

**ĐẶC ĐIỂM HÌNH THÁI VÀ PHÂN TỬ CỦA LOÀI TUYẾN TRÙNG
STEINERNEMA LONGICAUDUM Shen & Wang, 1991 Ở VIỆT NAM**

**NGUYỄN THỊ DUYÊN, LÊ THỊ MAI LINH,
NGUYỄN GIANG SƠN, NGUYỄN NGỌC CHÂU**

Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật

PHAN KẾ LONG

Bảo tàng Thiên nhiên Việt Nam

Tuyến trùng ký sinh gây bệnh côn trùng (Entomopathogenic nematodes - EPN) thuộc hai giống *Steinernema* và *Heterorhabditis* đã được biết đến từ những năm 1930. Với nhiều ưu thế về khả năng diệt sâu hại nên tuyến trùng EPN đã được thương mại hóa và sử dụng rộng rãi như những chế phẩm phòng trừ sinh học nhiều loài sâu hại ở nhiều nước như Mỹ, Úc, Canada, Trung Quốc, Nhật Bản, Thái Lan... [9].

Ở Việt Nam, nghiên cứu EPN mới chỉ bắt đầu từ năm 1997. Bước đầu tiến hành điều tra, phân lập và nghiên cứu hình thái, phân tử. Đến nay, đã phân lập được hơn 70 chủng tuyến trùng EPN từ các vùng sinh thái khác nhau. Hiện nay, với 11 loài tuyến trùng EPN đã được công bố ở Việt Nam, trong đó có 9 loài thuộc giống *Steinernema* và 2 loài thuộc giống *Heterorhabditis* [9]. Như vậy, sự hiện diện phong phú của các loài tuyến trùng EPN tạo nguồn để tuyển chọn cho phòng trừ sinh học. Qua quá trình điều tra thành phần loài tuyến trùng EPN ở Lai Châu (năm 2007) chúng tôi đã phát hiện một loài mới thuộc giống *Steinernema* chưa gặp ở Việt Nam. Trong nghiên cứu này chúng tôi mô tả đặc điểm hình thái và phân tử DNA của loài tuyến trùng *Steinernema longicaudum* ở Việt Nam và so sánh sự đa dạng của loài này với các quần thể khác trên thế giới.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Phân lập tuyến trùng

Tuyến trùng EPN được phân lập theo kỹ thuật bẫy côn trùng của Bedding & Akhurst [1]: Mẫu đất thu tại Lai Châu. Mỗi mẫu khoảng 1 kg bao gồm 3-5 mẫu nhỏ lấy ngẫu nhiên trong diện tích khoảng 100 m² ở độ sâu 10-20 cm. Đất được trộn đều, chia vào các hộp nhựa 250 ml, thả 5 ấu trùng bướm sáp lớn *Galleria mellonella* và giữ ở nhiệt độ phòng. Kiểm tra sau 48 giờ, ấu trùng bướm sáp chết được chuyển vào đĩa petri, thu ấu trùng cảm nhiễm bằng kỹ thuật White trap [21] sau 7 ngày. Ấu trùng cảm nhiễm được bảo quản ở nhiệt độ 15°C.

2. Nghiên cứu hình thái

Con trưởng thành thế hệ 1, thế hệ 2 và ấu trùng cảm nhiễm được xử lý bằng nhiệt, cố định trong dung dịch Formalin 4% tối thiểu 48h. Sau đó, tuyến trùng được làm trong bằng phương pháp Seinhorst (1959) [16]. Tiêu bản cố định được làm theo phương pháp Cobb (1918) [3]. Tất cả số đo đều sử dụng kính vẽ trên kính hiển vi Olympus CH40.

3. Giải trình tự DNA

DNA tổng số được tách theo phương pháp của Joyce *et al.* (1994) và Reid *et al.* (1997) có cải tiến: Gấp một cá thể cái trưởng thành vào ống eppendorf có chứa 8 µl dung dịch đệm WLB và 10 µl nước. Nghiền mẫu trong 2-3 phút. Thêm 2 µl proteinase K. Giữ ở lạnh ở nhiệt độ 75°C tối thiểu 60 phút. Sau đó ủ nhiệt ở 65°C và ở 95°C trong 10 phút. Bảo quản DNA thu được ở nhiệt độ -20°C.

Nhân vùng ITS-rDNA của tuyến trùng bằng kỹ thuật PCR sử dụng kit thương phẩm PCR Mastermix 2X (Qiagen, German) và ập môi có trình tự: 18S - 5'- GTA CAC ACC GCC CGT CGC TG-3' và 26S- 5'-AAT CCT AGT TAG TTT CTT TTC C -3'. Chu trình nhiệt PCR: 95°C trong 2 phút; 35 chu kỳ: 96°C trong 35 giây, 50°C trong 30 giây và 72°C trong 45 giây; chu kỳ cuối 72°C trong 3 phút. Điện di sản phẩm PCR trên gel agarose 1% và tinh sạch bằng QIA quick Gel Extraction Kit (GmbH Qiagen, Hilden, German). Giải trình tự sản phẩm PCR bằng BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (PE Applied Biosystem, USA) và đọc trình tự bằng máy ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (PE Applied Biosystem, USA).

Đổi chiếu trình tự nucleotit tương ứng giữa các loài dùng phần mềm ClustalW (Thompson *et al.*, 1994). Phần mềm MEGA v5.0 (Tamura K *et al.*, 2011) được dùng để phân tích khoảng cách di truyền và xây dựng cây phát sinh chủng loại.

II. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Chủng tuyến trùng phân lập được, đặt kí hiệu là LC, có những đặc điểm như sau:

1. Đặc điểm hình thái

Ấu trùng cảm nhiễm: Cơ thể được bao bọc bởi lớp vỏ mỏng của ấu trùng tuổi 2, thuận đều về phía đầu và đuôi, hơi cong về phía bụng khi xử lý bằng nhiệt. Đầu tròn không tách biệt với phần thân. Miệng và hậu môn khép kín. Thực quản dài và hẹp, điều hình quả lê, nằm hơi lệch về phía lưng. Vòng thần kinh rõ ràng, nằm ở phần eo thắt. Lỗ bài tiết nằm trước vòng thần kinh. Vùng bên có 9 đường bên. Hemizonid rõ, nằm ngang giữa điều thực quản. Bọc vi khuẩn nằm ở phần trước ruột tiếp giáp với thực quản. Đuôi dài, thẳng, dạng chóp, tận cùng đuôi vuốt nhọn và không có mấu đuôi. Phần hyaline nổi rõ và chiếm khoảng 50% chiều dài đuôi.

Con đực thế hệ 1: Khi xử lý bằng nhiệt cơ thể thường có dạng hình chữ J. Lớp vỏ cutin nhẵn. Đầu tròn và tách biệt rõ ràng với cơ thể. Lỗ bài tiết nằm trước vòng thần kinh, ở đoạn giữa của thực quản. Vòng thần kinh bao quanh isthmus ngay phía trước gốc thực quản. Tuyến sinh dục rõ ràng, tinh hoàn có dạng đơn và gấp khúc về phía bụng. Đôi gai sinh dục cong, thân rộng, đầu tròn, có velum. Gai đệm rộng, đầu hơi cong về phía bụng. Phần sau cơ thể có một nhú đơn lớn và 11 đôi nhú sinh dục phân bố như sau: 5 đôi nằm về phía bụng trước hậu môn; 1 đôi nhú bụng trước hậu môn; 1 đôi nhú bụng sau hậu môn; 3 đôi nhú đuôi phía bụng bên; 1 đôi ở lưng đuôi. Đuôi hình chóp, tận cùng đuôi không có mucron.

Con cái thế hệ 1: Kích thước con cái lớn hơn con đực. Lớp vỏ cutin nhẵn. Đầu tròn, không có ranh giới phân biệt với phần thân. Đỉnh đầu có nhú môi tách biệt với nhau. Thực quản rõ ràng, phần trước thực quản hình trụ, điều hình quả lê. Vòng thần kinh nằm bao quanh phần trên của điều. Lỗ bài tiết nằm trước vòng thần kinh. Hai buồng trứng nằm đối xứng nhau, mỗi buồng trứng đều gấp khúc về phía lưng. Vulva nằm giữa cơ thể và có dạng khe ngang, mép vulva lồi lên bề mặt cơ thể. Bên ngoài mép vulva không có cấu trúc nắp (epiptygma). Vagina ngắn, nằm xiên về phía trước. Đuôi ngắn, hình chóp, chiều dài đuôi ngắn hơn chiều rộng cơ thể tại hậu môn.

Nhận xét: Về hình thái chủng tuyến trùng *Steinernema* LC có nhiều đặc điểm giống với loài *S. longicaudum* được mô tả bởi Shen và Wang (1991) và mô tả lại bởi Stock *et al.* (2001) như: số lượng và vị trí nhú sinh dục của con đực thế hệ 1, hình dạng gai giao cấu và gai đệm; vulva của con cái thế hệ 1 không có cấu trúc nắp (epiptygma), vagina ngắn, nằm xiên về phía trước; Vùng bên của ấu trùng cảm nhiễm có 9 đường bên, mặc dù chiều dài cơ thể ngắn hơn (1032 so với 1043 μm) nhưng chiều rộng cơ thể, chiều dài thực quản, chiều dài vòng thần kinh, chiều rộng cơ thể tại anus không sai khác nhiều. Tuy nhiên, chủng *S.* LC có một số đặc điểm sai khác

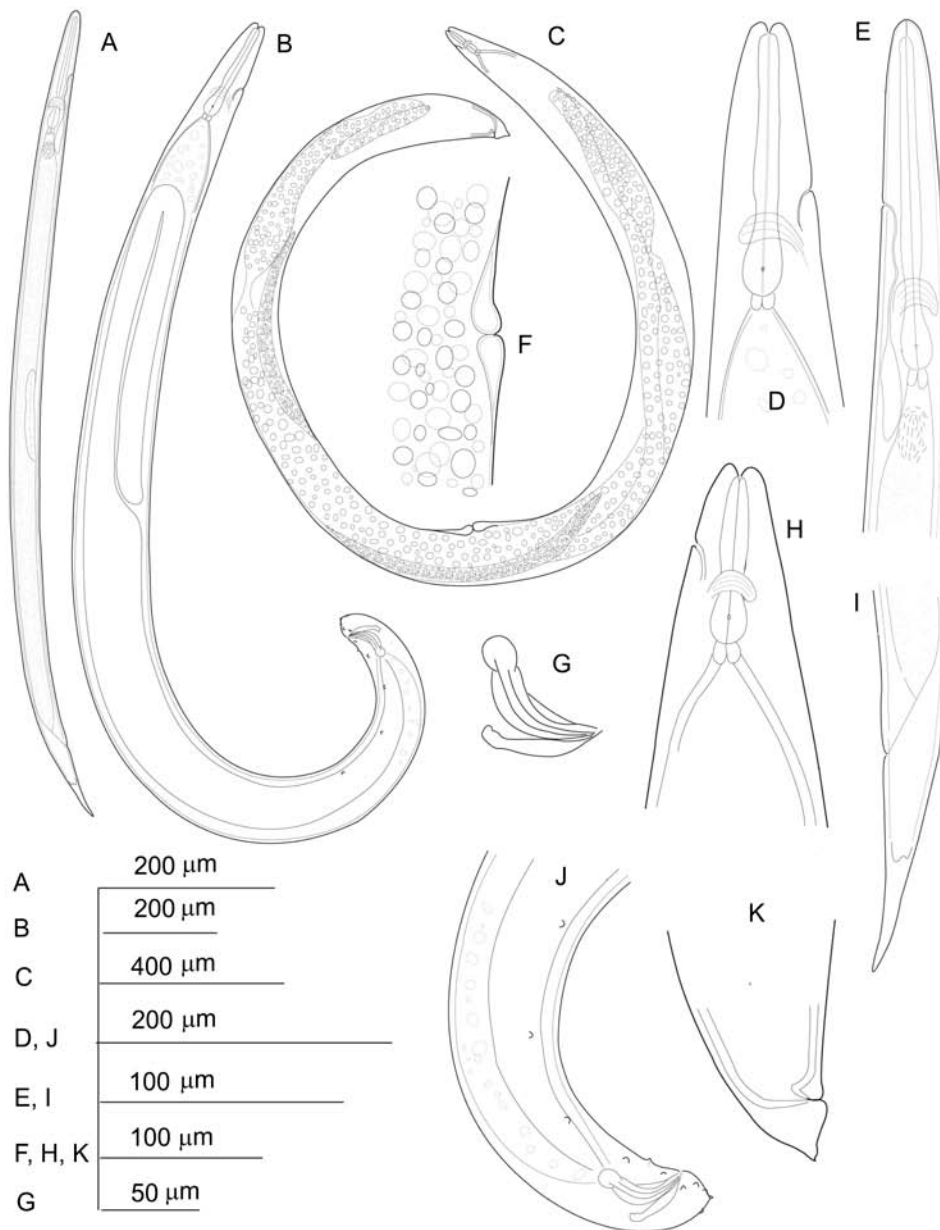
so với loài *S. longicaudum* gốc được mô tả bởi Shen & Wang năm 1991 [18] như: con cái ấu trùng cảm nhiễm ngắn hơn (1032 so với 1063 μm), lỗ bài tiết ngắn hơn (75 so với 83 μm); lỗ bài tiết của con cái thể hệ 1 ngắn hơn (145 so với 162 μm), đuôi ngắn hơn (53 so với 76 μm).

Bảng 1

Các chỉ số đo phân loại của loài *S. longicaudum* LC ở Việt Nam

Các chỉ số đo	Con cái		Con đực		Ấu trùng cảm nhiễm
	Thể hệ 1	Thể hệ 2	Thể hệ 1	Thể hệ 2	
L	7819 \pm 1137 (5602 - 9547)	2624 \pm 231,2 (2314 - 3130)	2212 \pm 140 (1957 - 2527)	1309 \pm 102 (1097 - 1527)	1032 \pm 45 (892 - 1086)
W	394 \pm 48,2 (263 - 481)	165 \pm 18,4 (134 - 206)	148 \pm 15,3 (114 - 176)	83 \pm 13,3 (66 - 119)	37 \pm 2,8 (30 - 42)
EP	145 \pm 27,6 (94 - 192)	89 \pm 14,3 (55 - 121)	138 \pm 10,8 (112 - 160)	102 \pm 10,8 (85 - 123)	75 \pm 3,1 (68 - 81)
NR	162 \pm 16,8 (125 - 195)	122 \pm 12,9 (98 - 148)	144 \pm 12,6 (110 - 162)	121 \pm 7,3 (108 - 135)	111 \pm 7,4 (94 - 127)
ES	228 \pm 17,5 (200 - 262)	169 \pm 9,7 (153 - 189)	183 \pm 13,7 (149 - 206)	162 \pm 10,5 (137 - 179)	143 \pm 7,2 (125 - 156)
ABW	83 \pm 12,5 (56 - 107)	52 \pm 6,5 (40 - 68)	49 \pm 2,4 (44 - 54)	42 \pm 3,7 (36 - 48)	23 \pm 1,1 (20 - 24)
T	53 \pm 12,7 (32 - 85)	63 \pm 11 (45 - 87)	29 \pm 2,3 (21 - 31)	30 \pm 3,9 (23 - 36)	88 \pm 5,3 (75 - 97)
Lst	9,3 \pm 1,3 (7 - 11)	7,7 \pm 0,9 (6 - 9)	5,9 \pm 1,3 (5 - 9)	5,4 \pm 0,9 (4 - 7)	-
Wst	14,3 \pm 1,4 (12 - 17)	11 \pm 1,4 (8 - 15)	9,8 \pm 0,7 (8 - 10)	6,9 \pm 0,7 (6 - 9)	-
H%	-	-	-	-	51 \pm 3,9 (42 - 58)
V%	50 \pm 2,3 (45 - 56)	52 \pm 3,9 (45 - 64)	-	-	-
TES	-	-	417 \pm 83,2 (290 - 624)	290 \pm 76,4 (194 - 441)	-
Lsp	-	-	94 \pm 3,6 (86 - 100)	74 \pm 3,1 (63 - 80)	-
Wsp	-	-	18 \pm 1,6 (14 - 21)	13 \pm 1 (10 - 15)	-
Lgu	-	-	64 \pm 3,6 (57 - 70)	48 \pm 2,6 (43 - 54)	-
Wgu	-	-	9,1 \pm 0,6 (7 - 10)	7,2 \pm 0,5 (6 - 8)	-
a	20 \pm 2,8 (15 - 25)	16 \pm 1,4 (14 - 19)	15 \pm 1,5 (13 - 19)	16 \pm 1,7 (13 - 19)	28 \pm 1,75 (25 - 33)
b	34 \pm 4,9 (27 - 46)	15,7 \pm 2 (14 - 22)	13 \pm 6,7 (10 - 45)	8,1 \pm 0,6 (7 - 10)	7,2 \pm 0,3 (7 - 8)
c	155 \pm 41,3 (92 - 244)	44 \pm 9,5 (27 - 58)	78 \pm 7,2 (68 - 98)	44,1 \pm 5,5 (33 - 55)	11,8 \pm 0,5 (11 - 13)
D%	63 \pm 10,2 (43 - 85)	53 \pm 8,4 (34 - 73)	79 \pm 8,3 (62 - 95)	63,3 \pm 4,9 (53 - 71)	52,4 \pm 2,2 (49 - 57)
E%	282 \pm 37 (206 - 467)	148 \pm 42,6 (78 - 223)	504 \pm 58 (393 - 695)	344,2 \pm 42,3 (271 - 441)	86 \pm 5,1 (76 - 95)

Chú thích: Số đo tính bằng μm .



Hình 1: *Steinernema longicaudum*

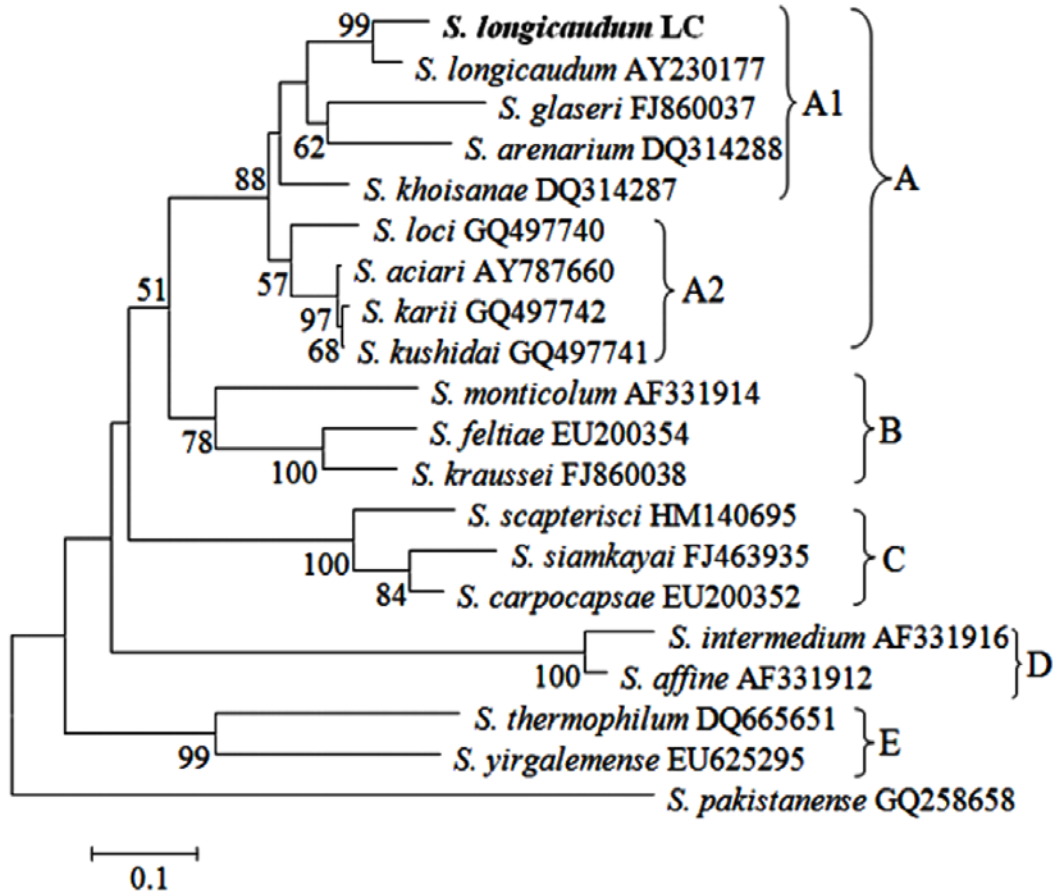
Chú giải: Ấu trùng cảm nhiễm: A - Toàn bộ cơ thể; E - Vùng đầu; I - Vùng đuôi. Con đực thể hệ 1: B - Toàn bộ cơ thể; D - Vùng đầu; J - Vùng đuôi; G - Gai giao cấu và gai đệm. Con cái thể hệ 1: C - Toàn bộ cơ thể; H - Vùng đầu; K - Vùng đuôi; F - Vùng vulva.

2. Đặc điểm phân tử DNA (vùng ITS-rDNA)

Đoạn trình tự ITS-rDNA của chủng tuyến trùng LC có chiều dài 730 bp, thành phần nucleotide như sau: Adenine 24%, Cytosine 18,3%, Guanine 24,8%, Thymine 32,9%. Khảo sát trình tự ITS-rDNA các loài trong giống *Steinernema* ghi nhận sự đa hình rất cao, chỉ số đa dạng nucleotide $\pi = 0,292$.

Trình tự ITS-rDNA của chủng LC và trình tự tương đồng của loài *S. longicaudum* (mã hiệu Genbank AY230177) có sự tương đồng cao tới 98,3%. Trong khi đó, mức độ tương đồng trình tự cao nhất giữa chủng LC và các loài khác trong giống *Steinernema* chỉ khoảng 85 - 93%. Ranh giới khác biệt trình tự ITS-rDNA rõ rệt giữa các loài và mức độ tương đồng trình tự cao trong loài cho phép xếp chủng LC thuộc loài tuyến trùng *S. longicaudum* và phù hợp với định loại theo hình thái.

Sơ đồ cây phát sinh loài (Hình 2) cho thấy sự phân hóa di truyền trong giống *Steinernema* đã hình thành nhiều nhóm tiến hóa nhỏ hơn. Loài *S. pakistanense* mang nhiều khác biệt hơn cả so với các loài còn lại trong giống này, tách khỏi tổ tiên chung của giống *Steinernema* từ khá sớm. Tiếp theo là sự phân rẽ lần lượt của một số loài hình thành nên những nhánh phát sinh riêng: nhóm E (*S. yirgalemense* và *S. thermophilum*), nhóm D (*S. affine* và *S. intermedium*), nhóm C (*S. carpocapsae*, *S. siamkayai*, *S. scapterisci*), nhóm B (*S. kraussei*, *S. feltiae*, *S. monticolum*) và nhóm A. Gốc phát sinh chung của từng nhóm được ủng hộ mạnh mẽ với giá trị bootstrap rất cao.



Hình 2: Cây phát sinh chủng loại Maximum likelihood (LogL = - 5446.23)

Chú giải: Số ở gốc các nhánh là giá trị bootstrap (%). Mô hình phân tích thích hợp được lựa chọn là Hasegawa-Kishino-Yano với phân phối Gamma (BIC = 11172.051, AICc = 10866.793, logL = -5391.227, $\gamma = 0,48$, R = 1,62), bootstrap 1000X.

Hệ số khác biệt di truyền giữa các trình tự

Trình tự	1	2	3	4	5	6	7	8
1. LC	-							
2. <i>S. aciari</i>	0.2513	-						
3. <i>S. kariii</i>	0.2439	0.0238	-					
4. <i>S. kushidai</i>	0.2455	0.0184	0.0078	-				
5. <i>S. loci</i>	0.249	0.1605	0.157	0.157	-			
6. <i>S. khoisanae</i>	0.2498	0.227	0.2256	0.2292	0.2222	-		
7. <i>S. glaceri</i>	0.3059	0.3302	0.3531	0.3521	0.3266	0.3098	-	
8. <i>S. arenarium</i>	0.3015	0.2409	0.2454	0.2451	0.2465	0.2621	0.3143	-
9. AY230177	0.1117	0.2389	0.2339	0.2353	0.215	0.2	0.2721	0.2632

Nhóm A bao gồm nhiều loài có mối liên hệ di truyền gần gũi hơn, hệ số khác biệt di truyền giữa các trình tự trong nhóm A được trình bày trong Bảng 2. Nhóm này bao gồm cả loài *S. longicaudum*, chủng LC phân lập được trong nghiên cứu này. Nhóm A tạo thành 2 phân nhóm: A1 và A2. Loài *S. longicaudum* nằm trong phân nhóm A1 cùng với loài *S. glaceri*, *S. arenarium*, *S. khoisanae*. Phân nhóm A2 có sự phân hóa không đồng đều, loài *S. loci* tách biệt khá rõ, 3 loài còn lại *S. aciari*, *S. kariii*, *S. kushidai* phân tách không nhiều.

III. KẾT LUẬN

Chủng tuyến trùng phân lập từ tỉnh Lai Châu, kí hiệu là LC, được định loại thuộc loài *Steinernema longicaudum* trên cơ sở phân tích các đặc điểm hình thái và di truyền. Hình thái của các quần thể *S. longicaudum* LC ở Việt Nam hoàn toàn phù hợp với mô tả các quần thể của loài này trên thế giới, nhưng có sự đa dạng về số đo của một số chỉ số phân loại.

Đã xác định được đoạn trình tự ITS-rDNA của chủng LC dài 730 bp và có độ tương đồng rất cao với trình tự tương đồng thuộc loài *S. longicaudum* (trên 98%). Phân tích tiến hóa trình tự ITS-rDNA trên đã cung cấp thông tin về quan hệ phát sinh loài trong giống *Steinernema*. Loài *S. longicaudum* có quan hệ di truyền gần gũi với các loài *S. glaceri*, *S. arenarium*, *S. khoisanae*.

Ghi nhận: Công trình được tài trợ kinh phí từ Quỹ Phát triển Khoa học và Công nghệ Quốc gia (NAFOSTED).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bedding R.A., R.J. Akhurst, 1975: *Nematologica*, 21: 109-110.
2. Caroli L. et al., 1996: *Biocontrol Science and Technology*, 6: 227-233.
3. Cobb N.A., 1981: *U. S. Dept. Agri. Agr. Tech. Circular*, 1: 48pp.
4. Dutky S.R. et al., 1974: *Proceedings of the summer Institute on Biological Control of Plant Insects and Diseases*. Jackson, p. 576-590.
5. Homonick W.M. et al., 1997: *Journal of Helminthology*, 71: 271-298.
6. Kaya H.K., S.P. Stock, 1997: *Manual of Techniques in Insect Pathology*. Academic Press, London, p. 281-324.
7. McInerney B.V. et al., 1991: *Journal of Natural Products*, 54: 774-784.

8. **Nguyen K.B., G.C. Smart Jr.**, 1994: *Journal of nematology*, 26: 162-174.
9. **Nguyễn Ngọc Châu**, 2008: Tuyển trùng ký sinh gây bệnh côn trùng ở Việt Nam. NXB. KHTN & CN, Hà Nội, 358 tr.
10. **Phan K.L. et al.**, 2001: *Russian Journal of nematology*, 9: 1-7.
11. **Phan Kế Long và cs.**, 2003: Những vấn đề nghiên cứu cơ bản trong khoa học và sự sống. NXB. KH & KT, Hà Nội, tr. 670-673.
12. **Phan Kế Long và cs.**, 2008: *Tạp chí sinh học*, 30: 12-17.
13. **Phan K.L. et al.**, 2001: *Nematology*, 3: 503-514.
14. **Phan K.L. et al.**, 2005: *BioControl*, p. 477-491.
15. **Poinar G.O. Jr.**, 1976: *Nematologica*, 21: 463-470.
16. **Seinhorst J.W.**, 1959: *Nematological*, 4: 67-69.
17. **Shen C.P., G.H. Wang**, 1992: *Fundamental and Applied Nematology*, 15: 563-573.
18. **Stock et al.**, 2001: *Journal of Helminthology*, 75: 81-92.
19. **Tamura K. et al.**, 2011: MEGA5: Molecular Biology and Evolution (published).
20. **Thompson J.D. et al.**, 1994: CLUSTAL W: *Nucleic Acids Research*, 22: 4673-4680.
21. **White G.F.**, 1927: *Science*, 66: 302-303.

**MOPHORLOGICAL AND MOLECULAR CHARACTERISTICS OF
STEINERNEMA LONGICAUDUM Shen & Wang, 1991 IN VIETNAM**

NGUYEN THI DUYEN, LE THI MAI LINH, NGUYEN GIANG SON,
NGUYEN NGOC CHAU, PHAN KE LONG

SUMMARY

Entomopathogenic nematode (EPN) was used as biological control agent to insect pest in agriculture in many countries. There are 70 EPN strains belonging to 11 species were described in Vietnam. In this research, we described morphological and molecular characteristics of *Steinernema longicaudum* strain LC, which was isolated from Lai Chau province recently. This is the first recored *S. longicaudum* in Vietnam. Many characteristics of *S. longicaudum* in Vietnam are similar to original *S. longicaudum*, which was described by Shen & Wang (1991) and re-described by Stock *et al.* (2001) *e.g.*: number and arranged of papillae, spicules and gubernaculum of the first generation male; female first generation: vulva has not epiptygma, vagina is short, sloping forward; body length, esophagus, nerve ring, body width at anus of the infective stage juvenile. Only few mophometrics data are different to original specimen *eg.* smaller body length. The composition of ITS-rDNA sequence is 98% similar between the strain *S. longicaudum* LC with the original sequence of *S. longicaudum* (AY230177). The phylogeny of ITS-rDNA sequences of *S. longicaudum* LC with related *Steinernema* species showed that *S. longicaudum* belongs subgroup with closest species *viz S. glaceri, S. arenarium, S. khoisanae.*