



DOI:10.22144/ctu.jsi.2019.020

ĐA DẠNG DI TRUYỀN VÀ TÍNH Mẫn CẢM VỚI QUINCLORAC CỦA CỎ LỒNG VỰC (*Echinochloa* spp.) TRÊN RUỘNG LÚA

Nguyễn Minh Chon*, Thái Đức Anh và Lê Thị Nhiên

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

*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Nguyễn Minh Chon (email: nmchon@ctu.edu.vn)

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 13/11/2018

Ngày nhận bài sửa: 27/03/2019

Ngày duyệt đăng: 12/04/2019

Title:

Genetic Diversity and Quinclorac Susceptibility Evaluation of Barnyard Grass (*Echinochloa* spp.) in Paddy Fields

Từ khóa:

Cỏ lồng vực, đa dạng di truyền, *Echinochloa*, quinclorac, RAPD

Keywords:

Barnyard grass, *Echinochloa*, genetic diversity, quinclorac, RAPD

ABSTRACT

In this study, the morphologic and genetic diversity of barnyard grass (*Echinochloa* spp.), their susceptibility and resistance to quinclorac was examined. The results showed that nine out of fifteen barnyard grass samples were resistant to recommended dose (250 g a.i/ha) of quinclorac. The EC4 sample was highly resistant to quinclorac, with an effective dose of 50% inhibition response (ED_{50}) of 416.5 g a.i/ha, giving a resistance index of 3.1. Basing on morphological and growth characteristics such as stem morphology, basal stem color, leaf blade margin color, leaf midrib color, spikelet color and spikelet awn types, barnyard grass samples were divided into 3 groups. Random amplified polymorphic DNA method (RAPD) was used to analyze genetic diversity of barnyard grasses using 9 primers. The amplification of the samples was showed a total of 62 repeatable fragments of which 36 bands were polymorphic (51.2% average). The genetic similarity of the samples was analyzed and revealed 3 distinct clusters with an average between-cluster and within-cluster similarity of 86 and 96%, respectively. Each cluster contained at least one resistant population without the correlation between genetic similarity and resistance level. Further research should be continuously performed to determine the gene of conferring resistance, to develop molecular analysis for rapid identification of quinclorac-resistance in *Echinochloa*.

TÓM TẮT

Nghiên cứu này đã đánh giá sự đa dạng di truyền của cỏ lồng vực (*Echinochloa* spp.), mức độ mẫn cảm và mức độ kháng của chúng với thuốc trừ cỏ quinclorac. Thí nghiệm cho thấy 9 trong 15 mẫu cỏ lồng vực thể hiện tính kháng ở liều khuyến cáo (250 g a.i/ha). Đặc biệt, mẫu cỏ EC4 kháng thuốc cỏ mạnh nhất với giá trị ED_{50} (liều lượng thuốc cần kiểm soát được 50% cỏ) lên đến 416,5 g a.i/ha, chỉ số kháng là 3,1. Dựa vào đặc tính hình thái và sinh trưởng như kiểu thân, màu sắc gốc thân, màu sắc bìa lá và gân lá, màu sắc hạt và kiểu râu hạt đã chia các mẫu cỏ thành 3 nhóm. Phương pháp random amplified polymorphism DNA (RAPD) được sử dụng để phân tích đa dạng di truyền của cỏ lồng vực với 9 đoạn mồi. Kết quả đã khuếch đại được 62 băng với 36 băng đa hình (chiếm tỷ lệ 51,2%). Độ tương đồng di truyền được phân tích và các mẫu cỏ lồng vực được phân thành 3 nhóm với độ tương đồng trong cùng nhóm là 96%, giữa 2 nhóm là 86%. Mỗi nhóm có ít nhất một mẫu cỏ kháng mạnh với thuốc quinclorac, tuy nhiên không có sự tương quan rõ rệt giữa mức độ kháng thuốc và độ tương đồng di truyền ở cỏ lồng vực. Định hướng nghiên cứu tiếp theo sẽ xác định gene quy định tính kháng và phát triển kỹ thuật phát hiện nhanh tính kháng quinclorac của loài cỏ lồng vực.

Trích dẫn: Nguyễn Minh Chon, Thái Đức Anh và Lê Thị Nhiên, 2019. Đa dạng di truyền và tính mẫn cảm với quinclorac của cỏ lồng vực (*Echinochloa* spp.) trên ruộng lúa. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 55(Số chuyên đề: Công nghệ Sinh học)(1): 151-159.

1 GIỚI THIỆU

Cỏ lồng vực (*Echinochloa spp.*) là một trong những loài cỏ dại gây hại quan trọng đến sản xuất nông nghiệp và đặc biệt là đối với canh tác lúa trên toàn thế giới. Trong những năm gần đây, cỏ lồng vực trở thành vấn đề nghiêm trọng trên các vùng canh tác lúa. Loài cỏ này có khả năng cạnh tranh dinh dưỡng và ánh sáng mạnh mẽ với cây lúa, gây ảnh hưởng nặng nề đến năng suất lúa. Cùng với khả năng thích nghi cao là một yếu tố quan trọng giúp cỏ lồng vực phân bố rộng rãi trên toàn thế giới (Vengris *et al.*, 1966). Hiện nay, việc tiêu diệt và khống chế cỏ lồng vực phần lớn phụ thuộc vào thuốc hóa học. Quinclorac là hoạt chất đã được sử dụng rộng rãi để phòng trừ cỏ lồng vực trên ruộng lúa trong thời gian qua. Việc sử dụng thuốc trừ cỏ liên tục đã làm phát triển các quần thể cỏ lồng vực kháng quinclorac (Li *et al.*, 2003). Hiện tượng kháng thuốc quinclorac của cỏ lồng vực đã được ghi nhận vào năm 1997 ở Brazil, Tây Bang Nha và Mỹ. Tại Arkansas, việc sử dụng liên tục thuốc quinclorac đã dẫn đến sự gia tăng các quần thể kháng thuốc quinclorac bao gồm *Echinochloa crus-pavonis*, *E. crus-galli*, *E. colona*, *E. phyllopogon*, *E. hispidula* và *E. oryzicola* (Heap, 1999). Công tác phòng trừ cỏ dại trên ruộng lúa ngày càng trở nên khó khăn hơn do sự phát triển của các dòng cỏ lồng vực kháng thuốc quinclorac. Ngày nay, nhiều công trình nghiên cứu về những quần thể cỏ kháng thuốc quinclorac trên ruộng lúa đã được thực hiện (Rutledge *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2013). Những hiểu biết về nguồn gốc tính kháng, hoặc sự khác biệt về hình thái cũng như sự đa dạng di truyền giữa quần thể cỏ lồng vực kháng và quần thể mẫn cảm với thuốc trừ cỏ quinclorac vẫn còn hạn chế.

Echinochloa spp. là cỏ lồng vực bao gồm nhiều loài phụ. Mặc dù, đặc điểm hình thái của chúng khá giống nhau nhưng lại phản ứng lại tác dụng của thuốc trừ cỏ khác nhau. Mức độ kháng hoặc mẫn cảm khác nhau với thuốc hóa học trong cùng quần thể của loài đã đặt ra yêu cầu cấp thiết để hình thành phương pháp thích hợp trong việc xác định mối quan hệ di truyền và hình thái của chúng. Những biến đổi về hình thái có thể làm thay đổi sự thích ứng của cây đối với hóa chất, môi trường và khả năng cạnh tranh của loài. Vì thế, việc xác định mức độ đa dạng trong cùng loài là nhân tố cần quan tâm cho việc nghiên cứu phòng trừ cỏ dại. Dấu hình thái được sử dụng để nghiên cứu quan hệ phát sinh loài và sự đa dạng di truyền trong cùng loài. Tasrif *et al.* (2004) đã nghiên cứu sự đa dạng về chiều cao cây, chiều dài bông, số hạt trên bông, chiều dài râu hạt và các đặc điểm hình thái khác của *E. crus-galli* ảnh hưởng bởi vị trí địa lý của quần thể. Tuy nhiên, phương pháp dấu hình thái gặp khó khăn đối với phân tích cỏ lồng vực vì loài cỏ này có kiểu hình phức tạp và

đa dạng cao ở các đặc tính hình thái (Lopez-Martinez *et al.*, 1999). Sự phát triển của sinh học phân tử và kỹ thuật phân tử đóng vai trò quan trọng trong các nghiên cứu sinh thái học. Sự ra đời của dấu phân tử cho phép các nhà nghiên cứu có thể đánh giá và phân biệt thực vật dựa trên các đặc tính mà không bị ảnh hưởng bởi yếu tố môi trường. Tuy nhiên, một vài kỹ thuật đã gặp phải hạn chế. Ví dụ kỹ thuật isozyme không đánh giá được đầy đủ sự đa dạng của quần thể và giới hạn ở số lượng locus (Nissen *et al.*, 1995). Một kỹ thuật khác là RFLP (restriction fragment length polymorphism) thì cần lượng lớn DNA, thời gian thực hiện kéo dài và cần thiết kế probe riêng biệt. Sự phát triển của kỹ thuật PCR (polymerase chain reaction) và RAPD (random amplified polymorphic DNA) đã khắc phục được những hạn chế này. Phân tích RAPD là một kỹ thuật nhanh và đơn giản, chỉ cần một lượng nhỏ DNA, không cần hiểu biết trước về di truyền của loài để thiết kế probe (Williams *et al.*, 1993). Những nghiên cứu sự đa dạng di truyền và tìm hiểu cấu trúc di truyền của quần thể của cỏ lồng vực sử dụng dấu phân tử isozyme và RAPD đã được thực hiện trong nhiều năm qua (Asins *et al.*, 1999; Lopez-Martinez *et al.*, 1999). Trong những năm gần đây, RAPD được sử dụng như một kỹ thuật hiệu quả trong việc đánh giá tính đa dạng di truyền của cỏ lồng vực ở Hoa Kỳ (Rutledge *et al.*, 2000), Hàn Quốc (Kim *et al.*, 2000) và Thổ Nhĩ Kỳ (Altop and Menan, 2011). Tại Việt Nam, Le *et al.* (2017) đã xác nhận được 9 trong tổng số 13 quần thể cỏ lồng vực kháng thuốc và sự đa dạng kiểu gene của các quần thể ở khu vực Đồng bằng sông Cửu Long.

Quinclorac đã được giới thiệu và sử dụng từ lâu ở Việt Nam để trừ cỏ lồng vực ở các vùng canh tác lúa. Tuy nhiên, vẫn chưa có nhiều công bố của các công trình nghiên cứu về cỏ lồng vực cũng như tính kháng của chúng đối với hoạt chất quinclorac. Vì thông tin di truyền của các quần thể cỏ lồng vực kháng quinclorac tại Việt Nam còn hạn chế, nên việc áp dụng kỹ thuật RAPD cho phép xác định được nguồn gốc và sự thay đổi di truyền giữa quần thể cỏ kháng và quần thể mẫn cảm ở khu vực canh tác lúa. Nghiên cứu này nhằm đánh giá tính mẫn cảm của cỏ lồng vực đối với quinclorac, xác định sự đa dạng di truyền của quần thể kháng và sự mẫn cảm của chúng đối với quinclorac để hiểu rõ hơn về cấu trúc quần thể, nguồn gốc có thể hình thành hay tồn tại tính kháng. Qua đó, cung cấp những dữ liệu và thông tin cần thiết cho việc nghiên cứu tính kháng thuốc và phòng trừ cỏ lồng vực đạt hiệu quả cao hơn.

2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Vật liệu

Mười lăm mẫu cỏ đánh số từ EC1 đến EC15 thuộc 3 tỉnh An Giang (mẫu EC1 đến EC5), Kiên

Giang (mẫu EC6 đến EC10) và Vĩnh Long (EC11 đến EC15). Mẫu thí nghiệm được lựa chọn dựa vào sự thể hiện tính kháng hoặc mẫn cảm rõ ràng khi khảo sát với 4 loại thuốc trừ cỏ từ nguồn sưu tập 90 mẫu cỏ lồng vực trong năm 2017 của Phòng thí nghiệm Sinh hóa, Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ.

Lúa giống IR50404 được dùng để so sánh hình thái cũng như di truyền với cỏ lồng vực, được cung cấp từ Công ty sản xuất giống Bình Đức tại thành phố Long Xuyên, tỉnh An Giang.

Thuốc trừ cỏ Facet 25 SC với hoạt chất quinclorac được sử dụng trong thí nghiệm là sản phẩm của công ty BASF (Đức).

2.2 Phương pháp nghiên cứu

2.2.1 Đánh giá đặc tính hình thái

Hạt cỏ lồng vực được xử lý phá miên trạng trước khi sử dụng cho các thí nghiệm. Hạt giống được ngâm trong nước sạch 24 giờ, tiếp theo ngâm vào nước ấm khoảng 50°C trong 15 phút. Sau đó, hạt giống được ủ cho nảy mầm, các hạt giống nảy mầm được tuyển chọn đồng nhất và sử dụng cho thí nghiệm.

Cỏ lồng vực được đánh giá các chỉ tiêu hình thái của thân: kiểu thân, màu sắc gốc thân; lá: màu sắc bìa lá, màu sắc gân chính của lá, lông tơ ở cổ lá; chiều dài bông; hạt gồm màu sắc, kiểu râu hạt; và chiều cao thân dựa trên nghiên cứu của Tabacchi *et al.* (2006) và Altop and Mennan (2011).

2.2.2 Random Amplified Polymorphism DNA (RAPD)

a. Ly trích DNA

DNA được trích từ lá theo quy trình CTAB (Doyle and Doyle, 1987) như sau: Mẫu lá được nghiền bằng chày và cối với dung dịch đệm (extraction buffer, 0,1 M tris-HCl pH 8; 0,5 M ethylenediamine- tetraacetic acid (EDTA) pH 8; 0,2% β -mercapto ethanol). Sau đó, mẫu được chuyển sang ống eppendorf 2,2 mL cùng với 50 μ L sodium dodecyl sulfate (SDS) 10%, được trộn đều và ủ ở 65°C trong 30 phút. Tiếp tục, mẫu được ly tâm 10 phút với tốc độ 13.000 vòng/phút. Sau khi chuyển 800 μ L dung dịch phía trên qua ống eppendorf mới, thêm 800 μ L isopropanol, đảo ống nhẹ nhàng và ủ ở -20°C trong 2 giờ. Mẫu được tiếp tục ly tâm 10 phút với tốc độ 13.000 vòng/phút, loại bỏ phần dung dịch thu phần kết tủa. Thêm 400 μ L dung dịch tris-ethylenediamine tetraacetic acid (TE), dung dịch đệm pH 8 và trộn đều. Tiếp tục thêm 400 μ L dung dịch đệm cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB) và ủ ở 65°C trong 15 phút. Thêm 800 μ L hỗn hợp chloroform: isoamyl alcohol với tỉ lệ 24:1 và trộn đều trước khi đem ly tâm 13.000

vòng/phút trong 5 phút. Chuyển 600 μ L dung dịch ở trên sang ống nghiệm mới rồi thêm 1,2 mL cồn 96% và ủ ở nhiệt độ phòng trong 15 phút. Mẫu được tiếp tục ly tâm 13.000 vòng/phút trong 10 phút để thu phần kết tủa. Rửa DNA bằng 500 μ L cồn 70% và ly tâm 13.000 vòng/phút trong 10 phút. DNA được làm khô và trữ trong 100 μ L TE. Nồng độ và độ tinh sạch DNA được xác định bằng máy đo quang phổ ở bước sóng 260 và 280 nm.

b. Kỹ thuật PCR

Phản ứng PCR thực hiện với thể tích 25 μ L bao gồm: Dung dịch PCR có nồng độ 1X, 2 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs (các deoxynucleotide đơn), 0,2 μ M môi RAPD, 1,5 U taq DNA polymerase, 50 ng DNA khuôn mẫu và nước. Phản ứng PCR được thực hiện qua 45 chu kỳ gia nhiệt: giai đoạn khởi đầu ở 94°C trong 5 phút; 45 chu kỳ gồm biến tính 15 giây ở 94°C, bắt mỗi 15 giây ở 38°C, kéo dài 1 phút ở 72°C; giai đoạn kết thúc 72°C trong 7 phút (Williams *et al.*, 1993). Chín đoạn mỗi được sử dụng dựa theo các tác giả Rutledge *et al.*, 2000; Mamatha *et al.*, 2017; Le *et al.*, 2017 như sau:

- OPA02: 5'-TGC CGA GCT G- 3'
- OPE01: 5'-CCC AAG GTC C- 3'
- OPH02: 5'-TCG GAC GTG A- 3'
- OPN06: 5'-GAG ACG CAC A- 3'
- OPN07: 5'-CAG CCC AGA G- 3'
- OPN16: 5'-AAG CGA CCT G- 3'
- OPJ06: 5'-TCG TTC CGC A- 3'
- OPK20: 5'-GTG TCG CGA G- 3'
- DAS08: 5'-AAC GTC TGC C- 3'

Sản phẩm PCR được điện di với gel agarose 1,5% trong dung dịch đệm tris-borate (TBE) bằng máy điện di Power Pac 300 (Bio-Rad). Thang chuẩn DNA 100 bp được sử dụng để ước lượng kích thước băng của sản phẩm. Kết quả điện di được ghi nhận bằng máy đọc gel (Bio-Rad UV 2000) và hình ảnh được phân tích bằng phần mềm Quantity One 4.6.

2.2.3 Đánh giá sự mẫn cảm với thuốc cỏ

Khảo sát sự mẫn cảm với thuốc cỏ được thực hiện theo phương pháp của Xu *et al.* (2013). Ở giai đoạn 2 - 3 lá, cây con được xử lý bằng thuốc trừ cỏ Facet 25 SC (quinclorac) ở liều lượng tương đương với 0; 187,5; 250; 312,5 và 375 g hoạt chất quinclorac (a.i.) ha⁻¹. Thí nghiệm được bố trí theo khối hoàn toàn ngẫu nhiên với 4 lần lặp lại và có 10 cây trong mỗi lần lặp lại.

Ở 14 ngày sau khi phun (NSKP), độ hữu hiệu (DHH) được xác định bằng cách đếm số cây sống và chết trong nghiệm thức và tính theo công thức Henderson-Tilton (1955):

$$DHH (\%) = \left[1 - \frac{Ta \times Cb}{Ca \times Tb} \right] \times 100$$

Trong đó:

Ca: Số cây ở chậu đối chứng vào 14 NSKP; Cb: Số cây ở chậu đối chứng vào thời điểm trước khi xử lý; Ta: Số cây ở trong chậu có xử lý thuốc vào 14 NSKP; Tb: Số cây ở chậu có xử lý thuốc, trước khi xử lý thuốc.

Đánh giá sự miễn cảm của cỏ lồng vực dựa trên mô tả của Moss *et al.* (2007), trong đó DHH (%) ở liều khuyến cáo của mẫu miễn cảm (S) là 81-100%; các mẫu kháng từng cấp độ lần lượt R: 72-80%; RR: 36-71% và RRR: 0-35%.

ED₅₀, liều lượng (g a.i/ha) thuốc có thể không chế được 50% cỏ được tính dựa trên phân tích hồi quy phi tuyến tính bằng phần mềm GrapPad Prism 7.04 (Motulsky, 1999) với phương trình:

$$Y = \frac{a + X^e \times (b - a)}{X^e + ED_{50} \times e}$$

Trong đó: Y: Độ hữu hiệu (DHH); X: Liều lượng quinclorac (g a.i/ha); ED₅₀: Liều lượng thuốc không chế được 50% cỏ (g a.i/ha); a: Giới hạn dưới; b: Giới hạn trên; e: Độ dốc của đường hồi quy

Tỷ lệ RI (resistant index) tại ED₅₀ được tính bằng cách chia giá trị ED₅₀ của quần thể kháng với giá trị ED₅₀ của nhóm nhạy cảm.

2.3 Phân tích dữ liệu

– Số liệu được thu thập và xử lý bằng phần mềm Excel, IBM SPSS Statistics 20 và GrapPad Prism 7.04.

– Bảng điện di được mã hóa nhị phân (0 và 1) bằng phần mềm PyElph 1.4 (Pavel and Vasile, 2012). Sơ đồ phân nhóm (dendrogram) được xây dựng bởi phương pháp phân tích tương đồng DICE và SAHN- UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Average) (Sokal, 1958), phần mềm NTSYSpc v.2.1.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Sự miễn cảm với quinclorac

Ở liều khuyến cáo, quinclorac chỉ đạt được hiệu quả không chế cỏ lồng vực trung bình 58,5 ± 7,3% (Bảng 1), cho thấy rằng hiện nay đã có xuất hiện các quần thể cỏ lồng vực kháng thuốc trừ cỏ hoạt chất quinclorac ở liều thuốc xử lý thông thường. Cụ thể, có 9 mẫu cỏ lồng vực kháng đối với hoạt chất quinclorac, trong đó, 7 mẫu kháng ở mức trung bình và 2 mẫu kháng mạnh ở liều lượng khuyến cáo (250 g a.i/ha).

Bảng 1: Sự miễn cảm của 15 mẫu cỏ lồng vực với thuốc quinclorac

| Mẫu | Độ hữu hiệu (%) ở liều khuyến cáo (250 g a.i. ha ⁻¹) | Cấp độ R-S | ED ₅₀ (g a.i/ha) | Chỉ số RI ^A |
|------------|--|------------|-----------------------------|------------------------|
| EC1 | 41,2 ^b ± 6,2 | RR | 266,2 ^{cd} ± 30,8 | 2,0 |
| EC2 | 78,8 ^{ef} ± 7,3 | S | 150,7 ^{ab} ± 9,1 | 1,1 |
| EC3 | 81,6 ^{ef} ± 6,4 | S | 171,4 ^{ab} ± 4,8 | 1,3 |
| EC4 | 16,1 ^a ± 4,7 | RRR | 416,5 ^f ± 73,1 | 3,1 |
| EC5 | 16,6 ^a ± 6,1 | RRR | 320,0 ^{de} ± 32,3 | 2,4 |
| EC6 | 72,6 ^{de} ± 9,6 | RR | 180,4 ^{ab} ± 1,8 | 1,3 |
| EC7 | 79,9 ^{ef} ± 8,5 | S | 164,3 ^{ab} ± 5,7 | 1,2 |
| EC8 | 54,4 ^c ± 7,4 | RR | 284,8 ^d ± 49,0 | 2,1 |
| EC9 | 33,6 ^b ± 6,4 | RR | 319,5 ^{de} ± 41,0 | 2,4 |
| EC10 | 89,6 ^f ± 9,5 | S | 156,8 ^{ab} ± 6,3 | 1,2 |
| EC11 | 37,1 ^b ± 8,0 | RR | 314,5 ^{de} ± 40,7 | 2,3 |
| EC12 | 34,6 ^b ± 6,8 | RR | 377,0 ^{ef} ± 61,0 | 2,8 |
| EC13 | 88,5 ^f ± 9,3 | S | 140,6 ^a ± 36,8 | 1,0 |
| EC14 | 67,8 ^d ± 5,4 | RR | 213,2 ^{bc} ± 37,9 | 1,6 |
| EC15 | 86,2 ^f ± 7,6 | S | 134,1 ^a ± 21,0 | - |
| Trung bình | 58,5 ± 7,3 | - | 240,6 ± 32,7 | - |
| F | * | - | * | - |
| CV% | 12,88 | - | 17,84 | - |

*: Các chữ cái theo sau giá trị trung bình trong cùng một cột giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức 5% theo phép thử Duncan

^A: Chỉ số RI: Giá trị ED₅₀ của các mẫu chia cho giá trị ED₅₀ của mẫu miễn cảm EC15

Cấp độ R-S: Dựa trên thang đánh giá của Moss *et al.* (2007), trong đó độ hữu hiệu (%) ở liều lượng khuyến cáo của mẫu miễn cảm S là từ 81-100%; các mẫu kháng từng cấp độ lần lượt R: 72-80%; RR: 36-71% và RRR: 0-35%

Dựa vào giá trị ED₅₀ (liều lượng không chế hiệu quả 50% quần thể), mẫu cỏ lông vược kháng quinclorac mạnh nhất là EC4 với giá trị ED₅₀ cao, 416,5 g a.i. ha⁻¹, chỉ số kháng RI = 3,1 (Bảng 1). Bên cạnh đó, các mẫu kháng thấp hơn như EC12 (377,0 g a.i./ha, RI = 2,8), EC5 (320,0 g a.i./ha, RI = 2,4), EC9 (319,5 g a.i./ha, RI = 2,4) và EC11 (314,5 g a.i./ha, RI = 2,3). Do đó, quinclorac ở nồng độ khuyến cáo không thể không chế được các quần thể kháng này, cần có biện pháp phòng trừ kết hợp để đạt hiệu quả hơn trong công tác quản lý cỏ dại. Dựa trên giá trị ED₅₀ và chỉ số kháng RI, có thể kết luận rằng EC13 và EC15 là mẫu nhạy cảm với quinclorac và mẫu EC4; EC5; EC8; EC9; EC11 và EC12 là các mẫu cỏ lông vược kháng quinclorac, với thứ tự kháng là EC4 > EC12 > EC5 > EC9 > EC11 > EC8.

Giá trị ED₅₀ trung bình của cỏ lông vược là 240,6 g a.i./ha, cao hơn so với kết quả của Xu *et al.* (2013) là 36,75 g a.i./ha ở *Echinochloa crus-galli* var. *zelayensis*. Kết quả này cho thấy cỏ lông vược tại Việt Nam kháng quinclorac mạnh hơn do quá trình sử dụng thuốc quinclorac liên tiếp trong khoảng thời gian dài. Mặt khác, giá trị ED₅₀ này thấp so với kết quả của Lopez-Martinez *et al.* (1999) (từ 400 đến 900 g a.i. ha⁻¹). Ngoài ra, Chen *et al.* (2016) ghi nhận 48% quần thể cỏ lông vược nghiên cứu tại Trung Quốc là quần thể cỏ kháng với nhiều cấp độ từ kháng cao (RI >10) cho đến các quần thể kháng rất cao (RI lên đến 100).

3.2 Đa dạng hình thái của cỏ lông vược

Trong các đặc điểm hình thái khảo sát ở cỏ lông vược (Bảng 2), tất cả các đặc tính đều biểu hiện tính đa hình. Trong 15 mẫu cỏ lông vược thấy được sự phát triển của thân chồi và lá ở 2 dạng: thẳng đứng

và xòe, với kiểu thân dạng xòe phổ biến hơn (53,3%). Phần thân gốc có 3 màu sắc riêng biệt bao gồm màu đỏ tím, hồng hoặc xanh. Bìa lá và gân lá chính của cỏ lông vược cũng có sự đa dạng màu sắc gồm trắng, xanh và tím. Trong đó, gân lá màu trắng được tìm thấy phổ biến nhất trong các mẫu quan sát (66,6%) và gân lá màu tím chỉ chiếm tỉ lệ 6,7%. Kiểu hạt và màu sắc hạt cũng là 2 đặc điểm hình thái cơ bản có thể dễ quan sát thấy sự khác biệt trên đồng ruộng. Với 3 kiểu hạt như không có râu hạt, hạt có râu ngắn hoặc hạt có râu dài. Đa số các mẫu đều có hạt màu xanh với tỉ lệ 80%, và hạt có râu dài chiếm 60% tổng số. Dựa vào sơ đồ hình nhánh (Hình 2) có thể chia 15 mẫu cỏ lông vược vào 3 nhóm chính với độ tương đồng từ 30 đến 89%:

Nhóm 1 gồm có 10 mẫu phân vào 2 nhóm phụ, có chung đặc điểm gân lá màu trắng. Cụ thể, nhóm 1.1 gồm có 5 mẫu: EC1, EC2, EC6, EC13 và EC14. Bên cạnh sự giống nhau về màu sắc của gân lá thì các mẫu trong nhóm này còn có chung hình thức phát triển của bụi là thẳng đứng và phần gốc thân có màu đỏ tím. Đặc biệt trong nhóm này có 2 mẫu EC1 và EC2 giống nhau 7 đặc điểm hình thái quan sát được, có độ tương đồng lớn nhất (89%). Vị trí địa lý của hai mẫu cỏ lông vược này gần nhau, vì thế hai mẫu này có thể có cùng nguồn gốc hoặc kiểu hình bị chi phối bởi môi trường sống tương tự. Mặt khác, nhóm 1.2 cũng gồm 5 mẫu: EC3, EC4, EC11, EC12 và EC5, có dạng bụi xòe và thân màu xanh.

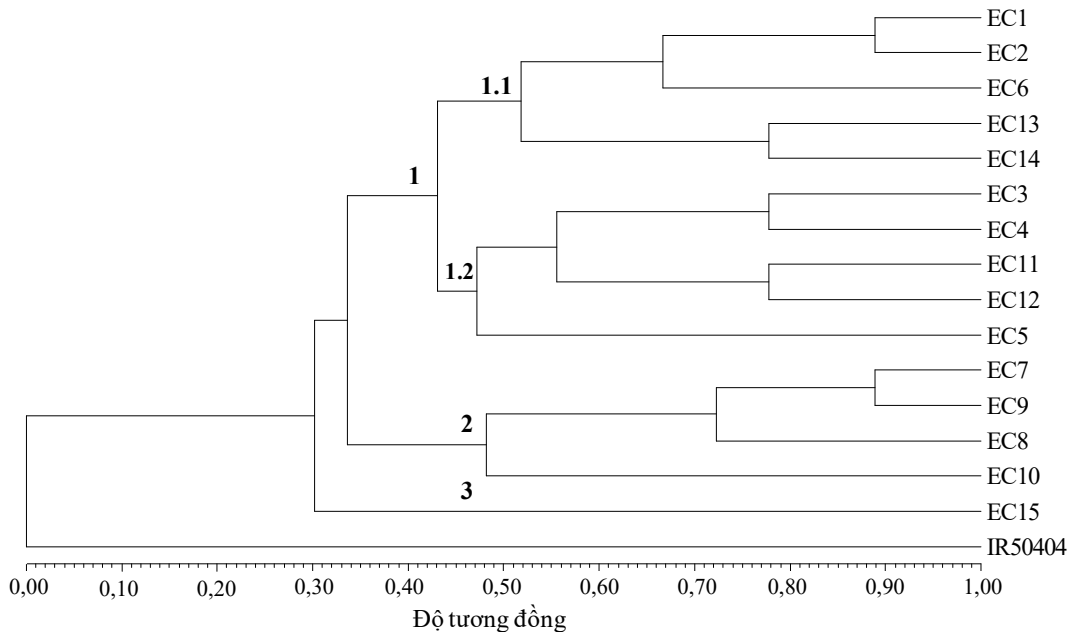
Nhóm 2 gồm có 4 mẫu EC7, EC8, EC9 và EC10 có gân lá màu xanh, bìa lá và hạt màu xanh. Độ tương đồng lớn nhất là 89% ở mẫu EC7 và EC9 trong khi độ tương đồng trong nhóm thấp nhất là 41% giữa EC7 và EC10.

Bảng 2: Sự đa dạng về các đặc điểm hình thái của cỏ lông vược

| Đặc điểm hình thái | | Tỷ lệ (%) | Đặc điểm hình thái | | Tỷ lệ (%) |
|----------------------|------------|-----------|--------------------|----------------|-----------|
| 1. Kiểu thân | Thẳng đứng | 46,7 | 6. Màu sắc hạt | Tím | 20,0 |
| | Xòe | 53,3 | | Xanh | 80,0 |
| 2. Màu sắc gốc thân | Đỏ tím | 26,7 | 7. Kiểu râu hạt | Không râu | 20,0 |
| | Hồng | 40,0 | | Râu ngắn | 20,0 |
| | Xanh | 33,3 | | Râu dài | 60,0 |
| 3. Màu sắc bìa lá | Tím | 26,7 | 8. Chiều cao | < 130 cm | 53,3 |
| | Xanh | 33,3 | | 131-170 cm | 33,4 |
| | Trắng | 40,0 | | > 170 cm | 13,3 |
| 4. Màu sắc gân lá | Tím | 6,7 | 9. Chiều dài bông | Ngắn hơn 26 cm | 26,7 |
| | Xanh | 26,7 | | Từ 26-30 cm | 40,0 |
| | Trắng | 66,6 | | Dài hơn 30 cm | 33,3 |
| 5. Lông tơ ở cuộn lá | Có | 53,3 | | | |
| | Không | 46,7 | | | |



Hình 1: Sự đa dạng màu sắc gân và bìa lá và đặc điểm râu hạt của cỏ lồng vực



Hình 2: Mối quan hệ giữa 15 mẫu cỏ lồng vực qua phân tích tương đồng DICE và phương pháp UPGMA dựa trên phân tích hình thái

Nhóm 3 chỉ có mẫu EC15 có kiểu hình khác biệt so với tất cả các mẫu cỏ lồng vực quan sát trong nghiên cứu này. EC15 có hình dạng bụi xòe, gốc thân màu hồng, bìa lá và gân lá màu tím, hạt màu tím và không có râu hạt. EC15 có độ tương đồng thấp nhất với EC1 và tương đồng với các nhóm còn lại ở 30%.

Kết quả phân tích cho thấy hình thái của chi *Echinochloa* không chỉ đa dạng giữa các loài mà còn đa dạng trong cùng loài. Lopez-Martinez et al. (1999) đánh giá được giữa 7 quần thể cỏ lồng vực có sự tương đồng hình thái lớn hơn của cỏ lồng vực ở nghiên cứu này. Sự khác biệt về vị trí địa lý và điều kiện môi trường, thụ phấn chéo hoặc có thể có sự xuất hiện của đột biến trong kiểu gene là những nguyên nhân có thể tạo nên sự biến đổi hình thái của quần thể. Vì thế, cần đến phân tích sinh học phân tử để có thể đánh giá được chính xác hơn mối quan hệ giữa các quần thể cỏ lồng vực.

3.3 Đa dạng di truyền của cỏ lồng vực

Trong các đoạn môi RAPD đã được sử dụng trên 15 mẫu cỏ lồng vực, có 9 đoạn môi khuếch đại được các băng đa hình và có tính lặp lại trên tất cả 15 mẫu cỏ lồng vực (Bảng 3). Các đoạn môi khuếch đại được 62 băng, với 36 băng đa hình chiếm tỷ lệ 51,2%. Hầu hết các mẫu cỏ lồng vực đều có độ tương đồng di truyền cao từ 86-96%. Theo sơ đồ có thể chia 15 mẫu cỏ lồng vực vào 3 nhóm chính (Hình 3).

Nhóm 1: gồm có 9 mẫu phân thành 2 nhóm phụ. Nhóm phụ 1.1 gồm có 4 mẫu EC1, EC2, EC9 và EC13 tương đồng với nhau trong khoảng 90-96%. Trong đó, mẫu EC1 có mối quan hệ gần gũi nhất với EC2, tương đồng đến 96%. Điều này phù hợp với kết quả phân tích hình thái khi 2 mẫu này di truyền cùng nhau với độ tương đồng lớn nhất. Nhóm phụ 1.2 có 5 mẫu bao gồm EC3, EC4, EC7, EC10 và EC12 tương đồng ở mức từ 92-95%.

Nhóm 2: nhóm này chỉ có một mẫu duy nhất là EC15. Mẫu này luôn có quan hệ xa với các mẫu còn lại trong cả phân tích hình thái và di truyền. Tương đồng di truyền cao nhất với mẫu EC12 là 90% và có độ tương đồng thấp nhất đối với mẫu EC5 là 80%. Khoảng cách di truyền giữa EC15 và EC5 có thể bị ảnh hưởng bởi khoảng cách địa lý khi 2 mẫu này thuộc những vùng xa nhau. Trái lại, EC15 và EC12 thuộc vùng địa lý gần nhau nên có độ tương đồng di truyền cao.

Nhóm 3: gồm có 5 mẫu EC5, EC11, EC14, EC6 và EC8, với độ tương đồng trong khoảng 91-94%. Trong cùng nhóm, EC6 có quan hệ di truyền gần nhất với EC8 (94%) và xa nhất với EC5 (91%). So với ngoài nhóm, EC8 có quan hệ xa nhất với EC1, khi 2 mẫu này chỉ tương đồng di truyền ở 85%.

Ruiz-Santaella *et al.* (2006) cho thấy khảo sát các quần thể cỏ lồng vực có quan hệ di truyền gần với nhau với độ tương đồng lên đến 100%. Trong một nghiên cứu khác, Altop and Mennan (2011) khảo sát được trong 34 quần thể cỏ lồng vực khác nhau có độ tương đồng di truyền trong khoảng 75 – 98%. Các quần thể cỏ lồng vực ở nghiên cứu của Lopez-Martinez *et al.* (1999) cho thấy có độ tương đồng thấp hơn, chỉ ở mức 70%.

Mẫu cỏ lồng vực EC15 khác biệt nhất trong 15 mẫu cỏ quan sát, luôn thuộc một nhóm riêng lẻ trong 2 phương pháp phân tích hình thái và di truyền. Đối

với phân tích hình thái, EC15 thuộc nhóm 3 và có độ tương đồng hình thái thấp nhất (30%) với các mẫu còn lại. Đối với phân tích di truyền bằng kỹ thuật RAPD, EC15 thuộc nhóm 2, cũng là một nhóm riêng tách biệt so với các mẫu còn lại. Kỹ thuật RAPD giúp nhận diện được chính xác hơn mối quan hệ di truyền của cỏ lồng vực khi có sự giống nhau phức tạp về hình thái. Cụ thể ở mẫu cỏ lồng vực EC11 và EC12, với độ tương đồng hình thái đến 78%. Hơn nữa, vị trí thu mẫu của 2 mẫu cỏ này khá gần nhau, nhưng phân tích di truyền cho thấy 2 mẫu này hoàn toàn khác nhau, chúng thuộc 2 nhóm riêng biệt với độ tương đồng thấp. Mẫu EC11 thuộc nhóm 3, có quan hệ gần với EC14 trong khi EC12 có độ tương đồng di truyền cao với EC10 thuộc nhóm 1.

Mẫu cỏ lồng vực EC5 thuộc nhóm 3 trong khi các mẫu còn lại có chung khu vực địa lý tỉnh An Giang (EC1, EC2, EC3 và EC4) thuộc nhóm 1. Tuy nhiên, phân tích hình thái cho thấy tất cả 5 mẫu thuộc khu vực này đều có kiểu hình tương tự thuộc nhóm 1. Trường hợp này, chọn lọc địa lý và điều kiện và môi trường dường như ảnh hưởng đến sự đa dạng di truyền của cỏ lồng vực. Có sự khác biệt di truyền nhưng được sinh trưởng trong cùng điều kiện tương tự sẽ dẫn đến sự tương đồng về kiểu hình. Mặc khác, mẫu EC6 độ tương đồng di truyền 94% với EC8 nhưng hình thái của chúng lại khác biệt nhau, điều kiện môi trường có thể đóng góp vào sự đa dạng của cỏ lồng vực.

Bảng 3: Sự đa hình của 9 môi RAPD ở 15 mẫu cỏ lồng vực

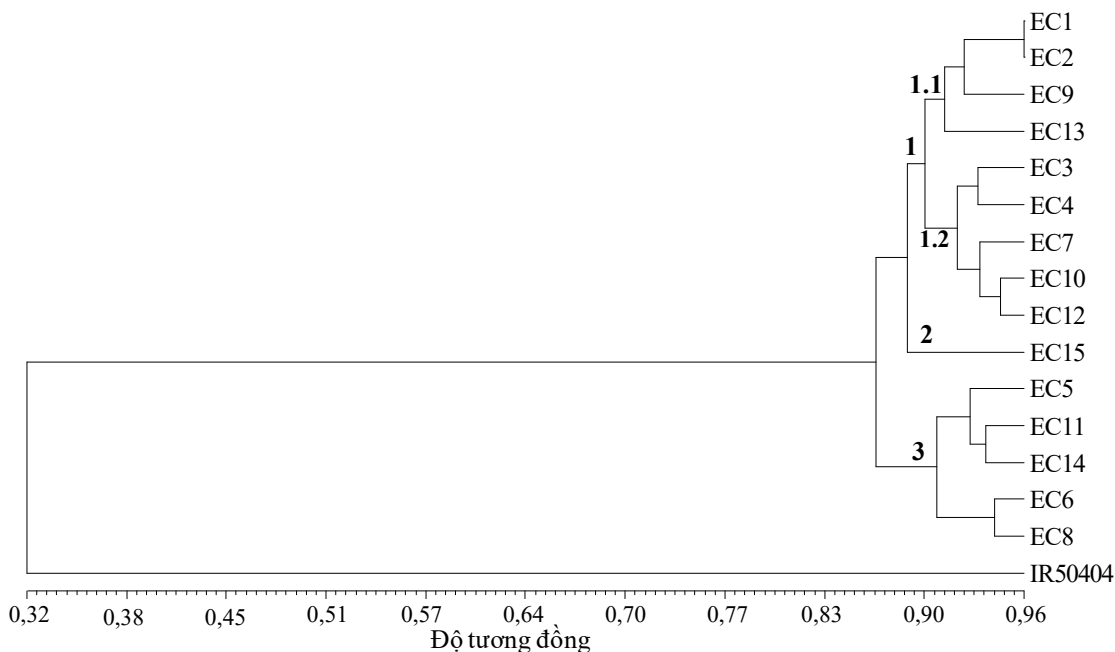
| STT | Môi | Tổng số băng | Số băng đa hình | Tỷ lệ đa hình (%) |
|------------|-------|--------------|-----------------|-------------------|
| 1 | OPA02 | 4 | 1 | 25,0 |
| 2 | OPE01 | 6 | 2 | 33,3 |
| 3 | OPH02 | 11 | 8 | 72,7 |
| 4 | OPN06 | 3 | 1 | 33,3 |
| 5 | OPN07 | 8 | 2 | 25,0 |
| 6 | OPN16 | 4 | 3 | 75,0 |
| 7 | OPJ06 | 5 | 2 | 40,0 |
| 8 | OPK20 | 14 | 12 | 85,7 |
| 9 | DAS08 | 7 | 5 | 71,4 |
| Tổng | | 62 | 36 | - |
| Trung bình | | 6,8 ± 3,6 | 4,0 ± 3,7 | 51,2 ± 24,4 |

Sự tương đồng di truyền trong quần thể cùng nhóm và mức độ kháng thuốc quinclorac được phân tích để tìm mối tương quan có thể tồn tại giữa di truyền và tính kháng thuốc của cỏ lồng vực. Nhìn chung, sự tương đồng di truyền (phân tích RAPD) và mức độ kháng thuốc quinclorac chưa thể hiện được mối quan hệ tương quan. Mẫu cỏ lồng vực EC1 và EC2 có quan hệ di truyền gần nhất (độ tương đồng di truyền 96%), nhưng sự mẫn cảm của chúng với thuốc quinclorac lại khác nhau. Cụ thể, mẫu EC2 mẫn cảm với quinclorac ($ED_{50} = 150,7$ g a.i/ha) trong khi giá trị ED_{50} của EC1 là 266,2 g a.i/ha. Mặc

khác, EC4 và EC5 có tính kháng với quinclorac ở liều lượng khuyến cáo, nhưng chúng lại thuộc 2 nhóm riêng biệt. Giá trị ED_{50} của EC4 và EC5 lần lượt là 416,5 g a.i/ha và 320 g a.i/ha, nhưng EC4 thuộc nhóm 1 và EC5 thuộc nhóm 3, khoảng cách di truyền là 0,13. Dữ liệu RAPD chỉ ra rằng đột biến có thể diễn ra độc lập khi 2 mẫu cỏ lồng vực kháng hiện diện trong 2 nhóm di truyền riêng biệt, đại diện cho 2 quần thể riêng biệt. Hơn nữa, mẫu EC7 và EC9 tương đồng di truyền đến 90% cùng với những đặc điểm hình thái giống nhau nhưng chúng có tính kháng thuốc quinclorac khác nhau. Trong đó, giá trị

ED₅₀ của EC7 và EC9 lần lượt là 164,3 và 319,5 g a.i/ha. Ngoài ra, 2 mẫu cỏ lồng vực mẫn cảm nhất với quinclorac là EC13 (ED₅₀ = 140,4 g a.i/ha) và

EC15 (134,1 g a.i/ha) có sự khác biệt về phương diện hình thái lẫn di truyền.



Hình 3: Mối quan hệ giữa 15 mẫu cỏ lồng vực qua phân tích tương đồng DICE và phương pháp UPGMA dựa trên dấu phân tử RAPD

4 KẾT LUẬN

Cỏ lồng vực ở 3 tỉnh thuộc khu vực đa dạng cả phương diện hình thái lẫn di truyền. Nghiên cứu cho thấy rằng các mẫu cỏ lồng vực có nguồn gốc thu mẫu cùng một tỉnh nhưng có sự khác nhau về khả năng kháng thuốc cỏ hoạt chất quinclorac cũng như độ di truyền. Hơn nữa, các nhóm tương đồng di truyền bao gồm cả các quần thể cỏ lồng vực nhạy cảm và kháng quinclorac mạnh. Tính kháng có thể phát triển độc lập trong mỗi nhóm bởi vì tính kháng phát triển nhanh hơn sự thay đổi di truyền của quần thể. Kỹ thuật RAPD giúp nhận diện được chính xác hơn mối quan hệ di truyền của cỏ lồng vực trong trường hợp có sự giống nhau phức tạp về hình thái do ảnh hưởng bởi yếu tố môi trường. Ngoài ra, nghiên cứu chỉ ra rằng phân tích RAPD hiệu quả trong đánh giá sự đa dạng trong các quần thể cỏ lồng vực thu từ 3 tỉnh An Giang, Kiên Giang và Vĩnh Long. Kết quả khoảng cách di truyền từ phân tích RAPD chưa cung cấp đầy đủ thông tin di truyền để có thể phát hiện được tính kháng trong các quần thể cỏ lồng vực khảo sát. Các mẫu cỏ kháng mạnh đối với quinclorac biểu hiện sự không đồng di truyền với kết quả phân tích RAPD. Tính kháng có thể phát triển độc lập gần đây, vì thế chúng không có đủ thời gian để mẫu kháng ở 2 nhóm di truyền khác nhau phát triển từ một nền tảng di truyền chung trong phạm vi rộng. Nghiên cứu xa hơn nên được

thực hiện để khảo sát số lượng các quần thể đại diện ở khu vực này, số lượng quần thể phát triển tính kháng quinclorac. Bên cạnh, các nghiên cứu khác bao gồm xác định gene quy định tính kháng, phát triển kỹ thuật phát hiện nhanh tính kháng của loài cỏ lồng vực cần được tiếp tục nghiên cứu.

LỜI CẢM ƠN

Các tác giả xin chân thành cảm ơn các thành viên của Phòng thí nghiệm Sinh hoá, Bộ môn Công Nghệ Sinh học Phân tử, Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học của Trường Đại học Cần Thơ đã tạo điều kiện và hỗ trợ để thực hiện nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Altop, E. K. and Mennan, H., 2011. Genetic and morphologic diversity of *Echinochloa crus-galli* populations from different origins. *Phytoparasitica*. 39(1): 93-102.
- Asins, M. J., Carretero, J. L., Del Busto, A., Carbonell, E. A. and De Barreda, D. G., 1999. Morphologic and isozyme variation in barnyardgrass (*Echinochloa*) weed species. *Weed technology*. 13(2): 209-215.
- Chen, G., Wang, Q., Yao, Z., Zhu, L. and Dong, L., 2016. Penoxsulam-resistant barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*) in rice fields in

- China. *Weed Biology and Management*. 16(1): 16-23.
- Doyle, J. and Doyle, J. L., 1987. Genomic plant DNA preparation from fresh tissue-CTAB method. *Phytochem Bull.* 19(11): 11-15.
- Heap, I. M., 1999. International survey of herbicide-resistant weeds: lessons and limitations. In 1999 Brighton crop protection conference: weeds. Proceedings of an international conference, Brighton, UK, 15-18 November 1999. British Crop Protection Council, 3: 769-776.
- Henderson, C. F., and Tilton, E. W., 1955. Tests with acaricides against the brown wheat mite. *Journal of Economic Entomology*. 48(2): 157-161.
- Kim, D. S., Caseley, J. C., Brain, P., Riches, C. R. and Valverde, B. E., 2000. Rapid detection of propanil and fenoxaprop resistance in *Echinochloa colona*. *Weed Science*. 48(6): 695-700.
- Le, D., Nguyen, C. M., Mann, R. K., Yerkes, C. N., and Kumar, B. V. 2017. Genetic diversity and herbicide resistance of 15 *Echinochloa crus-galli* populations to quinclorac in Mekong Delta of Vietnam and Arkansas of United States. *Journal of Plant Biotechnology*. 44(4): 472-477.
- Li, Y. B., Wu, Z. H., Chen, X., Liu, H. B., and Huang, B. Q., 2003. Determination of resistance of *Echinochloa crus-galli* to quinclorac in the rice planting areas of South China. *Chinese Journal of Pesticides Science*, 5(4): 99-101.
- Lopez-Martinez, N., Salvá, A. P., Finch, R. P., Marshall, G. and De Prado, R., 1999. Molecular markers indicate intraspecific variation in the control of *Echinochloa* spp. with quinclorac. *Weed Science*. 47(3): 310-315.
- Mamatha, N. C., Tehlan, S. K., Srikanth, M., Shivaprasad, M. K., and Reddy, P. K., 2017. Molecular Characterization of Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) Genotypes Using Rapd Markers. *International Journal of Current Microbiology Applied Science*. 6(6): 2573-2581.
- Moss, S. R., Perryman, S. A., and Tatnell, L. V., 2007. Managing herbicide-resistant blackgrass (*Alopecurus myosuroides*): theory and practice. *Weed Technology*. 21(2): 300-309.
- Motulsky, H., 1999. Analyzing data with GraphPad prism. GraphPad Software Incorporated, 397 pages.
- Nissen, S. J., Masters, R. A., Lee, D. J., and Rowe, M. L., 1995. DNA-based marker systems to determine genetic diversity of weedy species and their application to biocontrol. *Weed Science*. 43(3): 504-513.
- Pavel, A. B., and Vasile, C. I., 2012. PyElph-a software tool for gel images analysis and phylogenetics. *BMC bioinformatics*, 13(1): 9 pages.
- Ruiz-Santaella, J. P., Bastida, F., Franco, A. R. and De Prado, R., 2006. Morphological and molecular characterization of different *Echinochloa* spp. and *Oryza sativa* populations. *Journal of agricultural and food chemistry*. 54(4): 1166-1172.
- Rutledge, J., Talbert, R. E. and Sneller, C. H., 2000. RAPD analysis of genetic variation among propanil-resistant and susceptible *Echinochloa crus-galli* populations in Arkansas. *Weed Science*. 48(6): 669-674.
- Sokal, R. R., 1958. A statistical method for evaluating systematic relationship. *University of Kansas science bulletin*. 28: 1409-1438.
- Tabacchi, M., Mantegazza, R., Spada, A. and Ferrero, A., 2006. Morphological traits and molecular markers for classification of *Echinochloa* species from Italian rice fields. *Weed science*. 54(6): 1086-1093.
- Tasrif, A., Juraimi, A. S., Kadir, J., Sastroutomo, S. S. and Napis, S., 2004. Genetic diversity of *Echinochloa crus-galli* var. *crus-galli* (L.) Beauv (Barnyard grass: Poaceae) ecotypes in Malaysia and Indonesia as revealed by RAPD markers. *Asian Journal of Plant Sciences*. 3: 231-238.
- Vengris, J., Kacperska-Palacz, A. E., and Livingston, R. B., 1966. Growth and development of barnyardgrass in Massachusetts. *Weeds*. 14: 299-301.
- Williams, J. G., Hanafey, M. K., Rafalski, J. A., and Tingey, S. V., 1993. Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. *Methods in enzymology*. 218: 704-740.
- Won, O. J., Lee, J. J., Eom, M. Y., Suh, S. J., Park, S. H., Hwang, K. S. and Park, K. W., 2014. Identification of Herbicide-Resistant Barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli* var. *crus-galli*) Biotypes in Korea. *Weed & Turfgrass Science*. 3(2): 110-113.
- Xu, J., Lv, B., Wang, Q., Li, J., and Dong, L., 2013. A resistance mechanism dependent upon the inhibition of ethylene biosynthesis. *Pest management science*. 69(12): 1407-1414.