

**HIỆU LỰC GÂY CHẾT VÀ KHẢ NĂNG SINH SẢN CỦA
HAI CHỦNG TUYẾN TRÙNG KÝ SINH GÂY BỆNH CÔN TRÙNG
S-PQ16 VÀ H-KT3987 TRÊN BƯỚM SÁP LỚN (*Galleria mellonella*)
TRONG ĐIỀU KIỆN PHÒNG THÍ NGHIỆM**

ĐỖ TUẤN ANH, NGUYỄN HỮU TIỀN, NGUYỄN NGỌC CHÂU
*Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật,
Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam*

Các loài tuyến trùng ký sinh gây bệnh côn trùng (Entomopathogenic nematode – EPN) thực chất là những tổ hợp cộng sinh bắt buộc giữa tuyến trùng ký sinh thuộc 2 giống *Steinernema* (Họ Steinernematidae) và *Heterorhabditis* (Họ Heterorhabditidae) và vi khuẩn gây bệnh của 2 giống *Caenorhabdus* và *Photobacterium* tạo nên những tổ hợp ký sinh gây bệnh tuyến trùng – vi khuẩn. Những tổ hợp này có nhiều ưu thế trong phòng trừ sinh học sâu hại do chúng có được một số tính chất đặc biệt như: có khả năng ký sinh gây bệnh cho nhiều loại sâu hại khác nhau; gây chết vật chủ nhanh chóng trong vòng 24 - 48h; không độc với người, động vật, thực vật và môi trường; có thể được sản xuất cho sinh khối lớn bằng cả phương pháp *in vivo* và *in vitro*.

Khả năng sinh sản của tuyến trùng EPN để tạo ra số lượng lớn ấu trùng cảm nhiễm (infective juveniles - IJs) trong cơ thể vật chủ từ một vài IJs ban đầu là yếu tố quyết định trong việc sản xuất sinh khối lớn EPN để sử dụng trong phòng trừ sinh học sâu hại. Một trong những ưu thế của tuyến trùng trong phòng trừ sâu hại là khả năng sinh sản của chúng rất cao, trên một ấu trùng bướm sáp lớn (BSL) là 200.000 IJs của *S. feltiae* và 350.000 IJs của *H. bacteriophora*. Tuy nhiên, sản lượng trung bình thì nhỏ hơn, chỉ vào khoảng 30.000 đến 50.000 IJs trên một ấu trùng BSL. Sản lượng IJs thu được từ cơ thể côn trùng cũng rất khác nhau, phụ thuộc vào khả năng sinh sản của các chủng, sự miễn cảm của vật chủ và sinh khối vật chủ và được coi như là một chỉ tiêu quan trọng để đánh giá tiềm năng sinh học của một chủng EPN trong phòng trừ sinh học sâu hại.

Bài báo này đánh giá hiệu lực gây chết và khả năng sinh sản của 2 chủng tuyến trùng S-PQ16 và H-KT3987, đồng thời xác định nồng độ gây nhiễm tối ưu trên vật chủ là bướm sáp lớn (*Galleria mellonella* - BSL).

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Bướm sáp lớn - BSL (*Galleria mellonella*): được nhập nội và nhân nuôi trong phòng thí nghiệm ở tủ nuôi sâu chuyên dụng bằng thức ăn tự nhiên bánh tổ ong. Sau đó được thu ở giai đoạn ấu trùng tuổi cuối (last instar larva), được xử lý nhiệt để chống việc tạo kén và được bảo quản ở nhiệt độ 12 - 14°C. Số lượng ấu trùng BSL được sử dụng cho thí nghiệm khoảng 225 con.

Tuyến trùng: sử dụng 2 chủng là S-PQ16 thuộc loài *Steinernema guangdongensis* được phân lập từ đất cát ven biển ở đảo Phú Quốc, tỉnh Kiên Giang và chủng H-KT3987 thuộc loài *Heterorhabditis indica* được phân lập tại Vườn quốc gia Chư Mom Ray, tỉnh Kon Tum. Hai chủng tuyến trùng trên được phân lập từ mẫu đất cát theo phương pháp côn trùng bẫy (insect baiting trap) sử dụng ấu trùng Bướm sáp lớn. Các chủng EPN này được bảo quản trong nước cất ở nhiệt độ 12 - 14°C.

Quy trình thử nghiệm: mỗi đĩa petri đường kính 9 cm được đặt vào 5 BSL trên giấy lọc ẩm đã bơm tuyến trùng. Mỗi thí nghiệm có 6 công thức ở 6 nồng độ IJs khác nhau từ 30 đến 80 IJs/ấu trùng. Số lượng BSL dùng trong thí nghiệm từ 180 đến 200 con. Theo dõi sau 48 giờ, các BSL chết được ghi lại và chuyển ra ủ trên giấy lọc ẩm khoảng 3 ngày đối với chủng S-PQ16 và

khoảng 14 ngày với chủng H-KT3987. Sau đó, ấu trùng cảm nhiễm được thu bằng bẫy nước hàng ngày. Số lượng IJs được đếm trên đĩa đếm dưới kính hiển vi soi nổi và giá trị trung bình IJs sản sinh trên mỗi BSL được xử lý thống kê theo Anon [1].

II. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

1. Hiệu lực gây chết bướm sáp lớn của hai chủng EPN

Thí nghiệm đánh giá hiệu lực gây chết GM của hai chủng EPN được tiến hành ở các nồng độ từ 30 IJs/BSL đến 80 IJs/BSL. Tỷ lệ sâu chết sau 48h gây nhiễm được trình bày ở bảng 1 dưới đây.

Bảng 1

Hiệu lực gây chết BSL (*Galleria mellonella*) của hai chủng EPN
($T = 25 \pm 3^{\circ}\text{C}$; $H = 80 \pm 5\%$)

Nồng độ nhiễm (IJs)	Số lượng sâu thí nghiệm	Hiệu lực gây chết			
		S-PQ16		H-KT3987	
		Số sâu chết	Tỷ lệ (%)	Số sâu chết	Tỷ lệ (%)
30	15	8	53,3	6	40,0
40	15	10	66,7	8	53,3
50	15	13	86,7	11	73,3
60	15	11	73,3	12	80,0
70	15	14	93,3	13	86,7
80	15	15	100,0	14	93,3
C_{50}		21		35	
Đối chứng	15	0	0	0	0

Số liệu từ bảng 1 cho thấy: Sau 2 ngày gây nhiễm, ở nồng độ 30 IJs đã có 53,3% sâu chết bởi chủng S-PQ16; còn ở chủng H-KT3987 chỉ có 40% sâu chết và tỷ lệ chết đạt 53,3% khi nồng độ nhiễm là 40 IJs. Khi tăng nồng độ gây nhiễm lên thì tỷ lệ sâu chết tăng dần lên ở chủng H-KT3987 và đạt cao nhất là 93,3% ở công thức nồng độ 80 IJs. Còn đối với chủng S-PQ16, tỷ lệ sâu chết giảm còn 73,3% ở nồng độ 60 IJs, tỷ lệ chết tăng trở lại khi nhiễm ở nồng độ 70 IJs và đạt tỷ lệ cực đại là 100% ở công thức nồng độ 80 IJs.

Giá trị $LC_{50} = 21$ IJs ở chủng S-PQ16 là thấp hơn so với $LC_{50} = 35$ IJs chủng H-KT3987 và giá trị này cũng được coi là khá thấp, chứng minh cho độc lực của chủng S-PQ16 là khá mạnh đối với ấu trùng bướm sáp lớn.

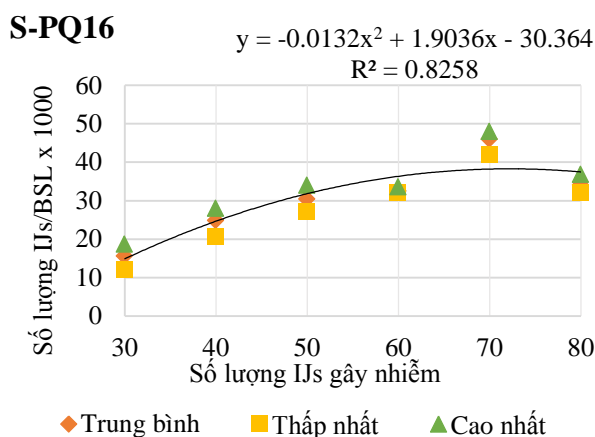
2. Khả năng sinh sản của các chủng EPN trên bướm sáp lớn

Khả năng sinh sản của tuyến trùng là yếu tố quyết định đến sản xuất sinh khối chế phẩm sinh học tuyến trùng. Thí nghiệm đánh giá khả năng sinh sản của 2 chủng EPN trên BSL được tiến hành ở 6 nồng độ IJs ban đầu khác nhau từ 30 IJs đến 80 IJs trên một ấu trùng BSL.

Trong thí nghiệm với chủng S-PQ16 với 6 công thức nồng độ gây nhiễm cho thấy: Ở nồng độ gây nhiễm 30 IJs cho sản lượng IJs thấp nhất là $15,6 \times 10^3$ IJs/BSL. Khi nồng độ IJs gây nhiễm tăng lên thì sản lượng IJs cũng tăng lên và đạt giá trị trung bình cao nhất là $46,0 \times 10^3$ IJs/BSL ở nồng độ 70 IJs. Khi số lượng gây nhiễm tăng lên 80 IJs thì sản lượng thu được giảm còn $34,1 \times 10^3$ IJs/BSL (Bảng 2).

Mối quan hệ giữa nồng độ IJs gây nhiễm ban đầu và sản lượng IJs thu được trên 1 BSL được biểu diễn đặc trưng là hàm số tương quan bậc 2: $Y = -ax^2 + bx + c$ với hệ số tương quan

(R^2) có thể có giá trị âm (-) hoặc (+). Đồ thị biểu diễn hàm bậc hai là một đường parabol chuẩn (good-ness-of-fit-test) cho thấy sản lượng IJs cao nhất chỉ tương ứng với nồng độ IJs gây nhiễm ban đầu nhất định (Hình 1, 2). Nếu số lượng IJs gây nhiễm cao hoặc thấp hơn đều làm giảm sản lượng. Điều này có thể giải thích theo cơ chế nồng độ ban đầu là tối ưu với sinh khối của vật chủ để EPN có thể sản sinh ra các thể hệ thích hợp nhất trong cơ thể vật chủ. Khi nồng độ IJs gây nhiễm ban đầu quá ít, EPN sẽ không tận dụng được hết nguồn thức ăn để sinh ra nhiều IJs, ngược lại nồng độ gây nhiễm ban đầu quá lớn sẽ dẫn đến việc cạnh tranh thức ăn giữa các cá thể.



Hình 1: Tương quan giữa nồng độ gây nhiễm và sản lượng IJs của chủng S-PQ16 trên BSL

Bảng 2

Sản lượng IJs của chủng S-PQ16/LIL ($T = 25 \pm 3^\circ\text{C}$; $H = 80 \pm 5\%$)

ND nhiễm (IJs)	Số lượng IJs / LIL ($\times 10^3$)		
	Trung bình (\pm SD)	Thấp nhất	Cao nhất
30	15,6 \pm 2,7	12,0	18,7
40	24,8 \pm 3,0	20,8	28,0
50	30,4 \pm 2,8	27,2	34,0
60	32,5 \pm 0,8	32,0	33,6
70	46,0 \pm 2,8	42,0	48,0
80	34,1 \pm 2,0	32,0	36,8

Bảng 3

Sản lượng IJs của chủng H-KT3987/LIL ($T = 25 \pm 3^\circ\text{C}$; $H = 80 \pm 5\%$)

ND nhiễm (IJs)	Số lượng IJs / LIL ($\times 10^3$)		
	Trung bình (\pm SD)	Thấp nhất	Cao nhất
30	122,7 \pm 2,5	120,0	126,0
40	132,4 \pm 1,2	131,2	134,0
50	153,2 \pm 5,7	146,0	160,0
60	177,6 \pm 4,7	172,8	184,0
70	162,4 \pm 2,8	158,4	164,8
80	142,3 \pm 3,0	138,6	146,0

Từ số liệu thu được từ bảng 2 có thể kết luận rằng: Nồng độ IJs gây nhiễm tối ưu của chủng S-PQ16 trên ấu trùng GM là 70 IJs/BSL. Giá trị của hàm số tương quan $R^2 = 0,8274$ đã chỉ ra mức độ tương quan giữa nồng độ gây nhiễm và sản lượng IJs thu được của chủng S-PQ16 trên một vật chủ GM là khá chặt chẽ.

Số liệu thí nghiệm về sự tương quan giữa nồng độ gây nhiễm ban đầu và sản lượng IJs thu được ở chủng H-KT3987 trên ấu trùng BSL được trình bày ở bảng 3 cho thấy: số lượng IJs thu được trung bình thấp nhất là 122,7 $\times 10^3$ ở 30 IJs ban đầu và tăng dần lên đến 132,4 $\times 10^3$ ở 40

IJs và $153,2 \times 10^3$ ở 50 IJs gây nhiễm ban đầu. Sản lượng trung bình cao nhất $177,6 \times 10^3$ ứng với số lượng 60 IJs gây nhiễm. Mức cao nhất thực tế khi làm thí nghiệm là $184,0 \times 10^3$ IJs trên một ấu trùng BSL. Sau đó sản lượng giảm dần xuống $162,4 \times 10^3$ và $142,3 \times 10^3$ IJs ứng với số lượng gây nhiễm ban đầu là 70 và 80 IJs. Như vậy, mỗi chủng EPN có một nồng độ gây nhiễm tối ưu đối với mỗi loài côn trùng vật chủ. Nồng độ cao hơn hoặc thấp hơn đều không đạt được sản lượng tối ưu. Kết quả này phù hợp với các nghiên cứu trước đây tiến hành trên BSL và trên các loại sâu hại khác [3, 4, 6].

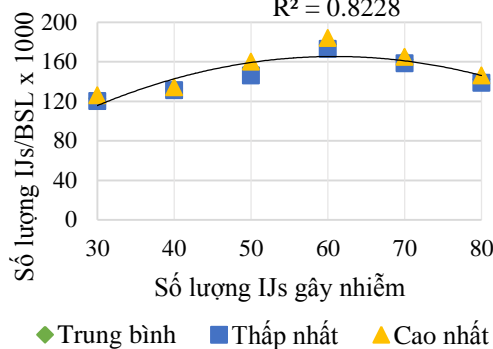
Tương quan giữa số lượng gây nhiễm ban đầu và sản lượng IJs thu được đối với chủng H-KT3987 trên ấu trùng BSL biểu hiện chặt chẽ ($R^2 = 0,823$). Đường biểu thị sản lượng IJs thu được qua các nồng độ gây nhiễm ban đầu từ thấp đến cao là một parabol lồi, điều này cho thấy sản lượng sinh sản cao nhất của chủng H-KT3987 tương ứng với một nồng độ gây nhiễm ban đầu thích hợp nhất – chính là 60 IJs – và nồng độ này được coi là nồng độ gây nhiễm tối ưu.

Khả năng sinh sản của 2 chủng tuyến trùng (Hình 3) cho thấy có sự sai khác khá lớn về nồng độ gây nhiễm tối ưu và sản lượng IJs trên ấu trùng BSL. Sản sinh ra số lượng IJs lớn nhất của chủng tuyến trùng S-PQ16 trên BSL ứng với nồng độ gây nhiễm 70 IJs, còn đối với chủng H-KT3987 ứng với nồng độ gây nhiễm là 60 IJs/BSL – là ít hơn so với chủng S-PQ16, trong khi sản lượng IJs thu được cao đến $177,6 (\pm 4,7)$ IJs/BSL, cao hơn gấp 4 lần chủng S-PQ16 ($40,6 \pm 2,8$ IJs).

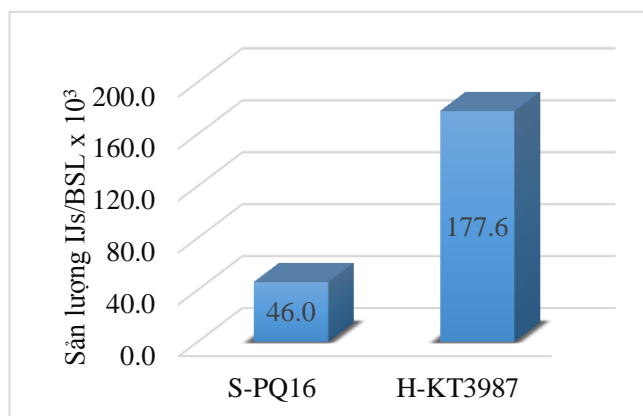
Nhìn chung, hai chủng EPN bản địa S-PQ16 và H-KT3987 đều có hiệu lực gây chết khá cao đối với ấu trùng bươm sấp lớn. Hơn nữa, cả 2 chủng này đều có khả năng sinh sản tốt, với sản lượng IJs ở mức trung bình khá (S-PQ16) và cao (H-KT3987) so với các chủng trên thế giới, trung bình từ 46,0 đến 177,6 IJs/BSL (một trong những chủng có khả năng sinh sản tốt nhất trên thế giới là chủng *S. carpocapsae* DD-136 sản lượng có thể tới 200.000 IJs/BSL) [2, 8]. Do vậy, chúng có thể đáp ứng tiêu chuẩn của tác nhân sinh học trong việc sản xuất và sử dụng cho phòng trừ sinh học sâu hại tại Việt Nam. Tuy nhiên, cần nghiên cứu thêm về hiệu lực gây chết cũng như khả năng sinh sản của hai chủng này trên các loại sâu hại khác nhau để có thể kết luận chính xác hơn về tiềm năng sử dụng hai chủng này trong phòng trừ sinh học sâu hại.

Lời cảm ơn: Công trình được hoàn thành trong khuôn khổ đề tài VAST.ĐL.04/13-14 với tài trợ của Viện Hàn lâm KH & CN Việt Nam.

H-KT3987 $y = -0.0523x^2 + 6.3622x - 27.956$
 $R^2 = 0.8228$



Hình 2: Tương quan giữa nồng độ gây nhiễm và sản lượng IJs của chủng H-KT3987 trên BSL



Hình 3: So sánh số lượng IJs trung bình cao nhất thu được/ấu trùng giữa 2 chủng EPN

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Anon**, 1988. SAS technical report. Additional SAS/STAT Procedures. Release 6.03. SAS Institute, Cary, NC, USA: 179.
2. **Bedding R. A., A. S. Molyneux, R. J. Akhurst**, 1983. Exp. Parasit., 55: 249-257.
3. **Cabanillas H. E., J. S. Raulston**, 1994. Fundam. Appl. Nematology, 17: 212-223.
4. **Lại Phú Hoàng, Nguyễn Ngọc Châu**, 2003. Nghiên cứu sự phát triển và sinh sản trên bướm sáp lớn (*Galleria mellonella*) của một số chủng tuyến trùng ký sinh gây bệnh côn trùng. Những vấn đề nghiên cứu cơ bản trong khoa học sự sống. Nxb. KHKT, Hà Nội: 463-466.
5. **Mason J. M., A. R. Razak, D. J. Wright**, 1996. Journal of Helminthology, 70: 303-307.
6. **Nguyen, K. B., G. C. Smart**, 1991. J. Nematol., 23(1): 7-11.
7. **Nguyễn Ngọc Châu**, 1998. Tạp chí Khoa học và Công nghệ, 36(3): 24-29.
8. **Nguyễn Ngọc Châu**, 2008. Tuyến trùng ký sinh gây bệnh côn trùng ở Việt Nam. Nxb. KHTH & CN, Hà Nội, 302 trang.
9. **Woodring J. L., H. K. Kaya**, 1998. Steinernematid and heterorhabditid nematodes. A handbook of techniques, Arkansas Experiment Station, Fayetteville, Arkansas, USA, South Cooperative Series Bulletin, 33: 11-30.
10. **Wouts W.M.**, 1991. Steinernema (Neoplectana) and Heterorhabditis species. In: Nickle, W.R. (E.d.). Manual of Agricultural Nematology, Marcel Dekker Inc., New York, p. 885-897.

PATHOGENICITY AND REPRODUCTION CAPABILITY OF TWO ENTOMOPATHOGENIC NEMATODES STRAINS (S-PQ16 AND H- KT3987) ON GREAT WAX MOTH (*Galleria mellonella*) IN THE LABORATORY CONDITION

DO TUAN ANH, NGUYEN HUU TIEN, NGUYEN NGOC CHAU

SUMMARY

The evaluation experiments on pathogenicity and reproduction capability of two indigenous entomopathogenic nematode strains (S-PQ16 and H-KT3987) were conducted on *Galleria mellonella* (GM) in laboratory condition. The tested results showed the lethal effect of strain S-PQ16 is moderate strong with $LC_{50} = 21$ and the highest yield is $46,0 \pm 2,8 \times 10^3$ IJs at the infected concentration of 70 IJs. In comparison, the highest yield of strain H-KT3987 with $177,6 \pm 4,7 \times 10^3$ IJs/GM at the infected concentration of 60 IJs showed high lethal effect and also strong toxic with $LC_{50}=35$. With high confidential value ($R^2=0,823$) the correlation between infected concentration and yielded IJs, strain H-KT3987 is being potential for biocontrol. The highest reproduction of H-KT3987 at infected concentration of 60 IJs that considered optimal infected concentration.

Although the considerable differences at infected concentrations and yielded IJs on *Galleria mellonella*, both strains S-PQ16 and H-KT3987 need to be conducted on insect pests to evaluate their potentials for biocontrol.