

## ĐẶC ĐIỂM HÌNH THÁI VÀ HOẠT TÍNH MỘT SỐ ENZYME NGOẠI BÀO CỦA CÁC MẪU NẤM SỢI PHÂN LẬP ĐƯỢC TẠI HÀ NỘI

### Morphological Characteristics and Enzymatic Activity of Some Fungal Isolates Collected in Hanoi

Phan Trọng Nhật

Khoa Công nghệ sinh học, Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội

#### TÓM TẮT

Mười sáu mẫu nấm sợi được phân lập từ 30 mẫu đất lấy từ các tổ mối chết vùng Hà Nội. Dựa vào các đặc điểm hình thái như màu sắc, hình dạng và kích thước của các khuẩn lạc cũng như bào tử để lựa chọn ra 5 chủng đặc trưng, kí hiệu là M<sub>1</sub>, M<sub>6</sub>, M<sub>9</sub>, M<sub>13</sub> và M<sub>16</sub>. Dịch lọc thô của 5 mẫu nấm sợi từ các môi trường nuôi cấy được thử các hoạt tính enzyme ngoại bào như kitinaza, proteaza và xenlulaza. Kết quả thử nghiệm cho thấy mẫu nấm M<sub>16</sub> có khả năng sinh enzyme ngoại bào kitinaza cao nhất. Hiệu lực diệt mối trực tiếp của bào tử 5 mẫu nấm sợi cũng được xác định là ở liều lượng 0,005 gam bào tử/100 cá thể mối, cả 5 mẫu nấm sợi đều cho hiệu lực diệt mối đạt 100% sau 4 ngày thí nghiệm.

Từ khoá: Bào tử, khuẩn lạc, *Metarhizium*, mối *Coptotermes*, nấm sợi, tàn nấm.

#### SUMMARY

Sixteen fungal isolates were isolated from 30 soil samples collected from dead termite colonies in Hanoi. Based on morphological characteristics such as colour, shape and dimension of colonies and spores, five representative isolates designated as M<sub>1</sub>, M<sub>6</sub>, M<sub>9</sub>, M<sub>13</sub> and M<sub>16</sub> were selected. The filtrates obtained from culture media of these 5 isolates were tested for enzymatic activity of chitinase, protease and cellulase. The isolate M<sub>16</sub> exhibited the highest activity of chitinase. The ability of direct control of fungal spores against termites was also tested. The results showed that at a dose of 0.005 g spores/100 termites individuals of the 5 isolates could exterminate 100% termites after 4 days of treatment.

Key words: Colony, *Coptotermes*, fungi, *Metarhizium*, spore.

#### 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Từ những năm 80 của thế kỷ XIX, một số bệnh do nấm sợi gây ra trên côn trùng cánh cứng hại lúa mì và sâu non bọ đầu dài hại củ cải đường đã được nhà khoa học Nga Metschnikov nghiên cứu và phát hiện. Cho tới những thập kỷ gần đây, nhiều công trình nghiên cứu về nấm sợi đã xác định được khoảng 700 loài nấm gây bệnh cho các loại côn trùng khác nhau. Trong các loài nấm sợi thì *Beauveria* và *Metarhizium* được xác định là mầm bệnh nguy hiểm của hơn 200 loài côn

trùng như: mối đất, châu chấu, bọ ngô đầu đỏ ở Mỹ, Đà Loan, Nam Phi, Australia (Tsai và cộng sự, 1992; Nasr và Moein, 1997).

Ở Việt Nam, năm 1996, Tạ Kim Chính khi thử nghiệm nấm sợi *Metarhizium* trên mối *Coptotermes formosanus* cho thấy mối chết do nấm sau 3 ngày đạt 91,35% ở nồng độ  $18 \times 10^7$ bt/ml (Tạ Kim Chính, 1996). Nguyễn Dương Khuê và cộng sự (1998) tại Viện Khoa học Lâm nghiệp đã thử nghiệm bào tử nấm *Metarhizium* để diệt mối *Coptotermes formosanus* trong điều kiện phòng thí nghiệm.

Kết quả cho thấy mối chết 76,2% sau 2 tuần phun và 94,4 % sau 3 tuần phun. Từ năm 1998 đến năm 2002, Trịnh Văn Hạnh và cộng sự (2001) ở Trung tâm nghiên cứu phòng trừ mối đã tuyển chọn được nhiều chủng nấm *Metarhizium* có khả năng gây chết mối trong điều kiện phòng thí nghiệm với hàm lượng bào tử thích hợp là 0,005g/100 cá thể mối. Phạm Thị Thuỳ và cộng sự (2002) đã sử dụng nấm *Metarhizium* để phòng trừ bọ dừa (*Brontispa* sp.) ở Bến Tre và kết quả cho thấy khả năng phòng trừ đạt 78% sau 7 ngày phun.

Mục đích nghiên cứu này là tiến hành phân lập các nấm sợi từ các mẫu đất thu được tại vùng Hà Nội, phân tích các đặc điểm hình thái và hoạt tính enzyme ngoại bào của chúng. Sau đó thử nghiệm khả năng gây bệnh cho một số loài côn trùng gây hại trong nông nghiệp nhằm cung cấp một nguồn thuốc sinh học phục vụ công tác trồng rau sạch nói chung và bảo vệ cây trồng trong tương lai.

## 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Vật liệu nghiên cứu

30 mẫu đất được thu thập tại các điểm trên địa bàn Hà Nội.

Môi trường Czapek\_Dox:  $C_{12}H_{22}O_{11}$ : 30,0 g,  $NaNO_3$ : 2,0 g,  $C_3H_7MgO_6P$ : 0,5 g, KCl: 0,5 g,  $K_2SO_4$ : 0,35 g,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ : 0,01 g,  $C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$ : 0,5 g, Thạch: 15,0 g, pH: 6,8 0,2.

Môi trường Sauboraud: Pepton casein: 5,0 g, Pepton thịt: 5,0 g, Đường glucoza: 40,0 g, Chất kháng sinh chloramphenicol: 0,5 g, Thạch: 15,0 g, pH: 5,6 0,2.

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.2.1. Phân lập nấm sợi từ các mẫu đất

Các mẫu nấm sợi được phân lập trên môi trường Sauboraud và Czapek - Dox, có bổ sung chất kháng sinh chloramphenicol, để

ngăn không cho các loại vi khuẩn phát triển, theo phương pháp pha loãng (Nguyễn Lân Dũng và cộng sự, 1978).

#### 2.2.2. Phương pháp xác định số lượng bào tử trên bằng đếm trực tiếp dưới kính hiển vi

Số lượng bào tử trên của các mẫu nấm sợi được xác định theo hai phương pháp đếm là phương pháp đếm trực tiếp và phương pháp đếm khuẩn lạc. Đếm số lượng bào tử trên buồng đếm hồng cầu có 25 ô lớn, khoảng trống giữa phiến kính và lá kính có chiều cao 0,02 mm, tổng diện tích là 1 mm<sup>2</sup>, tổng thể tích là 0,02 mm<sup>3</sup>. Như vậy 1 cm<sup>3</sup> (1 ml) sẽ ứng với  $5 \times 10^4$  lần thể tích buồng đếm. Đếm số lượng bào tử có trong vài ô lớn, tính giá trị trung bình (a), gọi K là độ pha loãng. Khi đó số lượng bào tử được xác định theo công thức sau:

$$\text{Số bào tử/ml} = a \times 25 \times 5 \times 10^4 \times 1/K$$

#### 2.2.3. Phương pháp xác định số lượng bào tử trên bằng đếm số khuẩn lạc trên đĩa thạch

Để xác định tổng số tế bào có trong một đơn vị thể tích người ta thường dùng thuật ngữ “Đơn vị hình thành khuẩn lạc trong một đơn vị thể tích” (CFU/v - Colony Forming Unit/v). Trừ những đĩa khuẩn lạc dày đặc không đếm được chỉ lấy các đĩa mà khuẩn lạc có đơn vị đo trong khoảng 30 CFU - 300 CFU.

Từ số khuẩn lạc trên đĩa có thể suy ra số tế bào (CFU) có trong mẫu vật theo công thức dưới đây, trong đó a: số khuẩn lạc trung bình; V: thể tích dịch pha loãng; K: độ pha loãng của dịch cấy.

$$CFU/ml = a \times 1/K \times 1/v$$

#### 2.2.4. Phương pháp chiết tách và thử hoạt tính enzyme ngoại bào

Các enzyme ngoại bào được thử hoạt tính theo phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch. Hoạt tính phân giải cơ chất được tính bằng hiệu số D - d (mm) trong đó D là đường

kính vòng phân giải (mm) và d là đường kính lỗ khoan (mm).

### 2.2.5. Phương pháp thử khả năng diệt mối trực tiếp của các mẫu nấm sợi

Sau khi tuyển chọn, xác định các đặc điểm hình thái, số lượng bào tử và hoạt tính của các enzyme ngoại bào của 5 mẫu nấm sợi, chúng tôi tiến hành thử khả năng diệt mối trực tiếp của 5 mẫu nấm sợi này. Thí nghiệm được tiến hành trên đĩa petri với 100 cá thể mối (90% mối thợ, 10% mối lính) nuôi trên giấy lọc. Rắc 0,005g bào tử của từng chủng lên từng đĩa thí nghiệm. Hàm lượng này theo các nghiên cứu trước (Tạ Kim Chinh, 1999; Trịnh Văn Hạnh và cộng sự, 2001) đã chỉ ra là thích hợp nhất khi thử trực tiếp trên 100 cá thể mối. Mối thí nghiệm ở các lô đối chứng không rắc bào tử mà rắc bột đất. Theo dõi sự hoạt động của các cá thể mối theo từng ngày.

## 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1. Phân lập, tuyển chọn các mẫu nấm sợi

16 mẫu nấm sợi thu được từ phân lập 30 mẫu đất của các tổ mối chết trên địa bàn Hà Nội. Các tản nấm có các màu sắc khác nhau như trắng, xanh, vàng, đen nâu và xanh lục. Từ đó, 5 mẫu đại diện được chọn để tiến

hành các thí nghiệm tiếp theo. Năm mẫu này được ký hiệu là M<sub>1</sub>, M<sub>6</sub>, M<sub>9</sub>, M<sub>13</sub> và M<sub>16</sub>.

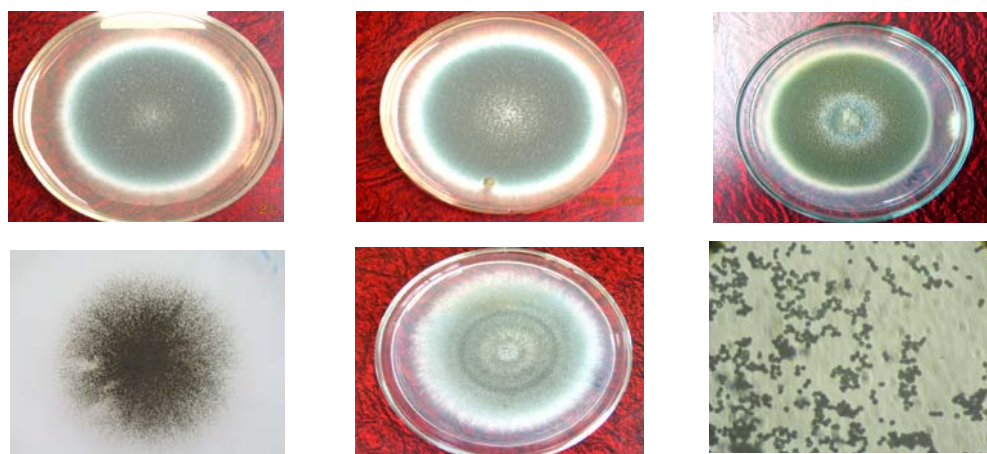
### 3.2. Đặc điểm nuôi cấy và hình thái của 5 mẫu nấm sợi (Bảng 1)

Cả năm mẫu nấm sợi M<sub>1</sub>, M<sub>6</sub>, M<sub>9</sub>, M<sub>13</sub>, M<sub>16</sub> đều có hình dạng bào tử hình elip. Hình dạng bào tử của cả 5 mẫu nấm sợi này đều giống với hình dạng bào tử của nấm *Metarhizium* (Ine, 1999; Kimberly, 2004).

Kết quả quan sát màu sắc tản nấm cũng cho thấy sự tương đồng với màu sắc có thể có của tản nấm *Metarhizium* (Tạ Kim Chinh, 1996; Ine, 1999). Màu sắc mặt sau của tản nấm có màu vàng nâu, trắng ngà hay xanh vàng, các đặc điểm không thấy mô tả ở các tài liệu nghiên cứu về *Metarhizium*. Ngoài ra, ba mẫu M<sub>1</sub>, M<sub>6</sub>, M<sub>9</sub> có những đặc điểm gần giống với nhau về màu sắc tản nấm, tốc độ sinh trưởng. Bào tử của 3 mẫu này đều có bề mặt nhẵn, song màu sắc của chúng lại khác nhau. Mặt khác, hai mẫu M<sub>13</sub>, M<sub>16</sub> lại có bề mặt bào tử mịn và màu sắc bào tử giống nhau, khác 3 mẫu đầu tiên. Kích thước tản nấm đo được sau 10 ngày nuôi cấy của các mẫu M<sub>1</sub>, M<sub>6</sub> và M<sub>16</sub> đạt cao nhất (8,0 cm), sau là mẫu M<sub>9</sub> (7,9 cm), và thấp nhất là mẫu M<sub>13</sub> (7,2 cm). Hình ảnh của tản nấm của các mẫu nấm sợi được mô tả rõ ở hình 1.

**Bảng 1. Đặc điểm nuôi cấy và hình thái của 5 mẫu nấm sợi**

Mẫu	Đặc điểm nuôi cấy (trong 10 ngày)			Đặc điểm hình thái bào tử trần (sau 4 ngày)		
	Màu sắc tản nấm	Màu sắc mặt sau tản nấm	Tốc độ sinh trưởng	Đường kính tản nấm (cm)	Bề mặt bào tử	Màu sắc bào tử trần
M <sub>1</sub>	Nâu đen	Vàng nâu	Mọc nhanh	8,0	Nhẵn	Vàng rom
M <sub>6</sub>	Nâu đen	Vàng nâu	Mọc chậm	8,0	Nhẵn	Vàng nhạt
M <sub>9</sub>	Đen	Vàng nâu	Mọc chậm	7,9	Nhẵn	Nâu sẫm
M <sub>13</sub>	Xanh rêu	Trắng ngà	Mọc nhanh	7,2	Mịn	Xanh xám
M <sub>16</sub>	Xanh sậm	Xanh vàng	Mọc chậm	8,0	Mịn	Xanh xám



**Hình 1. Tán nấm của 5 mẫu nấm sợi M1 (a), M6 (b), M9 (c), M13 (d) và M16 (e) sau 10 ngày nuôi cấy và hình dạng bào tử của mẫu nấm sợi M16 (f)**

### 3.3. Xác định số lượng bào tử trần của 5 mẫu nấm sợi

Kết quả của phương pháp đếm khuẩn lạc được quan tâm nhiều hơn vì phương pháp này xác định được số bào tử sống mà khả năng ký sinh gây bệnh của nấm sợi phụ thuộc vào khả năng nảy mầm của bào tử sống. Số lượng bào tử của các mẫu nấm sợi rất khác nhau: chủng  $M_{16}$  là chủng có số bào tử lớn nhất, thứ hai là chủng  $M_9$  còn chủng có số lượng bào tử ít nhất là chủng  $M_6$  (Bảng 2). Tuy nhiên, số lượng bào tử ở cả 5 chủng đều dao động trong khoảng từ  $77 \times 10^8$  đến  $312 \times 10^8$  bào tử/g. Sự sai khác về số lượng bào tử có thể là do sự khác nhau về khả năng sinh bào tử giữa chúng.

### 3.4. Khả năng hình thành một số enzyme ngoại bào của 5 mẫu nấm sợi

Khả năng sinh enzyme ngoại bào là một trong các yếu tố quan trọng quyết định đến khả năng gây bệnh của nấm sợi trên các đối tượng côn trùng khác nhau.

Sau 3 ngày nuôi cấy, khả năng sinh các enzyme ngoại bào kitinaza, proteaza và xenlulaza của năm mẫu nấm sợi thể hiện rõ (Bảng 3). Cả 5 chủng nấm sợi đều sinh ra 3 loại enzyme ngoại bào (kitinaza, proteaza, cellulaza) với hoạt tính khác nhau. Kitinaza được sinh ra nhiều nhất ở cả năm mẫu nấm

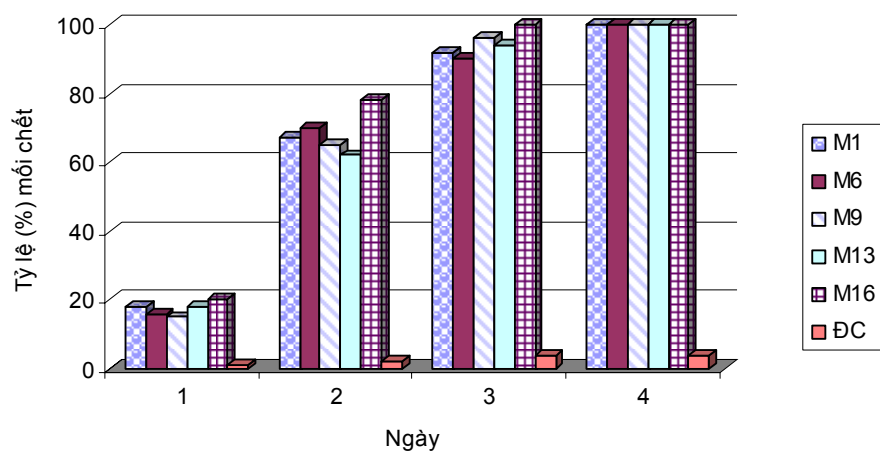
sợi. Vòng phân giải đo được cao nhất ở mẫu  $M_{16}$  và thấp nhất ở mẫu  $M_1$  và  $M_9$ . Sự khác nhau này có thể được giải thích là do các mẫu nấm sợi này được phân lập tại các nguồn mẫu khác nhau nên có các điều kiện ngoại cảnh khác nhau ảnh hưởng đến khả năng sinh enzyme ngoại bào, nhưng sự khác nhau này không phải là quá nhiều. Kitinaza được sinh ra nhiều hơn proteaza và xenlulaza có thể là do các mẫu nấm sợi này đều được phân lập từ mẫu đất lấy tại tổ mối chết nên khả năng sinh enzyme này là cao nhất. Proteaza cũng được sinh ra ở cả 5 mẫu nấm với hoạt tính gần như là tương đương nhau, không có sự khác biệt nhiều ở các mẫu nấm khác nhau. Điều này có thể được giải thích là enzyme proteaza chỉ được sinh ra sau khi sợi nấm đã xuyên được qua cơ thể côn trùng rồi, khi đó proteaza được sinh ra để phân huỷ các cơ quan nội tạng của côn trùng với thành phần chủ yếu là proteaza. Xenlulaza được sinh ra có sự khác nhau rõ rệt giữa các mẫu nấm. Cao nhất vẫn là ở mẫu  $M_{16}$  và thấp nhất là ở mẫu  $M_{13}$ . Các thử nghiệm đo hoạt tính của enzyme ngoại bào mới chỉ được thực hiện từ dịch nuôi cấy thô nên mới chỉ xác định được khả năng sinh enzyme ngoại bào một cách tương đối, để có các kết luận chính xác và cụ thể hơn thì cần phải tinh sạch và xác định đơn vị hoạt động của từng enzyme này.

**Bảng 2. Số lượng bào tử của 5 mẫu nấm sợi**

Mẫu	Số lượng bào tử/gam x 10 <sup>8</sup>	
	Phương pháp đếm khuẩn lạc	Phương pháp đếm trực tiếp
<b>M<sub>1</sub></b>	102 ± 28	130 ± 36
<b>M<sub>6</sub></b>	77 ± 21	96 ± 25
<b>M<sub>9</sub></b>	268 ± 36	290 ± 38
<b>M<sub>13</sub></b>	126 ± 47	159 ± 52
<b>M<sub>16</sub></b>	312 ± 29	373 ± 34

**Bảng 3. Hoạt tính một số enzyme ngoại bào của 5 mẫu nấm sợi**

Mẫu	Hoạt tính enzyme ngoại bào (mm)		
	Kitinaza	Proteaza	Xenulaza
<b>M<sub>1</sub></b>	11	10	5
<b>M<sub>6</sub></b>	12	12	5
<b>M<sub>9</sub></b>	11	12	6
<b>M<sub>13</sub></b>	12	12	4
<b>M<sub>16</sub></b>	13	12	10

**Hình 2. Hiệu lực diệt mối của 5 mẫu nấm sợi**

### 3.5. Khả năng diệt mối của 5 mẫu nấm sợi

Sau 1 ngày rắc bào tử ở các lô thí nghiệm tỷ lệ mối chết lần lượt là 18%; 16%; 15%; 37,5%, 18% và 30% tương ứng với 5 chủng. Còn ở các lô đối chứng tỷ lệ mối chết không đáng kể chỉ 1%. Có thể giải thích nguyên nhân gây chết mối ngày thứ nhất là do độc tố destruxin mới bắt đầu được vi nấm tiết ra, các loại enzyme ngoại bào lúc này chưa được tiết ra (Tạ Kim Chính, 1999).

Sau ngày thứ 2, tỷ lệ mối chết tăng rất nhanh, cao nhất ở chủng  $M_4$  đạt đến 67%, 70%, 65%, 62% và 78% tương ứng với các chủng. Còn ở các lô đối chứng tỷ lệ mối chết cao nhất cũng chỉ đạt 2%. Sau 3 ngày, tỷ lệ mối chết ở cả 5 lô thí nghiệm đều đạt xấp xỉ 100%, trong khi tỷ lệ mối chết do chủng  $M_{16}$  đạt 100. Có thể giải thích là do đến ngày thứ 3 lượng enzyme ngoại bào như kitinaza, xenlulaza, proteaza được nấm sợi tiết ra nhiều nhất và các độc tố destruxin A, B vẫn được tiết ra do đó gây chết đồng thời hàng loạt các cá thể mối. Ở lô đối chứng, lượng mối chết là 4%. Sang đến ngày thí nghiệm thứ 4 thì 100% các cá thể mối ở tất cả các lô thí nghiệm đều chết, những cá thể mối chết cuối cùng đều là các cá thể mối lính. Một giả thiết khác được đưa ra là các cá thể mối chết ngoài con đường xâm nhập qua lớp vỏ kitin thì còn bị chết qua đường miệng. Tức là các cá thể mối ăn bào tử vi nấm vào ruột, từ đó bào tử nảy mầm và gây chết mối. Có thể giải thích là do các cá thể mối lính phải được mớm thức ăn từ các cá thể mối thợ và các cá thể mối lính đều khoẻ hơn mối thợ nên có thể chịu được trong thời gian lâu hơn.

Trong nghiên cứu này, hiệu lực diệt mối mới được thử trực tiếp từ các mẫu nấm sợi. Để kết quả nghiên cứu có ý nghĩa khoa học hơn, hiệu lực diệt mối của các mẫu nấm này cần được thử nghiệm trên mô hình hộp lầy nhím và với số lượng nhiều cá thể hơn nữa. Mặt khác, các mẫu nấm này cần được thử để đánh giá khả năng diệt các loại côn trùng khác như sâu tơ, sâu khoang, sâu xanh... thì

mới đánh giá chính xác và hiệu quả hơn của chúng trong việc áp dụng diệt trừ côn trùng. Có như vậy ý nghĩa trong việc phòng trừ các loài côn trùng gây hại của các mẫu nấm sợi này sẽ cao hơn.

## 4. KẾT LUẬN

$M_1$ ,  $M_6$ ,  $M_9$ ,  $M_{13}$  và  $M_{16}$  là 5 mẫu nấm sợi được phân lập từ 30 mẫu đất thu tại các tổ mối chết tại khu vực Hà Nội. Năm mẫu nấm sợi này có nhiều đặc điểm đặc điểm hình thái, tản nấm giống như nấm *Metarhizium*, chi nấm sợi có phổ diệt côn trùng rất rộng.

Cả 5 mẫu nấm sợi đều có khả năng sinh các enzyme ngoại bào kitinaza, xenlulaza và proteaza. Enzyme ngoại bào kitinaza được sinh ra nhiều nhất bởi mẫu  $M_{16}$ .

Cả 5 mẫu nấm sợi phân lập được đều có khả năng diệt mối trực tiếp, trong đó chủng  $M_{16}$  có hiệu lực diệt mối cao nhất. Ở liều lượng 0,005g bào tử/100 cá thể mối hiệu lực diệt mối 100% chỉ sau 3 ngày thí nghiệm.

## Lời cảm ơn

Nghiên cứu là một phần nội dung của đề tài khoa học cấp Bộ "Nghiên cứu quy trình sản xuất chế phẩm nấm *Metarhizium* hiệu lực cao nhằm phòng trừ một số loài côn trùng gây hại nông nghiệp". Kinh phí do Bộ Giáo dục và Đào tạo cấp.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Tạ Kim Chính (1996). Nghiên cứu tuyển chọn một số chủng vi nấm diệt côn trùng gây hại ở Việt Nam và khả năng ứng dụng. Luận án phó tiến sĩ khoa học sinh học.
- Nguyễn Lân Dũng, Phạm Thị Trân Châu, Nguyễn Thanh Hiền, Lê Đình Lương, Đoàn Xuân Mượng, Phạm Văn Ty (1978). Một số phương pháp nghiên cứu vi sinh vật học, tập 3. NXB Khoa học Kỹ thuật.

- Nguyễn Dương Khuê và cộng tác viên (2001). Thử nghiệm dùng vi nấm *Metarhizium* cho phòng trừ mối nhà. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn* số 5/2001.
- Trịnh Văn Hạnh, Võ Thu Hiền, Phan Trọng Nhật (2001). Nghiên cứu khả năng gây chết loài mối *Coptotermes formosanus* bởi bào tử của một số chủng *Metarhizium*. Tuyển tập kết quả khoa học và công nghệ 1999 - 2000, Viện Khoa học Thủy lợi. NXB Nông nghiệp, tr 261 – 265.
- Nasr, F. N. and Moein, S. I. M (1997). New trend of the use of *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sokorin and *Verticillium indicum* (Petch) Gams as entomopathogens to the termite *Cryptotermes brevis* (Walker) (Isoptera: Kalotermitidae). Anz, Schadlingskde., Pflanzenschutz, Umweltschutz 70: 13 - 16.
- Ine Stolz (1999). The effect of *Metarhizium anisopliae* (Mestch.) Sorokin (=flavoviride) Gams and *Rozsypal var. acridum* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) on non-target Hymenoptera. PhD Thesis, Basel University (Germany).
- Kimberly M. E (2004). Effects of multiple generations of *Metarhizium anisopliae* on subterranean termite feeding and mortality. Master thesis, Texas A&M University (USA).
- Tsai, Y. S., C. W. Kao., R. E. Hou (1992). Effect of insecticides on the virulence of the green muscardine fungus *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* against the beetle Armyworm Spodoptera exigua. *Bull. Plant Protection* (Taipei). 34: 26 - 216.