

ÁP DỤNG CÁC KỸ THUẬT DNA ĐỂ PHÂN LOẠI HAI GIỐNG TUYẾN TRÙNG *STEINERNEMA* TRAVASSOS, 1927 VÀ *HETERORHABDITIS* POINAR, 1975 Ở VIỆT NAM

NGUYỄN NGỌC CHÂU, PHAN KẾ LONG

Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật

Các đặc trưng phân tử DNA, đặc biệt vùng phiên mã ITS-rDNA, đã trở thành công cụ đặc lực trong việc định loại tuyến trùng nói chung và tuyến trùng ký sinh gây bệnh cho côn trùng (entomopathogenic nematodes = epn) thuộc 2 giống *Steinernema* và *Heterorhabditis* nói riêng. Đặc trưng phân tử DNA không những cho phép phân biệt cấp độ phân loại của các taxon tuyến trùng mà còn chỉ ra mối quan hệ họ hàng và khả năng phát sinh của chúng.

Các loài tuyến trùng epn thuộc 2 giống *Steinernema* và *Heterorhabditis* là các loài ký sinh bắt buộc và gây bệnh cho côn trùng. Đây là nhóm tuyến trùng có triển vọng rất lớn trong phòng trừ sinh học sâu hại. Hiện nay, trên thế giới đã phát hiện khoảng 30 loài thuộc giống *Steinernema* và 8 loài thuộc giống *Heterorhabditis*. Tuy nhiên, việc định loại hình thái các loài của 2 giống tuyến trùng này rất khó khăn do chúng có hình dạng, kích thước của giai đoạn trưởng thành khá giống nhau giữa các loài, nhưng lại rất khác nhau giữa các thế hệ ngay trong cùng một loài. Mỗi loài tuyến trùng ký sinh trên nhiều vật chủ côn trùng khác nhau và trên mỗi vật chủ, chúng có thể phát triển từ 2-3 thế hệ, phụ thuộc vào vật chủ. Vì vậy, đối với nhóm tuyến trùng này, đặc trưng phân tử DNA được coi là một chỉ tiêu quan trọng để mô tả một loài mới [2]. Nhờ kỹ thuật DNA, số loài valid giảm đáng kể, hàng chục loài hình thái trước đây nay trở thành loài synonym.

Ở Việt Nam, tuyến trùng epn là một trong những nhóm động vật đầu tiên được áp dụng kỹ thuật sinh học phân tử để phân loại. Từ năm 1997 đến nay, đã tiến hành điều tra, thu mẫu từ

các vùng sinh thái tự nhiên, chủ yếu là sinh cảnh rừng nguyên sinh tại 42 tỉnh. Kết quả đã phân lập được gần 50 chủng (isolates) epn [5, 6]. Tất cả các chủng này được duy trì nhân nuôi bằng kỹ thuật *in vivo* trên bướm sáp lớn (*Galleria mellonella* Lin, 1758). Trên cơ sở phân tích DNA, đã xác định thành công 7 loài epn, trong đó 5 loài thuộc giống *Steinernema* và 2 loài thuộc giống *Heterorhabditis*. Trong số này, có 4 loài mới cho khoa học thuộc giống *Steinernema* là *S. tami* Phan et al, 2000; *S. sangi* Phan et al., 2001a; *S. loci* Phan et al., 2001b và *S. thanhi* Phan et al., 2001b đã được công bố [6, 7, 8] và được đăng ký bản quyền tại Ngân hàng gen (GenBank). Bài báo này tổng quan một số thành tựu áp dụng kỹ thuật phân tử DNA trong định loại tuyến trùng epn ở Việt Nam.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Phân lập tuyến trùng

Các chủng tuyến trùng epn được phân lập từ đất theo phương pháp bẫy của Bedding & Akhurst [1]. Sử dụng ấu trùng tuổi 4 của bướm sáp lớn (BSL) làm côn trùng bẫy. Thu thập tuyến trùng từ BSL theo phương pháp bẫy nước của White [13]. Sau khi xác định chủng tuyến trùng epn, tiến hành nhiễm trở lại để thu con cái trưởng thành và ấu trùng thuần chủng (tinh sạch) phục vụ cho các phân tích.

Nghiên cứu này được tiến hành trên 4 chủng epn, trong đó 3 chủng thuộc giống *Steinernema* là S-TK10, S-TG10, S-TX1 và 1 chủng thuộc giống *Heterorhabditis* là H-MP11. Các chủng epn được phân lập trong thời gian từ

Công trình được hỗ trợ về kinh phí của Chương trình nghiên cứu cơ bản.

1997-1999. Các phân tích đa hình chiều dài các đoạn đặc thù (RFLP) và trình tự (sequencing) được tiến hành tại Trung tâm nghiên cứu nông nghiệp Merelbeke (CLO), Vương quốc Bỉ. Ngoài ra, 3 chủng S-TK10, S-TG10 và H-MP11 cũng đã được phân tích trình tự gen tại Viện Công nghệ sinh học và sau đó đã được kiểm tra tại CLO.

2. Tách chiết và nhân đoạn DNA cho phân tích RFLP

Quy trình tách chiết và nhân đoạn DNA cho phân tích RFLP được tiến hành theo Joyce et al. [2] và Reid et al. [9] gồm các bước sau đây:

Tách chiết DNA: đối với mỗi isolat (chủng phân lập theo địa điểm), gắp một cá thể cái trưởng thành từ nguồn nhân nuôi tinh sạch vào 1 ống eppendorf nhỏ đã tiệt trùng, có chứa sẵn 8µl dung dịch đệm WLB (worm lysis buffer, gồm 500 mM KCl; 100 mM Tris-Cl pH = 8,3; 1,5 mM MgCl₂; 10 mM DTT; 4,5% Tween 20% gelatin). Cho thêm 10 µl nước cất 2 lần (ddw) và 2 µl proteinaza K (600 µl/ml). Nghiền mẫu tuyến trùng bằng máy nghiền rung (vibro mixer) trong vòng 2-3 phút. Làm lạnh đến -80°C trong ít nhất 60 phút, sau đó ủ ở nhiệt độ 65°C trong 60 phút và tiếp tục 95°C trong 10 phút trên máy PCR. Ly tâm 1 phút ở 13.000 vòng/phút. Lấy 5 µl dịch tuyến trùng để chuẩn bị hỗn hợp PCR, còn lại bảo quản ở -80°C. Có thể dùng một dao mổ loại nhỏ để cắt tuyến trùng (đặt sẵn trên lam lõm có chứa 10 µl ddw) thành nhiều mảnh dưới kính hiển vi soi nổi thay cho công đoạn xay nghiền; sau đó dùng pipet hút 5 µl có chứa các mảnh tuyến trùng vào ống eppendorf, thêm 8µl dung dịch đệm và 2 µl proteinaza K; ủ như trên sau khi để lạnh -80°C trong ít nhất 60 phút.

Phản ứng trùng hợp (PCR): chuẩn bị hỗn hợp cho PCR bao gồm 10 µl dịch tuyến trùng, 4 µl 10x PCR buffer, 1 µl MgCl₂ (25 mM), 1µl hỗn hợp dNTP (10 mM), 0,2µl (500 nM) mỗi mỗi, 1,5U Taq polymeraza và 33,3 µl ddw để có được khối lượng đủ 50 µl cho mỗi mẫu. Hai đoạn môi được sử dụng trong phản ứng PCR là Vrain2 18S (> 5'-CTTTGTACACACCGCCGCTCGCT-3') và Vrain2 26S (>5'- TTTC- ACTCGCCGTTACTAAGGGAATC-3') [11].

Chu trình nhiệt cho phản ứng PCR được lập trình trên máy PCR như sau: 92°C trong 2 phút,

35 chu kỳ ở 92°C trong 30 giây, tái tiếp ở 54°C trong 30 giây và trùng hợp (polymerization) ở 72°C trong 2 phút và 72°C trong 10 phút sau khi đã kết thúc 35 chu kỳ trên. Sau khi PCR kết thúc, lấy 5 µl dung dịch PCR-DNA thêm 2 µl dung dịch đệm điện di (loading buffer), chạy điện di trên gel 1% agarosa và 0,003% ethidium bromit (0,02 µg/ml) ở điện thế 100 V trong thời gian 1 giờ. Kiểm tra kết quả của phản ứng PCR-DNA và chụp ảnh dưới đèn cực tím.

Phân tích RFLP: mỗi mẫu PCR-DNA sử dụng 5 µl sản phẩm PCR cho phân giải với một trong số 17 enzym đặc thù (endoenzyme) sau: Alu I, Mva I, Dde I, EcoR I, Hae III, Cfo I, Hind III, Hinf I, Msp I, Kpn I, Pst I, Pvu II, Rsa I, Sal I, Nde II, BsiI I và Xba I. Sử dụng tủ định ôn bằng nước (water-incubator) cho phản ứng cắt đoạn DNA ở 37°C trong 24 giờ. Các bước tiếp theo là chạy điện di, kiểm tra và chụp ảnh RFLP, sau đó như mô tả ở phần trên.

Các kết quả RFLP được so sánh với cơ sở dữ liệu RFLP của EPN được lưu trữ tại Viện Kỹ sinh trùng học quốc tế ở Vương quốc Anh.

Các sản phẩm PCR-DNA được gắn vào vectơ pBluescript KS (-). Sau đó, plasmid tái tổ hợp được biến nạp vào chủng *E.Coli* DH5a. Tách chiết DNA plasmid và các kỹ thuật DNA tái tổ hợp được tiến hành theo Sambrook et al. [10]. Trình tự gen được đọc trên máy ALF express và được xử lý bằng chương trình PC/GEN.

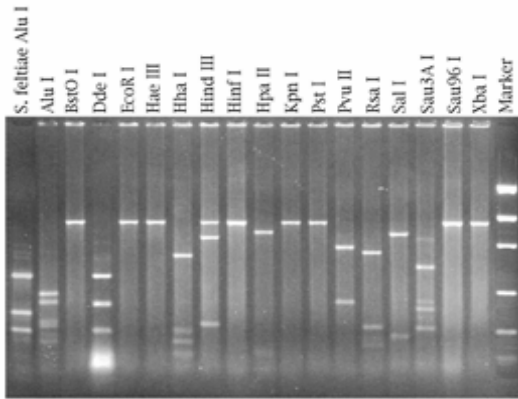
II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Phân tích RFLP-rDNA

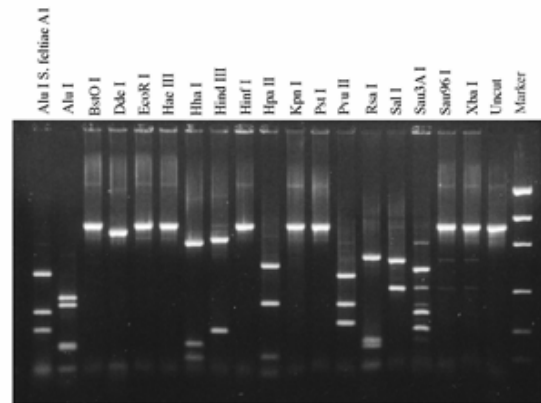
Về mặt hình thái, 3 chủng tuyến trùng S-TK10, S-TG10 và S-TX1 rất gần nhau về kích thước của cả cá thể đực và cá thể cái cũng như cấu trúc của spicule và gubernaculum ở con đực. Chúng chỉ khác nhau ở chiều dài của cơ thể, chiều dài của đuôi và vị trí của lỗ bài tiết ở ấu trùng cảm nhiễm. Tuy nhiên, một trong những khác biệt quan trọng giữa 3 chủng này là về mặt sinh thái và sinh học: đó là sự khác xa nhau về sinh cảnh nơi phát hiện. Chủng S-TK10 được phân lập từ sinh cảnh bãi cát ven biển, chủng S-TG10 được phát hiện từ sinh cảnh vườn nhà trong khi chủng S-TX1 được phân lập từ sinh cảnh rừng nguyên sinh. Cả 3

địa điểm phát hiện cách xa nhau về kinh, vĩ tuyến. Thêm vào đó, khả năng nhiễm và sinh

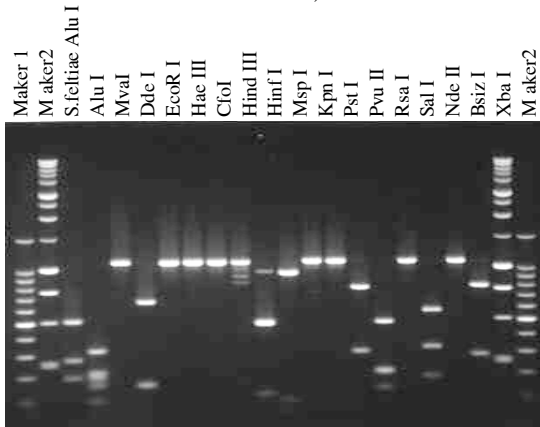
sản của chúng trên ấu trùng của BSL và một số sâu hại khác là khá khác biệt.



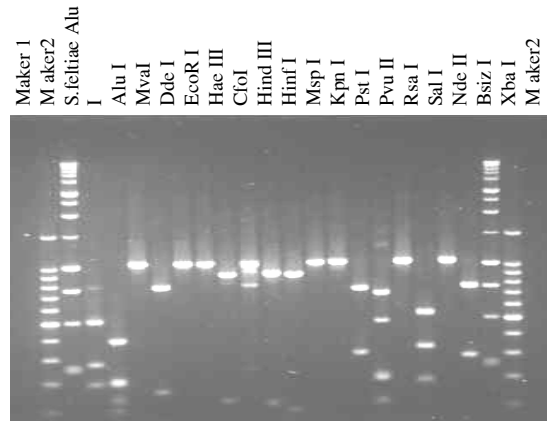
Steinernema arenarium (Artyukhovskiy, 1967)
Wouts et al., 1982



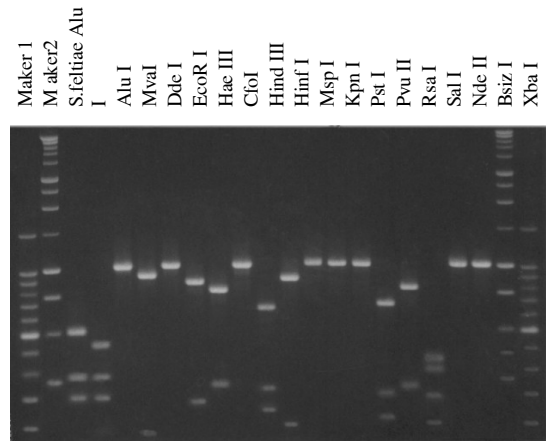
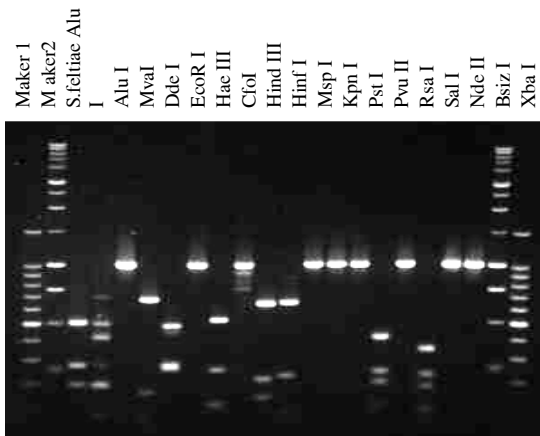
Steinernema glaseri (Steiner, 1929)
Wouts et al., 1982



Steinernema loci Phan et al, 2001



Steinernema thanhi Phan et al, 2001



Steinernema kraussei (Steiner, 1923)
Travassos, 1927

Hình 1. Mẫu vạch RFLP của 3 loài mới *Steinernema sangi*, *S. loci* và *S. thanhi* từ Việt Nam so với 3 loài *S. arenarium*, *S. glaseri* và *S. kraussei*

Kết quả phân tích đa hình chiều dài của các đoạn DNA đặc thù của vùng ITS-rDNA của 3 chủng tuyến trùng S-TK10, S-TG10 và S-TX1 của Việt Nam so sánh với mẫu PCR-RFLP được lưu trữ tại Viện Ký sinh trùng học quốc tế tại Anh (IIP-CABI) của 3 loài gần gũi khác là *Steinernema arenarium* (Artyukhovsky, 1967) Wouts, Mracek, Gerdin & Bedding, 1982, *S. glaseri* (Steiner, 1929) Wouts, Mracek, Gerdin & Bedding, 1982 và *S. kraussei* (Steiner, 1923) Travassos, 1927 cho thấy: mẫu vạch của 3 chủng *Steinernema* đều khác biệt với mẫu vạch của 3 loài đã biết trên đây (hình 1). Sự khác biệt này thể hiện rất rõ về số vạch điện di thu được và kích thước (bp) của các đoạn DNA đặc thù.

Đặc biệt, về mặt hình thái, có thể coi 3 loài *Steinernema* của Việt Nam rất gần với loài *S. kraussei*, và có thể xếp các loài này vào nhóm loài lớn. Tuy nhiên, so sánh kết quả điện di các

mẫu ITS-rDNA giữa 3 chủng epn của Việt Nam với mẫu vạch của loài *S. kraussei*, có sự sai khác rất rõ bởi có ít nhất 6 vết RFLP khác nhau hoàn toàn (xem bảng). Chúng khác nhau không những về số lượng của đoạn giới hạn được cắt mà còn khác nhau bởi độ dài của các đoạn DNA. 6 mẫu vạch RFLP sai khác này được cắt đoạn bởi 7 enzym là *Alu I*, *Dde I*, *Cfo I*, *Hinf I*, *Msp I*, *Rsa I*, *Nde II*. Trong số các enzym còn lại, có 5 enzym không có khả năng tiêu hóa DNA là *Mva I*, *Hind III*, *Kpn I* và *Pst* và 5 enzym khác cho kết quả phân cắt tương đồng, cho thấy các loài/chủng epn của Việt Nam thuộc nhóm loài *S. kraussei*.

Kết quả phân tích PCR-RFLP trên đây được coi là một trong những căn cứ quan trọng và đáng tin cậy để phân biệt và mô tả 3 loài tuyến trùng mới từ Việt Nam là *Steinernema sangi* (chủng S-TX1), *S. loci* (chủng S-TK10) và *S. thanhi* (chủng S-TG10).

Bảng

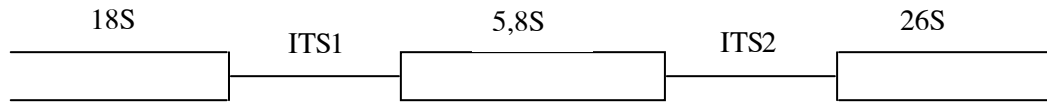
Kích thước đoạn ITS-rDNA của 3 chủng *Steinernema* của Việt Nam được cắt bởi 17 enzym đặc thù so với loài *S. kraussei*

Enzym	<i>S. sangi</i> (S-TX1)	<i>S. loci</i> (S-TK10)	<i>S. thanhi</i> (S-TG10)	<i>S. kraussei</i>
<i>Alu I</i>	700, 280, 80, 500, 400, 160	320, 210, 200, 180, 100, 40	400, 200, 200, 150, 120	450, 280, 200, 120
<i>Mva I</i>	1050	1050	1050	1050
<i>Dde I</i>	700, 155, 50	680, 180, 60 (3 bands)	750, 180, 60, 60	950, 100
<i>EcoR I</i>	500, 480, 260, 260, 280, 280	1050	1050	1050
<i>Hae III</i>	1050	1050	1050	880, 170
<i>Cfo I</i>	510, 270, 140, 140	1050	910, 140	820, 230
<i>Hind III</i>	1050	1050	1050	1050
<i>Hinf I</i>	650, 250, 170	525, 525, 900, 150	920, 130	700, 230, 120
<i>Msp I</i>	650, 260, 150	900, 150	920, 120	950, 100
<i>Kpn I</i>	1050	1050	1050	1050
<i>Pst</i>	1050	1050	1050	1050
<i>Pvu II</i>	1050	800, 250	750, 300	1050
<i>Rsa I</i>	420, 260, 240, 140	500, 220, 180, 180	700, 500, 250, 230, 150	700, 210, 140
<i>Sal I</i>	1050	1050	1050	810, 240
<i>Nde II</i>	370, 230, 180, 180, 100	550, 310, 200	550, 350, 180	390, 320, 210, 130
<i>Bsz I</i>	1050	1050	1050	1050
<i>Xba I</i>	1050	800, 280	750, 300	1050

2. Phân tích trình tự của đoạn gen 18S rDNA

Đã sử dụng 3 chủng epn, trong đó 2 chủng thuộc giống *Steinernema* S-TK10, S-TG10 và 1 chủng thuộc giống *Heterorhabditis* H-MP11 cho phân tích trình tự một phần của đoạn gen 18S rDNA. Đoạn 18S rDNA nằm trước vùng

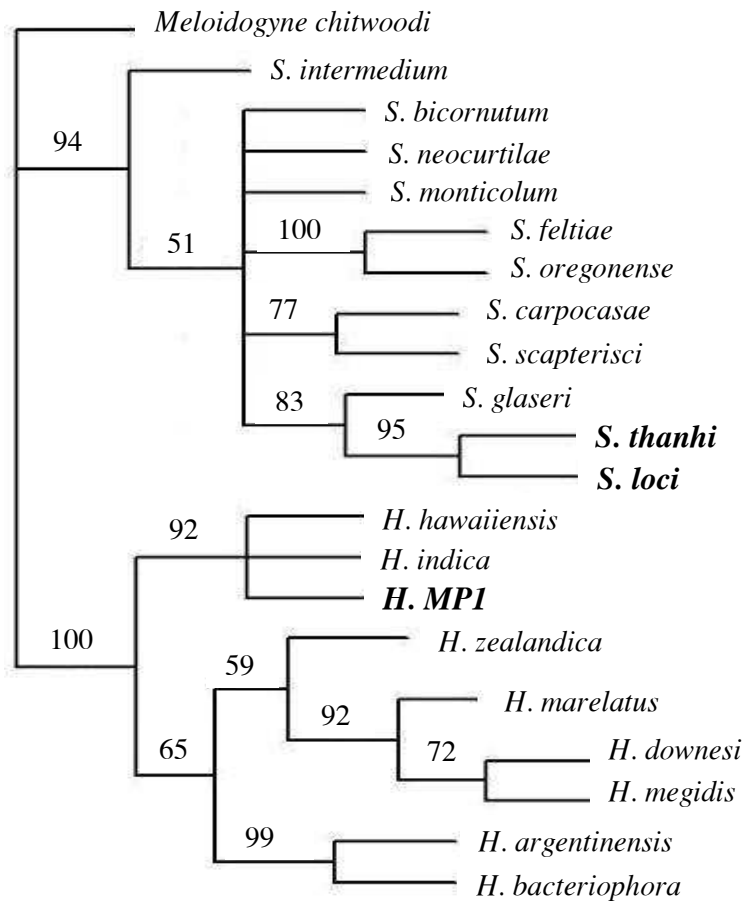
phiên mã (Internal Transcribed Spacer-ITS) như ở hình 2. Đây là vùng chứa các gen có tính năng bảo tồn di truyền cao nên rất có lợi cho các phân tích trình tự để đánh giá và so sánh đặc trưng sai khác về mặt di truyền giữa các loài và cũng để xác định chủng loại phát sinh của chúng [6].



Hình 2. Sơ đồ vùng phiên mã rDNA

Các đoạn gen (sequence) của vùng 18S rDNA được căn chỉnh (alignment) bằng Chromas 1.45 và sắp xếp bằng chương trình ClustalX 1.64 cùng với đoạn gen 18S rDNA

của các loài khác thuộc 2 giống *Steinernema* và *Heterorhabditis* thu thập từ GenBank và phân tích bằng chương trình PAUP (4.0 beta version) [11].



Hình 3. Mối quan hệ di truyền của *S. loci*, *S. thanhi* và *H. MP1* tại Việt Nam với 11 loài thuộc giống *Steinernema* và 9 loài thuộc giống *Heterorhabditis* bằng kết quả so sánh trình tự của đoạn gen 18S-rDNA

So sánh kết quả phân tích trình tự của đoạn 18S rDNA của hai loài *S. thanhi* và *S. loci* cùng với 11 loài thuộc giống *Steinernema* đã biết cho thấy các loài này rất gần nhau (95%) và có quan hệ kiểu “chị em” với loài *S. glaseri* (Steiner, 1929) Wouts, Mracek, Gerdin & Bedding, 1982 (hình 3). Kết quả phân tích trình tự này cũng phù hợp với nghiên cứu về hình thái và phân tích PCR-RFLP trên đây.

Về mặt hình thái, loài mới *Heterorhabditis* sp. nov. (chủng H-MP11) của Việt Nam rất giống với 2 loài đã được phát hiện trước đây ở khu vực châu Á-Thái Bình Dương là *Heterorhabditis indica* Poinar, Karunakar & David 1992 và *Heterorhabditis hawaiiensis* Gardner, Stock & Kaya, 1994. Tuy nhiên, kết quả phân tích đoạn gen 18S-rDNA cho thấy, mặc dù cùng mức tương đồng và cùng một nhóm nhưng loài *Heterorhabditis* (chủng H-MP11) của Việt Nam là loài riêng biệt (hình 3). Tuy vậy, để có đủ cơ sở kết luận đây là loài mới, cần phân tích trình tự của toàn bộ vùng ITS (ITS1+ITS2) hoặc ND4 của cả 3 loài này vì khi so sánh những đoạn gen dài như vậy, sẽ thấy rõ sự sai khác đặc thù hơn và cho kết quả sẽ chuẩn xác hơn.

Kết quả so sánh trình tự của đoạn gen 18S rDNA cho phép xây dựng cây chủng loại phát sinh thể hiện mối quan hệ di truyền của *S. loci*, *S. thanhi* và H. MP11 tại Việt Nam với 11 loài thuộc giống *Steinernema* và 9 loài thuộc giống *Heterorhabditis*. Sơ đồ phát sinh này cũng cho thấy sự khác biệt về quan hệ di truyền của các loài epn thuộc 2 giống *Steinernema* và *Heterorhabditis* so với loài *Meloidogyne chitwoodi* Golden, O' Bannon, Santo & Finley, 1980.

III. KẾT LUẬN

Lần đầu tiên ở Việt Nam, các kỹ thuật phân tử DNA (PCR-RFLP và Sequencing) đã được áp dụng thành công để phân loại nhóm tuyến trùng epn. Đây là một trong những nhóm tuyến trùng quan trọng nhưng cũng rất khó phân loại về mặt hình thái, vì hầu hết các loài trong nhóm này vừa mang tính đồng hình cao ở giai đoạn trưởng thành ở cùng một thể hệ nhưng chúng cũng rất dị hình ở các thế hệ khác nhau trong cùng một loài.

Trên cơ sở nghiên cứu hình thái và đặc trưng phân tử DNA, đã xác định 3 loài tuyến trùng epn của Việt Nam là *Steinernema sangi*, *S. loci* và *S. thanhi*. Sự sai khác DNA là cơ sở vững chắc cho phân loại tuyến trùng, đặc biệt đối với các nhóm vừa biểu hiện đồng hình vừa dị hình ở các pha phát triển khác nhau như nhóm epn.

Kết quả phân tích DNA, không những cho phép định loại chính xác loài tuyến trùng mà bước đầu cũng đã chỉ ra quan hệ tiến hóa về mặt di truyền của 3 loài tuyến trùng ở Việt Nam (*S. loci*, *S. thanhi* và *Heterorhabditis* sp.) với các loài epn khác trên thế giới.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Bedding R. A. & Akhust R. J.**, 1975: *Nematologica*, 21: 109-110.
2. **Hominick W. M. et al.**, 1997: *J. Helminthology*, 71: 271-298.
3. **Joyce S. A. et al.**, 1994: *Proceeding of Symposium & Workshop: 178-187*. St. Patrick's College, Maynooth, Co. Kildare, Ireland (A.M. Ehlers & J.P. Masson. Eds.) Luxemboug.
4. **Nguyễn Đăng Tôn và cs.**, 2000: Những vấn đề nghiên cứu cơ bản trong sinh học. Báo cáo khoa học Hội nghị sinh học toàn quốc: 163-167. Nxb. Đại học quốc gia Hà Nội.
5. **Nguyễn Ngọc Châu, Nguyễn Vũ Thanh**, 1997: *Tạp chí Sinh học*, 19(4): 24-29.
6. **Nguyễn Ngọc Châu và cs.**, 1999: *Tạp chí Sinh học*, 21(2B): 90-95.
7. **Pham V. Luc et al.**, 2000: *Russian Journal of Nematology*, 8(1): 33-43
8. **Phan K. Long, Nguyen N. Chau & Moens M.**, 2001: *Russian Journal of Nematology*, 1.9(1): 1-7.
9. **Phan K. Long, Nguyen N. Chau & Moens M.**, 2001: *Nematology*, 3(6): 503-514.
10. **Reid A. P., Hominick W. M., Briscoe B. R.**, 1997: *Systematic Parasitology*, 37: 187-193.
11. **Sambrook J., Fristch E. F. & Maniatis T.**, 1989: In: Forsol N., Nolan C., Ferguson M. & Ockler M.(Eds.). *Molecular cloning*, a

- laboratory manual: 66-67. New York, USA, Cold Spring Harbor laboratory Press.
12. **Swofford D. L.**, 1998: PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony. Version 4. Sinauer, Sunderland, MA, 128 pp.
13. **Vrain T. C. et al.**, 1992: *Fundamental and Applied Nematology*, 15: 536-574.
14. **White G. F.**, 1927: *Science*, 66: 302-303.

APPLICATION OF DNA TECHNIQUES FOR THE IDENTIFICATION OF TWO ENTOMOPATHOGENIC NEMATODE GENERA *STEINERNEMA* AND *HETERORHABDITIS* FROM VIETNAM

NGUYEN NGOC CHAU, PHAN KE LONG

SUMMARY

Entomopathogenic nematodes (epn), e.g. *Steinernema* Travassos, 1927 and *Heterorhabditis* Poinar, 1975 belong to one of the most important groups among biological agents. Their morphological identification to species level is very difficult. Since they are often homomorphic in the adult stage of the first generation, but they are strongly polymorphic and variable among different generations that are usually occurred even in the same species. Therefore, the molecular techniques have become useful tools for the identification and taxonomy of these nematodes.

The DNA techniques such as polymerise chain reaction (PCR), restriction fragment length polymorphism (RFLP) and sequencing have been employed for the molecular characterization of entomopathogenic nematode isolates collected from Vietnam. Based on the morphological diagnoses, morphometrics and genetic analyses of 18S-rDNA of collected isolates from Vietnam were revealed 7 species of two genera *Steinernema* and *Heterorhabditis* so far. Of these, four species viz. *Steinernema tami* Pham et al., 2000, *S. sangi* Phan et al., 2001, *S. loci* Phan et al., 2001, and *S. thanhi* Phan et al., 2001 were described as new species for science.

The results of the rDNA digestion with seventeen endoenzymes, e.g. *Alu* I, *Mva* I, *Dde* I, *EcoR* I, *Hae* III, *Cfo* I, *Hind* III, *Hinf* I, *Msp* I, *Kpn* I, *Pst*, *Pvu* II, *Rsa* I, *Sal* I, *Nde* II, *Bsiz* I and *Xba* I RFLP shown a significant difference in RFLP pattern between three isolates S-TK10, S-TG10, S-TX1 and that of *S. Kraussei* (Steiner, 1923) Travassos, 1927. Apparently, the complete differences which were occurred in six RFLP patterns digested by seven enzymes *Alu* I, *Dde* I, *Cfo* I, *Hinf* I, *Msp* I, *Rsa* I, *Nde* II. were not only by the band number but are also by the size (bp) of the DNA fragment lengths, inspite of five other enzymes were not digested any more. These might be documented the genetic similarly within the *S. kraussei* group. Along with some morphological characters and morphometrics, these genetic characterizations were strongly support to reveal three new species of three correspondent isolates.

Based on the sequencing of 18S according ITS (Internal Transcribed Spacer) of DNA ribosome, the paper gives also the phylogenic tree that shown the related relationship and degree of genetic distance of species among each genus of *Steinernema* and *Heterorhabditis* and that were also significantly distinguished to *Meloidogyne chitwoodi* Golden, O' Bannon, Santo & Finley, 1980.

Ngày nhận bài: 1-10-2004