

ẢNH HƯỞNG CỦA NỒNG ĐỘ GLYCEROL ĐẾN TỶ LỆ SỐNG CỦA TUYẾN TRÙNG TRONG BẢO QUẢN ĐÔNG LẠNH BẰNG NITƠ LỎNG

NGUYỄN NGỌC CHÂU

Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật

RALF-UDO EHLERS

Viện Bệnh học thực vật, Đại học tổng hợp Kiel, CHLB Đức

Nhóm tuyến trùng ký sinh gây bệnh côn trùng (epn) giống *Steinernema* và *Heterorhabditis* khá đa dạng với hơn 50 loài và mỗi loài có nhiều chủng khác nhau với đặc trưng sinh học và khả năng phòng trừ sâu hại của chúng cũng rất khác nhau. Việc bảo quản các chủng tuyến trùng epn có ý nghĩa lớn trong việc cung cấp nguồn vật liệu ban đầu cho sản xuất thuốc sinh học tuyến trùng. Ngoài ra, việc bảo quản các chủng epn còn phục vụ cho việc nghiên cứu, tuyển chọn theo phương pháp cổ điển hoặc bằng kỹ thuật chuyển gen để tạo nên các chủng mới có khả năng phòng trừ sâu hại tốt hơn. Tuy nhiên, một vài nghiên cứu đã cho thấy, việc duy trì các chủng epn bằng phương pháp nhân nuôi nhiều lần tuyến trùng epn trên ấu trùng bướm sáp lớn (*Galleria mellonella*) có thể làm mất hoặc làm giảm độc lực của chúng và dẫn đến giảm khả năng phòng trừ sâu hại [13, 15, 17]. Vì vậy, việc lựa chọn và cải thiện phương pháp bảo quản các chủng epn tự nhiên như là nguồn vật liệu di truyền epn luôn có ý nghĩa quyết định.

Bảo quản đông lạnh epn trong nitơ lỏng được coi như sự lựa chọn đúng đắn để bảo quản lâu dài epn mà vẫn có thể giữ được độc lực của chúng [17]. Tuy nhiên, việc bảo quản đông lạnh tuyến trùng epn trong nitơ lỏng cũng hoàn toàn không đơn giản, vì tỷ lệ sống sót và độc lực của tuyến trùng sau bảo quản rất khác nhau, phụ thuộc vào nhiều yếu tố khác nhau như nguồn gốc các chủng epn, quy trình xử lý epn trong dung dịch bảo vệ đông lạnh trước khi đưa vào đông lạnh, quy trình điều chỉnh độ làm lạnh cũng như nồng độ epn và quy trình tan đông [8, 16].

Đã có một số nghiên cứu cải tiến quy trình bảo quản đông lạnh epn trong nitơ lỏng cho kết

quả khá tốt với mức độ sống sót khá cao và độc tố hầu như được duy trì sau bảo quản lạnh [1, 3, 8]. Tuy nhiên, hầu hết các nghiên cứu trên đây được tiến hành đối với các chủng epn có nguồn gốc từ vùng ôn đới, còn các thông tin với tuyến trùng epn từ vùng nhiệt đới hầu như chưa có. Mục tiêu nghiên cứu của chúng tôi là xác định ảnh hưởng của nồng độ glycerol đối với quá trình xử lý bảo quản lạnh và hiệu quả sống sót của các chủng tuyến trùng epn phân lập từ Việt Nam, nơi có điều kiện khí hậu nhiệt đới và cận nhiệt đới.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Nguồn tuyến trùng epn sử dụng cho thí nghiệm là các chủng tuyến trùng bản địa *Steinernema* và *Heterorhabditis* phân lập từ Việt Nam, bao gồm 38 chủng, trong đó có 26 chủng *Steinernema* và 12 chủng *Heterorhabditis*. Các chủng này được thu thập từ năm 1997 đến 2002 và đã trải qua nhiều lần nhân nuôi duy trì trên ấu trùng bướm sáp lớn trước khi sử dụng cho thí nghiệm bảo quản đông lạnh bằng nitơ lỏng. Tuyến trùng được nhân nuôi *in vivo* trên ấu trùng bướm sáp lớn và ấu trùng cảm nhiễm (IJs) được bảo quản ở 12°C theo quy trình của Kaya & Stock (1997).

Thí nghiệm đánh giá ảnh hưởng của nồng độ Glycerol đến sự sống sót của tuyến trùng: được tiến hành theo mô tả của Curran và cs. (1992): 100 ml dung dịch chứa IJs được lọc qua giấy lọc Whatman No1 bằng máy hút chân không để loại bỏ nước. IJs nằm trên giấy lọc được nhúng vào đĩa petri (đường kính 60 mm) chứa dung dịch 15% và 30% glycerol và ringer tỷ lệ 1: 1 cho 2 chủng đại diện là *Steinernema* DL23 và

Heterorhabditis BY. Sau 48 và 72 giờ lấy 1 ml dung dịch tuyến trùng pha loãng 100 lần và chuyển sang khay đếm để kiểm tra số lượng tuyến trùng IJs sống và chết dưới kính hiển vi soi nổi.

Thử nghiệm xác định sự sống sót của tuyến trùng sau bảo quản đông lạnh: trên cơ sở các thí nghiệm được tiến hành theo quy trình của Curran và cs. (1992) và Nurgent và cs. (1996) cho thấy nồng độ glycerol theo quy trình trên là quá cao và không phù hợp với các chủng epn nhiệt đới, chúng tôi đã cải tiến giảm nồng độ glycerol còn 10% đối với các chủng *Steinernema* và 7,5% glycerol đối với *Heterorhabditis*.

Các khâu xử lý tuyến trùng epn tiếp theo được tiến hành theo quy trình của Curran và cs. (1992) và Nurgent và cs. (1996). Sau 72 giờ ngâm ủ đối với các chủng *Steinernema* và 168 giờ đối với các chủng *Heterorhabditis* epn được lọc qua máy hút chân không, sau đó cho vào methanol 70% đã được làm lạnh (khoảng -10°C) trong 10 phút, sau đó epn được lọc qua máy hút chân không trong khi tiếp tục được gội rửa bằng methanol 70% đã được làm lạnh. Giấy lọc chứa IJs được cuộn lại và đặt vào ống tít chuyên dụng cho bảo quản đông lạnh. Các tít này đã được làm lạnh sẵn ở -5°C trong dung dịch muối NaCl. Các ống tít này được ghi số, tên chủng và xếp trong một hộp chuyên dụng để giữ lạnh rồi đặt nhanh cả hộp vào bình nitơ lỏng. Sau 72 giờ bảo quản lạnh, đưa hộp từ bình nitơ lỏng ra, lấy nhanh các ống tít chứa epn và làm tan lạnh bằng cách đổ 1,5 ml dung dịch ringer (chuẩn bị dung dịch ringer theo Kaya & Stock, 1997, nhưng sử dụng NaHCO₃ thay cho NaH₂CO₃) vào ống tít có chứa epn, 30 phút ở nhiệt độ phòng, sau đó đổ nhanh dung dịch ringer có chứa tuyến trùng ra đĩa petri để kiểm tra dưới kính hiển vi soi nổi. Tuyến trùng còn sống được xác định trên cơ sở chúng còn chuyển động khi chạm kim nhọn vào chúng. Tỷ lệ sống tối ưu trong các thí nghiệm sơ bộ được xác định là số trung bình (mean) và cộng trừ sai số chuẩn (sd).

Thử nghiệm xác định độc lực của IJs sau bảo quản đông lạnh: được tiến hành để xác định độc lực của epn sau khi bảo quản lạnh. Mỗi thử nghiệm sử dụng 10 ấu trùng bướm sấp lớn (*Galleria mellonella* = GM) đặt trong 1 đĩa petri đường kính 60 mm có sẵn giấy lọc và cho gây

nhiễm 150 IJs trong 1 ml nước (khoảng 15 IJs/sâu). Thí nghiệm được lập lại 6 lần đối với mỗi công thức thí nghiệm và toàn bộ thí nghiệm được lập lại 3 lần. Nhiệt độ thí nghiệm ở 25°C. Tỷ lệ sâu chết được kiểm tra qua 24, 48 và 72 giờ sau khi nhiễm epn.

Thống kê số liệu: kết quả thí nghiệm được so sánh theo ANOVA và Student - Newman - Keuls test (SAS Institute, Inc, Cary, NC). Tỷ lệ sâu chết từ thử nghiệm độc lực của epn được phân tích với t-test.

II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Ảnh hưởng của nồng độ glycerol

Kết quả thí nghiệm ban đầu của chúng tôi ở các nồng độ glycerol 15% và 30% đối với 2 chủng epn đại diện cho 2 giống là *Steinernema* DL23 và *Heterorhabditid* BY đều cho thấy nồng độ glycerol và thời gian xử lý tuyến trùng (thời gian ủ) trong glycerol có ảnh hưởng rõ rệt đến tỷ lệ sống của tuyến trùng. Trong 2 yếu tố này thì nồng độ glycerol có ảnh hưởng rõ rệt nhất. Ở cùng thời gian xử lý sau 48 giờ, ở các công thức xử lý nồng độ glycerol 20 và 30% tỷ lệ tuyến trùng *Steinernema* DL23 giảm 46 đến 75% so với ở nồng độ 10%, tương tự *Heterorhabditid* BY tỷ lệ sống ở các nồng độ 15 và 30% cũng giảm từ 43 đến 64% so với tỷ lệ này ở nồng độ 7,5% (bảng 1).

So với thí nghiệm của Curran và cs. (1992), Nugent và cs. (1996) và Popiel & Vasquez (2002) thì kết quả thí nghiệm tiến hành trên tuyến trùng Việt Nam của chúng tôi như trên là khá khác biệt: trong khi các thí nghiệm của các tác giả trên đều sử dụng 2 nồng độ 15 và 30% cho kết quả khá tốt với tỷ lệ sống của hầu hết các chủng tuyến trùng và tỷ lệ sống trung bình khá cao (58% đối với *Steinernema* và 51% đối với *Heterorhabditis*), trong khi trong thí nghiệm của chúng tôi trên 2 chủng tuyến trùng bản địa ở 2 nồng độ tương đương sau 72 giờ thì tỷ lệ sống của epn đều dưới 50%. Kết quả này là khá thấp so với kết quả của các tác giả trên. Trong khi đó các thí nghiệm với nồng độ glycerol thấp lại cho kết quả tương đối tốt, đặc biệt tỷ lệ sống của chủng *Steinernema* DL23 cao tới 85-91%, trong khi tỷ lệ này ở chủng *Heterorhabditis* BY sau 48 giờ khá cao (gần 94%), nhưng sau 72 giờ giảm xuống đột ngột còn 44,1%.

Ảnh hưởng nồng độ glycerol và thời gian xử lý đến tỷ lệ sống của tuyến trùng

Thời gian XL	Steinernema DL23			Heterorhabditis BY			
	Nồng độ XL	10%	20%	30%	7,5%	15%	30%
Sau 48 giờ		91,5 ± 2,6	49,8 ± 3,4	24,5 ± 2,4	93,9 ± 5,7	58,6 ± 4	34,2 ± 4,2
Sau 72 giờ		85,7 ± 2,0	36,4 ± 2,9	18,8 ± 3,1	44,1 ± 13,4	26,3 ± 3,7	16,6 ± 2,7

Từ kết quả thí nghiệm trên đây đã cho phép điều chỉnh giảm nồng độ glycerol xuống thấp tối ưu là 10% đối với các chủng *Steinernema* và 7,5% đối với các chủng *Heterorhabditis* để xử lý tuyến trùng trước khi bảo quản đông lạnh.

Quan sát tuyến trùng IJs qua xử lý Glycerol-Ringer cho thấy hầu hết tuyến trùng epn chết trong quá trình xử lý là do tác dụng của chất glycerol tạo thành dạng tinh thể nội bào trong cơ thể tuyến trùng, trong khi theo Curran và cs. (1992) và Popiel & Vasquez (2002) thì chất Glycerol chính là chất có thể làm giảm thiểu sự hình thành tinh thể nội bào. Như vậy, vấn đề ở đây là ngoài nồng độ Glycerol thì nồng độ tuyến trùng trong quá trình xử lý cũng đóng vai trò trong việc tạo thành tinh thể nội bào trong cơ thể tuyến trùng. Về bản chất, dung dịch Glycerol-Ringer có tác dụng giúp tuyến trùng chuyển dần sang trạng thái đông lạnh mà không bị tổn thương do môi trường nước đông lạnh tạo ra. Vì vậy, tinh thể nội bào hình thành trong cơ thể tuyến trùng nhiều hay ít chính là biểu hiện cho thấy mức độ tuyến trùng có tổn thương nhiều hay ít và tuyến trùng có thể tồn tại được hay không.

2. Khả năng sống của tuyến trùng sau bảo quản đông lạnh

Tổng số 38 chủng epn của Việt Nam được xử lý để bảo quản đông lạnh trong nitơ lỏng thì chỉ có 7 chủng là sống sót sau bảo quản đông lạnh, trong đó có 5 chủng S-TS2, S-TX1, H-CP6, H-CP16 và H-MP11 có tỷ lệ sống sót cao

từ 70-95%, trong khi tỷ lệ sống của 2 chủng S-TG10 và S-XT thấp dưới 50% (bảng 2). Như vậy, có tới 29 chủng không thể sống sót sau khi bảo quản đông lạnh, trong số này có 22 chủng *Steinernema* là S-BM12, S-CP13, S-CP14, S-DL13, S-DL21, S-DL23, S-HS2, S-NH7, S-TD16, S-BC, S-CP12, S-DL9, S-DL14, S-DL16, S-DL20, S-MP9 S-MP9, S-TK10, S-TN10, S-TN24, S-TN53 và S-TS10. Có 8 trên 12 chủng *Heterorhabditis* không sống sót sau bảo quản đông lạnh là H-BB9, H-BY, H-CP8, H-HS5, H-NT3, H-QB3, H-TN48 và H-PP6. Điều đáng lưu ý tất cả các chủng này đều có tỷ lệ sống sót khá cao sau khâu xử lý ngâm ủ trong dung dịch Glycerol - Ringer tức là trước khi đưa vào xử lý đông lạnh trong nitơ lỏng. Như vậy có thể khẳng định là khâu xử lý đông lạnh trong nitơ lỏng và khâu tan đông đã có ảnh hưởng quan trọng đến khả năng sống sót của các chủng tuyến trùng này.

Vấn đề là tại sao trong cùng một điều kiện xử lý thì một số ít chủng có khả năng sống sót, thậm chí sống với tỷ lệ khá cao, trong khi đó nhiều chủng lại không sống được sau khi đông lạnh. Để tìm câu trả lời cho vấn đề này cần tiếp tục các thử nghiệm tiếp theo nhằm làm sáng tỏ một số yếu tố có thể ảnh hưởng đến khả năng sống sót của epn, trong đó có yếu tố nồng độ epn khi tan đông. Ngoài ra, để xác định điều kiện bảo quản tối ưu cần tiến hành riêng rẽ cho từng chủng hoặc từng nhóm chủng epn có đặc điểm sinh học, phân bố địa lý gần như nhau.

Tỷ lệ sống của các tuyến trùng epn sau đông lạnh

STT	EPN isolates	Nồng độ glycerol (%)	Tỷ lệ sống sau đông lạnh (%)
1	S-TG10	10	5 □ 1,8
2	S-XT	10	45,9 □ 3,9
3	S-TS2	10	70,4 □ 3,7
4	S-TX1	10	95,0 □ 3,2
5	H-CP6	7,5	81,5 □ 4,5
6	H-CP16	7,5	95,0 □ 3,3
7	H-MP11	7,5	95,2 □ 4,5

3. Độc lực của IJs sau bảo quản lạnh

Trong số 6 chủng epn sống sót qua bảo quản đông lạnh được sử dụng để xác định độc tố của chúng trên ấu trùng ngài sếp *G. mellonella* cho thấy cả 6 chủng này đều duy trì được độc tố sau đông lạnh. Tỷ lệ chết của ấu trùng ngài sếp lớn sau 72 giờ phơi nhiễm với IJs (nồng độ 150

IJs/ml) là khá cao (bảng 2). Đặc biệt, kết quả thử nghiệm so sánh giữa nguồn IJs qua đông lạnh và nguồn IJs không qua đông lạnh cũng cho thấy không có sự sai khác rõ ràng về độc lực của các chủng epn thí nghiệm với IJs qua bảo quản lạnh và IJs đối chứng (không qua bảo quản lạnh).

Bảng 3

Tỷ lệ chết của GM gây nhiễm bởi các chủng epn sau bảo quản đông lạnh trong nitơ lỏng

STT	EPN isolates	Nồng độ IJs/ml	Tỷ lệ chết của GM			Tỷ lệ chết của GM (Đối chứng)		
			24 giờ	48 giờ	72 giờ	24 giờ	48 giờ	72 giờ
3	S-TS2	150	36,4 □ 2,8	60,2 □ 3,3	76,4 □ 2,8	38,5 □ 2,1	62,1 □ 2,6	78,1 □ 2,5
4	S-TX1	150	35,1 □ 3,0	65,4 □ 3,5	85,0 □ 4,1	34,9 □ 2,7	61,7 □ 2,8	87,2 □ 3,8
5	S-XT	150	29,7 □ 2,4	65,0 □ 2,7	78,5 □ 3,2	32,4 □ 2,9	67,5 □ 3,2	80,4 □ 3,6
6	H-CP6	150	30,3 □ 2,5	51,9 □ 3,8	82,5 □ 2,5	25,1 □ 3,2	59,4 □ 2,4	78,7 □ 3,2
7	H-CP16	150	29,7 □ 3,6	62,1 □ 3,3	75,9 □ 2,7	36,2 □ 2,7	64,4 □ 3,0	76,0 □ 2,4
8	H-MP11	150	25,9 □ 3,7	65,2 □ 5,5	85,8 □ 3,6	30,3 □ 2,5	63,8 □ 2,3	83,5 □ 2,9

4. Thảo luận

Các nghiên cứu của Curan và cs. (1992), Nugent và cs. (1996) đã chứng minh khả năng sống sót của các loài, chủng epn khác nhau sau bảo quản đông lạnh phụ thuộc vào thời gian ủ lạnh trước, tốc độ tan lạnh và chủng loại và nồng độ của các chất chống đông được sử dụng.

Nghiên cứu mới đây của Bai và cs., 2004 cho thấy tỷ lệ sống sót của IJs sau bảo quản trong nitơ lỏng không chỉ dựa vào nồng độ Glycerol nhưng còn phụ thuộc lớn vào nồng độ IJs trong Glycerol trước khi bảo quản và cũng phụ thuộc vào nồng độ của chúng trong dung dịch Ringer tại thời gian tan đông sau thời gian bảo quản. Trong thí nghiệm của chúng tôi, nồng độ IJs là 12.000 IJs/ml được coi là nồng độ tối ưu khi xử lý trong hỗn hợp Glycerol-Ringer. Ảnh hưởng của nồng độ IJs trong quá trình xử lý ủ trong các dung dịch chống đông (Glycerol và Ringer) trước khi đông lạnh bằng nitơ lỏng và nồng độ IJs trong dung dịch Ringer cũng như thời gian tan đông đến tỷ lệ sống của IJs sau bảo

quản đông lạnh bằng nitơ lỏng đã được cải tiến thay đổi về nồng độ so với Bai và cs. (2004) nhưng không thu được kết quả như thí nghiệm của Bai và cs. (2004) hay nói đúng hơn là chỉ thu được kết quả một số chủng mà thôi. 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 chung của các chất chống đông tự nhiên (như Lipids, Trehalose hoặc Glycerol) trong ống tít đông, trong đó IJs phản ứng với hỗn hợp Glycerol-Ringer bằng cách sản sinh ra Trehalose và Glycerol như là các chất bảo vệ và đối phó với sự thay đổi nhiệt độ hoặc các stress môi trường khác. Tuy nhiên một khi nồng độ IJs quá cao có thể làm giảm tỷ lệ sống của IJs có thể do hiệu ứng giảm oxy huyết (Jagdale và Grewal, 2003; Qiu và Bedding, 2002).

Trước các nghiên cứu bảo quản đông lạnh của epn của Bai và cs. (2004) không có thông tin nào về mối quan hệ giữa nồng độ tuyến trùng đến sự sống sau bảo quản. Một số tác giả như

Popiel, Vasquez (1991) và Nugent và cs. (1996) đã sử dụng nồng độ 5000 và $2,5 \times 10^6$ IJs/ml, còn trong nghiên cứu của Curran và cs. (1992) thì không nói rõ nồng độ này. Trong cả 3 nghiên cứu trên cũng không đề cập rõ ràng về nồng độ IJs sử dụng trong quá trình tan đông. Vì vậy, khó để so sánh mối tương quan giữa nồng độ với tỷ lệ sống trong thí nghiệm này. Tuy nhiên, qua các nghiên cứu này cũng có thể nhận thấy rằng một số dẫn liệu sai khác về tỷ lệ sống trong các nghiên cứu trước đây có thể do thay đổi về nồng độ IJs trong bảo quản đông lạnh.

Bảo quản đông lạnh tuyến trùng epn thực chất là những kỹ thuật để duy trì nguồn gen của chúng phục vụ cho cả 2 mục đích là nghiên cứu và thương mại. Nghiên cứu này đã minh chứng ngoài nồng độ IJs tối ưu, thì nồng độ Glycerol sử dụng để xử lý IJs trước khi đông lạnh có ảnh hưởng tới hạn đến tỷ lệ sống sót của IJs sau đông lạnh. Hy vọng rằng, kết quả nghiên cứu của chúng tôi trên đây là cơ sở bước đầu để cải tiến và hoàn thiện quy trình bảo quản đông lạnh cho các chủng epn của Việt Nam nói riêng và epn vùng nhiệt đới nói chung.

Lời cảm ơn

Tác giả đầu cảm ơn cơ quan Trao đổi Hàn lâm CHLB Đức (DAAD) đã tài trợ kinh phí cho tác giả đến thăm và hợp tác nghiên cứu với GS. R. Ehlers, Phòng thí nghiệm Công nghệ sinh học và Phòng trừ sinh học, Viện Bệnh học thực vật, trường Đại học tổng hợp Kiel, CHLB Đức. Các nghiên cứu tuyến trùng epn tại Việt Nam được tài trợ bởi Chương trình nghiên cứu cơ bản trong khoa học tự nhiên.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Bai C., Shapiro D. I., Gaugler R., Yi S.**, 2004: J. Nematology, 36: 281-284.
2. **Burnell A.**, 2002: In: R. Gaugler, ed. Entomopathogenic Nematology, New York, CABI: 241-264.
3. **Curran J., Gibert C., Buler K.**, 1992: J. Nematology, 24: 269-270.
4. **Grewal P., Georgis R.**, 1999: In: F.R. Hall and J.J. Menn, eds. Methods in Biotechnology 5, Biopesticides: Use and Delivery. Totowa, NJ: Humana Press, Inc., 279-299.
5. **Jagdale G. B., Grewal P. S.**, 2003: Inter. J. Parasitology, 33: 145-152.
6. **Kaya H. K., Stock S. P.**, 1997: In: L. A. Lacey, ed. Manual of techniques in insect pathology, San Diego, Academic Press: 281-324.
7. **Major C. P., Dougal J. D., Harrison A. P.**, 1955: J. Bacteriology, 69: 244-249.
8. **Nugent M. J., O'Leary S. A., Burnell A. M.**, 1996: Fund. and Appl. Nematology, 19: 1-6.
9. **Palmfeldt J., Radstrom P., Hahn-Hagerdal B.**, 2003: Cryobiology, 47: 21-29.
10. **Poinar G. O. Jr.**, 1990: In: R. Gaugler and H.K. Kaya, eds. Entomopathogenic Nematodes in Biological Control. Boca Raton, FL, CRC Press: 23-62.
11. **Popiel I., Vasquez E. M.**, 1991: J. Nematology, 23: 432-437.
12. **Qiu L. H., Bedding R. A.**, 2002: Comparative Biochem. and Physiol. Part B: Biochem. and Molec. Biology, 131: 757-765.
13. **Shapiro D. I., Glazer I., Segal D.**, 1996: Bio-Control, 6: 238-244.
14. **Shapiro-Ilan D. I., Gauge D. H., Koppenhofer A. M.**, 2002: In: R. Gaugler, ed. Entomopathogenic Nematology. New York, NY: CABI: 333-355.
15. **Stuart R. J., Gaugler R.**, 1996: Canadian J. Zoology, 74: 164-170.
16. **Triantaphyllou A. C., McCabe E.**, 1989: J. Nematology, 21: 423-426.
17. **Wang X., Grewal P.S.**, 2002: Bio-Control, 23: 71-78.

INFLUENCE OF GLYCEROL CONCENTRATION ON SURVIVAL OF ENTOMOPATHOGENIC NEMATODES THROUGH CRYOPRESERVATION

NGUYEN NGOC CHAU, RALF-UDO EHLERS

SUMMARY

A modified procedure based on reduced concentration of glycerol for cryopreservation of infective juvenile stage nematodes has been developed using indigenous isolates *Steinernema* and *Heterorhabditis* collected from Vietnam.

The survival of infective juveniles (IJs) depended on some factors such as concentration of glycerol, IJs concentration and timing for thawing. Optimum survival for both genera was archived with 12,000 IJs/ml in glycerol and 7,500 IJs/ml in ringer's solution. For *Steinernema* strains optimum survival also was observed with 12,000 IJs/ml in 10% glycerol concentration whereas with the same IJs concentration in 7.5% Glycerol concentration. The maximum retentions of *Steinernem* were 45.9-95% whereas these retentions of *Heterorhabditis* isolates were 81.5-95.2%.

The survival of Vietnamese epn isolates in post-cryopreservation was more or less low that only 4 *Steinernema* isolates among 26 treated were survival whereas only 3 per 12 *Heterorhabditis* isolates were post-cryopreservation survival. Among survival isolates, apart from two isolates S-TG10 and S-TX1 with survival percentage was lower as 5 and 45.9%, respectively, remaining isolates with survival percentage was higher as 70-95%.

For toxicology, *Steinernema* were 78-87 retention of original virulence to GM larvae, whereas this toxicology of *Heterorhabditis* was 76-83.5 retention of original virulence to GM larvae.

Ngày nhận bài: 26-7-2007