

**MỘT SỐ DẪN LIỆU SINH HỌC CỦA CHỦNG TUYẾN TRÙNG KÝ SINH  
GÂY BỆNH CÔN TRÙNG S-DK13 (*Steinernema siamkayai*)  
PHÂN LẬP TỪ ĐẮK LẮK, VIỆT NAM**

NGUYỄN NHƯ TRANG, NGUYỄN NGỌC CHÂU  
*Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật,  
Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam*

Tuyến trùng ký sinh gây bệnh cho côn trùng (EPN) thực chất là những tổ hợp cộng sinh giữa các loài tuyến trùng ký sinh thuộc giống *Steinernema* (Họ Steinernematidae) và *Heterorhabditis* (Họ Heterorhabditidae) và các loài vi khuẩn gây bệnh giống *Xenorhabdus* và *Photorhabdus*. Trong đó, tuyến trùng đóng vai trò vừa là ký sinh lại là những véc tơ mang truyền vi khuẩn gây bệnh. Chính vì vậy mà nhóm tuyến trùng này trở thành tác nhân sinh học có nhiều ưu thế trong phòng trừ sinh học sâu hại như: phổ diệt sâu hại rộng, khả năng diệt sâu nhanh, có khả năng tự sản sinh tăng số lượng sau khi đã giết chết sâu hại và có thể sản xuất sinh khối lớn bằng công nghệ sinh học thích hợp in vivo và in vitro.

Tuyến trùng ký sinh gây bệnh côn trùng đã được nghiên cứu ứng dụng rộng rãi và thương mại hóa ở nhiều nước [2]. Ở Việt Nam mặc dù nghiên cứu tuyến trùng EPN chỉ mới được triển khai vài thập niên gần đây và đã đạt được một số thành tựu bước đầu trong việc điều tra phân loại, nghiên cứu, tuyển chọn các chủng tuyến trùng có tiềm năng sinh học ứng dụng vào thực tiễn trong phòng trừ sinh học sâu hại [7-10]. Tuy nhiên, các nghiên cứu cho thấy hầu hết các chủng, loài tuyến trùng được phân lập chủ yếu từ hệ sinh thái tự nhiên mà rất ít hiện diện trong hệ sinh thái nông nghiệp [9]. Vì vậy, việc điều tra phân lập nhóm tuyến trùng này trong các hệ sinh thái nông nghiệp, đặc biệt hệ sinh thái nông nghiệp Tây Nguyên là rất cần thiết.

Bài báo này cung cấp một số dẫn liệu sinh học của chủng tuyến trùng S-DL13 thuộc loài tuyến trùng *Steinernema siamkayai* được phân lập từ hệ sinh thái nông nghiệp Tây Nguyên. Một số dẫn liệu sinh học về sinh trưởng, phát triển và độc lực học cũng như khả năng sinh sản của tuyến trùng trên côn trùng bươm sấp lớn bước đầu cũng được đánh giá và thảo luận.

## **I. MẪU VẬT VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**

### **1. Mẫu vật thí nghiệm**

*Chủng tuyến trùng S-DL13* được phân lập từ đất cà phê ở tỉnh Đắk Lắk, thuộc loài tuyến trùng ký sinh gây bệnh côn trùng *Steinernema siamkaya* lần đầu tiên được phân lập từ Việt Nam, năm 2012 được nhân nuôi và bảo quản tại Phòng Tuyến trùng học, Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật.

*Bướm sấp lớn* – BSL được sử dụng trong thí nghiệm là ấu trùng tuổi 5 (last-instar larvae) của loài *Galleria mellonella* thuộc Bộ côn trùng cánh vẩy (Lepidoptera) được nhân nuôi tại Phòng Tuyến trùng học, Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật.

### **2. Các phương pháp nghiên cứu**

*Phân lập tuyến trùng*: Bằng phương pháp côn trùng bẫy (insect trap) của Bedding & Akhurst (1975) [2]. Các mẫu đất được cho vào hộp nhựa có nắp, dung tích 500 mL, lắc đều để đất cách miệng hộp 2 cm, sau đó cho vào hộp 5 ấu trùng BSL, đậy nắp hộp và lật ngược hộp để trong buồng tối, kiểm tra hàng ngày, chuyển sâu chết sang đĩa petri để ủ và bổ sung số sâu mới vào hộp bẫy.

*Xác định phát triển của tuyến trùng trong côn trùng vật chủ:* được tiến hành theo Elawad et al. (1999) [5]. Mỗi ấu trùng BSL, cùng với 60 ấu trùng cảm nhiễm (IIs) của chủng S-DL13 được cho vào từng đĩa petri (3.5 cm x 1.5 cm) có lót giấy lọc (Whatman No1) giữ ẩm. Đặt các đĩa petri ở nhiệt độ phòng 22-25°C. Định kỳ sau thời gian 12, 24, 36 và 48h tiến hành mổ ấu trùng BSL đã nhiễm tuyến trùng để kiểm tra sự hiện diện của tuyến trùng dưới kính hiển vi soi nổi OLYMPUS SZ-12. Các giai đoạn phát triển của tuyến trùng được xác định dựa vào kích thước tuyến trùng và các đặc trưng hình thái.

*Xác định độc lực của tuyến trùng EPN:* được triển khai theo quy trình của Cabanillas & Raulston (1994) [4] với 12 công thức nồng độ IJs khác nhau: 0, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 IJs. Mỗi công thức gồm 10 ấu trùng BSL, nhắc lại 3 lần. Thí nghiệm được theo dõi trong 48h ở nhiệt độ 27 °C. Thống kê số lượng ấu trùng BSL do tuyến trùng với các đặc điểm: có màu vàng nhạt, gach, nâu, không có mùi thối, da xác chết mềm và dai có thể đàn hồi, có thể quan sát thấy tuyến trùng trong cơ thể xác chết hoặc trên bề mặt.

*Xác định khả năng sinh sản của tuyến trùng:* Khả năng sinh sản của tuyến trùng S-DL13 trên ấu trùng BSL được tiến hành theo Cabanillas & Raulston (1994) [4] với 10 công thức nồng độ ấu trùng cảm nhiễm, từ 10 - 100 IJs / ấu trùng BSL. Mỗi công thức nồng độ sử dụng 10 ấu trùng BSL. Thí nghiệm được lập lại 3 lần. Sau khi gây nhiễm đặt các đĩa petri vào tủ định ôn ở nhiệt độ 27 °C. Theo dõi số ấu trùng BSL chết sau 48 giờ. Sau khi ủ 7-10 ngày, chuyển toàn bộ sâu chết sang bể nước (White trap) để thu hoạch ấu trùng cảm nhiễm (IJs) trong 5 ngày. Đếm số lượng tuyến trùng IJs dưới kính hiển vi soi nổi với đĩa đếm chia ô.

*Xử lý số liệu:* Các số liệu thí nghiệm được xử lý thống kê theo ANOVA trong chương trình thống kê SPSS 11.0 [1]. Số lượng tuyến trùng thu được được chuyển sang giá trị log (x+1). Trên cơ sở số liệu ấu trùng BSL chết ở các nồng độ ấu trùng cảm nhiễm gây nhiễm ban đầu khác nhau có thể tính được chỉ số LC<sub>50</sub> theo quy trình xử lý PROBIT [4].

## II. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

### 1. Thời gian sinh trưởng và phát triển của tuyến trùng trong BSL

Theo dõi quá trình sinh trưởng và phát triển của chủng tuyến trùng thu được trên ấu trùng bướm sấp lớn cho thấy: Thời gian sinh trưởng của một số chủng tuyến trùng *Steinernema siamkayai* ở Việt Nam tương tự như các chủng *Steinernema* khác. Ấu trùng cảm nhiễm xâm nhập vào cơ thể côn trùng qua các lỗ tự nhiên như miệng, hậu môn hoặc lỗ thở. Sau khi vào cơ thể vật chủ IJs nhanh chóng xâm nhập vào xoang máu, giải phóng vi khuẩn cộng sinh ra khỏi cơ thể để vào xoang máu của côn trùng, vi khuẩn cộng sinh nhân nhanh số lượng và tạo ra độc tố gây chết côn trùng vật chủ trong vòng 24-48 giờ. Xác chết côn trùng vật chủ có màu nâu, da trở nên khá dẻo và đàn hồi, quan sát dưới kính hiển vi soi nổi có thể thấy tuyến trùng hoạt động, di chuyển bên trong xác chết. Đặc biệt, xác chết côn trùng do tuyến trùng EPN không có mùi thối.

Tuyến trùng trưởng thành thế hệ 1 xuất hiện sau 24-36 giờ gây nhiễm, ở nhiệt độ 24-25°C. Tuyến trùng trưởng thành thế hệ 2 xuất hiện sau 5-6 ngày. Ấu trùng cảm nhiễm bắt đầu phát tán và xuất hiện trên bề mặt ấu trùng BSL sau 8-10 ngày gây nhiễm.

### 2. Khả năng sinh sản của chủng tuyến trùng S-DL13 trong ấu trùng BSL

Kết quả thí nghiệm được trình bày ở bảng 1 cho thấy sự sai khác có ý nghĩa với các số lượng gây nhiễm (IJs) ban đầu của chủng S-DL13 (số liệu được chuyển sang log (x+1) trước khi xử lý ( $P \leq 0.05$ ). Sản lượng IJs cao nhất là  $126 \times 10^3$  IJs/ ấu trùng BSL với số lượng IJs gây nhiễm ban đầu là 70, sản lượng IJs thấp nhất là  $73,3 \times 10^3$  IJs/ ấu trùng BSL với số lượng IJs gây nhiễm ban đầu là 10. Tuy nhiên không phải số lượng IJs gây nhiễm ban đầu càng cao thì thu sản lượng

càng cao vì khi số lượng gây nhiễm ban đầu tiếp tục tăng lên 80, 90, 100 IJs thì sản lượng thu được có xu hướng giảm dần. Mật độ lây nhiễm 60, 80 và 90 IJs cho thấy không sai khác rõ ràng và cùng mức ý nghĩa. Mặc dù với số lượng lây nhiễm ban đầu cao nhất với 100 IJs nhưng mức ý nghĩa của sản lượng tuyến trùng thu được cũng chỉ tương ứng với mức lây nhiễm ban đầu với 40 và 50 IJs.

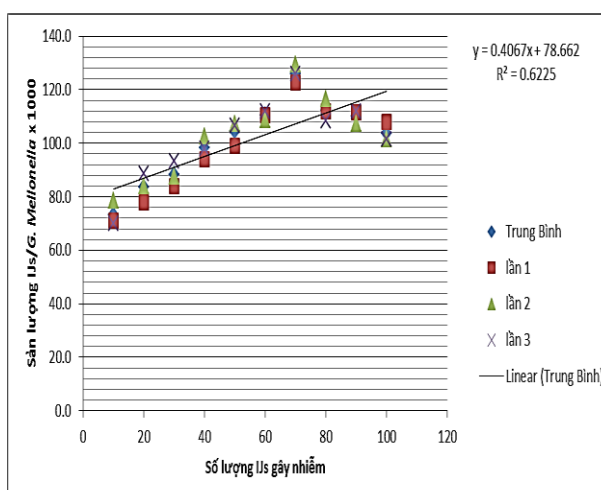
Bảng 1

**Khả năng sinh sản của chủng S-DL13 trên ấu trùng BSL**

NĐGN (IJs)	Sản lượng IJs / BSL (x10 <sup>3</sup> )		
	Trung bình (*)	Thấp nhất	Cao nhất
10	73,3 ± 4,8 a	70,0	78,8
20	83,5 ± 5,4 b	77,8	88,7
30	88,2 ± 4,8 b	83,9	93,3
40	98,2 ± 4,3 c	94,1	102,7
50	104,3 ± 4,5cd	99,1	107,3
60	110,4 ± 1,7 d	108,6	112,0
70	126,0 ± 3,5 e	122,5	129,5
80	112,4 ± 4,1 d	108,5	116,7
90	110,3 ± 2,6 d	107,3	112,0
100	103,7 ± 3,7cd	101,5	108,0

Mối tương quan giữa số lượng gây nhiễm ban đầu và sản lượng thu được của chủng tuyến trùng S-DL13 được thể hiện bằng một hàm số bậc 1 với hệ số tương quan cao, R<sup>2</sup> = 0.6225 (hình 2). Trong đó, giá trị sản lượng IJs thu được tăng dần theo giá trị tăng lên của số lượng gây nhiễm ban đầu. Đến một giới hạn xác định tùy thuộc vào từng chủng tuyến trùng sản lượng thu được sẽ giảm đi trong khi số lượng gây nhiễm vẫn tiếp tục tăng lên.

Qua số liệu thí nghiệm thu được, có thể xác định được số lượng gây nhiễm ban đầu tối ưu để sinh sản ra sản lượng lớn nhất của chủng S-DL13 là 70 IJs. Các số lượng khác càng xa giá trị tối ưu này thì sản lượng thu được càng giảm đi. Điều này có thể giải thích là số lượng cảm nhiễm ban đầu phải luôn phù hợp với khả năng sinh sản của từng chủng tuyến trùng và còn phụ thuộc vào sinh khối của vật chủ. Bởi vì, nếu số lượng IJs ban đầu quá ít thì tuyến trùng sẽ không tận dụng hết nguồn thức ăn để sinh sản ra nhiều IJs. Ngược lại, nếu số lượng ấu trùng xâm nhiễm ban đầu quá cao sẽ dẫn đến sự cạnh tranh thức ăn và môi trường không gian giữa các cá thể. Cả hai nguyên nhân này đều dẫn đến làm giảm sản lượng IJs sản sinh ra.



**Hình 1: Đồ thị tương quan giữa NĐGN và sản lượng IJs của chủng S-DL13 trên BSL**

Theo Kaya & Gaugler (1993) [6] tiềm năng sinh học của một chủng tuyến trùng ký sinh gây bệnh côn trùng có thể đáp ứng tiêu chí của một tác nhân sinh học, trên cơ sở được đánh giá qua 3 chỉ tiêu cơ bản sau: i) Độc lực học của chủng tuyến trùng hay khả năng gây chết đối tượng côn

trùng vật chủ; ii) Phổ diệt côn trùng vật chủ; iii) Khả năng sinh sản của chủng tuyến trùng trong đối tượng côn trùng vật chủ. Ngoài ra, còn một số tiêu chí khác như khả năng sản xuất sinh khối của chủng tuyến trùng, khả năng bảo quản chế phẩm sinh học tuyến trùng, khả năng tồn tại và tồn lưu khi phun rải chế phẩm tuyến trùng ra đồng ruộng.

### 3. Hiệu lực gây chết của tuyến trùng đối với ấu trùng BSL

Kết quả thử nghiệm trình bày tại Bảng 2, cho thấy ngay ở nồng độ gây nhiễm ban đầu thấp nhất là 5 IJs, tỷ lệ chết BSL đã đạt 42,22%. Tỷ lệ chết của BSL tăng dần đến 100% ở nồng độ gây nhiễm 40 IJs. Giá trị LC<sub>50</sub> là 7 IJs, trong khi giá trị LC<sub>90</sub> là 22 IJs. Qua đó có thể khẳng định độc lực của chủng S-DL13 là khá cao đối với ấu trùng BSL.

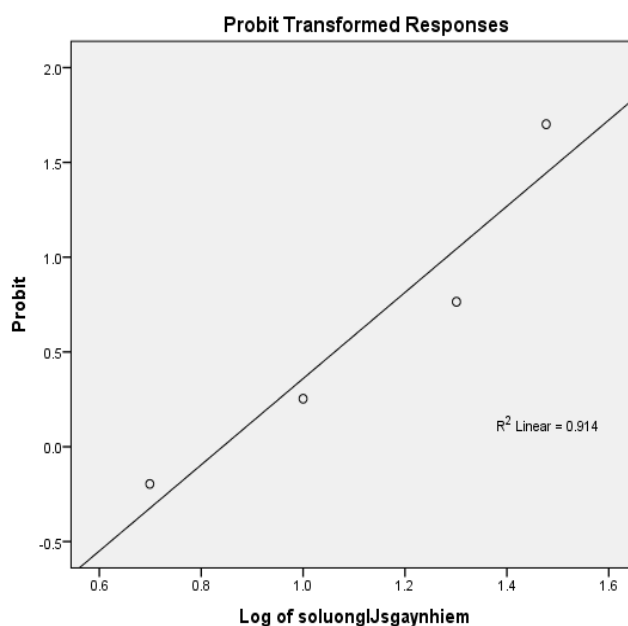
Bảng 2

Hiệu lực gây chết ấu trùng BSL của chủng S-DL13

Số GN (IJs)	Số sâu TN	Số sâu chết	Tỷ lệ chết (%)
0	45	0	0,00
5	45	19	42,22
10	45	27	60,00
20	45	35	77,78
30	45	43	95,56
40	45	45	100,00
50	45	45	100,00
60	45	45	100,00
70	45	45	100,00
80	45	45	100,00
90	45	45	100,00

LC<sub>50</sub> = 7; LC<sub>90</sub> = 22

Đồ thị tương quan giữa nồng độ gây nhiễm và tỷ lệ sâu chết (Hình 2) với các giá trị tương quan  $R^2 = 0.914$  cũng chỉ ra mối tương quan chặt chẽ giữa 2 đại lượng nồng độ gây nhiễm của tuyến trùng và tỷ lệ BSL chết. Chỉ số LC<sub>50</sub> hay còn gọi là liều gây chết 50% là số lượng tuyến trùng gây chết 50% côn trùng vật chủ được coi là một trong những chỉ số quan trọng để đánh giá tiềm năng của một chủng tuyến trùng trong phòng trừ sinh học. Một chủng tuyến trùng có chỉ số LC<sub>50</sub> càng thấp chứng tỏ độc lực của chúng càng cao và càng có tiềm năng trở thành tác nhân sinh học trong phòng trừ loài sâu hại đó. Mặc dù tuyến trùng ký sinh gây bệnh côn trùng có phổ diệt sâu hại khá rộng, nhưng chỉ số LC<sub>50</sub> đối với từng loài côn trùng vật chủ lại rất khác nhau. Một số kết quả thử nghiệm trước đây



Hình 2: Đồ thị tương quan giữa tỷ lệ chết của BSL và nồng độ gây nhiễm của chủng S-DL13

của Lại Phú Hoàng và cs (2003, 2003b, 2005) [7, 8] và Nguyễn Ngọc Châu và cs (1999) [10] cho thấy chỉ số  $LC_{50}$  biến động khá lớn, phụ thuộc chủng tuyến trùng và loài côn trùng vật chủ. Tương tự, kết quả thí nghiệm của Doucet *et al.* (1999) [3] cho thấy  $LC_{50}$  của *S. rarum* = 6, *S. feltiae* = 9, *H. bacteriophora* = 3 trên ấu trùng BSL. Như vậy, để đánh giá tiềm năng sinh học của các chủng tuyến trùng EPN cho phòng trừ sâu hại, cần thử nghiệm trên nhiều côn trùng để khẳng định  $LC_{50}$  của chủng tuyến trùng đối với các loài côn trùng khác nhau.

### III. KẾT LUẬN

Thời gian để hoàn thành chu kỳ phát triển của chủng tuyến trùng S-DL13 trong cơ thể vật chủ ấu trùng BSL bắt đầu từ khi IJs xâm nhập vào cơ thể ấu trùng BSL cho đến khi IJs xuất hiện trên bề mặt ấu trùng BSL được xác định là 8-10 ngày.

Khả năng sinh sản của chủng tuyến trùng S-DL13 trong ấu trùng BSL là khác nhau. Sản lượng thu được phụ thuộc vào sinh khối vật chủ và có mối tương quan chặt chẽ với số lượng IJs gây nhiễm ban đầu.

Tỷ lệ gây chết ấu trùng BSL tỷ lệ thuận với số lượng IJs gây nhiễm ban đầu, ở công thức lây nhiễm 5 IJs tỷ lệ sâu chết của chủng S-DL13 đã đạt trên 40% và ở công thức 40 IJs đạt 100%. Với giá trị  $LC_{50}$  khá thấp cho thấy độc lực của cả chủng tuyến trùng S-DL13 là tương đối mạnh.

**Ghi nhận:** Công trình được thực hiện trong khuôn khổ đề tài độc lập cấp Viện Hàn lâm KH & CN Việt Nam (mã số VAST.ĐL.04/13-14) và đề tài NAFOSTED (mã số 106.12-2012.84).

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Anon**, 1988a. SAS Technical Report. Additional SAS/STAT Procedures. Release 6.03, SAS Institute, NC, USA, 179 pp.
2. **Bedding R.A.**, 1984. Annals of Applied Biology, 104: 117-120.
3. **Doucet, M. M. A., M. A. Bertolotti, A. L. Giayetto, M. B. Miranda**, 1999. Journal of Invertebrate Pathology, 73:237-242.
4. **Cabanias, H. E., J. R. Raulston**, 1994. Pathogenicity of *Steinernema riobranis* against corn earworm, *Helicoverpa zea* (Boddie). Fund. Appl. Nemat. 17(3): 219-223.
5. **Elawad, S. A., S. L. Gowen, N. G. M. Hague**, 1999. The life cycle of *S. abbasi* and *S. riobave* in *Galleria mellonella*, Nematology 1(7-8): 762-764.
6. **Kaya, H. K., R. Gaugler**, 1993. Entomopathogenic nematodes. Annual Review of entomology 38: 181-206.
7. **Lại Phú Hoàng, Nguyễn Ngọc Châu**, 2005. Hiệu lực diệt sâu xanh *Helicoverpa armigera* (Hubner) của chủng tuyến trùng TX1. Tạp chí Sinh học 27(3A): 87-90.
8. **Lại Phú Hoàng, Phạm Hồng Thái, Nguyễn Ngọc Châu, Vũ Tứ Mỹ**, 2003. Hiệu lực phòng trừ sâu xám (*Agrotis ypsilon*) hại thuốc lá của một số chế phẩm sinh học tuyến trùng (EPN). Tạp chí BVTV 4 (190): 26-29.
9. **Nguyễn Ngọc Châu**, 2008. Tuyến trùng ký sinh gây bệnh côn trùng ở Việt Nam, Nxb. KHTN & CN, Hà Nội, 302trang.
10. **Nguyễn Ngọc Châu, Vũ Tứ Mỹ, Lại Phú Hoàng, Ngô Xuân Tường**, 1999. Tạp chí Sinh học, 21(2B): 104-113.

11. **Stock S.P., V. Somsook, A Reid**, 1998. Systematic Parasitology, 41: 105-113.
12. **Wang J.X., R.A. Bedding**, 1996. Fundamental and Applied Nematology, 19: 363-367.

**SOME BIOLOGICAL DATA OF THE ENTOMOPATHOGENIC NEMATODE  
S-DL13 (*Steinernema siamkya*) ISOLATED FROM DAK LAK, VIET NAM**

NGUYEN NHU TRANG, NGUYEN NGOC CHAU

SUMMARY

Firstly, the biological cycle and development of entomopathogenic nematode strain S-DL13 (*Steinernema siamkayai*) was investigated in the laboratory condition. The duration time for a completed cycle of strain S-DL13 were started from infective juvenile infected in insect host until its imerging from insect cadaver were established 8-10 days totally.

The reproduction capacity of strains S-DL13 in the GM is different and the yield of infective juveniles (IJs) from insect cadaver is depended on the host biomass and its closely correlated with the initial infected concentration of nematode infective juveniles.

The mortality rates of GM larvae were closely relationship and that depended on initial infected concentration of in the insect host as GM larvae. These clearly documented in the formula with innitial concentration of 5 IJs whereas mortality percentage 100% with 40 IJs concentration. With the low value of  $LC_{50}$  and high virulence the nematode strain S-DL13 showed the potential for biocontrol.