

ẢNH HƯỞNG NỒNG ĐỘ GLYCERIN ĐẾN TỶ LỆ SỐNG CỦA LOÀI TUYẾN TRÙNG *Heterorhabditis indica* (CHŨNG H-NT3) KHI BẢO QUẢN TRONG NITƠ LỎNG

NGUYỄN THỊ DUYÊN, LÊ THỊ MAI LINH,
TRÌNH QUANG PHÁP, 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 thuộc hai giống *Steinernema* và *Heterorhabditis* là những loài ký sinh bắt buộc và gây bệnh cho côn trùng (EPNs). Chúng có nhiều ưu thế của một tác nhân sinh học như: phổ diệt sâu hại rộng; thời gian tìm kiếm và tiêu diệt vật chủ nhanh chóng; có khả năng tự sản sinh tăng số lượng do đó có thể sản xuất sinh khối lớn; an toàn cho người, động vật, sinh vật có ích, thực vật và môi trường; có thể tương hợp với nhiều biện pháp kiểm soát sâu hại khác [7].

Một số phương pháp bảo quản và giữ nguồn tuyến trùng EPNs gặp khó khăn trong duy trì độc lực, cũng như vi khuẩn cộng sinh. Cho đến nay, bảo quản trong nitơ lỏng vẫn được xem là phương pháp tối ưu nhất trong bảo quản tuyến trùng EPNs, do thời gian bảo quản dài hơn và không làm thay đổi độc lực của tuyến trùng như các phương pháp khác. Tuy nhiên, tỷ lệ sống và độc lực của tuyến trùng sau khi bảo quản trong nitơ lỏng phụ thuộc vào nhiều yếu tố như: nguồn gốc các chủng/loài EPNs, nồng độ glycerin, nồng độ tuyến trùng, thời gian làm tan đông [8, 9].

Chủng tuyến trùng *Heterorhabditis indica*. H-NT3 là một chủng bản địa có nhiều ưu điểm nổi bật như: khả năng di chuyển nhanh, sinh sản cho sinh khối lớn, độc lực rất mạnh và phổ vật chủ rộng. Đặc biệt, đã được thử nghiệm trên đồng ruộng phòng trừ sâu keo da láng hại nho ở Ninh Thuận và cho kết quả khá tốt [7]. Tuy nhiên, so với các thử nghiệm trước thì độc lực của chủng tuyến trùng này đã bị giảm đi rất nhiều.

Do vậy, trong nghiên cứu này chúng tôi đưa ra ảnh hưởng của nồng độ glycerin đến tỷ lệ sống của chủng tuyến trùng H-NT3 khi bảo quản trong Nitơ lỏng để lựa chọn nồng độ glycerin tối ưu nhất trong việc bảo quản EPN.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng nghiên cứu

Chủng tuyến trùng H-NT3 thuộc loài *Heterorhabditis indica* Poinar, Karunaka & David, 1992 được phân lập ở Ninh Thuận.

2. Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp xác định ảnh hưởng của nồng độ glycerin đến tỷ lệ sống của tuyến trùng trước khi bảo quản: Theo phương pháp của Curran *et al.* [4]: Hút 100 ml dung dịch chứa ấu trùng cảm nhiễm (IJs) (nồng độ 12.000 IJs/ml) lọc qua máy hút chân không để loại bỏ nước. IJs nằm trên giấy lọc được nhúng vào các đĩa Petri có chứa dung dịch glycerin ở các nồng độ khác nhau. Kiểm tra tuyến trùng sống sau 24h và 48h.

Phương pháp xác định ảnh hưởng của glycerin đến tỷ lệ sống của tuyến trùng sau khi bảo quản trong nitơ lỏng: Tiến hành theo mô tả của Curran *et al.* (1992) và Nurgent *et al.* (1996): Hút 100 ml dung dịch chứa IJs lọc qua máy hút chân không. IJs nằm trên giấy lọc được nhúng vào đĩa Petri chứa dung dịch glycerin với các nồng độ khác nhau. Sau 48h tuyến trùng được lọc qua máy hút chân không, rồi cho vào Methanol 70% đã được làm lạnh -10°C trong 10 phút, sau

đó tuyến trùng được lọc qua máy hút chân không. Giấy lọc chứa IJs đặt vào ống tuýp rồi đưa bình nitơ lỏng. Sau 72h tuyến trùng được lấy ra và làm tan đông bằng dung dịch Ringer. Tuyến trùng nhuộm phloxin B và kiểm tra dưới kính hiển vi soi nổi để xác định tuyến trùng sống.

Phương pháp xác định độc lực của tuyến trùng: Dựa trên nghiên cứu của Cabanillas & Rraulston (1994) với 10 công thức IJs khác nhau. Mỗi công thức gồm 30 ấu trùng bướm sấp lớn, thí nghiệm nhắc lại 3 lần. Thí nghiệm được theo dõi trong 48h ở nhiệt độ 25°C. Sau đó, thống kê số lượng sâu chết do tuyến trùng, sâu bị chết do tuyến trùng có màu đỏ gạch, không có mùi thối, số lượng IJs tăng do tuyến trùng đã sinh sản ra.

Phương pháp xử lý số liệu: Số liệu để tính tỷ lệ sống (%) của tuyến trùng EPNs và tỷ lệ chết (%) của ấu trùng bướm sấp được chuyển sang arsin và xử lý thống kê ANOVA trong chương trình SPSS 13.

II. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

1. Ảnh hưởng nồng độ glycerin đến tỷ lệ sống của chủng tuyến trùng H-NT3

Kết quả thử nghiệm ở các nồng độ glycerin từ 5 đến 20% cho thấy sau 24h ở các nồng độ glycerin khác nhau tỷ lệ sống của tuyến trùng không có sự sai khác nhiều và đều đạt trên 90%. Sau 48h, tỷ lệ sống của tuyến trùng đã có sự sai khác đáng kể và có mối tương quan tỷ lệ nghịch với nồng độ glycerin. Ở các nồng độ glycerin 5, 7,5, 10 và 12,5% tỷ lệ sống không thay đổi nhiều và vẫn đạt tỷ lệ cao trên 95%. Ở nồng độ glycerin 15% tỷ lệ sống giảm còn 89,8% và ở nồng độ 20% tỷ lệ sống của tuyến trùng chỉ đạt 63,3% (bảng 1).

Bảng 1

Tỷ lệ tuyến trùng H-NT3 sống trong dung dịch Glycerin

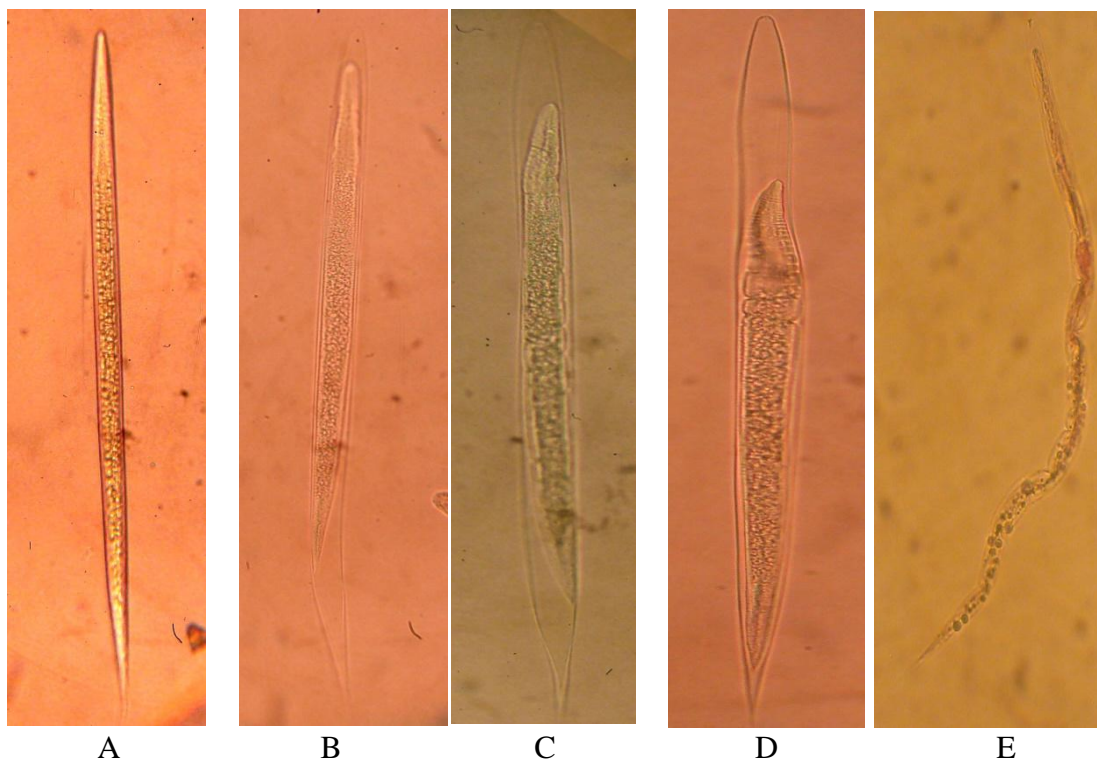
STT	Nồng độ Glycerin (%)	Tỷ lệ tuyến trùng sống (%) (*)	
		Sau 24h	Sau 48h
1	5	99,9 ± 0,2 a	98,3 ± 0,2 a
2	7,5	99,6 ± 0,4 ab	97,4 ± 0,4 a
3	10	99,5 ± 0,4 ab	95,2 ± 0,4 a
4	12,5	98,5 ± 1,3 ab	95,5 ± 1,3 a
5	15	98,3 ± 1,2 b	89,8 ± 1,2 b
6	17,5	95,6 ± 0,8 c	73,3 ± 0,8 c
7	20	93,7 ± 1,2 d	63,3 ± 1,2 d

(*) chữ khác nhau trong cột thể hiện sai khác có ý nghĩa theo Duncan với $P \leq 0,05$, số liệu được chuyển sang arsin trước khi xử lý.

Kết quả trên có thể được giải thích là do nước đóng một vai trò quan trọng trong sự ổn định cấu trúc và chức năng của đại phân tử và duy trì tính toàn vẹn của màng lipid trong các hệ thống sinh học [2]. Khi nước bị mất do thẩm thấu hoặc đóng băng, các màng thấm qua dung môi, hợp nhất và màng hạt có thể tổng hợp dẫn đến gây tử vong [2]. Một số chất bảo quản lạnh như: Trehalose, Glucose, Fructose, Glycerin, Sorbitol,... có tác dụng thay thế lượng nước bị mất do đó làm giảm số lượng băng hình thành trong cơ thể [10]. Quá trình này sẽ ngăn chặn cơ thể bị đóng băng ở nhiệt độ dưới 0°C.

Tuyến trùng EPNs có khả năng tích lũy chất bảo vệ lạnh như trehalose và glycerin để đáp ứng với điều kiện nhiệt độ thấp [8]. Các chất này cũng đã được phát hiện trong cơ thể ấu trùng cảm nhiễm với nồng độ tương đối cao [5]. Một số thử nghiệm cho thấy khi tuyến trùng đóng băng thì nồng độ Glycerin gia tăng đáng kể, còn trehalose thì không có, điều này có thể khẳng định glycerin đóng vai trò quan trọng hơn trehalose trong sự sống còn của tuyến trùng khi đóng

băng. Trehalose không thay đổi trong quá trình đóng băng do đó vai trò của nó như là một chất bảo vệ lạnh trước khi hoặc bắt đầu đóng băng.



Hình 1: Tuyến trùng H-NT3 bị co rút khi ở trong các nồng độ glycerin khác nhau
(A: trong nước cất, B: trong glycerin 12.5%, C: trong glycerin 15%,
D: trong glycerin 17,5%, E: trong glycerin 20%)

Với mỗi một chủng tuyến trùng khác nhau thì cần một nồng độ glycerin khác nhau để bảo vệ cơ thể chịu lạnh. Điều này giải thích vì sao khi xử lý tuyến trùng EPNs ở các nồng độ glycerin khác nhau thì tỷ lệ sống lại khác nhau. Ở các nồng độ glycerin thấp như 5%, 7,5%, 10% và 12,5% tuyến trùng H-NT3 đang tích lũy thêm glycerin nên không ảnh hưởng nhiều đến sự sống của tuyến trùng. Khi tăng nồng độ glycerin lên thì glycerin tích lũy trong cơ thể sẽ tăng lên. Khi nồng độ glycerin tích lũy được vượt quá lượng cần thiết, cơ thể sẽ bị co rút quá mức làm cho tuyến trùng bị chết (hình 1). Vì vậy, ở nồng độ glycerin 17,5 và 20% sau 48h tuyến trùng H-NT3 lại có tỷ lệ chết cao hơn.

Như vậy, sau 24h ở các nồng độ glycerin 5, 15, 17,5 và 20% tỷ lệ sống của tuyến trùng H-NT3 đều cho kết quả sai khác có ý nghĩa, còn ở các nồng độ 7,5, 10 và 12,5% thì tỷ lệ sống không có sai khác. Sau 48h, tỷ lệ sống của tuyến trùng ở các nồng độ glycerin khác nhau đều sai khác có ý nghĩa. Kết quả này tương tự như một số nghiên cứu của Curan *et al.* (1992), Nugent *et al.* (1996), Popiel *et al.* (1991), Bai *et al.* (2004), ... và có tỷ lệ sống cao hơn so với kết quả nghiên cứu của Nguyễn Ngọc Châu (2007). Theo Nguyễn Ngọc Châu (2007), tỷ lệ sống của chủng tuyến trùng H-BY ở nồng độ glycerin 5% là 93% sau 24h và 44% sau 72h. Ở nồng độ glycerin 15% tỷ lệ sống của tuyến trùng lại có kết quả khá thấp, sau 24h là 58% và sau 72h chỉ còn 24% [6]. Điều này cho thấy nồng độ glycerin có sẵn trong cơ thể hai chủng H-NT3 và H-BY là khác nhau.

2. Khả năng sống của chủng tuyến trùng H-NT3 sau khi bảo quản trong nitơ lỏng

Ở nồng độ glycerin là 5 và 7% thì tuyến trùng H-NT3 không thể tồn tại trong nitơ lỏng. Ở nồng độ glycerin 10% đã bắt đầu có một tỷ lệ nhỏ (2,8%) tuyến trùng sống và tỷ lệ này tăng lên 14% khi ở nồng độ glycerin 12,5%. Tuyến trùng H-NT3 có tỷ lệ sống cao nhất là 47% ở nồng độ glycerin 15%. Như vậy, ở các nồng độ glycerin 5, 7,5, 10, và 12,5% nồng độ glycerin mà tuyến trùng tích lũy chưa đủ để bảo vệ cơ thể chống chịu lạnh. Vì thế, khi đưa vào bảo quản trong nitơ lỏng thì tuyến trùng H-NT3 không chịu được lạnh nên tỷ lệ sống rất thấp. Ngược lại, ở nồng độ glycerin cao quá thì cơ thể tuyến trùng bị co rút quá mức, điều này đã ảnh hưởng đến tỷ lệ sống của chúng ngay ở khâu xử lý và khi đưa từ trong nitơ lỏng ra để làm tan đông thì cơ thể không thể phục hồi lại được. Vì vậy mà, tuyến trùng H-NT3 ở nồng độ glycerin 17,5 và 20% bị chết tương đối nhiều sau khi bảo quản trong nitơ lỏng (Bảng 2).

Bảng 2

Tỷ lệ tuyến trùng H-NT3 sống ở các ngưỡng nồng độ glycerin sau khi bảo quản trong nitơ lỏng

STT	Nồng độ Glycerin (%)	Tỷ lệ tuyến trùng sống (%) (*)
1	5	0 a
2	7,5	0 a
3	10	2,8 ± 1,2 b
4	12,5	14 ± 1,7 c
5	15	47,2 ± 1,6 d
6	17,5	17,8 ± 2,6 e
7	20	5,7 ± 2,3 f

(*) chữ khác nhau trong cột thể hiện sai khác có ý nghĩa theo Duncan với $P \leq 0,05$, số liệu được chuyển sang asin trước khi xử lý.

Bảng 3

Tỷ lệ ấu trùng bướm sấp lớn chết trước và sau khi bảo quản chủng tuyến trùng H-NT3 trong nitơ lỏng

STT	Nồng độ IJs	Tổng số sâu thí nghiệm	Số sâu chết		Tỷ lệ sâu chết (%)	
			Trước bảo quản	Sau bảo quản	Trước bảo quản	Sau bảo quản
1	10	30	0	1	0,00	3,33
2	20	30	1	1	3,33	3,33
3	30	30	1	0	3,33	0,00
4	40	30	7	8	23,33	26,67
5	50	30	8	10	26,67	33,33
6	60	30	14	14	46,67	46,67
7	70	30	20	18	66,67	60,00
8	80	30	28	26	93,33	86,67
9	90	30	30	30	100	100,00
10	100	30	30	30	100	100,00

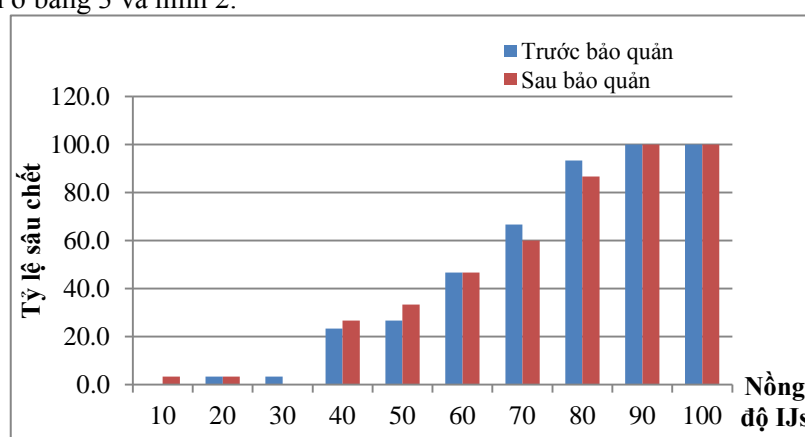
Nồng độ glycerin tối ưu của chủng H-NT3 là 15%. Ở nồng độ này tỷ lệ sống của tuyến trùng đạt giá trị cao nhất (47%). So với kết quả nghiên cứu của Curan, kết quả này có nhỏ hơn tỷ lệ sống trung bình của các chủng thuộc giống *Heterorhabditis* là 51% (25-87%) [4]. Kết quả này cũng nhỏ hơn so với một số chủng như S-TX1, H-MP11, H-CP16 nhưng lại cao hơn các chủng S-TS2, S-XT, S-TG10, H-CP6 mà N. N. Châu đã thử nghiệm [6]. Chủng H-NT3 không thể tồn tại ở nồng độ xử lý glycerin 7.5% sau khi bảo quản trong nitơ lỏng trong thử nghiệm của N. N.

Châu [6] và thí nghiệm của chúng tôi với nồng độ glycerin này thì chủng H-NT3 cũng không có khả năng sống sót. Trong khi đó, mỗi một chủng lại có nồng độ glycerin tối ưu khác nhau, do đó có thể 7.5% không phải là nồng độ tối ưu đối với chủng H-NT3. Vì vậy, chúng không thể tồn tại sau khi bảo quản trong nitơ lỏng. Như vậy, nồng độ glycerin tối ưu của chủng H-NT3 là 15% và ở nồng độ này thì tỷ lệ sống sau bảo quản đạt 47%.

3. Đánh giá độc lực học của chủng tuyến trùng H - NT3 sau khi bảo quản trong nitơ lỏng

Độc lực học của tuyến trùng EPNs là điều kiện quan trọng nhất khi quyết định sử dụng một chủng tuyến trùng trong phòng trừ một loài sâu hại. Tuy nhiên, một số phương pháp bảo quản đã làm giảm hoặc làm mất độc lực của chúng. Một phương pháp bảo quản tuyến trùng EPNs được coi là thành công khi không làm thay đổi (giảm hoặc mất) độc lực.

Kết quả đánh giá độc lực học của tuyến trùng H-NT3 trước và sau khi bảo quản trong nitơ lỏng được thể hiện ở bảng 3 và hình 2.



Hình 2: Đồ thị tỷ lệ ấu trùng bọ sấp lớn chết trước và sau khi bảo quản chủng tuyến trùng H-NT3 trong nitơ lỏng

Dựa vào kết quả cho thấy độc lực của chủng H-NT3 trước và sau khi bảo quản không có sai khác nhiều ở các nồng độ lây nhiễm IJs ban đầu. Ở nồng độ ban đầu 10 IJs thì tỷ lệ sâu chết trước khi bảo quản là 0%, sau bảo quản là 3,33%. Khi nồng độ gây nhiễm ban đầu tăng lên thì tỷ lệ sâu chết cũng tăng lên. Ở nồng độ 60 IJs tỷ lệ sâu chết trước và sau khi bảo quản đều đạt trên 50%, và ở nồng độ 90 IJs tỷ lệ sâu chết đạt 100%. Như vậy, độc lực của chủng tuyến trùng H-NT3 sau khi bảo quản không có sự sai khác so với trước khi bảo quản. Kết quả này cũng tương tự như thử nghiệm của Nguyễn Ngọc Châu (2007) [6].

III. KẾT LUẬN

Tỷ lệ sống của chủng tuyến trùng H-NT3 sau khi bảo quản có mối tương quan tỷ lệ nghịch với nồng độ glycerin khi xử lý. Khi nồng độ glycerin càng cao thì tỷ lệ tuyến trùng chết càng nhiều. Sau 24h xử lý trong dung dịch glycerin ở các nồng độ khác nhau, tỷ lệ sống của tuyến trùng H-NT3 không có sự sai khác nhiều. Sau 48h, tỷ lệ sống của tuyến trùng H-NT3 đạt giá trị cao nhất (98,3%) ở nồng độ glycerin 5%, thấp nhất (63,3%) ở nồng độ glycerin 20%.

Tỷ lệ sống của chủng tuyến trùng H-NT3 phụ thuộc nhiều vào nồng độ glycerin. Ở Nồng độ glycerin 5 và 7,5% tỷ lệ sống của tuyến trùng H-NT3 là 0%, ở nồng độ glycerin 15%, tỷ lệ sống của tuyến trùng đạt giá trị cao nhất. Như vậy, nồng độ glycerin tối ưu của chủng H-NT3 là 15% và tỷ lệ sống sau bảo quản đạt 47%. Kết quả thử nghiệm độc lực sau bảo quản cũng cho thấy độc lực của chủng H-NT3 không thay đổi nhiều so với trước khi bảo quản.

Mặc dù tỷ lệ sống của tuyến trùng H-NT3 sau khi bảo quản chỉ đạt 47%, nhưng đây cũng là thành công bước đầu trong nghiên cứu bảo quản các chủng tuyến trùng EPNs ở Việt Nam.

Lời cảm ơn: Bài báo được hoàn thành với sự trợ giúp kinh phí của đề tài KHCN độc lập cấp Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, mã số: VAST.ĐL.04/13-14

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Bai, C., D. I. Shapiro, R. Gaugler, S. Yi**, 2004. Journal of Nematology 36(3): 281–284.
2. **Beall, P. T.**, 1983. States of water in biological systems. Cryobiology ZO: 324-334.
3. **Cabanillas H. E., Raulston J. R.**, 1994. Fundametal and Applied of Nematology, 17: 212-223.
4. **Curran J., C. Gilbert, K. Butler**, 1992. Journal of Nematology, 24: 269-270.
5. **Lee R. E.**, 1991: Principles of insect low temperature tolerance. In: Insects at Low Temperature. R. E. Lee and D. L. Denlinger. (Eds.). Chapman and Hall, New York, NY: 17-46.
6. **Nguyễn Ngọc Châu, Ralf-Udo Ehlers**, 2007. Tạp chí Sinh học, 29 (4): 13-18.
7. **Nguyễn Ngọc Châu**, 2008: Tuyến trùng ký sinh gây bệnh côn trùng ở Việt Nam, Nxb. KHTN & CN, Hà Nội: 358tr.
8. **Nugent, M. J., S. A. O’Leary, A. M. Burnell**, 1996. Fundametal and Applied of Nematology, 19: 1-6.
9. **Popiel I., E. M. Vasquez**, 1991. Journal of Nematology, 23:432–437.
10. **Zachariassen K. E.**, 1985: Physiology of cold tolerance in insects. Physiological Reviews S5: 799-832.

THE EFFECT OF GLYCERIN CONCENTRATION TO SPECIES *Heterorhabditis indica* (H-NT3 STRAIN) ON SURVIVAL DURING NITROGEN CRYOPRESERVATION

NGUYEN THI DUYEN, LE THI MAI LINH,
TRINH QUANG PHAP, NGUYEN NGOC CHAU

SUMMARY

The H-NT3 nematode strain were isolated in Ninh Thuan province, *Heterorhabditis indica*, which is fast movement, high mass production and high virulence. Especially, they were tested on a grape field in Ninh Thuan province to prevent these fruits from *Spodoptera exigua* prospectly. However, due to being cryopreserved by traditional methods, their virulence was decreased gradually. Cryopreserved in liquid nitrogen is known as one of the best methods to cryopreserved EPNs because it does not change the virulence. According to recent research, the survival rate of the H-NT3 strain after being cryopreserved in liquid nitrogen depends on the concentration of glycerin. Recommended concentration of liquid nitrogen is 15% for this strain. At this ideal concentration, survival rate of nematodes reaches a peak of 47% and the virulence also has no change after the process. However, the survival rate is not high, acceptable in nitrogen preservation. According to this research, different concentrations of glycerin affect on different rate of success in EPNs nematode Cryopreserved in liquid nitrogen.