Nghiên cứu tinh sạch thể vùi Nucleo Polyhedrosis Virus (NPV) sâu khoang và tạo dạng chế phẩm

Occlusion bodies purity of Nuclear Polyhedrosis Virus (NPV) and product

Lê Thanh Hải Hà^{1*}, Lê Văn Trịnh²

¹Trường Đại học Bách khoa, Hà Nội, Việt Nam

²Viện Bảo vệ Thực vật, Việt Nam

*Tác giả liên hệ, Email: lethanhhaiha.aw@gmail.com

THÔNG TIN	TÓM TẮT
<p>DOI:10.46223/HCMCOUJS.tech.vi.14.1.444.2019</p> <p>Ngày nhận: 13/02/2019 Ngày nhận lại: 26/03/2019 Duyệt đăng: 10/04/2019</p> <p><i>Từ khóa:</i> bột thấm nước, NPV (Nucleo Polyhedrosis Virus), OB (Occlusion Bodies), sâu khoang (<i>Spodoptera litura</i>), thể vùi tinh</p> <p><i>Keywords:</i> NPV (Nucleo Polyhedrosis Virus), OB (Occlusion Bodies), Pured Obs, <i>Spodoptera litura</i> insect pest, wettable powder</p>	<p>Hiệu lực phòng trừ sâu hại cây trồng của một chế phẩm virus tùy thuộc rất lớn vào hàm lượng thể vùi của NPV có trong chế phẩm và đảm bảo phải đạt từ $9,0 \times 10^{11}$ đến $3,0 \times 10^{12}$ OB/ha sau khi phun rải trên đồng ruộng. Vì vậy, việc tinh sạch và định lượng thể vùi khi tạo dạng sử dụng sản phẩm là yêu cầu cần thiết. Kết quả nghiên cứu trong năm 2017 đã xác định có thể tinh sạch để thu hoạch thể vùi tinh của virus NPV sâu khoang (<i>Spodoptera litura</i> Fabricius) bằng việc phối hợp sử dụng 2 lần SDS xen kẽ với 3 lần nước cất thì lượng thể vùi thu được cao nhất, đạt tới $2,35 \times 10^{10}$ OB/ml và tỷ lệ thu hồi thể vùi tới 83,93%. Khi tạo dạng sử dụng chế phẩm với liều lượng 500gam/ha dưới dạng bột thấm nước có hàm lượng thể vùi $2,0 \times 10^9$ OB/gam, tương đương 1×10^{12} OB/ha cho hiệu quả gây chết sâu khoang trong điều kiện phòng thí nghiệm đạt 81,23% với chế phẩm không bổ sung Boric và đạt 87,14% với chế phẩm có bổ sung thêm 5% axit Boric, đạt tới 81,13 % và 82,92% (tương ứng) trong điều kiện nhà lưới ở thời điểm 7 ngày sau phun.</p> <p>ABSTRACT</p> <p>The efficacy in controlling insect pest in the crop of a virus biopesticide was significant depends on the concentration of occlusion bodies (OB) of NPV and dosage of product released in crop field after spraying which how to meet level from $9,0 \times 10^{11}$ to $3,0 \times 10^{12}$ OBs per hecta. By that, it is considered to be necessary for OBs purity and qualification when making using formulation.</p> <p>The result of a study undertaken in 2017 showed that the OBs of <i>Spodoptera litura</i> NPV could be purified by rotational use of two times of SDS and three times of pure water. By the way, the quantity of NPV's OB could be $2,35 \times 10^{10}$ OB/ml and</p>

their harvested percentage reached 83.93%. The result of study was also showed that it was possible to formulate bioproduct under the wettable powder for a hectare with a dosage of 500 gram, in which the concentration of $2,0 \times 10^9$ OBs per gram equivalence an using dosage of 1×10^{12} Obs per ha of the crop. It was also indicated that the efficacy in controlling the insect pest reached to 81.23% with a product without adding 5% Boric axit and 87,14% for the product mixtured with 5% of Boric axit in a laboratory experiment, to 81,13% and 82.92% (equivalent) in greenhouse condition at 7 days after spraying.

1. Đặt vấn đề

Sâu khoang (*Spodoptera litura*) là sâu hại quan trọng trên nhiều loại cây trồng khác nhau và chế phẩm NPV (Nucleo Polyhedrosis Virus) thường có hiệu quả cao trong phòng trừ sâu hại này. Tuy nhiên, hàm lượng thể vùi của vi rút NPV (Nucleo Polyhedrosis Virus) trong chế phẩm là yếu tố quyết định hiệu lực trừ sâu. Lâu nay, việc sản xuất NPV vẫn tiến hành theo phương pháp thủ công bằng cách nuôi sâu sống số lượng lớn, sau đó nhiễm vi rút NPV của loài sâu tương ứng, rồi nghiền lọc và đem ra sử dụng (Nguyen, Hoang, & Huger, 1996). Với cách làm này, chất lượng sản phẩm khi sử dụng không ổn định do không thể kiểm soát được số lượng thể vùi có trong sản phẩm. Vì vậy, việc tinh sạch để thu hoạch thể vùi tinh để định lượng trước khi tạo dạng sử dụng chế phẩm là khâu kỹ thuật không thể thiếu trong quá trình sản xuất chế phẩm NPV phục vụ phòng trừ sâu hại cây trồng nông nghiệp.

Kết quả nghiên cứu của các tác giả Cisneros và cộng sự (2002) đã chỉ rõ lượng sử dụng chế phẩm NPV phải tính theo tổng lượng thể vùi cần phun cho 1 ha cây trồng để phòng trừ sâu hại và tùy theo từng đối tượng sâu hại khác nhau, đối với sâu khoang và sâu keo da láng cần đảm bảo tới $9,0 \times 10^{11}$ OB/ha, còn đối với sâu xanh phải từ $1,5-3,0 \times 10^{12}$ OB/ha tùy theo từng loại cây trồng có tán lá rộng hay hẹp. Như vậy, việc tạo dạng sản phẩm để sử dụng phòng trừ loài sâu hại chủ đích có thể có những khác nhau, nhưng nhiều tác giả đều khẳng định liều lượng sản phẩm sử dụng có thể nhiều hay ít tùy theo công nghệ tạo dạng, nhưng cần phải đảm bảo được số lượng thể vùi phun rải đối với từng loài sâu hại cụ thể. Điều đó đòi hỏi thể vùi phải được định lượng một cách chủ động trước khi tạo dạng. Có như vậy mới có thể đảm bảo chế phẩm có chất lượng ổn định và hiệu quả cao trong phòng trừ sâu hại khi sử dụng trên đồng ruộng.

Dưới đây xin trình bày kết quả nghiên cứu phân lập tinh sạch thể vùi tinh NPV sâu khoang và tạo dạng sử dụng chế phẩm.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Bao gồm sâu khoang được nuôi nhân bằng thức ăn nhân tạo và NPV được nhân sinh khối trên tế bào sâu khoang. Hoá chất SDS phục vụ tinh sạch thể vùi và phân tích PCR. Các phụ gia tạo bột thấm nước như bột tan, khoáng sét và axit Boric.

Các nội dung nghiên cứu được thực hiện năm 2017 tại phòng thí nghiệm và nhà lưới của Trung tâm Sinh học (Viện Bảo vệ thực vật - Bộ Nông nghiệp và PTNT).

2.2. Tinh sạch thể vùi tinh

Tiến hành theo phương pháp của Sajap và cộng sự (2000). Thí nghiệm với 7 công thức tinh sạch thể vùi khác nhau với dịch thể vùi vi rút NPV thu hoạch vào thời điểm 10 ngày sau khi nhiễm trên tế bào nhân nuôi được xác định là $2,8 \times 10^8$ OB/ml. Tiến hành ly tâm với tốc độ 1.500 vòng/phút trong 5 phút để loại bỏ dịch môi trường. Các lần tiếp theo được tiến hành sau khi pha loãng với 100ml nước cất vô trùng hoặc với 100ml dung dịch SDS 0,1%, sau đó tiến hành ly tâm với tốc độ 1.500 vòng/phút trong 5 phút và gạn bỏ phần dịch lỏng, giữ lại phần thể vùi tinh màu trắng đục đã được làm sạch.

2.3. Kiểm định NPV sâu khoang

Phân tích giải trình tự gen theo phương pháp PCR và so sánh với ngân hàng Genbank. Các gen để kiểm định gồm 3 gen có mức độ bảo thủ cao trong số các NPVs được sử dụng để làm DNA khuôn cho phản ứng PCR, gồm: Polyhedrin (*Polh*); Granulin (*gran*) và Late expression factor gene (*lef-8*, *lef-9*). Hệ thống PCR dùng khuếch đại gen là Eppendorf Mastercycler Pro-S.

Sản phẩm PCR được phân ly bằng 1% Agarose gel và được tinh sạch từ Agarose gel sử dụng DNA Purification Kit (Qiagen). Sau đó, sản phẩm PCR tinh sạch được gắn vào pDrive cloning vector sử dụng pDrive Cloning kit (Qiagen) rồi đọc trình tự bằng máy ABI3100 sử dụng BigDye Terminator 3.1 Kit (Applied Biotech). Trình tự các mẫu được so sánh mức độ tương đồng với nhau bằng phần mềm ClustalW2 và so sánh với Ngân hàng Gen bằng phần mềm BLAST. Cây phả hệ được xây dựng theo phương pháp Neighbor-joining trong phần mềm MEGA 6.0.

2.4. Tạo dạng sử dụng chế phẩm

Tiến hành theo phương pháp tạo dạng bột thấm nước với phụ gia gồm 60% bột tan và 40% bột khoáng sét. Các phụ gia được nghiền nhỏ mịn với kích thước 0,02-0,05mm.

Trước hết, đếm số lượng thể vùi tinh và tính toán số lượng thể vùi trong chế phẩm tạo dạng đảm bảo hàm lượng 2×10^9 OB/gam với định hướng liều lượng 500gam/ha sẽ có được lượng thể vùi phun rải cho 1 ha cây trồng là 1×10^{12} OB/ha. Đếm số lượng thể vùi tinh theo phương pháp pha loãng và nhuộm màu bằng Tryphan Blue. Sau đó kiểm tra số thể vùi trên buồng đếm hồng cầu dưới kính hiển vi, từ đó xác định lượng thể vùi cần sử dụng để phối trộn với phụ gia để tạo ra 1kg chế phẩm. Nếu tạo chế phẩm có chứa axit Boric, pha 50 gam axit với 100ml nước cất rồi phun trộn đều cho 1kg chế phẩm.

Điều chỉnh mức pH của chế phẩm từ 6,5 - 7,0 và sấy khô ở nhiệt độ 30 - 35°C trong thời gian 10 - 12 giờ để độ ẩm ở mức 10 - 12%. Sau đó, đóng gói trong bao giấy bạc và bảo quản chế phẩm ở nhiệt độ thường hoặc nhiệt độ từ 5 đến 10°C trong khi chờ sử dụng.

2.5. Đánh giá hiệu quả trừ sâu khoang của chế phẩm trong phòng thí nghiệm

Thí nghiệm được bố trí trong phòng thí nghiệm bằng cách phun chế phẩm lên sâu non tuổi 2 được nuôi trên lá bắp cải trong xô can thủy tinh đường kính 20cm với 3 công thức, 3 lần

nhắc lại/công thức, mỗi lần nhắc lại là một bộ can có 50 sâu non sâu khoang, tương ứng với các công thức như sau:

Công thức 1: Chế phẩm NPV-1 không có axit Boric, liều lượng 500gam/ha, nồng độ phun 0,1%.

Công thức 2: Chế phẩm NPV-1 không có axit Boric, liều lượng 500gam/ha, nồng độ phun 0,1%.

Công thức 3: Đối chứng phun nước lã.

Theo dõi số sâu sống, sâu chết ở các công thức thí nghiệm và tính hiệu lực gây chết sâu khoang của chế phẩm theo công thức Abbott:

$$H(\%) = \frac{C - T}{C} \times 100 \quad (1)$$

Trong đó: C là số sâu sống ở công thức đối chứng

T là số sâu sống ở công thức thí nghiệm

2.6. Đánh giá hiệu lực phòng trừ sâu khoang của chế phẩm ngoài nhà lưới

Thí nghiệm được tiến hành trên sâu khoang hại rau bắp cải được trồng trong nhà lưới. Thí nghiệm được bố trí với 5 công thức, 3 lần nhắc lại/công thức. Mỗi lần nhắc lại tiến hành trên 10 cây bắp cải 50 ngày tuổi được thả 5 sâu tuổi 2 cho mỗi cây.

Công thức 1: Chế phẩm NPV-1 không có axit Boric, liều lượng 500gam/ha, nồng độ phun 0,1%.

Công thức 2: Chế phẩm NPV-1 không có axit Boric, liều lượng 500gam/ha, nồng độ phun 0,1%.

Công thức 3: Sâu chết bệnh được nghiền, lọc với liều lượng 500 sâu/ha và nồng độ phun 5%.

Công thức 4: Đối chứng, phun nước lã.

Theo dõi mật độ sâu khoang sống trước phun, sau phun 7 ngày và tính hiệu lực phòng trừ sâu khoang của chế phẩm theo công thức Henderson - Tilton:

$$H(\%) = \left(1 - \frac{T_a \times C_b}{T_b \times C_a}\right) \times 100 \quad (2)$$

Trong đó: T_a là số sâu sống ở công thức thí nghiệm sau xử lý

T_b là số sâu sống ở công thức thí nghiệm trước xử lý

C_a là số sâu sống ở công thức đối chứng sau xử lý

C_b là số sâu sống ở công thức đối chứng trước xử lý

2.7. Phương pháp tính toán, xử lý số liệu

Xử lý thông kê số liệu theo chương trình Irristat 4.0 trên phần mềm Excel.

3. Kết quả nghiên cứu

Tinh sạch thể vùi

Kết quả thí nghiệm với 7 công thức tinh sạch thể vùi khác nhau với dịch thể vùi vi rút NPV thu hoạch sau khi nhiễm trên tế bào nhân nuôi được xác định là $2,8 \times 10^8 \text{OB/ml}$ ở thời điểm 10 ngày sau khi nhiễm được trình bày ở Bảng 1. Kết quả cho thấy khi phân lập, tinh sạch thể vùi nếu sử dụng từ 2 - 4 lần nước cất vô trùng thì hàm lượng thể vùi tinh thu được từ $1,04 - 1,80 \times 10^8 \text{OB/ml}$. Điều đó có nghĩa lượng thể vùi bị loại bỏ đi khá nhiều, chỉ thu được 37, 14-64,26% số thể vùi có được sau khi nhiễm.

Nếu sử dụng 1 lần nước cất vô trùng với 1 lần SDS 0,1% ly tâm trong thời gian 5 phút/lần để phân lập thì hàm lượng thể vùi tinh thu được đạt từ $2,33 \times 10^8 \text{OB/ml}$ (thu được 83,21% lượng thể vùi trước tinh sạch). Nếu ly tâm trong thời gian 3 phút/lần trong việc dùng 2 lần nước cất xen kẽ với 1 lần SDS thì lượng thể vùi thu được là cao nhất, tới $2,71 \times 10^8 \text{OB/ml}$, bằng 96,79% lượng thể vùi. Nếu sử dụng 2 lần SDS 0,1% xen kẽ với 2 lần nước cất vô trùng thì hàm lượng thể vùi có thể đạt từ $2,10 \times 10^{10} \text{OB/ml}$, còn sử dụng 2 lần SDS xen kẽ với 3 lần nước cất thì lượng thể vùi thu được là $2,35 \times 10^{10} \text{OB/ml}$. Lượng thể vùi thu được tương ứng là 75,0% và 83,93% (Bảng 1).

Bảng 1

Hàm lượng thể vùi tinh thu được sau khi nhiễm trên tế bào với các phương pháp tinh sạch khác nhau

Công thức thí nghiệm	Phương pháp phân lập tinh sạch thể vùi tinh	Hàm lượng thể vùi (OB/ml)
Công thức 1	2 lần (nước cất)	$1,04 \times 10^8$
Công thức 2	3 lần (nước cất)	$1,50 \times 10^8$
Công thức 3	4 lần (nước cất)	$1,80 \times 10^8$
Công thức 4	2 lần (nước cất - SDS)	$2,33 \times 10^8$
Công thức 5	3 lần (nước cất- SDS - nước cất)	$2,71 \times 10^8$
Công thức 6	4 lần (SDS - nước cất- SDS - nước cất)	$2,10 \times 10^{10}$
Công thức 7	5 lần (nước cất- SDS - nước cất- SDS - nước cất)	$2,35 \times 10^{10}$

Nguồn: Kết quả phân tích dữ liệu của nhóm nghiên cứu

Có thể sử dụng nước để tinh sạch thu hồi thể vùi tinh tạo ra sau khi nhiễm tế bào bằng nước cất khi ly tâm với tốc độ 600 vòng/phút là chưa đáp ứng yêu cầu của việc làm sạch và giữ được tối đa thể vùi tinh. Còn cách làm của Kanokwan và cộng sự (2004) đã thực hiện tinh sạch thể vùi tinh bằng cách ly tâm với tốc độ 5.000 vòng/phút để loại bỏ môi trường nuôi nhân, sau đó ly tâm lại bằng nước cất có thể có hiệu quả hơn.

Với lượng thể vùi thu được rất dễ dàng cho việc tạo sản phẩm dạng bột thấm nước, dịch lỏng hoặc để đông khô phục vụ bảo quản lâu dài vì thể tích để bảo quản nguyên liệu thể vùi tinh sẽ ít hơn. Đồng thời, việc phân lập thành công thể vùi tinh đã tạo ra việc tạo dạng chế phẩm vi rút sẽ đơn giản hơn nhiều. Vì từ dịch thể tế bào nuôi nhân sau khi nhiễm vi rút NPV (sản xuất theo công nghệ tế bào) hoặc từ dịch nghiền sâu non chết sau khi nhiễm NPV (sản xuất theo công nghệ truyền thống), sau khi phân lập thể vùi tinh sẽ cho phép dễ dàng trong bảo quản nguyên liệu thể vùi và tạo dạng sử dụng chế phẩm khác nhau với hàm lượng thể vùi như đã được dự kiến cho 1 ha cây trồng cần phòng trừ sâu khoang. Đặc biệt đối với tạo dạng bột thấm nước với hàm lượng thể vùi trong chế phẩm một cách mong muốn.

Hình 1. Kết quả phân tích PCR các mẫu NPV trên tế bào và sâu bị bệnh

Qua tiến hành phân tích cấu trúc trình tự gen của sản phẩm nhân sinh khối NPV từ tế bào trên cơ sở áp dụng kỹ thuật PCR. Kết quả gửi phân tích giải xây dựng cây phả hệ của cả 4 mẫu vi rút NPV sâu khoang (*Spodoptera litura*) thu được sau lây nhiễm trên tế bào và trên sâu non đã xác định trình tự gen của chúng hoàn toàn giống nhau (Hình 1) và đều thuộc loài *Spodoptera litura* Nucleo Polyhedrosis Virus (NPV-Spl), giống *Alphabaculovirus*, họ *Baculoviridae* với độ tương đồng 100% khi so sánh trình tự gen NPV trên ngân hàng GenBank và cùng nhánh với trình tự gen của vi rút NPV sâu khoang của Ấn Độ (Bảng 2 và Hình 2). Kết quả phân tích cho phép khẳng định sản phẩm vi rút NPV được sản xuất bằng công nghệ lây nhiễm trên tế bào nhân nuôi.

Bảng 2

Các chủng NPV sâu khoang sử dụng trong phân tích phả hệ

Nguồn vi rút	Tên mẫu phân tích	Mã số GenBank	Nguồn gốc
<i>Spodoptera litura</i> nucleopolyhedrovirus polyhedrin gene	Từ NPVSpl-2 đến NPVSpl-5	-	Việt Nam
<i>Spodoptera litura</i> nucleopolyhedrovirus polyhedrin gene	NPVSpl-6	-	Việt Nam

Nguồn vi rút	Tên mẫu phân tích	Mã số GenBank	Nguồn gốc
<i>Spodoptera litura</i> nuclear polyhydrosis virus polh gene for polyhedrin	SpltNPV-In	X94437	Ấn Độ
<i>Spodoptera litura</i> NPV gene for polyhedron	SpltNPV-Jap	AB326102	Nhật Bản
<i>Spodoptera litura</i> nucleopolyhedrovirus polyhedrin gene	SpltNPV-Kore	DQ152923	Hàn Quốc
<i>Spodoptera litura</i> nucleopolyhedrovirus polyhedrin gene	SpltNPV-Kore	DQ350142	Hàn Quốc
<i>Spodoptera litura</i> nucleopolyhedrovirus polyhedrin gene	SpltNPV-Ger	AY706714	Đức
<i>Spodoptera litura</i> nucleopolyhedrovirus polyhedrin gene	SpltNPV- Ger	AY706715	Đức
<i>Spodoptera litura</i> nuclear polyhedrosis virus polyhedrin (polh) gene	SpltNPV-Aus	AF068189	Australia
<i>Spodoptera littoralis</i> NPV gene for nuclear polyhedron	SpltNPV- Fra	D01017	Pháp
<i>Pieris rapae</i> granloviruses	PiraGV	AY706673	-

Nguồn: Kết quả phân tích dữ liệu của nhóm nghiên cứu

Hình 2. Cây phả hệ xây dựng theo phương pháp Neighbor-joining

Ghi chú: So sánh trình tự gen polh với các đại diện từ Ngân hàng Gen. Mẫu vi rút NPV sâu khoang của Việt Nam được in đậm (mũi tên). Tên mẫu phân tích được chỉ rõ ở Bảng 1, mã số Ngân hàng Gen đặt trong dấu ngoặc đơn. Sâu *Pieris rapae* granuloviruses được đưa vào làm đối chứng. Gốc nhánh là giá trị thống kê Bootstrap với 1000 lần lặp (chỉ ghi những giá trị lớn hơn 80%). Thước đo khoảng cách di truyền 5%

3.2. Nghiên cứu tạo chế phẩm NPV dạng bột thấm nước

Dù tạo dạng sử dụng theo cách nào và định hướng liều lượng sử dụng chế phẩm là bao nhiêu thì mục tiêu cuối cùng vẫn phải đảm bảo tổng lượng thể vùi phun rải cho 1 ha cây trồng đạt từ 9×10^{10} đến 1×10^{12} OB/ha (Grzywacz, Brown, Jones, & Parnell, 1996). Theo Cisneros và cộng sự (2002) thì việc bổ sung axit Boric sẽ góp phần duy trì độ pH trong chế phẩm ở mức trung tính để thể vùi không bị công phá và giúp bảo vệ thể vùi không bị diệt khi bị tác động của ánh sáng cực tím.

Kết quả đã tiến hành tạo dạng thử nghiệm được 2 loại sản phẩm bột thấm nước có hàm lượng thể vùi là $2,0 \times 10^9$ OB/gam với ý tưởng sử dụng theo liều lượng 500gam/ha. Trong đó NPV-1 là chế phẩm không có axit Boric và NPV-2 là chế phẩm có bổ sung thêm 0,5% axit Boric để phục vụ các thí nghiệm đánh giá hiệu quả phòng trừ sâu khoang của chế phẩm.

Đánh giá hiệu lực gây chết sâu khoang của các chế phẩm trong điều kiện phòng thí nghiệm với các liều lượng và nồng độ phun khác nhau được tính toán dựa trên số lượng thể vùi của vi rút NPV có trong sản phẩm và số lượng cần thiết cho 1 ha như khi sử dụng ngoài đồng ruộng.

Kết quả thí nghiệm (Bảng 3) hiệu lực phòng trừ sâu khoang của chế phẩm NPV-1 có hàm lượng $2,0 \times 10^9$ OB/gam đạt 81,23%. Khi có bổ sung thêm 0,5% axit Boric với liều lượng 5gam/kg chế phẩm (NPV-2) khi tạo dạng thì hiệu lực trừ sâu đạt tới 87,14%, cao hơn so với không bổ sung axit Boric.

Kết quả đánh giá hiệu lực trừ sâu khoang trên rau bắp cải của chế phẩm trong nhà lưới (Bảng 4) cho thấy: Khi sử dụng chế phẩm dạng bột thấm nước NPV-1 có hàm lượng $2,0 \times 10^9$ OB/gam và sử dụng với liều lượng 500gam/ha (tương đương với $1,0 \times 10^{12}$ OB/ha) hiệu quả đạt 81,13% ở 7 NSP chế phẩm.

Bảng 3

Hiệu lực phòng trừ sâu khoang của các dạng sản phẩm trong điều kiện phòng thí nghiệm

Công thức thí nghiệm	Loại sản phẩm	Liều lượng cho 1 ha (gam)	Nồng độ sử dụng (%)	Hiệu lực trừ sâu (%)
1	NPV-1	500 gam	0,1	81,23
2	NPV-2	500 gam	0,1	87,14
3	Đối chứng	Nước lã	-	-

Ghi chú: NPV-1: chế phẩm không bổ sung axit Boric
NPV-2: chế phẩm có bổ sung thêm 0,5% axit Boric

Nguồn: Kết quả phân tích dữ liệu của nhóm nghiên cứu

Nếu sử dụng chế phẩm có bổ sung thêm 0,5% axit Boric (NPV-2) với liều lượng 5gam/kg chế phẩm thì hiệu lực trừ sâu khoang đạt 82,92%, cao hơn chế phẩm không bổ sung Boric là 1,79%. Tuy nhiên, kết quả xử lý thống kê cho thấy không có sự sai khác có ý nghĩa về hiệu quả phòng trừ sâu khoang giữa 2 công thức chế phẩm.

Trong khi đó, nếu sử dụng sâu chết bệnh do NPV theo phương pháp truyền thống với liều lượng sử dụng là 500 sâu chết bệnh cho 1ha và phun với nồng độ 5% thì hiệu lực trừ sâu cũng chỉ đạt 47,68% (Bảng 4). Kết quả này hoàn toàn phù hợp với kết quả thí nghiệm trước đây của tác giả Nguyen và cộng sự (1996).

Bảng 4

Hiệu lực phòng trừ sâu khoang trên rau bắp cải của chế phẩm trong điều kiện nhà lưới

Công thức	Loại chế phẩm	Lượng sử dụng 1 ha	Nồng độ phun (%)	Hiệu lực ở 7NSP (%)
CT 1	NPV-1	500 gam	0,1	81,13 a
CT 2	NPV-2	500 gam	0,1	82,92 a
CT 3	Sâu bị bệnh nghiền lọc (Đ/c 1)	500 sâu	5,0	47,68 b
CT 4	Nước lã (Đ/c 2)	-	-	-
CV (%)		-	-	0,437
LSD		-	-	5,18

Ghi chú: Đ/c: Đối chứng; NSP: Ngày sau phun

NPV-1: chế phẩm không bổ sung axit Boric;

NPV-2: chế phẩm có bổ sung thêm 0,5% axit Boric

Nguồn: Kết quả phân tích dữ liệu của nhóm nghiên cứu

4. Thảo luận

Nhận thức rõ việc xác định được kỹ thuật phân lập thể vùi tinh là khâu kỹ thuật hết sức quan trọng và có tính thực tiễn cao trong chuỗi các công đoạn của quá trình sản xuất chế phẩm vi rút. Dựa theo phương pháp Shapiro và Shepard (2007). Sajap và cộng sự (2000) để thu hoạch thể vùi tinh từ dịch tế bào đã nhiễm vi rút NPV bằng cách li tâm 1500 vòng/phút sử dụng nước cất kết hợp sử dụng SDS 0,1%, mỗi lần ly tâm với nước cất hoặc SDS trong thời gian 5 phút. Kết quả thí nghiệm cho thấy việc tinh sạch thể vùi tinh giúp cho việc bảo quản thuận tiện, không cần nhiều dụng cụ và thiết bị. Đồng thời, sản phẩm thể vùi tinh sau tinh sạch giúp chủ động định lượng số lượng thể vùi cần thiết khi tạo dạng sử dụng sản phẩm. Đồng thời, việc thu hoạch thể vùi tinh còn tạo điều kiện bảo quản lâu dài dễ dàng và vận chuyển với khối lượng ít khi đi xa, đến nơi tiêu thụ sản phẩm mới tiến hành tạo dạng mà chưa cần phải tạo dạng sử dụng sản phẩm ngay.

Theo Huda, Sajap, và Lau (2012) thì SDS (Sodium Dodecyl Sulphate) là một tác nhân tạo sủi trong việc phân lập thể vùi tinh từ dịch tế bào đã nhiễm vi rút NPV vì SDS có tác dụng giúp cân bằng sinh lý tế bào, không gây phá vỡ vỏ protein của thể vùi và chống hiện tượng kết mảng thể vùi sau khi phân lập thể vùi tinh. Sajap và cộng sự (2000), Grzywacz và cộng sự (1996) cho rằng sử dụng SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) để thu hoạch thể vùi tinh từ dịch nhiễm có hiệu quả cao do chúng làm cho thể vùi tách rời nhau, dễ phân bố đồng đều trong phụ gia khi tạo dạng sản phẩm.

Nghiên cứu của Shapiro và Shepard (2007) đã khẳng định việc bổ sung axit Boric với tỷ lệ 0,5% có tác dụng giúp thể vùi NPV bền vững dưới tác động của tia tử ngoại. Kết quả thử nghiệm cho thấy hoàn toàn có thể tạo dạng sử dụng chế phẩm với liều lượng 500gam/ha dưới dạng bột thấm nước có hàm lượng thể vùi $2,0 \times 10^9$ OB/gam, tương đương 1×10^{12} OB/ha với phụ gia có thành phần gồm 60% bột tan và 40% cao lanh. Cách làm này ưu việt hơn so với cách làm truyền thống vì nhu cầu lượng phụ gia cho tạo dạng ít hơn, thuận tiện cho việc bảo quản, vận chuyển tiêu thụ sản phẩm và tiện dùng cho người nông dân khi sử dụng để phòng trừ sâu khoang hại cây trồng nông nghiệp.

5. Kết luận

Có thể tinh sạch để thu hoạch thể vùi tinh NPV sâu khoang bằng việc phối hợp sử dụng 2 lần SDS xen kẽ với 3 lần nước cất thì lượng thể vùi thu được cao nhất, đạt tới $2,35 \times 10^{10}$ OB/ml và tỷ lệ thu hồi thể vùi tới 83,93%. Tạo dạng sử dụng chế phẩm với liều lượng 500gam/ha dưới dạng bột thấm nước có hàm lượng thể vùi $2,0 \times 10^9$ OB/gam, tương đương 1×10^{12} OB/ha cho hiệu quả gây chết sâu khoang trong điều kiện phòng thí nghiệm đạt 81,23% với chế phẩm không bổ sung Boric và đạt 87,14% với chế phẩm có bổ sung thêm 5% axit Boric, đạt tới 81,13 % và 82,92% (tương ứng) trong điều kiện nhà lưới ở thời điểm 7 ngày sau phun.

LỜI CẢM ƠN

Chúng tôi xin chân thành cảm ơn Ban quản lý chương trình Công nghệ sinh học nông nghiệp (Bộ Nông nghiệp và PTNT) đã tạo điều kiện tài chính và Trung tâm Sinh học (Viện Bảo vệ thực vật) đã tạo điều kiện thuận lợi về thiết bị máy móc để tiến hành các thí nghiệm trong nghiên cứu nói trên.

Tài liệu tham khảo

- Cisneros, J., Perez, J. A., Penagos, D. I., Ruiz, J. V., Cabellero, P., Cave, R. D., & Williams, T. (2002). Formulation of a nucleopolyhedrosis with Boric acid for control of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in maize. *Journal of Biological Control*, 23(1), 87-95.
- Grzywacz, R. R. J., Brown, M., Jones, A. K., & Parnell, M. (1996). *The Helicoverpa armigera NPV production manual, Book of Instruction manual*. New York, NY: Academic Press.
- Huda, N., Sajap, A. S., & Lau, W. H. (2012). Stability of *Spodoptera litura* nucleopolyhedrosis virus in Sodium Dodecyl Sulphate. *African Journal of Biotechnology*, 11(16), 3877-3881.
- Kumar, C. M. S., Sathiah, N., & Rabindra, R. J. (2005). Optimizing the time of harvest of Nucleopolyhedrovirus infected *Spodoptera litura* (Farbricius) larvae under in vivo production systems. *Curent Sciences*, 88(10), 1682-1684.
- Nguyen, C. V., Hoang, V. T., & Huger, A. M. (1996). Một số Baculovirut gây bệnh trên sâu hại thuộc bộ Lepidoptera ở Việt Nam [Some Baculoviruses cause pests of the Lepidoptera

order in Vietnam]. In *Tuyển tập công trình nghiên cứu biện pháp sinh học phòng trừ dịch hại cây trồng (1990-1995)* (pp. 17-23). Hanoi, Vietnam: NXB Nông nghiệp.

Sajap, A. S., Kotulai, J. R., Bakir, M. A., Hong, L. W., Samad, N.A., & Kadir, H. A. (2000). Pathogenicity and characteristics of *Spodoptera litura* Nucleopolyhedrovirus from Peninsular Malaysia. *Journal of Tropical Agricultural Sciences*, 23(1), 23-28.

Shapiro, M., & Shepard, B. M. (2007). Evaluation of clays and fluorescent brightener upon the activity of the Gypsy Moth (Lepidoptera: Lymantridae) nucleopolyhedrovirus. *Journal of Agricultural and Urban Entomology*, 24(4), 165-175.