

**ĐẶC ĐIỂM HÌNH THÁI VÀ PHÂN TỬ CỦA VI KHUẨN
XENORHABDUS SP. CHỨNG L1 CỘNG SINH VỚI TUYẾN TRÙNG
STEINERNEMA LONGICAUDUM PHÂN LẬP Ở VƯỜN QUỐC GIA BA VÌ**

LÊ THỊ MAI LINH, NGUYỄN THỊ DUYÊN, NGUYỄN GIANG SƠN

Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật

PHẠM NGỌC TUYÊN

*Trung tâm Quốc gia Giống thủy sản nước ngọt miền Bắc,
Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản*

PHAN KẾ LONG

Bảo tàng Thiên nhiên Việt Nam

Tuyến trùng *Steinernema* spp. đã được biết là vật chủ mang vi khuẩn cộng sinh thuộc giống *Xenorhabdus*. Vi khuẩn cộng sinh này sinh ra các chất trao đổi chất thứ cấp có hoạt tính sinh học như kháng sinh, ngăn chặn sự tăng sinh của các tế bào ung thư... [1, 2, 3, 4]. Trong nghiên cứu này chúng tôi tiến hành tìm hiểu về đặc điểm hình thái và phân tử của chủng vi khuẩn L1 của *Steinernema* spp. cộng sinh với tuyến trùng *S. longicaudum* phân lập từ Vườn Quốc gia (VQG) Ba Vì, tạo cơ sở ban đầu cho các nghiên cứu tiếp theo.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

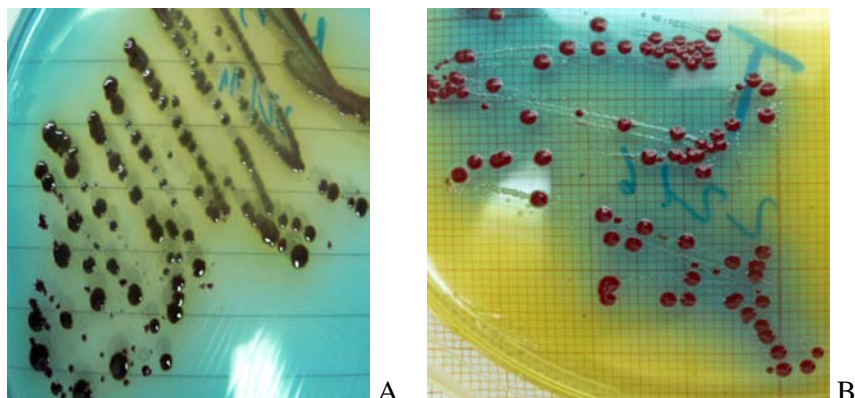
Vi khuẩn cộng sinh nằm trong khoang ruột tuyến trùng *Steinernema longicaudum* thu tại VQG Ba Vì, Hà Nội (hiện lưu trữ tại Phòng Tuyến trùng học, Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam). Nuôi giữ tuyến trùng *S. longicaudum* mang vi khuẩn cộng sinh trên vật chủ là ấu trùng Bướm sáp lớn (*Galleria mellonella*). Phân lập vi khuẩn cộng sinh với tuyến trùng từ xoang máu của *G. mellonella* chết với biểu hiện đặc trưng do nhiễm tuyến trùng trên các đĩa môi trường NBTA và nuôi cấy ở điều kiện nhiệt độ 30°C. Môi trường phân lập vi khuẩn: Tryptone 1%, cao nấm men 0,5%, NaCl 0,5%, bromothymon blue (BTB) 0,0025%, triphenyltetrazolium chloride (TTC) 0,004%, agar 1,5 %, pH 7, khử trùng ở 1 atm/30 phút, để nguội 50°C đổ TTC. Quan sát, ghi nhận đặc điểm khuẩn lạc phát triển trên bề mặt thạch, sự thay đổi màu môi trường xung quanh khuẩn lạc sau thời gian nuôi cấy 24h, 36h.

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 bản một phần vùng gen 16S ribosomal RNA có kích thước khoảng 1550 bp bằng kỹ thuật PCR sử dụng Taq Mastermix 2X (Qiagen, Đức). 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 như sau: mồi xuôi U16SF: 5'-TGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGC-3', mồi ngược PXR: 5'-TAC GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3'. Chu trình nhiệt PCR: 95°C 2 phút; 35 chu kì: 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%, cắt và tinh sạch bằng Qiaquick gel extraction kit (Qiagen, Đức). Phản ứng giải trình tự trực tiếp sử dụng BigDye terminator cyclers v3.1 (Applied Biosystem, Mỹ). Mồi dùng trong phản ứng giải trình tự gồm: mồi xuôi (U16SF), Mồi trong (PXF: 5'-TCC TAC GGG AGG CAG CAG TG-3') và mồi ngược (PXR). Tinh sạch sản phẩm giải trình tự bằng sắc ký lọc gel (Sephadex G50 - Sigma, Mỹ) 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) [5]. Cây phát sinh chủng loại xây dựng theo phương pháp Maximum Likelihood với 1000 lần lấy lại mẫu.

II. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

1. Đặc điểm phát triển và hình thái của vi khuẩn

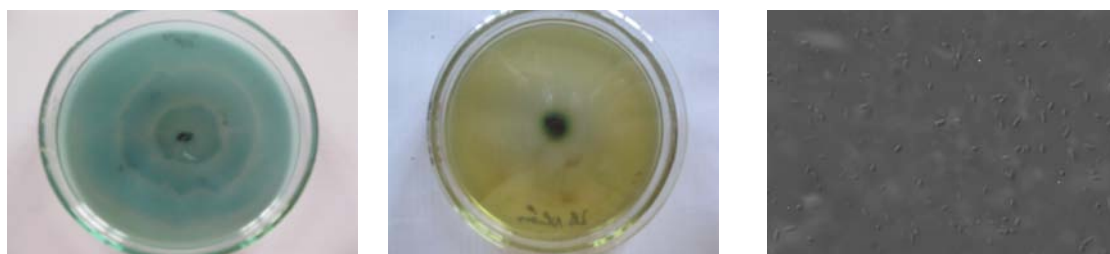


Hình 1: Khuẩn lạc của vi khuẩn cộng sinh với *Steinernema longicaudum* phân lập ở VQG Ba Vì, Hà Nội

A: Pha sơ cấp, B: Pha thứ cấp

Chủng vi khuẩn nghiên cứu phát triển mạnh nhất ở điều kiện nhiệt độ 30°C, sau thời gian nuôi cấy 24h khuẩn lạc đạt tới đường kính 2 mm. Khuẩn lạc có rìa không đều, bề mặt nhẵn, không lồi, màu xanh (pha sơ cấp) hay có màu đỏ sẫm (pha thứ cấp sau 36h) (Hình 1). Môi trường xung quanh khuẩn lạc (pha sơ cấp) đổi màu từ vàng sang xanh. Các vi khuẩn ở pha sơ cấp có khả năng di động, tạo nhu động quanh khuẩn lạc (Hình 2).

Quan sát dưới kính hiển vi quang học ở độ phóng đại 1000x, các tế bào vi khuẩn có dạng hình que, kích thước khoảng 1 x 3-5 μm , có tiên mao, di chuyển được (Hình 3).



Hình 2: Môi trường xung quanh khuẩn lạc của vi khuẩn cộng sinh với *Steinernema longicaudum* phân lập ở VQG Ba Vì, Hà Nội

A: Pha sơ cấp, B: Pha thứ cấp

Hình 3: Hình ảnh tế bào vi khuẩn cộng sinh

2. Đặc điểm phân tử DNA vùng gen khảo sát

Trình tự nucleotide chủng vi khuẩn L1 thu được có chiều dài 1429 bp. Đối chiếu trình tự nghiên cứu với các trình tự 16S-rDNA của các loài vi khuẩn đã được công bố cho thấy có sự tương đồng cao giữa mẫu nghiên cứu với các loài vi khuẩn thuộc giống *Xenorhabdus*, từ 95-97% (Hình 4). Những khác biệt giữa trình tự nghiên cứu với các trình tự tương đồng được thể hiện trong Bảng 1. Sự khác biệt ghi nhận được ở mức giữa các loài trong cùng giống.

Vùng trình tự nghiên cứu khá đa dạng giữa các loài, chỉ số đa dạng nucleotide $\pi = 0,038$. Khảo sát trình tự 16S-rDNA trong toàn bộ *Xenorhabdus* ghi nhận 115 vị trí mang thông tin parsimony, 50 vị trí có biến đổi đặc trưng, trong đó chủng vi khuẩn L1 mang 10 biến đổi đặc trưng.

HỘI NGHỊ KHOA HỌC TOÀN QUỐC VỀ SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT LẦN THỨ 4

X-L1	: AGTCGAGCGGCaGCGGGAAGAAGCTTGTCTCTTTGCCGGCGAGCGGCGGA	: 50
X.ehlersii	:GGA....G....TCC.....	: 50
X.budapest	:G.....G.....G.....C.....	: 50
X.innexi	:GG.....CC.....	: 50
X-L1	: CGGGTGAGTAATGTCTGGGGATCTGCCCGATGGAGGGGATAACCACTGG	: 100
X.ehlersii	:T.....	: 100
X.budapest	:T.....	: 100
X.innexi	:G.A.....	: 100
X-L1	: AAACGGTGGCTAATACCGGATAACCTCTTTGGAGCAAAGTGGGGGACCTT	: 150
X.ehlersii	:C.....GA.....	: 150
X.budapest	:C.....C.G.....	: 150
X.innexi	:C.....A.....	: 150
X-L1	: CGGGCCTCACGCCATCGGATGAACCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGAGGG	: 200
X.ehlersii	:T.....	: 200
X.budapest	:T.....	: 200
X.innexi	:T.....T.....	: 200
X-L1	: GTAACGGCCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCA	: 250
X.ehlersii	:A...T.....	: 250
X.budapest	:G...T.....	: 250
X.innexi	:T...T.....	: 250
X-L1	: GCCACACTGGGACTGAGACAAGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTG	: 300
X.ehlersii	:C.....	: 300
X.budapest	:C.....	: 300
X.innexi	:C.....	: 300
X-L1	: GGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTAT	: 350
X.ehlersii	:GC.....	: 350
X.budapest	:GC.....	: 350
X.innexi	:GC.....	: 350
X-L1	: GAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTTTCAGTGGGGAGGAAGGCATAA	: 400
X.ehlersii	:C.....G.....	: 400
X.budapest	:C.....	: 400
X.innexi	:C.....G..G.....	: 400
X-B1	: AAGCGAATACCTTTTTATGATTGACGTTACCCACAGAAGAAGCACCGGCTA	: 450
X.ehlersii	: .GC.....GC.....G.....	: 450
X.budapest	: .CTT...GG.....G.....	: 450
X.innexi	: .C.....G.....C.....G.....	: 450
X-L1	: ACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGA	: 500
X.ehlersii	:G.....	: 500
X.budapest	:G.....	: 500
X.innexi	:G.....	: 500
X-L1	: ATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGTCAATTAAGTTAGATGTGAAA	: 550
X.ehlersii	:C.....	: 550
X.budapest	:C.....	: 550
X.innexi	:C.....	: 550
X-L1	: TCCCGGGCTTAACCTGGGAACCTGCATCTAAGACTGGTTGGCTAGAGTCT	: 600
X.ehlersii	:TG.....A.....	: 600
X.budapest	:C.....G.....A.....	: 600
X.innexi	: G.....G.....	: 600
X-L1	: CGTAGAGGGGGTAGAATCCACGTGTAGCGTTGAAATGCGTAGAGATGT	: 650
X.ehlersii	:G.....	: 650
X.budapest	:G.....	: 650
X.innexi	:G.....	: 650
X-L1	: GGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCCGCCCCCTGGACGAAGACTGACGCTCA	: 700
X.ehlersii	:G.....	: 700
X.budapest	:G.....	: 700
X.innexi	:G.....	: 700
X-L1	: GGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGATTAGATACCCTGGTAGTCCACG	: 750
X.ehlersii	:G.....	: 750
X.budapest	:G.....	: 750
X.innexi	:G.....	: 750

HỘI NGHỊ KHOA HỌC TOÀN QUỐC VỀ SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT LẦN THỨ 4

X-L1	: CTGTAACGATGTCGATTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGG	: 800
X.ehlersii	:G.....CT.....	: 800
X.budapest	: .C.....G.....CT.....	: 800
X.innexi	: .C.....A.C.....G.....C.....	: 800
	* 820 * 840 *	
X-L1	: AGCTAACGCGTTAAATCGACCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAATA	: 850
X.ehlersii	:	: 850
X.budapest	:	: 850
X.innexi	:G.T.....	: 850
	860 * 880 * 900	
X-L1	: CTCAAATGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAA	: 900
X.ehlersii	:	: 900
X.budapest	:	: 900
X.innexi	:	: 900
	* 920 * 940 *	
X-L1	: TTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGCGAAGCCT	: 950
X.ehlersii	:	: 950
X.budapest	:	: 950
X.innexi	:A.....	: 950
	960 * 980 * 1000	
X-L1	: TTAGAGATAGAGGCGTGCCTTCGGGAACGCTGAGACAGGTGATGCATGGC	: 1000
X.ehlersii	:C.....	: 1000
X.budapest	: ..G...C.....C.....	: 1000
X.innexi	:T.....C.....	: 1000
	* 1020 * 1040 *	
X-L1	: TGTCGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCAGACGAGCGC	: 1050
X.ehlersii	:A.....	: 1050
X.budapest	:A.....	: 1050
X.innexi	:A.....	: 1050
	1060 * 1080 * 1100	
X-L1	: AACCTTATCCTTTGTTGCCAGCACGTTATGGTGGGAACTCAAGGGAGAC	: 1100
X.ehlersii	:	: 1100
X.budapest	:C.....	: 1100
X.innexi	:G.....	: 1100
	* 1120 * 1140 *	
X-L1	: TGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGC	: 1150
X.ehlersii	:	: 1150
X.budapest	:	: 1150
X.innexi	:	: 1150
	1160 * 1180 * 1200	
X-L1	: CCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGGATACAAAGAGAAG	: 1200
X.ehlersii	:	: 1200
X.budapest	:A.....	: 1200
X.innexi	:A.....	: 1200
	* 1220 * 1240 *	
X-L1	: CGACCTCGCGAGAGCTAGCGGACCTCATAAAGTCTGTGCTAGTCCGGATT	: 1250
X.ehlersii	:A.A.....	: 1250
X.budapest	:A.....A.....	: 1250
X.innexi	:A.....A.....	: 1250
	1260 * 1280 * 1300	
X-L1	: GGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCAGAT	: 1300
X.ehlersii	:	: 1300
X.budapest	:	: 1300
X.innexi	:T.....	: 1300
	* 1320 * 1340 *	
X-L1	: CAGAATGTTGCGGCGAAACGTTCCCGAGCCTTGTACACACCGCCCGTCA	: 1350
X.ehlersii	:C.....T...T.....G.....	: 1350
X.budapest	: ..C...C...T...T.....G.....	: 1350
X.innexi	:C.A...T...T.....G.....	: 1350
	1360 * 1380 * 1400	
X-L1	: CACCATGGGAGTGGGTTGCAAAAGAAGTCGGTAGCTTAACCTGTAGGAGG	: 1400
X.ehlersii	:	: 1400
X.budapest	:G.....CT.....	: 1400
X.innexi	:A.....TCG.....	: 1400
	* 1420	
X-L1	: GCGCTGACCACTTTGTGATTCATGACTGG	: 1429
X.ehlersii	:	: 1429
X.budapest	:C.....	: 1429
X.innexi	:T.....	: 1429

Hình 4: So sánh trình tự nucleotide của vi khuẩn cộng sinh với *Steinernema longicaudum* phân lập ở VQG Ba Vì, Hà Nội
Vị trí in đậm là biến đổi đặc trưng

Bảng 1

Ma trận khoảng cách di truyền (phía trên bên phải) và số khác biệt nucleotide (phía dưới bên trái)

	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)
(1) X-L1	-	0.0308	0.0308	0.0343	0.0364	0.0410
(2) <i>X. ehlersii</i>	38	-	0.0233	0.0233	0.0357	0.0310
(3) <i>X. budapestensis</i>	46	32	-	0.0288	0.0366	0.0426
(4) <i>X. innexi</i>	51	36	42	-	0.0345	0.0391
(5) <i>X. stockiae</i>	54	48	48	35	-	0.0404
(6) <i>X. kozodoii</i>	57	45	55	48	49	-

3. Quan hệ di truyền giữa chủng vi khuẩn L1 với các loài trong chi *Xenorhabdus*



Hình 5: Quan hệ phát sinh chủng loại giữa các loài trong giống *Xenorhabdus* theo phương pháp Maximum Likelihood, số ở các gốc nhánh là giá trị bootstrap (%)

Cây phát sinh chủng loại xây dựng trên cơ sở phân tích các trình tự 16S-rDNA theo phương pháp Maximum Likelihood được thể hiện trên Hình 5. Mô hình Tamura- Nei thích hợp nhất được lựa chọn với phân phối Gamma và hằng định (BIC = 9649.740, AICc = 9230.580, lnL = -4565.211, I = 0.83, γ -shape = 0.66, R = 1.94, A = 0.247, T = 0.197, C = 0.230, G = 0.325).

Cây phát sinh cho thấy các loài trong giống *Xenorhabdus* được chia thành hai nhóm lớn I và II. Nhóm I tách thành 2 phân nhóm Ia và Ib. Chủng vi khuẩn L1 nằm trong nhóm II và có quan hệ di truyền gần gũi nhất với loài *X. ehlersii* và *X. budapestensis*, gốc phát sinh chung của X-L1 và 2 loài này được ủng hộ mạnh với giá trị bootstrap 83%. Trong nhóm II, loài *X. bovienii* mang nhiều khác biệt nhất và phân rẽ từ rất sớm khỏi gốc phát sinh chung, loài *X. japonica* và *X. koppenhoeferi* cũng thể hiện nhiều khác biệt với các loài còn lại và hình thành một nhánh phụ tách biệt.

III. KẾT LUẬN

Đã phân lập được chủng vi khuẩn L1 cộng sinh với tuyến trùng *S. longicaudum* có những đặc điểm phát triển và hình thái khuẩn lạc đặc trưng, có khả năng gây nhiễm trùng huyết côn trùng. Phân tích trình tự gen 16S RNA ribosomal đã giúp xác định vị trí phân loại của chủng vi khuẩn này thuộc giống *Xenorhabdus* và có quan hệ di truyền khá gần gũi với 2 loài *X. ehlersii* và *X. budapestensis*. Hiện nay trên thế giới đã phân lập được loài vi khuẩn *X. beddingii* cộng sinh với tuyến trùng *S. longicaudum*, nên chủng vi khuẩn L1 chúng tôi phân lập được có thể là loài vi khuẩn mới cộng sinh với tuyến trùng *S. longicaudum*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Nguyen K. B. and G. C., G. Stecher, M. Nei and S. Kumar**, 2011: *Molecular Biology and Evolution* (Smart, 1995: *Journal of Nematology*, 27: 206-212).
2. **Hu K., J. Li & J. Webster**, 1999: *Nematology*, 1: 457-469.
3. **Chen G., G. B. Dunphy and J. M. Webster**, 1994: *Biological Control*, 4: 157-162.
4. **McInerney B. V., W. C. Taylor, M. J. Lacey, R. J. Akhurst & R. P. Gregson**, 1991: *Journal of Natural Products*, 54: 785-795.
5. **Tamura K., D. Peterson, N. Peterson**(published).

Lời cảm ơn: Bài báo được hoàn thành với sự trợ giúp kinh phí của Quỹ Phát triển khoa học và Công nghệ (NAFOSTED), Đề tài số 106.06.16.09.

THE MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *XENORHABDUS* SP. STRAIN L1 SYMBIOSIS WITH *STEINERNEMA* *LONGICAUDIUM* ISOLATED FROM BA VI NATIONAL PARK, VIETNAM

LE THI MAI LINH, NGUYEN THI DUYEN, NGUYEN GIANG SON,
PHAM NGOC TUYEN, PHAN KE LONG

SUMMARY

L1 bacterium strain symbiosis with *S. longicaudum* was isolated from Ba Vi National Park, Viet Nam, has been studying the development characteristics, colony morphology and 16S RNA ribosomal sequence. In our study L1 bacterium strain could be to kill insect by septicemia. Morphology and characteristics development L1 bacterium colony have specific traits as: zigzag border, smooth surface, not protruding, adsorb dye and can change the color of medium surrounding. 16S-rDNA sequences analysis results showed that L1 bacterium strain belongs genus *Xenorhabdus* and has closely relationship to *X. ehlersii* and *X. budapestensis*.