

SỐ ĐO VÀ ĐẶC ĐIỂM DI TRUYỀN CỦA MỘT SỐ CHỦNG TUYẾN TRÙNG KÝ SINH GÂY BỆNH CÔN TRÙNG NHÓM “*FELTIAE-KRAUSSEI-OREGONENSE*” CỦA VIỆT NAM

PHAN KẾ LONG, NGUYỄN NGỌC CHÂU

Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật

MAURICE MOENS

Viện Nghiên cứu Nông nghiệp và Thủy sản, Vương quốc Bỉ

Tuyến trùng ký sinh gây bệnh côn trùng (Entomopathogenic nematodes - EPN) thuộc hai giống *Steinernema* và *Heterorhabditis* hiện được sử dụng như một tác nhân phòng trừ sinh học sâu hại rất có hiệu quả trên thế giới. Cơ chế gây bệnh của EPN là nhờ vào vi khuẩn cộng sinh (VKCS) (*Xenorhabdus* ở *Steinernema* và *Photorhabdus* ở *Heterorhabditis*) mà ấu trùng của chúng mang theo trong ruột. Khi thâm nhập vào vật chủ qua miệng, hậu môn, tuyến tơ hoặc nơi có lớp cutin mỏng, ấu trùng giải phóng VKCS vào xoang máu của vật chủ. Ở đây, các vi khuẩn này nhân lên nhanh chóng và tạo ra độc tố giết chết vật chủ trong vòng 48h [2, 7].

Ngoài lợi ích trong phòng trừ sinh học sâu hại, hiện nay các nhà khoa học trên thế giới đang quan tâm đến ứng dụng các VKCS của EPN trong y dược. Khoảng 30 năm trước, Dutky [1] đã phát hiện ra tính kháng sinh của vi khuẩn *Xenorhabdus nematophilus* cộng sinh với *Steinernema feltiae*. Cho đến nay, người ta đã biết rằng không chỉ VKCS với EPN có tính kháng sinh mà những độc tố do chúng sinh ra trong quá trình trao đổi chất cũng có khả năng diệt khuẩn, diệt nấm, chống loét và diệt sâu [9].

EPN đã được thu thập và mô tả trên 37 quốc gia. Ở Việt Nam, EPN đã được nghiên cứu từ năm 1997 và đã thu thập được hơn 50 chủng ở 13 tỉnh [10] trong đó có 14 chủng có các đặc điểm hình thái giống với các loài thuộc nhóm “*feltiae-kraussei-oregonense*”. Trong đó có 3 chủng *S. robustispiculum* và 5 chủng *S. sangi* [3, 4, 5, 6]. Trong bài báo này, chúng tôi mô tả một số đặc điểm hình thái và thông tin di truyền trên cơ sở giải mã vùng ITS của các chủng còn lại (bảng 1).

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Tuyến trùng

Các mẫu đất được thu thập chủ yếu từ rừng tự nhiên của các Vườn Quốc gia, Khu Bảo tồn. Tuyến trùng được phân lập từ đất bằng phương pháp bẫy môi *Galleria mellonella*. Ấu trùng cảm nhiễm được thu từ xác *G. mellonella* bằng White trap [10] sau đó được làm sạch và bảo quản trong tủ định ôn ở nhiệt độ 5-10°C.

2. Chuẩn bị mẫu vật cho quan sát dưới kính hiển vi quang học

EPN được nuôi *in-vivo* bằng ấu trùng *G. mellonella*. Thế hệ thứ nhất của EPN được thu bằng cách mổ xác *G. mellonella* sau khi chết từ 3-5 ngày. Ấu trùng cảm nhiễm thu từ White trap trong vòng 1 tuần kể từ khi chúng bắt đầu giải phóng ra khỏi xác của *G. mellonella* [3].

Tuyến trùng được cố định bằng dung dịch formalin 4% nóng (50-60°C) và giữ trong dung dịch này tối thiểu 48 giờ, làm trong bằng lacto-phenol sau đó lên tiêu bản cố định [3]. Tất cả số đo của tuyến trùng đều sử dụng kính vẽ trên kính hiển vi Olympus CH 40.

Các chủng *Steinernema* thuộc nhóm “*feltiae-kraussei-oregonense*”

TT	Chủng	Địa điểm thu mẫu
1	BM12	Bạch Mã, Huế
2	HS2	Hương Sơn, Hà Tĩnh
3	TN9	Sa Thầy, Kon Tum
4	TN38	Sa Thầy, Kon Tum
5	TD16	Tam Đảo, Vĩnh Phúc
6	TD6	Tây Thiên Mẫu, Vĩnh Phúc

3. Chuẩn bị mẫu vật cho nghiên cứu sinh học phân tử

DNA tổng số của EPN được tách từ một con cái trưởng thành [3]. Phản ứng PCR như sau: 10µl dung dịch trên cùng với 40 µl hỗn hợp phản ứng PCR gồm 10× dung dịch đệm PCR, 1 µl MgCl₂ (25mM), 1 µl hỗn hợp dNTP (10mM cho từng loại), 0,2 µl (500mM) cho từng loại mỗi, 1,5 đơn vị *Taq* polymerase và 33,3 µl nước cất 2 lần. Cặp mỗi tổng hợp đoạn ITS theo Vrain et al. [8]. Chu trình phản ứng PCR theo các bước: đun nóng 92°C trong 2 phút, 35 chu kỳ của 92°C trong 30 giây, 54°C trong 30 giây và 72°C trong 2 phút và tiếp tục ở 72°C trong 10 phút. Sau khi phản ứng kết thúc, điện di 5 µl sản phẩm PCR trên agarose gel 1% để kiểm tra, phần còn lại bảo quản ở -20 °C.

Tinh sạch DNA và giải mã: Các sản phẩm PCR được tinh sạch bằng QIAquick Gel Extraxtion Kit (GmbH Qiagen, Hilden, Germany). Giải mã các đoạn DNA bằng BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (PE Applied Biosystem, USA) và đọc trình tự trên máy ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (PE Applied Biosystem, USA).

Phân tích kết quả: so sánh kết quả giải mã vùng ITS của các chủng EPN của Việt Nam với các loài EPN cùng nhóm và 1 loài ngoài nhóm bằng phần mềm ClustalX 1.81. Xây dựng cây phát sinh chủng loại và phân tích kết quả bằng phần mềm PAUP 4.0.

II. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Về hình thái, các chủng *Steinernema* này có chung các đặc điểm của các loài *Steinernema* trong nhóm “*feltiae-kraussei-oregonense*” như chiều dài trung bình của ấu trùng cảm nhiễm từ 600-900 µm, đường bên của ấu trùng cảm nhiễm có 8 đường, hai đường gần biên và hai đường ở giữa kém phát triển; sự có mặt của mucron, chiều dài và hình dáng của gai sinh dục ở con đực thể hệ thứ nhất. Các chủng này rất khó phân biệt với nhau bởi chúng khá giống nhau về hình thái và chỉ có một chút sai khác về số đo như chiều dài ấu trùng cảm nhiễm, vị trí lỗ đồ thực quản, chiều dài thực quản; chiều dài con đực thể hệ thứ nhất, chiều dài gai sinh dục và trợ gai sinh dục (bảng 2).

So sánh số đo ấu trùng cảm nhiễm và con đực thể hệ thứ nhất của các chủng *Steinernema* thuộc nhóm “feltiae-kraussei-oregonense” của Việt Nam (đơn vị μm , * chiều dài từ đầu đến lỗ đổ thực quản, ** chiều rộng ở hậu môn)

		Ấu trùng cảm nhiễm					
		<i>S. sangi</i>	<i>S. robustispiculum</i>	<i>Steinernema</i> sp.1	<i>Steinernema</i> sp.2	<i>Steinernema</i> sp.3	<i>Steinernema</i> sp.4
n		20	20	20	20	20	20
Chiều dài		753 (704-784)	712 (642-778)	684 (502-780)	648 (583-691)	696 (599-742)	734 (646-797)
Chiều rộng		35 (30-40)	28 (26-35)	30 (25-32)	29 (25-34)	31 (26-34)	33 (26-40)
EP*		51 (46-54)	56 (50-68)	52 (46-55)	49 (45-57)	51 (48-56)	49 (30-56)
Thực quản		127 (120-138)	120 (115-152)	116 (111-125)	103 (97-112)	117 (109-124)	113 (101-122)
Đuôi		82 (76-89)	75 (68-92)	63 (58-70)	63 (56-70)	66 (60-72)	67 (60-72)
ABW**		18 (17-19)	16 (14-18)	16 (15-17)	16 (14-17)	16 (14-21)	16 (14-19)
		Con đực thể hệ thứ nhất					
n		20	20	20	20	20	20
Chiều dài		1674 (1440-2325)	1433 (1320-1665)	1560 (1305-1980)	1427 (1215-1575)	1743 (1590-1935)	1364 (1155-1560)
Chiều rộng		159 (120-225)	127 (105-150)	162 (135-225)	153 (135-195)	167 (135-190)	86 (75-105)
EP*		82 (67-99)	96 (89-104)	83 (72-105)	87 (74-99)	98 (59-116)	70 (62-78)
Thực quản		166 (150-221)	173 (162-186)	167 (144-201)	155 (144-168)	181 (170-192)	145 (137-155)
Đuôi		32 (27-42)	29 (23-33)	29 (24-36)	31 (21-36)	40 (33-53)	28 (23-35)
ABW**		43 (40-50)	46 (39-56)	42 (38-48)	44 (39-50)	49 (42-59)	36 (33-39)
Gai sinh dục		63 (58-80)	58 (51-65)	58 (51-65)	57 (50-63)	67 (62-74)	60 (56-66)
Trụ gai sinh dục		40 (34-46)	41 (36-44)	46 (36-51)	46 (38-53)	49 (44-54)	42 (35-48)

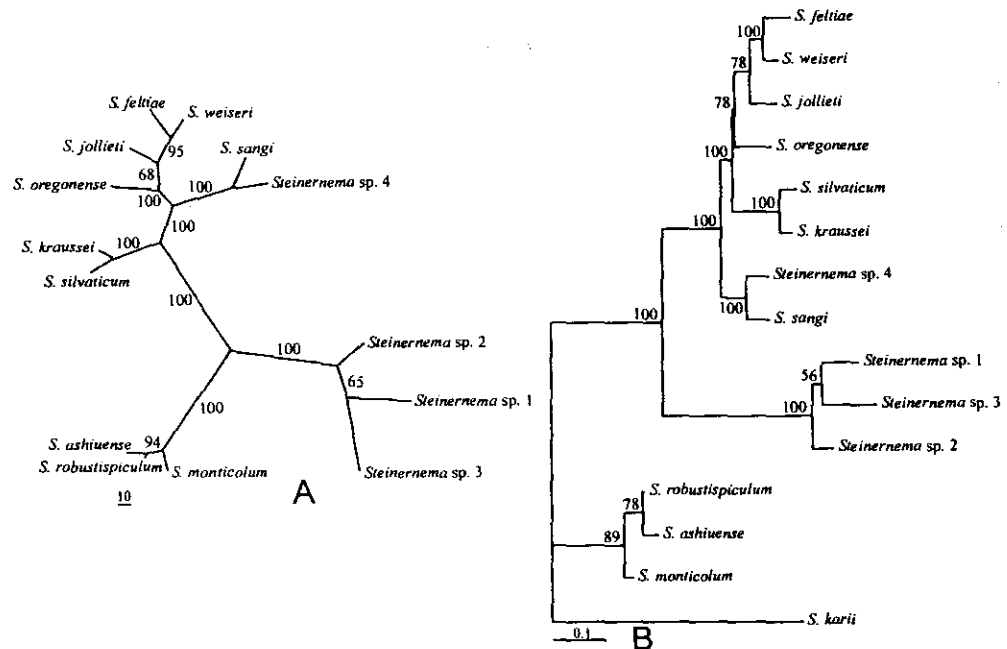
Tuy nhiên các chủng này có thể phân biệt với nhau bằng chiều dài và thông tin di truyền của đoạn ITS. Đoạn ITS của các chủng TN38 và TN9 có cùng chiều dài (725 bp) và không có sai khác nên có thể là 1 loài, *Steinernema* sp. 4; các chủng TD6 và TD16 (*Steinernema* sp.1) cũng tương tự như vậy (chiều dài đoạn ITS là 809 bp và không có sai khác) nên chúng tôi chỉ sử dụng thông tin di truyền của 1 chủng của các loài này trong các phân tích tiếp theo. Tỷ lệ sai khác về thông tin di truyền trên đoạn ITS giữa các loài dao động từ 4,3 - 28,8%. Loài *Steinernema* sp.4 có sai khác nhỏ nhất đối với *S. sangi* (41 nucleotid) và lớn nhất đối với *Steinernema* sp.1 (177 nucleotide); loài *Steinernema* sp.1 có sai khác nhỏ nhất đối với loài

Steinernema sp.3 (98 nucleotide) và lớn nhất đối với *S. kraussei* (211 nucleotide); chủng *Steinernema* sp.3 có sai khác nhỏ nhất đối với *S. silvaticum* (182 nucleotide) và lớn nhất đối với *S. kraussei* (200 nucleotide); loài *Steinernema* sp.2 có sai khác nhỏ nhất đối với *Steinernema* sp.3 và lớn nhất đối với *S. kraussei* (194 nucleotide) (bảng 3).

Bảng 3

Tỷ lệ sai khác (số trên), sai khác trung bình (số dưới) thông tin di truyền và chiều dài đoạn ITS của các loài trong nhóm “feltiae-kraussei-oregonense”

TT	Loài EPN	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	Chiều dài (bp)
1	<i>Steinernema</i> sp.4	-	6.7	25.4	25	24	14.3	14.8	12	12.7	13.6	12.4	24	23.7	24	725
2	<i>S. sangi</i>	48	-	24	24.3	23.4	15.4	14.8	12.2	12.2	13.6	12.2	25.5	25	25	720
3	<i>Steinernema</i> sp.1	177	168	-	12.5	9.6	28.7	29.6	25.7	25.4	28.7	26.6	29.2	28.8	29.6	809
4	<i>Steinernema</i> sp.2	174	169	98	-	12	27	28	24.9	26.3	28.3	26	27.9	27.9	28.2	814
5	<i>Steinernema</i> sp.3	165	160	75	95	-	26.7	27.6	24.5	25.9	27.5	26.1	27.2	27	27.2	793
6	<i>S. silvaticum</i>	101	108	199	187	182	-	4.3	10.8	11.9	12.2	11.1	23.7	23.3	22.5	725
7	<i>S. kraussei</i>	106	105	211	200	194	31	-	11.3	12.7	12.8	11.6	24.9	24.2	23.6	746
8	<i>S. jollieti</i>	84	85	176	170	167	75	80	-	10.5	8.9	6.9	20.8	20.1	19.7	710
9	<i>S. oregonense</i>	89	85	175	182	177	83	90	73	-	11.8	9.4	24.7	24.7	23.3	720
10	<i>S. feltiae</i>	95	95	200	199	191	85	91	62	83	-	5.8	24.3	24	23.6	728
11	<i>S. weiseri</i>	87	85	183	181	180	77	82	48	66	41	-	22.6	22.2	21.4	717
12	<i>S. robustispiculum</i>	149	157	188	177	172	146	158	127	154	152	140	-	27.2	4.5	667
13	<i>S. ashiuense</i>	146	154	184	176	170	143	153	122	152	149	137	18	-	5.9	661
14	<i>S. monticolum</i>	148	154	190	178	171	138	149	120	145	147	132	30	39	-	664



Hình 2: Cây phát sinh chủng loại của các chủng *Steinernema* nhóm “feltiae-kraussei-oregonense” của Việt Nam trên cơ sở phân tích đoạn ITS

A: một của 3 cây Maximum parsimony (tree length = 781). B: một cây duy nhất Maximum likelihood (DNA model = GTR + G + I, -ln L = 5222.53464)

Kết quả phân tích dữ liệu giải mã vùng ITS của 4 chủng *Steinernema* của Việt Nam với 10 loài trong nhóm "*feltiae-kraussei-oregonense*" bằng phương pháp Maximum parsimony (MP) thu được 3 cây phát sinh chủng loại (hình 2 A), và cùng với 1 loài ngoài nhóm (*S. kari*) bằng phương pháp Maximum likelihood (ML) thu được duy nhất 1 cây (hình 2 B). Trong cả hai cây MP và ML, các chủng *Steinernema* của Việt Nam luôn tạo thành các nhánh riêng biệt và có quan hệ gần gũi với nhau: loài *Steinernema* sp.4 có quan hệ gần gũi với *S. sangi* (bootstrap 100%); các chủng *Steinernema* sp.1, *Steinernema* sp.2 và *Steinernema* sp.3 cùng chung 1 nhánh với bootstrap 100%.

III. KẾT LUẬN

Dựa trên các đặc điểm về hình thái và thông tin di truyền trên đoạn ITS, 6 chủng tuyến trùng trong nhóm "*feltiae-kraussei-oregonense*" của Việt Nam có thể là 4 loài mới: *Steinernema* sp.1 (TD6 + TD16), *Steinernema* sp.2 (BM12), *Steinernema* sp.3 (HS2), *Steinernema* sp.4 (TN9 + TN38). Do kích thước của chúng nhỏ nên khó quan sát được toàn bộ các đặc điểm hình thái bằng kính hiển vi quang học nên trong các nghiên cứu tiếp theo cần sử dụng kính hiển vi điện tử quét (SEM) để bổ sung thêm một số đặc điểm hình thái của ấu trùng cảm nhiễm và con đực thể hệ thứ nhất. Ngoài ra cũng cần bổ sung thêm các số đo của con đực và con cái thể hệ thứ hai để có đủ dẫn liệu mô tả loài mới cho khoa học.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Dutky S. R., 1974: Proceedings of the Summer Institute on Biological Control of Plant Insects and Diseases. University Press Mississippi, Jackson: 576-590.
2. Kaya H. K., A. M. Koppenhöfer, 1999: Optimal use of insecticidal nematodes in pest management. Rutgers University New Jersey: 1-8.
3. Phan K. L., N. C. Nguyen, M. Moens, 2001: Russian Journal of Nematology, 9: 1-7.
4. Phan K. L., S. A. Subbotin, L. Waeyenberge, M. Moens, 2005: Systematic Parasitology, 60: 23-32.
5. Phan Kế Long, 2003: Những vấn đề nghiên cứu cơ bản trong khoa học sự sống: 156-159. Nxb KH&KT, Hà Nội.
6. Phan Kế Long, Nguyễn Ngọc Châu, Maurice Moens, 2003: Những vấn đề nghiên cứu cơ bản trong khoa học sự sống: 670-673. Nxb KH&KT, Hà Nội.
7. Poinar G. O., 1990: Entomopathogenic Nematodes in Biological Control. CRC Press, Boca Raton, Florida: 23-61.
8. Vrain T. C., D. A. Wackruch, A. C. Levesque, R. I. Hamilton, 1992: Fundamental and Applied Nematology, 15: 563-574.
9. Webster J. M., G. Chen, K. Hu, X. Li, 2002: Entomopathogenic nematology. CABI Publishing: 99-114.
10. White G. F., 1927: Science, 66: 302-303.

**MORPHOMETRIC AND MOLECULAR CHARACTERISATION
OF VIETNAMESE ENTOMOPATHOGENIC NEMATODES
IN THE “*FELTIAE-KRAUSSEI-OREGONENSE*” GROUP**

Phan Ke Long, Nguyen Ngoc Chau, Maurice Moens

SUMMARY

The six isolates of Vietnamese entomopathogenic nematodes in the “*feltiae-kraussei-oregonense*” group can be separated into four species on the basis of minor differences in their morphometrics, but especially because of the difference in the ITS sequences. The lengths of the ITS region of these species are diagnostic and show high variation among species in the group. The pairwise divergence between species in the group ranged from 4.3-28.8%. In the MP and ML trees, *Steinernema* sp.4 appears as the sister to *S. sangi* with high bootstrap supported (100%). *Steinemema* sp.1, *Steinemema* sp.2 and *Steinernema* sp.3 cluster together with a high bootstrap value (100%).