

KHẢO SÁT TÍNH KHÁNG RẦY NÂU (*NILAPARVATA LUGEN STAL*) TRÊN CÁC GIỐNG LÚA (*ORYZA SATIVA L.*) BẰNG HAI DẤU PHÂN TỬ RG457 VÀ RM190

Nguyễn Thị Diễm Thúy, Lê Vĩnh Thúc và Trần Nhân Dũng¹

ABSTRACT

*Evaluating 34 rice varieties of *Oryza sativa* L., in which two standard resistant varieties (PTB33 and OM4495) and one infected variety (TN1), obtained from Biotechnology Research and Development Institute, University of Can Tho and Mekong Delta Rice Institute resistance to brown planthopper (*Nilaparvata lugens* Stal) using molecular marker RG457, RM190 and standard seedling box test method of IRRI (1996). By using molecular marker RM190, there were 25 resistant varieties and nine infected varieties to brown planthopper with the band size of about 130bp and 120 bp, respectively. By using RG457 marker, there were five varieties showing resistant heterozygous genotype with the band size of about 200, 250, 350 and 600 bp, nine varieties carrying homozygous resistance with band size of about 200, 250 and 350 bp and 20 varieties carrying infected homozygous genotype with the band size of about 200 and 600 bp. In the 34 rice varieties, 13 varieties including OM4495 carrying two planthopper resistance genes of *bph4* (*Bph3*) and *Bph10* linked with two molecular markers RG457 and RM190, two varieties PTB33 and OM2395 carried only *Bph10* resistance gene linked with RG457, 12 varieties carried *bph4* (*Bph3*) gene linked with molecular marker RM190 and seven varieties including standard planthopper infected variety TN1 without carrying planthopper resistance gene above. Testing planthopper resistance of 34 rice varieties by standard seedling box test method of IRRI (1996), most of rice varieties carry planthopper resistant genes tested with two molecular marker RG457 and RM190 were serious planthopper infections of scale 7 to 9. Rice varieties OM6377, OM4103 and AS996 carrying resistance genes *bph4* (*Bph3*) and *Bph10* were slightly infected and resistant with brown planthopper from levels 3 - 5.*

Keywords: Brown planthopper, heterozygous, homozygous, molecular marker, rice

Title: Surveying to brown planthopper resistance (*Nilaparvata lugens stal*) of rice varieties by (*Oryza sativa L.*) using molecular marker RG457 and RM190

TÓM TẮT

*Khảo sát tính kháng rầy nâu (*Nilaparvata lugens* Stal) của ba mươi bốn giống lúa *Oryza sativa* L. thu thập từ Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Đại học Cần Thơ và Viện Lúa ĐBSCL trong đó có 2 giống chuẩn kháng (PTB33 và OM4495) và 1 giống chuẩn nhiễm (TN1) bằng dấu phân tử RG457 và RM190 và phương pháp hộp mạ của IRRI (1996). Đối với dấu phân tử RM190 có 25 giống thể hiện tính kháng rầy với kích thước băng khoảng 130 bp và 9 giống thể hiện tính nhiễm rầy với kích thước băng khoảng 120 bp. Kết quả kiểm tra bằng dấu phân tử RG457 cho thấy 5 giống mang kiểu gen dị hợp tử kháng gồm các giống với kích thước các băng khoảng 200, 250, 350 và 600 bp, 9 giống mang kiểu gen đồng hợp kháng gồm các giống với kích thước các băng khoảng 200, 250 và 350 bp và 20 giống mang kiểu gen đồng hợp nhiễm với kích thước các băng khoảng 200 và 600 bp. Trong 34 giống lúa có 13 giống lúa trong đó có giống OM4495 mang gen kháng rầy *Bph10* và *bph4* (*Bph3*) liên kết với 2 dấu phân tử RG457 và*

¹ Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ

RM190, 2 giống OM2395 và PTB33 chỉ mang gen kháng rầy Bph10 liên kết với dấu phân tử RG457, 12 giống chỉ mang gen kháng rầy bph4 (Bph3) liên kết với dấu phân tử RM190 và 7 giống kể cả giống chuẩn nhiễm TN1 không mang gen kháng. So với phương pháp đánh giá hộp mạ của IRRI (1996) hầu hết các giống lúa mang gen kháng rầy kiểm tra bằng 2 dấu phân tử RG457 và RM190 đều nhiễm nặng từ cấp 7 đến cấp 9. Giống lúa OM6377, OM4103 và AS996 mang gen kháng rầy Bph10 và bph4 (Bph3) thì nhiễm nhẹ và kháng nhẹ với rầy nâu từ cấp 3 - 5.

Từ khóa: Dấu phân tử, dị hợp tử, đồng hợp tử, lúa, rầy nâu

1 ĐẶT VẤN ĐỀ

Việc thâm canh ba vụ lúa ở ĐBSCL là nơi trú ngụ của nhiều loại sâu bệnh như rầy nâu, sâu cuốn lá nhỏ, sâu đục thân hai chấm, bọ xít dài, sâu năn và sâu phao, trong đó rầy nâu là một trong những tác nhân quan trọng. Rầy nâu (tên khoa học là *Nilaparvata lugens* Stal) là một trong những sâu hại lúa nghiêm trọng hàng đầu ở các quốc gia trồng lúa ở Châu Á (Brar *et al.*, 2009; Sun *et al.*, 2005). Theo Bùi Chí Bửu và Nguyễn Thị Lang (2003) thì ở Việt Nam rầy nâu làm giảm đáng kể năng suất lúa, có thể gây thiệt hại năng suất lên đến 60% hoặc có thể gây nên hiện tượng cháy rầy. Trong nhiều năm qua, giống lúa kháng rầy luôn luôn được tìm kiếm và sử dụng như IR2151, IR2153, IR26, IR28, IR30, TN73-2, việc sử dụng giống lúa kháng rầy một mặt làm giảm thiệt hại năng suất do rầy nâu gây ra, tiết kiệm chi phí phòng trừ, mặt khác hạn chế được việc dùng thuốc hóa học gây ô nhiễm môi trường và góp phần ổn định môi trường sinh thái. Tuy nhiên, vẫn không tránh khỏi hiện tượng cháy rầy, nguyên nhân là do nông dân sử dụng giống kháng không đúng cách đã làm xuất hiện những loại hình sinh học rầy nâu khác nhau trên đồng ruộng và khả năng mất tính kháng là điều không tránh khỏi. Chính vì thế, công tác tìm kiếm những giống lúa kháng rầy mới hiện nay vẫn là nhiệm vụ cấp thiết và được đặt lên hàng đầu đối với những nhà chọn giống không chỉ ở Việt Nam mà còn ở nhiều quốc gia khác (Luu Thị Ngọc Huyền *et al.*, 2003). Qua nhiều năm nghiên cứu, đã có rất nhiều dấu phân tử được tìm ra nhằm chọn lọc những giống lúa kháng rầy nâu phục vụ sản xuất như RM8213, RM5953 (Sun *et al.*, 2005), RM586, RM589 (Jarin *et al.*, 2010), RG457 (Ishii *et al.*, 1994, Nguyễn Thị Lang và Bùi Chí Bửu, 2003) và RM190 (Kawaguchi *et al.*, 2001). Trong các dấu phân tử kể trên, hai dấu phân tử RM190 và RG457 ngày càng được sử dụng rộng rãi tại Việt Nam đặc biệt là các tỉnh ĐBSCL. Trong những năm gần đây, có khá nhiều nghiên cứu về hai dấu phân tử này như các nghiên cứu về gen kháng rầy trên lúa của Nguyễn Thị Lang và Bùi Chí Bửu (2003), Trần Nhân Dũng *et al.* (2010), Luu Thị Ngọc Huyền (2010) vì theo Ishii *et al.* (1994), Nguyễn Thị Lang *et al.* (1999), Nguyễn Thị Lang và Bùi Chí Bửu (2004) thì dấu phân tử RG457 liên kết với gen kháng rầy nâu Bph10, có khả năng kháng với rầy nâu loại hình sinh học 2 và 3 và Ikeda and Vaughan (2006) cho rằng dấu phân tử RM190 liên kết với gen kháng rầy nâu bph4, có khả năng kháng với 4 loại hình sinh học rầy nâu. Tuy nhiên, sự phát triển mạnh mẽ của các loại hình sinh học rầy nâu trên đồng ruộng như hiện nay liệu rằng hai dấu phân tử này có còn mang lại hiệu quả trong công tác chọn tạo giống lúa kháng rầy nâu hiện hành hay không. Để kiểm chứng điều này, đề tài “Khảo sát tính kháng rầy nâu (*Nilaparvata lugens* Stal) trên 34 giống lúa (*Oryza sativa* L.) bằng hai dấu phân tử RG457 và RM190” sử dụng 2 dấu phân tử RG457

và RM190 với mục tiêu khảo sát tính kháng rầy nâu dựa trên hai dấu phân tử này thông qua so sánh với phương pháp đánh giá kiểu hình theo IRRI (1996).

2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1 Vật liệu

Ba mươi bốn giống lúa *Oryza sativa* L. (bao gồm 1 giống chuẩn nhiễm TN1 và 2 giống chuẩn kháng PTB33 và OM4495) (Bảng 1) thu thập từ Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học (Đại học Cần Thơ) và Viện Lúa ĐBSCL.

Bảng 1: Danh sách các giống lúa *Oryza sativa* L.

Stt	Tên Giống	Stt	Tên Giống	Stt	Tên Giống
1	OM5451	12	MTL495	23	OM8108
2	IR50404	13	MTL500	24	OM6932
3	OM5472	14	MTL645	25	OM1364
4	OM6377	15	OM4218	26	OM6706
5	AS996	16	OM576	27	OM4103
6	OM2395	17	OM6690	28	OM10037
7	OM6976	18	OM6018	29	OM8105
8	OMCS2000	19	OM6004	30	OM5886
9	NV1	20	OM2517	31	OM1400
10	HĐ1	21	OM10043		
11	MTL480	22	OM8923		
	TN1		Giống chuẩn nhiễm		
	PTB33		Giống chuẩn kháng		
	OM4495				

2.2 Phương pháp thí nghiệm

2.2.1 Đánh giá kiểu hình bằng phương pháp hộp mạ (IRRI, 1996)

Chuẩn bị lúa cho rầy ăn: giống lúa TN1 được sử dụng làm thức ăn cho rầy, lúa được 10 ngày tuổi thì bón phân theo công thức chung là 100:60:50 kg NPK/ha, khi lúa được khoảng 25 - 30 ngày tuổi, trồng lúa vào chậu, tỉa bớt lá sử dụng để nuôi rầy.

Nuôi rầy: rầy nâu trưởng thành được bắt đem về nuôi trong lồng lưới để sinh ấu trùng và khi trứng nở thành rầy cám tuổi 1 - 2 đồng thời với lúa ở giai đoạn 2 - 3 lá mầm (cao khoảng 10 cm) tiến hành thanh lọc. Rầy được nuôi trong lồng lưới bằng giống lúa TN1, rầy sinh trưởng và phát triển rất tốt trên giống lúa này.

Chuẩn bị khay bùn: bùn được cho vào khay, khay bùn được chuẩn bị trước khi gieo 1 ngày để mặt bùn được khô ráo, thuận tiện cho việc gieo hạt, sau đó dùng thước kẻ ô để thuận tiện cho việc gieo hạt.

Phương thức thực hiện

Thí nghiệm được bố trí với 2 đợt thí nghiệm, đợt 2 cách đợt 1 khoảng 30 ngày. Mỗi đợt thí nghiệm bố trí với 3 lần lặp lại với 30 hạt/giống, mỗi lần lặp lại 10 hạt. Lấy mỗi giống 45 - 50 hạt, gói vào giấy báo (đánh số thự tự), sau đó đem ngâm sốc nhiệt (3 sôi, 2 lạnh) trong 15 phút, đem ủ 48 giờ đến khi hạt giống nảy mầm đều. Sau khi các giống lúa nảy mầm đều, tiến hành cấy vào khay bùn (đã chuẩn bị sẵn), cấy từng tự từng giống vào khay theo hình nón, đến khi hết các giống lúa ở mỗi

khay, sau đó đánh số thứ tự từng giống để thuận tiện cho việc kiểm tra và đánh giá kết quả (*Số hạt giống còn lại của mỗi giống đem ủ để trích DNA*). Đặt kín khay bùn để giúp mầm lúa phát triển đều, đạt chiều cao khoảng 2 cm, cho khay vào hộp mạ, theo dõi những hạt không lên để cấy dặm. Khi mạ được 2 - 3 lá mầm (khoảng 7 - 10 ngày sau khi gieo) tiến hành thả rầy tuổi 1 - 2 với mật độ 4 - 6 con/cây (Nguyễn Thị Lang và Bùi Chí Bửu, 2002) và theo dõi đánh giá kết quả.

Chỉ tiêu theo dõi

Khi giống chuẩn nhiễm (TN1) chết 100% do rầy gây hại, tiến hành đánh giá sự gây hại của rầy nâu theo thang điểm chín cấp của IRRI (1996).

2.2.2 Phương pháp đánh giá dựa vào dấu phân tử

Ly trích DNA

DNA lá lúa được trích theo quy trình mô tả bởi Rogers và Bendich (1988) (có hiệu chỉnh). Lá non của các giống lúa được thu riêng biệt và được khử trùng bằng cồn 70%. Tiếp theo đó, lá lúa được cắt thành từng đoạn ngắn và cho vào tube 2ml lượng khoảng 0,1g, cho vào mỗi tube 1 viên bi, sau đó ngâm các tube vào Nitơ lỏng trong 15 phút. Nghiền mẫu 3 - 4 lần bằng máy nghiền mẫu, 27lần/giây trong 30 giây. Cho vào 1ml (EB+β-mercapto ethanol) + 50μl SDS 10%. Ủ ở 65°C trong 30 phút, đảo tube 5phút/lần. Ly tâm 13000rpm/phút, trong 10 phút. Lấy 800μl dịch trong cho vào tube mới. Thêm 800μl isopropanol để trầm hiện DNA, lắc nhẹ. Ủ trong tủ lạnh -20°C trong 2 giờ. Ly tâm 13000rpm/phút trong 10 phút, lấy phần trầm hiện, đổ bỏ phần nước. Thêm 400μl TE 0.1 để hoà tan DNA. Thêm 400μl CTAB và ủ ở 65°C trong 15 phút. Thêm 800μl Chloroform: isoamylalcohol (24:1). Ly tâm 13000rpm/phút, trong 5 phút. Rút lấy phần trên (700μl) cho vào tube mới. Cho vào 1,4ml Ethanol 96% làm lạnh, để 15 phút ở nhiệt độ phòng. Ly tâm 13000rpm/phút trong 10 phút, bỏ phần nước. Cho vào 700μl cồn 70% ly tâm 13000rpm/phút trong 10 phút, đổ nước (*thực hiện thao tác này 2 lần*). Sấy chân không ở 45°C trong 10 phút. Cho vào 200μl TE 0.1 trữ ở -20°C. Chạy điện di kiểm tra độ tinh sạch của DNA trên gel Agarose 0,8%. Sản phẩm được chụp hình gel bằng máy chụp hình và đọc gel BioRad UV. Nếu EtBr đã được hợp nhất trên gel agarose thì DNA có thể được phát hiện dưới đèn UV khi kiểm tra bằng máy BioRad UV.

Phản ứng PCR

Primer: Thực hiện phản ứng PCR lần lượt với từng cặp primer RG457, RM190 (Bảng 2) được thiết kế từ các dấu phân tử tương ứng.

Bảng 2: Thông tin về primer RG457 và RM190

Mũi	Trình tự	NST	Gen	Tm
RG457FL	5'GCAGTGGCAGATGGGATCGT 3'	12	<i>Bph10</i>	62°C
RG457RL	5'GCTCCGAAATCCCAAGCGAT 3'			
<i>(Nguyễn Thị Lang et al., 1999)</i>				
RM190FL	5'CTTTGTCTATCTCAAGACAC 3'	6	<i>bph4</i> <i>(Bph3)</i>	50°C
RM190RL	5'TTGACAGATGTTCTTCCTGATG 3'			
<i>(Jairin et al., 2007)</i>				

Đối với primer RG457: Thể tích phản ứng PCR 25μl bao gồm: 16,6μl BiH₂O, 3μl Buffer ABgen 10X, 1μl dNTPs 20mM, 2μl MgCl₂ 25mM, 0,5μl *Taq* polymerase (5U/μl), 0,2μl mỗi primer xuôi và ngược 100 pmol/μl, 1,5μl DNA 50 ng/μl với

chu kỳ gia nhiệt của phản ứng PCR ở 95⁰C trong 5 phút, sau đó lặp lại 35 chu kỳ như sau: biến tính DNA ở 94⁰C trong 1 phút, gắn mồi vào khuôn ở 62⁰C trong 45 giây, kéo dài ở 72⁰C trong 2 phút. Cuối cùng phản ứng duy trì ở 72⁰C trong 7 phút. Chạy điện di kiểm tra sản phẩm PCR với nồng độ agarose là 1,5% ở 5V/cm trong 60 phút.

Đối với primer RM190: Thể tích phản ứng PCR 25µl bao gồm: 11µl BiH₂O, 2,5µl Buffer ABgen 10X, 4µl dNTPs 20mM, 3µl MgCl₂ 25mM, 0,25µl *Taq* polymerase (5U/µl), 1µl mỗi primer xuôi và ngược 100 µmol/µl, 0,25µl BSA 10X, 2µl DNA 50 ng/µl với chu kỳ gia nhiệt của phản ứng PCR ở 95⁰C trong 5 phút, sau đó lặp lại 35 chu kỳ: biến tính DNA ở 95⁰C trong 30 giây, gắn mồi vào khuôn ở 50⁰ trong 30 giây, kéo dài ở 72⁰C trong 1 phút. Cuối cùng phản ứng duy trì ở 72⁰C trong 10 phút. Chạy điện di kiểm tra sản phẩm PCR với nồng độ agarose là 3% ở 5V/cm trong 2 giờ 30 phút.

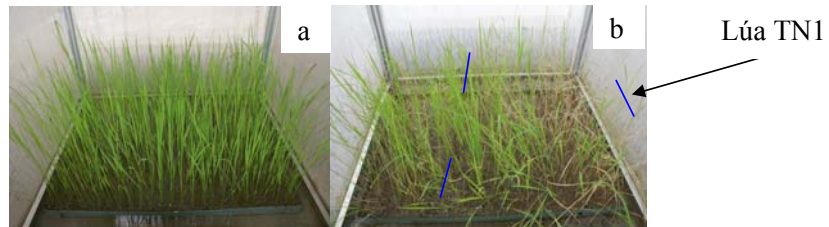
Cắt bằng enzyme giới hạn

Đối với primer RG457 sản phẩm PCR (DNA STS) được cắt bằng enzyme *HinfI* (có trình tự cắt là G/ANTC) với công thức được thể hiện như sau: 6µl DNA STS, 4µl enzyme *HinfI* 10U/µl (Invitrogen), 2µl RC buffer (50mM Tris-HCl pH 7.5, 0.1mM EDTA, 10mM 2-mercaptoethanol, 500µg/ml BSA, 50% (v/v) glycerol), thêm BiH₂O vào cho đủ thể tích 20µl, rồi đem ủ ở 37⁰C trong 16 giờ. Kiểm tra sản phẩm cắt bằng gel agarose 2% với hiệu điện thế 5V/cm trong 1 giờ 30 phút.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Đánh giá tính kháng rầy bằng phương pháp hộp mạ theo IRRI (1996)

Lúa sau khi gieo được 10 ngày (Hình 1a) được 2 - 3 lá mầm, tiến hành thả rầy để đánh giá kết quả. Sau 10 ngày thanh lọc giống chuẩn nhiễm TN1 chết 100%, kết quả cho thấy sự gây hại của rầy thể hiện ở các mức độ khác nhau trên từng giống lúa (Hình 1b).



Hình 1: Lúa trước (a) và sau (b) thanh lọc

Bảng 3: Bảng tổng hợp kết quả đánh giá kiểu hình 34 giống lúa *Oryza sativa* L.

	Mức độ kháng rầy của các giống lúa					
Cấp	0	1	3	5	7	9
Số giống			7	2	13	12

Ghi chú:

0: Rất kháng; 1: kháng; 3: kháng nhẹ; 5: nhiễm nhẹ; 7: nhiễm;

9: nhiễm nặng

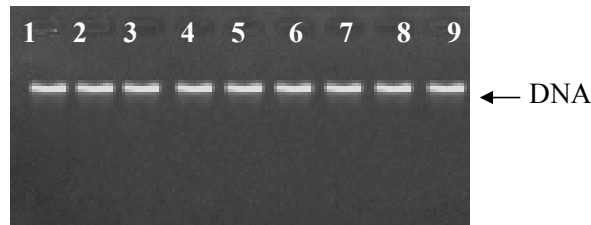
Khi so sánh kết quả thanh lọc của thí nghiệm với kết quả thanh lọc từ Trần Nhân Dũng *et al.* (2010) cho thấy, một vài giống lúa thể hiện mức độ gây hại của rầy nâu

tăng từ 2 đến 3 cấp, một số giống tăng 4 đến 6 cấp như giống HĐ1, OM1364, OM1400. Điều này thể hiện độc tính của rầy đã tăng lên, gây thiệt hại cho cây lúa. Giống TN1 (giống chuẩn nhiễm) thể hiện mức độ nhiễm rầy cấp 9. Kết quả này phù hợp với kết quả của Nguyễn Thị Hồng Thúy (2008) và Bùi Thị Kim Vi (2010). Giống PTB33 thể hiện mức độ nhiễm rầy cấp 5 - 7, cấp độ nhiễm rầy của giống PTB33 đã tăng lên. Theo Tiến sĩ Lương Minh Châu đã ghi nhận giống PTB33 là giống lúa kháng rầy nâu được chọn làm giống chuẩn kháng cho công tác nghiên cứu, biểu hiện tính kháng cấp 0, cấp 1 liên tục suốt 20 năm qua ở ĐBSCL. Nhưng trong các đợt thí nghiệm bộc phát rầy nâu lần này, PTB33 biểu hiện cấp 5, và thí nghiệm của đề tài giống PTB33 biểu hiện cấp độ cao hơn, cấp 5 - 7. Điều này chứng tỏ độc tính rầy nâu đã thay đổi và có độc tính cao hơn.

3.2 Kết quả đánh giá tính kháng rầy bằng dấu phân tử

3.2.1 Kết quả ly trích DNA

Sản phẩm DNA sau khi được kiểm tra trên gel agarose 0,8% cho thấy hầu hết các mẫu sau khi ly trích đều có vạch DNA sáng và rõ (Hình 2), ít bị nhiễm tạp chất như chloroform hay protein thể hiện ở kết quả đo quang phổ, tỷ lệ OD₂₆₀/OD₂₈₀ từ 1,8 đến 2,1. Sản phẩm DNA sau khi ly trích được bảo tồn và lưu giữ ở -20°C và được sử dụng trong những bước nghiên cứu tiếp theo.

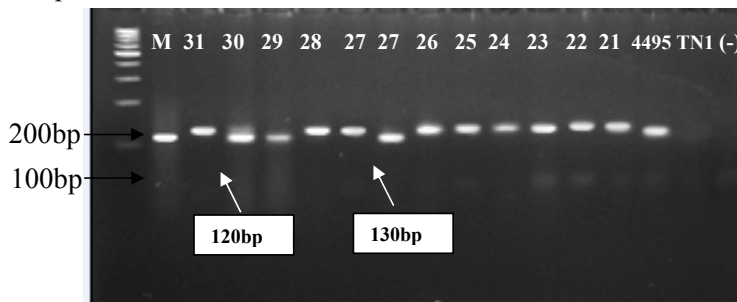


Hình 2: Kết quả kiểm tra DNA

3.2.2 Kết quả kiểm tra sản phẩm PCR

Đối với dấu phân tử RM190

Kết quả từ hình gel cho thấy đoạn DNA thu được có kích thước khoảng 120bp và 130bp (Hình 3). Kết quả này phù hợp với kết quả của Trần Nhân Dũng *et al.* (2010) khi kiểm tra sản phẩm PCR bằng dấu phân tử RM190, những giống mang gen kháng rầy nâu sẽ liên kết với gen *bph4* thể hiện trên gel với band khoảng 130bp và những giống không mang gen kháng rầy nâu sẽ thể hiện trên gel với band 120bp.



Hình 3: Sản phẩm PCR-RM190

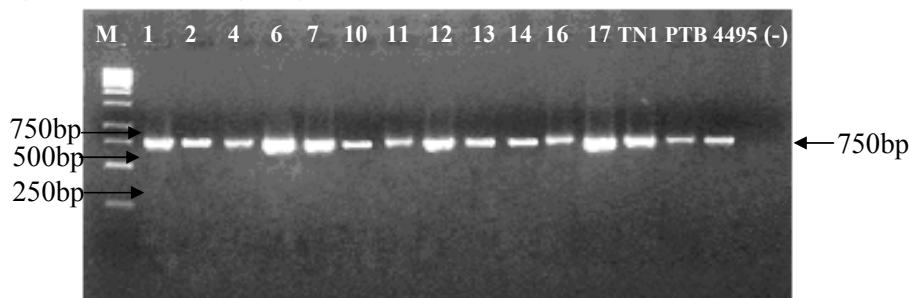
M: thang chuẩn 100bp, (-): mẫu đối chứng âm.

Kết quả sản phẩm PCR đối với dấu phân tử RM190 cho thấy có 09 giống thể hiện với band khoảng 120bp (thể hiện tính nhiễm rầy) là những giống TN1 (đối chứng nhiễm), PTB33, OM2395, MTL480, OM2517, OM6706, OM10037, OM8105, OM1400 và có 25 giống với band 130bp (thể hiện tính kháng rầy) là những giống OM4495 (đối chứng kháng), OM5451, IR50404, OM5472, OM6377, AS996, OM6976, OMCS2000, NV1, HD1, MTL495, MTL500, MTL645, OM4218, OM576, OM6690, OM6018, OM6004, OM10043, OM8923, OM8108, OM6932, OM1364, OM4103, OM5886.

Trong đó, những giống mang gen kháng rầy nâu *bph4* liên kết với dấu phân tử RM190 phù hợp với kết quả của Trần Nhân Dũng *et al.* (2010). Các giống mang gen kháng rầy như giống OM5451, OM5472, OM6976, OMCS2000, HD1, MTL645, OM6690, OM6004, OM10043, OM8923, OM6932, OM8108, OM1364, OM4103, OM5886 thể hiện với band 130bp, các giống không mang gen kháng như OM2517, OM8105, OM1400 thể hiện với band 120bp. Tuy nhiên, một số giống thể hiện tính nhiễm rầy OM2395, OM6706, OM10037 với band 120 bp, trong khi kết quả của Trần Nhân Dũng *et al.* (2010) thể hiện tính kháng rầy với band 130 bp.

Đối với dấu phân tử RG457

Kết quả phổ điện di trên gel Hình 4 cho thấy khi thực hiện phản ứng PCR sử dụng cặp mồi RG457FL/RL thì đoạn DNA được khuếch đại có kích thước khoảng 750 - 800 bp, thể hiện một băng rõ nét khi chụp dưới tia U.V. Kết quả này phù hợp với kết quả của Nguyễn Thị Lang (1999), Nguyễn Văn Tú (2010), Bùi Thị Kim Vi (2010), Phạm Văn Một (2010).



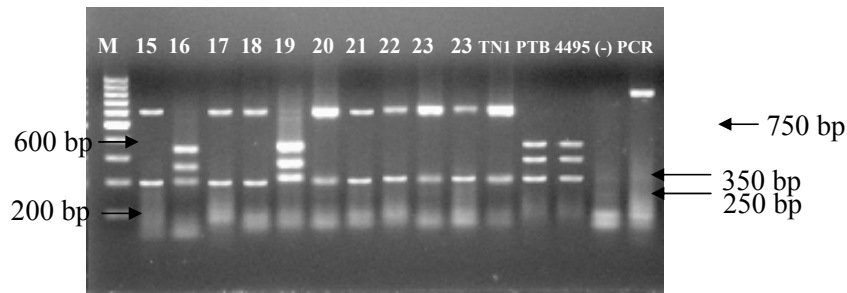
Hình 4: Hình gel kiểm tra sản phẩm PCR-RG457

Mẫu 1, 2, 4, 6, 7, 10 đến 14, 16, 17, TN1, PTB33, OM4495. M là thang chuẩn 1kb, (-) là mẫu đối chứng âm.

Kết quả sản phẩm PCR sử dụng dấu phân tử RG457 như trên thể hiện sự đa hình không cao vì thế cần được cắt bằng enzym *HinfI* để xác định được giống lúa nào là kháng hay nhiễm rầy nâu.

3.2.3 Kết quả cắt bằng enzym *HinfI* đối với dấu phân tử RG457

Kết quả sản phẩm DNA STS được cắt bằng enzym *HinfI* thể hiện trên gel khi chụp dưới tia U.V với 2, 3, 4 band của từng giống rõ, đẹp (Hình 5). Kết quả này phù hợp với kết quả Nguyễn Thị Lang (1999), Nguyễn Thị Cẩm Nhung (2009), Nguyễn Văn Tú (2010), Bùi Thị Kim Vi (2010). Kết quả sản phẩm DNA STS cho thấy bên dưới những band chính còn band phụ mờ. Tuy nhiên, mẫu đối chứng âm cũng có những vệt như thế, cho thấy các vệt sáng mờ này không ảnh hưởng đến sản phẩm cắt bằng enzym.



Hình 5: Kết quả cắt DNA STS bằng enzyme *HinfI*.

M: thang chuẩn 100 bp, (-): mẫu đối chứng âm, PCR là mẫu không sử dụng enzyme cắt.

Qua kết quả thể hiện trên hình gel chụp dưới tia UV khi cắt bằng enzyme *HinfI* cho thấy có 5 giống mang gen dị hợp kháng bao gồm các giống IR50404, OM6377, AS996, OM6976 và OM4103, enzyme *HinfI* cắt sản phẩm PCR tạo ra 4 band với chiều dài tương ứng khoảng 200 bp, 250 bp, 350 bp và 600 bp. 9 giống mang gen đồng hợp kháng bao gồm các giống OM5451, OM5472, OM2395, OMCS2000, OM576, OM1364, OM5886, PTB33 (đối chứng kháng), OM4495 (đối chứng kháng), enzyme *HinfI* cắt sản phẩm PCR tạo ra 3 band với chiều dài tương ứng khoảng 200 bp, 250 bp và 350 bp và 20 giống không mang gen kháng bao gồm NV1, HĐ1, MTL480, MTL495, MTL500, MTL645, OM4218, OM6690, OM6018, OM6004, OM2517, OM10043, OM8923, OM8108, OM6932, OM6706, OM10037, OM8105, OM1400 và TN1 (đối chứng nhiễm), enzyme *HinfI* cắt sản phẩm PCR tạo ra 2 band với chiều dài tương ứng khoảng 200 bp và 600 bp.

Kết quả cho thấy giống TN1 (giống chuẩn nhiễm) mang kiểu gen nhiễm với kết quả cắt bằng enzym *HinfI* thể hiện 2 band. Kết quả này phù hợp với kết quả Nguyễn Thị Cẩm Nhung (2009), Bùi Thị Kim Vi (2010), Nguyễn Văn Tú (2010). Giống PTB33 (giống chuẩn kháng) mang kiểu gen đồng hợp kháng với kết quả cắt bằng enzym *HinfI* thể hiện 3 band. Kết quả này phù hợp với kết quả Bùi Thị Kim Vi (2010), Nguyễn Văn Tú (2010). Giống OM4495 (giống chuẩn kháng) mang kiểu gen đồng hợp kháng với kết quả cắt bằng enzym *HinfI* thể hiện 3 band. Kết quả này phù hợp với kết quả Nguyễn Thị Cẩm Nhung (2009).

3.2.4 Kết quả về gen kháng rầy của các giống lúa *Oryza sativa L.* trên 2 dấu phân tử RG457 và RM190

Có tất cả 13 giống lúa mang gen kháng rầy *Bph10*, *bph4* (*Bph3*) liên kết với 2 dấu phân tử RG457 và RM190 bao gồm OM5451, IR50404, OM5472, OM6377, AS996, OM6976, OMCS2000, OM576, OM6004, OM1364, OM4183, OM5886, OM4495 (đối chứng kháng), 2 giống OM2395, PTB33 chỉ mang gen kháng rầy *Bph10* liên kết với dấu phân tử RG457, 12 giống NV1, HĐ1, MTL495, MTL500, MTL645, OM4218, OM6690, OM6018, OM10043, OM8923, OM8108 và OM6932 chỉ mang gen kháng rầy *bph4* (*Bph3*) liên kết với dấu phân tử RM190 và 7 giống lúa không mang gen kháng rầy *Bph10*, *bph4* (*Bph3*).

Kết quả tổng hợp tại Bảng 4 cho thấy, hầu hết các giống lúa mang gen kháng rầy *Bph10* và *bph4* (*Bph3*) đều nhiễm rầy với mức độ nặng (trên cấp 5), chỉ vài giống lúa mang các gen kháng nêu trên là nhiễm nhẹ và kháng nhẹ với rầy nâu như OM6377 (cấp 5), OM4103 (cấp 5) và AS996 (cấp 3 - 5). Các giống mang gen kháng rầy trước đây giờ đã bị nhiễm rầy rất nặng như IR50404, OM1364. Điều

này có thể thấy rầy nâu đã thay đổi độc tính theo thời gian, độc tính rầy ngày càng tăng thêm thể hiện ở mức độ nhiễm rầy trên các giống lúa thí nghiệm. Bên cạnh đó, một số giống không mang gen kháng lại thể hiện tính kháng như OM6706, OM10037, OM8105. Điều này có thể do bản thân các giống này chứa gen kháng nào đó (không phải *bph4* (*Bph3*) và *Bph10*) kháng với rầy nâu hiện hành, cần phải nghiên cứu thêm. Một số giống mang một trong các gen kháng trên cũng thể hiện tính kháng nhẹ là OM10043 và OM8923 mang gen *bph4* (*Bph3*), OM2395 mang gen *Bph10*.

Bảng 4: Các giống lúa mang cả 2 gen kháng *Bph10* và *bph4*

Stt	Tên giống	RG457	RM190	Cấp kháng	Độc tính kháng rầy
1	OM4495	++	+	7-9	Nhiễm nặng
2	IR50404	+-	+	7-9	Nhiễm nặng
3	OM1364	++	+	7-9	Nhiễm nặng
4	OM6004	++	+	5-7	Nhiễm vừa
5	OM5451	++	+	5-7	Nhiễm vừa
6	OM5472	++	+	5-7	Nhiễm vừa
7	OM6976	+-	+	5-7	Nhiễm vừa
8	OMCS2000	++	+	5-7	Nhiễm vừa
9	OM576	++	+	5-7	Nhiễm vừa
10	OM6377	+-	+	5	Nhiễm nhẹ
11	OM4103	+-	+	5	Nhiễm nhẹ
12	AS996	+-	+	3-5	Kháng nhẹ

Ghi chú: ++: đồng hợp tử kháng;

+ -: dị hợp tử kháng;

4 KẾT LUẬN

Kết quả có 2 giống nhiễm rất nặng (cấp 9) (bao gồm chuẩn nhiễm TN1), chiếm 6%, 10 giống nhiễm nặng (từ cấp 7 đến 9) (bao gồm chuẩn kháng OM4495), chiếm 29%, 15 giống nhiễm vừa và nhiễm nhẹ (từ cấp 5 đến 7) (bao gồm chuẩn kháng PTB33), chiếm 44%, 7 giống kháng nhẹ (từ cấp 3 đến 5), chiếm 21%, không có giống lúa rất kháng hay kháng rầy cấp độ 0 và cấp độ 1 - 3.

Kết quả có 13 giống (bao gồm chuẩn kháng OM4495) mang gen kháng rầy *Bph10* và *bph4* (*Bph3*) chiếm 38%, 2 giống (bao gồm giống chuẩn kháng PTB33) chỉ mang gen kháng rầy *Bph10* liên kết với dấu phân tử RG457 chiếm 6%, 12 giống chỉ mang gen kháng rầy *bph4* (*Bph3*) liên kết với dấu phân tử RM190 chiếm 35% và 7 giống (bao gồm chuẩn nhiễm TN1) không mang gen kháng rầy chiếm 21%.

Hầu hết các giống lúa mang gen kháng rầy *Bph10* và *bph4* (*Bph3*) đều nhiễm rầy với mức độ nặng (trên cấp 5). Các giống lúa OM6377, OM4103 và AS996 mang gen kháng rầy *Bph10* và *bph4* (*Bph3*) nhiễm nhẹ và kháng nhẹ với rầy nâu cấp 3-5, đây sẽ là nguồn vật liệu cho công tác chọn tạo giống lúa mới phục vụ cho công tác nghiên cứu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Brar, D.S, P.S. Virk, K.K. Jena, and G.S. Khush. 2009. Breeding for resistance to planthopper in rice. International Rice Research Institute, pp 401-428.

- Bùi Thị Kim Vi. 2010. *Thanh lọc các giống lúa kháng rầy ở Thành phố Cần Thơ và trích DNA*. Luận án Thạc sĩ, Viện NC&PT Công nghệ Sinh học, Đại học Cần Thơ.
- Buu, B.C. and N.T. Lang. 2003. Application of molecular markers in rice breeding in the Mekong Delta of Vietnam. *In Advances in Rice Genetics*. IRRI, Philippines, 216-220.
- Ikeda, R. and D.A. Vaughan. 2006. *The distribution of resistance genes to brown planthopper in rice germplasm*. IRRI, P.O. Box 933, Manila, Philippines.
- IRRI. 1996. The Standard Evaluation System for Rice IRRI. Los Banos, Philippines
- Ishii, T, D.S. Brar, D.S. Multani, and G.S. Khush. 1994. Molecular tagging of genes for brown planthopper resistance and earliness introgressed from *Oryza australiensis* into cultivated rice, *O. sativa*. *Genome* 37: 217-221.
- Jairin, J, K. Sansen, W. Wongboon and J. Kothcharerk. 2010. Detection of a brown planthopper resistance genes *bph4* at the same chromosomal position of *Bph3* using two different genetic backgrounds of rice. *Breeding Science* 60: 71-75.
- Jairin, J, S. Teangdeerith, P. Leelagud, K. Phengrat, A. Vanavichit and T. Toojinda. 2007. Detection of Brown Planthopper Resistance Genes from Different Rice Mapping Populations in the Same Genomic Location. *ScienceAsia* 33 (2007): 347-352.
- Kawaguchi, M., K. Murata, T. Ishii, S. Takumi, and N. Mori. 2001. Assignment of a brown planthopper (*Nilaparvata lugens* S.) resistance gene to the rice chromosome 6. *Breed. Scri.* 51: 13-19.
- Lang, N.T. and B. C. Buu. 2004. Quantitative analysis of amylose content by DNA markers through backcross populations of rice (*Oryza sativa* L.). *Omon rice* 12, pp. 12-17.
- Lang, N.T. and B.C. Buu. 2003. Genetic And Physical Maps Of Gene *Bph10* Controlling Brown Plant Hopper Resistance In Rice (*Oryza sativa* L.). *Omonrice* 11: 35-40.
- Lang, N.T., D. Barr, G.S. Khush, Ning Huang, and B.C. Buu. 1999. Development of STS Markers to Identify Brown Planthopper resistance in a Segregating Population. *Omonrice* 7: 27-38.
- Luu Thị Ngọc Huyền, Vũ Đức Quang và Thiều Văn Đường. 2003. Định vị các gen kháng rầy nâu BPH4 và BPH6 trên nhiễm sắc thể lúa. *Tạp chí di truyền học và ứng dụng*, số 2, tr. 29-33.
- Luu Thị Ngọc Huyền. 2010. Tạo giống lúa thuần kháng rầy nâu bằng công nghệ chỉ thị phân tử. http://www.agrobiotech.gov.vn/web/tin.aspx?sdm_id=10888&id=721.pdf (ngày 20/9/2011).
- Nguyễn Thị Cẩm Nhung. 2009. *Sử dụng dấu phân tử phát hiện gen kháng rầy nâu trên một số giống lúa ở ĐBSCL*. Luận văn tốt nghiệp Đại học, Khoa Khoa học, Đại học Cần Thơ.
- Nguyễn Thị Hồng Thúy. 2008. *Ứng dụng Marker phân tử trong chọn giống lúa kháng rầy nâu*. Luận án Thạc sĩ, Viện NC&PT Công nghệ Sinh học, Đại học Cần Thơ.
- Nguyễn Thị Lang và Bùi Chí Bửu. 2002. *Thiết lập bản đồ gen rầy nâu trên quần thể F2 cây lúa Oryza sativa. L.* <http://www.lrc.ctu.edu.vn/pdoc/54/20raynau.pdf> (ngày 16/8/2011).
- Nguyễn Văn Tú. 2010. *Thanh lọc các giống lúa mang gen kháng rầy nâu bằng dấu phân tử DNA*. Luận án Thạc sĩ, Viện NC&PT Công nghệ Sinh học, Đại học Cần Thơ.
- Phạm Văn Một. 2010. *Thanh lọc và sử dụng dấu phân tử nhằm phát hiện các giống lúa mang gen kháng rầy nâu ở Cần Thơ*. Luận văn tốt nghiệp Đại học, Viện NC&PT Công nghệ Sinh học, Đại học Cần Thơ.
- Rogers, S.O. and A.J. Bendich. 1988. Extraction of DNA from plant tissues. *Plant Molecular Biology Manual* A6: 1-10.
- Sun, L, C. C. Su, C.Wang, H. Zhai and J. Wan. 2005. Mapping of a major resistance gene to the Brown Planthopper to the Rice cultivar Rathu Heenati. *Breeding Science* 55: 391-396.
- Trần Nhân Dũng, Lý Tiến, Nguyễn Vũ Linh và Trần Thị Xuân Mai. 2010. Khảo sát một số chỉ thị phân tử dùng trong chọn tạo các giống lúa kháng rầy nâu (*Nilaparvata lugens* Stal) ở vùng ĐBSCL. *Tạp chí Công nghệ sinh học* 8(3A): 573-579.