

TẠO NỘI SINH NHÂN TẠO NẤM BẠCH CƯƠNG (*Beauveria bassiana*) CHO BẠCH ĐÀN CAMAL ĐỂ PHÒNG TRỪ ONG ĐEN (*Leptocybe invasa*) GÂY U BƯỚU

Lê Văn Bình, Đặng Như Quỳnh, Phạm Quang Thu

Trung tâm Nghiên cứu Bảo vệ rừng - Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam

TÓM TẮT

Nấm Bạch cương (*Beauveria bassiana*) là một loài nấm ký sinh phổ biến đối với nhiều loài côn trùng. Các chế phẩm từ nấm *B. bassiana* đã được biết đến và sử dụng rộng rãi để phòng trừ sinh học trong nông, lâm nghiệp. Nhiều chủng nấm được nhân sinh khối và sản xuất thuốc trừ sâu sinh học ở nhiều quốc gia. Loài nấm này đã được phát hiện sống nội sinh tự nhiên với rất nhiều loài thực vật. Một số nghiên cứu đã chỉ ra rằng nấm Bạch cương (*B. bassiana*) có thể sống nội sinh nhân tạo với một số loài thực vật. Khi gây nhiễm, sợi nấm xâm nhiễm, lan truyền và sống trong mô của thực vật. Cho đến ngày nay, nấm Bạch cương đã được ghi nhận sống nội sinh nhân tạo trên các loài cây như: Ngô, Khoai tây, Cà chua, Ca cao, Bông, Lúa mỳ và Chuối. Bài báo này trình bày thí nghiệm tạo nội sinh nhân tạo nấm Bạch cương (*B. bassiana*) cho cây Bạch đàn camal (*Eucalyptus camaldulensis*) để phòng trừ loài Ong đen (*Leptocybe invasa*) gây u bướu. Nhiễm nhân tạo nấm Bạch cương được thực hiện theo 2 phương pháp: tưới bào tử nồng độ 10^8 CFU/ml vào hạt giống nảy mầm và hạt giống nảy mầm trên hệ sợi nấm trong thời gian 7 ngày. Kết quả chỉ ra rằng sau 12 tuần nhiễm nấm, nấm Bạch cương sống và tồn tại trong lá, chồi và thân cây con Bạch đàn camal với tỷ lệ 76,7% đối với phương pháp tưới dung dịch bào tử và 80,0% đối với phương pháp hạt giống nảy mầm trên hệ sợi nấm. Chiều cao của cây con nhiễm nấm cao hơn 33,2% và tỷ lệ bị hại giảm 82,1% so với đối chứng cây con không nhiễm nấm. Mức độ bị hại của cây con nhiễm nấm rất nhỏ trong khi đó cây không nhiễm nấm bị hại nặng. Kết quả nghiên cứu trên mở ra một triển vọng mới trong phòng trừ sâu hại.

Từ khóa: Nội sinh nhân tạo, *Beauveria bassiana*, *Eucalyptus camaldulensis*, *Leptocybe invasa*

Establishing the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* as an artificial endophyte in *Eucalyptus camaldulensis* for the control of the gall wasp *Leptocybe invasa*.

The fungus *Beauveria bassiana* is a common fungal parasite of many arthropod species. The entomopathogenic properties of *B. bassiana* are well-known and it is used widely in biological control strategies in agriculture and forestry. Some strains of the fungus are mass-produced as commercial biological insecticides in many countries. This fungus can live as a natural endophyte in various plant species. Some studies have shown that *B. bassiana* can survive as an artificial endophyte in several plants. Its mycelium can infect, colonize and survive in plant tissues after artificial inoculation. Until now, *B. bassiana* has been reported only as an artificial endophyte of maize, potato, tomato, cocoa, cotton, wheat and banana. Therefore, the aim of this study is to experiment *B. bassiana* as an artificial endophyte of *Eucalyptus camaldulensis* for the control of the gall wasp *Leptocybe invasa*. We established artificial inoculation of the fungus as an endophyte in *E. camaldulensis* seedlings using two methods: (1) germinated seeds were drenched with conidial solution with a

Keywords: Artificial endophyte, *Beauveria bassiana*, *Eucalyptus camaldulensis*, *Leptocybe invasa*.

concentration of 10^8 CFU/ml of *B. bassiana*, and (2) germinated seeds were grown in a fungal mat of *B. bassiana* for 7 days. Results showed that at 12 weeks post-inoculation, *B. bassiana* had colonized the leaves, shoots and stems of the seedlings, with 76.7% of seedlings colonized using the conidial solution on germinated seeds and 80.0% colonized using germinated seeds grown in fungal mats. Height of seedlings colonized with *B. bassiana* was increased by 33.2% compared to non-inoculated control seedlings. Damage index scored for *L. invasa* on colonized seedlings was reduced by 82.1% compared to control seedlings and the damage severity of the colonized seedlings was also low, in the other hand, the non-colonized control seedlings got high level of damage.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Nấm Bạch cương (*Beauveria bassiana*) được biết đến là một tác nhân gây bệnh cho côn trùng, chúng có thể xâm nhiễm nhiều loài côn trùng gây hại thuộc bộ Cánh vẩy (Lepidoptera), bộ Cánh cứng (Coleoptera), bộ Cánh màng (Hymenoptera) và cả bộ Cánh nửa cứng (Hemiptera), bộ Hai cánh (Diptera) (Yoshinori và Harry, 1993). Ở nước ta nấm Bạch cương đã và đang được sử dụng trong phòng trừ Sâu róm thông và một số loài sâu tơ trong nông nghiệp, các sản phẩm từ chúng ngày càng được phát triển thương mại hóa và có tên trong danh sách các chế phẩm sinh học phòng trừ sâu trong nông lâm nghiệp. Nhưng phần lớn được sử dụng dưới dạng bột hoặc dạng dung dịch để phun trực tiếp lên côn trùng và những vị trí mà sâu di chuyển qua. Phương pháp này không mang lại hiệu quả cao đối với những loài côn trùng gây hại sống trong thân cây, vì khả năng tiếp xúc của nấm với các loài này rất thấp. Với loài Ong đen (*L. invasa*) vị trí gây hại là ngọn, cuống và gân lá bạch đàn, pha trứng, sâu non và nhộng sống trong mô của cây chủ nên việc sử dụng thuốc hóa học và sinh học trong phòng trừ sẽ gặp nhiều khó khăn. Khi các loài nấm ký sinh côn trùng sống nội sinh, tạo ra các hợp chất hóa học, tăng cường khả năng kháng sâu hại của cây chủ. Bing và Lewis (1991) đã chỉ ra rằng *B. bassiana* đã được nhiễm vào cây ngô làm chết

hàng loạt sâu đục thân ở châu Âu, trên khoai tây (Jones, 1994), cà chua (Leckie, 2002), ca cao và ngô (Arnold và Lewis, 2005) và trên cây (*Theobroma gileri*) một cây cùng họ với ca cao (Evans *et al.*, 2003). Posada và Vega (2005) đã thành công khi nhiễm nấm *B. bassiana* cho cây con ca cao trong ống nghiệm để kháng lại sâu đục vỏ quả. Parsa và đồng tác giả (2013) đã nhiễm nấm *B. bassiana* cho cây Đậu (*Phaseolus vulgaris*), kết quả cho thấy (*B. bassiana*) có trong 80% các bộ phận được lây nhiễm.

Với khả năng ký sinh côn trùng và đóng vai trò như một loài nấm nội sinh *B. bassiana* mở ra hướng đi mới trong phòng trừ các loài sâu hại trong nông lâm nghiệp. Do vậy chúng tôi tiến hành thử nghiệm việc nhiễm nấm vào cây Bạch đàn camal (*Eucalyptus camaldulensis*) bằng phương pháp tưới dung dịch bào tử khi gieo ươm cây con và phương pháp nhiễm nấm cho hạt giống nảy mầm trên hệ sợi nấm trong 7 ngày. Bài báo này trình bày kết quả về phương pháp nhiễm nấm cho cây và đánh giá hiệu quả phòng trừ Ong đen gây u bướu bạch đàn của cây được nhiễm nấm.

II. VẬT LIỆU, PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Sâu non Ong ăn lá thông (*Neodiprion* sp.), trưởng thành Cầu cầu xanh (*Hypomeces squamosus*) và

trưởng thành Một forni (*Euwallacea fornicatus*) bị nhiễm nấm Bạch cương.

Hạt giống Bạch đàn camal (*Eucalyptus camaldulensis*).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phân lập các chủng nấm *Beauveria bassiana* và tuyển chọn chủng có hiệu lực cao

Các mẫu côn trùng chết do nấm *B. bassiana* được thu thập từ rừng, trên cơ thể côn trùng được bao phủ lớp bột màu trắng. Dùng kim khử trùng khều nhẹ một ít bào tử được tách ra và hòa tan trong 1 giọt nước vô trùng trên phiến kính, sau đó dùng que cấy cấy dạng zic zắc trên môi trường thạch khoai tây dextrose (PDA) có bổ sung streptomycin 1%. Hộp lồng cấy nấm được đặt trong tủ định ôn 25°C, sau 2 - 3 ngày, tách khuẩn lạc riêng rẽ ra môi trường mới.

Từ các chủng phân lập được lựa chọn một chủng mạnh nhất bằng cách pha dung dịch bào tử nấm *B. bassiana* ở ba nồng độ 10^6 ; 10^8 ; 10^{10} (CFU/ml) phun lần lượt lên Ong đen gây u bướu. Tiến hành đặt các đĩa petri có sẵn mật ong và 10 ong trưởng thành, mỗi chủng nấm thực hiện trên 2 đĩa Petri ở 3 nồng độ khác nhau như trên và công thức đối chứng phun nước cất (lặp 3 lần). Kiểm tra và đánh giá sau 2 - 4 ngày tỷ lệ ong chết do nấm.

2.2.2. Phương pháp nhiễm nấm *Beauveria bassiana* vào Bạch đàn camal và đánh giá hiệu lực phòng trừ Ong đen

Nhiễm nấm bằng phương pháp tưới: xử lý hạt Bạch đàn camal bằng cách ngâm trong NaClO nồng độ 0,5% trong hai phút, sau đó chuyển sang ngâm cồn 70% trong 2 phút. Cuối cùng rửa qua 3 lần bằng nước cất vô trùng. Gieo hạt vào rỗ cát vô trùng, để ở nhiệt độ phòng, tưới nước vô trùng để duy trì độ ẩm cho hạt nảy mầm. Phun dung dịch bào tử nấm trên rỗ cát khi hạt bắt đầu nứt nanh và nảy mầm. Phun

1 lần/ngày liên tục trong 1 tuần. Khi cây được 4 - 6 lá chuyển ra trồng trong bầu đất vô trùng.

Nhiễm nấm bằng phương pháp hạt giống nảy mầm trên hệ sợi nấm: Hạt được khử trùng cây trên môi trường nuôi cấy mô (*Trigiano và Gray, 2010*). Sau khi cây được hai tuần tuổi thì tiến hành nhiễm nấm vào môi trường, sau 7 ngày đưa cây ra huấn luyện ánh sáng trước khi chuyển ra bầu.

Đánh giá hiệu lực phòng trừ Ong đen của cây con Bạch đàn camal được nhiễm nấm Beauveria bassiana

Kiểm tra sự tồn tại của nấm trong cây sau 3 tháng, lựa chọn những cây đã kết hợp với kiểm tra sinh trưởng và tỷ lệ bị hại, mức độ bị hại của các cây con được nhiễm nấm và không được nhiễm nấm.

Phương pháp phân lập mẫu như sau: Lấy mẫu lá ở các công thức rửa sạch, khử trùng bằng NaClO 0,5% trong hai phút sau đó rửa qua cồn 70% trong 2 phút và rửa lại ba lần bằng nước cất vô trùng. Các mẫu lá được cắt nhỏ kích thước 3 × 4mm đặt vào môi trường PDA có chứa kháng sinh (tetracycline, streptomycin và penicillin với 2mg/lít mỗi loại). Sau 4 - 6 ngày kiểm tra đánh giá sự xuất hiện của nấm *B. brassiana*.

Kết quả đánh giá khả năng kháng ong của cây con được nhiễm nấm *B. bassiana* ở vườn ươm thông qua việc điều tra xác định tỷ lệ bị hại, mức độ bị hại và số liệu sinh trưởng về đường kính gốc (D_0) và chiều cao vút ngọn (H_{vn}) của Bạch đàn camal.

Tỷ lệ cây bị ong u bướu hại được xác định theo công thức:

$$P\% = \frac{n}{N} \times 100$$

Trong đó: n: là số cây bị ong hại, N: là tổng số cây điều tra.

Cây bị hại trong các công thức được phân cấp cho từng cây với các cấp và tiêu chí như sau:

Cấp hại	Chi tiêu phân cấp
0	Cây khỏe mạnh, không bị Ong đen gây hại.
1	< 25% gân lá và ngọn, cành non bị Ong đen gây hại.
2	25 - < 50% gân lá và ngọn, cành non bị Ong đen gây hại.
3	50 - < 75% gân lá và ngọn, cành non bị Ong đen gây hại.
4	≥ 75% gân lá và ngọn, cành non bị Ong đen gây hại.

Chỉ số bị hại bình quân trong ô tiêu chuẩn được tính theo công thức sau:

$$R = \frac{\sum_{i=0}^4 ni \times vi}{N}$$

Trong đó: R: chỉ số bị Ong đen hại trung bình.

ni: số cây bị hại với chỉ số bị ong hại i.

vi: là trị số của cấp bị ong hại thứ i.

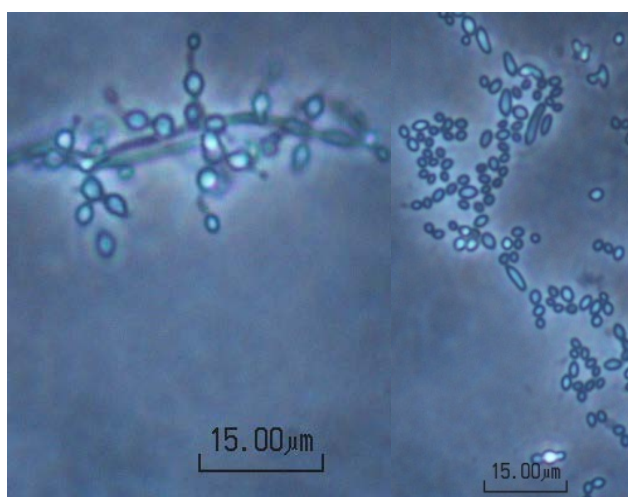
N: tổng số cây điều tra.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Kết quả phân lập và tuyển chọn chủng nấm *Beauveria bassiana*

Từ các mẫu sâu bị nhiễm nấm đã phân lập

được 3 chủng nấm ký hiệu là Bb1, Bb2 và Bb3. Trong nuôi cấy thuần khiết, tốc độ sinh trưởng của các chủng nấm là khác nhau và chủng nấm Bb3 sinh trưởng nhanh nhất. Nấm *B. bassiana* (chủng Bb3) bào tử tập trung kết lại thành khối tròn, khối này được tạo thành bởi những tế bào sinh bào tử dính hình cầu, có cuống bị kéo dài thành hình zic zắc không đều sau mỗi bào tử dính được sinh ra. Bào tử dính hình cầu đến gần cầu đường kính 1 - 3µm (Hình 1). Sợi nấm màu trắng, ngắn, chiều ngang khoảng 3 - µm, mang nhiều cuống sinh bào tử và bào tử, sợi nấm mỏng mọc sát môi trường, mọc theo hình tỏa đều, bề mặt trơn và có nhiều bột (Hình 2).



Hình 1: Bào tử dính của nấm *B. bassiana*



Hình 2: Sợi nấm trên môi trường PDA

Bào tử của nấm *B. bassiana* có kích thước nhỏ, số lượng lớn và sinh trưởng nhanh. Do vậy, có nhiều thuận lợi trong việc sử dụng nấm để

nuôi với số lượng lớn sử dụng trong phòng trừ sâu hại.

Tiến hành thí nghiệm kiểm tra hiệu lực của bào tử khác nhau. Kết quả thu được và tính toán trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Tỷ lệ chết của Ong đen trưởng thành sau khi phun nấm *B. bassiana*

TT	Chủng khuẩn	Nồng độ	Tỷ lệ Ong đen trưởng thành chết (%)		
			Sau 2 ngày	Sau 3 ngày	Sau 4 ngày
1	Chủng Bb1	10 ⁶ CFU/ml	3,2	44,7	88,0
		10 ⁸ CFU/ml	3,0	58,0	95,3
		10 ¹⁰ CFU/ml	3,0	72,0	97,3
2	Chủng Bb2	10 ⁶ CFU/ml	2,5	49,3	91,3
		10 ⁸ CFU/ml	2,2	57,3	97,3
		10 ¹⁰ CFU/ml	2,2	73,3	98,0
3	Chủng Bb3	10 ⁶ CFU/ml	2,2	48,7	96,0
		10 ⁸ CFU/ml	1,5	62,0	100
		10 ¹⁰ CFU/ml	1,5	77,3	100
4	Đối chứng (nước cất)		1,5	6,0	17,8

Từ kết quả bảng 1 cho thấy sau hai ngày đầu phun nấm tỷ lệ Ong đen trưởng thành chết ở cả ba chủng không có sự chênh lệch nhiều với nhau và với đối chứng. Sang ngày thứ 3 số lượng Ong chết tăng đáng kể, mặc dù giữa các chủng nấm chưa có sự sai khác rõ rệt nhưng so với đối chứng thì có sự khác biệt hoàn toàn. Sau ba ngày, nồng độ phun cũng cho thấy sự khác biệt rõ ràng, ở mật độ bào tử nấm *B. bassiana* càng cao số lượng Ong chết càng lớn. Ở mật độ 10⁶CFU/ml tỷ lệ ong chết trung bình dao động là 44,7% đến 49,3%; ở mật độ 10⁸CFU/ml là 57,3% đến 62,0%, trong khi đó ở mật độ 10¹⁰CFU/ml là 72,0% đến 77,3% còn ở công thức đối chứng tỷ lệ ong chết thấp trung bình là 6%. Đến ngày thứ 4 số lượng Ong sống không còn nhiều, tỷ lệ ong chết ở các chủng đều ở mức cao đến rất cao từ 88,0% đến 100%. Tuy nhiên, phun chủng nấm Bb3 ở mật độ 10⁸CFU/ml và 10¹⁰CFU/ml không còn một cá thể nào sống sót, còn ở công thức đối chứng số lượng Ong chết là 17,8%. Trong các chủng nấm thử nghiệm, chủng nấm Bb3 có hiệu quả mạnh nhất và tốt nhất ở nồng độ 10⁸CFU/ml và 10¹⁰ CFU/ml, ong chết sau 4 ngày, nấm *B. bassiana* phát triển bao phủ toàn bộ cơ thể. Do vậy chủng Bb3 là chủng sẽ được lựa chọn để làm thí nghiệm nhiễm cho bạch đàn.

3.2. Đánh giá hiệu quả phương pháp nhiễm nấm *Beauveria bassiana* vào Bạch đàn camal

Sau 4 tuần nhiễm nấm *B. bassiana* cho cây Bạch đàn camal bằng 2 phương pháp (tưới nấm hạt giống nảy mầm và hạt giống nảy mầm trên hệ sợi nấm), kiểm tra sự tồn tại của nấm trong lá cây bạch đàn, kết quả thí nghiệm chỉ ra rằng việc nhiễm nấm bằng hai phương pháp: tưới bào tử nồng độ 10⁸CFU/ml vào hạt giống nảy mầm và hạt giống nảy mầm trên hệ sợi nấm trong thời gian 7 ngày đều thu được kết quả tốt. Phương pháp tưới đạt tỷ lệ nhiễm nấm 76,7%, trong khi đó đối với phương pháp hạt giống nảy mầm trên hệ sợi nấm đạt tỷ lệ 80,0%, cao hơn không đáng kể so với phương pháp tưới dung dịch bào tử vào hạt bạch đàn nứt nanh gieo trong cát ẩm. Như vậy, trong sản xuất có thể áp dụng biện pháp tưới dung dịch bào tử nấm *B. bassiana*, nồng độ 10⁸CFU/ml khi gieo ươm bạch đàn để tạo cây con được nhiễm nấm *B. bassiana* sống nội sinh trong mô lá và thân của cây bạch đàn non.

3.3. Hiệu quả kích kháng và sinh trưởng của cây con được nhiễm nấm *Beauveria bassiana*

Những cây con sau ba tháng khi đã được kiểm tra sự có mặt của nấm *B. bassiana* được xếp riêng thành một công thức là công thức 1: cây

con được nhiễm nấm *B. bassiana* (Hình 3) để đánh giá hiệu quả kích kháng và sinh trưởng của cây con được nhiễm nấm *Beauveria bassiana* tại vườn ươm Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam (thời điểm thí nghiệm từ tháng 5 đến tháng 7 năm 2015 là mùa Ong đen xuất hiện và gây hại bạch đàn) và Công thức 2:

cây con không được nhiễm nấm (Hình 4). Tiến hành đo sinh trưởng của cây, tỷ lệ cây bị Ong đen ký sinh và chỉ số bị hại của 2 công thức thí nghiệm cây con được nhiễm nấm và cây con không được nhiễm nấm. Kết quả thí nghiệm được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2. Hiệu quả kích kháng Ong đen hại bạch đàn của nấm Bạch cương (chủng Bb3) (thí nghiệm sau 3 tháng)

TT	Công thức	Chỉ tiêu					
		Sinh trưởng về chiều cao bạch đàn H_{vn} (cm)	Sd	Tỷ lệ bị hại (P%)	Sd	Chỉ số bị hại trung bình (R_{tb})	Sd
1	Cây con được nhiễm nấm	33,7	±0,25	13,4	±0,33	75,0	±0,42
2	Cây con không được nhiễm nấm	25,3	±0,28	0,18	±0,29	2,52	±0,36

Từ kết quả ở bảng 2 cho thấy ở công thức 1 cây được nhiễm nấm có sinh trưởng trung bình về chiều cao tăng hơn 33,2% so với đối chứng cây không được nhiễm nấm. Bên cạnh đó công thức đối chứng không được nhiễm *B. bassiana* có tỷ lệ bị hại là rất cao (75%), còn với công thức cây con được nhiễm nấm tỷ lệ cây bị hại là 13,4% (giảm 82,1% tỷ lệ bị hại so với đối chứng). Đáng chú ý là cây con được nhiễm nấm có chỉ số bị hại trung bình rất thấp (0,18) cây bị hại nhẹ, trong khi đó cây con ở công thức đối chứng có chỉ số bị hại cao (2,52)

tương ứng với cấp bị hại nặng. Từ kết quả trên cho thấy, nhờ áp dụng khả năng nội sinh của nấm *B. bassiana* giúp việc phòng trừ bằng nấm hiệu quả hơn rất nhiều. Nấm *B. bassiana* không chỉ được biết đến là một loại thuốc trừ sâu sinh học được sử dụng bằng cách phun tưới dạng bột, mà chúng còn có thể nội sinh trong cây, giúp cây tiêu diệt những loài ký sinh gây hại trong thân. Đây là một kết quả có ý nghĩa trong việc phòng trừ loài Ong đen gây u bướu bằng biện pháp sinh học.



Hình 3. Cây bạch đàn được nhiễm *B. bassiana*



Hình 4. Cây bạch đàn đối chứng

VI. KẾT LUẬN

Nấm Bạch cương (*B. bassiana*) chủng Bb3 có hiệu lực cao đối với phòng trừ loài Ong đen gây u bướu bạch đàn. Sau 12 tuần tạo nội sinh nhân tạo nấm Bạch cương cho cây con Bạch đàn camal nấm Bạch cương sống và tồn tại trong lá, chồi và thân cây con Bạch đàn camal với tỷ lệ 76,7% đối với phương pháp tưới dung dịch bào tử và 80,0% đối với phương pháp hạt giống nảy mầm trên hệ sợi nấm Bạch cương.

Cây con được nhiễm nấm sinh trưởng phát triển nhanh hơn, tỉ lệ và mức độ bị hại do loài Ong đen gây ra thấp hơn so với cây con không được nhiễm nấm. Chiều cao của cây con nhiễm nấm cao hơn 33,2% và tỷ lệ bị hại giảm 82,1% so với đối chứng là cây con không nhiễm nấm. Kết quả nghiên cứu trên mô ra một triển vọng mới trong phòng trừ sâu hại trên cây trồng nói chung và cây rừng nói riêng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Arnold, A. E., Lewis, L. C., 2005. Ecology and evolution of fungal endophytes and their roles against insects. In: Vega FE, Blackwell M (eds), *Insect - Fungal Associations: Ecology and Evolution*. Oxford University Press, New York. 74 - 96.
2. Bing, L. A., Lewis, L. C., 1991. Suppression of *Ostrinia nubilalis* (Hubner) (Lepidoptera, Pyralidae) by endophytic *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin. *Environmental Entomology* 20: 1207 - 1211.
3. Jones, K. D., 1994. Aspects of the biology and biological control of the European corn borer in North Carolina [Doctoral dissertation]. Raleigh: North Carolina State University. 127p.
4. Leckie, B. M., 2002. Effects of *Beauveria bassiana* mycelia and metabolites incorporated into synthetic diet and fed to larval *Helicoverpa zea*, and detection of endophytic *Beauveria bassiana* in tomato plants using PCR and ITS [Master's dissertation]. Knoxville: The University of Tennessee. 75 p.
5. Parsa, S., Ortiz, V., Vega, F.E., 2013. Establishing Fungal Entomopathogens as Endophytes: Towards Endophytic Biological Control. *J. Vis. Exp.* (74), e50360, doi:10.3791/50360.
6. Posada, F. J & Vega, F.E., 2005. Establishment of the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) as an endophyte in cocoa seedlings (*Theobroma cacao*), *Mycologia*, 97(6): 1195 - 1200.
7. Trigiano, Robert N. & Gray, Dennis J., 2010. *Plant Tissue Culture, Development and Biotechnology*. Boca Raton: CRC Press. 186p. ISBN 1 - 4200 - 8326 - 0.
8. Vega, F. E., 2008. Insect pathology and fungal endophytes. *Journal of invertebrate pathology*. **98**: 277 - 279.
9. Yoshinori Tanada and Harry K. Kaya, 1993. *Insect pathology*. Academic press, IRC. Harcourt brace jovanovich, publishers, San Diego/ New Yourk/ Boston/London/ Sydney/Tokyo/Toronto.

Người thẩm định: GS.TS. Nguyễn Thế Nhã