,5%. Việc áp dụng biện pháp xử lý dây nuôi củ nhằm hạn chế dây khoai phát triển thân lá, giúp dây khoai tập trung dinh dưỡng phát triển củ tốt hơn. Nhiều cách thức xử lý dây nuôi củ được áp dụng như nhắc dây, cắt dây, ngắt đọt, xịt thuốc trừ cỏ cho dây khoai bị tổn thương phát triển chậm lại. Trong các cách xử lý này thì nhắc dây là biện pháp truyền thống được áp dụng lâu đời tại địa phương, nhưng tỷ lệ nông dân áp dụng biện pháp này chưa cao (tỷ lệ 13,4%) thấp hơn so với 2 biện pháp còn lại (cắt dây và ngắt ngọn chiếm 23,2%, phun thuốc trừ cỏ chiếm 33,9%). Khi so sánh các biện pháp xử lý dây nuôi củ thì thấy biện pháp phun thuốc trừ cỏ lên dây khoai được nông dân áp dụng nhiều nhất (tỷ lệ 33,9%).

Theo Hội nông dân Cần Thơ, biện pháp nhắc dây khoai làm cho đứt rễ con để dây khoai tập trung dinh dưỡng nuôi củ cũng được khuyến cáo. Nhắc dây cần tiến hành thường xuyên, nhắc xong phải đặt dây khoai đúng vị trí cũ, không lật dây, tránh gây tổn thương đến thân, lá (hoinongdan.cantho.gov.vn).

Bên cạnh các nông hộ xử lý dây nuôi củ, số hộ nông dân không quan tâm đến biện pháp xử lý dây nuôi củ và không có nhiều thời gian chăm sóc, để cho khoai tạo củ tự nhiên chiếm tỉ lệ 29,5% tổng số nông dân điều tra.

Bảng 4.4: Tỉ lệ nông hộ điều tra theo phương pháp xử lý ra củ, xử lý dây nuôi củ, thời gian neo củ và xử lý ruộng sau thu hoạch

Hạng mục	Các phương pháp áp dụng/Tỉ lệ (%) hộ					
Xử lý ra củ						
Phương pháp	<i>Xiết nước</i>	<i>Ngưng phân</i>	<i>Cho ngập nước</i>	<i>Tưới NPK</i>	<i>Khác</i>	<i>Không xử lý</i>
Tỉ lệ (%) hộ	39,2	14,5	3,6	12,7	9,1	20,9
Xử lý nuôi củ						
Phương pháp	<i>Nhắc dây</i>	<i>Cắt dây, ngắt đọt</i>	<i>Xịt thuốc cỏ</i>	<i>Không xử lý</i>		
Tỉ lệ (%) hộ	13,4	23,2	33,9	29,5		
Thời gian neo củ						
Số ngày neo củ	0	1-15	16-30	45-60		
Tỉ lệ (%) hộ	14,7	5,2	49,1	31		
Xử lý ruộng sau thu hoạch						
Phương pháp	<i>Chôn lấp dây</i>	<i>Đem nơi khác</i>	<i>Cho ngập nước</i>	<i>Không xử lý</i>		
Tỉ lệ (%) hộ	45	6	4	45		

Thời gian neo củ: khi đến thời điểm thu hoạch, nông dân thường thu hoạch ngay để bán cho thương lái với giá cả hợp lý. Nếu đến thời gian thu hoạch mà giá cả chưa thỏa thuận hợp lý với thương lái thì nông dân tiếp tục neo củ khoai trên ruộng (kéo dài thời gian thu hoạch để chờ giá bán tăng lên). Thời gian neo củ dài hay ngắn tùy theo điều kiện mỗi ruộng và tình hình biến động giá cả thị trường tiêu thụ. Kết quả điều tra ở Bảng 4.4 cho thấy trên 85% nông dân có neo củ, kéo dài thời gian thu hoạch để bán được giá cao hơn. Biện pháp này nông dân thường áp dụng vào mùa thu hoạch tập trung (rộ), rớt giá. Tuy nhiên, họ cần có biện pháp quản lý sùng tốt để tránh thiệt hại năng suất.

Nhìn chung, thời gian neo củ tại địa bàn điều tra kéo dài tối đa từ 45-60 ngày chiếm tỉ lệ 31%. Đa số nông dân thu hoạch khoai bán trong thời gian từ 16-30 ngày neo củ kể từ khi đến thời điểm thu hoạch (chiếm tỉ lệ 49,1%). Nông dân thu hoạch trong thời gian neo củ từ 1-15 ngày neo củ chiếm tỉ lệ rất thấp (5,2%). Ngoài ra, có 14,7% nông dân điều tra không áp dụng neo củ, nguyên nhân là do những hộ này không có điều kiện phòng trị sùng lúc neo củ hoặc sản lượng củ không nhiều và phần chênh lệch thu nhập không cao cho nên họ không muốn kéo dài thời gian thu hoạch. Nguyên nhân khác có thể do áp lực sùng trên ruộng trong thời gian neo củ là rất lớn, neo củ phải tốn thêm

chi phí phòng trị sùng, lợi nhuận cũng không chênh lệch nhiều so với thu hoạch đúng thời điểm.

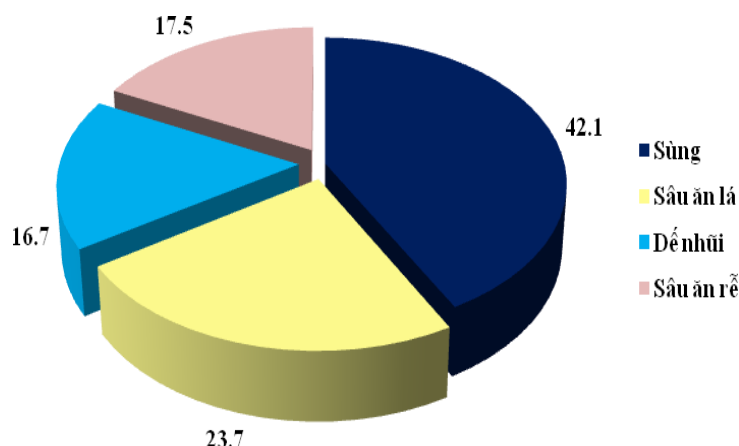
Xử lý ruộng sau thu hoạch: những tàn dư thực vật, phế phẩm trên ruộng khoai sau khi thu hoạch được nông dân xử lý bằng nhiều cách khác nhau. Kết quả ở Bảng 4.4 cho thấy nông dân áp dụng biện pháp xử lý bằng cách cày xới chôn vùi tàn dư thực vật (lắp dây khoai) dưới đất chiếm tỉ lệ 45% tương đương với trường hợp nông dân không có xử lý chôn vùi tàn dư thực vật sau thu hoạch (chiếm tỉ lệ 45%). Ngoài 2 biện pháp trên, nông dân xử lý bằng cách mang dư thừa thực vật này tới nơi khác loại bỏ khỏi ruộng chiếm tỉ lệ 6%, hoặc họ cho nước vào ngập ruộng (chiếm tỉ lệ 4%) để ruộng ngập nước cho dây khoai mau thối rửa và giết chết sùng còn lưu tồn trên đó, hạn chế sùng lây lan sang vụ kế tiếp hoặc những ruộng lân cận trong khu vực.

Việc nông dân xử lý ruộng khoai sau thu hoạch cũng phù hợp khuyến cáo với một số nghiên cứu, các tác giả cho rằng cần tiêu hủy tàn dư của khoai lang sau khi thu hoạch. Nếu có điều kiện nên cho nước vào ngập ruộng từ 1-2 tuần, tàn dư cây khoai lang sẽ bị thối rửa để tiêu diệt ấu trùng và nhộng sùng còn lẫn bên trong và sùng sẽ chết (Nguyễn Văn Huỳnh và Lê Thị Sen, 2011). Sau khi thu hoạch, sùng vẫn có thể tiếp tục sinh sống trên tàn dư của cây khoai (thân, củ còn sót lại trên ruộng) và trở thành nguồn lưu tồn và lây lan sang vụ sau. Chính vì vậy, những ruộng trồng khoai liên tục nhiều năm thường bị sùng gây hại rất nặng (Talekar, 1983). Cả thành trùng và ấu trùng đều gây hại trên khoai lang, nhưng chỉ ấu trùng được tìm thấy bên trong củ khoai (Nguyễn Đức Khiêm, 2006).

4.1.1.3 Tình hình côn trùng gây hại trên khoai lang

Về sâu hại: kết quả trình bày ở Hình 4.2 cho thấy nông dân nhận biết các đối tượng sâu hại phổ biến trên ruộng khoai là SKL, sâu ăn lá, sâu ăn rễ và đế nhũ. Trong đó, SKL được nhận định là đối tượng gây hại phổ biến, nguy hiểm nhất chiếm tỉ lệ 42,1% tổng số nông dân điều tra, kế đến là sâu ăn lá chiếm 23,7%, sâu hại rễ chiếm 17,5% và thấp nhất là đế nhũ chiếm 16,7%. Nông dân có kinh nghiệm canh tác nhiều năm dễ dàng nhận biết các loài côn trùng gây hại phổ biến trên khoai lang, xác định được loài gây hại chủ yếu và tập trung phòng trị loài này có thể kết hợp kiểm soát các loài gây hại khác.

Sâu hại trên khoai lang bao gồm các đối tượng gây hại phổ biến như sâu sùng ăn lá, các loài miêng kiến và SKL. Tại Việt Nam, SKL là loài gây hại phổ biến nhất trên khoai lang và xuất hiện ở hầu hết các vùng trồng khoai lang trên cả nước (Nguyễn Văn Huỳnh và Lê Thị Sen, 2011).



Hình 4.2: Tỷ lệ (%) sâu hại phổ biến trên ruộng khoai tại địa bàn điều tra

Phòng trị sâu hại: Trong quá trình canh tác khoai lang, khi có sâu bệnh hại xuất hiện thì nông dân thường áp dụng biện pháp hóa học là chủ yếu. Kết quả điều tra cho thấy để đối phó với sâu hại xuất hiện trên ruộng khoai lang, hầu hết nông dân điều tra có sử dụng thuốc trừ sâu hóa học (chiếm tỷ lệ 94,1% tổng số nông hộ điều tra) để phòng trị côn trùng gây hại, chủ yếu là SKL, đôi khi cũng có những đợt xuất hiện sâu ăn lá, phổ biến là sâu ăn tạp. Rất ít nông dân sử dụng các loại thuốc trừ sâu khác phòng trị sâu hại trên ruộng khoai lang (5,9%). Tuy nhiên, theo khuyến cáo của Nguyễn Văn Huỳnh và Lê Thị Sen (2011), nếu ruộng khoai bị sùng gây hại hàng năm, nên điều khiển thời vụ sao cho thời kỳ có củ tránh rơi vào mùa khô. Khoảng 1 tháng sau khi trồng hoặc từ khi hình thành củ trở đi nếu phát hiện thấy sùng sống rải rác trên ruộng khoai lang thì có thể sử dụng các loại thuốc trừ sâu thông dụng phun định kỳ 10 ngày/lần.

Kết quả điều tra cho thấy nông dân thường lạm dụng thuốc trừ sâu hóa học để quản lý sâu hại, dẫn đến sâu hại mau quen thuốc và phát triển tính kháng thuốc nhanh hơn, nhất là SKL. Nông dân thường sử dụng những loại thuốc trừ sâu hóa học có tính độc cao, phổ tác động rộng, tạo nên áp lực chọn lọc trên đồng ruộng, làm cho côn trùng kháng thuốc trở nên khó phòng trị hơn. Ngoài ra, thuốc trừ sâu hóa học còn ảnh hưởng tới sức khỏe con người và môi trường sinh thái, các loài thiên địch có ích, mất cân bằng sinh học trong hệ sinh thái nông nghiệp.

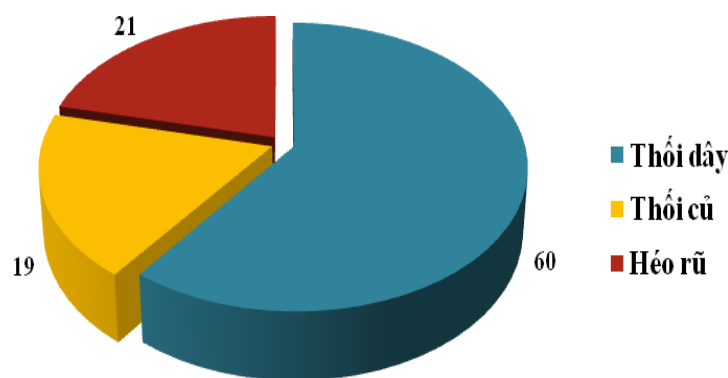
Tỷ lệ thiệt hại củ do sùng: do nông dân sử dụng thuốc trừ sâu hóa học để phòng trị SKL định kỳ trong suốt vụ khoai, cho nên việc kiểm soát sùng tương đối tốt, dẫn đến tỷ lệ thiệt hại do sùng gây ra trên củ khoai có tỷ lệ thấp. Kết quả ở Bảng 4.5 cho thấy tỷ lệ củ khoai lang bị sùng gây hại trên ruộng của nông dân điều tra ở vụ trước từ 1-2% chiếm tỷ lệ 38% tổng số nông hộ điều tra. Các ruộng khoai có tỷ lệ củ bị sùng gây hại trên 2% chiếm 35%, riêng tỷ lệ củ

khoai bị sùng gây hại trên 10% chiếm tỉ lệ 8%, trường hợp này xảy ra với những nông hộ kiểm soát sùng chưa chặt chẽ. Mặt khác, vụ khoai được điều tra là vụ mùa mưa nên mức độ gây hại của sùng cũng thấp hơn so với vụ mùa khô, dẫn đến thiệt hại củ khoai do sùng gây ra cũng chiếm tỉ lệ thấp. Bên cạnh đó, có những nông dân cho rằng không có củ khoai bị sùng, chiếm tỉ lệ thấp 27% tổng số nông hộ điều tra, có thể những nông hộ này kiểm soát sùng rất chặt chẽ, hiệu quả hơn nên thiệt hại do sùng gây ra coi như không đáng kể.

Bảng 4.5: Tỉ lệ nông hộ điều tra theo biện pháp phòng trừ sâu hại và tỉ lệ củ khoai bị sùng ở vụ trước

Hạng mục	Kết quả điều tra nông hộ trồng khoai lang				
Tỉ lệ củ khoai bị sùng ở vụ trước					
Tỉ lệ (%) khoai bị sùng	0%	1-2%	3-5%	6-10%	>10%
Tỉ lệ (%) nông hộ	27	38	14	13	8

Về bệnh hại: song song với côn trùng gây hại trên ruộng khoai lang thì cũng xuất hiện nhiều loại bệnh hại, chủ yếu bệnh gây hại trên thân và củ. Nhìn chung, kết quả ở Hình 4.3 cho thấy theo quan điểm và kinh nghiệm đánh giá của nông dân điều tra thì các bệnh phổ biến, thường gây hại nghiêm trọng trên khoai lang là bệnh thối dây, thối củ và héo rũ. Trong đó, bệnh thối dây được đánh giá là thường xuất hiện nhiều nhất chiếm tỉ lệ 60% tổng số nông dân điều tra. Còn bệnh thối củ và héo rũ thì ít xuất hiện hơn, chiếm tỉ lệ từ 19-21% nông dân điều tra nhận định có sự xuất hiện của bệnh này trên ruộng khoai.



Hình 4.3: Tỉ lệ (%) bệnh hại phổ biến trên ruộng khoai tại địa bàn điều tra

4.1.1.4 Quan điểm của nông dân đối với pheromone giới tính

Kết quả cho thấy tại địa bàn điều tra, tỉ lệ nông dân đã biết (chiếm tỉ lệ 52%) và chưa từng biết (chiếm tỉ lệ 48%) đối với pheromone giới tính hấp dẫn SKL gần tương đương nhau. Trong số những nông dân đã biết về pheromone giới tính (52%) thì tỉ lệ nông dân đã từng sử dụng pheromone giới tính đặt bẫy

ngoài đồng để hấp dẫn SKL khi nhận từ các đề tài nghiên cứu trước đó chiếm tỉ lệ 15% trong tổng số 52% nông dân điều tra biết về pheromone này. Như vậy, rất ít nông dân có cơ hội tiếp cận và sử dụng mỗi pheromone giới tính để đặt bẫy hấp dẫn SKL trên ruộng khoai lang.

4.1.2 Khảo sát ngoài đồng về tình hình côn trùng gây hại và thiên địch trên ruộng khoai lang

4.1.2.1 Thành phần côn trùng gây hại trên ruộng khoai lang

Kết quả khảo sát ngoài đồng ghi nhận thành phần côn trùng gây hại hiện diện trên 9 ruộng khoai lang tại huyện Bình Tân, tỉnh Vĩnh Long được trình bày ở Bảng 4.6 cho thấy có 20 loài côn trùng và nhện hại hiện diện trên các ruộng khoai. Trong đó, bộ cánh vảy (Lepidoptera) chiếm đa số với 7 loài hiện diện, bộ cánh cứng (Coleoptera) có 5 loài, bộ cánh đều (Homoptera) có 4 loài, bộ cánh tơ (Thysanoptera) có 1 loài, bộ cánh thẳng (Orthoptera) có 1 loài, bộ hai cánh (Diptera) có 1 loài và bộ nhện hại (Acarina) có 1 loài.

Mức độ phổ biến của các loài gây hại này trên ruộng khoai cũng khác nhau. Các loài xuất hiện nhiều, phổ biến trên ruộng khoai (mức độ phổ biến: +++ (hiện diện trên 50% tổng số điểm điều tra)) gồm sâu ăn tạp, dòi đục lòn, rầy phấn trắng, bọ dưa, rầy mềm, bọ trĩ và nhện đỏ. Tần suất xuất hiện của các loài gây hại như sâu ăn tạp, dòi đục lòn, bọ dưa và rầy phấn trắng là 100% (hiện diện 9/9 lần khảo sát). Trong đó, loài sâu ăn tạp có khả năng gây hại trên lá khoai khá quan trọng, đây là đối tượng thuộc nhóm sâu ăn lá hiện diện trong suốt vụ khoai mà nông dân thường quan tâm phòng trị khi thấy chúng xuất hiện nhiều. Các loài khác mặc dù xuất hiện thường xuyên qua các lần khảo sát nhưng chưa thấy tiềm năng gây hại quan trọng trên khoai lang cho nên nông dân ít quan tâm đến các loài này.

Kết quả nghiên cứu của Nguyễn Văn Đĩnh và *ctv.*, (2005) tại các tỉnh Hà Nội, Hà Tây, Thanh Hóa và Bắc Giang từ năm 1997-1998 và 2002 ghi nhận thành phần sâu hại trên các ruộng khoai lang gồm 29 loài xuất hiện. Trong đó, các loài côn trùng gây hại hiện diện phổ biến nhất gồm SKL (*Cylas formicarius*), sâu đục dây (*Omphisia anastomasalis*), sâu sừng (*Agrius convolvuli*) và bọ hung (*Serica orientalis*). Trong các đối tượng này thì SKL là loài gây hại quan trọng nhất trên ruộng khoai lang, cần được quan tâm phòng trị trong suốt vụ khoai.

Kết quả ở Bảng 4.6 ghi nhận trong quá trình khảo sát các loài từ rầy xanh đuôi đen tới sâu cuốn lá thì ít xuất hiện hơn trên các ruộng khoai (mức độ phổ biến: ++ (hiện diện từ 22-50% tổng số điểm điều tra)), tần suất xuất hiện ít hơn

6/9 lần khảo sát, cho thấy các loài này ít hiện diện trên ruộng khoai tại địa bàn khảo sát. Trong đó, loài sâu đục dây là đáng quan tâm hơn các loài khác, vì chúng tấn công vào bên trong dây khoai làm ảnh hưởng tới sự sinh trưởng và phát triển của cây và năng suất. Tuy nhiên, qua khảo sát thì chúng ít phổ biến với tần suất xuất hiện rất thấp, chỉ ghi nhận hiện diện 3/9 lần khảo sát, loài này có xu hướng phát triển, cần được quan tâm nhiều hơn trong vùng chuyên canh. Kết quả nghiên cứu của Nguyễn Văn Đĩnh và *ctv.*, (2005) ghi nhận ở các tỉnh phía Bắc thì sâu đục dây là một trong những loài hiện diện khá phổ biến trên khoai lang.

Bảng 4.6: Thành phần côn trùng gây hại hiện diện trên 9 ruộng khoai lang tại địa bàn khảo sát thuộc huyện Bình Tân, tỉnh Vĩnh Long, năm 2010

Stt	Tên thông thường	Bộ côn trùng	Mức độ phổ biến ^a	Tần suất xuất hiện ^b
1	Sâu ăn tạp	Lepidoptera	+++	9/9
2	Dòi đục lòn	Diptera	+++	9/9
3	Rầy phấn trắng	Homoptera	+++	9/9
4	Bọ dưa	Coleoptera	+++	9/9
5	Rầy mềm	Homoptera	+++	8/9
6	Bọ trĩ	Thysanoptera	+++	8/9
7	Nhện đỏ	Acarina	+++	8/9
8	Rầy xanh đuôi đen	Homoptera	++	6/9
9	Sâu xếp lá	Lepidoptera	++	5/9
10	Miêng kiếng xanh	Coleoptera	++	5/9
11	Sâu xanh da láng	Lepidoptera	++	4/9
12	Sâu đục dây	Lepidoptera	++	3/9
13	Sâu đo	Lepidoptera	++	3/9
14	Bọ nhảy	Coleoptera	++	2/9
15	Sâu cuốn lá	Lepidoptera	++	2/9
16	Sùng khoai lang	Coleoptera	+	2/9
17	Châu chấu	Orthoptera	+	2/9
18	Rầy nâu	Homoptera	+	1/9
19	Sùng trắng	Coleoptera	+	1/9
20	Sâu sùng	Lepidoptera	+	1/9

Ghi chú: a: Mức độ phổ biến trên 9 ruộng khoai lang khảo sát: (45 điểm điều tra)

+: rất ít xuất hiện (< 22%)

++: ít xuất hiện (từ 22 - 50%)

+++ : Xuất hiện nhiều (> 50%)

b: Tần suất xuất hiện của các loài côn trùng trên ruộng khoai lang trong tổng số 9 lần khảo sát.

Kết quả khảo sát trên các ruộng điều tra tại huyện Bình Tân, tỉnh Vĩnh Long, SKL rất ít hiện diện (mức độ phổ biến: + (hiện diện ít hơn 22% tổng số điểm điều tra)) và tần suất xuất hiện là 2/9 lần khảo sát, sùng chỉ hiện diện tại 2 ruộng có đặt bẫy pheromone và mức độ phổ biến là rất thấp (dưới 22%). Điều này có thể là do việc quan sát ghi nhận chỉ tiêu sâu hại chỉ được thực hiện trên tán lá khoai, đặc điểm của thành trùng SKL là có xu tính yếu đối với ánh sáng, sùng có tập quán lẫn trốn vào ban ngày và hoạt động mạnh vào ban đêm, cho nên khó nhìn thấy sùng hiện diện tại các điểm điều tra. Ban ngày sùng thường lẫn trốn các tia nắng trực xạ ở dưới tán lá hoặc chui xuống những kẽ nứt của đất nên rất khó nhìn thấy chúng (Nguyễn Văn Huỳnh và Lê Thị Sen, 2011; Nguyễn Đức Khiêm, 2006). Trong kết quả điều tra nông dân, SKL (*Cylas formicarius* Fab.) là đối tượng gây hại phổ biến và quan trọng nhất trên khoai lang nhưng họ khó phát hiện chỉ phòng trị định kỳ trong suốt vụ khoai.

4.1.2.2 Thành phần thiên địch trên các ruộng khoai lang khảo sát

Bên cạnh côn trùng gây hại, khảo sát thành phần thiên địch trên 9 ruộng khoai lang tại huyện Bình Tân, tỉnh Vĩnh Long được thực hiện. Kết quả trình bày ở Bảng 4.7 ghi nhận có 10 loài thiên địch hiện diện trên các ruộng khoai lang khảo sát, trong đó nhóm nhện ăn thịt thuộc bộ nhện lớn (Araneae) chiếm đa số với 6 loài (nhện lùn, nhện chân dài, nhện lưới, nhện linh miêu, nhện sói, nhện nhảy). Bộ cánh cứng (Coleoptera) có 2 loài (kiến ba khoang, bọ rùa). Bộ cánh nửa cứng (Hemiptera) có 1 loài (bọ xít mù xanh) và bộ cánh da (Dermaptera) có 1 loài (bọ đuôi kim).

Các loài thiên địch như kiến ba khoang, nhện lùn, nhện chân dài và bọ rùa là những loài xuất hiện thường xuyên trên các ruộng khoai khảo sát (với mức độ phổ biến: +++). Các loài này hiện diện phổ biến trên ruộng khoai tại khu vực khảo sát, trong mỗi lần khảo sát thì các loài này có tần suất bắt gặp cao. Trong đó, nhện lùn và kiến ba khoang là 2 loài có mức độ phổ biến cao (+++) và tần suất xuất hiện đạt 100% (9/9 lần khảo sát), đều hiện diện hầu hết các lần khảo sát. Điều này cho thấy nhện lùn và kiến ba khoang là 2 loài thiên địch quan trọng trên ruộng khoai lang. Các loài thiên địch khác như nhện lưới, nhện linh miêu, nhện sói thì ít xuất hiện hơn (mức độ phổ biến trung bình: ++), rất ít xuất hiện là các loài nhện nhảy, bọ xít mù xanh và bọ đuôi kim (mức độ: +), đồng thời, các loài này có tần suất xuất hiện rất thấp.

Bảng 4.7: Thành phần thiên địch hiện diện trên 9 ruộng khoai lang khảo sát tại huyện Bình Tân, tỉnh Vĩnh Long, năm 2010

TT	Tên thông thường	Bộ côn trùng	Mức độ phổ biến ^a	Tần suất xuất hiện ^b
1	Kiến ba khoang	Coleoptera	+++	9/9
2	Nhện lùn	Araneae	+++	9/9
3	Nhện chân dài	Araneae	+++	8/9
4	Bọ rùa	Coleoptera	+++	6/9
5	Nhện lưới	Araneae	++	4/9
6	Nhện linh miêu	Araneae	++	2/9
7	Nhện sói	Araneae	++	2/9
8	Nhện nhảy	Araneae	+	3/9
9	Bọ xít mù xanh	Hemiptera	+	1/9
10	Bọ đuôi kìm	Dermaptera	+	1/9

Ghi chú: a: Mức độ phổ biến của thiên địch trên 9 ruộng khoai lang khảo sát. (45 điểm điều tra)

+: rất ít xuất hiện (< 22%)

++: ít xuất hiện (từ 22 - 50%)

+++ : xuất hiện nhiều (> 50%)

b: Tần suất xuất hiện của thiên địch trên ruộng khoai lang trong tổng số 9 lần khảo sát.

4.2 Nghiên cứu về pheromone giới tính tổng hợp của sùng khoai lang

4.2.1 Tổng hợp hợp chất (Z3-12:E2) pheromone giới tính của sùng khoai lang trong phòng thí nghiệm

4.2.1.1 Con đường tổng hợp hợp chất (Z)-3-Dodecenyl (E)-2-Butenoate (Z3-12:E2) pheromone giới tính của sùng khoai lang

Con đường tổng hợp thành hợp chất (Z)-3-dodecenyl (E)-2-butenoate (Z3-12:E2) theo phản ứng Wittig bao gồm 5 bước như sau:

a) Bước 1: Tổng hợp hợp chất 3-Bromo-propan-1-ol (2)

Từ hợp chất ban đầu là 1,3-propanediol (1) (3 g; 39,4 mmol) phản ứng Brom hóa với HBr (48%) (6,6 g; 39,4 mmol) được khuấy trong Toluene (100 ml) ở nhiệt độ 110⁰C liên tục trong 12 giờ trên máy khuấy từ gia nhiệt. Sau đó chờ hỗn hợp nguội xuống đến nhiệt độ phòng, hỗn hợp này được chuyển vào phễu phân tách, thêm vào 100 ml nước muối bão hòa, lắc đều rồi tách lấy phần hữu cơ. Phần dung dịch nước còn lại được trích với dung môi *n*-Hexane (100 ml), lắc đều và tách lấy phần chất hữu cơ (lặp lại 3 lần).

Phần dung môi hữu cơ thu được lọc qua cột thủy tinh nhồi với chất Sodium sulfate (Na₂SO₄) để loại bỏ toàn bộ nước và các chất rắn, sau đó cô đặc hỗn hợp và làm tinh khiết bằng cột sắc ký mở sử dụng Silicagel làm pha

tĩnh thu được hợp chất 3-Bromo-propan-1-ol (**2**) (2,8 g; 20,1 mmol) đạt năng suất 51%. MS (m/z): 27, 31, 41, 58, 120 (base) và 122. Phổ ^1H NMR δ (ppm) = 2,05 - 2,13 (2H, tt, J = 6,53, 6,37 Hz), 3,53 - 3,57 (2H, t, J = 6,58 Hz) và 3,77 - 3,82 (2H, t, J = 6,15 Hz). Phổ ^{13}C NMR δ (ppm) = 30,40, 34,96 và 60,31.

b) Bước 2: Tổng hợp chất 1-Bromo-3-methoxymethoxy-propane (3)

Hỗn hợp của hợp chất 3-bromo-propan-1-ol (**2**) (2,8 g; 20,1 mmol) với LithiumBromide Monohydrate (220 mg; 2,1 mmol) và *p*-Tolunesofonic Acid Monohydrate (500 mg) được khuấy trong Dimthoxymethane (150 ml) ở nhiệt độ phòng liên tục trong 24 giờ. Sau đó thêm vào hỗn hợp với 150 ml nước muối và hỗn hợp được chuyển sang phễu phân tách để lắc và tách lấy phần hữu cơ. Phần dung dịch nước còn lại được ly trích với dung môi *n*-Hexane (100 ml), lắc đều và tách lấy phần chất hữu cơ (lặp lại 3 lần).

Phần dung môi hữu cơ được lọc qua cột thủy tinh nhồi với hợp chất Sodium sulfate (Na_2SO_4) để loại bỏ toàn bộ nước và các chất rắn, sau đó cô đặc hỗn hợp và làm tinh khiết bằng cột sắc ký mở sử dụng Silicagel làm pha tĩnh thu được hợp chất 1-Bromo-3methoxymethoxy-propane (**3**) (3,38 g; 18,5 mmol) đạt năng suất 92%. MS (m/z): 29, 41, 45 (base), 75, 121, 123, 152, 154, 181 và 183. Phổ ^1H NMR δ (ppm) = 2,08-2,17 (2H, tt, J = 6,84, 6,23 Hz), 3,37 (3H, s), 3,51-3,56 (2H, t, J = 6,62 Hz), 3,64-3,69 (2H, t, J = 6,19) và 4,63 (2H, s). Phổ ^{13}C NMR δ (ppm) = 30,46, 32,75, 55,25, 65,00 và 96,47.

c) Bước 3: Tổng hợp chất (Z)-1-Methoxymethoxy-dodec-3-ene (4)

Tiếp theo hợp chất 1-Bromo-3-methoxymethoxy-propane (**3**) (3,38 g; 18,5 mmol) được đun với hợp chất Triphenylphosphine (4,9 g; 18,5 mmol) trong 100 ml Benzen ở nhiệt độ 110°C liên tục trong 72 giờ. Sau đó hỗn hợp để nguội xuống nhiệt độ phòng, lượng Benzen trong bình phản ứng được gạn bỏ, hỗn hợp còn lại trong bình được rửa với 50 ml dung môi Benzen (lặp lại 3 lần), rồi loại bỏ toàn bộ dung môi Benzen bằng cách đặt bình phản ứng vào buồng hút chân không liên tục trong 12 giờ. Tiếp theo, sau khi thêm vào hỗn hợp với 50 ml hợp chất THF, bình phản ứng được đặt vào một chậu nước đá (nhiệt độ từ $0-5^\circ\text{C}$) và liên kết với môi trường trơ của khí Argon (một bong bóng khí Argon).

Tiếp theo, dung dịch 1M của hợp chất Sodium Bis (trimethylsilyl) amide trong hợp chất THF (19 mmol) được cho vào từng giọt. Đợi đến khi hỗn hợp trong bình phản ứng hòa tan hoàn toàn (có màu đỏ cam), tiếp tục cho hợp chất 1-nonanal (2,63 g; 18,5 mmol) từng giọt vào hỗn hợp trong bình phản ứng. Giữ hỗn hợp ở điều kiện nhiệt độ phòng, tiếp tục khuấy thêm 1 giờ trên máy

khuấy từ, thêm 100 ml nước lạnh vào hỗn hợp, rồi chuyển vào phễu phân tách để tách lấy phần hữu cơ. Phần nước còn lại trong phễu phân tách được ly trích tiếp tục với 100 ml dung môi *n*-Hexane (lặp lại 3 lần).

Phần hữu cơ thu được rửa bằng cách lắc với dung dịch 1N HCl (100 ml) và NaHCO₃ (100 ml), sau đó cô đặc hỗn hợp thu được và làm tinh khiết bằng cột sắc ký mở với Silicagel làm pha tĩnh, thu được 2,21 g (9,7 mmol) MOM ether của hợp chất (*Z*)-3-dodecen-1-ol (**4**) (đạt trên 99% đồng phân *Z*) (hiệu suất đạt 52,4%). MS (*m/z*): 45 (base), 55, 68, 82, 96, 109, 124, 138, 166, 183, 197 và 227. Phổ ¹H NMR δ (ppm) = 0,85 - 0,90 (3H, t, *J*= 7,39 Hz), 1,26 (12 H, broad), 2,01 - 2,08 (2H, td, *J*= 7,01, 7,23 Hz), 2,31 - 3,38 (2H, td, *J*= 7,66, 7,56 Hz), 3,36 (3H, s), 3,51 - 3,56 (2H, t, *J*= 7,26 Hz), 4,63 (2H, s), 5,33 - 5,39 (2H, m). Phổ ¹³C NMR δ (ppm) = 14,14, 22,72, 27,38, 27,92, 29,21, 29,35, 29,55, 29,66, 31,94, 55,12, 67,45, 96,35, 125,38 và 132,27.

***d* Bước 4: Tổng hợp hợp chất (*Z*)-3-dodecen-1-ol (**5**)**

Tiếp theo hợp chất (*Z*)-3-dodecen-1-ol (**4**) (2,21 g; 9,68 mmol) được khuấy trong 20 ml dung dịch 0,5 N HCl trong Methanol liên tục trong 24 giờ, sau đó thêm 30 ml dung môi *n*-Hexane và 30 ml nước lạnh vào hỗn hợp, rồi chuyển hỗn hợp này sang phễu phân tách để tách lấy phần hữu cơ. Phần nước còn lại trong phễu phân tách được ly trích tiếp tục với 30 ml dung môi *n*-Hexane (lặp lại 3 lần).

Phần hữu cơ thu được rửa bằng cách lắc với 30 ml dung dịch NaHCO₃, sau đó cô đặc hỗn hợp này và làm tinh khiết bằng cột sắc ký mở thu được 1,69 g (9,2 mmol) hợp chất (*Z*)-3-dodecen-1-ol (*Z*3-12:OH) (**5**), với độ tinh khiết được kiểm tra bằng máy Sắc ký khí khối phổ (GC-MS) đạt trên 99% và hiệu suất đạt 94,6%. MS (*m/z*)= 29, 41, 55, 68 (base), 81, 95, 109, 123, 138, 166 và 184. Phổ ¹H NMR δ (ppm) = 0,86 - 0,90 (3H, t, *J*= 7,27 Hz), 1,27 - 1,94 (12H, broad), 2,03 - 2,12 (2H, dt, *J*= 7,53, 6,96 Hz), 2,30 - 2,37 (2H, td, *J*= 6,84, 7,39 Hz), 3,62 - 3,67 (2H, t, *J*= 7,43 Hz), 5,37 - 5,46 (1H, td, *J*= 7,61, 11,57 Hz) và 5,54- 5,63 (1H, td, *J*= 7,4, 11,09). Phổ ¹³C NMR δ (ppm) = 14,14, 22,72, 27,45, 29,35, 29,37, 29,55, 29,79, 30,80, 31,94, 62,30, 124,91 và 133,35.

***e* Bước 5: Tổng hợp hợp chất (*Z*)-3-Dodecen (*E*)-2-butenolate**

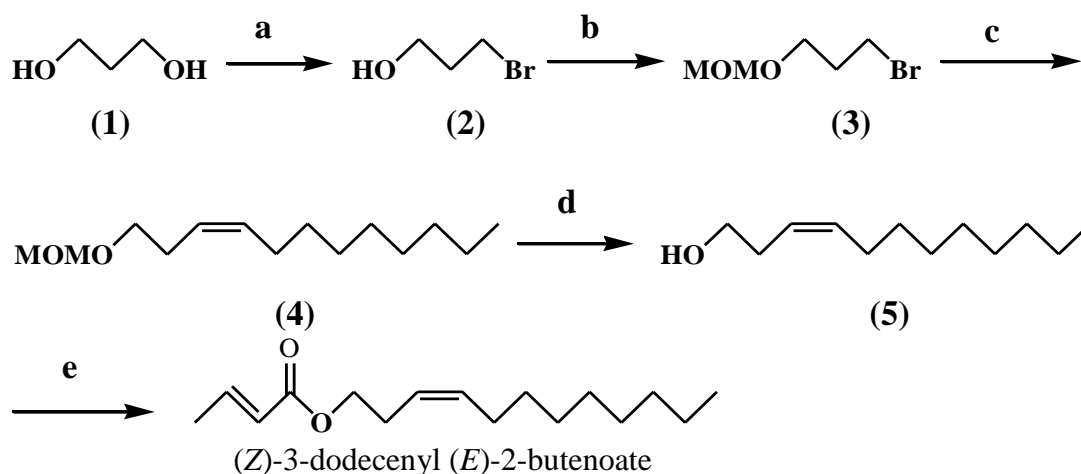
Tiếp theo hợp chất (*Z*)-3-dodecen-1-ol (**5**) (1,69 g; 9,2 mmol) được hỗn hợp với hợp chất CH₂Cl₂ (30 ml) và chất Pyridine (5 ml) rồi khuấy ở điều kiện lạnh, nhiệt độ khoảng 0-5⁰C và cho vào hỗn hợp đang khuấy này từng giọt chất Crotonyl chloride (1,15 g; 11 mmol). Sau khi khuấy hỗn hợp liên tục trong 1 giờ, thêm 30 ml nước lạnh và 30 ml dung môi *n*-Hexane vào hỗn hợp này

và chuyển hỗn hợp vào phễu ly trích để tách lấy phần hữu cơ. Phần nước còn lại trong phễu được ly trích tiếp với 30 ml dung môi *n*-Hexane (lặp lại 3 lần).

Phần hữu cơ thu được rửa bằng cách lắc với 30 ml dung dịch NaHCO_3 , sau đó cô đặc hỗn hợp này và làm tinh khiết bằng cột sắc ký mở thu được hợp chất (Z)-3-Dodecen (E)-2-butenolate, chính là hợp chất Z3-12:E2, (pheromone giới tính tổng hợp của sùng khoai lang), với độ tinh khiết được kiểm tra bằng Sắc ký khí khối phổ (GC-MS) đạt trên 99% (1,86 g; 7,4 mmol) và hiệu suất đạt 80,4%. MS (m/z) = 29, 41, 54, 69 (base), 82, 96, 109, 124, 138, 166 và 252. Phổ ^1H NMR δ (ppm) = 0,85 - 0,90 (3H, t, J = 7,39 Hz), 1,27 (12H, broad), 1,86 - 1,89 (3H, dd, J = 8,52, 1,50 Hz), 2,00 - 2,08 (2H, dt, J = 7,57, 7,48 Hz), 2,36 - 2,44 (2H, td, J = 7,35, 7,40 Hz), 4,09 - 4,14 (2H, t, J = 8,13 Hz), 5,30 - 5,40 (1H, td, J = 7,31, 12,3 Hz), 5,46 - 5,55 (1H, dt, J = 11,05, 7,44 Hz), 5,81 - 5,87 (1H, dt, J = 15,69, 1,59 Hz) và 6,91 - 7,03 (1H, qd, J = 6,97, 15,61 Hz). Phổ ^{13}C NMR δ (ppm) = 14,14, 17,99, 22,72, 26,94, 27,36, 29,35, 29,35, 29,58, 29,66, 31,95, 63,73, 122,77, 124,39, 132,99, 144,56 và 166,59.

Mỗi giai đoạn phản ứng sau khi ly trích và tinh lọc phải giữ lại một ít mẫu chuẩn để kiểm tra phản ứng bằng sắc ký lớp mỏng và thẩm định cấu trúc hóa học bằng các phân tích Cộng hưởng từ hạt nhân và Sắc ký khí khối phổ.

Nhìn chung, trải qua 5 bước thực hiện tổng hợp thành hợp chất (Z)-3-Dodecen (E)-2-butenolate (Z3-12:E2) từ hợp chất ban đầu là 1,3-propanediol như phần trình bày ở trên, có thể đúc kết xây dựng thành quy trình tổng hợp pheromone giới tính của SKL một cách tổng quát, gồm 5 bước cụ thể như sau:



Hình 4.4: Quy trình tổng hợp hợp chất (Z)-3-dodecenyl (E)-2-butenolate, pheromone giới tính của sùng khoai lang

a = HBr/Toluene ; b = $\text{DMM/LiBr}/p\text{-TsOH}$;

c = $\text{PPh}_3/\text{Sodium Bis(trimethylsilyl)amide/Heptanal/THF}$;

d = $0,5 \text{ N HCl/MeOH}$; e = $\text{Crotonyl Chloride/Pyridine/CH}_2\text{Cl}_2$.

Bước 1: Brom hóa nhóm -OH của hợp chất 1,3-propanediol (1) bằng hợp chất HBr trong môi trường dung môi Toluene thu được hợp chất (2).

Bước 2: Bảo vệ nhóm -OH còn lại bằng Ether của Dimethoxy-methane (-OMOM) (2). Đun hợp chất (2) với Triphenylphosphine trong dung môi Benzen ở 110⁰C trong 48 giờ thu được muối Phosphorane, hợp chất (3).

Bước 3: Sử dụng phản ứng Wittig liên kết hợp chất (3) với **1-nonanal** bằng Sodium Bis(trimethylsilyl)amide được sử dụng làm môi trường bazơ trong dung môi THF thu được MOM-Ether của hợp chất (Z)-3-dodecenyl-1-ol (4).

Bước 4: Loại bỏ sự bảo vệ nhóm -OH của MOM-Ether bằng cách khuấy hợp chất (4) với dung dịch HCl liên tục trong 24 giờ thu được hợp chất (5).

Bước 5: Hợp chất (Z)-3-dodecenyl-1-ol (Z3-12:OH) (5) được **kết hợp với hợp chất Crotonyl Chloride** bằng phản ứng ester hóa trong dung môi CH₂Cl₂ dưới môi trường kiềm của Pyridine tạo thành hợp chất (Z)-3-dodecenyl (E)-2-butenolate (Z3-12:E2).

Cho đến nay hợp chất Z3-12:OH đã được tổng hợp bằng các con đường khác nhau chủ yếu thông qua phản bắt cặp và phản ứng Wittig. Mỗi con đường tổng hợp có những ưu, khuyết điểm riêng thực hiện theo 2 nhóm tác giả được so sánh trong phần thảo luận chung bên dưới:

* **Con đường tổng hợp thông qua phản ứng bắt cặp:** các tác giả Heath *et al.* (1986), Lo *et al.* (1992), Sureda *et al.* (2006) tổng hợp thông qua phản ứng bắt cặp để tạo thành hợp chất Dodec-3-yn-1-ol, sau đó khử nối ba bằng phản ứng Lindlar để thu được hợp chất Z3-12:OH.

- **Ưu điểm:** hợp chất Z3-12:OH có cấu hình Z (*cis*) của nối đôi được chọn lọc, từ đó làm tăng hiệu suất tổng hợp của toàn bộ quy trình.

- **Nhược điểm:** phản ứng bắt cặp sử dụng các chất phản ứng đắt tiền, bao gồm các tác nhân gây ung thư như hợp chất Ethylene oxide và Hexamethyl phosphoric triamide (HMPA). Chất xúc tác Lindlar dùng trong phản ứng khử (Hydrogenation) là hỗn hợp của chất Bariumsulfate và chì, là hợp chất có tính độc đối với sức khỏe con người. Do đó, con đường tổng hợp thông qua phản ứng bắt cặp đòi hỏi phải được thực hiện trong điều kiện an toàn nghiêm ngặt.

* **Con đường tổng hợp thông qua phản ứng Wittig:** Nguyen Cong Hao *et al.* (1996), Mithran và Subbaraman (1999) đã xây dựng quy trình tổng hợp thành hợp chất Z3-12:OH thông qua phản ứng Wittig như sau:

Con đường tổng hợp của Nguyen Cong Hao *et al.* (1996), hợp chất Methyl acrylate được sử dụng làm chất phản ứng ban đầu. Mặc dù, chưa tìm thấy

những mô tả cụ thể, nhưng qua sơ đồ con đường tổng hợp của Nguyen Cong Hao *et al.* (1996) nhận thấy phản ứng Brom hóa nhóm chức Alken của hợp chất Methyl acrylate bằng Hydrogen bromide để tạo thành hợp chất Methyl 3-bromopropionate theo nguyên tắc Markovnikov thì hiệu suất của phản ứng sẽ rất thấp. Thêm vào đó, việc loại bỏ sự bảo vệ nhóm chức rượu của Ester bằng Lithium aluminium hydride là phức tạp hơn so với việc loại bỏ sự bảo vệ nhóm chức rượu của Ether.

Con đường tổng hợp của Mithran và Subbaraman (1999) sử dụng hợp chất Bromoacetal và hợp chất 2-(2-bromo-ethyl)-[1,3]-dioxolane làm chất phản ứng ban đầu. Đây là hợp chất với nhóm chức Aldehyde được bảo vệ nên sản phẩm của phản ứng Wittig là Olefinic acetal, sau khi loại bỏ sự bảo vệ nhóm chức chỉ thu được hợp chất (Z)-3-dodecenal. Điều này làm cho con đường tổng hợp phải tăng thêm công đoạn khử Z3-12:Ald để thu được hợp chất Z3-12:OH. Toàn bộ con đường tổng hợp này thông qua 8 bước thực hiện trải qua nhiều công đoạn rất phức tạp.

Tổng hợp thông qua phản ứng Wittig có ưu khuyết điểm như sau:

- **Ưu điểm:** khắc phục được việc sử dụng các chất là tác nhân gây ung thư, trong khi điều kiện phản ứng đơn giản, dễ thực hiện với chất phản ứng rẻ tiền (so với phản ứng bắt cặp).

- **Nhược điểm:** phản ứng Wittig có khuyết điểm quan trọng là tạo thành hợp chất Z3-12:OH đồng thời có 2 cấu hình Z (*cis*) và E (*trans*) của nối đôi dẫn đến quy trình phải thêm công đoạn khử hợp chất Z3-12:Ald bằng Sodium borohydride để thu được hợp chất Z3-12:OH, quy trình gồm 8 bước, như vậy chi phí và thời gian thực hiện phản ứng sẽ gia tăng, trong khi hiệu suất tổng hợp của quy trình giảm.

*** Con đường tổng hợp hợp chất (Z)-3-dodecenyl (E)-2-butenolate (Z3-12:E2) tại phòng thí nghiệm, ĐHCT, năm 2010**

Con đường tổng hợp thông qua phản ứng Wittig với các hợp chất ban đầu là hợp chất 1,3-propanediol và 1-nonanal. Trong quy trình này, phản ứng Wittig được điều chỉnh để tổng hợp chọn lọc cấu hình Z (*cis*) của nối đôi trong phân tử theo mô tả của Lê Văn Vàng và *ctv.* (2006). Vì vậy, cần thay đổi điều kiện phản ứng, cụ thể là thay đổi chất phản ứng *n*-Butyllithium bằng hợp chất Sodium Bis(trimethylsilyl) amide, để thu được sản phẩm Z3-12:OH chỉ có cấu hình Z (*cis*) đã được mô tả bởi Le Van Vang *et al.* (2008).

Để khắc phục nhược điểm của phản ứng Wittig, thực hiện bằng cách chọn hợp chất phản ứng ban đầu ít độc hại là hợp chất 1,3-propanediol và 1-

nonanal với nhóm chức OH được bảo vệ bằng OMOM ether và sử dụng hợp chất Sodium bis(trimethylsilyl) amide để tạo môi trường kiềm cho phản ứng Wittig, thu được sản phẩm Z3-12:OH chỉ có cấu hình Z (*cis*), không phải thêm công đoạn phân tách và tinh lọc sản phẩm Z3-12:OH để chọn lọc cấu hình Z. Hiệu suất tổng hợp của toàn bộ quy trình thông qua 5 bước thực hiện là 62%. Quy trình này rút ngắn công đoạn tổng hợp, chỉ còn 5 bước (con đường tổng hợp của Mithran và Subbaraman (1999) có 8 bước), ít tốn chi phí hóa chất, dung môi, với độ tinh khiết sản phẩm cuối cùng được kiểm định bằng Sắc ký khí khối phổ (GC-MS) đạt trên 99%. Như vậy, con đường tổng hợp thành hợp chất (Z)-3-dodeceny-(E)-2-butenolate (Z3-12:E2) đã thành công thông qua phản ứng Wittig khắc phục được nhược điểm như trình bày ở trên.

- **Ưu điểm:** sử dụng các hợp chất ban đầu ít độc hại, điều kiện phản ứng đơn giản, dễ thực hiện với chất phản ứng rẻ tiền, có sẵn trên thị trường. Thay đổi chất phản ứng để chọn lọc cấu hình Z (*cis*) của nối đôi trong phân tử, đây là điểm mấu chốt quan trọng của quy trình tổng hợp tạo nên sự khác biệt so với các quy trình trước đây.

- **Khuyết điểm:** để khắc phục phản ứng Wittig tạo thành hợp chất Z3-12:OH có 2 cấu hình Z (*cis*) và E (*trans*) của nối đôi, bằng cách thay đổi hợp chất phản ứng để tạo môi trường kiềm cho phản ứng Wittig thu được sản phẩm Z3-12:OH chỉ có cấu hình Z (*cis*), quy trình chỉ còn 5 bước, ít tốn chi phí hóa chất, thời gian, với độ tinh khiết đạt trên 99%, hiệu suất toàn bộ quy trình là 62% (từ 3 g chất ban đầu tổng hợp ra sản phẩm cuối cùng là 1,86 g).

4.2.1.2 Thẩm định cấu trúc hợp chất (Z)-3-dodeceny-(E)-2-butenolate

Sau khi tổng hợp được hợp chất (Z)-3-dodeceny-(E)-2-butenolate tiến hành gửi mẫu hợp chất này qua phòng thí nghiệm Sinh thái hóa chất, Bộ môn Khoa học sinh học ứng dụng, Khoa Nông Nghiệp, Trường Đại học Nông nghiệp và Công nghệ Tokyo, Nhật Bản để phân tích mẫu. Hình 4.5 trình bày kết quả phân tích và thẩm định cấu trúc, độ tinh khiết của hợp chất Z3-12:E2 tổng hợp bằng các phân tích Cộng hưởng từ hạt nhân và Sắc ký khí khối phổ.

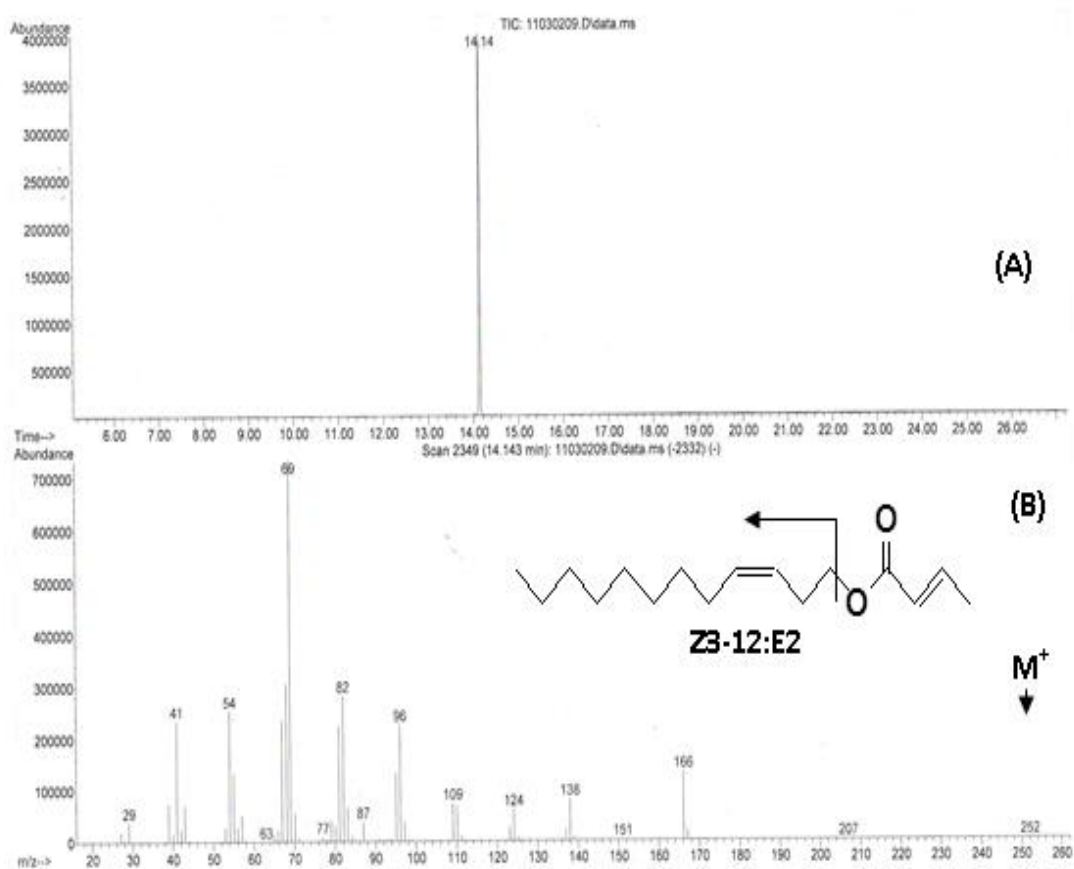
Sử dụng cột thủy tinh phân tích là DB-23 và chương trình nhiệt độ như sau: bắt đầu ở 80°C (trong 1 phút), tiếp tục tăng lên 210°C với tốc độ 8°C/phút và giữ ở 210°C trong 10 phút thì hợp chất Z3-12:E2 tổng hợp có thời gian lưu là 14,14 phút với độ tinh khiết của hợp chất biểu hiện là 100% (Hình 4.5 (A)).

Phổ khối lượng (Hình 4.5 (B)) với các ion phân tử lượng M^+ ở m/z 252 và các ion phân rã ở m/z 166 (M-butenic acid), 54, 69, 82, 96, 109, 124 và

136 (hình thành do sự phân tách của một nhóm CH₃ hoặc -CH₂) đã chứng tỏ hợp chất ester mạch thẳng 16 carbon chứa 2 nối đôi trong phân tử.

Phổ ¹H NMR (Phụ lục B) cho các cao điểm ở δ (ppm) =5,30-5,40 (1H, td, *J*=7,31, 12,3 Hz), 5,46-5,55 (1H, dt, *J*=11,05, 7,44 Hz) có hằng số bắt cặp của các germinal hydrogens là 12,3 Hz và 11,05 Hz cho thấy nối đôi của dẫn xuất rượu có cấu hình *Z* (*cis*) và các cao điểm ở 5,81- 5,87 (1H, dt, *J*=15,69, 1,59 Hz) và 6,91-7,03 (1H, qd, *J*=6,97, 15,61 Hz) có hằng số bắt cặp của các germinal hydrogens là 15,69 Hz và 16,61 Hz, chứng tỏ nối đôi của dẫn xuất axit có cấu hình *E* (*trans*).

Thêm vào đó, phổ ¹³C NMR δ (ppm)=14,14, 17,99, 22,72, 26,94, 27,36, 29,35, 29,35, 29,58, 29,66, 31,95, 63,73, 122,77, 124,39, 132,99, 144,56 và 166,59 (Mục 4.2.2.1 và Phụ chương) cho thấy sự hiện diện của 16 carbon với các cao điểm ở δ (ppm) là 122,77 (O=C-CH=CH), 124,39 (-CH=CH-CH₂-), 132,99 (-CH₂-CH=CH-) và 144,56 (-CH=CH-CH₃), dựa vào kết quả phân tích này đã xác định được cấu trúc phân tử của hợp chất (*Z*)-3-dodeceny (*E*)-2-butenolate (*Z*3-12:*E*2) (pheromone giới tính tổng hợp).



Hình 4.5: Phân tích GC-MS của hợp chất Z3-12:E2 tổng hợp
(A) Phổ sắc ký tổng ion (TIC, Total ion Chromatogram);
(B) Phổ khối lượng (MS, Mass Spectrum).

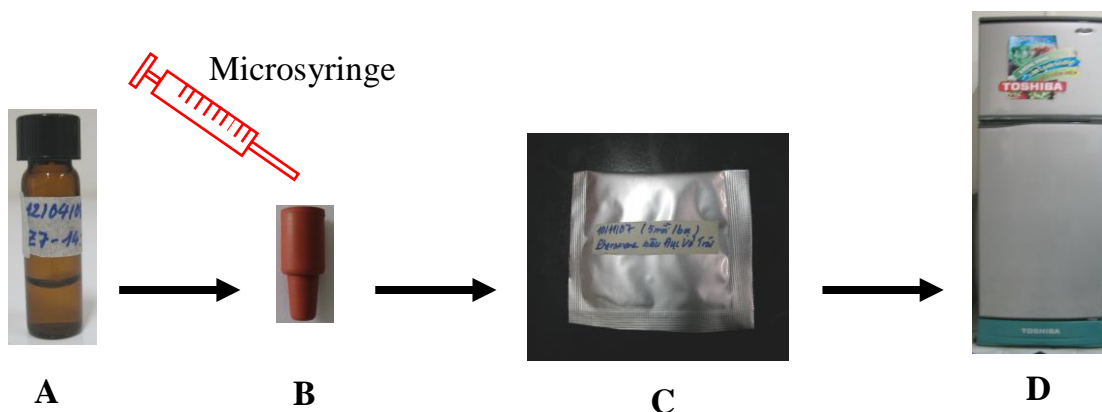
4.2.1.3 Điều chế môi pheromone giới tính của sùng khoai lang

Sau khi tổng hợp thành hợp chất (*Z*)-3-dodecenyl (*E*)-2-butenolate (*Z*3-12:*E*2) là pheromone giới tính tổng hợp của SKL, bước tiếp theo là thực hiện điều chế thành môi pheromone giới tính tổng hợp bằng cách bơm hợp chất này vào tuýp cao su để kìm giữ và phóng thích mùi pheromone từ từ, dùng đặt bẫy hấp dẫn sùng đục tới tiêu diệt chúng ở điều kiện ngoài đồng. Từ đó, làm cơ sở cho việc ứng dụng pheromone giới tính tổng hợp trong việc phòng trị SKL theo hướng thân thiện với môi trường, thay thế dần thuốc trừ sâu hóa học độc hại làm ảnh hưởng tới môi trường sinh thái và sức khỏe con người.

Pheromone giới tính tổng hợp, sau khi tinh lọc, tạo ra sản phẩm cuối cùng được pha loãng trong dung môi *n*-Hexane ở nồng độ 10 mg/ml (tương ứng 10 µg/µl). Dùng các microsyringe (dụng cụ kim bơm hóa chất) có dung tích 25 và 100 µl để rút dung dịch pha loãng ở các nồng độ khác nhau rồi bơm vào tuýp cao su (quy cách 0,8 cm OD rubber septum, Aldrich, Germany) hoặc ống cao su non, đặt các tuýp cao su (ống cao su non) này vào trong tủ hút hơi độc khoảng 10 phút làm bay hơi dung môi. Sau đó, lấy tuýp cao su ra ngoài và không thêm bất kỳ chất ổn định hay chất chống oxy hóa nào, tuýp cao su này gọi là môi pheromone giới tính tổng hợp của SKL và được cho vào các bao nhôm ép miệng kín lại, dán nhãn và lưu trữ bảo quản trong điều kiện lạnh của tủ lạnh cho đến khi làm thí nghiệm.

Trong quá trình điều chế môi pheromone giới tính tổng hợp, các thao tác được thực hiện cẩn thận theo phương pháp mô tả ở trên, môi pheromone giới tính tổng hợp khi sử dụng ngoài đồng thì hiệu quả hấp dẫn sùng đục vào bẫy có thể kéo dài tới 2 tháng. Như vậy, việc thay môi mới được thực hiện định kỳ 2 tháng/lần. Vụ khoai lang có thời gian sinh trưởng từ 3-5 tháng tùy theo giống khoai có thể sử dụng 2 lần môi pheromone giới tính để đặt bẫy trên ruộng khoai hấp dẫn sùng đục vào bẫy trong suốt vụ khoai.

Tóm lại, các bước thực hiện điều chế môi pheromone giới tính tổng hợp của SKL trong điều kiện phòng thí nghiệm được mô tả theo Hình 4.6 như sau:



Hình 4.6: Các bước điều chế mồi pheromone giới tính tổng hợp của sùng khoai lang
 (A) Pheromone tổng hợp hòa tan trong dung môi *n*-Hexane;
 (B) Pheromone tổng hợp được nhồi vào túyp cao su;
 (C) Đóng gói mồi pheromone trong bao nhôm;
 (D) Bảo quản ở điều kiện lạnh trong tủ lạnh.

Bước 1: Pha loãng hợp chất (*Z*)-3-dodecenyl-(*E*)-2-butenolate (**A**) trong dung môi *n*-Hexane tinh khiết ở nồng độ 10 mg/ml.

Bước 2: Dùng microsyringe hút 30 μ l dung dịch pha loãng (Bước 1), tương ứng với 0,3 mg hợp chất (*Z*)-3-dodecenyl-(*E*)-2-butenolate, bơm vào túyp cao su (**B**) để làm mồi pheromone giới tính.

Bước 3: Cho túyp cao su (**B**) đã được bơm hợp chất (Z3-12:E2) (mồi pheromone giới tính tổng hợp) vào bao giấy nhôm hàn kín lại, bảo quản ở điều kiện lạnh trong tủ lạnh cho đến khi làm thí nghiệm hay áp dụng ngoài đồng.

4.2.2 Ứng dụng của pheromone giới tính tổng hợp ở điều kiện ngoài đồng

4.2.2.1 Khảo sát hiệu quả hấp dẫn của pheromone giới tính tổng hợp đối với SKL ở điều kiện ngoài đồng tại huyện Bình Tân, tỉnh Vĩnh Long

a) Khảo sát hiệu quả hấp dẫn của pheromone giới tính tổng hợp ở các khối lượng/bẫy khác nhau đối với sùng khoai lang ở ngoài đồng

Kết quả trình bày ở Bảng 4.8 cho thấy các NT có mồi pheromone là (*Z*)-3-dodecenyl-(*E*)-2-butenolate ở các khối lượng sản phẩm (KLSP) khác nhau đều cho hiệu lực hấp dẫn cao hơn có ý nghĩa so với NT đối chứng (mồi là dung môi *n*-Hexane). Điều này chứng tỏ pheromone giới tính tổng hợp đã cho hiệu lực hấp dẫn SKL trên ruộng khoai. Giữa các KLSP thí nghiệm (0,1, 0,3, 0,5, 0,7 và 1,0 mg/bẫy) thì nghiệm thức A-4 và A-5 có KLSP là 0,7 và 1,0 mg/bẫy cho hiệu quả hấp dẫn sùng đực lần lượt là 39 và 44 con/bẫy/tuần, tương đương nhau, có ưu thế trội hơn so với các NT khác. Tuy nhiên, kết quả phân tích thống kê cho thấy số lượng sùng đực vào bẫy/tuần ở các NT còn lại đều tương đương nhau và không khác biệt ý nghĩa 5% so với 2 NT A-4 và A-5. Từ kết

quả này có thể chọn NT A-1 với KLSP 0,1 mg/bẫy để áp dụng, tuy nhiên qua theo dõi số lượng sùng đục vào bẫy nhận thấy hiệu lực hấp dẫn sùng có tính không ổn định theo thời gian so với NT A-2, vì vậy để áp dụng pheromone tổng hợp ở KLSP thấp nhằm đảm bảo hiệu lực hấp dẫn sùng ổn định theo thời gian trên đồng ruộng, có thể chọn NT A-2 với KLSP là 0,3 mg/bẫy để áp dụng làm môi pheromone là phù hợp.

Bảng 4.8: Hiệu quả hấp dẫn của pheromone giới tính tổng hợp ở các khối lượng sản phẩm khác nhau đối với sùng khoai lang tại xã Thành Lợi, huyện Bình Tân, Vĩnh Long, năm 2010

Nghiệm thức	Thành phần	Khối lượng sản phẩm/bẫy (mg/bẫy)	Số lượng sùng đục (con/bẫy/tuần)
A-1	Z3-12:E2 tinh khiết	0,1	23,0 ^{ab}
A-2	Z3-12:E2 tinh khiết	0,3	21,7 ^{ab}
A-3	Z3-12:E2 tinh khiết	0,5	27,3 ^{ab}
A-4	Z3-12:E2 tinh khiết	0,7	44,0 ^a
A-5	Z3-12:E2 tinh khiết	1,0	39,0 ^a
A-6	Z3-12:E2 chưa tinh khiết	0,3	22,0 ^{ab}
A-7	<i>n</i> -Hexane (Đối chứng)	0	0,0 ^c
CV(%)			11,84
Mức ý nghĩa			*

Các số trong cùng một cột có chữ theo sau giống nhau thì không khác biệt nhau qua thống kê ở mức ý nghĩa 5% và kiểm định Duncan. Số liệu các trung bình được chuyển đổi sang $\log(x+10)$ trước khi phân tích thống kê.

Trong thí nghiệm này có NT A-6 với KLSP 0,3 mg/bẫy chưa tinh khiết hợp chất Z3-12:E2, đưa vào để so sánh với sản phẩm đã tinh khiết ở cùng khối lượng, làm cơ sở đánh giá sơ bộ độ tinh khiết của pheromone tổng hợp thông qua hiệu lực hấp dẫn sùng đục vào bẫy. Theo giả thuyết nếu hiệu lực hấp dẫn sùng đục vào bẫy tương đương nhau thì độ tinh khiết của 2 sản phẩm này cũng giống nhau, như vậy sản phẩm tổng hợp không cần thêm công đoạn tinh khiết sẽ tiết kiệm chi phí và thời gian. Qua thử nghiệm thăm dò có thể chọn KLSP 0,3 mg/bẫy (chưa tinh khiết) là phù hợp với thí nghiệm này, do ở khối lượng thấp thì hiệu lực hấp dẫn sùng đục vào bẫy sẽ thể hiện sự khác biệt rõ hơn so với khối lượng cao.

Kết quả ở Bảng 4.8 cho thấy (a) nghiệm thức A-2 và A-6 cùng khối lượng SP 0,3 mg/bẫy cho hiệu quả hấp dẫn sùng đục tương đương nhau (21,7 và 22 con/bẫy/tuần) và cùng khác biệt so với đối chứng ở mức ý nghĩa 5%; (b) nếu sử dụng khối lượng SP tinh khiết thấp (từ 0,1-0,5 mg/bẫy) và chưa tinh

khiết (0,3 mg/bẫy) cho hiệu lực hấp dẫn sùng đực tương đương nhau, điều này cho thấy hợp chất Z3-12:E2 tổng hợp có độ tinh khiết cao; (c) khối lượng SP/bẫy cao có số lượng sùng đực vào bẫy cao so với bẫy có khối lượng SP/bẫy thấp, tuy nhiên chưa có khác biệt rõ rệt giữa các khối lượng SP/bẫy khác nhau.

Kết quả này cũng phù hợp với kết quả thăm định cấu trúc pheromone tổng hợp tại phòng thí nghiệm Sinh thái hóa chất, Bộ môn Khoa học sinh học ứng dụng, Khoa Nông Nghiệp, Trường Đại học Nông nghiệp và Công nghệ Tokyo, Nhật Bản với độ tinh khiết sản phẩm được kiểm tra bằng Sắc ký khí khối phổ (GC-MS) đạt trên 99%, như vậy quy trình tổng hợp này đã tổng hợp được hợp chất Z3-12:E2 pheromone giới tính có độ tinh khiết rất cao, không có lẫn tạp chất trong sản phẩm. Vì vậy, sản phẩm tổng hợp không cần phải thêm công đoạn tinh khiết nữa, nếu như bỏ qua được công đoạn tinh khiết sản phẩm sẽ rút ngắn thời gian tổng hợp và giảm bớt lượng hóa chất sử dụng trong quá trình tổng hợp pheromone giới tính của SKL, góp phần làm giảm giá thành sản xuất môi pheromone.

Bước đầu đã đánh giá hiệu lực hấp dẫn và tìm ra KLSP/bẫy phù hợp, các nghiên cứu tiếp theo nhằm tìm ra điều kiện thích hợp cho việc áp dụng môi pheromone giới tính tổng hợp của SKL ở ngoài đồng đã được thực hiện, kết quả khảo sát đạt được như sau.

b) Khảo sát ảnh hưởng của kiểu tuýp môi lên hiệu quả hấp dẫn của pheromone giới tính đối với sùng khoai lang ở ngoài đồng

Kết quả trình bày ở Bảng 4.9 với cùng KLSP là 0,3 mg/tuýp cao su (môi) cho thấy cả 2 kiểu tuýp môi ở NT B-1 và B-2 đều cho hiệu quả hấp dẫn sùng đực tương đương nhau và khác biệt so với đối chứng (ĐC: bẫy không) ở mức ý nghĩa 5%. Đặc biệt, ở tuần 3 và 4 cho thấy NT B-2 (kiểu tuýp môi Việt Nam: ống cao su non) có khác biệt so với B-3 (bẫy không), nhưng NT B-1 (kiểu tuýp môi Aldrich, Đức) lại không khác biệt so với NT B-3 ở mức ý nghĩa 5%. Như vậy, chứng tỏ kiểu tuýp môi Việt Nam (ống cao su non) là vật liệu nền có tác dụng giữ và phóng thích pheromone giới tính tổng hợp cho hiệu quả hấp dẫn sùng đực cao và không làm ảnh hưởng đến chất lượng của pheromone giới tính khi được khảo sát ngoài đồng.

Việc áp dụng hóa chất tín hiệu (pheromone) để quản lý côn trùng gây hại thường gặp trở ngại quan trọng, nhất là đối với các nước đang phát triển nơi mà nông sản có giá trị thấp, chi phí áp dụng cao. Trong đó, tuýp môi chiếm tỉ lệ chi phí đáng kể. Năm 2010, 1 tuýp cao su Aldrich, Đức có giá ở thời điểm hiện tại khoảng 15.000 đồng/tuýp. Việc tìm ra kiểu tuýp môi được sản xuất ở

Việt Nam (khoảng 50 đồng/ống cao su non) để thay thế cho kiểu tuýp môi Aldrich, Đức là tín hiệu rất tốt, đã mở ra triển vọng lớn cho việc áp dụng hóa chất tín hiệu để quản lý các loài côn trùng gây hại ở Việt Nam. Bởi vì, cùng khối lượng pheromone/tuýp môi như nhau, giá thành tuýp môi phụ thuộc vào vật liệu làm tuýp môi. Nếu chọn vật liệu rẻ tiền có sẵn phù hợp sẽ làm giảm giá thành tuýp môi một cách đáng kể và có hiệu quả kinh tế.

Bảng 4.9: Ảnh hưởng của kiểu tuýp môi lên hiệu lực hấp dẫn của pheromone giới tính tổng hợp đối với sùng khoai lang ở điều kiện ngoài đồng, năm 2010

Nghiệm thức	Kiểu tuýp môi	Số lượng sùng đực vào bẫy (con/bẫy/tuần)				
		Tuần 1	Tuần 2	Tuần 3	Tuần 4	Trung bình
B-1	Aldrich, Đức	157,0 ^a	119,7 ^a	76,33 ^{ab}	90,67 ^{ab}	109,0 ^a
B-2	Việt Nam	148,3 ^a	149,3 ^a	124,3 ^a	141,0 ^a	146,5 ^a
B-3	ĐC (bẫy không)	0,0 ^b	0,0 ^b	0,0 ^b	0,0 ^b	0,0 ^b
	CV(%)	40,45	68,95	68,94	84,43	52,90
	Mức ý nghĩa	*	*	*	*	*

Các số trong cùng một cột có cùng chữ theo sau giống nhau thì không khác biệt nhau qua thống kê ở mức ý nghĩa 5% và kiểm định Duncan. (ĐC: đối chứng). Số liệu các trung bình được chuyển đổi sang $\log(x+10)$ trước khi phân tích thống kê.

Về chất liệu tuýp cao su (môi) qua quan sát cảm quan nhận thấy tuýp môi Aldrich, Đức có kích thước lớn, có nhiều màu sắc, cao su dẻo và dày hơn, sau thời gian sử dụng 2 tháng còn nguyên hình dạng, hình trụ tròn rỗng bên trong, đầu lớn, đầu nhỏ, giá thành cao, số lượng 1 kg vật liệu ít. Ngược lại, tuýp môi Việt Nam có kích thước nhỏ, chỉ có màu vàng, cao su dẻo và mỏng hơn rất nhiều, là ống cao su non (dùng ghép cà chua) sau 2 tháng sử dụng có thể tự phân hủy, hình ống dài 2 cm, rỗng ở giữa, giá thành rẻ, số lượng 1 kg vật liệu rất lớn.

Sau khi xác định được kiểu tuýp môi phù hợp, nghiên cứu tiếp theo sẽ tìm ra kiểu bẫy cho hiệu quả hấp dẫn cao phù hợp với điều kiện ngoài đồng.

c) Khảo sát ảnh hưởng của kiểu bẫy lên khả năng hấp dẫn của pheromone giới tính tổng hợp đối với sùng khoai lang ở ngoài đồng

Kết quả trình bày ở Bảng 4.10 cho thấy số lượng sùng đực vào bẫy ở 2 nghiệm thức C-1 (bẫy nước+0,3 mg Z3-12:E2/tuýp) và nghiệm thức C-3 (bẫy dính+0,3 mg Z3-12:E2/tuýp) là tương đương nhau và cao hơn có ý nghĩa so với 2 nghiệm thức C-2 và C-4 (đối chứng, *n*-Hexane). Kết quả này cho thấy hiệu quả bắt được sùng đực của bẫy nước (109 con/bẫy/tuần) và bẫy dính (68 con/bẫy/tuần) là tương đương nhau, không khác biệt ý nghĩa. Tuy nhiên, số

lượng sùng đực vào bẫy trên thực tế ở bẫy nước cao gấp 1,6 lần so với bẫy dính. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Smit *et al.* (1997) bẫy nước dạng chai tròn cao cho hiệu quả hấp dẫn cao nhất so với các loại bẫy khác như bẫy thùng, bẫy can dầu, bẫy sô và bẫy dính trên 2 đối tượng SKL là loài *Cylas puncticollis* và *C. brunneus* ở Uganda.

Bảng 4.10: Hiệu quả của kiểu bẫy lên khả năng hấp dẫn của pheromone giới tính đối với thành trùng SKL trên ruộng khoai lang tại huyện Bình Tân, năm 2010

Nghiệm thức	Thành phần môi pheromone	Dạng kiểu bẫy	Số lượng sùng đực (con/bẫy/tuần)
C-1	Z3-12:E2 (0,3 mg)	Bẫy nước, chai 1,5 lít	109 ^a
C-2	n- Hexane	Bẫy nước, chai 1,5 lít	0 ^b
C-3	Z3-12:E2 (0,3 mg)	Bẫy dính, Takeda	68 ^a
C-4	n- Hexane	Bẫy dính, Takeda	0 ^b
CV(%)			13,30
Mức ý nghĩa			*

Các số trong cùng một cột có cùng chữ theo sau giống nhau thì không khác biệt nhau qua thống kê ở mức ý nghĩa 5% và kiểm định Duncan. Số liệu các trung bình được chuyển đổi sang $\log(x+10)$ trước khi phân tích thống kê.

Theo Le Van Vang *et al.* (2008) việc sử dụng bẫy dính cho hiệu quả hấp dẫn bướm sâu vẽ bùa (*Phyllocnistis citrella*) rất cao (178,4 bướm/bẫy/đêm). Tuy nhiên, đối với SKL thì bẫy dính tỏ ra không có hiệu quả hấp dẫn vượt trội hơn so với bẫy nước. Kết quả này có thể do tập quán sinh sống khác nhau giữa SKL (*C. formicarius*) và bướm sâu vẽ bùa (*P. citrella*) nói riêng, cũng như giữa bộ cánh cứng (Coleoptera) và bộ cánh vẩy (Lepidoptera) nói chung. Kết quả trình bày ở Bảng 4.10 cho thấy cả 2 loại bẫy đều cho hiệu quả tiêu diệt SKL là tương đương nhau. Tuy nhiên, nếu so về hiệu quả kinh tế thì bẫy nước có giá trị kinh tế cao hơn so với bẫy dính, vì bẫy dính được nhập từ Nhật Bản với giá khoảng 250.000 đồng/bẫy, còn bẫy nước rẽ tiền hơn nhiều (khoảng 1.200 đồng/bẫy). Mặt khác, bẫy nước dễ tìm mua ở Việt Nam và có thể sử dụng đại trà dễ dàng hơn, phù hợp với điều kiện ở Việt Nam, nhất là ở vùng ĐBSCL, có thể ứng dụng một cách rộng rãi ngoài đồng, nông dân dễ chấp nhận hơn và có thể tìm kiếm vật liệu này một cách dễ dàng. Như vậy, bẫy dính với giá thành quá đắt, do nhập từ Nhật Bản, chỉ thích hợp cho việc nghiên cứu chứ không phù hợp sử dụng rộng rãi. Trong khi đó, bẫy nước là loại bẫy cho hiệu quả hấp dẫn sùng đực và có hiệu quả kinh tế cao.

Sau khi tìm ra được kiểu bẫy bằng vật liệu đơn giản, rẽ tiền, dễ sử dụng, việc tìm hiểu màu sắc của bẫy có ảnh hưởng tới hiệu quả hấp dẫn sùng ngoài đồng hay không cũng được nghiên cứu tiếp theo.

d) Khảo sát ảnh hưởng của màu sắc bẫy lên khả năng hấp dẫn của pheromone giới tính tổng hợp đối với sùng khoai lang ở ngoài đồng

Kết quả trình bày ở Bảng 4.11 cho thấy số lượng sùng đục vào bẫy ở các NT D-1 (bẫy bình thường), D-2 (bẫy dán keo màu xanh) và D-3 (bẫy dán keo màu vàng) là tương đương, không khác biệt ý nghĩa 5%. Điều này chứng tỏ màu xanh dương và màu vàng không ảnh hưởng lên hiệu lực hấp dẫn của pheromone giới tính đối với SKL. Về khía cạnh màu sắc, nhất là màu vàng, đã được nghiên cứu và ứng dụng rộng rãi xem như là biện pháp vật lý (bẫy dính màu vàng) để thu hút côn trùng. Tuy nhiên, do tác động lên thị giác của côn trùng nên phạm vi tác động (hấp dẫn) của màu sắc là không lớn. Trong khi đó, pheromone giới tính là loại tín hiệu hóa học có tác động lên hệ thần kinh khứu giác của côn trùng, nên phạm vi hấp dẫn là lớn hơn rất nhiều so với màu sắc.

Bảng 4.11: Ảnh hưởng của màu sắc bẫy đối với thành trùng sùng khoai lang tại xã Thành Lợi, huyện Bình Tân, tỉnh Vĩnh Long, năm 2010

Nghiệm thức	Thành phần môi pheromone (Z3-12:E2)	Màu sắc bẫy pheromone	Số lượng sùng đục (con/bẫy/tuần)
D-1	0,5 mg/bẫy	Bẫy bình thường	156,9 ^a
D-2	0,5 mg/bẫy	Bẫy dán keo màu xanh	115,5 ^a
D-3	0,5 mg/bẫy	Bẫy dán keo màu vàng	172,3 ^a
D-4	0,5 mg nước cất	ĐC (bẫy bình thường)	0,0 ^b
CV(%)			22,13
Mức ý nghĩa			*

Các số trong cùng một cột có cùng chữ theo sau giống nhau thì không khác biệt nhau qua thống kê ở mức ý nghĩa 5% và kiểm định Duncan. ĐC: đối chứng. Số liệu các trung bình được chuyển đổi sang $\log(x+10)$ trước khi phân tích thống kê.

Mặt khác, thành trùng SKL thường hoạt động nhiều về đêm, nên ảnh hưởng của màu sắc (nếu có) lên hiệu lực hấp dẫn của pheromone giới tính là rất thấp và không khác biệt thống kê.

Khi đặt bẫy pheromone giới tính ở ngoài đồng, việc tìm hiểu độ cao đặt bẫy trên luống khoai có ảnh hưởng tới hiệu quả hấp dẫn sùng hay không cũng được nghiên cứu tiếp theo.

e) Khảo sát ảnh hưởng của độ cao đặt bẫy lên khả năng hấp dẫn của pheromone giới tính tổng hợp đối với sùng khoai lang ở ngoài đồng

Kết quả trình bày ở Bảng 4.12 khảo sát sự ảnh hưởng của độ cao đặt bẫy lên khả năng hấp dẫn của pheromone giới tính đối với SKL cho thấy số lượng sùng đục vào bẫy ở các nghiệm thức có độ cao đặt bẫy từ 0 m (cửa bẫy ngang

tán lá khoai) đến 30 cm, 50 cm và 1 m (cửa bẫy cao hơn tán lá khoai) là tương đương, không khác biệt ý nghĩa 5%, (dao động từ 22,9- 39,6 con/bẫy/tuần). Như vậy, chiều cao đặt bẫy trên ruộng khoai lang cũng không có ảnh hưởng đến khả năng hấp dẫn SKL của bẫy pheromone. Vì thế, có thể chọn việc đặt bẫy ở độ cao 0 cm (ngang tán lá khoai) là tốt nhất, vì bẫy được đặt cố định trên mặt ruộng, có thể tránh được đổ ngã và đỡ tốn công sức cũng như chi phí treo bẫy lên cao. Tuy nhiên, kết quả này có sự khác biệt so với nghiên cứu của Reddy (2012) đã thực hiện trên loài sùng này cho thấy chiều cao 50 cm có số lượng sùng đực vào bẫy cao hơn so với chiều cao đặt bẫy khác nhau (sát mặt đất hay cao hơn 1 m), có thể điều kiện thí nghiệm khác nhau nên kết quả ghi nhận cũng khác nhau.

Bảng 4.12: Ảnh hưởng của độ cao đặt bẫy lên khả năng hấp dẫn của bẫy pheromone giới tính đối với sùng khoai lang tại Bình Minh, năm 2010

Nghiệm thức	Thành phần môi pheromone	Độ cao đặt bẫy	Số lượng sùng đực (con/bẫy/tuần)
E-1	0,5 mg/bẫy	0 cm (ngang tán lá)	36,3 ^a
E-2	0,5 mg/bẫy	30 cm	39,6 ^a
E-3	0,5 mg/bẫy	50 cm	22,9 ^a
E-4	0,5 mg/bẫy	1 m	23,2 ^a
E-5	0 mùi/bẫy	0 cm (đối chứng)	0,0 ^b
CV(%)			33,28
Mức ý nghĩa			*

Các số trong cùng một cột có cùng chữ theo sau giống nhau thì không khác biệt nhau qua thống kê ở mức ý nghĩa 5% và kiểm định Duncan. Số liệu các trung bình được chuyển đổi sang $\log(x+10)$ trước khi phân tích thống kê.

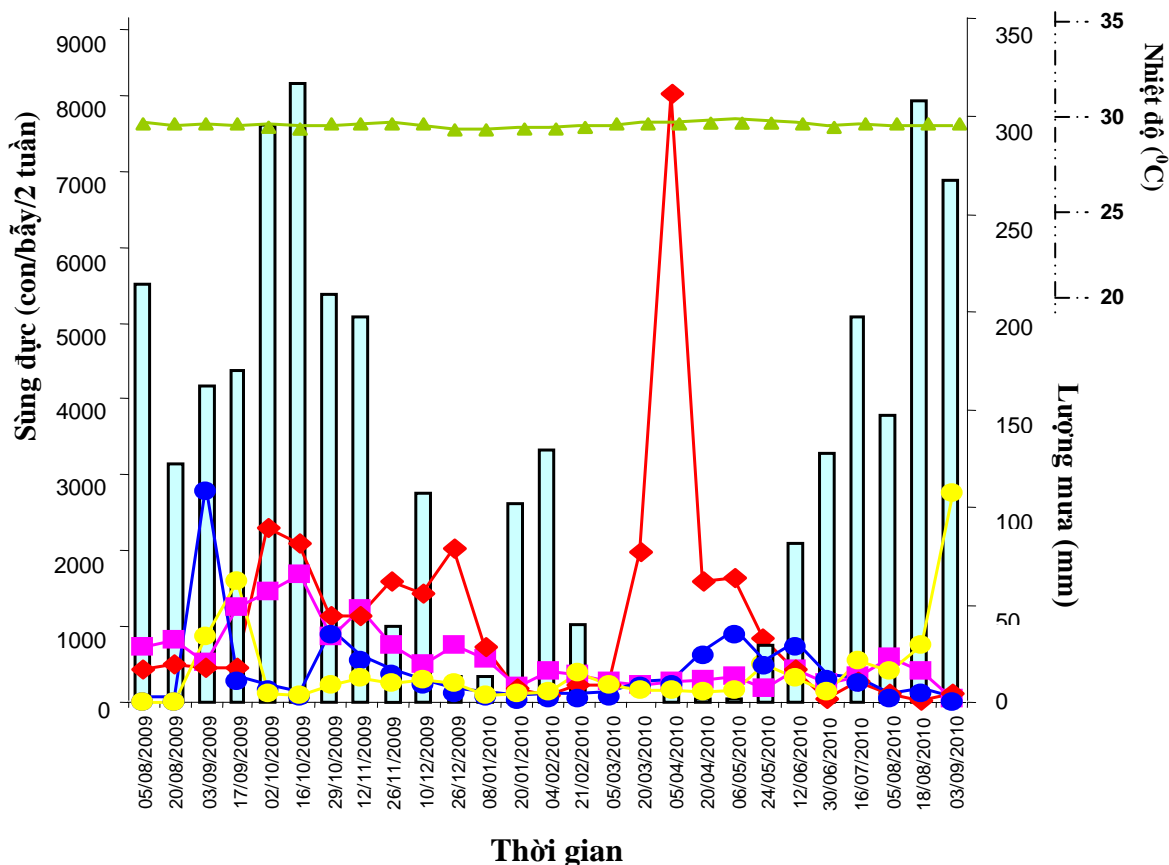
Qua các kết quả nghiên cứu trên đã tìm ra được các điều kiện thích hợp để đặt bẫy pheromone ở ngoài đồng cho hiệu quả hấp dẫn sùng đực cao, bước tiếp theo là sử dụng bẫy pheromone làm công cụ tìm hiểu qui luật biến động quần thể SKL ngoài tự nhiên trong suốt năm, làm cơ sở cho việc dự tính, dự báo, quy luật phát sinh và phát triển của đối tượng gây hại này trong quá trình sản xuất khoai lang.

4.2.2.2 Khảo sát diễn biến mật số quần thể sùng khoai lang bằng pheromone giới tính tổng hợp ở ngoài đồng tại tỉnh Vĩnh Long

a) Ghi nhận tổng quát tình hình trên ruộng khảo sát

Tại 4 địa điểm khảo sát diễn biến mật số quần thể SKL ở các khu vực trồng khoai lang thuộc tỉnh Vĩnh Long được trình bày ở Hình 4.7 cho thấy SKL hiện diện trong suốt thời gian khảo sát (12 tháng).

Diễn biến mật số quần thể SKL tại 4 địa điểm khảo sát rất phức tạp, không giống nhau, mật số sùng đực vào bẫy dao động từ 300 đến 2.000 con/bẫy/2 tuần. Riêng khu vực xã Thành Lợi tạo ra 1 cao điểm rất lớn lên đến 8.013 con/bẫy/2 tuần vào đầu tháng 4/2010 và 2 cao điểm khác thấp hơn vào đầu tháng 10 và cuối tháng 12/2009 với số lượng sùng đực vào bẫy từ 2.021-2.303 con/bẫy/2 tuần.



Hình 4.7: Diễn biến mật số quần thể SKL tại 4 xã Đông Bình, Thành Lợi, Tân Quới, Tân Hưng, tỉnh Vĩnh Long từ 05/8/2009 đến 03/9/2010

—■— ; —●— ; —●— ; —■— = số lượng sùng đực vào bẫy tại xã Đông Bình, huyện Bình Minh; xã Tân Hưng, Tân Quới và Thành Lợi, huyện Bình Tân, Vĩnh Long.
 —▲— = nhiệt độ; □ = lượng mưa

Trong khi đó, 3 địa điểm còn lại tại xã Đông Bình, Tân Hưng và Tân Quới chủ yếu có 1 cao điểm từ đầu tháng 9 đến giữa tháng 10/2009 với số lượng sùng đực vào bẫy dao động từ 1.601-2.770 con/bẫy/2 tuần.

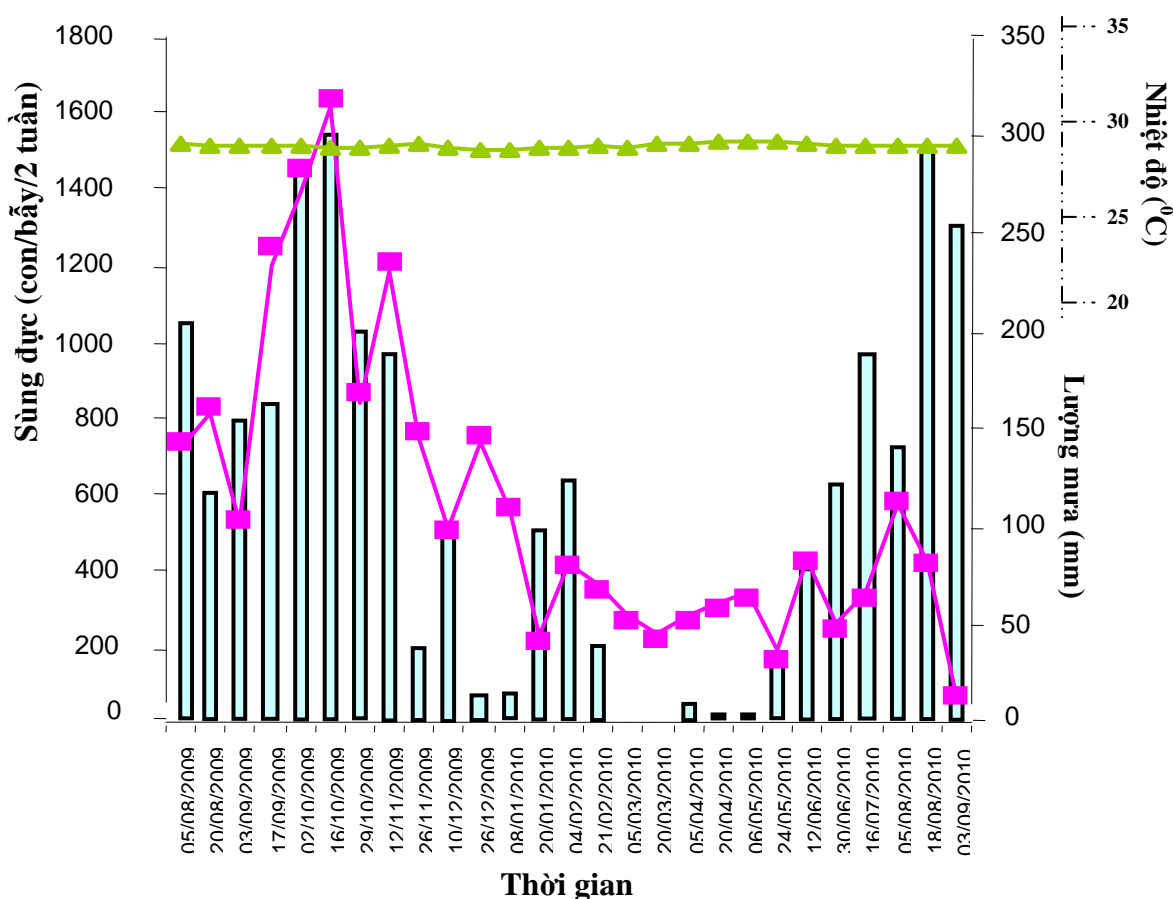
Nhiệt độ trung bình của các tháng trong thời gian khảo sát tại tỉnh Vĩnh Long dao động từ 26,1-29⁰C cho thấy diễn biến mật số quần thể SKL không phụ thuộc vào nhiệt độ môi trường.

Lượng mưa cũng biến động tăng giảm trong năm, không phù hợp theo quy luật phát triển của SKL. Thời điểm mưa nhiều tùy theo từng địa điểm khảo sát có nơi mật số sùng tăng lên cao, có nơi mật số giảm xuống thấp. Từ kết quả khảo sát cho thấy diễn biến mật số quần thể SKL không phụ thuộc nhiều vào lượng mưa.

Nhìn chung, diễn biến mật số SKL trong thời gian 12 tháng theo dõi tại 4 xã thuộc tỉnh Vĩnh Long không phụ thuộc vào lượng mưa và nhiệt độ môi trường, mà chủ yếu phụ thuộc vào mùa vụ khoai lang và cơ cấu cây trồng ở từng khu vực khảo sát.

b) Diễn biến mật số quần thể sùng khoai lang tại xã Đông Bình, huyện Bình Minh, tỉnh Vĩnh Long

Kết quả khảo sát diễn biến mật số SKL ở địa điểm 1 tại xã Đông Bình, huyện Bình Minh, tỉnh Vĩnh Long được trình bày ở Hình 4.8 cho thấy:



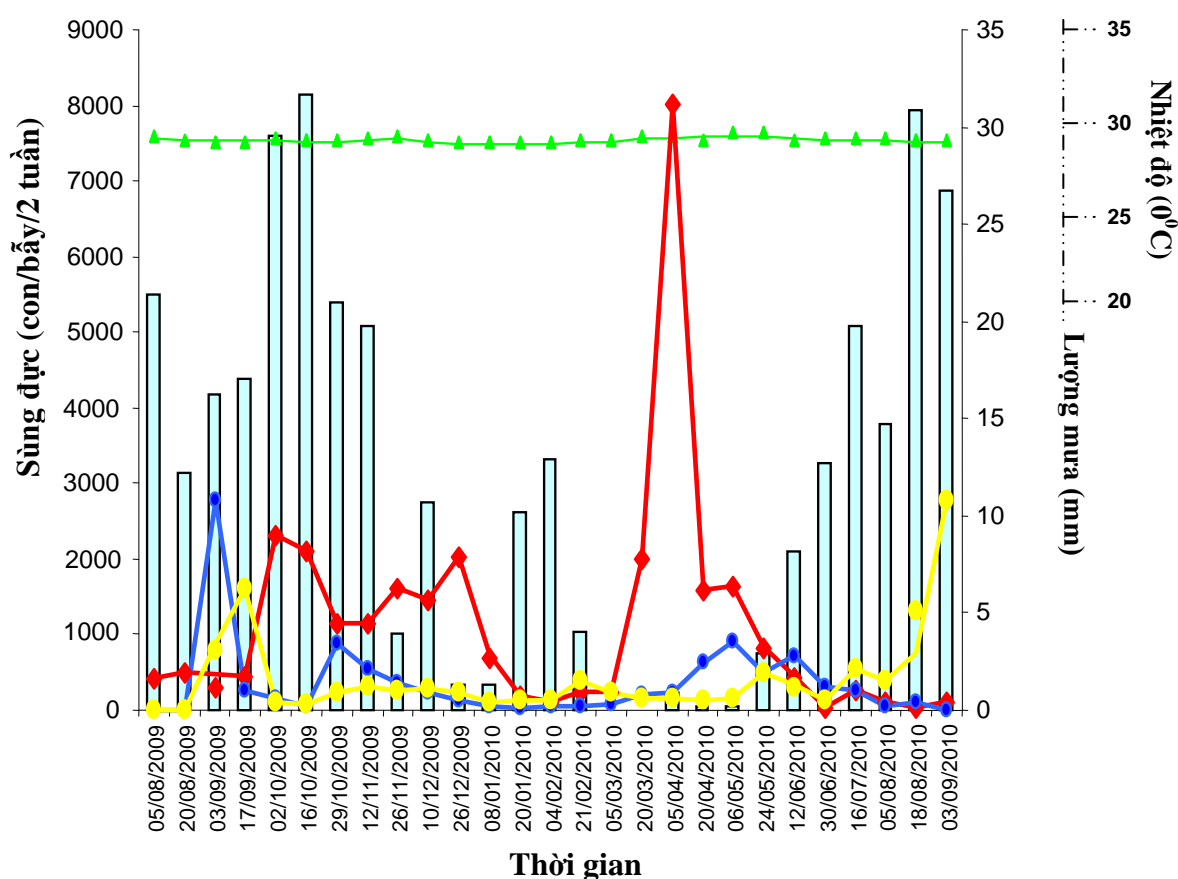
Hình 4.8: Diễn biến mật số quần thể sùng khoai lang tại xã Đông Bình, huyện Bình Minh, tỉnh Vĩnh Long, từ ngày 05/8/2009 đến ngày 03/9/2010

—■— = số lượng thành trùng đục vào bẫy, —▲— = nhiệt độ; □ = lượng mưa

Quần thể SKL hiện diện mật số cao khi ruộng đang trồng khoai lang, số lượng sùng đực vào bẫy bắt đầu tăng cao từ 03/9/2009 và hình thành 1 cao điểm vào ngày 16/10/2009 với số lượng sùng đực vào bẫy cao nhất là 1.688 con/bẫy/2 tuần và thời gian này trùng với giai đoạn thu hoạch khoai của nông dân. Sau đó, khi hết vụ khoai lang mật số quần thể SKL giảm xuống, từ đầu tháng 01/2010 đến đầu tháng 9/2010 với số lượng sùng đực vào bẫy thấp, ít biến động, do nông dân nơi đây thường chỉ trồng 1 vụ khoai trong năm, giai đoạn này họ thay đổi cơ cấu cây trồng, cắt vụ khoai chuyển sang luân canh với cây trồng khác như đậu phộng và đậu bắp thì quần thể sùng giảm xuống và duy trì ở mật số thấp.

c) Diễn biến mật số quần thể sùng khoai lang tại xã Thành Lợi, Tân Quới, Tân Hưng, huyện Bình Tân, tỉnh Vĩnh Long

Kết quả khảo sát diễn biến mật số SKL ở địa điểm 2 tại xã Thành Lợi, huyện Bình Tân, tỉnh Vĩnh Long có số lượng sùng đực vào bẫy là cao nhất trong các địa điểm khảo sát khác.



Hình 4.9: Diễn biến mật số quần thể sùng khoai lang tại huyện Bình Tân, tỉnh Vĩnh Long, từ ngày 05/8/2009 đến ngày 03/9/2010

—■— ; —●— ; —●— = số lượng thành trùng đực vào bẫy tại xã Thành Lợi, Tân Quới, Tân Hưng, huyện Bình Tân, Vĩnh Long; —▲— = nhiệt độ; □ = lượng mưa

Diễn biến mật số quần thể SKL tại xã Thành Lợi trình bày ở Hình 4.9 cho thấy số lượng sùng đực vào bẫy thấp từ tháng 8 đến tháng 9/2009, sau đó tăng lên tạo thành cao điểm vào đầu tháng 10/2009 đạt 2.303 con/bẫy/2 tuần và giảm xuống duy trì mật số thấp hơn. Sau đó tiếp tục tăng lên tạo thành cao điểm vào cuối tháng 12/2009 đạt 2.021 con/bẫy/2 tuần và giảm dần xuống rất thấp từ đầu tháng 01/2010, đến tháng 3/2010 số lượng sùng đực vào bẫy bắt đầu tăng lên đột biến tạo thành cao điểm vào đầu tháng 4/2010 đạt cao nhất là 8.013 con/bẫy/2 tuần. Kết quả đợt này cao gấp 4 lần so với 2 đợt cao điểm vào đầu tháng 10 và cuối tháng 12/2009. Ở các đợt mật số sùng đực vào bẫy đạt cao điểm trên đều trùng với giai đoạn thu hoạch khoai của nông dân.

Ở nơi đây nông dân thường trồng khoai lang rãi vụ trong năm và luân canh với các cây trồng khác, cao điểm đợt 1 và 2 trùng vào giai đoạn thu hoạch khoai rãi rác, đến cao điểm đợt 3 vào tháng 4/2010 mật số sùng đực tăng lên rất nhanh, có thể do thời điểm này nông dân lân cận thu hoạch khoai tập trung nhiều hơn nên sùng có sự di cư sang ruộng khảo sát làm cho mật số sùng đực vào bẫy tăng lên cao nhất và rất nhanh.

Kết quả khảo sát diễn biến mật số SKL ở địa điểm 3 tại xã Tân Quới, huyện Bình Tân, tỉnh Vĩnh Long cho thấy mật số sùng đực vào bẫy thấp trong tháng 8/2009 và tăng lên nhanh đạt cao điểm vào đầu tháng 9/2009 (2.770 con/bẫy/2 tuần), sau đó mật số sùng giảm xuống rất nhanh. Đến cuối tháng 10/2009 số lượng sùng vào bẫy tăng nhẹ trở lại, đạt cao điểm nhỏ thứ 2 và giảm thấp dần. Đến đầu tháng 5/2010 số lượng sùng vào bẫy tăng nhẹ trở lại, tạo thành cao điểm nhỏ thứ 3 và sau đó giảm dần đến tháng 9/2010. Tại địa điểm khảo sát này, kết quả ghi nhận số lượng sùng đực vào bẫy pheromone cao nhất là 2.770 con/bẫy/2 tuần và thấp nhất là 32 con/bẫy/2 tuần.

Qua theo dõi diễn biến mật số sùng đực vào bẫy có biến động tăng giảm trong thời gian 12 tháng và tạo thành 1 cao điểm vào đầu tháng 9/2009 có mật số sùng cao nhất, nhận thấy đợt cao điểm này trùng với thời gian thu hoạch khoai của nông dân tại địa bàn khảo sát. Có thể do nông dân nơi đây chỉ canh tác 1 vụ khoai lang trong năm và thu hoạch vào tháng 9/2009. Sau khi thu hoạch, nông dân thu gom các phế phẩm (tàn dư thực vật) trên ruộng khoai chất thành từng đống trên bờ đê hoặc gần nhà, đó chính là nơi SKL tiếp tục cư trú, lưu tồn trên tàn dư thực vật và sùng thoát ra từ các củ khoai bị nhiễm sùng (phế phẩm) sẽ là nguồn sùng còn lại sau thu hoạch tiếp tục vào bẫy làm cho mật số sùng tăng lên tạo thành cao điểm nhỏ vào cuối tháng 10/2009, đến đầu tháng 5/2010 mật số sùng tăng lên tạo thành cao điểm nhỏ, có thể do sùng di chuyển từ các xã lân cận sau thu hoạch tới khu vực khảo sát bắt đầu vụ mới.

Kết quả nghiên cứu của Miyatake *et al.*, (1995) đã ghi nhận khoảng cách phân tán của sùng ở điều kiện ngoài đồng khi không có trồng khoai lang là lớn hơn so với tại các vùng có trồng khoai lang. Khoảng cách di chuyển lớn nhất của sùng ở nơi có trồng khoai là 500 m, trong khi đó tại nơi không trồng khoai lại lên đến 1.000 m. Từ đó, cho thấy sùng có thể di chuyển qua lại dễ dàng giữa các ruộng khoai lang lân cận trên diện rộng.

Kết quả khảo sát diễn biến mật số SKL ở địa điểm 4 tại xã Tân Hưng, huyện Bình Tân, tỉnh Vĩnh Long cho thấy mật số sùng đực vào bẫy thấp vào tháng 8/2009 và tăng lên hình thành cao điểm thứ nhất vào giữa tháng 9/2009, sau đó mật số sùng giảm dần từ đầu tháng 10/2009 luôn duy trì ở mật số thấp. Đến đầu tháng 8/2010 mật số sùng đực vào bẫy bắt đầu tăng trở lại đến đầu tháng 9/2010 tạo thành cao điểm thứ hai với số lượng sùng đực vào bẫy cao nhất là 2.767 con/bẫy/2 tuần. Trong suốt thời gian khảo sát mật số sùng đực vào bẫy thấp nhất là 86 con/bẫy/2 tuần (vào giữa tháng 10/2009).

Diễn biến mật số sùng vào bẫy pheromone tương đối thấp, ít biến động theo thời gian và tạo thành 2 cao điểm vào giữa tháng 9/2009 và đầu tháng 9/2010 cho thấy quy luật quần thể SKL gia tăng mật số lên cao chủ yếu vào tháng 9, trùng với thời điểm thu hoạch khoai lang tập trung của nông dân tại khu vực này. Quan sát thực tế nhận thấy do địa bàn khảo sát này có địa hình tương đối thấp hơn so với các xã lân cận, ruộng dễ bị ngập nước trong mùa lũ cho nên nông dân thu hoạch khoai tập trung vào tháng 9 để né tránh lũ gây ngập úng thối củ. Mặt khác, do vị trí nơi đây cách xa các sông lớn nên thường xuyên bị thiếu nguồn nước tưới trong mùa khô. Vì thế, nông dân tại xã này chỉ canh tác tập trung 1 vụ khoai lang trong năm và đến tháng 9 hàng năm là thời điểm thu hoạch khoai làm cho mật số SKL tăng lên cao vào thời điểm này. Sau đó, quần thể sùng giảm xuống do nông dân chuyển sang canh tác lúa.

Mặt khác, khoảng thời gian từ tháng 10/2009 đến tháng 8/2010, mật số sùng dao động rất thấp, có thể là do sau khi thu hoạch khoai thì các tàn dư thực vật được nông dân dọn sạch và chôn vùi dưới nước, đất, họ làm tốt vệ sinh đồng ruộng sau thu hoạch, cho ruộng ngập nước trong mùa lũ, cũng giúp tiêu diệt sùng còn lưu tồn trong tàn dư thực vật. Điều này cho thấy việc thu gom, dọn sạch và chôn vùi phế phẩm sau thu hoạch để hạn chế sự phát triển và lây lan của quần thể SKL là rất cần thiết. Theo Hà Quang Hùng (2005) và Nguyễn Đức Khiêm (2006) cho rằng khi thu hoạch khoai cần thu gom triệt để các tàn dư thực vật trên ruộng khoai chôn vùi dưới hố sâu 20-30 cm.

Tóm lại, dựa vào kết quả khảo sát tại 4 địa điểm trên cho thấy mật số quần thể SKL luôn biến động tăng giảm trong 12 tháng, thu hoạch là thời điểm

sùng vào bẫy đạt mật số cao nhất. Sau đó, mật số sùng giảm khi nông dân chuyển đổi cơ cấu cây trồng, không phải là ký chủ của sùng. Vì vậy, luân canh là biện pháp kỹ thuật canh tác rất quan trọng hạn chế sự phát triển của quần thể SKL. Điều này phù hợp với Nguyễn Đức Khiêm (2006), tác giả cho rằng khoai lang phải thực hiện biện pháp luân canh, tốt nhất là với lúa sẽ hạn chế được sự gây hại của sùng. Nguyễn Văn Huỳnh và Lê Thị Sen (2011) cũng khuyến cáo nếu có điều kiện thì sau vụ trồng khoai lang nên luân canh với cây trồng khác không phải là thức ăn của sùng, tốt nhất là với cây lúa để tránh tình trạng sùng lây lan sang vụ sau.

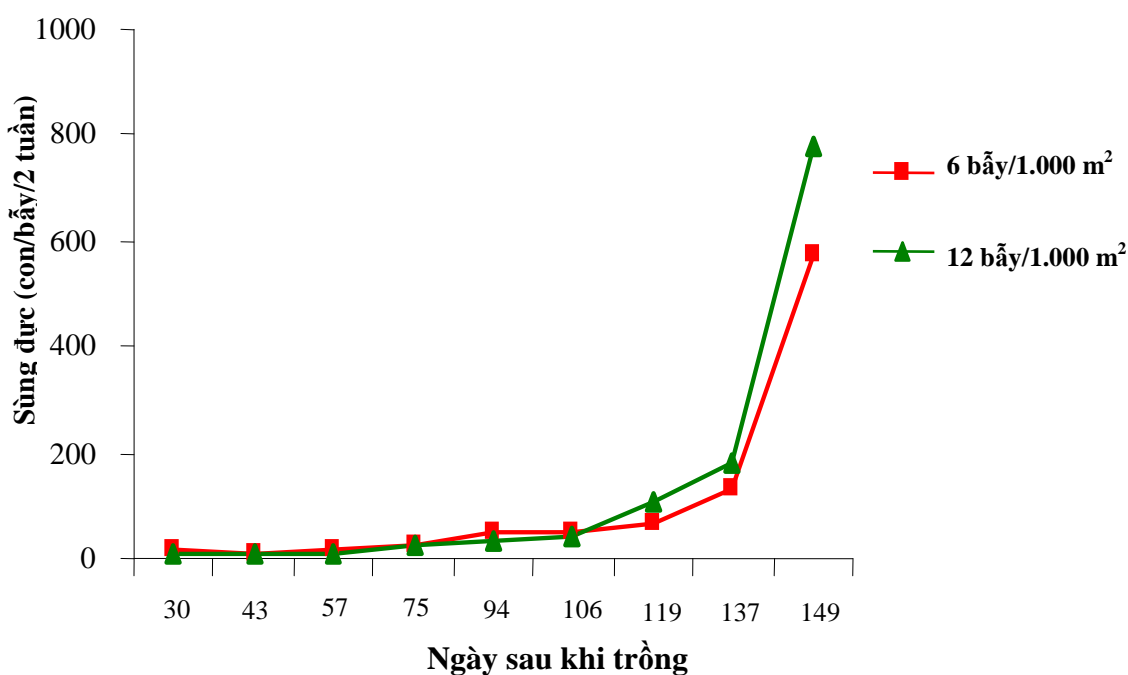
4.2.2.3 *Đánh giá hiệu quả phòng trị sùng khoai lang bằng pheromone giới tính tổng hợp ở ngoài đồng tại huyện Bình Tân, Vĩnh Long*

a) Diễn biến mật số sùng khoai lang trên ruộng đặt bẫy pheromone

Kết quả theo dõi diễn biến mật số SKL trên các ruộng đặt bẫy pheromone giới tính thể hiện ở Hình 4.10 và Hình 4.11 cho thấy diễn biến mật số sùng vào bẫy ở nghiệm thức 12 bẫy/1.000 m² luôn cao hơn so với nghiệm thức 6 bẫy/1.000 m² qua các thời điểm quan sát trong cả 2 vụ khoai lang (mùa thuận và mùa nghịch), nhìn chung là diễn biến mật số sùng vào bẫy biến động tương tự nhau trên 2 ruộng và cả 2 vụ khoai lang.

** Đối với vụ 1 (vụ mùa thuận)*

Kết quả vụ 1 trình bày ở Hình 4.10 cho thấy số lượng sùng vào bẫy tăng dần theo thời gian và duy trì ở mức cao đến cuối vụ.



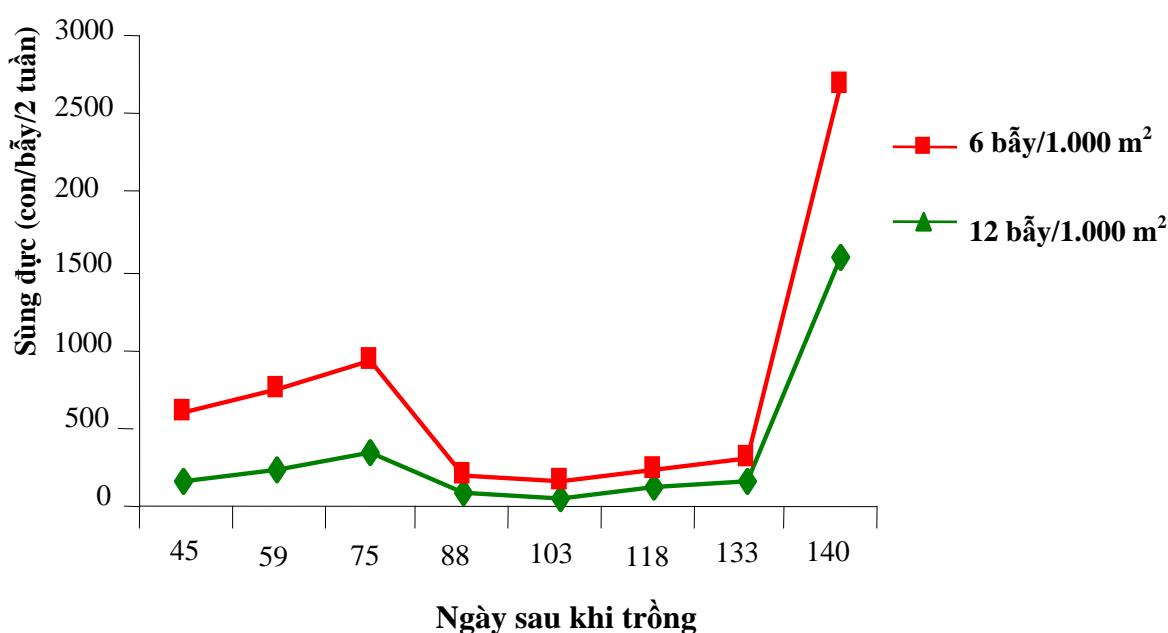
Hình 4.10: Diễn biến mật số SKL trên 2 ruộng thí nghiệm ở vụ 1

Từ đầu vụ đến khoảng 1 tháng trước khi thu hoạch (119 ngày sau khi trồng), số lượng sùng vào bẫy rất thấp và tăng chậm dần theo thời gian, bình quân dưới 70 con/bẫy/2 tuần. Sau thời gian này, số lượng sùng vào bẫy bắt đầu tăng lên rất nhanh, nhất là thời điểm 15 ngày trước khi thu hoạch (từ 137-149 NSKT). Trong giai đoạn này, số lượng sùng vào bẫy trung bình lên đến 369 con/bẫy/2 tuần ở nghiệm thức 6 bẫy và 573 con/ bẫy/2 tuần ở nghiệm thức 12 bẫy/1.000 m².

Kết quả trên cho thấy giai đoạn đầu khoai phát triển thân, lá thì sùng có xuất hiện trên ruộng với mật số rất thấp, đến 2,5 tháng (75 NSKT) khoai bắt đầu tạo củ và phát triển lớn dần lên thì mật số sùng có khuynh hướng gia tăng. Do sùng thích gây hại trên củ hơn trên dây khoai, nhất là giai đoạn củ lớn gần thu hoạch thì mật số sùng tăng lên rất nhanh. Do đây là mùa thuận nên nông dân thu hoạch tập trung vào tháng 5/2010 sùng tích lũy mật số đến cuối vụ, làm cho mật số sùng gia tăng nhanh chóng vào thời điểm thu hoạch.

*** Đối với vụ 2 (vụ mùa nghịch)**

Kết quả diễn biến mật số SKL ở vụ 2 (Hình 4.11) cho thấy số lượng sùng đục vào bẫy khá nhiều và biến động tăng giảm theo thời gian. Diễn biến mật số sùng vào bẫy ở 2 NT 6 bẫy và 12 bẫy/1.000 m² tương tự nhau, cùng quy luật biến động mật số quần thể sùng trên ruộng thí nghiệm. Trong đó, NT 6 bẫy/1.000 m² có mật số sùng vào bẫy luôn cao hơn so với NT 12 bẫy/1.000 m² trong suốt vụ, so với vụ 1 thì diễn biến mật số sùng vào bẫy ở 2 NT hoàn toàn ngược nhau.



Hình 4.11: Diễn biến mật số sùng khoai lang trên 2 ruộng thí nghiệm ở vụ 2

NT 6 bẫy/1.000 m² ở giai đoạn từ 45-75 NSKT, mật số sùng đục vào bẫy tăng dần theo thời gian (từ 500-1.000 con/bẫy/2 tuần). Đến giai đoạn từ 75-88 NSKT, mật số sùng vào bẫy trong 2 tuần giảm nhanh (từ 1.000 con/bẫy giảm xuống 208,5 con/bẫy). Sau đó, mật số sùng duy trì ở mật số thấp, ít biến động, từ 167,5-312,5 con/bẫy, đến giai đoạn 7 ngày trước khi thu hoạch (từ 133-140 NSKT) mật số sùng đục vào bẫy tăng lên nhanh chóng đạt 2.623 con/bẫy/tuần.

NT 12 bẫy/1.000 m² ở giai đoạn từ 45-75 NSKT, mật số sùng vào bẫy tăng chậm theo thời gian (từ 100-368,5 con/bẫy/2 tuần). Đến giai đoạn từ 75-133 NSKT, mật số sùng vào bẫy giảm xuống và duy trì ở mật số thấp, ít biến động, từ 63,2-126 con/bẫy/2 tuần. Sau đó, mật số sùng vào bẫy tăng lên rất nhanh đến thời điểm thu hoạch (140 NSKT) đạt 1.560 con/bẫy/tuần.

Kết quả trên cho thấy thí nghiệm ở vụ 2 xuống giống vào tháng 8/2010 đây là giai đoạn mùa mưa và mùa lũ, ruộng thí nghiệm là nơi đất gò cao, có thể canh tác khoai lang quanh năm nên mật số sùng vào bẫy trên 2 ruộng thí nghiệm diễn biến khác hơn so với vụ 1 nông dân tập trung canh tác khoai lang đồng loạt trên diện rộng. Ở vụ 2, từ giai đoạn đầu đến 2,5 tháng (75 NSKT) mật số sùng có khuynh hướng gia tăng, có thể do điều kiện vệ sinh đồng ruộng sau thu hoạch và trước khi trồng, sùng lây lan từ vụ trước kết hợp với sùng di chuyển từ các ruộng khoai lân cận đang thu hoạch sang ruộng thí nghiệm làm cho mật số sùng biến động tăng giảm khác thường so với vụ 1.

Tuy nhiên, sự biến động mật số sùng trên 2 ruộng thí nghiệm diễn biến cùng quy luật là khi mật số tăng đến một thời điểm nào đó chúng sẽ giảm do sự cạnh tranh về thức ăn, nơi ở, mật độ. Đến giai đoạn gần thu hoạch thì mật số sùng đục vào bẫy gia tăng nhanh chóng tạo nên áp lực sùng rất cao vào thời điểm cuối vụ. Đây cũng là vấn đề khó khăn đối với nông dân có ý định neo củ chờ giá bán hợp lý hơn. Để đối phó với thiệt hại do sùng nông dân thường áp dụng biện pháp hóa học phun thuốc thường xuyên hơn cho đến lúc thu hoạch.

b) Thành phần côn trùng gây hại và thiên địch trên ruộng thí nghiệm

**** Thành phần côn trùng gây hại trên ruộng thí nghiệm***

+ Đối với vụ 1 (vụ mùa thuận)

Kết quả khảo sát ở vụ 1 ghi nhận côn trùng gây hại trên ruộng thí nghiệm tại huyện Bình Tân, Vĩnh Long ở Bảng 4.13 cho thấy thành phần côn trùng gây hại ở NT đối chứng (xử lý sùng theo cách của nông dân) ít hơn so với 2 NT 6 bẫy và 12 bẫy/1.000 m² (trương ứng là 10 loài so với 15 loài và 12 loài).

NT 6 bẫy/1.000 m², có thành phần gây hại bao gồm 15 loài. Trong đó, bộ cánh vẩy (Lepidoptera) chiếm đa số (7 loài), 2 loài thuộc bộ cánh cứng

(Coleoptera), 3 loài thuộc bộ cánh đều (Homoptera), 1 loài thuộc bộ cánh tơ (Thysanoptera), 1 loài thuộc bộ hai cánh (Diptera) và 1 loài nhện đỏ thuộc bộ nhện (Acarina). Kết quả cho thấy sâu ăn tạp, rầy phấn trắng và dòi đục lòn là 3 loài gây hại xuất hiện nhiều (+++), phổ biến nhất. Kế đến là 4 loài gồm rầy mềm, bọ trĩ, bọ dưa, sâu đo thì ít xuất hiện hơn (++) và 8 loài còn lại rất ít xuất hiện (+) (rầy xanh đuôi đen, miễng kiến xanh, sâu xếp lá, sâu xanh da láng, sâu cuốn lá, sùng khoai lang, sâu sùng và nhện đỏ). Trong đó, SKL chỉ hiện diện ở NT này với mức độ phổ biến rất thấp (dưới 22%), lý do giải thích cho điều này đã được thảo luận ở phần trên (diễn biến mật số SKL trên 2 ruộng thí nghiệm ở vụ 1).

Tại NT đặt 12 bẫy pheromone/1.000 m², thành phần côn trùng và nhện hại ghi nhận được ít loài hiện diện hơn, gồm có 12 loài. Trong đó, bộ cánh vẩy (Lepidoptera) chiếm đa số với 5 loài, 3 loài thuộc bộ cánh đều (Homoptera), 1 loài thuộc bộ cánh cứng (Coleoptera), 1 loài thuộc bộ cánh tơ (Thysanoptera), 1 loài thuộc bộ hai cánh (Diptera) và 1 loài nhện (Acarina).

Bảng 4.13: Thành phần côn trùng gây hại trên các ruộng khoai lang ở vụ 1 tại huyện Bình Tân, Vĩnh Long, từ tháng 12 năm 2009 đến tháng 5 năm 2010

TT	Tên thông thường	Mức độ phổ biến của các loài trên ruộng		
		6 bẫy/ 1.000 m ²	12 bẫy/1.000 m ²	Đối chứng
1	Sâu ăn tạp	+++	+++	+++
2	Rầy phấn trắng	+++	+++	+++
3	Dòi đục lòn	+++	++	++
4	Rầy mềm	++	++	++
5	Bọ dưa	++	++	++
6	Nhện đỏ	+	++	++
7	Bọ trĩ	++	++	++
8	Rầy xanh đuôi đen	+	++	++
9	Miễng kiến xanh	+		+
10	Sâu đục dây		+	
11	Sâu xếp lá	+	++	
12	Sâu xanh da láng	+	+	++
13	Sâu cuốn lá	+		
14	Sâu đo	++	+	
15	Sùng khoai lang	+		
16	Sâu sùng	+		

Ghi chú: Mức độ phổ biến của các loài trên các ruộng thí nghiệm:

+: rất ít xuất hiện (số lần bắt gặp < 22%)

++: ít xuất hiện (số lần bắt gặp từ 22 - 50%)

+++ : xuất hiện nhiều (số lần bắt gặp > 50%)

Kết quả cho thấy sâu ăn tạp và rầy phấn trắng là 2 loài xuất hiện nhiều (+++), phổ biến nhất. Kế đến các loài gồm dòi đục lòn, rầy mềm, bọ trĩ, bọ dưa, rầy xanh đuôi đen, sâu xếp lá và nhện đỏ thì ít xuất hiện (++) và 3 loài còn lại rất ít xuất hiện (+) là sâu đo, sâu đục dây và sâu xanh da láng, hầu như rất ít thấy các loài này xuất hiện trên ruộng khoai lang. Bên cạnh đó, ở NT đối chứng (xử lý thuốc trừ sâu theo cách của nông dân), thành phần côn trùng và nhện hại trên ruộng khảo sát ghi nhận gồm 10 loài. Trong đó, bộ cánh vẩy (Lepidoptera) có 2 loài, bộ cánh đều (Homoptera) với 3 loài, 2 loài thuộc bộ cánh cứng (Coleoptera), 1 loài thuộc bộ cánh tơ (Thysanoptera), 1 loài thuộc bộ hai cánh (Diptera) và 1 loài nhện (Acarina). Kết quả trên cho thấy thành phần loài gây hại trên ruộng đối chứng ít đa dạng hơn, hầu như các loại sâu ăn lá và SKL không thấy xuất hiện, có thể do việc phun thuốc của nông dân đã hạn chế sự xuất hiện của các loài gây hại này.

+ Đối với vụ 2 (vụ mùa nghịch)

Tiếp tục theo dõi thí nghiệm ở vụ khoai thứ 2, ghi nhận thành phần côn trùng trên các ruộng khảo sát trình bày ở Bảng 4.14 cho thấy:

Bảng 4.14: Thành phần côn trùng gây hại trên các ruộng khoai lang ở vụ 2 tại huyện Bình Tân, Vĩnh Long, từ tháng 8 đến 12 năm 2010

TT	Tên thường gọi	Mức độ phổ biến của các loài trên ruộng		
		6 bẫy/1.000 m ²	12 bẫy/1.000 m ²	Đối chứng
1	Sùng khoai lang	+	+	
2	Sâu ăn tạp	++	++	+
3	Miễng kiếng xanh	+	+	+
4	Miễng kiếng vàng	+		
5	Sâu xanh da láng		+	+
6	Sâu đục dây			+
7	Rầy mềm	+	+	+
8	Rầy phấn trắng	+++	+++	+++
9	Dòi đục lòn	++	++	++
10	Sâu sùng	+	+	
11	Cào cào xanh	++	+	+
12	Bọ dưa		+	
13	Rầy xanh	+	+	+
14	Nhện đỏ			+
15	Ngài sâu tơ		+	+
16	Bọ xít		+	+
17	Bọ trĩ		++	+
18	Châu chấu		+	+

Ghi chú: Mức độ phổ biến của các loài trên các ruộng thí nghiệm:

+: rất ít xuất hiện (số lần bắt gặp < 22%)

++: ít xuất hiện (số lần bắt gặp từ 22 - 50%)

+++ : xuất hiện nhiều (số lần bắt gặp > 50%)

Cả 3 NT có số lượng thành phần côn trùng xuất hiện gồm 18 loài. Trong đó, NT 6 bẫy/1.000 m² gồm 14 loài, NT 12 bẫy/1.000 m² có 16 loài xuất hiện và NT đối chứng chỉ xuất hiện 13 loài. Kết quả khảo sát ghi nhận sâu ăn tạp, rầy phấn trắng và dòi đục lòn là 3 loài gây hại xuất hiện nhiều, phổ biến nhất và thường xuyên hiện diện trên ruộng khoai thí nghiệm.

Mặt khác, kết quả khảo sát ở vụ 2 cho thấy SKL rất ít xuất hiện ở cả 2 NT 6 bẫy/1.000 m² và 12 bẫy/1.000 m² (mức độ ít phổ biến: +) (số lần bắt gặp < 22%). Trong khi đó, NT đối chứng không ghi nhận sùng hiện diện trên ruộng qua tất cả các lần điều tra. Có thể do sùng có xu tính yếu đối với ánh sáng, ban ngày thường hay lẫn trốn các tia nắng trực xạ (Nguyễn Đức Khiêm, 2006), sùng hoạt động nhiều vào ban đêm (Reddy *et al.*, 2012) cho nên khi quan sát khó thấy sùng xuất hiện trên các ruộng khoai lang.

Tóm lại, các loài rầy phấn trắng, sâu ăn tạp và dòi đục lòn là 3 loài thường gây hại trên lá non, xuất hiện nhiều phổ biến trên cả 3 NT ở 2 vụ khoai thí nghiệm. Trong khi đó, SKL chỉ xuất hiện ở NT đặt bẫy pheromone với mức độ phổ biến rất thấp (+). Mặc dù, kết quả khảo sát diễn biến mật số SKL trong suốt vụ khoai trên các ruộng thí nghiệm ở vụ 1 (Hình 4.10) và khảo sát sự hiện diện của sùng tại khu vực thí nghiệm ở vụ 1 trong 3 ngày sau khi thu hoạch (Hình 4.12) cho thấy sự hiện diện của sùng là rất lớn, quá trình khảo sát sự hiện diện của sùng trực tiếp trên ruộng thí nghiệm (Bảng 4.13 và Bảng 4.14) ghi nhận sự hiện diện của sùng là không nhiều.

*** Thành phần thiên địch ăn thịt trên ruộng khoai thí nghiệm
+ Đối với vụ 1 (vụ mùa thuận)**

Thành phần thiên địch ăn thịt trên các ruộng thí nghiệm vụ 1 được trình bày ở Bảng 4.15. Kết quả ghi nhận số loài thiên địch ăn thịt hiện diện trên NT 12 bẫy/1.000 m² là nhiều nhất (7 loài), kế đến là NT 6 bẫy/1.000 m² là khá nhiều (6 loài) và NT đối chứng (xử lý thuốc trừ sâu theo cách của nông dân) là thấp nhất (5 loài). Trong đó, NT 6 bẫy/1.000 m² tương tự như NT 12 bẫy/1.000 m² có nhện lùn và kiến ba khoang là 2 loài hiện diện nhiều, phổ biến nhất. Nhện chân dài và bọ rùa là 2 loài ít xuất hiện hơn và 3 loài gồm nhện lưới, nhện linh miêu và nhện nhảy rất ít xuất hiện trên ruộng thí nghiệm. Mặc dù, thành phần loài thiên địch ăn thịt hiện diện trên ruộng khoai không nhiều, tuy nhiên các loài này đều có khả năng tấn công lên các loài gây hại trên ruộng khoai, có triển vọng trong việc hạn chế các loài gây hại ngoài đồng.

NT đối chứng tương tự như 2 NT 6 bẫy/1.000 m² và 12 bẫy/1.000 m² gồm có nhện lùn và kiến ba khoang là 2 loài xuất hiện nhiều, phổ biến nhất.

Ba loài còn lại gồm nhện chân dài, bọ rùa và nhện lưới rất ít xuất hiện trên ruộng khoai. Nhện linh miêu và nhện nhảy rất ít xuất hiện. Nhìn chung, 2 NT đặt bẫy pheromone xuất hiện nhiều thiên địch ăn thịt (đa dạng) hơn so với đối chứng, có thể do các ruộng này ít phun thuốc trừ sâu nên có nhiều loài thiên địch hiện diện (đa dạng) hơn so với ruộng đối chứng.

Bảng 4.15: Thành phần thiên địch ăn thịt trên các ruộng khoai lang ở vụ 1 tại huyện Bình Tân, Vĩnh Long, từ tháng 12 năm 2009 đến tháng 5 năm 2010

TT	Tên thông thường	Mức độ phổ biến của các loài trên ruộng		
		6 bẫy/1.000m ²	12 bẫy/1.000m ²	Đối chứng
1	Nhện lùn	+++	+++	+++
2	Kiến ba khoang	+++	+++	+++
3	Nhện chân dài	++	++	+
4	Bọ rùa		++	+
5	Nhện lưới	+	+	+
6	Nhện linh miêu	+	+	
7	Nhện nhảy	+	+	

Ghi chú: Mức độ phổ biến của các loài thiên địch ăn thịt trên ruộng thí nghiệm:

+: rất ít xuất hiện (số lần bắt gặp < 22%)

++: ít xuất hiện (số lần bắt gặp từ 22 - 50%)

+++ : xuất hiện nhiều (số lần bắt gặp > 50%)

+ Đối với vụ 2 (vụ mùa nghịch)

Thí nghiệm ở vụ 2, kết quả khảo sát thành phần thiên địch ăn thịt trên các ruộng thí nghiệm trình bày ở Bảng 4.16 ghi nhận có 10 loài xuất hiện. Trong đó, nghiệm thức 12 bẫy/1.000 m² có 10 loài thiên địch hiện diện nhiều hơn so với nghiệm thức 6 bẫy/1.000 m² có 8 loài xuất hiện và nghiệm thức đối chứng hiện diện 7 loài. Có ghi nhận thêm loài ong ký sinh hiện diện trên cả 3 ruộng khoai lang.

Ở vụ 2, kết quả khảo sát cho thấy thành phần thiên địch đa dạng hơn, nhiều loài hơn so với vụ 1. Thành phần thiên địch ăn thịt hiện diện phổ biến trên ruộng khoai là nhện lùn và bọ rùa, còn nhện chân dài và kiến ba khoang thì xuất hiện ít hơn. Kết quả này khác hơn so với vụ 1 có nhện lùn và kiến ba khoang xuất hiện phổ biến nhất, bọ rùa và nhện chân dài xuất hiện ít hơn. Có thể do thành phần các loài gây hại hiện diện phổ biến có khác nhau nên các loài thiên địch xuất hiện cũng có sự thay đổi. Nhìn chung, các loài thiên địch này đều có thể tấn công lên các loài gây hại xuất hiện trên ruộng khoai lang.

Mặt khác, ở vụ này có 2 loài thiên địch ít xuất hiện là ong ký sinh (họ ong kén trắng) và chuồn chuồn kim khá phổ biến: ++ (số lần bắt gặp từ 22-50%). Hai loài này có thể tấn công lên các loài gây hại có kích thước nhỏ,

cũng là thiên địch khá phổ biến trên đồng ruộng. Lagnaoui *et al.* (2000) cho rằng kiến và vài loài ong ký sinh được xem như là thiên địch của SKL. Việc sử dụng kiến đối phó với sùng là thành phần khác của chiến lược IPM được chấp nhận cho quản lý SKL tại Cuba. Kết quả nghiên cứu của Maeto và Uesato (2007) cho rằng có vài loài ong ký sinh kén trắng tại các đảo phía Tây Nam, Nhật Bản là thiên địch ký sinh trên ấu trùng SKL. Theo Jansson và Lecrone (1991) cho rằng loài ong *Euderus purpureas*, họ Eulophidae ký sinh trên SKL tại Nam Florida. Tuy nhiên, sự thành công của các loài ong ký sinh ở điều kiện ngoài đồng còn nghi ngờ bởi chúng được ghi nhận rất ít (Rajasekhara *et al.*, 2010).

Bảng 4.16: Thành phần thiên địch ăn thịt trên các ruộng khoai lang ở vụ 2 tại huyện Bình Tân, Vĩnh Long, từ tháng 8 đến 12 năm 2010

TT	Tên thường gọi	Mức độ phổ biến của các loài trên ruộng		
		6 bẫy pheromone/ 1.000 m ²	12 bẫy pheromone/ 1.000 m ²	Đối chứng (nông dân)
1	Nhện lùn	+++	+++	+++
2	Nhện chân dài	++	++	+
3	Bọ rùa	+++	+++	+
4	Ong ký sinh	++	++	+
5	Kiến ba khoang	+	++	++
6	Bọ đuôi kìm	+	+	+
7	Bọ xít mù xanh		+	
8	Ruồi thích khách	+	+	
9	Chuồn chuồn kim	+++	+	+
10	Bọ cánh lưới		+	

Ghi chú: Mức độ phổ biến của các loài thiên địch ăn thịt trên ruộng thí nghiệm:

+: rất ít xuất hiện (số lần bắt gặp < 22%)

++: ít xuất hiện (số lần bắt gặp từ 22 - 50%)

+++ : xuất hiện nhiều (số lần bắt gặp > 50%)

Kết quả trên cho thấy thiên địch hiện diện giữa các nghiệm thức có chênh lệch số lượng loài nhưng các loài xuất hiện ở nghiệm thức đối chứng cũng hiện diện ở cả 2 nghiệm thức đặt bẫy pheromone. Trong đó, nhện lùn và kiến ba khoang là 2 loài có mức độ phổ biến cao và hiện diện ở cả 3 nghiệm thức. Như vậy, nhện lùn và kiến ba khoang là 2 loài thiên địch phổ biến quan trọng trên các ruộng khoai lang thí nghiệm tại huyện Bình Tân.

c) Tỷ lệ củ bị thiệt hại do sùng khoai lang trên ruộng thí nghiệm

*** Đối với vụ 1 (vụ mùa thuận)**

Kết quả ở Bảng 4.17 cho thấy tỉ lệ sùng gây hại trên giống khoai Tím Nhật tại thời điểm 2,5 tháng SKT, các NT A (6 bẫy/1.000 m²), B (12 bẫy/1.000 m²) và C (đối chứng-xử lý thuốc trừ sâu theo cách của nông dân) đều không ghi nhận sự gây hại của SKL ở cả bên ngoài vỏ và bên trong củ khoai (lúc này khoai đang hình thành củ còn rất nhỏ). Đến thời điểm 3,5 tháng sau khi trồng, hầu như không ghi nhận sự gây hại của SKL ở 3 NT A, B, C. Riêng NTB có tỉ lệ sùng gây hại ở bên ngoài vỏ củ, không đáng kể (0,54%), hầu như không thấy sùng gây hại bên trong củ khoai tại thời điểm này.

Kết quả khảo sát tại thời điểm 4,5 tháng SKT cho thấy tỉ lệ gây hại của sùng ở 2 NT A và B tăng lên cao hơn so với đợt khảo sát trước đó. NT A có tỉ lệ sùng gây hại là 0,33% ở bên ngoài vỏ củ và 0% ở bên trong củ (chưa phát hiện sùng gây hại). NT B có tỉ lệ gây hại là 0,82% ở bên ngoài vỏ củ và 0,42% bên trong củ. Trong khi đó, NT đối chứng vẫn không ghi nhận sự gây hại của sùng trên củ khoai cả bên ngoài vỏ lẫn bên trong củ.

Ở thời điểm 5 tháng SKT (3 ngày trước khi thu hoạch), tương tự như lần ghi nhận chỉ tiêu đầu tiên, tất cả các NT A, B, C đều không ghi nhận sự gây hại của sùng cả bên ngoài vỏ và trong củ khoai.

Bảng 4.17: Tỷ lệ củ khoai bị sùng gây hại trên các ruộng khoai lang ở vụ 1 tại huyện Bình Tân, Vĩnh Long, từ tháng 12 năm 2009 đến tháng 5 năm 2010

Thời điểm quan sát	Nghiệm thức	Số củ quan sát	T.lượng củ (g)	Tỉ lệ (%) củ bị sùng hại	
				Ngoài vỏ	Trong củ
2,5 tháng	A	266	30,92	0	0
	B	200	32,66	0	0
	C	164	29,26	0	0
3,5 tháng	A	241	54,62	0	0
	B	243	58,24	0,54	0
	C	218	52,35	0	0
4,5 tháng	A	245	72,72	0,33	0
	B	227	87,84	0,82	0,42
	C	123	80,15	0	0
Khi thu hoạch (5 tháng)	A	192	88,31	0	0
	B	219	100,31	0	0
	C	187	91,17	0	0

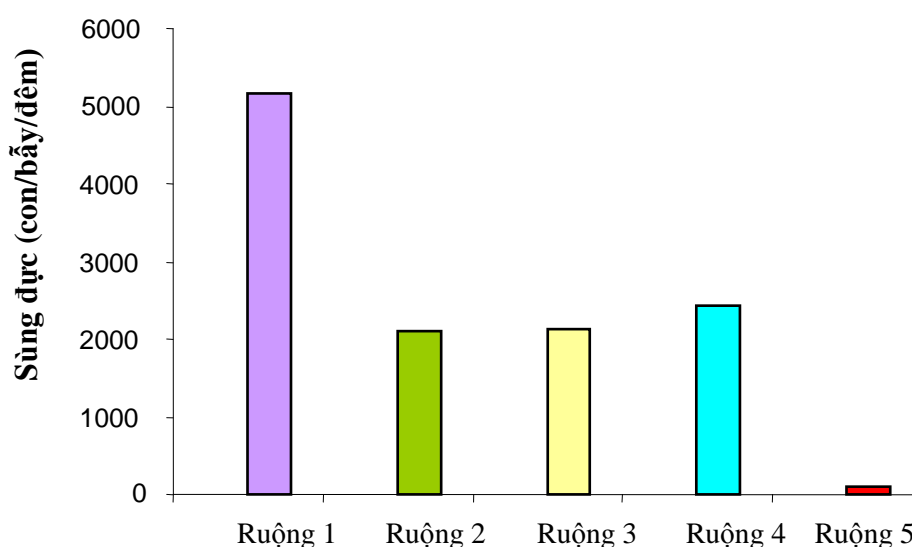
Ghi chú: Nghiệm thức A: đặt 6 bẫy pheromone/1.000m²

Nghiệm thức B: đặt 12 bẫy pheromone/1.000m²

Nghiệm thức C: Đối chứng (xử lý sùng theo cách nông dân)

Trong 4 đợt khảo sát củ khoai tại các thời điểm 2,5, 3,5, 4,5 và 5 tháng SKT, ghi nhận tỉ lệ củ khoai lang bị sùng gây hại ở NT A và B là tương đương nhau và hơi cao hơn so với đối chứng. Tuy nhiên, tỉ lệ gây hại của sùng ở các NT này là rất thấp (dưới 1% ngoài vỏ và dưới 0,5% trong củ). Ngoài ra, NT đối chứng, thuốc trừ sâu hóa học được phun liên tục (định kỳ 7 ngày/lần kể từ 3 NSKT đến khi thu hoạch). Điều này chứng tỏ bẫy pheromone có khả năng thay thế cho thuốc trừ sâu hóa học để quản lý sự gây hại của SKL trên giống khoai Tím Nhật tại huyện Bình Tân, tỉnh Vĩnh Long.

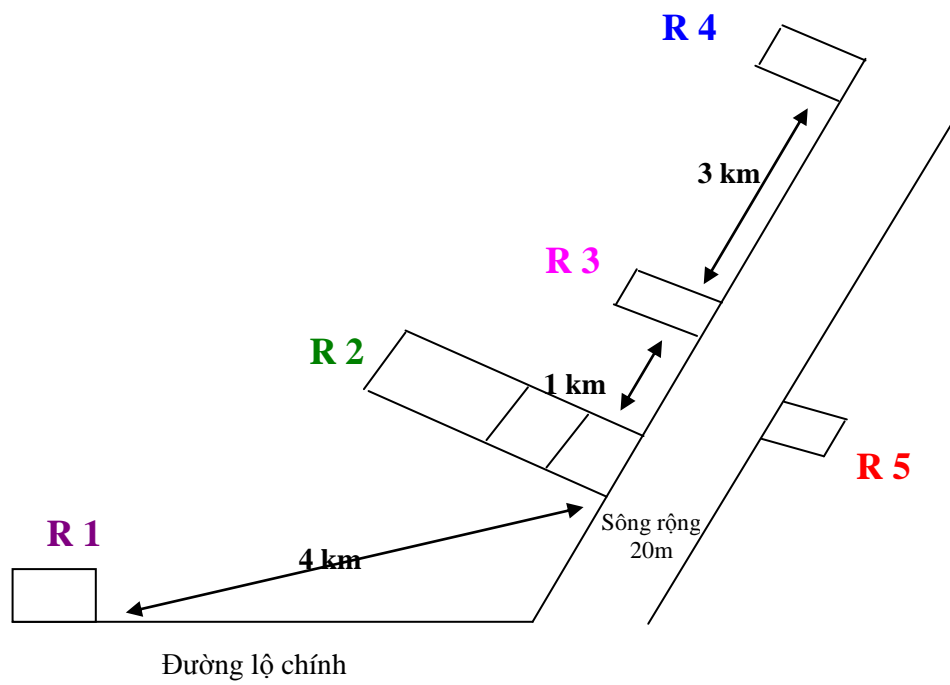
Để khẳng định thêm hiệu quả sử dụng pheromone giới tính ở điều kiện ngoài đồng, khảo sát thêm sự hiện diện của SKL đã tiến hành trong 3 đêm sau khi thu hoạch trên địa bàn thí nghiệm ở vụ 1. Kết quả ghi nhận ở Hình 4.12 cho thấy sự hiện diện SKL tại khu vực thí nghiệm ở vụ 1 là rất cao sau khi thu hoạch, nhưng tỉ lệ củ bị sùng gây hại rất thấp, chứng tỏ hiệu quả phòng trị của bẫy pheromone giới tính tổng hợp đối với sùng rất cao.



Hình 4.12: Số lượng sùng đực vào bẫy trong 3 đêm khảo sát tại 5 ruộng trên địa bàn thí nghiệm ở vụ 1 tại xã Thành Đông, huyện Bình Tân
Ruộng 1 (9.100m²) tại ấp Thành An, xã Thành Đông, Bình Tân (theo nông dân)
Ruộng 2 (6.000m²) tại ấp Thành Tân, xã Thành Đông, Bình Tân (6 bẫy/1.000 m²)
Ruộng 3 (6.000m²) tại ấp Thành Hội, xã Thành Đông, Bình Tân (12 bẫy/1.000 m²)
Ruộng 4 (5.000m²) tại ấp Thành Hậu, xã Thành Đông, Bình Tân (Đối chứng)
Ruộng 5 (2.000m²) khoai lang 2 tháng tuổi tại ấp Thành Lợi, xã Thành Trung (theo nông dân)
 Mỗi ruộng khoai lang đặt 3 bẫy pheromone để khảo sát mật số sùng vào bẫy trong vòng 3 ngày đêm sau khi thu hoạch vụ 1 trên địa bàn thí nghiệm.

Số lượng sùng đực vào bẫy (Hình 4.12) tại các ruộng khảo sát trung bình từ 110-5.100 con/bẫy/đêm. Khi nguồn thức ăn bị thiếu thì sự di chuyển của sùng sẽ nhanh và dễ dàng hơn (Moriya and Hiroyoshi, 1998).

Trong 5 ruộng khảo sát, vị trí theo sơ đồ như ở Hình 4.13 cho thấy ruộng 2, 3 và 4 là 3 ruộng tương ứng với 3 NT bố trí thí nghiệm trong vụ 1 có mật số sùng vào bẫy gần tương đương nhau. Kết quả này cho thấy áp lực sùng trên ruộng thí nghiệm ở cả 3 NT gần giống nhau.



Hình 4.13: Sơ đồ vị trí 5 ruộng khoai khảo sát đặt bẫy pheromone trong 3 ngày sau khi thu hoạch ở vụ 1 tại xã Thành Đông, huyện Bình Tân

Mặt khác, kết quả ghi nhận ở Bảng 4.17 cho thấy đến khi thu hoạch thì tỉ lệ củ khoai bị sùng gây hại ở cả ba nghiệm thức đều như nhau (0%, không bị thiệt hại do sùng), trong khi đó áp lực sùng trên các ruộng này là rất cao. Từ kết quả trên cho thấy trong điều kiện áp lực sùng rất lớn, tương đương nhau giữa các ruộng thí nghiệm, nhưng tỉ lệ gây hại do sùng trên các củ khoai tương tự nhau và không có thiệt hại do sùng ở thời điểm thu hoạch, mặc dù số lượng sùng vào bẫy gia tăng nhanh chóng về cuối vụ. Điều này một lần nữa chứng tỏ tiềm năng của pheromone giới tính tổng hợp có thể thay thế thuốc trừ sâu hóa học trong việc quản lý SKL ở điều kiện ngoài đồng.

Riêng ở ruộng 1, có số lượng sùng đục vào bẫy nhiều nhất, trung bình là 5.100 con/bẫy/đêm cũng chính là ruộng khoai có tỉ lệ sùng gây hại thực tế là cao nhất (thiệt hại hơn 60% năng suất). Đây là ruộng của nông dân tự canh tác khoai lang trên vùng đất gò cao tại xã Thành Đông, hầu như trồng khoai lang quanh năm (chuyên canh) để nhân giống khoai cung cấp cho người dân trong khu vực và phòng trị sùng chủ yếu bằng thuốc trừ sâu hóa học trong suốt vụ.

Ruộng khoai này cách khu vực thí nghiệm ở vụ 1 khoảng 4 km về hướng đường lộ chính, nơi đây hàng năm đều có áp lực sùng gây hại rất cao và nông dân sử dụng thuốc trừ sâu rất nhiều.

Nguyên nhân có thể là do ruộng 1 khảo sát nằm trong khu vực trồng khoai lang với mức độ thâm canh cao và áp lực sùng gây hại rất lớn, nhưng chủ ruộng lại không chú trọng nhiều đến biện pháp canh tác, vệ sinh đồng ruộng, luân canh và biện pháp phòng trị sùng. Mặc dù, chủ ruộng vẫn sử dụng thuốc trừ sâu hóa học để phòng trị sùng, nhưng khoảng cách giữa 2 lần phun thuốc trừ sâu khá xa so với các ruộng khoai lân cận (tương ứng khoảng 2-3 tuần/lần so với 7-10 ngày/lần, khoảng cách thời gian giữa 2 lần áp dụng xa nhau, dài gấp đôi so với bình thường, như vậy sùng có nhiều cơ hội gây hại trên khoai lang, dẫn đến thiệt hại trên củ nặng nề hơn).

Kết quả trên một lần nữa minh chứng cho biện pháp sử dụng bẫy pheromone giới tính tổng hợp có khả năng hạn chế được sự gây hại của sùng ở ngoài đồng, ngay cả ở vùng chuyên canh khoai lang. Do các nghiệm thức bố trí ở vụ 1 đều nằm trên khu vực có áp lực sùng khá lớn (Hình 4.14), nếu không phòng trị kịp thời và áp dụng phù hợp biện pháp phòng trị sùng thì năng suất củ khoai dễ bị thiệt hại đáng kể như ở ruộng 1 là điều khó tránh khỏi.



Hình 4.14: Sùng đực vào bẫy pheromone trong 3 đêm sau khi thu hoạch các ruộng khoai thí nghiệm ở vụ 1 tại xã Thành Đông, huyện Bình Tân, Vĩnh Long, 2010

*** Đối với vụ 2 (vụ mùa nghịch)**

Kết quả ở Bảng 4.18 cho thấy tỉ lệ củ bị sùng gây hại trên các ruộng thí nghiệm ở vụ 2 tại huyện Bình Tân, Vĩnh Long qua các đợt khảo sát thiệt hại trên củ ở thời điểm 2,5 tháng SKT, cả 2 NT đặt bẫy pheromone đều không ghi nhận sự gây hại của sùng ở ngoài vỏ và trong củ. Riêng đối chứng có sự gây hại của sùng ở cả bên ngoài vỏ và trong củ với tỉ lệ là 0,85%, rất thấp, dưới 1%,

hầu như không đáng kể. Tuy nhiên, giữa 3 NT cũng không khác biệt ý nghĩa qua phân tích thống kê.

Tại thời điểm 3,5 tháng SKT, hoàn toàn không ghi nhận sự gây hại của sùng ở ngoài vỏ và trong củ cả 3 NT. Điều này hoàn toàn phù hợp với thực tế, vì ở giai đoạn này diễn biến mật số sùng vào bẫy ở vụ 2 trên 2 ruộng đặt bẫy (Hình 4.14) là rất thấp.

Đến thời điểm 4,5 tháng SKT, tỉ lệ gây hại của sùng ở cả 2 NT A và B tăng lên khá nhanh. Ở NT A có tỉ lệ là 18,52% (ngoài vỏ) và 9,88% (trong củ). NT B củ khoai bị sùng gây hại có tỉ lệ là 8,51% ở ngoài vỏ và trong củ là 5,32%, cho thấy thiệt hại do sùng gây ra trên củ khoai thấp hơn phân nửa so với NT A.

Kết quả này cũng phù hợp với thực tế, qua theo dõi diễn biến mật số SKL vào bẫy trên 2 ruộng khoai (Hình 4.14) cho thấy số lượng sùng ở NT A luôn cao hơn so với NT B và số lượng sùng tăng nhanh về cuối vụ, gây ra áp lực sùng trên ruộng khoai lang nhiều hơn, dẫn đến thiệt hại trên củ khoai cũng cao hơn.

Bảng 4.18: Tỉ lệ củ khoai lang Tím Nhật bị sùng gây hại trên các ruộng thí nghiệm ở vụ 2 tại huyện Bình Tân, Vĩnh Long, từ tháng 8 đến 12 năm 2010

Thời điểm quan sát	Nghiệm thức	Số củ quan sát	Trọng lượng củ (g)	Tỉ lệ (%) củ bị sùng hại	
				Ngoài vỏ	Trong củ
2,5 tháng	A	81	49,75	0	0
	B	87	45,40	0	0
	C	117	38,89	0,85	0,85
CV(%)				3,33	3,33
Mức ý nghĩa				ns	ns
3,5 tháng	A	82	65,24	0	0
	B	90	63,89	0	0
	C	117	55,98	0	0
Khi thu hoạch (4,5 tháng)	A	81	97,28	18,52 ^a	9,88 ^a
	B	94	94,29	8,51 ^{ab}	5,32 ^{ab}
	C	93	83,87	0 ^b	0 ^b
CV(%)				16,33	12,22
Mức ý nghĩa				*	*

Các số trong cùng một cột có chữ theo sau giống nhau thì không khác biệt nhau qua phân tích thống kê ở mức ý nghĩa 5% và kiểm định Duncan. Số liệu các trung bình được chuyển đổi sang $\sqrt{x+0.5}$ trước khi phân tích thống kê.

Ghi chú: Nghiệm thức A: đặt 6 bẫy pheromone/1.000m²

Nghiệm thức B: đặt 12 bẫy pheromone/1.000m²

Nghiệm thức C: Đối chứng (xử lý sùng theo cách nông dân)

Tuy nhiên, kết quả phân tích thống kê ở Bảng 4.18 cho thấy tỉ lệ củ bị sùng gây hại không khác biệt ý nghĩa giữa 2 NT đặt bẫy pheromone. Trong khi đó, NT đối chứng hoàn toàn không có sự gây hại của sùng ngay cả ở ngoài vỏ và bên trong củ khoai, là do nông dân sử dụng thuốc trừ sâu thường xuyên để phòng trị sùng nên hạn chế sự gây hại này. Mặc dù, NT đối chứng không có bị thiệt hại do sùng nhưng cũng không khác biệt ý nghĩa so với NT 12 bẫy/1.000 m² và có khác biệt so với NT 6 bẫy/1.000 m² qua phân tích thống kê ở mức ý nghĩa 5%.

Kết quả trên cho thấy trong thời điểm áp lực sùng cao trên ruộng, nếu áp dụng 12 bẫy/1.000 m² thì tỉ lệ thiệt hại do sùng gần tương đương so với ruộng đối chứng chỉ áp dụng thuốc trừ sâu phòng trị sùng. Nhận thấy biện pháp sử dụng bẫy pheromone giới tính tổng hợp có khả năng hạn chế được sự gây hại của sùng ở ngoài đồng, ngay cả thời điểm áp lực sùng khá cao.

Thời điểm trước khi thu hoạch (4,5 tháng SKT) có tỉ lệ củ bị sùng gây hại tăng lên khá nhiều, trùng khớp với sự gia tăng đột ngột mật số sùng vào bẫy trên ruộng khoai vào thời điểm này, có thể do sùng di chuyển từ các ruộng khác và sự tích lũy mật số trên ruộng dẫn tới sự gia tăng mật số nhanh chóng tạo áp lực sùng cao vào cuối vụ khoai.

Ở NT đối chứng, nông dân có thói quen áp dụng thuốc trừ sâu hóa học rất nhiều lần (định kỳ 7 ngày/lần) bắt đầu từ lúc 3 NSKT đến khi thu hoạch. Việc phun thuốc liên tục có thể khống chế quần thể sùng gây hại. Do đó, họ canh tác cùng thời gian với 2 ruộng đặt bẫy pheromone nhưng không thấy củ bị thiệt hại do sùng (cả ngoài vỏ và trong củ).

Kết quả ở Bảng 4.18 cho thấy tỉ lệ củ thiệt hại do sùng ở NT đặt 6 bẫy/1.000 m² và 12 bẫy/1.000 m² là khá cao so với ruộng đối chứng (xử lý sùng theo cách nông dân), nhưng trên thực tế khi chủ ruộng thu hoạch khoai thì mức độ thiệt hại thấp hơn, cụ thể qua kết quả đánh giá cho thấy tỉ lệ thiệt hại củ do sùng là 12,5% (ruộng đặt 6 bẫy) và 7,45% (ruộng đặt 12 bẫy) qua quan sát ở bên ngoài vỏ củ.

Mặc khác, do thí nghiệm được bố trí vào mùa mưa trên vùng đất gò cao (vùng chuyên canh) và các ruộng xung quanh đang vào thời điểm thu hoạch rộ nên áp lực sùng trên ruộng là rất lớn. Theo nhận định của nông dân xung quanh và xác nhận của chủ ruộng, khu vực bố trí 2 NT đặt bẫy pheromone có tỉ lệ thiệt hại do sùng ở vụ trước rất cao (chiếm 50% năng suất) và chủ ruộng phải thu hoạch sớm vào thời điểm khoai trồng được 3 tháng 10 ngày (khoảng 100 NSKT). Mặc dù, thu hoạch sớm năng suất thấp hơn so với thời điểm cuối

vụ, ở thời điểm này thiệt hại do sùng rất lớn, do vậy cũng làm giảm thu nhập của nông dân và mất nhiều thời gian hơn. Trong khi đó, giống khoai lang Tím Nhật có thời gian sinh trưởng trung bình từ 4-5 tháng mới thu hoạch (từ 120-150 ngày). Thêm vào đó, địa bàn xung quanh khu vực thí nghiệm cũng là nơi trồng khoai lang để làm giống cho mùa vụ sau.

Từ kết quả trên cho thấy nếu muốn canh tác khoai tốt và hiệu quả phòng trị sùng cao nên chú trọng vệ sinh đồng ruộng sau thu hoạch, giảm áp lực sùng cho vụ tiếp theo bằng cách cắt vụ và tốt nhất là chuyển sang canh tác lúa.

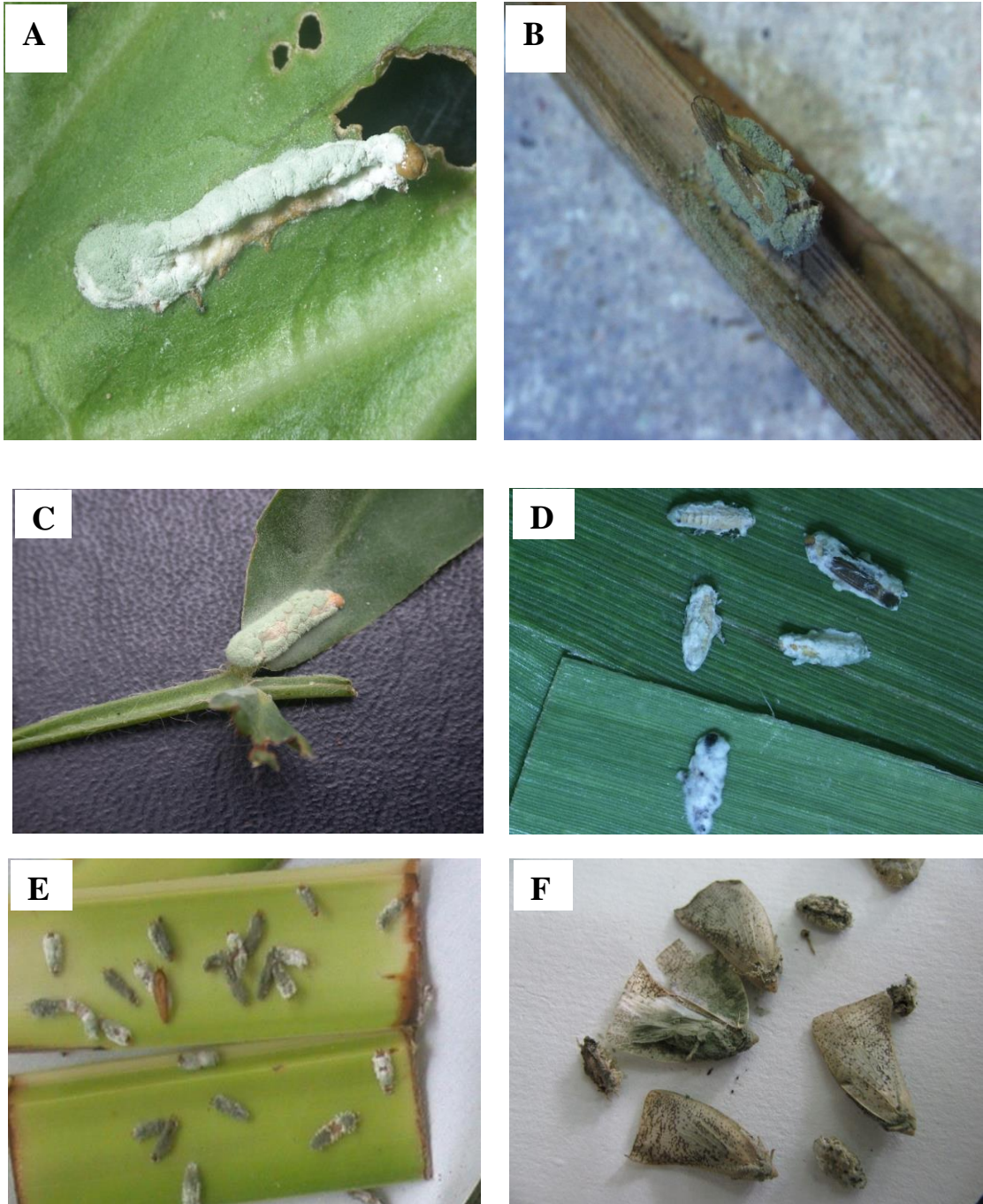
Có thể áp dụng biện pháp đặt 12 bẫy/1.000 m² ở những nơi có áp lực SKL cao để thay thế hoặc hỗ trợ nhằm giảm số lần phun thuốc trừ sâu hóa học cho ruộng khoai so với biện pháp chỉ đơn thuần sử dụng thuốc hóa học thường xuyên (định kỳ 7 ngày/lần kể từ 3 NSKT đến thu hoạch). Do sùng thích gây hại trên củ hơn, nên tập trung phòng trị vào giai đoạn sau là rất quan trọng. Việc áp dụng biện pháp đặt bẫy giúp giảm chi phí sử dụng thuốc trừ sâu hóa học, hạn chế phát sinh loài kháng thuốc, tránh gây mất cân bằng sinh thái, ảnh hưởng tới sức khỏe con người và môi trường.

4.3 Nghiên cứu về nấm ký sinh trên sùng khoai lang trong PTN

4.3.1 Phân lập và định danh loài từ chi nấm *Metarhizium* ký sinh trên côn trùng theo phương pháp phân loại truyền thống

Bảng 4.19: Các nguồn nấm *Metarhizium* đã thu thập trên một số côn trùng gây hại cây trồng tại một số tỉnh ĐBSCL

TT	Ký hiệu mẫu	Ký chủ (tên thường gọi, tên khoa học, họ, bộ)	Địa điểm thu thập (huyện, tỉnh)
1	Ma_SAT-CT	Sâu ăn tạp (<i>Spodoptera litura</i> Fab.) (Lepidoptera: Noctuidae)	Bình Thủy, TP. Cần Thơ
2	Ma_RN-ST	Rầy nâu hại lúa (<i>Nilaparvata lugens</i> Stal) (Homoptera: Delphacidae)	Long Phú, Sóc Trăng
3	Ma_SXL-TV	Sâu xếp lá đậu phộng (<i>Archips micacerana</i> Walker) (Lepidoptera: Tortricidae)	Cầu Ngang, Trà Vinh
4	Ma_RĐV-ST	Rầy đầu vàng hại mía (<i>Eoerysa flavocapitata</i> Muir) (Homoptera: Delphacidae)	Cù Lao Dung, Sóc Trăng
5	Ma_BD-KG	Bọ cánh cứng hại dứa (<i>Bronstispa longissima</i>) (Coleoptera: Chrysomelidae)	Kiên Lương, Kiên Giang
6	Ma_SKL-VL	Sùng khoai lang (<i>Cylas formicarius</i> Fab.) (Coleoptera: Curculionidae)	Bình Tân, Vĩnh Long
7	Ma_RB-CT	Rầy bướm cam quýt (<i>Lawana conspersa</i>) (Homoptera: Flatidae)	Phong Điền, Cần Thơ



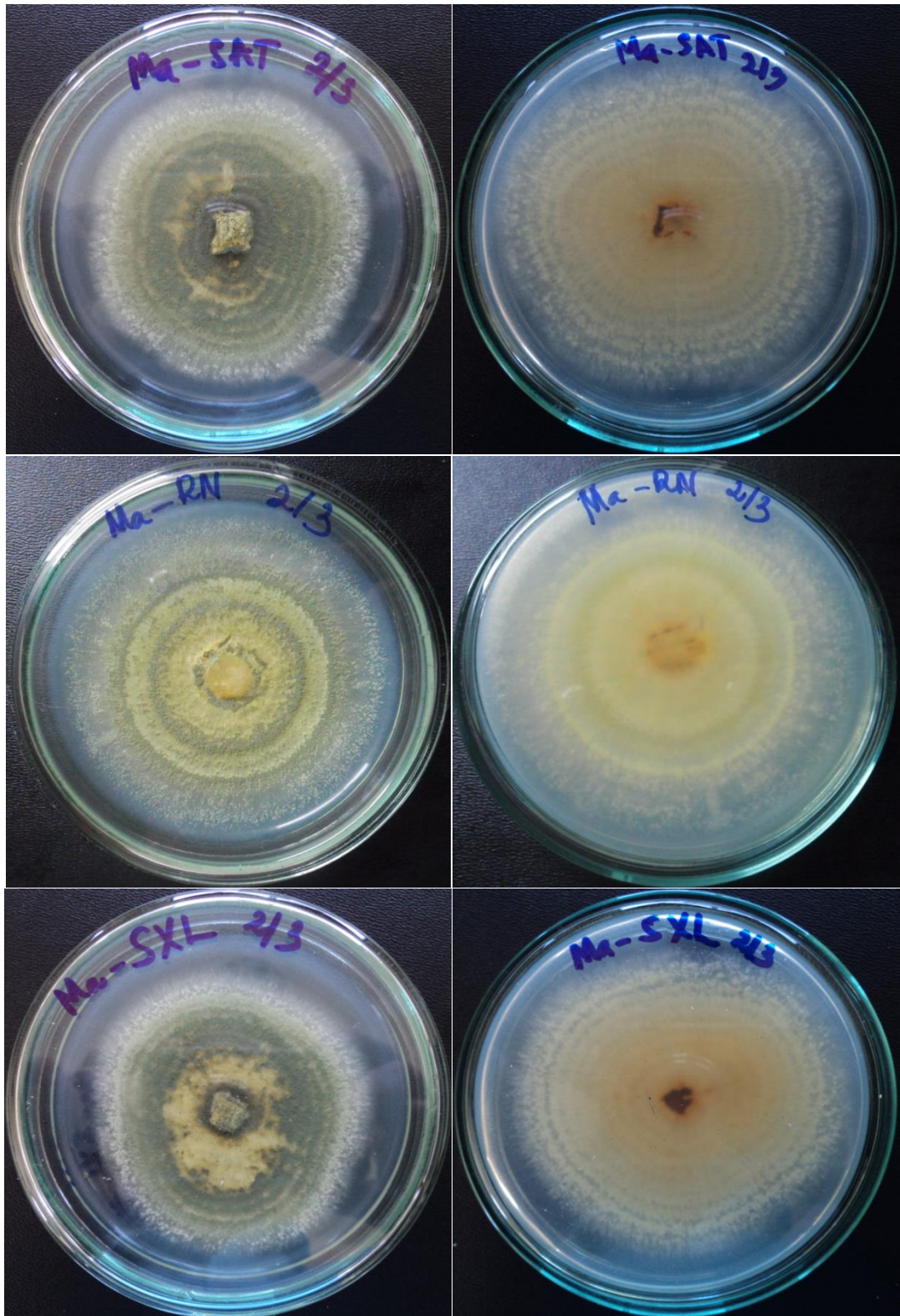
Hình 4.15: Nấm *Metarhizium* ký sinh trên một số côn trùng gây hại cây trồng
 A: Sâu ăn tạp (*Spodoptera litura*); B: Rầy nâu hại lúa (*Nilaparvata lugens*)
 C: Sâu xếp lá đậu phộng (*Archips micacerana*); D: Rầy đầu vàng hại mía (*Eoerysa flavocapitata*); E: Bộ cánh cứng hại dừa (*Bronstispa longissima*);
 F: Rầy bướm trên cam quýt (*Lawana conspersa*)

Từ các mẫu côn trùng bị nấm ký sinh thu được ngoài tự nhiên tại một số tỉnh vùng ĐBSCL đem về PTN để phân lập nấm trên môi trường PDA chọn ra dòng thuần và xác định loài của các mẫu phân lập (MPL) nấm đã thu thập. Các MPL này được mã hóa ký hiệu theo tên ký chủ, địa điểm thu mẫu như trình bày ở Bảng 4.19 và triệu chứng nấm ký sinh trên côn trùng được minh họa như ở Hình 4.15.

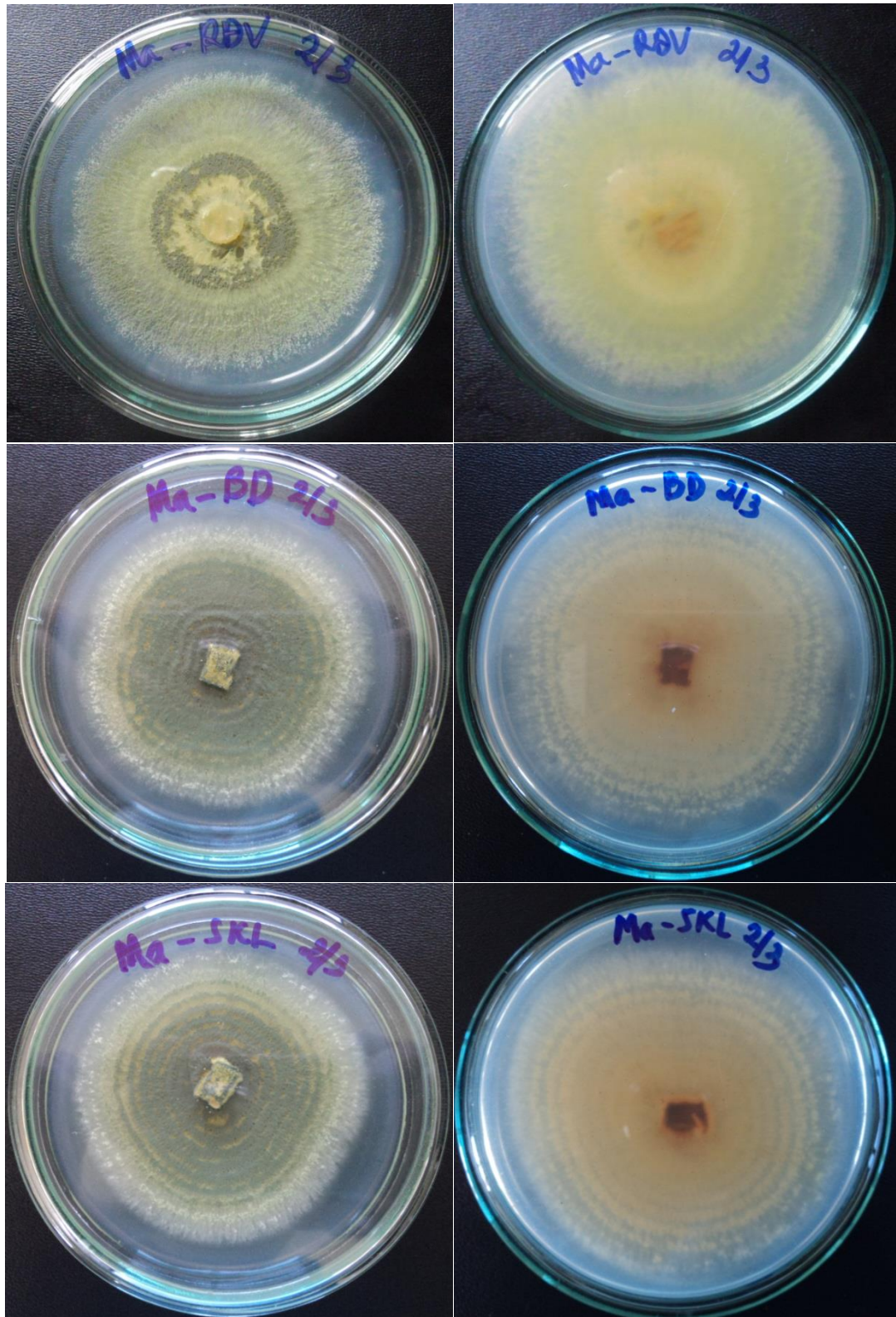
Dựa trên kết quả nghiên cứu của Phạm Thị Thùy (2004), Luangsa *et al.* (2006) và Samson (1981) thì chi nấm *Metarhizium* có 3 loài được xác định là ký sinh gây bệnh trên côn trùng gồm loài *M. anisopliae*, *M. flavoviride* và *M. acridum*, có khả năng ký sinh trên nhiều loài sâu hại cây trồng thuộc các bộ Diptera, Homoptera, Hemiptera, Orthoptera và Isoptera. Đặc biệt ký sinh gây bệnh nhiều loài côn trùng thuộc bộ cánh cứng Coleoptera và sâu non bộ cánh vẩy Lepidoptera, với hơn 240 loài côn trùng bị nhiễm bệnh bởi nấm *M. anisopliae*.

Trên môi trường nuôi cấy PDA, khuẩn lạc ban đầu có sợi nấm màu trắng khi hình thành bào tử chuyển sang màu xanh lục tối. Khuẩn lạc nấm xốp, mịn, phân bố tỏa tròn đều theo vòng đồng tâm trên bề mặt môi trường nuôi cấy (Hình 4.16 và Hình 4.17). Kết quả này tương tự với mô tả về khuẩn lạc của loài *M. anisopliae* bởi các tác giả Phạm Thị Thùy (2004); Tulloch (1976); Chase *et al.* (1986); Kamp and Bidochka (2002); Luangsa *et al.* (2006). Theo phân loại truyền thống, sự phát triển, màu sắc khuẩn lạc trên môi trường nuôi cấy cũng được xem là một trong những đặc điểm để phân loại loài nấm *M. anisopliae*. Tuy nhiên, nếu định danh nấm ký sinh côn trùng nói chung và *Metarhizium* nói riêng mà dựa vào hình dạng, màu sắc khuẩn lạc khi nuôi cấy trên môi trường dinh dưỡng dễ bị nhầm lẫn vì các đặc điểm này có thể thay đổi do ảnh hưởng bởi các chất có trong môi trường nuôi cấy.

4.3.1.1 Đặc điểm hình thái của chi nấm *Metarhizium*



Hình 4.16: Khuẩn lạc các MPL *Metarhizium* phát triển trên môi trường PDA (mặt trên (trái) và mặt dưới (phải) của một số MPL ở thời điểm 10 NSKC)

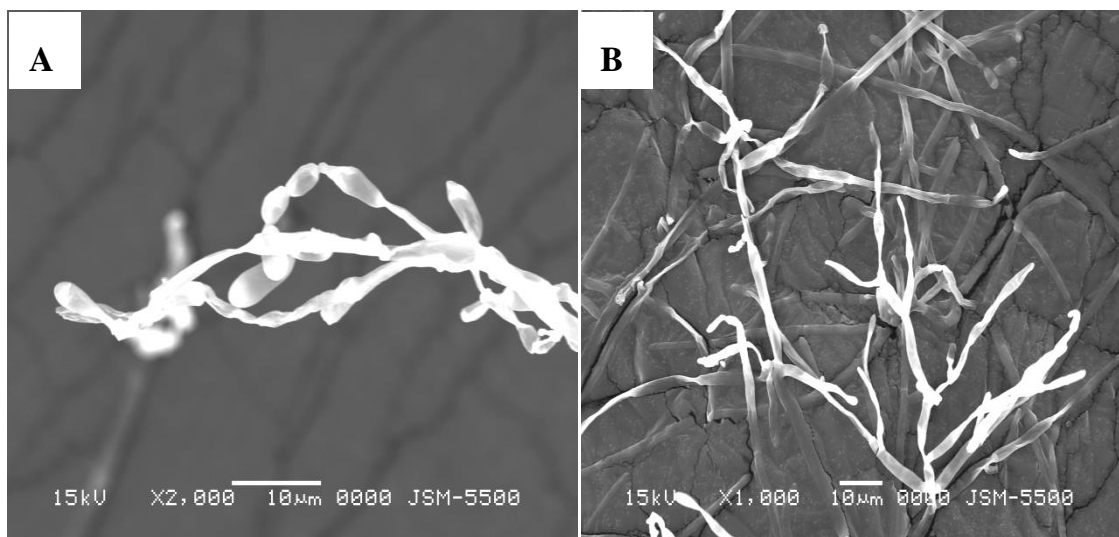


Hình 4.17: Khuẩn lạc các MPL *Metarhizium* phát triển trên môi trường PDA (mặt trên (trái) và mặt dưới (phải) của một số MPL ở thời điểm 10 NSKC) (tt)

4.3.1.2 Đặc điểm hình thái cơ quan sinh bào tử (cành bào đài)

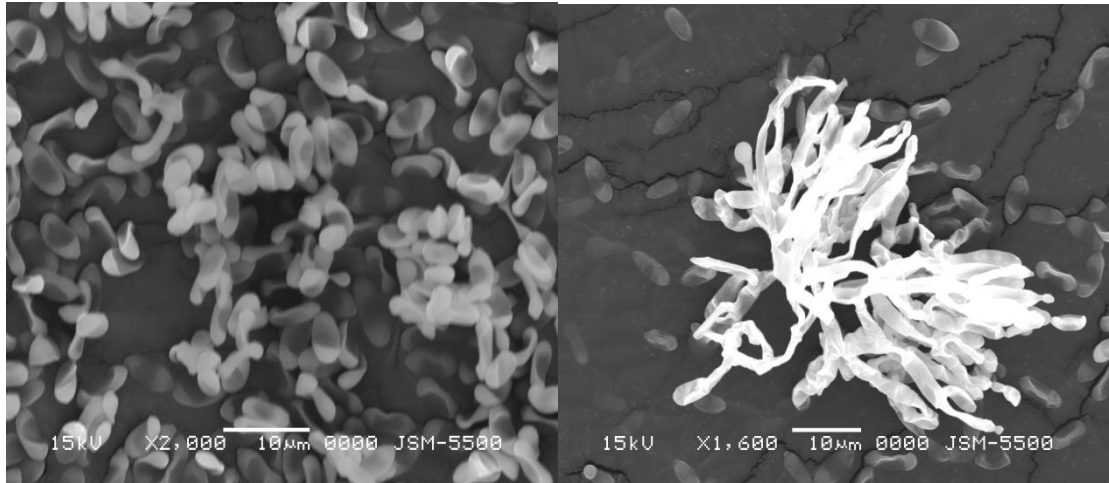
Sợi nấm *Metarhizium* phát triển trên bề mặt côn trùng có màu trắng đến xanh lục. Bào tử đính đơn bào, hình trụ, hình hạt đậu. Khi côn trùng chết có thể nhìn thấy lớp bào tử được tạo ra trên bề mặt cơ thể lớp bột màu xanh. Sau khi đã quan sát bào tử và cành bào đài cho thấy cả 7 MPL đều có bào tử dạng hình trụ trên cành bào đài, có phân nhánh và dạng thể bình gắn bào tử (Hình 4.18, Hình 4.19, Hình 4.20, Hình 4.21). Dựa vào khóa phân loại của Barnett và Barry (1998) có thể kết luận ban đầu là 7 MPL nấm *Metarhizium* đều là loài *Metarhizium anisopliae*. Kết quả này phù hợp với các nghiên cứu của Phạm Thị Thùy (2004); Luangsa *et al.* (2006) và Samson (1981).

Kết quả cho thấy quần thể nấm *Metarhizium* trong tự nhiên có loài nấm *M. anisopliae* hiện diện phổ biến ở các địa điểm thu mẫu. Đặc điểm hình thái nấm *Metarhizium* bị ảnh hưởng bởi các yếu tố như nhiệt độ, thành phần môi trường nuôi cấy và các lần cấy truyền đều có thể ảnh hưởng đến hình dạng, màu sắc khuẩn lạc. Vì vậy, cần lưu ý khi mô tả, do đó cần phải có phương pháp khác để xác định tính chính xác của phương pháp phân loại truyền thống (Houping *et al.*, 2003).

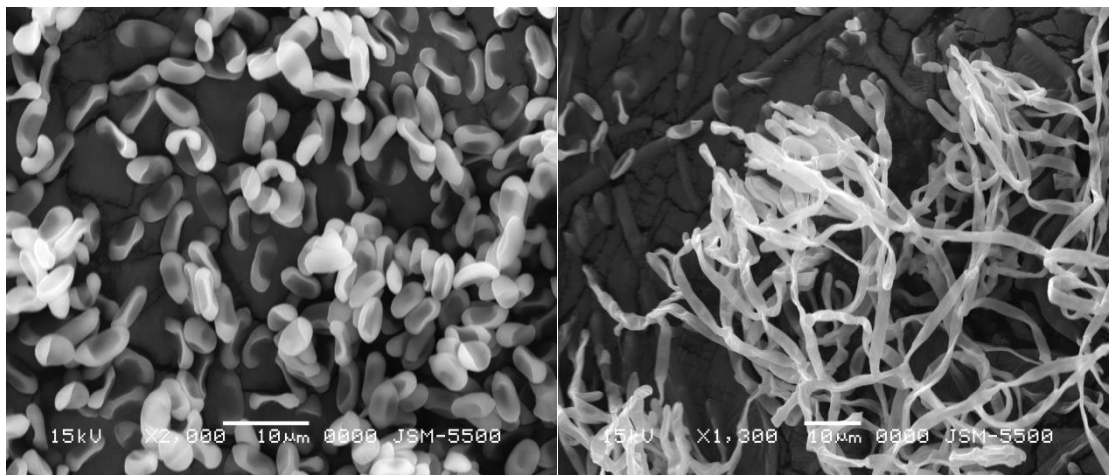


Hình 4.18: Cấu trúc hình dạng cành bào đài của chi nấm *Metarhizium*

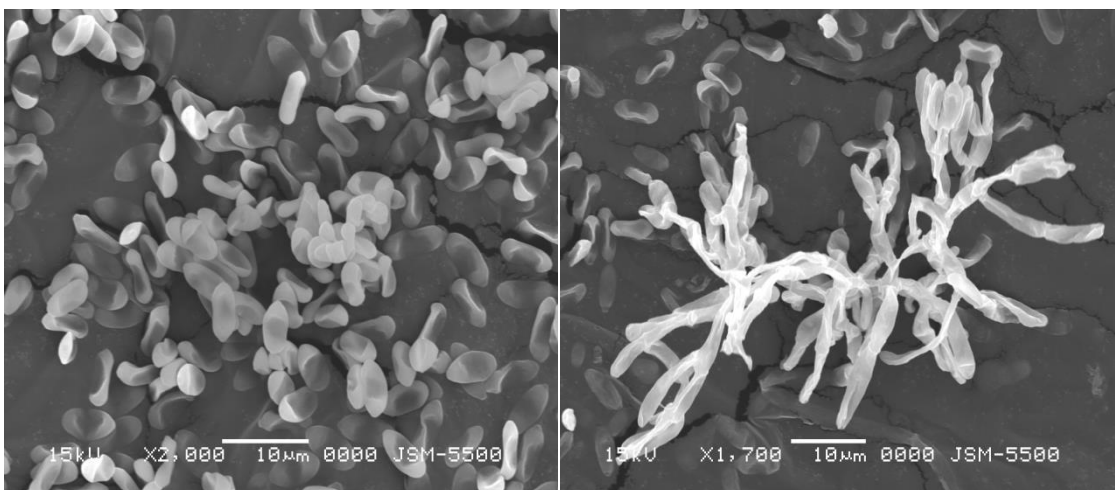
A: Hình dạng thể bình đính bào tử; B: Cấu trúc cành bào đài
chụp hình qua SEM (KHV điện tử)



a) MPL Ma_SAT-CT

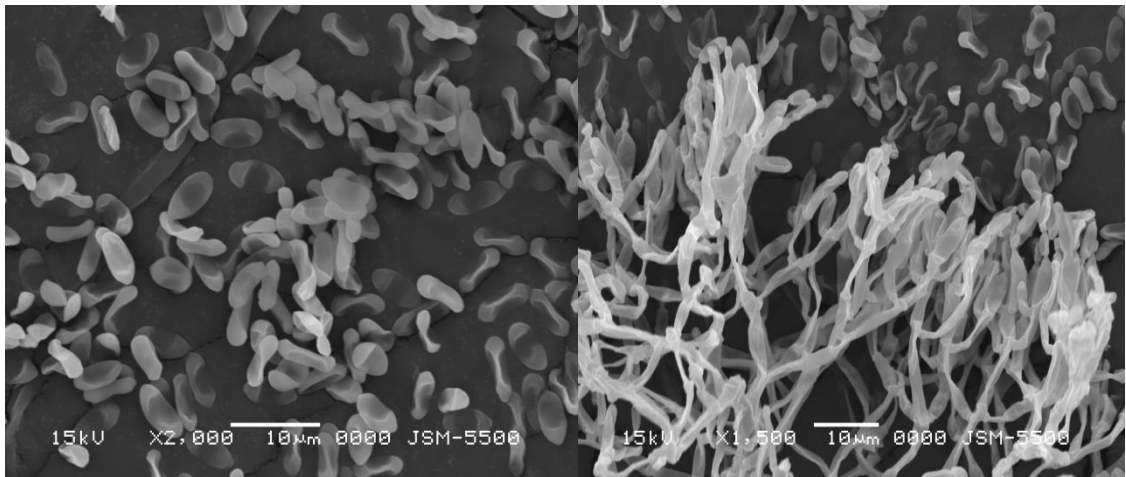


b) MPL Ma_RN-ST

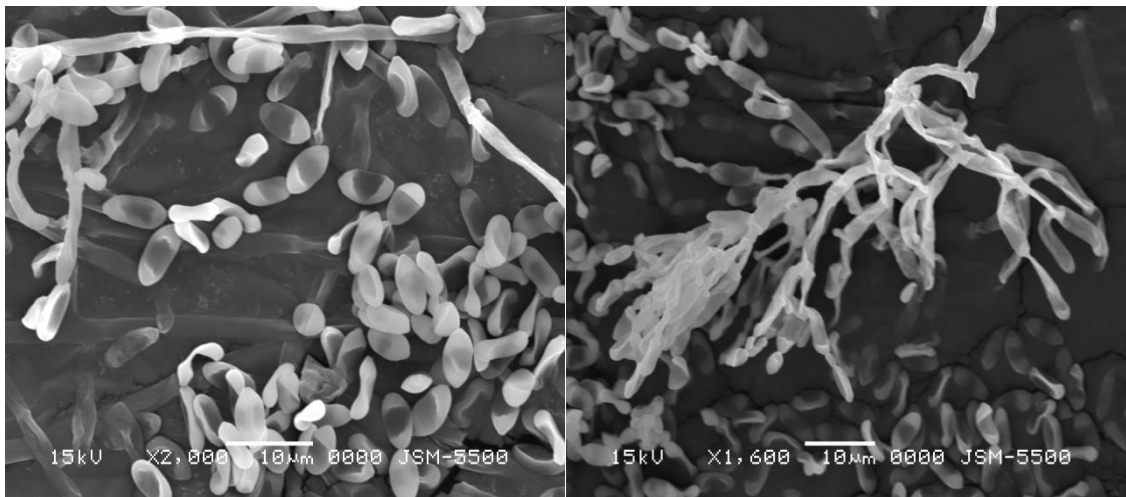


c) MPL Ma_SXL-TV

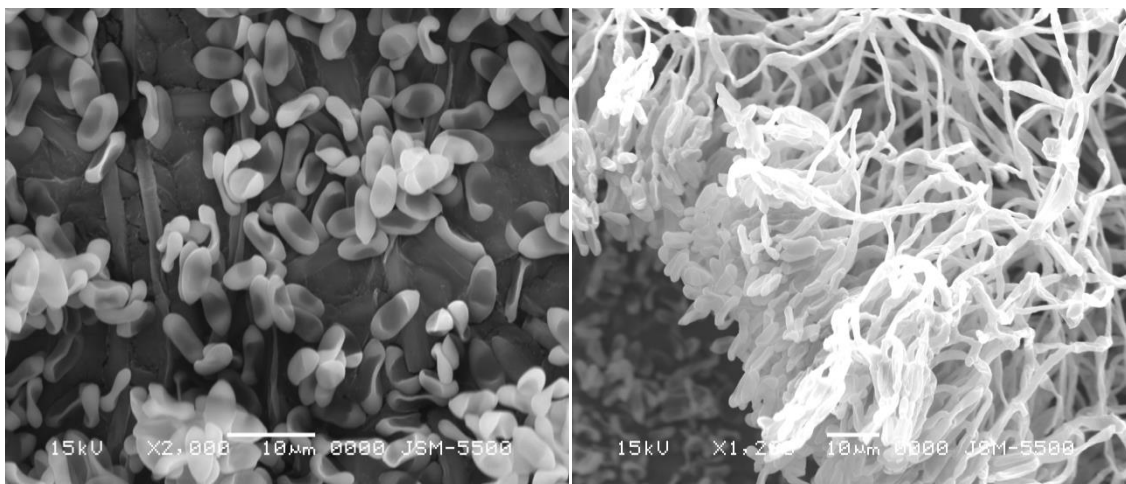
Hình 4.19: Hình dạng bào tử (trái) và cấu trúc cành bào đài (phải) của các MPL *Metarhizium* chụp hình qua SEM



d) MPL Ma_RDV-ST

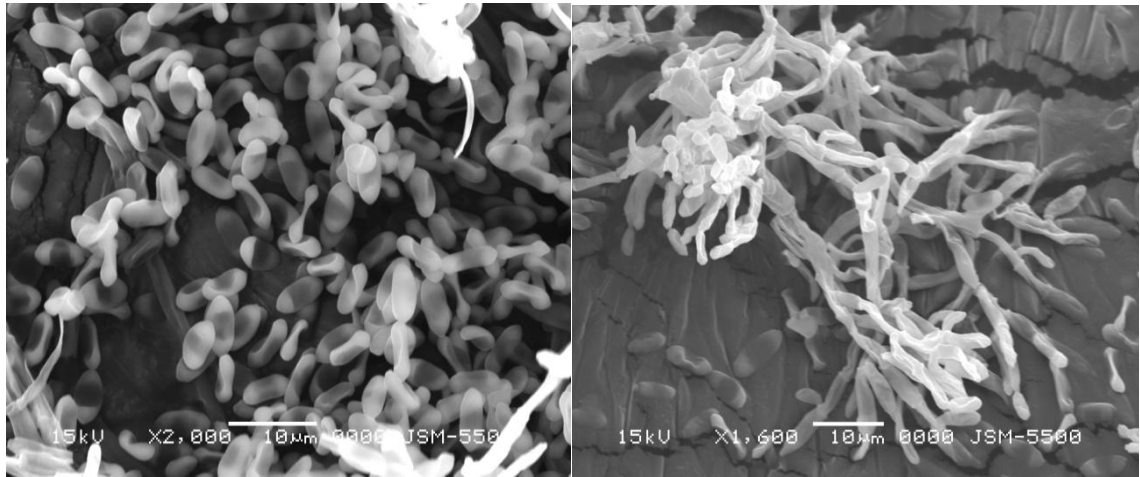


e) MPL Ma_BD-KG



f) MPL Ma_SKL-VL

Hình 4.20: Hình dạng bào tử (trái) và cấu trúc cành bào đài (phải) của các MPL *Metarhizum* chụp qua SEM (tt)



g) MPL Ma_RB-CT

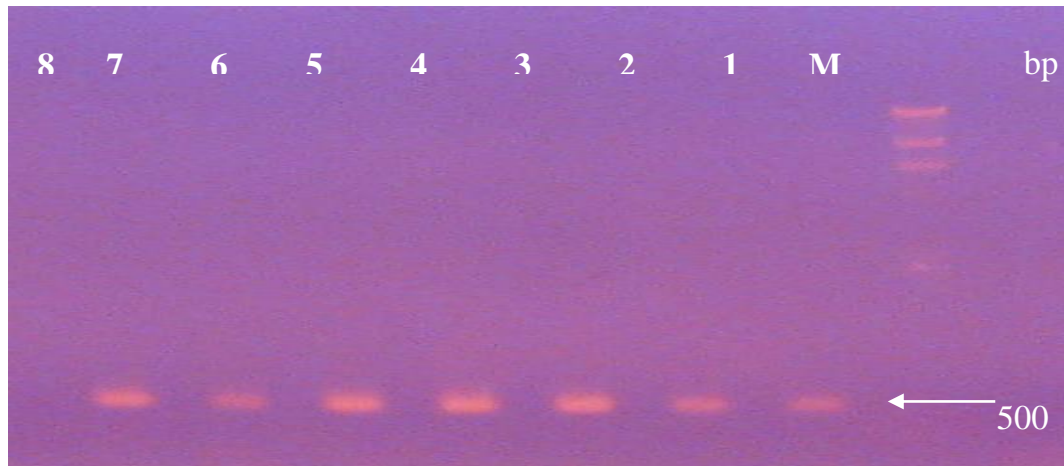
Hình 4.21: Hình dạng bào tử (trái) và cấu trúc cành bào đài (phải) của các MPL *Metarhizium* chụp qua SEM (tt)

4.3.2 Phân loại, xác định loài nấm *Metarhizium* dựa vào trình tự vùng ITS-rDNA theo phương pháp sinh học phân tử

4.3.2.1 Phân loại nấm *Metarhizium* dựa vào trình tự vùng ITS-rDNA

Hiện nay, nhiều kỹ thuật phân tử như PCR với các primer chuyên biệt, phân tích RAPD-PCR, RFLP-PCR của rDNA, phân tích Isozyme, lai phân tử, chuyển gen... đã được sử dụng rộng rãi để nhận biết các loài trong chi nấm *Metarhizium* (Bidochka *et al.*, 2000). Trong nghiên cứu này trình tự vùng ITS-rDNA của các MPL *Metarhizium* được phân tích và so sánh với trình tự của các loài thuộc chi *Metarhizium* khai thác từ cơ sở dữ liệu ngân hàng gen để xác định loài của 7 MPL này.

Phản ứng PCR được thực hiện với 2 primer ITS₁ và ITS₄ khuếch đại vùng ITS-rDNA của tất cả 7 MPL *Metarhizium*. Kết quả ở Hình 4.22 cho thấy vùng ITS-rDNA có chiều dài khoảng 500 bp khi phân tích điện di trên Agarose 1%. Sản phẩm PCR được giải trình tự trực tiếp với 2 primer ITS₁ và ITS₄. Kết quả đã ghi nhận có sự khác biệt trong vùng ITS giữa các mẫu phân lập và hiện tượng mất nucleotictide hoặc thêm nucleotide. Milner *et al.* (1991) cũng thống nhất ý kiến khi mô tả một loài mới phát hiện dựa vào đặc điểm hình thái học thì sự tương đồng trình tự, sự phân nhóm loài của các mẫu nấm cần phải được so sánh và phân tích đánh giá ở mức độ phân tử.



Hình 4.22: Sản phẩm PCR khuếch đại vùng ITS-rDNA của các MPL *Metarhizium*, sử dụng hai primer ITS1 và ITS4
(M: Marker 100 bp; 1: *Ma_SAT-CT*; 2: *Ma_SKL-VL*; 3: *Ma_SXL-TV*; 4: *Ma_BD-KG*; 5: *Ma_RN-ST*; 6: *Ma_RDV-ST*; 7: *Ma_RB-CT*; 8: Mẫu nước)

4.3.2.2 So sánh trình tự vùng ITS-rDNA của 7 mẫu phân lập *Metarhizium* thu thập với các mẫu *Metarhizium* trên thế giới

Các mẫu *Metarhizium* thu thập từ một số nước trên thế giới đã xác định loài nấm bởi các tác giả công bố qua các năm và bổ sung số ký hiệu riêng của từng loài nấm vào ngân hàng gen thế giới dùng để so sánh xác định tên các loài nấm phân lập ngoài tự nhiên (Bảng 4.20).

Bảng 4.20: Các mẫu *Metarhizium* trên thế giới được sử dụng để xác định loài

GenBank Accession No.	Tên loài nấm - Quốc gia	Tác giả và năm công bố
AY624204	<i>M. cylindrospora</i> -Thái Lan	Luangsa <i>et al.</i> , 2004
AF137059	<i>M. anisopliae</i> -Úc	Driver and Milner, 1999
AB071712	<i>M. anisopliae</i> -Nhật Bản	Yazawa and Shimizu, 2001
DQ177434	<i>M. anisopliae</i> -Trung Quốc	Zang <i>et al.</i> , 2005
EF113338	<i>M. acridum</i> -Trung Quốc	Guo and Huang, 2006
AF137063	<i>M. acridum</i> -Úc	Driver and Milner, 1999
AF138267	<i>M. flavoviride</i> -Úc	Driver and Milner, 1999

(Nguồn: www.NCBI.nlm.nih.gov)

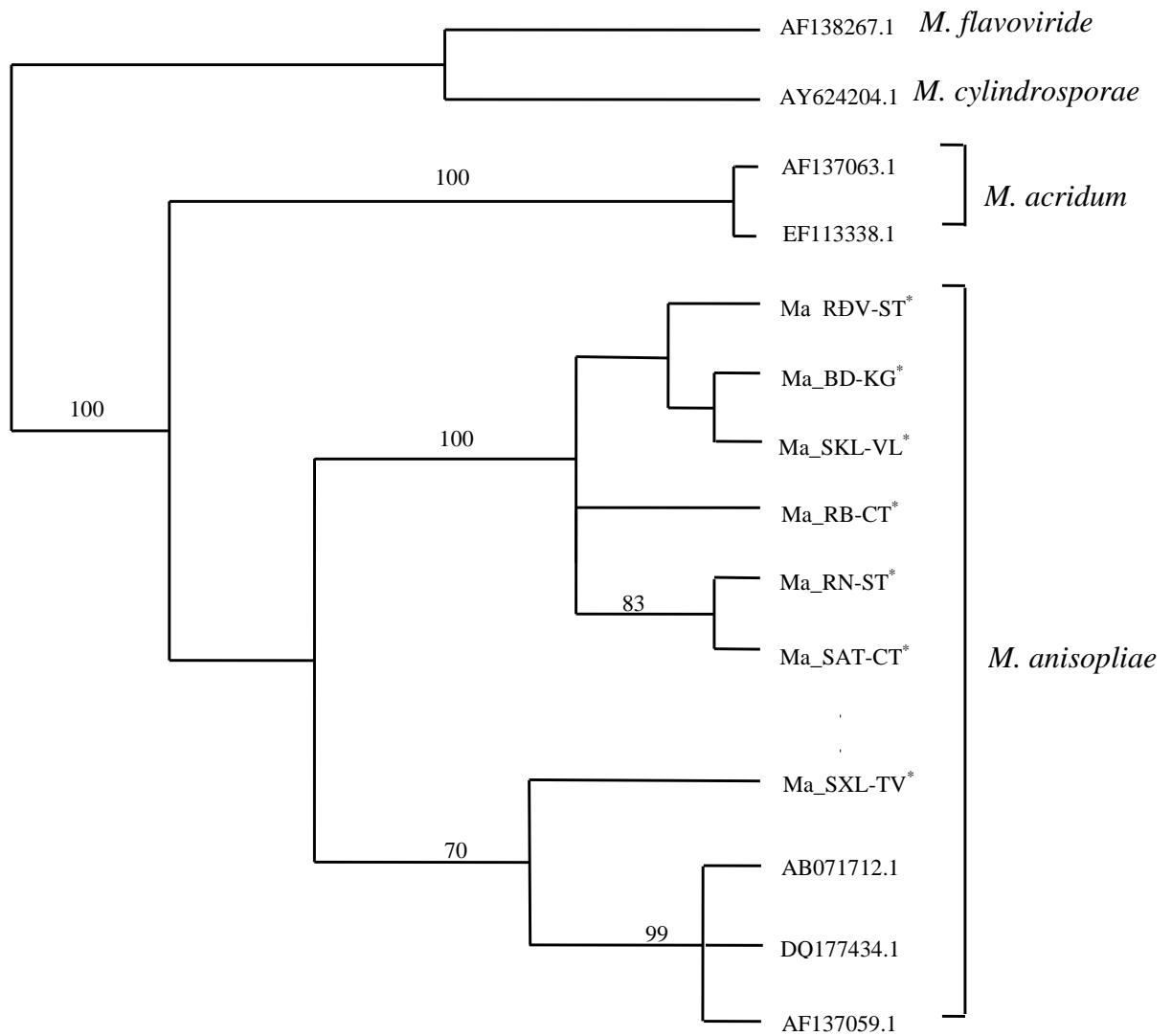
Kết quả so sánh mức độ tương đồng trình tự DNA giữa 7 MPL *Metarhizium* thu thập tại một số tỉnh ĐBSCL (VN) với trình tự DNA tương ứng của 7 mẫu *Metarhizium* trên thế giới thể hiện ở Bảng 4.21.

Mức độ tương đồng của các MPL tại VN so với 7 mẫu trên thế giới, dao động từ 83,1-99,3%. Trong đó, sự tương đồng trình tự DNA giữa 7 MPL so

với 3 mẫu xác định loài *M. anisopliae*, có nguồn gốc từ Trung Quốc, Nhật Bản và Úc (DQ177434, AB071712, AF137059) gần giống nhau, dao động từ 96,3-99,3%, tương đồng với 2 mẫu nấm có nguồn gốc từ Trung Quốc và Úc (EF113338, AF137063) từ 91,1-91,8%. Sự tương đồng trình tự DNA với mẫu AY624204 của Thái Lan là 82,9-84% và mẫu nấm từ Úc (AF138267) là 83,1-83,8%. Các MPL *Metarhizium* thu thập tại ĐBSCL (VN) có quan hệ di truyền gần gũi với nhau hơn, các MPL có mức độ tương đồng từ 97,5-99,7%. Trong đó, MPL Ma_SXL-TV và Ma_SKL-VL tương đồng 97,5%, MPL Ma_SKL-VL và Ma_BD-KG tương đồng 99,3%, MPL Ma_SAT-CT và Ma_RN-ST tương đồng 99,7%,...). Như vậy, các mẫu nấm *Metarhizium* phân lập tại vùng ĐBSCL có sự tương đồng trình tự DNA cao so với các mẫu nấm trên thế giới, đã được xác định là loài nấm *M. anisopliae*. Qua đó, minh chứng thêm cho xác định 7 MPL *Metarhizium* nghiên cứu đều thuộc loài nấm *M. anisopliae* phù hợp với ngân hàng gen của chủng nấm này trên thế giới.

Xác định loài nấm dựa trên cơ sở so sánh trình tự DNA của 14 mẫu *Metarhizium* thể hiện qua Hình 4.23 cho thấy cây phân nhóm loài được chia thành 2 nhánh chính: (1) nhánh gồm trình tự 2 mẫu trên thế giới (AF138267, AY624204) và (2) nhánh gồm trình tự 12 mẫu (5 mẫu trên thế giới và 7 MPL tại Việt Nam). Trong đó, nhánh (2) chia thành 2 nhánh nhỏ: nhánh gồm trình tự 2 mẫu trên thế giới (AF137063 và EF113338) và nhánh gồm trình tự 6 MPL tại Việt Nam; 3 mẫu trên thế giới (AB071712, DQ177434 và AF137509). Kết quả này cho thấy 7 MPL *Metarhizium* xếp cùng nhóm với 3 mẫu trên thế giới (AB071712, DQ177434 và AF137509), được xác định cùng loài nấm *M. anisopliae*, có sự khác biệt trình tự DNA so với các trình tự DNA của các mẫu trên thế giới. Trong số các MPL tại Việt Nam thì mẫu Ma_SXL-TV có độ tương đồng di truyền về trình tự DNA so với 3 mẫu trên thế giới là cao nhất (98,1-99,3%), được xếp vào cùng 1 nhánh riêng biệt với nhánh có 6 MPL tại Việt Nam còn lại. Do có độ tương đồng di truyền cao nhất (99,7%), cho nên 2 mẫu Ma_SAT-CT và Ma_RN-ST được xếp vào cùng 1 nhánh riêng biệt so với 2 nhánh còn lại gồm Ma_RĐV-ST, Ma_BD-KG, Ma_SKL-VL và Ma_RB-CT.

Tóm lại, từ kết quả định danh theo phương pháp truyền thống dựa vào đặc điểm hình thái học của nấm và kết quả xác định loài nấm dựa vào trình tự vùng ITS-rDNA đã phân loại 7 MPL *Metarhizium* nghiên cứu cùng 1 nhóm với loài nấm *M. anisopliae*, chưa xác định có sự hiện diện của các loài nấm khác và đã khẳng định kết quả phân loại truyền thống là chính xác. Đây cũng là cơ sở khoa học để kết luận loài *M. anisopliae* là loài nấm phân bố rộng rãi tại một số tỉnh vùng ĐBSCL.



Hình 4.23: Sơ đồ phân nhóm loài của 7 MPL *Metarhizium* nghiên cứu (*) so với các mẫu nấm *Metarhizium* trên thế giới dựa trên trình tự vùng ITS-rDNA. Phần trăm bootstrap từ 1.000 lần lặp lại được ghi nhận trên các nhánh.

Bảng 4.21: Mức độ tương đồng (%) về trình tự DNA trong vùng ITS-rDNA giữa 7 mẫu phân lập nấm *Metarhizium* tại một số tỉnh ĐBSCL và 7 mẫu *Metarhizium* thế giới

Mẫu nấm	Ma-SAT	Ma-RN	Ma-SKL	Ma-BD	Ma-RB	Ma-RDV	Ma-SXL	DQ177434	AB071712	AF137059	EF113338	AF137063	AY624204	AF138267
Ma-SAT														
Ma-RN	99,7													
Ma-SKL	98,4	98,6												
Ma-BD	98,8	99,0	99,3											
Ma-RB	99,0	99,3	99,0	98,8										
Ma-RDV	98,4	98,6	98,4	98,8	98,6									
Ma-SXL	98,1	98,4	97,5	97,9	98,4	98,4								
DQ177434	97,0	97,2	96,3	96,3	97,0	96,3	97,9							
AB071712	97,7	97,9	97,0	97,0	97,7	97,0	98,6	99,3						
AF137059	97,2	97,5	96,5	96,5	97,2	96,5	98,1	98,8	99,5					
EF113338	91,5	91,3	91,5	91,5	91,8	91,1	91,1	90,6	91,1	90,6				
AF137063	91,5	91,3	91,5	91,5	91,8	91,1	91,1	90,6	91,1	90,6	100			
AY624204	83,8	83,6	83,8	83,8	84,0	83,4	82,9	82,9	83,1	83,1	84,0	84,0		
AF138267	83,6	83,4	83,6	83,6	83,8	83,1	83,1	82,7	83,4	83,4	84,0	84,0	92,5	

4.3.3 Khảo sát hiệu lực của các mẫu phân lập nấm *Metarhizium* đối với thành trùng sùng khoai lang trong điều kiện phòng thí nghiệm

Kết quả trình bày ở Bảng 4.22 cho thấy các MPL *Metarhizium* tại các tỉnh vùng ĐBSCL thể hiện hiệu lực ký sinh gây chết thành trùng SKL trong điều kiện phòng thí nghiệm là tương đương nhau, hầu như các MPL không khác biệt hiệu lực gây chết qua các thời điểm quan sát. Các MPL trong thí nghiệm này đều sử dụng cùng nồng độ là 10^8 bào tử/ml.

Bảng 4.22: Hiệu lực gây chết của các mẫu phân lập *Metarhizium* đối với thành trùng SKL trong điều kiện phòng thí nghiệm, năm 2011

STT	Nghiệm thức	Độ hữu hiệu (%) của các MPL vào các NSKXL			
		2	3	4	5
1	Ma_SAT-CT	7,5	39,0 ^c	97,3	100
2	Ma_RN-ST	11,7	64,0 ^a	95,4	97,2
3	Ma_SXL-TV	5,8	54,3 ^{ab}	97,3	98,3
4	Ma_RĐV-ST	5,0	20,0 ^d	92,8	98,2
5	Ma_BD-KG	3,2	51,6 ^b	97,1	98,1
6	Ma_SKL-VL	6,7	27,3 ^d	95,4	97,2
7	Ma_RB-CT	7,5	42,9 ^{bc}	95,7	96,5
CV (%)		34,6	9,6	2,0	1,7
Mức ý nghĩa		ns	**	ns	ns

*Trong cùng một cột, các số có cùng chữ theo sau giống nhau thì không khác biệt qua thống kê và kiểm định Duncan. **: khác biệt ở mức ý nghĩa 1%; ns: không khác biệt thống kê; MPL: mẫu phân lập nấm xanh; NSKXL: ngày sau khi xử lý nấm.*

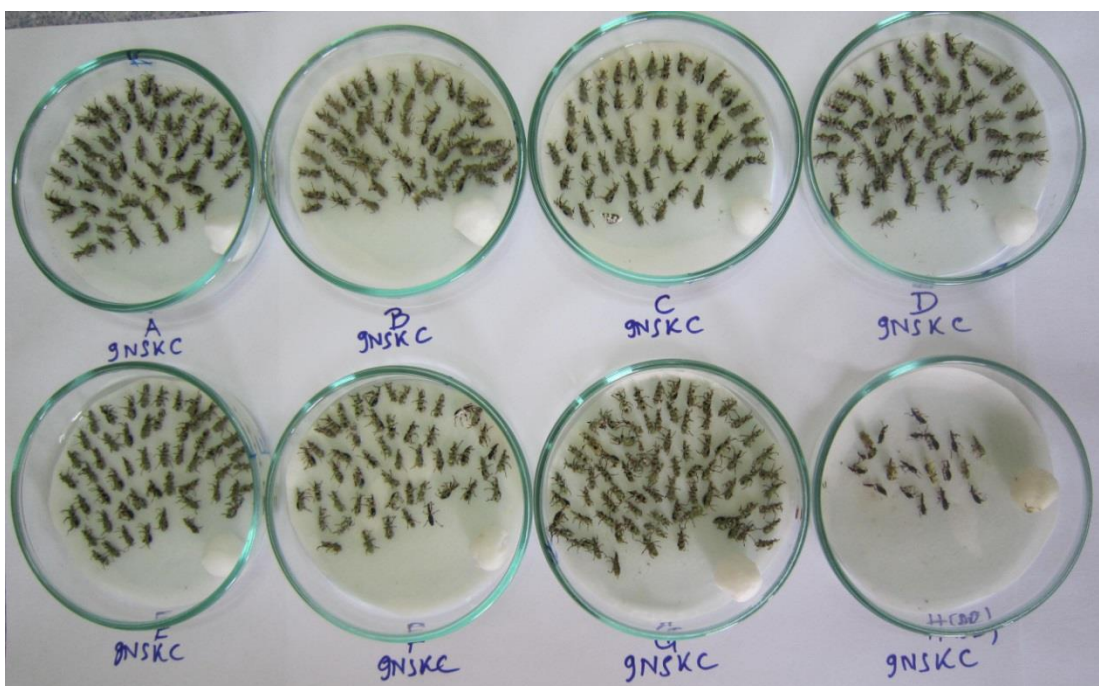
Ở thời điểm 2 NSKXL các NT xử lý nấm có hiệu lực gây chết sùng thấp, đạt 3,2-11,7% và chưa khác biệt ý nghĩa. Hiệu lực gây chết sùng có sự khác biệt ý nghĩa ở thời điểm 3 NSKXL, đạt hiệu quả từ 20-64%. Trong đó, NT Ma_RN-ST cho hiệu lực diệt sùng khá cao đạt 64% và không khác biệt ý nghĩa so với NT Ma_SXL-TV (đạt 54,3%). Tuy nhiên, hiệu lực diệt sùng có sự khác biệt so với các NT còn lại ở mức ý nghĩa 1%. Các NT Ma_SXL-TV, Ma_BD-KG, Ma_RB-CT có hiệu lực diệt sùng lần lượt là 54,3%, 51,6%, 42,9% không khác biệt ý nghĩa. Cả 3 NT trên đều khác biệt ý nghĩa so với 2 NT Ma_RĐV-ST (20,0%) và Ma_SKL-VL (27,3%).

Tại thời điểm 4 NSKXL, hiệu lực gây chết sùng ở các NT xử lý nấm tăng lên rất cao, dao động từ 92,8-97,3% và không khác biệt ý nghĩa.

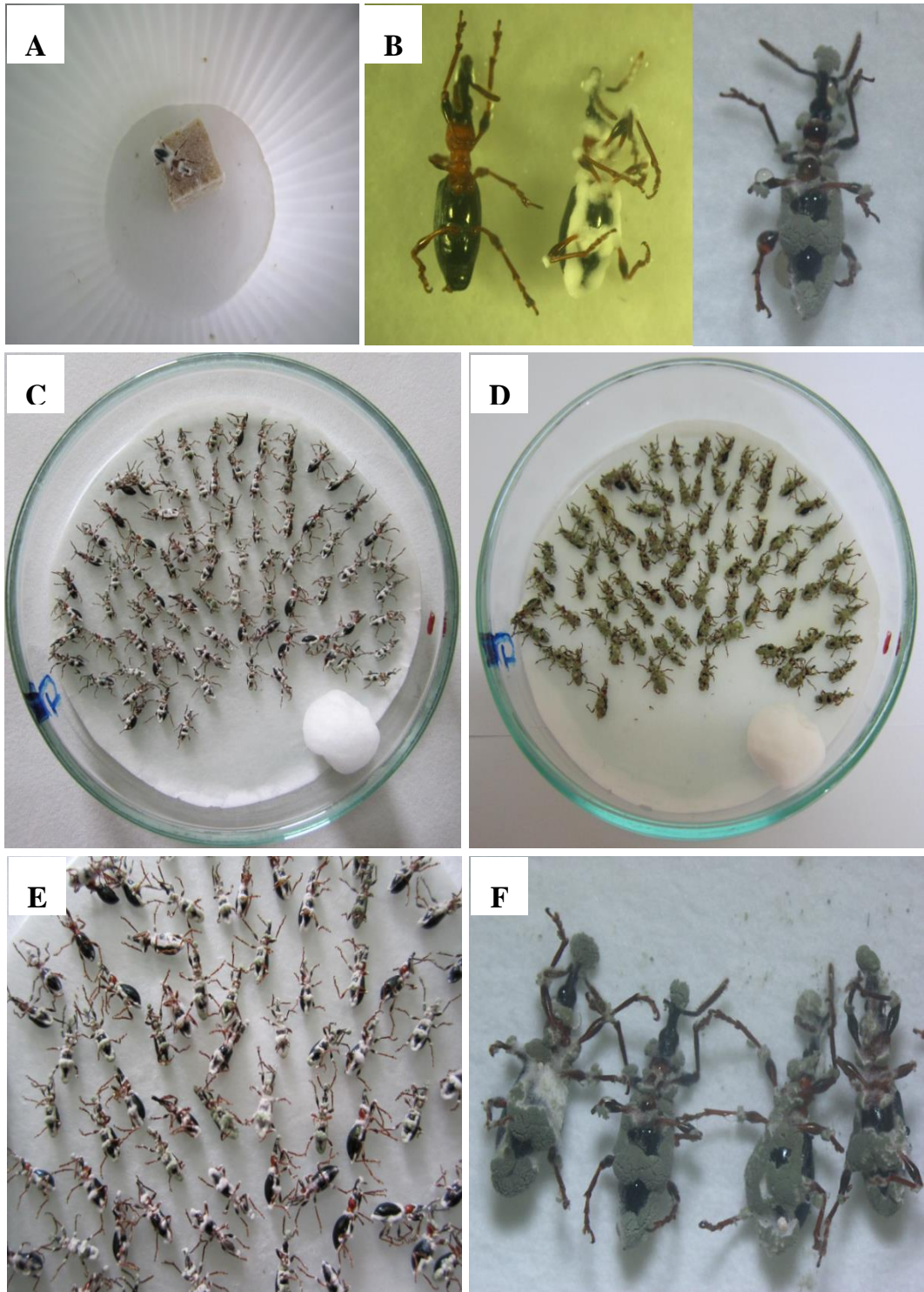
Đến thời điểm 5 NSKXL, hiệu lực gây chết sùng của các NT xử lý nấm tiếp tục tăng lên, dao động từ 96,5-100%. Trong đó, các NT Ma_SXL-TV,

Ma_RDV-ST, Ma_BD-KG, Ma_SAT-CT có hiệu lực đạt trên 98%. Các NT xử lý nấm đều không khác biệt ý nghĩa thống kê.

Tóm lại, qua các thời điểm quan sát cho thấy các MPL *Metarhizium* đều cho hiệu quả diệt sùng cao và tương đương nhau. Các MPL có hiệu lực đạt trên 96% sau 5 ngày xử lý. Thời gian từ 4-5 NSKXL thì hiệu lực diệt sùng tăng không đáng kể. Do đó, việc đánh giá kết quả có thể kết thúc ở thời điểm 4 NSKXL.



Hình 4.24: Các MPL nấm *Metarhizium* ký sinh gây chết thành trùng SKL trong điều kiện phòng thí nghiệm, năm 2011



Hình 4.25: Kết quả xử lý nấm *Metarhizium* trên thành trùng SKL trong điều kiện phòng thí nghiệm, năm 2011

A, C và E: Thành trùng SKL bị nấm ký sinh ở thời điểm 5 NSKXL;

B: Thành trùng SKL chết ở NT đối chứng và NT có xử lý nấm;

D và F: Thành trùng SKL bị nấm ký sinh ở thời điểm 7 NSKXL

4.3.4 Khảo sát hiệu lực gây chết của chủng nấm xanh (*Ma*) ở các mật số bào tử khác nhau đối với thành trùng SKL trong điều kiện PTN

Kết quả ở Bảng 4.23 cho thấy ở điều kiện nhiệt độ phòng (trung bình là 30°C) các NT nấm xanh đều cho khả năng gây chết SKL trong điều kiện phòng thí nghiệm từ thời điểm 3 NSKC và hiệu lực gây chết sùng tăng dần về sau.

Bảng 4.23: Hiệu lực gây chết của các mật số bào tử nấm xanh (*Ma*) đối với thành trùng sùng khoai lang trong điều kiện phòng thí nghiệm, năm 2012

Nhiệt độ: 30,2°C; ẩm độ: 75,5%

Nghiệm thức	Độ hữu hiệu (%) của nấm xanh vào các NSKC					
	3	5	7	9	11	13
<i>Ma</i> -10 ⁹	80,46 ^a	100,0 ^a	100,0 ^a	100,0 ^a	100,0 ^a	100,0 ^a
<i>Ma</i> -10 ⁸	50,57 ^b	92,45 ^b	100,0 ^a	100,0 ^a	100,0 ^a	100,0 ^a
<i>Ma</i> -10 ⁷	36,78 ^b	93,68 ^{ab}	94,77 ^a	97,33 ^a	98,67 ^a	98,67 ^a
<i>Ma</i> -10 ⁶	22,99 ^c	53,51 ^c	78,03 ^b	85,59 ^b	86,87 ^b	88,21 ^b
Đối chứng	0,00 ^d	0,00 ^d	0,00 ^c	0,00 ^c	0,00 ^c	0,00 ^c
CV (%)	9,52	9,69	8,17	7,84	6,74	5,97
Mức ý nghĩa	**	**	**	**	**	**

Các số trong cùng một cột có chữ theo sau giống nhau thì không khác biệt nhau qua phân tích thống kê và kiểm định Duncan. NSKC: Ngày sau khi chủng nấm. **: khác biệt ở mức ý nghĩa 1%.

Ở thời điểm 3 NSKC, hiệu lực gây chết SKL tỉ lệ thuận với các mật số bào tử nấm xanh, thể hiện qua hiệu lực của NT *Ma*-10⁶ (22,99%), *Ma*-10⁷ (36,78%), *Ma*-10⁸ (50,57%) và cao nhất ở *Ma*-10⁹ (80,46%) có sự khác biệt ý nghĩa. Ở thời điểm này, các mật số bào tử nấm xanh ảnh hưởng rõ rệt thể hiện qua hiệu lực gây chết đối với SKL.

Ở thời điểm 5 NSKC, hiệu lực gây chết SKL ở cả 4 NT đều gia tăng. Trong đó, NT *Ma*-10⁹ đạt tối đa 100%, cả 3 NT *Ma*-10⁹, *Ma*-10⁸, *Ma*-10⁷ cho hiệu lực gần tương đương nhau và cùng khác biệt ý nghĩa so với NT *Ma*-10⁶ chỉ đạt 53,51%.

Ở thời điểm 7 NSKC, hiệu lực gây chết SKL ở NT *Ma*-10⁸ tăng lên đạt 100%, hiệu lực thấp nhất vẫn là NT *Ma*-10⁶ (78,03%). Ba NT *Ma*-10⁹, *Ma*-10⁸, *Ma*-10⁷ cho hiệu lực cao tương đương nhau, không khác biệt từ 7 NSKC về sau và cùng khác biệt so với NT *Ma*-10⁶ có hiệu lực tăng chậm đến 13 NSKC đạt 88,21% thấp nhất.

Tóm lại, cả 4 NT nấm xanh đều có khả năng gây chết SKL trong điều kiện PTN, hiệu lực gây chết sùng ở các NT từ 10^7 tới 10^9 bào tử/ml cao tương đương nhau từ 7 NSKC, trong đó NT *Ma-10⁷* có hiệu lực tăng chậm hơn.

Kết quả Bảng 4.24 cho thấy ở điều kiện nhiệt độ 25°C các NT nấm xanh đều cho hiệu quả gây chết SKL tăng dần lên cao và có khác biệt ý nghĩa 5%.

Bảng 4.24: Độ hữu hiệu (%) của các nồng độ bào tử nấm xanh (*Ma*) đối với thành trùng SKL ở điều kiện nhiệt độ 25°C trong phòng thí nghiệm, năm 2012

Nhiệt độ: 25°C; ẩm độ: 56,4%

Nghiệm thức	Độ hữu hiệu (%) của nấm xanh vào các NSKC					
	3	5	7	9	11	13
<i>Ma-10⁹</i>	27,3 ^a	92,0 ^a	98,9 ^a	98,7 ^a	100 ^a	100 ^a
<i>Ma-10⁸</i>	21,6 ^a	69,4 ^b	96,4 ^a	98,7 ^a	100 ^a	100 ^a
<i>Ma-10⁷</i>	6,7 ^{bc}	29,1 ^c	63,2 ^b	66,0 ^b	85,3 ^b	89,2 ^b
<i>Ma-10⁶</i>	13,6 ^{ab}	33,9 ^c	70,3 ^b	75,7 ^b	83,0 ^b	83,8 ^b
Đôi chứng	0,00 ^d	0,00 ^d	0,00 ^c	0,00 ^c	0,00 ^c	0,00 ^c
CV(%)	25,5	16,8	14,7	16,6	11,4	11,3
Mức ý nghĩa	*	*	*	*	*	*

Các số trong cùng một cột có chữ theo sau giống nhau thì không khác biệt nhau qua phân tích thống kê và kiểm định Duncan. NSKC: Ngày sau khi chúng nấm. *: khác biệt ở mức ý nghĩa 5%.

Ở thời điểm 3 NSKC, hiệu lực của nấm xanh chưa thể hiện rõ sự khác biệt giữa các NT, đạt từ 6,7-27,3%, tuy nhiên có sự khác biệt so với đôi chứng. Trong đó, 2 NT *Ma-10⁸* và *Ma-10⁹* có hiệu lực đạt 21,6-27,3%, khác biệt so với NT *Ma-10⁷* (6,7%).

Ở thời điểm 5 NSKC, các NT nấm xanh đều cho hiệu lực tăng lên khá nhanh và khác biệt ý nghĩa 5%, đạt từ 29,1-92%. Trong đó, NT *Ma-10⁹* cho hiệu lực tăng lên cao nhất, đạt 92%. Kế đến là *Ma-10⁸* cho hiệu lực đạt thấp hơn (69,4%). Cả 2 NT trên cùng khác biệt so với 2 NT còn lại cho hiệu lực thấp tương đương nhau, đạt từ 29,1-33,9%.

Ở thời điểm 7 và 9 NSKC, 2 NT *Ma-10⁹* và *Ma-10⁸* cho hiệu lực tăng lên cao, đạt trên 96%, tương đương nhau và cùng khác biệt ý nghĩa so với 2 NT còn lại. Mặc dù, 2 NT này có hiệu lực tăng lên rất nhanh, gấp đôi so với thời điểm trước đó, dao động từ 63,2-75,7%, tương đương nhau. Sau khi chùng 1 tuần thì nấm xanh (*Ma*) cho hiệu lực gây chết sùng tăng lên rất cao ở mật số từ 10^8 bào tử/ml trở lên.

Ở thời điểm 11 và 13 NSKC, các NT nấm xanh cho hiệu lực tăng lên chậm hơn so với thời điểm trước đó. NT $Ma-10^8$ và $Ma-10^9$ có hiệu lực đạt tối đa (100%) cũng khác biệt so với 2 NT còn lại, đạt từ 83-89,2%.

Tóm lại, ở điều kiện nhiệt độ 25°C , 2 NT $Ma-10^8$ và $Ma-10^9$ bào tử/ml cho hiệu lực gây chết sùng rất cao và nhanh so với 2 NT còn lại.

Kết quả 2 thí nghiệm trên cho thấy ở điều kiện nhiệt độ 25°C và 30°C trong PTN thì hiệu lực gây chết sùng gần giống nhau, trong đó 2 NT $Ma-10^8$ và $Ma-10^9$ bào tử/ml cho hiệu lực rất cao và nhanh hơn so với 2 NT còn lại. Do nấm xanh phát triển thích hợp ở khoảng nhiệt độ này, nên cho hiệu lực ký sinh gây chết sùng cao. Nhiệt độ là yếu tố quan trọng cho sự sinh trưởng và phát triển của nấm xanh *M. anisopliae*, nhiệt độ tối ưu thích hợp cho nấm phát triển là $25-30^{\circ}\text{C}$ (Phạm Thị Thùy, 2004; Trần Văn Mão, 2002). Kết quả trên hoàn toàn phù hợp với kết quả ghi nhận của Huỳnh Thị Ngọc Linh (2010); Bùi Thị Ngọc Liễu (2010) và Bùi Cẩm Thu (2011). Với khả năng thích nghi này thì việc ứng dụng nấm xanh (*Ma*) trong phòng trừ sinh học ở vùng ĐBSCL là rất thuận lợi, vì có điều kiện khí hậu nhiệt đới, thời tiết nóng ẩm, góp phần tạo điều kiện thuận lợi cho nguồn nấm xanh (*Ma*) ký sinh phát triển tốt và lưu tồn trên đồng ruộng, làm giảm bớt côn trùng gây hại khi tiếp xúc với bào tử nấm. Mặt khác, việc sản xuất nấm xanh có mật số 10^8 bào tử/ml dễ dàng và đơn giản hơn.

4.3.5 Khảo sát khả năng ký sinh của nấm xanh (*Ma*) trong quần thể SKL qua các hình thức xử lý khác nhau trong PTN

Kết quả khảo sát khả năng ký sinh gây chết thành trùng SKL của nấm xanh (*Ma*) qua các hình thức xử lý khác nhau thể hiện ở Bảng 4.25. NT dạng nấm tươi có khả năng gây chết thành trùng SKL cao và nhanh hơn so với dạng bột khô trong điều kiện phòng thí nghiệm.

Ở thời điểm 3 NSKXL, cả 4 NT có tỉ lệ sùng chết đều thấp, dao động từ 2,67-10,67%, gần như không có khác biệt thống kê ở mức ý nghĩa 1%.

Ở thời điểm 6 NSKXL, NT nấm tươi kết hợp rãi có tỉ lệ sùng chết tăng rất nhanh, đạt cao nhất là 79,11% và khác biệt có ý nghĩa so với các NT còn lại. Kế đến là NT nấm tươi kết hợp phun có tỉ lệ sùng chết tăng lên mức trung bình (đạt 49,56%). Tới thời điểm này, khả năng gây chết SKL của 2 NT dạng bột khô vẫn rất thấp (< 10%) và chưa thể hiện rõ khác biệt so với đối chứng.

Thời điểm 9 NSKXL, tỉ lệ sùng chết ở cả 4 NT đều gia tăng. Trong đó, 2 NT nấm tươi kết hợp rãi (đạt 98,67%) và nấm tươi kết hợp phun (đạt 87,56%).

Tỉ lệ sùng chết ở 2 NT nấm bột khô kết hợp rãi và phun đều tăng chậm, lần lượt là 17,48% và 15,78%, khác biệt có ý nghĩa so với đối chứng.

Thời điểm 12 NSKXL, tỉ lệ sùng chết ở 2 NT nấm tươi kết hợp rãi và phun gia tăng trên 97% tương đương nhau. Tại thời điểm này, khả năng gây chết sùng ở 2 NT bột khô kết hợp rãi và phun có gia tăng nhưng vẫn còn thấp, lần lượt là 42,67% và 32,44%.

Khả năng gây chết SKL ở NT nấm tươi kết hợp phun cũng đạt tỉ lệ 100% tại thời điểm 15 NSKXL. Tại thời điểm này, tỉ lệ sùng chết ở NT nấm bột khô kết hợp phun vẫn thấp nhất (đạt 57,11%) và khác biệt ý nghĩa với so các NT còn lại. Tỉ lệ sùng chết ở 2 NT nấm bột khô kết hợp rãi và phun tiếp tục gia tăng và đạt 100% ở thời điểm 24 NSKXL.

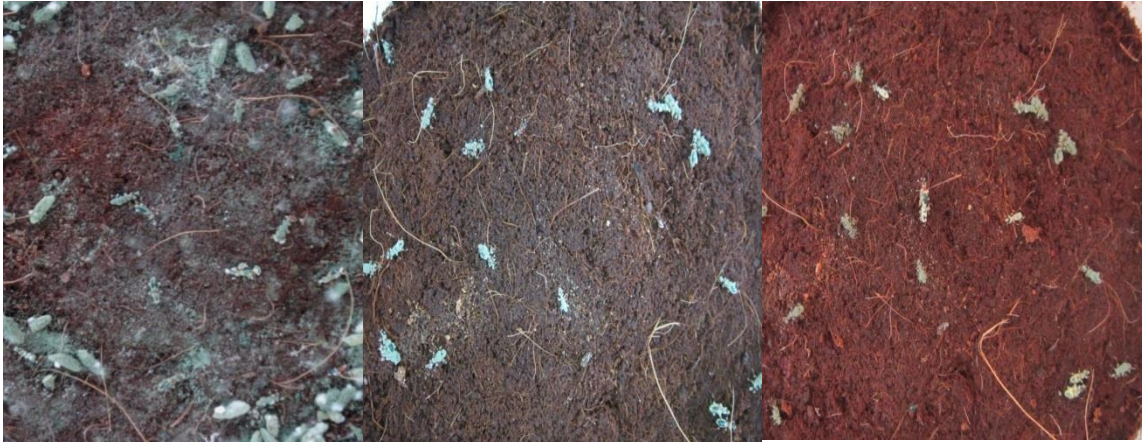
Tóm lại, nấm xanh dạng nấm tươi có khả năng ký sinh gây chết SKL cao và nhanh hơn so với dạng bột khô, tỉ lệ sùng chết gia tăng nhanh và đạt 100% từ 12 NSKXL. Còn dạng bột khô có tỉ lệ sùng chết tăng chậm tới 24 NSKXL đạt 100%. Nấm xanh với hình thức xử lý là rãi nấm có ưu thế nhanh hơn so với phun nấm, thể hiện qua tỉ lệ chết cao và nhanh hơn, sự khác biệt này thể hiện ở giai đoạn đầu. Có thể do hình thức rãi nấm, các cá thể SKL dễ dàng tiếp xúc với bào tử nấm trên bề mặt giá thể lớp mụn sơ dừa; với hình thức phun nấm, bào tử nấm hòa lẫn vào nước và thấm vào lớp mụn sơ dừa nên khó tiếp xúc với các cá thể SKL hơn.

Kết quả trên cũng cho thấy dạng nấm tươi có hoạt lực sinh học cao hơn so với dạng bột khô. Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu của Trần Nam Dương (2010), trong điều kiện nhà lưới khi phun chế phẩm nấm xanh dạng nấm tươi cho hiệu lực ký sinh trên rầy đầu vàng hại mía đạt 73,3% cao hơn so với dạng bột khô đạt hiệu lực 55,9% ở thời điểm 12 NSKXL.

Bảng 4.25: Khả năng ký sinh của nấm xanh (*Ma*) đối với sùng khoai lang qua các hình thức xử lý khác nhau trong điều kiện phòng thí nghiệm
Nhiệt độ: 30,4⁰C; ẩm độ: 73,7%

Nghiệm thức	Tỉ lệ (%) sùng chết theo thời gian vào các ngày sau khi xử lý nấm (NSKXL)							
	3	6	9	12	15	18	21	24
Dạng nấm tươi + rãi	10,67 ^a	79,11 ^a	98,67 ^a	100 ^a	100 ^a	100 ^a	100 ^a	100 ^a
Dạng nấm tươi + phun	4,44 ^{ab}	49,56 ^b	87,56 ^b	97,33 ^a	100 ^a	100 ^a	100 ^a	100 ^a
Nấm bột khô + rãi	4,89 ^{ab}	8,44 ^c	17,78 ^c	42,67 ^b	72,44 ^b	89,33 ^b	96,89 ^b	100 ^a
Nấm bột khô + phun	2,67 ^b	5,78 ^{cd}	15,78 ^c	32,44 ^c	57,11 ^c	82,67 ^b	96,22 ^b	100 ^a
Đối chứng	0,89 ^b	2,67 ^d	3,78 ^d	4,67 ^d	6,67 ^d	7,78 ^c	9,33 ^c	10,67 ^b
CV (%)	6,58	5,55	2,69	2,91	5,96	3,47	1,21	0,36
Mức ý nghĩa	**	**	**	**	**	**	**	**

Các số trong cùng một cột có chữ theo sau giống nhau thì không khác biệt nhau qua phân tích thống kê và kiểm định Duncan;
NSKXL: Ngày sau khi xử lý nấm xanh; **: khác biệt ở mức ý nghĩa 1%.



Rãi nấm tươi

Rãi nấm bột khô

Phun nấm vào giá thể

Hình 4.26: Sùng khoai lang bị nhiễm nấm xanh (*Ma*) qua các hình thức xử lý

4.4 Khảo sát hiệu quả ứng dụng kết hợp pheromone giới tính tổng hợp và nấm xanh (*M. anisopliae*) đối với sùng khoai lang

4.4.1 Khảo sát khả năng lây lan bệnh của sùng đực sau khi tiếp xúc với pheromone giới tính và nấm xanh trong điều kiện phòng thí nghiệm

Kết quả ở Bảng 4.26 cho thấy 2 NT dạng nấm tươi và dung dịch bào tử nấm có tỉ lệ sùng chết nhanh và cao hơn, khác biệt ý nghĩa so với dạng bột khô từ thời điểm 6 ngày sau khi xử lý (NSKXL) thả sùng đực vào quần thể sùng (30 con) trong hộp nhựa.

Ở thời điểm 6, 9, 12 NSKXL, tỉ lệ sùng chết tăng dần theo thời gian và có khác biệt ý nghĩa giữa các NT, trong đó tỉ lệ chết tăng nhanh ở NT nấm tươi đạt cao nhất (78,92%) và kế đến là NT dung dịch đạt 64,09%, thấp nhất là NT dạng bột khô chỉ đạt 14,19% rất thấp, tăng chậm và khác biệt ý nghĩa so với đối chứng (7,53%).

Từ thời điểm 15 NSKXL về sau, tỉ lệ sùng chết ở 2 NT nấm tươi và dung dịch tăng lên nhanh, cao và tương đương nhau, đạt trên 94%. Trong đó, tỉ lệ chết đạt 100% ở NT nấm tươi vào thời điểm 18 NSKXL và NT dung dịch có tỉ lệ chết tăng lên đến 24 NSKXL đạt 100%. Bên cạnh đó, khi cho sùng đực tiếp xúc với nấm dạng bột khô có tỉ lệ chết thấp hơn và tăng chậm đến 36 NSKXL đạt 99,57%. Điều này có thể do ở dạng nấm tươi, nấm xanh đang phát triển mạnh sinh ra rất nhiều bào tử trên nền cơ chất gạo sau 14 ngày nuôi cấy nên khả năng nhiều bào tử dễ dàng bám dính vào cơ thể khi sùng đực tiếp xúc với pheromone giới tính và rơi xuống đáy hộp nhựa chứa các hạt gạo phủ đầy bào tử xung quanh, giúp cho nấm lây nhiễm gây chết sùng trong quần thể dễ dàng và nhanh hơn.

Khả năng gây chết sùng ở dạng bột khô có hiệu quả gia tăng nhanh từ thời điểm 30 NSKXL về sau. Ở dạng bột khô, sùng có thể dễ dàng tiếp xúc với bào tử nấm nhưng do sùng cũng khô ráo nên bào tử khó bám dính vào cơ thể hơn. Mặt khác, trong quá trình sản xuất nấm dạng bột khô có qua công đoạn sấy khô và nghiền mịn môi trường cơ chất gạo cho nấm phát triển thành chế phẩm dạng bột khô mịn, có thể bào tử lẫn một số tạp chất, cơ chất, không còn thuần chủng, bào tử chuyển sang trạng thái tiềm sinh ngủ nghỉ, làm suy giảm hoạt lực sinh học của nấm xanh nên khả năng gây chết sùng tương đối chậm hơn so với 2 NT dạng dung dịch và nấm tươi.

Tóm lại, khi sử dụng pheromone giới tính hấp dẫn sùng đực vào bẫy và lây nhiễm nấm xanh (*Ma*) theo 3 dạng khác nhau đều cho hiệu lực gây chết SKL trong điều kiện phòng thí nghiệm. Có thể do quần thể SKL sử dụng trong thí nghiệm này được chọn ngẫu nhiên từ các củ khoai lang bị nhiễm sùng thoát ra và không phân biệt giới tính đực cái nên khả năng nấm xanh lây nhiễm trong quần thể sùng theo kiểu bắt cầu có thể xảy ra hoặc do va chạm tiếp xúc với nhau trong hoạt động hàng ngày của chúng bên trong hộp nhựa.

Như vậy, việc sử dụng pheromone giới tính kết hợp với nấm xanh cho hiệu quả gây chết SKL tăng cao. Bên cạnh đó, quy trình sản xuất chế phẩm nấm xanh (*Ma*) dạng nấm tươi tương đối đơn giản, chi phí thấp, dễ sản xuất với số lượng lớn. Do đó, sử dụng pheromone giới tính hấp dẫn sùng đực vào bẫy và lây nhiễm với dạng nấm tươi có tiềm năng triển vọng trong phòng trị SKL ở điều kiện ngoài đồng.

Nghiên cứu khác cũng đã đề cập tới hệ thống lây nhiễm tự động. Từ đó, có thể xác định tiềm năng hiệu quả của việc áp dụng bẫy pheromone giới tính được thiết kế đặc biệt thành hệ thống lây nhiễm tự động có lỗ thoát bên dưới để hấp dẫn sùng đực ngoài tự nhiên vào bẫy rồi lây nhiễm với số lượng lớn bào tử nấm *B. bassiana* bên trong bẫy và thả chúng tự do trở lại đồng ruộng. Đó là phương pháp lây nhiễm tự động của việc sử dụng côn trùng tự chúng sẽ phát tán và lây nhiễm nấm ký sinh trên quần thể côn trùng ngoài tự nhiên (Ignoffo, 1992; Furlong *et al.*, 1995).

Bảng 4.26: Tỷ lệ chết (%) của thành trùng SKL qua sự lây lan bệnh trong quần thể từ sùng đực sau khi tiếp xúc với pheromone giới tính và nấm xanh (*Ma*) trong điều kiện phòng thí nghiệm, năm 2012

Nhiệt độ: 29,7⁰C; ẩm độ: 83,3%

Nghiệm thức	Tỷ lệ (%) sùng chết theo thời gian vào các ngày sau khi xử lý (NSKXL) thả sùng vào hộp nhựa											
	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30	33	36
Nấm tươi	9,89 ^a	32,26 ^a	56,77 ^a	78,92 ^a	97,42 ^a	100 ^a	100 ^a	100 ^a	100 ^a	100 ^a	100 ^a	100 ^a
Dung dịch	6,67 ^{ab}	17,42 ^b	33,55 ^b	64,09 ^b	94,24 ^a	94,84 ^a	98,28 ^a	100 ^a	100 ^a	100 ^a	100 ^a	100 ^a
Bột khô	3,87 ^{bc}	6,88 ^c	10,32 ^c	14,19 ^c	19,35 ^b	24,95 ^b	29,03 ^b	33,12 ^b	40,00 ^b	60,42 ^b	80,00 ^b	99,57 ^a
Đối chứng	2,37 ^c	4,30 ^c	4,73 ^d	7,53 ^d	10,11 ^c	13,76 ^c	16,99 ^c	19,78 ^c	23,23 ^c	24,73 ^c	27,10 ^c	28,17 ^b
CV (%)	8,88	3,31	2,12	3,59	3,35	2,71	0,42	1,07	1,44	1,61	1,15	1,79
Mức ý nghĩa	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**

Các số trong cùng một cột có chữ theo sau giống nhau thì không khác biệt qua phân tích thống kê và kiểm định Duncan; **: khác biệt ở mức ý nghĩa 1%.

4.4.2 Khảo sát ảnh hưởng của pheromone giới tính tổng hợp và nấm xanh (*Ma*) lên khả năng sinh sản của thành trùng SKL bố mẹ trong PTN

Khảo sát ảnh hưởng pheromone giới tính tổng hợp và nấm xanh lên thời gian sống và sức sinh sản của thành trùng SKL (Bảng 4.27) cho thấy:

NT A, sùng bố mẹ bình thường có thời gian sống lâu nhất, với thời gian sống trung bình của sùng bố (98,97 ngày) và sùng mẹ (97,03 ngày) là tương đương nhau trong điều kiện bình thường. Do sùng bố mẹ sống lâu nhất, khỏe mạnh nên sinh sản ra thế hệ con nhiều nhất (9.915 con/30 cặp).

NT B, sùng bố tiếp xúc pheromone giới tính và sùng mẹ bình thường có thời gian sống ngắn hơn so với đối chứng (A), thời gian sống trung bình của sùng bố (87,37 ngày) và sùng mẹ (90,03 ngày) gần tương đương nhau. Do sùng bố mẹ có thời gian sống ngắn hơn và số lượng con sinh ra của từng đợt quan sát chênh lệch ít hơn dẫn đến thế hệ con sinh ra cũng thấp hơn (7.636 con/30 cặp) và tỉ lệ sức sinh sản của sùng bố mẹ giảm so với đối chứng là 22,98%. Do sự chênh lệch về thời gian sống của sùng bố mẹ và sùng con sinh ra không nhiều so với đối chứng nên sức sinh sản giảm tương đối ít, rất thấp so với các NT còn lại. Có thể do sùng bố bị hấp dẫn bởi pheromone giới tính và bắt cặp với môi (ống cao su non chứa pheromone) làm thay đổi sinh lý trong cơ thể sùng bố là nguyên nhân ảnh hưởng tới khả năng sinh sản của sùng bố mẹ.

NT C và D, sùng bố tiếp xúc pheromone giới tính và nấm xanh (dung dịch và nấm tươi) với sùng mẹ bình thường có thời gian sống rất ngắn và khác biệt ý nghĩa so với đối chứng (A) và NT B. Thời gian sống trung bình của sùng bố (10,8 và 10,2 ngày) và sùng mẹ (18,7 và 17,1 ngày) gần tương đương nhau. Thời gian sống giảm xuống rất nhiều so với đối chứng. Do sùng bố mẹ có thời gian sống rất ngắn và số lượng con sinh ra chủ yếu ở đợt 1 (15 ngày đầu tiên) dẫn đến thế hệ con sinh ra rất thấp (996 và 742 con/30 cặp) và khả năng sinh sản của sùng bố mẹ giảm rất nhiều so với đối chứng (tỉ lệ giảm là 89,95% và 92,51%). Do sự chênh lệch rất nhiều về thời gian sống của sùng bố mẹ và sùng con sinh ra so với đối chứng nên tỉ lệ sức sinh sản giảm rất nhiều, chênh lệch rất cao so với NT B (22,98%). Thời gian sống của sùng cái ngắn lại sau khi bị nhiễm nấm có thể là nguyên nhân gây ảnh hưởng bất lợi lên tổng số sùng con được sinh ra (Rana and Vallacarlos, 1991). Có thể do sùng bố bị hấp dẫn bởi pheromone giới tính và tiếp xúc với nấm xanh, bào tử nấm sẽ dính vào bàn chân sùng bố, sau đó sùng bố tiếp xúc, bắt cặp với sùng mẹ, có thể bào tử nấm lây lan theo kiểu

bắt cầu, khi bào tử nấm xâm nhập vào bên trong cơ thể sùng, làm thay đổi sinh lý trong cơ thể sùng bố mẹ là nguyên nhân ảnh hưởng tới thời gian sống và khả năng sinh sản của sùng bố mẹ. Sùng cái dường như bị nhiễm nấm thông qua sự bắt cặp với sùng đực bị nhiễm nấm (Yasuda, 1999; Yasuda, 2000). NT đối chứng (không xử lý nấm) thì sùng cái đẻ trứng nhiều hơn so với sùng cái bị nhiễm nấm, là tác nhân ký sinh gây bệnh và sự xâm nhiễm của nấm vào cơ thể sùng sẽ làm giảm khả năng ăn và sinh sản của thành trùng SKL (Ondiaka *et al.*, 2008).

NT E và F, sùng bố chỉ đơn thuần tiếp xúc với nấm xanh (dung dịch và nấm tươi) và sùng mẹ bình thường có thời gian sống rất ngắn và khác biệt ý nghĩa so với đối chứng (A) và NT B, trong đó NT F không khác biệt so với NT C và D, tuy nhiên cũng khác biệt so với NT E cao hơn. Thời gian sống trung bình của sùng bố (11,7 và 10,1 ngày) và sùng mẹ (21,3 và 17,2 ngày) có khác biệt ý nghĩa giữa 2 NT này, thời gian sống giảm xuống rất thấp (sùng mau chết) so với đối chứng. Do sùng bố mẹ có thời gian sống rất ngắn và số lượng con sinh ra chủ yếu ở đợt 1 (15 ngày đầu tiên) dẫn đến thế hệ con sinh ra rất thấp (1.532 và 729 con/30 cặp) và khả năng sinh sản của sùng bố mẹ giảm rất nhiều so với đối chứng (tỉ lệ giảm là 84,54% và 92,64%). Do sự chênh lệch rất nhiều về thời gian sống của sùng bố mẹ và sùng con sinh ra so với đối chứng nên sức sinh sản giảm rất nhiều, chênh lệch rất cao so với NT B. Lý do giải thích cũng tương tự như NT C và D.

Nhìn chung, sùng đực chỉ đơn thuần tiếp xúc với pheromone giới tính tổng hợp (NT B) có thời gian sống của sùng bố mẹ ngắn hơn và số lượng sùng con sinh ra ít hơn so với bình thường. Đây cũng là lợi thế của pheromone giới tính giúp làm giảm thế hệ sùng con sinh ra. Nếu như xét trên quần thể lớn, mật số sùng đông thì sự sụt giảm thế hệ con sinh ra rất ý nghĩa làm giảm bớt quần thể sùng trong tự nhiên.

Các NT sùng đực có tiếp xúc với nấm xanh (C, D, E, F) thì nguyên nhân chủ yếu gây chết sùng chính là nhân tố nấm xanh. Trong đó, 2 NT C và D có pheromone giới tính hấp dẫn sùng đực tới bẫy và lây nhiễm nấm xanh dễ dàng, sau đó chúng mang nguồn bệnh này tìm bắt cặp với sùng cái và lây nhiễm bệnh theo kiểu bắt cầu, sau thời gian bị nấm xanh ký sinh gây bệnh thì cơ thể sùng kiệt sức và chết nhanh hơn bình thường. Cho thấy vai trò của nấm xanh là tác nhân phòng trừ sinh học rất ý nghĩa, có thể gây chết côn trùng theo tiêu chí an toàn thay thế cho thuốc trừ sâu hóa học, có khả năng lây nhiễm bệnh giữa các cá thể trong cùng quần thể. Tuy nhiên, giữa 2 dạng nấm xanh thí nghiệm thì dạng nấm tươi có ưu thế trội hơn so với dạng

dung dịch, phù hợp với kết quả khảo sát khả năng lây lan bệnh trong quần thể từ sùng đực tiếp xúc với pheromone giới tính và nấm xanh (Bảng 4.26).

Bảng 4.27: Ảnh hưởng của pheromone giới tính và nấm xanh lên số lượng sùng con và thời gian sống của sùng bố mẹ trong điều kiện phòng thí nghiệm, năm 2013

Nhiệt độ: 30,91⁰C; ẩm độ: 73,42%

Nghiệm thức	Tổng số sùng con thoát ra (con/30 cặp)	Tỉ lệ sùng sinh sản giảm so với đối chứng (%)	Thời gian sống sùng bố mẹ (ngày)	
			Sùng bố	Sùng mẹ
A	9.915 ^a	-	98,9 ± 3,7 ^a	97,0 ± 3,3 ^a
B	7.636 ^b	22,98	87,3 ± 3,0 ^b	90,0 ± 3,9 ^b
C	996 ^d	89,95	10,8 ± 2,6 ^d	18,7 ± 4,6 ^d
D	742 ^d	92,51	10,2 ± 1,3 ^d	17,1 ± 4,8 ^d
E	1.532 ^c	84,54	11,7 ± 2,9 ^c	21,3 ± 5,0 ^c
F	729 ^d	92,64	10,1 ± 1,4 ^d	17,2 ± 4,8 ^d
CV (%)	6,96		1,40	3,11
Mức ý nghĩa	**		**	**

Trong cùng một cột, các số có cùng chữ theo sau giống nhau thì không khác biệt thống kê ở mức ý nghĩa 1% qua kiểm định Duncan.

A: Đối chứng chứa 1 củ khoai + 1 TT đực và 1 TT cái bình thường (TT: thành trùng)

B: 1 củ khoai + 1 TT cái và 1 TT đực tiếp xúc pheromone.

C: 1 củ khoai + 1 TT cái và 1 TT đực tiếp xúc pheromone và nấm xanh dạng dung dịch.

D: 1 củ khoai + 1 TT cái và 1 TT đực tiếp xúc pheromone và nấm xanh dạng nấm tươi.

E: 1 củ khoai + 1 TT cái và 1 TT đực tiếp xúc nấm xanh dạng dung dịch.

F: 1 củ khoai + 1 TT cái và 1 TT đực tiếp xúc nấm xanh dạng nấm tươi.

Kết quả ở Bảng 3.28 cho thấy cụ thể số lượng sùng con thoát ra từ các cặp sùng bố mẹ ở các NT trong khảo sát này.

Tổng cộng số lượng sùng con sinh ra từ 30 cặp sùng bố mẹ ở NT A (đối chứng) là cao nhất (9.915 con), tỉ lệ giới tính đực:cái của thể hệ con (1:1) tương đương nhau. Kế đến là NT B (7.636 con), tỉ lệ đực:cái (1:1,04) gần tương đương. NT C, D, E, F do có tác động của nấm xanh (dung dịch và nấm tươi) làm cho thời gian sống của sùng bố mẹ ngắn hơn nên số lượng sùng con sinh ra ít hơn so với đối chứng (A) (tương ứng là 996, 742, 1.532, 967 con), tỉ lệ đực:cái (dao động từ 1:1,09 tới 1:1,29) có sự chênh lệch về tỉ lệ giới tính, con cái luôn cao hơn con đực. Nhận thấy khi sùng bố mẹ bị nhiễm nấm xanh thì thể hệ sùng con sinh ra có khuynh hướng chênh lệch về phía sùng cái nhiều hơn. Điều này cũng phù hợp với nghiên cứu của Yasuda (1999) ghi nhận ở ruộng có xử lý nấm ký sinh thì tỉ lệ giới tính của quần thể SKL bị lệch nhiều về phía con cái.

Bảng 4.28: Số lượng sùng con thoát ra từ các cặp sùng bố mẹ theo thời gian trong điều kiện phòng thí nghiệm, năm 2013

Nhiệt độ: 30,91⁰C; ẩm độ: 73,42%

Đợt	NT	A		B		C		D		E		F	
		Đực	Cái	Đực	Cái	Đực	Cái	Đực	Cái	Đực	Cái	Đực	Cái
1		883	838	753	779	435	561	342	400	737	795	462	505
2		864	857	676	690	0	0	0	0	0	0	0	0
3		927	898	819	835	0	0	0	0	0	0	0	0
4		886	886	510	530	0	0	0	0	0	0	0	0
5		710	764	506	542	0	0	0	0	0	0	0	0
6		686	716	484	512	0	0	0	0	0	0	0	0
Tổng cộng (con/30 cặp)		4.956	4.959	3.748	3.888	435	561	342	400	737	795	462	505
		9.915		7.636		996		742		1.532		967	
TB số lượng sùng con thoát ra (con/cặp)		330,5		254,5		33,2		24,7		51,1		32,2	

Mỗi đợt thay củ khoai lang mới cách nhau là 15 ngày/lần. NT: nghiệm thức

A: Đối chứng chứa 1 củ khoai + 1 TT cái và 1 TT đực bình thường.

B: 1 củ khoai + 1 TT cái và 1 TT đực tiếp xúc pheromone.

C: 1 củ khoai + 1 TT cái và 1 TT đực tiếp xúc pheromone và nấm xanh dạng dung dịch.

D: 1 củ khoai + 1 TT cái và 1 TT đực tiếp xúc pheromone và nấm xanh dạng nấm tươi.

E: 1 củ khoai + 1 TT cái và 1 TT đực tiếp xúc nấm xanh dạng dung dịch.

F: 1 củ khoai + 1 TT cái và 1 TT đực tiếp xúc nấm xanh dạng nấm tươi.

Mặt khác, khi quan sát số lượng sùng con sinh ra ở từng đợt thay củ khoai mới (15 ngày/lần) nhận thấy NT A và B đủ 6 đợt có sùng con sinh ra, NT A có số lượng sùng con luôn cao hơn so với NT B, chênh lệch từng đợt là 189, 355, 171, 732, 438, 406 con, số lượng sùng con có khuynh hướng giảm dần từ đợt 3 trở về sau, có thể giải thích về mặt sinh lý khi sùng bố bị hấp dẫn bởi pheromone giới tính, cảm thấy rất hưng phấn và bắt cặp với cục môi đã giải phóng bớt một lượng tinh trùng nên khả năng thụ tinh cho con cái sẽ giảm hơn so với con đực bình thường, do nguồn sùng bố mẹ được chọn thoát ra từ củ khoai bị nhiễm sùng và chưa bắt cặp lần nào. Như vậy, khi sùng đực bị hấp dẫn và tiếp xúc với môi pheromone giới tính dù chỉ 1 lần mà không cần giết chết, có thể giúp làm giảm thể hệ sùng con sinh ra, quần thể sùng sẽ giảm dần trong tự nhiên, phát hiện ra điều này rất ý nghĩa trong thực tiễn.

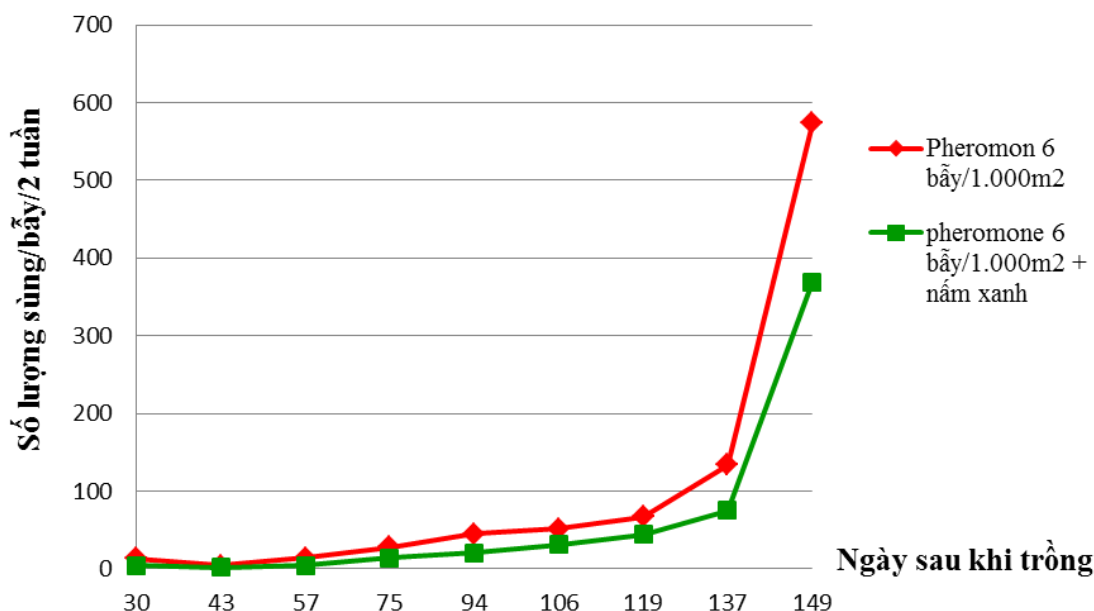
Kết quả trên chứng tỏ nấm xanh có thể lan truyền thông qua sự tiếp xúc giữa các cá thể và sự lây nhiễm bằng cách thông qua sự hấp dẫn của

môi pheromone giới tính và tiếp xúc với nấm xanh đều ảnh hưởng làm giảm thời gian sống của sùng bố mẹ rất nhiều và sự nhiễm bệnh cũng ảnh hưởng tới sức khỏe và khả năng sinh sản của sùng bố mẹ, có thể là nguyên nhân chính dẫn đến sụt giảm số lượng sùng con sinh ra. Cho thấy vai trò của nấm xanh ký sinh gây bệnh côn trùng và là tác nhân phòng trừ sinh học hiệu quả.

4.4.3 Khảo sát hiệu quả của pheromone giới tính tổng hợp kết hợp với nấm xanh (*Ma*) phòng trị SKL tại huyện Bình Tân, Vĩnh Long

4.4.3.1 Diễn biến mật số sùng khoai lang trên ruộng thí nghiệm

Diễn biến mật số SKL (Hình 4.27) ở NT sử dụng pheromone giới tính luôn cao hơn so với NT pheromone và nấm xanh qua các thời điểm quan sát. Tuy nhiên, qui luật biến động quần thể ở cả 2 NT này là chậm và tăng đột biến ở cuối vụ. Từ đầu vụ đến 1 tháng trước khi thu hoạch (119 NSKT), số lượng sùng tăng chậm theo thời gian và thấp dưới 70 con/bẫy/2 tuần. Sau đó, số lượng sùng vào bẫy tăng lên rất nhanh, nhất là vào giai đoạn 15 ngày trước thu hoạch (từ 137-149 NSKT). Số lượng sùng vào bẫy tăng lên 369 con/bẫy/2 tuần ở NT pheromone và nấm xanh, còn NT chỉ sử dụng pheromone là 573 con/bẫy/2 tuần. Kết quả này cho thấy việc sử dụng nấm xanh kết hợp rãi vào đầu vụ (3 NSKT) và phun nấm 3 lần vào các thời điểm 50, 70 và 90 NSKT có hiệu quả giảm mật số sùng trội hơn so với NT chỉ áp dụng bẫy pheromone.



Hình 4.27: Diễn biến mật số sùng khoai lang trên ruộng thí nghiệm tại huyện Bình Tân, tỉnh Vĩnh Long, năm 2011

4.4.3.2 Tỷ lệ gây hại của sùng khoai lang trên củ khoai

Kết quả ở Bảng 4.29 ghi nhận tỉ lệ sùng gây hại trong thí nghiệm trên giống khoai lang Tím Nhật. Ở thời điểm 2,5 tháng SKT, 3 NT A, B và C đều không thấy sự gây hại của sùng ở bên ngoài vỏ và trong củ khoai lang.

Bảng 4.29: Tỷ lệ củ khoai Tím Nhật bị sùng gây hại ở 3 thời điểm sau khi trồng tại xã Thành Đông, huyện Bình Tân, tỉnh Vĩnh Long, năm 2011

Thời điểm quan sát	Nghiệm thức	Số củ quan sát	TL củ (g)	Tỷ lệ (%) củ bị hại	
				Ngoài vỏ	Trong củ
2,5 tháng	A	276	31,95	0	0
	B	250	32,66	0	0
	C	175	32,35	0	0
3,5 tháng	A	252	55,46	0	0
	B	243	58,24	0,5	0
	C	225	54,36	0	0
4,5 tháng	A	238	75,62	0,35	0
	B	227	87,84	0,82	0,42
	C	132	81,35	0	0
Khi thu hoạch (5tháng)	A	195	89,26	0	0
	B	219	100,31	0	0
	C	191	92,42	0	0

Nghiệm thức A: đặt 6 bẫy pheromone/1.000m²; Nghiệm thức B: Nấm xanh + đặt 6 bẫy pheromone/1.000m²; Nghiệm thức C: Đối chứng (theo nông dân); TL: Trọng lượng củ

Ở thời điểm 3,5 tháng SKT, NT A và C đều không thấy sự gây hại của sùng cả bên ngoài vỏ và trong củ khoai. Riêng NT B ghi nhận có sự gây hại của sùng ở ngoài vỏ củ, nhưng tỉ lệ không đáng kể (0,5%).

Ở thời điểm 4,5 tháng SKT, ghi nhận NT A có tỉ lệ củ bị hại là 0,33% (ngoài vỏ) và 0% (trong củ), NT B có tỉ lệ là 0,82% (ngoài vỏ) và 0,42% (trong củ). NT đối chứng (xử lý sùng theo cách của nông dân) vẫn không thấy sùng gây hại cả bên ngoài vỏ và trong củ khoai lang.

Ở thời điểm 5 tháng SKT (khi thu hoạch), các NT đều không ghi nhận được sự gây hại của sùng cả bên ngoài vỏ và trong củ khoai lang.

Tóm lại, qua 4 đợt quan sát nhận thấy hầu như rất ít (NT A và B) hoặc không có thiệt hại (NT C) do sùng trên củ khoai. Kết quả này cho thấy việc áp dụng bẫy pheromone giới tính đơn thuần hoặc kết hợp với nấm xanh có khả năng thay thế dần cho việc sử dụng thuốc trừ sâu hóa học để quản lý sự gây hại của SKL trên giống khoai Tím Nhật tại huyện Bình Tân, tỉnh Vĩnh Long.

4.4.4 Khảo sát hiệu quả của pheromone giới tính tổng hợp kết hợp với nấm xanh (*Ma*) phòng trị SKL tại huyện Cù Lao Dung, Sóc Trăng

Kết quả ở Bảng 4.30 cho thấy bẫy pheromone giới tính tổng hợp cho hiệu quả hấp dẫn cao đối với SKL. Tổng số sùng vào bẫy của 3 NT A, B, C là 50.095 con, trung bình khoảng 11 con/bẫy/đêm. NT A với diện tích lớn nhất (6.000 m²) tương ứng với số lượng bẫy nhiều nhất (36 bẫy), tổng số sùng đực vào bẫy là nhiều nhất (28.720 con). NT B có diện tích ít hơn (3.500 m²) tương ứng với số lượng bẫy cũng ít hơn (22 bẫy) và số lượng sùng vào bẫy thấp hơn (15.385 con). NT C có diện tích nhỏ nhất (1.500 m²) tương ứng với số lượng bẫy ít nhất (8 bẫy) và số lượng sùng vào bẫy là thấp nhất (5.990 con).

Bảng 4.30: Số lượng SKL vào bẫy pheromone trên ruộng khoai Trắng Sữa tại xã An Thạnh Tây, huyện Cù Lao Dung, tỉnh Sóc Trăng, năm 2011

Nghiệm thức	Diện tích (m ²)	Số bẫy	Thời điểm NSKT (con/bẫy/đêm)				Tổng (con)
			42	63	84	TB	
(A) Pheromone	6.000	36	9,9	8,0	18,3	12,1	28.720
(B) Pheromone+Phun nấm	1.500	9	2,8	4,2	27,0	11,3	5.990
(C) Pheromone+Rãi và phun nấm	3.500	21	6,5	2,9	22,4	10,6	15.385

Quan sát số lượng sùng đực vào bẫy của 3 NT A, B, C ở 3 thời điểm 42, 63 và 84 NSKT cho thấy số sùng vào bẫy thấp ở giai đoạn đầu và tăng lên ở cuối vụ. Trung bình số lượng sùng đực vào bẫy ở 3 NT tương đương nhau, dao động từ 10,6-12,1 con/bẫy/đêm. Như vậy, sử dụng nấm xanh chưa có ảnh hưởng rõ rệt lên SKL trên ruộng thí nghiệm. Mặc dù, ruộng có xử lý nấm xanh nhưng số lượng sùng vào bẫy vẫn tăng lên về cuối vụ khi áp lực sùng tăng cao, diễn biến sùng tương tự như ruộng chỉ áp dụng pheromone. Kết quả này có thể do ảnh hưởng của điều kiện ngoại cảnh không thuận lợi cho nấm phát huy hiệu lực gây chết sùng như buổi trưa nắng nóng, buổi chiều ánh nắng có tia cực tím (UV) cũng làm ảnh hưởng lên sự sống sót của bào tử nấm. Đây là nguyên nhân làm cho nấm xanh chưa phát huy hiệu quả cao gây chết sùng ở ngoài đồng. Do đó, sự chênh lệch số lượng sùng giữa các NT không đáng kể. Trong khi đó, nấm xanh cho hiệu lực gây chết sùng rất cao trong điều kiện phòng thí nghiệm.

Kết quả ở Bảng 4.31 cho thấy ở thời điểm 2 tháng SKT, tỉ lệ củ bị sùng gây hại ở các NT A, B, C đều thấp hơn so với đối chứng cả ngoài vỏ và trong củ. Trong đó, NT A có tỉ lệ củ bị hại là 8,73% (ngoài vỏ) và 0,57% (trong củ); NT B có tỉ lệ củ bị hại ngoài vỏ và trong củ lần lượt là 16,05% và 2,62%; NT C có tỉ lệ là 19,84% và 3,01%. NT đối chứng (D) có tỉ lệ củ bị hại là 19,84% và 3,01% cao hơn các NT khác.

Bảng 4.31: Tỷ lệ củ khoai bị sùng gây hại trên giống khoai Trắng Sữa tại thời điểm 2 tháng và 2,5 tháng tại xã An Thạnh Tây, huyện Cù Lao Dung, tỉnh Sóc Trăng

Nghịệm thức	Diện tích (m ²)	Trọng lượng củ trung bình (g)	Số củ quan sát	Tỷ lệ củ bị hại (%)	
				Ngoài vỏ	Trong củ
Thời điểm 2 tháng sau khi trồng					
(A) Pheromone	6.000	61,9	216	8,7	0,6
(B) Pheromone+Phun nấm	1.500	65,1	216	16,1	2,6
(C) Pheromone+Rãi+Phun nấm	3.500	62,3	199	9,5	2,1
(D) Đối chứng	2.000	54,1	217	19,8	3,0
Thời điểm 2,5 tháng sau khi trồng					
(A) Pheromone	6.000	77,1	279	7,9	3,9
(B) Pheromone+Phun nấm	1.500	73,9	178	27,6	5,1
(C) Pheromone+Rãi+Phun nấm	3.500	71,2	196	14,1	3,8
(D) Đối chứng	2.000	56,5	202	12,5	4,4

Ở thời điểm 2,5 tháng SKT, tỷ lệ sùng gây hại ở bên ngoài vỏ ở NT A vẫn duy trì ở mức thấp hơn so với đối chứng (D). Tuy nhiên, 2 NT B và C có tỷ lệ gây hại ở ngoài vỏ có khuynh hướng tăng lên, có thể do 2 NT này cùng địa điểm và số lượng sùng vào bẫy tăng lên về cuối vụ tạo nên áp lực sùng cao hơn và khả năng gây hại cũng cao hơn. Mặt khác, có sự hiện diện của các luống khoai giâm ở xung quanh ruộng thí nghiệm, các luống khoai này được trồng để lấy hom giống, không xử lý sùng và không thu hoạch củ, có thể đây là điều kiện cho sùng lưu tồn và lây lan sang các ruộng lân cận dễ dàng hơn, góp phần làm cho tỷ lệ củ bị hại ở ruộng thí nghiệm cao hơn. Khi so sánh 2 NT B và C nhận thấy NT C với 2 hình thức rãi và phun nấm có tỷ lệ củ bị hại thấp hơn ở cả 2 thời điểm quan sát, có ưu thế hiệu quả hơn so với NT B phun nấm.

Tỷ lệ bị sùng gây hại trong củ ở các NT đều tăng lên, dao động từ 3,8-5,1%. Tuy nhiên, không có sự chênh lệch giữa các NT A, B, C so với đối chứng (D). Đến thời điểm gần thu hoạch, tỷ lệ gây hại trong củ rất thấp (chỉ khoảng 4-5%). Đây là chỉ tiêu quan trọng trong đánh giá phẩm chất củ vì phần thịt củ bị sùng gây hại thì mất phẩm chất, có vị đắng, không sử dụng được (phế phẩm). Trong khi đó, nếu như sùng gây hại bên ngoài vỏ củ có triệu chứng nhỏ li ti, chỉ làm giảm vẻ mỹ quan so với củ bình thường, nhưng còn sử dụng được. Mặt khác, NT B và C có áp lực sùng nhiều hơn NT A, tỷ lệ củ bị hại ngoài vỏ cao gấp 1,8-3,5 lần, nhưng tỷ lệ gây hại trong củ gần tương đương nhau. Kết quả này cho thấy nấm xanh cũng góp phần hạn chế bớt thiệt hại sùng trong tình hình áp lực sùng cao, tuy nhiên hiệu quả cộng hưởng giữa nấm xanh và pheromone giới tính chưa thể hiện rõ sự khác biệt giữa các NT này. Điều này chứng tỏ bẫy pheromone riêng lẻ hoặc kết hợp với nấm xanh có

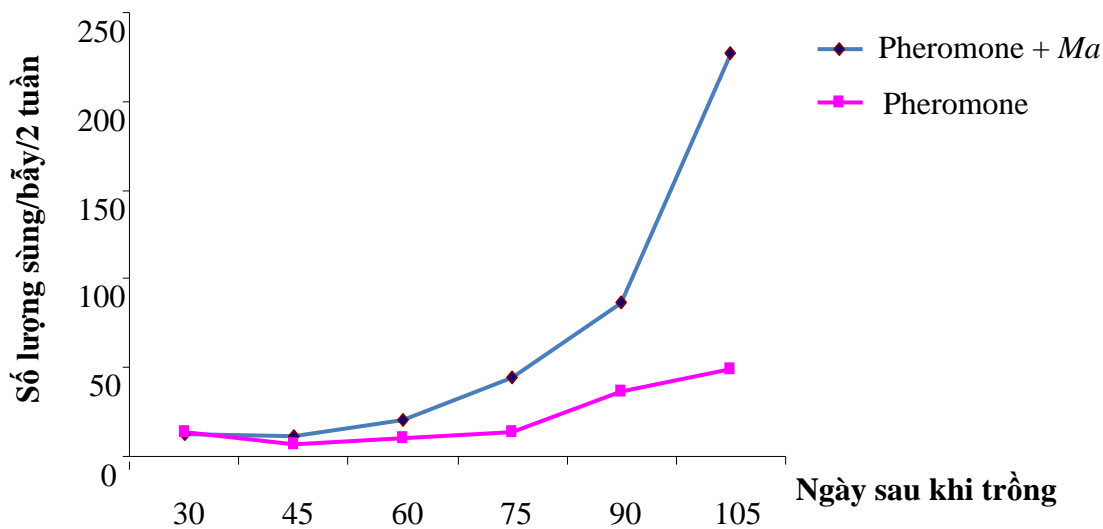
khả năng thay thế dần thuốc trừ sâu hóa học để quản lý sự gây hại của SKL trên giống khoai Trắng Sữa ở ngoài đồng.

Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu của Hwang, 2000 (Đài Loan), Pillai *et al.* 1993 (Ấn Độ), Yasuda, 1995 (Nhật Bản) đã sử dụng bẫy pheromone để phòng trị SKL đạt hiệu quả cao tương đương so với xử lý bằng thuốc trừ sâu hóa học. Biện pháp đặt bẫy pheromone riêng lẻ hoặc kết hợp với nấm xanh là phương pháp tương đối mới ở vùng ĐBSCL, việc sử dụng bẫy pheromone được làm từ vật liệu rẻ tiền, dễ tìm kiếm, cách làm đơn giản và chi phí thấp kết hợp với quy trình sản xuất nấm xanh tại nông hộ thì người dân có thể áp dụng được mô hình này nhằm thay thế dần thuốc trừ sâu hóa học trong việc phòng trị SKL trên đồng ruộng mà không ảnh hưởng đến sức khỏe người sản xuất và thân thiện với môi trường.

Khảo sát trên ruộng khoai Tàu Nghẹn tại huyện Cù Lao Dung, Sóc Trăng từ tháng 11/2012 đến tháng 02/2013, đạt kết quả như sau:

*** Diễn biến mật số sùng vào bẫy pheromone giới tính**

Kết quả ở Hình 4.28 cho thấy số lượng sùng đực vào bẫy tăng dần theo thời gian, cùng quy luật, trong đó NT B (pheromone và xử lý nấm xanh) có sự chênh lệch số lượng sùng vào bẫy khá nhiều so với NT A (pheromone).



Hình 4.28: Diễn biến số lượng SKL vào bẫy pheromone giới tính trên ruộng khoai lang tại huyện Cù Lao Dung, tỉnh Sóc Trăng, 2013

NT B, từ 30-60 NSKT có sùng vào bẫy tăng dần theo thời gian (từ 12,67-20,27 con/bẫy/2 tuần). Đến thời điểm từ 60-90 NSKT thì sùng vào bẫy tăng lên nhanh (từ 20,27-87,27 con/bẫy/2 tuần) và đến gần thu hoạch (105 NSKT)

thì sùng vào bẫy tăng lên cao (226,67 con/bẫy/2 tuần). Có thể do các ruộng khoai lân cận thu hoạch trước nên sùng di chuyển sang ruộng thí nghiệm làm cho số lượng sùng vào bẫy tăng lên cao đột ngột, nhưng tỉ lệ củ bị hại tăng lên không nhiều, từ 2,07-8,67% (ngoài vỏ) và 5,1% (trong củ).

Trong khi đó, NT A ở giai đoạn đầu từ 30-60 NSKT có sùng vào bẫy không tăng (từ 13,53-10,13 con/bẫy/2 tuần). Đến thời điểm từ 60-90 NSKT thì sùng vào bẫy gia tăng chậm (từ 10,13-37,07 con/bẫy/2 tuần) và đến gần thu hoạch (105 NSKT) thì sùng vào bẫy tăng lên 48,60 con/bẫy/2 tuần.

Nhìn chung, sự gia tăng số lượng sùng vào bẫy theo quy luật chung là khi có thức ăn, nơi ở và điều kiện thuận lợi thì sùng sẽ gia tăng mật số. Nhận thấy lúc đầu vụ khoai thì nguồn thức ăn ít do dây khoai đang phát triển thân lá nên số lượng sùng vào bẫy thấp. Khi gần thu hoạch có nguồn thức ăn dồi dào nên mật số tăng lên khá nhanh. Kết quả này cũng phù hợp với các thí nghiệm khác áp dụng bẫy pheromone trên ruộng khoai lang theo quy luật chung là số lượng sùng vào bẫy gia tăng lên nhanh về cuối vụ khoai.

*** Tỉ lệ củ khoai bị sùng gây hại trên ruộng thí nghiệm**

Kết quả quan sát củ khoai bị sùng gây hại ở 3 thời điểm của giống khoai Tàu Nghẹn thể hiện ở Bảng 4.32 ghi nhận tỉ lệ củ bị sùng gây hại như sau:

Ở thời điểm 2 tháng SKT, các NT A, B, C và D đều chưa phát hiện sự gây hại của sùng cả ngoài vỏ và trong củ khoai. Nguyên nhân do củ mới hình thành, kích thước, trọng lượng củ còn nhỏ và nằm khá sâu trong luống khoai nên sùng chưa có cơ hội tiếp cận để gây hại củ.

Đến 2,5 tháng SKT, củ khoai đã có biểu hiện sùng gây hại mức độ nhẹ ở các NT A, B, C và D. Trong đó, NT B và C có sùng gây hại ở ngoài vỏ với tỉ lệ rất thấp (lần lượt là 2,07% và 2,24%), không thấy có sự gây hại bên trong củ. Với NT A rất ít triệu chứng sùng gây hại trên củ có tỉ lệ ngoài vỏ (2,25%) và trong củ (0,75%). NT D (đối chứng) có tỉ lệ củ bị sùng gây hại ở ngoài vỏ (5,42%) và trong củ (3,61%) cao hơn so với các NT khác. Kết quả này có thể do cách phòng trị sùng của nông dân chưa chặt chẽ nên sùng có cơ hội tiếp cận gây hại củ khoai nhiều hơn cả ngoài vỏ và trong củ.

Khi thu hoạch (3 tháng SKT), các NT có tỉ lệ củ bị sùng gây hại gia tăng lên cả trong củ và ngoài vỏ. Trong đó, NT B có tỉ lệ củ bị hại ở ngoài vỏ (8,67%) và trong củ (5,10%), cao hơn so với 2 NT A và C, nhưng vẫn thấp hơn so với NT D. NT A có tỉ lệ củ bị hại ở ngoài vỏ (5,57%) và trong củ (2,97%), gần tương đương với NT C có tỉ lệ củ bị hại ở ngoài vỏ (4,34%) và trong củ (2,71%). NT D có tỉ lệ củ bị hại ở ngoài vỏ (11,76%) và trong củ

(7,05%) cao hơn gấp đôi so với 2 NT A và C. Kết quả ghi nhận tỉ lệ củ bị sùng gây hại tương đối thấp ở các NT nên chưa thấy có sự chênh lệch thiệt hại nhiều giữa các NT và tỉ lệ củ bị hại luôn thấp hơn so với đối chứng, chứng tỏ các NT thí nghiệm có khả năng quản lý sùng khá tốt, có thể thay thế dần cho biện pháp áp dụng thuốc trừ sâu hóa học để quản lý SKL ở ngoài đồng. Mặt khác, thí nghiệm này nhận thấy NT A và C có tỉ lệ củ bị hại cả ngoài vỏ và trong củ tương đương nhau, nhưng ở NT B thì chưa thấy rõ hiệu quả cộng hưởng giữa pheromone và nấm xanh trong quản lý sùng, cũng tương tự như kết quả của các thí nghiệm trước.

Bảng 4.32: Tỉ lệ gây hại của sùng khoai lang trên củ khoai thu từ ruộng thí nghiệm

Thời điểm quan sát	Nghiệm thức	Số củ quan sát	Trọng lượng củ (g)	Tỉ lệ (%) củ bị hại	
				Ngoài vỏ	Trong củ
2 tháng	A	274	18,46	0	0
	B	254	20,34	0	0
	C	192	10,87	0	0
	D	146	10,0	0	0
2,5 tháng	A	266	55,21	2,25	0,75
	B	241	49,03	2,07	0
	C	178	44,64	2,24	0
	D	166	41,73	5,42	3,61
Thu hoạch	A	269	69,24	5,57	2,97
	B	196	72,37	8,67	5,10
	C	184	73,86	4,34	2,71
	D	170	77,60	11,76	7,05

*Nghiệm thức A: Pheromone; Nghiệm thức B: Pheromone + nấm xanh (Ma)
Nghiệm thức C: Nấm xanh; Nghiệm thức D: Đối chứng (nông dân)*

Tóm lại, qua 3 đợt khảo sát tỉ lệ củ bị hại cho thấy sùng bắt đầu gây hại củ từ 2,5 tháng SKT và tỉ lệ gây hại tăng dần đến khi thu hoạch. Trong giai đoạn phát triển củ thì sùng di chuyển tới ruộng nhiều hơn làm gia tăng mật số và gây hại củ khoai nhiều hơn, phù hợp với thực tế sản xuất khoai lang.

Kết quả ở Bảng 4.33 cho thấy trung bình số lượng sùng đực vào bẫy pheromone giới tính tại các khu vực ruộng thí nghiệm sau thu hoạch khá cao. Sau khi đặt bẫy 1 tuần thì số lượng sùng vào bẫy cao nhất ở ruộng 2 (NT B) (trung bình 1.310 con/bẫy/tuần), kể đến là ruộng 1 (NT A) (trung bình 803 con/bẫy/tuần) và ruộng 3 (NT C, D) thấp nhất (trung bình 215,5 con/bẫy/tuần).

Sau khi đặt bẫy 2 tuần, số lượng sùng vào bẫy giảm so với tuần 1, ở ruộng 2 có số lượng sùng vào bẫy khá cao (trung bình 997,3 con/bẫy/tuần), giảm 312,7 con so với tuần 1; kể đến là ruộng 3 có số lượng sùng vào bẫy trung bình là 747,5 con/bẫy/tuần (cao hơn tuần 1, ở ruộng 1 có 1 bẫy bị ngã và trung bình số lượng sùng vào 2 bẫy còn lại), thấp nhất là ruộng 1 có số lượng sùng vào bẫy là 660 con/bẫy/tuần, giảm 143 con. Sau thu hoạch khoai thì sùng còn hiện diện ngoài đồng khá cao, cần tiêu diệt giảm bớt mật số. Có thể đây là nguồn lây lan sang các nơi khác, cũng như cư trú trên các tàn dư thực vật còn lại trên ruộng khoai. Vì vậy, có thể khuyến cáo cần đặt thêm bẫy pheromone trên các ruộng khoai sau thu hoạch nhằm tiêu diệt số lượng sùng đực khá nhiều giúp làm giảm quần thể SKL trong tự nhiên, cũng như giảm bớt sự bắt cặp trong quần thể sùng và sự lây lan sang các ruộng khoai khác trong khu vực canh tác, do trưởng thành SKL sống rất lâu và sinh sản nhiều.

Bảng 4.33: Số lượng sùng đực vào bẫy pheromone giới tính trên các ruộng khoai lang thí nghiệm sau thu hoạch tại huyện Cù Lao Dung, tỉnh Sóc Trăng, 2013

Ruộng đặt bẫy	Bẫy	Bẫy 1	Bẫy 2	Bẫy 3	TB sùng vào bẫy (con/bẫy/tuần)
	Ruộng 1	Tuần 1	1.358	744	307
	Tuần 2	778	542	-	660
Ruộng 2	Tuần 1	982	1.148	2.782	1.310
	Tuần 2	850	765	2.227	997,3
Ruộng 3	Tuần 1	248	183	-	215,5
	Tuần 2	573	922	-	747,5

Ruộng 1: Nghiệm thức A (pheromone).

Ruộng 2: Nghiệm thức B (pheromone + nấm xanh).

Ruộng 3: Nghiệm thức D (đối chứng) và nghiệm thức C (nấm xanh).

Dấu “-”: Bẫy bị ngã, không đếm được sùng vào bẫy.

4.4.5 Khảo sát hiệu quả của pheromone giới tính tổng hợp kết hợp với nấm xanh (*Ma*) phòng trị SKL tại huyện Duyên Hải, Trà Vinh

4.4.5.1 Diễn biến mật số SKL vào bẫy trên các ruộng thí nghiệm

* *Ruộng khoai lang mới canh tác*

Kết quả ở Bảng 4.34 cho thấy NT D-1 có tổng số sùng đực vào bẫy là 5.234 con/1.700 m² (trung bình 3.380 con/1.000 m²) tương đương với NT D-2 có tổng số sùng vào bẫy là 4.582 con/1.400 m² (trung bình 3.323 con/1.000 m²). Trung bình số lượng sùng đực vào bẫy (con/bẫy/đêm) ở cả 2 NT cũng không khác biệt ý nghĩa, lần lượt là 7,51 con/bẫy/đêm (D-1) và 6,84 con/bẫy/đêm (D-

2). Cho thấy việc xử lý nấm xanh chưa thể hiện rõ ảnh hưởng đến mật số sùng đục vào bẫy pheromone trên ruộng khoai mới canh tác.

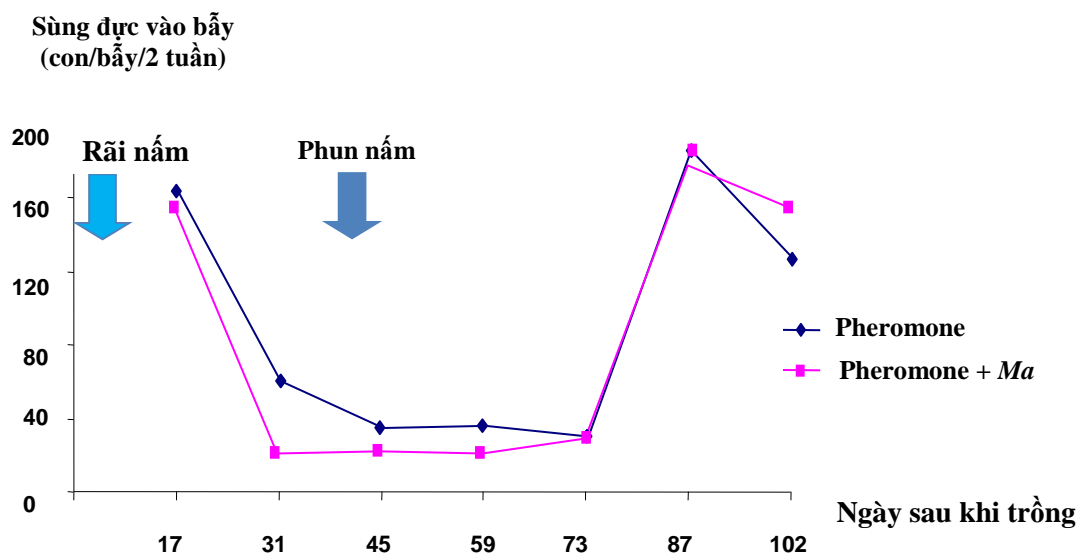
Diễn biến số lượng sùng đục vào bẫy ở Hình 4.29 cho thấy 2 tuần đầu có số lượng sùng vào bẫy khá cao, từ 154-164 con/bẫy/2 tuần. Sau đó, số lượng sùng vào bẫy giảm nhanh và duy trì ở mức thấp từ 20-34 con/bẫy/2 tuần (D-1) và từ 22-29 con/bẫy/2 tuần (D-2). Giai đoạn từ 73-87 NSKT thì số lượng sùng vào bẫy đồng loạt tăng lên rất nhanh ở cả 2 NT, đạt 186 con/bẫy/2 tuần (D-1) và 177 con/bẫy/2 tuần (D-2).

Khi gần thu hoạch (2 tuần cuối) thì số lượng sùng vào bẫy giảm còn 128 con/bẫy/2 tuần (D-1) và 157 con/bẫy/2 tuần (D-2). Nhìn chung, diễn biến số lượng sùng vào bẫy tại hai ruộng thí nghiệm là tương tự nhau, cùng qui luật tăng giảm suốt vụ, việc xử lý nấm xanh tại 2 thời điểm rải nấm ở đầu vụ và phun nấm ở giữa vụ vẫn chưa thể hiện rõ hiệu quả cộng hưởng của nấm xanh với bẫy pheromone đối với quần thể sùng trên ruộng khoai.

Bảng 4.34: Số lượng sùng khoai lang vào bẫy pheromone tại các ruộng khoai lang mới canh tác thuộc huyện Duyên Hải, tỉnh Trà Vinh

Nghiệm thức	Ruộng thí nghiệm	Diện tích (m ²)	TB số lượng sùng vào bẫy (con/bẫy/đêm)	Tổng cộng sùng vào bẫy (con/1.000m ²)
D-1	Pheromone	1.700	7,51	3.380
D-2	Pheromone + <i>Ma</i>	1.400	6,84	3.323
Giá trị T-tính			0,44 ^{ns}	

ns: không khác biệt ở mức ý nghĩa 5% qua kiểm định T-test



Hình 4.29: Diễn biến số lượng sùng khoai lang vào bẫy tại các ruộng khoai lang mới canh tác thuộc huyện Duyên Hải, tỉnh Trà Vinh

*** Ruộng khoai lang canh tác lâu năm**

Kết quả ở Bảng 4.35 cho thấy tại khu vực canh tác khoai lang lâu năm thì sùng hiện diện trong suốt vụ khoai và số lượng sùng tăng lên nhanh trong giai đoạn tạo củ, xuất hiện 1 cao điểm trước khi thu hoạch nửa tháng. Trong đó, NT E-1 có tổng số sùng vào bẫy trong suốt vụ là 24.719 con/1.800 m² (trung bình 13.733 con/1.000 m²) khá cao tương đương với NT E-2 có tổng số sùng vào bẫy là 16.632 con/1.200 m² (trung bình 13.860 con/1.000 m²). Nếu so sánh với khảo sát tại ruộng khoai mới canh tác thì số lượng sùng vào bẫy ở cả 2 NT E-1 và E-2 tại các ruộng canh tác lâu năm đều cao hơn nhiều so với các ruộng mới canh tác, số lượng sùng vào bẫy cao hơn từ 4,06-4,17 lần.

Số lượng sùng vào bẫy trung bình mỗi đêm ở cả 2 NT E-1 và E-2 tại các ruộng canh tác lâu năm là khá cao, tương đương nhau, không khác biệt, trung bình từ 41,68-43,34 con/bẫy/đêm, cao hơn nhiều so với 2 NT D-1 và D-2 tại các ruộng mới canh tác, trung bình số lượng sùng vào bẫy/đêm cao hơn từ 5,77-6,09 lần. Chứng tỏ có sự tích lũy quần thể SKL tại khu vực canh tác lâu năm nhiều hơn so với khu vực mới canh tác và NT xử lý nấm xanh qua hình thức rải và phun nấm chưa thấy rõ ảnh hưởng đến mật số sùng vào bẫy.

Bảng 4.35: Số lượng sùng khoai lang vào bẫy pheromone tại các ruộng khoai lang canh tác lâu năm thuộc huyện Duyên Hải, tỉnh Trà Vinh

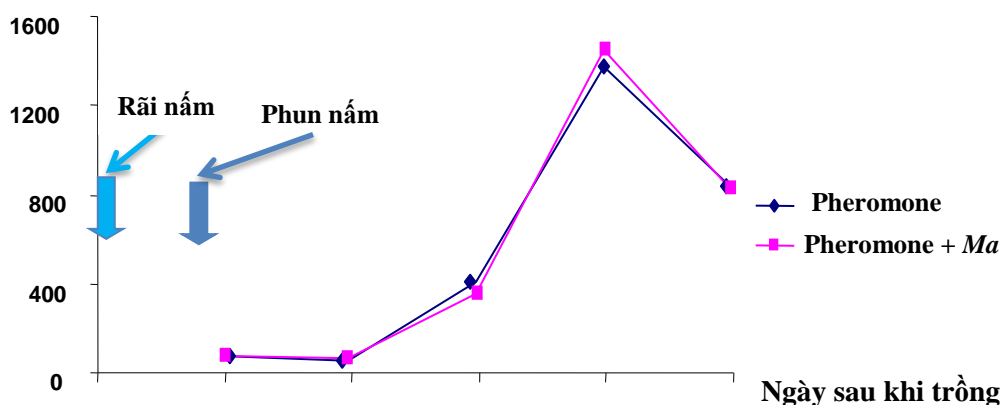
Nghiệm thức	Ruộng thí nghiệm	Diện tích (m²)	TB số lượng sùng vào bẫy (con/bẫy/đêm)	Tổng cộng sùng (con/1.000 m²)
E-1	Pheromone	1.800	43,37	13.733
E-2	Pheromone + nấm	1.200	41,68	13.860
	Giá trị T-tính		0,16 ^{ns}	

ns: không khác biệt ở mức ý nghĩa 5% qua kiểm định T-test

Diễn biến số lượng sùng vào bẫy ở Hình 4.30 cho thấy NT E-1 và E-2 biến động tương tự nhau. Giai đoạn từ 45-87 NSKT thì số lượng sùng vào bẫy ở cả 2 NT đều tăng dần theo thời gian phát triển củ và tạo ra 1 cao điểm ở thời điểm 87 NSKT (1.446 con/bẫy/2 tuần) ở NT E-2 và (1.377 con/bẫy/2 tuần) ở NT E-1, gần tương đương nhau.

Sau đó, số lượng sùng vào bẫy ở cả 2 NT đều giảm tới khi thu hoạch, tương tự nhau. Trong đó, NT E-2 có số lượng sùng vào bẫy đạt 826 con/bẫy/2 tuần tương đương với NT E-1 đạt 835 con/bẫy/2 tuần. Cho thấy diễn biến số lượng sùng vào bẫy ở cả 2 NT đều cùng chung quy luật tăng giảm trong suốt vụ và hiệu quả của nấm xanh cũng chưa thể hiện rõ ảnh hưởng tới sùng so với ruộng khoai chỉ đặt bẫy pheromone giới tính.

Sùng đục vào bẫy
(con/bẫy/2 tuần)



Hình 4.30: Diễn biến số lượng sùng khoai lang vào bẫy tại các ruộng khoai lang canh tác lâu năm thuộc huyện Duyên Hải, tỉnh Trà Vinh

4.4.5.2 Hiệu quả của biện pháp áp dụng pheromone giới tính kết hợp với nấm xanh phòng trị SKL tại huyện Duyên Hải, tỉnh Trà Vinh

* Ruộng khoai lang mới canh tác

Kết quả ở Bảng 4.36 cho thấy tại thời điểm 2 tháng SKT (60 NSKT), NT D-1 có tỉ lệ củ bị sùng gây hại ở ngoài vỏ là 1% và NT D-2 là 2,3%, không khác biệt so với NT đối chứng D-3 là 2%. Trong đó, NT D-2 có tỉ lệ củ bị sùng gây hại cao hơn, khác biệt so với NT D-1 ở mức ý nghĩa 5%, nhưng tỉ lệ bị hại này là rất thấp, chỉ dao động từ 1-2%, chênh lệch rất ít.

Bảng 4.36: Tỉ lệ củ bị gây hại do sùng khoai lang trên ruộng khoai lang mới canh tác tại huyện Duyên Hải, tỉnh Trà Vinh

Nghiệm thức	Tổng số củ quan sát	Trọng lượng củ trung bình (g)	Tỉ lệ củ bị hại (%)	
			Ngoài vỏ	Trong củ
2 tháng sau khi trồng				
(D-1) Pheromone	294	29,9	1,0 ^b	0,0
(D-2) Pheromone + Ma	177	33,3	2,3 ^a	0,6
(D-3) Đối chứng	160	25,0	2,0 ^{ab}	0,6
CV(%)			4,21 [*]	4,62 ^{ns}
Thời điểm thu hoạch				
(D-1) Pheromone	226	53,1	5,8 ^b	0,4 ^b
(D-2) Pheromone + Ma	221	51,6	7,2 ^{ab}	3,6 ^a
(D-3) Đối chứng	151	60,9	10,6 ^a	2,6 ^a
CV(%)			7,02 [*]	4,90 [*]

Các số trong cùng một cột có cùng chữ theo sau giống nhau thì không khác biệt nhau qua thống kê ở mức ý nghĩa 5% và kiểm định Duncan; ns: không khác biệt ở mức ý nghĩa 5%.

Tuy nhiên, tỉ lệ sùng gây hại bên trong củ ở các NT đều rất thấp so với ngoài vỏ, xuất hiện rải rác dưới 1%, cả 3 NT đều không khác biệt nhau ở mức ý nghĩa 5%. Trong đó, NT D-2 có tỉ lệ sùng gây hại trong củ bằng với NT đối chứng D-3 là 0,6%, NT D-1 không thấy sùng gây hại bên trong củ khoai.

Kết quả trên do ở thời điểm này là giai đoạn khoai lang mới tạo củ và kích thước củ còn nhỏ nằm sâu trong luống khoai nên sùng tập trung gây hại trên thân dây và bên ngoài vỏ củ là chủ yếu, dẫn đến tỉ lệ sùng gây hại bên trong củ khoai là rất thấp, mỗi điểm (1 m) thu mẫu củ chỉ có từ 0-1 củ bị hại.

Đến khi thu hoạch thì tỉ lệ củ bị sùng gây hại tăng lên cao hơn so với giai đoạn đầu mới tạo củ. NT D-1 có tỉ lệ sùng gây hại ở bên ngoài vỏ là 5,8%, NT D-2 là 7,2% và D-3 cao nhất là 10,6%; Trong đó, NT D-2 có tỉ lệ bị hại ngoài vỏ không khác biệt so với D-1 và D-3, tuy nhiên D-1 có khác biệt so với D-3.

Tỉ lệ sùng gây hại bên trong củ ở NT D-1 thấp nhất là 0,4%, có khác biệt ý nghĩa so với D-2 là 3,6% và đối chứng D-3 là 2,6%, còn 2 NT D-2 và D-3 thì tương đương nhau. Chứng tỏ đặt bẫy pheromone (6 bẫy/1.000 m²) cho hiệu quả quản lý sự gây hại của sùng thấp hơn có ý nghĩa so với đối chứng áp dụng thuốc trừ sâu hóa học theo cách phòng trị sùng của nông dân.

Nhìn chung, cả 2 NT D-1 và D-2 có tỉ lệ sùng gây hại ở thời điểm thu hoạch cao hơn so với ở thời điểm 2 tháng SKT. Kết quả này cho thấy áp lực gây hại của sùng gia tăng theo sự phát triển của củ khoai, tương tự các thí nghiệm trước. Thí nghiệm này, NT (D-2) đặt bẫy pheromone kết hợp xử lý nấm xanh có tỉ lệ sùng gây hại tương đương với đối chứng, tuy nhiên nấm xanh chưa thể hiện rõ hiệu lực kết hợp với pheromone giới tính quản lý sùng.

*** Ruộng khoai lang canh tác lâu năm**

Kết quả ở Bảng 4.37 cho thấy ở thời điểm 60 NSKT thì tỉ lệ củ bị sùng gây hại ở 2 NT E-1 và E-2 là gần tương đương so với đối chứng. Trong đó, NT E-1 có tỉ lệ sùng gây hại ở bên ngoài vỏ là 4,1%, E-2 là 3,8%, E-3 là 4,1%, đều không khác biệt nhau ở mức ý nghĩa 5%. NT E-1 có tỉ lệ sùng gây hại ở bên trong củ là 2%, E-2 là 1,9% và E-3 là 2,1%, tương đương nhau, chỉ có 50% số củ bị sùng gây hại bên ngoài vỏ là có sùng gây hại trong củ. Ở thời điểm này củ khoai còn nhỏ nhưng đã bị sùng gây hại trên củ để lại triệu chứng các lỗ nhỏ li ti trên vỏ củ xuất hiện rải rác chiếm tỉ lệ rất thấp (dưới 4,1%). Khi quan sát trong củ khoai thấy sùng gây hại rất ít, chỉ có vài củ xuất hiện triệu chứng sùng gây hại (dưới 2,1%), tỉ lệ sùng gây hại trong củ giảm xuống 50% so với bên ngoài vỏ củ. Nhìn chung, tỉ lệ sùng gây hại trên củ ở thí nghiệm này tương đối cao gấp đôi so với thí nghiệm trên ruộng khoai lang mới canh tác cả bên ngoài vỏ và trong củ khoai ở cùng thời điểm 2 tháng SKT.

Bảng 4.37: Tỷ lệ củ bị gây hại do sùng khoai lang ở ruộng khoai lang canh tác lâu năm tại huyện Duyên Hải, tỉnh Trà Vinh

Nghiệm thức	Tổng số củ quan sát	Trọng lượng củ trung bình (g)	Tỷ lệ củ bị hại (%)	
			Ngoài vỏ	Trong củ
60 ngày sau khi trồng				
(E-1) Pheromone	197	35,5	4,1	2,0
(E-2) Pheromone + <i>Ma</i>	156	40,4	3,8	1,9
(E-3) Đối chứng	97	22,7	4,1	2,1
CV(%)			8,63 ^{ns}	4,34 ^{ns}
Thời điểm thu hoạch				
(E-1) Pheromone	155	89	0,6 ^b	0,6 ^b
(E-2) Pheromone + <i>Ma</i>	170	70	2,9 ^b	2,4 ^b
(E-3) Đối chứng	88	101	9,1 ^a	4,5 ^a
CV(%)			10,21 [*]	6,90 [*]

Các số trong cùng một cột có cùng chữ theo sau giống nhau thì không khác biệt nhau qua thống kê ở mức ý nghĩa 5% và kiểm định Duncan; ns: không khác biệt ở mức ý nghĩa 5%.

Đến khi thu hoạch, 2 NT E-1 và E-2 có tỷ lệ củ bị sùng gây hại thấp hơn. Trong đó, NT E-1 có tỷ lệ sùng gây hại ở bên ngoài vỏ và trong củ thấp nhất (0,6%), chỉ có 1 củ bị gây hại trong tổng số 155 củ quan sát. NT E-2 có tỷ lệ gây hại ở ngoài vỏ là 2,9% và trong củ là 2,4%, chỉ có 5 củ bị hại trong tổng số 170 củ quan sát. Cả 2 NT này đều có tỷ lệ củ bị sùng gây hại thấp hơn và khác biệt so với đối chứng (E-3) có tỷ lệ sùng gây hại ở ngoài vỏ (9,1%) và trong củ (4,5%). Ở thời điểm này, ruộng đối chứng có tỷ lệ củ bị sùng gây hại ở ngoài vỏ cao hơn gấp 3 lần và trong củ cao hơn gấp đôi so với NT E-2. Kết quả này cho thấy việc phòng trị SKL bằng biện pháp đặt bẫy pheromone (6 bẫy/1.000 m²) và bẫy pheromone kết hợp xử lý nấm xanh cho hiệu quả cao hơn so với việc áp dụng phòng trị sùng bằng thuốc hóa học theo nông dân. Tuy nhiên, nấm xanh chưa thể hiện rõ hiệu lực kết hợp với pheromone giới tính quản lý sùng ở ngoài đồng, có thể do ảnh hưởng của điều kiện ngoại cảnh chưa phù hợp cho sự duy trì và phát huy vai trò ký sinh của nấm xanh.

4.4.6 Khảo sát hiệu quả của pheromone giới tính tổng hợp kết hợp với nấm xanh (*Ma*) phòng trị SKL tại huyện Tri Tôn, An Giang

4.4.6.1 Diễn biến mật số SKL vào bẫy trên ruộng khoai Tráng Sữa

Kết quả ở Bảng 4.38 cho thấy ruộng đặt bẫy pheromone kết hợp phun nấm xanh có số lượng sùng vào bẫy ở khu vực ngoại vi luôn cao hơn so với trung tâm qua các thời điểm quan sát. Tổng số sùng vào bẫy ở khu vực ngoại vi là 30.332 con/vụ, cao hơn gấp 3 lần và khác biệt có ý nghĩa so với khu vực trung tâm là 9.015 con/vụ. Mặt khác, số lượng sùng vào bẫy trung bình mỗi

đêm ở khu vực ngoại vi là 44,04 con/bẫy/đêm, cao hơn gấp đôi so với khu vực trung tâm là 18,21 con/bẫy/đêm. Kết quả này cho thấy đặt bẫy pheromone giới tính ở khu vực ngoại vi xung quanh ruộng khảo sát có khả năng bảo vệ sự xâm nhiễm của sùng từ các ruộng lân cận, cũng phù hợp với sự tập tính di chuyển của sùng là thích bò, khi di chuyển tới ruộng đặt bẫy thì sùng sẽ bị hấp dẫn tới các bẫy pheromone dễ dàng hơn.

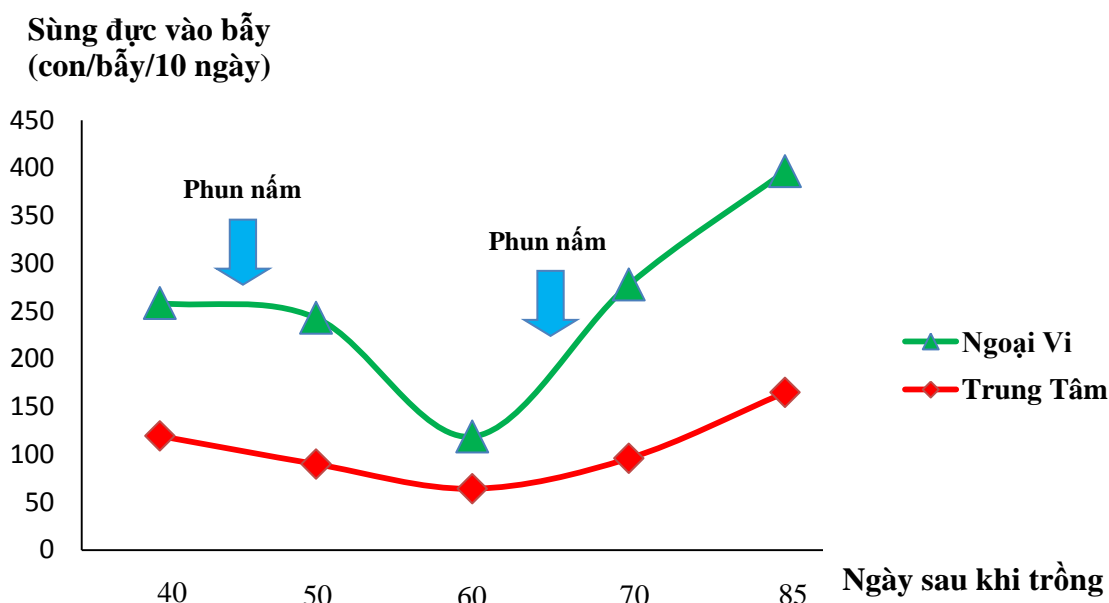
Bảng 4.38: Số lượng sùng khoai lang vào bẫy ở các khu vực của ruộng đặt bẫy pheromone kết hợp với nấm xanh tại huyện Tri Tôn, An Giang

Khu vực	Số bẫy	Số lượng sùng (con/bẫy/đêm)	Tổng số sùng (con/vụ)
Ngoại vi	16	44,04	30.332
Trung tâm	9	18,21	9.015
Giá trị T-tính		5,23*	

*: Khác biệt thống kê ở mức ý nghĩa 5% qua kiểm định T-test

Hình 4.31 cho thấy số lượng sùng vào bẫy ở 2 khu vực ngoại vi và trung tâm của ruộng khảo sát giảm dần từ thời điểm 40-60 NSKT và tăng trở lại từ thời điểm 70-85 NSKT. Ở giai đoạn đầu, số lượng sùng vào bẫy tương đối cao và giảm dần là do sùng hiện diện sẵn trên ruộng thí nghiệm (thời điểm 30 NSKT, khoai lang đang phát triển thân lá). Sau đó, số lượng sùng giảm dần ở thời điểm 50-60 NSKT. Như vậy, bẫy pheromone kết hợp với phun nấm xanh đã làm mật số sùng giảm xuống thấp trên ruộng khảo sát, nhất là ở thời điểm khoai được 60 NSKT.

Từ thời điểm 60 NSKT đến khi thu hoạch, có số lượng sùng vào bẫy ở khu vực ngoại vi tăng lên khá nhanh so với trung tâm của ruộng khảo sát. Nguyên nhân có thể do đây là giai đoạn khoai phát triển củ đến khi thu hoạch và sùng ưa thích gây hại ở giai đoạn này nên di chuyển từ các ruộng lân cận tới ruộng khảo sát làm cho số lượng sùng tăng lên nhanh hơn. Kết quả này cũng phù hợp với thực tế canh tác khoai lang, thường mật số sùng tăng lên về cuối vụ tương tự các thí nghiệm khác. Mật số sùng trên ruộng khảo sát gia tăng lên khi khoai tạo củ và có sự xâm nhiễm của sùng từ các ruộng lân cận xung quanh.



Hình 4.31: Diễn biến mật số sùng vào bẫy ở ruộng khảo sát tại huyện Tri Tôn

4.4.7.2 Hiệu quả áp dụng pheromone giới tính kết hợp với nấm xanh làm giảm tỉ lệ củ bị hại do SKL tại huyện Tri Tôn, tỉnh An Giang

Kết quả đánh giá hiệu quả pheromone giới tính kết hợp với nấm xanh ở Bảng 4.39 cho thấy tỉ lệ củ bị sùng gây hại trên giống khoai Trắng Sữa ở ngoài vỏ tại khu vực ngoại vi qua 2 thời điểm 60 và 75 NSKT lần lượt là 1,3% và 7,8% thấp hơn và khác biệt ý nghĩa 5% so với ruộng xử lý thuốc hóa học theo nông dân với tỉ lệ gây hại ở ngoài vỏ lần lượt là 29,7 và 52,7%.

Tỉ lệ gây hại do sùng ở trong củ trên ruộng khảo sát ở khu vực ngoại vi qua 2 thời điểm lần lượt là 1,3% và 1,6%, thấp hơn rất nhiều so với ruộng đối chứng (lần lượt là 20,4% và 31,9%). Do áp lực gây hại của sùng rất cao trên ruộng đối chứng ở 75 NSKT, nông dân đã thu hoạch ở thời điểm 80 NSKT nhằm tránh thiệt hại nặng hơn, trước 15 ngày so với dự kiến thu hoạch. Đến thời điểm 93 NSKT, chỉ ghi nhận thiệt hại ở ruộng thí nghiệm với tỉ lệ sùng gây hại ngoài vỏ (25,8%) và trong củ (16,9%), tăng lên so với thời điểm trước.

Mặt khác, số lượng sùng con thoát ra từ những củ khoai bị nhiễm sùng trên ruộng khảo sát ở cả 3 thời điểm là 60, 75 và 93 NSKT (tương ứng là 0, 69 và 76 con, trung bình số sùng /củ bị hại là 0 con, 11 con và 0,15 con) thấp hơn rất nhiều so với ruộng đối chứng ở 2 thời điểm 60 và 75 NSKT (tương ứng là 894 và 2.923 con, trung bình số sùng /củ bị hại là 45,6 con và 63 con).

Bảng 4.39: Tỷ lệ củ bị hại do SKL ở khu vực ngoại vi trên các ruộng khoai lang Trắng Sữa tại huyện Tri Tôn, tỉnh An Giang

Thời điểm quan sát	Nghiệm thức	TL củ (g)	Số củ quan sát	Tỷ lệ củ bị hại (%)		Sùng thoát ra
				Ngoài vỏ	Trong củ	
60 NSKT	Pheromone + nấm xanh	48,7	80	1,3	1,3	0
	Theo nông dân	43,6	66	29,7	20,4	894
	Giá trị T-tính			6,16*	5,06*	
75 NSKT	Pheromone + nấm xanh	54,2	75	7,8	1,6	69
	Theo nông dân	55,7	88	52,7	31,9	2.923
	Giá trị T-tính			7,76*	3,98*	
93 NSKT	Pheromone + nấm xanh	88,4	69	25,8	16,9	76
	Theo nông dân	-	-	-	-	-

*: Khác biệt thống kê ở mức ý nghĩa 5% qua kiểm định T-test

(-): Thu hoạch củ khoai lang sớm vào thời điểm 80 NSKT

Kết quả ở Bảng 4.40 cho thấy tỉ lệ củ bị sùng gây hại ở ngoài vỏ tại khu vực trung tâm trên ruộng khảo sát ở cả 3 thời điểm 60, 75 và 93 NSKT lần lượt là 2,1%; 0% và 1,6%, rất thấp, có khác biệt ý nghĩa so với ruộng đối chứng (tỉ lệ củ bị hại ở ngoài vỏ, lần lượt là 39,3% (60 NSKT) và 83,6% (75 NSKT)). Bên cạnh đó, tỉ lệ gây hại bên trong củ ở khu vực trung tâm trên ruộng khảo sát ở 3 thời điểm 60, 75 và 93 NSKT lần lượt là 2,1%; 0% và 1,6%, đều thấp hơn rất nhiều so với ruộng đối chứng có tỉ lệ gây hại ở trong củ lần lượt là 29,6% (60 NSKT) và 67,9% (75 NSKT).

Ruộng thí nghiệm ở khu vực trung tâm cho hiệu quả cao với tỉ lệ củ bị hại rất thấp, luôn duy trì từ 1,6-2,1% ở ngoài vỏ, cũng như trong củ. Trong khi đó, ở khu vực trung tâm của ruộng đối chứng có tỉ lệ củ bị hại rất cao từ 29,6-67,9% (trong củ) và từ 39,3-83,6% (ngoài vỏ). Ruộng thí nghiệm ở khu vực trung tâm có mật số sùng thấp hơn, áp lực sùng thấp, dẫn tới tỉ lệ củ bị sùng gây hại rất thấp so với khu vực ngoại vi. Ruộng đối chứng quản lý sùng chưa hiệu quả, chỉ phun 1 lần thuốc trừ sâu hóa học trong suốt vụ, nên tỉ lệ củ bị gây hại khá cao, nhất là gần thu hoạch, thiệt hại trên 50% đều khắp ruộng cả khu vực trung tâm và ngoại vi khá nặng, các củ khoai bị nhiễm sùng có sùng con thoát ra nhiều, ruộng khoai có áp lực sùng cao dẫn đến thiệt hại trên củ nhiều hơn, phù hợp với thực tế sản xuất khoai lang.

Bảng 4.40: Tỷ lệ củ bị hại do SKL gây ra ở khu vực trung tâm trên các ruộng khoai lang Trắng Sữa tại huyện Tri Tôn, tỉnh An Giang

Thời điểm quan sát	Nghiệm thức	TL củ (g)	Số củ quan sát	Tỷ lệ củ bị hại (%)		Sùng thoát ra
				Ngoài vỏ	Trong củ	
60 NSKT	Pheromone + Nấm xanh	62,5	51	2,1	2,1	0
	Theo nông dân	58,5	66	39,3	29,6	1.512
	Giá trị T-tính			3,74*	3,75*	
75 NSKT	Pheromone + Nấm xanh	50,7	77	0	0	0
	Theo nông dân	79,5	73	83,6	67,9	1.621
	Giá trị T-tính			23,0*	6,76*	
93 NSKT	Pheromone + Nấm xanh	80,4	59	1,6	1,6	4
	Theo nông dân	-	-	-	-	-

*: Khác biệt thống kê ở mức ý nghĩa 5% qua kiểm định T-test

(-): Thu hoạch củ khoai lang sớm vào thời điểm 80 NSKT

Hiệu quả phòng trị còn thể hiện ở số lượng sùng con sinh ra trên cả 2 ruộng khoai. Cho thấy ruộng đặt bẫy pheromone kết hợp phun nấm xanh đã làm giảm khả năng gây hại và đẻ trứng của SKL, nên số lượng sùng con sinh ra từ củ khoai bị nhiễm rất thấp, dao động từ 0-4 con/củ bị hại. Trong khi đó, ruộng đối chứng có số lượng sùng con sinh ra rất cao, dao động là 1.512-1.621 con, trung bình 26-28 con/củ bị hại, chênh lệch rất nhiều so với ruộng thí nghiệm. Cho thấy ruộng thí nghiệm áp dụng bẫy pheromone kết hợp với phun nấm xanh cho hiệu quả quản lý SKL khá cao trong trường hợp này ở ngoài đồng.

Tóm lại, biện pháp đặt bẫy pheromone kết hợp nấm xanh có thể triển khai trên diện rộng và phổ biến cho nông dân áp dụng nhằm hạn chế tối đa việc sử dụng thuốc trừ sâu hóa học, có hiệu quả đối với việc phòng trị SKL và khả năng kéo dài thời gian thu hoạch giúp cho nông dân có thể chủ động thời gian bán khoai giá cao hơn. Như vậy, bẫy pheromone và nấm xanh có thể thay thế dần thuốc trừ sâu hóa học có độc tính cao trong việc quản lý SKL ở điều kiện ngoài đồng, có thể áp dụng biện pháp này trong chương trình quản lý dịch hại tổng hợp (IPM) để quản lý sùng là loài gây hại chủ yếu trong canh tác cây khoai lang theo hướng sản xuất an toàn.

Chương 5

KẾT LUẬN VÀ ĐỀ XUẤT

5.1 Kết luận

Xây dựng qui trình tổng hợp Z3-12:E2 pheromone giới tính thông qua phản ứng Wittig có khả năng hấp dẫn sùng cao phù hợp với điều kiện PTN. Các bước điều chế mỗi pheromone và qui trình áp dụng bẫy pheromone giới tính tổng hợp phòng trị SKL ở ngoài đồng phù hợp với điều kiện vùng ĐBSCL.

Diễn biến mật số sùng tại 2 huyện Bình Minh và Bình Tân, Vĩnh Long không phụ thuộc vào lượng mưa và nhiệt độ môi trường mà phụ thuộc vào thời vụ khoai trên ruộng và mật số sùng gia tăng nhanh vào thời điểm thu hoạch và giảm xuống khi nông dân chuyển đổi cơ cấu cây trồng, nhất là luân canh với lúa.

Kết quả định danh theo phương pháp truyền thống đã xác định 7 MPL *Metarhizium* thuộc loài nấm *Metarhizium anisopliae*. Theo phương pháp sinh học phân tử, sử dụng kỹ thuật PCR, giải trình tự DNA trên vùng ITS-rDNA và ngân hàng gen đã khẳng định 7 MPL ngoài tự nhiên thuộc loài *Metarhizium anisopliae*, có độ tương đồng cao (từ 97,5- 99,7%). Trong PTN, các MPL này có hiệu lực gây chết sùng rất cao, đạt từ 96,5-100% sau 5 ngày xử lý.

Trong PTN, nấm xanh có mật số 10^8 , 10^9 bào tử/ml cho hiệu lực gây chết sùng rất cao, đạt 100% sau 5 ngày. Sùng đực nhiễm nấm xanh có khả năng lây lan gây chết quần thể sùng với hiệu lực trên 90% sau 9 ngày. Nấm xanh dạng nấm tươi cho hiệu quả gây chết sùng nhanh và cao hơn dạng bột khô, hình thức phun nấm cho hiệu quả cao hơn rải nấm, đạt 100% sau 12 ngày.

Sùng đực tiếp xúc với pheromone giới tính và nhiễm nấm xanh dạng nấm tươi có hiệu quả gây chết quần thể sùng cao nhất, đạt 100% sau 18 ngày. Sùng cái bắt cặp với sùng đực tiếp xúc với pheromone giới tính và nhiễm nấm xanh có thời gian sống và số lượng sùng con sinh ra giảm thấp có ý nghĩa so với cặp sùng bình thường (đối chứng) trong điều kiện PTN.

Kết quả khảo sát ngoài đồng, sùng đực vào bẫy thấp trong giai đoạn đầu và tăng nhanh khi sắp thu hoạch, cùng qui luật diễn biến mật số sùng suốt vụ khoai, có thể áp dụng 6-12 bẫy/1.000 m² tùy theo áp lực sùng, cho hiệu quả quản lý sùng tương đương so với đối chứng (nông dân dùng thuốc hóa học).

Biện pháp đặt bẫy pheromone và pheromone kết hợp với nấm xanh cho hiệu quả phòng trị sùng tương đương với đối chứng (nông dân) trên các giống khoai Tím Nhật, Trắng sữa, Tàu Nghen tại các huyện Bình Tân, Cù Lao Dung, Duyên Hải. Nấm xanh chưa thể hiện rõ hiệu quả cộng hưởng với pheromone giới tính trong các thí nghiệm dẫn đến không khác nhau giữa 2 biện pháp này.

5.2 Đề xuất

Nghiên cứu quy trình sản xuất pheromone giới tính tổng hợp của SKL với khối lượng lớn để có thể thương mại hóa, với chi phí hợp lý nhằm cung cấp cho nông dân sử dụng quản lý sùng khoai lang ở ngoài đồng.

Bước đầu giới thiệu tập huấn chuyển giao kỹ thuật cho nông dân trồng khoai lang hiểu biết cách áp dụng bẫy pheromone giới tính tổng hợp và nấm xanh để quản lý sùng khoai lang trên diện rộng.

Trình diễn mô hình sử dụng pheromone giới tính tổng hợp và nấm xanh trên ruộng khoai lang chuyên canh giúp người nông dân nhận thức hơn nữa về việc hạn chế sử dụng thuốc trừ sâu hóa học và thay thế bằng các hóa chất sinh thái, có hiệu quả kinh tế, an toàn cho môi trường sinh thái và con người.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Alcazar, J., F. Cisneros and A. Morales, 1997. Large scale implementation of IPM for sweetpotato weevil in Cuba: A collaborative effort, pp. 185-190. In Program Report 1995-1996. International Potato Center, Lima, Peru, pp. 323.
- Allard, G.B., C.A. Chase, J.B. Heale, J.E. Isaac, and C. Prior, 1990. Field evaluation of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) as a mycoinsecticide for control of sugarcane froghopper, *Aeneolamia varia saccharina* (Hemiptera: Cercopidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 55: 41-46.
- Alvarez, P., P. Escarraman, E. Gomez, A. Villar, R. Jimenez, O. Ortiz, J. Alcázar, and M. Palacios, 1996. Economic impact of managing sweetpotato weevil (*Cylas formicarius*) with sex pheromones in the Dominican Republic, pp. 83-94. In: T. Walker and C. Crissman (Eds.), Case Studies of the Economic Impact of CIP Related Technology. International Potato Center, Lima, Peru.
- Ames, T., N.E.J.M. Smit, A.R. Braun, J.N. O'Sullivan, and L.G. Skoglund, 1997. Sweet potato: major pests, diseases and nutritional disorders. International Potato Center (CIP). Lima, Peru, 152: 46-49.
- Amiri, B., L. Ibrahim, and T.M. Butt, 1999. Antifeedent properties of destruxins and their potential use with the entomogenous *Metarhizium anisopliae* for improved control of crucifer pests. *Biocontrol Science and Technology*, 9: 487-489.
- Anonymous, 1978. Postharvest food losses in developing countries, FAO, p. 206-208.
- Aono, N., K. Natsumi, and Y. Yukawa, 1989. Mating suppression to the cherry tree borer, *Conopia hector* Butler, in Japanese apricot by its synthetic sex pheromone (in Japanese). *Plant Protection*, 43: 329-332.
- Austin, D.F., Jansson, R.K. and Wolfe, G.W., 1991. Convolvulaceae and *Cylas*: a proposed hypothesis on the origins of this plant/insect relationship. *Tropical Agriculture (Guildford)*, 68: 2, 162-170.
- Barnett, H.L., and Barry B. Hunter, 1998. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. 4th edition. APS Press, St. Paul, Minnesota. 218 p.
- Bennasar, A., C. Guasp, and J. Lalucat, 1998. Molecular methods for the detection and identification of *Pseudomonas stutzeri* in pure culture and environmental samples. *Microbiology Ecology*, 35: 22-33.
- Boucias, D.G., and J.C. Pendland, 1998. Principles of Insect Pathology. Boston: Kluwer Academic Publishers.

- Boucias, D.G., J.C. Pendland, and J.P. Latge, 1988. Nonspecific factors involed in attachment of entomopathogenic Deuteromycetes to host insect cuticle. *Applied and Environment Microbiology*, 54(7): 1795-1805.
- Bourke, R.M., 1985. Sweet potato (*Ipomoea batatas*) production and research in Papua New Guinea. *Papua New Guinea Journal of Agriculture, Forestry and Fisheries*, 33 (3-4): 89-108.
- Braun, A.R., and E. Van De Fliert, 1999. Evaluation of the inapct of sweet potato weevil (*Cylas formicarius*) and the effectiveness of *Cylas* sex pheromone traps at the farm level in Indonesia. *International Journal of Pest Management*, 45(2): 101-110.
- Burdeos, A.T., and L.T. Villacarlos, 1989. Comparative pathogenicity of *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces lilacinus* to adult sweet potato weevil, *Cylas formicarius* (F.) (Coleoptera: Curculionidae). *Philippines Entomologist*, 7 (6): 561-571.
- Butt, T.M., and L. Copping, 2000. Fungal biological control agents. *Pesticide Outlook*, 11: 186-191.
- Capinera, J.L., 1998. Sweetpotato Weevil, *Cylas formicarius* (Fabricius) (Insecta: Coleoptera: Brentidae (Curculionidae)). University of Florida.
- Capinera, J.L., 2006. Internet database. <http://entnemdept.ufl.edu>.
- Carde, R.T., and A.K. Minks, 1995. Control of moth pests by mating disruption. *Ann. Rev. Entomol.* 40: 559-585.
- Carruthers, R.I., and R.S. Soper, 1987. Fungal diseases. *In: Epizootiology of Insect Diseases*, (eds.) J.R. Fuxa and Y. Tanada, J. Wiley. New York. pp. 357-416.
- Carter, N., and H. Fraser, 2009. Mating disruption for management of insect pests. <http://www.omafra.gov.on.ca/english/crops/facts/03-079.htm>, 1-10.
- Castineiras, A., T. Cabrera, A. Calderon and O. Obregon, 1984. Virulencia de cuatro cepas de *Beauveria bassiana* sobre adultos de *Cylas formicarius elegantulus* (Coleoptera: Curculionidae) in Cuba. *Cienc. Tec. Agric., Protection de Plantas*, 7 (1): 67-74.
- Cerenius, L., A. Balows, and M. Sussman, 1998. Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections. *Appl. Environ. Microbiology*, 9(4): 125-129.
- Chalfant, R.B., R.K. Jansson, D.R. Seal, and J.M. Schalk, 1990. Ecology and Management of Sweet Potato Insects. *Annu. Rev. of Entomol.*, 35: 157-180.
- Chase, A.R., L.S. Osborne and V.M. Ferguson, 1986. Selective isolation of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* from an artificial potting medium. *Florida Entomology*, 69: 285-292.

- Chiranjeevi, C., Reddy, D.D. R., Gour, T.B., Reddy, Y.N. and Sultana, A., 2003. Comparative biology of sweet potato weevil *Cylas formicarius* Fabricius on vines and tubers of sweet potato. *Journal of Research Angrau.*, 31: 2, 17-21.
- Cockerham, K.L., O.T. Deen, M.B. Christain, and L.D. Newsom, 1954. The biology of the sweet potato weevil. Louisiana Agricultural Experiment Station Technical Bulletin, 483, 30 pp.
- Diaz, Sanchez J., and H. G. Ravelo, 1986. An isolate of *Beauveria bassiana* Bals (Vuill.) as a pathogen of *Cylas formicarius elegantulus* Summer. *Centro Agricola*, 13: 94-95.
- Downham, M.C.A., N.J.E.M. Smit, P.O. Laboke, and B. Odongo, 2001. Reduction of preharvest infestations of African sweetpotato weevils *Cylas brunneus* and *C. puncticollis* (Coleoptera: Apionidae). *Crop protection*, 20: 163-166.
- Dumas, C., K.V. Matha, J.M. Quiot, and A. Vey, 1996. Effect of destruxins, cyclic depsipeptic mycotoxins. On: Calcium balance and phosphorylation of intracellular proreins in Lepidopteran cell lines. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 114: 213-219.
- Dương Minh, 1999. Giáo trình môn học Hoa màu. Phần khoai lang. Chương 4: Kỹ thuật canh tác. Trường Đại học Cần Thơ. Trang 78-88.
- Dwayne, D. Hegedus, and George G. Khachatourians, 1993. Identification of molecular variants in mitochondrial DNAs of members of the genera *Beauveria*, *Verticillium*, *Paecilomyces*, *Tolypocladium* and *Metarhizium*. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(12): 4283-4288.
- Eguchi, M., 1992. Protein protease inhibition the silkworm with special reference to the characteristics to the fungal protease inhibition of *Bombyx mori*. *Indian Journal of Sericulture*, 31(2): 93-95.
- Ferron, P., 1978. Biological control of insect pests by entomogenous fungi. *Annual Review of Entomology*, 23: 409-442.
- Furlong, M.J., J.K. Pell, P.C. Ong, and A.R. Syed, 1995. Field and laboratory evaluation of a sex pheromone trap for the autodissemination of the fungal entomopathogen *Zoophthora radicans* (Entomophthorales) by the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Yponomeutidea). *Bull. Entomol. Res.*, 85: 331-337.
- Hà Quang Hùng, 2005. Giáo trình dịch học bảo vệ thực vật, Nhà xuất bản Nông Nghiệp. Hà Nội, 143 trang.
- Heath, P.R., J.A. Coffelt, P.E. Sonnet, E.I. Proshold, B. Dueben, and J.H. Tumlinson, 1986. Identification of sex pheromone produced by female sweet potato weevil, *Cylas formicarius elegantulus* (Summers). *Journal of Chemical Ecology*, 12(6): 1489-1503.

- Heath, R.R., 1992. USDA ARS, Insect Attractant, Behavior and Basic Biology. *Research Laboratory*, pp. 81-87.
- Hedlund, R.C., and B.C. Pass, 1968. Infection of the alfalfa weevil, *Hyperapostica* by the fungus *Beauveria bassiana*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 11: 25-34.
- Hoog, G.S., J. Guarro, J. Gene, and M.J. Figueras, 2000. Atlas of Clinical Fungi. 2nd ed. CBS, Utrecht, the Netherlands. 1126 p.
- <http://www.khoailangbahao.com.vn>.
- Huỳnh Thị Ngọc Linh, 2010. Đánh giá hiệu quả phòng trị pheromone giới tính tổng hợp và nấm xanh (*Metarhizium anisopliae* Sorokin) đối với sùng khoai lang (*Cylas formicarius* Fabricius). Luận văn thạc sĩ khoa học nông nghiệp, trường Đại học Cần Thơ. 62 trang.
- Huỳnh Thị Ngọc Linh, Châu Nguyễn Quốc Khánh, Nguyễn Thị Huyền Trang, Phạm Kim Sơn và Lê Văn Vàng, 2012. Nghiên cứu điều kiện thích hợp cho việc áp dụng pheromone giới tính của sùng khoai lang, *Cylas formicarius* Fab., trên đồng ruộng. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 21b: 54- 61.
- Hwang, J.S., and C.C. Hung, 1991. Evaluation of the effect of integrated control of sweet potato weevil, *Cylas formicarius* Fabricius, with sex pheromone and insecticide. *Chinese Journal of Entomology*, 11: 140-146.
- Hwang, J.S., 2000. Integrated Control of Sweetpotato Weevil, *Cylas formicarius* Fabricius with Sex Pheromone and Insecticide. In: Extension Bulletin, *Food and Fertilizer Technology Center*, for the Asian and Pacific Region. Taiwan. 13 p.
- Ignoffo, C.M., 1992. Environmental factors affecting persistence of entomopathogens. *Florida Entomologist*. 75(4): 516-525.
- Jackson, D., and J. Bohac, 2007. Evaluation of pheromone traps for monitoring sweetpotato weevil. *Journal of Agriculture and Urban Entomology*. 23(3): 141-158.
- Jansson, R.K., 1991. Biological control of *Cylas* spp., p. 169-201, In: R.K. Jansson and K.V. Raman (eds.). Sweet Potato Pest Management. Oxford & IBH Publishing, New Delhi.
- Jansson, R.K., 1992. Biological approaches for management of weevils of root and tuber crops: A review. *Florida Entomologist*, 75(4): 568-584.
- Jansson, R.K., L.J. Mason, R.R. Heath, S.H. Lecrone, and D.E. Forey, 1993. Pheromone trap monitoring system for sweetpotato weevil (Coleoptera: Apionidae) in the Southern united states: effects of lure type, age and duration in storage. *Journal of Economic Entomology*, 86(4): 1109-1115.
- Jansson, R.K., L.J. Mason, R.R. Heath, K.A. Sorensen, A. Kenneth, A.M. Hammond, and J.V. Robinson, 1992. Pheromone trap monitoring system

- for sweetpotato weevil (Coleoptera: Apionidae) in the Southern United State: effects of trap type and pheromone dose. *Journal of Economic Entomology*, 85(2): 416-423.
- Jansson, R.K., R.R. Heath, and J.A. Coffelt, 1989. Temporal and spatial patterns of sweetpotato weevil (Coleoptera: Curculionidae) counts in pheromone baited traps in white fleshed sweet potato fields in Southern Florida. *Environmental Entomology*, 18(4): 691-697.
- Jaronski, S.T., 2010. Ecological factors in the inundative use of fungal entomopathogens. *Biocontrol*, 55: 159-185.
- Jansson, R.K., L.J. Mason, and R.R. Heath, 1991. Use of sex pheromone for monitoring and managing *Cylas formicarius*, p. 97-138. In: R.K. Jansson and K.V. Raman (eds.), Sweet potato pest management: a global perspective. Westview Press, Boulder and London, 458 p.
- Kakizaki, M., 2007. Mass trapping. Encyclopedia of pest management . Vol. 1.
- Kao, S.S., Y.S. Tsai, P.S. Yang, B.C. Wang, and J. Hua, 1998. User's guide of commonly occurred entomopathogenic fungi in Taiwan. *Food Industry Research and Development Institute*, Hsinchu, Taiwan, ROC, 120 p.
- Kershaw M.J., Moorehouse E.R., Bateman R., Reynolds S.E., Charnley A.K. (1999). The role of destruxins in the pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* for three species of insect. *Journal Invert. Pathol.* 74:213–223.
- Lagnaoui, A., F. Cisnerros, J. Alcázar, and F. Morales, 2000. A sustainable pest management strategy for sweet potato weevil in Cuba: A success story, pp. 3-13. In: Chien-The, C. Control of weevils in sweet potato production. Proc. 12th Int. Symp. Int. Soc. Trop. Root Crops. Tsukuba. Japan.
- Lê Tấn Hưng, Võ Thị Hạnh, Lê Thị Bích Phượng, Trần Thanh Phong, Trương Thị Hồng Vân và Somsak Sivichai, 2010. Nấm côn trùng tại Vườn quốc gia Cát Tiên: Nguồn tài nguyên quý giá cho các ứng dụng sinh học. Hội nghị Khoa học kỷ niệm 35 năm. Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Hà Nội.
- Lê Thị Thanh Hiền, Lê Vĩnh Thúc và Nguyễn Bảo Vệ, 2014. Điều tra kỹ thuật canh tác và khảo sát dinh dưỡng kali, canxi trên khoai lang (*Ipomoea batatas* Lam.) tại huyện Bình Tân, tỉnh Vĩnh Long. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. Nông nghiệp (2014) (4): 14-23.
- Le Van Vang, M.D. Azharul Islam, Nguyen Duc Do, Tran Van Hai, Shinji Koyano, Yoshiki Okahana, Nobuo Ohbayashi, Masanobu Yamamoto, and Tetsu Ando, 2008. 7,11,13-Hexadecatrienal identified from female moths of the citrus leafminer as a new sex pheromone component: synthesis and field evaluation in Vietnam and Japan. *Journal of Pesticide Science*, 33(2): 152-158.

- Lê Văn Vàng, 2016. Nghiên cứu và ứng dụng hóa chất tín hiệu của côn trùng trong bảo vệ thực vật ở đồng bằng sông Cửu Long. *Trong: Quản lý dịch hại cây trồng thân thiện với môi trường*. Nhà xuất bản Đại Học Cần Thơ.
- Lê Văn Vàng, Nguyễn Đức Độ, Phạm Kim Sơn, Nguyễn Trọng Nhân và Lăng Cảnh Phú, 2006. Tổng hợp (7Z)-7-tetradecenal, pheromone giới tính của bướm sâu đục vỏ trái bưởi *Prays citri* Millière (Lepidoptera: Yponomeutidae). Hội thảo quốc gia Bệnh cây và Sinh học phân tử. Nhà xuất bản Nông Nghiệp, trang 134-141.
- Leger, R.J., A.K. Charnley, and R.M. Cooper, 1986. Cuticle degrading enzymes of entomopathogenic fungi synthesis in culture on cuticle. *Journal of Invertebrate Pathology*, 48: 85-95.
- Lo, C.C., Hung, M.D., and Liu, C.J., 1992. Replacement of carcinogenic alkylating agent ethylene oxide in the synthesis of (Z)-3-dodecen-1-yl (E)-2-butenate, sex pheromone of sweet potato weevil, *Cylas formicarius elegantulus* (Summers) and *Cylas formicarius* (F.). *Journal of Chemical Ecology*, 18(2): 95-103.
- Luangsa, A.J.J., K. Tasanathai, S. Mongkosamrit, S. Sivichai, and H.J. Nigel, 2006. Workshop on the collection, Isolation. Cultivation and identification of insect pathogenic fungi. Biotect Thailand and Vast Ho Chi Minh City, Vietnam, p. 1-13.
- Maeto, K., and T. Uesato, 2007. A new species of Bracon (Hymenoptera: Braconidae) parasitic on alien sweetpotato weevils in the south-west islands of Japan. *Entomological Science*, 10: 55-63.
- Mai Thạch Hoàn, 2001. Cây khoai lang: các côn trùng gây bệnh và những rối loạn dinh dưỡng chủ yếu. Nhà xuất bản Văn hóa Dân tộc. Hà Nội, trang 7-9.
- Marcano, D.A., J.A. Marcano, and M. Morales, 1999. Pathogenicity of *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus* on adults of sweet potato weevil, *Cylas formicarius elegantulus* Summers (Curculionidae). *Revista de la Facultad de Agronomia. Rev. Fac. Agron.*, 16(1): 52-63.
- Mason, L.J., and R.K. Jansson, 1991. Disruption of sex pheromone communication in *Cylas formicarius* (Coleoptera: Apionidae) as a potential means of control. *Florida Entomology*, 74: 469-472.
- Matsumoto, K., K. Nakamura, and T. Nakashima, 2007. Mating disruption controls the cherry tree borer, *Synanthedon hector* (Butler) (Lepidoptera: Sesiidae), in a steep orchard of cherry trees. *Journal of Forest Research*, 12: 34-37.
- Milner, J.R., G. Pierrad, A. Baw, and M. Chit, 1992. The potential of *Metarhizium anisopliae* for the control of scarab pest of groundnut of Myanmar (Burma), pp. 277-280. *In: T.A. Jackson and R.T. Glare (eds.). Use of pathogens in scarab pest management*. Intercept, Andover, Great Britain. 298 p.

- Mithran, S., and A.S. Subbaraman, 1999. Synthesis of (3Z)-Dodecenyl-(E)-2-butenate, the pheromone of Sweet Potato Weevil. *Molecules*, 4: 159-164.
- Miyatake, T., 2001. Effects of starvation on death-feigning in adults of *Cylas formicarius* (Coleoptera: Brentidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 94(4): 612-616.
- Miyatake, T., K. Kawasaki, T. Kohama, S. Moriya, and K. Shimoji, 1995. Dispersal of male sweetpotato weevil (Coleoptera: Curculionidae) in field with oryctes rhinoceros without sweet potato plants. *Environmental Entomology*, 24(5): 1167-1174.
- Moriya, S., and S. Hiroyoshi, 1998. Flight and locomotion activity of the sweetpotato weevil (Coleoptera: Brentidae) in relation to adult age, mating status, and starvation. *Journal Economic Entomology*, 91: 439-443.
- Mullen, M.A., 1981. Sweet potato weevil, *Cylas formicarius elegantulus* (Summers): development, fecundity, and longevity. *Annals of the Entomological Society of America*, 74: 5, 478-481.
- Niên giám thống kê tỉnh Vĩnh Long, 2014. Cục Thống kê tỉnh Vĩnh Long. Nhà xuất bản Văn hóa Dân tộc.
- Nguyen Cong Hao, Nguyen Cuu Thi Huong Giang, Nguyen Cuu Khoa, and Nguyen Thanh Son, 1996. Synthesis and application of insect attractants in Vietnam. *Resources, Conservation and Recycling*, 18: 59-68.
- Nguyễn Đức Khiêm, 2006. Giáo trình côn trùng học nông nghiệp. Nhà xuất bản Nông Nghiệp. Hà Nội, 268 trang.
- Nguyễn Thị Thu Cúc, 2010. Giáo trình Côn trùng đại cương. Nhà xuất bản Đại Học Cần Thơ. Cần Thơ, trang 85-86.
- Nguyễn Quốc Tuấn, 2012. Hiệu lực kết hợp của pheromone giới tính và nấm xanh (*Metarhizium anisopliae* Sorok.) trong phòng trị sùng khoai lang (*Cylas formicarius* Fab.) tại An Giang và Trà Vinh. Luận văn thạc sĩ khoa học nông nghiệp, Trường Đại Học Cần Thơ. 55 trang.
- Nguyễn Văn Đĩnh, 2005. Nghiên cứu thành phần sâu hại khoai lang và kỹ thuật mới phòng ngừa bọ hà hại khoai lang (*Cylas formicarius* F.). Tạp chí Bảo Vệ Thực Vật số 5.
- Nguyễn Văn Huỳnh và Lê Thị Sen, 2011. Côn trùng gây hại cây trồng. Nhà xuất bản Nông Nghiệp. TP. Hồ Chí Minh, trang 74-76.
- Nguyễn Viết Tùng, 2006. Giáo trình côn trùng học đại cương. Nhà xuất bản Nông nghiệp. 239 trang.
- Ondiaka, S., N. Maniania, G. Nyamasyo, and J. Nderitu, 2008. Virulence of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* to sweetpotato weevil, *Cylas puncticollis* and effects on fecundity and egg viability. *Annals of Applied Biology*. 153(1): 41-48.

- Palaniswami, M.S., P. Rajamma, and K.S. Pillai, 1988. Biological agents of the pests of tropical tuber crops in India: a review. *Journal of Root Crops*, 14(2): 41-46.
- Parker, B.L., G.W. Wolfe, and A. Abubaker, 1992. Occurrence of *Cylas formicarius* (F.) (Coleoptera: Apionidae) in Central and Southern Africa. *Journal of Applied Entomology*, 114: 400-402.
- Phạm Thị Thùy, 2004. Công nghệ sinh học trong bảo vệ thực vật. Nhà xuất bản Đại Học Quốc Gia. Hà Nội, trang 109-146.
- Pillai, K.S., P. Rajamma, and M.S. Palaniswami, 1993. New technique in the control of the sweet potato weevil using synthetic sex pheromone in India. *Int. Journal Pest Management*, 39: 84-89.
- Proshold, F.I., J.L. Gonzalez, C. Asencio, and R.R. Heath, 1986. A traps for monitoring the sweetpotato weevil (Coleoptera: Curculionidae) using pheromone or live female as bait. *Journal of Economic Entomology*. 79(3): 641-647.
- Rajasekhara, Rao Korada, S.K. Naskar, M.S. Palaniswami, and R.C. Ray, 2010. Management of Sweet Potato Weevil, *Cylas formicarius* (Fab.): An Overview. *Indian Society for Root Crops*, 36(1): 14-26.
- Rana, R.L., and L.T. Villacarlos, 1991. Effect of *Metarhizium anisopliae* (Metch) Sorokin infection on the fecundity and survival of the sweet potato weevil, *Cylas formicarius* (Fab.) (Coleoptera: Curculionidae). *Philippines Entomologist*, 8(3): 963-972.
- Reddy, G.V.P., Nirupa Gadi, Anthony J. Taianao, 2012. Efficient sex pheromone trapping: catching the sweetpotato weevil, *Cylas formicarius*. *Journal Chemical Ecology*, 38: 846-853.
- Rombach, M.C., A.R. Humber, and D.W. Roberts, 1986. *Metarhizium flavoride* var. *minus* var. *nov.*, a pathogen of plant and leafhoppers on rice in Philippines and Solomon Islands, *Mycotaxonomy*, 27: 87-92.
- Rombach, M.C., R.M. Aguda, and D.W. Roberts, 1988. Production of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) in different liquid media and subsequent conidiation of dry mycelium. *Entomophaga*. 33: 315-324.
- Samson, R.A., 1981. Identification: Entomopathogenic Deuteromycetes. Chap. VI. In Burges, H.D. (ed.), *Microbial Control of Pests and Plant Diseases*, 1970-1980, Academic Press. New York, pp. 93-107.
- Samson, R.A., H.C. Evans, and J.P. Latge, 1988. Atlas of Entomopathogenic Fungi. Springer Verlag, Berlin. Heidelberg, New York, 187 p.
- Sato K., Uritani I., and Saito T., 1982. Properties of terpene-inducing factor extracted from adults of the sweet potato weevil, *Cylas formicarius* Fabricius (Coleoptera: Brentidae). *Applied Entomology and Zoology*, 17(3): 368-374.

- Sherman, M., and M. Tamashiro, 1954. The Sweet Potato Weevils in Hawaii, their Biology and Control. University of Hawaii Technical Bulletin, 23. 36 p.
- Singh, V. K., Sharma, R. C. and Ram, S., 2001. Studies on biology of sweet potato weevil *Cylas formicarius* Fab. (Coleoptera: Curculionidae). *Annals of Plant Protection Sciences*, 9: 1, 8-11.
- Smit, N.E.J.M., M.C.A. Downham, P.O. Laboke, D.R. Hall, and B. Odongo, 2001. Mass trapping male *Cylas* spp. with sex pheromones: a potential IPM component in sweetpotato production in Uganda. *Crop Protection*. 20: 643-651.
- Smit, N.E.J.M., 1997. Integrated pest management for sweetpotato in Eastern Africa. Ph.D. Thesis, Wageningen Agricultural University. The Netherlands, 151 p.
- Snow, J.W., 1990. Peach tree borer and lesser peach tree borer control in the United States. *In: Behavior modifying chemicals for insect management*. Ridgway, R. I., Silverstein, R.M. and Inscoe, M.N. (eds.) Marcel Dekker, New York, p. 241-253.
- Sorensen, K.A., 2009. Sweetpotato insects: identification, biology and management. *In: Loebenstein G., Thottappilly G. (eds.) The Sweet potato*. Springer Verlag New York Inc. New York, p. 161-188.
- Stathers, T.E., D. Rees, and D. Jeffries, 1999. Investigating the potential of cultivar differences in susceptibility to sweetpotato weevil as a means of control. Department for International Development (DFID), Natural Resources Institute (NRS), Final Technical Report R6769.
- Su, C.Y., 1991. Field application of *Beauveria bassiana* for control of sweet potato weevil, *Cylas formicarius*. *Chinese Journal Entomol.*, 11: 174-178.
- Su, C.Y., S.S. Tzean, and W.H. Ko, 1988. *Beauveria bassiana* the lethal factor in a Taiwanese soil pernicious to sweet potato weevil, *Cylas formicarius*. *Journal Invertebrate Pathology*, 52: 195-197.
- Sureda, Tania, Carmen Quero, Ma. Pilar Bosch, Rubén Avilés, Francisco Coll, Michel Renou, and Ángel Guerrero, 2006. Electrophysiological and Behavioral Responses of a Cuban Population of the Sweet Potato Weevil to its Sex Pheromone. *Journal Chemical Ecology*, 32: 2177-2190.
- Sutherland, J.A., 1986. Damage by *Cylas formicarius* Fab. to sweet potato vines and tubers, and the effect of infestations on total yield in Papua New Guinea. *Tropical Pest Management*, 32: 316-323.
- Talekar, N.S., 1983. Infestation of sweet potato weevil (Coleoptera: Curculionidae) as influenced by best management techniques. *Journal of Economic Entomology*, 70: 342-344.
- Tamerler, C., M. Ullah, M.W. Adlard, and T. Keshavarz, 1998. Effect of pH on

- physiology of *Metarhizium anisopliae* for production of swainsonine. *FEMS Microbiology Letter*, 168(1): 17-23.
- Teli, V.S., and G.N. Salunkhe, 1993. Monitoring adults of sweet potato weevil, *Cylas formicarius* Fab. with sex pheromone. *Journal of Insect Science*, 6: 283-284.
- Trần Thị Thanh, 2000. Công nghệ vi sinh. Nhà xuất bản Giáo Dục, trang 65-75.
- Trần Văn Hai, Trịnh Thị Xuân và Phạm Kim Sơn, 2006. Tạo sinh khối và thử nghiệm hiệu lực của một số loại nấm ký sinh trên sâu ăn tạp và rầy mềm hại rau cải tại TP. Cần Thơ. Tạp chí nghiên cứu khoa học, trường ĐHCT.
- Trần Văn Hai, Trịnh Thị Xuân và Phạm Kim Sơn, 2009. Khảo sát đặc tính sinh học và hiệu lực của một số chủng nấm xanh *Metarhizium anisopliae* Sorok. và nấm trắng *Beauveria bassiana* Vuill. đối với sùng đất *Lepidoptera cochinchinae* Brenske hại rễ đậu phộng và bắp. Tạp chí khoa học trường Đại Học Cần Thơ. 11: 63-70.
- Trần Văn Mão, 2002. Sử dụng côn trùng và vi sinh vật có ích. Tập II. Sử dụng vi sinh vật có ích. Nhà xuất bản Nông nghiệp. 300 trang.
- Tulloch, M., 1976. The genus *Metarhizium*. Transactions of the British Mycological Society, 66(3): 407-411.
- Villacarlos, L.T., and M.F.U. Granados Polo, 1989. Potential of *Metarhizium anisopliae* for the control of sweet potato weevil, *Cylas formicarius* (Fab.) (Curculionidae: Coleoptera). *Philippines Journal of Crop Science*. 14(3): 109-114.
- Wakamura, S., 1992. Development in application of synthetic sex pheromone to pest management. *Japan Pest Information*, 61: 26-31.
- Walstad, J.D., R.F. Anderson, and W.J. Stambaugh, 1970. Effects of environmental conditions on two species of muscardine fungi (*Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*). *J. Invertebr. Pathol.*, 16: 221-226.
- Witzgall, P., Kirsch, P., and Cork, A., 2010. Sex Pheromones and Their Impact on Pest Management. *Journal of Chemical Ecology*, 36(1): 80-100.
- Wolfe, G.W., 1991. The origin and dispersal of the pest species of *Cylas* with key to the pest species groups of the world. In: Jansson R.K., Raman, K.V., (eds.) Sweet Potato Pest Management: A Global Perspective. Boulder, USA: Westview Press.
- Yasuda, K., 1995. Mass trapping of the Sweet Potato Weevil *Cylas formicarius* (Fabricius) (Coleoptera: Brentidae) with a synthetic sex pheromone. *Applied Entomology and Zoology*, 30: 31-36.
- Yasuda, K., 1999. Auto-infection system for the sweet potato weevil, *Cylas formicarius* Fabricius (Coleoptera: Curculionidae) with entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana*, using a modified sex pheromone trap in the field. *Applied Entomology and Zoology*, 34: 501-505.

- Yasuda, K., 2000. Integrated Pest Management of West Indian Sweet Potato Weevil *Euscepes postfasciatus* (Fairmaire) and Sweet Potato Weevil *Cylas formicarius* (Fabricius) in Okinawa, Japan. *Food and Fertilizer Technology Center*, Taiwan. p. 8-14.
- Yasuda, K., H. Sugie, and R.R. Heath, 1992. Field evaluation of synthetic sex attractant pheromone of the sweetpotato weevil *Cylas formicarius* Fabricius (Coleoptera: Brentidae). *Japanese Journal of Applied Entomology and Zoology*, 36: 81-87.
- Yasuda, K., T. Hongo, and N. Etoo, 2004. A new type of pheromone formulation with visual stimulation for control of sweet potato weevil, *Cylas formicarius* (Fabricius). *Japanese Journal of Applied Entomology and Zoology*, 48(2): 287-293.
- Yasuda, K., T. Toyosato, and K. Takaesu, 2000. Enhanced infectivity of oil formulation of *Beauveria bassiana* to *Cylas formicarius* (Fabricius) (Coleoptera: Curculionidae). *Japanese Journal of Applied Entomology and Zoology*, 44(4): 241-243.
- Yasuda, K., K. Takayesu, and K. Uehara, 1997. Effects of Temperature, Humidity and Conidial Density on Infection by *Beauveria bassiana* of Adult Sweet Potato Weevil, *Cylas formicarius* (Fabricius) (Coleoptera: Curculionidae). *Japanese Journal of Applied Entomology and Zoology*, 41(1): 55-58.
- Yasuhisa K., 2005. Current status and prospects on the use of insect pathogens as biocontrol agents, Tokyo University of Agriculture and Technology.
- Yoshinori, T., and Harry, K. Kaya, 1993. *Insect Pathology*. Academic Press Inc. Printed in the United States of America. 665 p.
- Yubak, G.C.D., 2006. White grubs (Coleoptera: Scarabaeidae) associated with Nepalese agriculture and their control with the indigenous entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin. Ph.D. Thesis. Basel University, Thụy Sĩ, p. 12-32.
- Zimmerman, E.C., 1994. Australian weevils (Coleoptera: Curculionidae) Volume II. Eurhynchidae, Aionidae, and a Chapter on immatures stages by Brenda May, CSIRO, Australia. 755 p.

Phụ lục A
PHIẾU ĐIỀU TRA TÌNH HÌNH CANH TÁC KHOAI LANG
CỦA NÔNG DÂN TẠI HUYỆN BÌNH TÂN, VĨNH LONG

Người điều tra:.....Ngày điều tra:.....

I. ĐIỀU TRA CƠ BẢN

- Tên nông dân:.....Năm canh tác:.....
- Địa chỉ:
- Diện tích trồng:.....Số vụ/ năm:.....
- Loại giống:.....Thời gian sinh trưởng:.....ngày
- Ngày xuống giống:.....
- Loại đất trồng:.....Cây trồng vụ trước:.....
- Luân canh: Không Có Loại cây:.....

II. BIỆN PHÁP CANH TÁC

- Xử lý đất:.....
-
-
- Bề rộng luống:.....Chiều cao luống.....Khoảng cách giữa 2 luống.....
- Nguồn hom Tự cung cấp Mua nơi khác
- Xử lý hom:.....
- Xử lý ra củ (tạo củ):.....
-
- Xử lý dây nuôi củ: Nhắc dây Cắt dây or ngắt dọt
 Xịt thuốc cỏ. Loại thuốc
- Nước tưới:.....
- Cách tưới:
- Thời gian tưới:
- Khoảng cách giữa các lần tưới:.....
- Bón phân:.....
- * Phân hữu cơ: Có Không

Đợt bón	Loại phân	Cách bón	Liều lượng	Ngày sau khi trồng
Lần 1				
Lần 2				
Lần 3				

* Phân vô cơ:

Đợt bón	Loại phân	Cách bón	Liều lượng	Ngày sau khi trồng
Lần 1				
Lần 2				
Lần 3				
Lần 4				
Lần 5				

- Xử lý ruộng sau thu hoạch:

III. TÌNH HÌNH DỊCH HẠI

1. Bệnh hại:

- 1-
- 2-
- 3-
- 4-

- Bệnh gây hại nhiều nhất:

- Cách phòng trị:

2. Côn trùng hại:

- 1-
- 2-
- 3-
- 4-

- Côn trùng gây hại nhiều nhất

- Cách phòng trị:

3. Cỏ dại:

- Các loài cỏ dại gây hại chủ yếu:

.....

- Loài cỏ dại gây hại nhiều nhất:

- Cách phòng trị

.....

IV. KINH TẾ

1. Năng suất:

Vụ trước: Vụ hiện nay:

2. Tổng chi phí

- Phân: - Giống:

- Thuốc: - Nhân công:

- Khác:

3. Thiệt hại do sùng khoai lang gây ra:

- Tỷ lệ sùng gây hại ở vụ trước:

- Chi phí phòng trị sùng:

- Biện pháp xử lý sùng trong thời gian neo củ:

4. Quan điểm của nông dân về pheromone hấp dẫn SKL:

- Nông dân có hiểu biết về pheromone hấp dẫn SKL không?:

+ Hiểu biết như thế nào?:

+ Hiểu biết từ đâu?:

- Nông dân đã từng áp dụng pheromone hấp dẫn SKL chưa?:

- Áp dụng như thế nào (nếu có áp dụng)?:

+ Có hiệu quả không?

Vì sao?:

- Nông dân có đồng ý áp dụng pheromone hấp dẫn SKL không?:

Vì sao?

Chân thành cảm ơn sự hợp tác của cô chú!

**PHIẾU ĐIỀU TRA CÔN TRÙNG HẠI VÀ THIÊN ĐỊCH TRÊN
KHOAI LANG TẠI HUYỆN BÌNH TÂN, VĨNH LONG**

Tên chủ ruộng:.....Người điều tra:.....

Địa chỉ:.....Ngày điều tra:.....

Diện tích:.....

Giống:.....

Ngày xuống giống:.....

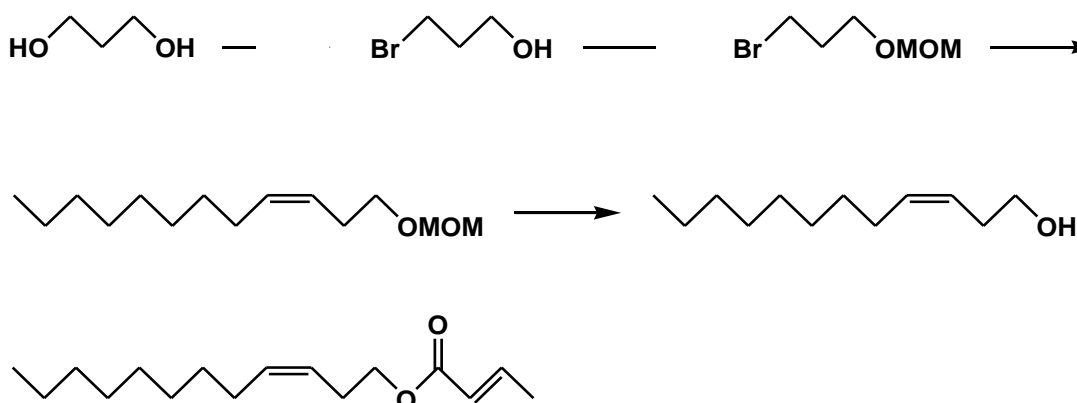
Nghiệm thức xử lý:.....

Côn trùng gây hại	Mức độ gây hại					Ghi chú
	1	2	3	4	5	
Sùng khoai lang Sâu ăn tạp Miềng kiếng xanh Miềng kiếng vàng Sâu sừng Sâu đục dây Rầy mềm Rầy phấn trắng Sâu xếp lá						
Thiên địch	Mức độ xuất hiện					Ghi chú
	1	2	3	4	5	
Nhện bắt mồi Bọ rùa ăn thịt Ong kí sinh Kiến ba khoang Bọ đuôi kìm						

Phụ lục B
TỔNG HỢP PHEROMONE GIỚI TÍNH CỦA
SỪNG KHOAI LANG TRONG PTN

1. Tổng quát con đường tổng hợp (Z)-3-Dodecenyyl-(E)-2-Butenoate

Sự tổng hợp (Z)-3-dodecenyyl (E)-2-butenolate thông qua phản ứng Wittig được thực hiện theo con đường trình bày trong Hình 2.1. Sau khi brom hóa một nhóm -OH của hợp chất 1,3-propanediol (1), nhóm -OH còn lại được bảo vệ bằng Ether của Dimethoxymethane (-MOM) (2). Đun hợp chất (2) và Triphenylphosphine trong Benzen ở 110⁰C trong 48 giờ để thu được muối Phosphorane, hợp chất (3). Hợp chất (3) sau đó được kết hợp với 1-nonanal thông qua phản ứng Wittig với Sodium Bis(trimethylsilyl)amide được sử dụng làm môi trường bazơ thu được MOM-ether của (Z)-3-dodecenyyl-1-ol (4). Sau khi loại bỏ sự bảo vệ nhóm OH của MOM-ether, (Z)-3-dodecenyyl-1-ol (5) kết hợp với hợp chất Crotonyl chloride bằng phản ứng ester hóa trong dung môi CH₂Cl₂ dưới môi trường kiềm của Pyridine để tạo thành (Z)-3-dodecenyyl (E)-2-butenolate.



Hình 1: Con đường tổng hợp hợp chất (Z)-3-dodecenyyl (E)-2-butenolate, pheromone giới tính của sùng khoai lang

a = HBr/Toluene; b = DMM/LiBr/*p*-TsOH;

c = PPh₃/Sodium Bis(trimethylsilyl)amide/1-nonanal/THF;

d = Crotonyl chloride/Pyridine/CH₂Cl₂.

2. Tổng hợp pheromone giới tính của sùng khoai lang

2.1. Điều chế hợp chất 3-Bromo-propan-1-ol (2)

Chất 1,3-propanediol (3 g, 39,4 mmol) và HBr (48%) (6,6 g, 39,4 mmol) được khuấy trong Toluene (100 ml) ở 110⁰C trong 12 giờ. Sau khi để nguội xuống nhiệt độ phòng, hỗn hợp được chuyển vào phễu ly trích, thêm vào 100 ml nước muối bão hòa, lắc đều rồi tách lấy phần hữu cơ. Phần dung dịch nước

còn lại được thêm vào 100 ml *n*-hexane, lắc đều và tách lấy phần hữu cơ, lặp lại 3 lần. Phần dung môi hữu cơ được lọc qua một cột nhồi Sodium sulfate (Na_2SO_4) để loại bỏ toàn bộ nước và các chất rắn, cô đặc và làm tinh khiết bằng cột sắc ký mở sử dụng Silicagel làm pha tĩnh thu được 3-Bromo-propan-1-ol (**2**) (2,8 g, 20,1 mmol) đạt năng suất 51%.

- Dữ liệu GC-MS. *m/z*: 27, 31, 41, 58, 120 (base) và 122.

- Dữ liệu NMR:

+ Phổ ^1H NMR (Bảng 2.1).

Bảng 2.1: Dữ liệu phổ ^1H NMR của hợp chất 3-Bromo-propan-1-ol

Chemical shift (δ :ppm)	Số lượng Hydro	Kiểu peak	Kiểu bắt cặp	Hằng số (<i>J</i> :Hz)	Proton ^a
2,05-2,13	2	tt	v	6,53, 6,37	$\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$
3,53-3,57	2	t	v	6,58	$\text{HO-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$
3,77-3,82	2	t	v	6,15	$\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-Br}$

Ghi chú: ^a*H* (đậm và nghiêng) chỉ proton mà các thông số trong bảng biểu diễn.
t = triplet; *v* = vicinal.

+ Phổ ^{13}C NMR (Bảng 2.2).

Bảng 2.2: Dữ liệu phổ ^{13}C NMR của hợp chất 3-Bromo-propan-1-ol

Chemical shift (δ :ppm)	$^{13}\text{C}^a$
30,40	$\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$
34,96	$\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-Br}$
60,31	$\text{HO-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$

Ghi chú: ^a*C* (đậm và nghiêng) chỉ ^{13}C Carbon (^{13}C) là các thông số trong bảng biểu diễn.

2.2. Hợp chất 1-Bromo-3methoxymethoxy-propane (3)

Hỗn hợp của 3-Bromo-propan-1-ol (**2**) (2,8 g, 20,1 mmol), Lithium Bromide Monohydrate (220 mg, 2,1 mmol) và *p*-Tolunesofonic Acid Monohydrate (500 mg) được khuấy trong Dimthoxymethane (150 ml) ở nhiệt độ phòng trong 24 giờ. Sau đó, 150 ml nước muối được thêm vào, hỗn hợp được chuyển sang phễu ly trích để lắc và tách lấy phần hữu cơ. Phần dung dịch nước còn lại được thêm vào 100 ml *n*-Hexane, lắc đều và tách lấy phần hữu cơ, lặp lại 3 lần. Phần dung môi hữu cơ được lọc qua một cột nhồi Sodium sulfate (Na_2SO_4) để loại bỏ toàn bộ nước và các chất rắn, cô đặc và làm tinh khiết bằng cột sắc ký mở sử dụng Silicagel làm pha tĩnh thu được 1-Bromo-3 methoxymethoxy-propane (**3**) (3,38 g, 18,5 mmol) đạt năng suất 92%.

- Dữ liệu GC-MS. m/z : 29, 41, 45 (base), 75, 121, 123, 152, 154, 181 và 183.
- Dữ liệu NMR:
- + Phổ ^1H NMR (Bảng 2.3).

Bảng 2.3: Dữ liệu phổ ^1H NMR của hợp chất 1-Bromo-3 methoxymethoxy-propane

Chemical shift (δ :ppm)	Số lượng Hydro	Kiểu peak	Kiểu bắt cặp	Hằng số (J :Hz)	Proton ^a
2,08-2,17	2	tt	v	6,84, 6,23	$\text{CH}_3\text{-O-}$
3,37	3	s	-	-	$\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$
3,51-3,56	2	t	v	6,62	$\text{-O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$
3,64-3,69	2	t	v	6,19	$\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-Br}$
4,63	2	s	-	-	$\text{-O-CH}_2\text{-O-}$

Ghi chú: ^aH (đậm và nghiêng) chỉ proton mà các thông số trong bảng biểu diễn
t = triplet; *v* = vicinal.

+ Phổ ^{13}C NMR (Bảng 2.4).

Bảng 2.4: Dữ liệu phổ ^{13}C NMR của hợp chất 1-Bromo-3 methoxymethoxy-propane

Chemical shift (δ :ppm)	$^{13}\text{C}^a$
30,46	$\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$
32,75	$\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-Br}$
55,25	$\text{CH}_3\text{-O-}$
65,00	$\text{-O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$
96,47	$\text{-O-CH}_2\text{-O-}$

Ghi chú: ^aC (đậm và nghiêng) chỉ ^{13}C Carbon (^{13}C) là các thông số trong bảng biểu diễn

2.3. Hợp chất (Z)-3-dodecen-1-ol (4)

Hợp chất 1-Bromo-3methoxymethoxy-propane (**3**) (3,38 g, 18,5 mmol) được đun với Triphenylphosphine (4,9 g, 18,5 mmol) trong 100 ml Benzen ở nhiệt độ 110°C trong 48 giờ. Sau khi để nguội xuống nhiệt độ phòng, lượng Benzen trong bình phản ứng được gạn bỏ, hỗn hợp còn lại trong bình được rửa với 50 ml Benzen (3 lần), rồi loại bỏ toàn bộ Benzen bằng cách đặt bình phản ứng vào một buồng hút chân không. THF (50 ml) được thêm vào, điều kiện phản ứng được chuyển sang môi trường trơ của khí argon và đặt ở nhiệt độ $0\text{-}5^\circ\text{C}$, tiếp theo, dung dịch 1M của Sodium Bis(trimethylsilyl)amide trong THF (19 ml) được cho vào từng giọt. Đợi cho đến khi hỗn hợp trong bình hòa tan hoàn toàn và chuyển sang màu đỏ cam, 1-nonanal (2,63 g, 18,5 mmol) được

cho vào. Tiếp tục khuấy trong 1 giờ rồi thêm vào hỗn hợp 100 ml nước lạnh. Sau đó hỗn hợp được chuyển vào phễu ly trích để tách lấy phần hữu cơ. Phần nước còn lại trong phễu được ly trích tiếp với 100 ml *n*-Hexane (3 lần). Phần hữu cơ được rửa bằng cách lắc với dung dịch 1N HCl (100 ml) và NaHCO₃ (100 ml), cô đặc và làm tinh khiết bằng cột sắc ký mở, thu được 2,21 g (9,7 mmol) MOM ether của hợp chất (Z)-3-dodecen-1-ol (**4**) (hiệu suất 52,4%).

Hợp chất (**4**) được khuấy tiếp trong 20 ml dung dịch 0,5 N HCl trong Methanol 24 giờ. Sau đó thêm vào hỗn hợp 30 ml *n*-Hexane và 30 ml nước lạnh rồi chuyển sang phễu ly trích để tách lấy phần hữu cơ. Phần nước còn lại trong phễu được ly trích tiếp với 30 ml *n*-Hexane (3 lần). Phần hữu cơ được rửa bằng cách lắc với dung dịch NaHCO₃ (30 ml), cô đặc và làm tinh khiết bằng cột sắc ký mở, thu được hợp chất (Z)-3-dodecen-1-ol (**5**) với độ tinh khiết được kiểm tra bằng GC-MS > 99% (1,69 g 9,2 mmol), đạt hiệu suất 94,6%.

- Dữ liệu GC-MS: *m/z*: 29, 41, 55, 68 (base), 81, 95, 109, 123, 138, 166 và 184.

- Dữ liệu NMR:

+ Phổ ¹H NMR (Bảng 2.5).

Bảng 2.5: Dữ liệu phổ ¹H NMR của hợp chất (Z)-3-dodecen-1-ol

Chemical shift (δ:ppm)	Số lượng Hydro	Kiểu peak	Kiểu bắt cặp	Hằng số (J:Hz)	Proton ^a
0,86-0,90	3	t	v	7,27	CH ₃ -CH ₂ -
1,27-1,94	12	broad	-	-	CH ₃ CH ₂ -CH ₂ -
2,03-2,12	2	dt	v	7,53, 6,96	=CH-CH ₂ -CH ₂ -
2,30-2,37	2	td	v	6,84, 7,39	-CH ₂ -CH ₂ -CH=
3,62-3,67	2	t	v	7,43	HO-CH ₂ -CH ₂ -
5,374-5,46	1	td	vg	7,61, 11,57	-CH=CH-CH ₂ -
5,54-5,63	1	td	vg	7,4, 11,09	-CH ₂ -CH=CH-

Ghi chú: ^aH (đậm và nghiêng) chỉ proton mà các thông số trong bảng biểu diễn.
t = triplet; d = doublet; v = vicinal; g = germinal.

+ Phổ C¹³NMR (Bảng 2.6).

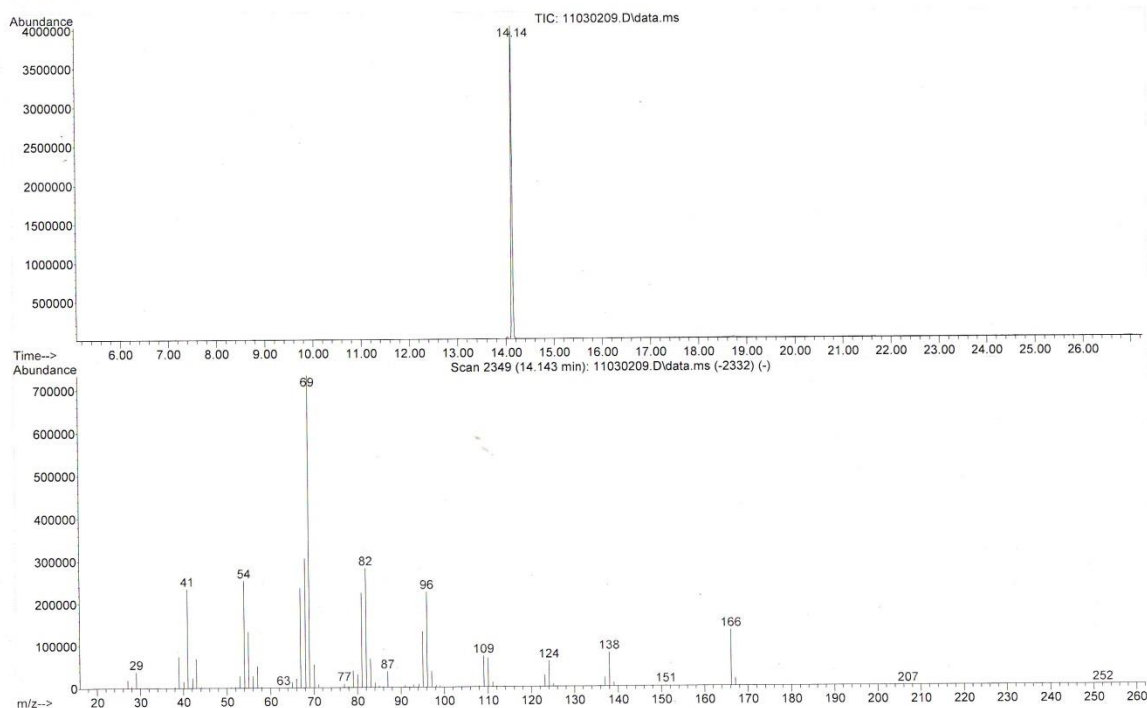
Bảng 2.6: Dữ liệu phổ ^{13}C NMR của hợp chất (Z)-3-dodecen-1-ol

Chemical shift (δ :ppm)	$^{13}\text{C}^a$
14,14	$\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-}$
22,72	$\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$
27,45	$\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH=}$
29,35	$\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$
29,37	$\text{=CH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$
29,55	$\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$
29,79	$\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$
30,80	$\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$
31,94	$\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$
62,30	$\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-OH}$
124.91	$\text{-CH}_2\text{-CH=CH-}$
133,35	$\text{-CH=CH-CH}_2\text{-}$

Ghi chú: ^aC (đậm và nghiêng) chỉ ^{13}C Carbon (^{13}C) là các thông số trong bảng biểu diễn.

2.4. Hợp chất (Z)-3-Dodecen (E)-2-butenoate (5)

File :D:\vang\11030209.D
 Operator : vang
 Acquired : 3 Mar 2011 1:04 using AcqMethod HAMA.K1.M
 Instrument : 5975C
 Sample Name: Z3-12-E2
 Misc Info : Fr3
 Vial Number: 1



Hình 2.2: Phổ GC-MS xác định độ tinh khiết của mẫu tổng hợp hợp chất Z3-12:E2 thông qua phản ứng Wittig

Cho vào dung dịch đang khuấy của (*Z*)-3-đoceten-1-ol (1,69 g 9,2 mmol) trong 30 ml CH₂Cl₂ và 5 ml Pyridine ở điều kiện nhiệt độ 0-5⁰C từng giọt Crotonyl chloride (1,15 g , 11 mmol). Sau khi khuấy 1 giờ, nước lạnh (30 ml) và *n*-Hexane (30 ml) được thêm vào. Hỗn hợp được chuyển vào phễu ly trích để tách lấy phần hữu cơ. Phần nước còn lại trong phễu được ly trích tiếp với 30 ml *n*-Hexane (3 lần). Phần hữu cơ được rửa bằng cách lắc với dung dịch NaHCO₃ (30 ml), cô đặc và làm tinh khiết bằng cột sắc ký mở, thu được hợp chất (*Z*)-3-Dodecen (*E*)-2-butenolate (**6**) với độ tinh khiết được kiểm tra bằng GC-MS >99% (1,86 g 9,2 mmol) (Hình 2.2), đạt hiệu suất 80,4%.

- Dữ liệu GC-MS. *m/z*: 29, 41, 54, 69 (base), 82, 96, 109, 124, 138, 166 và 252.

- Dữ liệu NMR:

+ Phổ ¹H NMR (Bảng 2.7).

Bảng 2.7: Dữ liệu phổ ¹H NMR của hợp chất (*Z*)-3-dodeceny (*E*)-2-butenolate

Chemical shift (δ:ppm)	Số lượng Hydro	Kiểu peak	Kiểu bắt cặp	Hằng số (J:Hz)	Proton ^a
0,85-0,90	3	t	v	7,39	CH ₃ -CH ₂ -
1,27	12	broad	-	-	CH ₃ CH ₂ -CH ₂ -
1,86-1,89	3	dd	vl	8,52, 1,5	-CH=CH-CH ₃
2,00-2,08	2	dt	v	7,57, 7,48	=CH-CH ₂ -CH ₂ -
2,36-2,44	2	td	v	7,35, 7,40	-CH ₂ -CH ₂ -CH=
4,09-4,14	2	t	v	8,13	-CH ₂ -CH ₂ - O-
5,30-5,40	1	td	vg	7,31, 12,3	-CH=CH-CH ₂ -
5,46-5,55	1	dt	gv	11,05, 7,44	-CH ₂ -CH=CH-
5,81-5,87	1	dt	gl	15,69, 1,59	O=C-CH=CH-CH ₂ -
6,91-7,03	1	qd	vg	6,97, 15,61	-CH=CH-CH ₃

Ghi chú: ^aH (đậm và nghiêng) chỉ proton mà các thông số trong bảng biểu diễn.

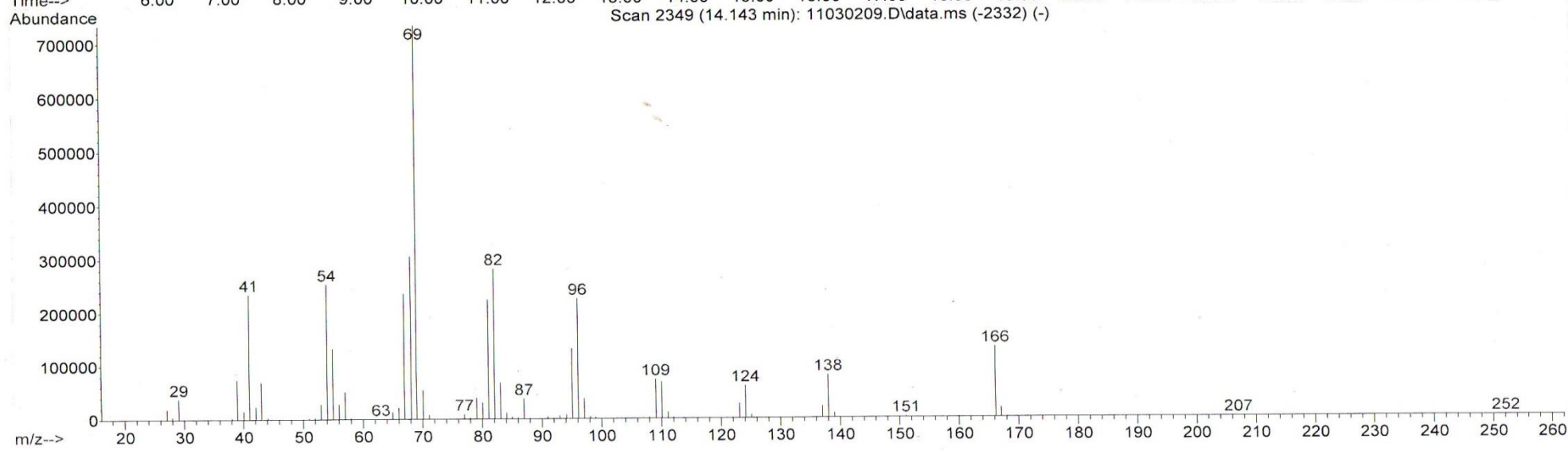
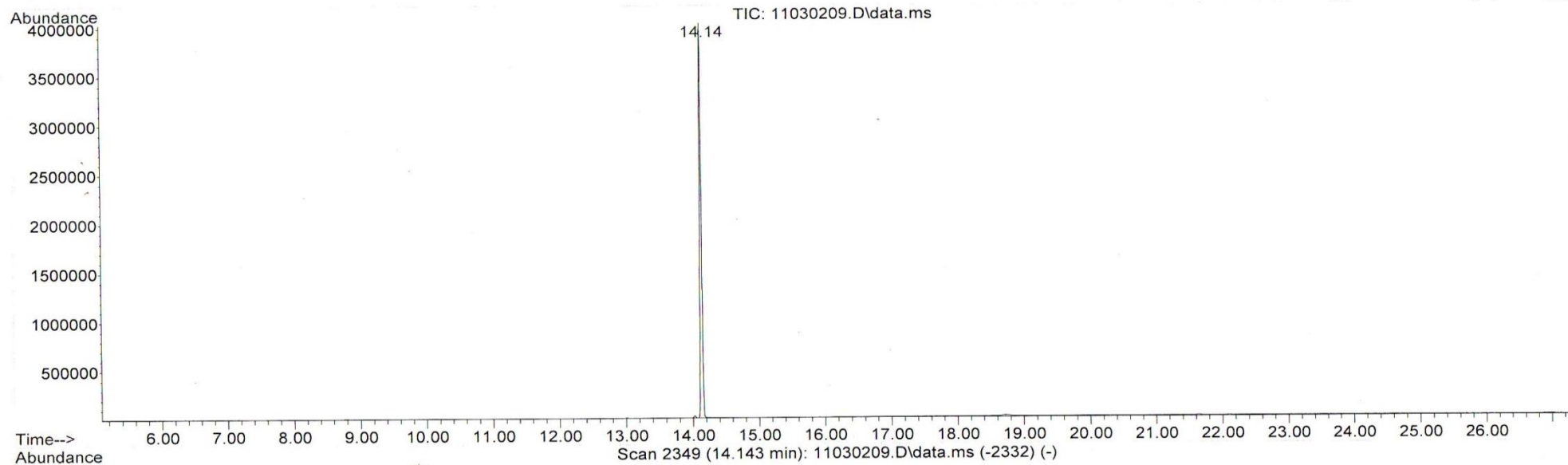
t = triplet ; *d* = doublet ; *v* = vicinal ; *g* = germinal ; *l* = long range.

+ Phổ ¹³C NMR (Bảng 2.8).

Bảng 2.8: Dữ liệu phổ ^{13}C NMR của hợp chất (Z)-3-dodecenyl (E)-2-butenolate

Chemical shift (δ :ppm)	$^{13}\text{C}^a$
14,14	$\text{CH}_3\text{-CH}_2$
17,99	$=\text{CH-CH}_3$
22,72	$\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$
26,94	$=\text{CH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$
27,36	$\text{-CH}_2\text{-CH}_2=\text{CH-}$
29,35	$\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$
29,35	$\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$
29,58	$\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$
29,66	$\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$
31,95	$\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$
63,73	$\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-}$
122,77	O=C-CH=CH-
124,39	$\text{-CH=CH-CH}_2\text{-}$
132,99	$\text{-CH}_2\text{-CH=CH-}$
144,56	-CH=CH-CH_3
166,59	-O-C=O

Ghi chú: ^aC (đậm và nghiêng) chỉ ^{13}C Carbon (^{13}C) là các thông số trong bảng biểu diễn.



Data Path : D:\vang\
Data File : 11030209.D
Acq On : 3 Mar 2011 1:04
Operator : vang
Sample : Z3-12-E2
Misc : Fr3
ALS Vial : 1 Sample Multiplier: 1

Integration Parameters: autoint1.e
Integrator: RTE
Smoothing : OFF
Sampling : 1
Start Thrs: 0.2
Stop Thrs : 0
Filtering: 5
Min Area: 5 % of largest Peak
Max Peaks: 100
Peak Location: TOP

If leading or trailing edge < 100 prefer < Baseline drop else tangent >
Peak separation: 5

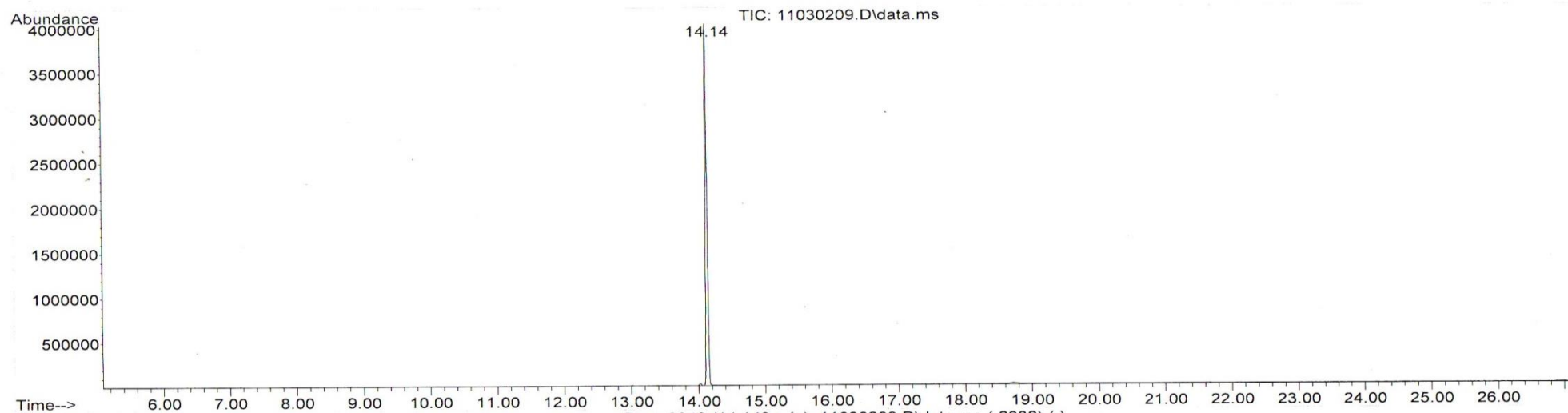
Method : C:\msdchem\2\METHODS\STD23SL1.M
Title :

Signal : TIC: 11030209.D\data.ms

peak #	R.T. min	first scan	max scan	last scan	PK TY	peak height	corr. area	corr. % max.	% of total
1	14.143	2330	2349	2369	rBV	4033757	7556761	100.00%	100.000%

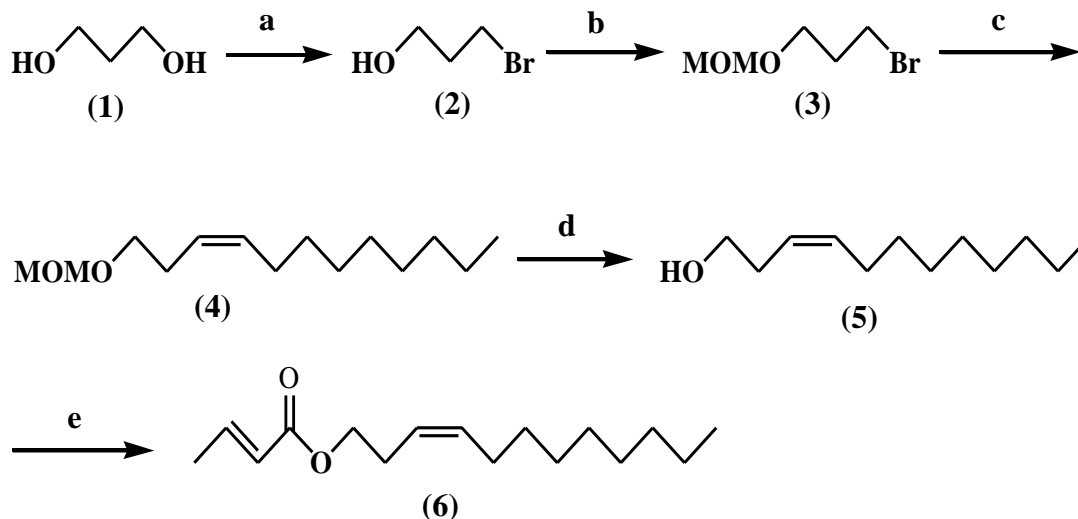
Sum of corrected areas: 7556761

STD23SL1.M Thu Mar 03 02:11:04 2011



QUY TRÌNH TỔNG HỢP (Z)-3-DODECENYL (E)-2-BUTENOATE, PHEROMONE GIỚI TÍNH SÙNG KHOAI LANG, *CYLAS FORMICARIUS* FAB.

Con đường tổng hợp hợp chất Z3-12:E2 trình bày trong sơ đồ sau:



Sơ đồ con đường tổng hợp hợp chất (Z)-3-dodecyl (E)-2-butenoate, pheromone giới tính của sùng khoai lang

a = HBr/Toluene; b = DMM/LiBr/*p*-TsOH;

c = PPh₃/Sodium Bis(trimethylsilyl)amide/Heptanal/THF;

d = 0,5 N HCl/MeOH; e = Crotonyl chloride/Pyridine/CH₂Cl₂.

Giai đoạn 1: Sau khi **Brom hóa một nhóm chức -OH** của hợp chất 1,3-propanediol (1) bằng HBr trong môi trường dung môi Toluene sẽ thu được hợp chất (2).

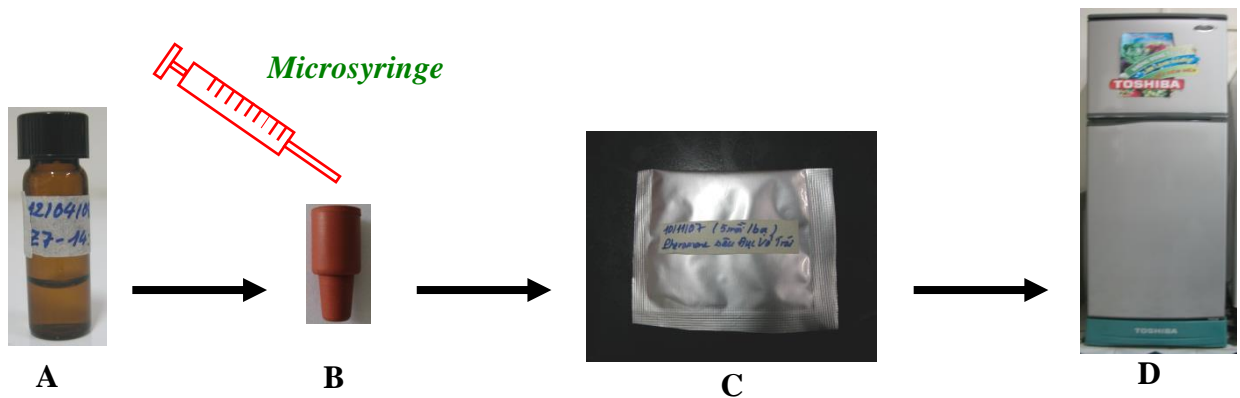
Giai đoạn 2: **Bảo vệ nhóm -OH** còn lại bằng Ether của hợp chất Dimethoxymethane (-OMOM) (2). Đun hợp chất (2) và Triphenylphosphine trong Benzen ở 110⁰C trong 48 giờ thu được muối phosphorane, hợp chất (3).

Giai đoạn 3: Sử dụng phản ứng Wittig nối hợp chất (3) với **1-nonanal** bằng Sodium bis(trimethylsilyl)amide sử dụng làm môi trường Bazơ (base) trong dung môi THF thu được hợp chất MOM-ether của hợp chất (Z)-3-dodecyl-1-ol (4).

Giai đoạn 4: Sau khi **loại bỏ sự bảo vệ nhóm chức -OH** của hợp chất MOM-ether bằng cách khuấy hỗn hợp (4) trong dung dịch HCl trong 24 giờ, thu hợp chất (5).

Giai đoạn 5: Sau đó hợp chất (Z)-3-dodecyl-1-ol (5) được **kết hợp với hợp chất Crotonyl chloride** bằng phản ứng ester hóa trong dung môi CH₂Cl₂ dưới môi trường kiềm của chất xúc tác Pyridine sẽ tạo thành hợp chất (Z)-3-dodecyl (E)-2-butenoate (6), là pheromone giới tính tổng hợp (3Z-12E2).

CÁC BƯỚC ĐIỀU CHẾ MÔI PHEROMONE GIỚI TÍNH, SÙNG KHOAI LANG, *CYLAS FORMICARIUS* FAB.



Các bước điều chế môi pheromone giới tính tổng hợp của sùng khoai lang

- (A) pheromone tổng hợp hòa tan trong *n*-Hexane (10 mg/ml);
- (B) pheromone tổng hợp được nhồi vào tuýp cao su non;
- (C) đóng gói kín trong bao nhôm; (D) bảo quản trong tủ lạnh.

Bước 1: Pha loãng hợp chất (*Z*)-3-dodeceny-(*E*)-2-butenate (3*Z*-12*E*2) trong dung môi *n*-Hexane tinh khiết ở nồng độ 10 mg/ml (tương ứng 10 µg/µl).

Bước 2: Sử dụng microsyringe hoặc micropipette hút 30 µl dung dịch pha loãng, tương ứng với 0,3 mg (*Z*)-3-dodeceny-(*E*)-2-butenate, bơm vào tuýp cao su non (B) để làm môi pheromone giới tính. Sau đó đặt tuýp cao su vào tủ hút khoảng 10 phút để bay hơi dung môi và không thêm bất cứ chất ổn định hay chất chống oxy hóa nào.

Bước 3: Dùng giấy nhôm bao gói cẩn thận tuýp cao su non đã được bơm hóa chất, hàn kín, dán nhãn và tồn trữ trong điều kiện lạnh đến khi đem ra sử dụng ngoài đồng.

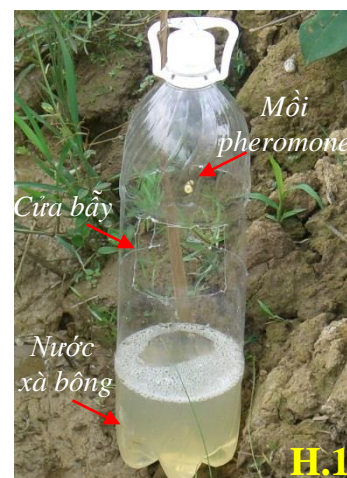
CÁC BƯỚC ÁP DỤNG BÃY PHEROMONE PHÒNG TRỊ SÙNG KHOAI LANG, *CYLAS FORMICARIUS* FAB.

1. Môi pheromone: Là ống cao su non được bơm chất pheromone giới tính tổng hợp, bảo quản ở điều kiện lạnh.

2. Chuẩn bị bẫy:

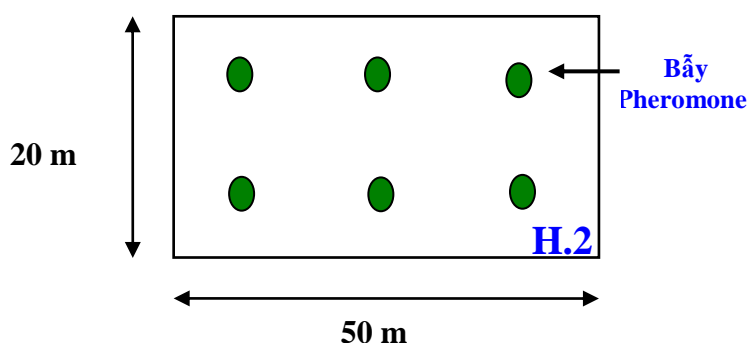
Bẫy: Là chai nước suối 1,5 lít được cắt 3 ô vuông (4 x 4 cm) xung quanh chai, cách nút chai xuống 8 cm với khoảng cách đều nhau, tính từ đáy chai lên 10 cm đục khoảng 5 lỗ nhỏ xung quanh để thoát nước mưa (không cho mực nước dâng lên cao) (Hình 1).

Treo môi: Dùng dây chỉ treo môi ở giữa chai, chiều dài vừa sát với mép trên của ô vuông (cửa bẫy) (Hình 1).



3. Đặt bẫy ngoài đồng:

Đặt bẫy ở cạnh luống khoai (6 bẫy/1.000 m²), cách đều nhau và bố trí tùy theo ruộng (Hình 2). Có thể đặt bẫy trên ruộng khoai sau khi trồng khoảng 2 tuần.



Cách đặt bẫy: Đổ nước vào bẫy cao từ 8-10 cm và cho ½ muỗng xà bông bột (5-7 gam) vào bẫy và lắc đều. Dùng cây dài khoảng 0,8-1 m làm cọc cắm đất để cố định bẫy luôn đứng thẳng, tránh đổ ngã, đặt bẫy sao cho ô vuông cửa bẫy ngang với tán lá (Hình 3). Sau 2 tuần đổ bỏ xác sùng vào bẫy và thay nước xà bông khác. Sau 2 tháng thay môi mới 1 lần.



*** Lưu ý:**

- Luôn giữ cho môi pheromone không thấm nước.
- Ruộng xuống giống khoai khoảng 10-15 ngày thì bắt đầu đặt bẫy pheromone cho đến cuối vụ và sử dụng liên tục cho các vụ tiếp theo sẽ đạt hiệu quả cao.
- Sử dụng bẫy pheromone đặt trên ruộng sau thu hoạch để tiêu diệt sùng và cắt nguồn sùng lây lan cho vụ sau.

Phụ lục C
CÁC BẢNG ANOVA VỀ ĐÁNH GIÁ HIỆU QUẢ HẤP DẪN
CỦA PHEROMONE GIỚI TÍNH TỔNG HỢP

Bảng 1: Khảo sát hiệu quả hấp dẫn của kiểu mùi pheromone đối với SKL ở điều kiện ngoài đồng

K Value	Source	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob
1	Replication	2	0.205	0.103	0.8361	
2	Factor A	3	5.805	1.935	15.7552	0.0030
-3	Error	6	0.737	0.123		
Total		11	6.747			

Coefficient of Variation: 23.40%

Bảng 2: Khảo sát ảnh hưởng của kiểu bẫy lên khả năng hấp dẫn của pheromone giới tính đối với sùng khoai lang ở điều kiện ngoài đồng

K Value	Source	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob
1	Replication	2	0.259	0.129	2.4487	0.1669
2	Factor A	3	6.489	2.163	40.9557	0.0002
-3	Error	6	0.317	0.053		
Total		11	7.065			

Coefficient of Variation: 13.30

Bảng 3: Đánh giá sự ảnh hưởng của màu sắc bẫy lên khả năng hấp dẫn của mùi pheromone giới tính đối với sùng khoai lang ở điều kiện ngoài đồng

K Value	Source	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob
1	Replication	2	0.540	0.270	1.4793	0.3004
2	Factor A	3	9.121	3.040	16.6434	0.0026
-3	Error	6	1.096	0.183		
Total		11	10.758			

Coefficient of Variation: 28.57%

Bảng 4: Khảo sát ảnh hưởng của độ cao đặt bẫy pheromone giới tính lên khả năng hấp dẫn sùng khoai lang ở điều kiện ngoài đồng

K Value	Source	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob
1	Replication	2	1.578	0.789	4.3432	0.052
2	Factor A	4	3.857	0.964	5.3065	0.0219
-3	Error	8	1.454	0.182		
Total		14	6.889			

Coefficient of Variation: 43.09%

Bảng 5: Hiệu lực của một số chủng nấm lên thành trùng sùng khoai lang ở thời điểm 3 NSKC (số liệu chuyển sang $\log(x+20)$).

	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value	Prob.
Between	3	0.443	0.148	5.370	0.0256
Within	8	0.220	0.027		
Total	11	0.663			

Coefficient of Variation = 11.66%

Bảng 6: Hiệu lực của một số chủng nấm lên thành trùng sùng khoai lang ở thời điểm 5 NSKC (số liệu chuyển sang $\log(x+20)$).

	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value	Prob.
Between	3	0.870	0.290	15.198	0.0011
Within	8	0.153	0.019		
Total	11	1.022			

Coefficient of Variation = 8.97%

Bảng 7: Hiệu lực của một số chủng nấm lên thành trùng SKL ở thời điểm 7 NSKC

	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value	Prob.
Between	3	13281.381	4427.127	82.054	0.0000
Within	8	431.629	53.954		
Total	11	13713.011			

Coefficient of Variation = 24.48%

Bảng 8. Anova hiệu lực của một số loại nấm lên thành trùng sùng khoai lang *C.formicarius* ở thời điểm 9 NSKC.

	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value	Prob.
Between	3	13955.314	4651.771	151.300	0.0000
Within	8	245.963	30.745		
Total	11	14201.277			

Coefficient of Variation = 15.50%

Bảng 9. Anova hiệu lực của một số loại nấm lên thành trùng sùng khoai lang *C.formicarius* ở thời điểm 11 NSKC.

	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value	Prob.
Between	3	14198.244	4732.748	115.636	0.0000
Within	8	327.425	40.928		
Total	11	14525.669			

Coefficient of Variation = 16.37%

Bảng 10. Anova hiệu lực của một số loại nấm lên thành trùng sùng khoai lang *C.formicarius* ở thời điểm 13 NSKC.

	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value	Prob.
Between	3	15208.847	5069.616	179.813	0.0000
Within	8	225.550	28.194		
Total	11	15434.397			

Coefficient of Variation = 13.00%

Bảng 11. Anova hiệu lực của một số loại nấm lên thành trùng sùng khoai lang *C.formicarius* ở thời điểm 15 NSKC.

	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value	Prob.
Between	3	15441.300	5147.100	287.724	0.0000
Within	8	143.112	17.889		
Total	11	15584.413			

Coefficient of Variation = 9.40%

Bảng 12. Anova hiệu lực của nấm xanh lên thành trùng sùng khoai lang *C.formicarius* ở thời điểm 3 NSKC.

	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value	Prob.
Between	4	0.024	0.006	0.176	
Within	10	0.342	0.034		
Total	14	0.366			

Coefficient of Variation = 13.81%

Bảng 13. Anova hiệu lực của nấm xanh lên thành trùng sùng khoai lang *C.formicarius* ở thời điểm 5 NSKC.

	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value	Prob.
Between	4	9173.493	2293.373	83.603	0.0000
Within	10	274.316	27.432		
Total	14	9447.808			

Coefficient of Variation = 24.07%

Bảng 14. Anova hiệu lực của nấm xanh lên thành trùng sùng khoai lang *C.formicarius* ở thời điểm 7 NSKC.

	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value	Prob.
Between	4	14091.101	3522.775	90.827	0.0000
Within	10	387.857	38.786		
Total	14	14478.958			

Coefficient of Variation = 19.32%

Bảng 15. Anova hiệu lực của nấm xanh lên thành trùng sùng khoai lang *C.formicarius* ở thời điểm 9 NSKC.

	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value	Prob.
Between	4	15693.813	3923.453	151.756	0.0000
Within	10	258.536	25.854		
Total	14	15952.349			

Coefficient of Variation = 12.96%

Bảng 16. Anova hiệu lực của nấm xanh lên thành trùng sùng khoai lang *C.formicarius* ở thời điểm 11 NSKC.

	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value	Prob.
Between	4	16758.645	4189.661	93.934	0.0000
Within	10	446.020	44.602		
Total	14	17204.665			

Coefficient of Variation = 14.89%

Bảng 17. Anova hiệu lực của nấm xanh lên thành trùng sùng khoai lang *C.formicarius* ở thời điểm 13 NSKC.

	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value	Prob.
Between	4	18189.126	4547.282	70.827	0.0000
Within	10	642.027	64.203		
Total	14	18831.153			

Coefficient of Variation = 20.02%

Bảng 18. Anova hiệu lực của nấm xanh lên thành trùng sùng khoai lang *C.formicarius* ở thời điểm 15 NSKC.

	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value	Prob.
Between	4	17343.173	4335.793	49.326	0.0000
Within	10	879.005	87.901		
Total	14	18222.178			

Coefficient of Variation = 19.99%

Bảng 19. Anova khả năng lây lan của nấm xanh trong quần thể sùng khoai lang trong điều kiện phòng thí nghiệm vào thời điểm 5 NSKC (chuyển sang $\arcsin(\sqrt{x+0.5})$).

	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value	Prob.
Between	2	1.055	0.528	0.244	
Within	12	25.951	2.163		
Total	14	27.007			

Coefficient of Variation = 7.79%

Bảng 20. Anova khả năng lây lan của nấm xanh trong quần thể sùng khoai lang trong điều kiện phòng thí nghiệm vào thời điểm 10 NSKC (chuyển sang $\arcsin(\sqrt{x+0.5})$).

	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value	Prob.
Between	2	8.192	4.096	0.863	
Within	12	56.956	4.746		
Total	14	65.148			

Coefficient of Variation = 10.06%

Bảng 21. Anova khả năng lây lan của nấm xanh trong quần thể sùng khoai lang trong điều kiện phòng thí nghiệm vào thời điểm 15 NSKC (chuyển sang $\arcsin(\sqrt{x+0.5})$).

	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value	Prob.
Between	2	17.636	8.818	1.948	0.1851
Within	12	54.326	4.527		
Total	14	71.962			

Coefficient of Variation = 9.10%

Bảng 22. Anova khả năng lây lan của nấm xanh trong quần thể sùng khoai lang trong điều kiện phòng thí nghiệm vào thời điểm 20 NSKC (chuyển sang $\arcsin(\sqrt{x+0.5})$).

	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value	Prob.
Between	2	125.806	62.903	4.955	0.0270
Within	12	152.349	12.696		
Total	14	278.155			

Coefficient of Variation = 13.35%

Bảng 23. Anova khả năng lây lan của nấm xanh trong quần thể sùng khoai lang trong điều kiện phòng thí nghiệm vào thời điểm 25 NSKC (chuyển sang $\arcsin(\sqrt{x+0.5})$).

	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value	Prob.
Between	2	211.680	105.840	2.222	0.1511
Within	12	571.714	47.643		
Total	14	783.395			

Coefficient of Variation = 23.24%

Bảng 24. Anova khả năng lây lan của nấm xanh trong quần thể sùng khoai lang trong điều kiện phòng thí nghiệm vào thời điểm 30 NSKC (chuyển sang $\arcsin(\sqrt{x+0.5})$).

	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value	Prob.
Between	2	489.568	244.784	5.282	0.0226
Within	12	556.152	46.346		
Total	14	1045.720			

Coefficient of Variation = 20.82%

Bảng 25. Anova khả năng lây lan của nấm xanh trong quần thể sùng khoai lang trong điều kiện phòng thí nghiệm vào thời điểm 35 NSKC (chuyển sang $\arcsin(\sqrt{x+0.5})$).

	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value	Prob.
Between	2	751.465	375.732	13.826	0.0008
Within	12	326.121	27.177		
Total	14	1077.585			

Coefficient of Variation = 14.31%

Bảng 26. Thời gian sống của thành trùng sùng đực sau khi tiếp xúc với pheromone và nấm xanh trong điều kiện phòng thí nghiệm (chuyển sang $\log_{10}(x+1)$).

	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value	Prob.
Between	3	9.012	3.004	44.068	0.0000
Within	96	6.544	0.068		
Total	99	15.556			

Coefficient of Variation = 19.78%

Bảng 27. Thời gian sống của thành trùng SKL cái sau khi tiếp xúc với pheromone và nấm xanh trong điều kiện phòng thí nghiệm (chuyển sang $\log_{10}(x+1)$).

	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value	Prob.
Between	3	17069.416	5689.805	139.016	0.0000
Within	16	654.864	40.929		
Total	19	17724.280			

Coefficient of Variation = 11.24%

Bảng 28. Anova số lượng sùng con được sinh ra từ thành trùng sùng khoai lang đã qua tiếp xúc với pheromone và nấm xanh trong điều kiện phòng thí nghiệm (chuyển sang $\log_{10}(x+1)$).

	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value	Prob.
Between	3	14.864	4.955	16.548	0.0000
Within	96	28.745	0.299		
Total	99	43.609			

Coefficient of Variation = 28.98%

Bảng 29. Thành phần hóa chất của môi trường SDAY₃

STT	Thành phần	Trọng lượng (g)
1	Pepton	10
2	Dextrose	40
3	Yeast extract	2
4	NaNO ₃	2
5	KH ₂ PO ₄	1
6	MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5
7	Agar	20
8	Nước cất	100 ml

pH = 6,5

Phân tích thống kê các chủng nấm xanh *Metarhizium anisopliae* ở nhiệt độ 25⁰C.

Bảng 30: 3NSKC

	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value	Prob.
Between	4	1094.097	273.524	23.299	0.0000
Within	10	117.398	11.740		
Total	14	1211.495			

Coefficient of Variation = 15.56%

Bảng 31: 5NSKC

	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value	Prob.
Between	4	6725.897	1681.474	24.832	0.0000
Within	10	677.134	67.713		
Total	14	7403.031			

Coefficient of Variation = 18.79%

Bảng 32: 7NSKC

	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value	Prob.
Between	4	9347.552	2336.888	31.974	0.0000
Within	10	730.877	73.088		
Total	14	10078.430			

Coefficient of Variation = 14.74%

Bảng 33: 9NKSC

	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value	Prob.
Between	4	8283.853	2070.963	19.332	0.0001
Within	10	1071.237	107.124		
Total	14	9355.090			

Coefficient of Variation = 16.78%

Bảng 34: 11NSKC

	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value	Prob.
Between	4	8283.773	2070.943	44.594	0.0000
Within	10	464.402	46.440		
Total	14	8748.175			

Coefficient of Variation = 10.31%

Bảng 35: 13NSKC

	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value	Prob.
Between	4	8186.885	2046.721	57.033	0.0000
Within	10	358.868	35.887		
Total	14	8545.753			

Coefficient of Variation = 8.98%

Bảng 36: 15NSKC

	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value	Prob.
Between	4	8287.778	2071.944	68.126	0.0000
Within	10	304.132	30.413		
Total	14	8591.910			

Coefficient of Variation = 8.22%

Bảng 37: Tỷ lệ mọc nấm

	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value	Prob.
Between	3	1378.618	459.539	9.247	0.0056
Within	8	397.581	49.698		
Total	11	1776.199			

Coefficient of Variation = 11.30%

Phân tích thống kê các chủng nấm xanh *Metarhizium anisopliae* ở nhiệt độ 30⁰C.

Bảng 38: 3 NSKC

	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value	Prob.
Between	4	2020.038	505.010	8.289	0.0032
Within	10	609.269	60.927		
Total	14	2629.307			

Coefficient of Variation = 28.28%

Bảng 39: 5NSKC

	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value	Prob.
Between	4	7450.436	1862.609	59.432	0.0000
Within	10	313.399	31.340		
Total	14	7763.836			

Coefficient of Variation = 10.90%

Bảng 40: 7NSKC

Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square
--------------------	----------------	-------------

	Freedom	Squares	Square	F-value	Prob.
Between	4	8310.102	2077.526	41.549	0.0000
Within	10	500.019	50.002		
Total	14	8810.121			

Coefficient of Variation = 12.19%

Bảng 41: 9NSKC

	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value	Prob.
Between	4	8373.228	2093.307	41.758	0.0000
Within	10	501.298	50.130		
Total	14	8874.526			

Coefficient of Variation = 11.44%

Bảng 42: 11NSKC

	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value	Prob.
Between	4	8353.639	2088.410	54.059	0.0000
Within	10	386.317	38.632		
Total	14	8739.956			

Coefficient of Variation = 9.79%

Bảng 43: 13NSKC

	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value	Prob.
Between	4	8416.171	2104.043	40.445	0.0000
Within	10	520.226	52.023		
Total	14	8936.397			

Coefficient of Variation = 11.15%

Bảng 44: 15 NSKC

	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value	Prob.
Between	4	8562.806	2140.702	38.659	0.0000
Within	10	553.738	55.374		
Total	14	9116.544			

Coefficient of Variation = 11.10%

Bảng 45: Tỷ lệ mọc nấm

	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value	Prob.
Between	3	79.487	26.496	1.172	0.3790
Within	8	180.800	22.600		
Total	11	260.287			

Coefficient of Variation = 7.30%

Thí nghiệm: So sánh hiệu quả phòng trị sùng khoai lang (*C. fomicarius*) tại huyện Duyên Hải, Trà Vinh

Bảng 46: T-test hai trung bình của mật số SKL vào bẫy trong suốt vụ ở đợt 1:
T-TEST FOR THE HYPOTHESIS "MEAN 1 = MEAN 2"

Variance of the difference between the means:	0.0023
Standard Deviation of the difference:	0.0483
t Value:	0.4435
Effective degrees of freedom:	6
Probability of t:	0.6729
Result: Non-Significant t - Accept the Hypothesis	
Confidence limits for the difference of the means (for alpha=0.05):	

Bảng 47: T-test hai trung bình của mật số SKL vào bẫy trong suốt vụ ở đợt 2:
T-TEST FOR THE HYPOTHESIS "MEAN 1 = MEAN 2"

Variance of the difference between the means:	0.0354
Standard Deviation of the difference:	0.1883
t Value:	0.1615
Effective degrees of freedom:	4
Probability of t:	0.8795
Result: Non-Significant t - Accept the Hypothesis	
Confidence limits for the difference of the means (for alpha=0.05):	

Bảng 48: T-test hai trung bình của mật số SKL vào bẫy ở ruộng phòng trị ở huyện Tri Tôn.

T-TEST FOR THE HYPOTHESIS "MEAN 1 = MEAN 2"

Variance of the difference between the means:	23.3867
Standard Deviation of the difference:	4.8360
t Value:	5.2358
Effective degrees of freedom:	4
Probability of t:	0.0064
Result: Significant t - Reject the Hypothesis	
Confidence limits for the difference of the means (for alpha=0.05):	

Bảng 49: T-test so sánh Tỷ lệ sùng ngoài củ ở VNV tại 2 ruộng tại huyện Tri Tôn thời điểm 60NSKT

T-TEST FOR THE HYPOTHESIS "MEAN 1 = MEAN 2"

Variance of the difference between the means: 13.8477
Standard Deviation of the difference: 3.7212
t Value: 6.1559
Effective degrees of freedom: 3
Probability of t: 0.0086
Result: Significant t - Reject the Hypothesis
Confidence limits for the difference of the means (for alpha=0.05):

Bảng 50: T-test so sánh Tỷ lệ sùng ngoài củ ở VNV tại 2 ruộng tại huyện Tri Tôn thời điểm 75NSKT

T-TEST FOR THE HYPOTHESIS "MEAN 1 = MEAN 2"

Variance of the difference between the means: 132.4093
Standard Deviation of the difference: 11.5069
t Value: 7,7566
Effective degrees of freedom: 3
Probability of t: 0.0051
Result: Significant t - Accept the Hypothesis
Confidence limits for the difference of the means (for alpha=0.05):

Bảng 51: T-test so sánh Tỷ lệ sùng trong củ ở VNV tại 2 ruộng tại huyện Tri Tôn thời điểm 60NSKT

T-TEST FOR THE HYPOTHESIS "MEAN 1 = MEAN 2"

Variance of the difference between the means: 9.4334
Standard Deviation of the difference: 3.0714
t Value: 5.5057
Effective degrees of freedom: 3
Probability of t: 0.0118
Result: Significant t - Reject the Hypothesis
Confidence limits for the difference of the means (for alpha=0.05):

Bảng 52: T-test so sánh Tỷ lệ sùng trong ở VNV tại 2 ruộng huyện Tri Tôn thời điểm 75NSKT

T-TEST FOR THE HYPOTHESIS "MEAN 1 = MEAN 2"

Variance of the difference between the means: 46.9774
Standard Deviation of the difference: 6.8540
t Value: 3.9809
Effective degrees of freedom: 3
Probability of t: 0.0284
Result: Significant t - Reject the Hypothesis
Confidence limits for the difference of the means (for alpha=0.05):

Bảng 53: T-test so sánh Tỷ lệ sùng ngoài ở VTT tại 2 ruộng huyện Tri Tôn thời điểm 60NSKT

T-TEST FOR THE HYPOTHESIS "MEAN 1 = MEAN 2"

Variance of the difference between the means: 76.7798
Standard Deviation of the difference: 8.7624
t Value: 3.7405
Effective degrees of freedom: 2
Probability of t: 0.0473
Result: Significant t - Accept the Hypothesis
Confidence limits for the difference of the means (for alpha=0.05):

Bảng 54: T-test so sánh Tỷ lệ sùng trong ở VTT tại 2 ruộng huyện Tri Tôn thời điểm 60NSKT

T-TEST FOR THE HYPOTHESIS "MEAN 1 = MEAN 2"

Variance of the difference between the means: 67.8803
Standard Deviation of the difference: 8.2389
t Value: 3.0396
Effective degrees of freedom: 2
Probability of t: 0.0933
Result: Non-Significant t - Accept the Hypothesis
Confidence limits for the difference of the means (for alpha=0.05):

Bảng 55: T-test so sánh Tỷ lệ sùng ngoài củ ở 2 ruộng tại huyện Tri Tôn thời điểm 60 NSKT

T-TEST FOR THE HYPOTHESIS "MEAN 1 = MEAN 2"

Variance of the difference between the means: 17.6784
Standard Deviation of the difference: 4.2046
t Value: 6.2728
Effective degrees of freedom: 6
Probability of t: 0.0008
Result: Significant t - Reject the Hypothesis
Confidence limits for the difference of the means (for alpha=0.05):

Bảng 56: T-test so sánh Tỷ lệ sùng ngoài củ ở 2 ruộng tại huyện Tri Tôn thời điểm 75NSKT

T-TEST FOR THE HYPOTHESIS "MEAN 1 = MEAN 2"

Variance of the difference between the means: 69.3426
Standard Deviation of the difference: 8.3272
t Value: 5.6237
Effective degrees of freedom: 6
Probability of t: 0.0014
Result: Significant t - Reject the Hypothesis
Confidence limits for the difference of the means (for alpha=0.05):

Bảng 57: T-test so sánh Tỷ lệ sùng trong củ ở 2 ruộng tại huyện Tri Tôn thời điểm 60NSKT

T-TEST FOR THE HYPOTHESIS "MEAN 1 = MEAN 2"

Variance of the difference between the means: 12.9713
Standard Deviation of the difference: 3.6016
t Value: 5.6630
Effective degrees of freedom: 6
Probability of t: 0.0013
Result: Significant t - Reject the Hypothesis
Confidence limits for the difference of the means (for alpha=0.05):

Bảng 58: T-test so sánh Tỷ lệ sùng trong củ ở 2 ruộng tại huyện Tri Tôn thời điểm 75NSKT

T-TEST FOR THE HYPOTHESIS "MEAN 1 = MEAN 2"

Variance of the difference between the means: 43.4168
Standard Deviation of the difference: 6.5891
t' Value: 5.7404
Effective degrees of freedom: 6
Probability of t': 0.0012
Result: Significant t - Reject the Hypothesis
Confidence limits for the difference of the means (for alpha=0.05):