

**ĐẶC ĐIỂM HÌNH THÁI VÀ TRÌNH TỰ GEN 16S RNA RIBOSOMAL
CỦA CHŨNG VI KHUẨN X_{TD18} CỘNG SINH VỚI TUYẾN TRÙNG
STEINERNEMA SP. TĐ3 PHÂN LẬP TỪ TAM ĐẢO, VĨNH PHÚC**

HOÀNG THỊ BÍCH

Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên

**NGUYỄN GIANG SON, LÊ THỊ MAI LINH,
NGUYỄN THỊ DUYÊN, PHẠM NGỌC TUYẾN**

Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật

PHAN KẾ LONG

Bảo tàng Thiên nhiên Việt Nam

ĐỖ TRUNG SỸ

Viện Hóa học

Vi khuẩn *Xenorhabdus* X_{TD18} là chủng vi khuẩn cộng sinh tuyến trùng *Steinernema* sp. TĐ3 phân lập ở Tam Đảo, Vĩnh Phúc đã được chứng minh có khả năng diệt sâu và khả năng kháng khuẩn, kháng nấm mạnh. Ngày nay, phương pháp phân loại phân tử cũng đã được áp dụng để phân loại các loài vi khuẩn nhằm khắc phục các hạn chế của phương pháp phân loại hình thái truyền thống.

Bài báo này trình bày một số đặc điểm hình thái và trình tự gen 16S RNA ribosomal (16S-rDNA) của chủng vi khuẩn X_{TD18}, góp phần trong nghiên cứu chất kháng khuẩn, kháng nấm ứng dụng trong nông nghiệp và y dược.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Chủng vi khuẩn X_{TD18} được phân lập từ xoang máu của ấu trùng bướm sáp lớn (*Galleria mellonella*) chết do nhiễm tuyến trùng *Steinernema* sp. TĐ3. Môi trường phân lập vi khuẩn (môi trường NBTA): Tryptone 1%, Cao nấm men 0,5%, NaCl 0,5%, Bromothymon Blue (BTB) 0,0025%, Triphenyltetrazolium Chloride (TTC) 0,004%, Agar 1,5%, pH7. Khử trùng ở 1atm/30 phút, để nguội môi trường < 50⁰C mới bổ sung TTC. Môi trường nuôi cấy vi khuẩn (môi trường LB): Tryptone 1%, Cao nấm men 0,5%, NaCl 0,5%, pH 7; Khử trùng môi trường ở 1 atm/30 phút.

Cấy các chủng vi khuẩn lên môi trường NBTA, nuôi ở tủ ấm 30°C trong 24 - 48h. Quan sát hình dạng khuẩn lạc thu được. Làm tiêu bản giọt ép, tiêu bản nhuộm Gram để quan sát đặc điểm tế bào của vi sinh vật phân lập được với đối sánh là vi khuẩn *Escherichia coli* ATCC 25922 (đại diện cho vi khuẩn Gram âm) và vi khuẩn *Bacillus subtilis* ATCC 27212 (đại diện cho vi khuẩn Gram dương).

Tách chiết DNA tổng số từ khuẩn lạc đơn sử dụng EZ-10 spin column Genomic DNA MiniPreps Kit for Bacteria (Bio Basic, Canada). Nhân một phần vùng gen 16S ribosomal RNA có kích thước khoảng 1550 bp bằng kỹ thuật PCR sử dụng Taq Mastermix 2X (Qiagen, Đức) và máy chu trình nhiệt Eppendorf Mastercycler. Cặp mồi sử dụng để nhân bản vùng gen đích được thiết kế dựa trên thông tin trình tự DNA của các chủng vi khuẩn thuộc chi *Xenorhabdus* đã được công bố trên Genbank có trình tự mở xuôi U16SF: 5'-TGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGC-3', mồi ngược PXR: 5'-TAC GGTTACCTT GTTACGACT T-3'. Chu trình nhiệt PCR như sau: 95°C 2 phút; 35 chu kỳ 95°C 30 giây, 50°C 25 giây, 72°C 50 giây; 72°C 3 phút. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1,5, được cắt và tinh sạch bằng Qiaquick gel extraction kit (Qiagen,

Đức). Phản ứng giải trình tự trực tiếp sử dụng BigDye terminator cyclor v3.1 (Applied Biosystem, Mỹ), sử dụng mỗi xuôi (U16SF), mỗi trong (PXF: 5'-TCC TAC GGG AGG CAG CAG TG-3') và mỗi ngược (PXR) và đọc kết quả trên máy ABI 3100 Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystem, Mỹ).

Trình tự DNA của mẫu nghiên cứu được ráp nối, đối chiếu với các trình tự tương đồng bằng chương trình phần mềm ClustalW (Thompson *et al.*, 1994), phân tích các đặc điểm tiến hóa bằng phần mềm PAUP v4.0 (Swofford, 2003).

II. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

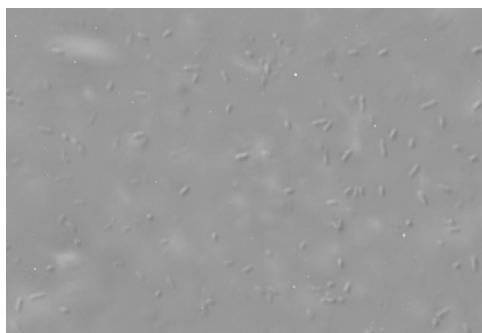
1. Đặc điểm hình thái vi khuẩn

Nuôi cấy ở môi trường rắn trên giá thể agarose chủng X_{TD18} hình thành các khuẩn lạc có hình tròn, lồi, bề mặt nhẵn bóng và bắt màu xanh lá cây của thuốc nhuộm trong môi trường NBTA (Hình 1).

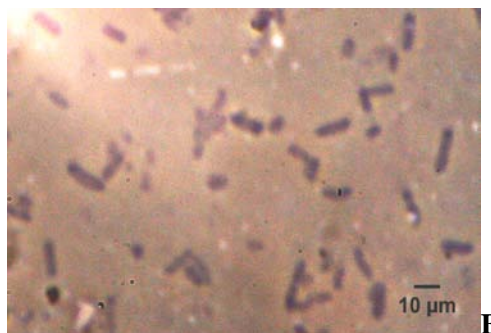


Hình 1: Khuẩn lạc chủng X_{TD18}

Quan sát trên kính hiển vi quang học ở vật kính 100X nhận thấy chủng X_{TD18} là trực khuẩn, kích thước khoảng 3-5 x 1-1,5 μm, Gram âm (bắt màu thuốc nhuộm tím Gentian), di động được (Hình 2).



A



B

Hình 2: Tế bào chủng X_{TD18}

A - Tiêu bản giọt ép, B - Tiêu bản nhuộm Gram

2. Đặc điểm trình tự gen 16S RNA ribosomal (16S-rDNA)

Trình tự 16S rDNA xác định được có chiều dài 1429 bp, có thành phần nucleotide: Adenine = 24,9%, Cytosine = 23,0%, Guanine = 32,0%, Thyminine = 20,1%. Đối chiếu trình tự 16S rDNA trong chi *Xenorhabdus* ghi nhận 156 vị trí đa hình, trong đó 115 vị trí mang thông tin parsimony. Chỉ số đa dạng nucleotide $\pi = 0,036$. Các vị trí đa hình khi so sánh trình tự DNA chủng X.TĐ18 với các trình tự tương đồng cao thể hiện trong Bảng 1.

Mối quan hệ di phát sinh chủng loại giữa các loài thuộc chi *Xenorhabdus* và *Photorhabdus* được thể hiện trên hình 3. Ở đây, mô hình phân tích thích hợp nhất được lựa chọn là mô hình

Hasegawa-Kishino-Yano với phân phối Gamma và hằng định (BIC = 10469.806, AICc = 10039.377, logL = -4968.611, I = 0.78, $\gamma = 0.45$, R = 1.83), phân tích bootstrap 1000 nh ắc lại mẫu.

Bảng 1

Các vị trí đa hình trình tự 16S-rDNA

Vị trí nucleotide	6	7	11	13	15	20	21	23	23	33	34	44	44	11	11	11	11	11	20	40	44	44	44	44		
X. sp. TĐ18	A	G	C	G	G	G	A	T	C	C	G	C	A	C	G	T	A	C	G	A	A	G				
X. miraniensis	T	A	.	G	
X. szentirmaii	G	.	T	G	G	T			
X. mauleonii	A	.	T	A	G	G	T				
X. nematophila	G	A	T	A	A	A	C	G	T	T	A	T	G	.	T	G	.	T	A	.	G	T				
X. doucetiae	G	A	T	A	A	A	C	G	T	T	A	T	.	T	.	.	G	A	A	G	G	C				
X. romanii	T	A	T	.	.	G	G	A	G	.	A				
Vị trí nucleotide	40	41	44	45	47	48	49	55	56	58	58	58	58	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	
X. sp. TĐ18	G	T	T	A	T	T	T	C	A	C	G	G	A	A	T	A	T	A	T	A	C	T				
X. miraniensis	.	C	.	.	G	.	.	T	C	G	.	C	.	G				
X. szentirmaii	.	G	C	.	G	.	.	T	.	A				
X. mauleonii	T	G	C	A	T	C	G				
X. nematophila	.	G	C	G	G	C	C	.	G	A	T	C	G				
X. doucetiae	T	G	C	G	G	C	C	.	G	A	T	C	G	G	C	G	C	G	G	C	T	G				
X. romanii	T	.	.	G	G	C	.	.	.	A	T	C	G	G	C	G	C	G	G	C	T	G				

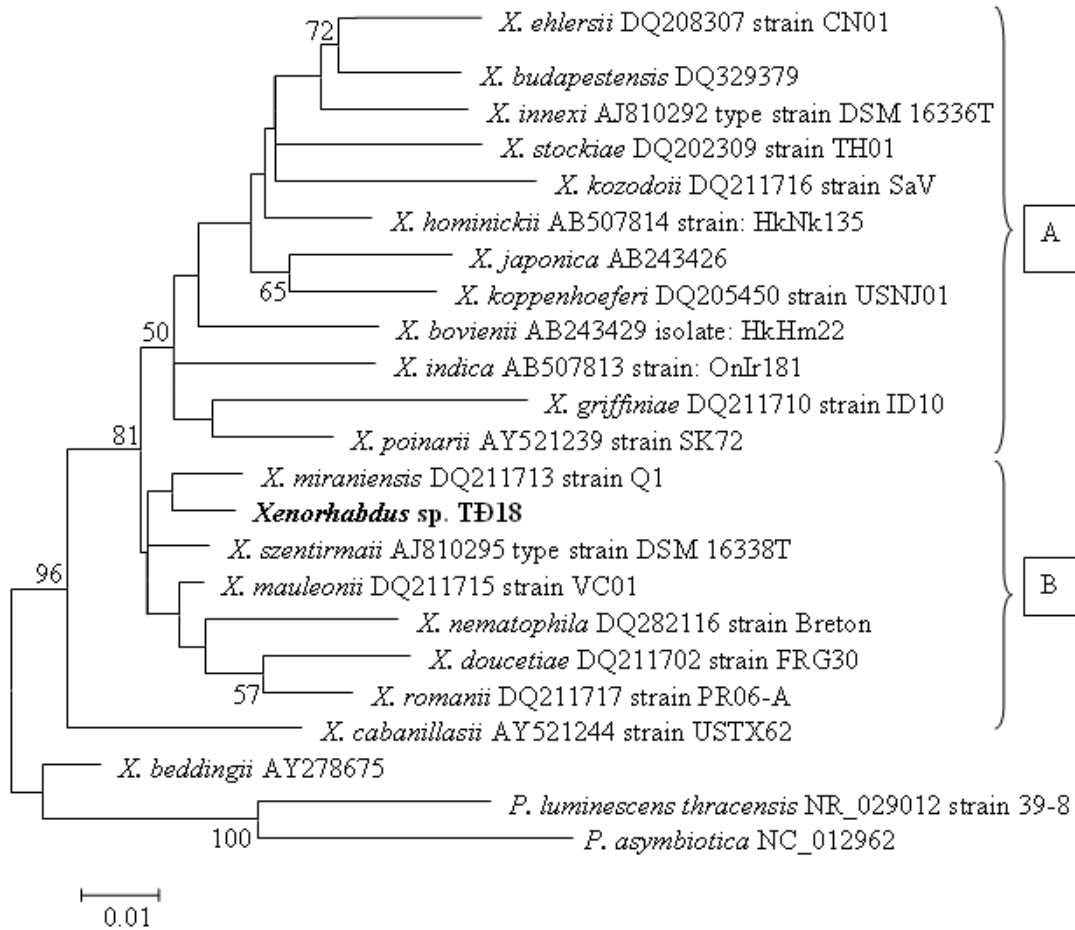
Sơ đồ cây phát sinh loài (Hình 3) cho thấy giữa chi *Xenorhabdus* và chi *Photorhabdus* (2 chi vi khuẩn tương ứng cộng sinh với 2 giống tuyến trùng *Steinernema* và *Heterorhabditis*) có sự khác biệt di truyền rất rõ ràng. Chi *Xenorhabdus* có sự phân hóa thành 2 nhánh phát sinh ần tương ứng hình thành nên nhóm A và nhóm B, gốc phát sinh có giá trị bootstrap khá cao 81%. Loài *X. beddingii* và *X. cabanillasii* có vẻ mang nhiều đặc điểm riêng biệt hơn và tách từ khá sớm khỏi tổ tiên chung của chi *Xenorhabdus*. Sự phân hóa xa hơn hình thành nên các đơn vị phân loại hiện tại trong cả 2 nhóm A và B chưa hoàn toàn rõ ràng với các giá trị bootstrap thấp hơn.

Bảng 2

Hệ số khác biệt di truyền

STT	1	2	3	4	5	6
1. X. TĐ18						
2. X. miraniensis	0.011					
3. X. szentirmaii	0.012	0.012				
4. X. mauleonii	0.013	0.016	0.011			
5. X. romanii	0.024	0.021	0.028	0.020		

6. <i>X. nematophila</i>	0.033	0.034	0.026	0.025	0.038	
7. <i>X. doucetiae</i>	0.036	0.033	0.035	0.027	0.019	0.024



Hình 3: Cây phát sinh chủng loại Maximum likelihood (logL = - 5109.52)
Số ở các gốc cây là giá trị bootstrap (%), thang tỉ lệ biểu thị hệ số khác biệt di truyền.

Chủng vi khuẩn X_{TĐ18} nằm trong nhóm B và có quan hệ di truyền rất gần gũi với loài *X. miraniensis*, *X. szentirmaii* và *X. mauleonii*, mức tương đồng trình tự giữa các loài này lên tới 96-97%. Các loài còn lại thuộc nhóm này gồm *X. nematophila*, *X. doucetiae* và *X. romanii* mang nhiều khác biệt với tổ tiên chung của nhóm và hình thành những nhánh tiến hóa xa hơn. Hệ số khác biệt trình tự giữa các loài trong nhóm B được thể hiện trong Bảng 2.

III. KẾT LUẬN

Chủng vi khuẩn X_{TĐ18} cộng sinh với tuyến trùng *Steinernema* sp. TĐ3 phân lập ở Tam Đảo, Vĩnh Phúc là trực khuẩn Gram âm, kích thước 3-5 x 1-1,5 μm, thuộc họ vi khuẩn đường ruột Enterobacteriaceae, chi *Xenorhabdus* và có quan hệ di truyền rất gần gũi với loài *X. miraniensis*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Hoàng Thị Bích, Nguyễn Thị Phương, Phạm Ngọc Tuyên, Lê Thị Mai Linh, Phan Kế Long**, 2010: *Tạp chí Dược học*, 417: 36-40.
2. **Nguyễn Ngọc Châu**, 2008: Tuyển trùng ký sinh gây bệnh côn trùng ở Việt Nam. NXB. KHTN & CN, tr. 63- 64.
3. **Swofford, D.L.**, 2003: PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods) Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
4. **Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J.**, 1994: *Nucleic Acids Research* 22, 4673-4680.

**MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS AND SEQUENCING OF
16S RNA RIBOSOMAL GENE OF BACTERIUM STRAIN X_{TD}18 SYMBIOSIS
WITH *STEINERNEMA* SP. TĐ3 ISOLATED FROM TAM DAO, VINH PHUC**

**HOANG THI BICH, NGUYEN GIANG SON,
LE THI MAI LINH, NGUYEN THI DUYEN, PHAM NGOC TUYEN,
PHAN KE LONG, DO TRUNG SY**

SUMMARY

Bacterium strain X_{TD}18 symbiosis with *Steinernema* sp. TĐ3 which was isolated from Tam Dao, Vinh Phuc province, was demonstrated to have a strong antibiotic capability. Morphology study shows that bacterium strain X_{TD}18 is in sticky form, Gram negative, size 3-5 x 1-1,5 μm. 16S RNA ribosomal gene sequence analyzing shows that bacterium strain X_{TD}18 belongs to family Enterobacteriaceae, genus *Xenorhabdus* and has close relationship with *X. miraniensis*.