

ẢNH HƯỞNG CỦA THỜI GIAN BẢO QUẢN ĐẾN SỰ SỐNG SỐT, ĐỘC LỰC VÀ SINH SẢN CỦA MỘT SỐ CHỦNG TUYẾN TRÙNG GIỐNG *STEINERNEMA* VÀ *HETERORHABDITIS*

VŨ TÚ MỸ, NGUYỄN NGỌC CHÂU

Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật

Với nhiều ưu thế nổi bật trong phòng trừ sâu hại, các loài tuyến trùng ký sinh gây bệnh côn trùng thuộc hai giống *Heterorhabditis* (Họ Heterorhabditidae) và *Steinernema* (Họ Steinernematidae) đã được nhiều nước trên thế giới nghiên cứu và sử dụng cho phòng trừ sinh học sâu hại. Hiện trên thế giới đã phân lập được hàng trăm chủng thuộc nhóm tuyến trùng này, nhưng cũng chỉ một số chủng được tuyển chọn và đưa vào sử dụng. Một trong những hạn chế của nhóm tác nhân sinh học này là thời gian bảo quản còn hạn chế, hơn nữa chúng có thể giảm độc lực trong quá trình bảo quản. Một số nghiên cứu cho thấy, ấu trùng cảm nhiễm (IJs) của tuyến trùng *Steinernema* spp. được bảo quản ở nhiệt độ 5-10°C với mật độ 20.000 IJs/ml có thể giữ được từ 6-12 tháng, độc lực diệt sâu vẫn còn, trong khi *Heterorhabditis* spp. chỉ giữ được độc lực 4 tháng [9, 13]. Ở nhiệt độ cao hơn thời gian bảo tồn giảm đi [9]. Vì vậy, nghiên cứu đánh giá ảnh hưởng của thời gian bảo quản đến sự sống sót và độc lực của IJs là cơ sở quan trọng để tuyển chọn một chủng sử dụng cho sản xuất chế phẩm sinh học tuyến trùng.

Ở Việt Nam đến nay đã phân lập được hơn 65 chủng EPN trong đó có 45 chủng thuộc giống *Steinernema* và 20 chủng thuộc giống *Heterorhabditis*. Từ các chủng được phân lập, đã nhân nuôi và duy trì thành công 43 chủng EPN trong đó 31 chủng thuộc giống *Steinernema* và 12 chủng thuộc giống *Heterorhabditis* [10]. Trong số các chủng EPN đã được nghiên cứu thử nghiệm, thì 4 chủng

tuyến trùng S-TX1, S-XS4 (*Steinernema sangi*) và H-NT3, H-MF11 (*Heterorhabditis indica*) đã được thử nghiệm cho phòng trừ sinh học sâu hại cây trồng, có hiệu lực diệt sâu cao [10].

Bài báo này công bố kết quả thử nghiệm xác định thời gian bảo quản của 4 chủng EPN trên đây và ảnh hưởng của thời gian bảo quản đến tỷ lệ sống sót, độc lực học cũng như khả năng sinh sản của chúng trong *Galleria*.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Phân lập và nhân nuôi tuyến trùng

Các tuyến trùng bản địa sử dụng cho nghiên cứu bao gồm 2 chủng là S-TX1 và S-XS4 thuộc loài *Steinernema sangi* Phan et al., 2001 và 2 chủng H-NT3 và H-MF11 thuộc loài *Heterorhabditis indica* Poinar et al., 1992. Các chủng này được phân lập từ mẫu đất theo phương pháp côn trùng môi [1]. Ấu trùng xâm nhiễm (IJs) được nhân nuôi *in vivo* bằng ấu trùng bướm sếp lớn *Galleria mellonella* (LM). Thu IJs từ LM bằng kỹ thuật white trap [13] và được bảo quản 10 ngày trong đĩa petri ở nồng độ 2000 IJs/ml, nhiệt độ phòng trước khi đưa vào bảo quản lâu dài.

2. Theo dõi thí nghiệm

IJs được bảo quản trong nước cất được chứa trong các lọ nhựa kích thước 6 × 6 × 6 cm nồng độ 1000 IJs/ml, mỗi lọ 10 ml và bảo quản liên tục trong tủ ổn nhiệt (MEDICOOL, SANYO) ở nhiệt độ 12°C. Thời gian theo dõi thí nghiệm là

20 tháng.

Định kỳ hàng tháng kiểm tra tỷ lệ sống (ST), hiệu lực gây chết đối với LM.(LC₅₀), khả năng sinh sản của mỗi chủng (số lượng IJs được sản sinh/LM).

Chuyển tuyến trùng vào hộp đếm (counting disk) và tính tỷ lệ sống và chết của IJs dưới kính hiển vi soi nổi. Sau đó loại bỏ số tuyến trùng chết bằng phương pháp lọc tủa với rây lọc, kích thước lỗ cỡ 40 µm, số IJs sống sẽ chui qua rây lọc xuống đáy đĩa Petri được sử dụng để gây nhiễm tiếp trên GM, số IJs chết còn nằm lại trên rây sẽ bị loại bỏ.

Thí nghiệm về hiệu lực gây chết được tiến hành trên LM với 10 công thức nồng độ từ 10-100 IJs/GM: mỗi công thức 5 GM và lặp lại 3 lần. Các GM chết do nhiễm IJs được chuyển sang đĩa petri mới và ủ ở nhiệt độ phòng để thu IJs và đánh giá sinh sản của tuyến trùng qua bảo quản.

Thời gian gây chết (LT₅₀) và hiệu lực gây chết (LC₅₀) được xử lý thống kê theo Anova với P < 0,005. Đánh giá sinh sản và nồng độ tối ưu theo Cabarnilas & Raulston, 1994 [2] và Elawad và cs., 1999 [3].

II. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Số lượng IJs sống qua hàng tháng, độc lực học cũng như sản lượng IJs/GM của 2 chủng *Steinernema* được trình bày ở bảng 1. Mối tương quan giữa số lượng IJs sống, LT₅₀, LC₅₀ và khả năng sinh sản của chúng được thể hiện ở các hình 1 và 2. Tương ứng, số lượng IJs sống qua hàng tháng, độc lực học cũng như sản lượng của IJs/GM của 2 chủng *Heterorhabditis* được trình bày thể hiện ở bảng 2. Mối tương quan giữa số lượng IJs sống, LT₅₀, LC₅₀ và khả năng sinh sản của chúng được thể hiện ở các hình 3 và 4.

Bảng 1

Thời gian sống (ST %), độc lực (LC50) và sản lượng IJs/GM của 2 chủng *Steinernema*

Tháng	S-TX1			S-XS4		
	ST (%)	LC ₅₀	Số lượng IJs (× 1000)	ST (%)	LC ₅₀	Số lượng IJs (× 1000)
0	100 □ 3	12 □ 1	51,2 □ 13,8	100 □	14 □ 1	46,3 □ 15,7
1	95,7 □ 2	11 □ 1	53,4 □ 15,2	92,7 □ 2	13 □ 1	47,5 □ 16,3
2	91,7 □ 3	13 □ 1	54,6 □ 19,5	86,3 □ 2	15 □ 2	45,9 □ 21,7
3	87,7 □ 4	12 □ 1	51,7 □ 21,3	81,3 □ 2	14 □ 1	46,7 □ 22,6
4	80,7 □ 5	12 □ 1	53,3 □ 14,5	74,3 □ 6	14 □ 1	45,7 □ 17,3
5	76,3 □ 3	13 □ 1	49,6 □ 26,2	70,3 □ 7	14 □ 1	47,3 □ 16,1
6	73,7 □ 3	15 □ 2	49,7 □ 23,1	63,7 □ 10	15 □ 1	46,4 □ 19,2
7	71,7 □ 3	15 □ 2	47,7 □ 27,4	62 □ 6	15 □ 2	48,5 □ 17,6
8	69,0 □ 3	15 □ 2	48,1 □ 31,2	59 □ 6	15 □ 2	48,2 □ 18,6
9	66,7 □ 3	21 □ 4	46,6 □ 29,5	57 □ 6	26 □ 3	38,5 □ 19,4
10	63,7 □ 5	41 □ 3	31,2 □ 21,3	52 □ 9	43 □ 5	29,1 □ 23,3
11	60,7 □ 5	47 □ 4	17,6 □ 32,1	45 □ 1	46 □ 5	19,5 □ 28,4
12	57,3 □ 6	54 □ 7	18,3 □ 25,6	42 □ 1	56 □ 7	17,8 □ 29,1
13	31,7 □ 4	112 □ 10	LM chết IJs không sinh sản	32 □ 9	125 □ 11	LM chết IJs không sinh sản
14	26,7 □ 2	247 □ 14	LM chết IJs không sinh sản	28 □ 7	121 □ 13	LM chết IJs không sinh sản
15	20,7 □ 5	0	LM không chết	22,3 □ 6	0	LM không chết
16	16,0 □ 3	-	LM không chết	18,7 □ 5	-	LM không chết
17	14,3 □ 3	-	LM không chết	14,3 □ 3	-	LM không chết
18	10,7 □ 3	-	LM không chết	12 □ 3	-	LM không chết
19	6,7 □ 2	-	LM không chết	5,3 □ 2	-	LM không chết
20	0,0			0,0		

Trên bảng 1 và 2 cho thấy: tỷ lệ sống của các chủng *Steinernema* ở tháng thứ nhất và tháng thứ hai với các chủng *Steinernema* và *Heterorhabditis* giảm khoảng 10% tuy nhiên sự sai khác về tỷ lệ sống của cả 4 chủng ở 2 tháng đầu là không có nghĩa ($P > 0,016$). Chỉ số LC_{50} và số lượng IJs/LM cũng chỉ rõ điều này. LC_{50} của cả 2 chủng dao động trong khoảng 12-13, số lượng IJs/LM 46,13 \pm 15,7 và 53,4 \pm 15,2.

Đối với hai chủng *Heterorhabditis* tỷ lệ sống khoảng 50% ở tháng thứ 5. Sự sai khác ST_{50} của

2 chủng này là không đáng kể (H-MF11 có $ST_{50} = 4,65 \pm 0,47$; H-NT3 = 4,87 \pm 0,42). Trong 5 tháng đầu mặc dù tỷ lệ sống giảm dần xuống còn 50% ở tháng thứ 4 và 5 nhưng khả năng xâm nhiễm và gây chết đối với LM chênh lệch trong khoảng 13 \pm 1 đến 15 \pm 2 và số lượng IJs được sản sinh ra/LM trong khoảng từ 47,7 \pm 27,4 đến 54,6 \pm 19,5. Sự sai khác này về mặt thống kê là không có ý nghĩa. Điều này cũng có nghĩa là độc lực của chúng trong thời gian bảo quản từ 0 đến 5 tháng hầu như không thay đổi.

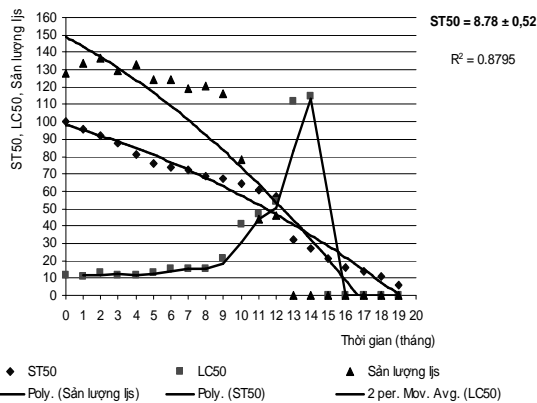
Bảng 2

Thời gian sống (ST%), độc lực (LC_{50}) và sản lượng IJs/GM của 2 chủng *Heterorhabditis*

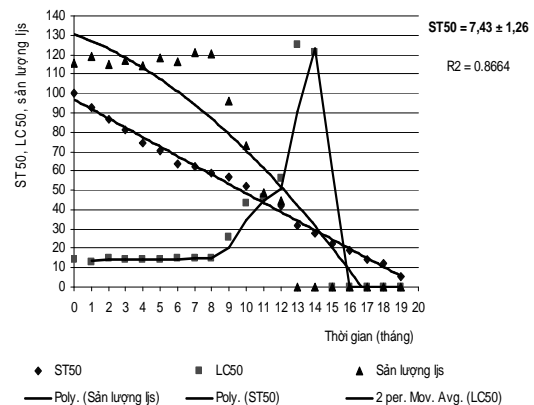
Tháng	H-NT3			H-MF11		
	ST (%)	LC_{50}	Số lượng IJs ($\times 1000$)	ST (%)	LC_{50}	Số lượng IJs ($\times 1000$)
0	100	9 \pm 1	192 \pm 17,5	100 \pm	9 \pm 2	237,4 \pm 24,1
1	88,0 \pm 1	10 \pm 1	185,3 \pm 16,3	89,7 \pm 6	10 \pm 1	238,1 \pm 15,5
2	79,3 \pm 5	9 \pm 2	194,4 \pm 19,4	82,7 \pm 5	9 \pm 2	237,6 \pm 14,6
3	70,3 \pm 2	11 \pm 1	186,1 \pm 24,3	75,3 \pm 3	12 \pm 1	234,5 \pm 21,3
4	62,0 \pm 5	12 \pm 2	182,5 \pm 26,5	64,7 \pm 6	11 \pm 1	231,7 \pm 17,6
5	54,7 \pm 6	12 \pm 1	187,5 \pm 18,3	58,7 \pm 6	11 \pm 1	212,1 \pm 21,4
6	51,7 \pm 5	16 \pm 1	179,2 \pm 27,6	56,0 \pm 2	17 \pm 2	221,6 \pm 25,2
7	44,7 \pm 6	32 \pm 3	86,3 \pm 34,2	45,7 \pm 6	41 \pm 3	104,5 \pm 29,6
8	41,3 \pm 4	112 \pm 9	76,4 \pm 31,2	39,3 \pm 2	124 \pm 12	83,6 \pm 28,3
9	29,7 \pm 6	247 \pm 15	LM chết IJs không sinh sản	30,0 \pm 5	259 \pm 21	LM chết IJs không sinh sản
10	16,3 \pm 3	246 \pm 18	LM chết IJs không sinh sản	15,7 \pm 2	254 \pm 19	LM chết IJs không sinh sản
11	12,0 \pm 2	0	LM không chết	10,7 \pm 2	0	LM không chết
12	6,7 \pm 3	0	LM không chết	6,0 \pm 2	0	LM không chết
13	0,0			0,0		

Ở tháng thứ 8 tỷ lệ sống 50% chủng S-TX1 ($ST_{50} = 8,78 \pm 0,52$) và chủng S-XS4 ($ST_{50} = 7,43 \pm 1,26$) so với 2 tháng đầu và những tháng tiếp theo đối với 2 chủng này thì giá trị sai khác là rất lớn ($P < 0,005$). Từ tháng thứ hai đến tháng thứ 8 mặc dù tỷ lệ sống giảm đáng kể từ 90% xuống còn 50% nhưng khả năng xâm nhiễm và gây chết đối với LM chênh lệch trong

khoảng 13 \pm 1 đến 15 \pm 2 và số lượng IJs được sản sinh ra/LM trong khoảng từ 47,7 \pm 27,4 đến 54,6 \pm 19,5 sự sai khác này không có ý nghĩa. Điều này cũng có nghĩa là độc lực của các chủng này không thay đổi trong thời gian bảo quản từ 0 đến 8 tháng, mặc dù tỷ lệ sống của IJs ở tháng thứ 8 chỉ còn 50% ($ST_{50} = 8$).



Hình 1. Đồ thị tương quan giữa ST50, LC50 và số lượng IJs của chủng tuyến trùng S-TX1

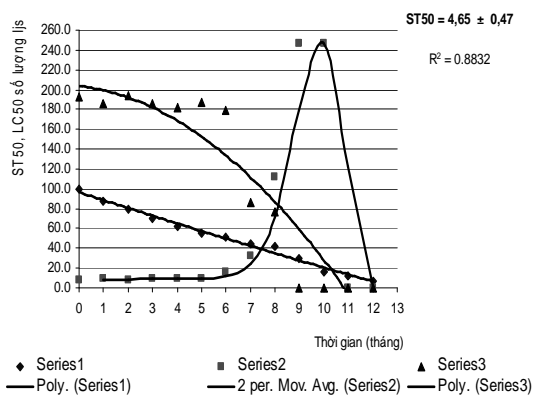


Hình 2. Đồ thị tương quan giữa ST50, LC50 và số lượng IJs của chủng tuyến trùng S-XS4

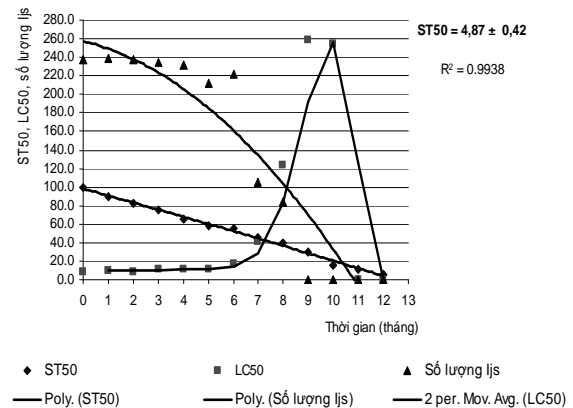
$$\text{Số lượng IJs} = 4 \times 10^2$$

Theo số liệu khảo sát ở các tháng thứ 11-12 đối với 2 chủng S-TX1 và S-XS4 thì mặc dù tỷ lệ sống của IJs vẫn còn trên dưới 50% (42,0 \square 1 đến 60,7 \square 5) nhưng độc lực của IJs đã giảm đáng kể (LC₅₀ trong khoảng 46 \square 5 đến 56 \square 7) và khả năng sinh sản của tuyến trùng trên LM cũng giảm chỉ còn 17,6 \square 32,1 đến 19,5 \square 28,4.

Tương tự như vậy, với H-NT3 và H-MF11 ở tháng thứ 7 và 8 tỷ lệ sống còn hơn 40% (từ 39,3 \square 2 đến 45,7 \square 6) cùng với liều LC₅₀ tăng lên từ 32 \square 3 đến 124 \square 12. Khả năng sinh sản IJs trong LM giảm còn 76,4 \square 31,2 đến 124 \square 12. Điều này chứng tỏ độc lực của cả 4 chủng tuyến trùng đối với vật chủ đã giảm.



Hình 3. Đồ thị tương quan giữa ST50, LC50 và số lượng IJs của chủng tuyến trùng H-MF11



Hình 4. Đồ thị tương quan giữa ST50, LC50 và số lượng IJs của chủng tuyến trùng H-NT3

$$\text{Số lượng IJs} = 4 \times 10^2$$

Ở mốc thời gian từ các tháng 13 và 14 đối với 2 chủng *Steinernema* và các tháng 9, 10 đối với 2 chủng *Heterorhabditis*, tuy tỷ lệ sống của IJs vẫn còn từ 26,7 \square 2 đến 32,0 \square 9 và độc lực

vẫn còn tuy liều LC₅₀ đã tăng cao 112 \square 10 đến 247 \square 14. Tuy nhiên, lúc này IJs chỉ có khả năng gây chết đối với LM mà không có khả năng sinh sản được trong GM. Kết quả kiểm tra khi mổ xác vật chủ GM cho thấy một số tuyến

trùng chỉ phát triển đến pha trưởng thành rồi chết chứ không có khả năng sinh sản tiếp.

Từ tháng thứ 15 đến tháng 19 tỷ lệ sống của hai chủng *Steinernematis* vẫn còn từ $5,3 \pm 2$ đến $22,3 \pm 6$ và tháng thứ 11-12 ở H-NT3 và H-MF11 tỷ lệ sống của IJs là $6,0 \pm 2$ đến $12,0 \pm 2$ nhưng không còn khả năng giết chết vật chủ $LC_{50} = 0$. Đến tháng tháng thứ 20 thì hầu như IJs của hai chủng *Steinernema* chết hết và tỷ lệ chết hết cũng xảy ra đối với các chủng *Heterorhabditis* ở tháng thứ 13.

Để dàng nhận thấy mặc dù tuyến trùng cảm nhiễm ở giai đoạn này không dinh dưỡng, nhưng chúng đã sử dụng năng lượng dự trữ ở dạng các hạt lipid chứa trong ruột chúng để tồn tại. Thời gian tồn tại của mỗi chủng phụ thuộc vào nhiều yếu tố nhưng chủ yếu và trước hết là phụ thuộc vào lượng lipid dự trữ trong ruột. Quan sát này của chúng tôi cũng phù hợp với nghiên cứu của Paul và cs., (2006) [11]. Do có kích thước lớn và chứa nhiều lipid nên hầu hết ấu trùng cảm nhiễm của các chủng *Steinernema* có khả năng tồn tại lâu hơn so với ấu trùng cảm nhiễm của các chủng *Heterorhabditis* thường có kích thước nhỏ và lượng lipid dự trữ cũng ít hơn so với *Steinernema*.

III. KẾT LUẬN

Từ các nghiên cứu trên có thể rút ra một số kết luận sau đây:

Trong điều kiện nhiệt độ 12°C các chủng tuyến trùng *Steinernema* có thể tồn tại 19 tháng lâu hơn so với các chủng *Heterorhabditis* 12 tháng.

Các chủng *Steinernema* có khả năng duy trì độc lực trong 9 tháng bảo quản ở điều kiện nhiệt độ như trên, trong khi thời gian duy trì độc lực của các chủng *Heterorhabditis* là 6 tháng. Sau thời gian trên mặc dù IJs vẫn tồn tại nhưng độc lực của chúng giảm đi nhiều.

Thời gian sống sót của ấu trùng cảm nhiễm của các chủng EPN phụ thuộc vào lượng lipid dự trữ trong cơ thể chúng. Nhìn chung ấu trùng cảm nhiễm của các chủng *Steinernema* có lượng

lipid dự trữ lớn hơn ấu trùng cảm nhiễm của các chủng *Heterorhabditis* nên khả năng tồn tại của chúng cũng lâu hơn các chủng *Heterorhabditis*.

Từ kết quả trên cho thấy để duy trì được độc lực các chủng EPN cần tiến hành nhân nuôi định kỳ 9-12 tháng đối với các chủng *Steinernema* và 6 tháng đối với các chủng *Heterorhabditis*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Bedding R. A., Akhurst R. J.,** 1975: Nematologica, 21: 109-110.
2. **Cabanillas H. E., Raulston J. R.,** 1994: Fundam. Appl. Nematology, 17: 212-223.
3. **Elawad S. A. et al.,** 1999: Nematology, 1: 762-764.
4. **Fitters P. F. L., Griffin C. T.,** 2006: Biological Control, 37: 82-88.
5. **Gaugler R.,** 2002: Entomopathogenic Nematology. CABI, Wallingford, UK.
6. **Grewal P. et al.,** 2005: Nematodes as Biocontrol agents. CABI, Wallingford, UK.
7. **Phan K. L., Nguyen N. C. and Moens M.,** 2001: Nematology, 3: 503-514.
8. **Phan K. L., Nguyen N. C. and Moens M.,** 2001: Russian Journal of Nematology, 9: 1-7.
9. **Molyneux A. S.,** 1985: Revue de Nematologie, 8: 165-170.
10. **Nguyễn Ngọc Châu và cs.,** 2005: Báo cáo khoa học về Sinh thái và Tài nguyên sinh vật: 680-689, Hội thảo Quốc gia lần thứ nhất. Nxb. Nông nghiệp Hà Nội.
11. **Paul F. L. et al.,** 2006: Biological Control, 37: 82-88.
12. **Strauch O. et al.,** 2000: Biocontrol, 45: 483-500.
13. **Woodring J. L. & Kaya H. K.,** 1988: South. Coop. Ser. Bull. 331: 30pp.

INFLUENCE OF THE STORAGE DURATION TO SURVIVAL, TOXICITY AND REPRODUCTION OF SOME ENTOMOPATHOGENIC NEMATODE STRAINS GENERA *STEINERNEMA* AND *HETERORHABDITIS*

VU TU MY, NGUYEN NGOC CHAU

SUMMARY

The influence of storage duration of infective juveniles (IJs) of entomopathogenic nematodes, viz. S-TX1, S-XS4 (*Steinernema sangi*) and H-NT3 and H-MF11 (*Heterorhabditis indica*) to themselves survival ratio (LT), toxicity (LC₅₀) and reproduction capacity in *Galleria mellonella* (IJs/GM) were assessed in the Laboratory condition.

The assays results showed three these above indexes reduced in duration of storage, though they were different between *Steinernema* and *Heterorhabditis* strains.

In strains of *Steinernema* the survival 50% ratio (LT₅₀) was stable after 12 months in storage whereas LC₅₀ and reproduction capacity were stable after 8-9 month in storage and *Steinernema* strains can be survived up to 20 month-storage but their toxicology and reproduction capacity were exhausted at 12-13 months in storage.

In strains of *Heterorhabditis*, these indexes occurred in earlier. The survival ratio 50% (LT₅₀), LC₅₀ and reproduction capacity were stable after 6 months in storage. *Heterorhabditis* strains can be survived up to 12 months in storage condition but their toxicity and reproduction capacity were exhausted at 10-month storage.

The storage duration of IJs was related closely with the lipid amount reserved in IJs intestine. Due to the large body size in *Steinernema* juveniles and the bigger amount of lipid reserved in their intestine they are significantly longer survival than *Heterorhabditis* juveniles. The decreasing the lipid in during storage was observed and its to be exhausted at timing that infective juvenile to be died.

Ngày nhận bài: 24-5-2007