

## NHỮNG GHI NHẬN BAN ĐẦU VỀ ĐA DẠNG DI TRUYỀN QUẦN THỂ RẦY NÂU HẠI LÚA Ở VIỆT NAM

Tạ Hoàng Anh, Ngô Vĩnh Viễn,  
Nguyễn Doãn Phương, Trần Thị Thu Huyền,  
Nguyễn Văn Chung, Phạm Văn Sơn,  
Jaan Cheng, Jean-Louis Zeddard, Eugénie Ébrard.

### SUMMARY

#### Phylogenetic diversity of rice brown plant hoppers in Vietnam

The *Mitochondrial cytochrome oxidase subunit 1* (COI) gene was used to analyze preliminarily the genetic diversity of the brown planthopper (BPH) population in Vietnam. Totally 38 partial COI sequences were analyzed and a phylogenetic tree was built. These sequences are including 31 sequences of BPH individuals collected in rice fields on rice and on the grass *Leersia hexandra* from different provinces in Vietnam; 4 sequences from GenBank of 4 different species of rice hoppers (*Nilaparvata lugens*, *Sogatella furcifera*, *Laodelphax striatellus* and *Nephotettix virescens*); and three sequences of *N. lugens*, *N. muiri* and *N. bakeri* provided by a Chinese scientist. The phylogenetic tree shows that BPH population of Vietnam separates into three different clades with high bootstrap values. Among 31 Vietnam sequences, 28 sequences are stay in the same clade with *N. lugens* (both of Chinese and GenBank sequences), one sequence stays in the same clade with *N. muiri* and two sequences stay in the same clade with *N. bakeri*. This is the first report of *N. muiri* and *N. bakeri* and their COI sequences in Vietnam.

**Keywords:** Brown planthopper, cytochrome oxidase subunit 1, *Leersia hexandra*, RT-PCR, phylogeny.

### I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Rầy nâu *Nilaparvata lugens* (Stal), họ Delphacidae, bộ Hemiptera là môi giới truyền bệnh chung cho cả hai virus gây bệnh vàng lùn, hay còn gọi là lúa cỏ (RGSV), và lúa lùn xoắn lá (RRSV). Rầy nâu di trú mang theo virus gây bệnh từ ruộng lúa nhiễm bệnh, xâm nhập và truyền bệnh cho ruộng lúa mới gieo cấy. Phạm vi di chuyển của rầy nâu rất lớn, thậm chí vượt đại dương (Hogenhout et al., 2008). Ngoài *N. lugens* (Stal) còn có 2 loài rầy nâu khác là *N. bakeri* (Muir) và *N. muri* (China) cũng tham gia truyền virus lúa cỏ. Các kết quả nghiên cứu trước đây đã chỉ ra rằng 2 loài RN này là rầy trên cỏ, ký chủ ưa thích của chúng là cỏ môi, *Leersia hexandra*, và rất phổ biến ở Trung Quốc (Hibino, 1996). Ở Việt Nam chưa có một nghiên cứu nào ghi nhận về sự hiện diện của hai loài rầy nâu này.

Một số kết quả nghiên cứu đã ghi nhận những khác biệt về đặc tính sinh học và sinh thái học giữa hai quần thể rầy nâu trên lúa và

trên cỏ môi. Năm 2008, Latif và cộng sự đã đưa ra những căn cứ xác thực về sự khác biệt di truyền giữa 2 quần thể *N. lugens* dựa trên phương pháp RAPD (Latif et al., 2008). Tuy nhiên, phương pháp này khá phức tạp, yêu cầu phần mềm phân tích bản quyền.

Ngày nay, việc giải trình tự gen đã trở nên thông dụng và rẻ tiền. Trình tự gen có thể được xác định chính xác trực tiếp từ sản phẩm PCR mà không cần phải tách dòng. Mặt khác, trình tự gen ty thể (*Mitochondrial cytochrome oxidase* subunit 1 - COI), một gen có tính bảo thủ cao và đặc trưng cho mỗi loài côn trùng, đã được sử dụng như một công cụ hữu hiệu trong việc phân tích đa dạng di truyền cũng như hỗ trợ việc phân loại một số loài côn trùng mà dựa vào khóa phân loại truyền thống đã không thể hoàn thiện. Phân loại quần thể bọ phấn, *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) là một minh chứng điển hình về ứng dụng trình tự đoạn gen COI (Laura et al., 2007).

Trong nghiên cứu này, trình tự đoạn gen COI sẽ được khuếch đại bằng cặp mồi đặc hiệu COI-20F/COI-812R từ DNA tổng số tách chiết từ các cá thể rầy nâu thu thập trên lúa và cỏ môi ở Việt Nam. Sản phẩm PCR được giải trình tự, so sánh và phân tích bằng phần mềm MEGA5 để xác định mối quan hệ gia phả của chúng với các trình tự trên GenBank.

## II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 1. Vật liệu nghiên cứu

Nguồn rầy nâu thu thập trên lúa và trên cỏ môi tại Tiền Giang (2010), Bình Thuận (2011) và Bắc Giang (2012).

Cặp mồi đặc hiệu dùng để khuếch đại đoạn gen COI (Laura et al., 2007):

COI-20F: 5'-TTCTTATTCTTCCAGGATTGG-3'

COI-812R: 5'-GGAATTTTCATTAAGGAGTGTTCTC-3'

Trình tự đoạn gen COI trên GenBank được tham khảo gồm: *Nilaparvata lugens*, *Sogatella furcifera*, *Laodelphax striatellus* và *Nephotettix virescens* với các mã số truy cập tương ứng là JN391181, JN391183, JN391182 và JN391184.

Trình tự đoạn gen COI của 3 loài rầy nâu trên lúa và trên cỏ của Trung Quốc được GS Jaan Cheng (Zhejiang University, Trung Quốc) xác định bằng phương pháp tương tự.

Phần mềm phân tích gen MEGA5.

### 2. Phương pháp nghiên cứu

**Điều tra, thu thập rầy nâu:** Rầy nâu trưởng thành được thu trên cây lúa và trên cỏ môi mọc quanh bờ ruộng hoặc kênh mương xung quanh ruộng lúa. Rầy sau khi thu thập được bảo quản ngay trong cồn tuyệt đối và lưu giữ trong tủ lạnh sâu -20°C tại Viện Bảo vệ Thực vật (BVTV). Nguồn rầy nâu trên lúa được thu thập trực tiếp trên cây lúa trong ruộng lúa. Nguồn rầy nâu trên cỏ môi được

thu thập theo hai cách: (i) Thu trực tiếp trên cỏ môi (mẫu thu năm 2010 và 2011); và (ii) Thu cỏ môi với vết đẻ trứng rồi nhân nuôi trong lồng lưới chống côn trùng tại Viện BVTV để thu rầy trưởng thành nở và phát triển từ cỏ môi đó (mẫu thu năm 2012 tại Bắc Giang).

**Quy trình tách chiết DNA tổng số từ cá thể rầy nâu:** Dùng pipette rửa rầy 3 lần bằng cồn 70% và 3 lần bằng nước cất. Nghiên cứu từng cá thể rầy trong tube 1,5ml với 200µl “dịch chiết DNA”<sup>1</sup>. Lắc mạnh trên máy lắc rung 15 giây/mẫu rồi ủ ở nhiệt độ 60°C có lắc (200 vòng/phút, trong 15 phút). Các tube lấy ra để ở nhiệt độ phòng 5 phút. Thêm vào mỗi tube 4µl Rnase-A (100 mg/ml) và ủ ở nhiệt độ 37°C. Thêm vào mỗi tube 1.200µl Phenol (25:24:1) và lắc mạnh trên máy lắc rung trong 2 phút. Ly tâm 10.000 vòng/phút ở 10°C trong 7 phút rồi hút phần dung dịch phía trên sang tube mới. Thêm vào mỗi tube 200-250µl Chloroform tinh khiết rồi lắc mạnh trên máy lắc rung trong 1 phút. Ly tâm 10.000 vòng/phút ở 10°C trong 7 phút rồi hút phần dung dịch phía trên sang tube mới. Thêm vào mỗi tube 1 lượng tương đương Isopropanol rồi để mẫu ở -20°C trong 60 phút. Ly tâm 13.000 vòng/phút ở 4°C trong 10 phút. Loại bỏ phần dịch trong và rửa kết tủa 3 lần với cồn 70% và 1 lần bằng cồn tuyệt đối. Hòa tan DNA bằng 20µl nước cất vô trùng. Sử dụng 2µl DNA này cho mỗi phản ứng PCR dung tích 25µl.

**Quy trình PCR:** Phản ứng PCR được thực hiện trên máy PCR Perkin-Elmer 2000 (USA) với tổng thể tích 25µl cho mỗi tube phản ứng, trong đó bao gồm: 18,5µl H<sub>2</sub>O; 2,5µl 10 × buffer (Promega); 0,75µl 25mM MgCl<sub>2</sub>; 0,5µl 10mM dNTPs; 0,5µl COI-20F và 0,5µl COI-812R; 0,5-unit Taq-DNA-polymerase (Promega) và 2µl DNA. Chu

<sup>1</sup> Dịch chiết DNA: 10ml dịch chiết bao gồm 4ml CTAB 5%; 2,8ml NaCl 5M; 0,4ml EDTA 0,5M; 1ml Tris pH 8,0; 20µl 2-mercaptoethanol; và 1,78ml nước.

trình nhiệt bao gồm 1 vòng tại 95°C trong 3 phút; 35 vòng với 94°C/30 giây, 46°C/30 giây và 72°C/45 giây; và kết thúc bằng 1 vòng tại 72°C trong 10 phút (Laura et al., 2007).

*Điện di:* 10 µl sản phẩm PCR cùng 2µl loading-dye được chạy điện di trên gel 1% agarose với 0,5X-TAE và đọc kết quả trên hệ thống chụp gel GELDOC. Sản phẩm PCR có kích thước mong đợi khoảng 600 bp.

*Giải trình tự gen:* Sản phẩm PCR được chuẩn nồng độ theo yêu cầu bằng máy Nano-Drop ND100 và gửi cho Công ty Mille-Gen (<http://www.millegen.com>) để giải trình tự theo phương pháp đọc trình tự trực tiếp.

*Phân tích trình tự gen:* Trình tự gen thu được sẽ được phân tích theo phương pháp gia phả sử dụng phần mềm MEGA5 (Anh et al., 2012).

### III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Từ tổng số 200 cá thể rầy nâu thu thập tại Bình Thuận (2010), Tiền Giang (2011) và Bắc Giang (2012), đã lựa chọn được 31 trình tự hoàn chỉnh đoạn gen COI của Việt Nam (bảng 1).

Bảng 1. Danh sách và nguồn gốc các trình tự gen COI đã sử dụng (Viện BVTV, 2012).

TT	Ký hiệu mẫu	Năm thu thập	Nơi thu mẫu	Ký chủ
1	Sogatella_furcifera_JN391183		GenBank	
2	Laodelphax_striatellus_JN391182		GenBank	
3	Nephotettix_virescens_JN391184		GenBank	
4	Nilaparvata_lugens_JN391181		GenBank	
5	Nilaparvata_lugens	2012	Trung Quốc	Lúa
6	Nilaparvata_bakeri	2012	Trung Quốc	Cỏ
7	Nilaparvata_muiri	2012	Trung Quốc	Cỏ
8	Vn6, Vn9a, Vn10 (3 rầy)	2010	Tiền Giang	Lúa
9	Vn9b, Vn11, Vn12 (3 rầy)	2010	Tiền Giang	Cỏ
10	Vn1 ~ 10 (10 rầy)	2011	Bình Thuận	Lúa
11	Vn11 ~ 17 (7 rầy)	2011	Bình Thuận	Cỏ
12	Vn1 ~ 3 (3 rầy)	2012	Bắc Giang	Lúa
13	Vn4, 5, 7, 7, 9 (5 rầy)	2012	Bắc Giang	Cỏ

Kết quả phân tích về khoảng cách di truyền (*P-distance*) cho thấy các cá thể rầy nâu phân làm 3 nhóm với các trị số *P-distance* dao động trong nhóm từ 0 - 0,8% trong khi trị số *P-distance* giữa các nhóm dao động từ 2,6 - 11%:

2 cá thể rầy nâu ký hiệu 2011\_Vn6, 2011\_Vn\_16 và rầy nâu *N. bakeri* ( $P = 0$ ).

Cá thể rầy nâu ký hiệu 2012\_Vn5 và *N. muiri* ( $P = 0,008$ ).

28 cá thể rầy nâu còn lại của Việt Nam cùng với *N. lugens* ( $P = 0 - 0,006$ ).

Kết quả phân tích quan hệ gia phả cho thấy sự phân lớp thể hiện rất rõ trên cây

phả hệ, với độ tin cậy cao (giá trị bootstrap 81 - 99%):

Cá thể 2011\_Vn6 và 2011\_Vn16 cùng phân nhánh với *N. bakeri*.

Cá thể 2012\_Vn5 cùng nằm trên 1 nhánh với *N. muiri*;

28 cá thể rầy nâu của Việt Nam cùng với *N. lugens* của Trung Quốc và GenBank (*N. lugens*\_JN391181) nằm cùng 1 nhánh riêng biệt, trong đó bao gồm cả một số cá thể rầy nâu nhân nuôi từ cỏ môi;

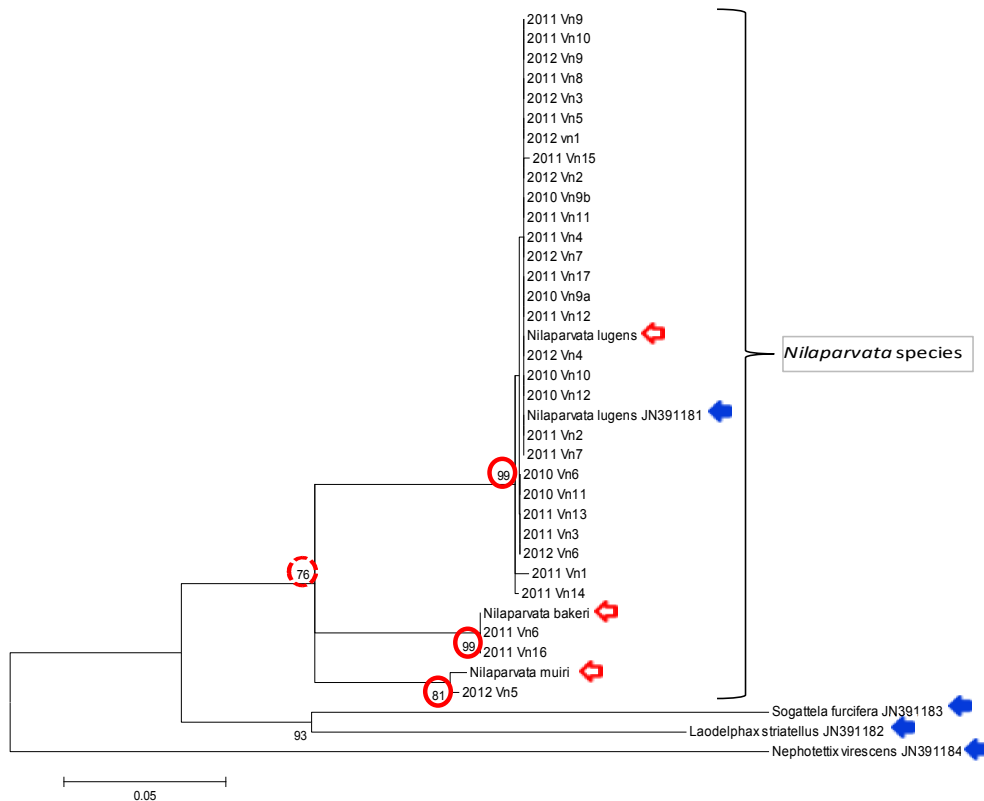
Căn cứ vào kết quả phân tích trình tự đoạn gen COI ở trên, ghi nhận lần đầu tiên sự tồn tại 2 loài rầy nâu trên cỏ

(*N. muiri* và *N. bakeri*) trên sinh thái ruộng lúa ở Việt Nam.

Xem xét về nguồn gốc của các cá thể rầy được phân tích gen cho thấy một số cá thể rầy nở ra từ cỏ môi cũng nằm cùng nhánh trên cây phả hệ với rầy thu thập trên lúa trong ruộng lúa (2012\_Vn4, 6, 7, 9) và ngược lại (2011\_Vn6). Điều này cho thấy rầy nâu trên lúa có thể tồn tại, đẻ trứng và hoàn thành vòng đời trên cỏ môi. Ngược lại, một số cá thể rầy trên cỏ có thể tồn tại

trên lúa và chúng đã được thu thập trong quá trình thu thập rầy nâu trên cây lúa.

Theo kết quả nghiên cứu trước đây của các nhà khoa học Nhật Bản, hai loài rầy nâu trên cỏ *N. muiri* và *N. bakeri* có thể truyền virus gây bệnh vàng lùn với hiệu quả thấp (Hibino, 1986). Theo giáo sư Ja-an Cheng (Đại học Tổng hợp Triết Giang, Trung Quốc), tại Trung Quốc, bên cạnh *N. lugens* còn tồn tại 2 loài rầy nâu *N. bakeri* và *N. muiri* trong hệ sinh thái ruộng lúa. Hai loài rầy nâu này thích ứng tồn tại trên cỏ.



Hình 1: Cây phả hệ được xây dựng bằng phần mềm MEGA5 (Phương pháp Neighbour-joining; mô hình Kimura-2 tham số, Bootstrap 1.000) dựa trên 38 trình tự đoạn gen COI. Trình tự tham khảo trên GenBank được viết tên Latin và mã số truy cập. Trình tự do GS Ja-an Cheng - Đại học Triết Giang (Trung Quốc) cung cấp được viết tên Latin. Thanh tỷ lệ: Số thay thế tại mỗi vị trí nucleotide. Giá trị bootstrap dưới 80% đã được để ẩn.

Với những kết quả ban đầu ghi nhận ở trên, việc phòng trừ rầy nâu và loại bỏ tàn

dư cây bệnh trên đồng ruộng sau khi thu hoạch lúa trong hệ thống các biện pháp

tổng hợp mà Viện BVTV đã đề xuất trước đây cần bổ sung đối tượng rầy trên cỏ và cỏ môi. Mặt khác, để công bố đầy đủ hơn về sự hiện diện của hai loài rầy nâu này trên ruộng lúa của Việt Nam cần có những nghiên cứu bổ sung về mặt côn trùng học.

#### KẾT LUẬN

Đã xác định được 31 đoạn trình tự của gen COI và đã xây dựng được 1 cây phả hệ tương ứng dựa trên các trình tự này.

Tồn tại cả 3 loài rầy nâu trong sinh thái ruộng lúa ở Việt Nam, bao gồm *Nilaparvata lugens*, *N. muiri* và *N. bakeri*, với mức độ đa dạng di truyền trong loài dưới 1% và giữa các loài dao động trong khoảng 2,6 - 11%.

Lần đầu tiên ghi nhận hai loài rầy nâu trên cỏ là *N. muiri* và *N. bakeri* trong quần thể rầy nâu hại lúa ở Việt Nam.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Anh T.H., Phuong N.D., Sandrine C., Duc N.T., Vien N.V., Hebrard E., 2012. *Molecular diversity of Rice grassy stunt virus in Vietnam*. *Virus Genes*, 46(2): 383-386.

2. Hibino H., 1996. *Biology and Epidemiology of rice viruses*. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 34:249-74.

3. Hogenhout S.A., Ammar E.D., Whitfield A.E., and Redinbaugh M.G., 2008. *Insect vector interactions with persistently transmitted viruses*. *Annu. Rev. Phytopathol.* 46: 327-359.

4. Latif M. A., Tan S.G., Omar M.Y., Siti S.S., 2008. *Evidence of Sibling Species in the Brown Planthopper Complex (*Nilaparvata lugens*) Detected from Short and Long Primer Random Amplified Polymorphic DNA Fingerprints*. *Biochem Genet*, 46:520-537

5. Laura M.B., Robert G.S.J., Rosemarie C.R., Cindy L.McK., Ruth A.B., Paul D.B., Donald R.F., 2007. *Global relationships of Bemisia tabaci (Hemiptera: Aleyrodidae) revealed using Bayesian analysis of mitochondrial COI DNA sequences*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 44: 1306-1319.

Ngày nhận bài: 10/3/2013

Người phản biện: PGS. TS. Nguyễn Văn Viêt,  
ngày 12/3/2013

Ngày duyệt đăng: 5/7/2013

### **NGHIÊN CỨU MỐI QUAN HỆ GIỮA QUẦN THỂ VI SINH VẬT ĐẤT CÓ ÍCH VÀ SỰ PHÁT TRIỂN CỦA CÂY NGÔ LÀM CƠ SỞ DỮ LIỆU NỀN ĐỂ XÁC ĐỊNH ẢNH HƯỞNG CỦA CÂY NGÔ BIẾN ĐỔI GEN ĐẾN ĐA DẠNG SINH HỌC CỦA VIỆT NAM**

Ngô Xuân Quý, Phạm Anh Cường,  
Nguyễn Thị Thanh Thủy, Tạ Kiều Anh,  
Nguyễn Bá Tú, Lương Hữu Thành,  
Hứa Thị Sơn, Nguyễn Ngọc Quỳnh

#### **SUMMARY**

#### **Study on relationship between beneficial soil microorganisms population and development of corn plant as the database to determine the impact of genetically modified corn (GM corn) to biodiversity in Viet Nam**

The research was conducted in order to characterized the diversity of microorganisms population incorporated with evaluation of corn plant development in different corn growing areas in Vietnam.