

ĐẶC ĐIỂM TRÌNH TỰ 16S-rDNA CỦA CHỦNG VI KHUẨN CỘNG SINH VỚI TUYẾN TRÙNG *Heterorhabditis indica* Ở VIỆT NAM

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

*Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật,
Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam*

PHAN KẾ LONG

*Bảo tàng Thiên nhiên Việt Nam,
Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam*

Tuyến trùng ký sinh gây bệnh côn trùng *Heterorhabditis* spp. từ lâu đã được biết là vật chủ mang vi khuẩn cộng sinh thuộc chi *Photorhabdus*. Nguồn vi khuẩn cộng sinh này có tiềm năng ứng dụng rất lớn bởi khả năng sinh ra các chất thứ cấp có hoạt tính sinh học như: Khả năng kháng sinh, ngăn chặn sự tăng sinh của các tế bào ung thư... Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành tìm hiểu về mối quan hệ di truyền của chủng vi khuẩn cộng sinh với tuyến trùng *Heterorhabditis indica* ở Việt Nam với các chủng cùng chi để xác nhận khả năng phân lập được chủng vi khuẩn có giá trị.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vi khuẩn cộng sinh được phân lập từ khoang ruột tuyến trùng *Heterorhabditis indica* hiện lưu trữ tại Phòng Tuyến trùng học, Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật, bằng môi trường phân lập: 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.

Gây nhiễm tuyến trùng *H. indica* mang vi khuẩn cộng sinh trên vật chủ là ấu trùng bướm sấp 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. 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.

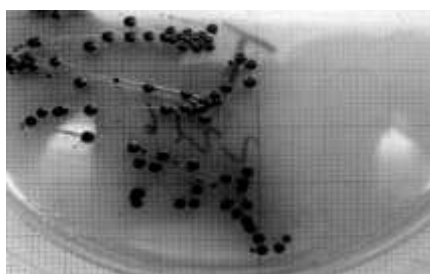
Giải trình tự DNA: Tách chiết DNA tổng số từ khuẩn lạc đơn sử dụng EZ-10 spin column Genomic DNA MiniPreps Kit for Bacteria (Bio Basic, Canada). Nhân bản một phần vùng gen 16S ribosomal RNA có kích thước khoảng 1200bp bằng kỹ thuật PCR sử dụng Taq Mastermix 2X (Qiagen, Đức) trên máy Eppendorf Mastercycler. 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 *Photorhabdus* đã được công bố trên Genbank, trình tự mồi như sau: Mồi xuôi U16SF: 5'-TCC TAC GGG AGG CAG CAG TG-3', mồi ngược PXR: 5'-TAC GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3'. Chu trình nhiệt phản ứng: 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%, băng sản phẩm đúng kích thước thiết kế được cắt và tinh sạch bằng Qiaquick gel extraction kit (Qiagen, Đức). Phản ứng giải trình tự trực tiếp sản phẩm PCR sử dụng BigDye terminator cyclor v3.1 (Applied Biosystem, Mỹ). Mồi dùng trong phản ứng giải trình tự gồm có: 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), phần mềm MEGA 5 (Tamura K. *et al.*, 2011) được dùng để phân tích khoảng cách di truyền và xây dựng cây phát sinh chủng loại theo các phương pháp Maximum Parsimony (MP) (Eck R. V. and Dayhoffm. O., 1966), Minimum Evolution (ME) (Rzhetsky A. and Neim., 1992).

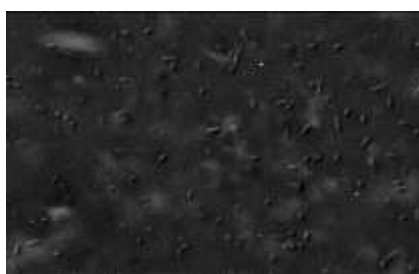
II. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

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

Chủng vi khuẩn phân lập được ký hiệu là D9.



Hình 1. Khuẩn lạc của chủng vi khuẩn D9



Hình 2. Tế bào chủng vi khuẩn D9

Chủng vi khuẩn D9 phát triển mạnh nhất ở điều kiện nhiệt độ 30°C, sau thời gian nuôi cấy 24h khuẩn lạc đạt tới đường kính 2mm. Khuẩn lạc có rìa không đều, bề mặt nhẵn, không lồi có màu đỏ sẫm. Hoạt động trao đổi chất của vi khuẩn ở pha sơ cấp hấp thụ màu thuốc nhuộm và khiến môi trường xung quang chuyển sang xanh nhạt (hình 1).

Quan sát dưới kính hiển vi quang học ở độ phóng đại 1000 lần, các tế bào vi khuẩn chủng D9 có dạng hình que, kích thước khoảng 1 × 3-5 (µm × µm), có tiên mao, di chuyển được (hình 2).

2. Đặc điểm trình tự 16S-rDNA của chủng vi khuẩn D9

Kết quả đọc và ghép nối trình tự nucleotide chủng vi khuẩn D9 thu được trình tự nucleotide có chiều dài 1122bp. Kết quả tìm kiếm trình tự nucleotide tương đồng với cơ sở dữ liệu các trình tự hiện có trên Genbank (BLASTn) cho thấy chủng D9 thuộc loài *Photorhabdus luminescens* và có trình tự tương đồng 99% với trình tự 16S-rDNA chủng *P. luminescens* subsp. *akhurstii* mã hiệu NR_028869.1 (hình 3).

```

ref|NR_028869.1| Photorhabdus luminescens subsp. akhurstii strain FRG04
16S ribosomal AFN, partial sequence
Score = 2052 bits (1111), Expect = 0.0
Identities = 1115/1119 (99%), Gaps = 0/1119 (0%)
Strand=Plus/Plus
Query 1 CAATGGGCGCAAGCCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCCTTCGGGTTGTAA 60
Sbjct 361 CAATGGGCGCAAGCCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCCTTCGGGTTGTAA 420
Query 61 AGTACTTTCAGCGGGGAGGAAGGATTGAACCTGAAACAGGGTTGGACCTTGACGTTACCCG 120
Sbjct 421 AGTACTTTCAGCGGGGAGGAAGGATTGAACCTGAAACAGGGTTGGAYTTGACGTTACCCG 480
Query 1021 TGTACACACGCCCGCTCACACCATGGGAGTGGGTTGCAAAAGAAGTCGGTAGCTTAACCT 1080
Sbjct 1381 TGTACACACGCCCGCTCACACCATGGGAGTGGGTTGCAAAAGAAGTCGGTAGCTTAACCT 1440
Query 1081 TTTTGGAGGGCGCTGACCACCTTTGTGGCTCATGACTGGG 1119
Sbjct 1441 TTTTGGAGGGCGCTGACCACCTTTGTGGCTCATGACTGGG 1479
    
```

Hình 3. Một phần kết quả BLAST trình tự nucleotide chủng vi khuẩn D9

Kết quả so sánh tương đồng trình tự các loài vi khuẩn thuộc chi *Photothabdus* tại locus nghiên cứu cho thấy các đặc trưng biến đổi nucleotide thể hiện trong bảng 1.

Bảng 1

Sự biến đổi nucleotide của nhóm *Photothabdus*

Chỉ số	ii	si	sv	R
Giá trị	1083	18	17	1,1

Ghi chú: **ii:** Số vị trí không có biến đổi; **si:** Số vị trí có thay thế đồng nhóm (đồng hoán); **sv:** Số vị trí có thay thế khác nhóm (dị hoán); **R:** Tương quan đồng hoán/dị hoán (si/sv)

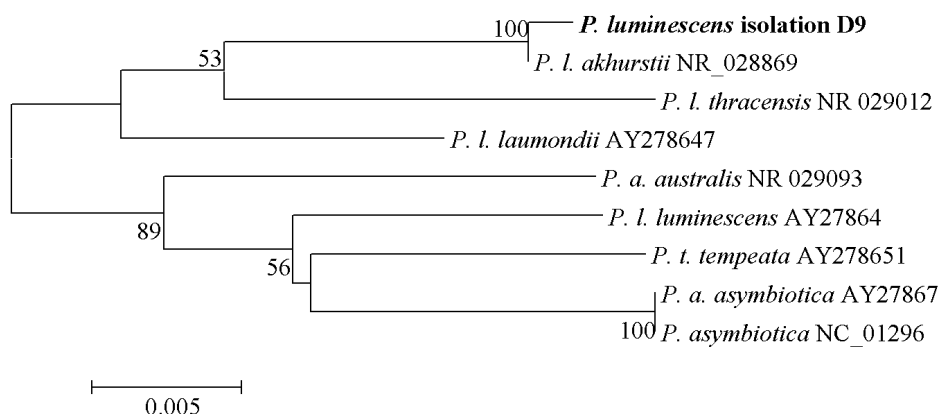
Sử dụng mô hình Jukes-Cantor 1 tham số, phân phối đồng đều để xây dựng ma trận khoảng cách di truyền và xây dựng cây phát sinh chủng loại (Nei et Kumar S., 2000).

Bảng 2

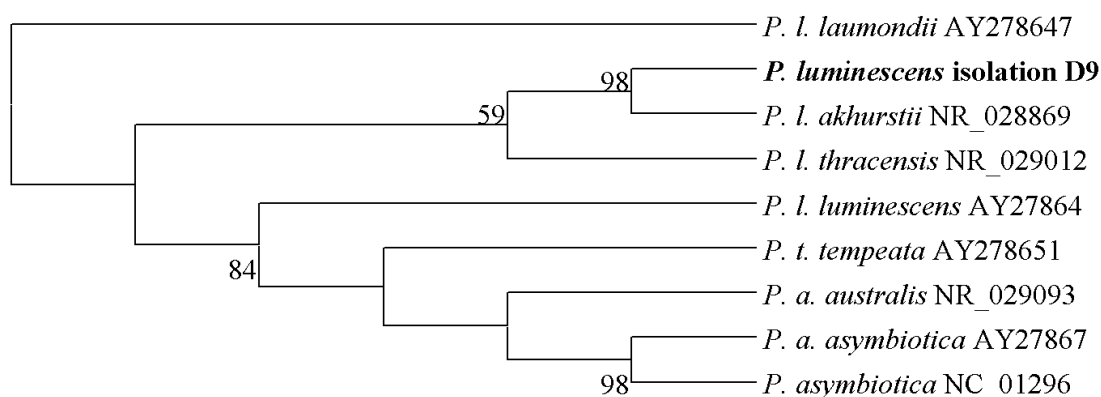
Ma trận khoảng cách di truyền của nhóm *Photothabdus* theo mô hình Jukes-Cantor

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1. <i>Photothabdus</i> sp.D9									
2. <i>p.luminescens. akhurstii</i> .NR 028869	0.000								
3. <i>p.luminescens. laumondii</i> .AY278647	0.022	0.019							
4. <i>P.l.thracensis</i> .NR 029012	0.026	0.023	0.037						
5. <i>p. luminescens. luminescens</i> .AY27864	0.036	0.032	0.031	0.042					
6. <i>p.asymbiotica. australis</i> . NR 029093	0.038	0.035	0.036	0.040	0.038				
7. <i>p.asymbiotica. asymbiotica</i> .AY27867	0.042	0.040	0.036	0.045	0.022	0.025			
8. <i>P.asymbiotica</i> .NC 01296	0.042	0.040	0.036	0.045	0.022	0.025	0.000		
9. <i>p.temperata. tempeata</i> .AY278651	0.043	0.041	0.038	0.030	0.024	0.033	0.023	0.023	

Ma trận khoảng cách di truyền được trình bày trong bảng 2 cho thấy khoảng cách di truyền giữa trình tự của *P. luminescens* chủng D9 với trình tự các loài trong nhóm từ 0-0,043. Cây phát sinh chủng loại xây dựng theo 2 phương pháp khác nhau ME (hình 4) và MP (hình 5) thể hiện các quan hệ di truyền gần gũi giữa chủng D9 với phân loài *P. l. akhurstii*.



Hình 4. Cây phát sinh chủng loại ME của nhóm *Photothabdus*



Hình 5. Cây phát sinh chủng loại MP của nhóm *Photorhabdus*

III. KẾT LUẬN

Đã phân lập được chủng vi khuẩn D9 cộng sinh với tuyến trùng *H. indica* với những đặc điểm gây nhiễm trùng huyết côn trùng, có sự phát triển và hình thái khuẩn lạc đặc trưng. Phân tích trình tự gen 16S RNA ribosomal đã chỉ ra vị trí phân loại của chủng vi khuẩn này thuộc loài *Photorhabdus luminescens* và có quan hệ di truyền khá gần gũi với phân loài *P. l. akhurstii*.

Lời cảm ơn: Bài báo được hoàn thành với sự trợ giúp kinh phí của đề tài hỗ trợ cán bộ trẻ của Viện Hàn lâm Khoa học Công nghệ Việt Nam mã số IEBR.CBT.ThS10/2013.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chen G., Dunphy G. B., Webster J.M., 1994. *Biological Control*, 4: 157-162.
2. Hu K., Li J., Webster J.M., 1999. *Nematology*, 1: 457-469.
3. Nguyen K. B., Smart G. C., 1995. *Journal of Nematology*, 27: 206-212.
4. Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Neim., Kumar S., 2011. *Molecular Biology and Evolution*, 28: 2731-2739.

16S-rDNA SEQUENCE CHARACTERISTICS OF BACTERIA SYMBIOSIS WITH *Heterorhabditis indica* IN VIET NAM

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

SUMMARY

Bacterium symbiosis with *H. indica* (Entomo pathogenic nematoda) was isolated and assigned as isolation D9. In this study, strain D9 could be to kill insect by septicemia. Morphology and characteristics development of strain D9 have specific traits as: Colony has zigzag border, smooth surface, not protruding, adsorb dye to change the color of medium surrounding. Comparison of 16S-rDNA sequences showed that strain D9 belongs species *Photorhabdus luminescens* and has closely relationship with *P. l. akhurstii*.