

## GHI NHẬN MỚI LOÀI TUYẾN TRÙNG *Meloidogyne incognita* KÝ SINH GÂY SẴN RỄ TRÊN CÂY NGÔ TẠI TỈNH ĐẮK LẮK

Lê Thị Mai Linh<sup>1,2</sup>, Nguyễn Thị Duyên<sup>1,2</sup>, Nguyễn Hữu Tiên<sup>2</sup>, Trịnh Quang Pháp<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm KH & CN Việt Nam

<sup>2</sup>Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật, Viện Hàn lâm KH & CN Việt Nam

**TÓM TẮT:** Tuyến trùng sắn rễ, *Meloidogyne incognita*, là một trong các tác nhân chính gây hại cho nhiều cây trồng như cà phê, hồ tiêu, rau màu, nhưng chưa có công bố nào về loài này ký sinh và gây hại trên cây ngô ở Việt Nam. Lần đầu tiên ở Việt Nam, quần thể tuyến trùng sắn rễ trên ngô được thu thập và phân tích hình thái, phân tử dựa trên trình tự vùng ITS và phản ứng PCR với mỗi đặc hiệu (PCR-SCAR) cùng các quần thể tuyến trùng sắn rễ khác. Kết quả nghiên cứu khẳng định quần thể sắn rễ trên ngô là loài *M. incognita*. Nghiên cứu này cũng bổ sung những đặc điểm hình thái giữa các quần thể loài *M. incognita* trên các cây ký chủ khác nhau. Kết quả phân tích PCR với cặp mỗi đặc hiệu của loài *M. incognita* với sản phẩm đặc trưng là 1000 bp. Mức độ đa dạng di truyền dựa trên trình tự vùng gen ITS-rDNA của các quần thể *M. incognita* thuộc cây ký chủ khác nhau, cũng như giữa quần thể của 3 loài *M. incognita*, *M. javanica* và *M. arenaria* rất thấp.

**Từ khóa:** *Meloidogyne*, cây ngô, cặp mỗi đặc hiệu MIF/MIR, tuyến trùng sắn rễ, vùng ITS-rDNA, Đắc Lắc.

### MỞ ĐẦU

Tuyến trùng ký sinh gây sắn rễ giống *Meloidogyne* đã ghi nhận có hơn 90 loài ký sinh ở nhiều cây trồng khác nhau, trong đó nhiều loài gây hại nghiêm trọng làm suy giảm năng suất và sản lượng cây trồng (Perry et al., 2009). Cây ngô (*Zea mays* L.) cũng được ghi nhận là một trong những ký chủ của các loài tuyến trùng sắn rễ, bao gồm *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria*, *M. africana* và *M. chitwoodi* (Luc et al., 2005; Perry et al., 2009). Gần đây, loài *M. incognita* cũng được phát hiện gây hại trầm trọng trên nhiều vùng trồng ngô tại phía Tây Nam Nigeria làm giảm đáng kể năng suất và sản (Adegbite, 2011). Mặc dù đã được nghiên cứu nhiều về các loài tuyến trùng sắn rễ trên nhiều cây trồng khác nhau, nhưng chưa có ghi nhận nào về *Meloidogyne* trên cây ngô ở Việt Nam.

Việc giám định các loài *Meloidogyne* thường gặp khó khăn vì sự đa dạng về hình thái trong loài và các loài gần gũi (Perry et al., 2009). Tuy nhiên, kỹ thuật phân tử dựa trên phản ứng PCR-SCAR với cặp mỗi đặc hiệu “specific primers” cho phép giám định nhanh, chính xác đối với một số loài *Meloidogyne* quan trọng (Meng et al., 2004). Kết quả khảo sát tuyến trùng trên cây cà phê và các cây trồng xen tại tỉnh Đắc Lắc năm 2015, chúng tôi đã phát

hiện sự có mặt quần thể tuyến trùng sắn rễ *Meloidogyne* ký sinh ở cây ngô với hình thái khá tương đồng với loài *M. incognita* mặc dù có sự khác biệt về một số đặc điểm hình thái. Vì vậy, để có cơ sở khẳng định sự hiện diện của tuyến trùng sắn rễ trên ngô, chúng tôi phân tích các đặc điểm hình thái và giám định phân tử bằng kỹ thuật PCR-SCAR với mỗi đặc hiệu, đa dạng về di truyền trình tự gene vùng ITS của loài tuyến trùng của quần thể *Meloidogyne* sp. trên ngô với các quần thể *M. incognita* khác.

### VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

**Thu mẫu và tách lọc tuyến trùng:** Mẫu đất (250g) và rễ ngô (cả bộ rễ cây 30 ngày tuổi) trồng xen tại vườn cà phê huyện Krông Năng (Đắc Lắc) được thu thập ngẫu nhiên. Mẫu đất tách lọc bằng phương pháp lọc tĩnh được mô tả theo Nguyễn Ngọc Châu (2003). Mẫu rễ ngô được kiểm tra trực tiếp trên kính hiển vi soi nổi, các nốt sắn được tách riêng để thu cá thể cái và túi trứng của các loài *Meloidogyne* spp. phục vụ cho việc định loại. Do các cá thể trưởng thành cái nằm sâu trong phần nội bì của rễ nên việc tách lọc gặp nhiều khó khăn do con cái bị vỡ nên chỉ thu được 1 cá thể cái sử dụng cho hình thái lượng. Túi trứng của cá thể cái tách từ rễ ngô được ủ ở nhiệt độ 25°C trong nước cất để

thu ấu trùng phục vụ cho phân tích hình thái, phân tử và nhân nuôi thuần trên cây cà chua. Mặc dù ấu trùng thu được sau khi nở đã được nhân nuôi trên cây cà chua trong điều kiện nhà lưới nhưng không thành công.

**Phương pháp làm tiêu bản tuyến trùng:** Ấu trùng tuổi 2 của *Meloidogyne* sau khi nở ra từ các túi trứng của con cái sẽ được giết chết nhiệt ở nhiệt độ 70°C và cố định trong dung dịch TAF, sau một tuần cố định tuyến trùng được làm trong theo phương pháp Seinhorst (1959). Với con cái của *Meloidogyne*, được tách riêng và cắt tấm cutin vùng chậu (tấm perineal pattern) để lên tiêu bản phục vụ cho phân loại theo Perry et al. (2009). Quy trình xử lý tuyến trùng để làm tiêu bản cố định được mô tả trong Nguyễn Ngọc Châu (2003).

**Phân tích hình thái tuyến trùng:** Các chỉ số hình thái được đo, vẽ trên kính hiển vi Olympus CH40 kết nối với ống vẽ Olympus BH2-DA. Các đặc điểm hình thái được đánh giá và so sánh trong khóa định loại các loài *Meloidogyne* theo Kazachenko & Mukhina (2013).

**Tách chiết DNA tổng số:** cắt một cá thể cái trưởng thành vào 1 ống effendorf có chứa 8 µl dung dịch đệm WLB (Worm Lysis Buffer) [50 mM KCl, 10 mM Tris pH 8,0, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,45% Tween 20] và 10 µl nước cất 2 lần, thêm 2 µl proteinase K, và đặt trong tủ lạnh sâu -75°C ít nhất 60 phút. Sau đó chuyển mẫu sang ủ ở nhiệt độ 65°C trong 60 phút, tiếp tục để ở nhiệt độ 96°C trong 10 phút. Bảo quản DNA thu được ở tủ lạnh sâu -20°C (Subbotin et al., 2001).

**Phản ứng PCR-SCAR với mỗi đặc hiệu:** Giám định nhanh loài *M. incognita* bằng cặp mỗi đặc hiệu MIF/MIR 5'-GTGAGGATTCAGCTCCCCAG-3'/5'-ACGAGGAACATACTTCTCCGTCC-3' được mô tả bởi Meng et al. (2004).

**Nhân bản vùng gen ITS:** Cặp mỗi MelR/MelF 5'-TCGTAACAAGGTAGCTGTA G-3'/5'-TGCTCTCGACTGAGTTCAG-3' được thiết kế với phần mềm Primer 3 để khuếch đại vùng gen ITS dựa trên các trình tự nucleotide vùng gen ITS sẵn có của các loài *Meloidogyne* trên Genbank (Lê Thị Mỹ Linh, 2013). Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng QIA quick Gel Extraction Kit (Qiagen) và giải trình tự tại công

ty Macrogen, Hàn Quốc.

**Phân tích số liệu di truyền:** Sử dụng chương trình BLAST để tìm kiếm các trình tự ITS tương đồng công bố trên Genbank. So sánh sự khác nhau về vị trí nucleotide giữa các cặp loài dùng phần mềm Bioedit (Hall, 1999). Sử dụng phần mềm MEGA 6.0 (Tamura et al., 2013) để phân tích khoảng cách di truyền và xây dựng cây phát sinh chủng loại theo các phương pháp Maximum Likelihood (ML) với mô hình Hasegawa-Kishino-Yano model với thông số Gamma distributed (HKY+G) (Felsenstein, 1981).

## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### Triệu chứng ký sinh gây bệnh

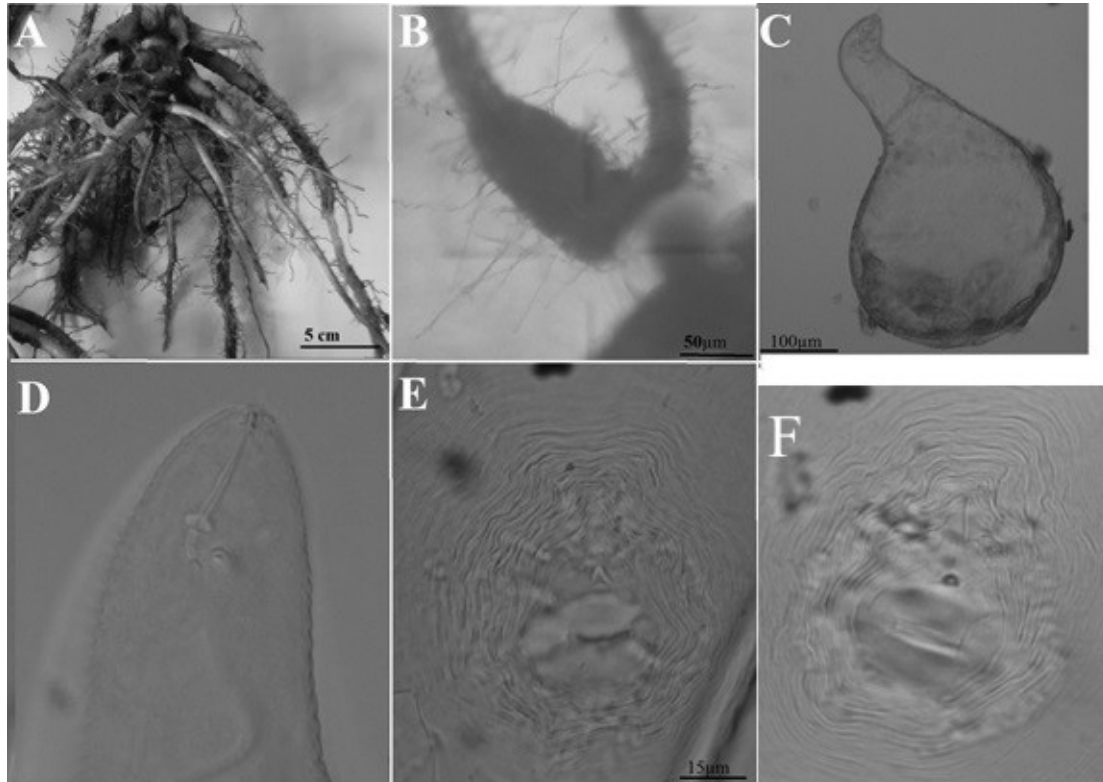
Triệu chứng vàng lá không thấy rõ trên cây ngô nhưng cây kém phát triển, còi cọc hơn những cây xung quanh. Quan sát rễ ngô thu nhận được bằng mắt thường khó phát hiện nốt sần (u sưng) phát triển. Tuy nhiên, khi soi dưới kính hiển vi soi nổi cho thấy có các nốt sần rất nhỏ, hơi phình to so với bề mặt rễ ở các rễ phụ của cây ngô (hình 1A, B). Mỗi nốt sần phân lập được một cá thể cái trưởng thành, rễ không biến màu. Phần đầu của con cái cắm sâu vào phần nội bì và libe rễ, phần thân con cái phình to ngoài phần vỏ rễ, túi trứng nằm ngoài vỏ rễ. Tiwari et al. (2009) ghi nhận rễ cây ngô bị nhiễm tuyến trùng *Meloidogyne* có hiện tượng còi cọc, đổi màu, các nốt sần nhỏ hoặc rất khó để nhận biết mặc dù số lượng tuyến trùng ký sinh lớn, ngô bị nhiễm tuyến trùng sẽ bị suy giảm năng suất do tuyến trùng ký sinh, hủy hoại bộ rễ, ngăn cản quá trình hấp thu dinh dưỡng của cây.

Các triệu chứng nốt sần trên rễ khác nhau tùy thuộc vào loài *Meloidogyne* ký sinh trên cây chủ. Như trên cây cà phê, các triệu chứng có thể được sử dụng để chia thành các nhóm loài khác nhau: đối với loài *M. exigua* và *M. izalcoensis* gây nốt sần nhỏ và tròn, nhưng loài *M. exigua* thì tạo ra nốt sần với túi trứng ở phía trong nốt sần, trong khi *M. izalcoensis* lại tạo ra các túi trứng bọc bên ngoài rễ (Carneiro et al., 2005). Ngược lại, *M. coffeicola* và *M. paranaensis* không gây ra nốt sần mà tạo ra các vết nứt trong mô rễ (Carneiro et al., 2005; Souza, 2008).

**Đặc điểm hình thái của tuyến trùng sần rỗ (*Meloidogyne* sp.) trên ngô**

*Con cái:* Cơ thể dạng quả lê, thân tròn, cổ ngắn đến hơi dài (hình 1C). Phần đầu có vùng mô bằng, hơi tách rời với đường viền cơ thể, kitin hóa rõ ràng, kim hút to khỏe và có dạng thẳng phần chóp cong về phía lưng, gốc kim hút

vát về phía sau (hình 1D), lỗ bài tiết ngang với vị trí gốc kim hút. Điều giữa có dạng oval, van điều giữa kitin hóa mạnh. Perineal pattern với vòm lưng nhô cao, hơi vuông và bóp hẹp lại từ hai phía bên, vân bụng tròn mịn, đứt đoạn không đều, cấu trúc vulva, anus và mút đuôi rõ ràng. Vùng bên đặc trưng với dạng đứt nối giữa các vân vùng bụng và vùng lưng (hình 1E).



Hình 1. Quần thể *Meloidogyne* sp.: Triệu chứng bộ rễ ngô nhiễm (A); triệu chứng nốt sần rỗ qua kính hiển vi soi nổi (B); con cái (C); phần đầu con cái (D); perineal (pattern E); Perineal pattern của quần thể loài *M. incognita* trên cà phê (F).

*Con đực:* không ghi nhận được.

*Ấu trùng tuổi 2:* Cơ thể dạng giun, thon nhỏ vào ở phần đầu và đuôi. Vùng mô kitin hóa yếu, hơi tách biệt với đường viền cơ thể. Kim hút mảnh, kitin hóa yếu, gốc kim hút tròn nhỏ. Khoảng cách từ gốc kim hút đến lỗ đổ tuyến thực quản lưng khoảng 3 μm. Điều giữa lớn, dạng oval, van điều giữa kitin hóa mạnh. Van ruột- thực quản rõ ràng. Lỗ bài tiết ngang với vị trí vòng thân kinh, mở ngay sau vị trí hemizonid (hình 1G). Đường bên với 4 đường rõ ràng.

Phasmids nhỏ nằm giữa đường bên khoảng một phần hai chiều dài đuôi, tính từ anus đến tận cùng đuôi. Đuôi thon nhọn với phần hyaline chiếm khoảng 33% chiều dài đuôi (hình 1H).

Đặc điểm hình thái và phần perineal pattern của con cái cho thấy, mẫu nghiên cứu *Meloidogyne* sp. có các đặc điểm giống với mô tả gốc của loài *M. incognita* (Whitehead, 1968) quần thể *M. incognita* thu trên cà phê (hình 1F) và tương đồng với loài *M. incognita* ở Việt Nam theo mô tả của Nguyen (1996) như perineal

pattern có vòm lưng cao, vuông, vân không liên tục, không có đường bên; ấu trùng tuổi 2 hình giun, kim hút mảnh với núm gốc khá nhỏ, điều giữa phát triển yếu, đuôi dài hình chóp nhọn với mút đuôi tròn tù, hơi cong về phía bụng. Tuy nhiên, bên cạnh đó còn có sự sai khác về hình thái như phần lưng perineal pattern của *Meloidogyne* sp. bị bóp lại từ hai phía bên. Kích thước con cái của loài *Meloidogyne* sp. lớn hơn so với mô tả của Nguyen (1996) chiều dài cơ thể (667 vs. 412-490  $\mu\text{m}$ ), chiều rộng thân (430 vs. 165-285  $\mu\text{m}$ ), chiều dài kim hút (15 vs. 12  $\mu\text{m}$ ) (bảng 1). Khoảng cách giữa 2 phasmids của *Meloidogyne* sp. ngắn hơn 14,6  $\mu\text{m}$  so với

quần thể *M. incognita* 17-26  $\mu\text{m}$  của Kaur & Attri (2013), khoảng cách vulva-anus nhỏ hơn so với quần thể *M. incognita* trên cà phê (13,5 vs. 16-21,3  $\mu\text{m}$ ).

Kích thước ấu trùng của *Meloidogyne* sp. trên ngô và *M. incognita* trên cà phê lớn hơn so với mô tả Whitehead (1968) và Kaur & Attri (2013) (bảng 2). Đối với 2 quần thể *Meloidogyne* sp. trên ngô và *M. incognita* trên cà phê cùng địa điểm thì khoảng cách từ đỉnh đầu đến điều giữa của *Meloidogyne* sp. lớn hơn so với quần thể *M. incognita* trên cà phê (46,8-65,5 vs. 35,6-46,8  $\mu\text{m}$ ) và chỉ số b nhỏ hơn (2,1-2,7 vs. 2,8-3,6).

Bảng 1. Đặc điểm hình thái ( $\mu\text{m}$ ) con cái quần thể tuyến trùng *Meloidogyne* sp. với các quần thể loài *M. incognita*

	<i>Meloidogyne</i> sp. (ngô)	Whitehead (1968)	Kaur & Attri (2013)	Nguyen (1996)	<i>M. incognita</i> (cà phê)
Số lượng cá thể	01	20	10	2	10
Chiều dài cơ thể	667	609 (500-723)	717 (530-812)	- 412-490	717 $\pm$ 77 (591-795)
Chiều rộng cơ thể	430	33 -520	(51-692)	165-285	431 $\pm$ 39 (344-483)
Chiều dài kim hút	15	14 (13-16)	19 (16-27)	12	14,5 $\pm$ 0,5 (13,5-15,6)
DGO	3,2	3 (2-4)	-	3	2,94 $\pm$ 0,22 (2,6-3,12)
Khoảng cách từ đầu đến lỗ bài tiết	19,8	-	-	-	15,5 $\pm$ 0,6 (14,5-16,6)
Khoảng cách từ đầu đến điều giữa	65,5	-	-	-	64,8 $\pm$ 4 (58-70,2)
Chiều dài điều giữa	29,1	46 (37-63)	33 (20-42)	24,5	28,6 $\pm$ 1 (27-30)
Chiều rộng điều giữa	29	39 (33-49)	33 (20-42)	22	34,4 $\pm$ 2,6 (27-30)
Chiều dài khe vulva	13,5	-	22 (16,5-26)	-	12,8 $\pm$ 1,7 (9,36-14,6)
Khoảng cách vulva- anus	13,5	-	-	-	18,6 $\pm$ 2,1 (16-21,3)
Khoảng cách giữa 2 phasmid	14,6	-	22 (17-26)	-	15 $\pm$ 2,5 (11,4-18)

Mặc dù có sự sai khác về đặc điểm hình thái giữa các quần thể của loài *M. incognita* ký sinh trên các cây ký chủ khác nhau, nhưng các chỉ số hình thái của quần thể *Meloidogyne* sp. vẫn phù hợp với các mô tả của loài *M. incognita* (bảng 2).

Theo Kaur & Attri (2013), có sự biến đổi hình thái của loài tuyến trùng *M. incognita* ở trên các ký chủ khác nhau các cây chủ: đậu, cà tím, chuối, củ cải, hoa hướng dương. Do đó, nếu định loại chỉ căn cứ vào các đặc điểm hình thái dễ dẫn đến

sự nhầm lẫn do sự giống về hình thái giữa các loài gần gũi, cũng như thay đổi các đặc điểm giữa các quần thể trong cùng một loài. Như vậy, nghiên cứu này cũng cho thấy có sự thay đổi các đặc điểm hình thái của con cái và ấu trùng tuổi 2

giữa các quần thể loài *M. incognita* trên các cây trồng khác nhau, thậm chí ngay cùng một địa điểm thu mẫu cây ngô trồng xen cây cà phê ở Đắk Lắk.

Bảng 2. Đặc điểm hình thái ( $\mu\text{m}$ ) ấu trùng tuyến trùng *Meloidogyne* sp. với các quần thể loài *M. incognita*

	<i>Meloidogyne</i> sp. (ngô)	Whitehead (1968)	Kaur & Attri (2013)	Nguyen (1996)	<i>M. incognita</i> (cà phê)
Số lượng cá thể	20	20	10	-	20
Chiều dài cơ thể	420 $\pm$ 8,8 (417-428)	371 (337-403)	281 (200-380)	-	334 $\pm$ 12 (315-368)
Chiều rộng cơ thể	15,2 $\pm$ 1,17 (13,5-16,6)	-	14 (8-17)	-	13,5 $\pm$ 1,3 (11,4-15,6)
Chiều dài kim hút	14,5 $\pm$ 0,9 (13,4-16,5)	10,5 (9,6-11,7)	17 (11-25)	-	13,5 $\pm$ 0,8 (12,5-15,5)
DGO	3,2 $\pm$ 0,3 (2,1-4,2)	-	-	-	3,0 $\pm$ 0,4 (2,1-3,6)
Khoảng cách từ đỉnh đầu vòng thân kinh	64,6 $\pm$ 3,1 (57,2-68,6)	-	-	-	50 $\pm$ 3,6 (47,6-62,4)
Khoảng cách từ đỉnh đầu đến lỗ bài tiết	81,2 $\pm$ 2,9 (73,8-86,3)	-	-	-	76 $\pm$ 6 (69,6-86,3)
Khoảng cách từ đỉnh đầu đến điều giữa	53,8 $\pm$ 3,3 (46,8-65,5)	-	51 (35-68)	-	43,4 $\pm$ 3,0 (35,6-46,8)
Chiều dài đuôi	44,5 $\pm$ 4,3 (37,4 - 53,0)	46 (38-55)	- (15-60)	-	36 $\pm$ 4,5 (28 - 59,2)
Chiều dài hyaline	14,3 $\pm$ 2,6 (10,5-17)	-	-	-	12,75 $\pm$ 1,8 (10,4-16,6)
a	27,5 $\pm$ 2,1 (25-29,6)	28,3 (24,9-31,5)	-	-	26,7 $\pm$ 2,7 (22,2-30,4)
b	2,39 (2,10-2,66)	2,4 (2-3,1)	-	-	3,2 $\pm$ 0,2 (2,8-3,6)
b'	6,5 (5,9-7,2)	7,1 (6,4-8,4)	-	-	6,07 $\pm$ 0,3 (5,4-6,55)
c	9,4 $\pm$ 0,8 (7,7-10,7)	8,1 (6,9-10,6)	10 (4,5-17)	-	9,1 $\pm$ 1,05 (7,7-11,5)
c'	4,29 $\pm$ 0,5 (3,6-5,6)	-	4 (1-6,1)	-	4,2 $\pm$ 0,5 (3,5-5,2)

### Đặc trưng phân tử

Phản ứng PCR-SCAR với môi đặc hiệu MIF/MIR

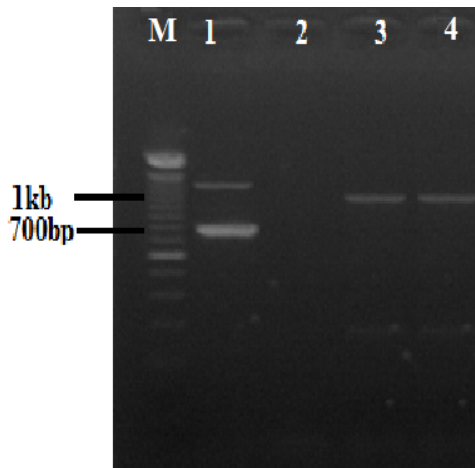
Trong phản ứng này, mẫu *Meloidogyne* sp. và *M. incognita* trên cà phê thu nhận được sản phẩm PCR có cùng 1 băng duy nhất với kích thước khoảng 1000 bp, trong khi mẫu *M. exigua* thu được 2 băng sản phẩm ở kích thước khoảng

600 bp và 1100 bp và mẫu đối chứng âm không cho sản phẩm (hình 2). Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Meng et al. (2004) về loài *M. incognita* đặc trưng đối với môi MIF/MIR kích cỡ 1000 bp và các loài khác không phát hiện được băng hoặc các băng không đặc hiệu, qua đó có thể khẳng định mẫu *Meloidogyne* sp. thuộc loài *M. incognita*.

**Đặc trưng vùng gen ITS**

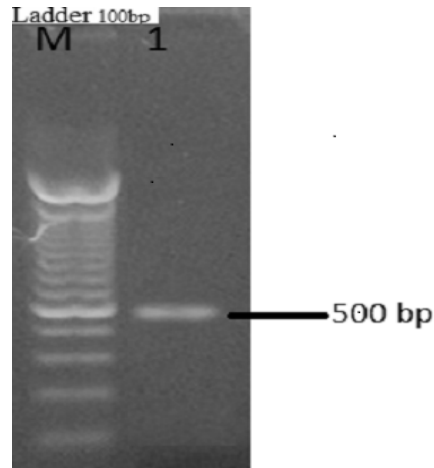
Chiều dài phiên mã vùng gen ITS của *Meloidogyne* sp. với kích khoảng 500 bp (hình 3). Đối chiếu trình tự nghiên cứu với các trình tự của một số loài *Meloidogyne* đã được công bố cho thấy có sự tương đồng cao giữa *Meloidogyne* sp. trên ngô với các loài *Meloidogyne* từ 95-100% tương đồng cao nhất với loài *M. incognita* với mức độ tương đồng

lên tới 100%. Giả thuyết sử dụng mô hình Jukes-Cantor 1 tham số phân phối đồng đều để xây dựng ma trận khoảng cách di truyền (bảng 3), giá trị khoảng cách di truyền của mẫu nghiên cứu với các loài dao động từ 0-0,06 đối với các loài gần gũi và từ 0,14-0,22 đối với các loài xa hơn. Khoảng cách di truyền giữa loài *M. incognita*, *M. javanica* và *M. arenaria* lần lượt là 0-0,01, cho thấy đối với vùng gen ITS của 3 loài này không có sự biến đổi nhiều.



Hình 2. Sản phẩm PCR với cặp mồi đặc hiệu MIR/MIF

M. Ladder100bp( *Invitrogen*<sup>TM</sup>); 1. *M. exigua*; 2. Mẫu đối chứng âm; 3. *M. incognita* (cà phê); 4. *Meloidogyne* sp. (ngô).



Hình 3. Sản phẩm PCR vùng gen ITS

M. Ladder100bp( *Invitrogen*<sup>TM</sup>); 1. Mẫu *Meloidogyne* sp. (ngô).

Bảng 3. Ma trận khoảng cách di truyền giữa một số loài *Meloidogyne* dựa trên trình tự đoạn gen ITS

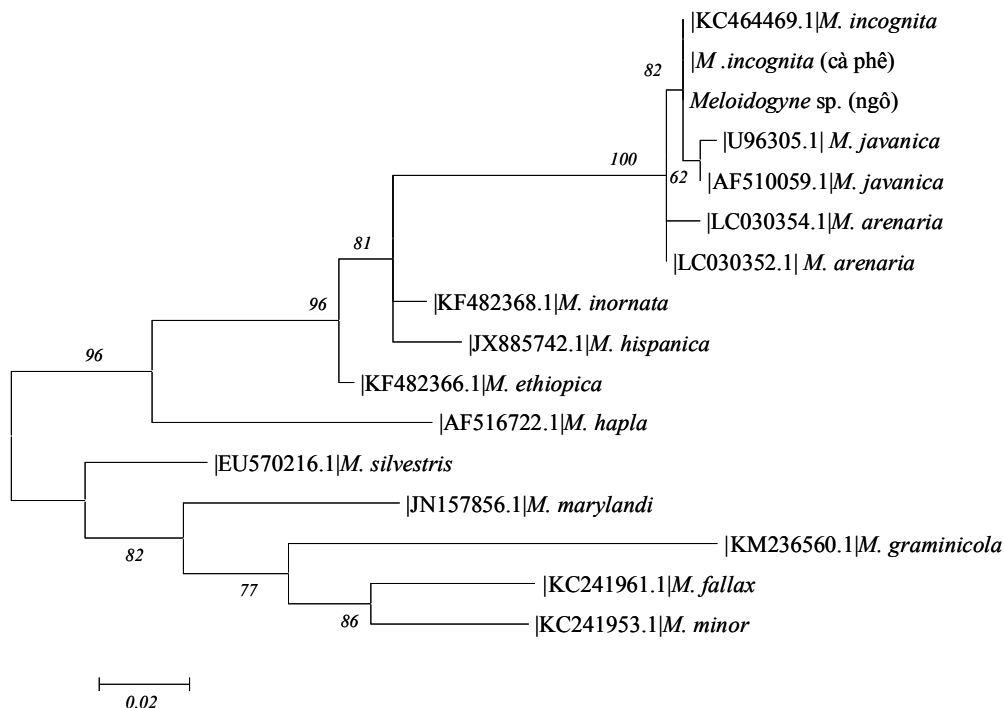
Loài	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1- <i>Meloidogyne</i> sp. (ngô)									
2- <i>M. incognita</i> (cà phê)	0,00								
3- KC464469.1 <i>M. incognita</i>	0,00	0,00							
4- U96305.1 <i>M. javanica</i>	0,01	0,01	0,01						
5- LC030354.1 <i>M. arenaria</i>	0,01	0,01	0,01	0,01					
6- KF482366.1 <i>M. ethiopica</i>	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06				
7- KF482368.1 <i>M. inornata</i>	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06			
8- AF516722.1 <i>M. hapla</i>	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,15	0,08		
9- KC241961.1 <i>M. fallax</i>	0,17	0,17	0,17	0,17	0,16	0,17	0,12	0,13	
10- KM236560.1 <i>M. graminicola</i>	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22	0,15	0,17	0,15

Cây phát sinh chủng loại xây dựng trên cơ sở phân tích các trình tự vùng gen này theo phương pháp Maximum Likelihood, bootstrap với 1000 lần lấy lại mẫu được thể hiện trên hình

4. Mô hình phân tích thích hợp nhất được lựa chọn là thông số HKY + G với phân phối Gamma (BIC = 2174,857, AICc = 1951,078, lnL = -939,183, G = 0,45, R = 0,94, f(A) =

0,251,  $f(T) = 0,347$ ,  $f(C) = 0,176$ ,  $f(G) = 0,227$ ). Cây phát sinh chủng loại có độ tương đồng cao về hình dạng và mức độ tương đồng, cả về dạng hình học của cây và chiều dài các nhánh, phần

ảnh tính trung thực trong đánh giá mối quan hệ phát sinh chủng loại giữa các loài. Các giá trị bootstrap ở gốc nhánh từ 75 trở lên cho thấy kết quả phân tích đáng tin cậy.



Hình 4. Cây phát sinh chủng loại từ trình tự ITS của các loài *Meloidogyne* bằng phương pháp Maximum Likelihood (ML), giá trị bootstrap thể hiện ở mỗi gốc nhánh

Qua cây phát sinh chủng loại cho thấy quần thể *Meloidogyne* sp. trên ngô có cùng một gốc nhánh đối với ba loài *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* và khoảng cách di truyền giữa các loài này rất thấp. Trong đó khoảng cách di truyền quần thể *Meloidogyne* sp. với quần thể *M. incognita* trên cà phê và *M. incognita* (LC030365.1, KC464469.1, Nhật Bản) là 0,00; với loài *M. javanica* (U96305.1-Mỹ), *M. arenaria* (LC030354.1, Nhật Bản) là 0.01. Điều này chứng tỏ quần thể *Meloidogyne* sp. ở ngô là cùng một loài đối với *M. incognita*. Đây là các loài tuyến trùng phổ biến với phổ ký chủ rộng từ cây rau, hoa màu cho đến các cây trồng lâu năm như cà phê, hồ tiêu.

Bên cạnh đó, mối quan hệ di truyền trong cây phát sinh chủng loại cho thấy mức độ đa dạng di truyền dựa trên trình tự ITS của các loài

là khá thấp, đặc biệt là 3 loài *M. incognita*, *M. javanica* và *M. arenaria* không có sự biến động nhiều cũng như sự tách biệt giữa các loài này, mặc dù về đặc điểm hình thái là hoàn toàn khác nhau.

#### KẾT LUẬN

Quần thể tuyến trùng sản rễ *Meloidogyne* sp. được khẳng định là loài *M. incognita*, ký sinh gây triệu chứng cây còi cọc, kém phát triển cho cây ngô, các nốt sản rất nhỏ, thường hơi nhô cao hơn so với bề mặt rễ ở các rễ phụ.

Loài *M. incognita* ký sinh trên các cây chủ khác nhau có thay đổi về đặc điểm hình thái. Trong nghiên cứu này bổ sung biến động hình thái của các quần thể *M. incognita* về kích thước cơ thể, cấu trúc perineal pattern, khoảng

cách vulva-anus, khoảng cách giữa 2 phasmids chiều dài khe vulva của con cái; khoảng cách từ đầu đến điều giữa, chỉ số b của ấu trùng.

Phản ứng PCR với môi đặc hiệu MIR/MIF cho phép giám định nhanh loài *M. incognita* với kích thước sản phẩm PCR là 1000 bp. Đặc điểm di truyền dựa trên trình tự nucleotide vùng gen ITS có tính đa dạng thấp trong loài cũng như đối với một số loài gần gũi đối với *M. incognita*, *M. javanica* và *M. arenaria*.

Đây là lần đầu tiên ghi nhận sự ký sinh gây hại của *M. incognita* trên cây ngô tại Việt Nam vì số lượng mẫu thu được ít sẽ cần có những nghiên cứu tiếp để khẳng định thêm những thay đổi về hình thái trong quần thể và khả năng gây hại của chúng trên ngô ở Việt Nam.

**Lời cảm ơn:** Bài báo được hoàn thành dưới sự trợ giúp kinh phí của đề tài Nafosted mã số: 106-NN.03-2013.56.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Adegbite A. A., 2011. Reaction of some maize (*Zea mays* sl.) varieties to infestation with root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* under field conditions. *African Journal of Plant Science*, 5(3): 162-167.
- Carneiro R. M. D. G., Carneiro R. G., Abrantes I. M. O., Santos M. S. N. A., Almeida M. R. A., 1996. *Meloidogyne paranaensis* n. sp. (Nemata: Meloidogynidae), a root-knot nematode parasitizing coffee in Brazil. *Journal of Nematology*, 28: 177-189.
- Carneiro R. M. D. G., Almeida M. R. A., Gomes A. C. M. M., Hernández A., 2005. *Meloidogyne izalcoensis* n. sp. (Nematoda: Meloidogynidae), a root-knot nematode parasitizing coffee in El Salvador. *Nematology*, 7: 819-832.
- Nguyễn Ngọc Châu, Nguyễn Vũ Thanh, 2000. Động vật chí Việt Nam, Phần 4: Tuyến trùng ký sinh thực vật. Nxb. Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội: 218-220.
- Nguyễn Ngọc Châu, 2003. Tuyến trùng thực vật và cơ sở phòng trừ. Nxb. Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội: 302tr.
- Felsenstein J., 1981. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *Journal of Molecular Evolution*, 17(6): 368-376.
- Hall T. A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41: 95pp.
- Hasegawa M., Kishino H., Yano T., 1985. Dating of human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution*, 22(2): 160-174.
- Kaur H., Attri R., 2013. Morphological and morphometrical characterization of *Meloidogyne incognita* from different host plants in four districts of Punjab, India. *Journal of Nematology*, 45(2): 122-127.
- Kazachenko I. P., Mukhina T. I., 2013. Root-knot nematodes of genus *Meloidogyne* Goeldi (Tylenchida: Meloidogynidae) of the world. *Biol.-soil. Inst Dalnevost. Dept. Ros. Acad. Science, Dalnevost. Feder. Univ. Vladivostok: Dal'nauka*: 306 p.
- Koressaar T., Remm M., 2007. Enhancements and modifications of primer design program Primer 3. *Bioinformatics*, 23(10): 1289-1291.
- Lê Thị Mai Linh, 2015. Phân tích mối quan hệ di truyền của một số loài tuyến trùng ký sinh gây sần rễ *Meloidogyne* spp. trên cây Hồ tiêu ở Quảng Trị. Báo cáo kết quả nghiên cứu đề tài cán bộ trẻ 2015. Viện Sinh thái và Tài nguyên Sinh vật.
- Luc M., Sikora R., Bridge J., 2005. *Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture*. C.A.B International Institute of Parasitology: 629 pp.
- Meng Q. P., Long H., Xu J. H., 2004. PCR assays for rapid and sensitive identification of three major root-knot nematodes, *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* and *M. arenaria*. *Acta Phytopathologica Sinica*, 34: 204-210
- Perry R. N., Moens M., Starr J. L., 2009. *Root-knot nematodes*. Wallingford, UK, CAB International: 520 pp.



- Seinhorst J. W., 1959. A rapid method for the transfer of nematodes from fixative to anhydrous glycerin. *Nematologica*, 4: 67-69.
- Souza R. M., 2008. Plant-parasitic nematodes of coffee. Springer Netherlands: 340 pp.
- Subbotin S. A., Peng D., Moens M., 2001. A rapid method for the identification of the soybean cyst nematode *Heterodera glycines* using duplex PCR. *Nematology*, 3: 365-371.
- 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.
- Tiwari S., Eisenback J. D., Youngman R. R., 2009. Root-knot nematode in field Corn. Virginia Tech. pub.: 444-107.
- Whitehead A. G., 1968. Taxonomy of *Meloidogyne* (Nematodea: Heteroderidae) with descriptions of four new species. *Trans. Zool. Soc. Lond.*, 31: 263-401.

**FIRST RECORD OF *Meloidogyne incognita* ON MAIZE (*Zea mays* L.)  
IN WESTERN HIGHLAND, VIETNAM**

**Le Thi Mai Linh<sup>1,2</sup>, Nguyen Thi Duyen<sup>1,2</sup>, Nguyen Huu Tien<sup>2</sup>, Trinh Quang Phap<sup>1,2\*</sup>**

<sup>1</sup>Graduate University of Science and Technology, VAST

<sup>2</sup>Institute of Ecology and Biological Resources, VAST

**SUMMARY**

The root-knot nematodes, *Meloidogyne incognita*, is one of the most important pest on many crops, such as coffee, pepper, vegetables, etc. Firstly, the root-knot nematode populations were collected on corn in Krong Nang (Dak Lak province) and analyzed in comparison with other root-knot nematodes on morphology, ITS sequencing and specific primers. The results confirmed that the corn root-knot nematode population is *M. incognita* species. The study also added variations of different *M. incognita* populations on different host plants in the morphological characteristics. PCR product with specific primers for *M. incognita* is 1000 bp. The genetic diversity based on ITS-rDNA sequencing the *M. incognita* populations, and between populations of *M. incognita*, *M. javanica* and *M. arenaria* were very low.

*Keywords:* *Meloidogyne*, ITS-rDNA, maize, MIR/MIF specific primers, root-knot nematode, Dak Lak.

*Citation:* Le Thi Mai Linh, Nguyen Thi Duyen, Nguyen Huu Tien, Trinh Quang Phap, 2017. First record of *Meloidogyne incognita* on maize (*Zea mays* L.) in western highland, Vietnam. *Tap chi Sinh hoc*, 39(1): 15-23. DOI: 10.15625/0866-7160/v39n1.7229.

\*Corresponding author: tqphap@yahoo.com.

Received 3 October 2015, accepted 20 March 2017