



DOI:10.22144/ctu.jsi.2019.005

PHÂN TÍCH ĐẶC ĐIỂM HÌNH THÁI VÀ TRÌNH TỰ VÙNG ITS CỦA RẦY NÂU (*Nilaparvata lugens* STAL.) Ở TỈNH ĐỒNG THÁP, VINH LONG, CẦN THƠ VÀ HẬU GIANG

Lâm Thị Huyền Trân¹, Trần Văn Bé Năm² và Đỗ Tấn Khang^{2*}

¹Khoa Khoa học Nông nghiệp, Trường Đại học Cửu Long

²Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ

*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Đỗ Tấn Khang (email: dtkhang@ctu.edu.vn)

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 13/11/2018

Ngày nhận bài sửa: 24/01/2019

Ngày duyệt đăng: 12/04/2019

Title:

Study on morphological characteristics and ITS sequences of brownplant hoppers (*Nilaparvata lugens* STAL.) in Dong Thap, Vinh Long, Can Tho and Hau Giang provinces

Từ khóa:

Hình thái, *Nilaparvata lugens*, rầy nâu, trình tự ITS

Keywords:

Brown plant hopper, ITS sequence, morphology, *Nilaparvata lugens*, phylogeny

ABSTRACT

The study was conducted to compare morphological characteristics of brown plant hopper lines in various ecological regions, simultaneously compare the internal transcribed spacer (ITS) region in the genome of the species. Thirty-six samples were collected and compared the phenotypes. The results showed that the differences in morphological features were not recorded among brown plant hopper populations collected from four areas including Dong Thap, Vinh Long, Can Tho and Hau Giang, and there was no differences with previous reports. Fourteen nucleotide sequences obtained from DNA sequencing were checked and analyzed with the software Bio-Edit V.7.0. After that, the PAUP* 4.0 program was employed to construct the phylogenetic tree which was generated with CI = 0.667 and RI = 0.7222. The genetic tree showed that clustering was very clear between the samples collected in alluvial soil regions (Group C with the samples 3VL, 6VL, 21VLHT and 7HG) and acid soil areas (Group D with the samples 34DTHT, 28HGHT, 32DTHT, 11HG, 9HG, 35DTHT), but not between the Winter-Spring and the Summer-Autumn crops.

TÓM TẮT

Đề tài được thực hiện nhằm so sánh đặc điểm hình thái của các chủng rầy nâu ở các vùng sinh thái khác nhau, đồng thời so sánh trình tự vùng ITS trong bộ gen của các chủng. Ba mươi sáu mẫu được thu thập và so sánh hình thái. Kết quả cho thấy không có khác biệt hình thái giữa các quần thể rầy nâu thu ở bốn tỉnh Đồng Tháp, Vĩnh Long, Cần Thơ và Hậu Giang và cũng không có sự khác biệt khi so sánh với mô tả của các nghiên cứu trước. Mười bốn chuỗi nucleotide sau khi giải trình tự được kiểm tra và phân tích bằng phần mềm Bio-Edit phiên bản 7.0. Sau đó, phần mềm PAUP* 4.0 được sử dụng để vẽ cây phát sinh chủng loại. Kết quả được gián đồ với chỉ số CI (Consistency Index) = 0,667 và RI = 0,7222. Giản đồ phát sinh chủng loại cho thấy có sự phân nhóm khá rõ giữa các mẫu rầy thu ở vùng đất phù sa (nhóm C với các mẫu 3VL, 6VL, 21VLHT và 7HG) và vùng đất phèn (nhóm D với các mẫu 34DTHT, 28HGHT, 32DTHT, 11HG, 9HG, 35DTHT). Sự khác biệt thời tiết giữa hai vụ Đông Xuân và Hè Thu không ảnh hưởng đến sự phân nhóm.

Trích dẫn: Lâm Thị Huyền Trân, Trần Văn Bé Năm và Đỗ Tấn Khang, 2019. Phân tích đặc điểm hình thái và trình tự vùng ITS của rầy nâu (*Nilaparvata lugens* Stal.) ở tỉnh Đồng Tháp, Vĩnh Long, Cần Thơ và Hậu Giang. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 55(Số chuyên đề: Công nghệ Sinh học)(1): 40-49.

1 ĐẶT VẤN ĐỀ

Rầy nâu là mối hiểm họa đối với nghề trồng lúa ở Châu Á nói chung và Việt Nam nói riêng. Trước đây chúng chỉ là đối tượng gây hại thứ yếu ở các nước trồng lúa nhiệt đới vì chỉ canh tác một vụ/năm. Nhưng để đáp ứng nhu cầu lương thực khi dân số ngày càng tăng, nhiều giống lúa ngắn ngày đã được lai tạo để có thể canh tác ba vụ/năm. Vì vậy, nhiều nhà khoa học cho rằng việc gia tăng độc tính của rầy nâu có liên quan đến trồng lúa cải tiến ngắn ngày. Khi giống lúa kháng rầy IR26 ra đời, người ta nghĩ rằng vấn đề rầy nâu sẽ được giải quyết đơn giản. Nhưng chỉ sau vài năm sử dụng rộng rãi ở Indonesia và Philippines, giống IR26 đã nhiễm biotype mới của rầy nâu (Brady, 1979).

Trong một vài năm gần đây, rầy nâu đã được kiểm soát ở Đồng bằng sông Cửu Long (ĐBSCL) nhờ vào việc áp dụng các biện pháp phòng trừ tổng hợp (IPM - Integrated pest management) rộng khắp, trong đó có sử dụng giống lúa kháng rầy nên rất hữu hiệu để khống chế mật số rầy nâu. Nhưng sau đó, nông dân chuyển dịch trồng lúa thơm xuất khẩu ở ĐBSCL để đáp ứng nhu cầu thị trường. Hầu hết các giống lúa thơm như: Jasmine 85, Khao Dawk Mali, ST, Nàng Thơm Chợ Đào.... không mang gen kháng rầy và được trồng rải rác trong các vùng thâm canh nên mật số rầy nâu tăng cao và lây lan sang các giống lúa cao sản khác.

Hiện nay, rầy nâu vẫn đang hiện diện trên ruộng lúa với các dạng hình sinh học (biotype) nguy hiểm gồm biotype 1 và 3 (Luu Văn Quỳnh và *ctv.*, 2010). Vì vậy, giả thuyết đặt ra là có thể có nhiều chủng rầy nâu mới có khả năng tấn công cả giống lúa kháng rầy. Để giải thích cơ chế rầy nâu kháng lại các giống lúa kháng, cơ chế kháng thuốc trừ sâu và cơ chế

truyền virus, việc nghiên cứu bộ gen rầy nâu là một công cụ rất mạnh mẽ và hữu ích. Trong hầu hết các nghiên cứu phân tử về mối liên hệ giữa sinh vật với sinh vật hay sự tương tác giữa sinh vật với môi trường tự nhiên thường dựa trên việc phân tích trình tự vùng ITS (internal transcribed spacer) và đặc biệt hữu dụng trong phương pháp phân tử để phân loại sinh vật ở mức độ loài và thậm chí trong cùng một loài để xác định các chủng ở các vị trí địa lý khác nhau (Horton and Bruns, 2001). Trình tự vùng ITS sẽ góp phần vào nghiên cứu bộ gen rầy nâu, dự kiến rất hữu ích trong việc xây dựng hệ thống quản lý rầy hiệu quả và bền vững hơn (Noda, 2009). Từ các cơ sở trên đề tài “Phân tích trình tự ITS của rầy nâu (*Nilaparvata lugens*. Stal) tại bốn tỉnh Đồng Tháp, Vĩnh Long, Cần Thơ, Hậu Giang” được thực hiện với mục tiêu xác định sự đa dạng trình tự vùng ITS (bao gồm vùng ITS1, 5.8S và ITS2), từ đó giúp xác định các chủng rầy nâu hiện có ở bốn tỉnh Đồng Tháp, Vĩnh Long, Hậu Giang và Cần Thơ.

2 PHƯƠNG TIỆN VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1 Phương tiện nghiên cứu

Thí nghiệm được thực hiện tại phòng Sinh học Phân tử, Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ.

2.2 Nguyên vật liệu

Rầy nâu: thu 36 mẫu rầy nâu, trong đó: 18 mẫu ký hiệu từ 1 – 18 (vụ Đông Xuân 2015-2016), 18 mẫu ký hiệu từ 19 - 36 (vụ Hè Thu – 2016). Các mẫu được thu ở 3 tỉnh Đồng Tháp, Vĩnh Long, Hậu Giang. Mỗi tỉnh thu ba huyện, mỗi huyện thu 2 mẫu (Bảng 1). 06 mẫu rầy (ký hiệu từ 37 – 44) thu bằng bẫy đèn ở Cần Thơ, mỗi tháng thu mẫu một lần. Rầy nâu bắt được cho vào keo nhựa có khoan lỗ trên nắp. Sau đó sấy ở 50°C qua đêm và trữ ở -20°C.

Bảng 1: Danh sách mẫu rầy nâu vụ Đông xuân và vụ Hè Thu

Vụ Đông Xuân		Vụ Hè Thu	
Ký hiệu mẫu	Địa điểm	Ký hiệu mẫu	Địa điểm
1 - 2	Long Hồ – Vĩnh Long	19 - 20	Long Hồ – Vĩnh Long
3 - 4	Tam Bình – Vĩnh Long	21 - 22	Tam Bình – Vĩnh Long
5 - 6	Vũng Liêm – Vĩnh Long	23 - 24	Vũng Liêm – Vĩnh Long
7 - 8	Phụng Hiệp – Hậu Giang	25 - 26	Phụng Hiệp – Hậu Giang
9 - 10	Vị Thủy – Hậu Giang	27 - 28	Vị Thủy – Hậu Giang
11 - 12	Vị Thanh – Hậu Giang	29 - 30	Vị Thanh – Hậu Giang
13 - 14	Thanh Bình – Đồng Tháp	31 - 32	Thanh Bình – Đồng Tháp
15-16	Tam Nông – Đồng Tháp	33 - 34	Tam Nông – Đồng Tháp
17-18	Tháp Mười – Đồng Tháp	35 - 36	Tháp Mười – Đồng Tháp

2.3 Dụng cụ, thiết bị thí nghiệm và hóa chất

Máy ly tâm eppendorf 5417C, cân điện tử, lò vi sóng, máy hút chân không, bộ điện di, máy đọc và chụp hình gel BioRad UV 2000, máy đo quang phổ

Beckman Coulter DU 640, máy PCR Perkin Elmer 9700, máy chụp hình...

Hóa chất: Dung dịch đệm EB, SDS (sodium dodecyl sulfate), β -mercapto ethanol, isopropanol, CTAB, chloroform, dung dịch đệm TE, ethidium

bromide, loading buffer, Taq polymerase, dNTPs, BSA, DMSO, đoạn mồi ITS1 và ITS4.

2.4 Phương pháp nghiên cứu

2.4.1 Quan sát các đặc điểm hình thái

Quan sát hình thái, chụp hình và ghi nhận các đặc điểm của rầy nâu tại phòng thí nghiệm theo các đặc điểm sau (Mochida và Okada, 1979):

Giai đoạn ấu trùng: Màu sắc, kích thước.

Rầy trưởng thành: Kích thước cơ thể, dạng cánh, màu mắt, màu thân, đỉnh đầu, trán, râu, đặc điểm chân sau.

2.4.2 Theo dõi mật số rầy nâu vào bẫy đèn ở Cần Thơ

Bẫy đèn được treo ở sân Viện Nghiên cứu & Phát triển Công nghệ Sinh học. Thời gian bắt đèn từ 18h đến 7h sáng hôm sau. Độ cao bẫy đèn 6 m. Thu mẫu rầy nâu vào bẫy đèn mỗi đêm. Sấy ở 50°C qua đêm. Phân loại, đếm mật số. Trữ mẫu ở -20°C. Ghi nhận số liệu theo từng tháng. Vẽ biểu đồ bằng phần mềm Excel.

2.4.3 Giải trình tự DNA vùng ITS

Trích DNA: Sử dụng phần thân trên của rầy nâu để trích DNA theo quy trình của Rogers and Bendich (1988).

Kiểm tra DNA: DNA của rầy sau khi trích được kiểm tra bằng cách điện di trên gel agarose 0.8%.

Khuếch đại vùng ITS bằng kỹ thuật PCR

Các mẫu DNA của rầy nâu sau khi ly trích và được điện di để kiểm tra chất lượng và độ tinh sạch của DNA được sử dụng để thực hiện phản ứng PCR. Thành phần hóa học của một phản ứng PCR với cặp mồi ITS1 và ITS4 (White *et al.*, 1990) được thể hiện ở Bảng 2.

Bảng 2: Thành phần một phản ứng PCR với mồi ITS1 và ITS4

Hóa chất	Nồng độ gốc	Thể tích (μl)	Nồng độ sau cùng
Bi H ₂ O	-	32,5	
Buffer 4	10X	5	1X
MgCl ₂	25 mM	4	2 mM
dNTPs	200 μM	2	8 μM
ITS1	10 pmol/μl	2	0,4 pmol/μl
ITS4	10 pmol/μl	2	0,4 pmol/μl
Taq polymerase	0,5 U/μl	0,5	0,05 U/μl
DNA mẫu	50 ng/μl	2	2 ng/μl
Tổng		50	

Trình tự cặp primer: ITS1 5'–TCC GTA GGT GAA CCT GCG G–3'; ITS4 5'–TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC–3'.

Phản ứng được thực hiện ở máy PCR Perkin Elmer 9700 với 30 chu kỳ. Trước khi bắt đầu chu kỳ PCR, máy được gia nhiệt lên tới 103°C để khởi động và giữ ở 95°C trong 1 phút 30 giây để biến tính DNA. Kế đến là ba giai đoạn: 95°C trong 50 giây; 55°C trong 70 giây; 72°C trong 90 giây. Ba giai đoạn này được lặp lại 30 chu kỳ. Bước cuối cùng của phản ứng PCR là 72°C trong 10 phút.

Bước tiếp theo là kiểm tra sản phẩm PCR trên gel agarose 2%.

Giải trình tự vùng ITS được khuếch đại: Giải trình tự được thực hiện bằng máy ABI 3130 và được phân tích sơ bộ với phần mềm Sequencing Analysis 3.0.

Phân tích và xử lý số liệu: Các trình tự được kiểm tra độ nhiễu và lỗi bằng phần mềm BioEdit 7.0. Sau đó dùng phần mềm SeqVerter để chuyển định dạng dữ liệu (format) theo phần mềm PAUP* - 4.0 (Swofford, 2002). Cuối cùng dùng phần mềm PAUP* - 4.0 dựng cây giản đồ mối quan hệ di truyền (Phylogenetic tree). Giản đồ gồm những nhánh phân loại dựa trên kết quả phân tích bootstrap với 1000 lần lặp lại, chỉ số CI (Consistency Index) và RI (Retention Index) sẽ phản ánh mức độ tin cậy của giản đồ.

Chỉ số CI là tỷ số đo tương thích giữa một cây bất kỳ nào đó trong tổng số các cây được phân tích có tổng số nhánh ít nhất. Giá trị CI biến động trong khoảng 1.0 (tương thích tối đa) tiệm cận đến 0 (ít tương thích nhất). Giá trị CI càng lớn thì kết quả có mức độ tin cậy càng cao. CI được tính theo công thức sau:

$$CI = \frac{M}{S}$$

M: số lượng nhỏ nhất có thể có của sự thay đổi tính trạng (bậc) trong một cây phát sinh loài bất kỳ.

S: số lượng sự thay đổi tính trạng thật sự (bậc) trong cây phát sinh loài đang nói đến (cây mối quan hệ di truyền đã có ý nghĩa giải thích tất cả sự phân bố tính trạng của giống cần phân loại).

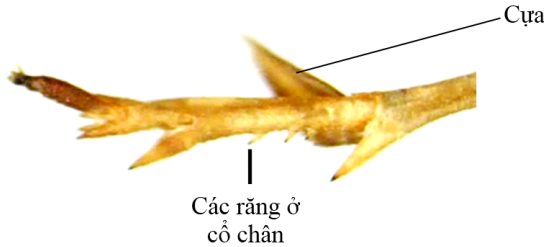
Chỉ số RI thể hiện số lượng tính trạng tương đồng của hai hay nhiều giống cùng tổ tiên.

Chỉ số bootstrap là tần số xuất hiện của một nhóm (cluster) trên số lần giản đồ được thiết lập, đơn vị tính là %. Chỉ số bootstrap nói lên độ tin cậy của sự gần gũi giữa các nhóm trong giản đồ (Trần Nhân Dũng và Nguyễn Vũ Linh, 2011).

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Đặc điểm hình thái rầy nâu

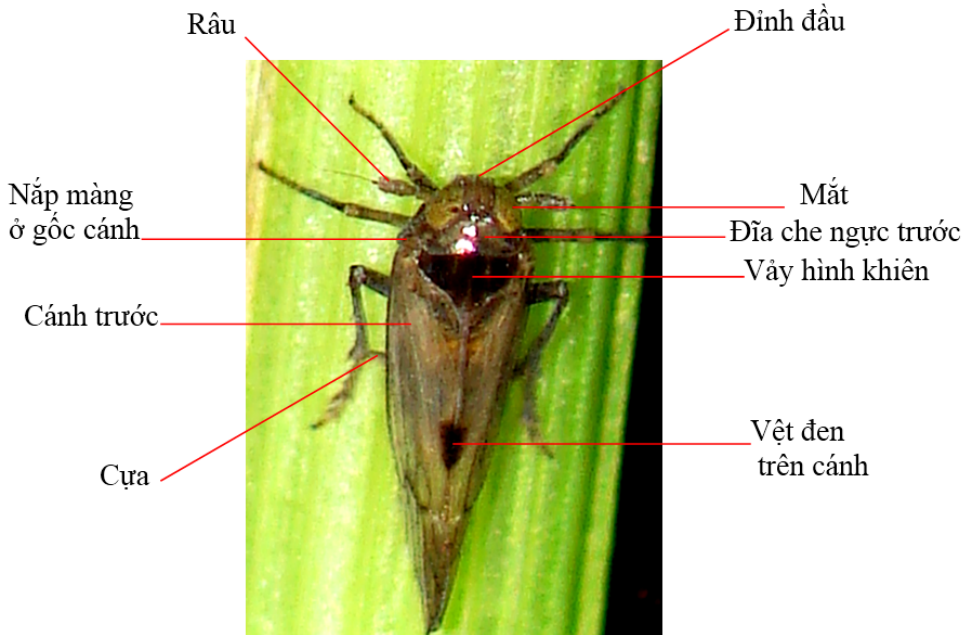
Đặc điểm để nhận dạng chi *Nilaparvata* là một loạt các răng nằm trên đoạn cổ chân và cựa (spur) (Hình 1) rất linh hoạt để nhận biết ở chân sau (Mochida and Okada, 1979; Bartlett, 2007).



Hình 1: Các răng và cựa ở chân sau của chi *Nilaparvata*

Cấu tạo cơ thể và chân sau của *N. lugens* được mô tả trong Hình 2 và 3 dựa trên việc quan sát thực tế các mẫu rầy nâu thu được.

Qua Hình 2 và 3, có thể mô tả sơ lược các đặc điểm hình thái của rầy nâu như sau:



Hình 2: Cấu tạo cơ thể *N. lugens* (trưởng thành đực cánh dài) (18/12/2015)

Cơ thể dài 3,7 – 5 mm (cánh dài), 2,4 – 3,3 mm (cánh ngắn), màu nâu đến nâu sẫm, đôi khi có màu đen.

Cánh trước: trong suốt, có vết màu đen hình chùy trên gờ, có chiều dài hơn rộng theo tỷ lệ khoảng 3,3:1.

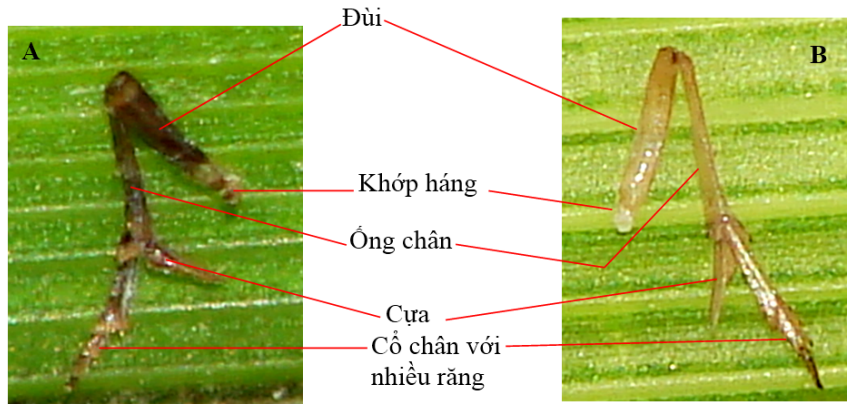
Đỉnh đầu: vuông, mở rộng, mép đỉnh ngang, đường sống bên không tiếp giáp đỉnh.

Trán có đường giữa dài hơn chiều rộng, tỷ lệ chiều dài với điềm rộng nhất khoảng 2,2:1, điềm rộng nhất nằm ngang đuôi mắt, đường sống bên gần như thẳng, đường sống giữa phân thành 4 nhánh.

Râu nằm xuyên qua khớp nối mảnh gốc môi ở trán, gồm 3 phần, phần gốc có chiều dài hơn chiều rộng khoảng 2:1, phần gốc ngắn hơn phần thứ 2 khoảng 1:2, đốt roi dài, nhỏ.

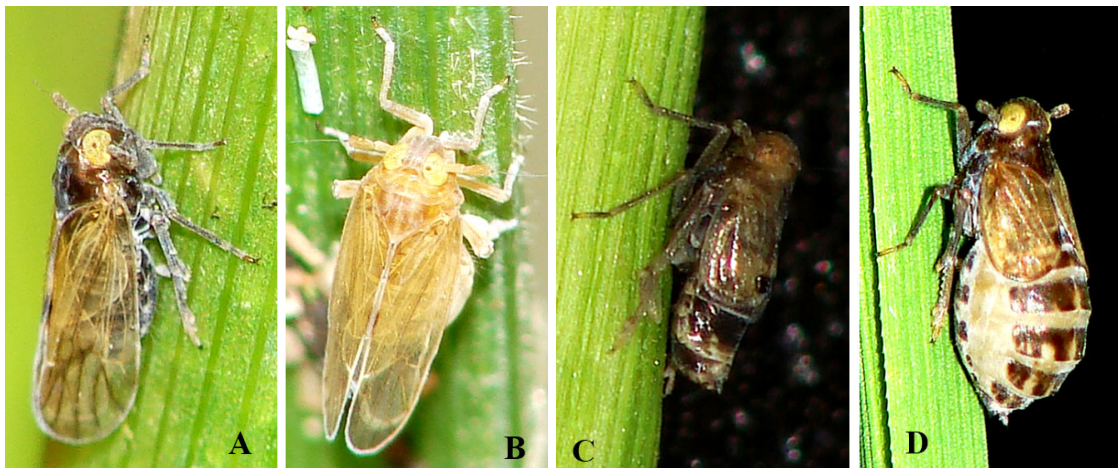
Pronotum (nắp màng ở gốc cánh) có màu từ nâu đến nâu như màu rom.

Mỗi ống chân sau có một cựa lớn, nhọn và rất linh hoạt. Đoạn cổ chân sau có nhiều răng.



Hình 3: Cấu tạo chân sau *N. lugens* (18/12/2015)

(A) Đực cánh ngắn; (B) Cái cánh dài



Hình 4: Rầy nâu cánh dài (A: con đực, B: con cái) và Rầy nâu cánh ngắn (C: con đực, B: con cái) (18/12/2015)



Hình 5: Các dạng cánh rầy nâu (18/12/2015)

(A) Dạng cánh dài; (B) Dạng cánh ngắn

Hình 4 và 5 mô tả dạng cánh lưỡng hình của rầy nâu. Ấu trùng phát triển thành dạng cánh dài hay cánh ngắn tùy thuộc vào hàm lượng hormone JH trong cơ thể (Ayoade *et al.*, 1999). Mặc dù chưa rõ cơ chế điều tiết hormone này nhưng dựa trên các quan sát thực tế có thể sự tương quan giữa hàm lượng chất dinh dưỡng trong cây lúa nơi rầy nâu chích hút và nồng độ hormone JH. Cây lúa trong

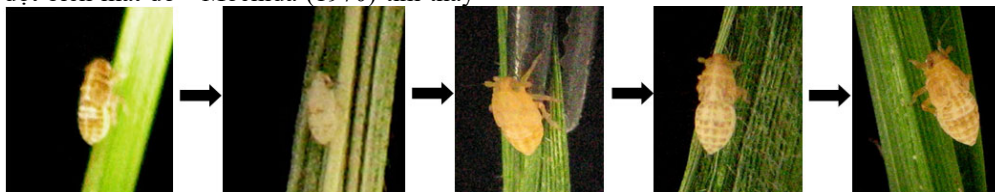
giai đoạn làm từ đòng đến trở thường được cung cấp nhiều chất dinh dưỡng và rầy nâu cánh ngắn hiện diện với mật số khá cao. Khi lúa chín, hàm lượng các chất dinh dưỡng ở thân và lá giảm do phải tập trung nuôi bông, mật số rầy cánh ngắn giảm nhanh so với rầy cánh dài. Các con rầy nâu cánh dài này sẽ di trú để tìm nguồn thức ăn mới. Nhiệt độ và quang kỳ cũng có ảnh hưởng đến sự tạo dạng cánh. Trong

điều kiện nhiệt độ và quang kỳ thích hợp cây lúa sẽ quang hợp mạnh nhất, tổng hợp được nhiều glucose hơn từ đó chuyển hóa thành các dạng chất dinh dưỡng cho cây. Ấu trùng rầy nâu khi được cung cấp đầy đủ chất dinh dưỡng sẽ tạo dạng cánh ngắn là chủ yếu và ngược lại. Tất cả các quan sát trên phù hợp với nghiên cứu của Zhang (1983).

Ngoài ra, còn một nhân tố khác ảnh hưởng đến sự tạo dạng cánh là mật độ quần thể trong giai đoạn nhộng. Khi mật độ ấu trùng quá nhiều, hàm lượng chất dinh dưỡng cung cấp cho mỗi ấu trùng giảm đi, lúc đó dạng cánh dài sẽ chiếm ưu thế giúp rầy nâu có thể di trú tìm nguồn thức ăn khác. Điều này phù hợp với kết quả nghiên cứu của Iwanaga and Tojo (1986).

Tóm lại, nhân tố bên ngoài quyết định trực tiếp đến sự tạo dạng cánh ở rầy nâu có thể là hàm lượng các chất dinh dưỡng trong cây lúa và nhân tố bên trong là JH hormone được tìm thấy ở giai đoạn ấu trùng.

Trong các mẫu rầy thu được, không tìm thấy rầy nâu có đột biến mắt đỏ - Mochida (1970) tìm thấy



Hình 6: Năm giai đoạn ấu trùng của rầy nâu (từ 1 đến 5 ngày tuổi) (28/4/2016)



Hình 7: Vỏ còn lại của rầy nâu sau khi lột xác (28/4/2016)

Như vậy, các đặc điểm về hình thái của rầy nâu về cơ bản không khác so với mô tả của Mochida và Okada (1979); Bartlett (2007). Điều này phù hợp với kết luận của Claridge *et al.* (1984) và Bahagiawati and Rijzaani (2005), việc xác định các biotype rầy nâu không quan trọng bằng sự đa dạng nguồn gen giữa các cá thể trong một quần thể hay giữa các quần thể địa lý khác nhau và không có sự khác biệt về hình thái giữa các biotype.

đột biến rầy mắt đỏ khi nuôi rầy trong phòng thí nghiệm. Nếu rầy cái mang trứng bị đột biến mắt đỏ sẽ gây chết phôi ngay trong bụng. Đây là gen lặn có thể liên quan đến việc tạo sắc tố đen ở mắt bị đột biến.

Trong các mẫu rầy nâu thu được có sự khác nhau về màu sắc cơ thể. Rầy nâu có màu nâu nhưng đôi khi chúng có màu từ hơi đen đến rất đen, thường xuất hiện ở rầy đực. Theo Morooka *et al.* (1988) sự khác nhau về màu sắc này có thể liên quan đến việc tạo sắc tố melanin trong cơ thể rầy.

Rầy nâu trải qua năm giai đoạn ấu trùng (Hình 6). Ấu trùng tuổi 1 có màu trắng kem dài khoảng 0,91 mm và rộng khoảng 0,37 mm, đầu có dạng hình tam giác với đầu trên thu hẹp lại. Ấu trùng lột xác (Hình 7) và biến đổi màu cơ thể từ trắng sang nâu khi tuổi già hơn. Ấu trùng tuổi 5 dài khoảng 2,99 mm và rộng khoảng 1,25 mm, không có các vết đen và trắng trên cơ thể như rầy trưởng thành. Đây là đặc điểm dễ phân biệt ấu trùng tuổi 5 với rầy cánh ngắn. Nhận diện các tuổi của ấu trùng rầy chủ yếu dựa vào kích thước và màu sắc cơ thể.

3.2 Kết quả mật số rầy nâu vào bẫy đèn ở Cần Thơ

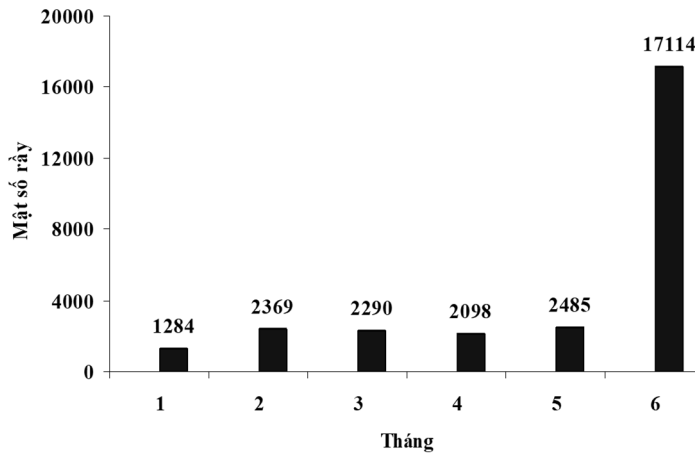
Bẫy đèn là một dụng cụ khá đơn giản dùng để thu hút rầy nâu và một số loại sâu hại khác dựa vào đặc tính sinh học (tính hướng sáng) của một số loài côn trùng. Đa số rầy nâu vào đèn là rầy trưởng thành cánh dài.

Dựa trên các số liệu tính tổng rầy nâu vào đèn theo từng tháng, có biểu đồ sau Hình 8.

Biểu đồ Hình 8 cho thấy mật số rầy nâu từ tháng 1 đến tháng 5 không cao và cũng không biến động nhiều. Qua thực tế thu mẫu, số lượng rầy trên một bụi ít khoảng 5 – 7 con, có thể do các nguyên nhân sau:

Đa phần nông dân tiến hành gieo sạ theo lịch của Trung tâm Khuyến nông thường là sau đợt rầy nâu di trú từ 2 – 3 ngày. Rõ ràng với cùng số lượng rầy nâu nhưng khi được dàn trải trên một diện tích lớn thì mật độ rầy trên bụi sẽ giảm đi đáng kể.

Mật độ cây lúa trên ruộng vừa phải. Thường ruộng sạ hàng mật độ rầy ít hơn ruộng sạ lan. Bón phân và phun xịt thuốc diệt trừ rầy nâu hiệu quả.



Hình 8: Biểu đồ rầy nâu vào bẫy đèn ở Cần Thơ từ tháng 1 đến tháng 6

Tuy nhiên, diễn biến mật số rầy nâu vào đèn tháng 6 lại tăng đột biến. Nguyên nhân có thể do đây là thời gian thu hoạch tập trung lúa hè thu nên rầy di trú rất nhiều. Một nguyên nhân khác là nông dân chú trọng phòng trừ rầy nâu trong giai đoạn cây lúa từ khoảng 20 ngày đến khi trổ. Nhưng rầy có thể quay lại cư trú trên cây lúa trong giai đoạn chín, khi đó ruộng được cung cấp đầy đủ nước, lá lúa nhiều đan xen lẫn nhau, đôi khi cây lúa bị ngã đổ, điều này sẽ tạo tiểu môi trường thích hợp cho sự phát triển của rầy nâu. Theo Nguyễn Văn Liêm (2010) rầy nâu di trú khi chưa đẻ trứng, sau khi ăn 24 giờ buồng trứng mới phát triển, đến 48 giờ sau buồng trứng hoàn thiện và có thể sinh sản. Như vậy, đợt rầy di trú cao đột biến vào tháng 6 sẽ tiếp tục đẻ trứng trên các ruộng lúa Thu Đông sớm và chúng sẽ gây hại cho lúa ngay từ đầu vụ với mật số ban đầu khá cao.

Rầy nâu di trú khi nguồn thức ăn giảm, vì vậy nếu tiến hành gieo sạ và thu hoạch đồng loạt rầy sẽ không tìm được nguồn thức ăn mới và không xảy ra

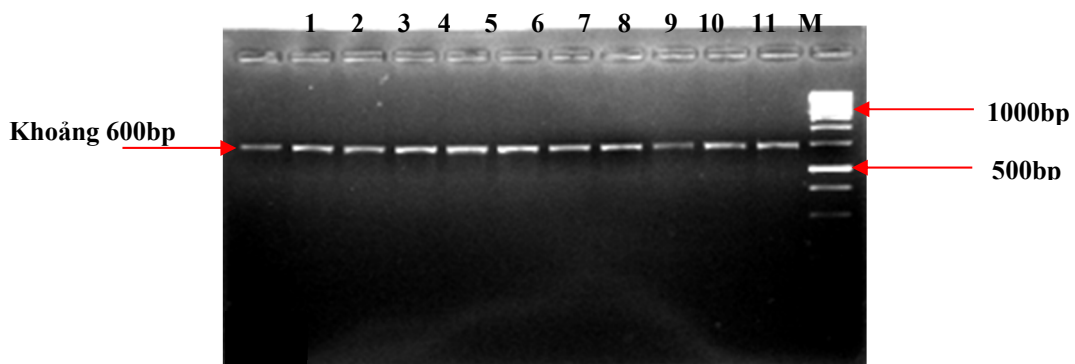
tình trạng các lúa rầy “gối đầu” lên nhau giúp cho việc phòng trừ rầy đạt hiệu quả cao hơn. Dựa trên thông tin mật số rầy nâu vào bẫy đèn có thể giúp theo dõi, dự báo tình hình phát sinh, phát triển của các lúa rầy nâu trên đồng ruộng, từ đó xác định được lịch thời vụ thích hợp để khuyến cáo cho người nông dân.

3.3 Kết quả phân tích trình tự vùng ITS

Trích DNA

Ban đầu, chân rầy nâu được sử dụng tách chiết DNA để tránh nhiễm DNA lạ, vì trong tuyến nước bọt và trong ruột của rầy nâu có nhiều sinh vật cộng sinh. Nhưng hàm lượng DNA thu được rất thấp vì vậy phân ngực, đầu, cánh được dùng để trích thay vì sử dụng chân. Urban *et al.* (2010) cũng sử dụng phân ngực hay chân rầy nâu để trích DNA.

Phản ứng PCR



Hình 9: Sản phẩm PCR với cặp mồi ITS1 và ITS4 trên gel agarose 1.5% (M: thang 100bp) (15/3/2016)

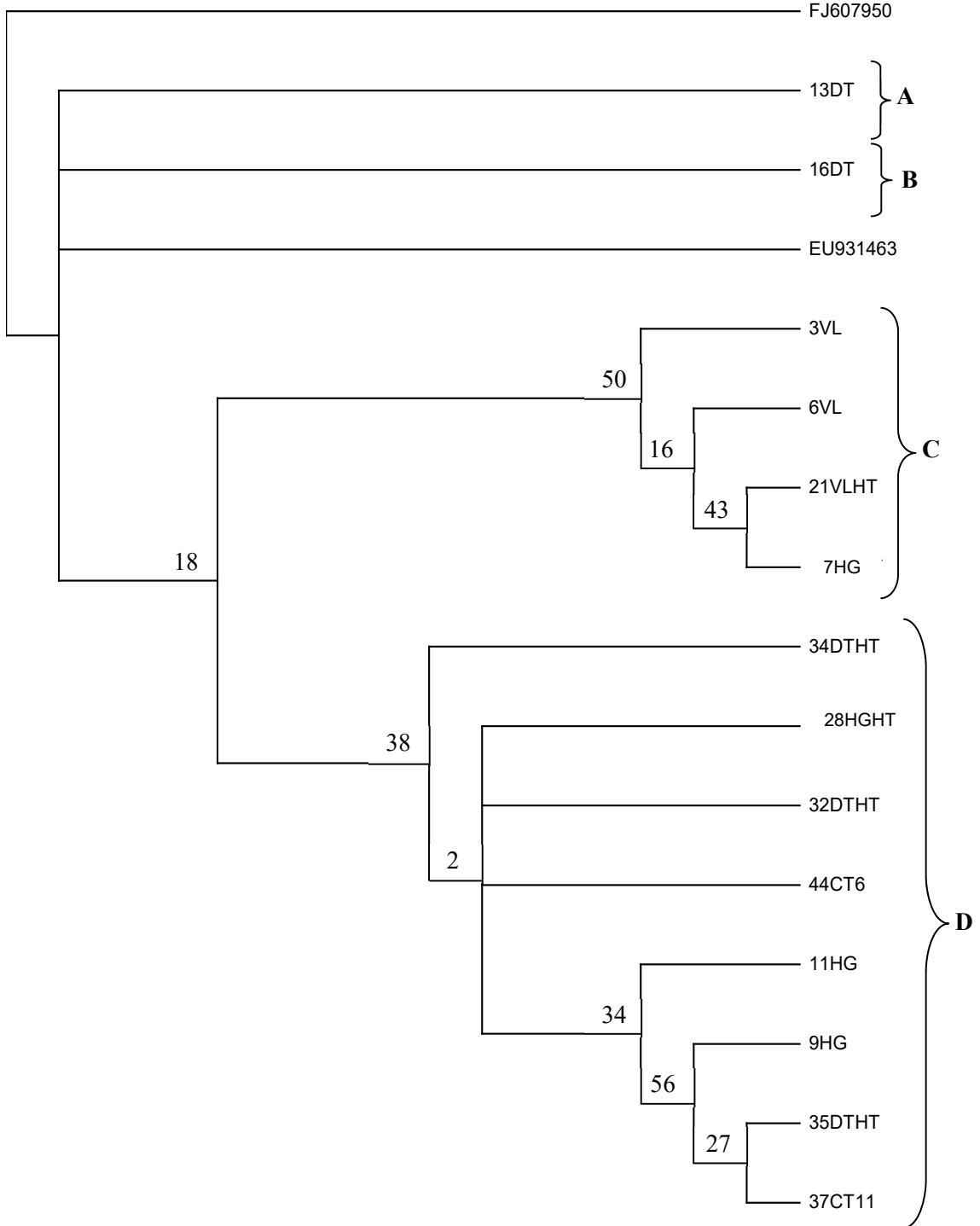
nâu với primer ITS1 và ITS4, tất cả sản phẩm khuếch đại có cùng kích thước khoảng 600bp.

Xác định các chủng rầy nâu

Do sản phẩm PCR có kích thước như nhau nên chỉ chọn mười hai mẫu (3, 6, 7, 9, 11, 13, 16, 21, 28, 32, 34, 35) đại diện cho ba tỉnh Đồng Tháp, Vĩnh

Long, Hậu Giang và hai mẫu (37, 44) đại diện cho mật số rầy nâu vào bẫy đèn ở Cần Thơ để giải trình tự.

PAUP_1



Hình 10: Mối quan hệ di truyền chủng loại của 14 mẫu rầy nâu

(Chỉ số bootstrap được ghi trên đầu các nhánh. Hai mẫu FJ607950, EU931463 là mẫu đối chứng)

Kết quả phân tích được giản đồ như Hình 10 với chỉ số CI = 0.667 và RI = 0.7222. Các chỉ số này cho thấy cây phát sinh chủng loại có độ tin cậy tốt.

Các chủng rầy nâu phân tích chia làm 4 nhánh chính:

Nhánh A là mẫu 13DT, thu ở Thanh Bình – Đồng Tháp, vụ Đông Xuân. Nhánh B là mẫu 16DT, thu ở Tam Nông – Đồng Tháp, vụ Đông Xuân. Hai mẫu này tuy thu cùng thời điểm và có cùng điều kiện thổ nhưỡng (đất nhiễm phèn) nhưng được phân thành hai nhóm riêng.

Nhóm C gồm bốn mẫu 3VL (Tam Bình – Vĩnh Long, vụ Đông Xuân), 6VL (Vũng Liêm – Vĩnh Long, vụ Đông Xuân), 21VLHT (Tam Bình – Vĩnh Long, vụ Hè Thu) và mẫu 7HG (Phụng Hiệp – Hậu Giang, vụ Đông Xuân) với chỉ số bootstrap là 50%. Trong đó, hai mẫu 21VLHT và 7HG tạo thành một nhóm nhỏ với chỉ số bootstrap 43%.

Nhóm D gồm tám mẫu 34DTHT (Tam Nông – Đồng Tháp, vụ Hè Thu), 28HGHT (Vị Thủy – Hậu Giang, vụ Hè Thu), 32DTHT (Thanh Bình – Đồng Tháp, vụ Hè Thu), 44CT6 (Cần Thơ, tháng 6), 11HG (Vị Thanh – Hậu Giang, vụ Đông xuân), 9HG (Vị Thủy – Hậu Giang, vụ Đông Xuân), 35DTHT (Tháp Mười – Đồng Tháp, vụ Hè Thu) và 37CT11 (Cần Thơ, tháng 11) với chỉ số bootstrap là 38%. Trong đó bốn mẫu 11HG, 9HG, 35DTHT và 37CT11 tạo thành một nhóm nhỏ với chỉ số bootstrap là 34%. Ngoại trừ hai mẫu 37CT11 và 44CT6 là mẫu rầy nâu vào bẫy đèn nên khó xác định nguồn gốc chính xác (do rầy nâu có đặc tính di trú cao), sáu mẫu còn lại tuy được thu ở hai tỉnh khác nhau nhưng có điều kiện thổ nhưỡng khá tương đồng (ba mẫu thu ở vùng Đồng Tháp Mười - đất nhiễm phèn nặng, hệ thống thủy lợi có nhiều kênh để xả phèn và ba mẫu thu ở hai huyện Vị Thủy và Vị Thanh - đất nhiễm phèn nhẹ, nông dân bón tro để trung hòa độ acid trong đất) nên có thể hiểu được tại sao các mẫu này được xếp cùng một nhóm.

Xét riêng hai mẫu thu bằng bẫy đèn ở Cần Thơ, mẫu 37CT11 thu vào vụ Đông Xuân (vụ Đông Xuân khoảng từ tháng 11 đến tháng 3 năm sau) và mẫu 44CT6 thu vào vụ Hè Thu (vụ Hè Thu khoảng từ tháng 3 đến tháng 7). Chúng được phân thành nhóm riêng với chỉ số bootstrap khá cao (56%) thể hiện ý nghĩa của sự phân nhóm này. Ở ĐBSCL, điều kiện thời tiết giữa hai vụ lúa trên khác nhau không đáng kể và giản đồ Hình 27 cũng không cho thấy có sự phân nhóm rõ ràng giữa các mẫu được thu vào hai vụ lúa này. Vì vậy, không thể giải thích sự phân nhóm dựa vào những khác biệt về thời tiết giữa hai vụ Đông Xuân và Hè Thu. Tuy nhiên, với giả định hai quần thể rầy nâu trên có nguồn gốc khác nhau

(chẳng hạn như sống ở vùng thổ nhưỡng khác nhau) thì cơ sở để giải thích sự phân nhóm sẽ hợp lý hơn.

Kết quả nghiên cứu này khá phù hợp với nghiên cứu của Jones *et al.* (1993). Ban đầu, nhóm tác giả này đã dựa vào trình tự vùng 18S để xây dựng cây phát sinh loài của các quần thể *Nilaparvata lugens* sống trên lúa và trên cỏ *Leersia hexandra* (Schwartz) ở Ấn Độ, Đông Nam Á, Nhật và Australia. Nhưng do có rất ít sự khác biệt trong trình tự gen 18S nên họ đã chọn vùng trình tự ITS để tiếp tục nghiên cứu. Kết quả cho thấy có sự khác biệt lớn trong trình tự ITS giữa các quần thể Châu Á và Australia hơn là khác biệt giữa các quần thể trên cây lúa và *Leersia*. Họ cho rằng hai quần thể rầy nâu trên cây lúa và trên *Leersia* chỉ là một loài. Tuy không khẳng định đây là hai chủng khác nhau nhưng rõ ràng điều kiện địa lý khác biệt đã làm thay đổi trình tự vùng ITS, cơ sở phát sinh chủng mới trong cùng một loài.

Tóm lại, giản đồ cho thấy có sự phân nhóm khá rõ giữa các mẫu rầy thu ở vùng đất phù sa (nhóm C) và vùng đất phèn (nhóm D) và sự khác biệt thời tiết giữa hai vụ Đông Xuân và Hè Thu không ảnh hưởng đến sự phân nhóm. Như vậy, ở một ngưỡng nào đó, điều kiện thổ nhưỡng có thể đã tác động đến trình tự gen vùng ITS dẫn đến có sự phân nhóm giữa các mẫu. Nhưng những khác biệt này chưa thể hiện rõ, chưa đủ để gây biến đổi chủng rầy nâu hiện hành.

4 KẾT LUẬN

Dựa vào kết quả khảo sát hình thái và phân tích trình tự vùng ITS của rầy nâu cho thấy không có khác biệt hình thái giữa các quần thể rầy nâu thu ở bốn tỉnh Đồng Tháp, Vĩnh Long, Cần Thơ và Hậu Giang. Có sự phân nhóm rõ ràng giữa nhóm C (3VL, 6VL, 21VLHT và 7HG) và nhóm D (34DTHT, 28HGHT, 32DTHT, 11HG, 9HG, 35DTHT). Như vậy, điều kiện sống khác nhau giữa các vùng trồng lúa có thể đã ảnh hưởng đến trình tự vùng ITS nhưng chưa đủ để gây biến đổi chủng rầy nâu.

LỜI CẢM ƠN

Xin chân thành cảm ơn PGS.TS. Trần Nhân Dũng đã hỗ trợ thực hiện nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Ayoade, O., Morooka S., Tojo S., 1999. Enhancement of short wing formation and ovarian growth in the genetically defined macropterous strain of the brown planthopper (*Nilaparvata lugens*). *Journal of Insect Physiology*. 45(1): 93-100.
- Bahagiawati, B. and Rijzaani, H., 2005. Clustering of brown planthopper biotype based on RAPD-PCR. *HAYATI Journal of Biosciences*. 12(1): 1-6.

- Bartlett, C.R., 2007. A review of the planthopper genus *Nilaparvata* (Hemiptera: Delphacidae) in the New World. *Entomological News.*, 118(1): 49-66.
- Brady, N.C., 1979. Brown planthopper: Threat to rice production in Asia, International Rice Research Institute. Philippines, pp: 3-125.
- Claridge, M.F., Hollander J.D. and Haslam D., 1984. The significance of morphometric and fecundity difference between the “biotype” of the Brown Planthopper (*Nilaparvata lugens*). *Entomol. Exp. Appl.* 36: 107-114.
- Horton, T.R. and Bruns, T.D., 2001. The molecular revolution in ectomycorrhizal ecology: peeking into the black-box. *Molecular Ecology*, 10(8): 1855 -1871.
- Iwanaga, K., and Tojo, S., 1986. Effects of juvenile hormone and rearing density on wing dimorphism and oocyte development in the brown planthopper (*Nilaparvata lugens*). *Journal of Insect Physiology*. 32(6): 585-590.
- Jones, P., Gacesa P. and Butlin R., 1993. A molecular approach to planthopper systematics. In *Proceeding of the 8th Auchemorrhyncha Congress. 9-13 August 1993. Delphi, Greece. The International Auchenorrhyncha Society*, 7 - 9.
- Lưu Văn Quỳnh, Hồ Lệ Quyên và Trần Vũ Thị Bích Kiều., 2010. Kết quả thanh lọc rầy nâu bộ giống lúa miền Trung. Kết quả nghiên cứu khoa học công nghệ 2006-2010. Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam.
- Mochida, O. and Okada, T., 1979. Taxonomy and biology of *Nilaparvata lugens* (Hom., Delphacidae). *Brown planthopper: Threat to rice production in Asia*, International Rice Research Institute, . Philippine, s, pp. 21 - 45.
- Mochida, O., 1970. A red-eyed form of the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Stål). *Bull. Kyushu Agric. Exp. Stn.* 15: 141 - 273.
- Mochida, O., 1979. Brown planthopper reduced rice production. *International Rice Research Institute*, Philippines, pp. 2 - 7.
- Morooka, S., Ishibashi N., and Tojo S., 1988. Relationships between wing-form response to nymphal density and black colouration of adult body in the brown planthopper *Nilaparvata lugens* (Homoptera: Delphacidae). *Appl. Entomol. Zool.* 23: 449 - 458.
- Nguyễn Văn Liêm., 2010. Diễn biến số lượng rầy nâu vào đèn và những vấn đề cần quan tâm cho vụ lúa Thu Đông, Sở nông nghiệp và phát triển nông thôn Vĩnh Long.
- Noda, H., 2009. How can planthopper genomics be useful for planthopper management. *Planthoppers: new threats to the sustainability of intensive rice production systems in Asia*, Australian Center for International Rice Research Institute. Philippines,, pp. 429 – 446.
- Rogers, S.O., Bendich, A.J., 1988. Extraction of DNA from plant tissues. In: Gelvin S, Schilperoort RA (eds) *Plant Molecular Biology Manual*, . Boston: Kluwer Academic Publishers. Boston., pp. A6: 1–10.
- Swofford, D.L., 2002. PAUP*. *Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and other methods)*. Version 4.0b10. Sinauer Associates. Sunderland. Massachusetts.
- Trần Nhân Dũng và Nguyễn Vũ Linh. 2011. *Giáo trình tin sinh học.*, Nhà xuất bản Đại học Cần Thơ. TP. Cần Thơ, 145 trang.
- Urban, J.M., Bartlett C.R., and Cryan J.R., 2010. Evolution of Delphacidae (Hemiptera: Fulgoroidea): combined-evidence phylogenetics reveals importance of grass host shifts. *Systematic Entomology.*, 35: 678- – 691.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., and Taylor, J.W., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR Protocols: A Guide to methods and Application*, eds. Innis, M.A., D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, and T.J. White. Academic Press, Inc., New York, 5: 315-322.
- Zhang, Z.-Q., 1983. A study on the development of wing dimorphism in the rice brown planthopper (*Nilaparvata lugens* (Stal)). *Acta Entomologica Sinica.*, 26(3): 260-267.