

**ĐẶC ĐIỂM HÌNH THÁI VÀ PHÂN TỬ CỦA VI KHUẨN *Xenorhabdus* sp.  
X-7TN CỘNG SINH VỚI TUYẾN TRÙNG *Steinernema longicaudum*  
PHÂN LẬP Ở TÂY NGUYÊN, 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*

*Xenorhabdus* và *Photorhabdus* là hai chi vi khuẩn cộng sinh (VKCS) với tuyến trùng ký sinh gây bệnh côn trùng *Steinernema* và *Heterorhabditis* thuộc họ *Enterobacteriaceae*. Các loài thuộc 2 chi VKCS này có vai trò và tiềm năng ứng dụng trong bảo vệ thực vật và y học (Nguyen & Hunt, 2007) [9].

Trên thế giới có nhiều nghiên cứu về các sản phẩm trao đổi chất từ vi khuẩn cộng sinh này và ứng dụng của chúng, hơn 30 hoạt chất trao đổi thứ cấp thuộc các nhóm khác nhau đã tìm thấy từ dịch nuôi cấy của *Xenorhabdus* và *Photorhabdus* virus (Chen *et al.*, 1994) [2]. Những sản phẩm trao đổi chất này không chỉ đa dạng về cấu trúc hóa học mà còn đa dạng về hoạt tính sinh học đối với y học và nông nghiệp, như kháng khuẩn, kháng nấm, diệt côn trùng và ức chế tuyến trùng thực vật, chống viêm, chống ung thư và kháng virus (Chen *et al.*, 1994) [2].

Ở Việt Nam, đã có nhiều nghiên cứu về đa dạng loài tuyến trùng EPN nhưng những nghiên cứu về vi khuẩn cộng sinh với tuyến trùng này và các sản phẩm trao đổi chất của chúng còn ít được thực hiện (L.T.M. Linh & cs, 2011) [8]. Những nghiên cứu trong phân loại các loài vi khuẩn còn hạn chế trong nghiên cứu hình thái, sinh hóa, thử hoạt tính sinh hóa phức tạp, để ổn định phải yêu cầu điều kiện thí nghiệm rất nghiêm ngặt. Hiện nay, việc sử dụng sinh học phân tử trong phân loại chính xác và nhanh chóng hơn. Đối với vi khuẩn vùng gen 16S-rDNA có nhiều ưu điểm và sử dụng rộng rãi trong định loại và xác định quan hệ di truyền (Christensen *et al.*, 1998)[3].

Với ý nghĩa khoa học và tiềm năng ứng dụng của vi khuẩn cộng sinh nói trên. Trong nghiên cứu này, chúng tôi mô tả đặc điểm hình thái và phân tử vùng gen 16S ribosomal RNA của chủng vi khuẩn *Xenorhabdus* sp. X-7TN cộng sinh với tuyến trùng *S. longicaudum* phân lập ở Kon Tum - Tây Nguyên, phục vụ cho quá trình nghiên cứu hoạt tính và bảo tồn sau này.

## **I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**

### **1. Vật liệu**

*Nguồn phân lập vi khuẩn:* Vi khuẩn cộng sinh nằm trong khoang ruột tuyến trùng *Steinernema longicaudum*. 7TN thu tại tỉnh Kon Tum - Tây Nguyên (hiện lưu trữ tại Phòng Tuyến trùng học, Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật, VAST).

*Môi trường phân lập vi khuẩn:* Tryptone 1%, cao nấm men 0,5%, NaCl 0,5%, bromothymon blue 0,25%, triphenyltetrazolium chloride (TTC) 4 %, agar 1,5%, pH 7, Khử trùng ở 1 atm/ 30 phút, để nguội 50°C đổ TTC (Woodring & Kaya, 1988 [13]).

### **2. Phương pháp nghiên cứu**

*Phương pháp phân lập vi khuẩn, mô tả hình thái, đặc điểm phát triển* (Akhurst, 1980; Woodring and Kaya, 1988) [1, 13]: Gây nhiễm tuyến trùng *S. longicaudum* mang VKCS 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. 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.

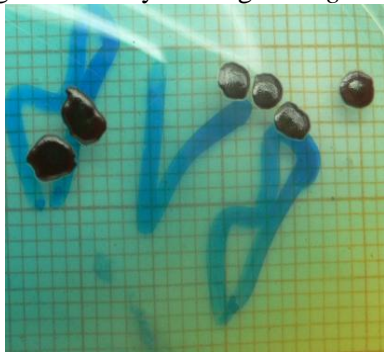
**Giải trình tự DNA:** Tách chiết DNA tổng số từ khuẩn lạc đơn sử dụng EZ-10 spin column Genomic DNA MiniPreps Kit for Bacteria (Bio Basic, Canada). Nhân bản một phần vùng gen 16S ribosomal RNA có kích thước khoảng 1500 bp bằng kỹ thuật PCR sử dụng Taq Mastermix 2X (Qiagen, Đức) trên máy Eppendorf Mastercycler. Cặp mồi được sử dụng để nhân bản vùng gen 16S-rRNA có trình tự mồi như sau (L. T. M. Linh & cs, 2011) [8]: Mồi xuôi U16SF: 5'-TGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGC-3', Mồi ngược PXR: 5'-TAC GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3'. Chu trình nhiệt phản ứng như sau: 95°C 2 phút; 35 chu kỳ 95°C 30 giây, 50°C 25 giây, 72°C 50 giây; 72° 3 phút. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1,5% trong đệm TBE, nhuộm Ethidium Bromide và hiển thị kết quả dưới ánh sáng tử ngoại (302 nm). Vạch sản phẩm đặc hiệu có kích thước đúng như thiết kế khi so sánh với thang chuẩn kích thước phân tử (DNA ladder 1 Kb – Invitrogen, Mỹ) được cắt và tinh sạch bằng Qiaquick gel extraction kit (Qiagen, Đức). Phản ứng giải trình tự trực tiếp sử dụng BigDye terminator cyclor v3.1 (Applied Biosystem, Mỹ). Tinh sạch sản phẩm 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 sử dụng chương trình BLAST để tìm kiếm các trình tự tương đồng đã được các tác giả khác công bố trên ngân hàng ADN (Genbank), trình tự gen mẫu X. L1 ( L.T.M. Linh & cs, 2011) [8]. So sánh sự khác nhau về vị trí nucleotit giữa các cặp loài dùng phần mềm Bioedit v7.2.5 (Hall, 1999)[6]. Phần mềm MEGA 5.0 (Tamura K *et al.*, 2011)[12] được dùng để phân tích khoảng cách di truyền và xây dựng cây phát sinh chủng loại theo các phương pháp Maximum Likelihood (ML) theo mô hình Hasegawa-Kishino-Yano model với thông số Gamma distributed with Invariant sites ( HKY+G+I) (Felsenstein, 1981)[4].

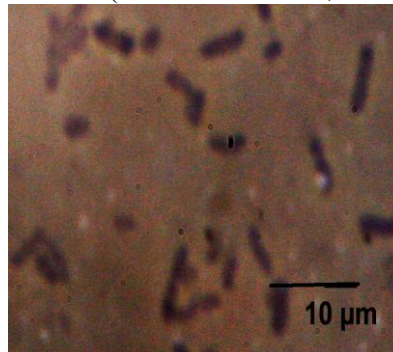
## II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

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

Chủng VKCS 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 3 mm. Khuẩn lạc có rìa không đều, bề mặt nhẵn, không lồi, nhuộm màu xanh, kích thước khuẩn lạc từ 1-3 mm (hình 1). Môi trường xung quanh khuẩn lạc đổi màu từ vàng sang xanh. Các vi khuẩn ở pha sơ cấp có khả năng di động, tạo nhu động quanh khuẩn lạc. Quan sát dưới kính hiển vi quang học, các tế bào vi khuẩn có dạng hình que, kích thước khoảng 1×3-5 μm, có tiên mao, di chuyển được (hình 2). Các đặc điểm hình thái khuẩn lạc, hình ảnh tế bào cho thấy chủng nghiên cứu có các đặc điểm hoàn toàn phù hợp với vi khuẩn thuộc chi *Xernorhabus* spp. (Akhurst, 1980) [1] và cũng tương đồng với chủng VKCS X. L1 cộng sinh với tuyến trùng *S. longicaudum* phân lập trước đó (L.T.M. Linh & cs, 2011) [8].



Hình 1: Khuẩn lạc của vi khuẩn X.7TN



Hình 2: Tế bào vi khuẩn cộng sinh X.7TN

## 2. Đặc điểm phân tử DNA vùng gen khảo sát

Kết quả đọc và ghép nối trình tự nucleotide chủng vi khuẩn *Xenorhabdus X. 7TN* thu được trình tự nucleotide nghiên cứu có chiều dài 1450 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 chi *Xenorhabdus* từ 97-99%.

Bảng 1

Ma trận khoảng cách di truyền giữa một số loài khảo sát

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1. 7TN-16S																		
2. 1LC-1-	0.00																	
3.  DQ202312.1  <i>Xenorhabdus ehlersii</i>	0.00	0.00																
4.  gb DQ202306.1  <i>Xenorhabdus ehlersii</i>	0.00	0.00	0.00															
5.  AJ3810294.1  <i>Xenorhabdus ehlersii</i>	0.00	0.00	0.00	0.00														
6.  DQ208307.1  <i>Xenorhabdus ehlersii</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00													
7.  JQ026406.1  <i>Xenorhabdus ehlersii</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00												
8.  DQ208308.1  <i>Xenorhabdus ehlersii</i>	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01											
9.  KJ413067.1  <i>Xenorhabdus budapestensis</i>	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02										
10.  DQ329379.1  <i>Xenorhabdus budapestensis</i>	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	0.00									
11.  NR_043642.1  <i>Xenorhabdus doucetiae</i>	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02								
12.  NR_042325.1  <i>Xenorhabdus innexi</i>	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.03							
13.  NR_115713.1  <i>Xenorhabdus vietnamensis</i>	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.03						
14.  KJ413079.1  <i>Xenorhabdus japonica</i>	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.03	0.01					
15.  NR_043644.1  <i>Xenorhabdus miraniensis</i>	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.04	0.03	0.03				
16.  DQ202308.1  <i>Xenorhabdus kozodoii</i>	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.03	0.02	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.04	0.05			
17.  NR_042822.1  <i>Xenorhabdus beddingii</i>	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.04	0.03	0.03	0.01	0.04		
18.  HM072284.1  <i>Photobacterium luminescens</i>	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.06	0.06	0.06	0.06	0.05	0.06	0.05	
19.  EU136626.1  <i>Photobacterium temperata</i>	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.04	0.06	0.04	0.02

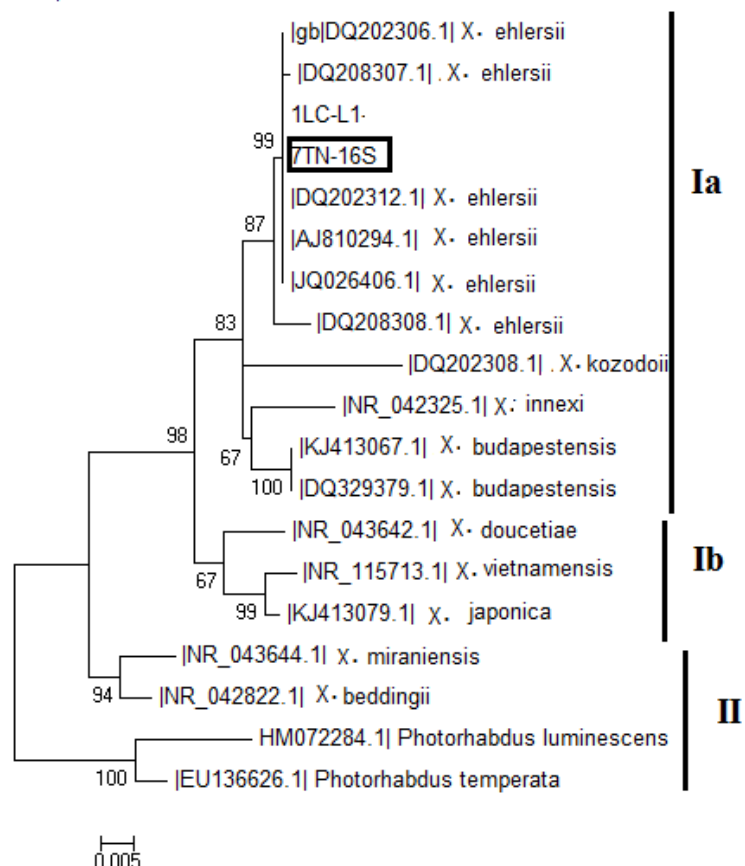
Những khác biệt giữa trình tự nghiên cứu với các trình tự tương đồng được thể hiện trong bảng 1. Sự khác biệt ghi nhận được ở mức giữa các loài trong cùng chi. Chúng tôi giả thuyết sử dụng mô hình Jukes-Cantor 1 tham số phân phối đồng đều để xây dựng ma trận khoảng cách di truyền (Bảng 1) và thiết lập cây phát sinh chủng loại theo phương pháp Maximum Likelihood (ML) (Hình 3).

Khoảng cách di truyền giữa các trình tự giữa các loài *Xenorhabdus* spp. gần gũi từ 0.02 đến 0.03 và khoảng cách từ 0.03-0.05 đối với các loài cách xa nhau và nhóm tham chiếu *Photobacterium* spp. (Bảng 1). Trong đó khoảng cách di truyền giữa trình tự của chủng *Xenorhabdus* sp. X-7TN với các chủng thuộc loài *X. ehlersii* là 0.00-0.01.

## 3. Quan hệ di truyền giữa chủng vi khuẩn 7TN với các loài trong chi *Xenorhabdus*

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 3. Ở đây, chúng tôi thực hiện phân tích bootstrap với 1000 lần lấy lại mẫu. Mô hình phân tích thích hợp nhất được lựa chọn là mô hình HKY+G+I với phân phối Gamma và hằng định (BIC = 4752.277, AICc = 4432.029, lnL = -2174.920, I = 0.40, R = 2.36, f(A)=0.257, f(T) = 0.203, f(C) = 0.222, f(G)=0.31).

Mối quan hệ di truyền giữa các loài *Xenorhabdus* spp. được chia thành hai nhóm lớn: nhóm I và nhóm II, nhóm I tách thành 2 phân nhóm: Ia và Ib. Trong nhánh Ia bao gồm các loài *X. ehlersii*, *X. kozodoii*, *X. innexi* và *X. budapestensis*.



**Hình 3: Quan hệ di truyền giữa các loài *Xenorhabdus* spp. theo phương pháp Maximum Likelihood, Số ở các góc là giá trị bootstrap (%)**

Các chủng VKCS thuộc loài *X. ehlersii* tách riêng với các loài khác với bootstrap 87% bao gồm các chủng VKCS *Xenorhabdus* sp. 7TN phân lập từ *S. longicaudum* (Việt Nam), chủng AJ810294 phân lập từ *S. serratum* (Trung Quốc), chủng DQ208307 phân lập từ *S. serratum* (Trung Quốc), DQ208308 phân lập từ *S. longicaudum* (Hàn Quốc), DQ202306 (Hàn Quốc), DQ202312 phân lập từ *S. longicaudum* (Mỹ) và chủng X-1LC-L1 phân lập từ *S. longicaudum* (Việt Nam). Như vậy, chủng VKCS *Xenorhabdus* X.7TN và chủng X.L1 được phân lập từ 2 chủng của loài *S. longicaudum* (Kon Tum và Ba Vì) là cùng một loài *X. ehlersii* và khoảng cách di truyền là 0.00.

Mối quan hệ di truyền trong cây phả hệ của đoạn 16S rDNA cho thấy mức độ đa dạng của các loài/chủng của chi *Xenorhabdus* tương đối thấp, không có sự biến động giữa các chủng được phân lập từ sinh thái khác nhau hay vật chủ khác nhau. Mặc dù, trong nhóm *X. ehlersii* có sự phân tách của chủng DQ208308 phân lập từ *S. longicaudum* (Hàn Quốc) đối với các chủng *X. ehlersii* khác.

Nhóm II gồm các loài *X. beddingii* và *X. miraniensis* đây là nhánh có mức độ tiến hóa khá xa so với các loài còn lại, nhóm *Photorhabdus luminescens* và *P. temperata* là nhóm tham chiếu tách biệt hẳn so với các loài thuộc chi *Xenorhabdus*, với các giá trị bootstrap cao và khoảng cách di truyền tách biệt chứng minh cây phát sinh chủng loại đưa ra kết quả chính xác và tin cậy.

Các nghiên cứu trước đây cũng cho thấy, một loài tuyến trùng có thể có nhiều loài vi khuẩn cộng sinh, như loài *S. scapterisci* có 2 loài vi khuẩn cộng sinh *X. innexi* (Fischer-Le Saux *et al.*, 1998)[5] và *X. koppenhoeferi* (Tailliez *et al.*, 2006)[11]. Hay một loài vi khuẩn có thể cộng sinh với nhiều loài tuyến trùng EPN, các loài *Steinernema* ở Nhật Bản thuộc nhóm “*affine-intermedium*” cộng sinh với *X. bovienii*; nhóm “*glaseri*” cộng sinh với *X. poinarii*. (Kuwata *et al.*, 2006)[7]. Đối với hai chủng *Xenorhabdus* được phân lập từ một loài *S. longicaudum* ở Việt Nam từ hai vùng sinh thái khác nhau đưa ra cùng một loài VKCS *X. ehlersii*. Do vậy, việc nghiên cứu tuyển chọn các loài/chủng tuyến trùng ký sinh côn trùng, cũng cần có sự bảo tồn nguồn VKCS trong chính của mỗi loài.

### III. KẾT LUẬN

Chủng vi khuẩn *Xenorhabdus* X-7TN cộng sinh với tuyến trùng *Steinernema longicaudum* được phân lập ở Kon Tum (Tây Nguyên) có các đặc điểm hình thái khuẩn lạc, hình ảnh tế bào đặc trưng của vi khuẩn thuộc chi *Xenorhabdus* spp.

Trình tự gen 16S RNA ribosomal của chủng VKCS *Xenorhabdus* X-7TN có chiều dài 1450 bp. Khoảng di truyền giữa các chủng trong loài *X. ehlersii* là 0.00-0.01, giữa các loài *Xenorhabdus* spp. gần gũi từ 0.02 đến 0.03 và khoảng cách từ 0.03 - 0.05 đối với các loài cách xa nhau và nhóm tham chiếu *Photorhabdus* spp. Chủng VKCS *Xenorhabdus* X-7TN và 1-LC-L1 được phân lập từ loài *Steinernema longicaudum* ở Việt Nam thuộc loài *Xenorhabdus ehlersii*.

*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 KHCNVN mã số: IEBR.CBT.ThS04/2014

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Akhurst, R. J., 1980. Journal of General Microbiology 121, 303–309.
2. Chen, G., G. B. Dunphy, J. M. Webster, 1994. Biological control, 4, 175-162.
3. Christensen, H., S. Nordentoft, J. E. Olsen, 1998. Journal of Systematic Bacteriology 48, 605–610.
4. Felsenstein J. 1981. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. J Mol Evol. 17:368–376
5. Fischer-Le Saux, M., E. Arteaga-Hernandez, Z. Mracek, N. E. Boemare, 1999. FEMS Microbiol Ecol 29, 149–157.
6. Hall, T. A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic acid symposium series 41: 95-98.
7. Kuwata, R., M. Shigematsu, T. Yoshiga, M. Yoshida, E. Kondo, 2006. Phylogenetic analyses of Japanese steinernematid nematodes and their associating *Xenorhabdus* bacteria. Jpn J Nematol 36: 75–85.
8. Lê Thị Mai Linh, Nguyễn Thị Duyên, Nguyễn Giang Sơn, Phạm Ngọc Tuyên, Phan Kế Long, 2011. “Đặc điểm hình thái và phân tử của chủng *Xenorhabdus* sp. Chủng L1 cộng sinh với tuyến trùng *Steinernema longicaudum* phân lập ở VQG Ba Vì”. Báo cáo khoa học về Sinh thái và Tài nguyên sinh vật, Hội nghị khoa học toàn quốc lần thứ IV: 691-696.
9. McInerney, B. V., W. C. Taylor, M. J. Lacey, R. J. Akhurst, R. P. Gregson, 1991. Journal of Natural Products 54: 785-795.

10. **Nguyen, K. B., D. Hunt**, 2007. Entomopathogenic Nematodes: Systematics, Phylogeny and Bacterial Symbionts. Nematology Monographs and Perspectives 5, BRILL: 816 pp
11. **Tailliez P., S. Pages, N. Ginibre, N. E. Boemare**, 2006. New insight into diversity in the genus *Xenorhabdus*, including the description of ten novel species. Int J Syst Evol Microbiol 56, 2805– 2818.
12. **Tamura, K, D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M Nei, S. Kumar**, 2011. Molecular Biology and Evolution, 28:2731-2739.
13. **Woodring, J. L., H. K. Kaya**, 1988. Steinernematid and Heterorhabditid Nematodes: a Handbook of Biology and Techniques. Arkansas Agricultural Experiment Station Nematode Subcommittee of the Southern Regional Project S-135 Entomopathogens for use in Pest-Management Systems, Fayetteville, Arkansas: 32 pp.

**MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR CHARACTERISTICS OF  
*Xenorhabdus* sp. X-7TN SYMBIOSIS WITH *Steinernema longicaudum*  
ISOLATED FROM TAY NGUYEN HIGHLAND, VIETNAM**

**LE THI MAI LINH, NGUYEN GIANG SON, NGUYEN THỊ DUYEN**

SUMMARY

Species of two genera *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* are symbiotic bacteria with entomopathogenic nematodes. They undergo a complex life cycle that involves a symbiotic stage, in which the bacteria are carried in the gut of the nematodes, and a pathogenic stage, in which susceptible insect prey are killed by the combined action of the nematode and the bacteria. Both bacteria produce antibiotics, intracellular protein crystals, and numerous other products. In this study, we investigated the morphological and molecular characteristics of the *Xenorhabdus* X-7TN bacterium strain symbiosis with *Steinernema longicaudum* that was isolated from Kon Tum (the Western Highland, Vietnam). The nucleotide sequence of 16S RNA ribosomal sequence was determined with 1450 bp and used for analysis of phylogeny. The analysis indicated that strains of *Xenorhabdus ehlersii* were distinctly separated with high bootstrap. The *Xenorhabdus* X-7TN and ILC-L1 bacterium strains, isolated from *S. longicaudum* in Vietnam, belong to *Xenorhabdus ehlersii*.