

## ĐẶC ĐIỂM HÌNH THÁI VÀ PHÂN TỬ CỦA LOÀI TUYẾN TRÙNG *Steinernema siamkayai* KÝ SINH GÂY BỆNH CÔN TRÙNG Ở VIỆT NAM

Nguyễn Như Trang, Nguyễn Ngọc Châu\*

Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật, Viện Hàn lâm KH & CN Việt Nam,  
\*nguyengochau.iebr@gmail.com

**TÓM TẮT:** Chúng tuyến trùng ký sinh gây bệnh côn trùng S-DL13 thuộc loài *Steinernema siamkayai* được phân lập từ đất cà phê Đắk Lắk là ghi nhận đầu tiên cho Việt Nam. Về hình thái, con đực đặc trưng với 11 đôi nhú sinh dục và 1 nhú đơn phân bố ở trước và sau huyệt sinh dục; con cái có bờ vulva nhô cao và đôi nắp vulva (epitygma) nằm đối xứng ở bờ trước và sau vulva. Ấu trùng cảm nhiễm thuộc nhóm "cappocapsae" với kích thước nhỏ hơn 600 µm; có 7 đường ở vùng bên. Mặc dù có một vài sai khác nhỏ về kích thước con đực, cái so với mô tả gốc nhưng kết quả phân tích đặc trưng phân tử vùng ITS.rDNA cho thấy chúng tuyến trùng S-DL13 của Việt Nam và chúng tuyến trùng ở Thái Lan có cùng vị trí trên cây phát sinh của loài *Steinernema siamkayai*.

**Từ khóa:** *Steinernema siamkayai*, chủng S-DL13, đặc trưng hình thái và phân tử, tuyến trùng ký sinh gây bệnh côn trùng, Đắk Lắk, Việt Nam.

### MỞ ĐẦU

Tuyến trùng ký sinh gây bệnh cho côn trùng (EPN) thực chất là những tổ hợp cộng sinh giữa các loài tuyến trùng ký sinh thuộc giống *Steinernema* (họ Steinernematidae) và *Heterorhabditis* (họ Heterorhabditidae) và các loài vi khuẩn gây bệnh giống *Xenorhabdus* và *Photorhabdus* (họ Enterobacteriaceae). Trong đó, tuyến trùng đóng vai trò vừa là ký sinh lại là những vector mang truyền vi khuẩn gây bệnh. Chính vì vậy mà nhóm tuyến trùng này trở thành tác nhân sinh học có nhiều ưu thế trong biện pháp sinh học phòng chống sâu hại như phổ diệt sâu hại rộng, diệt sâu nhanh, có khả năng tự sản sinh tăng số lượng sau khi đã giết chết sâu hại và có thể sản xuất sinh khối lớn bằng công nghệ sinh học thích hợp *in vivo* và *in vitro* với các qui mô khác nhau [6].

Tuyến trùng ký sinh gây bệnh côn trùng đã được nghiên cứu ứng dụng rộng rãi và thương mại hóa ở nhiều nước nông nghiệp phát triển [1]. Ở Việt Nam, mặc dù nghiên cứu tuyến trùng EPN đã được triển khai từ vài thập niên gần đây và đã đạt được một số thành tựu đáng kể trong việc điều tra phân loại và nghiên cứu, tuyến chọn các chủng tuyến trùng có tiềm năng sinh học đưa vào sản xuất sinh khối và ứng dụng vào thực tiễn trong phòng trừ sinh học sâu hại [2]. Tuy nhiên, cho đến nay hầu hết các chủng, loài tuyến trùng EPN đã được phân lập chủ yếu từ

các hệ sinh thái tự nhiên mà rất ít trong hệ sinh thái nông nghiệp. Vì vậy, việc điều tra, phân lập nhóm tuyến trùng này trong các hệ sinh thái nông nghiệp, đặc biệt đối với hệ sinh thái nông nghiệp Tây Nguyên là rất cần thiết. Bài báo này cung cấp dẫn liệu về đặc điểm hình thái và phân tử của chủng tuyến trùng S-DL13 thuộc loài tuyến trùng *Steinernema siamkayai* Stock, Somsook & Reid, 1998 được phân lập từ hệ sinh thái nông nghiệp Tây Nguyên.

### VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

#### Mẫu vật tuyến trùng

Đã tiến hành phân lập tuyến trùng ký sinh gây bệnh côn trùng (EPN) từ 394 mẫu đất thu tại các vùng cà phê chính ở 5 tỉnh Tây Nguyên (Kon Tum, Gia Lai, Đắk Lắk, Đắk Nông và Lâm Đồng) trong 2 năm 2012-2013. Các mẫu tuyến trùng sống và tiêu bản tuyến trùng được lưu giữ tại Phòng Tuyến trùng học, Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật.

#### Các phương pháp nghiên cứu

Tuyến trùng EPN được phân lập từ các mẫu đất theo phương pháp côn trùng bẫy (insect baiting trap) với ấu trùng bướm sáp lớn (BSL), *Galleria mellonella*. Quy trình xử lý tuyến trùng cho phân tích hình thái được thực hiện theo Seinhorst (1959) [14]. Ảnh tuyến trùng được chụp qua kính hiển vi OLYMPUS BX51. Kích

thước và hình thái tuyến trùng được đo và vẽ dưới kính hiển vi OLYMPUS CH40. Các chỉ số hình thái lượng được kiểm tra theo Hunt (2007) [9] và Nguyễn Ngọc Châu (2008) [2].

Các kỹ thuật chuẩn loại phân tử theo Joyce et al. (1994) [10] và Reid et al. (1997) [13], gồm các bước: Tách DNA tổng số với một cá thể trưởng thành. Nhân đoạn DNA bằng kỹ thuật PCR vùng gen ITS với cặp mồi 5'-GCT TGT CTC AAA GAT TAA GCC-3' và 5'-TGA TCC C GCAGG TTCAC-3' (Holterman et al. (2009) [8]. Chu trình nhiệt cho phản ứng PCR gồm: Biến tính ban đầu ở 95°C trong 115"; Biến tính ở 96°C trong 35", lặp lại 35 kỳ; nung ủ ở 50°C trong 30", lặp lại 35 kỳ; kéo dài ở 72°C trong 45", lặp lại 35 kỳ; kết thúc ở 72°C trong 180". Tinh sạch sản phẩm PCR bằng kit MinElute của hãng QIAGEN. Sản phẩm sau tinh sạch được đọc kết quả trên máy phân tích trình tự tự động ABI 3100 Avant Genetic Analyzer. Sử dụng chương

trình BLAST để đánh giá các trình tự tương đồng đã được các tác giả khác công bố trên ngân hàng DNA (GenBank). So sánh sự khác nhau về vị trí nucleotid giữa các cặp loài dùng phần mềm Bioedit (Hall, 1999). Áp dụng phần mềm MEGA 6.0 (Tamura et al., 2013) cho phép phân tích quan hệ phát sinh khoảng cách di truyền và xây dựng cây phát sinh chủng loại theo các phương pháp Maximum Likelihood (ML) theo mô hình Hasegawa-Kishino-Yano với thông số Gamma phân ly ở các vị trí bất biến (HKY + G) (Felsenstein, 1985).

### KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Trong số 314 mẫu đất ở cà phê Tây Nguyên, chỉ có 3 mẫu đất cà phê Đắk Lắk có sự hiện diện của chủng tuyến trùng *Steinernema*, ký hiệu S-DL13. Như vậy, tỷ lệ hiện diện của tuyến trùng EPN trong mẫu đất cà phê Tây Nguyên rất thấp (chỉ 0,95% tổng số mẫu).



**Hình 1.** Ảnh chụp hiển vi của loài *Steinernema siamkayai* ở Việt Nam  
 A-C: Con cái thể hệ 1 (A. Toàn bộ cơ thể con cái; B. Vùng vulva; C. Đuôi con cái);  
 D-E: Con đực thể hệ 1 (D. Toàn bộ cơ thể; E. Vùng đuôi và gai sinh dục);  
 H-G: Ấu trùng cảm nhiễm (H. Phần trước cơ thể; G. Vùng đuôi).

### Đặc điểm hình thái

**Con đực:** Kích thước cơ thể nhỏ hơn khá nhiều so với con cái. Cơ thể cong về phía bụng khi xử lý nhiệt. Con đực thế hệ 1 có kích thước (trung bình 1312  $\mu\text{m}$ , lớn hơn thế hệ 2 (973  $\mu\text{m}$ ). Vỏ cutin mịn khi quan sát dưới kính hiển vi quang học, vùng bên và phasmid không rõ. Đầu tròn và ngắn, liên tục với đường viền cơ thể. Đỉnh đầu có 6 nhú môi ở vòng trong và 4 nhú đầu ở vòng ngoài nhô lên. Hai amphids nhỏ, nằm 2 bên phía sau nhú môi. Xoang miệng hình phễu nông, ngắn và rộng. Phần trước thực quản hình trụ, phân giữa hơi phình rộng, phần sau thực quản dạng quả lê và không có van thực quản. Vòng thần kinh bao quanh eo thắt (isthmus), ngay phía trước gốc thực quản. Lỗ bài tiết nằm ở 1/3 phía sau của phần giữa thực quản, trước vòng thần kinh. Tinh hoàn dạng nhánh đơn và gấp khúc ở phần sau. Gai giao cấu cong về phía bụng, có màu vàng nâu, đầu gai có chiều dài lớn hơn chiều rộng, thân gai lồi lên, tám bản cong và có 2 sườn bên trong. Diềm gai mỏng. Gai đệm rộng và mảnh, có chiều dài bằng  $\frac{3}{4}$  gai giao cấu, dạng cánh cung. Đuôi hình chóp và có mucro, con đực thế hệ 2 có mucro dài hơn con đực thế hệ 1. Hệ thống nhú sinh dục gồm 11 nhú đôi và 1 nhú đơn, trong đó có 6 nhú đôi nằm trước huyết, gần bụng, 1 nhú đơn nằm chính mặt bụng, trước huyết, 1 nhú đôi gần bụng, sau huyết, 2 nhú đôi gần đuôi, 1 nhú đôi mặt bên và 1 nhú đôi mặt lưng, sau huyết.

**Con cái:** cơ thể cong về phía bụng hình chữ C khi xử lý nhiệt. Con cái thế hệ 1 có kích thước cơ thể lớn, chiều dài trung bình 5050  $\mu\text{m}$ , lớn gấp đôi con cái thế hệ 2 (trung bình 2453  $\mu\text{m}$ ). Vùng đầu có 6 nhú môi và 4 nhú đầu, tạo thành vòng tròn bao quanh miệng. Cấu tạo phần thực quản, lỗ bài tiết, vòng thần kinh giống như ở con đực. Nhánh sinh dục kép, gấp khúc ở phần sau, ống dẫn trứng phát triển, tử cung nằm phía bụng, bên trong chứa đầy trứng. Vagina ngắn, thành vagina có cấu trúc cơ. Vulva hình khe, nằm gần giữa cơ thể, có cấu trúc nắp (epitygma) đối xứng nhau. Con cái thế hệ 1 có vulva phát triển hơn con cái thế hệ 2 với mép vulva nhô cao so với bề mặt cơ thể. Đuôi hình chóp ngắn, chiều dài của đuôi nhỏ hơn chiều rộng cơ thể tại hậu môn. Tận cùng đuôi có 1 mucro. Con cái thế hệ 2 có phần cơ thể sau hậu môn phình ra.

**Ấu trùng cảm nhiễm:** Cơ thể thuần đều về phía đầu và đuôi, cong về phía bụng khi xử lý nhiệt. Cutin phân đốt với các đường vân ngang, vùng bên có 6 gờ hay 7 đường bên. Vùng môi tròn, hầu như không tách biệt với phần thân. Vùng miệng khép kín. Thực quản dài, hẹp. Thực quản gốc phình rộng về phía sau tạo thành điều sau thực quản và nằm lệch về phía lưng. Vòng thần kinh nằm bao quanh isthmus. Lỗ bài tiết nằm ở khoảng 1/3 trước của thực quản. Ruột sau dài, mảnh, phân biệt với hậu môn. Mâm sinh dục đã xuất hiện tương đối rõ ở ấu trùng tuổi 3. Đuôi hình chóp, nửa sau đuôi thường vuốt nhọn và hơi cong về phía bụng.

**Nhận xét:** Nhìn chung về hình thái, chủng S-DL13 đặc trưng bởi các đặc điểm của loài là hệ thống nhú sinh dục đực gồm 11 nhú đôi và 1 nhú đơn, trong đó có 6 nhú đôi nằm trước huyết, gần bụng, 1 nhú đơn nằm chính mặt bụng, trước huyết, 1 nhú đôi gần bụng, sau huyết, 2 nhú đôi gần đuôi, 1 nhú đôi mặt bên và 1 nhú đôi mặt lưng, sau huyết. Vulva ở con cái nhô cao so với bề mặt cơ thể, hai bờ trước và sau vulva đều có cấu trúc nắp (epitygma) đối xứng nhau. Ấu trùng cảm nhiễm có kích thước nhỏ thuộc nhóm "cappocapsae" với chiều dài <600  $\mu\text{m}$ . Vùng bên có 6 gờ hay 7 đường bên.

Mặc dù có nhiều đặc điểm tương đồng với mô tả gốc của loài *Steinernema siamkayai*, nhưng về hình thái, chủng tuyến trùng S-DL13 ở Việt Nam có một số đặc điểm sai khác so với mô tả gốc, như: chiều dài trung bình của ấu trùng cảm nhiễm ngắn hơn (426 vs 446  $\mu\text{m}$ ), chỉ số E% của ấu trùng cảm nhiễm cao hơn (98 vs 96 %). Kích thước con cái thế hệ 1 và thế hệ 2 đều lớn hơn nhiều so với miêu tả gốc (5051  $\mu\text{m}$  vs 3937  $\mu\text{m}$  ở thế hệ 1 và 2453  $\mu\text{m}$  vs 1836  $\mu\text{m}$  ở thế hệ 2; chiều rộng cơ thể = 242 vs 198  $\mu\text{m}$  ở thế hệ 1 và 132  $\mu\text{m}$  vs 105  $\mu\text{m}$  ở thế hệ 2. Tuy nhiên, kích thước của ấu trùng cảm nhiễm tương đối ổn định, còn kích thước cơ thể con đực và cái trưởng thành ở hầu hết các loài tuyến trùng EPN thường biến động khá lớn, phụ thuộc vào côn trùng vật chủ và môi trường nhân nuôi. Như vậy, dù có sự sai khác nhất định về kích thước con đực và cái trưởng thành, hình thái của chủng S-DL13 về cơ bản phù hợp với mô tả gốc của loài *Steinernema siamkayai* được Stock, Somsook & Reid (1998) [15] mô tả từ Thái Lan.

Bảng 1. Hình thái lượng (morphometrics) của chủng S-DL13, *S. siamkayai*

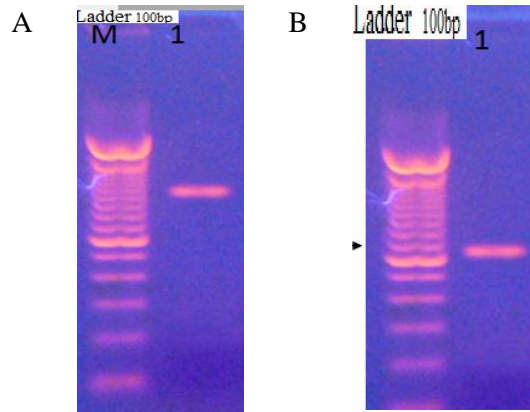
Chỉ số	Con đực		Con cái		Ấu trùng cảm nhiễm
	Thế hệ 1	Thế hệ 2	Thế hệ 1	Thế hệ 2	
L (µm)	1312±110 (1156-1605)	974±67 (909-1043)	5051±764 (3551-6838)	2453±269 (2051-2945)	426±23 (375-455)
W (µm)	99±14 (80-123)	63±5 (59-69,6)	242±42 (184-342)	132±20 (102-160)	21±2 (16-27)
EP (µm)	62±4,9 (56-75)	51±5 (45-57)	93±12 (67-120)	72±12,9 (48-88)	35±3 (29-41,6)
NR (µm)	93±8 (80-112)	74±4 (71-78)	157±18 (134-200)	124±14 (99-160)	71±7 (53-92)
ES (µm)	127±11 (110-158)	104±6,4 (99-114)	220±22 (187-267)	173±16 (152-214)	94±6 (77-102)
ABW (µm)	33±3 (29-40)	27±2 (24-29)	66±13 (45 -94)	53±8 (40-66)	11±1 (9-13)
T (µm)	25±2 (21-29)	17±3 (14-21)	33±5 (24-40)	25±5 (19-35)	36±4 (30-43)
Lst (µm)	4±1 (3-5)	4±1 (3-4)	8±2 (5-11)	7±1 (5-8)	-
Wst (µm)	6±1 (4-7)	5±1 (4-6)	10±1 (8-13)	8±2 (7-13)	-
H (%)	-	-	-	-	39±4 (33-48)
V (%)	-	-	53±3 (48-58)	54±2 (51-58)	-
Ltes (µm)	358±6 (321-366)	150±4 (128-163)	-	-	-
Lsp (µm)	77±5 (65-85)	61±7 (52-69)	-	-	-
Wsp (µm)	9±1 (7-11)	6±1 (5-7)	-	-	-
Lgu (µm)	55±4 (47-62)	45±6 (41-51)	-	-	-
Wgu	6±1 (4-7)	4±1 (4-5)	-	-	-
a	13±1 (11-16)	15±1 (15-16)	21±3 (18-29)	19±3 (14-27)	20±2 (17-24)
b	10±1 (9-12)	9±1 (9-11)	23±4 (16-31)	14±2 (11-18)	4±1 (4-5)
c	52±4 (45-59)	58±9 (44-68)	158±32 (102-217)	101±22 (75-135)	12±1 (10-14)
D (%)	49±4 (44-59)	49±4 (43-53)	42±5 (31-50)	42±5 (31-52)	37±3 (34-42)
E (%)	248±29 (210-313)	278±40 (225-333)	288±44 (214-380)	292±51 (220-413)	98±3 (94-103)

**Đặc trưng phân tử**

Kết quả phân tích trình tự nucleotide chủng tuyến trùng S-DL13 đã xác định vùng gen ITS có chiều dài 1000 bp (hình 2). Đối chiếu với các trình tự vùng ITS và D2-D3 của các loài tuyến trùng giống *Steinernema* trên GenBank cho thấy trình tự của chủng S-DL13 của Việt Nam có sự tương đồng cao (95-99%) với các loài tuyến trùng thuộc giống *Steinernema*. Sử dụng mô hình Jukes-Cantor với 1 tham số phân phối đồng đều để xây dựng ma trận quan hệ di truyền giữa 10 chủng / loài giống *Steinernema* (bảng 2) cho thấy giá trị khoảng cách di truyền của chủng S-DL13 dao động từ 0,00-0,08 đối với các loài gần gũi và từ 0,08-0,37 đối với các loài xa hơn, trong khi đó khoảng cách di truyền của chủng S-DL13 với chủng khác của loài *S. siamkayai* là 0,01.

Trình tự nucleotid của chủng S-DL13 có độ tương đồng cao tới 99% so với chủng *S. siamkayai* AF331917.1 và chỉ số đa dạng

nucleotide  $\pi = 0,038$ . Kết quả so sánh trình tự vùng ITS của các loài thuộc giống *Steinernema* đã ghi nhận 115 vị trí mang thông tin parsimony, 50 vị trí có biến đổi riêng, trong đó chủng S-DL13 của Việt Nam có 10 vị trí nucleotid biến đổi đặc trưng.



Hình 2. Ảnh điện di PCR vùng ITS (A) và vùng D2-D3 (B) với Marker (100bp)

Bảng 2. Khoảng cách di truyền của chủng S-DL13 trên cơ sở trình tự gen ITS

Loài	1	2	3	4	5	7	8	9	10
1. S-DL13 (Vietnam)									
2. <i>S. siamkayai</i>	0,01								
3. <i>S. minutum</i>	0,02	0,01							
4. <i>S. tami</i>	0,02	0,03	0,02						
5. <i>S. eapokense</i>	0,02	0,02	0,03	0,03					
6. <i>S. cumgarensense</i>	0,03	0,01	0,01	0,02	0,02				
7. <i>S. scapterisci</i>	0,08	0,09	0,08	0,09	0,08	0,10			
8. <i>S. rarum</i>	0,37	0,38	0,39	0,40	0,37	0,39	0,33		
9. <i>S. unicornum</i>	0,30	0,30	0,31	0,31	0,29	0,3	0,29	0,21	
10. <i>S. longicaudum</i>	0,28	0,29	0,29	0,30	0,27	0,31	0,25	0,23	0,16

**Quan hệ phát sinh**

Cây phát sinh chủng loại của chủng S-DL13 loài *Steinernema siamkayai* được xây dựng trên cơ sở phân tích các trình tự gen ITS theo phương pháp Maximum Likelihood và kết quả phân tích bootstrap với 1000 lần lặp lại mẫu. Mô hình phân tích thích hợp nhất được lựa chọn là mô hình HKY + G với phân phối Gamma và hằng định (BIC = 8087,965, AICc = 7545,714, lnL = -3700,478, G = 0,41, R = 2,11, f(A) = 0,257, f(T) = 0,203, f(C) = 0,222, f(G) = 0,31).

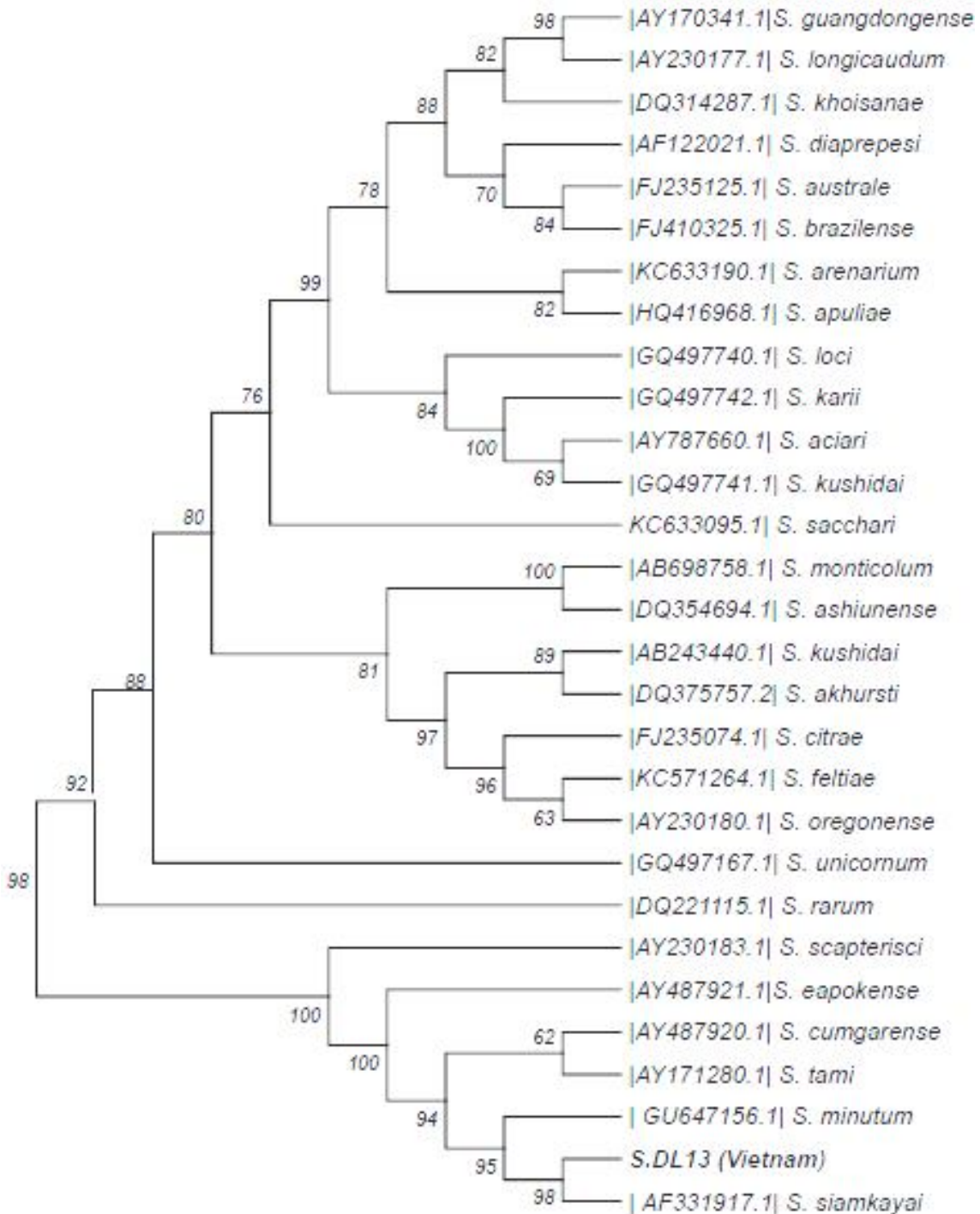
Sơ đồ cây phát sinh của các chủng và loài

tuyến trùng giống *Steinernema* (hình 3) trên cơ sở tái cấu trúc dẫn liệu phân tử của chủng tuyến trùng S-DL13 với trình tự của loài *Steinernema siamkayai* và 27 trình tự của loài khác của giống *Steinernema* có sẵn từ GenBank. Cây phát sinh cho thấy vị trí của chủng tuyến trùng S-DL13 đều nằm ở cùng nhánh phát sinh với chủng *S. siamkayai* AF331917.1 và nằm độc lập với các nhánh của chủng/loài tuyến trùng còn lại trong giống *Steinernema*.

Độ tương đồng về vị trí và chiều dài các nhánh phản ánh trung thực mối quan hệ phát sinh

chủng loại giữa các loài và các chủng trong mỗi loài. Cây phát sinh chủng loại trên cơ sở phân tích 2 vùng gen khác nhau là vùng gen ITS (hình 3) cho thấy chủng S-DL13 ở Đắk Lắk, Việt Nam

và chủng *Steinernema siamkayai* AF331917.1 đều nằm trên một nhánh phát sinh với giá trị bootstrap là 98.



Hình 3. Cây phát sinh chủng loại vùng gen ITS của chủng S. DL13 (Việt Nam) theo phương pháp ML

## KẾT LUẬN

Lần đầu tiên ghi nhận loài tuyến trùng *Steinernema siamkayai* trong hệ sinh thái nông nghiệp Tây Nguyên, Việt Nam. Kết quả phân tích về hình thái và phân tử cho thấy chủng tuyến trùng S-DL13 ở Việt Nam có chung đặc trưng phân tử vùng gen ITS-rDNA và cùng vị trí phát sinh với chủng tuyến trùng ở Thái Lan thuộc loài *Steinernema siamkayai*.

**Lời cảm ơn:** Công trình được thực hiện trong khuôn khổ đề tài độc lập cấp Viện Hàn lâm KHCNVN- mã số VAST.ĐL.04/13-14 và đề tài NAFOSTED-mã số 106.12-2012.84.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Akhurst R. J., 1986. Controlling insects in soil with Entomopathogenic Nematodes. In: Fundamental and Applied Aspects of Invertebrate Pathology. Wageningen, The Netherlands, 265-267.
2. Nguyễn Ngọc Châu, 2008. Tuyến trùng ký sinh gây bệnh côn trùng ở Việt Nam. Nxb. Khoa học tự nhiên và Công nghệ, Hà Nội: 312 tr.
3. Cutler C. G., Stock S. P., 2003. *Steinernema websteri* sp. n. (Rhabditida: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from China. *Nematologia Mediterranea*, 31: 215-224.
4. De Ley P., Félix M. A., Frisse L. M., Nadler S. A., Sternberg P. W., Thomas W. K., 1999. Molecular and morphological characterisation of two reproductively species with mirror-image anatomy (Nematoda: Cephalobidae). *Nematology*, 2: 591-612.
5. Phan Kế Long, 2004. Cây phát sinh chủng loại của một số chủng *Steinernema* ở Việt Nam trên cơ sở giải mã vùng ITS-rDNA. Những vấn đề nghiên cứu cơ bản trong khoa học sự sống. Nxb. Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội: 156-159.
6. Friedman M. J., 1990. Commercial production and development. In: Gaugler R. & Kaya H.K. (Eds.). *Entomopathogenic Nematodes in Biological Control*, CRC Press, Florida: 153-172.
7. Glaser R.W., 1932. Studies on *Neoaplectana glaseri*, a nematodes parasite of the Japanese beetle (*Popillia japonica* Newn). New Jersey Department of Agriculture, Trenton, NJ. Circular, 211: 34-42.
8. Holterman M., Rybarczyk Van den Elsen K., Van Megen H., Mooyman P., Santiago R.P., Bongers T., Bakker J., Helder J., 2009. A ribosomal DNA-based framework for the detection and quantification of stress-sensitive nematode families in terrestrial habitats. *Molecular Ecology Resources*, 8: 23-34.
9. Hunt D. J., 2007. Overview of taxonomy and systematics. In: Nguyen K.B. & Hunt D.J. (Eds). *Entomopathogenic nematodes: systematics, phylogeny and bacterial symbionts*. *Nematology Monographs and Perspectives* 5. Leiden, Brill: 27-57.
10. Joyce S. A., Reid A., Driver F., Curan J., 1994. Application of polymerase chain reaction (PCR) methods to the identification of entomopathogenic nematodes. In: Burnell A.M., Ehlers R.U. & Masson J.P. (Eds). *COST 812 Biotechnology: Genetics of entomopathogenic nematodes bacterium complexes*. European Commission, DGXII: 178-187.
11. Kaya H.K., Gaukler R., 1993. *Entomopathogenic nematodes*. *Annual Review of Entomology*, 38: 181-206.
12. Maneesakorn P., Grewal P.S., Chandrapatya A., 2010. *Steinernema minutum* sp. nov. (Rhabditida: Steinernema): a new entomopathogenic from Thailand. *International Journal of Nematology*, 20: 27-42.
13. Reid A. P., Hominick W. M., Briscoe B. R., 1997. Molecular taxonomy and phylogeny of entomopathogenic nematode species (Rhabditida: Steinernematidae) by RFLP analysis of the ITS region of the ribosomal DNA repeat unit. *Systematic Parasitology*, 37: 187-193.
14. Seinhorst J. W., 1959. A rapid method for the transfer of nematodes from fixative to anhydrous glycerin. *Nematologica*, 4: 67-69.

15. Stock S. P., Somsook V., Reid A., entomopathogenic nematode from Thailand.  
1998. *Steinernema siamkayai* n. sp. Systematic Parasitology, 41:105-113.  
(Rhabditida: Steinernematidae), an 16. GenBank: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

**MORPHOLOGY AND MOLECULAR CHARACTERISTICS OF  
ENTOMOPATHOGENIC NEMATODE TRAIN S-DL13, *Steinernema siamkayai*  
ISOLATED FROM VIETNAM**

**Nguyen Nhu Trang, Nguyen Ngoc Chau**

Institute of Ecology and Biological Resources, VAST

**SUMMARY**

As first record for Vietnam, a strain of entomopathogenic nematodes, S-DL13 belonging to *Steinernema siamkayai* has been isolated from coffee soils in Dak Lak province. In general, the morphology of S-DL13 strain is characterized in male by number and arrangement of the genital papillae with 11 pairs of papillae and 1 single papilla, of which 6 preloacal subventral pairs, one preloacal lateral pair, one postloacal subventral pair, one preloacal subdorsal pair and two subterminal subventral pairs; the single preanal papilla is located ventrally between level of preloacal pairs 5 and 6, rounded from anterior. Spicule length is  $77\pm 5$  (65-85)  $\mu\text{m}$  in 1<sup>st</sup> generation and  $61\pm 7$  (52-69)  $\mu\text{m}$  in 2<sup>nd</sup> generation. Vulva lips protruding prominently, prominent double-flapped epiptygma present. Body length of infective juveniles are smaller than 600  $\mu\text{m}$  as typical for the "carpocapsae" species group. Lateral field with 6 ridges or 7 incisures.

Although strain S-DL13 shared many common morphological features with the original description of *Steinernema siamkayai*, the Vietnamese strain shows some differences such as a slightly shorter body length of infective juveniles (average 426  $\mu\text{m}$  vs 446  $\mu\text{m}$ ) and higher index E% (98 vs 96%). Body lengths of 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> generation (females) are greater than in the original description (5051  $\mu\text{m}$  vs 3937  $\mu\text{m}$  in 1<sup>st</sup> generation and 2453 vs 1836  $\mu\text{m}$  in 2<sup>nd</sup> generation); body width has also greater (242 vs 198  $\mu\text{m}$  in 1<sup>st</sup> generation and 132  $\mu\text{m}$  vs 105  $\mu\text{m}$  in 2<sup>nd</sup> generation).

In addition, the molecular characteristics of the Vietnamese strain, S-DL13 based on ITS rDNA genes provide evidence on the similarity with Thailand strain both in position and genetic length, also located in the same phylogenic clade with the bootstrap value as 98 on the ML tree that enable conclusion on the strain S-DL13 belongs to species *Steinernema siamkayai*.

**Keywords:** *Steinernema siamkayai*, entomopathogenic nematode, morphology, molecular characterizations, strain S-DL13, Dak Lak, Vietnam.

Ngày nhận bài: 12-1-2015