

Xác định loài ngài sáp có trong tổ ong mật ở Long An, Bình Dương và Đắk Lắk

Identification of wax moth in the beehives from Long An, Binh Duong and DakLak Provinces

Trần Lê Ngọc Ngân¹, Lý Khánh Nguyên¹, Nguyễn Mai Nghiệp¹,
Nguyễn Ngọc Bảo Châu², Nguyễn Bảo Quốc^{1*}

¹Trường Đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh, Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

²Trường Đại học Mở Thành phố Hồ Chí Minh, Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

*Tác giả liên hệ, Email: baoquoc@hcmuaf.edu.vn

THÔNG TIN

DOI:10.46223/HCMCOUJS.
tech.vi.18.2.2440.2023

Ngày nhận: 09/09/2022

Ngày nhận lại: 30/09/2022

Duyệt đăng: 03/10/2022

Từ khóa:

Achroia grisella; bướm sáp;
định danh dựa vào hình thái;
định danh phân tử; gen COI

Keywords:

Achroia grisella; wax moth;
morphological identification;
molecular identification; COI
gene

TÓM TẮT

Ấu trùng ngài sáp gây hại trên tổ ong mật ảnh hưởng đến năng suất cho nghề nuôi ong là một mối nguy đang được quan tâm trên thế giới. Tuy nhiên, việc xác định rõ loài côn trùng gây hại này còn chưa được quan tâm nhiều do nghề nuôi ong chỉ mới phát triển gần đây ở Việt Nam. Nghiên cứu này đã định danh chính xác loài ngài sáp gây hại tại 03 tỉnh Long An, Bình Dương và Đắk Lắk thông qua các đặc điểm hình thái và định danh phân tử. Các mẫu ấu trùng thu thập tại 03 tỉnh đều có kích thước trung bình là 15 - 20mm x 3 - 5mm với phần đầu không có đặc điểm đặc trưng của loài *Galleria mellonella*, thân có màu trắng sữa hoặc vàng nhạt. Kích thước trung bình của thành trùng đực là 6 - 10mm x 1 - 2mm, của thành trùng cái là 7 - 12mm x 2 - 3mm, kích thước trung bình của 02 cặp cánh đạt 5 - 7mm x 2 - 3mm. Kết quả định danh phân tử dựa vào gen *COI* cho thấy các mẫu thu thập này phân bố ở 03 tỉnh khảo sát thuộc loài *Achroia grisella* (Lepidoptera: Pyralidae) và có cùng nguồn gốc với loài phân bố ở Trung Quốc. Nghiên cứu đã cung cấp thêm nhiều thông tin về loài ngài sáp gây hại tổ ong phân bố tại 03 tỉnh Long An, Bình Dương và Đắk Lắk dựa vào sự kết hợp giữa đặc điểm hình thái và định danh phân tử.

ABSTRACT

The harmful wax moth larvae on honeybees, which decrease beekeeping productivity, are a worldwide concern. However, since beekeeping only has developed recently in Vietnam, identifying this insect has been neglected. Through morphological characteristics and molecular identification, this study accurately identified the harmful wax moth in three provinces: Long An, Binh Duong, and DakLak. Larvae samples collected in three provinces range in size from 15 - 20mm to 3 - 5mm, with the head lacking the particular features of large wax moths (*Galleria mellonella*) and the body milky white or light

yellow. Males have an average size of 6 - 10mm x 1 - 2mm, females have an average size of 7 - 12mm x 2 - 3mm, and two pairs of wings have an average size of 5 - 7mm x 2 - 3mm. The results of molecular identification using the *COI* gene revealed that the wax moths found in the three provinces sampled refer to the species *Achroia grisella* and were of the same origin as the butterflies found in China. Based on morphological characteristics and molecular identification, the study provided more information on the honeycomb wax moth, which is found in three provinces: Long An, Binh Duong, and DakLak.

1. Giới thiệu

Ở Việt Nam nghề nuôi ong để lấy mật đang ngày càng phát triển theo diện tích của cây trồng ăn trái. Tuy nhiên, ngành này đang đối mặt với một loài côn trùng gây hại tạo nên nỗi lo cho những người làm nghề nuôi ong lấy mật. Trưởng thành của sâu sáp thường sống và đẻ trứng vào các tổ của đàn ong nhỏ yếu hay bị bệnh và các ấu trùng của loài này sẽ ăn kén, phấn hoa, da ong và cuối cùng dẫn đến phá hủy tổ ong. Loài *Galleria mellonella* phân bố ở Tây Ban Nha từng được phát hiện có khả năng phá hủy túi nhựa (Bombelli, Howe, & Bertocchini, 2017), khả năng phá hủy túi nhựa của chúng có thể là do sự tương đồng về cấu trúc hóa học (CH₂-CH₂) giữa túi nhựa và sáp ong (Jones, Prasad, Heskins, Morgan, & Guillet, 1974; Khyade, 2018). Bên cạnh đó, kết quả nghiên cứu của Kundungal, Gangarapu, Sarangapani, Patchaiyappan, và Devipriya (2019) đã minh chứng loài *Achroia grisella* cũng có khả năng ăn túi nhựa như loài *Galleria mellonella*, và cơ chế có thể tiêu thụ được nhựa của các loài bướm này đã và đang được chứng minh sự hiện diện của một số nhóm vi sinh vật có trong đường ruột của chúng (Giacomucci, Raddadi, Soccio, Lotti, & Fava, 2019; Ren & ctg., 2019; Yang, Yang, Wu, Zhao, & Jiang, 2014). Ngoài ra, nhiều công bố khoa học ghi nhận gen *COI* (*Cytochrome oxidase I*) là dấu ấn phân tử tiềm năng trong phân tích hệ phân tử cũng như thiết lập “DNA barcoding” đối với nhóm loài côn trùng, tiêu biểu là công bố của Roh và cộng sự (2020). Thông qua ứng dụng công cụ sinh học phân tử kết hợp tin sinh học nhằm hỗ trợ công tác định danh một cách chính xác, cũng như tiềm năng về xử lý túi nhựa của sâu sáp thì việc xác định loài phân bố chủ yếu tại địa phương là cần thiết nhằm phát triển chúng như một giải pháp cho xử lý sinh học rác thải nhựa. Tuy nhiên hiện nay loài ngài sáp nhỏ vốn phân bố chủ yếu tại Việt Nam và đang gây ảnh hưởng nghiêm trọng cho các trang trại nuôi ong vẫn chưa được định danh.

2. Cơ sở lý thuyết

Ngài sáp thuộc họ Pyraliade, bao gồm hai loài phổ biến là ngài sáp lớn (*Galleria mellonella*) và ngài sáp nhỏ (*Achroia grisella*). Hiện nay sự hiện diện của loài *Galleria mellonella* đã được xác nhận ở 27 quốc gia châu Phi, 09 quốc gia châu Á, 05 quốc gia Bắc Mỹ, 03 quốc gia Mỹ Latin, Úc, 10 quốc gia châu Âu và 05 quốc đảo (Kwadha, Ong’amo, Ndegwa, Raina, & Fombong, 2017). Trong khi đó loài *Achroia grisella* lại phổ biến ở những vùng khí hậu nhiệt đới, cận nhiệt đới và không thể tồn tại trong thời gian dài ở nhiệt độ đóng băng. Loài sâu sáp nhỏ có khả năng tồn tại ở những vùng có vĩ độ cao và nhiệt độ thấp hơn so với loài sâu sáp lớn. Trong ngành nuôi ong, *Galleria mellonella* là một loài gây hại rất nghiêm trọng cho các trang trại nuôi ong và là đối tượng mẫu cho các nghiên cứu về độc học của các vi sinh vật kiểm soát côn trùng (Ellis, Graham, & Mortensen, 2013; Harding, Schroeder, Collins, & Frankel, 2013; Ritter & Akratanakul, 2006; Ramarao, Nielsen-Leroux, & Lereclus, 2012; Shimanuki,

Knox, Furgala, Caron, & Williams, 1980; Williams, 1997). Hiện nay tại các trang trại nuôi ong Việt Nam đang đối mặt với loài sâu sáp gây hại phá hủy cấu trúc tổ ong. Nghiên cứu về loài này cũng chỉ mới tập trung vào loài sâu sáp lớn (*Galleria mellonella*) (Dang, Do, & Hoang, 2021) nhưng vẫn chưa có nhiều công bố về loài sâu sáp nhỏ (*Achroia grisella*) tại Việt Nam. Bên cạnh việc định danh dựa trên hình thái vốn được xem là chuẩn vàng trong định danh côn trùng, việc giải trình tự DNA của một vùng gen chuẩn hay DNA mã vạch có thể là một giải pháp nhanh chóng (Hebert, Penton, Burns, Janzen, & Hallwachs, 2004). Mã vạch DNA có thể hữu ích trong việc chẩn đoán loài vì sự phân kỳ trình tự thường thấp hơn nhiều giữa các cá thể của một loài so với giữa các loài có quan hệ họ hàng gần (Avise & Walker, 1999). Thật vậy, các loài bướm đêm cho thấy sự khác biệt về trình tự trung bình là 6.5% trong gen *cytochrome c oxidase I (COI)* của ty thể trong khi sự khác biệt giữa các cá thể cụ thể chỉ trung bình là 0.25% (Moore, 1995). Trình tự gen *COI* được xem là dấu ấn phân tử tiềm năng trong phân tích phả hệ cũng như thiết lập “DNA barcoding” đối với nhóm loài côn trùng (Roh & ctg., 2020). Trong nghiên cứu này việc định danh chính xác dựa trên hình thái và sinh học phân tử dựa trên trình tự gen *COI* của loài bướm sáp nhỏ phân bố tại ba tỉnh của Việt Nam là Long An, Bình Dương và Đắk Lắk đóng vai trò rất quan trọng trong các nghiên cứu sau này về đặc tính sinh học, chức năng, tập tính cũng như vai trò của hệ vi sinh đường ruột đến khả năng phân huỷ túi nhựa của chúng.

3. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

3.1. Vật liệu nghiên cứu

Ấu trùng được thu thập từ các thùng nuôi ong ở các trại ong thuộc tỉnh Long An, Bình Dương và Đắk Lắk. Mẫu thu thập được đựng trong hộp nhựa thoáng khí đã dán nhãn và kí hiệu cho từng vùng khác nhau, sau đó mẫu được đưa về phòng thí nghiệm và bảo quản ở nhiệt độ phòng. Ấu trùng tiếp tục được nhân nuôi tại phòng thí nghiệm bệnh học và chẩn đoán phân tử (Viện Công nghệ Sinh học và Môi trường, Trường Đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh) để tìm hiểu về vòng đời và nghiên cứu về hình thái của loài với nguồn thức ăn chủ yếu là sáp tổ ong, bổ sung mật ong pha loãng 50%.

3.2. Định danh hình thái

Mỗi tuổi ấu trùng được xác định dựa vào nghiên cứu của Ellis và cộng sự (2013) chọn ngẫu nhiên 10 cá thể ấu trùng và 05 cá thể trưởng thành mỗi giới tính. Tiến hành phân tích các đặc điểm hình thái của ấu trùng ở các độ tuổi thông qua kích thước và thời gian tăng trưởng cùng với thời gian hoá nhộng và vũ hoá. So sánh sự khác biệt giữa đặc điểm hình thái giữa các cá thể đực và các cá thể cái. So sánh với nghiên cứu của Ellis và cộng sự (2013) cùng với nghiên cứu của Mahgoub, Lau, và Omar (2015) về hình thái loài ngài sáp này. Các bộ phận của ấu trùng và cá thể trưởng thành được chụp dưới kính hiển vi soi nổi với độ phóng đại 1,200 lần (Terino, Trung Quốc).

3.3. Định danh phân tử sử dụng gen *COI*

Ngài sáp được định danh phân tử thông qua so sánh trình tự gen *COI* phản ứng khuếch đại bằng primer chuyên biệt cho côn trùng bộ hai cánh. Sau khi giải trình tự tiến hành so sánh với cơ sở dữ liệu của Genbank (NCBI, Mỹ) nhằm xác định tên loài. Cây phân nhóm di truyền được xây dựng từ trình tự gen *COI* đã giải với các trình tự tham chiếu của Genbank để xác định sự khác biệt trong trình tự từ đó cho thấy sự khác biệt về nguồn gốc.

Chọn ngẫu nhiên 03 cá thể trong 10 cá thể ấu trùng đã phân tích hình thái để tiến hành ly trích DNA. Tiến hành cắt lấy phần chân của những cá thể này và sử dụng bộ kit GeneJET Genomic DNA Purification (Thermo, Mỹ) với quy trình ly trích đã điều chỉnh cho phù hợp để ly

trích DNA. DNA tổng số được kiểm tra thông qua điện di với gel Agarose 1% ở hiệu điện thế 100V trong 30 phút và đo OD bằng máy Nano Drop (Thermo, Mỹ). Kết quả phải cho band tổng số phải có độ sáng rõ ràng, DNA không bị đứt gãy và không bị tạp nhiễm và mẫu nào chưa đạt chuẩn sẽ tiến hành ly trích lại. Các mẫu sau khi đã kiểm tra được tiến hành lưu trữ ở nhiệt độ -20°C nhằm bảo quản cho các ứng dụng về sau.

Trình tự gen *COI* được khuếch đại bằng với primer LepF1 (5'-ATTCAACCAATCATAAAGATATTGG-3') và LepR1 (5'-TAAACTTCTGGATGTCCAAAAAATCA-3') (Hebert & ctg., 2004). Với thành phần phản ứng PCR được trình bày ở **Bảng 1**, và kích thước của gen *COI* được khuếch đại là 648bp. Bộ kit PCR được sử dụng trong nghiên cứu này là My Taq DNA polymerase (Bioline, Anh).

Bảng 1

Thành phần phản ứng PCR khuếch đại gen *COI*

Thành phần	Nồng độ đầu	Thể tích	Nồng độ cuối
My Taq Buffer	5X	10 μ L	1X
Primer LepF1	10 μ M	1.5 μ L	0.3nM
Primer LepR1	10 μ M	1.5 μ L	0.3nM
Taq DNA polymerase	5 U/ μ L	0.5 μ L	0.05 U/ μ L
DNA template		5 μ L	
H ₂ O		31.5 μ L	

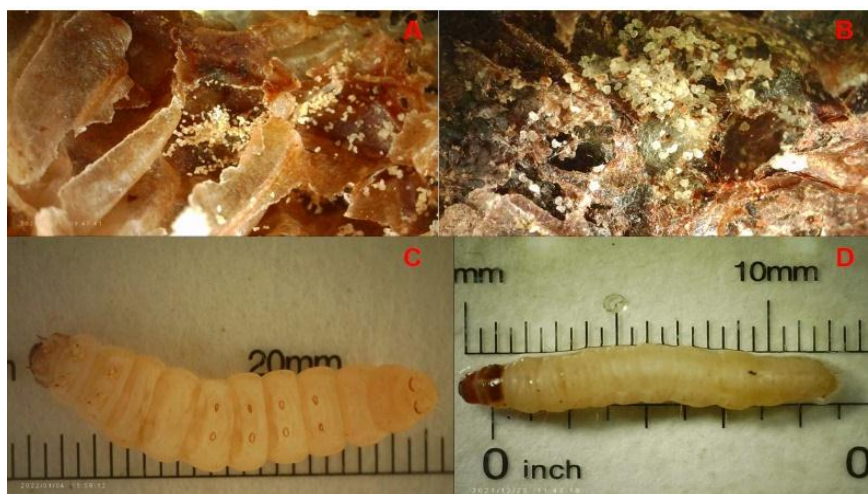
Phản ứng PCR khuếch đại vùng đặc trưng của gen *COI* ở côn trùng bộ hai cánh được thực hiện với chu trình nhiệt như sau: 1 chu kỳ với nhiệt độ 95°C trong 5 phút; với 35 chu kỳ tiếp theo ở nhiệt độ 95°C trong 30 giây, 46°C trong 30 giây, 72°C trong 2 phút; 1 chu kỳ 72°C trong 7 phút. Sản phẩm PCR được trộn với GelRed và điện di trên gel agarose 1% ở hiệu điện thế 100V trong 30 phút. Tiến hành soi và chụp ảnh kết quả điện di dưới tia UV bằng thiết bị UVP Multidoc Gel Doc System (UVP, Mỹ). Kết quả của phản ứng PCR phải cho band sáng rõ ràng, không có band phụ và đúng với kích thước; sau đó được tiến hành giải trình tự ở công ty 1st Base (Malaysia) và đối chiếu với dữ liệu của Genbank (NCBI, Mỹ).

Trình tự gen *COI* của các mẫu được đối chiếu với cơ sở dữ liệu của Genbank (NCBI, Mỹ) nhằm xác định tên loài. Tiến hành xây dựng cây phân nhóm di truyền từ trình tự gen *COI* đã giải với các trình tự tham chiếu của Genbank để xác định sự khác biệt về nguồn gốc. Cây phân nhóm di truyền được xây dựng theo phương pháp Neighbor-Joining theo mô hình của Tamura-Nei với 1,000 lần lặp lại bằng phần mềm MEGA11.

4. Kết quả nghiên cứu và thảo luận

4.1. Đặc điểm hình thái loài bướm sấp

Các tổ ong bị ấu trùng gây hại tại 03 tỉnh Long An, Bình Dương và Đắk Lắk với dấu hiệu tổ bị hoá đen, xuất hiện các ấu trùng lạ trong tổ và kết cấu tổ có các hạt sấp li ti như trên Hình 1A, B. Ấu trùng của loài ngài sấp gây hại được tiến hành nuôi ở điều kiện phòng thí nghiệm nhằm quan sát hình thái và so sánh với các nghiên cứu trước đây trên thế giới.



Hình 1. Ấu trùng và ảnh hưởng của tổ ong do loài này gây ra
(A, B): Tổ ong mật bị ấu trùng phá hoại, (C): Ấu trùng ở tuổi 5, (D): Ấu trùng ở tuổi 3

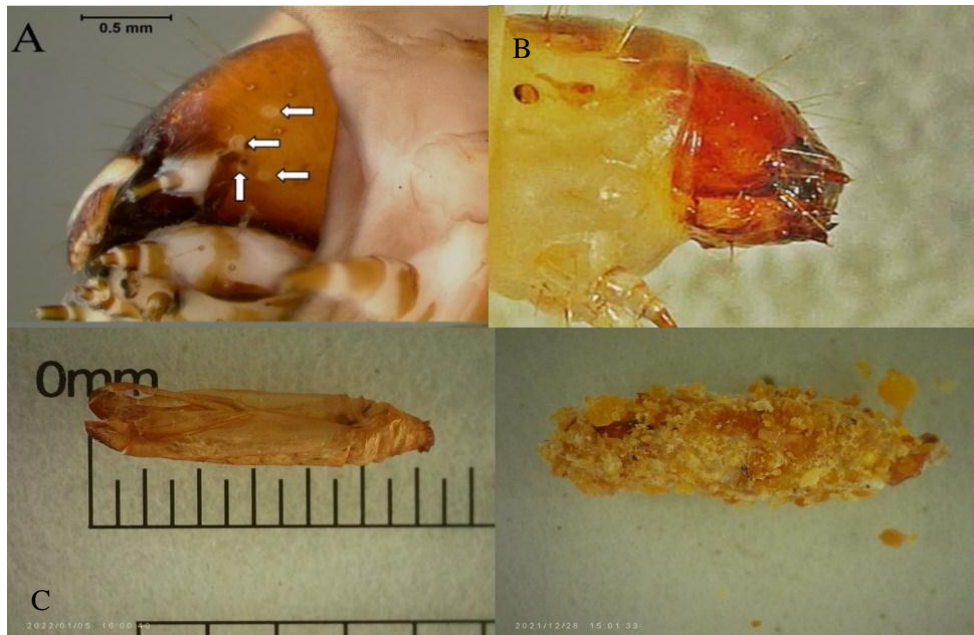
Kết quả quan sát thời gian sinh trưởng của ấu trùng ngài sáp cho thấy chúng có 05 tuổi và tương đồng với nghiên cứu của Mahgoub và cộng sự (2015) (**Hình 1** thể hiện dấu hiệu tổ ong mật bị ấu trùng sâu sáp phá hoại cấu trúc tổ và hình thái ấu trùng ở 02 giai đoạn tuổi 3 và 5). Các mẫu thu thập tại cả 02 khu vực địa lý là Bình Dương và Đắc Lắc đều có hình thái tương tự nhau. Ấu trùng của loài này có thể đạt đến kích thước với chiều dài từ 15 - 20mm và chiều rộng từ 3 - 5mm và thời gian sinh trưởng của ấu trùng trung bình đạt đến 20 ± 5 ngày. Trong khi đó, loài ngài sáp lớn có kích thước ấu trùng trung bình đạt từ 25 - 30mm x 5 - 7mm ở tuổi 5 (Kwadha & ctg., 2017). Về màu sắc của ấu trùng ngài sáp được thu thập đều có màu trắng sữa, hơi vàng và dần ngả sang nâu ở giai đoạn tuổi lớn. So sánh hình thái mảnh đầu của ấu trùng ngài sáp được thu thập tại 03 tỉnh ở Việt Nam cho thấy có nhiều đặc điểm tương đồng với loài bướm sáp nhỏ và khác hẳn so với đặc điểm của bướm sáp lớn (**Hình 2**, mô tả sự khác biệt giữa hình thái đầu của ấu trùng ngài sáp lớn và nhỏ với những dấu hiệu đặc trưng chỉ có ở loài ngài lớn theo Egelie Mortensen, Barber, Sullivan, và Ellis (2015)).

Ấu trùng bắt đầu tạo kén và hoá nhộng ở sau khoảng 20 ngày sinh trưởng. Các ấu trùng tuổi lớn thường nhả tơ gần khu vực hoá kén và sau đó tạo một lớp tơ xung quanh cơ thể để bắt đầu quá trình hoá nhộng. Nhộng của ngài sáp có màu nâu nhạt (**Hình 2C**) với kén được bao bọc bên ngoài bằng lớp tơ và có lẫn các vụn sáp của tổ ong do quá trình phá huỷ tổ ong tạo ra (**Hình 2D**). Giai đoạn vũ hoá không có thời gian cụ thể do phụ thuộc vào điều kiện khí hậu nên không được khảo sát trong nghiên cứu khi lưu trữ ấu trùng trong điều kiện phòng thí nghiệm.

Ngài sáp trưởng thành có kích thước rất khác biệt giữa cá thể đực và cái. Các cá thể đực thu ở cả 03 khu vực địa lý có kích thước đạt trung bình 6 - 10mm x 1 - 2mm, cá thể cái đạt trung bình 7 - 12mm x 2 - 3mm (**Hình 3**). Trưởng thành đực luôn có kích thước nhỏ hơn so với trưởng thành cái, kết quả khảo sát này phù hợp với nghiên cứu về loài *Achroia grisella* của Egelie và cộng sự (2015); Ellis và cộng sự (2013); Chalup và cộng sự (2018). Trưởng thành có 02 cặp cánh với cặp cánh trước có hình bầu dục, cặp cánh sau có nhiều tua với kích thước cả 02 cặp cánh đạt trung bình 5 - 7mm x 2 - 3mm. Kích thước này tương đồng với các nghiên cứu trên thế giới về bướm sáp nhỏ và nhỏ hơn so với kích thước cánh của bướm sáp lớn (Kwadha & ctg., 2017).

Khi trưởng thành chúng có thân màu vàng, phần cánh màu ánh bạc với phần đầu màu vàng nâu ở cá thể đực và cá thể cái. Trưởng thành không có khả năng tiêu thụ sáp ong. Bên cạnh

kích thước, những cá thể đực có phần miệng với cấu trúc vòi như mũi hếch và cấu trúc vòi như mũi thẳng ở cá thể cái (Kwadha & ctg., 2017). Đặc điểm này tương đồng với mô tả về loài sáp nhỏ *Achroia grisella* như được mô tả trong các nghiên cứu trước đây (Chalup & ctg., 2018; Egelie & ctg., 2015; Ellis & ctg., 2013). Dựa vào các đặc điểm về màu sắc, kích thước của ấu trùng và của các cá thể ngài sáp trưởng thành ở 03 tỉnh Long An, Bình Dương và Đắk Lắk cho thấy loài côn trùng gây hại tương đồng với *Achroia grisella*.



Hình 2. Hình thái đầu của ấu trùng ngài sáp, nhộng và kén.

A: Hình thái đầu của ấu trùng ngài sáp lớn (Egelie & ctg., 2015);

B: Hình thái đầu của ấu trùng ngài sáp nhỏ; C: Hình thái nhộng; D: Kén của ngài sáp nhỏ



Hình 3. Hình thái ngài sáp đực và cái quan sát dưới kính hiển vi soi nổi.

A: Ngài đực; B: Ngài cái; C: Phần đầu của ngài cái với vòi chia đôi;

D: Phần đầu của ngài đực (không có vòi chia đôi)

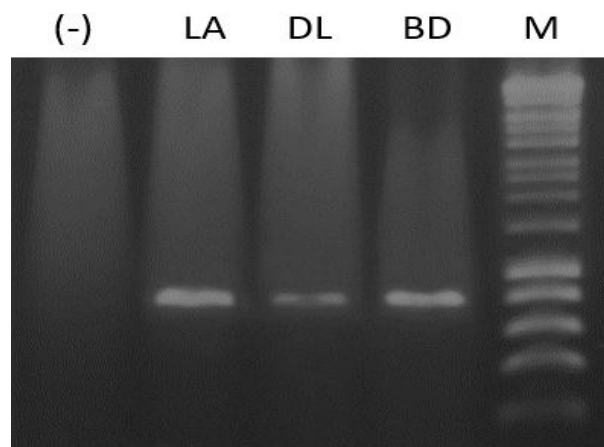
4.2. Kết quả ly trích DNA

DNA các mẫu sau khi ly trích được kiểm tra DNA tổng số thông qua điện di trên Gel Agrose 1% trong 30 phút ở hiệu điện thế 100V. Và được kiểm tra nồng độ thông qua phương pháp đo OD bằng Nano Drop (Thermo, Mỹ), kết quả cho thấy DNA có độ tinh sạch cao nhưng nồng độ thì tương đối thấp với mẫu Đắc Lắc có nồng độ thấp nhất khi đạt 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Tuy nhiên, qua kết quả điện di DNA tổng số cho thấy band tổng số có độ sáng tương đối, không bị đứt gãy và đạt độ tinh sạch cao. Bên cạnh đó, nồng độ DNA các mẫu vẫn phù hợp cho phản ứng PCR với bộ kit của My Taq DNA polymerase (Bioline, Anh) với nồng độ tối thiểu là 5ng.

Bảng 2

Nồng độ các mẫu DNA sau khi ly trích

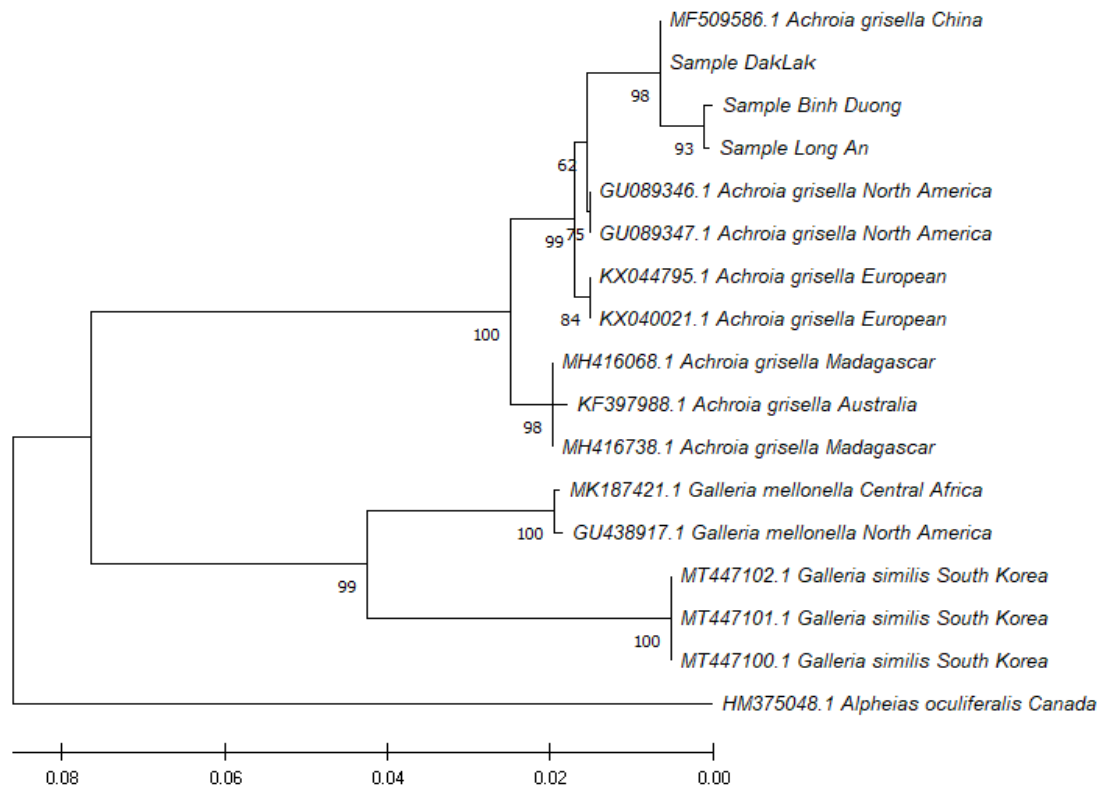
Địa điểm thu mẫu	Nồng độ DNA ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	A260/A280
Long An (LA)	5.9	1.9
Đắc Lắc (DL)	5	2.6
Bình Dương (BD)	8.1	2



Hình 4. Kết quả điện di sản phẩm PCR gen *COI*

Ghi chú: Long An (LA), Đắc Lắc (DL), Bình Dương (BD), M: Thang DNA 1kb

Phản ứng PCR khuếch đại gen *COI* ở côn trùng bộ hai cánh với các mẫu thu thập được kiểm tra bằng phương pháp điện di trên gel Agarose 1% trong 30 phút ở hiệu điện thế 100V. Kết quả cho thấy sản phẩm PCR được khuếch đại rất tốt với sản phẩm là các band đơn, sáng rõ ràng, kích thước 648bp (Hình 4). Và thông qua độ sáng của band cho thấy mẫu Đắc Lắc có nồng độ DNA nạp vào ít hơn so với 02 mẫu còn lại, kết quả này phù hợp với kết quả đo OD và kiểm tra DNA tổng số. Sản phẩm PCR các mẫu sau đó được gửi giải trình tự 02 chiều ở công ty 1st Base (Malaysia). Kết quả này tương đồng với nghiên cứu của Hebert và cộng sự (2004) và cho thấy gen *COI* là một chỉ thị phân tử phù hợp cho định danh các loài côn trùng. Hơn thế, chỉ thị này có thể được dùng như một đối chứng nội nhằm kiểm tra chất lượng DNA sau khi ly trích trong trường hợp không thể định lượng nồng độ mẫu thông qua phương pháp đo OD.



Hình 5. Cây phân nhóm di truyền được xây dựng bằng phương pháp Neighbor-Joining với mô hình Tamura-Nei. Các con số hiển thị trên cây là giá trị bootstrap của 1,000 lần lặp lại

4.3. Kết quả định danh phân tử

Kết quả so sánh trình tự với cơ sở dữ liệu của Genbank (NCBI, Mỹ) bằng công cụ BLAST cho thấy các mẫu bươm sáp thu thập ở Đắc Lắc tương đồng 99.7%, mẫu Long An tương đồng 99.4% và mẫu Bình Dương tương đồng 99.3% với loài *Achroia grisella* (MF509586.1). Kết quả phân nhóm di truyền với một số trình tự tham chiếu cho thấy cả 02 mẫu bươm sáp được thu thập tại tỉnh Đắc Lắc và Bình Dương đều là loài *Achroia grisella* và có mối quan hệ tương đồng gần với loài *A. grisella* phân bố ở Trung Quốc (Hình 5).

Hơn thế, 02 mẫu thu thập ở Bình Dương và Long An có sự phân nhóm so với mẫu thu thập ở Đắc Lắc và mẫu ở Trung Quốc (MF509586.1). Điều này cho thấy loài *A. grisella* ở Việt Nam có nguồn gốc gần gũi với loài này ở Trung Quốc. Kết quả này cho thấy gen *COI* là một chỉ thị hiệu quả giúp định danh côn trùng và có thể cho biết sự sai khác về địa lý dựa vào cây phân nhóm di truyền.

Thông qua các nghiên cứu về hình thái ấu trùng và trưởng thành của loài ngài sáp gây hại ở tổ ong tại 03 tỉnh Long An, Bình Dương và Đắc Lắc có thể xác định đây là loài ngài sáp nhỏ đã được phát hiện ở nhiều nơi trên thế giới. Loài ngài sáp nhỏ ở Việt Nam có kích thước tương tự với các nghiên cứu về loài này ở nhiều nơi trên thế giới. Đồng thời, kết quả nghiên cứu chỉ ra rằng tại các trang trại nuôi ong ở 03 tỉnh của Việt Nam không có sự xuất hiện của ngài sáp lớn (*Galleria mellonella*). Kết quả định danh hình thái nghi ngờ loài ngài sáp nhỏ là *Achroia grisella* mà không phải là loài *Galleria mellonella* phổ biến trên thế giới.

Bên cạnh đó, kết quả định danh phân tử cho thấy loài ngài sáp ở 03 tỉnh Long An, Bình Dương và Đắc Lắc có cùng nguồn gốc với loài *Achroia grisella* phân bố ở Trung Quốc. Và các

mẫu ở Bình Dương và Long An đang có xu hướng xuất hiện nhiều đột biến điểm hơn trong gen *COI* do sự khác biệt về địa lý so với các mẫu được thu thập ở Đắk Lắk. Kết quả này cho thấy gen *COI* là một chỉ thị hữu hiệu trong việc định danh chính xác loài *Achroia grisella*. Đồng thời thông qua cây phân nhóm di truyền được xây dựng từ trình tự của gen này có thể xác định được nguồn gốc của loài *A. grisella*.

5. Kết luận, gợi ý

Nghiên cứu đã cung cấp thêm thông tin về loài gây hại trên tổ ong tại 03 tỉnh Long An, Bình Dương và Đắk Lắk đều là loài *Achroia grisella* và có nguồn gốc gần với loài *A. grisella* phân bố tại Trung Quốc. Đồng thời, nghiên cứu đã cho thấy gen *COI* là một chỉ thị phân tử tiềm năng có thể phát triển trở thành một chỉ thị giúp phát hiện sớm sự hiện diện của *A. grisella* trong tổ ong mật.

LỜI CẢM ƠN

Nhóm nghiên cứu xin chân thành cảm ơn Trường Đại Học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh đã tài trợ kinh phí cho đề tài nghiên cứu khoa học sinh viên, mã số CS-CV21-KHSH-06.

Tài liệu tham khảo

- Avise, J. C., & Walker, D. (1999). Species realities and numbers in sexual vertebrates: Perspectives from an asexually transmitted genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(3), 992-995. doi:10.1073/pnas.96.3.992
- Bombelli, P., Howe, C. J., & Bertocchini, F. (2017). Polyethylene bio-degradation by caterpillars of the wax moth *Galleria mellonella*. *Current Biology*, 27(8), 292-293. doi:10.1016/j.cub.2017.02.060
- Chalup, A., Ayup, M. M., Garzia, A. C. M., Malizia, A., Martin, E., De Cristóbal, R., & Galindo-Cardona, A. (2018). First report of the lesser wax moth *Achroia grisella* F. (Lepidoptera: Pyralidae) consuming polyethylene (silo-bag) in northwestern Argentina. *Journal of Apicultural Research*, 57(4), 569-571. doi:10.1080/00218839.2018.1484614
- Dang, H. H., Do, P. T. M., & Hoang, L. B. (2021). Study on the biological characteristics of waxworms and the application of wax worm to nylon PE waste treatment in international school - Thai Nguyen University. *TNU Journal of Science and Technology*, 226(9), 87-92.
- Egelie, A. A., Mortensen, A. N., Barber, L., Sullivan, J., & Ellis, J. D. (2015). *Achroia grisella* Fabricius (Insecta: Lepidoptera: Pyralidae). Gainesville, FL: University of Florida Press.
- Ellis, J. D., Graham, J. R., & Mortensen, A. (2013). Standard methods for wax moth research. *Journal of Apicultural Research*, 52(1), 1-17. doi:10.3896/IBRA.1.52.1.10
- Giacomucci, L., Raddadi, N., Soccio, M., Lotti, N., & Fava, F. (2019). Polyvinyl chloride biodegradation by *Pseudomonas citronellolis* and *Bacillus flexus*. *New Biotechnology*, 52, 35-41. doi:10.1016/j.nbt.2019.04.005
- Harding, C. R., Schroeder, G. N., Collins, J. W., & Frankel, G. (2013). Use of *Galleria mellonella* as a model organism to study *Legionella pneumophila* infection. *Journal of Visualized Experiments*, 81(50964), 1-10. doi:10.3791/50964

- Hebert, P. D. N., Penton, E. H., Burns, J. M., Janzen, D. H., & Hallwachs, W. (2004). Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astrartes fulgerator*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(41), 14812-14817. doi:10.1073/pnas.0406166101
- Jones, P. H., Prasad, D., Heskins, M., Morgan, M. H., & Guillet, J. E. (1974). Biodegradability of photodegraded polymers. I. Development of experimental procedures. *Environmental Science & Technology*, 8(10), 919-923. doi:10.1021/es60095a010
- Khyade, V. (2018). Review on biodegradation of plastic through waxworm (Order: Lepidoptera; Family: Pyralidae). *International Academic Journal of Economics*, 5(4), 84-91. doi:10.9756/IAJE/V5I1/1810008
- Kundungal, H., Gangarapu, M., Sarangapani, S., Patchaiyappan, A., & Devipriya, S. P. (2019). Efficient biodegradation of polyethylene (HDPE) waste by the plastic-eating lesser waxworm (*Achroia grisella*). *Environmental Science and Pollution Research*, 26(18), 18509-18519. doi:10.1007/s11356-019-05038-9
- Kwadha, C. A., Ong'amo, G. O., Ndegwa, P. N., Raina, S. K., & Fombong, A. T. (2017). The biology and control of the greater wax moth, *Galleria mellonella*. *Insects*, 8(2), Article 61. doi:10.3390/insects8020061
- Mahgoub, M. O., Lau, W., & Omar, D. (2015). Observations on the biology and larval instars discrimination of wax moth *Achroia grisella* F.(Pyralidae: Lepidoptera). *Journal of Entomology*, 12(1), 1-11. doi:10.3923/je.2015.1.11
- Moore, W. S. (1995). Inferring phylogenies from mtDNA variation: Mitochondrial gene trees versus nuclear-gene trees. *Evolution (Lawrence, Kans)*, 49(4), 718-729. doi:10.2307/2410325
- Ramarao, N., Nielsen-Leroux, C., & Lereclus, D. (2012). The insect *Galleria mellonella* as a powerful infection model to investigate bacterial pathogenesis. *Journal of Visualized Experiments*, (70), Article e4392. doi:10.3791/4392
- Ren, L., Men, L., Zhang, Z., Guan, F., Tian, J., Wang, B., ... Zhang, W. (2019). Biodegradation of Polyethylene by Enterobacter sp. D1 from the Guts of Wax Moth *Galleria mellonella*. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16(11), 1941-1951. doi:10.3390/ijerph16111941
- Rezaee, A., Godini, H., Dehestani, S., & Kaviani, S. (2010). Isolation and characterization of a novel denitrifying bacterium with high nitrate removal: *Pseudomonas stutzeri*. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*, 7(4), 313-318.
- Ritter, W., & Akwatanakul, P. (2006). *Honey bee diseases and pest: A practical guide* (Vol. 4). Rome, Italy: Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Roh, S. J., Park, H., Kim, S. H., Kim, S. Y., Choi, Y. S., & Song, J. H. (2020). A new species of *Galleria* Fabricius (Lepidoptera, Pyralidae) from Korea based on molecular and morphological characters. *ZooKeys*, 970(2020), 51-61. doi:10.3897/zookeys.970.54960
- Shimanuki, H., Knox, D., Furgala, B., Caron, D., & Williams, J. (1980). Diseases and pests of honey bees. In *Beekeeping in the United States* (pp. 118-128). Rome, Italy: Food and Agriculture Organization of the United Nations.

- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In *PCR - Protocols and applications - A laboratory manual* (pp. 315-322). New York, CA: Academic Press.
- Williams, J. L. (1997). Insects: Lepidoptera (moths). In *Honey bee pests, predators, and diseases* (pp. 119-142). Washington, D.C.: Agriculture Research Service, United State Department of Agriculture.
- Yang, J., Yang, Y., Wu, W. M., Zhao, J., & Jiang, L. (2014). Evidence of polyethylene biodegradation by bacterial strains from the guts of plastic-eating waxworms. *Environmental Science and Technology*, 48(23), 13776-13784. doi:10.1021/es504038a

