

**ĐẶC ĐIỂM HÌNH THÁI VÀ PHÂN TỬ LOÀI TUYẾN TRÙNG
PRATYLENCHUS ZEAЕ GRAHAM, 1951 KÝ SINH CÂY CÀ RỐT Ở
ĐÔNG ANH, HÀ NỘI**

**Nguyễn Thị Duyên^{1,2}, Lê Thị Mai Linh^{1,2},
Nguyễn Hữu Tiền¹, Trịnh Quang Pháp^{1,2}**

¹*Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật,
Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam*
²*Học viện Khoa học và Công nghệ,
Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam*

Tuyến trùng gây tổn thương rễ thuộc giống *Pratylenchus* là nhóm tuyến trùng đa thực phân bố rộng khắp trên thế giới (Castillo & Vovlas, 2007). Trong số đó, loài *Pratylenchus zeaе* gây hại nghiêm trọng trên một số loại cây trồng ở các nước nhiệt đới và cận nhiệt đới (Castillo & Vovlas, 2007). Ở Việt Nam, *P. zeaе* phân bố phổ biến ở các tỉnh miền Bắc, miền Trung và Tây Nguyên và ký sinh trên nhiều loại cây trồng khác nhau như: dưa, chè, cam, chuối, thuốc lá, hồ tiêu, cà phê, mía, thông, lúa, khoai lang, lạc, hành, tỏi, củ cải, cải bắp, đậu, cà chua, xúp lơ, cà rốt,... (N. N. Châu & N. V. Thanh, 2000). Một số nghiên cứu cơ bản về hình thái loài *P. zeaе* phân lập ở Việt Nam đã được công bố nhưng chưa có dữ liệu phân tử về loài này (N. N. Châu & N. V. Thanh, 2000).

Với số lượng lớn loài *Pratylenchus* đã phát hiện trên thế giới (trên 70 loài), phân loại tuyến trùng thuộc giống *Pratylenchus* gặp nhiều khó khăn do sự biến đổi một số đặc điểm hình thái trong cùng một loài hoặc giữa các loài gần gũi, đặc biệt đối với nhóm loài có 3 vòng đầu, túi chứa tinh không có tinh trùng và không có con đực hoặc ít gặp, gồm có: *P. zeaе*, *P. parazeaе*, *P. elamini*, *P. japonicus*, *P. mulchandi*, *P. subranjani*. Castillo & Vovlas (2007) đã cung cấp các đặc điểm hình thái chi tiết và các dữ liệu phân tử vùng gen nhân ITS và D2D3 mở rộng vùng 28S rDNA để phục vụ phân loại những loài gần gũi (Castillo & Vovlas, 2007). Trong nghiên cứu này, chúng tôi cung cấp dẫn liệu về hình thái, hình thái lượng và phân tử của quần thể loài tuyến trùng *P. zeaе* ký sinh trên cây cà rốt ở Đông Anh - Hà Nội, so sánh với một số quần thể *P. zeaе* và các loài gần gũi của giống *Pratylenchus* ở Việt Nam.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Thu mẫu đất và mẫu rễ: Tiến hành thu mẫu đất và mẫu rễ ở những cây có biểu hiện vàng lá, còi cọc kém phát triển. Mẫu đất và rễ được thu ở độ sâu từ 15-20 cm xung quanh cây cà rốt. Tuyến trùng được tách lọc từ các mẫu đất theo phương pháp Baermann cải tiến và rễ theo phương pháp xay nghiền được mô tả trong Nguyễn Ngọc Châu (2003). Quần thể tuyến trùng *Pratylenchus zeaе* (P.4854) thu tại vùng trồng cà rốt (Đông Anh, Hà Nội) được thực hiện trong nghiên cứu này.

Xử lý và làm tiêu bản cố định: Tuyến trùng sau khi tách lọc được giết nhiệt và cố định, bảo quản bằng dung dịch TAF (Nguyễn Ngọc Châu 2003). Sau đó, xử lý làm trong và làm tiêu bản cố định theo phương pháp của Nguyễn Ngọc Châu (2003).

Phân loại tuyến trùng: Tuyến trùng được phân loại dựa trên các tài liệu của Nguyễn Ngọc Châu & Nguyễn Vũ Thanh (2000) và Castillo & Vovlas (2007).

Khuếch đại vùng gen D2D3, ITS-rDNA: DNA tổng số được tách chiết theo phương pháp của Subbotin et al. (2006) và khuếch đại vùng gen D2D3 bằng cặp mồi D2A và D3B (Subbotin et al. 2006); vùng gen ITS bằng cặp mồi VRAIN 2F và VRAIN 2R (Vrain et al. 1992). Chu

trình PCR được thực hiện với các bước nhiệt: 95°C trong 2 phút, 35 chu kỳ của 96°C/ 35 giây, 50°C/30 giây, 72°C/45 giây và kết thúc ở 72°C/3 phút. Sau khi phản ứng kết thúc điện di sản phẩm PCR trên gel agarose 1% để kiểm tra, phần còn lại bảo quản ở -20°C. Các sản phẩm PCR được tinh sạch bằng QIA quick Gel Extraction Kit (GmbH Qiagen, Hilden, Germany) và gửi đọc trình tự tại công ty Macrogen- Hàn Quốc.

Phân tích số liệu: Sử dụng chương trình BLAST để tìm kiếm các trình tự tương đồng đã được công bố trên ngân hàng DNA (Genbank). So sánh sự khác nhau về vị trí nucleotit giữa các cặp loài dùng phần mềm ClustalW trên Bioedit 7.2.0. Phân tích khoảng cách di truyền và xây dựng cây phát sinh chủng loại theo các phương pháp Minimum Likelihood (ML) mô hình TN93+G, phân tích giá trị bootstrap với 1000 mẫu lặp được thực hiện trên phần mềm MEGA 6.0 (Tamura et al. 2013).

II. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

1. Đặc điểm hình thái của loài tuyến trùng *Pratylenchus zaeae*

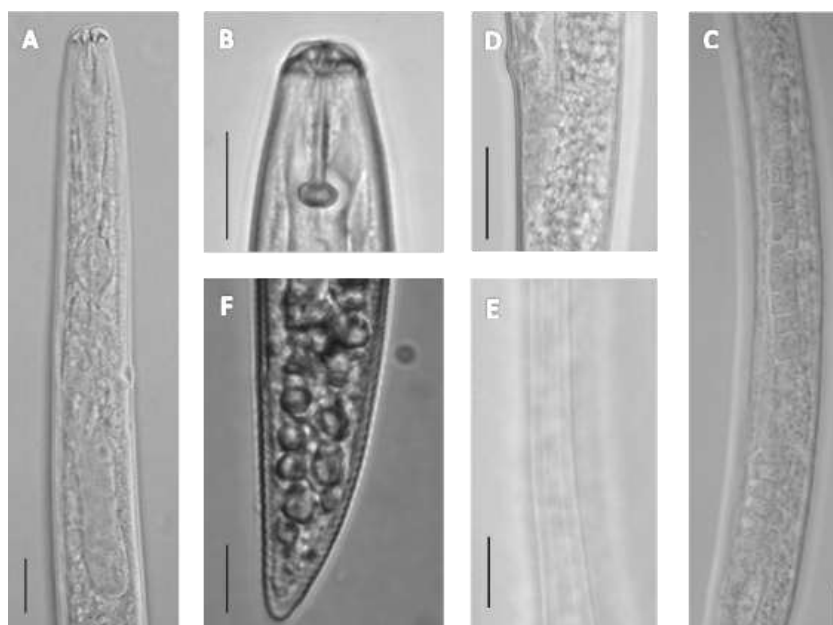
Các đặc điểm hình thái, số đo (bảng 1) của quần thể tuyến trùng *Pratylenchus zaeae* (P.4854) trên cà rốt phân lập ở Đông Anh - Hà Nội hoàn toàn phù hợp với mô tả gốc và những nghiên cứu trước đó của Graham (1951), Taylor & Jenkins (1957), Doucet & Cagnolo (1998). Ma trận mã theo Castillo & Vovlas (2007): A2, B2, C3, D1, E1, F5, G3, H3, I2, J1, K1. (A: số vòng đầu; B: có đực hay không; C: chiều dài kim hút; D: hình dạng túi chứa tinh; E: vị trí vulva; F: chiều dài từ cung sau; G: hình dạng đuôi con cái; H: hình dạng nút đuôi con cái; I: chiều dài thực quản tuyến; J: số lượng đường bên tại vị trí vulva; K: cấu trúc đường bên ở vị trí vulva).

Con cái: Cơ thể thẳng hoặc hơi cong về phía bụng khi cố định bằng nhiệt. Vùng đầu gồm 3 vòng cutin, cao 2,2-3 µm, rộng 6,5-8,4 µm. Kim hút kitin hoá mạnh dài 14-15,8 µm, gốc kim hút tròn. Phần procorpus rộng và thắt lại ở trước điều giữa. Vòng thần kinh bao quanh isthmus. Lỗ bài tiết mở ra ngay sau vị trí của hemizonid. Van thực quản - ruột ở phía trước hoặc phía sau lỗ bài tiết. Thực quản tuyến phủ về phía bụng dài 29-41 µm. Vùng bên có 4 đường bên. Từ cung trước kéo dài về phía trước, không kéo dài đến thực quản, có 2 hàng noãn bào, trừ hai đến ba noãn bào cuối xếp thành 1 hàng. Túi chứa tinh không phát triển, hình tròn, nhỏ, không chứa tinh trùng. Vị trí của vulva cao, tỷ lệ khoảng cách từ đầu đến vulva/chiều dài cơ thể bằng 69-74%. Từ cung sau ngắn, chiều dài từ cung sau bằng 1-1,5 lần chiều rộng cơ thể tại vulval. Đuôi hình chóp, nút đuôi nhẵn, thường có 21-26 vòng cutin ở mặt bụng. Phần hyaline ngắn (1,3-2,3 µm) và hẹp (2,5-3,6 µm).

Con đực: Chưa gặp.

Cây chủ: *Pratylenchus zaeae* được mô tả đầu tiên trên ngô (*Zea mays*) tại Florence, South Carolina, USA. Ở Việt Nam đã được ghi nhận trên đậu tương, bông, cà phê, mía, đào, lúa, lạc, cà chua, khoai tây,... *Pratylenchus zaeae* đã được ghi nhận trên cà rốt ở Lâm Đồng, Hải Dương và tiếp tục được ghi nhận ở Đông Anh (N. N. Châu và N. V. Thanh, 2000, N. T. Duyên và cs, 2016).

Ghi chú: Những đặc điểm của quần thể *P. zaeae* trên cà rốt có chỉ số c' nhỏ hơn một quần thể khác đã ghi nhận trước đó trên thế giới (Castillo & Vovlas, 2007). Những đặc điểm chi tiết được sử dụng trong phân loại giữa loài *P. zaeae* với các loài gần gũi khác như: hình dạng đuôi và nút đuôi, đường bên tại vị trí vulva, chiều dài thực quản tuyến khác với loài *P. parazeae*; hình dạng gốc kim hút, kích thước gốc kim hút khác với loài *P. subranjani* và *P. japonicus*.



Hình 1: Ảnh chụp kính hiển vi của con cái loài *P. zae* phân lập ở Đông Anh A: Vùng thực quản; B: Phần kim hút; C: Tử cung trước; D: Tử cung sau; E: Đường bên; F: Đuôi (Thước đo = 10 μ m).

Bảng 1

Số đo con cái quần thể tuyến trùng *Pratylenchus zae* ký sinh trên cây cà rốt ở Đông Anh - Hà Nội (P.4854) và một số nghiên cứu trước đó (Số đo theo μ m)

Chỉ số đo	P. 4854	Graham, 1951	Taylor & Jenkins, 1957	Doucet & Cagnolo, 1998
N	20		90	15
L	491,5 \pm 26 (450-537)	540 (360-580)	520 (410-640)	500 (400-500)
A	22 \pm 1,3 (20,4-25)	27 (25-30)	21,1 (17-25,4)	29,2 (25,3-35)
B	6,2 \pm 0,3 (5,5-6,8)	6,5 (5,4-8)	6,3 (5-9,6)	6,5 (5,5-7,4)
b'	4,3 \pm 0,1 (4-4,5)	-	-	4,1 (3,5-5)
C	18 \pm 1,5 (14,8-20,5)	15,2 (17-21)	17,3 (11,2-24,1)	17,6 (15,3-19,8)
c'	2 \pm 0,2 (1,7-2,5)	-	-	-
V	71,5 \pm 1,3 (68,8-74,2)	71 (68-76)	71 (65-75)	72 (70-79)
Chiều dài kim hút	14,6 \pm 0,5 (14-15,8)	15,5 (15-17)	15-17	15 (14-16)
Chiều cao gốc kim hút	2,3 \pm 0,4 (1,5-3)	-	-	-
Chiều rộng gốc kim hút	4,3 \pm 0,4 (3,6-5,2)	-	-	-
DGO	2,5 \pm 0,2 (2-3)	-	-	-
Chiều rộng đầu	7,2 \pm 0,5 (6,5-8,4)	-	-	-
Chiều cao đầu	2,6 \pm 0,2 (2,2-3)	-	-	-
Chiều rộng điều giữa	8,6 \pm 0,5 (7,7-9,5)	-	-	-
Chiều dài điều giữa	11 \pm 0,7 (9,5-12,2)	-	-	-
Chiều dài từ đầu đến điều giữa	49,7 \pm 2,4 (44,7-52,7)	-	-	-
Chiều dài từ đầu đến vòng thân kinh	61,3 \pm 3,6 (54-66,7)	-	-	-
Chiều dài từ đầu đến van thực quản-ruột	79 \pm 4 (70,6-85,6)	-	-	-
Chiều dài từ đầu đến vị trí lỗ bài tiết	75,7 \pm 3,6 (68-82,6)	-	-	-

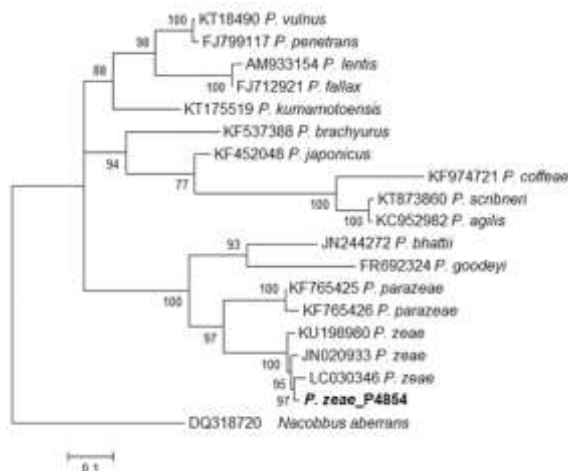
Chiều dài từ đầu đến hết thực quản tuyến	115,2±5 (105,5-122)	-	-	-
Chiều dài thực quản tuyến	36,2±3,5 (29,4-41)	-	-	-
Chiều rộng cơ thể	22,4±2 (18-25)	-	-	-
Chiều dài từ cung trước	156±19 (117,3-189)	-	-	-
Chiều rộng túi chứa tinh	9,8±1,2 (8-12)	-	-	-
Chiều dài túi chứa tinh	10,8±2 (7,7-13,3)	-	-	-
Chiều dài từ vulval đến túi chứa tinh	45,8±5 (39,4-56,6)	-	-	-
Chiều rộng cơ thể tại vulval	21,3±1,6 (17,8-23,6)	-	-	-
Chiều dài từ cung sau	27±3,6 (20,6-35)	-	-	-
Chiều rộng cơ thể tại anus	13±1 (11,3-14,6)	-	-	-
Chiều dài đuôi	27,7±2,7 (22,6-34)	-	-	-
Chiều dài hyalin	1,8±0,3 (1,3-2)	-	-	-
Chiều rộng hyalin	3±0,3 (2,5-3,6)	-	-	-
Số vòng đuôi	23±1,7 (21-26)	-	-	-

2. Đặc điểm phân tử

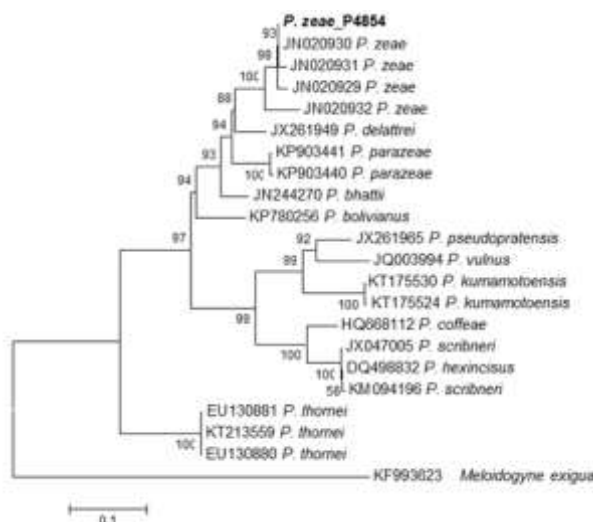
Kết quả đọc trình tự vùng gen ITS của quần thể tuyến trùng *P. zae* P.4854 thu được đoạn gen với chiều dài 884 bp (%T = 24,7; %C = 21,7; %A= 27,5; %G= 26,1). Đối chiếu với các trình tự tương đồng trên genbank cho thấy quần thể tuyến trùng *P. zae* P.4854 có sự tương đồng đối với các loài thuộc giống *Pratylenchus* từ 90-96%, tương đồng cao nhất đối với loài *P. zae* (KU198980; JN020933; LC030346). Phân tích vùng gen ITS cho thấy sự biến đổi nucleotide giữa các cá thể trong loài *P. zae* từ 3-6%. Biến đổi nucleotide giữa các loài khác nhau từ 6-28%. Phân tích trình tự của các loài thuộc giống *Pratylenchus* thấy sự biến đổi nucleotide trong cùng một loài và giữa các loài là khá lớn, cụ thể trong cùng loài *P. parazeae* (KF765426 và KF765425) khác nhau 39 nucleotide, giữa *P. zae* và *P. parazeae* khác nhau 219 nucleotide. Trình tự của mẫu *P. zae* P.4854 khác biệt 30 nucleotide so với trình tự LC030346 của loài *P. zae* và 216 nucleotide so với loài *P. parazeae* (KF765425).

Trình tự đoạn gen D2/D3 của quần thể *P. zae* P.4854 với chiều dài 682 bp (%T = 21,3 ; %C = 23,8; %A = 20,3; %G = 34,6) tương đồng 99% với trình tự của loài *P. zae* (JN020929, JN020930, JN020931, JN020932). Với vùng gen D2D3, sự biến đổi nucleotide trong cùng một loài tương đối thấp: 0-5% đối với nhóm loài *P. zae*, 5-9% đối với nhóm loài *P. parazeae* và từ 10-22% với các loài khác. Các nghiên cứu trước đây đã chỉ ra rằng vùng gen D2D3 thích hợp để phân tích phát sinh loài giữa các loài trong giống *Pratylenchus*. Sự biến đổi di truyền của vùng D2D3 giữa các loài thuộc giống *Pratylenchus* là đáng kể, các trình tự của loài *P. parazeae* (KP903441) và loài *P. bhattii* (JN244270) khác nhau 75 vị trí nucleotide, trình tự loài *P. parazeae* (KP903441) và loài *P. zae* (JN020930) khác nhau 70 nucleotide. Tuy nhiên, sự khác nhau của các mẫu trong cùng một loài không đáng kể, trình tự KP903441 và KP903440 của loài *P. parazeae* chỉ khác nhau 06 vị trí nucleotide, các trình tự của loài *P. zae* (JN020929, JN020930, JN020931, JN020932) khác nhau 52 vị trí.

Phân tích cây phát sinh chủng loại vùng gen ITS (hình 2) cho thấy cây được chia ra làm 3 nhánh chính trong đó quần thể loài *P. zae* P.4854 thuộc nhánh thứ 3 bao gồm các loài *P. parazeae*, *P. zae*, *P. goodeyi*, *P. bhattii* với giá trị bootstrap là 100%, trình tự loài *P. zae* P.4854 cùng nhánh với tất cả các quần thể của loài *P. zae* và tách biệt khỏi các loài khác. Cây phát sinh chủng loại vùng gen D2/D3 cho kết quả tương tự với trình tự loài *P. zae* P.4854 được nhóm chung với tất cả các quần thể của loài *P. zae* và tách biệt khỏi các quần thể của loài khác (hình 3).



Hình 2: Cây phát sinh chủng loại dựa trên vùng gen ITS-rDNA xây dựng theo phương pháp Maximum Likelihood (mô hình HKY+G+I), số ở các gốc là giá trị bootstrap (%)



Hình 3: Cây phát sinh chủng loại dựa vào vùng gen D2D3 (28S-rDNA) xây dựng theo phương pháp Maximum Likelihood (mô hình HKY+G+I) số ở các gốc là giá trị bootstrap (%)

III. KẾT LUẬN

Chủng tuyến trùng *P.4854* ký sinh trên cây cà rốt ở Đông Anh - Hà Nội có đặc điểm hình thái, hình thái lượng và phân tử tương đồng nhất với các quần thể thuộc loài *P. zeae*.

Loài *P. zeae* ký sinh trên cây cà rốt ở Đông Anh-Hà Nội đặc trưng bởi vùng đầu có 3 vòng cutin, vùng bên có 4 đường bên vị trí vulva chiếm 69-74% chiều dài cơ thể, túi chứa tinh hình tròn, nhỏ, không chứa tinh trùng, chiều dài từ cung sau bằng 1-1,5 lần chiều rộng cơ thể tại vulva, đuôi hình chóp, tận cùng mấu đuôi nhẵn, phần hyaline ngắn.

Vùng gen ITS của quần thể *P. zeae P.4854* có chiều dài 884 bp, tương đồng cao nhất (96%) với các trình tự (KU198980 ; JN020933; LC030346) của loài *P. zeae*.

Vùng gen D2D3 của quần thể *P. zeae P.4854* có chiều dài 682 bp, tương đồng cao nhất (99%) với các trình tự (JN020929, JN020930, JN020931, JN020932) của loài *P. zeae*.

Lời cảm ơn: Bài báo được hỗ trợ về kinh phí của Đề tài cơ sở mã số IEBR.DT.04/16-17.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Castillo P., Vovlas V.**, 2007. *Pratylenchus (Nematoda: Pratylenchidae):* Diagnosis, Biology, Pathogenicity and Management. Brill Leiden-Boston, 528 pp.
2. **Doucet M. E. & Cagnolo S.**, 1998. Variabilidad intra e inter-específica de caracteres morfológicos en poblaciones del orden Tylenchida (Nematoda) provenientes de Argentina. *Nematologia Mediterranea*, 26: 231-236.
3. **Graham T. W.**, 1951. *Nematode root rot of tobacco and other plants.* Bulletin 390. South Carolina Agricultural Experiment Station, Clemson Agricultural College, 25 pp.
4. **Nguyễn Ngọc Châu**, 2003. *Tuyển trùng thực vật và cơ sở phòng trừ.* Nxb.Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội, 301 trang.
5. **Nguyễn Ngọc Châu, Nguyễn Vũ Thanh**, 2000. *Tuyển trùng ký sinh thực vật ở Việt Nam. Động vật chí Việt Nam 4.* Nxb.Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội, 400 trang.
6. **Nguyễn Thị Duyên, Lê Thị Mai Linh, Nguyễn Hữu Tiên, Trịnh Quang Pháp**, 2016. Bước đầu điều tra thành phần loài tuyển trùng ký sinh gây hại trên cà rốt ở Hải Dương. *Tạp chí sinh học*, Số 38(1). 6-13.
7. **Subbotin S. A., Sturhan D., Chizhov V. N., Vovlas N., & Baldwin J. G.**, 2006. Phylogenetic analysis of Tylenchida Thorne, 1949 as inferred from D2 and D3 expansion fragments of the 28S rRNA gene sequences. *Nematology*, 8(3), 455–474.
8. **Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A. & Kumar S.**, 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30: 2725-2729.
9. **Taylor D. P. & Jenkins W. R.**, 1957. Variation within the nematode genus *Pratylenchus*, with the descriptions of *P. hexincisus* n. sp. and *P. subpenetrans* n. sp. *Nematologica*, 2: 159-174.
10. **Vrain T. C., Wakarchuk D. A., Levesque A. C., Hamilton R. I.**, 1992. Intraspecific rDNA restriction fragment length polymorphism in the *Xiphinema americanum* group. *Fundamental and Applied Nematology*, 15(6), 563-573.

MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR CHARACTERISTICS OF *PRATYLENCHUS ZEA* GRAHAM, 1951 ISOLATED FROM CARROTS IN DONG ANH, HANOI

Nguyen Thi Duyen, Le Thi Mai Linh, Nguyen Huu Tien, Trinh Quang Phap

SUMMARY

The morphological, morphometric and molecular characteristics of the population *Pratylenchus zae* P.4854 which parasites carrots in Dong Anh (Hanoi) were analysed. It resembled other populations of the species *Pratylenchus zae*. The samples collected from carrots in Dong Anh district is characterised by: labial region with three annuli, lateral fields with four lines, vulva at 68-76% of body length, spermatheca round, small, without sperm, post-vulval uterine sac short, 1-1.5 vulval body diam., tail conoid, tail tip smooth, hyaline short. Molecularly, ITS region and D2D3 region of *P. zae* P.4854 were 884bp and 682 bp in length, respectively. They showed highest similarities (96-99%) to the sequences of *P. zae* (ITS2: KU198980; JN020933; LC030346 and D2D3 region: JN020929, JN020930, JN020931, JN020932).