

Bài báo nghiên cứu
PHÂN LẬP, TUYỂN CHỌN CHỦNG VI NẤM
CÓ KHẢ NĂNG KÍ SINH GÂY CHẾT SÂU ĐÀU ĐEN (*Opisina arenosella* Walker)
GÂY HẠI TRÊN CÂY DỪA TẠI TỈNH BẾN TRE

**Hồ Thị Nguyệt^{1,2}, Đỗ Thị Mai Trinh¹, Lê Thanh Bình¹, Nguyễn Bá Thọ¹,
Nguyễn Đào Thanh Hương¹, Trương Minh Ngọc¹, Phan Thị Phương Trang^{2*}**

¹Chi nhánh Viện Ứng dụng Công nghệ tại Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

²Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

^{*}Tác giả liên hệ: Phan Thị Phương Trang – Email: ptptrang@hcmus.edu.vn

Ngày nhận bài: 23-10-2023; ngày nhận bài sửa: 18-11-2023; ngày duyệt đăng: 21-11-2023

TÓM TẮT

Sâu đầu đen (*Opisina arenosella* Walker) là một trong những đối tượng gây ảnh hưởng nghiêm trọng đến năng suất dừa tại tỉnh Bến Tre. Trong bài báo này, nhóm nghiên cứu tiến hành phân lập, tuyển chọn các chủng vi nấm có khả năng kí sinh gây chết sâu đầu đen. Từ 40 mẫu sâu, 25 mẫu đất và 25 mẫu lá thu thập được tại tỉnh Bến Tre và An Giang đã phân lập được 147 chủng vi nấm, đã sàng lọc được 25 chủng vi nấm có khả năng tiết đồng thời enzyme chitinase và protease thể hiện khả năng phân giải chitin và protein ở lớp biểu bì của sâu. Trong đó, chủng vi nấm *Metarhizium anisopliae* S39.6 và chủng *Talaromyces pinophilus* Đ6.6 có khả năng gây chết sâu đầu đen với hiệu lực lần lượt là 100% và 85,77% sau 7 ngày xử lí. Hai chủng vi nấm này có tiềm năng ứng dụng để phòng trị sâu đầu đen gây hại trên cây dừa tại tỉnh Bến Tre.

Từ khóa: chitinase; protease; sâu đầu đen; vi nấm

1. Giới thiệu

Theo số liệu của Cục thống kê Bến Tre tháng 5 năm 2023, tỉnh Bến Tre có diện tích trồng dừa cao nhất cả nước, diện tích gần 78,195 ha. Tuy nhiên, từ năm 2020 đến năm 2023, cây dừa Bến Tre đối mặt với một đối tượng sâu hại nguy hiểm là sâu đầu đen (*Opisina arenosella* Walker). Đây là loài sâu hại mới xuất hiện, lây lan nhanh chóng và gây thiệt hại nghiêm trọng đến năng suất dừa của tỉnh Bến Tre, tổng diện tích nhiễm sâu đầu đen từ khi mới phát hiện đến tháng 5 năm 2023 lên đến 2459,78 ha (Ben Tre Provincial Statistics Department, 2023).

Sâu đầu đen có tên khoa học là *Opisina arenosella* Walker, gây hại trên cây dừa, chà là, cọ. Sâu tàn phá bộ lá của cây thông qua việc ăn bẻ mặt và chất diệp lục của lá, sau đó

Cite this article as: Ho Thi Nguyet, Do Thi Mai Trinh, Le Thanh Binh, Nguyen Ba Tho, Nguyen Dao Thanh Huong, Trương Minh Ngọc, & Phan Thi Phuong Trang (2023). Isolation, selection of fungus strains capable of parasitically killing coconut blackhead worms (*Opisina arenosella* Walker) in Ben Tre Province. *Ho Chi Minh City University of Education Journal of Science*, 20(11), 1920-1930.

chúng làm các mạng tơ kéo các mép lá sát lại, tạo chỗ ẩn nấp, gây khó khăn trong việc phun thuốc hóa học. Bên cạnh đó, việc phun thuốc hóa học không những gây ảnh hưởng xấu đến môi trường, thiên địch có ích mà còn gây tác hại trực tiếp đến sức khỏe con người. Do đó, tỉnh Bến Tre đang hướng đến các giải pháp sinh học phòng trừ sâu đầu đen.

Nhiều nghiên cứu trong và ngoài nước đã chứng minh được một số loài vi nấm như *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, *Trichoderma*, *Paecilomyces* có khả năng kí sinh gây chết côn trùng gây hại. Theo Zimmermann và cộng sự (2007), vi nấm *Metarhizium anisopliae* còn có khả năng kiểm soát hơn 200 loài côn trùng gây hại như sâu xanh, bọ cánh cứng, dế, muỗi, mối... Theo Mwamburi (2020), vi nấm *Beauveria bassiana* có phạm vi kí chủ rộng, có khả năng kí sinh trên 700 loại côn trùng khác nhau như sâu tơ, bọ ngũ cốc, châu chấu, muỗi... Vi nấm kí sinh là nhóm sinh vật kiểm soát sinh học tự nhiên, đóng một vai trò quan trọng trong việc kiểm soát nhiều loài côn trùng gây hại (Dinu et al., 2022). Nghiên cứu của Mondal và cộng sự cho thấy các chủng vi nấm kí sinh gây chết côn trùng như *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* và *Verticillium lecanii* đều có khả năng tiết đồng thời các enzyme protease và chitinase, các enzyme này có chức năng phân hủy lớp biểu bì của côn trùng (Mondal et al., 2016). Theo Schrank và cộng sự, enzyme protease, lipase là các enzyme quan trọng trong cơ chế kí sinh của nấm gây chết côn trùng (Schrank et al., 2010).

Trên cơ sở đó, nhóm nghiên cứu tiến hành phân lập, tuyển chọn các chủng vi nấm có khả năng gây chết sâu đầu đen, hướng tới tạo chế phẩm sinh học phòng trị sâu đầu đen hại dứa tại tỉnh Bến Tre.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu và địa điểm nghiên cứu

Vật liệu: 40 mẫu đất, 25 mẫu sâu, 25 mẫu lá được thu thập tại các vườn dứa thuộc tỉnh Bến Tre và rừng tự nhiên tại tỉnh An Giang.

Nghiên cứu này được thực hiện tại Phòng Thí nghiệm Vi sinh của Chi nhánh Viện Ứng dụng Công nghệ tại Thành phố Hồ Chí Minh.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp phân lập vi nấm từ mẫu sâu, đất, lá

Mẫu sâu, đất, lá thu thập được tại các vườn dứa thuộc tỉnh Bến Tre và rừng tự nhiên tại tỉnh An Giang được phân lập vi nấm bằng phương pháp pha pha loãng và cấy trải trên đĩa petri chứa môi trường Potato Dextrose Agar (PDA). Các đĩa petri ủ ở nhiệt độ 25°C, quan sát khuẩn lạc trên bề mặt môi trường sau 48-72 giờ, phân lập làm thuần vi nấm từ những khuẩn lạc riêng lẻ trên đĩa petri đến khi thu được giống thuần.

2.2.2. Phương pháp sàng lọc chủng vi nấm có hoạt tính tiết enzyme chitinase

Xác định chủng vi nấm có hoạt tính tiết enzyme chitinase theo phương pháp của Jenin (2016). Cấy các chủng vi nấm đã phân lập trên môi trường chitin-agar. 1000 mL môi trường gồm (NH₄)₂SO₄ (1 g), K₂HPO₄ (1 g), KCl (0,5 g), NaCl (5 g), MgSO₄ (0,5 g), FeSO₄ (0,01 g), agar (20 g) và colloidal chitin (5 g), streptomycin (0,06%). Hoạt tính chitinase được quan

sát bởi vùng phân giải chitin xung quanh các khuẩn lạc vi nấm sau khi nhuộm bằng dung dịch Congo Red 0,1%. Kích thước của vùng phân giải được đo và được ghi lại sau 72 giờ ủ. Kích thước vòng phân giải được tính theo công thức: Kích thước vòng phân giải = D – d. trong đó: D: đường kính vòng phân giải (mm); d: đường kính khuẩn lạc (mm).

2.2.3. Phương pháp sàng lọc chủng vi nấm có hoạt tính tiết enzyme protease

Các chủng vi nấm sản xuất enzyme protease được sàng lọc theo phương pháp của Islam (2022) bằng cách sử dụng môi trường Skimmed Milk Agar (SMA) chứa streptomycin (0,06%). Cấy các chủng vi nấm đã phân lập lên môi trường SMA và ủ ở 28°C trong 72 giờ. Quan sát sự xuất hiện của vòng phân giải protein xung quanh khuẩn lạc. Kích thước của vùng phân giải được đo và được ghi lại sau 72 giờ ủ. Kích thước vòng phân giải được tính theo công thức: Kích thước vòng phân giải = D – d.

trong đó: D: đường kính vòng phân giải (mm); d: đường kính khuẩn lạc (mm)

2.3.4. Đánh giá khả năng phòng trị sâu đầu đen của các chủng vi nấm riêng lẻ ở quy mô phòng thí nghiệm

Sâu đầu đen 2-5 ngày tuổi được khử trùng sơ bộ bằng nước cất vô trùng và phân vào các hộp nhựa, mỗi hộp 10 con. Gây nhiễm 25 chủng vi nấm lên sâu bằng cách phun 2 mL dung dịch vi nấm ở mật độ 10^7 CFU/ mL vào hộp. Mỗi hộp nhựa tương ứng với 1 nghiệm thức thí nghiệm (1 chủng vi nấm), mỗi nghiệm thức được lặp lại 3 lần. Thí nghiệm đối chứng được xử lý bằng nước cất vô trùng. Đếm số sâu chết sau 3 ngày, 5 ngày, 7 ngày lây nhiễm.

Hiệu lực gây chết sâu đầu đen của chủng vi nấm được tính theo công thức Abbott (1925):

$$E (\%) = (C - T)/C * 100.$$

trong đó:

E: Hiệu lực tính theo (%)

C: Số côn trùng sống ở nghiệm thức đối chứng

T: Số côn trùng sống ở nghiệm thức có xử lý vi nấm.

2.2.5. Định danh chủng vi nấm đã tuyển chọn

Các chủng vi nấm được định danh bằng phương pháp sinh học phân tử. Các mẫu DNA li trích từ nấm được tiến hành định danh sinh học phân tử bằng phân tích trình tự ITS1 – ITS4 (White et al., 1990). Trong đó, mỗi phân tích trình tự ITS1 là: 5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' và mỗi phân tích trình tự ITS4 là: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'.

2.2.6. Phương pháp xử lý số liệu

Dùng phần mềm excel để xử lý các số liệu. Các số liệu ghi nhận được xử lý thống kê bằng phương pháp One-Way ANOVA trên phần mềm Statgraphics phiên bản 19.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Kết quả phân lập

Kết quả phân lập được thể hiện trong Bảng 1 cho thấy từ 40 mẫu sâu, 25 mẫu đất và 25 mẫu lá thu thập được tại tỉnh Bến Tre và An Giang đã phân lập được 147 chủng vi nấm. Số

lượng vi nấm phân lập được từ các mẫu sâu và mẫu đất đa dạng hơn số lượng vi nấm phân lập được từ mẫu lá. Sự khác nhau về số lượng chủng vi nấm giữa các mẫu có thể do các yếu tố như: loại đất, loại sâu, hàm lượng dinh dưỡng trong mẫu, điều kiện thời tiết khi lấy mẫu.

Bảng 1. Số lượng vi nấm trong các mẫu phân lập

STT	Địa điểm lấy mẫu	Loại mẫu	Số lượng mẫu	Số chủng phân lập được
1	Thành phố Bến Tre – Bến Tre	Mẫu sâu (S)	10	15
		Mẫu đất (Đ)	5	18
		Mẫu lá (L)	5	5
2	Châu Thành – Bến Tre	Mẫu sâu (S)	10	11
		Mẫu đất (Đ)	5	12
		Mẫu lá (L)	5	4
3	Ba Tri – Bến Tre	Mẫu sâu (S)	5	10
		Mẫu đất (Đ)	5	9
		Mẫu lá (L)	5	3
4	Bình Đại – Bến Tre	Mẫu sâu (S)	5	8
		Mẫu đất (Đ)	5	8
		Mẫu lá (L)	5	4
5	Tri Tôn – An Giang	Mẫu sâu (S)	10	19
		Mẫu đất (Đ)	5	16
		Mẫu lá (L)	5	5
Tổng số			90	147

Ghi chú: Các chủng vi nấm được kí hiệu theo nguồn gốc mẫu phân lập:

Các chủng vi nấm phân lập từ sâu được kí hiệu bằng chữ S

Các chủng vi nấm phân lập từ đất được kí hiệu bằng chữ Đ

Các chủng vi nấm phân lập từ lá được kí hiệu bằng chữ L.

3.2. Kết quả sàng lọc chủng vi nấm có hoạt tính tiết enzyme chitinase

Tiến hành cấy chuyền 147 chủng vi nấm phân lập được lên môi trường chứa chitin là nguồn carbon duy nhất. Khả năng tiết enzyme chitinase thể hiện qua kích thước vòng phân giải chitin xung quanh khuẩn lạc sau khi nhuộm đĩa thạch bằng Congo Red.

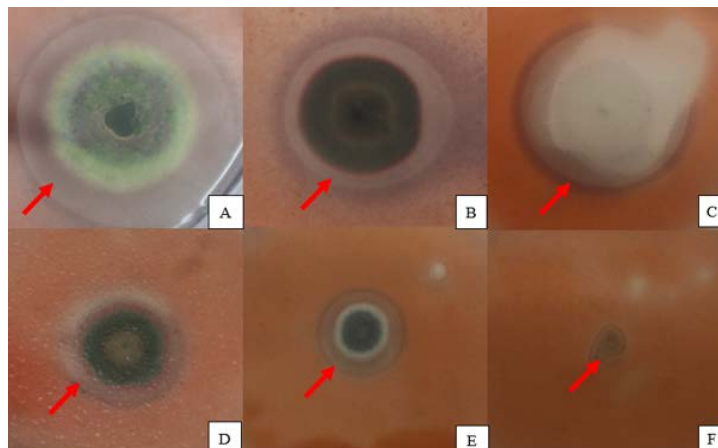
Kết quả sàng lọc khả năng tiết enzyme chitinase của 147 chủng vi nấm được thể hiện trong Bảng 2.

Bảng 2. Kết quả sàng lọc khả năng tiết enzyme chitinase của các chủng vi nấm phân lập

STT	Kích thước vòng phân giải chitin (D-d: mm)	Mức độ	Số chủng	Tỉ lệ (%)
1	0	Không hoạt tính	102	69,4
2	<10	Yếu	26	17,7
3	10-20	Trung bình	11	7,5
4	>20	Mạnh	8	5,4
Tổng số có hoạt tính			45	30,6

Kết quả cho thấy, từ 147 chủng vi nấm phân lập được, có 45 chủng vi nấm có khả năng tiết enzyme chitinase, chiếm 30,6% tổng số chủng vi nấm phân lập được. Trong đó, số vi nấm có hoạt tính tiết enzyme chitinase mạnh chiếm 5,4%; số vi nấm có hoạt tính tiết enzyme chitinase trung bình chiếm 7,5% và số vi nấm có hoạt tính tiết enzyme chitinase yếu chiếm 17,7%.

Kích thước vòng phân giải chitin xung quanh khuẩn lạc được thể hiện qua Hình 1.



Hình 1. Vòng phân giải chitin của một số chủng vi nấm trên môi trường chitin agar
A: Chủng Đ6.6; B: Chủng S3; C: Chủng S17; D: Chủng S1.1; E: Chủng Đ1.4; F: Chủng L3

Chủng Đ6.6 có kích thước vòng phân giải chitin xung quanh khuẩn lạc là 21,3 mm (>20 mm) thể hiện hoạt tính tiết enzyme chitinase mạnh (Hình 1A). Chủng S3, S17 có kích thước vòng phân giải chitin xung quanh khuẩn lạc lần lượt là 15,0 mm và 11,3 mm (10-20 mm) thể hiện hoạt tính tiết enzyme chitinase trung bình (Hình 1B, 1C). Chủng S1.1, Đ1.4 có kích thước vòng phân giải chitin xung quanh khuẩn lạc là 5,3 mm (<10 mm) thể hiện hoạt tính tiết enzyme chitinase yếu (Hình 1D, 1E). Chủng L3 không có vòng phân giải chitin xung quanh khuẩn lạc thể hiện không có hoạt tính tiết enzyme chitinase (Hình 1F).

3.3. Kết quả sàng lọc chủng vi nấm có hoạt tính tiết enzyme protease

Tiến hành cấy chuyển 147 chủng nấm phân lập được lên môi trường SMA chứa casein là nguồn carbon duy nhất. Khả năng tiết enzyme protease thể hiện qua kích thước vòng phân giải protein xung quanh khuẩn lạc.

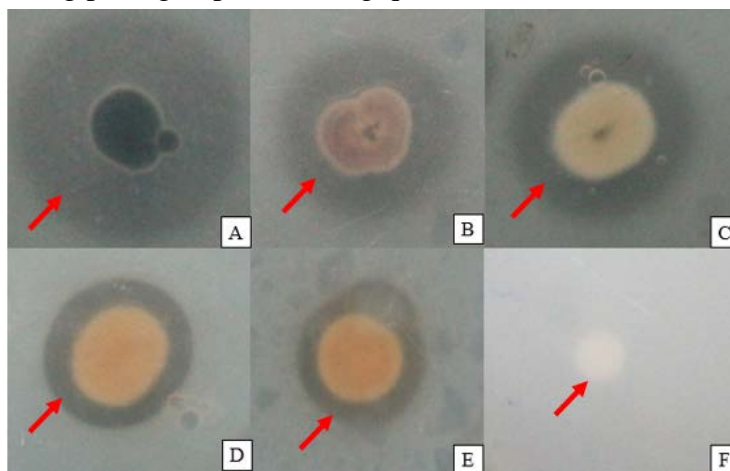
Kết quả sàng lọc khả năng tiết enzyme protease của 147 chủng vi nấm được thể hiện trong Bảng 3.

Bảng 3. Kết quả sàng lọc khả năng tiết enzyme protease của các chủng vi nấm phân lập

STT	Kích thước vòng phân giải protein (D-d: mm)	Mức độ	Số chủng	Tỉ lệ (%)
1	0	Không hoạt tính	117	79,6
2	<10	Yếu	19	12,9
3	10-20	Trung bình	8	5,4
4	>20	Mạnh	3	2,0
Tổng số có hoạt tính			30	20,4

Kết quả sàng lọc khả năng tiết enzyme protease được thể hiện trong Bảng 3 cho thấy, từ 147 chủng nấm phân lập được, có 30 chủng nấm có khả năng tiết enzyme protease, chiếm 20,4% tổng số vi nấm phân lập được. Trong đó, số chủng có hoạt tính tiết enzyme protease mạnh chiếm 2,0%; số chủng có hoạt tính tiết enzyme protease trung bình chiếm 5,4% và số chủng có hoạt tính tiết enzyme protease yếu chiếm 12,9%.

Kích thước vòng phân giải protein xung quanh khuẩn lạc được thể hiện qua Hình 2.



Hình 2. Vòng phân giải protein của một số chủng vi nấm trên môi trường SMA

A: Chủng Đ11.1; B: Chủng S8; C: Chủng S39.6; D: Chủng S5; E: Chủng Đ1.2; F: Chủng L3

Chủng Đ11.1 có kích thước vòng phân giải protein xung quanh khuẩn lạc là 22,3 mm (>20 mm) thể hiện hoạt tính tiết enzyme protease mạnh (Hình 2A). Chủng S8, S39.6 có kích thước vòng phân giải protein xung quanh khuẩn lạc lần lượt là 11,7 mm và 12,3 mm (10-20 mm) thể hiện hoạt tính tiết enzyme protease trung bình (Hình 2B, 2C). Chủng S5, Đ1.2 có kích thước vòng phân giải protein xung quanh khuẩn lạc lần lượt là 8,0 mm và 4,7 mm (<10 mm) thể hiện hoạt tính tiết enzyme protease yếu (Hình 2D, 2E). Chủng L3 không có vòng phân giải protein xung quanh khuẩn lạc thể hiện không có hoạt tính tiết enzyme protease (Hình 2F).

Như vậy, tổng hợp kết quả sàng lọc các chủng vi nấm có khả năng tiết enzyme chitinase, protease cho thấy, từ 147 chủng nấm phân lập được, có 45 chủng nấm có khả năng tiết enzyme chitinase, 40 chủng nấm có khả năng tiết enzyme protease, trong đó, có 25 chủng nấm có khả năng tiết đồng thời enzyme chitinase và protease.

Theo nghiên cứu của (Mondal et al., 2016), các chủng vi nấm kí sinh gây chết côn trùng như *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* và *Verticillium lecanii* đều có khả năng tiết đồng thời các enzyme protease và chitinase, các enzyme này có chức năng phân hủy lớp biểu bì của côn trùng. Do đó, từ kết quả sàng lọc khả năng tiết enzyme chitinase, protease của các chủng vi nấm, chọn 25 chủng vi nấm có khả năng tiết đồng thời hai loại enzyme protease, chitinase cho thí nghiệm khảo sát khả năng gây chết sâu đầu đen. Hoạt tính tiết enzyme chitinase và protease của 25 chủng vi nấm này được thể hiện trong Bảng 4.

Bảng 4. Kích thước vòng phân giải chitin, protein của 25 chủng vi nấm

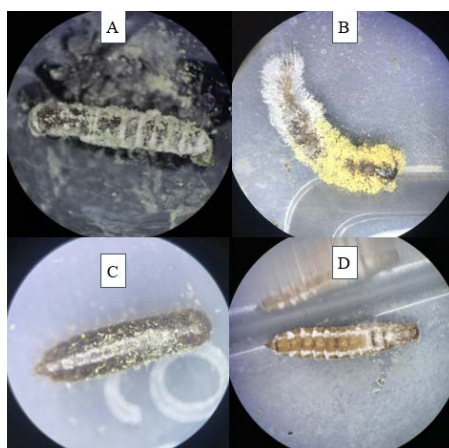
STT	Chủng	Kích thước vòng phân giải chitin (mm)	Kích thước vòng phân giải protein (mm)	STT	Chủng	Kích thước vòng phân giải chitin (mm)	Kích thước vòng phân giải protein (mm)
1	S1.1	5,3 ^k	4,3 ^{kl}	14	Đ1.4	5,3 ^k	7,7 ^{gh}
2	S1.2	6,7 ^j	3,3 ^{lm}	15	Đ1.5	8,7 ^h	8,3 ^{fg}
3	S2	7,3 ^{ij}	7,7 ^{gh}	16	S16	8,3 ^{hi}	2,7 ^m
4	S3	15,0 ^e	6,3 ^{hi}	17	S17	11,3 ^g	5,3 ^{ijk}
5	S4	3,3 ^l	6,0 ^{ij}	18	S18	20,7^{cd}	11,3^{cd}
6	S5	24,3 ^a	8,0 ^g	19	Đ6.6	21,3^{cd}	14,3^b
7	S6	3,3 ^l	4,3 ^{kl}	20	S21.3	8,3 ^{hi}	2,7 ^m
8	S7	6,7 ^j	17,3 ^a	21	Đ12	21,0^{cd}	12,0^{cd}
9	S8	21,7^{bc}	11,7^{cd}	22	S28.2	7,7 ^{hij}	9,7 ^{ef}
10	S9.1	7,7 ^{hij}	3,3 ^{lm}	23	S39.6	22,7^b	12,3^c
11	Đ1.1	7,7 ^{hij}	3,3 ^{lm}	24	Đ23.3	13,3 ^f	7,7 ^{gh}
12	Đ1.2	7,3 ^{ij}	4,7 ^{jkl}	25	Đ25.1	11,3 ^g	10,7 ^{de}
13	Đ1.3	20,3^d	11,3^{cd}				

Ghi chú: (^{abcde}, Các kí tự theo hàng dọc khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa $p \leq 0.05$)

Kết quả từ Bảng 4 cho thấy, các chủng vi nấm có khả năng tiết đồng thời hai enzyme chitinase và protease đều được phân lập từ mẫu sâu và mẫu đất. Kết quả này tương đồng với báo cáo của (Dinu et al., 2022), cho biết vi nấm kí sinh gây chết côn trùng thường sống trong đất và kí sinh trong cơ thể côn trùng. Các chủng vi nấm S8, Đ1.3, S18, Đ6.6, Đ12, S39.6 đều có khả năng tiết đồng thời cả hai enzyme chitinase và protease từ trung bình đến mạnh, do đó, các chủng này được dự đoán là có tiềm năng gây chết sâu đầu đen cao.

3.4. Kết quả đánh giá khả năng gây chết sâu đầu đen của các chủng vi nấm riêng lẻ ở quy mô phòng thí nghiệm

Từ 25 mẫu vi nấm phân lập và sàng lọc có khả năng tiết đồng thời hai enzyme chitinase và protease, tiến hành đánh giá khả năng gây chết sâu đầu đen của các chủng nấm riêng lẻ ở quy mô phòng thí nghiệm. Quan sát hình thái một số chủng vi nấm kí sinh trên sâu đầu đen cho thấy, các chủng vi nấm bám dính lên bề mặt biểu bì sâu đầu đen, sau đó xâm nhập vào bên trong, gây chết sâu, và cuối cùng tạo thành lớp bào tử bao phủ xung quanh xác sâu đầu đen. Bào tử tiếp tục phóng thích, bắt đầu một chu trình kí sinh mới. Chu trình này kéo dài 5-7 ngày trên đối tượng sâu đầu đen (Hình 3).



Hình 3. Các chủng vi nấm kí sinh gây chết sâu đầu đen

A: S39.6; B: Đ6.6; C: S8; D: Đ1.3

Số lượng sâu đầu đen sống và số lượng sâu đầu đen chết được ghi nhận, từ đó tính được hiệu lực gây chết sâu đầu đen của 25 chủng vi nấm riêng lẻ. Kết quả được trình bày ở Bảng 5.

Bảng 5. Hiệu lực gây chết sâu đầu đen của 25 chủng vi nấm

Chủng	Hiệu lực (%)		
	3 ngày	5 ngày	7 ngày
S1.1	10,53 ^{ijkl}	17,74 ^{fghi}	19,49 ^{kml}
S1.2	10,53 ^{ijkl}	14,13 ^{ghij}	21,35 ^{kl}
S2	21,05 ^{ghi}	21,44 ^{fg}	26,80 ^{jk}
S3	12,28 ^{ijkl}	19,69 ^{fgh}	23,20 ^{kl}
S4	7,02 ^{klm}	24,95 ^f	33,92 ^{ij}
S5	8,77 ^{iklm}	62,38 ^c	65,98 ^c
S6	7,02 ^{klm}	8,87 ^{ijk}	8,87 ^{no}
S7	36,84 ^{cd}	37,43 ^d	53,51 ^{ef}
S8	43,86 ^{bc}	62,57 ^c	66,08 ^c
S9.1	22,81 ^{fgh}	24,95 ^f	25,05 ^{kl}
Đ1.1	10,53 ^{ijkl}	12,38 ^{ghij}	17,74 ^{lm}
Đ1.2	7,02 ^{klm}	8,87 ^{ijk}	12,48 ^{mn}
Đ1.3	47,37 ^b	59,06 ^c	62,57 ^{cd}
Đ1.4	12,28 ^{ijkl}	19,59 ^{fgh}	21,44 ^{kl}
Đ1.5	26,32 ^{efg}	26,71 ^{ef}	37,33 ^{hi}
S16	5,26 ^{klm}	10,72 ^{hij}	17,84 ^{lm}
S17	3,51 ^{lm}	5,36 ^{jk}	21,35 ^{kl}
S18	8,77 ^{iklm}	41,13 ^d	66,08 ^c
Đ6.6	31,58^b	74,95^b	85,77^b
S21.3	22,81 ^{fgh}	39,38 ^d	55,36 ^{def}
Đ12	33,33 ^{de}	42,88 ^d	58,97 ^{cde}
S28.2	17,54 ^{ghij}	35,77 ^{de}	50,10 ^{fg}
S39.6	61,40^a	92,79^a	100,00^a
Đ23.3	31,58 ^{def}	41,23 ^d	57,02 ^{def}
Đ25.1	14,04 ^{hijk}	21,15 ^{fg}	42,79 ^{gh}
Đối chứng	0,00	0,00	0,00

Ghi chú: (^{abcde}, Các kí tự theo hàng dọc khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa $p \leq 0.05$)

Kết quả từ Bảng 5 cho thấy, hiệu lực gây chết sâu đầu đen của các chủng vi nấm khác nhau có sự chênh lệch rất lớn. Sau 3 ngày xử lí, hiệu lực gây chết sâu đầu đen của đa số các chủng vi nấm nhỏ hơn 40%. Sau 5 ngày xử lí, hiệu lực gây chết sâu đầu đen dao động từ 5,36%-92,79% ở các chủng vi nấm khác nhau. Trong đó, sau 5 ngày, hiệu lực gây chết sâu đầu đen cao nhất ở chủng S39.6, đạt 92,79%, sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê; chủng Đ6.6 đạt hiệu lực gây chết sâu đầu đen lên đến 74,95%, sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê so với các chủng còn lại. Sau 7 ngày xử lí, hiệu lực gây chết sâu đầu đen ở chủng S39.6 đạt 100%, kể đến là chủng Đ6.6 đạt hiệu lực lên đến 85,77%, sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê so với các chủng còn lại.

Kết quả nghiên cứu cho thấy thời gian vi nấm kí sinh gây chết sâu đầu đen kéo dài 5-7 ngày, tương đồng với các nghiên cứu công bố trước. Quá trình kí sinh của vi nấm trải qua các giai đoạn: Bào tử bám dính trên biểu bì của côn trùng; nảy mầm; thâm nhập qua biểu bì; hình thành sợi nấm và tăng sinh; hình thành bào tử và tạo bào tử mới bao phủ xác côn trùng; qua trình này thường kéo dài 5 đến 7 ngày (Sharma et al., 2023).

Như vậy, trong 25 chủng vi nấm, chủng S39.6 là chủng vi nấm có hiệu lực gây chết sâu đầu đen cao nhất (100%) và kể đến là chủng vi nấm Đ6.6 (85,77%) sau 7 ngày xử lí. Do đó, hai chủng vi nấm này được tuyển chọn và thực hiện định danh bằng phương pháp sinh học phân tử.

3.5. Kết quả định danh

Các đoạn sản phẩm PCR ITS1 và ITS4 của các chủng vi nấm được tinh sạch và giải trình tự bằng phương pháp Sanger và so sánh trình tự trên ngân hàng dữ liệu NCBI - Blast cho thấy chủng vi nấm S39.6 là chủng *Metarhizium anisopliae* với độ tương đồng 99,77 %; chủng vi nấm Đ6.6 là chủng *Talaromyces pinophilus* với độ tương đồng 99,66%. Theo một số nghiên cứu cho thấy các chủng trên đều có khả năng kí sinh gây chết côn trùng và đều an toàn với môi trường và con người (Nicoletti et al., 2021; Syazwan et al., 2021).

Theo nghiên cứu của (Rahimzadeh et al., 2012), nấm *Metarhizium anisopliae* ở nồng độ 10^6 cfu/ml có hiệu lực gây chết môi lên đến 100% sau 7 ngày xử lí. (Osongo et al., 2019) cũng có báo cáo rằng nấm *Metarhizium anisopliae* có khả năng gây chết ruồi đục quả *Zeugodacus cucurbitae*, hiệu lực gây chết lên đến 100% sau 3 ngày xử lí. (Schrack et al., 2010), để kí sinh trên vật chủ, nấm *Metarhizium anisopliae* tiết ra protease, chitinase, lipase làm phân hủy các thành phần chính của lớp biểu bì, cho phép sợi nấm xâm nhập. Bên cạnh đó, vi nấm *Metarhizium anisopliae* còn tạo ra nhóm độc tố Destruxins (Dx), được xem là yếu tố độc lực quan trọng trong quá trình đẩy nhanh cái chết của côn trùng. Các chất độc này làm suy yếu khả năng miễn dịch của vật chủ, làm tổn thương tế bào, ảnh hưởng đến bài tiết, gây khó khăn trong việc kiếm ăn và vận động.

Theo (Vinale et al., 2017), dịch chiết từ *Talaromyces pinophilus* có tác dụng độc hại đối với rệp *Acyrtosiphon pisum*; nấm *Talaromyces pinophilus* tiết ra các hợp chất thứ cấp như ferrirubin, herquiline B và 3-O-methylfunicone, những hợp chất này ngoài tác dụng kích

thích sinh trưởng ở thực vật, chúng còn có tác dụng gây độc đối với côn trùng. Theo (Nicoletti et al., 2021), loài *Talaromyces* có tác dụng chống côn trùng, là một nhân tố tiềm năng trong ứng dụng làm thuốc bảo vệ thực vật sinh học. Khi lây nhiễm *Talaromyces flavus* vào ấu trùng muỗi, hiệu quả xử lý lên đến 75% sau 16 ngày.

Từ những nghiên cứu trên có thể thấy chủng vi nấm *Metarhizium anisopliae* S39.6 và chủng vi nấm *Talaromyces pinophilus* Đ6.6 được đánh giá là chủng vi nấm tiềm năng trong sản xuất chế phẩm sinh học phòng trị sâu đầu đen gây hại trên cây dừa tại tỉnh Bến Tre.

4. Kết luận

Từ 40 mẫu sâu, 25 mẫu đất và 25 mẫu lá phân lập được 147 chủng vi nấm và sàng lọc được 25 chủng vi nấm có khả năng tiết đồng thời hai enzyme chitinase và protease. Trong đó, chủng vi nấm S39.6 là chủng vi nấm có hiệu lực gây chết sâu đầu đen cao nhất và kế đến là chủng vi nấm Đ6.6 (hiệu lực gây chết sâu đầu đen lần lượt là 100% và 85,77% sau 7 ngày). Kết quả định danh cho thấy chủng vi nấm S39.6 là chủng *Metarhizium anisopliae* với độ tương đồng 99,77 %; chủng vi nấm Đ6.6 là chủng *Talaromyces pinophilus* với độ tương đồng 99,66%. Hai chủng vi nấm này có tiềm năng ứng dụng để phòng trị sâu đầu đen hại dừa tại tỉnh Bến Tre.

- ❖ **Tuyên bố về quyền lợi:** Các tác giả xác nhận hoàn toàn không có xung đột về quyền lợi.
- ❖ **Lời cảm ơn:** Nghiên cứu này là một phần nội dung trong đề tài nghiên cứu khoa học cấp Bộ – “Nghiên cứu tạo chế phẩm sinh học diệt trừ sâu đầu đen (*Opisina arenosella* Wailker) hại dừa tại tỉnh Bến Tre” theo hợp đồng 12/2022/HĐ-ĐT/CB. Chúng tôi chân thành cảm ơn Chi nhánh Viện Ứng dụng Công nghệ tại Thành phố Hồ Chí Minh đã tài trợ kinh phí và tạo điều kiện cho chúng tôi thực hiện nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Abbott, W. S. (1925). A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology*, 18(2), 265-267.
- Ben Tre Provincial Statistics Department. (2023). Report on Socio-Economic Situation in May and 5 months of 2023. <http://www.thongkebentre.gov.vn>
- Dinu, M. M., Fătu, A. C., & Băbeanu, N. (2022). The great potential of Entomophthoralean Fungi for biological control: A review. *Scientific Bulletin Series F. Biotechnologies*, 26(1), 24-32.
- Islam, M. S., Subbiah, V. K., & Siddiquee, S. (2022). Field Efficacy of Proteolytic Entomopathogenic Fungi against *Ceratovacuna lanigera* Zehntner. *Horticulturae*, 8(9), Article 808.
- Jenin, G. A., Babu, M. M., Murugan, M., & Murugan, T. (2016). Isolation and identification of chitinase producing native fungi from Saltpan of Puthalam, Kanyakumari District, Tamil Nadu, India. *Journal of Applied Biology and Biotechnology*, 4(3), 001-005.
- Kramer, K. J., & Muthukrishnan, S. (1997). Insect chitinases: molecular biology and potential use as biopesticides. *Insect biochemistry and molecular biology*, 27(11), 887-900.
- Mondal, S., Baksi, S., Koris, A., & Vatai, G. (2016). Journey of enzymes in entomopathogenic fungi. *Pacific Science Review A: Natural Science and Engineering*, 18(2), 85-99.

- Mwamburi, L. A. (2020). Beauveria. In N. Amaresan, M. Senthil Kumar, K. Annapurna, Krishna Kumar, A. Sankaranarayanan (Eds.), *Beneficial Microbes in Agro-Ecology* (pp. 727-748). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823414-3.00037-X>
- Nicoletti, R., & Becchimanzi, A. (2021). Talaromyces–insect relationships. *Microorganisms*, 10(1), Article 45.
- Rahimzadeh, A., Rashid, M., Sheikhi Garjan, A., & Naseri, B. (2012). Laboratory evaluation of *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) for controlling *Amitermes vilis* (Hagen) and *Microcerotermes gabrielis* (Weidner)(Isoptera: Termitidae). *Journal of Crop Protection*, 1(1), 27-34.
- Schrank, A., & Vainstein, M. H. (2010). *Metarhizium anisopliae* enzymes and toxins. *Toxicon*, 56(7), 1267-1274.
- Sharma, A., Sharma, S., & Yadav, P. K. (2023). Entomopathogenic fungi and their relevance in sustainable agriculture: A review. *Cogent Food & Agriculture*, 9(1), 2180857.
- Syazwan, S. A., Lee, S. Y., Sajap, A. S., Lau, W. H., Omar, D., & Mohamed, R. (2021). Interaction between *Metarhizium anisopliae* and its host, the subterranean termite *Coptotermes curvignathus* during the infection process. *Biology*, 10(4), 263.
- Vinale, F., Nicoletti, R., Lacatena, F., Marra, R., Sacco, A., Lombardi, N., & Woo, S. L. (2017). Secondary metabolites from the endophytic fungus *Talaromyces pinophilus*. *Natural product research*, 31(15), 1778-1785.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. J. W. T., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*, 18(1), 315-322.
- Zimmermann, G. (2007). Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Biocontrol Science and technology*, 17(9), 879-920.

**ISOLATION, SELECTION OF FUNGUS STRAINS CAPABLE
OF PARASITICALLY KILLING COCONUT BLACKHEAD WORMS (*Opisina arenosella* Walker)
IN BEN TRE PROVINCE**

Ho Thi Nguyet^{1,2}, *Do Thi Mai Trinh*¹, *Le Thanh Binh*¹, *Nguyen Ba Tho*¹,
*Nguyen Dao Thanh Huong*¹, *Truong Minh Ngoc*¹, *Phan Thi Phuong Trang*^{2*}

¹National Center for Technological Progress – HCM Branch, Ho Chi Minh City, Vietnam

²University of Science, Vietnam National University Ho Chi Minh City, Vietnam

*Corresponding author: Phan Thi Phuong Trang – Email: ptptrang@hcmus.edu.vn

Received: October 23, 2023; Revised: November 18, 2023; Accepted: November 21, 2023

ABSTRACTS

Blackhead worm (Opisina arenosella Walker) is one of the species that seriously affects coconut productivity in Ben Tre province. In this article, we isolated, screened, and selected fungal strains capable of parasitizing harmful blackhead worms on coconut trees in Ben Tre province. From 40 worm samples, 25 soil samples, and 25 leaf samples collected in Ben Tre and An Giang provinces, 147 fungal strains were isolated, and 25 fungal strains were screened for their ability to simultaneously secrete the enzyme chitinase and protease, demonstrating the ability to degrade chitin and proteins in the worm's cuticle layer. Among them, Metarhizium anisopliae S39.6 and Talaromyces pinophilus D6.6 can kill black-headed worms with an effectiveness of 100% and 85.77%, respectively, after 7 days of treatment. These two fungal strains have the potential for the prevention and treatment of harmful blackhead worms on coconut trees in Ben Tre province.

Keywords: Black Headed Caterpillar; chitinase; fungi; protease