

**NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM SINH HỌC CỦA NẤM KÝ SINH CÔN TRÙNG
ISARIA TENUIPES (Peck) Samson Ở VƯỜN QUỐC GIA PÙ MÁT
VÀ KHU BẢO TỒN THIÊN NHIÊN PÙ HUỐNG, TỈNH NGHỆ AN**

**TRẦN NGỌC LÂN, THÁI THỊ NGỌC LAM,
NGUYỄN THỊ THÚY, TRẦN VĂN CẢNH, NGUYỄN THỊ THU**
Trường Đại học Vinh

Nấm ký sinh côn trùng *Isaria tenuipes* (Peck) Samson (*Paecilomyces tenuipes* Peck) là dạng vô tính của *Cordyceps takaomontana* Yakush & Kumaz (Fukasu T. *et al.*, 1997). Hiện nay, ở Trung Quốc, Nhật Bản, Hàn Quốc đã sử dụng loài nấm này làm thực phẩm chức năng chữa nhiều loại bệnh khác nhau (Zhu J. S. *et al.*, 1998 a, b; Luangsa-ard J. J. *et al.*, 2007). Theo kết quả nghiên cứu của Haruhisa K. *et al.* (2004) cho thấy, trong sinh khối nấm *I. tenuipes* chứa adenosine, manitol, paecilomycine A, B và C là các hạt chất có hoạt tính sinh học cao. Khả năng nhân sinh khối của *I. tenuipes* trên các môi trường khác nhau đã được quan tâm nghiên cứu ở nhiều nước trên thế giới. Chun - Ping Zu *et al.* (2002) khi nhân sinh khối *I. tenuipes* các điều kiện nuôi như nguồn dinh dưỡng cacbon, khoáng, nitơ và độ pH ảnh hưởng lớn đến sinh trưởng phát triển của nấm. Nguồn dinh dưỡng tối ưu cho nhân sinh khối là đường glucose, meat peptone hoặc tryptone và K₂HPO₄ hoặc MgSO₄, PH = 6. Ở Việt Nam, các nghiên cứu về nấm ký sinh côn trùng còn rất hạn chế. Bài báo đề cập đặc điểm sinh học của nấm ký sinh côn trùng *Isaria tenuipes* (Peck) Samson là một trong những kết quả nghiên cứu của dự án Nghị định thư của Trường Đại học Vinh và BIOTEC Thái Lan (mã số: 04/2009/HĐ-NĐT).

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Đối tượng: Nấm ký sinh côn trùng *Isaria tenuipes* (Peck) Samson.

Địa điểm: Vườn Quốc gia Pù Mát và Khu Bảo tồn thiên nhiên Pù Huống, Nghệ An.

Thời gian nghiên cứu: 07/2007 - 12/2010.

Phương pháp nghiên cứu: Mẫu vật nấm ký sinh côn trùng *Isaria tenuipes* được thu thập trong rừng nguyên sinh ở Vườn Quốc gia Pù Mát và Khu Bảo tồn thiên nhiên Pù Huống, tỉnh Nghệ An. Phân lập nấm ký sinh côn trùng theo phương pháp của Goettel và Inglis (1997). Phân lập bào tử đơn dựa theo phương pháp của Choi *et al.* (1997). Sau khi phân lập thành công, thực hiện cấy chuyển sang môi trường PDA (Potato Dextrose Agar) theo phương pháp của Brown và Smith (1957). Định loại loài *Isaria tenuipes* được tiến hành theo phương pháp của Samson *et al.* (1988), Kobayasi và Shimizu (1983), Luangsa-ard *et al.* (2007), Sung *et al.* (2007). Số liệu được xử lý theo phần mềm Microsoft Office Excel 2003 và Statistix 9.0 theo phương pháp thống kê thông thường.

II. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

1. Vị trí phân loại

Giới: Nấm - T.l. Jahn & F.f. Jahn, 1949 Ex R.t. Moore, 1980 - Fungi

Ngành: Ascomycota - H.c. Bold, 1957 Ex T. Cavalier-Smith, 1998 - Sac Fungi

Lớp: Ascomycetes - (Tehler, 1988) Ex O.e. Eriksson & K. Winka, 1997

Bộ: Onygenales - Cif., 1957 Ex Benny & Kimbr., 1980

Họ: Clavicipitaceae - Berk., 1857

Giống: *Isaria*

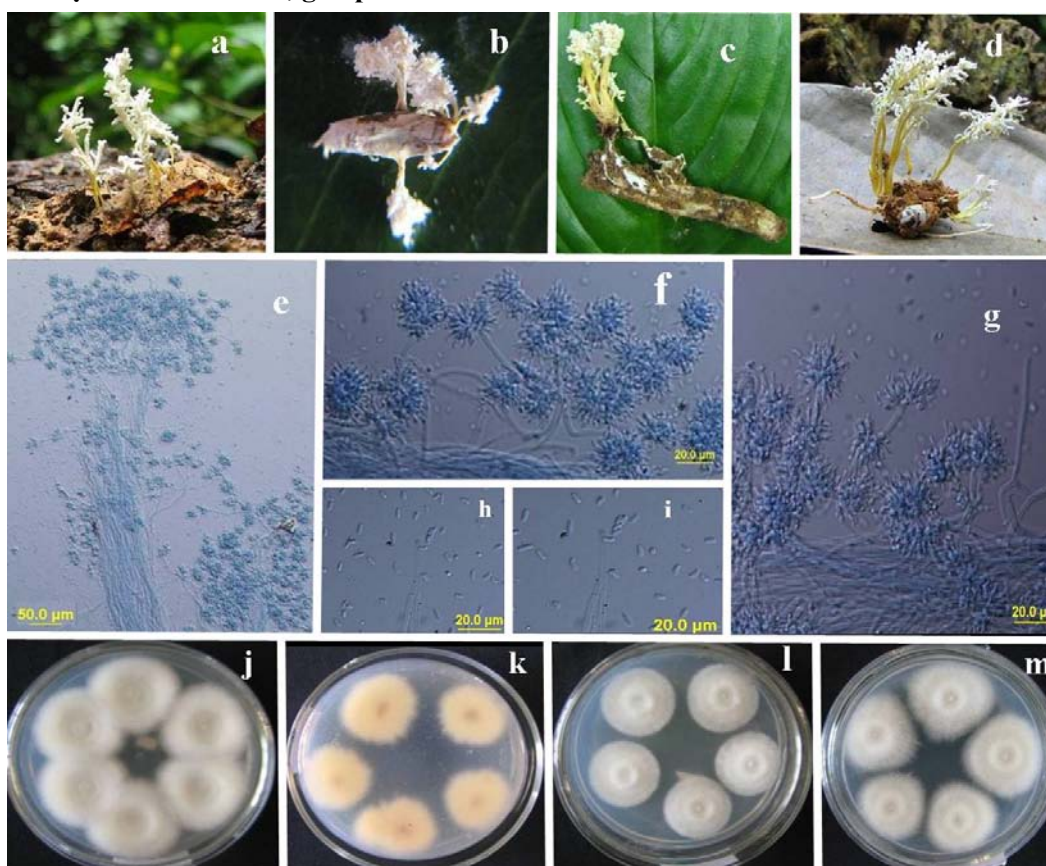
Loài: *Isaria tenuipes* (Peck) Samson

2. Sinh cảnh và vật chủ

Vườn Quốc gia Pù Mát và Khu Bảo tồn thiên nhiên Pù Huống là những khu vực có tính đa dạng sinh học cao. Tại đây chứa đựng nguồn lợi rất lớn về nấm ký sinh côn trùng trong đó có *Isaria. I. tenuipes* được tìm thấy trong tàn dư thực vật hoặc trong lớp đất mặt sâu 1 - 2 cm. Loại nấm này ưa ẩm, phân bố dọc hai bên các khe suối cạn trong rừng. Chúng phân bố rất rộng từ vùng đệm đến vùng lõi, thậm chí có thể bắt gặp ngay trên đường vào rừng.

Vật chủ của *I. tenuipes* chỉ có trên các loài nhộng hoặc sâu non bộ Cánh vẩy nhưng chủ yếu là nhộng côn trùng bộ Cánh vẩy (Lepidoptera). Kích thước vật chủ thay đổi rất lớn, nhộng vật chủ có chiều dài 2,21 - 27,36 mm, chiều rộng 1,13 - 7,78mm. Điều này, chứng tỏ *I. tenuipes* ký sinh trên nhiều loài sâu bộ Cánh vẩy khác nhau. Mức độ chuyên hóa tương đối cao chỉ ký sinh ở pha nhộng của sâu bộ Cánh vẩy. Các loại sâu Cánh vẩy khi hóa nhộng thường nằm trong lá, cành cây hay trong đất, khi nhộng bị nấm ký sinh thì sau một thời gian các synnemata mọc lên có màu trắng đặc trưng. *I. tenuipes* rất dễ nhận biết trong quá trình thu thập.

3. Đặc điểm hình thái, giải phẫu



Hình 1: Mẫu vật, cấu trúc sinh bào tử và khuẩn lạc trên môi trường PDA của *I. Tenuipes*
a-d nấm trên vật chủ, *e-g* cấu trúc sinh bào tử, *h-i* bào tử đỉnh, *j-m* khuẩn lạc trên môi trường PDA

Hình thái chung của các mẫu vật *I. tenuipes* thu thập được đều có synnemata mọc ra từ vật chủ. Các synnemata có thể dạng đơn, phân nhánh hay phân nhánh không đều đặn. Chiều dài của synnemata thay đổi từ 1,66 - 40,85 mm, đường kính 100 - 500 μm. Synnemata lớn nhất gấp 24,61 lần synnemata nhỏ nhất. Cuống synnemata có màu kem, vàng đến vàng nâu và giới hạn bởi phần

chứa nhiều bào tử dạng bột màu trắng đến màu kem. Synnema mọc chủ yếu ở hai đầu của nhộng. Bào tử dạng bột, nhẹ và phủ đầy synnema, rất dễ phát tán trong không khí nhờ gió.

Mức độ đa dạng về hình thái bên ngoài của *I. tenuipes* rất cao. Số lượng synnema mọc trên vật chủ thay đổi từ 1 - 10 cái. Màu sắc đặc trưng của loài này là màu trắng đến hơi vàng.

Quan sát cấu trúc sinh bào tử của *I. tenuipes* cho thấy, thành khuẩn ty thỉnh thoảng có dạng xù xì. Cấu trúc cuống bào tử đỉnh phân nhánh dày đặc và phình ra. Đối với các cuống bào tử đỉnh, sự phân nhánh và bào tử đều tập trung ở phần đầu của cuống thỉnh thoảng phân nhánh từ giữa cuống. Khoảng cách giữa các nhánh trên cùng một cuống bào tử đỉnh thay đổi từ 27 - 63 μm . Thể bình chia làm hai phần: phần thân có dạng hình cầu, cổ ngắn và nhỏ, kích thước 4,5 - 8,1 x 2,2 - 4,5 μm . Bào tử đỉnh hình trụ, lồi cong, cong một phần hoặc toàn bộ. Đặc trưng hình dạng bào tử của loài là dạng quả thận, kích thước thay đổi từ 4,5 - 7,0 x 1,0 - 2,5 μm .

Trên môi trường PDA, cấu trúc của cuống bào tử đỉnh có sự thay đổi về kích thước so với phân lập trực tiếp từ vật chủ. Cuống bào tử mọc từ khuẩn ty có bề mặt nhẵn, trơn, trong suốt và thẳng đứng. Chúng có thể là sợi đơn hay dạng bó, có kích thước 90 - 120 x 2,5 - 4,0 μm . Trên các cuống có sự phân nhánh, mỗi nhánh mọc thành vòng, mỗi vòng gồm 2- 6 thể bình. Thể bình có kích thước 4,5 - 6,2 x 2,5 - 3,2 μm gồm phần thân hình cầu búp nhọn tạo thành cổ ngắn có chiều rộng 0,5 μm . Bào tử đỉnh hình trụ, phần lớn dạng cong, kích thước thay đổi từ 3,0 - 7,5 x 2,0 - 2,5 μm đối với kiểu có một tế bào, đối với bào tử có 2 tế bào thường dài từ 6,0 - 12,0 μm .

4. Sự đa hình của *I. tenuipes*

Tiến hành thu thập mẫu nấm ký sinh côn trùng ở Vườn Quốc gia Pù Mát và Khu Bảo tồn thiên nhiên Pù Huông cho thấy, sự đa hình về các kiểu mọc synnema của loài *I. tenuipes*. Trong số 161 mẫu nấm *Isaria* thu thập từ rừng có tới 123 mẫu là *I. tenuipes* chiếm 76,40%. Kết quả này cho thấy mức độ phổ biến cao của loài *I. tenuipes* trong rừng tự nhiên ở Pù Mát và Pù Huông.

Dựa vào cấu trúc hình thái của synnema, có thể phân chia thành 4 dạng kiểu hình đặc trưng của *I. tenuipes*. Kết quả được trình bày ở Bảng 1. Sự xuất hiện của các kiểu hình này trong tự nhiên không như nhau. Tiến hành phân tích mối tương quan giữa kích thước vật chủ với chiều dài và số lượng synnema cho thấy, có mối tương quan rất yếu. Tần suất bắt gặp của các kiểu hình trong tự nhiên được trình bày ở Bảng 1. Kết quả ở Bảng 1 cho thấy, trong tự nhiên kiểu hình dạng hoa lục bình trắng phổ biến nhất với tần suất bắt gặp là 52,85%. Kiểu hình thể vô tính và hữu tính ít gặp nhất, chiếm 3,25%, đây là kiểu hình đặc biệt vì trên vật chủ tồn tại cả hai dạng hữu tính và vô tính.





Bảng 1

Tần suất bắt gặp các kiểu hình *I. tenuipes* trong tự nhiên (N = 123)

Kiểu hình	Số lượng	Tần suất (%)
Kiểu hình 1. Dạng hoa cúc trắng	12	9,75
Kiểu hình 2. Dạng hoa lục bình trắng	65	52,85
Kiểu hình 3. Dạng bông tuyết	42	34,15
Kiểu hình 4. Thể vô tính và hữu tính	4	3,25

Bảng 2

Các kiểu hình synnema của *I. tenuipes*

Tên gọi	Đặc điểm	Hình ảnh
Kiểu hình 1. Dạng hoa cúc trắng	Synnema hoàn toàn không phân nhánh. Bào tử bao phủ khoảng 1/3 phía trên của synnema. Bào tử dạng bột bao phủ nhiều lớp ở phần đầu của synnema.	
Kiểu hình 2. Dạng hoa lục bình trắng	Synnema phân nhánh. Có thể phân nhánh đối xứng đều đặn hoặc không đối xứng. Quan sát dưới kính hiển vi thấy được các cuống bào tử đính trên các nhánh.	
Kiểu hình 3. Dạng bông tuyết	Các synnema mọc thành cụm. Có rất nhiều synnema mọc từ một vị trí trên vật chủ, chúng phân nhánh liên tục và ngắn.	
Kiểu hình 4. Thể vô tính và hữu tính	Đây là kiểu hình rất đặc biệt, khi trên vật chủ tồn tại 2 dạng: Dạng hữu tính là <i>Cordyceps takaomon-tana</i> và dạng vô tính là <i>Isaria tenuipes</i> . Trên vật chủ đều có synnema và quả thể.	

5. Ảnh hưởng của địa điểm và thời gian thu mẫu đến kích thước vật chủ và synnema

5.1. Ảnh hưởng của địa điểm thu mẫu đến kích thước vật chủ và synnema

Bảng 3

Ảnh hưởng của địa điểm thu mẫu đến kích thước vật chủ và synnema

Địa điểm thu thập		VQG Pù Mát (N=30)	Khu BTTN Pù Huống (N=54)	LSD _{0.05}
Chiều dài vật chủ (mm)	Min-max	2,21 - 27,36	2,46 - 13,45	1,88
	TB±Sd	10,02±3,67	8,21 ^b ±2,82	
Chiều rộng vật chủ (mm)	Min-max	1,60 - 6,01	1,13 - 7,78	0,60
	TB±Sd	3,45 ^a ±1,20	3,20 ^a ±1,24	
Chiều dài synnema (mm)	Min-max	1,66 - 27,36	2,13 - 20,70	11,58
	TB±Sd	10,40 ^a ±6,94	7,02 ^a ±4,77	

Ghi chú: Các chữ cái khác nhau biểu thị sự sai khác có ý nghĩa giữa các địa điểm thu thập ở từng cột theo Statistix.

Tiến hành thu mẫu ở hai địa điểm là VQG Pù Mát và Khu BTTN Pù Huống ở cùng điều kiện khí hậu (cuối tháng 2 đầu tháng 3). Từ kết quả ở Bảng 3 cho thấy, *I. tenuipes* có chiều dài vật chủ có sự sai khác ý nghĩa, vật chủ ở VQG Pù Mát có chiều dài trung bình là 10,02 mm lớn

hơn, so với vật chủ thu thập ở Khu BTTN Pù Huống. Ở VQG Pù Mát chiều dài vật chủ thay đổi từ 2,21 - 27,36 mm cao hơn, so với ở khu BTTN Pù Huống là 2,46 - 13,45 mm. Như vậy, kích thước vật chủ lớn nhất lớn hơn vật chủ nhỏ nhất là 12,38 lần ở VQG Pù Mát và 5,47 lần ở Khu BTTN Pù Huống. Điều này chứng tỏ, *I. tenuipes* ký sinh trên nhiều loài sâu bộ Cánh vẩy khác nhau.

Địa điểm thu mẫu không ảnh hưởng đến chiều rộng vật chủ và chiều dài synnema, phân tích thống kê cho thấy, không có sự sai khác ý nghĩa. Chiều dài synnema tại hai điểm thu mẫu có kích thước tương tự nhau lần lượt là 10,40 mm và 7,02 mm. Mức độ thay đổi về kích thước của synnema tương đối lớn 1,66- 27,36 mm ở VQG Pù Mát và 2,13- 20,70 mm ở Khu BTTN Pù Huống.

5.2. Ảnh hưởng của thời gian thu mẫu đến kích thước vật chủ và synnema

Thu thập mẫu nấm *I. tenuipes* tại VQG Pù Mát ở các thời gian khác nhau: đợt 1 (26/02/2010) và đợt 2 (11/04/2010). Kết quả được trình bày ở Bảng 4.

Kết quả ở Bảng 4 cho thấy, kích thước vật chủ và chiều dài synnema không có sự sai khác rõ rệt giữa các đợt thu mẫu, phân tích thống kê không có ý nghĩa. Kết quả về chiều dài vật chủ, chiều rộng vật chủ và chiều dài synnema tương tự nhau ở hai đợt thu mẫu. Như vậy, điều kiện khí hậu ở hai đợt thu mẫu (đợt 1 vào mùa đông, đợt 2 vào đầu mùa hè) ảnh hưởng không rõ rệt đến kích thước vật chủ và chiều dài synnema của loài *I. tenuipes*.

Bảng 4

Ảnh hưởng của thời gian thu mẫu đến kích thước vật chủ và synnema

Thời gian thu thập		Đợt 1 (N=30)	Đợt 2 (N=43)	LSD _{0,05}
Chiều dài vật chủ (mm)	Min-max	2,21 - 27,36	4,38 - 19,56	1,99
	TB±Sd	10,02 ^a ±3,67	9,47 ^a ±3,67	
Chiều rộng vật chủ (mm)	Min-max	1,60 - 6,01	1,38 - 7,43	1,26
	TB±Sd	3,45 ^a ±1,20	3,66 ^a ±1,64	
Chiều dài synnema (mm)	Min-max	1,66 - 27,36	2,35 - 22,18	10,83
	TB±Sd	10,40 ^a ±6,94	10,00 ^a ±5,27	

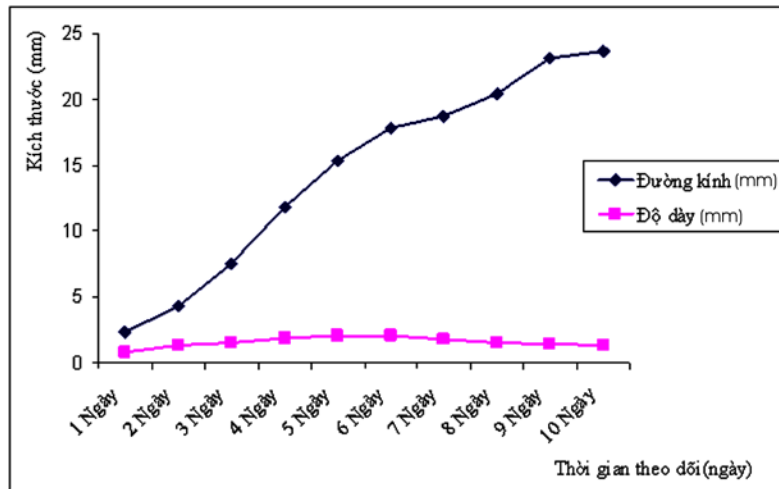
6. Sự sinh trưởng, phát triển của *I. tenuipes* trên môi trường PDA

Bảng 5

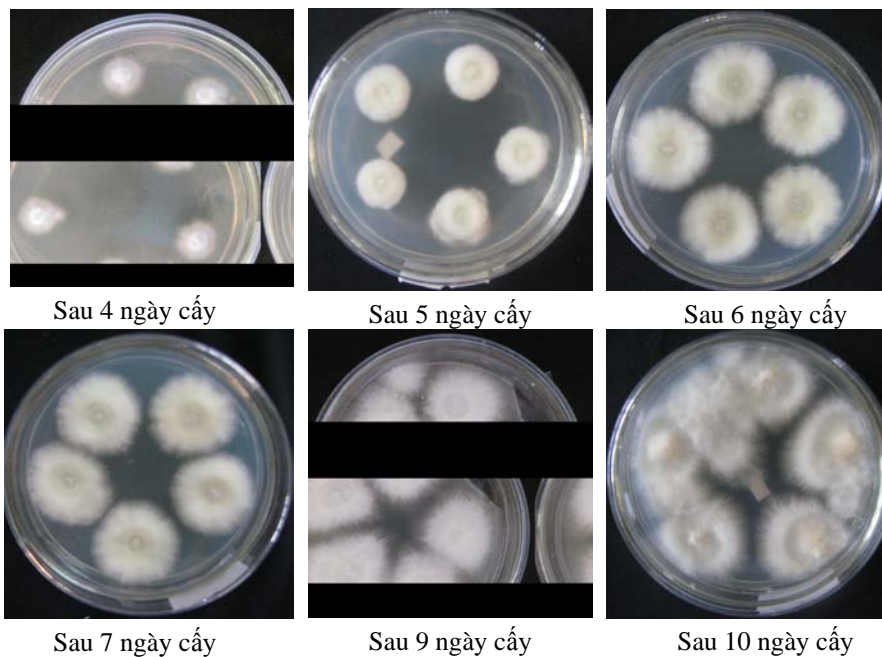
Khả năng sinh trưởng của *I. tenuipes* trên môi trường PDA

Thời gian theo dõi	Đường kính (mm)	Độ dày (mm)
Sau 1 ngày	2,37	0,82
Sau 2 ngày	4,33	1,31
Sau 3 ngày	7,51	1,55
Sau 4 ngày	11,79	1,89
Sau 5 ngày	15,33	2,08
Sau 6 ngày	17,83	2,09
Sau 7 ngày	18,70	1,76
Sau 8 ngày	20,45	1,56
Sau 9 ngày	23,13	1,41
Sau 10 ngày	23,66	1,32

Khuẩn lạc trên môi trường PDA mọc nhanh, hình toả tròn, hướng lên trên. Màu sắc khuẩn lạc thay đổi, đầu tiên màu trắng sau đó chuyển sang màu vàng và vàng nhạt khi thành thực. Bào tử xuất hiện sau nuôi cấy từ 4 - 7 ngày. Sau 10 ngày khuẩn lạc bao phủ môi trường PDA.



Hình 1: Khả năng sinh trưởng của khuẩn lạc *I. tenuipes* trên môi trường PDA



Hình 2: Sự sinh trưởng và phát triển của *I. tenuipes* trên môi trường PDA

Kết quả ở Bảng 5, Hình 1 cho thấy, đường kính của khuẩn lạc tăng dần theo thời gian nuôi cấy và đạt giá trị lớn nhất là 23,66 mm sau 10 ngày (khuẩn lạc phủ kín bề mặt môi trường PDA). Sau ngày thứ 4, bề mặt khuẩn lạc bắt đầu xuất hiện những đường tròn đồng tâm. Ngày thứ 5 ở giữa tâm của khuẩn lạc có xu hướng lõm xuống, mặt sau màu vàng nhạt, ở giữa màu trắng và bắt đầu xuất hiện bào tử màu trắng bao phủ trên bề mặt nấm, dạng bột. Sự xuất hiện bào tử ở ngày thứ 5 đã ảnh hưởng đến độ dày khuẩn lạc. Độ dày tăng dần từ ngày thứ nhất đến ngày thứ 5 và đạt đỉnh ở ngày thứ 6 sau đó giảm dần. Sau 6 ngày, nấm lõm xuống rõ ràng và phân biệt thành 3 đường tròn đồng tâm trên bề mặt môi trường PDA. Sợi nấm dạng lông nhưng màu vàng nhạt, mềm, có lớp bào tử trắng, dạng bột, mỏng bao phủ khắp bề mặt nấm. Sau 7 ngày, giữa tâm của khuẩn lạc bào tử nhô dần lên, dày đặc.

III. KẾT LUẬN

Isaria tenuipes ký sinh trên nhộng của côn trùng bộ Cánh vẩy. Nấm có màu trắng đặc trưng. Sinh cảnh sống thường là những nơi ẩm như trong tàn dư thực vật hay lớp đất mặt trong rừng tự nhiên. Kích thước vật chủ (nhộng bộ Cánh vẩy) có chiều dài 2,21 - 27,36 mm, chiều rộng 1,13 - 7,78mm. Bào tử đỉnh hình trụ, luôn cong, đặc trưng hình quả thận, kích thước từ 4,5 - 7,0 x 1,0 - 2,5 μm . Thể bình có kích thước 4,5 - 8,1 x 2,2 - 4,5 μm . Synnema có kích thước 1,66 - 40,85 mm. Về hình thái synnema của *Isaria tenuipes* có 4 dạng kiểu hình (dạng bông hoa cúc trắng, dạng hoa lục bình trắng, dạng bông tuyết và dạng thể vô tính và hữu tính), trong đó kiểu hình dạng hoa lục bình trắng là phổ biến nhất (tần suất bắt gặp là 52,85%).

Isaria tenuipes sinh trưởng nhanh trên môi trường PDA, khuẩn lạc đạt đường kính lớn nhất 23,66mm sau 10 ngày và độ dày đạt 2,09mm sau 6 ngày. Khuẩn lạc có màu trắng đến vàng, sau 4 đến 7 ngày xuất hiện bào tử dạng bột, màu trắng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Chun Ping X. et al.**, 2003: *Process Biochemistry*, 38: 1025-1030.
2. **Fukasu T., Sato H., Kuriyama H.**, 1997: *J. Invertebr. Pathol.*, 70: 203-208.
3. **Haruhisa K. et al.**, 2004: Novel trichothecanes, paecilomycine A, B and C, isolated from entomopathogenic fungus, *Paecilomyces tenuipes*, *Tetrahedron Letters*, 45: 6225-6228.
4. **Janet J. L. et al.**, 2007: *Alats of Invertebrate- Pathogenic Fungi of Thailand*, vol.1.
5. **Takano F., Kikuchi Y., Fushiya S., Hojo N., Nozoe S., Yahagi N. et al.**, 1996: *Biol. Pharm. Bull.*, 1996, 19: 641-643.
6. **Zhu J.S., Halpern G.M., Jones K.**, 1998: *J. Altern Complement Med.*, 4: 289-303.
7. **Zhu J.S., Halpern G.M., Jones K.**, 1998: *J. Altern Complement Med.*, 4: 429-457.

BIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF *ISARIA TENUIPES* (Peck) Samson IN PU MAT NATIONAL PARK AND PU HUONG NATURE RESERVE, NGHE AN PROVINCE

TRAN NGOC LAN, THAI THI NGOC LAM,
NGUYEN THI THUY, TRAN VAN CANH, NGUYEN THI THU

SUMMARY

Isaria tenuipes (Peck) Samson parasitized pupae of Lepidoptera. Mycelium was white. *I. tenuipes* was collected in damp places such as leaf litter or surface layer of soil in natural forests. Size of the hosts (pupae of Lepidoptera) were 2,21–27,36 x 1,13–7,78 mm. Conidia was cylindrical, curved, 4,5 - 7,0 x 1,0 - 2,5 μm . Phialides were 4,5 - 8,1 x 2,2 - 4,5 μm . Synema were 1,66 - 40.85 mm in length. *I. tenuipes* had 4 shapes (moonflower shape, white hyacinth flower, snow- flower and asexual - sexual shape). White hyacinth flower was the most common (52.85%). Colony on PDA medium fast-growing, 23,66 mm in diam within 10 days and 2,09 mm in thick within 6 days. Colony was white, in age becoming yellow, bearing white powdery conidia after 4 - 7 days.