



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0026872

(51)⁷ A01N 63/02; C12N 1/20; A01K 67/033 (13) B

(21) 1-2017-02286

(22) 19/06/2017

(45) 25/12/2020 393

(43) 25/12/2018 369A

(73) Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (VN)

18 Hoàng Quốc Việt, phường Nghĩa Đô, quận Cầu Giấy, thành phố Hà Nội

(72) Nguyễn Ngọc Châu (VN); Đỗ Tuấn Anh (VN); Nguyễn Hữu Tiền (VN).

(54) QUY TRÌNH BẢO TỒN EX-SITU CÁC CHỦNG TUYẾN TRÙNG KÝ SINH GÂY BỆNH CÔN TRÙNG

(57) Sáng chế đề cập đến quy trình bảo tồn *ex-situ* các chủng tuyến trùng ký sinh gây bệnh côn trùng (Entomopathogenic nematode - EPN) bao gồm 07 bước sau đây:

Bước 1: Phân lập tuyến trùng EPN từ các sinh cảnh tự nhiên;

Bước 2: Phân loại tuyến trùng và xác định tên khoa học của loài tuyến trùng EPN;

Bước 3: Đánh giá tiềm năng sinh học của tuyến trùng EPN;

Bước 4: Chuẩn bị nguồn tuyến trùng EPN để bảo tồn;

Bước 5: Tạo các lô bảo tồn tuyến trùng EPN trong tự nhiên;

Bước 6: Phun rải tuyến trùng EPN vào các lô bảo tồn; và

Bước 7: Kiểm tra hiệu quả bảo tồn.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế thuộc lĩnh vực bảo vệ thực vật, cụ thể, sáng chế đề cập đến quy trình bảo tồn chuyển vị (*ex-situ*) các chủng tuyến trùng ký sinh gây bệnh côn trùng phục vụ cho phòng trừ sinh học sâu hại cây trồng.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

1. Sự cần thiết bảo tồn sinh học tuyến trùng EPN

Các loài tuyến trùng ký sinh gây bệnh côn trùng (Entomopathogenic nematode – EPN) thực chất là những tổ hợp cộng sinh bắt buộc giữa tuyến trùng ký sinh thuộc 2 giống tuyến trùng *Steinernema* (Họ Steinernematidae) và *Heterorhabditis* (Họ Heterorhabditidae) và vi khuẩn gây bệnh giống *Xenorhabdus* và *Photorhabdus* (họ Enterobacteriaceae) tạo nên những tổ hợp ký sinh gây bệnh tuyến trùng - vi khuẩn. Những tổ hợp này có nhiều ưu thế về mặt sinh học (vừa ký sinh vừa gây bệnh) cũng như công nghệ (sản xuất sinh khối) nên được nghiên cứu sử dụng mạnh mẽ trong phòng trừ sinh học (PTSH) sâu hại.

Trong PTSH, việc nhập nội các tác nhân sinh học không phải bao giờ cũng mang lại hiệu quả mong muốn. Thực tế cho thấy chỉ khoảng 30% các chủng nhập nội cho kết quả tốt. Ngoài ra, các chủng nhập nội nếu không được thuần hóa tốt bao giờ cũng giảm hiệu lực nhanh chóng sau một thời gian sử dụng. Việc tìm kiếm các chủng tuyến trùng bản địa có tiềm năng cho PTSH luôn được quan tâm ở bất kỳ quốc gia nào. Mặc dù hầu hết các loài tuyến trùng EPN 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 EPN bản địa luôn có ý nghĩa quan trọng nhằm mục đích: i) xác định sự hiện diện và phân bố của EPN tại một vùng lãnh thổ, một quốc gia và bổ sung danh sách EPN cho thế giới; ii) có chiến lược duy trì bảo tồn EPN như một nguồn thiên địch tự nhiên; iii) thu thập và nhân nuôi để đánh giá tiềm năng PTSH của các chủng EPN bản địa đối với sâu hại tại địa phương; và iv) cung cấp vật liệu ban đầu để sản xuất sinh khối lớn phục vụ cho PTSH.

Kết quả điều tra cho thấy ở Việt Nam, hầu hết các chủng tuyến trùng EPN được phân lập từ các rừng tự nhiên mà chủ yếu là từ các hệ sinh thái tự nhiên (rừng nguyên sinh, các khu bảo tồn và hệ sinh thái hoang sơ ven biển), trong khi ở hệ sinh thái nông nghiệp thì rất hiếm hoi.

Một thực tế rõ ràng là sự tồn tại của EPN trong tự nhiên, ngoài các yếu tố không phải sinh học như các điều kiện địa lý, khí hậu, còn phụ thuộc rất nhiều vào sự hiện

diện của côn trùng vật chủ, và sự hiện diện của hệ côn trùng lại phụ thuộc phần lớn vào hoạt động của con người. Điều này khác hẳn so với các nước phương Tây nơi hệ sinh thái nông nghiệp cũng hiện hữu khá phổ biến tuyến trùng EPN. Điều này rất có thể liên quan đến việc sử dụng nhiều phân bón vô cơ và hoá chất bảo vệ thực vật không những tiêu diệt côn trùng gây hại, mà còn có thể tiêu diệt cả tuyến trùng có ích với vai trò là nguồn thiên địch của sâu hại một phần do thuốc hóa học phần khác do mất đi nguồn vật chủ tự nhiên.

Ngay cả các khu rừng thiên nhiên và các khu bảo tồn cũng đang có nguy cơ bị đe dọa thu hẹp thảm thực vật nguyên sinh, do nạn khai thác bừa bãi. Tình trạng này đe dọa sự suy giảm hoặc biến mất nguồn tài nguyên sinh vật có ích, trong đó có nguồn tuyến trùng EPN. Vì vậy, cần có giải pháp duy trì bảo quản các chủng EPN để đánh giá khả năng sinh học và cung cấp vật liệu cho sản xuất thuốc sinh học phòng trừ sâu hại.

Tuy nhiên, hiện nay, biện pháp duy trì bảo quản bằng nhân nuôi liên tục trên ấu trùng bướm sáp lớn (*Galleria mellonella*), vừa tốn công sức, chi phí vừa bị suy giảm độc lực. Vì vậy, bảo tồn chuyển vị (*ex-situ*) là giải pháp lưu giữ tự nhiên nguồn tài nguyên quan trọng này.

2. Tình trạng bảo tồn tuyến trùng EPN

Để duy trì, gìn giữ các chủng tuyến trùng, người ta thường sử dụng 2 giải pháp:

(a) Duy trì, bảo quản tuyến trùng EPN trong phòng thí nghiệm: bằng cách (i) Nhân nuôi *in vivo* định kỳ sử dụng bướm sáp lớn (BSL) hoặc một loại côn trùng thích hợp; hoặc (ii) Bảo quản đông lạnh tuyến trùng trong nitơ lỏng; và

(b) Bảo tồn tuyến trùng EPN:

Khái niệm bảo tồn tuyến trùng EPN trong tự nhiên bao gồm:

(i) Bảo tồn phòng trừ sinh học: Đây là hình thức bảo tồn, duy trì một chủng tuyến trùng có sẵn hoặc phun rải để phòng trừ một đối tượng sâu hại (như bảo tồn 3 loài tuyến trùng *Steinernema riobrave*, *Heterorhadtis bacteriophora* và *H.indica* để phòng trừ sâu đục thân cam chanh (*Diaprepes abbreviatus*) ở bang Florida, Hoa Kỳ; bảo tồn 2 loài tuyến trùng *Steinernema* sp. SA và *Steinernema* sp. Q để phòng trừ loài sâu đục thân cây cọ đỏ do một loài xén tóc *Rhynchophorus ferrugineus* gây hại ở Ả-rập Xê-út và vùng Trung Đông;

(ii) Bảo tồn tự nhiên với 2 phương thức là bảo tồn định vị (*in-situ conservation*) đối với các chủng tuyến trùng EPN hiện diện trong các khu bảo tồn tự nhiên, và bảo tồn chuyển vị (*ex-situ conservation*) bằng việc đưa các chủng tuyến trùng EPN thu được, phun rải tại một khu vực rừng tự nhiên khác với điều kiện được bảo vệ nghiêm ngặt.

Hiện nay hình thức duy trì bảo quản trong phòng thí nghiệm theo hình thức (a) như trên là khá phổ biến tại các cơ sở nghiên cứu tuyến trùng EPN. Tuy nhiên, việc

duy trì theo phương thức (a.i) như trên vừa mất thời gian, công sức, chi phí vừa có nguy cơ giảm độc lực các chủng tuyển trùng khi liên tục nhân nuôi trên một đối tượng côn trùng. Còn bảo quản theo hình thức (a.ii) đòi hỏi quy trình công nghệ xử lý thích hợp để tuyển trùng không bị chết trước khi đông lạnh, đồng thời chi phí mua nito lỏng và thiết bị xử lý và bảo quản là khá tốn kém.

Bảo tồn in-situ là mô hình tốt nhất nhưng phụ thuộc vào nhiều yếu tố tự nhiên và con người ở các khu bảo tồn. Những điều kiện chi phối tự nhiên như thiên tai, biến đổi khí hậu, v.v.. Do đó, bảo tồn *ex-situ* là giải pháp lưu giữ tự nhiên nhưng tại những vị trí có lựa chọn theo những điều kiện phù hợp, đã giúp khắc phục được nhược điểm này của bảo tồn in-situ. Tuy nhiên, hiện nay vẫn chưa có những quy trình bảo tồn *ex-situ* tuyển trùng được công bố một cách chi tiết để có thể áp dụng được trong thực tế.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là khắc phục những hạn chế của các phương pháp bảo tồn nêu trên do vừa tốn kém vừa làm giảm hiệu lực của tuyển trùng lại phải đầu tư cao.

Để đạt được mục đích đó, sáng chế đề xuất quy trình bảo tồn *ex-situ* các chủng tuyển trùng ký sinh gây bệnh côn trùng (EPN) thích hợp với điều kiện Việt Nam.

Mô hình bảo tồn chuyên vị (*ex-situ*) về bản chất là di chuyển các chủng tuyển trùng từ các vùng khu vực khác nhau để tập trung phun rải tại một nơi mới để chủ động quản lý, khai thác “kho dự trữ tuyển trùng EPN” như là vật liệu ban đầu trong sản xuất sinh khối phục vụ cho phòng trừ sinh học sâu hại.

Quy trình bảo tồn *ex-situ* các chủng tuyển trùng nêu trên bao gồm các bước sau:

Bước 1: Phân lập tuyển trùng EPN từ các sinh cảnh tự nhiên;

Bước 2: Phân loại tuyển trùng và xác định tên khoa học của loài tuyển trùng EPN;

Bước 3: Đánh giá tiềm năng sinh học của tuyển trùng EPN;

Bước 4: Chuẩn bị nguồn tuyển trùng EPN để bảo tồn;

Bước 5: Tạo các lô bảo tồn tuyển trùng EPN trong tự nhiên;

Bước 6: Phun rải tuyển trùng EPN vào các lô bảo tồn; và

Bước 7: Kiểm tra hiệu quả bảo tồn.

Mô tả vắn tắt hình vẽ

Hình 1 thể hiện Bản đồ định vị các lô bảo tồn tuyển trùng EPN tại Trạm Đa dạng sinh học Mê Linh thuộc Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật.

Mô tả chi tiết sáng chế

Quy trình bảo tồn *ex-situ* các chủng tuyến trùng ký sinh gây bệnh côn trùng (Entomopathogenic nematode – EPN) bao gồm các bước:

Bước 1: Phân lập tuyến trùng EPN từ các sinh cảnh tự nhiên

- Thu mẫu đất từ các sinh cảnh tự nhiên;
- Dùng bẫy côn trùng bẫy sử dụng ấu trùng tuổi 5 của bướm sáp lớn (*Galleria mellonella*) để bẫy tuyến trùng từ trong đất.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ biết các kỹ thuật thu mẫu đất từ sinh cảnh tự nhiên và thực hiện bẫy côn trùng sử dụng ấu trùng bướm sáp lớn (BSL). Kỹ thuật này có thể tham khảo trong, ví dụ, tài liệu White G. F., 1927, A method for obtaining infective nematodes larvae from culture; Science, 66: 302-303.

Tất cả các chủng tuyến trùng EPN được duy trì ở trạng thái sống ở dạng tuyến trùng cảm nhiễm (IJs). Ở dạng này, tuyến trùng không cần dinh dưỡng, chỉ cần cho IJs vào lọ 250 mL chứa nước sạch và để trong tủ mát ở nhiệt độ 12-14°C, tuyến trùng có thể sống được 6-9 tháng đối với các chủng *Heterorhabditis* và 9-15 tháng đối với các chủng *Steinernema*. Định kỳ 6 tháng (đối với các chủng *Heterorhabditis*) và 12 tháng (đối với các chủng *Steinernema*), tiến hành gây nhiễm trở lại trên BSL để tiếp tục duy trì các chủng tuyến trùng đã phân lập được.

Bước 2: Phân loại tuyến trùng và xác định tên khoa học của loài tuyến trùng EPN

Việc xác định tên khoa học của loài tuyến trùng EPN cần các thủ tục cơ bản là phân loại hình thái, chẩn loại phân tử và lai chéo với các chủng/loài gần gũi.

Tuyến trùng phân lập được từ Bước 1 được nhân nuôi trên BSL để thu mẫu vật tuyến trùng tại các giai đoạn phát triển khác nhau của tuyến trùng EPN phục vụ phân loại hình thái, phân tử và lai chéo, trong đó các giai đoạn phát triển khác nhau của tuyến trùng EPN bao gồm con đực và cái thế hệ 1 (TH1), con đực và cái thế hệ 2 (TH2) và ấu trùng cảm nhiễm (IJs), mỗi giai đoạn chọn lấy 25-30 cá thể để phục vụ cho việc phân loại, thu được 5 tập hợp mẫu.

Việc phân loại bao gồm 3 công đoạn:

(i) Phân loại hình thái được tiến hành trên cơ sở đo, vẽ dưới kính hiển vi quang học đối với 5 tập hợp mẫu trên; xử lý số liệu về hình thái lượng (morphometrics); vẽ và chụp ảnh hiển vi quang học và xử lý các mẫu tuyến trùng để chụp ảnh hiển vi điện tử quét (SEM) theo quy trình Eisenback (1990).

(ii) Phân tích chẩn loại phân tử để xác nhận chính xác loài tuyến trùng.

Chẩn loại đặc trưng phân tử các chủng tuyến trùng EPN trên cơ sở phân tích trình tự gen nhân ITS-rADN. Do đây là gen có chứa các thông tin đặc thù cho mỗi loài, có độ tin cậy cao ít bị biến đổi. Kết quả phân tích trình tự gen ITS-rADN cho phép đánh giá đặc trưng phân tử của loài tuyến trùng EPN như chiều dài đoạn gen, tỷ lệ các gốc nucleotit khác biệt và các vị trí nucleotit thay đổi. Kết quả phân tích trình tự sẽ được so sánh đối chiếu (alignment) với các trình tự gen đã có trên GenBank để đánh giá sự khác biệt phân tử của loài tuyến trùng.

(iii) Lai chéo bằng việc sử dụng con đực loài này với con cái loài khác và ngược lại để xác định loài sinh học nếu các tổ hợp ghép đôi không giao phối với nhau để sinh sản thế hệ mới.

Sau khi thực hiện phân loại, các chủng tuyến trùng phân lập được được định danh.

Bước 3: Đánh giá tiềm năng sinh học của tuyến trùng EPN

Các chủng tuyến trùng khác nhau (thậm chí là các chủng trong một loài) đều có tiềm năng sinh học khác nhau đối với sâu hại. Tiềm năng sinh học của các chủng tuyến trùng EPN là cơ sở để sử dụng chúng trong việc sản xuất sinh khối sử dụng trong phòng trừ sinh học sâu hại.

Tiềm năng của một chủng tuyến trùng EPN được đánh giá theo 2 tiêu chí cơ bản là độc lực và khả năng sinh sản của chủng tuyến trùng, trong đó:

(i) Xác định độc lực (nồng độ ấu trùng cảm nhiễm (IJs) gây chết 50 % sâu hại của chủng tuyến trùng - LC_{50}) của mỗi loại sâu hại bằng cách phơi nhiễm sâu hại với 10 nồng độ khác nhau từ thấp nhất (thường là 10 IJs) đến cao nhất (thường là 100 IJs) phụ thuộc sinh khối của loài sâu hại sử dụng trong thử nghiệm – sinh khối càng lớn nồng độ càng cao và ngược lại, qua đó xác định được LC_{50} của chủng tuyến trùng đối với sâu hại.

(ii) Xác định khả năng sinh sản của chủng tuyến trùng bằng cách phơi nhiễm côn trùng vật chủ với các nồng độ phơi nhiễm khác nhau, qua đó xác định sản lượng ấu trùng cảm nhiễm (IJs) cao nhất được tạo ra từ một xác chết côn trùng ứng với một nồng độ phơi nhiễm nhất định gọi là nồng độ tối ưu (đó là nồng độ phơi nhiễm cho sản lượng IJs cao nhất, còn ở các nồng độ khác (cao hơn hoặc thấp hơn) đều cho sản lượng IJs thấp hơn).

Các chủng tuyến trùng EPN có tiềm năng sinh học cao được lựa chọn làm nguồn tuyến trùng EPN để bảo tồn.

Bước 4: Chuẩn bị nguồn tuyến trùng EPN để bảo tồn

Các chủng tuyến trùng sau khi được tuyển chọn qua đánh giá tiềm năng sinh học sẽ được lập hồ sơ để tiếp tục duy trì bảo quản, trong đó pha ấu trùng cảm nhiễm (IJs) của chủng tuyến trùng EPN là pha được sử dụng như nguồn vật liệu ban đầu để sản xuất sinh khối tuyến trùng phục vụ cho việc phun rải khi phòng trừ sinh học một

hoặc một số loại sâu hại.

Tiến hành nhân nuôi sinh khối chủng tuyến trùng EPN đã được đánh giá tuyển chọn để bảo tồn lâu dài. Việc nhân nuôi sinh khối này được thực hiện bao gồm các công đoạn:

(i) Chuẩn bị vật liệu:

- Tuyển trùng giai đoạn ấu trùng cảm nhiễm được bảo quản trong nước cất, nồng độ 2000 IJs/mL, và

- Ấu trùng tuổi 5 của BSL hoặc dế nhà (*A. domesticus*) hay sâu quy (*Zophobas morio*).

- Dụng cụ gồm: 100 đĩa petri (hộp lồng) nhựa hoặc thủy tinh, đường kính 9cm hoặc 15cm, 100 đĩa đồng hồ đường kính 6cm hoặc 10cm để đặt trong đĩa petri đường kính 9cm hoặc 15cm, 10 hộp giấy lọc Whatmann No2 đường kính 10cm hoặc 14cm cho đĩa đồng hồ tương ứng đường kính 6cm hoặc 10cm; 02 rây lọc kích thước lỗ 5µm và 45µm. 100 hộp nhựa từ 250-1000 mL để đựng chế phẩm EPN, tủ mát để bảo quản chế phẩm tuyển trùng EPN, một số vật tư, hóa chất để xử lý, bảo quản tuyển trùng (như bình thủy tinh 500mL và 1000mL, các dung dịch Ringer và Formalin).

(ii) Nhân nuôi *in vivo* trên BSL: Sử dụng đĩa petri 9cm, mỗi đĩa petri được lót đáy bằng 1 tờ giấy lọc Whatmann No2 No2, đường kính 9cm. Dùng pipet hút 2mL nước có chứa ấu trùng cảm nhiễm (IJs) nồng độ 200 IJs/mL bơm rải đều lên giấy lọc, sau đó cho vào hộp 10 ấu trùng BSL. Bọc đĩa petri bằng giấy parafilm cho vào hộp tối để ủ trong 5-7 ngày để tuyển trùng EPN xâm nhập, giết chết BSL và sinh sôi 2-3 thế hệ trong BSL, cho đến khi xác chết BSL chỉ là cái bọc kitin chứa đầy ấu trùng EPN bên trong.

(iii) Thu hoạch tuyển trùng: Sau 5-7 ngày (tùy chủng tuyển trùng EPN) chuyển tất cả BSL đã chết do tuyển trùng EPN sang bể nước. Bể nước được làm bằng một đĩa đồng hồ (đĩa lõm), trên miệng đĩa đặt 1 tờ giấy lọc Whatmann No2 đã được vuốt xuống như tang trống để mép giấy có thể tiếp xúc với nước. Trên mặt giấy lọc xếp ấu trùng BSL đã chết do nhiễm tuyển trùng EPN thành vòng tròn xung quanh mép giấy lọc, sau đó đặt đĩa đồng hồ vào một đĩa petri và đổ nước sạch vào đĩa petri khoảng 5mm sao cho mức nước tiếp xúc với mép giấy lọc để ấu trùng EPN sau khi thoát ra khỏi xác chết BSL sẽ di chuyển theo giấy lọc xuống nước trong đĩa petri - thu hoạch trong 3-4 ngày.

(iv) Làm sạch tuyển trùng EPN: Dồn tất cả tuyển trùng thu được vào một cốc thủy tinh loại 1000mL, cho nước sạch vào và gạn lọc 2-3 lần để được dung dịch tuyển trùng sạch.

(v) Tính sản lượng tuyến trùng: Định lượng tuyến trùng EPN thu được bằng cách hút 1mL cho vào cốc thủy tinh và pha loãng theo tỷ lệ sau đó đổ vào đĩa có ô đếm để đếm tuyến trùng dưới kính hiển vi soi nổi.

Bước 5: Tạo các lô bảo tồn tuyến trùng EPN trong tự nhiên

Mỗi lô bảo tồn sẽ được phun rải một chủng tuyến trùng EPN vì vậy số lượng lô bảo tồn tương ứng với số lượng chủng tuyến trùng cần phun rải để bảo tồn *ex-situ*. Các lô bảo tồn được bố trí cách nhau ít nhất 50m để ngăn ngừa tuyến trùng có thể di chuyển pha trộn lẫn nhau. Chọn nơi đất tơi xốp, có nhiều mùn và lá cây mục, nơi được che phủ bằng thảm thực vật tốt, nguyên sinh, nơi có đa dạng sinh học cao để côn trùng có thể sống và hoàn thành vòng đời trong đó có pha sống trong đất. Thiết kế các lô bảo tồn gần nguồn nước, gần suối nước chảy để có thể duy trì ẩm độ quanh năm và tạo điều kiện cho hệ thực vật và côn trùng phát triển.

Lập bản đồ định vị các lô bảo tồn tuyến trùng EPN: Sau khi chọn được các lô bảo tồn cần đánh dấu số thứ tự bằng biển báo và xác định tọa độ các lô bảo tồn. Tiến hành vẽ sơ đồ các lô bảo tồn trong khu vực bảo tồn tuyến trùng EPN.

Xây dựng hồ sơ bảo tồn *ex-situ* tuyến trùng EPN cho khu bảo tồn: Hồ sơ bảo tồn *ex-situ* tuyến trùng EPN bao gồm các thông tin: sơ đồ, địa điểm, tọa độ các lô bảo tồn, thông tin chủng tuyến trùng được bảo tồn (gồm tên chủng tuyến trùng, loài tuyến trùng, đặc điểm hình thái như kích thước ấu trùng cảm nhiễm, số đường bên (đối với các chủng *Steinernema*) và đặc điểm sinh học của chủng tuyến trùng như đối tượng có thể phòng trừ, độc lực (LC₅₀) đối với côn trùng sâu hại).

Bước 6: Phun rải tuyến trùng EPN vào các lô bảo tồn

Chuẩn bị vật liệu tuyến trùng: mỗi chủng tối thiểu 1,5 - 3,0 triệu IJs, được đựng trong 1 hộp nhựa kín dung tích 250mL để vận chuyển đến nơi cần phun rải.

Tiến hành thu mẫu đất kiểm tra trước khi phun rải tuyến trùng: tại mỗi điểm thu 1 mẫu đất để kiểm tra tuyến trùng EPN và tuyến trùng khác trước khi phun rải.

Pha dung dịch tuyến trùng với nước suối sạch trong một bình phun 10 lít và tưới đều trên một diện tích 2 - 4m² trong khu vực bụi rậm hoặc gốc cây. Sau khi phun rải tuyến trùng, tiến hành rải một lớp mùn đất hoặc tốt nhất là lá mục lên trên để giữ ẩm cho tuyến trùng dễ dàng thiết lập nơi ở mới.

Bước 7: Kiểm tra hiệu quả bảo tồn

Trong vòng 12 tháng sau khi phun rải, định kỳ cứ 2 tháng kiểm tra 1 lần bằng cách tiến hành thu mẫu đất kiểm tra sự tồn tại của tuyến trùng EPN. Mỗi mẫu đất 500mL được thu tại 3 điểm trong 1 lô bảo tồn được cho vào một túi nilon, gán kín miệng túi, ghi nhãn số mẫu, để nơi râm mát và vận chuyển mẫu về phòng thí nghiệm để kiểm tra sự tồn tại của tuyến trùng EPN trong đất.

Mỗi mẫu đất được trộn đều chia đôi 250mL cho bảy tuyến trùng theo phương

pháp côn trùng bẫy bằng BSL: cho 250mL đất vào một hộp nhựa dung tích 400 mL, lắc đều và thả vào hộp 10 ấu trùng BSL, đậy nắp và đặt ngược hộp - lộn nắp xuống dưới.

Dùng 250mL đất để tách lọc tuyến trùng theo phương pháp lọc tĩnh được mô tả trong sách “Tuyến trùng ký sinh gây bệnh côn trùng ở Việt Nam” (Nguyễn Ngọc Châu, 2008). Số lượng ấu trùng cảm nhiễm/mẫu đất được quan sát trực tiếp và đếm dưới kính hiển vi soi nổi OLYMPUS SZ12.

Số liệu kiểm tra bao gồm tỷ lệ BSL nhiễm tuyến trùng và số lượng ấu trùng cảm nhiễm (IJs) được cập nhật trong Hồ sơ bảo tồn tuyến trùng EPN.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Bảo tồn *ex-situ* tại Trạm Đa dạng Mê Linh, Vĩnh Phúc đã được triển khai theo quy trình trên đây, bao gồm các bước sau đây:

Bước 1: Phân lập tuyến trùng EPN từ các sinh cảnh tự nhiên

Thu mẫu đất từ các sinh cảnh tự nhiên. Danh sách 12 chủng tuyến trùng EPN được thu và phân lập từ 12 địa điểm từ các sinh tự nhiên là các Vườn quốc gia (VQG) và Khu bảo tồn tự nhiên (KBT) như ở bảng 3 dưới đây.

Dùng côn trùng bẫy để bẫy tuyến trùng từ trong đất. Côn trùng bẫy được sử dụng là ấu trùng tuổi 5 của bướm sếp lớn – BSL (*Galleria mellonella*).

Tất cả các chủng tuyến trùng EPN phân lập được duy trì ở trạng thái sống ở dạng tuyến trùng cảm nhiễm (IJs).

Bước 2: Phân loại tuyến trùng-xác định tên khoa học của loài tuyến trùng EPN

Các chủng tuyến trùng EPN sau khi phân lập được tiến hành nhân nuôi trên BSL để thu lại các giai đoạn phát triển khác nhau của tuyến trùng EPN phục vụ phân loại hình thái, phân tử và lai chéo.

Trong các giai đoạn phát triển khác nhau của tuyến trùng EPN (bao gồm con đực và cái thể hệ 1 (TH1), đực và cái thể hệ 2 (TH2), ấu trùng cảm nhiễm (IJs), mỗi dạng như vậy chọn lấy 25-30 cá thể để phục vụ cho việc phân loại, xác định loài tuyến trùng, bao gồm 3 bước:

(i) Phân loại hình thái được tiến hành trên cơ sở đo, vẽ dưới kính hiển vi OLYMPUS BX51 đối với 5 tập hợp mẫu trên, xử lý số liệu về hình thái lượng (morphometrics), vẽ và chụp ảnh hiển vi quang học. Xử lý các mẫu tuyến trùng để chụp ảnh hiển vi điện tử quét (SEM) theo quy trình Eisenback (1990).

(ii) Phân tích chân loại phân tử để xác nhận chính xác loài và đặc trưng phân tử

của loài bằng việc phân tích trình tự gen nhân ITS-rADN. Kết quả chẩn loại phân tử sẽ xác định được đoạn trình tự (DNA sequence) đặc trưng cho mỗi loài.

(iii) Tiến hành lai chéo giữa con đực loài này với con cái loài khác và ngược lại để xác định loài sinh học khi các tổ hợp ghép đôi không giao phối với nhau để sinh sản thế hệ mới.

Bước 3: Đánh giá tiềm năng sinh học của tuyến trùng EPN

Tiềm năng của tất cả các chủng tuyến trùng EPN phân lập được được đánh giá theo 2 tiêu chí cơ bản là độc lực và khả năng sinh sản của chủng tuyến trùng.

- Xác định độc lực đối với mỗi loại sâu hại trên cơ sở thử nghiệm phơi nhiễm sâu hại với các nồng độ khác nhau (thường là 10) từ thấp nhất đến cao nhất (xác định nồng độ IJs phơi nhiễm thường được lựa chọn theo sinh khối của loài sâu hại - sinh khối càng lớn nồng độ càng cao và ngược lại), qua đó xác định được LC_{50} của chủng tuyến trùng đối với sâu hại.

- Xác định khả năng sinh sản của chủng tuyến trùng bằng thí nghiệm phơi nhiễm côn trùng với các nồng độ khác nhau, qua đó xác định sản lượng ấu trùng cảm nhiễm (IJs) cao nhất được tạo ra từ một xác chết côn trùng ứng với một nồng độ phơi nhiễm nhất định gọi là nồng độ tối ưu (đó là nồng độ phơi nhiễm cho sản lượng IJs cao nhất, còn ở các nồng độ khác trong thí nghiệm (cao hơn hoặc thấp hơn) đều cho sản lượng IJs thấp hơn).

Kết quả Bước 2 và Bước 3 đối với 16 chủng tuyến trùng EPN được thể hiện chi tiết trong Bảng 1 và Bảng 2 dưới đây.

Bảng 1. Danh sách các chủng tuyến trùng EPN đã được đánh giá độc lực trên một số sâu hại quan trọng

TT	Tên chủng và chỉ số	Đặc trưng hình thái, sinh học
1	Tên chủng S-CP12	Loài <i>Steinernema loci</i>
	Hình thái (Chiều dài IJs, số ĐB)	$L = 995 \pm 43(925-1086) \mu m$, 9 ĐB.
	Sinh học (Độc lực LC_{50})	$LC_{50} = 165$ (sâu quy)
		$LC_{50} = 2059$ (bọ hung đen)
2	Chủng S-TK10	Loài: <i>Steinernema loci</i>
	Hình thái (Chiều dài IJs, số ĐB)	$L = 986 \pm 88 (896-1072) \mu m$, 9 ĐB
	Sinh học (Độc lực LC_{50})	$LC_{50} = 12$ (sâu tơ),
		$LC_{50} = 13$ (sâu xanh bướm trắng),

		LC ₅₀ = 35 (sâu khoang),
		LC ₅₀ =28 (sâu cuốn lá đậu tương)
		LC ₅₀ = 1492 (bọ hung đen)
3	Chủng S-TLN	Loài: <i>Steinernema carpocapsae</i>
	Hình thái (Chiều dài IJs, số ĐB)	L = 558 (438-650)µm
	Sinh học (Độc lực LC ₅₀)	LC ₅₀ = 16 (sâu tơ),
		LC ₅₀ =25 (sâu xanh)
		LC ₅₀ =32 (sâu đục thân ngô)
		LC ₅₀ =1176 (bọ hung đen)
4	Chủng S-TX1	Loài <i>Steinernema sangi</i>
	Hình thái (Chiều dài IJs, số ĐB)	L= 753 ± 18 (704-784) µm, 8 ĐB
	Sinh học (Độc lực LC ₅₀)	LC ₅₀ = 11 (sâu tơ),
		LC ₅₀ =18 (sâu xanh)
		LC ₅₀ =36 (sâu đục thân ngô)
		LC ₅₀ =1286 (bọ hung đen)
5	Chủng S-XS4	Loài <i>Steinernema sangi</i>
	Hình thái (Chiều dài IJs, số ĐB)	L = 746 ± 22 (700-768)µm
	Sinh học (Độc lực LC ₅₀)	HL = 88,2% (sâu xám hại ngô, thuốc lá)
6	Chủng S-DL13	Loài <i>Steinernema siamkayai</i>
	Hình thái (Chiều dài IJs, số ĐB)	L= 426 ± 22 (374- 455) µ, 7 ĐB
	Sinh học (Độc lực LC ₅₀)	LC ₅₀ = 47 (sâu đục thân ngô).
7	Chủng S-PQ16	Loài <i>Steinernema phuquocgensae</i>
	Hình thái (Chiều dài IJs, số ĐB)	L= 898 ± 62,1 (765-1006)µm, 9 ĐB
	Sinh học (Độc lực LC ₅₀)	LC ₅₀ = 34 (sâu đục thân ngô)
		LC ₅₀ = 99 (dế nhà)
		LC ₅₀ =103 (sâu quy)
		LC ₅₀ =150 (ve sầu)
		LC ₅₀ =1696 (bọ hung đen)

8	Chủng S-QTr	Loài <i>Steinernema surkhetense</i>
	Hình thái (Chiều dài IJs, số ĐB)	$L = 503 \pm 21$ (460-556) μm , 8 ĐB
	Sinh học (Độc lực LC_{50})	$LC_{50} = 116$ (dế nhà)
9	Chủng S-LC	Loài <i>Steinernema longicaudum</i>
	Hình thái (Chiều dài IJs, số ĐB)	$L = 982 \pm 35,3$ (892-1042), 8 ĐB
	Sinh học (Độc lực LC_{50})	$LC_{50} = 35$ (sâu đục thân ngô);
		$LC_{50} = 122$ (dế nhà);
		$LC_{50} = 26$ (sâu quy).
10	Chủng S-ĐM	Loài <i>Steinernema longicaudum</i>
	Hình thái (Chiều dài IJs, số ĐB)	$L = 1062 \pm 44$ (896-1096) μm , 8 ĐB
	Sinh học (Độc lực LC_{50})	$LC_{50} = 26$ (sâu quy).
11	Chủng S-XL3147	Loài <i>Steinernema longicaudum</i>
	Hình thái (Chiều dài IJs, số ĐB)	$L = 1032 \pm 45$ (892-1086) μm , 8 ĐB
	Sinh học (Độc lực LC_{50})	$LC_{50} = 11$ (sâu quy)
12	Chủng S-TN10	Loài <i>Steinernema longicaudum</i>
	Hình thái (Chiều dài IJs, số ĐB)	$L = 1104 \pm 36$ (910-1088) μm , 8 ĐB
	Sinh học (Độc lực LC_{50})	HL = 88,6% (sâu xám hại ngô, thuốc lá)
13	Chủng H-NT3	Loài <i>Heterorhabditis indica</i>
	Hình thái (Chiều dài IJs)	$L = 593 \pm 21$ (542-638) μm
	Sinh học (Độc lực LC_{50})	$LC_{50} = 12$ (sâu tơ)
		$LC_{50} = 14$ (sâu keo)
		$LC_{50} = 22$ (sâu đục thân ngô)
		$LC_{50} = 50$ (sâu khoang)
		$LC_{50} = 80$ (sâu xám)
		$LC_{50} = 1070$ (bọ hung đen)
14	Chủng H-CB3452	Loài <i>Heterorhabditis indica</i>
	Hình thái (Chiều dài IJs)	$L = 571 \pm 23$ (482-621) μm
	Sinh học (Độc lực LC_{50})	$LC_{50} = 100$ (dế nhà)

		LC ₅₀ =2725 (bọ hung)
15	Chủng H-KT3987	Loài <i>Heterorhabditis indica</i>
	Hình thái (Chiều dài IJs)	L= 572 ± 32 (508-626) µm
	Sinh học (Độc lực LC ₅₀)	LC ₅₀ = 21 (sâu quy)
		LC ₅₀ =124 (dế nhà)
		LC ₅₀ =159 (ve sầu)
		LC ₅₀ =1773 (bọ hung đen)
16	Chủng H-MF11	Loài <i>Heterorhabditis indica</i>
	Hình thái (Chiều dài IJs)	L = 586 ± 23 (540-636) µm
	Sinh học (Độc lực LC ₅₀)	LC ₅₀ = 45 (sâu xanh)
		LC ₅₀ = 12 (sâu keo)
		LC ₅₀ = 15 (sâu tơ)
		LC ₅₀ = 1077 (bọ hung đen)

*ĐB: đường bên, hình thái đối với loài thuộc *Steinernema*

Bảng 2. Nồng độ (IJs) gây nhiễm tối ưu trên 6 loài sâu hại để đạt sản lượng tuyến trùng cao nhất.

TT	Đối tượng sâu hại	Nồng độ nhiễm tối ưu (IJs)
1	BSL (<i>Galleria mellonella</i>)	70
2	Sâu quy (<i>Zophobas morio</i>)	120
3	Dế nhà (<i>Acheta domesticus</i>)	120
4	Ve sầu (<i>Dundubianagarasagna</i>)	500
5	Sùng trắng (<i>Alissonotum impressicolle</i>)	2500
6	Sâu đục thân ngô (<i>Ostrinia furnacalis</i>)	40

Từ kết quả trên, chọn ra 12 chủng có tiềm năng sinh học cao để tiến hành bảo tồn. Các chủng được chọn được thể hiện trong Bảng 3 dưới đây.

Bảng 3. Các chủng / loài tuyến trùng EPN và địa điểm phân lập

TT	Tên	Tên loài EPN	Địa điểm phân lập
----	-----	--------------	-------------------

	chủng EPN		
1	S-CP12	<i>Steinernema loci</i>	VQG Cúc Phương, Ninh Bình
2	S-TK10	<i>Steinernema loci</i>	Bụi cây bãi biển Thạch Hà, Hà Tĩnh
3	S-TX1	<i>Steinernema sangi</i>	Rừng Thường Xuân, Thanh Hóa
4	S-XL3147	<i>Steinernema longicaudum</i>	KBT Xuân Liên, Thanh Hóa
5	S-DL13	<i>Steinernema siamkayai</i>	Vườn cà phê CưGma, Đắk Lắk
6	S-PQ16	<i>Steinernema phuquocgensae</i>	Bụi cây bãi biển Phú Quốc, Kiên Giang
7	S-QTr	<i>Steinernema surkhetense</i>	Rừng thông Đông Hà, Quảng Trị
8	S-LC	<i>Steinernema longicaudum</i>	Rừng Văn Chấn, Lào Cai
9	S-DM	<i>Steinernema longicaudum</i>	Rừng Đắc Min, Đắc Nông
10	H-NT3	<i>Heterorhabditis indica</i>	Rừng savan Ninh Hải, Ninh Thuận
11	H-CB3452	<i>Heterorhabditis indica</i>	VQG Cát Bà, Hải Phòng
12	H-KT3987	<i>Heterorhabditis indica</i>	KBT Chư Mom Ray, Kon Tum

Bước 4: Chuẩn bị nguồn tuyến trùng EPN để bảo tồn ex-situ

Tiến hành nhân nuôi sinh khối 12 chủng tuyến trùng EPN lựa chọn được sau bước 3 được lập hồ sơ để tiếp tục duy trì bảo quản, trong đó pha ấu trùng cảm nhiễm (IJs) của chủng tuyến trùng EPN là pha được sử dụng như nguồn vật liệu ban đầu để sản xuất sinh khối tuyến trùng phục vụ cho việc phun rải khi phòng trừ sinh học một hoặc một số loại sâu hại.

Tiến hành nhân nuôi sinh khối chủng tuyến trùng EPN đã được đánh giá tuyển chọn để bảo tồn lâu dài.

- Tuyến trùng giai đoạn ấu trùng cảm nhiễm được bảo quản trong nước cất, nồng độ 2000 IJs/mL.

- Đã sử dụng 3 loại côn trùng để sản xuất sinh khối tuyến trùng EPN là: ấu trùng tuổi 5 của bướm sếp lớn - BSL (*G. mellonella*) hoặc dế nhà (*A. domesticus*), sâu quy (*Z. morio*).

- Dụng cụ nhân nuôi, gồm: 100 Đĩa petri (hộp lồng) nhựa hoặc thủy tinh, đường kính 9cm hoặc 15cm, 100 đĩa đồng hồ đường kính 6cm hoặc 10cm để đặt trong đĩa petri đường kính 9cm hoặc 15cm, 10 hộp giấy lọc Whatmann No2 đường kính 10cm hoặc 14cm cho đĩa đồng hồ tương ứng đường kính 6cm hoặc 10cm; 02 rây lọc kích thước lỗ 5µm và 45µm. 100 hộp nhựa đựng chế phẩm EPN (từ 250-1000 mL), tủ

mát SANYO 450L để bảo quản chế phẩm tuyến trùng EPN, một số vật tư, hóa chất để xử lý, bảo quản tuyến trùng (như bình thủy tinh 500mL và 1000mL, các dung dịch Ringer và Formol).

ii) Nhân nuôi *in vivo* trên BSL (tương tự đối với nhân nuôi trên sâu quy, dế nhà): Sử dụng đĩa petri 9cm, mỗi đĩa petri được lót đáy bằng 1 tờ giấy lọc Whatmann No2, đường kính 9cm. Dùng pipet hút 2mL nước có chứa ấu trùng cảm nhiễm (IJs) nồng độ 200 IJs/mL bơm rải đều lên giấy lọc, sau đó cho vào hộp 10 ấu trùng BSL. Bọc đĩa petri bằng giấy bọc parafilm cho vào hộp tối để ủ 5-7 ngày để tuyến trùng EPN xâm nhập, giết chết BSL và sinh sôi 2-3 thế hệ trong BSL, cho đến khi xác chết BSL chỉ là cái bọc kitin chưa đầy ấu trùng EPN bên trong.

iii) Thu hoạch tuyến trùng: Sau 5-7 ngày (tùy chủng tuyến trùng EPN) chuyển tất cả BSL đã chết do tuyến trùng EPN sang bể nước. Bể nước được làm bằng một đĩa đồng hồ (đĩa lõm) đường kính 6cm, trên đặt 1 tờ giấy lọc Whatmann No2, đường kính 9cm đã được vuốt xuống như tang trống để mép giấy có thể tiếp xúc với nước. Xếp ấu trùng BSL đã chết do nhiễm tuyến trùng thành một vòng quanh mép giấy lọc, sau đó đặt đĩa đồng hồ vào một đĩa petri và đổ nước sạch vào đĩa petri khoảng 5mm sao cho mức nước tiếp xúc với mép giấy lọc để ấu trùng tuyến trùng thoát ra khỏi xác chết BSL và di chuyển theo giấy lọc xuống nước trong đĩa petri - thu hoạch trong 3-4 ngày.

iv) Làm sạch tuyến trùng EPN: Dồn tất cả tuyến trùng thu được vào một cốc thủy tinh loại 1000mL, cho nước sạch vào và gạn lọc 2-3 lần để được dung dịch tuyến trùng sạch.

v) Tính sản lượng tuyến trùng: Định lượng tuyến trùng EPN thu được bằng cách hút 1mL cho vào cốc thủy tinh và pha loãng theo tỷ lệ sau đó đổ vào đĩa có ô đếm để đếm tuyến trùng dưới kính hiển vi soi nổi.

Sản lượng IJs của các chủng tuyến trùng được thể hiện trong Bảng 4 dưới đây.

Bảng 4. Sản lượng tuyến trùng (IJs) trên 3 loại côn trùng được sử dụng làm giá thể nhân nuôi tuyến trùng EPN.

TT	Đối tượng sâu hại	Sản lượng trung bình IJs (thấp nhất – cao nhất)
1	BSL (<i>G. mellonella</i>)	46.000 ± 2.800 (43.200-48.800)
2	Sâu quy (<i>Zophobas morio</i>)	45.000 ± 4.200 (40.800 - 49.200)
3	Dế nhà (<i>A. domesticus</i>)	71.600± 5.800(65.800 - 77.400)

Bước 5: Tạo các lô bảo tồn tuyến trùng EPN trong tự nhiên

Địa điểm bảo tồn các chủng tuyến trùng EPN là Trạm Đa dạng sinh học Mê Linh thuộc Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật. Trạm Đa dạng sinh học Mê Linh nằm trên địa bàn Thị xã Phúc Yên, tỉnh Vĩnh Phúc. Trạm có diện tích 178 ha nằm ở phía Đông Nam dãy núi Tam Đảo, tỉnh Vĩnh Phúc.

Thành phần côn trùng: Khu vực Trạm gồm 880 loài thuộc 92 họ của 10 bộ là Bộ Cánh cứng (Coleoptera), Bộ Hai cánh (Diptera), Bộ Cánh màng (Hymenoptera) (trừ các họ ong ký sinh), Bộ Cánh vảy (Lepidoptera), Bộ Cánh khác (Heteroptera), Bộ Cánh giống (Homoptera) (tập trung vào phân Bộ Ve rày (Auchenorrhyncha)), Bộ Cánh thẳng (Orthoptera), Bộ Bọ ngựa (Mantodea), Bộ cánh da (Dermaptera) và Bộ Bọ que (Phasmatodea).

Sau khi khảo sát thực địa tại Trạm Đa dạng sinh học Mê Linh, đã xác định 12 lô bảo tồn, tương ứng với 12 địa điểm đáp ứng với tiêu chí bảo tồn. Các lô bảo tồn đều nằm cách xa nhau ít nhất 50m để ngăn ngừa các chủng tuyến trùng EPN có thể di chuyển pha trộn lẫn nhau.

Các lô bảo tồn được thiết kế nằm hai bên con đường mòn ven suối để thuận tiện cho việc thu mẫu kiểm tra định kỳ. Tại mỗi lô được thu thập thông tin về đất (chủ yếu là đất mùn với độ dày 30-40 cm), độ ẩm, thảm thực vật chủ yếu là cây bụi. Sau khi chọn được các lô bảo tồn theo yêu cầu như trên cần đánh dấu số thứ tự bằng biển báo và xác định tọa độ các lô bảo tồn.

Thiết kế số lượng lô bảo tồn: Mỗi lô bảo tồn sẽ được phun rải một chủng tuyến trùng EPN vì vậy số lượng lô bảo tồn tương ứng với số lượng chủng tuyến trùng cần phun rải để bảo tồn *ex-situ*. Các lô bảo tồn cách nhau ít nhất 50m để ngăn ngừa tuyến trùng có thể di chuyển pha trộn lẫn nhau.

Lập bản đồ định vị các lô bảo tồn tuyến trùng EPN: Sau khi chọn được các lô bảo tồn cần đánh dấu số thứ tự bằng bảng báo và xác định tọa độ các lô bảo tồn. Tiến hành vẽ sơ đồ các lô bảo tồn trong khu vực bảo tồn tuyến trùng EPN.

Xây dựng hồ sơ bảo tồn ex-situ tuyến trùng EPN cho khu bảo tồn: Hồ sơ bảo tồn *ex-situ* tuyến trùng EPN, bao gồm các thông tin: sơ đồ, địa điểm, tọa độ các lô bảo tồn. Thông tin chủng tuyến trùng được bảo tồn, gồm tên chủng tuyến trùng, loài tuyến trùng, đặc điểm hình thái như kích thước ấu trùng cảm nhiễm, số đường bên (đối với các chủng *Steinernema*) và đặc điểm sinh học của chủng tuyến trùng như đối tượng có thể phòng trừ, độc lực (LC₅₀) đối với côn trùng sâu hại.

Bản đồ định vị các lô bảo tồn tuyến trùng EPN được thể hiện trên Hình 1.

Bước 6: Phun rải tuyến trùng vào các lô bảo tồn

Trước khi phun rải tuyến trùng, tại mỗi điểm thu 1 mẫu đất để kiểm tra tuyến trùng EPN và tuyến trùng khác trước khi phun rải. Mỗi chủng EPN gồm 1,5 triệu IJs được đựng trong 1 hộp nhựa kín dung tích 250 mL để vận chuyển đến nơi cần phun rải. Tại mỗi điểm phun rải pha dung dịch tuyến trùng với nước suối sạch trong một bình phun 10 lít và tưới đều trên một diện tích 2 m² trong bụi/gốc cây. Sau khi phun rải, rải một lớp mùn đất hoặc tốt nhất là lá mục lên trên để giữ ẩm cho môi trường đất tạo điều kiện cho tuyến trùng xác lập trong môi trường mới.

Đánh dấu ô thí nghiệm bằng một bảng gỗ ghi tên (bằng sơn) chủng cấy xuống đất cạnh ô thí nghiệm.

Chuẩn bị phun rải tuyến trùng EPN vào các lô bảo tồn: để tiến hành phun rải tuyến trùng EPN vào các lô bảo tồn được thiết kế cần chuẩn bị vật liệu tuyến trùng và dụng cụ sau đây:

Chuẩn bị vật liệu tuyến trùng: mỗi chủng tối thiểu 1,5 - 3,0 triệu IJs, được đựng trong 1 hộp nhựa kín dung tích 250 mL để vận chuyển đến nơi cần phun rải. Dụng cụ phun rải gồm: 01 bình phun, 01 xẻng đào xúc đất, 10 tấm bảng gỗ hoặc tôn (kích thước 20 x 40 cm) kèm cọc cắm (chắc chắn), sơn xanh để ghi tên chủng + Búa để đóng cọc. Máy ảnh chụp sinh cảnh và các điểm thí nghiệm, thiết bị GPS để xác định tọa độ địa điểm thí nghiệm các chủng.

Tiến hành thu mẫu đất kiểm tra trước khi phun rải tuyến trùng: tại mỗi điểm thu 1 mẫu đất để kiểm tra tuyến trùng EPN và tuyến trùng khác trước khi phun rải.

Pha dung dịch tuyến trùng với nước suối sạch trong một bình phun 10 lít và tưới đều trên một diện tích 4 m² trong khu vực bụi/gốc cây. Sau khi phun rải rải một lớp mùn đất hoặc tốt nhất là lá mục lên trên để giữ ẩm cho tuyến trùng dễ dàng thiết lập nơi ở mới.

Bước 7: Kiểm tra hiệu quả bảo tồn

Kiểm tra trước phun rải: Trước khi phun rải đã tiến hành thu mẫu đất (500mL) tại 12 lô thiết kế. Tại mỗi lô bảo tồn tiến hành lấy mẫu đất tại 3 điểm. Ở mỗi điểm lấy đất ở độ sâu 10-15 cm từ mặt đất cho vào một túi nylon. Số lượng đất cho một mẫu là 500 mL. Ghi nhãn cho mỗi mẫu đất gồm các thông tin: số thứ tự của mẫu, ngày thu mẫu. Các mẫu đất được bảo quản ở nơi thoáng mát tránh phơi nắng trực tiếp và tránh nhiệt độ cao.

Kiểm tra định kỳ sau phun rải: Định kỳ 2 tháng kiểm tra 1 lần, tại mỗi lô bảo tồn tiến hành thu 500mL đất tại 3 điểm. Mẫu đất mang về phòng thí nghiệm chia đều thành 2 phần 250mL. Sử dụng 1 phần để bẫy tuyến trùng theo phương pháp côn trùng bẫy với ấu trùng BSL và một phần 250 mL đất tiến hành gạn lọc để quan sát và đếm tuyến trùng EPN trực tiếp dưới kính hiển vi soi nổi OLYMPUS SZ12.

Đánh giá độc lực của chủng tuyến trùng thu lại từ các lô bảo tồn: được tiến hành theo qui trình của Cabanillas & Raulston (1994) như sau: Bố trí 10 công thức nồng độ thí nghiệm từ 10-100 IJs/sâu và 1 công thức đối chứng. Mỗi công thức thí nghiệm sử dụng 5 ấu trùng BSL cho vào 1 đĩa petri (đường kính 60 mm) có lót sẵn giấy lọc Whatmann No2. Pha loãng IJs để có được nồng độ mong muốn theo yêu cầu của mỗi công thức nồng độ, dùng pipet hút 2 mL dung dịch chứa tuyến trùng phun đều lên mảnh giấy lọc. Xác định độc lực LC_{50} của chủng tuyến trùng EPN trên cơ sở xác định hiệu lực gây chết ở các nồng độ IJs gây nhiễm khác nhau được xử lý theo quy trình PROBIT với chương trình SPSS 2.0

Đánh giá kết quả bảo tồn qua 6 đợt thu mẫu kiểm tra sự hiện diện của tuyến trùng EPN tại 12 lô bảo tồn sau 12 tháng phun rải, cho kết quả dương tính 100 %. Kết quả chi tiết được thể hiện trong Bảng 5 dưới đây, với số liệu tỷ lệ BSL nhiễm tuyến trùng EPN ở cột thứ nhất và số lượng IJs trong mẫu 250 mL đất ở cột thứ 2 trong mỗi đợt.

Bảng 5. Kết quả kiểm tra tuyến trùng tại các lô bảo tồn

TT	Tên chủng EPN	Kết quả kiểm tra (qua 6 đợt, 12 tháng theo dõi)											
		Tỷ lệ BSL chết (%); số lượng IJs/250 mL đất											
		1 (15/2/2016)		2 (16/4/2016)		3 (16/6/2016)		4 (15/8/2016)		5 (15/10/2016)		6 (15/12/2016)	
1	S-CP12	65	250	70	180	65	350	65	420	65	540	85	450
2	S-TK10	70	180	80	220	70	240	70	280	80	530	70	460
3	S-TX1	85	380	85	420	65	480	75	480	70	570	75	640
4	S-XL3147	60	440	65	540	75	640	70	540	85	650	95	710
5	S-DL13	75	600	75	520	80	660	85	680	70	640	80	610
6	S-PQ16	95	760	95	580	85	620	90	720	75	670	90	690
7	S-QTr	85	520	75	380	80	640	80	620	80	540	75	580

8	S-LC	65	340	85	480	80	420	85	560	75	510	85	610
9	S-DM	75	430	85	560	75	490	70	610	80	520	85	550
10	H-NT3	85	760	90	620	75	680	85	590	90	620	75	710
11	H-CB3452	75	580	75	520	85	680	80	590	90	480	90	510
12	H-KT3987	90	520	85	420	85	580	80	590	65	520	75	640

Hiệu quả đạt được theo sáng chế

Mô hình bảo tồn *ex-situ* trong tự nhiên có thể thay thế cho phương thức duy trì, bảo quản tuyến trùng EPN bằng cách nhân nuôi định kỳ các chủng tuyến trùng bằng kỹ thuật *in vivo* (dùng giá thể côn trùng làm môi trường nhân nuôi).

Quy trình bảo tồn *ex-situ* trong tự nhiên có thể thay thế cho phương thức bảo quản đông lạnh tuyến trùng trong nitơ lỏng cũng khá tốn kém về chi phí thiết bị, nitơ lỏng để bổ sung định kỳ hàng tháng, chi phí thiết bị, vật tư, hóa chất để xử lý tuyến trùng, chi phí đào tạo nhân viên kỹ thuật để đảm nhận công việc này.

Bảo tồn *ex-situ* cho phép độc lực của các chủng tuyến trùng được duy trì ổn định trong điều kiện tự nhiên.

Bảo tồn *ex-situ* tuyến trùng EPN cũng chính là giải pháp bảo tồn sự đa dạng của sinh vật có ích, nguồn thiên địch của sâu hại trong nông và lâm nghiệp.

Quy trình bảo tồn *ex-situ* tuyến trùng EPN có thể được lập ra tại các vùng khác nhau thuận tiện cho việc khai thác và sử dụng.

Quy trình bảo tồn tuyến trùng EPN có thể áp dụng trong phòng trừ sâu hại trong điều kiện trang trại trồng một vài loại rau, cây ăn quả - được gọi là mô hình phòng trừ bảo tồn. Mô hình này có nhiều ưu thế như: i) không cần dùng thuốc hóa học độc hại cho người, môi trường và sản phẩm; ii) Do tuyến trùng EPN có khả năng tái sinh (sinh sản trong xác chết côn trùng vật chủ) nên chỉ cần phun rải một lần cho cả một chu kỳ sản xuất; iii) Rất hiệu quả đối với các loại sâu hại trú ẩn trong đất hoặc có pha phát triển trong đất; iv) Chi phí có thể cạnh tranh với thuốc hóa học đối với nhiều đối tượng sâu hại mẫn cảm với tuyến trùng EPN.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình bảo tồn *ex-situ* các chủng tuyến trùng ký sinh gây bệnh côn trùng (Entomopathogenic nematode – EPN) bao gồm các bước:

Bước 1: Phân lập tuyến trùng EPN từ các sinh cảnh tự nhiên

- Thu mẫu đất từ các sinh cảnh tự nhiên;
 - Dùng bẫy côn trùng bẫy sử dụng ấu trùng tuổi 5 của bướm sáp lớn – BSL (*Galleria mellonella*) để bẫy tuyến trùng từ trong đất;
- trong đó, tất cả các chủng tuyến trùng EPN được duy trì ở trạng thái sống ở dạng tuyến trùng cảm nhiễm (IJs) trong lọ 250 mL chứa nước sạch và để trong tủ mát ở nhiệt độ 12-14°C;

Bước 2: Phân loại tuyến trùng và xác định tên khoa học của loài tuyến trùng EPN

Tuyến trùng phân lập được từ Bước 1 được nhân nuôi trên BSL để thu mẫu vật tuyến trùng tại các giai đoạn phát triển khác nhau của tuyến trùng EPN phục vụ phân loại hình thái, phân tử và lai chéo, trong đó các giai đoạn phát triển khác nhau của tuyến trùng EPN bao gồm con đực và cái thế hệ 1 (TH1), con đực và cái thế hệ 2 (TH2) và ấu trùng cảm nhiễm (infective juveniles - IJs), mỗi giai đoạn chọn lấy 25-30 cá thể để phục vụ cho việc phân loại, thu được 5 tập hợp mẫu;

Việc phân loại bao gồm 3 công đoạn:

(i) Phân loại hình thái được tiến hành trên cơ sở đo, vẽ dưới kính hiển vi quang học đối với 5 tập hợp mẫu trên; xử lý số liệu về hình thái lượng (morphometrics); vẽ và chụp ảnh hiển vi quang học và xử lý các mẫu tuyến trùng để chụp ảnh hiển vi điện tử quét (SEM) theo quy trình Eisenback (1990);

(ii) Chẩn loại đặc trưng phân tử các chủng tuyến trùng EPN trên cơ sở phân tích trình tự gen nhân ITS-rADN và so sánh đối chiếu với các trình tự gen đã có trên GenBank để đánh giá sự khác biệt phân tử của loài tuyến trùng;

(iii) Lai chéo bằng việc sử dụng con đực loài này với con cái loài khác và ngược lại để xác định loài sinh học nếu các tổ hợp ghép đôi không giao phối với nhau để sinh sản thế hệ mới;

Sau khi thực hiện phân loại, các chủng tuyến trùng phân lập được được định danh;

Bước 3: Đánh giá tiềm năng sinh học của tuyến trùng EPN

Đánh giá tiềm năng sinh học của một chủng tuyến trùng EPN theo 2 tiêu chí cơ bản là độc lực và khả năng sinh sản của chủng tuyến trùng, trong đó:

(i) Xác định độc lực là nồng độ ấu trùng cảm nhiễm (IJs) gây chết 50 % sâu hại của chủng tuyến trùng - LC_{50} của mỗi loại sâu hại bằng cách phơi nhiễm sâu hại với các nồng độ khác nhau, thường là 10, từ thấp nhất đến cao nhất bằng cách xác định nồng độ IJs phơi nhiễm thường được lựa chọn theo sinh khối của loài sâu hại – sinh khối càng lớn nồng độ càng cao và ngược lại, qua đó xác định được LC_{50} của chủng tuyến trùng đối với sâu hại;

(ii) Xác định khả năng sinh sản của chủng tuyến trùng bằng cách phơi nhiễm côn trùng vật chủ với các nồng độ phơi nhiễm khác nhau, qua đó xác định sản lượng ấu trùng cảm nhiễm (IJs) cao nhất được tạo ra từ một xác chết côn trùng ứng với một nồng độ phơi nhiễm nhất định gọi là nồng độ tối ưu, đó là nồng độ phơi nhiễm cho sản lượng IJs cao nhất, còn ở các nồng độ cao hơn hoặc thấp hơn đều cho sản lượng IJs thấp hơn;

Các chủng tuyến trùng EPN có tiềm năng sinh học cao được lựa chọn làm nguồn tuyến trùng EPN để bảo tồn;

Bước 4: Chuẩn bị nguồn tuyến trùng EPN để bảo tồn

Các chủng tuyến trùng sau khi được tuyển chọn qua đánh giá tiềm năng sinh học sẽ được lập hồ sơ để tiếp tục duy trì bảo quản, trong đó pha ấu trùng cảm nhiễm (IJs) của chủng tuyến trùng EPN là pha được sử dụng như nguồn vật liệu ban đầu để sản xuất sinh khối tuyến trùng phục vụ cho việc phun rải khi phòng trừ sinh học một hoặc một số loại sâu hại;

Tiến hành nhân nuôi sinh khối chủng tuyến trùng EPN đã được đánh giá tuyển chọn để bảo tồn lâu dài;

Việc nhân nuôi sinh khối này được thực hiện bao gồm các công đoạn:

(i) Chuẩn bị vật liệu:

- Tuyển trùng giai đoạn ấu trùng cảm nhiễm được bảo quản trong nước cất, nồng độ 2000 IJs/mL, và

- Ấu trùng tuổi 5 của BSL (*Galleria mellonella*), dế nhà (*A. domesticus*) hoặc sâu quỳ (*Zophobas morio*),

- Dụng cụ gồm: 100 đĩa petri (hộp lồng) nhựa hoặc thủy tinh, đường kính 9cm hoặc 15cm, 100 đĩa đồng hồ đường kính 6cm hoặc 10cm để đặt trong đĩa petri đường kính 9cm hoặc 15cm, 10 hộp giấy lọc Whatmann No2, đường kính 10cm hoặc 14cm cho đĩa đồng hồ tương ứng đường kính 6cm hoặc 10cm; 02 rây lọc kích thước lỗ 5 μ m và 45 μ m. 100 hộp nhựa từ 250-1000 mL để đựng chế phẩm EPN, tủ mát để bảo quản chế phẩm tuyến trùng EPN, một số vật tư, hóa chất để xử lý, bảo quản tuyến trùng;

(ii) Nhân nuôi *in vivo* trên BSL: Sử dụng đĩa petri 9cm, mỗi đĩa petri được lót đáy bằng 1 tờ giấy lọc Whatmann No2, đường kính 9cm; dùng pipet hút 2mL nước

có chứa ấu trùng cảm nhiễm (IJs) nồng độ 200 IJs/mL bơm rải đều lên giấy lọc, sau đó cho vào hộp 10 ấu trùng BSL; bọc đĩa petri bằng giấy parafilm cho vào hộp tối để ủ trong 5-7 ngày để tuyến trùng EPN xâm nhập, giết chết BSL và sinh sôi 2-3 thế hệ trong BSL, cho đến khi xác chết BSL chỉ là cái bọc kitin chứa đầy ấu trùng EPN bên trong;

(iii) Thu hoạch tuyến trùng: Sau 5-7 ngày tùy theo chủng tuyến trùng EPN, chuyển tất cả BSL đã chết do tuyến trùng EPN sang bể nước; bể nước được làm bằng một đĩa đồng hồ, trên miệng đĩa đặt 1 tờ giấy lọc Whatmann No2 đã được vuốt xuống như tang trống để mép giấy có thể tiếp xúc với nước; trên mặt giấy lọc xếp ấu trùng BSL đã chết do nhiễm tuyến trùng EPN thành vòng tròn xung quanh mép giấy lọc, sau đó đặt đĩa đồng hồ vào một đĩa petri và đổ nước sạch vào đĩa petri khoảng 5mm sao cho mức nước tiếp xúc với mép giấy lọc để ấu trùng EPN sau khi thoát ra khỏi xác chết BSL sẽ di chuyển theo giấy lọc xuống nước trong đĩa petri - thu hoạch trong 3-4 ngày;

(iv) Làm sạch tuyến trùng EPN: Dồn tất cả tuyến trùng thu được vào một cốc thủy tinh loại 1000mL, cho nước sạch vào và gạn lọc 2-3 lần để được dung dịch tuyến trùng sạch;

(v) Tính sản lượng tuyến trùng: Định lượng tuyến trùng EPN thu được bằng cách hút 1mL cho vào cốc thủy tinh và pha loãng theo tỷ lệ sau đó đổ vào đĩa có ô đếm để đếm tuyến trùng dưới kính hiển vi soi nổi;

Bước 5: Tạo các lô bảo tồn tuyến trùng EPN trong tự nhiên

Số lượng lô bảo tồn tương ứng với số lượng chủng tuyến trùng cần phun rải để bảo tồn *ex-situ*;

Các lô bảo tồn được bố trí cách nhau ít nhất 50m;

Chọn nơi đất đai tốt, có nhiều mùn và lá cây mục, nơi được che phủ bằng thảm thực vật tốt, nguyên sinh, nơi có đa dạng sinh học cao, thiết kế các lô bảo tồn gần nguồn nước, gần suối nước chảy;

Lập bản đồ định vị các lô bảo tồn tuyến trùng EPN:

- Sau khi chọn được các lô bảo tồn cần đánh dấu số thứ tự bằng biển báo và xác định tọa độ các lô bảo tồn;

- Tiến hành vẽ sơ đồ các lô bảo tồn trong khu vực bảo tồn tuyến trùng EPN;

Xây dựng hồ sơ bảo tồn *ex-situ* tuyến trùng EPN cho khu bảo tồn, trong đó Hồ sơ bảo tồn *ex-situ* tuyến trùng EPN bao gồm các thông tin: sơ đồ, địa điểm, tọa độ các lô bảo tồn, thông tin chủng tuyến trùng được bảo tồn gồm tên chủng tuyến trùng, loài tuyến trùng, đặc điểm hình thái như kích thước ấu trùng cảm nhiễm, số đường

bên đối với các chủng *Steinernema* và đặc điểm sinh học của chủng tuyến trùng, trong đó ít nhất là đối tượng có thể phòng trừ, độc lực LC₅₀ đối với côn trùng sâu hại;

Bước 6: Phun rải tuyến trùng EPN vào các lô bảo tồn

Chuẩn bị vật liệu tuyến trùng: mỗi chủng tối thiểu 1,5 - 3,0 triệu IJs, được đựng trong 1 hộp nhựa kín dung tích 250mL để vận chuyển đến nơi cần phun rải;

Tiến hành thu mẫu đất kiểm tra trước khi phun rải tuyến trùng: tại mỗi điểm thu 1 mẫu đất để kiểm tra tuyến trùng EPN và tuyến trùng khác trước khi phun rải;

Pha dung dịch tuyến trùng với nước suối sạch trong một bình phun 10 lít và tưới đều trên một diện tích 2 - 4m² trong khu vực bụi rậm hoặc gốc cây; sau khi phun rải tuyến trùng, tiến hành rải một lớp mùn đất hoặc tốt nhất là lá mục lên trên; và

Bước 7: Kiểm tra hiệu quả bảo tồn

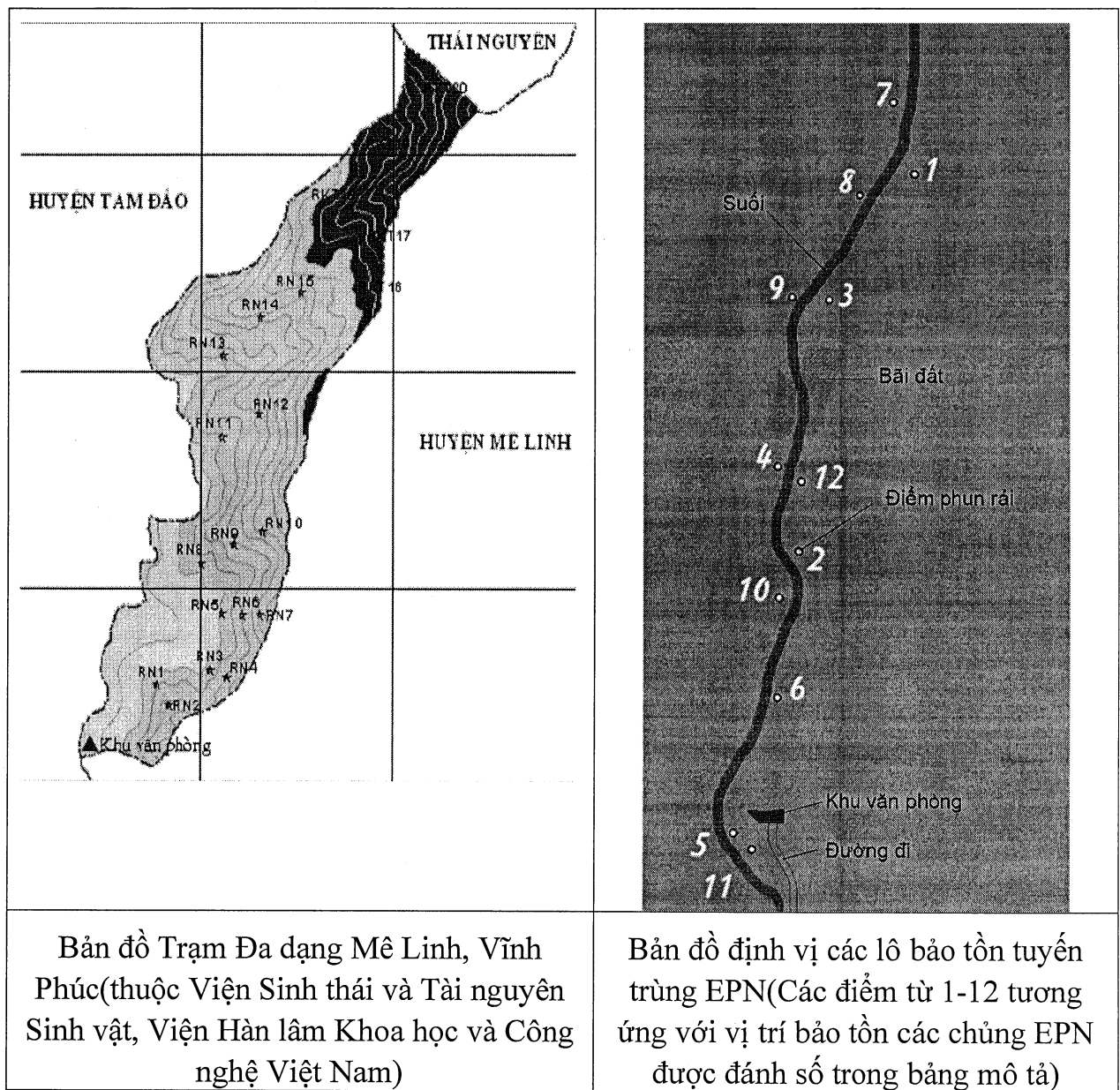
Trong vòng 12 tháng sau khi phun rải, định kỳ cứ 2 tháng kiểm tra 1 lần bằng cách tiến hành thu mẫu đất kiểm tra sự tồn tại của tuyến trùng EPN;

Mỗi mẫu đất 500mL được thu tại 3 điểm trong 1 lô bảo tồn được cho vào một túi nilon, gắn kín miệng túi, ghi nhãn số mẫu, để nơi râm mát và vận chuyển mẫu về phòng thí nghiệm để kiểm tra sự tồn tại của tuyến trùng EPN trong đất;

Mỗi mẫu đất được trộn đều chia đôi 250mL cho bẫy tuyến trùng theo phương pháp côn trùng bẫy bằng BSL: cho 250mL đất vào một hộp nhựa dung tích 400 mL, lắc đều và thả vào hộp 10 ấu trùng BSL, đậy nắp và đặt ngược hộp - lộn nắp xuống dưới;

Dùng 250mL đất để tách lọc tuyến trùng theo phương pháp gạn lọc để quan sát trực tiếp dưới kính hiển vi soi nổi và đếm số lượng ấu trùng cảm nhiễm/mẫu đất;

Số liệu kiểm tra bao gồm tỷ lệ BSL nhiễm tuyến trùng và số lượng ấu trùng cảm nhiễm (IJs) được cập nhật trong Hồ sơ bảo tồn tuyến trùng.



Hình 1. Bản đồ định vị các lô bảo tồn tuyến trùng EPN tại trạm Đa dạng sinh học Mê Linh, Vĩnh Phúc