

PHÁT TRIỂN CHẾ PHẨM SINH HỌC NPV-Spl BẰNG CÔNG NGHỆ TẾ BÀO ĐỂ PHÒNG TRỪ SÂU KHOANG

Lê Văn Trinh, Nguyễn Thị Nga,
Hà Thị Thu Thủy và Nguyễn Thị Như Quỳnh
Viện Bảo vệ thực vật

SUMMARY

The developing bio NPV-Spl by cell technology to prevent Spodoptera

The tobacco caterpillar *Spodoptera litura* is a polyphagous insect pest attacking many crops. An insect cell line from embryos of the pest have been established for purpose of NPV-Spl production, the mass cell cultured could reach to $3,022 \times 10^{10}$ cells/ml at the 31st passage and to $2,938 \times 10^{10}$ cells/ml. at 49th passage. Meanwhile, a virus species of NPV-Spl named TL-1 with as high occlusion body given as $12,5 \times 10^6$ OB/ml had been collected from cabbage field and purified as a material for NPV production. The technologies of virus inoculum on insect cells and isolation of occlusion bodies have been identified and 324ml of pure OB had been produced. A wettable powder containing $2,0 \times 10^8$ OB/gam was formulated and use with a dosage of 500 gam per ha, its effectiveness in controlling *S. litura* reached to 81,13 - 82,92% in greenhouse and to 80,51 - 82,29% in the cabbage field.

Keywords: Insect, crops, bio NPV-Spl, technology.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ*

Các loài Baculovirus chỉ lây nhiễm trên các loài động vật chân khớp, chủ yếu là các loài côn trùng thuộc bộ Lepidoptera. Chúng thuộc họ Baculoviridae, bao gồm 2 giống: vi rút nhân đa diện (Nucleo Polyhedrosis Virus- NPV) và vi rút hạt (Granulosis Virus - GV). Theo Yeh et al (2007), hiện nay đã xác định được hơn 600 chủng vi rút thuộc 42 loài Baculovirus. Trong số đó, có 28 loài NPV được xác định là có thể vùi (Occlusion Body - OB) chứa lượng lớn các thể vi rút (virion). Theo Farrar et al. (1999) thì NPV là nhóm vi rút lớn và có hiệu quả gây chết cao đối với các loài côn trùng, mỗi loài vi rút thường rất chuyên tính. Đặc biệt, các loài NPV hoàn toàn không lây nhiễm trên các loài động vật có xương sống. Vì thế, chúng là những tác nhân sinh học rất hữu ích trong phòng trừ sâu hại cây trồng

Việc nghiên cứu phát triển dòng tế bào và các kỹ thuật nuôi nhân tế bào côn trùng có ý nghĩa quan trọng, mở ra khả năng sản xuất các chế phẩm vi rút NPV với qui mô công nghiệp. Đến nay, các nhà khoa học Mỹ, Ấn Độ, Trung Quốc, Nhật bản, Đài Loan, Indonesia và một số nước khác [Cisneros et al., 2002. Yeh et al., 2007; Pant et al., 1997, 1998] đã nghiên cứu phát triển được dòng tế bào sâu khoang. Đồng thời, đã có nhiều thành công trong việc nghiên cứu lây nhiễm vi rút NPV-Spl trên tế bào nhân nuôi để sản xuất qui mô công

nghiệp các chế phẩm bảo vệ thực vật vi rút (Lynn, 2002, Granados et al. 1995).

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Sâu khoang (*S. litura*). Các loại môi trường nuôi nhân Schneider, Grace và Excel 14420; huyết thanh FBS và các dụng cụ nuôi nhân tế bào như bình Corning cổ vếch 25, 75cm² do Công ty Invitrogen cung cấp. Thiết bị nuôi cấy như tủ định ôn, kính hiển vi 40X, 400X, v.v. Nguồn thực liệu NPV-Spl được thu thập ngoài đồng và được phân lập, làm thuần và đánh giá hoạt lực trừ sâu khoang trong phòng thí nghiệm.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

- Phát triển dòng tế bào: Sâu khoang được nuôi bằng thức ăn sạch từ khi sâu non bắt đầu nở. Mô phôi của 30 trường thành sâu khoang vừa vũ hóa được phân lập dưới kính hiển vi 40X trong điều kiện vô trùng. Sau đó được nuôi nhân sơ cấp trong bình cổ vếch 25cm² chứa 4ml môi trường Grace có chứa 20% Fetal Bovine Serum (FBS) ở nhiệt độ 28^oC trong thời gian từ 1- 10 phút. Sau đó, loại bỏ môi trường cũ giữ lại lớp tế bào bám và thay bằng môi trường mới. Sau 3 chu kỳ nuôi nhân, tách lớp tế bào bám trên bề mặt thành bình theo phương pháp Trypsin hóa theo phương pháp của Lynn D.E. (2001). Tế bào tiếp tục nuôi nhân thứ cấp trong bình 75cm² chứa 10ml môi trường Exell có 10% FBS ở nhiệt độ 28^oC. Sau mỗi chu kỳ nhân nuôi, lấy mẫu đếm số lượng tế bào và

quan sát hình dạng tế bào dưới kính hiển vi 400X bằng kỹ thuật nhuộm Trypan Blue trên buồng đếm hồng cầu. Đồng thời, phân tích xác định trình tự gen của tế bào nhân nuôi so sánh với tế bào sâu non sâu khoang.

- Phát triển nguồn thực liệu vi rút NPV-Spl: Thu thập sâu khoang nhiễm bệnh NPV tự nhiên ngoài đồng ruộng, đem về phòng nghiên lọc, ly tâm phân lập thể vùi vi rút NPV. Nguồn thực liệu thu thập được nhân làm thuần trên sâu non nuôi bằng thức ăn sạch theo phương pháp của Grzywacz và cs.(1996) qua 3- 4 lần liên tiếp nhau. Trong mỗi lần làm thuần kết hợp đánh giá khả năng gây chết sâu khoang. Quá trình làm thuần tới khi lựa chọn được nguồn có hoạt lực trừ sâu cao, thể vùi hình thành nhiều và không bị lẫn tạp. Đồng thời phân tích giải trình tự gen vi rút NPV sâu khoang phân lập được bằng phương pháp RT-PCR và so sánh với Genbank

- Lây nhiễm vi rút trên tế bào nhân nuôi: Việc lây nhiễm được tiến hành theo phương pháp Lynn (2003) theo chỉ số MOI = 0,1. Sau 2- 4 ngày tiến hành ly tâm phân lập để thu hồi thể vùi tinh. Nguồn thực liệu thể vùi được bảo quản ở nhiệt độ - 20⁰C. Trước khi tạo dạng sản phẩm tiến hành kiểm tra hàm lượng thể vùi và tính toán sao cho trong sản phẩm bột thấm nước có chứa 2,0x 10⁹OB/gam để có liều lượng sử dụng chế phẩm là 500gam/ha.

- Tạo chế phẩm dạng bột thấm nước: Chất phụ gia tạo dạng là hỗn hợp chứa 60% bột tan và 40% cao lanh. Đánh giá hiệu lực trừ sâu khoang của chế phẩm được tiến hành trong nhà lưới và ngoài đồng theo phương pháp đánh giá thuốc BVTV vẫn thường áp dụng.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phát triển dòng tế bào từ tế bào gốc sâu khoang

Áp dụng kỹ thuật tách mô bào và phân lập mô phôi dưới kính và nuôi nhân trên môi trường nuôi cấy. Kết quả theo dõi 22 mẫu phân lập cho thấy sau 5 ngày thì số lượng tế bào sơ cấp phát triển với mật độ thấp. Qua đánh giá đã xác định được 3 nguồn tế bào sâu khoang có triển vọng và có tiềm năng phát triển tốt. Sau 5 ngày nuôi nhân đạt từ 0,330- 1,241 × 10¹⁰ tế bào/ml và duy trì ổn định khả năng phân chia trong các chu kỳ nhân.

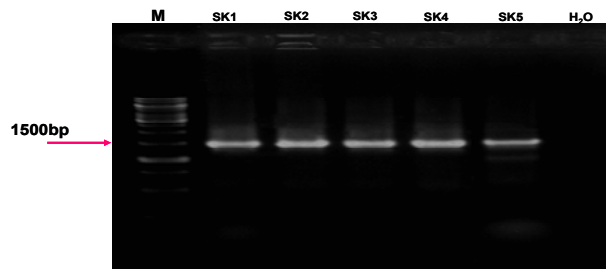
Theo dõi qua các chu kỳ nhân nuôi đã xác định được 2 dòng tế bào có nhiều tiềm năng phục vụ phát triển sinh khối số lượng lớn được trình bày ở bảng 1 cho thấy tế bào có dạng hình tròn hoặc bầu dục và phát triển ổn định. Trong 2 dòng tế bào đã xác định thì dòng 4. Ph.Sp được xác định có nhiều tiềm năng hơn, ở chu kỳ 31 đạt hàm lượng tế bào trong sinh khối là 3,022 × 10¹⁰ tb/ml, đến chu kỳ 49 vẫn đạt hàm lượng tế bào tới 2,938 × 10¹⁰ tb/ml và được lựa chọn để phục vụ nhân nuôi phát triển chế phẩm sau này.

Bảng 1. Tốc độ phát triển sinh khối của dòng tế bào qua các chu kỳ nhân nuôi (Viện BVTV, 2011 - 2012)

Mã số mẫu	Hàm lượng tế bào qua các chu kỳ nhân (tế bào/ml)				Hình dạng, kích thước tế bào
	Nhân sơ cấp	Chu kỳ 6	Chu kỳ 31	Chu kỳ 49	
4. Ph.Sp	1,241 × 10 ¹⁰	3,055 × 10 ¹⁰	3,022 × 10 ¹⁰	2,938 × 10 ¹⁰	Tròn hoặc bầu dục. Kích thước 15-19 μm

Sử dụng cặp môi ITS1-1 và ITS4 để xác định, kết quả điện di sản phẩm PCR các mẫu tế bào nhân nuôi được thể hiện ở hình 1 cho thấy

vạch băng trên bản gel là rõ nét, không bị đứt gãy đoạn và kích thước sản phẩm PCR là 1500 bp.



M: Marker (1,0 kb Fermentas);
SK1-SK4: mẫu số 1-4;
SK5: Sâu khoang tuổi 2 (đối chứng dương);
H₂O: Nước cất vô trùng (đối chứng âm).

Hình 1. Kết quả phân tích PCR các mẫu tế bào nhân nuôi và trên sâu non (Viện BVTV, 2012)

Kết quả giải trình tự gen tại Hàn Quốc được minh họa trong hình 2 và trình bày trong bảng 2 cho thấy tất cả các sản phẩm gen 18S rRNA của mẫu phân tích đều có chất lượng tốt. Kết quả Blast xác định trình tự gen của các

mẫu tế bào nuôi nhân hoàn toàn tương tự với trình tự gen từ mẫu sâu non sâu khoang và đều gần gũi với tế bào sâu khoang *Spodoptera litura* trên ngân hàng GenBank với độ tương đồng từ 82- 99%.



Hình 2. Minh họa một đoạn gen được giải trình tự của mẫu SK4

Bảng 2. Kết quả phân tích gen với cặp môi ITS1-1 và ITS4

TT	Mẫu phân tích	Phần trăm đoạn so sánh (%)	Mức độ tương đồng (%)	Loài gần gũi nhất trên GenBank (mã GenBank)
1	SK1	100	99	- <i>Spodoptera litura</i> 18S ribosomal RNA gen (JN863294).
2	SK2	97	82	- <i>Spodoptera litura</i> 18S ribosomal RNA gen (JN863294).
3	SK3	100	85	- <i>Spodoptera litura</i> 18S ribosomal RNA gen (JN863294).
4	SK4	100	98	- <i>Spodoptera litura</i> 18S ribosomal RNA gen (JN863294).
5	SK5 (Sâu T.2)	100	93	- <i>Spodoptera litura</i> 18S ribosomal RNA gen (JN863294).

3.2. Phân lập, chọn lọc chủng vi rút NPV-Spl có hoạt lực cao

Tiến hành thu thập nguồn thực liệu sâu khoang hại bị nhiễm bệnh NPV trên cải bắp, lạc, đậu tương và khoai sọ. Qua đánh giá cho thấy nguồn NPV trên sâu sống trên cải bắp có hàm

lượng thể vùi cao nhất đạt tới $3,5 \times 10^6$ OB/ml và hoạt lực gây chết sâu cũng cao nhất, tới 68,33%. Từ các nguồn thu thập và đánh giá hoạt lực, qua 4 lần làm thuần và đánh giá hoạt lực đã thu được 4 nguồn NPV-Spl có tiềm năng, khả năng sinh thể vùi đạt từ $5,0 - 12,5 \times 10^6$ OB/ml và hoạt lực gây chết sâu từ 78,0 - 81,0% (bảng 3)

Bảng 3. Khả năng sinh thể vùi và hiệu quả gây chết sâu của các nguồn vi rút NPV- Spl đã được chọn lọc (Viện BVTV, 2011)

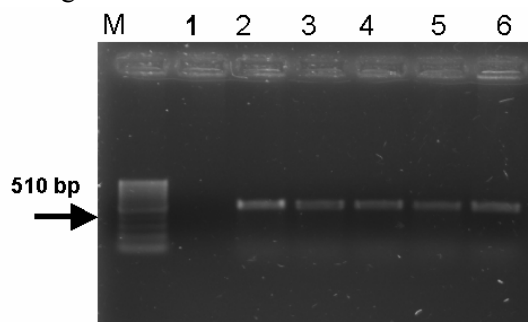
Ký hiệu	Nguồn vi rút	Thể vùi (OB/ml)	% sâu chết
TL1	M1.5.1.6.2	$12,5 \times 10^6$	81,00
TL2	M1.5.1.6.2.9	$5,0 \times 10^6$	78,00
TL3	M1.3.1.1	$9,0 \times 10^6$	80,00
TL4	M1.3.11.6	$9,0 \times 10^6$	80,05

Trong số 4 nguồn vi rút có tiềm năng nói trên thì chủng TL-1 được lựa chọn để nhân sinh khối thực liệu phục vụ sản xuất chế phẩm vi rút NPV-Spl sâu khoang, vì khả năng sinh thể vùi đạt tới $12,5 \times 10^6$ OB/ml và hiệu lực gây chết sâu đạt 81,0%.

Áp dụng kỹ thuật PCR phân tích giải trình tự gen cả 4 nguồn vi rút NPV-Spl thu được sau lấy nhiễm trên tế bào nhân nuôi và trên sâu non thấy chúng có kích thước 510bp (hình 2 và 3) và đều thuộc loài *Spodoptera litura* Nucleo Polyhedrosis Virus (NPV-Spl), giống *Alphabaculovirus*, họ

Baculoviridae với độ tương đồng 98% khi so sánh trình tự gen với GenBank. Đồng thời, thuộc nhóm vi rút hoàn toàn có khả năng hình thành thể

vùi như các kết quả nghiên cứu trong và ngoài nước lâu nay vẫn khẳng định (hình 3).



M: Marker, 100 bp, Fermentas; 1: H₂O (negative control);
Mẫu 2- 5: NVP tế bào; Mẫu 6: NPV sâu non bị bệnh

Hình 3. Kết quả phân tích PCR các mẫu NPV-Spl trên tế bào và trên sâu (Viện BVTV, 2012)

3.3. Lây nhiễm và sản xuất thể vùi vi rút NPV-Spl trên tế bào nhân nuôi

Qua nghiên cứu kỹ thuật lây nhiễm vi rút trên tế bào nhân nuôi, đã xác định việc lây nhiễm vi rút NPV- Spl trên dịch tế bào sâu khoang thích hợp và có có hiệu quả cao cần tiến hành theo chỉ số MOI là 0,1 - 0,5, ở nhiệt độ $30 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ và điều kiện pH của môi trường khi lây nhiễm ở mức trung tính (pH = 7,0).

Ngoài ra, để phục vụ cho việc sản xuất chế phẩm, thời gian qua đã xác định được kỹ thuật phân lập bảo quản vi rút dưới dạng thể vùi tinh. Kết quả (bảng 4), đã tiến hành nhân 6 mẻ tế bào để sản xuất thực liệu với số lượng 9,2 lít dịch tế bào được nhiễm vi rút và đã phân lập thu được 324 ml thể vùi tinh đậm đặc đưa vào bảo quản ở nhiệt độ -20°C phục vụ sản xuất chế phẩm NPV-Spl.

Bảng 4. Lượng dịch vi rút và thể vùi tinh đã sản xuất qua các đợt nhiễm (Viện BVTV, 2012)

Đợt sản xuất	Thời gian nhân sản xuất thực liệu	Lượng dịch vi rút (ml)	Thể vùi tinh (ml)
1	Tháng 2/2012	2.200	-
2	Tháng 5/2012	2.000	80
3	Tháng 6/2012	1.500	64
4	Tháng 7/2012	1.000	40
5	Tháng 8/2012	1.500	60
6	Tháng 9/2012	2.000	80
	Tổng cộng	9.200	324

3.4. Tạo sản phẩm dạng bột thấm nước và hiệu quả trừ sâu khoang

Tiến hành thử nghiệm tạo dạng sản phẩm dưới dạng bột thấm nước nhằm định hướng cho các hoạt động sản xuất chế phẩm. Dựa theo các tài liệu có được, phụ gia mà chúng tôi lựa chọn có thành phần gồm 50% bột tan và 50% cao lạnh. Đến nay, đã tiến hành 4 đợt sản xuất thử nghiệm chế phẩm dạng bột thấm nước với khối lượng 6 kg. Kết quả đánh giá lại hàm lượng thể vùi cho thấy khi bảo quản chế phẩm ở dạng dung dịch hàm lượng $2,40 \times 10^8$ OB/ml và bột thấm nước hàm lượng $5,0 \times 10^8$ OB/ml ở nhiệt độ -20°C trong thời gian 5 ngày thì hàm lượng thể vùi

trong chế phẩm không thay đổi ($2,4 \times 10^8$ OB/ml) và hiệu lực gây chết sâu có biểu hiện giảm nhưng không rõ rệt (78,24 và 77,78%).

Tuy nhiên, như nhiều tác giả đã nêu thì chế phẩm ở dạng bột thấm nước với hàm lượng thể vùi phải đảm bảo tối thiểu là 10×10^{10} OB để phun rải cho 1 ha. Năm 2012, đã tiến hành với định hướng liều lượng sử dụng 500gam/ha chế phẩm (tức hàm lượng phải đạt $2,0- 2,5 \times 10^8$ OB/gam). Qua đánh giá tạo dạng sản phẩm với hàm lượng 2,3- $2,7 \times 10^8$ OB/gam cho thấy hiệu lực trừ sâu vẫn đạt 76,67- 80,78% sau 10 ngày bảo quản. Điều này cũng cần được theo dõi tiếp trong thời gian tới để tạo dạng sản phẩm có chất lượng ổn định.

Bảng 5. Hiệu lực phòng trừ sâu khoang của các dạng sản phẩm (TN trong phòng, viện BVTV, 2012)

Ngày SX	Dạng sản phẩm	Hàm lượng thể vùi (OB/gam)		Hiệu lực trừ sâu (%)	
		Sau tạo dạng	Sau bảo quản	Sau tạo dạng	Sau bảo quản
20/9/12	Dịch (2lít)	$2,40 \times 10^8$	$2,40 \times 10^8$	78,24	77,78
	Bột TN (2kg)	$5,00 \times 10^7$	$5,00 \times 10^7$	75,92	75,56
26/9/12	Bột TN (2kg)	$2,30 \times 10^8$	$2,24 \times 10^8$	77,00	76,67
25/10/12	Bột TN (2kg)	$2,70 \times 10^8$	$2,64 \times 10^8$	81,23	80,78

Để tìm ra giải pháp nâng cao hiệu quả trừ sâu của chế phẩm, thời gian qua đã tiến hành thử nghiệm tạo 10 kg dạng bột thấm nước, trong đó 5 kg có chứa 0,5% a xít Boric. Kết quả đánh giá hiệu lực trừ sâu khoang của chế phẩm trong điều kiện nhà lưới (bảng 6) cho thấy nếu chỉ sử dụng bột thấm nước là hỗn hợp gồm bột tan 60% và cao lanh 40% thì hiệu lực gây chết sâu đạt 81,13%. Còn nếu bột thấm nước có phối trộn thêm 0,5% axit Boric thì hiệu lực trừ sâu đạt 82,92%, cao hơn bột thấm nước thuần túy là 1,79%. Tuy nhiên, kết quả sử lý thống kê cho thấy không có sự sai khác ở mức 98% giữa 2 công thức chế phẩm.

Theo các tác giả Cisneros et al. (2002) thì việc bổ sung axit Boric sẽ góp phần duy trì độ pH trong

chế phẩm ở mức thấp 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 và ánh nắng trực xạ.

Trong khi đó, nếu sử dụng sâu chết bệnh do NPV-Spl theo phương pháp truyền thống với liều lượng sử dụng là 500 sâu/ha và phun với nồng độ 5% thì hiệu lực trừ sâu cũng chỉ đạt 47,68%. Như vậy, nếu sử dụng sâu bị bệnh đem nghiền lọc rồi phun cũng có hiệu quả nhất định và có thể khuyến cáo nông dân tự chế biến chế phẩm vi rút NPV-Spl bằng cách thu gom sâu chết ngoài đồng đem về chế biến tạo sản phẩm bằng biện pháp thủ công. Tuy nhiên, sẽ gặp khó khăn trong quản lý số lượng thể vùi của vi rút có trong sản phẩm nghiền và không thể sản xuất chế phẩm theo hướng công nghiệp.

Bảng 6. Hiệu lực phòng trừ sâu khoang của chế phẩm trong nhà lưới (Viện BVTV, 2013)

Công thức	Thành phần chế phẩm	Lượng sử dụng cho 1 ha	Nồng độ phun (%)	% sâu chết
CT1	Phụ gia (Bột tan 60%, cao lanh 40%)	500 g	0,12	81,13 a
CT2	Phụ gia (Bột tan 60%, Cao lanh 40%) và 0,5% axit Boric	500 g	0,12	82,92 a
CT3	Sâu bị bệnh nghiền lọc (đối chứng 1)	500 sâu	5,0	47,68 b
CT4	Nước lã (đối chứng 2)	-	-	-

Thí nghiệm nhằm đánh giá hiệu lực của chế phẩm trong phòng trừ sâu khoang trên rau cải bắp với qui mô diện hẹp được tiến hành tương tự như thí nghiệm nhà lưới nêu trên. Kết quả theo dõi cũng thể hiện xu hướng tương tự. Nếu chế phẩm dạng bột thấm nước không có bổ sung axit Boric

thì hiệu quả trừ sâu đạt 80,51%, thấp hơn so với kết quả thí nghiệm nhà lưới 0,52%. Nếu bổ sung 0,5% axit Boric thì hiệu lực trừ sâu khoang cũng đạt 82,29% và cũng thấp hơn chút ít so với thí nghiệm nhà lưới (0,63%).

Bảng 7. Hiệu lực phòng trừ sâu khoang hại rau cải bắp của chế phẩm ngoài đồng ruộng (Đông Anh, Hà Nội, 2013)

Công thức	Thành phần chế phẩm	Lượng phun 1 ha	Nồng độ phun (%)	M.độ sâu trước phun (con/m ²)	% sâu chết
CT 1	Phụ gia (Bột tan 60%, cao lanh 40%)	500 gam	0,12	49,0	80,51 a
CT 2	Phụ gia (Bột tan 60%, Cao lanh 40%) và 0,5% axit Boric	500 gam	0,12	48,7	82,29 a
CT 3	Sâu bị bệnh nghiền lọc (đối chứng 1)	500 sâu	5,0	47,7	45,20 b
CT 4	Nước lã (đối chứng 2)	-	-	49,7	-

Trong khi đó, ở công thức sử dụng chế phẩm sâu bị bệnh nghiền lọc đem phun thì hiệu quả chỉ đạt 45,20%, thấp hơn kết quả thí nghiệm trong nhà lưới là 2,48%. Như vậy, hiệu lực trừ sâu của chế phẩm NPV-Spl theo phương pháp truyền thống có sự biến động mạnh hơn do chất lượng sản phẩm không ổn định như đã phân tích nêu trên.

Đến nay, chế phẩm NPV-Spl đã được sử dụng trên diện rộng để phòng trừ sâu khoang hại trên lạc với qui mô 2 ha tại xã Đại Bộ và Hoàng Gián (Chí Linh, Hải Dương) và 2 ha đậu tương tại xã Đồng Tiến (Phổ yên, Thái Nguyên). Sử dụng với lượng 500 gam/ha chế phẩm với hàm lượng $2,0 \times 10^{11}$ OB/ha, cho hiệu quả phòng trừ sâu khoang trên ruộng mô hình đạt từ 84,4-89,12%, tương đương với thuốc có nguồn gốc sinh học Tawin 5,5 WDG và thuốc Abafax 3,5EC sử dụng trên ruộng của nông dân.

IV. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

4.1. Kết luận

1) Đã phát triển, lựa chọn được 1 dòng tế bào sâu khoang có tiềm năng mã số 4. Ph.Sp, ở chu kỳ nhân nuôi thứ 31 đạt hàm lượng tế bào trong sinh khối là $3,022 \times 10^{10}$ tb/ml, đến chu kỳ 49 vẫn đạt hàm lượng tế bào tới $2,938 \times 10^{10}$ tb/ml.

2) Đã thu thập, tuyển chọn được chủng vi rút TL-1 có khả năng sinh thể vùi đạt tới $12,5 \times 10^6$ OB/ml, hiệu lực gây chết sâu đạt 81,0% và được lựa chọn để nhân sinh khối thực liệu phục vụ sản xuất chế phẩm vi rút NPV-Spl sâu khoang.

3) Đã nghiên cứu xác định được kỹ thuật lây nhiễm vi rút NPV- Spl trên dịch tế bào sâu khoang, cũng như kỹ thuật phân lập tách thể vùi tinh. Bước đầu sản xuất thử nghiệm được 324 ml thể vùi tinh để phục vụ tạo dạng sử dụng chế phẩm.

4) Thử nghiệm tạo dạng bột thấm nước chế phẩm vi rút NPV-Spl, hiệu quả phòng trừ đạt từ 81,13 - 82,92% trong điều kiện nhà lưới và đạt từ 80,51 - 82,29% ở ngoài đồng ruộng

4.2. Đề nghị

Hoàn thiện và ứng dụng công nghệ tế bào để phát triển chế phẩm NPV-Spl phục vụ phòng trừ sâu khoang hại cây trồng nông nghiệp.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Cisneros et al. (2002). Formulation of a nucleopolyhedrosis with Boric acid for control of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in maize. *Journal of Biological Control* Vol. 23. Page 87- 95.
2. Ducha N. and Asri T.M. (2009). Development *Spodoptera litura* cell line culture from primary cell culture epitel intestine larvae with monolayer method. *Journal of Biological Researches*. No. 3. Page 134- 142.
3. Farrar R.R., Ridgway R.L. (1999). Relative potency of selected nuclear polyhedrosis viruses against five species of Lepidoptera. *Journal of Agriculture and Entomology*. Vol.16. No.3. Pg.187-196.
4. Granados R.R. and McKenna K.A. (1995). Insect cell culture methods and their use in virus research. *Baculovirus expression systems and biopesticides*. Editors: Shuler M.L., Wood H.A., Granados R.R., Hammer D.A. Wiley - Liss, Inc. New York. 1995. Pg. 13-40.
5. Yeh S.C., Lee S. T., Wu C.Y, Wang C.H. (2007). A cell line (NTU- MV) established from *Maruca vitrata* (Lepidoptera: Pyralidae): Characterization, viral susceptibility and polyhedra production. *Journal of Invertebrate Pathology*. No. 96 (2007). Pg. 138- 146.
6. Pant U., Athawale S.S., Basu A., Banerjee K. (1998). A new cell line established from pupal ovaries of *Spodoptera litura* (F.) (Lepidoptera: Noctuidae). *Indian Journal Experiment. Biology*. No. 36. Pg. 195- 198.
7. Pant U., Athawale S.S., Sudeep A.B., Banerjee K. (1997). A new cell line from larval ovaries of *Spodoptera litura* (F.) (Lepidoptera: Noctuidae). In *Vitro Cell Development and Biology of Animal Journal*. No. 33. Pg. 161- 163.
8. Pant U., Athawale S.S. and Vipat V.C. (2000). A new cell line from larval hemocytes of *Spodoptera litura* (F.). *Indian Journal Experiment. Biology*. No. 38(12). Pg. 1201- 1206.
9. Lynn D.E. (2002). Routine maintenance storage of Lepidopteran insect cell lines and Baculoviruses. *Methods in Molecular Biology: Baculovirus and insect cell expression protocol*. Ed. by D.W. Murhammer. Murhammer Press. Totowa. New York. Vol. 338. Pgs. 187- 208.