

Tạp chí Công nghệ Sinh học 15(3): 481-487, 2017

BẢO QUẢN ĐÔNG LẠNH TUYẾN TRÙNG KÝ SINH GÂY BỆNH CÔN TRÙNG Ở VIỆT NAM TRONG NITROGEN LỎNG

Nguyễn Ngọc Châu[✉], Đỗ Tuấn Anh

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

[✉] Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: chaunguyen@iebr.vast.vn

Ngày nhận bài: 06.10.2016

Ngày nhận đăng: 28.3.2017

TÓM TẮT

Bảo quản đông lạnh các chủng tuyến trùng ký sinh gây bệnh côn trùng trong nitrogen lỏng là giải pháp tối ưu để duy trì bảo tồn tài nguyên tuyến trùng có lợi ở Việt Nam. Trong bảo quản đông lạnh bằng nitrogen lỏng, 2 yếu tố ảnh hưởng quan trọng đến khả năng sống và độc lực của các chủng tuyến trùng là nồng độ ấu trùng cảm nhiễm và nồng độ dung dịch Glycerol. Thử nghiệm với các nồng độ khác nhau đã xác định nồng độ tối ưu là 12.000 IJs /mL và 15% Glycerol. Trên cơ sở đó lần đầu tiên ở Việt Nam đã triển khai bảo quản đông lạnh 27 chủng tuyến trùng ký sinh gây bệnh côn trùng bản địa, bao gồm 24 chủng giống *Steinernema* và 3 chủng giống *Heterorhabditis*. Sau 72 giờ bảo quản đông lạnh, kết quả kiểm tra đã xác định tỷ lệ sống trung bình của các chủng tuyến trùng EPN là 79,2%, trong đó, 79,2% (55,6 - 95,7%) đối với các chủng *Steinernema* và 79% (70,1 - 86,2%) đối với các chủng *Heterorhabditis*. Độc lực của các chủng tuyến trùng EPN sau đông lạnh 72 giờ được xác định bằng tỷ lệ chết của ấu trùng tuổi 5 bướm sấp lớn là 71,6% (60,0 - 83,3%) ở công thức nhiễm với ấu trùng cảm nhiễm (infective juveniles - IJs) đông lạnh và 70,6% (63,6 - 80%) ở công thức đối chứng. Kết quả thử nghiệm cho thấy sau đông lạnh cho thấy sự sai khác không có ý nghĩa về hiệu lực gây chết của tuyến trùng đông lạnh và không đông lạnh. Như vậy, qua đông lạnh các chủng tuyến trùng ký sinh gây bệnh côn trùng vẫn duy trì độc lực như vốn có. Quy trình bảo quản đông lạnh được xác lập và áp dụng trong nghiên cứu này có thể đáp ứng yêu cầu bảo quản đông lạnh toàn bộ mẫu tuyến trùng ký sinh gây bệnh côn trùng sống đang được lưu giữ ở Việt Nam.

Từ khóa: Bảo quản đông lạnh, nitrogen lỏng, nồng độ IJs, Glycerol, tỷ lệ sống, tuyến trùng EPN, *Heterorhabditis*, *Steinernema*, Việt Nam.

GIỚI THIỆU

Mặc dù hầu hết các loài tuyến trùng ký sinh gây bệnh cho côn trùng (Entomopathogenic nematode - EPN) thuộc 2 giống *Steinernema* và *Heterorhabditis* đều có tiềm năng phòng trừ sâu hại nhưng hiệu lực diệt côn trùng của các loài rất khác nhau, thậm chí khác nhau giữa các chủng trong cùng một loài. Vì vậy việc điều tra phát hiện và thu thập các chủng, loài tuyến trùng EPN bản địa luôn có ý nghĩa quan trọng, nhằm: i) xác định sự hiện diện và phân bố của EPN trong tự nhiên và bổ sung danh sách các chủng, loài tuyến trùng EPN; ii) xây dựng chiến lược bảo tồn nguồn tài nguyên tuyến trùng EPN; iii) đánh giá tiềm năng phòng trừ sinh học của các chủng tuyến trùng EPN bản địa đối với sâu hại tại địa phương; iv) cung cấp vật liệu ban đầu để sản xuất sinh khối lớn phục vụ cho phòng trừ sinh học sâu hại.

Từ năm 1997 đến nay, Phòng Tuyến trùng học, Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật tiến hành điều tra phân lập tuyến trùng ký sinh gây bệnh côn trùng ở Việt Nam. Hơn 70 chủng tuyến trùng EPN đã được phân lập từ các hệ sinh thái rừng tự nhiên, bãi biển hoang sơ và hệ sinh thái nông nghiệp ở Việt Nam. Trong số này nhiều chủng/loài đã được nghiên cứu tuyển chọn đưa vào sản xuất sinh khối, sử dụng cho phòng trừ sinh học sâu hại. Tuy nhiên, việc duy trì bảo quản các chủng tuyến trùng EPN hiện nay vẫn được tiến hành bằng phương pháp nhân nuôi liên tục *in vivo* trên giá thể côn trùng là ấu trùng tuổi 5 của bướm sấp lớn (*Galleria mellonella* - GM). Mặc dù công nghệ nhân nuôi bằng giá thể côn trùng (*in vivo*) này khá đơn giản, giá thành rẻ nhưng mất nhiều công sức và thời gian. Đặc biệt, việc duy trì bảo quản tuyến trùng EPN theo công nghệ nhân nuôi *in vivo* liên tục trên một loại côn trùng là bướm sấp lớn

(GM) có thể làm giảm độc lực của các chủng tuyến trùng EPN. Vì vậy, việc lựa chọn bảo quản đông lạnh tuyến trùng EPN trong nitrogen lỏng được coi là giải pháp tối ưu để bảo quản lâu dài tuyến trùng EPN mà vẫn có thể giữ được độc lực của chúng (Wang, Grewal, 2002).

Bảo quản đông lạnh tuyến trùng EPN cho phép duy trì nguồn gen của tuyến trùng EPN nhằm cung cấp nguồn vật liệu ban đầu cho các nghiên cứu đánh giá, tuyển chọn và sản xuất sinh khối tuyến trùng phục vụ phòng trừ sinh học. Tuy nhiên, việc bảo quản đông lạnh tuyến trùng EPN trong nitrogen lỏng cũng không đơn giản, vì tỷ lệ sống sót và độc lực của tuyến trùng phụ thuộc vào một số yếu tố như nồng độ chất gây mê Glycerol, tình trạng và nồng độ ấu trùng cảm nhiễm (IJs), điều kiện xử lý IJs trong dung dịch bảo quản trước và sau khi đông lạnh. Bài báo này cung cấp quy trình cải tiến xử lý tuyến trùng và kết quả bảo quản đông lạnh 27 chủng tuyến trùng EPN của Việt Nam.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu

Nguồn tuyến trùng EPN sử dụng cho thí nghiệm bảo quản đông lạnh trong nitrogen lỏng bao gồm 27

chủng tuyến trùng bản địa Việt Nam, trong đó có 24 chủng giống *Steinernema* và 3 chủng giống *Heterorhabditis* (Bảng 1). Các chủng này được phân lập trong thời gian từ năm 1997 đến 2015 từ các hệ sinh thái rừng tự nhiên và hệ sinh thái nông nghiệp ở Việt Nam.

Tất cả các chủng tuyến trùng EPN trên đã được giám định đến loài và đánh giá về độc lực (hiệu lực gây chết và khả năng sinh sản) trên bướm sáo lớn, trong đó có 6 chủng, bao gồm S-TG10, S-TK10, S-TS10, S-DL13, S-PQ16 và S-NT3 đã được đưa vào sản xuất sinh khối sử dụng cho phòng trừ sinh học một số sâu hại quan trọng ở cây trồng Việt Nam (Nguyễn Ngọc Châu, 2008; Nguyễn Hữu Tiên *et al.*, 2015; Đỗ Tuấn Anh *et al.*, 2016; Đỗ Tuấn Anh, Nguyễn Ngọc Châu, 2016). Trước thử nghiệm bảo quản đông lạnh này, các chủng tuyến trùng EPN được duy trì bằng nhân nuôi *in vivo* định kỳ trên ấu trùng GM và nguồn ấu trùng cảm nhiễm (IJs) được bảo quản trong nước cất ở 12-14°C theo quy trình của Kaya, Stock (1997).

Vật tư, hóa chất để xử lý tuyến trùng: Glycerine 30%, Methanol 70%, dung dịch Ringer, đá xay, ống Eppendorf và giá đựng đã được làm lạnh, giấy lọc Whatman SS 595, 55mm, được chuẩn bị sẵn trước một ngày trước khi triển khai thí nghiệm.

Bảng 1. Danh sách các chủng/loài tuyến trùng EPN sử dụng cho thí nghiệm bảo quản đông lạnh trong nitrogen lỏng.

TT	Ký hiệu chủng EPN	Tên loài EPN	TT	Ký hiệu chủng EPN	Tên loài EPN	TT	Ký hiệu chủng EPN	Tên loài EPN
1	S-SP	<i>S. longicaudum</i>	10	S-TX1	<i>S. sangi</i>	19	S-DL14	<i>S. cumgarensis</i>
2	S-NH7	<i>S. longicaudum</i>	11	S-XL3147	<i>S. longicaudum</i>	20	S-DL13	<i>S. siamkayai</i>
3	S-XS4	<i>S. sangi</i>	12	S-BM12	<i>S. huense</i>	21	S-DL23	<i>S. eapokense</i>
4	S-TD16	<i>S. backanense</i>	13	S-QTr	<i>Steinernema</i> sp.1	22	S-DL9	<i>Steinernema</i> sp.2
5	S-BV	<i>S. longicaudum</i>	14	S-NT	<i>S. longicaudum</i>	23	S-DM	<i>S. longicaudum</i>
6	S-ML7	<i>S. longicaudum</i>	15	S-KT3987	<i>S. nepalense</i>	24	S-PQ16	<i>S. phuquocense</i>
7	S-TG10	<i>S. thanhii</i>	16	S-TS10	<i>S. robustispiculum</i>	25	HCB3452	<i>H. indica</i>
8	S-CP12	<i>S. loci</i>	17	S-TS2	<i>S. sasonense</i>	26	H-NT3	<i>H. indica</i>
9	S-TK10	<i>S. loci</i>	18	S-DL13	<i>S. cumgarensis</i>	27	HKT3987	<i>H. indica</i>

Phương pháp nghiên cứu

Quy trình xử lý bảo quản đông lạnh: Xử lý và bảo quản đông lạnh tuyến trùng EPN trong nitrogen lỏng được tiến hành theo quy trình của Curran *et al.* (1992) với một vài cải tiến trong điều kiện Việt Nam. Quy trình cải tiến gồm 5 bước sau: (1) Tách

tuyến trùng sống để định lượng bằng một rây lọc đặt trong một đĩa Petri để tuyến trùng sống tự chui qua rây lọc. (2) Chuyển tuyến trùng vào dung dịch Ringer với nồng độ 10⁵-10⁶ IJs/mL. (3) Ủ tuyến trùng trong dung dịch Glycerol 15% trong đĩa Petri bằng cách trộn dung dịch Ringer chứa tuyến trùng với dung dịch Glycerol 30% theo tỷ lệ 1:1, sau đó

cho bọc kín đĩa Petri bằng giấy parafilm và để trong hộp tối trong 48 giờ ở nhiệt độ 25°C. Tiến hành kiểm tra số lượng tuyến trùng sống/chết sau 24 và 48 giờ. (4) Loại bỏ dung dịch ngâm ủ tuyến trùng bằng máy hút chân không qua giấy lọc và rửa tuyến trùng bằng 10 mL methanol 70% (nhiệt độ thường). (5) Dùng pipet hút 1 mL methanol 70% để rửa tuyến trùng trên giấy lọc vào 1 ống Eppendorf 2 mL đáy nhọn. (6) chuyển ống chứa tuyến trùng vào buồng lạnh (-5°C) và ủ lạnh trong 10 phút trên một hộp đá xay (sau 5 phút lắc đều ống chứa methanol tuyến trùng). (7) Dùng pipet chia tuyến trùng đã ủ lạnh vào 10 ống Eppendorf chuyên dụng cho đông lạnh (đáy bằng, nắp màu để phân biệt các lô IJs sắp xếp trên giá đông lạnh), bằng cách hút 100 µl cho mỗi ống Eppendorf, sau đó xếp các ống Eppendorf vào giá mẫu đông lạnh và chuyển nhanh vào bình nitrogen lỏng.

Rã đông: Sau 72 giờ bảo quản đông lạnh, mỗi chủng lấy 1 ống cho tan đông bằng cách hút 1,5 mL dung dịch Ringer cho vào môi tuýp và để 30 phút ở nhiệt độ phòng.

Xác định sự sống sót của tuyến trùng sau đông lạnh: Đổ tuyến trùng ra hộp đếm để xác định tỷ lệ tuyến trùng sống /chết dưới kính hiển vi soi nổi OLYMPUS SZH10. Tuyến trùng sống được xác định ở trạng thái uốn cong chuyển động hoặc một số cơ thể ở trạng thái thẳng như chết nhưng chúng sẽ cử động khi chạm nhẹ kim nhọn vào chúng.

Xác định độc lực của tuyến trùng sau đông lạnh: Mỗi chủng đông lạnh và đối chứng (không đông lạnh) gây nhiễm cho 10 ấu trùng tuổi 5 bướm sấp lớn (*Galleria mellonella*) đặt trong đĩa Petri đường kính 60 mm có lót sẵn giấy lọc đã được chủng sẵn với 1 mL nước chứa 150 IJs (15 IJs/sâu). Thí nghiệm được lặp lại 3 lần và các đĩa Petri gây nhiễm được đặt trong buồng tối ở nhiệt độ 25°C. Tiến hành kiểm tra sâu chết sau 72 giờ. Sâu chết do tuyến trùng EPN được xác định với đặc trưng có màu nâu đen (đối với các chủng *Steinernema*) hoặc đỏ gạch (đối với các chủng *Herterorhabditis*), không có mùi thối

Bảng 2. Ảnh hưởng nồng độ ấu trùng cảm nhiễm (IJs) và Glycerol đến tỷ lệ sống của tuyến trùng.

Công thức nồng độ	Chủng S-PQ16		Chủng H-KT3987	
	15%	30%	15%	30%
Glycerol				
60.000 IJs/mL	56,6 ± 8,9 c	49,6 ± 2,7 c	67,6 ± 4,9 b	38,3 ± 2,7 c
12.000 IJs/mL	89,4 ± 3,0 a	74,5 ± 4,7 a	91,0 ± 2,8 a	64,7 ± 6,6 a
1.200 IJs/mL	80,9 ± 1,9 b	61,6 ± 3,2 b	77,9 ± 2,6 b	49,7 ± 2,8 b

* chữ cái khác nhau trong cùng một cột thể hiện sai khác có ý nghĩa theo Duncan với P ≤ 0,05

vỏ cơ thể ấu trùng GM trở nên dai, đàn hồi và trong suốt và có thể quan sát tuyến trùng vận động bên trong xác chết của ấu trùng GM.

Xử lý thống kê: Tỷ lệ sống (%) của các chủng tuyến trùng được xử lý theo chương trình thống kê Duncan với P = 0.05 (Anon, 1988).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Ảnh hưởng của nồng độ IJs và Glycerol đến sự sống sót của tuyến trùng trước bảo quản

Kết quả thí nghiệm xử lý tuyến trùng ở các công thức nồng độ IJs là 60.000 IJs/mL; 12.000 IJs/mL và 1.200 IJs/mL bằng Glycerol 15% và 30% đối với 2 chủng S-PQ16 và H-KT3987 (Bảng 2) cho thấy cả nồng độ IJs và nồng độ Glycerol đều có ảnh hưởng đến tỷ lệ sống của tuyến trùng trong quá trình xử lý trước và sau bảo quản đông lạnh. Trong đó, nồng độ IJs có ảnh hưởng rõ rệt hơn. Sau thời gian xử lý sau 48 giờ, với nồng độ Glycerol 15% thì tỷ lệ sống của hai chủng S-PQ16 và H-KT3987 đều có xu hướng tăng giảm tương tự nhau là 56,6% (S-PQ16) và 67,6% (H-KT3987) ở công thức nồng độ 60.000 IJs/mL, trong khi ở công thức nồng độ 12.000 IJs/mL, tỷ lệ sống sót của cả hai chủng đều ở mức cao nhất là 89,4% ở S-PQ16 và 91% ở H-KT3987. Ở công thức nồng độ thấp 1.200 IJs/mL thì tỷ lệ sống là 80,9% ở chủng S-PQ16 và 77,9% ở chủng H-KT3987, nghĩa là thấp hơn so với nồng độ 12.000 IJs/mL nhưng vẫn cao hơn ở nồng độ 60.000 IJs/mL.

Liên quan đến nồng độ Glycerol thì tỷ lệ sống của cả hai chủng ở nồng độ Glycerol 15% cao hơn công thức thí nghiệm ở nồng độ Glycerol 30%. Tương tự, ở nồng độ tuyến trùng thấp 1.200 IJs/mL thì tỷ lệ sống của chúng cũng giảm xuống mức thấp nhất là 61,6% ở S-PQ16 và 49,7% ở H-KT3987. Trong đó, tỷ lệ sống của chủng S-PQ16 thấp hơn chủng H-KT3987 khi xử lý với Glycerol 15%, trong khi xử lý với Glycerol 30% thì tỷ lệ sống của chủng S-PQ16 lại cao hơn so với H-KT3987 (Bảng 2).

Sự sai khác về tỷ lệ sống của hai chủng tuyến trùng EPN ở các nồng độ IJs khác nhau cho thấy hầu hết sự sai khác này có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$). Điều này một lần nữa cho thấy rằng ngoài nồng độ Glycerol xử lý thì nồng độ IJs có ảnh hưởng rõ rệt tới tỷ lệ sống của các chủng tuyến trùng. Kết quả này là cơ sở lựa chọn nồng độ tuyến trùng và Glycerol tối ưu (12.000 IJs/mL và Glycerol 15%) để xử lý toàn bộ 27 chủng tuyến trùng EPN cho bảo quản đông lạnh trong nitrogen lỏng.

Khả năng sống sót của các tuyến trùng EPN sau đông lạnh

Tất cả 27 chủng tuyến trùng EPN bản địa đều có tỷ lệ sống khá tốt sau đông lạnh trong nitrogen lỏng

(Bảng 3), trong đó, 4 chủng S-CP12, S-PQ16, S-NH7, S-TX1 có tỷ lệ sống cao trên 90% (90 - 95%); 11 chủng có tỷ lệ sống cao từ 80 - 89% là S-TK10, S-TS10, S-ĐM, S-BM12, S-QTr, S-TS2, S-DL9, S-TG10, S-DL14, H-NT3 và H-KT3987; 10 chủng có tỷ lệ sống dưới 80% (70 - 76%) là S-DL23, S-XS4, S-DL13, S-NT, S-ML7, S-SP, S-BV, S-XL3147, S-DL13A và H-CB3452; 2 chủng còn lại có tỷ lệ sống dưới 70% là S-KT3987 (69,2%) và S-TD16 (55,6%). Tính chung tỷ lệ sống trung bình của 27 chủng là 79,2%, thấp nhất là 55,6 và cao nhất là 95,7%. Trong đó, tỷ lệ sống trung bình của 24 chủng *Steinernema* là 79,2% (55,6 - 95,7%), không có khác biệt so với tỷ lệ sống trung bình của 3 chủng *Heterorhabditis* là 79% (70,1 - 86,2%).

Bảng 3. Tỷ lệ sống (%) của các tuyến trùng EPN sau bảo quản đông lạnh.

STT	Chủng EPN	Tỷ lệ sống	STT	Chủng EPN	Tỷ lệ sống	STT	Chủng	Tỷ lệ sống
1	S-SP	71,7 ± 5,1	10	S-TX1	90,3 ± 5,3	19	S-DL14	80,6 ± 5,6
2	S-NH7	91,3 ± 3,6	11	S-XL3147	70,8 ± 1,1	20	S-DL13A	70,5 ± 1,2
3	S-XS4	75,9 ± 1,4	12	S-BM12	82,9 ± 4,1	21	S-DL23	76,1 ± 1,5
4	S-TD16	55,6 ± 3,7	13	S-QTr	81,6 ± 5,5	22	S-DL9	81,4 ± 5,3
5	S-BV	71,6 ± 2,8	14	S-NT	73,9 ± 5,9	23	S-DM	83,9 ± 4,0
6	S-ML7	71,9 ± 1,5	15	S-KT3987	69,2 ± 1,6	24	S-PQ16	95,3 ± 2,4
7	S-TG10	80,8 ± 3,9	16	S-TS10	84,1 ± 1,7	25	H-CB3452	70,1 ± 1,3
8	S-CP12	95,7 ± 3,0	17	S-TS2	81,5 ± 2,0	26	H-NT3	86,2 ± 1,4
9	S-TK10	89,9 ± 3,6	18	S-DL13	74,7 ± 1,5	27	H-KT3987	80,6 ± 2,7

Bảng 4. Tỷ lệ chết của GM gây nhiễm bởi các chủng tuyến trùng EPN sau bảo quản đông lạnh. ĐL = đông lạnh; ĐC = đối chứng

TT	Chủng EPN	Tỷ lệ chết GM (ĐL)	Tỷ lệ chết GM (ĐC)	TT	Chủng EPN	Tỷ lệ chết GM (ĐL)	Tỷ lệ chết GM (ĐC)
1	S-SP	76,7 ± 5,8	66,7 ± 5,8	15	S-KT3987	73,3 ± 11,5	76,7 ± 5,8
2	S-NH7	63,3 ± 5,8	73,3 ± 5,8	16	S-TS10	70,0 ± 10,0	76,7 ± 5,8
3	S-XS4	63,3 ± 5,8	73,3 ± 5,8	17	S-TS2	70,0 ± 10,0	76,7 ± 5,8
4	S-TD16	70,0 ± 0,0	70,0 ± 10,0	18	S-DL13	70,0 ± 10,0	63,3 ± 5,8
5	S-BV	63,3 ± 5,8	66,7 ± 5,8	19	S-DL14	66,7 ± 5,8	70,0 ± 0,0
6	S-ML7	60,0 ± 0,0	63,3 ± 5,8	20	S-DL13A	80,0 ± 0,0	76,7 ± 5,8
7	S-TG10	66,7 ± 11,5	70,0 ± 10,0	21	S-DL23	76,7 ± 5,8	66,7 ± 5,8
8	S-CP12	73,3 ± 11,5	70,0 ± 10,0	22	S-DL9	83,3 ± 5,8	76,7 ± 5,8
9	S-TK10	76,7 ± 5,8	66,7 ± 5,8	23	S-DM	73,3 ± 5,8	63,3 ± 5,8
10	S-TX1	70,0 ± 10,0	73,3 ± 11,5	24	S-PQ16	83,3 ± 11,5	80,0 ± 0,0
11	S-XL3147	66,7 ± 5,8	63,3 ± 5,8	25	H-CB3452	73,3 ± 5,8	76,7 ± 5,8
12	S-BM12	70,0 ± 5,8	66,7 ± 11,5	26	H-NT3	66,7 ± 5,8	66,7 ± 5,8
13	S-QTr	73,3 ± 5,8	70,0 ± 10,0	27	H-KT3987	80,0 ± 10,0	76,7 ± 5,8
14	S-NT	73,3 ± 5,8	66,7 ± 11,5				

Độc lực của các chủng tuyến trùng EPN sau đông lạnh

Các chủng tuyến trùng EPN sau đông lạnh trong nitrogen lỏng được gây nhiễm trên ấu trùng GM để đánh giá độc lực. Kết quả thí nghiệm (Bảng 4) cho thấy tất cả 27 chủng bảo quản đông lạnh đều duy trì được độc lực. Trong thí nghiệm của chúng tôi với nồng độ nhiễm 150 IJs/mL tỷ lệ chết trung bình của GM nhiễm với IJs đã qua đông lạnh là 71,6% (60,0 - 83,3%) so với 70,6% (63,6 - 80%) ở công thức đối chứng (nhiễm với IJs không qua đông lạnh). Như vậy, độc lực của các chủng tuyến trùng EPN qua đông lạnh vẫn được duy trì như trước khi đông lạnh. Kết quả này cũng phù hợp với các nghiên cứu trước đó của Bai *et al.* (2004) và Nguyễn Ngọc Châu, Ehlers (2007).

THẢO LUẬN

Nghiên cứu trước đây của Bai *et al.* (2004) cho thấy tỷ lệ sống sót của tuyến trùng EPN trong khi ngâm ủ trước khi bảo quản đông lạnh trong nitrogen lỏng không chỉ phụ thuộc nồng độ Glycerol mà còn phụ thuộc vào nồng độ ấu trùng cảm nhiễm (IJs). Ngoài ra, nồng độ của IJs trong dung dịch Ringer khi tan đông cũng có ý nghĩa quan trọng đến sự sống sót của tuyến trùng EPN sau khi đông lạnh. Tuy nhiên, công bố của Bai *et al.* (2004) chỉ có số liệu về ảnh hưởng của nồng độ tuyến trùng và nồng độ glycerin trong ngâm ủ trước khi đông lạnh mà không có thông tin về ảnh hưởng của nồng độ IJs đến tỷ lệ sống sau bảo quản đông lạnh.

Có thể giả định về nguyên nhân tăng tỷ lệ sống của IJs sau bảo quản đông lạnh ở một số công thức thí nghiệm với nồng độ cao hơn có thể do tăng nồng độ của các chất chống đông tự nhiên như Lipid, Trehalose hoặc Glycerol, trong đó tuyến trùng phản ứng với hỗn hợp Glycerol-Ringer bằng cách sản sinh ra Trehalose và Glycerol là các chất bảo vệ tuyến trùng chống lại sự thay đổi nhiệt độ hoặc các stress môi trường. Tuy nhiên một khi nồng độ IJs quá cao có thể làm giảm tỷ lệ sống của tuyến trùng do hiệu ứng giảm oxy huyết (Jagdale, Grewal, 2003; Qiu, Bedding, 2002). Thí nghiệm của Popiel, Vasquez (1991) đã áp dụng quy trình ngâm ủ qua 2 giai đoạn đối với 2 chủng tuyến trùng *Steinernema capocapsae* và *Heterorhabditis bacteriophora*, trước tiên ngâm ủ tuyến trùng trong Glycerol qua 24 giờ, sau đó tuyến trùng được chuyển sang ngâm ủ trong methanol 70% ở nhiệt độ 0-1°C trong 10 phút trước khi chuyển đông lạnh trong nitrogen. Thí nghiệm bảo quản

đông lạnh của Curran *et al.* (1992) trên cơ sở cải tiến quy trình của Popiel, Vasquez (1991) bằng cách hạ thấp nồng độ Glycerol và kéo dài thời gian ngâm ủ tuyến trùng (nồng độ Glycerol 15 % và thời gian ngâm ủ là 48 giờ) đã cho kết quả khá tốt với tỷ lệ tuyến trùng sống sót 69% đối với các chủng *Steinernema* và 68% đối với các chủng *Heterorhabditis*. Thí nghiệm của chúng tôi với nồng độ 12.000 IJs/mL đạt tỷ lệ IJs sống cao 89,4 - 92%, vì vậy, đây được coi là nồng độ tối ưu để xử lý ngâm ủ tuyến trùng EPN trong Glycerol-Ringer trước khi đông lạnh.

Các nghiên cứu của Zachariassen (1985) và Nugent *et al.* (1996) cho thấy tuyến trùng có khả năng tích lũy chất chống lạnh như Trehalose và Glycerol để thích nghi với nhiệt độ thấp do các chất này thay thế lượng nước bị mất đi trong cơ thể tuyến trùng nên làm giảm lượng băng kết tinh trong cơ thể. Quá trình này có tác dụng ngăn chặn cơ thể IJs bị đông băng ở nhiệt độ dưới 0°C. Lee (1991) cũng đã xác định các chất chống đông như trên trong cơ thể của tuyến trùng với hàm lượng khá cao. Lượng Glycerol để bảo vệ cơ thể chịu lạnh như vậy rất khác nhau ở các chủng tuyến trùng EPN, phụ thuộc vào phản ứng sinh học và cơ địa của chủng tuyến trùng. Điều này cũng giải thích vì sao khi xử lý hai chủng S-PQ16 và H-KT3987 với cùng nồng độ Glycerol 15% và 30% thì tỷ lệ sống của chúng khác nhau: 89,4% và 91% ở nồng độ Glycerol 30% (thực chất là 15% sau pha trộn với Ringer) so với 74,5% và 64,7% ở nồng độ Glycerol 15% (thực chất là 7,5% sau pha trộn với Ringer). Theo Lee (1991) khi tăng nồng độ Glycerol lên thì lượng Glycerol tích lũy trong cơ thể tuyến trùng cũng tăng lên, nhưng khi lượng Glycerol vượt quá mức cần thiết, cơ thể tuyến trùng có thể sẽ bị co rút quá mức làm cho tuyến trùng bị chết. Ngược lại ở nồng độ Glycerol quá thấp thì lượng tích lũy chất chống đông thấp không đủ bảo vệ tuyến trùng. Tuy nhiên, nghiên cứu của Popiel, Vasquez (1991) cho thấy với nồng độ xử lý Glycerol 22% thì tỷ lệ sống của *S. carpocapsae* sau 48 giờ ngâm ủ là 74%, trong khi tỷ lệ sống của *H. bacteriophora* chỉ là 5,8%. Điều này một lần nữa khẳng định cùng một nồng độ ngâm ủ thì tỷ lệ sống của tuyến trùng cũng khác nhau ở các chủng/loài tuyến trùng phụ thuộc khả năng phản ứng chống lại các thay đổi đột ngột (stress) môi trường ngâm ủ và sinh khối của các chủng tuyến trùng EPN.

Tình trạng thành thực của ấu trùng cảm cũng có ảnh hưởng quan trọng đến tỷ lệ sống khi ngâm ủ trong Glycerol. Nghiên cứu trước đây của Nguyễn

Ngọc Châu, Ehlers (2007) cho thấy khi ấu trùng của các chủng tuyến trùng EPN mới thu hoạch chưa đủ thời gian thành thực (immature) tức là chưa trở thành ấu trùng cảm nhiễm thì tỷ lệ tuyến trùng bị chết khá nhiều ngay từ khâu ngâm ủ trong Glycerol trước khi đông lạnh. Tuy nhiên, khi để ấu trùng các chủng tuyến trùng EPN qua khoảng thời gian 7-10 ngày thì ấu trùng tuổi 2 chuyển thành ấu trùng cảm nhiễm thành thực (matured) để đưa vào bảo quản đông lạnh thì cho kết quả tốt nhất. Vì vậy, trong thí nghiệm này tất cả 27 chủng tuyến trùng EPN sử dụng cho bảo quản đông lạnh đã có đủ thời gian 2-3 tuần để trở thành ấu trùng cảm nhiễm thành thực. Thêm vào đó, nồng độ IJs và Glycerol tối ưu là 15% Glycerol và 12000 IJs/mL cũng được xác định thông qua thử nghiệm ban đầu đối với 2 chủng (S-PQ18 và H-KT3987) đại diện cho 2 giống tuyến trùng EPN là *Steinernema* và *Heterorhabditis*.

KẾT LUẬN

Nồng độ tối ưu của tuyến trùng trong bảo quản đông lạnh bằng nitrogen lỏng là 12.000 IJs/mL, nồng độ tối ưu của Glycerol để ngâm ủ tuyến trùng trước khi đông lạnh là 15%.

Tỷ lệ sống sau bảo quản đông lạnh của 27 chủng tuyến trùng ký sinh gây bệnh côn trùng bản địa Việt Nam, đạt trung bình là 79,2%, trong đó, tỷ lệ sống trung bình của các chủng *Steinernema* là 79% (55,6 - 95,7%) của các chủng *Heterorhabditis* là 79% (70,1 - 86,2%). Tất cả các chủng tuyến trùng EPN qua đông lạnh vẫn duy trì độc lực.

Quy trình bảo quản đông lạnh trong nghiên cứu này có thể đáp ứng yêu cầu bảo quản đông lạnh toàn bộ mẫu tuyến trùng EPN sống đang được lưu giữ ở Việt Nam.

Lời cảm ơn: Công trình được hoàn thành trong khuôn khổ đề tài VAST.ĐL 04/13-14 với sự tài trợ của Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Anon (1988) SAS/STAR User Guide Release 6.03, SAS Institute, Cary, NC, USA: 1028.
 Bai C, Shapiro DI, Gaugler R, Yi S (2004) Effect of entomopathogenic nematode concentration on survival during cryopreservation in liquid nitrogen. *Journal of Nematology* 36(3): 281–284.

Curran J, Gibert C, Buler K (1992) Routine

cryopreservation of isolates of *Steinernema* and *Heterorhabditis* spp. *J Nematol* 24(2): 269–270.

Đỗ Tuấn Anh, Nguyễn Hữu Tiền, Nguyễn Ngọc Châu (2016) Hiệu lực gây chết và khả năng sinh sản của 5 chủng tuyến epn trên bọ hung. *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 14(2): (đang in)

Jagdale GB, Grewal PS (2003) Acclimation of entomopathogenic nematodes to novel temperatures: trehalose accumulation and the acquisition of thermotolerance. *Int J Parasitol* 33: 145–152.

Kaya HK, Stock SP (1997) Techniques in insect nematology. In: LA Lacey (ed.) *Manual of techniques in insect pathology*. San Diego, CA: Academic Press: 281–324.

Lee RE Jr (1991) Principles of insect low temperature tolerance. In: Lee RE Jr and Denlinger DL (eds.) *Insects at Low Temperature*. Chapman and Hall, NY: 17–46.

Nguyễn Ngọc Châu (2008) *Tuyến trùng ký sinh gây bệnh côn trùng ở Việt Nam*. NXB Khoa học tự nhiên và Công nghệ, 351 trang.

Nguyễn Ngọc Châu, Ehlers R (2007) Ảnh hưởng của nồng độ Glycerol đến tỷ lệ sống của tuyến trùng trong bảo quản đông lạnh bằng nitrogen lỏng. *Tạp chí Sinh học* 29(4): 13–18.

Nguyễn Thị Duyên, Lê Thị Mai Linh, Trịnh Quang Pháp, Nguyễn Ngọc Châu (2015) Ảnh hưởng nồng độ glycerin đến tỷ lệ sống của tuyến trùng *Heterorhabditis indica* (chủng H-NT3) khi bảo quản trong nitrogen lỏng. *Tuyển tập Báo cáo HNKHTQ-6 về Sinh thái-TNSV*. NXB KH-CN Hà Nội: 1317–1322.

Nguyễn Hữu Tiền, Nguyễn Ngọc Châu (2015) Hiệu lực gây chết và khả năng sinh sản của 4 chủng tuyến trùng ký sinh gây bệnh côn trùng trên sâu quy (*Zophobas morio*) trong điều kiện phòng thí nghiệm. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 13(4): 1031–1039.

Nugent MJ, O'Leary SA and Burnell AM (1996) Optimised procedures for the cryopreservation of different species of *Heterorhabditis*. *Fundamental and Applied Nematology* 19: 1–6.

Popiel I, Vasquez EM (1991) Cryopreservation of *Steinernema carpocapsae* and *Heterorhabditis bacteriophora*. *J Nematol* 23 (4): 432–437.

Qiu LH, Bedding RA (2002) Characteristics of protectant synthesis of infective juveniles of *Steinernema carpocapsae* and importance of Glycerol as a protectant for survival of the nematodes during osmotic dehydration. *Comp Biochem Physiol* 131B: 757–765.

Triantaphyllou AC, McCabe E (1989) Efficient preservation of root-knot and cyst nematodes in liquid nitrogen. *J Nematol* 21: 423–426.

Wang X, Grewal PS (2002) Rapid genetic deterioration of

environmental tolerance and reproductive potential of an entomopathogenic nematode during laboratory maintenance. *Biologic Cont* 23: 71–78.

Zachariassen KE (1985) Physiology of cold tolerance in insects. *Physiol Rev* 65: 799–832.

THE CRYOPRESERVATION STORAGE OF INDIGENOUS ENTOMOPATHOGENIC NEMATODES IN VIETNAM IN LIQUID NITROGEN

Nguyen Ngoc Chau, Do Tuan Anh

Institute of Ecology and Biological Resources, Vietnam Academy of Science and Technology

SUMMARY

Cryopreservation of entomopathogenic nematodes in liquid nitrogen is considered as an optimal solution for long term storage with the biological generic maintenance of the benefit nematode resource. Two important factors that can be affect in the survival and virulence of the entomopathogenic nematode strains in the incubating process before deposition of nematodes in frozen e.g. concentration of infective juveniles (IJs) and concentration of Glycerol which is protectant for nematodes to frozen. The assays established an optimal concentrations of nematodes and an optimal concentrations of Glycerol in the incubating processing were 12,000 IJs/mL and 15% Glycerol. Based on these establishments firstly implemented in Viet Nam, the cryopreservation of entomopathogenic nematodes were carried out with 27 indigenous nematode strains, of these 24 strains of the genus *Steinernema* and 3 strains of the genus *Heterorhabditis*. The examination on survival and virulent of the frozen nematode strains after 72 hours stored in liquid nitrogen were 79.2% with *Steinernema* strains and 79% with *Heterorhabditis* strains. The mortality rates of *Galleria mellonella* larvae were 71.6% with the frozen IJs and 70.6% in average with the no frozen IJs (as control). It is indicated that the pathogenicity of nematodes does not have significant difference between frozen and non-frozen infective juveniles. These results showed that the entomopathogenic nematode strains stored through cryopreservation in liquid nitrogen retained stable original virulence. Thus cryopreservation procedure established and applied in this study can be satisfied the storage standards for the living collection of entomopathogenic nematodes in Vietnam.

Keywords: Cryopreservation, liquid nitrogen, concentration, survival, indigenous entomopathogenic nematodes, *Heterorhabditis*, *Steinernema*, Vietnam