

NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM SINH HỌC CỦA CHỦNG NẤM *BEAVERIA* PHÂN LẬP TỪ BẠCH CƯƠNG TÂM THU NHẬN TẠI XÃ TAM GIANG, HUYỆN YÊN PHONG, TỈNH BẮC NINH

STUDY ON CHARACTERISTICS OF *BEAVERIA* STRAINS ISOLATED FROM THE BACH CUONG TAM (*BOMBYX MORI*) IN TAM GIANG COMMUNE, YEN PHONG DISTRICT, BAC NINH PROVINCE

*Nguyễn Văn Hiếu**, *Đào Thị Hồng Vân†*
Đào Nguyên Mạnh‡, *Vũ Hoàng Giang‡*

Ngày tòa soạn nhận được bài báo: 04/03/2022
Ngày nhận kết quả phản biện đánh giá: 05/09/2022
Ngày bài báo được duyệt đăng: 29/09/2022

Abstract: *Bach Cuong Tam (Bombyx botryticatus)* is a traditional medicine dispensed from the silkworm (*Bombyx mori* L) after infection fungus *Beauveria bassiana*. From 05 samples of Bach Cuong Tam collected at Vong Nguyet Village, Tam Giang Commune, Yen Phong District, Bac Ninh Province, 11 strains of fungi have been isolated, of which 02 strains belong to the genus *Beauveria*. A Study on biological characteristics resulted in two strains with good growth ability at 20-30°C and pH from 5 to 7, assimilation of carbon sources including D-fructose, saccharose, lactose, mannitol, maltose, and D-glucose, and capable of producing several extracellular enzymes such as amylase, chitinase, and protease, the classification based on the 5.8S gene sequence resulted in two strains having 100% similarity with *Beauveria bassiana* and *Beauveria amorpha* strains. Two fungus strains were cultured on five-week-old mulberry silkworm (*Bombyx mori* L) and showed good growth after 7 days.

Keywords: *Bach cuong tâm, Beauveria bassiana, Bombyx botryticatus, Bombyx mori* L, characteristics

Tóm tắt: *Bạch cương tâm (Bombyx botryticatus)* là vị thuốc trong y học cổ truyền, được bào chế từ tằm dâu (*Bombyx mori* L) sau khi nhiễm nấm *Beauveria bassiana*. Từ 05 mẫu nấm Bạch Cương Tâm thu nhận tại thôn Vọng Nguyệt, xã Tam Giang, huyện Yên Phong, tỉnh Bắc Ninh, đã phân lập được 11 chủng nấm, trong đó có 02 chủng thuộc chi *Beauveria*. Nghiên cứu về đặc điểm sinh học cho thấy hai chủng có khả năng sinh trưởng tốt ở 20-30°C và pH từ 5-7, đồng hóa các nguồn cacbon bao gồm D-fructose, saccharose, lactose, mannitol,

* Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm khoa học và Công nghệ Việt Nam

† Viện Công nghệ sinh học và Công nghệ thực phẩm – Trường Đại học Mở Hà Nội

‡ Viện Y sinh Nhiệt Đới, Trung tâm Nhiệt đới Việt Nga

maltose và D-glucose, và có khả năng sinh một số enzym ngoại bào như amylase, chitinase và protease, phân loại dựa trên trình tự gen 5,8S rRNA cho kết quả hai chủng có độ tương đồng 100% với các chủng *Beauveria bassiana* và *Beauveria amorpha*. Khi nuôi hai chủng nấm trên tằm dâu (*Bombyx mori* L) 5 tuần tuổi và cho kết quả sinh trưởng tốt sau 7 ngày.

Keywords: Bạch cương tâm, *Beauveria bassiana*, *Bombyx botryticatus*, *Bombyx mori* L, đặc điểm sinh học

I. Đặt vấn đề

Bạch cương tâm (*Bombyx botryticatus*) là vị thuốc trong y học cổ truyền, được bào chế từ tằm *Bombyx mori* L. sau khi chết do nhiễm nấm *Beauveria bassiana*, có đặc điểm sắc trắng như vôi, cứng và giòn; khi bẻ đôi, vết bẻ có màu xanh nâu, mùi nặng, vị mặn, hơi đắng. Theo một số nghiên cứu, trong Bạch cương tâm có chứa một số nhóm chất protein và peptit, axit béo, flavonoid, nucleoside, steroid, coumarin, polysaccharide, chitinase, fibrinolysine, pyrausta nubialis, galleria mellonella, beauverician. Trong Đông y, Bạch cương tâm không độc, có tác dụng khử phong, hóa đờm; dùng chữa kinh giãn, cổ họng sưng đau, trúng phong mắt tiếng, răng đau... [4,10].

Beauveria bassiana là loài nấm thuộc họ *Moniliales*, lớp *Deuteromyces*, ký sinh trên cơ thể côn trùng, được dùng rộng rãi trong nông nghiệp để phòng trừ sâu hại. Nấm *Beauveria bassiana* thâm nhập vào cơ thể côn trùng, sau đó lây lan toàn bộ cơ thể côn trùng bởi các khuẩn ty, nhờ giá thể chúng bám vào cơ thể côn trùng, nhanh chóng xâm nhập qua biểu bì vào khoang cơ thể côn trùng, tạo ra các tiểu thể trong huyết tương. Các tiểu thể tiêu diệt các tế bào bạch huyết và gây chết cho côn trùng [8, 9]. Nấm *Beauveria bassiana* ký sinh và gây bệnh cho nhiều loài côn trùng, nhiều nghiên cứu ứng dụng vào sản xuất thuốc trừ sâu

sinh học [8]. Nấm *Beauveria bassiana* khi lây nhiễm và gây chết tằm dâu tạo ra Bạch cương tâm, đây là loại dược liệu rất quý dùng trong y học. Nghiên cứu tuyển chọn các chủng nấm *Beauveria* từ Bạch cương tâm là cơ sở cho ứng dụng trong lĩnh vực y dược học, chủ động nguồn dược liệu phục vụ sản xuất thuốc và thực phẩm bảo vệ sức khỏe. Trong bài báo này trình bày một số kết quả nghiên cứu về phân lập, nghiên cứu một số đặc điểm sinh học của chủng nấm được phân lập từ Bạch cương tâm thu nhận tại Làng Vọng Nguyệt, Xã Tam Giang, Huyện Yên Phong, Tỉnh Bắc Ninh.

II. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên liệu: Bạch cương tâm (*Bombyx botryticatus*) và tằm dâu (*Bombyx mori* L) năm tuần tuổi được thu nhận tại Làng Vọng Nguyệt, Xã Tam Giang, Huyện Yên Phong, Tỉnh Bắc Ninh.

2.2. Môi trường: *Hansen* (g/L): Glucose 50g; pepton 10g; KH₂PO₄ 3g; MgSO₄·7H₂O 3g; agar 20g; H₂O 1000mL; pH= 6,0. *Czapek* (g/L): Saccharose 30g; NaNO₂ 2g; K₂HPO₄·3H₂O 1g; KCl 0,5g; MgSO₄·7H₂O 0,5g; FeSO₄·7H₂O 0,01g; agar 20g; H₂O 1000mL; pH =6,5. *PDA* (g/L): Nước chiết khoai tây 200g; glucose 20g; agar 18g; H₂O 1000mL.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Phương pháp phân lập mẫu nấm có trong Bạch cương tằm: Sử dụng các đầu que cấy đã được đảm bảo vô trùng làm ướt sau đó lấy nhẹ lớp phân trên các mẫu, sau đó cấy ria lên đĩa môi trường PDA có chứa hỗn hợp kháng sinh (100 mg/L ampicilin; 100 mg/L tetracyclin), ủ đĩa nấm ở nhiệt độ 25-28°C trong 3-5 ngày. Khi nấm mọc lên các khuẩn lạc, dùng mũi dao nhỏ cắt và cấy chuyển sang đĩa PDA mới. Chúng nấm sợi được tách sạch được sử dụng nghiên cứu đặc điểm hình thái [1,2].

2.3.2. Nghiên cứu đặc điểm hình thái: Các chủng nấm sau quá trình làm sạch được cấy trên môi trường PDA, Hansen và Czapek để xác định: hình thái khuẩn lạc, khả năng phát triển và hình thái bào tử [1, 2]. Kiểm tra khả năng sinh enzym protease, chitinase, amylase của các chủng nấm trên môi trường Czapek có bổ sung thêm cơ chất casein, chitin và tinh bột nồng độ 1%, sau 72-84 giờ nuôi, kiểm tra khả năng sinh enzym trên cơ sở thủy phân cơ chất tạo ra các vòng chuyển hóa được biểu hiện bằng dung dịch thuốc thử: dung dịch Lugol (KI 3% (w/v) và I₂ 0,5% (w/v) đối với cơ chất tinh bột và chitin; cơ chất casein bằng dung dịch axit tricloaxetic 15% (w/v). Xác định khả năng sử dụng các nguồn cacbon trên cơ sở thay thế nguồn glucose có trong môi Czapek bằng D-fructose, D-maltose, D-manitol, D- Glucose, Lactose. Tiếp đó, nuôi nấm ở điều kiện nhiệt độ 25-28°C trong 3-5 ngày, quan sát và đánh giá sự sinh trưởng phát triển [2].

2.3.3. Nghiên cứu phân loại các chủng nấm dựa trên trình tự gen ITS1 –

5,8S – ITS2 [7, 14]: Trình tự vùng ITS1 – 5,8S – ITS2 rRNA được khuếch đại thông qua phản ứng PCR với sự có mặt của DNA tổng số được thu nhận bằng kit Fungi/Yeast DNA Extraction (Norgen, Canada), quá trình nhân sử dụng cặp mồi ITS1F (5'- CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A - 3'); ITS4 (5' - TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC - 3') [3, 4, 7, 10]. Chu kỳ phản ứng: Bước 1: 94°C - 4 phút; Bước 2: 94°C - 2 phút; Bước 3: 55°C- 45 giây; Bước 4: 72°C - 60 giây; Bước 5: Lặp lại 30 lần từ bước 2; Bước 6: 72°C – 10 phút; Bước 7: 4°C; Bước 8: Kết thúc. Sản phẩm PCR được kiểm tra, tinh sạch, giải trình tự trên máy đọc trình tự động ABI PRISM®3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) tại công ty 1st BASE (Singapore). Các trình tự được xử lý bằng phần mềm BioEdit (ver. 6. 0. 7, Mỹ) và so sánh với các trình tự tương ứng của các chủng đã được đăng ký trên GenBank bằng công cụ BLAST trên NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) và lập cây tương đồng di truyền bằng phần mềm CLC DNA Worbench 8. 0.

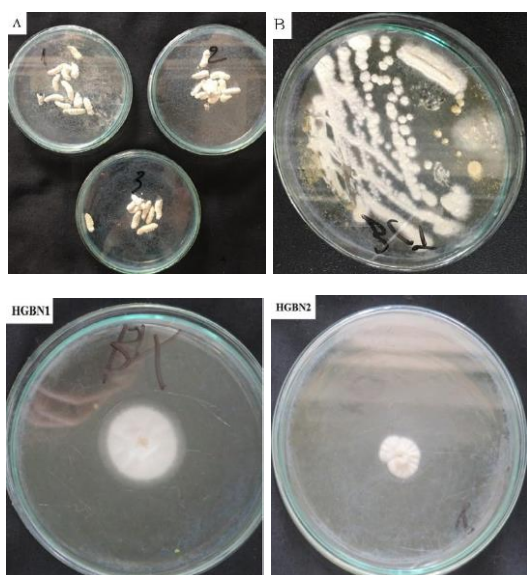
2.3.4. Đánh giá khả năng phát triển của chủng nấm trên tằm dâu (*Bombyx mori* L). Các chủng nấm sẽ được kiểm tra khả năng phát triển trên tằm dâu ở thời điểm năm tuần tuổi có chiều dài 4-5 cm có màu vàng. Tằm dâu được thu nhận về rửa sạch loại bỏ cứt và tơ, sau đó đun sôi trong thời gian 3 phút, chuyển vào các bình tam giác với lượng 10 w/v đem khử trùng 110°C, sau đó làm nguội xuống nhiệt độ phòng và cấy bào tử có mật độ 10⁶ bào tử/ml với lượng 0,1v/w. Bào tử nấm được thu nhận khi nuôi trên môi trường PDA sau 14 ngày trong dung dịch Tween 80 nồng độ 0,5%. Các bình tam giác sau khi cấy

bào tử được nuôi ở nhiệt độ phòng đánh giá khả năng phát triển của nấm trên tằm thông qua quan sát sự biến đổi hình thái bên ngoài.

III. Kết quả và thảo luận

3.1. Phân lập một số chủng nấm từ các mẫu Bạch cương tằm

Từ 05 mẫu sau quá trình phân lập và thuần khiết trên môi trường thạch PDA, kết quả đã phân lập được 11 chủng với màu sắc khuẩn lạc trắng, vàng, hồng, đen và xanh.



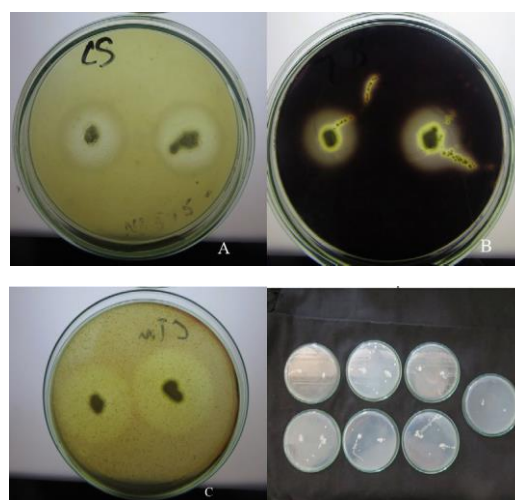
Hình 1. Mẫu Bạch cương tằm (A), Các khuẩn lạc nấm có trong các mẫu Bạch cương tằm sau 5 ngày nuôi trên môi trường PDA ở nhiệt độ 25-28oC (B) và Các chủng nấm sau quá trình thuần khiết (HGBN1 và HGBN2).

Khi so sánh đặc điểm mô tả có trong khóa phân loại nấm của Đặng Vũ Hồng Miên 2015 [1], chi nấm *Beauveria* có đặc điểm sợi nấm dài phát triển dày trên môi trường thạch và tạo nên các cuống sinh bào tử có bề mặt khuẩn lạc có dạng phấn trắng, xốp nhẹ, bột lúc đầu có màu trắng, sau có thể chuyển vàng nhạt hoặc hồng nhạt, lồi

tạo thành vòng tròn đồng tâm. Đã xác định trong số 11 chủng nấm phân lập được, có 2 chủng HGBN1 và HGBN2 hoàn toàn tương đồng với các đặc điểm trên, điều này hoàn toàn phù hợp với nhiều nghiên cứu cho biết nấm *Beauveria* là một trong tác nhân gây bệnh trên tằm dâu [13].

3.2. Nghiên cứu một số đặc điểm sinh học của 02 chủng nấm phân lập

Đã nghiên cứu một số đặc điểm sinh học và phân loại của hai chủng nấm, kết quả thể hiện ở hình 2 và bảng 1.



Hình 2. Đặc điểm sinh học của hai chủng nấm. Vòng thủy phân cơ chất casein (A), tinh bột (B), chitin (C) và khả năng phát triển trên các nguồn cacbon (D).

Bảng 2. Một số đặc điểm sinh học của 02 chủng nấm

Đặc tính	HGBN1	HGBN2
Màu sắc bề mặt khuẩn lạc	Màu trắng, sau chuyển sang màu vàng nhạt.	Màu trắng, sau chuyển sang màu hồng nhạt
Phân hủy chitin	+	+
Phân hủy tinh bột	+	+
Phân hủy casein	+	+
D- Glucose	+	+

Đặc tính	HGBN1	HGBN2
D-Maltose	+	+
D-Fructose	+	+
D-Mannitol	+	+
Lactose	+	+
Saccharose	+	+
Đối chứng âm	-	-

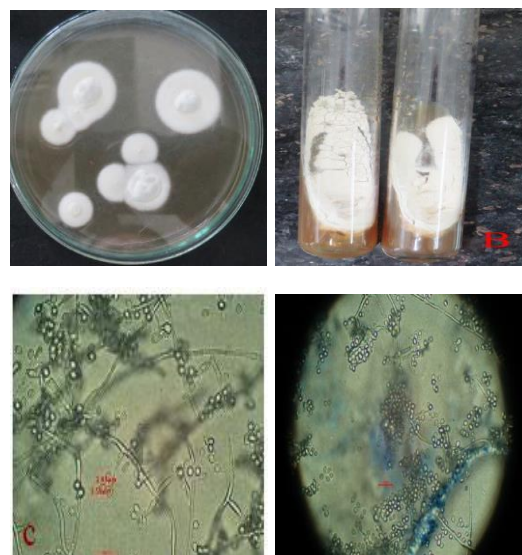
Kết quả thể hiện trên hình 2 và bảng 1 cho thấy hai chủng nấm đều có khả năng sinh trưởng tốt trên các nguồn cacbon như: D- fructose, saccharose, lactose, D- manitol, D-maltose và D-glucose và không phát triển trên môi không chứa nguồn cacbon. Cả 2 chủng nấm đều có khả năng sinh một số enzyme ngoại bào như amylase, chitinase và protease, kết quả này hoàn toàn phù hợp với nhiều nghiên cứu cho biết nấm *Beauveria* có khả năng sinh trưởng tốt ở nhiệt độ 20-30°C, đồng thời các chủng này có khả năng sinh nhiều loại enzym [6,12,13].

3.3. Phân loại 2 chủng nấm

Để có thể ứng dụng trong sản xuất các loại nguyên liệu sử dụng bảo vệ sức khỏe, việc xác định rõ các chủng nấm thuộc loài là yếu tố quyết định đến quá trình sản xuất về sau, đặc điểm phân loại của hai chủng nấm đã được thể hiện ở hình 3 và 4.

Đặc điểm phát triển của chủng nấm HGBN1 có khuẩn lạc phát triển chậm khoảng 1,5-3cm/7 ngày trên môi trường PDA, Hansen và *Czapek* ở nhiệt độ phòng 24-26°C, mặt dạng bông, xốp nhẹ, thường tạo thành dạng bột do sự hình thành của bào tử, lúc đầu màu trắng, sau chuyển sang màu hồng nhạt (Hình 3A, 3B). Giá bào tử trần tạo thành đám hoặc đơn độc, với phần gốc hơi phình to sau thon nhỏ dần tạo hình

zíc zắc dài tới 25 µm x 1 µm rộng. Bào tử trần hình trụ, hình trứng đến hình gần cầu, không ngăn vách, nhẵn, không màu, kích thước 3-7 x 2,5-3,5 µm (Hình 3C).



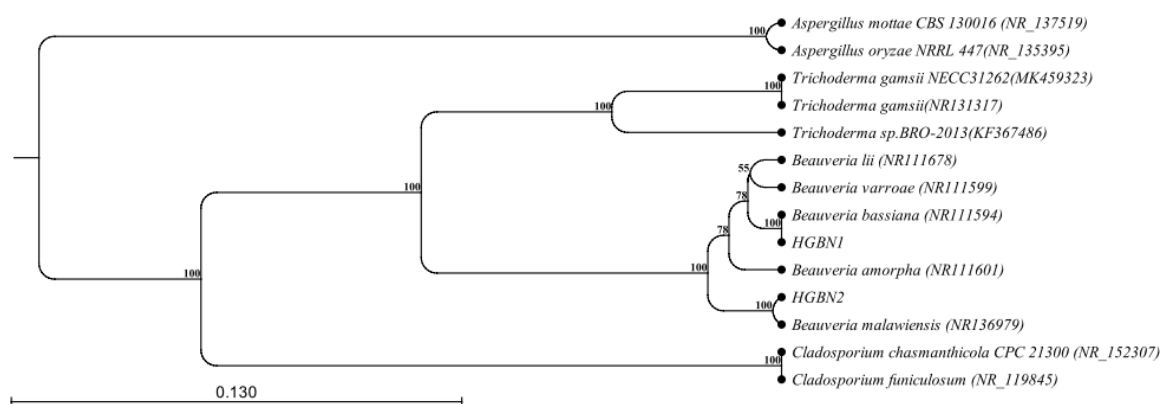
Hình 3. Hình thái khuẩn lạc của hai chủng nấm trên môi trường Hansen sau 7 ngày nuôi ở nhiệt độ 28°C (A và B) và đặc điểm cấu tạo chuỗi bào tử.

Đặc điểm phát triển của chủng nấm HGBN2 có khuẩn lạc phát triển chậm khoảng 1-3cm/7 ngày trên môi trường PDA, Hansen và *Czapek* ở nhiệt độ 24-26°C, mặt dạng bông, xốp nhẹ, thường tạo thành dạng bột do sự hình thành của bào tử có màu trắng (Hình 3A, 3B). Giá bào tử trần tạo thành đám, với phần gốc phình to tạo hình zíc zắc. Bào tử trần hình trụ, hình trứng đến hình gần cầu, không ngăn vách, nhẵn, không màu, kích thước 3-7 x 2,5-3,5 µm (Hình 3D). Đặc điểm sinh trưởng trên môi trường, cấu trúc chuỗi bào tử của hai chủng HGBN1 và HGBN2 phù hợp với rất nhiều nghiên cứu về đặc điểm của chi *Beauveria* [1,5,11].

Phân loại nấm bằng cách so sánh trình tự gen ITS1 – 5,8S – ITS2 với các đoạn gen tương ứng trên cơ sở dữ liệu

GenBank, giúp cho quá trình phân loại các chủng nấm một cách hiệu quả và nhanh. Kết quả sau phản ứng PCR cho kích thước gen ~600 bp. Kết quả giải trình tự gen so sánh với các trình tự tương ứng trên cơ sở dữ liệu Genbank, lập cây tương đồng di truyền với các chủng có mối quan hệ gần gũi (Hình 4). Gen ITS1-5,8S-ITS2 từ chủng nấm

HGBN1 và HGBN2 có tương đồng cao $\geq 99\%$ với các gen từ chủng nấm thuộc chi *Beauveria* đặc biệt là chủng *Beauveria bassiana* (NR111594) có độ tương đồng 100% với gen ITS1-5,8S-ITS2 của chủng HGBN1, và gen ITS1-5,8S-ITS2 của chủng HGBN2 tương đồng 100% với *Beauveria amorpha* (NR111601).



Hình 4. Cây tương đồng di truyền của các chủng nấm HGBN1 và HGBN2 với các chủng có mối quan hệ gần gũi.

Các loài *Beauveria bassiana* là một trong số các tác nhân kiểm soát sinh học và được biết đến nhiều vì khả năng gây bệnh của nó đối với côn trùng thuộc bộ *Lepidoptera* và Bộ cánh màng *Homoptera* và *Orthoptera*. Trong những năm gần đây, việc sử dụng nấm gây bệnh côn trùng đã đạt được nhiều tiến bộ và đầy mạnh ứng dụng trong kiểm soát sinh học do hiện tượng kháng thuốc trừ sâu ngày càng phổ biến. Như vậy việc thu nhận được HGBN1 và HGBN2 phù hợp với rất nhiều nghiên cứu về đặc điểm phân bố, đặc tính sinh học của các chủng nấm *Beauveria* trên tằm dâu.

3.4. Khả năng phát triển của chủng nấm trên tằm dâu *Bombyx mori*

Sử dụng các loài nấm *Beauveria* gây bệnh trên con tằm như một sản phẩm có hiệu quả cao trong việc nâng cao chất lượng chăm sóc và bảo vệ sức khỏe cần được dựa trên các nghiên cứu khoa học. Do đó hai chủng nấm trên được đánh giá rất có tiềm năng trong việc ứng dụng, cần có các bước nghiên cứu tiếp theo. Đã đánh giá khả năng phát triển của hai chủng nấm HGBN1 và HGBN2 trên tằm dâu, kết quả được thể hiện ở hình 5.



Hình 5. Khả năng phát triển hai chủng nấm trên tằm dâu *Bombyx mori* theo thời gian.

Trong 1-2 ngày đầu cấy bào tử nấm *Beauveria bassiana*, trên cơ thể tằm không có triệu chứng rõ ràng nào được nhận thấy. Đến ngày thứ ba thấy xuất hiện các biểu hiện có thể nhìn thấy bằng mắt thường với các đốm màu trắng nhỏ ở trên cơ thể tằm. Ban đầu các đốm trắng có kích thước nhỏ và ít, tuy nhiên sau đó vào ngày thứ 3-7 số lượng của các đốm ngày càng nhiều và lan rộng hơn (Hình 5). Cơ thể tằm trở nên mềm, dẻo vào ngày thứ 7 hoặc thứ 8 của thời kỳ nhiễm bệnh, toàn bộ cơ thể tằm được phủ kín các sợi nấm màu trắng và đến ngày thứ 12 trở đi các bào tử cuối cùng được hình thành phát triển trên toàn bộ cơ thể tạo thành dạng bột, những nghiên cứu cho thấy khá tương đồng với nghiên cứu về sự thay đổi trạng thái bên ngoài của tằm dâu khi bị nhiễm nấm *Beauveria bassiana* theo thời gian [3,9,13]. Kết quả bước đầu

cho thấy chủng nấm được tuyển chọn có khả năng sinh trưởng và phát triển trên tằm dâu với nhiều đặc điểm tương đồng quá trình phát triển của tằm khi bị nhiễm bệnh trong điều kiện tự nhiên. Trong thời gian tiếp theo, sẽ tiếp tục đánh giá chất lượng Bạch cương tằm ở điều kiện lên men trong phòng thí nghiệm với Bạch cương tằm thu nhận trong tự nhiên về đặc tính dược học trước khi mở rộng qui mô sản xuất.

IV. Kết luận

Từ 5 mẫu Bạch cương tằm thu thập Làng Vọng Nguyệt, Xã Tam Giang, Huyện Yên Phong, Tỉnh Bắc Ninh đã phân lập được 11 chủng nấm. Dựa trên đặc điểm hình thái khuẩn lạc đã xác định được hai chủng thuộc chi *Beauveria* đó là các chủng có kí hiệu HGBN1 và HGBN2.

Đã nghiên cứu một số đặc điểm sinh học của hai chủng HGBN1 và HGBN2 có khả năng sinh trưởng tốt trên các nguồn cacbon như: D- fructose, saccharose, lactose, D-manitol, D-maltose và D-glucose, nhiệt độ 20-30°C và pH từ 5 – 7, có khả năng sinh một số enzyme ngoại bào như: amylase, chitinase và protease. Phân loại 2 chủng nấm dựa trên trình tự gen ITS1 – 5,8S – ITS2 rRNA và chuỗi bào tử có kết quả tương đồng cao (100%) đối với các chủng nấm *Beauveria bassiana* và *Beauveria amorpha*.

Kết quả khi nuôi hai chủng nấm HGBN1 và HGBN2 trên tằm dâu (*Bombyx mori* L) năm tuần tuổi cho thấy khả năng phát triển tốt, bao phủ kín cơ thể tằm sau 7 ngày.

Lời cảm ơn: Công trình được sự hỗ trợ kinh phí từ đề tài “Hoàn thiện quy trình lên men tạo sinh khối Bạch cương

tâm” Theo QĐ số 738/QĐ-TTNDVN giao Viện Y sinh nhiệt đới, Trung tâm Nhiệt Đới Việt Nga và Thiết bị của Phòng Vi sinh vật Đất, Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn lâm khoa học và công nghệ Việt Nam.

Tài liệu tham khảo:

[1]. Đặng Vũ Hồng Miên, “Hệ nấm mốc Việt Nam - Phân loại, tác hại, độc tố, cách phòng chống”, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, 313-448 (2015).

[2]. Egorov N. X (Nguyễn Lâm Dũng dịch), “Thực tập vi sinh vật học”, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội (1976).

[3]. Chandrase K, Nataraju B. Studies on white muscardine disease of mulberry silkworm, *Bombyx mori* L. in India. *Indian Journal of Sericulture*, 47(2), 136–154 (2008).

[4]. Chinese Pharmacopoeia Commission. *Pharmacopoeia of the People’s Republic of China Part I*, People’s Medical Publishing House, Beijing, 375 (2015).

[5]. Deb L., Rajesh T. W., Monika H. J.. Growth of *Beauveria bassiana* in Different Solid Media. *Trends in Biosciences* 10 (23), 4815-4817 (2017).

[6]. Fargues J., Goettel M. S., Smits N., Ouedraogo A., Rougier M., Effect of temperature on vegetative growth of *Beauveria bassiana* isolates from different origins. *Mycologia*, 89 (3), 383-392 (1997).

[7]. Gardes M. , Bruns T. , “ITS primer with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts”, *Molecular Ecology*, 2, 113-118 (1993).

[8]. Janakiraman A.T., Diseases affecting the Indian silkworm races, *Journal Silk worm.*, 13, 91–101 (1961).

[9]. K. D. Seema, M. G. Priti, S. P. Shubhangi, Vitthalrao B. K, The influence of infection of *Beauveria assiana* (Bals) Vuill, a fungal species (Family: Iavicipitaceae) on quality of the cocoons of spinned by the larval instars of *Bombyx mori* (L) (Race: PMx CSR2), *Journal of Bacteriology & Mycology: Open Access*, 7(1), 14-18 (2019).

[10]. Meibian H., Zhijie Y., Wang J. L., Fan W. X., Liu Y., Li J., Xiao H., Li Y. C., Peng W., Wu C., *Traditional Uses, Origins, Chemistry and Pharmacology of Bombyx batryticatus*, A Review. *Molecules*, 22(10), 1779 (2017).

[11]. Mohammed E. D., Effect of growing media and water volume on conidial production of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Biological Sciences*, 6(2), 269-274 (2006).

[12]. Pérez L. S., S. R. Navarro, V. H. M. Cruz, M. Á. R. López, A. P. Ramos, J. E. B. Florido, Assessment of *Beauveria bassiana* and Their Enzymatic Extracts against *Metamasius spinolae* and *Cyclocephala lunulata* in Laboratory, *Advances in Enzyme Research*, 4, 98-112 (2016).

[13]. Vanitha S, Parthasarathy S. Isolation and characterization of white muscardine fungi, *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill.-Acausative of mulberry silkworm. *JEZS*, 5(3), 512–515 (2017).

[14]. White T. J. , Bruns T. , Lee S. , Taylor J. , “Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics”. In PCR protocols: a guide to methods and applications”, *Academic Press, San Diego, USA*, 315-322 (1990).

**Địa chỉ tác giả: Viện Y sinh nhiệt đới, Trung tâm Nhiệt đới Việt - Nga
Email: hieuan2008.3.20@gmail.com**

