

## ĐẶC ĐIỂM BA VÙNG DNA LỤC LẠP CỦA CỎ CHÁC THU THẬP Ở ĐỒNG BẰNG SÔNG CỬU LONG

Nguyễn Thị Ngọc Loan<sup>1</sup>, Trần Trọng Vinh<sup>2</sup>, Nguyễn Vũ Phong<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Bộ môn Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh

<sup>2</sup> Khoa Nông học, Trường Đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh

### TÓM TẮT

Cỏ chác (*Fimbristylis miliacea*) là một trong các loài cỏ dại gây hại nghiêm trọng trên các ruộng lúa ở Việt Nam và khu vực châu Á. Loại cỏ dại xâm lấn này có thể được tìm thấy ở những khu vực rộng lớn canh tác lúa theo các phương thức canh tác lúa và bị nhầm lẫn với các loài cỏ khác cùng chi. Trong nghiên cứu này, ba vùng DNA lục lập gồm *rbcL*, *matK* và *trnH-psbA* được khuếch đại từ 30 mẫu cỏ chác thu thập ở Long An, Tiền Giang và Kiên Giang và giải trình tự nhằm xác định DNA barcode chuyên biệt cho loài cỏ này. Kết quả khuếch đại sản phẩm PCR bằng 3 cặp primer chuyên biệt trên 30 mẫu cỏ chác cho các sản phẩm với kích thước lần lượt là 400, 900, 1.400 bp. Phân tích mối quan hệ di truyền các mẫu cỏ chác nghiên cứu cho thấy vùng gene *rbcL*, *matK* có sự tương đồng rất cao với các mẫu cỏ chác từ Genbank. Trình tự *trnH-psbA* của cỏ chác lần đầu tiên được giải mã và đăng ký Genbank có thể ứng dụng trong việc nhận diện và phân biệt với các loài cỏ khác trong cùng chi *Fimbristylis*.

*Từ khóa:* DNA barcode, *Fimbristylis miliacea*, *matK*, *rbcL*, *trnH-psbA*.

### MỞ ĐẦU

Cỏ dại là mối quan tâm hàng đầu của nông dân trồng lúa trên toàn thế giới do có thể làm giảm tới 60% năng suất lúa (Zimdahl, 2010). Ở Việt Nam, bên cạnh sâu bệnh và chuột, cỏ dại làm giảm năng suất trên lúa sạ khoảng 46% (Nguyễn Mạnh Chinh, Mai Thành Phụng, 1999). Cỏ chác (*Fimbristylis miliacea*), thuộc họ Cói (*Cyperaceae*), là loài cỏ có nguồn gốc ở vùng nhiệt đới ven biển châu Á nay đã lan rộng đến hầu hết các châu lục (Begum, 2006). Cỏ chác có khả năng sinh trưởng mạnh mẽ, ra hoa và kết hạt quanh năm. Hạt cỏ có khả năng nảy mầm cao trong cả điều kiện đất khô và đất ngập nước. Hơn nữa, hạt cỏ không bị tiêu hóa bởi những động vật ăn cỏ, hạt có khả năng nảy mầm ngay cạnh phân của động vật (Begum, 2006). Loại cỏ này có bộ rễ phát triển mạnh mẽ có khả năng lan rộng nhanh chóng và cạnh tranh dinh dưỡng gay gắt với các thực vật lân cận (Begum, 2006). Cỏ chác có thể làm giảm năng suất lúa khoảng 42% do cạnh tranh kéo dài theo mùa (Begum *et al.*, 2009). Ở Việt Nam, cùng với cỏ lồng vực và cỏ đuôi phụng, cỏ chác là một trong 3 loại cỏ dại gây hại nặng ở các khu vực trồng lúa nước do sự sinh trưởng mạnh mẽ và ngày càng kháng lại các loại thuốc trừ cỏ.

Cỏ chác là loài cỏ dại rất khó phân biệt với những loài cỏ dại cùng họ khác về mặt hình thái và có ít nghiên cứu về đa dạng di truyền loại cỏ này. Hiện nay, phương pháp sử dụng chỉ thị phân tử trong việc định danh và nghiên cứu di truyền ngày càng được sử dụng phổ biến. Mã vạch DNA (DNA barcode) là phương pháp phổ biến để xác định loài nhờ sử dụng những vùng DNA đáng tin cậy và đang được ứng dụng rộng rãi trên thế giới nhằm phục vụ công tác phân loại, đánh giá đa dạng sinh học và bảo tồn nguồn gene (CBOL Plant Working Group, 2009). Mã vạch DNA cung cấp một phương pháp tiềm năng để phân biệt các loại cỏ mà không phụ thuộc vào các giai đoạn phát triển của chúng. Dựa trên trình tự DNA, phương pháp này giúp xác định chính xác và nhanh chóng các loài, ngay cả từ các mẫu dạng vết hoặc mô mẫu đã phân hủy (Mahadani, Ghosh, 2013). Sự thành công của mã vạch DNA dựa vào sự khuếch đại một hay nhiều locus cụ thể trong bộ gen của loài quan tâm. Vùng COI (Cytochrome c Oxidase subunit I), đã được ứng dụng thành công phân biệt cấp độ loài ở nhiều loài động vật. Tuy nhiên, ở thực vật bậc cao, COI tỏ ra kém hiệu quả do tỷ lệ thay thế nucleotide trong DNA ty thể của thực vật trên cạn được bảo tồn (Wolfe *et al.*, 1987). Việc thiếu mã vạch phổ quát ở thực vật đã thúc đẩy việc tìm kiếm các vùng mã vạch DNA thay thế bên ngoài bộ gen ti thể (Kress *et al.*, 2005). Do đó, Hiệp hội mã vạch sự sống (CBOL) đã khuyến nghị sử dụng gen mã hóa maturase K (*matK*) và ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase oxygenase (*rbcL*) làm mã vạch thực vật cốt lõi và vùng ITS1-2 là các locus bổ sung. Tuy vậy, việc tìm ra các locus mạnh hơn để tăng độ phân giải trong việc phân biệt các nhóm loài thực vật cụ thể (đặc biệt là thực vật bậc cao) vẫn là một quá trình đang diễn ra (Dong *et al.*, 2015). Trong nghiên cứu này, trình tự ba vùng gene *rbcL*, *matK* và *trnH-psbA* thuộc lục lập được giải trình tự và phân tích các đặc điểm có thể sử dụng nhận diện loài cỏ chác.

**VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**

**Vật liệu nghiên cứu**

Sử dụng 30 mẫu cỏ chác, trong đó 10 mẫu được thu thập ở huyện Vĩnh Hưng (Long An), ký hiệu V01 - V10; 10 mẫu ở Cai Lậy (Tiền Giang), ký hiệu C01-C10; H01-H10 được thu thập tại huyện Hòn Đất, tỉnh Kiên Giang.

**Khuếch đại và giải trình tự các vùng DNA lục lạp**

DNA tổng số được tách chiết từ 30 mẫu lá theo quy trình của bộ kit GeneJET Plant genome Purification Kit (Thermo Scientific). Sau đó, được kiểm tra chất lượng độ tinh sạch và nồng độ DNA bằng cách đo OD. DNA tổng số sau khi kiểm tra chất lượng được sử dụng thực hiện PCR khuếch đại 3 vùng gene lục lạp gồm *rbcl*, *matK* và *trnH-psbA*. Các cặp primer sử dụng trong nghiên cứu này gồm primer *matK* (F: 5'- CGT ACA GTA CTT TTG TGT TTA CGA G và R 5'- ACC CAG TCC ATC TGG AAA TCT TGG TTC) và *rbcl* (F: GAC AAC TGT GTG GAC CGA TG, R: CCA CCG CGA AGA CAT TCA TA) theo Kress và đồng tác giả (2009) và primer *trnH-psbA* (F: CGC GCA TGG TGG ATT CAC AAT CC, R: GTT ATG CAT GAA CGT AAT GCT C) theo Kress và đồng tác giả (2005). Phản ứng PCR thực hiện với DreamTaq Master Mix (Thermo Scientific) theo chu kỳ nhiệt gồm 35 chu kỳ 94°C/30 giây, Ta°C/30 giây, 72°C/1 phút. Sản phẩm PCR được giải trình tự 2 chiều (1<sup>st</sup> BASE, Malaysia).

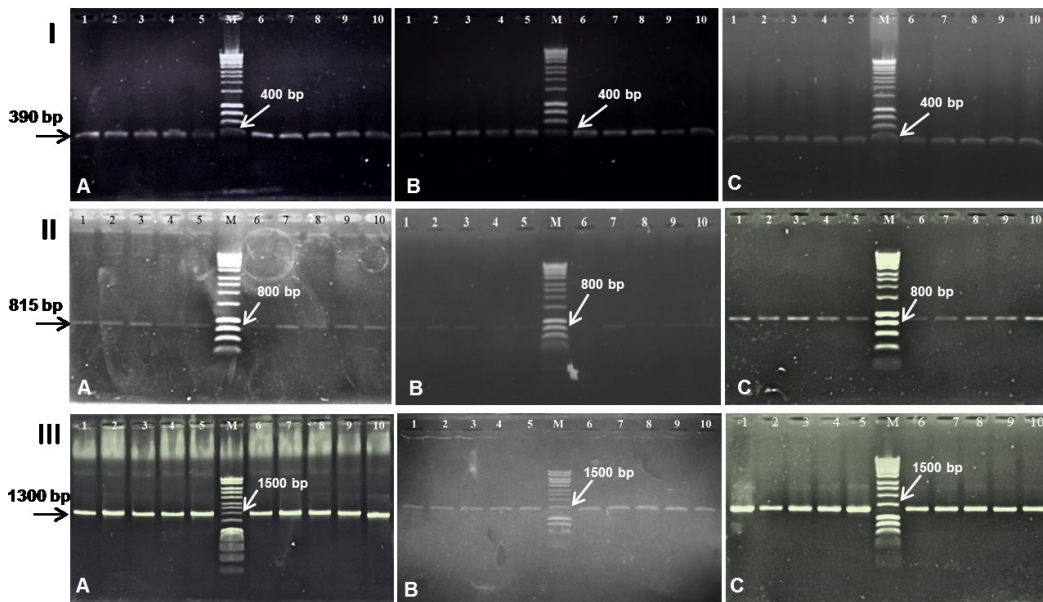
**Phân tích trình tự**

Trình tự DNA sau khi giải trình tự được xử lý và hiệu chỉnh bằng phần mềm BioEdit. Công cụ Blast trên NCBI được dùng để so sánh với các trình tự có sẵn của các loài thuộc chi *Fimbristylis* trên Genbank (Bảng 1). Cây phát sinh chủng loại của loài cỏ chác với các loài *Fimbristylis* khác được xây dựng thuật toán UPGMA bằng phần mềm Mega X (The Molecular Evolution Genetics Analysis) với hệ số bootstrap 1000.

**KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

**Khuếch đại 3 vùng DNA lục lạp**

DNA tổng số của 30 mẫu cỏ phân tích được tách chiết, định lượng và kiểm tra độ tinh sạch. Giá trị OD260/OD280 nằm trong khoảng 1,6 – 2,0, nồng độ DNA tổng số từ 150 ng/μL - 200 ng/μL. Độ tinh sạch được kiểm tra bằng cách điện di trên gel agarose, sản phẩm tạo ra rõ nét, không đứt gãy đảm bảo chất lượng thực hiện phản ứng PCR (kết quả điện di không trình bày). Kết quả PCR đã tạo sản phẩm có kích thước lần lượt khoảng 400 bp đối với gene *rbcl*, 900 bp đối với vùng gene *matK* và 1400 bp với *psbA-trnH* gần với kích thước dự kiến (Hình 1). Từ sản phẩm PCR thu được, 27 sản phẩm khuếch đại từ 9 mẫu bao gồm H01, H02, H03, V04, V05, V06, C07, C08, C09 trên ba vùng gene *rbcl*, *matK* và *trnH-psbA* được giải trình tự.



**Hình 1. Kết quả PCR khuếch đại vùng gene *rbcl* (I), *matK* (II) và vùng *trnH-psbA* (III)**  
(M): thang DNA chuẩn 1 kb (Bioline); (A): Cai Lậy; (B): Hòn Đất, (C): Vĩnh Hưng; (1 - 10): các mẫu cỏ chác từ 1 - 10.

**Phân tích trình tự nucleotide**

Trình tự được hiệu chỉnh thủ công nhờ phần mềm BioEdit, kết quả thu được trình tự của các vùng gene *rbcl*, *matK*, *trnH-psbA* có chiều dài tương ứng là 390 bp, 815 bp và 1300 bp. Vùng gene *rbcl* và *matK* có trình tự sau

hiệu chỉnh giống nhau hoàn toàn ở các mẫu phân tích. Riêng đối với vùng *trnH-psbA*, kết quả hiệu chỉnh nhận được trình tự có chiều dài khoảng 1.000 bp. Kết quả BLAST trên NCBI cho thấy mức độ bao phủ và mức độ tương đồng giữa trình tự nghiên cứu và trình tự tương ứng của các loài thuộc chi *Fimbristylis* ở vùng gene *rbcl* là 100% và 98,4%-98,9%, ở vùng gene *matK* là 92% - 100%, 98,6 - 99,6%. Vùng *trnH-psbA* có mức độ bao phủ và độ tương đồng thấp đạt từ 56 - 81%, 81,6 - 86,8% đối với 2 loài *F. caroliniana* và *F. cymosa* trên Genbank với vị trí nucleotide sai khác tương ứng là 66 và 108.

Từ kết quả hiệu chỉnh cho thấy trình tự cả 9 mẫu phân tích giống nhau hoàn toàn ở từng vùng gen. Vì vậy, mẫu V01 được sử dụng để phân tích mối quan hệ di truyền giữa các mẫu nghiên cứu với mẫu cô chác trên Genbank. Vùng gene *rbcl* của mẫu nghiên cứu V01 có 4 vị trí nucleotide sai khác với 2 mẫu *F. miliacea* (JX644692.1, Hàn Quốc) và *F. littoralis* Thụy Sĩ, AM999834.1) và 6 vị trí nucleotide sai khác với *F. dichotoma*, *F. puberula*, *F. autumnalis*, *F. thermalis*, *F. spadicea*, *F. schoenoides*, *F. verrucifera*, *F. subbispicata*, *F. stauntonii*, *F. sieboldii*, *F. diphyloides*, *F. complanata*, *F. ferruginea* (Bảng 1).

**Bảng 1. Các vị trí nucleotide biến đổi vùng gene *rbcl* giữa mẫu nghiên cứu với các mẫu tham khảo thuộc loài *Fimbristylis***

Loài, mã số / Vị trí nucleotide	10	16	49	75	236	352	382	385
Mẫu V01 (nghiên cứu)	G	C	G	T	G	A	T	C
<i>F. miliacea</i> JX644692.1	T	T					A	T
<i>F. littoralis</i> AM999834.1	T	T					A	T
<i>F. dichotoma</i> JX644688.1	T	T			T	G	A	T
<i>F. puberula</i> KJ773513.1	T	T		C		G	A	T
<i>F. autumnalis</i> MF963064.1	T	T		C		G	A	T
<i>F. caroliniana</i> KJ773511.1	T	T		C		G	A	T
<i>F. thermalis</i> MF963420.1	T	T		C		G	A	T
<i>F. spadicea</i> KJ773515.1	T	T			T	G	A	T
<i>F. schoenoides</i> KJ773514.1	T	T			T	G	A	T
<i>F. verrucifera</i> JX644696.1		T	C			G	A	T
<i>F. subbispicata</i> JX644695.1	T	T			T	G	A	T
<i>F. stauntonii</i> JX644694.1	T	T			T	G	A	T
<i>F. sieboldii</i> JX644690.1	T	T			T	G	A	T
<i>F. diphyloides</i> JX644689.1	T	T			T	G	A	T
<i>F. complanata</i> JX644687.1	T	T			T	G	A	T
<i>F. ferruginea</i> AM999833.1	T	T			T	G	A	T

Tại vùng gene *matK* có 3 vị trí nucleotide sai khác với *F. quinquangularis* (Ấn Độ, KY386837.1), 4 vị trí sai khác với *F. littoralis* và *F. dichotoma*, từ 6 - 8 vị trí nucleotide đối với *F. puberula*, *F. autumnalis*, *F. caroliniana*, *F. thermalis* (Bảng 2). Từ kết quả trên có thể thấy sự đa dạng nucleotide trong nhóm cô chác nghiên cứu ở Việt Nam với loài cô chác *F. miliacea* có nguồn gốc ở Hàn Quốc (JX644692.1) ở gene *rbcl*, và loài cô chác *F. quinquangularis* (*F. miliacea*) vùng gene *matK* ở Ấn Độ.

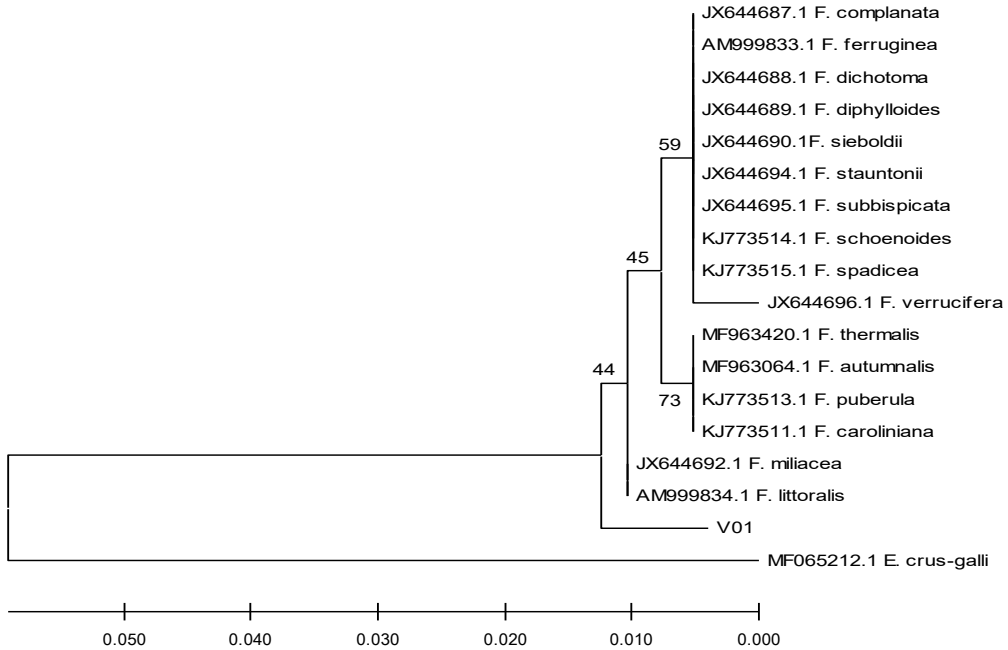
**Bảng 2. Các vị trí nucleotide biến đổi trên vùng gen *matK* giữa mẫu nghiên cứu với các mẫu tham khảo thuộc chi *Fimbristylis***

Loài, mã số / Vị trí nucleotide	31	64	87	114	424	465	468	469	507	543	642	670	730	737	759
V01	A	T	T	A	G	G	G	G	T	C	T	A	A	G	G
<i>F. quinquangularis</i> KY386837.1	C								A		C				
<i>F. littoralis</i> KY386838.1	C			G					A		C				
<i>F. dichotoma</i> KJ513620.1	C			G					A		C				
<i>F. puberula</i> MK520104.1						A			A		C	T			
<i>F. autumnalis</i> KY386832.1	C	C	C				T	C	A	T	C				
<i>F. caroliniana</i> MH621720.1									A		C	T			
<i>F. thermalis</i> MF963783.1	C								A		C	T	T	T	A

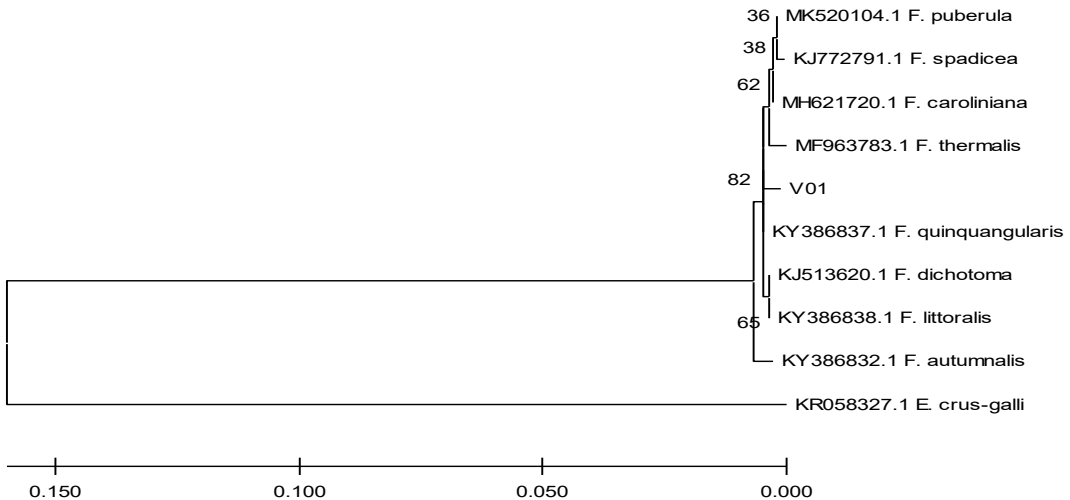
**Xây dựng cây phát sinh chủng loài**

Cây phát sinh chủng loài được xây dựng bằng phần mềm MEGA X với thuật toán Maximum Likelihood, hệ số bootstrap là 1.000. Cây phát sinh chủng loài của mẫu cô chác với trình tự các loài chi *Fimbristylis* có trên

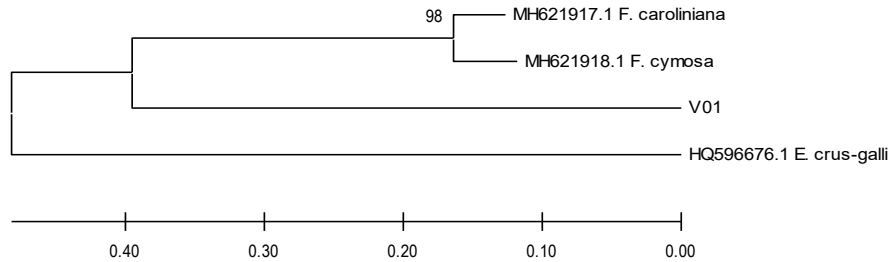
Genbank đối với ba vùng DNA nghiên cứu được thể hiện trong Hình 2, 3 và 4. Kết quả phân tích cho thấy, tất cả các loài trong cùng chi *Fimbristylis* đều hình thành một nhánh tiến hóa riêng và có mối quan hệ gần gũi với nhau với giá trị bootstrap tại các điểm giao tạo nhánh dao động từ 44 đến 73% đối với vùng gene *rbcl* (Hình 2), từ 36 đến 82% đối với vùng gene *matK* (Hình 3). Riêng đối với vùng gene *trnH-psbA* có sự phân nhánh rõ rệt của nhóm trình tự nghiên cứu với 2 trình tự của loài *Fimbristylis* trên Genbank (Hình 4). Cây phát sinh chủng loài cũng cho thấy nhóm trình tự nghiên cứu hình thành một nhánh riêng biệt so với các loài *Fimbristylis* ở cả 3 vùng gene *rbcl*, *matK* và *trnH-psbA*. Từ kết quả này cho thấy các DNA barcode *rbcl*, *matK* và *trnH-psbA* có thể sử dụng để nhận diện loài cỏ chác ở Việt Nam.



Hình 2. Cây phát sinh chủng loài dựa trên trình tự vùng *rbcl* của mẫu cỏ chác nghiên cứu và 17 trình tự tham khảo với thuật toán Maximum Likelihood



Hình 3. Cây phát sinh chủng loài dựa trên trình tự vùng *matK* của mẫu cỏ chác nghiên cứu và 9 trình tự tham khảo với thuật toán Maximum Likelihood



**Hình 4. Cây phát sinh chủng loài trên trình tự vùng *trnH-psbA* của mẫu cỏ chác nghiên cứu và trình tự tham khảo với thuật toán Maximum Likelihood**

Kết quả phân tích ở trên cho thấy tiềm năng phân biệt ở mức độ loài của cả ba DNA barcode nghiên cứu. Trình tự nucleotide của hai vùng gene *rbcl* và *matK* có số lượng nucleotide khác biệt gần như tương đương nhau. Tuy nhiên, *matK* có sự đa dạng về nucleotide sai khác cao hơn vùng gene *rbcl*. Vùng *trnH-psbA* có kết quả sai khác nucleotide cao nhất. Như vậy, hiệu quả phân biệt các loài *Fimbristylis* theo thứ tự *trnH-psbA* > *matK* > *rbcl*. Kết quả này phù hợp với báo cáo về các DNA barcode ở thực vật của CBOL, 2009. Các mẫu nghiên cứu đã được đăng ký trình tự trên Genbank với mã số từ MT521629-MT521637 đối với gene *rbcl*, MT521638 - MT521646 đối với *matK*. Vùng DNA *trnH-psbA* của cỏ chác lần đầu tiên được giải trình tự và đăng ký mã số Genbank từ MT521647-MT521655. Đây là cơ sở dữ liệu cho các nghiên cứu tiếp theo trên loài này.

## KẾT LUẬN

Vùng gene *rbcl*, *matK* và *trnH-psbA* của các mẫu cỏ chác thu thập ở Cai Lậy, Hòn Đất, Vĩnh Hưng đã được giải trình tự. Trình tự vùng gene *rbcl* và *matK* tương đồng rất cao với các loài thuộc chi *Fimbristylis*. Trình tự vùng *trnH-psbA* lần đầu tiên được giải trình tự và khác biệt rất rõ so với hai loài *Fimbristylis* khác. Kết quả này có thể được sử dụng nhận diện và đánh giá đa dạng di truyền cỏ chác ở Việt Nam.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Nguyễn Mạnh Chinh, Mai Thành Phụng (1999). *Cỏ dại trong ruộng lúa và biện pháp phòng trừ*. NXB Nông nghiệp, Hà Nội.
- Begum M, Juraimi AS, Amartalingum R, Syed Omar SR, Man AB (2009). Effect of *Fimbristylis miliacea* competition with MR220 rice in relation to different nitrogen levels and weed density. *Int J Agric Biol* 11: 183–187.
- Begum M (2006). Biology and management of *Fimbristylis miliacea* (L.) Vahl. PhD thesis, Universiti Putra Malaysia, Serdang Darul Ehsan, Malaysia.
- Kress JW, Wurdack KJ, Zimmer EA, Weigt LA, Janzen DH (2005). Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 8369–8374.
- Kress WJ, Erickson DL (2007) A Two-Locus Global DNA Barcode for Land Plants: The Coding *rbcl* Gene Complements the Non-Coding *trnH-psbA* Spacer Region. *PLoS ONE* 2(6): e508. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000508>
- CBOL Plant Working Group, Peter M. Hollingsworth, Laura L. Forrest, John L. Spouge, Mehrdad Hajibabaei, Sujeevan Ratnasingham, Michelle van der Bank, Mark W. Chase, Robyn S. Cowan, David L. Erickson, Aron J. Fazekas, Sean W. Graham, Karen E. James, Ki-Joong Kim, W. John Kress, Harald Schneider, Jonathan van AlphenStahl, Spencer C.H. Barrett, Cassio van den Berg, Diego Bogarin, Kevin S. Burgess, Kenneth M. Cameron, Mark Carine, Juliana Chacón, Alexandra Clark, James J. Clarkson, Ferozah Conrad, Dion S. Devey, Caroline S. Ford, Terry A.J. Hedderson, Michelle L. Hollingsworth, Brian C. Husband, Laura J. Kelly, Prasad R. Kesanakurti, Jung Sung Kim, Young-Dong Kim, Renaud Lahaye, Hae-Lim Lee, David G. Long, Santiago Madriñán, Olivier Maurin, Isabelle Meusnier, Steven G. Newmaster, Chong-Wook Park, Diana M. Percy, Gitte Petersen, James E. Richardson, Gerardo A. Salazar, Vincent Savolainen, Ole Seberg, Michael J. Wilkinson, Dong-Keun Yi, Damon P. Little (2009). A DNA barcode for land plants. *Proc Nat Acad Sci* 106 (31): 12794–12797.
- Mahadani P, Ghosh SK (2013). DNA Barcoding: A tool for species identification from herbal juices. In. *DNA Barcodes*. 35–38.
- Wolfe KH, Li WH, Sharp PM (1987). Rates of Nucleotide Substitution Vary Greatly among Plant Mitochondrial, Chloroplast, and Nuclear DNAs. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 9054–9058.
- Kress WJ, Wurdack KJ, Zimmer EA, Weigt LA, Janzen DH (2005). Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 8369–8374.
- Dong WP, Xu C, Li CH, Sun JH, Zuo YJ, Shi S, *et al.* (2015) *ycf1*, the most promising plastid DNA barcode of land plants. *Sci Rep* 5.
- Zimdahl RL (2010), *A history of weed science in the United State*, Elsevier Inc.

## CHARACTERISTICS OF THREE PLASTID REGIONS OF *Fimbristylis miliacea* COLLECTED IN MEKONG DELTA

Nguyen Thi Ngoc Loan<sup>1</sup>, Tran Trong Vinh<sup>2</sup>, Nguyen Vu Phong<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Biotechnology, Nong Lam University - Ho Chi Minh City

<sup>2</sup> Faculty of Agriculture, Nong Lam University - Ho Chi Minh City

### SUMMARY

Grasslike fimbry (*Fimbristylis miliacea*) is one of the most troublesome weeds in rice fields in Vietnam and the Asian region. This invasive seed can be found in large areas under different rice cultivation practices and confused with other species in the same genus. In this study, three chloroplast DNA regions including *rbcL*, *matK* and *trnH-psbA* were amplified from 30 grass samples collected in Long An, Tien Giang, and Kien Giang provinces and sequenced to establish the specific DNA barcodes to this species. Results of PCR using 3 pairs of specialized primers amplified products with size of 400, 900, 1400 bp, respectively. Analysis of the genetic relationship showed that the sequences of *rbcL*, *matK* regions are similar to the available sequences from Genbank. The *trnH-psbA* sequence of was first sequenced and registered Genbank can be applied to identify and distinguish with other species in the genus *Fimbristylis*.

*Keywords:* DNA barcode, *Fimbristylis miliacea*, *rbcL*, *matK*, *trnH-psbA*.

---

\* Author for correspondence: Email: nvphong@hcmuaf.edu.vn