

SỰ PHÂN BỐ KHÔNG ĐỒNG NHẤT CỦA TUYẾN TRÙNG *Caenorhabditis brenneri* Ở VƯỜN QUỐC GIA CÁT TIÊN VÀ CÚC PHƯƠNG

Lê Thọ Sơn, Bùi Thị Mai Hương, Hà Bích Hồng, Nguyễn Thị Thu
Trường Đại học Lâm nghiệp

TÓM TẮT

Sinh vật sống trong điều kiện khác nhau trải qua nhiều thế hệ thường dẫn tới có những đặc điểm tiến hóa khác nhau. Sự tiến hóa đó đạt trạng thái cao nhất khi được lưu giữ thành mã di truyền. Nghiên cứu này trình bày quy trình và kết quả phân lập, nuôi cấy và mô tả đặc điểm phân tử của tuyến trùng mô hình *Caenorhabditis brenneri* có nguồn gốc từ Vườn Quốc gia Cát Tiên và Cúc Phương của Việt Nam. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi đã phân lập, nuôi cấy nhân tạo và xác định được 19 chủng *C. brenneri* tự nhiên thu từ Vườn Quốc gia Cát Tiên và 01 chủng từ Vườn Quốc gia Cúc Phương. Độ tương đồng phân tử của trình tự 18S rDNA giữa các chủng không đồng nhất và dao động từ 97,95% đến 100% so với đối chứng *C. brenneri* CB5161. Kết quả nghiên cứu cho thấy tiềm năng đa dạng cao của loài tuyến trùng *C. brenneri* ở những hệ sinh thái thuộc lãnh thổ Việt Nam. Tiếp theo, chúng tôi hướng tới sử dụng tập hợp tuyến trùng *C. brenneri* từ hai Vườn Quốc gia để nghiên cứu mối quan hệ cấu trúc gen và tính đa hình tính trạng nói chung.

Từ khóa: *Caenorhabditis elegans*, đa dạng tuyến trùng, DNA barcoding, phân lập, nuôi cấy

NEMATODE ISOLATES OF *Caenorhabditis brenneri* YIELDED MORE IN CAT TIEN BUT LESS IN CUC PHUONG NATIONAL PARKS

Le Tho Son, Bui Thi Mai Huong, Ha Bich Hong, Nguyen Thi Thu
Vietnam National University of Forestry

ABSTRACT

Organisms within subpopulations of the same species may be diverse in respect of any traits because they have life histories under different conditions. We report the research of the diversity of *Caenorhabditis brenneri*: the isolation of the nematodes from decomposing vegetation collected in Cat Tien, and Cuc Phuong National Parks of Vietnam, molecular classification with DNA barcoding, and cultivation on artificial growth media of the wild-type *C. brenneri*. We successfully isolated, and cultured 20 wild-type strains of *C. brenneri* with highly conserved 18S rDNA (99.76% to 100%) to a control species *C. brenneri* CB5161, and found a likely high diversity amongst them. This result indicated the high potential diversity of the wild-type *C. brenneri* in Vietnam. We would extend the research of the diversity of *C. brenneri* and use this species as a model organism in biological studies in the future. We will use the strains of *C. brenneri* in this research to study the key genetic factors regulating differences within *C. brenneri* strains.

Keywords: *Caenorhabditis elegans*, cultivation, diversity of nematodes, DNA barcoding, isolation

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Tuyến trùng thuộc giống *Caenorhabditis* đã trở thành mô hình cho rất nhiều nghiên cứu liên quan tới sinh học, trong đó loài *Caenorhabditis elegans* đóng góp nổi bật thông qua những nghiên cứu tìm hiểu chức năng gen. Ngày nay, những loài gần với *C. elegans* được quan tâm nhiều trong các nghiên cứu tiến hóa và đa dạng, vì vậy, yêu cầu có nhiều loài và chủng tự nhiên. Điều này đã được minh chứng xu thế của thế giới đã bắt đầu sử dụng *C. elegans* (Brenner, 1973; Le, *et al.*, 2023), tiếp là *C. briggsae* (Gupta, *et al.*, 2007), và cho tới nhiều loài cùng họ khác gần đây (Nuez, Felix, 2012).

Cho tới nay, có khoảng 60 loài tuyến trùng *Caenorhabditis* đã được ghi nhận, trong đó phần lớn tại châu Á, châu Mỹ và một số tại châu Âu (*Caenorhabditis* Evolution Community, 2020). Số lượng này còn tăng lên theo thời gian vì các nhà khoa học vẫn nỗ lực phân lập những loài mới và chủng mới từ môi trường tự nhiên, trong đó có sự đóng góp từ Việt Nam. Sự tăng trưởng số lượng tuyến trùng này sẽ giúp con người hiểu được toàn cảnh hơn sự hiện diện và tính chất đa dạng của nhóm tuyến trùng *Caenorhabditis*.

Những nghiên cứu cơ bản xuất phát từ loài mô hình *C. elegans* (N2) về nhiều vấn đề đã mở rộng tới những loài thuộc giống *Caenorhabditis*. Một câu hỏi thông thường đó là những phát hiện được tìm ra từ sinh vật mô hình *C. elegans* từ những thí nghiệm trong phòng thí nghiệm có hay không tồn tại trong điều kiện sống tự nhiên của sinh vật. Mặt khác, sự đa dạng chủng tự nhiên cũng sẽ gắn liền với sự đa dạng đặc điểm, cấu trúc và chức năng của sinh vật, ví dụ như sự khác biệt nucleotide (SNP) trong hệ gen của *C. elegans* (Barriere, Fitch, 2005; Barriere, Felix, 2005) hay *C. inopinata* (Kanzaki, *et al.*, 2018). Mỗi chủng tự nhiên có thể không giống với những chủng khác cùng loài vì lịch sử tiến

hóa giữa chúng không giống nhau. Thông thường, sự đa dạng liên kết như vậy đều bắt nguồn từ khác biệt căn bản nào đó trong hệ gen, ví dụ sự khác biệt gen cơ bản đã làm cho những chủng *C. elegans* tự nhiên trong nghiên cứu có tuổi thọ khác nhau (Croll, *et al.*, 1977; Chen, 2011). Xét về một tính trạng giữa những tuyến trùng mà có lịch sử tiến hóa không giống nhau thì tính trạng đó có sự giống hay khác nhau vẫn còn là ẩn số vì chưa thực sự có nhiều nghiên cứu minh chứng ở những mức độ hiện tượng cho tới phân tử. Vì vậy, bổ sung những loài và chủng mới cùng với việc mô tả đặc điểm sẽ giúp ích những nghiên cứu ở tuyến trùng bao gồm cả *Caenorhabditis*.

Theo thống kê, tuyến trùng *Caenorhabditis* xuất hiện ở những điều kiện sinh thái kiểu nhiệt đới quanh xích đạo vì hội tụ điều kiện ẩm ướt, nhiệt độ và hệ sinh vật phong phú (Felix, *et al.*, 2013). So sánh theo tiêu chuẩn điều kiện sinh thái như vậy thì lãnh thổ Việt Nam có thể có sự đa dạng về tuyến trùng *Caenorhabditis*. Vì vậy, cần thiết có nghiên cứu đa dạng nhóm loài tuyến trùng *Caenorhabditis* trong những hệ sinh thái rừng ở Việt Nam.

Chúng tôi đã tiến hành điều tra sự hiện diện của tuyến trùng *Caenorhabditis* và thấy rằng sự đa dạng chủng và loài khá cao. Nghiên cứu này trình bày phương pháp và kết quả phân lập, nuôi cấy, xác định thành phần loài và tính đa dạng di truyền của tuyến trùng *C. brenneri* tự nhiên ở Vườn Quốc gia Cát Tiên và Cúc Phương. Kết quả là một số lượng lớn chủng tuyến trùng tự nhiên có kiểu hình giống với tuyến trùng thuộc giống *Caenorhabditis* đã được phân lập, nhân nuôi nhân tạo và mô tả phân tử. Bằng sự phân tích trình tự nucleotide của 18S rDNA, 20 chủng tuyến trùng được xác định là loài *C. brenneri*. Phân tích tính đa hình di truyền dựa vào 18S rDNA cho thấy sự khác biệt phức tạp dẫn tới tính đa dạng trong loài.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Hóa chất và môi trường

NaCl; peptone; agar; nutrient agar; dầu ăn thực vật; Yeast extract; cholesterol; CaCl₂; MgSO₄; KH₂PO₄; K₂HPO₄; mỡ lợn và dung dịch nấm.

Môi trường nuôi cấy “New Cheap Media No.18” (NcM18) (0,4 g mỡ lợn + 20 ml dịch nấm + 17 g agar + 4 ml (0,75 g/ml) NaCl + 1L nước cất) và “Nematode Growth Media” (NGM) (1 ml (5 mg/ml) Cholesterol + 2,5 g Peptone + 1 ml (1M) CaCl₂) + 1 ml (1M) MgSO₄ + 25 ml 1MKPO₄ + 17 g agar + 4 ml 0,75 g/ml NaCl + 1 L nước cất) (Le, *et al.*, 2021).

2.2. Phân lập và nuôi cấy tuyến trùng

Mẫu thực vật được thu tại hai bên tuyến đi chính xuyên Vườn Quốc gia Cúc Phương từ cổng vào cho tới khu Bồng. Ở Vườn Quốc gia Cát Tiên, mẫu được thu hai bên lối đi từ cổng vào cho tới khu Bàu Sấu.

Phương pháp phân lập và nuôi cấy tuyến trùng như trong nghiên cứu của Le T.S và đồng tác giả (2021). Từ 5 g tới 10 g mẫu thực vật (mùn lá rụng đang phân hủy, hoa và quả chín đang thối) đang trong quá trình thối rữa, thu từ những địa điểm khác nhau được ủ trên đĩa Petri có môi trường NGM hoặc NcM18 có nuôi cấy *Escherichia coli* OP50 trong 03 ngày, ở nhiệt độ phòng (khoảng 25°C). Tiếp sau đó, trung bình 02 cá thể tuyến trùng trưởng thành chọn lọc được nuôi cấy tiếp tục trên môi trường NGM và NcM18 có nuôi cấy *E. coli* OP50 ở nhiệt độ (19 ± 1)°C.

Bước tiếp theo là phân loại hình thái chung (độ sáng cơ thể, kích thước và kiểu dáng họng/hầu) tương tự như *C. elegans*. Cá thể tuyến trùng trưởng thành được làm tiêu bản và soi dưới kính hiển vi ở độ phóng đại 40X. Mỗi một cá thể tuyến trùng trưởng thành có những đặc điểm kích thước, cơ thể trong suốt và kiểu bỏ

lượn sóng dưới kính hiển vi (độ phóng đại 4 lần), tương tự *C. elegans* xuất hiện trên bề mặt đĩa trải mẫu thực vật NcM18 hoặc NGM + *E. coli* OP50 được chuyển qua 01 đĩa nuôi cấy NcM18 hoặc NGM + *E. coli* OP50. Để tạo chủng, mỗi cá thể mang trứng được tiếp tục nuôi cấy trên đĩa trong 7 - 10 ngày để sinh sản một số thế hệ tiếp theo (>5). Những chủng này được quan sát hình thái hầu/họng dưới kính hiển vi (độ phóng đại 40 lần), chủng tuyến trùng được dự đoán là *Caenorhabditis* cần có đặc điểm hình thái thực quản/hầu điển hình có “2 bóng đèn tròn” (Barriere, 2006). Trong số những chủng có các đặc điểm như vậy, chúng tôi chọn ra chủng sinh ra cả con đực và con cái.

2.3. Xác định loài tuyến trùng bằng DNA barcoding

Quy trình tách DNA tổng số được áp dụng là phương pháp “Single Worm Lysis” sử dụng phổ biến cho tuyến trùng *Caenorhabditis* (Ahringer, 2006). Trình tự 18S rDNA được khuếch đại bằng PCR cùng với 01 cặp primer (SSU18A (5'-AAAGATTAAGCCATGCATG-3') và SSU26R (5'-CATTCTTGGCAAATGCTTTTCG-3')) (Barriere, 2006)). Sản phẩm PCR sau đó được tinh sạch, giải trình tự và so sánh với cơ sở dữ liệu 18S rDNA trên trang điện tử “the National Center for Biotechnology Information (NCBI)”.

2.4. Phân tích phát sinh chủng loại

Khả năng phát sinh chủng loại của những chủng *C. brenneri* trong nghiên cứu này được phân tích và biểu hiện bằng cây phát sinh chủng loại bằng phương pháp Neighbor-joining trong phần mềm MEGA11 (Tamura *et al.*, 2021). Các trình tự nucleotide của những đoạn 18S rDNA không cắt ghép, thu được từ phản ứng khuếch đại PCR bằng phần mềm và giải trình tự được sử dụng làm cơ sở dữ liệu.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

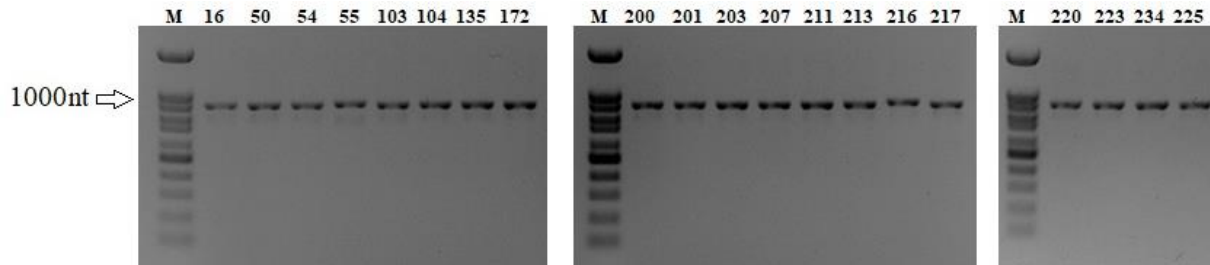
3.1. Phân lập tuyến trùng

Tổng số mẫu thực vật được sử dụng để phân lập trong nghiên cứu này là 102 mẫu (50 từ Vườn Quốc gia Cúc Phương và 52 là từ Vườn Quốc gia Cát Tiên). Trong số những chủng được kiểm tra, một lượng lớn (khoảng 100) chủng đã được chọn lọc ra từ đĩa nuôi cấy. Với kết quả này, 20 trong 50 mẫu từ Vườn Quốc gia Cúc Phương và 30 trong 52 mẫu từ Vườn Quốc gia Cát Tiên cho tuyến trùng. Các chủng này đều có đặc điểm cơ bản đặc trưng cho tuyến trùng *Caenorhabditis*: cơ thể trong suốt (có thể nhìn xuyên qua), kích thước cơ thể trưởng thành khoảng 1 mm, và có hậu/thực quản kiểu 2 “bóng đèn”. Thêm nữa, hầu hết các chủng này đều xuất hiện hai giới (đực và cái) tương tự như những loài đơn tính thuộc giống tuyến trùng *Caenorhabditis* để thực hiện xác định trình tự 18S rDNA.

Như vậy, những loài tuyến trùng *Caenorhabditis* xuất hiện trong mẫu mùn thực vật từ Vườn Quốc gia Cúc Phương và Cát Tiên. Có thể sử dụng môi trường thông dụng là NGM + *E.coli* OP50 và NcM18 + *E. coli* OP50 để thực hiện bước phân lập cá thể và nuôi cấy cá thể thành chủng riêng biệt. Cần nói thêm, NcM18 là môi trường có “giá thành thấp” và chủ động tạo ra dựa vào nguồn nguyên liệu xuất hiện phổ biến trong đời sống Việt Nam, so với môi trường phổ thông NGM là môi trường giá cao hơn phổ biến ở những nước phát triển và nguyên liệu phụ thuộc vào những hóa chất công nghiệp tinh sạch.

3.2. Phân tích phân tử xác định thành phần loài

Trình tự 18S rDNA của mỗi một trong số 20 chủng được khuếch đại bằng PCR cho sản phẩm khoảng 800 tới dưới 900 nucleotide (nt) (hình 1). Sản phẩm PCR được gửi tới dịch vụ giải trình tự để thu nhận trình tự nucleotide của mỗi chủng.



Hình 1. Sản phẩm PCR được điện di trên agarose gel. M-Chỉ thị kích thước DNA; số ở trên mỗi vạch tương ứng là sản phẩm PCR tương ứng (độ lớn gần với vạch 1000nt) của 20 chủng *C. brenneri* CFB (16 tới 225)

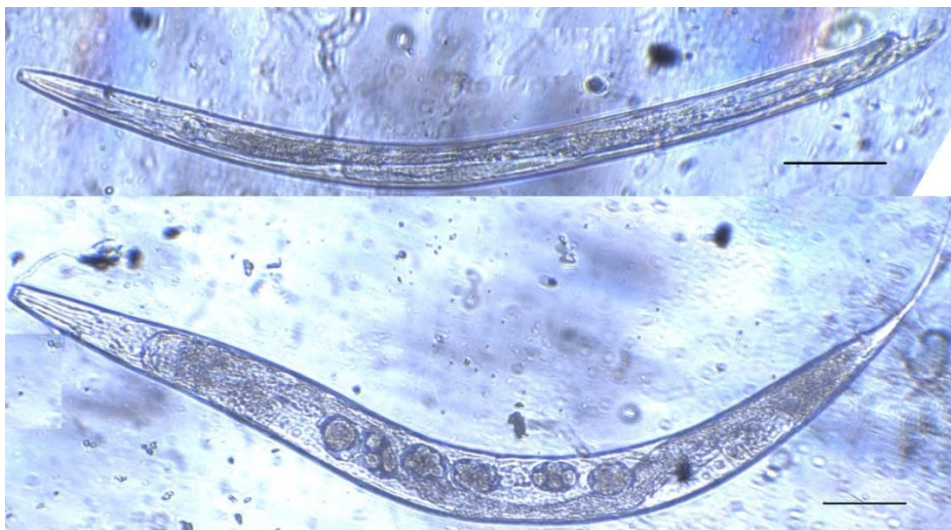
So sánh những trình tự này với cơ sở dữ liệu 18S rDNA của NCBI cho thấy rằng 19 trong 20 chủng *C. brenneri* có độ tương đồng từ 99,05% đến 100% và 01 chủng có độ tương đồng CFB207 (GenBank OQ891333) 97,95% so với trình tự so sánh đầu tiên của chủng *C. brenneri* CB5161 đã được thế giới phát hiện (bảng 1). Như vậy, nói chung không có sự khác biệt lớn khi so sánh đoạn nhất định của trình tự 18S rDNA giữa chủng được phân lập bắt nguồn từ hai vườn quốc gia với chủng *C. brenneri*

CB5161 được phân lập từ nơi xa khác là Venezuela (Sudhau, Kiontke, 2007). Hình dạng và biểu hiện được quan sát bằng kính hiển vi (40X) cho thấy rằng, 20 chủng này có vẻ không có sự khác biệt nổi trội, chúng có hình thái phổ biến của các cá thể tuyến trùng thuộc giống *Caenorhabditis*: kích thước cá thể trưởng thành khoảng 1 mm, những cá thể ở giai đoạn phát triển ấu trùng có kích thước bé hơn và tất cả có cơ thể trong suốt (hình 2).

Bảng 1. So sánh trình tự 18S rDNA của những chủng *C. brenneri* trong nghiên cứu này với cơ sở dữ liệu GenBank (NCBI)

Thứ tự	Ký hiệu	Mã số GenBank (NCBI)	Xuất xứ mẫu	Mức độ giống (trình tự so sánh) [†]
1	CFB16	OQ891324	Vườn Quốc gia Cúc Phương	100% (MT039632.1)
2	CFB50	OK086048	Vườn Quốc gia Cát Tiên	99,06% (U13930.1)
3	CFB54	OQ891326		99,29% (U13930.1)
4	CFB55	OQ891327		99,05% (U13930.1)
5	CFB103	OQ891328		100% (MT130970.1)
6	CFB104	OK086049		99,88% (MT130970.1)
7	CFB135	OK086050		100% (MT130970.1)
8	CFB172	OQ891329		98,31% (U13930.1)
9	CFB200	OQ891330		100% (MT130970.1)
10	CFB201	OQ891331		100% (MT130970.1)
11	CFB203	OQ891332		100% (MT130970.1)
12	CFB207	OQ891333		97,95% (MT130970.1)
13	CFB211	OQ891334		100% (MT130970.1)
14	CFB213	OQ891335		100% (MT130970.1)
15	CFB216	OQ891336		100% (MT130970.1)
16	CFB217	OQ891337		100% (MT130970.1)
17	CFB220	OQ891338		100% (MT130970.1)
18	CFB223	OQ891339		100% (MT130970.1)
19	CFB234	OK086052		99,88% (MT130970.1)
20	CFB225	OQ891340		100% (MT130970.1)

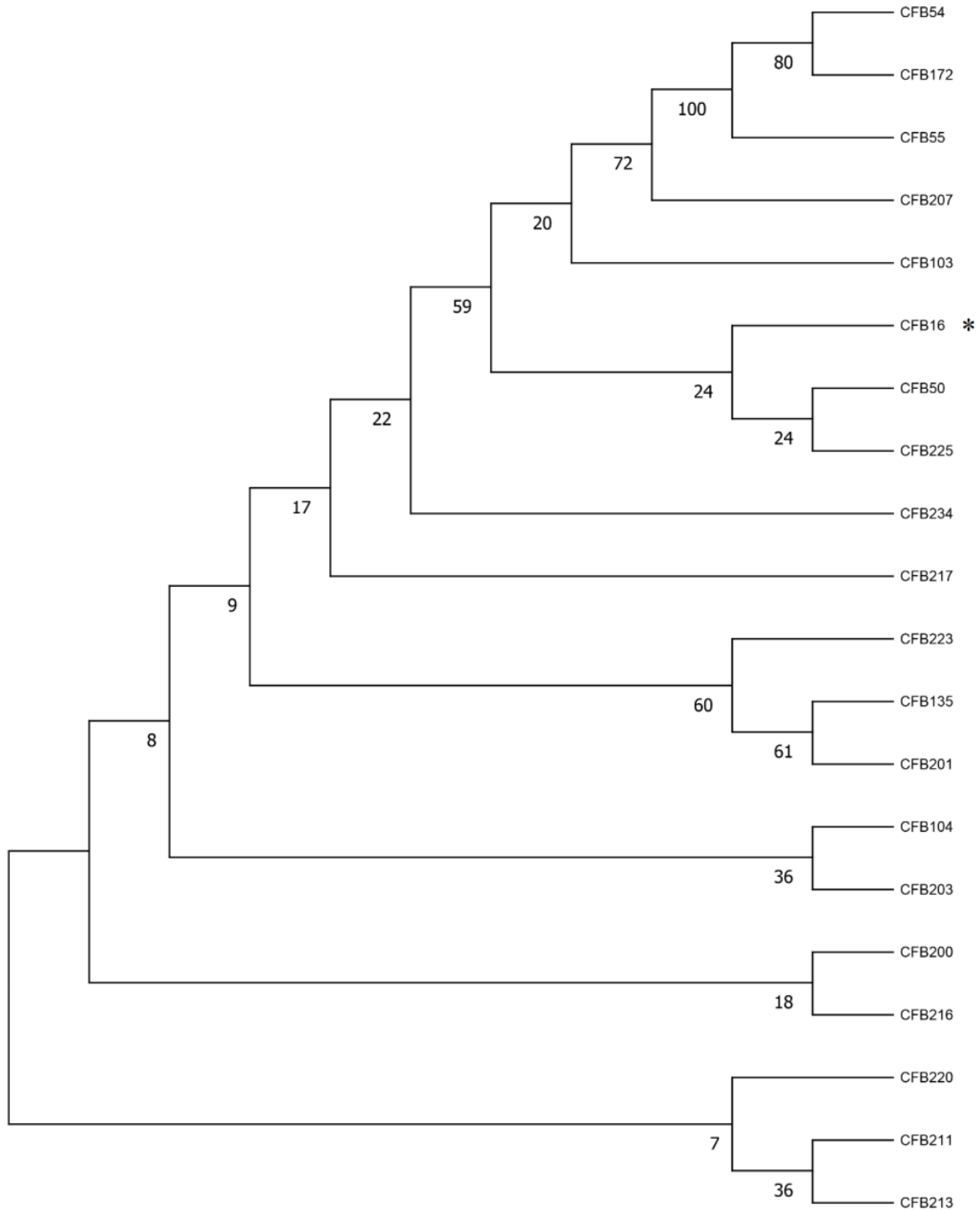
[†] Sự giống nhau giữa trình tự 18S rDNA của chủng CFB tìm ra trong nghiên cứu với trình tự có mức độ giống nhau cao nhất của các phân chủng bắt nguồn từ chủng *C. brenneri* CB5161 được công bố trên GenBank (NCBI).



Hình 2. Cá thể trưởng thành chủng *C. brenneri* CFB225. Con đực - hình trên; Con cái - hình dưới. Ảnh chụp bằng Camera Optika và xử lý bởi phần mềm OpticaView 7. Thước đo - 100 µm.

Phân tích phát sinh chủng loại bằng phương pháp Neighbor-joining với trình tự 18S rDNA của 20 chủng CFB cho thấy, những hệ số thống kê (bootstrap) thấp, có nghĩa là quan hệ này không hề đơn giản bởi vì sự khác nhau phức tạp giữa các trình tự ở những vị trí nucleotide

không giống nhau (hình 3). Điều này phân nào đó đúng với kết luận của Dey và đồng tác giả (2013) cho rằng, loài *C. brenneri* có sự đa dạng cao khi phân tích tính đa hình đột biến điểm trong toàn bộ hệ gen (Single Nucleotide Polymorphis) (Dey, *et al.*, 2013).



Hình 3. Mối quan hệ phát sinh của chủng *C. brenneri*. Trình tự 18S rDNA được giữ nguyên bản, không có sự cắt và ghép. * Chủng từ Vườn Quốc gia Cúc Phương. Những chủng còn lại từ Vườn Quốc gia Cát Tiên.

Như vậy, kết quả này phản ánh có sự đa dạng nhất định về chủng của loài *C. brenneri* phân lập từ hai vườn quốc gia, trong đó loài này phổ biến nhiều ở Cát Tiên hơn so với ở Cúc Phương. Rất có thể mô hình chênh lệch này còn đúng với nhiều loài tuyến trùng khác thuộc giống *Caenorhabditis*. Chúng tôi cho rằng số lượng chủng *C. brenneri* còn lớn hơn hiện tại nếu có nghiên cứu sâu rộng hơn ở những địa điểm khác ở Việt Nam, qua đó, sự đánh giá đa dạng chủng sẽ được toàn diện hơn. Vì vậy, hy vọng rằng *C. brenneri* có thể được sử dụng làm sinh vật mô hình nghiên cứu đa dạng phân tử thay thế cho mô hình phổ biến hiện tại là những tuyến trùng *Caenorhabditis* khác.

V. KẾT LUẬN

Kết quả cho thấy rằng, 19 chủng tuyến trùng *C. brenneri* đã được phân lập từ Vườn Quốc gia Cát Tiên và 01 chủng từ Cúc Phương. Giữa các chủng này có vẻ như không có sự khác biệt hình thái nổi trội có thể thấy. Mô tả phân loại phân tử mức độ 18S rDNA cho thấy có nhiều sự khác biệt nucleotide đơn lẻ giữa các trình tự nucleotide 18S rDNA dẫn tới tính đa dạng giữa các chủng đó.

Lời cảm ơn: Chúng tôi xin gửi lời cảm ơn chân thành tới cán bộ Vườn Quốc gia Cát Tiên và Cúc Phương đã hỗ trợ chúng tôi thu thập mẫu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Ahringer J., 2006. Reverse genetics. WormBook. WormBook, The *C. elegans* Research Community.
2. Barriere and D.H.A. Fitch, 2005. Natural variation and population genetics of *Caenorhabditis elegans*. <http://www.wormbook.org>.
3. Barriere A. and M.A. Felix, 2005. "High local genetic diversity and low outcrossing rate in *Caenorhabditis elegans* natural populations." *Curr Biol* 15(13): 1176-1184.
4. Barriere A., Felix, M. A., 2006. Isolation of *C. elegans* and related nematodes. WormBook. T. C. e. R. Community, WormBook: 1-9.
5. Brenner S., 1973. "The genetics of behaviour." *Br Med Bull* 29(3): 269-271.
6. *Caenorhabditis* Evolution Community, 2020. List of available *Caenorhabditis* species and the state of their genome projects.
7. Chen H.H., 2011. Impact of natural sequence variation on aging in the recombinant inbred lines of *Caenorhabditis elegans*, ProQuest, UMI Dissertation Publishing.
8. Croll N.A., J.M. Smith and B.M. Zuckerman, 1977. "The aging process of the nematode *Caenorhabditis elegans* in bacterial and axenic culture." *Exp Aging Res* 3(3): 175-189.
9. Dey A., C.K. Chan, C.G. Thomas and A.D. Cutter, 2013. "Molecular hyperdiversity defines populations of the nematode *Caenorhabditis brenneri*." *Proc Natl Acad Sci U S A* 110(27): 11056-11060.
10. Felix M.A., R. Jovelín, C. Ferrari, S. Han, Y.R. Cho, E.C. Andersen, A.D. Cutter and C. Braendle, 2013. "Species richness, distribution and genetic diversity of *Caenorhabditis* nematodes in a remote tropical rainforest." *BMC Evol Biol* 13(10): 1-13.
11. Gupta B.P., R. Johnsen and N. Chen, 2007. "Genomics and biology of the nematode *Caenorhabditis briggsae*." WormBook: 1-16.
12. Kanzaki N., I.J. Tsai, R. Tanaka, V.L. Hunt, D. Liu, K. Tsuyama, Y. Maeda, S. Namai, R. Kumagai, A. Tracey, N. Holroyd, S.R. Doyle, G.C. Woodruff, K. Murase, H. Kitazume, C. Chai, A. Akagi, O. Panda, H.M. Ke, F.C.

- Schroeder, J. Wang, M. Berriman, P.W. Sternberg, A. Sugimoto and T. Kikuchi, 2018. "Biology and genome of a newly discovered sibling species of *Caenorhabditis elegans*." *Nat Commun* 9(1): 3216.
13. Le T., T. Bui, B. Ha and T. Nguyen, 2023. "The abundance of parasitic nematodes *Halicephalobus* species (Nematoda: Rhabditida) invading humans and animals in national parks of Vietnam." *Vietnam J. Biotechnol.* 21(2): 9.
 14. Le T.S., T.T.H. Nguyen, B. Thi Mai Huong, H.G. Nguyen, B.H. Ha, V.S. Nguyen, M.H. Nguyen, H.H. Nguyen and J. Wang, 2021. "Cultivation of *Caenorhabditis elegans* on new cheap monoxenic media without peptone." *J Nematol* 53.
 15. Nuez I. and M.A. Felix, 2012. "Evolution of susceptibility to ingested double-stranded RNAs in *Caenorhabditis* nematodes." *PLoS One* 7(1): e29811.
 16. Sudhau W. and K. Kiontke, 2007. "Comparison of the cryptic nematode species *Caenorhabditis brenneri* sp. n. and *C. remanei* (Nematoda: Rhabditidae) with the stem species pattern of the *Caenorhabditis Elegans* group." *Zootaxa*(1456): 17.
 17. Tamura K., G. Stecher and S. Kumar, 2021. "MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11." *Mol Biol Evol* 38(7): 3022-3027.

Email tác giả liên hệ: sonlt@vnuf.edu.vn

Ngày nhận bài: 09/12/2023

Ngày phản biện đánh giá và sửa chữa: 03/01/2024

Ngày duyệt đăng: 10/01/2024