

KHẢO SÁT KHẢ NĂNG KHÁNG BỆNH BẠC LÁ, ĐẠO ÔN, RẦY NÂU CỦA 4 GIỐNG LÚA PHỤC TRÁNG: NẾP ĐÈO ĐÀNG, TÊ PUDE, BLECHÂU VÀ KHẨU DAO

Phan Hữu Tôn

Trung tâm Bảo tồn và Phát triển Nguồn gen Cây trồng, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

Email: phanhuuton@yahoo.com

Ngày gửi bài: 25.11.2016

Ngày chấp nhận: 05.05.2016

TÓM TẮT

Việt Nam là một trong những trung tâm khởi nguyên của cây lúa nên có nguồn gen vô cùng phong phú. Đặc biệt ở nước ta tồn tại rất nhiều giống lúa địa phương mang gen kháng sâu bệnh và những tính trạng quý hiếm cho công tác chọn tạo giống. Trong nghiên cứu này, 4 giống lúa địa phương nếp Đèo đàng, tẻ Pude, Blechâu và Khẩu dao được khảo sát về khả năng kháng bệnh bạc lá, đạo ôn và rầy nâu bằng lây nhiễm nhân tạo sử dụng 10 chủng vi khuẩn gây bệnh bạc lá miền bắc Việt Nam, 2 quần thể rầy nâu và 3 isolate nấm đạo ôn. Đồng thời sử dụng các chỉ thị phân tử DNA để xác định khả năng chứa gen kháng bệnh bạc lá như: chỉ thị MP2 xác định khả năng chứa gen kháng *Xa4*, chỉ thị P3 xác định gen kháng *Xa7*, chỉ thị YL155/YL 87 phát hiện khả năng chứa gen *Pi-ta* kháng bệnh đạo ôn và chỉ thị RG457L phát hiện gen *Bph10* kháng rầy nâu. Kết quả thu được giống Blechâu chứa 3 gen kháng *Xa4*, *Xa7* và *Pi-ta*, Khẩu dao mang gen *Xa4* và *Bph10*, giống nếp Đèo đàng chứa gen *Xa7* và *Pi-ta*, tẻ Pude mang gen *Xa4* và *Bph10*. Các giống chứa các gen kháng đều kháng tốt hữu hiệu với các chủng vi khuẩn gây bệnh bạc lá, đạo ôn và rầy nâu được nghiên cứu.

Từ khóa: Bệnh bạc lá, đạo ôn, gen *Xa4*, *Xa7*, *Pi-ta* và *Bph10*, rầy nâu.

Resistance of Local Rice Varieties, Deo Dang, Pude, Blechau and Khau Dao to Bacterial Leaf Blight, Blast Disease and Brown Plant Hopper

ABSTRACT

Vietnam is one of the centers of rice with rich genetic resource. Especially, in Vietnam exists a lot of local rice varieties carrying resistance genes that are unique materials for breeding work. In this study the resistance of four local varieties to bacterial blight and blast and brown plant hopper was investigated by artificial inoculation using 10 strains of bacterial leaf blight, three isolates of blast fungi and two hopper populations. The resistance genes in 4 cultivars were identified by using DNA markers, MP2, P3, YL155/YL87 and RG457L to detect *Xa4*, *Xa7*, *Pi-ta* and *Bph10* resistance genes, respectively. The results showed that cv Blechau contains three genes *Xa4*, *Xa7* and *Pi-ta*, while cv. Khau dao contains *Xa4* and *Bph10* genes, sticky rice cv. Deo dang has *Xa7* and *Pi-ta* genes and Pude cultivar has *Xa4* and *Bph10* resistance genes. The cultivars containing *Xa4*, *Xa7*, *Pi-ta* and *Bph10* genes also showed strong resistance to the tested strains of bacterial leaf blight and blast disease and two brown planthopper populations, respectively.

Keywords: Bacterial leaf blight, blast, brown plant hopper, *Xa4*, *Xa7*, *Pi-ta* and *Bph10* genes.

1. MỞ ĐẦU

Việt Nam là một trong những trung tâm khởi nguyên của cây lúa, có nguồn gen vô cùng

phong phú. Đặc biệt có nhiều giống lúa địa phương mang gen kháng bệnh và những tính trạng nông sinh học quý làm vật liệu cho công tác chọn tạo giống. Bốn giống lúa: nếp Đèo

đàng, tẻ Pude, Blechâu và Khẩu dao, là giống lúa đặc sản của Tuyên Quang, Điện Biên và Sơn La. Chúng có nhiều đặc điểm tốt như năng suất cao, chất lượng gạo tốt, cơm thơm và dẻo lâu, chống chịu sâu bệnh tốt và phù hợp với điều kiện sản xuất địa phương. Bốn giống này đã được Trung tâm Bảo tồn và Phát triển Nguồn gen Cây trồng, Học viện Nông nghiệp Việt Nam phục tráng và đang bảo tồn. Để sử dụng làm nguồn vật liệu trong các chương trình lai chọn tạo giống lúa năng suất cao, chất lượng tốt, chống chịu với điều kiện hữu và vô sinh, cũng như phát triển ra sản xuất đem lại hiệu quả kinh tế cao thì cần phải đánh giá lại các đặc điểm của chúng. Một trong những đặc điểm quan trọng là khả năng chứa các gen kháng và chống chịu tốt với các loại sâu bệnh chính hiện nay, cụ thể như: bạc lá, đạo ôn và rầy nâu.

Cho đến nay đã có nhiều công trình nghiên cứu về tác nhân gây bệnh bạc lá và đạo ôn, số lượng và thành phần phân bố các chủng ở mỗi vùng sinh thái và mức độ gây độc của từng chủng (Phan Hữu Tôn và cs., 2012). Đồng thời đã xác định được nhiều gen kháng bệnh, lập bản đồ liên kết trên từng nhiễm sắc thể, xác định gen kháng hữu hiệu đối với từng chủng gây bệnh cũng như nhiều gen đã được xác định chỉ thị phân tử DNA liên kết. Bệnh bạc lá do vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* gây ra, là một bệnh đặc biệt nguy hiểm đối với cây lúa. Bệnh làm giảm năng suất từ 10-80%, thậm chí mất trắng. Hiện đã phát hiện có 36 gen, trong đó đã xác định có 4 gen là *Xa4*, *xa5*, *Xa7* và *Xa21* là các gen kháng hữu hiệu đối với các chủng vi khuẩn gây bệnh bạc lá ở miền Bắc Việt Nam (Phan Hữu Tôn và Bùi Trọng Thủy, 2004b). Bệnh đạo ôn do nấm *Pyricularia grisea* gây ra, đây là một trong số các bệnh phổ biến và nguy hại nhất đối với lúa. Hiện các nhà nghiên cứu trên thế giới đã xác định được 30 locus gen kháng bệnh đạo ôn, trong đó có gen *Pi-ta* nằm trên nhiễm sắc thể số 12 được cho là kháng hữu hiệu với nhiều chủng nấm gây bệnh nhất (Yohei et al., 2009). Tương ứng có tới 426 chủng nấm

gây bệnh đã được phân lập và xác định đang tồn tại ở các vùng trồng lúa khác nhau trên thế giới. Đối với rầy nâu đã phát hiện có 10 gen kháng trội lặn và 5 biotypes rầy nâu đang tồn tại trên thế giới. Trong đó 2 gen *Bph4* và *Bph10* là 2 gen kháng tốt với biotype rầy nâu, phổ biến ở vùng Đông Nam châu Á. Trong nghiên cứu này, khả năng chứa gen *Xa4* và *Xa7* kháng hữu hiệu đối với các chủng vi khuẩn gây bệnh bạc lá, gen kháng bệnh đạo ôn *Pi-ta* và gen kháng biotype rầy nâu *Bph10* đã được xác định bằng sử dụng chỉ thị phân tử DNA liên kết gen. Đồng thời khả năng kháng bệnh và rầy nâu của 4 giống lúa phục tráng chứa các gen kháng khác nhau cũng được đánh giá thông qua lây nhiễm nhân tạo đối với 10 chủng vi khuẩn gây bệnh bạc lá, 3 chủng phân lập nấm đạo ôn và 2 quần thể rầy nâu Việt Nam.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Nghiên cứu sử dụng bốn giống lúa đã được phục tráng: Đèo dâng, Pude, Blechâu, Khẩu dao. Giống TN1 giống nhiễm chuẩn rầy nâu, IR24 giống nhiễm chuẩn bệnh bạc lá, giống IRBL24 kháng chuẩn bệnh đạo ôn, giống BLs nhiễm chuẩn bệnh đạo ôn, dòng đẳng gen IRBB4 (chứa gen *Xa4*), IRBB7 (chứa gen *Xa7*), giống chỉ thị BH362 (chứa gen *Bph10*). Hai quần thể rầy nâu thu thập tại Ý Yên, Nam Định và Tứ Kỳ, Hải Dương. 10 chủng vi khuẩn gây bệnh bạc lá đang tồn tại ở miền Bắc Việt Nam và 3 chủng phân lập nấm bệnh đạo ôn được thu thập lần lượt trên các giống BC15 tại Hưng Hà, Thái Bình và Q5 tại Bô Thới, Hưng Yên và nếp Nhung tại Phúc Thọ, Hà Nội.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Sử dụng chỉ thị DNA phát hiện gen kháng

Phương pháp chiết tách DNA lúa theo Zheng et al. (2003). Thành phần dung dịch phản ứng PCR gồm có: 10μl PCR master mix (2X), 1μl

Primer Forward (0,5pmol/ul), 1µl Primer Reverse (0,5pmol/ul), 1,5µl DNA mẫu và 6,5µl nuclease-Free water.

Phát hiện gen kháng bệnh bạc lá

Gen kháng bệnh bạc lá *Xa4* được phát hiện bằng sử dụng chỉ thị Npb181 theo Yoshida *et al.* (1991) với cặp mồi R 5'GTG CTA TAA AAG GCA TTC GGG 3'; F 5'ATC GAT CGA TCT TCA CGA GG 3'; Gen *Xa7* được phát hiện bằng sử dụng chỉ thị P3 theo Taura *et al.* (2004) với cặp mồi F 5' CAG CAA TTC ACT GGA GTA GTG GTT 3'; R 5' CAT CAC GGT CAC CGC CAT ATC GGA 3'. Chu trình nhiệt PCR của gen *Xa4* và *Xa7*: 94°C trong 4 phút, 30 chu kỳ: 94°C trong 1 phút, 56°C trong 1 phút, 72°C trong 2 phút, và bước cuối cùng 72°C trong 8 phút. Điện di sản phẩm PCR trên gel agarose nồng độ 1,5%. Để kiểm tra khả năng chứa 2 gen kháng bệnh bạc lá hữu hiệu *Xa4* và *Xa7* có trong 04 giống phục tráng nếp Đèo dâng, tẻ Pude, Blechâu và Khẩu dao, DNA genome nguyên bản của 04 giống được chiết xuất, rồi tiến hành phản ứng PCR sử dụng 02 cặp mồi có trình tự tương ứng với mỗi gen. Sau đó, sản phẩm nhân gen được chạy điện di cùng với sản phẩm nhân gen của các dòng đối chứng IR24, IRBB4, IRBB7 và so sánh kích thước với DNA ladder 1kb.

Phát hiện gen kháng bệnh đạo ôn

Để phát hiện gen kháng bệnh đạo ôn *Pi-ta* sử dụng cặp mồi YL155 có trình tự: 5'-AGCAGGTTATAAGCTAGGCC-3' và YL 87: 5'-CTA-CCAACAAGTTCATCAAA-3' theo Yu *et al.* (2002). Chu kỳ nhiệt của phản ứng: 95°C - 3 phút, tiếp theo là 29 chu kỳ, với mỗi chu kỳ có các bước: 95°C - 30 giây, 50°C - 30 giây, 72°C - 30 giây, sau đó giữ ở 72°C trong 7 phút. Điện di kiểm tra sản phẩm PCR trên gel agarose 1,5% ở 65V.

Phát hiện gen kháng rầy nâu

Sử dụng chỉ thị STS phát hiện gen kháng rầy nâu *Bph10* sử dụng chỉ thị RG457L với cặp mồi xuôi F: 5'-GCAGTGGCAGATGGGATCGT-3' và R: 5'-GCTCCGAAATCCCAAGCGAT-3'

trích dẫn theo Lang *et al.* (2006). Chu kỳ nhiệt của phản ứng gồm: biến tính DNA trong 94°C - 5 phút, tiếp theo là 30 chu kỳ, với mỗi chu kỳ có các bước: 94°C - 30 giây, 55°C - 30 giây, 72°C - 1 phút, sau đó giữ ở 72°C trong 5 phút. Sản phẩm PCR gen *Bph10* được cắt bằng enzyme *HinfI*. Phản ứng cắt bằng enzyme *HinfI* như sau: Nuclease free water: 18µl, 10X Buffer R: 2µl, *HinfI*: 2µl. Sản phẩm PCR: 10µl. Ủ ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 16 giờ. Điện di sản phẩm PCR đã được cắt trên gel agarose 2%, ở hiệu điện thế 60V.

2.2.2. Đánh giá khả năng kháng bệnh bạc lá, đạo ôn và rầy nâu bằng lây nhiễm nhân tạo

Bệnh bạc lá

10 chủng vi khuẩn gây bệnh bạc lá đang bảo tồn tại Bộ môn Sinh học phân tử và Công nghệ Sinh học ứng dụng, Khoa Công nghệ Sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam được nuôi cấy trên môi trường Wakimoto (1955), sau 48h nuôi cấy thành khuẩn lạc. Trước khi tiến hành, đánh giá khả năng duy trì tính gây nhiễm của các chủng bằng cách lây nhiễm trên giống nhiễm chuẩn IR24. Chủng nào còn khả năng gây nhiễm mới được tiếp tục sử dụng để lây nhiễm cho 4 giống nghiên cứu. Lấy ba vòng vi khuẩn hoà tan với 10ml nước cất tạo dung dịch lây nhiễm có nồng độ 10^8 - 10^9 tế bào vi khuẩn/ml. Lây nhiễm nhân tạo bằng cắt đầu lá theo Taura *et al.* (2004), có cải tiến vào thời kỳ làm đồng và ở vụ mùa bệnh phát triển mạnh, trước khi lây nhiễm 10 ngày bón thêm 20kg N/ha đạm ure để tăng tính miễn cảm với bệnh. Trồng mật độ thưa 35×40 cm để lá giữa các cây không cọ sát nhau, tránh truyền lan và cấy một danh. Dùng kéo vô trùng nhúng vào dịch vi khuẩn rồi cắt đầu lá dài 3-5cm (nhúng sâu 3 cm, cắt 5 lá), cắt toàn bộ các lá còn xanh trên một cây và ở 10 cây tương ứng với 10 chủng trên mỗi giống. Đánh giá khả năng kháng nhiễm bằng cách đo chiều dài vết bệnh của 5 lá sau 18 ngày lây nhiễm, tính trung bình. Chiều dài vết bệnh <8cm: kháng (R), chiều dài vết bệnh 8-

Khảo sát khả năng kháng bệnh bạc lá, đạo ôn, rầy nâu của 4 giống lúa phục tráng: nếp Đèo dâng, tẻ Pude, Blechâu và Khẩu dao

12cm: Nhiễm vừa (M), chiều dài vết bệnh >12cm: Nhiễm nặng (S).

Bệnh đạo ôn

Chuẩn bị nguồn bào tử: Ba nguồn nấm bệnh đạo ôn được phân lập từ giống BC15 cấy ở Thái Bình, Q5 từ Hải Dương và nếp Nhung từ Phú Thọ được nuôi cấy trên môi trường PDA, bổ sung thêm biotin và thiamin trong các đĩa petri. Mỗi chủng cấy 6 đĩa và để trong tủ định ôn 28°C. Sau khi nuôi cấy khoảng 2 tuần, lấy các đĩa ra khỏi tủ rồi cho vào mỗi đĩa 20ml nước cất, dùng chổi lông vô trùng quét hết sợi nấm rồi đặt đĩa vào tủ, mỗi ngày chiếu sáng 12 giờ. Sau khoảng 3 ngày thì lấy đĩa ra, cho vào mỗi đĩa 20ml nước cất có bổ sung Tween 20, dùng chổi lông quét nhiều lần trên mặt thạch, lọc lấy nước cho vào các bình tam giác có dung tích 100 ml. Mỗi chủng quét bằng một chổi và cho vào một bình. Kiểm tra và đếm bào tử bằng kính hiển vi, nếu có từ 40-50 bào tử trên một quang trường là đảm bảo mật độ.

Phương pháp lây nhiễm: Gieo mạ vào khay đất dày 3cm, mật độ cây × cây 2cm, mỗi giống gieo một hàng 20 cây, gieo 3 lần nhắc lại, xung quanh gieo giống nhiễm chuẩn IRBL24. Khi mạ được 4 lá thật, thường sau gieo 20-22 ngày thì đưa vào tủ lây nhiễm, rồi phun đều bào tử bệnh lên lá lúa, che nắng và giữ ẩm thường xuyên trên 96% trong 24 giờ bằng cách cứ 12 giờ phun mù một lần.

Cách đánh giá: Sau lây nhiễm được 7 ngày, tiến hành đánh giá khả năng kháng bệnh giữa các mẫu giống theo thang điểm của Kato, 1993: *Cấp 0:* Không có vết - Kháng cao (HR). *Cấp 1:* Vết bệnh chỉ nhỏ bằng đầu kim - Kháng (R). *Cấp 2:* Vết bệnh to hơn, màu nâu nhạt đến nâu tối - Kháng vừa (M). *Cấp 3:* Vết bệnh to hơn và có màu xám ở giữa - nhiễm (S). *Cấp 4:* Vết bệnh có hình thoi đặc trưng - Nhiễm nặng (HS).

Bệnh rầy nâu

Bốn giống lúa nghiên cứu được gieo trong khay chứa lớp đất bùn dày 5 cm, gieo thành từng hàng, mỗi hàng cách nhau 2,5cm, cây cách

cây 2,5cm. Mỗi hàng gieo 20 hạt, mỗi giống gieo tuần tự một hàng, xen kẽ và xung quanh gieo giống TN1 nhiễm rầy chuẩn, gieo nhắc lại 3 lần. Khi cây mạ được 2 lá thật thì tiến hành thả 2 rầy con tuổi 2-3/cây mạ. Hai quần thể rầy nâu được thu thập từ Ý Yên Nam Định và Tứ Kỳ, Hải Dương được nuôi liên tục trong lồng kính kín, thức ăn là giống TN1 nhiễm chuẩn và nuôi tại Trung tâm Bảo tồn và Phát triển Nguồn gen Cây trồng, Học viện Nông nghiệp Việt Nam. Đánh giá khả năng kháng rầy khi giống TN1 bị héo chết trên 90%, tiến hành vào vụ mùa 2015. Kết quả đánh giá dựa vào bảng phân cấp hại theo thang điểm của IRRI: từ cấp 0-1 là kháng, cấp 3-5 là kháng vừa và cấp 7-9 là nhiễm theo tiêu chuẩn của IRRI năm 1985. Cấp 0: không bị hại; Cấp 1: bị hại nhẹ; Cấp 3: đỉnh lá thứ nhất và thứ 2 bị vàng cam và lùn nhẹ; Cấp 5: hơn số lá bị vàng cam ở đỉnh lá, cây lùn rõ rệt; Cấp 7: hơn 1/2 cây bị chết, số còn lại bị lùn và héo và Cấp 9: tất cả các cây mạ bị chết.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Khả năng kháng bệnh bạc lá

3.1.1. Phát hiện gen kháng bệnh bạc lá Xa4 và Xa7 bằng chỉ thị phân tử DNA

Kết quả phát hiện gen kháng bằng chỉ thị DNA cho thấy giống nào có chứa gen Xa4 khi dùng cặp mồi MP2, sẽ nhân được vạch băng có kích thước 120bp, giống không chứa gen Xa4 sẽ nhân được đoạn dài hơn là 150bp (Hình 1). Đối với gen Xa7 phát hiện dùng cặp mồi P3 sẽ cho vạch băng nhân lên có kích thước ở mẫu giống có chứa gen kháng Xa7 là 297 bp, giống không chứa gen Xa7 sẽ có vạch băng là 262bp. Qua kết quả ảnh điện di sản phẩm nhân gen (Hình 2) cho thấy giống tẻ Pude và Khẩu dao đều chứa gen kháng bệnh bạc lá Xa7, giống nếp Đèo dâng và Blechâu không mang gen Xa7.

3.1.2. Kết quả lây nhiễm nhân tạo

Đánh giá khả năng kháng nhiễm của các giống Blechâu, Đèo dâng, Pude và Khẩu dao,

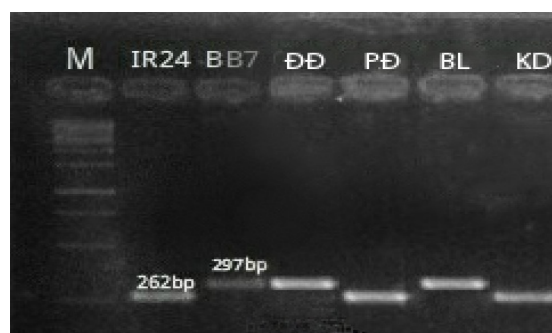
bằng cách lây nhiễm nhân tạo với 10 chủng vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae* được Phan Hữu Tôn và Bùi Trọng Thủy phân lập (2004b). Kết quả cho thấy 4 giống lúa địa phương phục tráng và các dòng đẳng gen có khả năng kháng nhiễm khác nhau đối với các chủng vi khuẩn gây bệnh bạc lá. Kết quả đánh giá tính kháng nhiễm của 4 giống địa phương phục tráng, dòng đẳng gen IRBB4, IRBB7 và IR24 với 10 chủng vi khuẩn gây bệnh được trình bày ở bảng 4, cho thấy giống nhiễm chuẩn IR24 không chứa gen kháng bệnh nào thì bị nhiễm nặng bởi tất cả 10 chủng gây nhiễm. Các giống còn lại có chứa gen kháng khác nhau đều kháng được một số chủng bệnh bạc lá, mặc dù tính kháng nhiễm của mỗi chủng đối với các giống chứa cùng gen kháng có khác nhau. Giống

Blechâu chứa cả hai gen Xa4 và Xa7 kháng được 5/10 chủng lây nhiễm là chủng 1, 2, 3, 6 và chủng 10, nhiễm vừa với chủng 7, 8 và 9. Trong khi đó giống Đèo đàng chứa gen Xa7 có tỷ lệ kháng nhiễm là 4R/3M/3S, kháng được 4/10 chủng đó là chủng 1, 8, 9 và 10, nhiễm vừa với chủng 2, 3 và 7. Giống Pude, Khẩu dao và dòng đẳng gen IRBB4 đều cùng chứa gen kháng Xa4 nhưng có tỷ lệ kháng nhiễm với 10 chủng lây nhiễm cũng khác nhau lần lượt là 4R/2M/4S, 3R/2M/5S và 4R/2M/4S. Giống Pude kháng được chủng 1, 2, 7 và 10, nhưng nhiễm nhẹ với chủng 6, 8 và 9. Trong khi đó giống Khẩu dao lại kháng được chủng 1, 7 và 9, nhiễm vừa với chủng 2, 3, 8 và 10. Giống nếp Đèo đàng chứa gen kháng hữu hiệu Xa7, có tỷ lệ kháng nhiễm là 4R/3M/3S, kháng được chủng 1, 8, 9 và 10,



Hình 1. Điện di sản phẩm PCR gen Xa4

Ghi chú: M-ladder, IR24 (đối chứng âm), IRBB4 (đối chứng dương), mẫu chứa gen Xa5: PĐ (Pude), BL (Blechâu) và KD (Khẩu dao).



Hình 2. Điện di sản phẩm PCR gen Xa7

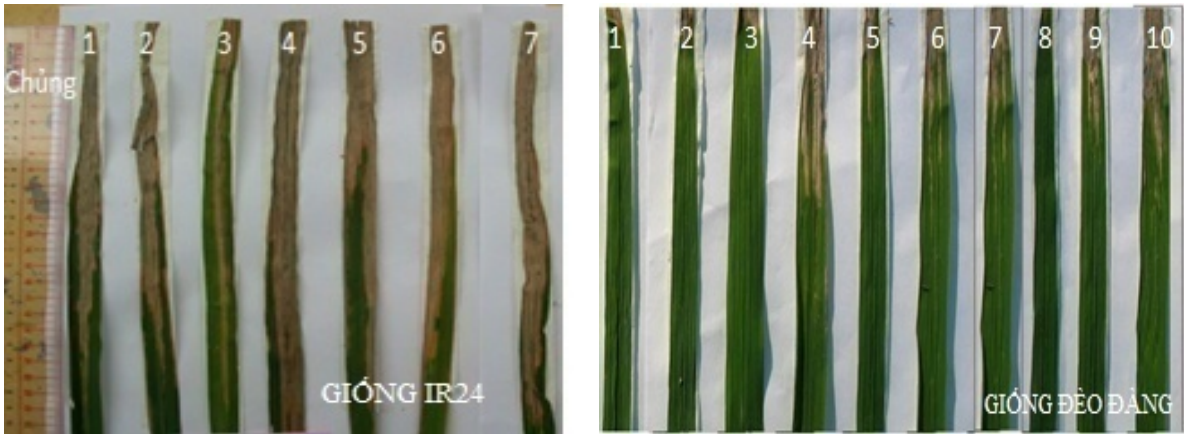
Ghi chú: M-ladder, IR24 (đối chứng âm), BB7 (đối chứng dương), Mẫu chứa gen Xa7: ĐĐ (Đèo đàng), BL (Blechâu)

Bảng 4. Kết quả lây nhiễm nhân tạo với 10 chủng vi khuẩn gây bệnh của các giống

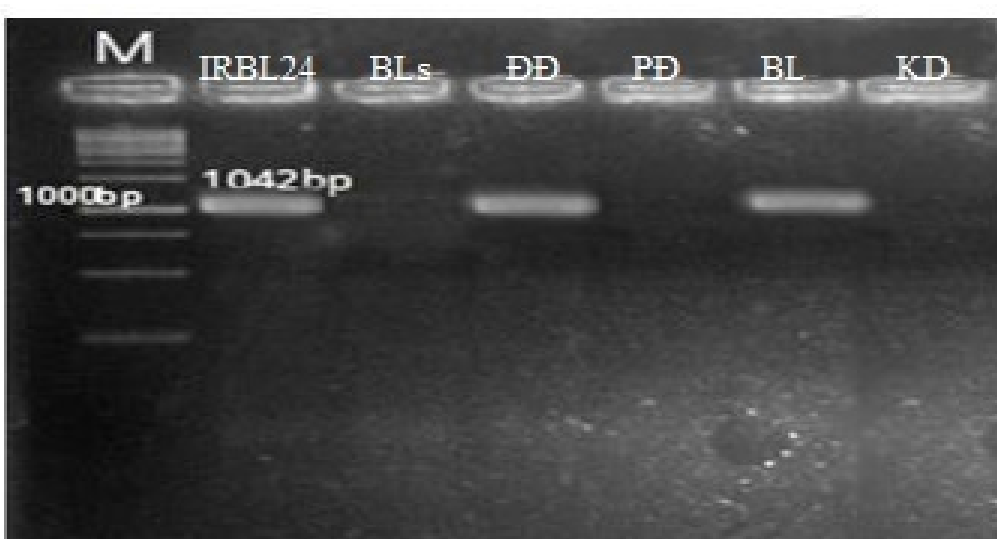
Tên giống	Phản ứng của các giống với 10 chủng vi khuẩn gây bệnh										Tỷ lệ R/M/S	Gen kháng
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
Đèo đàng	R	M	M	S	S	S	M	R	R	R	4/3/3	Xa7
Pude	R	R	S	S	S	M	R	M	M	R	4/2/4	Xa4
Khẩu dao	R	M	M	S	S	S	R	M	R	M	3/2/5	Xa4
Blechâu	R	R	R	S	S	R	M	M	M	R	5/3/2	Xa4 Xa7
IR24	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0/0/10	-
IRBB4	M	R	R	S	S	M	R	S	R	S	4/2/4	Xa4
IRBB7	R	M	M	S	S	R	R	M	M	R	5/3/2	Xa7

Ghi chú: R: resistance (kháng); M: medium resistance (kháng vừa); S: susceptible (nhiễm).

Khảo sát khả năng kháng bệnh bạc lá, đạo ôn, rầy nâu của 4 giống lúa phục tráng: nếp Đèo đảng, tẻ Pude, Blechâu và Khẩu dao



Hình 3. Ảnh lá bị nhiễm bệnh bạc lá của giống nhiễm chuẩn IR24 và nếp Đèo đảng với 10 chủng vi khuẩn gây bệnh sau 18 ngày lây nhiễm



Hình 4. Ảnh điện di sản phẩm PCR phát hiện gen *Pi-ta*

Ghi chú: M-ladder, BL_s (đối chứng âm), IRBL24 (đối chứng dương). Mẫu giống chứa gen *Pi-ta*: ĐĐ (Đèo đảng) và BL (Blechâu).

Bảng 5. Kết quả lây nhiễm 3 nguồn chủng nấm bệnh đạo ôn trên các dòng/giống lúa

Tên giống	Chủng phân lập từ BC15		Chủng phân lập từ Q5		Chủng phân lập từ nếp Nhung	
	Cấp độ nhiễm (đ)	P/U' kháng, nhiễm	Cấp độ nhiễm (đ)	P/U' kháng, nhiễm	Cấp độ nhiễm (đ)	P/U' kháng, nhiễm
Đèo đảng	1	R	2	M	1	R
Pude	2	M	3	S	3	S
Blechâu	1	R	1	R	0	HR
Khẩu dao	2	M	3	S	2	M
BL _s (NC)	3	S	4	HS	3	S
IRBL24	1	R	1	R	0	HR

Ghi chú: HR: Kháng cao; R: Kháng; M: Kháng vừa; S: Nhiễm; HS; Nhiễm nặng.

nhiễm nhẹ với chủng 2, 3 và 7. Trong khi đó IRBB7 chứa cùng gen kháng Xa7 lại có tỷ lệ kháng nhiễm là 5R/3M/2S và kháng được chủng 1,6,7 và 10, nhiễm nhẹ chủng 2,3,8 và 9, nhiễm chủng 4 và 5. Xét về độ độc tính giữa 10 chủng lây nhiễm thì tạm thời kết luận chủng 4 và 5 có độ độc tính cao nhất, gây nhiễm cho tất cả 7 dòng/giống lúa, kể cả giống Blechâu có chứa cả 2 gen kháng hữu hiệu Xa4 và Xa7.

3.2. Khả năng kháng bệnh đạo ôn

3.2.1. Phát hiện gen kháng bệnh bằng chỉ thị phân tử DNA

Để phát hiện khả năng chứa gen Pi-ta ở các mẫu giống, cặp mỗi YL 155/ YL87 nhân đoạn giữa của gen với kích thước khoảng 1042bp (Yu *et al.* 2002) đã được sử dụng. Kết quả nhận thấy những giống có chứa gen kháng Pi-ta như nếp Đèo đàng và tẻ Blechâu trong sản phẩm PCR nhân lên được một đoạn DNA có kích thước 1042bp, giống không chứa gen Pi-ta như Pude và Khẩu Dao không thấy có vạch băng DNA này được nhân lên (Hình 4).

3.2.2. Lây nhiễm nhân tạo

Đánh giá khả năng kháng nhiễm của 4 giống lúa phục tráng với bệnh đạo ôn được tiến hành bằng lây nhiễm nhân tạo 3 chủng nấm phân lập từ 3 giống lúa khác nhau. Sau 7 ngày lây nhiễm nhận thấy phản ứng kháng nhiễm của các giống đối với các chủng nấm bệnh đạo ôn phân lập có khác nhau. Giống nhiễm chuẩn BLs bị nhiễm với cả 3 chủng phân lập, trong khi đó giống này nhiễm nặng nhất với chủng phân lập từ giống BC15 tại Thái Bình và Q5 từ Hưng Yên và nhiễm nhẹ với chủng phân lập từ giống nếp Nhung Phú Thọ. Giống IRBL24 kháng chuẩn chứa gen *Pi-ta* biểu hiện kháng được cả 3 chủng phân lập, kháng mạnh với 2 chủng phân lập từ giống lúa Q5 và nếp Nhung.

Kết quả ở bảng 5 cho thấy giống nếp Đèo đàng, tẻ Blechâu là hai giống có chứa gen kháng *Pi-ta* đều cùng kháng được cả 2 chủng phân lập thu thập từ giống BC15 tại Thái Bình và nếp

Nhung từ Phú Thọ, riêng giống Blechâu kháng được với cả 3 isolate, đặc biệt kháng mạnh với chủng phân lập từ giống nếp Nhung tại Phú Thọ. Đối với 2 giống Pude và Khẩu dao không mang gen kháng *Pi-ta* nên chỉ nhiễm vừa và nhẹ với các chủng phân lập nấm đạo ôn nghiên cứu. Từ những kết quả trên có thể tạm thời kết luận 4 giống lúa phục tráng đều có khả năng kháng với các chủng nấm bệnh đạo ôn sử dụng.

3.3. Khả năng kháng rầy nâu

3.3.1. Phát hiện gen kháng rầy bằng chỉ thị phân tử DNA

Gen Bph10 là một trong những gen có khả năng kháng tốt với rầy nâu Việt Nam (Nguyễn Thị Lang và cs., 2006). Để phát hiện ra gen này thì cặp mỗi RG457 (chỉ thị STS) đã được sử dụng nhằm phát hiện ra gen kháng rầy nâu Bph10 với khoảng cách di truyền 1,7cM. Theo chỉ thị này thì sau khi nhân PCR, điện di sản phẩm trên gel agarose 2% cho thấy cả giống chứa gen và không chứa gen Bph10 đều nhân lên được một đoạn DNA dài khoảng 800bp, vì thế không thể phân biệt được sự đa hình giữa chúng. Để phân biệt được cần phải sử dụng enzyme *HinfI* để phân cắt sản phẩm PCR đoạn 800 bp này. Sau đó điện di sản phẩm cắt trên gel agarose 2%. Giống nào có chứa gen kháng Bph10 như Khẩu dao và Pude cho 3 vạch băng khoảng 300, 250, và 200bp tương tự như giống kháng chuẩn BH362 chứa gen Bph10. Giống nếp Đèo đàng và Blechâu không chứa gen Bph10 cho 2 vạch băng khoảng 600bp và 200bp (Hình 5).

3.3.2. Lây nhiễm nhân tạo

Lây nhiễm nhân tạo là một biện pháp đánh giá khả năng kháng bệnh và rầy nâu khá chính xác, vì biết được nguồn rầy nâu lây nhiễm và tạo điều kiện thuận lợi để rầy được tiếp xúc trực tiếp với cây lúa sẽ cho kết quả chính xác hơn.

Kết quả đánh giá thu được ở bảng 4 cho thấy giống lúa nếp Đèo đàng, tẻ Blechâu phản ứng với hai quần thể rầy nâu đều ở cấp hại đạt cấp 5 là

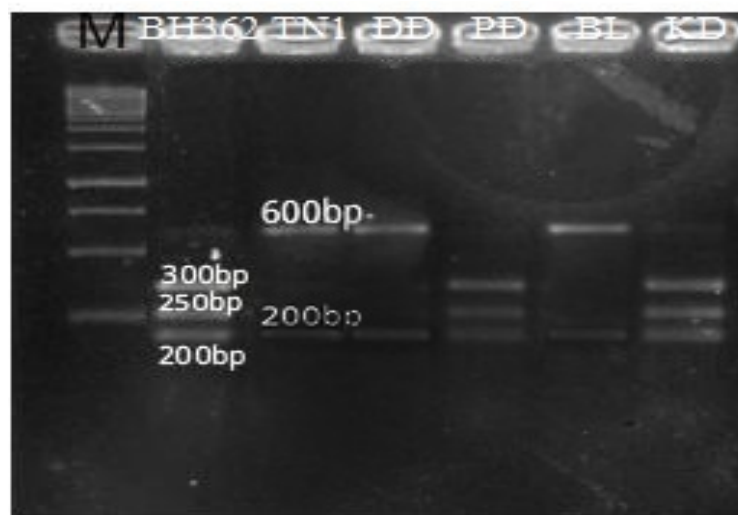
Khảo sát khả năng kháng bệnh bạc lá, đạo ôn, rầy nâu của 4 giống lúa phục tráng: nếp Đèo đẳng, tẻ Pude, Blechâu và Khẩu dao

cấp nhiễm nhẹ. Giống Pude và Khẩu dao phản ứng với hai quần thể rầy đều đạt cấp 3 tương tự với giống BH362 mang gen kháng và kháng mạnh với quần thể rầy nâu ở Nam định, giống Khẩu dao nhiễm nhẹ với quần thể rầy nâu thu từ Hải Dương. Trong khi đó, giống đối chứng TN1 nhiễm chuẩn nhiễm rất nặng với cả hai quần thể rầy nâu và đạt điểm 9. Giống BH362 chứa gen kháng *Bph10* kháng được quần thể rầy nâu thu từ Hải Dương và đạt cấp kháng 3.

4. KẾT LUẬN

Kết hợp giữa lây nhiễm nhân tạo và kỹ thuật dùng chỉ thị phân tử DNA dựa trên kỹ thuật PCR, bốn giống lúa đặc sản địa phương đã được phục tráng là: Blechâu, Pude, Khẩu

dao và nếp Đèo đẳng đã được đánh giá về khả năng mang gen kháng bệnh bạc lá *Xa4* và *Xa7*, gen kháng bệnh đạo ôn *Pi-ta* và gen kháng rầy nâu *Bph10*. Giống Blechâu chứa gen kháng bệnh *Xa4*, *Xa7* và *Pi-ta*. Giống Khẩu dao mang gen kháng *Xa4* và *Bph10*, giống Đèo đẳng chứa gen *Xa7* và *Pi-ta* còn giống Pude mang gen *Xa4* và *Bph10*. Các giống chứa gen kháng thường kháng tốt với các chủng vi khuẩn gây bệnh bạc lá miền Bắc, 3 chủng nấm đạo ôn và 2 quần thể rầy nâu nghiên cứu. Đây là những nguồn gen các giống chứa một số gen kháng bệnh bạc lá, đạo ôn và rầy nâu hữu hiệu cần được bảo tồn, phát triển và sử dụng trong các chương trình chọn tạo giống kháng bệnh bạc lá, đạo ôn và rầy nâu.



Hình 5. Điện di sản phẩm PCR sau khi cắt bằng enzyme *Hinfl* gen *Bph10*

Ghi chú: M-ladder, TN1 (đối chứng âm), BH362 (đối chứng dương), Mẫu chứa gen *Bph10*: PD (Pude), KD (Khẩu dao)

Bảng 6. Phản ứng của các giống lúa đối với các quần thể rầy nâu lây nhiễm

Tên giống	Rầy thu từ Nam Định		Rầy thu từ Hải Dương	
	Cấp hại (đ)	Mức độ kháng	Cấp hại (đ)	Mức độ kháng
Nếp Đèo đẳng	5	Nhiễm nhẹ	5	Nhiễm
Pude	3	Kháng	3	Kháng
Blechâu	5	Nhiễm nhẹ	5	Nhiễm
Khẩu dao	3	Kháng	3	Nhiễm nhẹ
TN1 (NC)	9	Nhiễm nặng	9	Nhiễm nặng
BH362(KC)	3	Kháng	3	Kháng

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Kato (1993). Plant diseases 77. pp. 1211-1216.
- Nguyễn Thị Lang, Trần Thị Thu Hằng, Phạm Thị Thu Hà, Bùi Thị Dương Khuyển, Phạm Công Thành, Nguyễn Thạch Cân và Bùi Chí Bửu (2006). Ứng dụng STS (Sequence Tagged Sites) và SSR (Simple Sequence Repeats) marker để đánh giá tính chống chịu rầy nâu trên cây lúa *Oryza sativa* L.. Tạp chí Nông Nghiệp và phát triển nông thôn, 4: 11-15.
- Phan Hữu Tôn, Bùi Trọng Thủy (2004b). Phân bố và đặc điểm gây bệnh của các chủng vi khuẩn bạc lá lúa miền Bắc Việt Nam, Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn, 6: 832-835.
- Phan Hữu Tôn, Tống Văn Hải, Nguyễn Văn Hùng và Phan Thanh Tùng (2012). Nghiên cứu đa dạng di truyền các chủng vi khuẩn bạc lá lúa *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae* ở Miền bắc Việt Nam, Hội thảo Quốc gia Bệnh hại thực vật Việt Nam, ngày 20 - 23/4/2012, tr. 73-81.
- Taura S., Sugita Y., Kawahara D. (2004). Gene distribution resistance to bacterial blight in Northern Vietnam rice varieties. Abstracts of the 1st international, Conference on Bacterial Blight of rice. March 17-19, 2004, Tsukuba, Japan.
- Wakimoto (1955). Multiplication of OP1 phage (*Xanthomonas oryzae* bacteriophage). 1. One - step growth experiment under various conditions. Sci. Bull. Fac. Agric. Kyushu Univ. 15: 151-160 (in Japanese with English summary).
- Yohei K, Nobuya K, Donghe X, Yoshimichi F (2009). Resistance genes and selection DNA markers for blast disease in rice (*Oryza sativa* L.). JARQ 43(4): 255-280.
- Yoshimura, S Yoshimura, A., Koshimoto N, Kawase M, Yano M, Nakagahra M, Ogawa T, Iwata N (1991). RFLP analysis of introgressed chromosomal segments 5in three near-isogenic lines of rice bacterial blight resistance gene, Xa-1, Xa-3 and Xa-4. 1. Jpn.J.Genet., 67: 29-37.
- Yu, J., Hu, S., Wang, J., Wong, G., Li, S., Liu, B., Deng, Y., Dai, L., Zhou, Y., and Zhang, X. et al. (2002). A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *indica*). Science, 296: 79-92.
- Zheng J.S., La B. (2003). PCR technique and its practical methods, Mol Plant Breeding, 1(3): 381-394.