

PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN MỘT SỐ CHỦNG NẤM SỢI CÓ KHẢ NĂNG ĐỐI KHÁNG SÂU TƠ (*Plutella xylostella*) HẠI RAU MÀU TẠI HUYỆN CHÂU THÀNH, TỈNH KIÊN GIANG

Nguyễn Văn Lê^{1*}, Hà Ngọc Bằng²,
Nguyễn Minh Khoa¹, Bùi Xuân Khanh²

TÓM TẮT

Nấm sợi có khả năng tổng hợp enzyme chitinase để tiêu diệt sâu tơ (*Plutella xylostella*) bằng cách phá hủy lớp vỏ chitin và cũng có thể sử dụng nấm sợi như một tác nhân sinh học an toàn thay thế cho thuốc trừ sâu hóa học. Nghiên cứu nhằm xác định và khảo sát khả năng gây bệnh các dòng nấm sợi có khả năng đối kháng sâu tơ phân lập tại huyện Châu Thành, tỉnh Kiên Giang. Các thí nghiệm khảo sát khả năng tổng hợp enzyme chitinase và khả năng đối kháng sâu tơ của các dòng nấm sợi phân lập được bố trí trong điều kiện phòng thí nghiệm theo thể thức hoàn toàn ngẫu nhiên với 3 lần lặp lại. Định danh nấm sợi dựa vào đặc điểm hình thái và phương pháp sinh học phân tử là giải trình tự gen. Trong số các mẫu sâu tơ thu thập ngoài đồng ruộng chọn được 6 mẫu sâu tơ có nhiễm nấm sợi và phân lập được 5 chủng nấm sợi có đặc điểm hình thái khác nhau. Kết quả nghiên cứu xác định được khả năng phân giải chitin của 5 chủng nấm sợi được phân lập. Trong đó, hai chủng nấm sợi L1.3 và L2.1 có hiệu lực cao nhất với vòng phân giải chitin lần lượt là 32,0 mm và 32,3 mm và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các chủng còn lại. Đồng thời, đã định danh được chủng nấm L1.3 thuộc loài *Aspergillus sydowii* và L2.1 thuộc loài *Aspergillus protuberus*. Đánh giá được hiệu lực diệt sâu tơ của 2 chủng nấm sợi ở thời điểm 5 ngày sau xử lý đều đạt hiệu quả cao, trong đó cao nhất là chủng nấm *Aspergillus protuberus* L2.1 đạt 96,6%.

Từ khóa: Đối kháng, enzyme chitinase, nấm sợi, sâu tơ, rau cải.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Việt Nam là một trong các nước sản xuất nông nghiệp với khí hậu nhiệt đới phù hợp cho sự sinh trưởng và phát triển của cây trồng. Tuy nhiên, với điều kiện này đã thuận lợi cho sâu, bệnh hại cây trồng phát triển. Trong đó, trên rau màu, sâu tơ (*Plutella xylostella*) là đối tượng sâu hại phổ biến và có khả năng kháng thuốc. Sâu tơ có ảnh hưởng rất lớn đến năng suất đây là một trong những loài sâu gây hại lớn nhất đối với rau màu nên việc phòng trừ và tiêu diệt chúng được xem là giải pháp hàng đầu. Để ứng phó với sâu tơ, nông dân thường sử dụng giải pháp sử dụng thuốc trừ sâu hóa học và đây là một trong các tác nhân ảnh hưởng đến sức khỏe con người [8]. Thuốc trừ sâu hóa học ảnh hưởng lớn đến môi trường đất, nước, không khí, sinh vật và sức khỏe của con người. Theo nghiên cứu của Phạm Minh Tuấn và cs (2016) thuốc trừ sâu có thể làm cho đất bị thoái hóa, bạc màu, gây chết các loài động vật xung quanh,... [9] đây cũng là tác nhân ảnh hưởng đến sức khỏe con người như gây ung thư, các bệnh

về đường hô hấp, rối loạn thần kinh hoặc ngộ độc thực phẩm nếu sử dụng phải thực phẩm có tồn dư thuốc bảo vệ thực vật hóa học với hàm lượng vượt ngưỡng an toàn. Để khắc phục hạn chế trên, phương pháp tối ưu là sử dụng chế phẩm sinh học để kiểm soát sâu, bệnh trên cây trồng, biện pháp này ngày càng phổ biến hơn nhờ những ưu điểm như: hiệu quả cao, chi phí thấp và không tác động đến môi trường cũng như sức khỏe của con người.

Nấm côn trùng được nhiều nhà khoa học quan tâm và phát hiện từ rất sớm cách đây hơn 150 năm và đã xác định được nhiều loài hữu ích. Trong tự nhiên có rất nhiều loài nấm có khả năng đối kháng sâu gây hại [13]. Trong đó, nấm sợi là loài nấm đối kháng hiện đang được quan tâm nhiều trong lĩnh vực sản xuất thuốc bảo vệ thực vật trong nông nghiệp [2]. Nấm sợi có thể tổng hợp enzyme chitinase có khả năng phân hủy lớp vỏ chitin của sâu tơ. Khi côn trùng chết, nấm phát triển trong ký chủ, gặp điều kiện thích hợp tạo thành từng lớp bào tử ở bề mặt cơ thể vật chủ và phóng thích sang cá thể sâu tơ khác. Có thể sử dụng nấm như một tác nhân điều chỉnh sinh học an toàn và dễ phân hủy thay cho thuốc trừ sâu hóa học bằng cách cho bào tử nấm tiếp xúc trực tiếp với côn trùng hay sâu gây hại [5].

¹ Trường Đại học Kiên Giang

*Email: nvle@vnkgu.edu.vn

² Trường Trung cấp Việt - Hàn

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**2.1. Vật liệu**

Các mẫu nấm sợi được thu thập từ sâu tơ từ cây cải ngọt, cải xanh tại huyện Châu Thành, Kiên Giang.

Các môi trường (MT) được sử dụng trong nghiên cứu gồm:

- MT1 (PGA): Khoai tây 250 g; glucose 20 g; agar 15 g; nước cất 1.000 mL.

- MT2 (PDA): Potato extract 4,0 g; glucose 20,0 g; bacteriological agar 15,0 g; pH = 6,5; nước cất 1.000 mL.

- MT3 (PGA không bổ sung agar): Khoai tây 250 g; glucose 20 g; nước cất 1.000 mL.

- MT4: NaNO_3 3,5 g; K_2HPO_4 1,5 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g; KCl 0,5 g; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01 g; bột kitin 10 g; agar 20 g; nước 1.000 mL; pH = 6,5.

2.2. Phương pháp nghiên cứu**2.2.1. Khảo sát và thu mẫu sâu tơ nhiễm nấm sợi**

Trước khi tiến hành thu mẫu ngoài thực địa, chuẩn bị dụng cụ thu mẫu như: kẹp inox, túi nylon, thùng xốp, nước đá, bút lông,...đảm bảo điều kiện vô trùng và chọn địa điểm thu mẫu. Địa điểm thu mẫu sâu tơ phải là nơi có diện tích đất trồng rau màu nhiều như: Giục Tượng, Mong Thọ A, Mong Thọ B. Cách thu mẫu sâu nhiễm nấm [4]: Sau khi xác định được địa điểm thu mẫu nấm sợi, tiến hành thu khoảng 2 - 5 mẫu sâu tơ bị nhiễm nấm ở mỗi khu vực. Dùng kẹp inox đã được khử trùng chuyển các mẫu sâu nhiễm nấm sợi ngoài tự nhiên (sâu bị nhiễm nấm sẽ xuất hiện khuẩn ty trên cơ thể) vào trong túi nylon vô trùng, ghi nhận khu vực lấy mẫu, buộc kín, đánh số thứ tự, thời gian thu mẫu, địa điểm thu mẫu, ngày, tháng thu mẫu được trữ lạnh trong thùng xốp và chuyển về phòng thí nghiệm.

2.2.2. Phân lập và tuyển chọn nấm sợi có khả năng tổng hợp enzyme chitinase**2.2.2.1. Phân lập nấm sợi**

Chuẩn bị môi trường PGA: Cân 250 g khoai tây sau đó gọt vỏ, rửa sạch, thái nhỏ thêm 1.000 mL nước, đun sôi với nhiệt độ 100°C trong 30 phút, tiếp đến dùng giấy lọc lọc lấy dịch trong cho vào chai thủy tinh cùng với các thành phần còn lại của MT1, sau đó hấp khử trùng ở 121°C trong 15 phút. Bổ sung khoảng 20 mL môi trường đã tiệt trùng vào các đĩa petri vô trùng và để nguội, sau 1 - 2 ngày để kiểm tra tạp nhiễm.

Cấy nấm sợi: Mẫu sâu tơ thu về được trữ trong đĩa petri có lót giấy thấm và bông gòn để tạo ẩm độ

cho nấm phát triển. Quan sát bằng mắt thường thấy tơ nấm xuất hiện thì dùng que cấy chuyển một ít tơ nấm lên môi trường PGA trong đĩa petri sau đó đem ủ ở nhiệt độ phòng, quan sát sự phát triển của nấm sợi hàng ngày. Sau vài ngày thì cấy chuyển liên tục cho đến khi có các mẫu nấm sợi thuần.

2.2.2.2. Tuyển chọn nấm sợi có khả năng tổng hợp enzyme chitinase cao

Nhân sinh khối: Giống gốc được nhân sinh khối với môi trường PDA, ủ ở nhiệt độ 30°C trong 24 giờ, theo dõi sự phát triển của khuẩn ty và thu sinh khối khi bào tử hình thành.

Thu dịch enzyme: Sau khi nấm sợi hình thành bào tử thì tiến hành thu lớp bào tử trên mặt môi trường cho vào bình tam giác có chứa môi trường PGA lỏng và lắc trên máy lắc ổn nhiệt trong 24 giờ, nhiệt độ 30°C , tốc độ lắc là 250 vòng/phút, sau 24 giờ lắc tiến hành lọc qua giấy lọc, thu dịch lọc, li tâm dịch lọc với tốc độ 5.000 vòng/phút trong 10 phút và chuyển phần dịch ly tâm cho vào các bình vô trùng.

Chuẩn bị môi trường cảm ứng tổng hợp enzyme chitinase trong các chai thủy tinh, hấp khử trùng ở 121°C trong 30 phút. Sau đó bổ sung môi trường đã tiệt trùng vào các đĩa petri với thể tích khoảng 20 mL, để nguội, ủ với thời gian 1 - 2 ngày để kiểm tra tạp nhiễm. Sử dụng pipet pasteur ($d = 0,9$ cm) vô trùng khoan lỗ thạch trên môi trường nuôi cấy nấm sợi ở các đĩa petri, sau đó hút 100 μL dung dịch enzyme chitinase chủng vào các giếng. Ủ ở nhiệt độ phòng ($28^\circ\text{C} - 30^\circ\text{C}$) trong 2 - 3 ngày và nhuộm với thuốc thử Lugol để quan sát vòng phân giải chikin.

Chỉ tiêu theo dõi: Thời gian phân giải sau khi chủng dung dịch có chứa enzyme chitinase, đường kính vòng phân giải. Sau đó chọn chủng nấm sợi có đường kính phân enzyme chitinase từ 20 mm trở lên để tiến hành định danh theo phương pháp của Phạm Thị Lịch (2013) [10]: i) đường kính $D - d \geq 25$ mm: hoạt tính enzyme mạnh; ii) $D - d \geq 20$ mm: hoạt tính enzyme khá mạnh; iii) $D - d \geq 15$ mm: hoạt tính enzyme trung bình; iv) $D - d \leq 10$ mm: hoạt tính enzyme yếu.

Phương pháp quan sát đặc điểm hình thái nấm sợi của Nguyễn Lâm Dũng và cs, (2000) [6], kết hợp với phương pháp sinh học phân tử và khóa phân loại của Robert A. Samson và cs (2004) [11] để so sánh mức độ tương đồng và xác định tên loài.

2.2.3. Khảo sát khả năng gây bệnh của các chủng nấm sợi đến sâu tơ trong phòng thí nghiệm**2.2.3.1. Tạo quần thể sâu tơ**

Nuôi sâu trực tiếp ngoài tự nhiên bằng cách tiến hành đánh dấu vị trí các trứng sâu tơ ở các địa điểm đã thu mẫu sâu bị nhiễm nấm sợi trước đó. Trứng đẻ rải rác hoặc thành cụm 3 - 5 quả mặt dưới lá, trứng hình bầu dục màu vàng xanh, sau khi trứng sâu tơ nở được 2 ngày tuổi thì thu sâu về phòng thí nghiệm để khảo sát khả năng đối kháng của các chủng nấm sợi được chọn.

2.2.3.2. Khảo sát khả năng đối kháng của nấm sợi đối với sâu tơ trong phòng thí nghiệm

Chuẩn bị dung dịch có chứa bào tử nấm sợi bằng cách nhỏ nước cất lên đĩa petri đã được cấy trước đó, lắc nhẹ và hút dung dịch cho vào ống nghiệm. Tiếp đến nhỏ dung dịch lên buồng đếm hồng cầu và đếm mật độ bào tử trên kính hiển vi quang học, khi mật độ bào tử trong dung dịch đạt 10^8 tế bào/mL thì tiến hành pha loãng dung dịch xuống mật độ bào tử 10^7 tế bào/mL với tỉ lệ 9 mL nước cất + 1 mL dung dịch 10^8 tế bào/mL, tiếp tục pha loãng dung dịch xuống mật độ 10^6 tế bào/mL với tỉ lệ 9 mL nước cất + 1 mL dung dịch 10^7 tế bào/mL.

Bố trí thí nghiệm theo thể thức hoàn toàn ngẫu nhiên với 4 nghiệm thức và 3 lần lặp lại: Cho số lượng sâu tơ 10 con/đĩa petri, đĩa đối chứng chỉ cho lượng nước cất bằng với lượng dung dịch chitinase (1 mL/đĩa petri). Dùng micropipet hút 1 mL dung dịch chitinase với mật độ bào tử/mL lần lượt là 10^6 , 10^7 , 10^8 cho vào đĩa petri đã có bố trí sâu. Các nghiệm thức (NT) thí nghiệm gồm: NT 1: 10 sâu tơ, mật độ 0 bào tử/mL (đối chứng); NT 2: 10 sâu tơ, mật độ 10^6 bào tử/mL; NT 3: 10 sâu tơ, mật độ 10^7 bào tử/mL và NT 4: 10 sâu tơ, mật độ 10^8 bào tử/mL [5].

Chỉ tiêu theo dõi: Thời gian xuất hiện sâu chết; thời gian xuất hiện sâu chết hoàn toàn; tỷ lệ sâu chết và hiệu lực diệt sâu của nấm gây bệnh được tính bằng công thức [1]:

$$M(\%) = \frac{C-T}{C} \times 100$$

Trong đó: C là tỷ lệ côn trùng còn sống ở công thức đối chứng; T là tỷ lệ côn trùng sống sót ở công thức xử lý nấm; M là tỷ lệ côn trùng chết sau khi phun thuốc và tỷ lệ sâu chết mọc lại nấm (TLCTMN) được tính theo công thức:

$$TLCTMN(\%) = \frac{\sum CTBMN}{\sum CTTN} \times 100$$

Trong đó: CTBMN là sâu chết bị mọc nấm lại; CNTN là sâu thí nghiệm.

Những con sâu chết sẽ được giữ ẩm trong đĩa petri có lót giấy thấm cho nấm mọc sau đó cấy lại trên môi trường PGA.

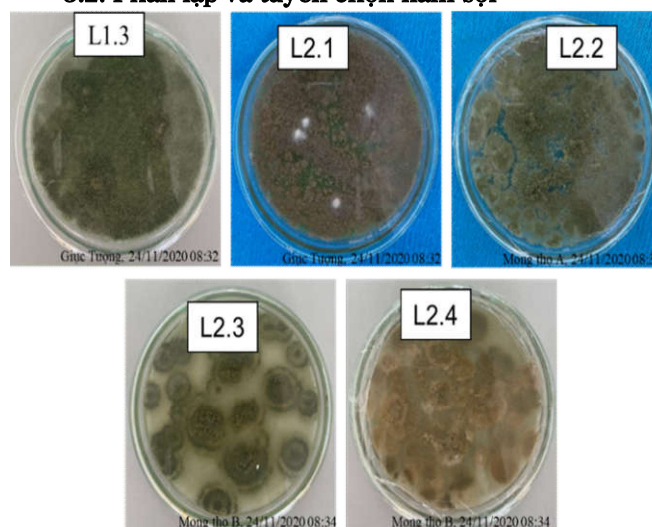
Xử lý số liệu: Số liệu được thống kê bằng công cụ Microsoft excel và sử dụng phần mềm Minitab 18.0 để phân tích phương sai trung bình giữa các nghiệm thức thí nghiệm.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Thu mẫu sâu tơ bị nhiễm nấm sợi

Sau 2 tháng tiến hành khảo sát ở huyện Châu Thành thu được 6 mẫu sâu tơ chết có dấu hiệu bị nhiễm nấm (mỗi xã chọn được 2 mẫu đại diện). Trong đó: 2 mẫu sâu tơ nhiễm nấm được thu trên luống cải ngọt ở xã Giục Tượng; 2 mẫu sâu tơ nhiễm nấm được thu trên luống cải ngọt ở xã Mong Thọ và 2 mẫu sâu tơ nhiễm nấm được thu trên luống cải xanh ở xã Mong Thọ B.

3.2. Phân lập và tuyển chọn nấm sợi



Hình 1. Nấm sợi được phân lập trên môi trường PGA

Từ 6 mẫu sâu tơ có biểu hiện do nấm sợi kí sinh đã phân lập được 5 chủng nấm sợi trên môi trường PGA kí hiệu lần lượt là L1.3, L2.1, L2.2, L2.3, L2.4. Trong đó, có 2/5 chủng nấm được phân lập từ sâu tơ nhiễm nấm tại xã Giục Tượng (chiếm tỉ lệ 40%), 2/5 chủng nấm được phân lập từ mẫu sâu ở xã Mong Thọ B (chiếm tỉ lệ 40%) và 1/5 chủng nấm phân lập từ sâu tơ bị nhiễm nấm ở xã Mong Thọ A (chiếm tỉ lệ 20%).

Các chủng nấm sợi sau khi được phân lập được nhân sinh khối trên môi trường lỏng trong vòng 24 giờ và ly trích để thu được enzyme. Kết quả thí nghiệm thu được 50 mL dung dịch enzyme chitinase trên mỗi chủng nấm sợi.

Bảng 1. Đường kính vòng phân giải chitin của các chủng nấm sợi được phân lập

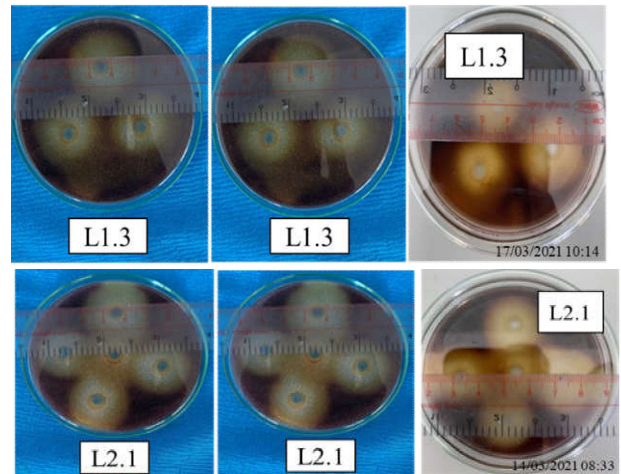
STT	Chủng nấm sợi	Đường kính trung bình vòng phân giải D - d (mm)
1	L1.3	$32,0 \pm 1,73^a$
2	L2.1	$32,3 \pm 0,577^a$
3	L2.2	$22,3 \pm 1,528^b$
4	L2.3	$24,3 \pm 0,577^b$
5	L2.4	$30,6 \pm 0,577^a$

Ghi chú: Các ký tự giống nhau là khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 99%.

Kết quả thí nghiệm cho thấy, đường kính phân giải chitin D - d (mm) của 5 chủng nấm sợi từ 0 mm đến 32,3 mm. Trong đó, 3 chủng nấm có đường kính vòng phân giải D - d (mm) lớn và hoạt độ chitin mạnh là chủng nấm L2.1: 32,3 mm, L1.3: 32,0 mm, L2.4: 30,6 mm còn lại chủng nấm có đường kính vòng phân giải D - d (mm) nhỏ và hoạt độ chitin khá mạnh lần lượt là L2.2: 22,3 mm, L2.3: 24,3 mm (Bảng 1). Các chủng nấm sợi được phân lập và tuyển chọn có hoạt tính chitinase cao hơn những nghiên cứu khác cũng trên đối tượng nấm sợi. So sánh với kết quả của Đỗ Thị Thanh Dung và cs (2018)[3], thì 5 chủng nấm sợi có đường kính phân giải chitin là TN7N3, CF8N3, TN7N1, CF10N2, TN2N1 và cao nhất chỉ đạt 31,6 mm thấp hơn so với kết quả tuyển chọn với đường kính phân giải của chủng nấm L2.1: 32,3 mm. So sánh với kết quả của Lê Thị Huệ (2010)[5], 4 chủng nấm nghiên cứu có khả năng phân giải chitin, trong đó chủng nấm *Aspergillus niger* có khả năng phân giải chitin thấp nhất là 20,1 mm, thấp hơn so với chủng nấm L2.2 với vòng phân giải chitin là 22,3 mm, cao nhất là chủng nấm *Aspergillus awamori* có đường kính vòng phân giải là 24,6 mm thấp hơn 7,73 mm so với kết quả phân giải của chủng nấm L2.1 với đường kính phân giải là 32,3 mm.

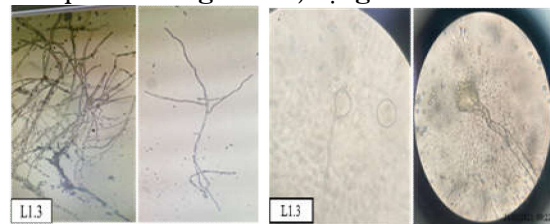
So sánh và đối chiếu kết quả của Lê Thị Huệ (2010)[5], Đỗ Thị Thanh Dung và cs (2018) [3] cho thấy, các chủng nấm sợi được phân lập tại huyện Châu Thành, tỉnh Kiên Giang đều có khả năng phân

giải chitin và hiệu quả nhất là 2 chủng nấm L1.3, L2.1.

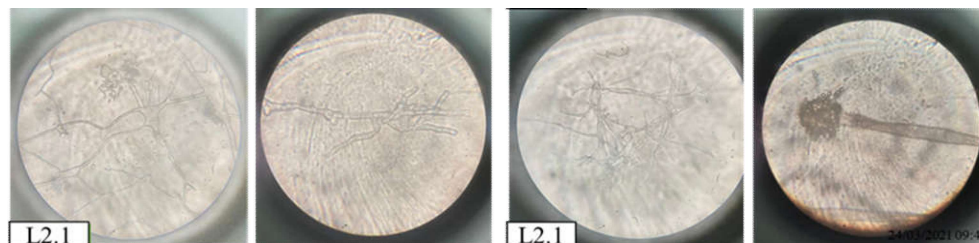


Hình 2. Vòng phân giải chitin của một số chủng nấm sợi

Theo kết quả thí nghiệm trên đã chọn ra 2 chủng nấm sợi là L1.3, L2.1 có hoạt tính chitinase cao để tiến hành định danh. Hai chủng nấm sợi L1.3 và L2.1 được định danh sơ bộ theo đặc điểm hình thái theo Robert A. Samson và cs (2004) [11]: Chủng nấm L1.3 có đặc điểm khuẩn lạc lúc đầu màu trắng sau chuyển dần sang màu xanh lục, bào tử lồi lên trên và thấp dần ở rìa mép, hệ sợi nấm trắng, có vách ngăn, phân nhánh, không màu, cuống bào tử tạo thành bụi phình lên ở ngọn, dạng bào tử trần; chủng nấm L2.1 có đặc điểm khuẩn lạc dạng bột mịn, tâm lồi, rìa thấp dần, khuẩn lạc ban đầu màu trắng dần chuyển sang màu nâu đen, hệ sợi nấm trắng, phân nhánh, có vách ngăn, cuống bào tử phồng to, có màu hơi nâu, có nốt sần bao quanh cuống bào tử, dạng bào tử trần.



Hình 3. Hình thái chủng nấm sợi L1.3 quan sát bằng kính hiển vi quang học với độ phóng đại 400X



Hình 4. Hình thái chủng nấm sợi L2.1 quan sát bằng kính hiển vi quang học với độ phóng đại 400X

Hai chủng nấm sợi tiếp tục dùng phương pháp sinh học phân tử để định danh bằng cách giải trình tự gen 28S rRNA và tra cứu trên BLAST SEARCH. Gen 28S rRNA của 2 chủng nấm như sau:

+ Gen 28S rRNA của chủng nấm L1.3:

TGCGCAAGAGCTCAAATTTGAAATCTGGCCC
CTCCGGGGTCCGAGTTGTAATTTGCAGAGGATG
CTTCGGGTGCGGCCCTGTCTAAGTGCCTGGAA
CGGGCCGTCAGAGAGGGTGAGTATCCCGTCTTG
GCAGGGTGCGTGCCCGTGTGAA

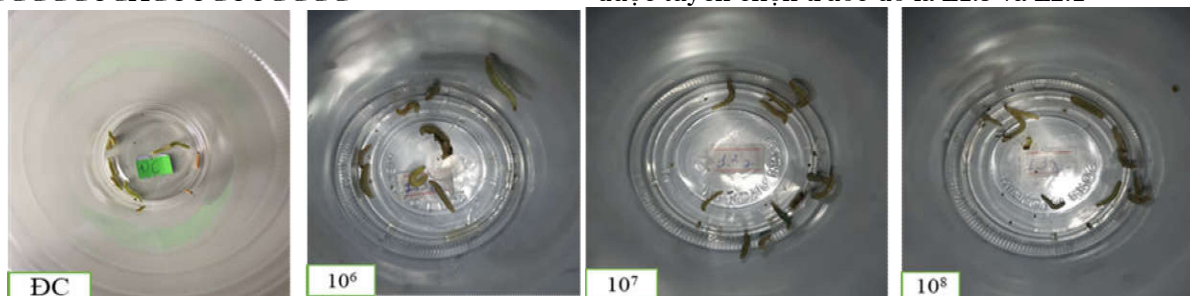
+ Gen 28S rRNA của chủng nấm L2.1:

AGGAAGTTAAAGGTCGTAACAAGGTTTCCGT
AGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACTGAGTGC
GGGCTGCTCCGGGCGCCCAACCTCCCACCCGTG
ACTACCTAACACTGTTGCTTCGGCGTGAGCCCC
TCTCGGGGCGAGCCGCCGGGG

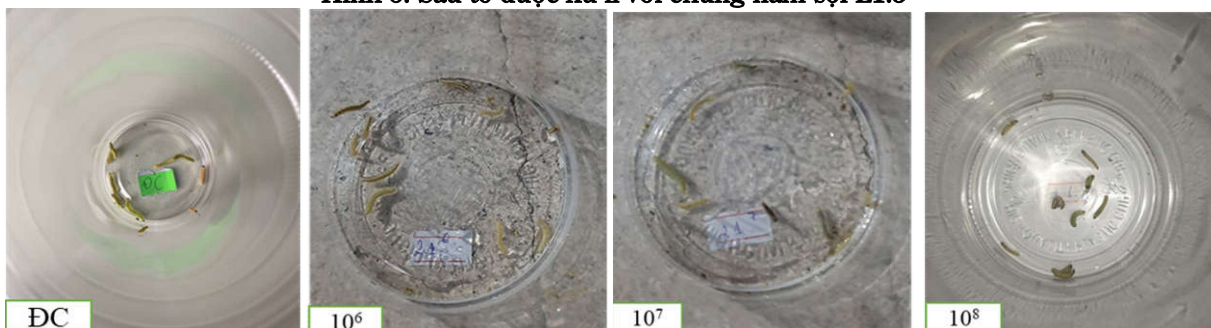
Trình tự gen của 2 chủng nấm sợi được so sánh và đối chiếu với trình tự DNA trên Ngân hàng NCBI kết quả cho thấy, chủng nấm sợi L1.3 thuộc loài *Aspergillus sydowii* và chủng nấm sợi L2.1 thuộc loài *Aspergillus protuberus*.

3.3. Đánh giá khả năng gây bệnh của các chủng nấm sợi đến sâu tơ trong phòng thí nghiệm

Tạo quần thể sâu tơ ngoài tự nhiên bằng cách khảo sát các khu vực đã từng thu mẫu sâu tơ bị nhiễm nấm sợi trước đó, sau đó quan sát tìm và đánh dấu các trứng sâu tơ được đẻ rải rác hoặc thành cụm dưới mặt lá. Nuôi trực tiếp ngoài tự nhiên và tiến hành thu về phòng thí nghiệm. Quần thể sâu tơ sau khi thu về thì tiến hành khảo sát khả năng diệt sâu qua sự phân giải lớp vỏ chitin của 2 chủng nấm sợi đã được tuyển chọn trước đó là L1.3 và L2.1



Hình 5. Sâu tơ được xử lý với chủng nấm sợi L1.3



Hình 6. Sâu tơ được xử lý với chủng nấm sợi L2.1

Bảng 2. Thời gian xuất hiện sâu chết của 2 chủng nấm sợi

Chủng nấm sợi	Mật độ bào tử/mL	Thời gian xuất hiện sâu chết (giờ)
L1.3	Đối chứng	106±10,82 ^{ab}
	10 ⁶	85,3±5,03 ^{bc}
	10 ⁷	56,6±15,28 ^{cd}
	10 ⁸	30,3±8,50 ^d
L2.1	Đối chứng	122±13,80 ^a
	10 ⁶	78,6±7,77 ^{bc}
	10 ⁷	67,6±15,95 ^c
	10 ⁸	67,3±15,37 ^c

Ghi chú: Các ký tự giống nhau là khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 99%.

Bảng 2 cho thấy, thời gian xuất hiện sâu chết ở 2 chủng nấm có sự khác nhau. Đối với chủng nấm sợi L1.3 ở mật độ bào tử 10⁷ bào tử/mL, 10⁸ bào tử/mL ghi nhận thời gian xuất hiện sâu chết ngắn nhất và có sự khác biệt ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức đối chứng. Ở chủng nấm sợi L2.1 mật độ bào tử ở nghiệm thức 10⁶ bào tử/mL, 10⁷ bào tử/mL, 10⁸ bào tử/mL đều cho kết quả diệt sâu tơ hiệu quả và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức đối chứng không chủng nấm.

Bảng 3 cho thấy, thời gian xuất hiện sâu chết hoàn toàn của 2 chủng nấm sợi có sự khác nhau. Ở chủng nấm sợi L1.3 mật độ bào tử ở nghiệm thức 10⁸ bào tử/mL ghi nhận thời gian xuất hiện sâu chết

hoàn toàn là hiệu quả nhất và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức còn lại. Đối với chủng nấm sợi L2.1 ở nghiệm thức có chủng bào tử nấm với mật độ 10^7 bào tử/mL và 10^8 bào tử/mL gây chết hiệu quả sâu tơ và khác biệt ý nghĩa thống kê so với đối chứng.

Bảng 3. Thời gian xuất hiện sâu chết hoàn toàn của 2 chủng nấm sợi

Chủng nấm sợi	Mật độ bào tử/mL	Thời gian sâu chết hoàn toàn (giờ)
L1.3	Đối chứng	172±7,94 ^a
	10^6	137±5,13 ^{bc}
	10^7	123±21,00 ^{bc}
	10^8	113±20,80 ^c
L2.1	Đối chứng	179±6,11 ^a
	10^6	149±3,61 ^{ab}
	10^7	136±8,50 ^{bc}
	10^8	117±9,45 ^{bc}

Ghi chú: Các ký tự giống nhau là khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 99%.

Bảng 4. Hiệu lực diệt sâu của nấm sợi trên 5 ngày

Chủng nấm sợi	Mật độ bào tử/mL	Hiệu lực diệt sâu/5 ngày (%)
L1.3	Đối chứng	0 ^c
	10^6	50±5,56 ^b
	10^7	70,4±25,70 ^{ab}
	10^8	92,5±12,83 ^a
L2.1	Đối chứng	0 ^c
	10^6	47,5±12,99 ^b
	10^7	60±17,30 ^{ab}
	10^8	96,6±5,77 ^a

Bảng 5. Tỷ lệ sâu tơ mọc lại nấm

Chủng nấm sợi	Mật độ bào tử/mL	Tỷ lệ sâu tơ mọc lại nấm (%)
L1.3	Đối chứng	0 ^b
	10^6	73,3±5,77 ^a
	10^7	66,6±15,28 ^a
	10^8	76,6±15,28 ^a
L2.1	Đối chứng	0 ^b
	10^6	60±17,30 ^a
	10^7	76,6±5,77 ^a
	10^8	80±17,30 ^a

Kết quả nghiên cứu cho thấy, hiệu lực diệt sâu của nấm ở các nghiệm thức có sự khác nhau (Bảng 4) và tỷ lệ sâu tơ mọc lại nấm khá cao (Bảng 5). Trong đó, đối với nghiệm thức có chủng nấm L2.1 với mật độ 10^7 bào tử/mL và 10^8 bào tử/mL cho kết

quả hiệu lực diệt sâu hiệu quả nhất lần lượt là 60% và 96,6% và kết quả tương tự cho chủng nấm L1.3. Kết quả nghiên cứu này đạt hiệu quả cao hơn so với với nghiên cứu của Nguyen Thi Loc và Vo Thi Bích Chi (2007) [7] ở giai đoạn 5 ngày thì tỷ lệ sâu tơ chết do nhiễm nấm sợi cao nhất là 76,9% [7] và so với kết quả thí nghiệm của Valda CA và cs (2003) tỷ lệ sâu chết dao động từ 28,0% ở nghiệm thức 10^8 bào tử/mL đến 96,0% ở nghiệm thức 10^8 bào tử/mL [12].

4. KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu thu được 6 mẫu sâu tơ bị nhiễm nấm sợi và phân lập được 5 chủng nấm sợi tại huyện Châu Thành, tỉnh Kiên Giang. Tuyển chọn được 2 chủng nấm sợi là L1.3, L2.1 có khả năng phân giải chitin thể hiện qua vòng phân giải lần lượt là 32 mm và 32,3 mm và có khả năng tiêu diệt sâu tơ hiệu quả. Trong đó, chủng L2.1 cho hiệu lực diệt sâu cao nhất đạt 96,6%. Kết hợp phương pháp định danh hình thái và phương pháp sinh học phân tử là giải trình tự gen, 2 chủng nấm L1.3 và L2.1 được xác định thuộc loài lần lượt là *Aspergillus sydowii* và *Aspergillus protuberus*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Abbott. U. S., 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide". Journal of Economic Entomology, 18: 265 - 267.
- Brameld A. Ken, William D. Shrader, Imperiali Barbara and Goddard III A, 1998. Substrate assistance in the Mechanism of family 18 chitinase: Theoretical studies of potential intermediates and inhibitors. J. Mol. Biol, 280: 923 - 933.
- Đỗ Thị Thanh Dung, Lê Thanh Bình, Đỗ Thị Hồng Thịnh, Võ Đình Quang, 2018. Phân lập và tuyển chọn một số chủng vi nấm có khả năng ký sinh tiêu diệt ấu trùng ve sầu gây hại cà phê. *Tạp chí Khoa học* - Trường Đại học Sư phạm thành phố Hồ Chí Minh, 15 (6): 139 - 148.
- Khuu Phương Yến Anh, 2007. *Nghiên cứu khả năng sinh enzyme cellulase của một số chủng nấm sợi phân lập từ rừng ngập mặn cần giờ*. Luận văn thạc sĩ Sinh học. Trường Đại học Sư phạm thành phố Hồ Chí Minh.
- Lê Thị Huệ, 2010. *Khảo sát khả năng sinh tổng hợp enzyme chitinase của một số chủng nấm sợi thuộc giống Aspergillus, Tricoderma và ứng dụng*. Luận văn thạc sĩ Sinh học. Trường Đại học Sư phạm thành phố Hồ Chí Minh.

6. Nguyễn Lâm Dũng, Nguyễn Đình Quyền, Phạm Văn Ty, 2000. *Vĩ sinh vật học*. Nhà xuất bản Giáo dục Việt Nam.
7. Nguyen Thi Loc and Vo Thi Bich Chi, 2007. Biocontrol potential of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* against diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Omonrice*, 15: 86 - 93.
8. Nguyễn Thị Nhã Vy, 2009. *Nghiên cứu khả năng sinh hoạt chất đối kháng vi sinh vật gây bệnh cho cây trồng của các chủng nấm sợi phân lập tại rừng Đà Lạt*. Luận văn thạc sĩ Sinh học. Trường Đại học Sư phạm thành phố Hồ Chí Minh.
9. Phạm Minh Tuấn, Nguyễn Thị Bích Tuyền, Tô Đình Phúc, Lê Thị Ánh Đông, 2016. Khảo sát khả năng đối kháng sinh học của nấm *Trichoderma* sp. đối với nấm gây bệnh vàng lá thối rễ trên cây có mùi. *Tạp chí Khoa học Công nghệ và Thực phẩm*, Chuyên san Công nghệ sinh học và Kỹ thuật môi trường 2017: 42 - 52.
10. Phạm Thị Lịch, 2013. *Nghiên cứu tạo chế phẩm enzyme chitinase thô từ chủng Trichoderma sp. phòng trừ vi nấm gây hại trên cây cà chua*. Luận văn thạc sĩ Sinh học. Trường Đại học Sư phạm thành phố Hồ Chí Minh.
11. Samson, R. A., Hoekstra, E. S., Frisvad, J. C., 2004. *Introduction to food - and airborne fungi: Centraalbureau voor Schimmelfcultures (CBS)*.
12. Valda CA, RB Silva, JM Edmilson and BT Jorge., 2003. Susceptibility of *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) to fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill and *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. *Neotropical Entomology*, 32 (4): 653 - 658.
13. Võ Thị Bích Viên, 2009. *Khảo sát đặc điểm sinh học một số chủng nấm sợi thuộc chi Aspergillus và Penicillium từ rừng ngập mặn Cần Giờ thành phố Hồ Chí Minh*. Luận văn thạc sĩ Sinh học. Trường Đại học Sư phạm thành phố Hồ Chí Minh.

ISOLATION AND SELECTION OF SOME FILAMENTOUS FUNGI HAVING THE ABILITY TO ANTAGONIZE THE SILKWORM (*Plutella xylostella*) VEGETABLE DAMAGE IN CHAU THANH DISTRICT, KIEN GIANG PROVINCE

**Nguyen Van Le, Ha Ngoc Bang,
Nguyen Minh Khoa, Bui Xuan Khanh**

Summary

Filamentous fungi have the ability to synthesize chitinase enzyme to destroy silkworm (*Plutella xylostella*) by destroying chitin and also can use filamentous fungi as a safe biological agent alternative to chemical pesticides. The study aimed to identify and investigate the pathogenicity of filamentous fungal strains capable of antagonizing silkworm isolated in Chau Thanh district, Kien Giang province. Experiments to investigate the ability of chitinase enzyme synthesis and resistance to silkworm of isolated filamentous fungi were arranged in laboratory conditions in a completely randomized design with 3 replicates. Identification of filamentous fungi based on morphological characteristics and molecular biology method is gene sequencing. Among the silkworm samples collected in the field, 6 samples of silkworm infected with filamentous fungi were selected and 5 strains of filamentous fungi with different morphological characteristics were isolated. The results of the study determined the chitinolytic ability of 5 isolated filamentous fungi with symbols with chitin resolution rings ranging from 3 - 5. In which, two filamentous fungal strains L1.3 and L2.1 had the highest potency with chitinolytic rings of 32.0 mm and 32.3 mm, respectively and significantly different from the other strains. At the same time, the fungal strain L1.3 was identified as *Aspergillus sydowii* and L2.1 was identified as *Aspergillus protuberus*. Evaluating the effectiveness of two filamentous fungi strains after 5 days with the highest efficiency was *Aspergillus protuberus* L2.1 = 96.6%.

Keywords: *Antagonists, cabbage, chitinase enzymes, filamentous fungi, silkworms.*

Người phản biện: GS.TS. Nguyễn Văn Tuất

Ngày nhận bài: 02/12/2021

Ngày thông qua phản biện: 5/01/2022

Ngày duyệt đăng: 12/01/2022