

P-ISSN 1859-4794 * E-ISSN 2615-9929

TẬP 66, SỐ 2, THÁNG 2 NĂM 2024
VOLUME 66, NUMBER 2, FEBRUARY 2024

TẠP CHÍ & KHOA HỌC CÔNG NGHỆ

Vietnam Journal of Science and Technology - MOST VIỆT NAM



HỘI ĐỒNG BIÊN TẬP

Chủ tịch

Châu Văn Minh - Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam, Việt Nam

Thành viên

Nguyễn Việt Anh - Trường Đại học Xây dựng, Việt Nam

Bùi Chí Bửu - Viện Khoa học Kỹ thuật Nông nghiệp miền Nam, Việt Nam

Vũ Dũng - Hội Tâm lý học Việt Nam, Việt Nam

Trần Thọ Đạt - Trường Đại học Kinh tế Quốc dân, Việt Nam

Nguyễn Đình Đức - Trường Đại học Công nghệ, Đại học Quốc gia Hà Nội, Việt Nam

Vũ Minh Giang - Đại học Quốc gia Hà Nội, Việt Nam

Trương Nam Hải - Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam, Việt Nam

Trần Thanh Hải - Trường Đại học Mở - Địa chất, Việt Nam

Phạm Huy Khang - Trường Đại học Giao thông Vận tải, Việt Nam

Phạm Gia Khánh - Hội Ghép tạng Việt Nam, Việt Nam

Hồ Đắc Lộc - Trường Đại học Công nghệ TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

Nguyễn Thị Mỹ Lộc - Trường Đại học Giáo dục, Đại học Quốc gia Hà Nội, Việt Nam

Bành Tiến Long - Đại học Bách khoa Hà Nội, Việt Nam

Lê Quan Nghiêm - Đại học Y Dược TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

Mai Trọng Nhuận - Đại học Quốc gia Hà Nội, Việt Nam

Trần Hữu Phúc - Hội đồng Giáo sư Nhà nước, Việt Nam

Nguyễn Thanh Phương - Trường Đại học Cần Thơ, Việt Nam

Nguyễn Thanh Thủy - Trường Đại học Công nghệ, Đại học Quốc gia Hà Nội, Việt Nam

Phạm Hùng Việt - Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội, Việt Nam

Tổng biên tập

Nguyễn Thị Hương Giang - Bộ Khoa học và Công nghệ, Việt Nam

Ban biên tập

Phạm Thị Minh Nguyệt - Bộ Khoa học và Công nghệ, Việt Nam

Phí Công Thường - Bộ Khoa học và Công nghệ, Việt Nam

Vũ Văn Hưng - Bộ Khoa học và Công nghệ, Việt Nam

Ninh Văn Diện - Bộ Khoa học và Công nghệ, Việt Nam

Lê Thị Bắc - Bộ Khoa học và Công nghệ, Việt Nam

Tăng Xuân Bình - Bộ Khoa học và Công nghệ, Việt Nam

Đoàn Đức Khải - Bộ Khoa học và Công nghệ, Việt Nam

Trương Thị Thảo Dương - Bộ Khoa học và Công nghệ, Việt Nam

EDITORIAL BOARD

Chairman

Chau Van Minh - Vietnam Academy of Science and Technology, Vietnam

Members

Nguyen Viet Anh - National University of Civil Engineering, Vietnam

Bui Chi Bui - Institute of Agricultural Science for Southern Vietnam, Vietnam

Vu Dung - Vietnam Association of Social Psychology, Vietnam

Tran Tho Dat - National Economics University, Vietnam

Nguyen Dinh Duc - University of Engineering and Technology, VNU, Hanoi, Vietnam

Vu Minh Giang - VNU, Hanoi, Vietnam

Truong Nam Hai - Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology, Vietnam

Tran Thanh Hai - Hanoi University of Mining and Geology, Vietnam

Pham Huy Khang - University of Transport and Communications, Vietnam

Pham Gia Khanh - Vietnam Society of Organ Transplantation, Vietnam

Ho Duc Loc - Ho Chi Minh City University of Technology, Vietnam

Nguyen Thi My Loc - University of Education, VNU, Hanoi, Vietnam

Banh Tien Long - Hanoi University of Science and Technology, Vietnam

Le Quan Nghiem - University of Medicine and Pharmacy at Ho Chi Minh City, Vietnam

Mai Trong Nham - VNU, Hanoi, Vietnam

Tran Huu Phuc - The State Council for Professorship, Vietnam

Nguyen Thanh Phuong - Can Tho University, Vietnam

Nguyen Thanh Thuy - University of Engineering and Technology, VNU, Hanoi, Vietnam

Pham Hung Viet - University of Science, VNU, Hanoi, Vietnam

Editor-in-Chief

Nguyen Thi Huong Giang - Ministry of Science and Technology, Vietnam

Managing Editors

Pham Thi Minh Nguyet - Ministry of Science and Technology, Vietnam

Phi Cong Thuong - Ministry of Science and Technology, Vietnam

Vu Van Hung - Ministry of Science and Technology, Vietnam

Ninh Van Dien - Ministry of Science and Technology, Vietnam

Le Thi Bac - Ministry of Science and Technology, Vietnam

Tang Xuan Binh - Ministry of Science and Technology, Vietnam

Doan Duc Khai - Ministry of Science and Technology, Vietnam

Truong Thi Thao Duong - Ministry of Science and Technology, Vietnam

TÒA SOẠN

113 Trần Duy Hưng - Cầu Giấy - Hà Nội - Việt Nam

Tel: (84.24) 39436793; Fax: (84.24) 39436794

Email: khoahocvacongnghevietnam@most.gov.vn

Tạp chí điện tử: b.vjst.vn

GIẤY PHÉP XUẤT BẢN

Số 459/GP-BTTTT ngày 20/7/2021

Số 50/GP-BTTTT ngày 01/02/2023

Giá: 18000^d

EDITORIAL OFFICE

113 Tran Duy Hung Str. - Cau Giay Dist. - Hanoi - Vietnam

Tel: (84.24) 39436793; Fax: (84.24) 39436794

Email: khoahocvacongnghevietnam@most.gov.vn

E-journal: b.vjst.vn

PUBLICATION LICENCE

No. 459/GP-BTTTT 20th July 2021

No. 50/GP-BTTTT 1st February 2023

Xác định các kiểu gen và phân tích đa hình gen *ompA* của *Chlamydia trachomatis* phân lập từ đường sinh dục của phụ nữ Việt Nam bị vô sinh

Nguyễn Hòa¹, Vũ Văn Du¹, Nguyễn Thị Như Quỳnh², Nguyễn Lê Văn³, Đỗ Ngọc Ánh^{2*}

¹Bệnh viện Phụ sản Trung ương, 43 Tràng Thi, phường Hàng Bông, quận Hoàn Kiếm, Hà Nội, Việt Nam

²Học viện Quân y, 160 Phùng Hưng, phường Phúc La, quận Hà Đông, Hà Nội, Việt Nam

³Bệnh viện Quân y 103, 261 Phùng Hưng, phường Phúc La, quận Hà Đông, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 7/7/2023; ngày chuyển phản biện 10/7/2023; ngày nhận phản biện 1/8/2023; ngày chấp nhận đăng 4/8/2023

Tóm tắt:

Nghiên cứu nhằm xác định phân bố các kiểu gen và phân tích đa hình gen *ompA* của *Chlamydia trachomatis* phân lập từ đường sinh dục phụ nữ bị vô sinh. Tổng số 119 mẫu dịch tiết cổ tử cung được thu thập từ phụ nữ vô sinh đến khám và điều trị tại Bệnh viện Phụ sản Trung ương trong thời gian từ tháng 1/2020 đến tháng 12/2021 được xác định nhiễm *C. trachomatis*. Trong số này, 81 trình tự gen *ompA* với kích thước khoảng 1100 bp đã được sử dụng để xác định kiểu gen và phân tích tính đa hình. Kết quả cho thấy, 9 kiểu gen khác nhau đã được xác định bao gồm: E, D/Da, F, G/Ga, J, H, K, B/Ba và I/Ia. Trong đó, các kiểu gen E, D/Da và F chiếm tỷ lệ cao nhất (lần lượt là 25,93; 22,22; 13,58%). Các kiểu gen E, F và G/Ga có tính bảo tồn cao, tương đồng 100% với trình tự tham chiếu, trong khi trình tự gen *ompA* của các kiểu gen B/Ba, D/Da, H, I/Ia, J và K có 1-10 vị trí thay đổi nucleotide với tổng số 19 vị trí thay đổi khác nhau, 7 trong số này dẫn tới thay đổi axit amin. Kết quả nghiên cứu cho thấy, các kiểu gen E, D/Da và F của *C. trachomatis* chiếm tỷ lệ cao ở phụ nữ vô sinh.

Từ khóa: *Chlamydia trachomatis*, kiểu gen, *ompA*, phụ nữ vô sinh.

Chỉ số phân loại: 3.1

1. Đặt vấn đề

C. trachomatis là vi khuẩn bắt màu gram âm, ký sinh nội bào bắt buộc. Vi khuẩn này được xác định là tác nhân gây bệnh lây truyền qua đường tình dục phổ biến nhất trên thế giới [1, 2]. Ở phụ nữ độ tuổi sinh đẻ, tỷ lệ nhiễm *C. trachomatis* dao động từ 3 đến 30% và khoảng 70% trong số này không có biểu hiện lâm sàng [3]. Do đó, hầu hết những người nhiễm *C. trachomatis* không được phát hiện và điều trị do bản thân họ không biết mình đang nhiễm [4]. Nếu không được điều trị, nhiễm *C. trachomatis* có thể dẫn tới sảy thai, viêm tiểu khung và vô sinh ở nữ giới [3].

Cho tới nay, dựa vào cấu trúc kháng nguyên màng tế bào được mã hóa bởi gen *ompA*, *C. trachomatis* được phân loại thành 19 kiểu gen khác nhau, gồm A, B/Ba, C, D/Da, E, F, G/Ga, H, I/Ia, J, K, L1, L2, L2a và L3 [5]. Các kiểu gen A-C chiếm ưu thế trong các trường hợp *C. trachomatis* gây bệnh đau mắt hột, D-K chiếm ưu thế trong nhiễm khuẩn tiết niệu sinh dục và L1-L3 chiếm ưu thế trong bệnh hột xoài [5, 6]. Tần suất của các kiểu gen thay đổi theo giới tính, chủng tộc, hành vi tình dục và khu vực địa lý [7-9]. Theo M.J.V.D. Laar và cs (1996) [10], sự khác biệt về độc lực của các kiểu

gen có thể là nguyên nhân dẫn đến biểu hiện đa dạng các triệu chứng lâm sàng trong nhiễm *Chlamydia* [10]. Do vậy, các thông tin về kiểu gen là mục tiêu quan trọng trong các nghiên cứu cơ bản, dịch tễ, cung cấp các thông tin giúp giải thích con đường lây truyền, khả năng gây bệnh và phát triển vắc-xin phòng chống tác nhân này [6, 11].

Ở Việt Nam, một số nghiên cứu về nhiễm *C. trachomatis* ở phụ nữ tuổi sinh đẻ và phụ nữ vô sinh [12, 13] đã được công bố, nhưng rất ít nghiên cứu xác định kiểu gen và phân tích đa hình gen *ompA* của *C. trachomatis* ở phụ nữ vô sinh. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm mục tiêu xác định sự phân bố các kiểu gen và phân tích đặc điểm đa hình gen *ompA* của *C. trachomatis* phân lập từ đường sinh dục phụ nữ vô sinh đến khám, điều trị tại Bệnh viện Phụ sản Trung ương.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng

Vi khuẩn *C. trachomatis* phân lập từ đường sinh dục phụ nữ vô sinh đến khám và điều trị tại Bệnh viện Phụ sản Trung ương trong thời gian từ tháng 1/2020 đến tháng 12/2021.

*Tác giả liên hệ: Email: dranhk61.vmmu@gmail.com

Genotype identification and genetic diversity of the *ompA* gene among *Chlamydia trachomatis* isolated from infertile Vietnamese women

Hoa Nguyen¹, Van Du Vu¹, Thi Nhu Quynh Nguyen²,
Le Van Nguyen³, Ngoc Anh Do^{2*}

¹National Hospital of Obstetrics and Gynecology,
43 Trang Thi Street, Hang Bong Ward, Hoan Kiem District, Hanoi, Vietnam

²Vietnam Military Medical University,
160 Phung Hung Street, Phuc La Ward, Ha Dong District, Hanoi, Vietnam

³103 Military Hospital,
261 Phung Hung Street, Phuc La Ward, Ha Dong District, Hanoi, Vietnam

Received 7 July 2023; revised 1 August 2023; accepted 4 August 2023

Abstract:

This study aimed to identify the distribution and analysis of genetic diversity of *Chlamydia trachomatis* genotypes in infertile Vietnamese women. A total of 119 endocervical swabs were isolated from infertile women at the National Hospital of Obstetrics and Gynecology, Vietnam, during the period from January 2020 to December 2021, and were diagnosed with *Chlamydia trachomatis* infection. 81 sequences of the *ompA* gene with a size of approximately 1,100 bp were used to determine the *Chlamydia trachomatis* genotypes by the current reference sequences from GenBank. Sequence analysis of the *ompA* gene from the 81 positive patients showed nine genotypes, including E, D/Da, F, G/Ga, J, H, K, B/Ba, and I/Ia. In which, genotypes E, D/Da, and F accounted for 25.93, 22.22, and 13.58% respectively. Genotypes E, F, and G/Ga were highly conserved, showing 100% similarity to the alternative reference sequences, whereas *ompA* sequences of genotypes B/Ba, D/Da, H, I/Ia, J, and K displayed from one to ten nucleotide substitutions. In total, nineteen nucleotide changes were detected, seven of which led to amino-acid substitutions. The findings of the current study showed high prevalence of the genotypes E, D/Da, and F of *C. trachomatis* in infertile Vietnamese women.

Keywords: *Chlamydia trachomatis*, genotypes, infertile women, *ompA*.

Classification number: 3.1

2.2. Thu thập bệnh phẩm và xác định nhiễm *C. trachomatis*

119 mẫu dịch phết cổ tử cung của phụ nữ vô sinh được xác định nhiễm *C. trachomatis* thu thập trong thời gian từ tháng 1/2020 đến tháng 12/2021 tại Bệnh viện Phụ sản Trung ương. Các mẫu dịch phết cổ tử cung nhiễm *C. trachomatis* được xác định bằng bộ sinh phẩm Cobas 4800 CT/NG Test (Roche, Đức) dựa vào nguyên lý kỹ thuật realtime PCR trên hệ thống tự động Cobas® 4800 (Roche) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Các mẫu dịch phết cổ tử cung nhiễm *C. trachomatis* được bảo quản trong môi trường Cobas® PCR Media (Roche) ở -20°C cho tới khi tách chiết DNA và xác định kiểu gen.

2.3. Khuếch đại gen *ompA* của *C. trachomatis*

DNA tổng số của mẫu dịch phết cổ tử cung được tách chiết bằng bộ sinh phẩm QIAamp DNA Mini Kit (Cat.No: 51304, Qiagen, Đức) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. DNA sau khi tách chiết được bảo quản ở -20°C cho tới khi thực hiện phản ứng PCR.

Gen *ompA* được khuếch đại bằng kỹ thuật PCR bán lồng tham khảo theo nghiên cứu của B.T. Beni và cs (2010) [11] công bố trước đó. Phản ứng PCR vòng ngoài (PCR1) sử dụng cặp mồi: CT1 (mũi xuôi: 5'-GCC GCT TTG AGT TCT GCT TCC TC-3') và CT5 (mũi ngược: 5'-ATT TAC GTG AGC AGC TCT CTC AT-3') [11]. Chu trình nhiệt của phản ứng PCR1 như sau: 94°C trong 5 phút, 10 chu kỳ gồm các bước 95°C trong 1 phút, 60°C trong 1 phút, 72°C trong 1,5 phút, tiếp theo là 20 chu kỳ gồm các bước: 95°C trong 5 phút, 55°C trong 1 phút, 72°C trong 1,5 phút, cuối cùng là 72°C trong 10 phút. Ở phản ứng PCR vòng trong (PCR2), 2 µl hỗn hợp phản ứng PCR1 được thêm vào phản ứng PCR2 để thực hiện nhân gen *ompA* với các mồi PCTM3 (mũi xuôi: 5'-TCC TTG CAA GCT CTG CCT GTG GGG AAT CCT-3') và CT5 (mũi ngược). Với cặp mồi này, sản phẩm thu được có kích thước khoảng 1100 bp [11]. Phản ứng PCR được thực hiện với chu trình nhiệt giống với phản ứng PCR1. Kết thúc phản ứng PCR2, sản phẩm được điện di trên gel agarose 1,2% chứa thuốc nhuộm RedSafe™ (iNtRON, Hàn Quốc) trong thời gian 1,5 giờ ở 90 V và được chụp ảnh trên thiết bị phát tia UV (UVP, Canada) để ghi lại hình ảnh. Thang DNA chuẩn 100 bp (Cleaver Scientific, Anh) được điện di cùng để xác định kích thước sản phẩm PCR2 thu được.

2.4. Giải trình tự gen *ompA* của *C. trachomatis*

Sản phẩm PCR vòng 2 của 90 mẫu được gửi tới Hãng First BASE Laboratories Sdn Bhd service (Kembangan 43300, Selangor, Malaysia) để tinh sạch và giải trình tự bằng 5 mỗi, bao gồm: PCTM3 (5'-TCC TTG CAA GCT CTG CCT GTG GGG AAT CCT-3') [11], CT5 (5'-ATT TAC GTG AGC AGC TCT CTC AT-3') [11], CT3 (5'-ACT TTG TTT TCG ACC GTG TTT TG-3') [8], CT4 (5'-GAT TGA GCG TAT TGG AAA GAA GC-3') [8] và mỗi tự thiết kế CT789 (5'-TGC CTC TAT TGA TTA CCA TG-3'). Trình tự hoàn thiện của gen *ompA* được xác định bằng cách ghép, nối 5 trình tự thu được từ 5 mỗi. Sau đó, trình tự gen *ompA* được so sánh với các trình tự tham chiếu trên Ngân hàng gen NCBI sử dụng công cụ BLAST để xác định các kiểu gen và đa hình gen của *C. trachomatis*.

2.5. Xử lý số liệu

Kết quả giải trình tự gen *ompA* của *C. trachomatis* được phân tích, chỉnh sửa bằng các phần mềm tin sinh học Mega 7.0.9, Bioedit 7.2.5 và so sánh với dữ liệu trên Ngân hàng gen NCBI sử dụng công cụ BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) để xác định kiểu gen. Các trình tự gen *ompA* tham chiếu của *C. trachomatis* sử dụng để xác định tính đa hình và xây dựng cây phả hệ gồm: kiểu gen B: DQ064280; kiểu gen D: X62919; kiểu gen E: X52557; kiểu gen F: X52080; kiểu gen G: CP001888; kiểu gen H: X16007; kiểu gen Ia: DQ116397; kiểu gen J: JN795432; kiểu gen K: JN795430. Cây phả hệ được xây dựng bằng thuật toán NJ (Neighbor-joining) trên phần mềm Mega 7.0.9, với hệ số bootstrap là 1.000 lần lặp lại. Trình tự *ompA* của *Chlamydia caviae* ở Hà Lan mã số KY777669.1 được sử dụng làm tham chiếu ngoại loài.

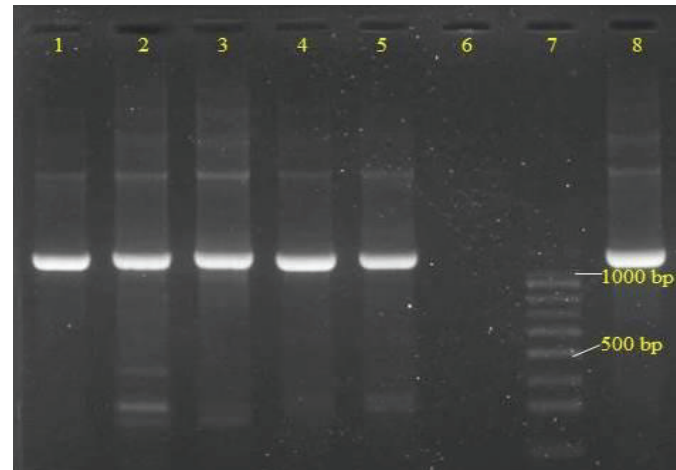
2.6. Vấn đề đạo đức trong nghiên cứu

Phụ nữ vô sinh tham gia nghiên cứu được giải thích về mục đích nghiên cứu và ký vào bản chấp thuận tham gia nghiên cứu trước khi lấy mẫu bệnh phẩm dịch phết cổ tử cung. Các quy trình và các khía cạnh đạo đức được thông qua Hội đồng Đạo đức trong nghiên cứu tại Bệnh viện Phụ sản Trung ương theo Quyết định số 221/QĐ-PSTW ngày 5/3/2020 và tại Viện Sốt rét - Ký sinh trùng - Côn trùng Trung ương theo quyết định số 182/QĐ-VSR ngày 24/2/2020. Các thông tin của đối tượng nghiên cứu được giữ bí mật và chỉ sử dụng cho mục đích nghiên cứu.

3. Kết quả

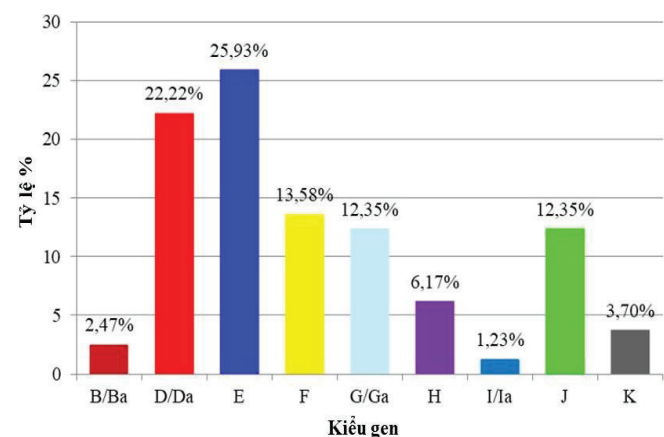
3.1. Các kiểu gen của *C. trachomatis*

90/119 mẫu có kết quả PCR2 chất lượng tốt được gửi giải trình tự (hình 1).



Hình 1. Sản phẩm PCR2 khuếch đại gen *ompA* của một số mẫu nghiên cứu. Giếng 1-5: sản phẩm khuếch đại gen *ompA* của các mẫu dịch phết cổ tử cung nhiễm *C. trachomatis* có mã số trên Ngân hàng gen tương ứng là MZ407931, Z407932, MZ407933, MZ407934 và MZ407935; giếng 6: chứng âm; giếng 7: thang DNA chuẩn 100-1000 bp; giếng 8: chứng dương.

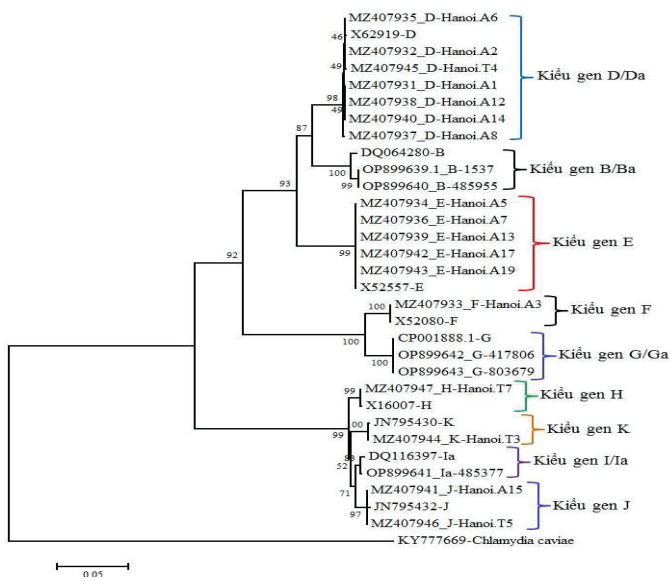
Kết quả 81 mẫu thu được trình tự tốt, rõ ràng, đủ điều kiện để phân tích kiểu gen. Kết quả phân tích cho thấy, 9 kiểu gen khác nhau đã được xác định, bao gồm B/Ba, D/Da, E, F, G/Ga, H, I/Ia, J và K. Tỷ lệ các kiểu gen như ở hình 2.



Hình 2. Phân bố các kiểu gen của *C. trachomatis*.

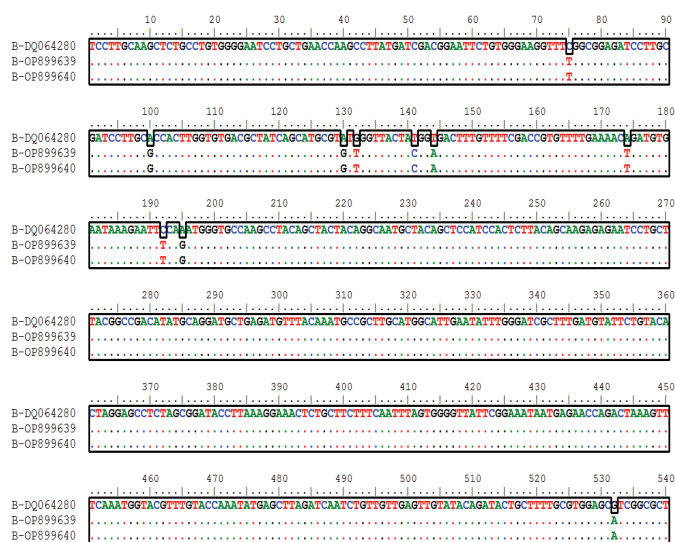
Kết quả hình 2 cho thấy, kiểu gen E chiếm tỷ lệ cao nhất (n=21, 25,93%), tiếp theo là kiểu gen D/Da (n=18, 22,22%), F (n=11, 13,58%), G/Ga (n=10, 12,35%), J (n=10, 12,35%), H (n=5, 6,17%), K (n=3, 3,70%), B/Ba (n=2, 2,47%) và thấp nhất là kiểu gen I/Ia (n=1, 1,23%). Các kiểu gen A, C và L1-L3 không thấy xuất hiện.

3.2. Đa hình gen *ompA* của *C. trachomatis*



Hình 3. Cây phát sinh loài xác định mối quan hệ về loài giữa các chủng *C. trachomatis* phân lập tại Việt Nam và trên thế giới dựa trên trình tự gen *ompA* xây dựng bằng chương trình MEGA7.0.9, sử dụng phương pháp kết nối liên kết NJ với hệ số tin cậy bootstrap là 1.000 lần lặp lại.

Kết quả so sánh chỉ ra rằng, 81 trình tự gen *ompA* của các mẫu *C. trachomatis* phân tích có tỷ lệ tương đồng nucleotide cao với trình tự của các kiểu gen tương ứng tham chiếu trên Ngân hàng gen, dao động 99,10-100%. Trong số 81 trình tự này, 22 trình tự của 9 kiểu gen của gen *ompA* đã được đăng ký và cấp mã số trên Ngân hàng gen, mã số từ MZ407931 đến MZ407947 và từ OP899639 đến OP899643. Phân tích quan hệ phát sinh loài cho thấy, các kiểu gen của các chủng *C. trachomatis* trong nghiên cứu này có quan hệ gần gũi với các kiểu gen tương ứng trên Ngân hàng gen (hình 3) và quan hệ xa với loài *Chlamydia caviae*.



Hình 4. Minh họa các vị trí nucleotide có sai khác trên gen *ompA* của kiểu gen B/Ba so với trình tự tham chiếu trên Ngân hàng gen.

Các trình tự gen *ompA* của các kiểu gen E, F và G/Ga thu được tương đồng 100% so với các trình tự tham chiếu. Các kiểu gen B/Ba, D/Da, H, I/Ia, J và K thu được có từ 1 đến 10 nucleotide sai khác (hình 4) so với các trình tự tham chiếu, với 19 vị trí thay đổi được phát hiện, trong đó 7 thay đổi nucleotide dẫn tới thay đổi axit amin (bảng 1).

Bảng 1. Thay đổi nucleotide ở 22 trình tự gen *ompA* của 9 kiểu gen của *C. trachomatis*.

Tên mẫu	Mã số trên Ngân hàng gen	Kiểu gen	Trình tự tham chiếu	Vị trí thay đổi nucleotide	Thay đổi axit amin
B-1537	OP899639	B/Ba	DQ064280	75: C → T;	Đồng nghĩa
				100: A → G;	T → A;
				130: A → G;	M → V;
				132: G → T;	Đồng nghĩa
				141: T → C;	Đồng nghĩa
				144: T → A;	Đồng nghĩa
B-485955	OP899640	B/Ba	DQ064280	174: A → T;	Đồng nghĩa
				192: C → T;	Đồng nghĩa
				195: A → G;	Đồng nghĩa
				532: G → A;	V → I
				75: C → T;	Đồng nghĩa
				100: A → G;	T → A;
D-Hanoi.A1	MZ407931	D/Da	X62919	940: G → A;	G → S;
D-Hanoi.A2	MZ407932	D/Da	X62919	1098: A → T	Đồng nghĩa
D-Hanoi.A6	MZ407935	D/Da	X62919	1098: A → T	Đồng nghĩa
D-Hanoi.A8	MZ407937	D/Da	X62919	922: A → G;	T → A;
				1098: A → T	Đồng nghĩa
D-Hanoi.A12	MZ407938	D/Da	X62919	940: G → A;	G → S;
				1098: A → T	Đồng nghĩa
D-Hanoi.A14	MZ407940	D/Da	X62919	940: G → A;	G → S;
				1098: A → T	Đồng nghĩa
D-Hanoi.T4	MZ407945	D/Da	X62919	431: A → G;	N → S;
				1098: A → T	Đồng nghĩa
E-Hanoi.A5	MZ407934	E	X52557	Không thay đổi	Không
E-Hanoi.A7	MZ407936	E	X52557	Không thay đổi	Không
E-Hanoi.A13	MZ407939	E	X52557	Không thay đổi	Không
E-Hanoi.A17	MZ407942	E	X52557	Không thay đổi	Không
E-Hanoi.A19	MZ407943	E	X52557	Không thay đổi	Không
F-Hanoi.A3	MZ407933	F	X52080	Không thay đổi	Không
G-417806	OP899642	G/Ga	CP001888	Không thay đổi	Không
G-803679	OP899643	G/Ga	CP001888	Không thay đổi	Không
H-Hanoi.T7	MZ407947	H	X16007	1110: A → T	Đồng nghĩa
Ia-485377	OP899641	I/Ia	DQ116397	223: A → G;	I → V
				756: C → T;	Đồng nghĩa
				786: G → T;	Đồng nghĩa
				1110: A → T;	Đồng nghĩa
J-Hanoi.A15	MZ407941	J	JN795432	315: C → T;	Đồng nghĩa
				1110: A → T	Đồng nghĩa
J-Hanoi.T5	MZ407946	J	JN795432	315: C → T;	Đồng nghĩa
				1110: A → T	Đồng nghĩa
K-Hanoi.T3	MZ407944	K	JN795430	1110: A → T	Đồng nghĩa

4. Bàn luận

Việc xác định các kiểu gen của *C. trachomatis* ngày càng trở nên quan trọng, vì giữa các kiểu gen có độc lực khác nhau và kiểu gen có liên quan đến các biểu hiện lâm sàng ở đường sinh dục hoặc nhiễm trùng xâm lấn [14]. Cho đến nay, chưa có nhiều nghiên cứu về sự phân bố kiểu gen của *C. trachomatis* phân lập từ đường sinh dục phụ nữ vô sinh tại Việt Nam. Trong nghiên cứu này, 9 kiểu gen khác nhau của *C. trachomatis* đã được xác định, bao gồm E, D/Da, F, G/Ga, J, H, K, B/Ba và I/Ia. Trong đó, kiểu gen E chiếm tỷ lệ cao nhất (25,93%), tiếp theo là D/Da (22,22%) và F (13,58%), trong khi các kiểu gen G/Ga, J, H, K, B/Ba và I/Ia có tỷ lệ thấp hơn, dao động từ 1,23 đến 12,35%.

Đa phần các nghiên cứu cho thấy, 3 kiểu gen E, D và F thường chiếm ưu thế ở đường sinh dục tiết niệu. Chẳng hạn như ở phụ nữ vô sinh tại Ấn Độ có 47,8% E, 32,2% D và 20% F; phụ nữ có triệu chứng viêm đường sinh dục tại Argentina có 46,9% E, 21,0% D, và 16,1% F; phụ nữ được xét nghiệm kiểm tra nhiễm khuẩn sinh dục tại Đài Loan (Trung Quốc) có 22% E, 19% D/Da và 16% F [9, 15, 16]. Ở Thổ Nhĩ Kỳ và Mexico, 3 kiểu gen này cũng được xác định chiếm ưu thế ở đường tiết niệu sinh dục [8, 17]. Tuy nhiên, tại một số nơi phân bố các kiểu gen có một số điểm khác so với nghiên cứu của chúng tôi. Cụ thể, các kiểu gen D, F và K phổ biến nhất ở bệnh nhân mắc bệnh lây truyền qua đường tình dục tại Thái Lan, trong khi kiểu gen F chiếm ưu thế ở Mexico và Brazil [6, 17, 18]. Các kiểu gen D và J phổ biến nhất ở Quảng Tây và Quảng Châu, Trung Quốc, với tỷ lệ lần lượt là 29,69 và 28,6% [7, 14]. Theo một số tài liệu, lý do phân bố các kiểu gen của *C. trachomatis* thay đổi giữa các nghiên cứu là do sự phân bố địa lý, đặc điểm của quần thể nghiên cứu và thời gian nghiên cứu [15, 18]. Để tìm hiểu rõ hơn về vấn đề này tại Việt Nam cần có thêm những nghiên cứu ở các đối tượng và khu vực địa lý khác nhau.

Trong nghiên cứu này, một điều khá đặc biệt là các kiểu gen G/Ga và J chiếm tỷ lệ khá cao (mỗi kiểu gen chiếm 12,35%) so với một số nơi trên thế giới. Dữ liệu từ các nghiên cứu đã công bố cho thấy, tỷ lệ kiểu gen G ở châu Âu cao hơn so với ở Mỹ (9 so với 2%), trong khi kiểu gen J thì ngược lại, ở Mỹ cao hơn ở châu Âu (11 so với 4,5%) [5]. Ở một số nơi, các kiểu gen này được xác định là một trong số các kiểu gen chiếm ưu thế. Chẳng hạn như ở Quảng Châu

(Trung Quốc) kiểu gen J được tìm thấy với tỷ lệ cao nhất 28,6% [14]. Trong khi ở Thâm Quyển (Trung Quốc), kiểu gen này chiếm 22,55%, đứng thứ 2 sau kiểu gen E trong số các kiểu gen được xác định [19]. Trên đối tượng phụ nữ tại Belém, Pará, miền bắc Brazil, kiểu gen J chiếm tới 25%, chỉ sau kiểu gen F (37,5%) [6]. Theo một nghiên cứu mới đây trên đối tượng là sinh viên nữ ở 4 thành phố lớn tại khu vực Amazone (Brazil), kiểu gen J được xác định chiếm ưu thế nhất với 27,2% [20].

Một nghiên cứu hiếm hoi ở Việt Nam của D.B. Pham và cs (2011) [21] sử dụng kỹ thuật PCR-RFLP để xác định các kiểu gen của *C. trachomatis* ở 85 bệnh nhân đến khám bệnh lây truyền qua đường tình dục tại Bệnh viện Da liễu Trung ương từ tháng 1/2010 đến tháng 8/2010 cho thấy, 3 kiểu gen D/Da, E, F cũng chiếm ưu thế với trên 80% tổng số các trường hợp được xác định. Tuy nhiên, trong nghiên cứu của D.B. Pham và cs (2011) [21] kiểu gen D chiếm tỷ lệ cao nhất với 29,5%, tiếp đến là E (27,1%) và đứng thứ 3 là kiểu gen F (23,5%), trong khi nghiên cứu của chúng tôi kiểu gen E chiếm tỷ lệ cao nhất (25,93%), tiếp theo là D/Da (22,22%) và F (13,58%). Nghiên cứu của D.B. Pham và cs (2011) [21] còn cho thấy có sự khác nhau về phân bố các kiểu gen giữa nhóm tuổi ≤ 25 và > 25 . Trong khi ở nghiên cứu của chúng tôi, phân bố các kiểu gen giữa các nhóm tuổi ≤ 25 và > 25 không có sự khác biệt. Điều này có thể do nghiên cứu của D.B. Pham và cs (2011) [21] được thực hiện trên cả 2 đối tượng nam giới và nữ giới nhiễm *C. trachomatis* đến khám bệnh lây truyền qua đường tình dục tại Bệnh viện Da liễu Trung ương, trong khi đối tượng trong nghiên cứu của chúng tôi là phụ nữ bị vô sinh.

Trong nghiên cứu này, 19 thay đổi nucleotide (đột biến điểm) đã được phát hiện ở các kiểu gen B/Ba, D/Da, H, I/Ia, J và K, trong số đó 7 thay đổi nucleotide dẫn tới thay thế axit amin (đột biến sai nghĩa). Kiểu gen B có số đột biến điểm nhiều nhất với 10 vị trí, trong đó có 3 đột biến sai nghĩa. Những thay đổi này có nhiều điểm khác với nghiên cứu của M. Jurstrand và cs (2001) [22] trên bệnh nhân mắc bệnh lây truyền qua đường tình dục tại Thụy Điển. Theo tác giả này, trong 9 kiểu gen B/Ba, D, E, F, G, H, I/Ia, J và K được xác định, kiểu gen B/Ba và I/Ia không có đột biến trên gen *ompA*. Các kiểu gen D, E, F, G, H, J và K có từ 1 đến 4 điểm đột biến với tổng 15 vị trí đột biến khác nhau,

trong đó 8 đột biến sai nghĩa tại các vị trí 331, 440, 487, 700, 997, 1003 và 1092 [22]. Cũng trên đối tượng mắc bệnh lây truyền qua đường tình dục, nghiên cứu của B. Yang và cs (2010) [23] tại Quảng Châu, Trung Quốc khá tương đồng với nghiên cứu của M. Jurstrand và cs (2001) [22]. Theo đó, 6 trong số 9 kiểu gen được xác định có các đột biến trên gen *ompA* gồm D, E, F, G, H và K với tổng 16 vị trí đột biến khác nhau. Ở mỗi kiểu gen này đều có những đột biến sai nghĩa. Các kiểu gen B, I và J không ghi nhận đột biến [23]. Một nghiên cứu gần đây của Y. Tang và cs (2022) [14] cũng thực hiện tại Quảng Châu, Trung Quốc ở phụ nữ trong độ tuổi sinh đẻ đi khám phụ khoa cho thấy, toàn bộ 8 kiểu gen được xác định đều có thay đổi nucleotide trên gen *ompA* với tổng 25 vị trí thay đổi khác nhau. Số thay đổi nucleotide của mỗi kiểu gen dao động 1-11, trong đó kiểu gen H có nhiều vị trí thay đổi nhất (11 vị trí) và đa phần dẫn đến thay đổi axit amin (10/11) [14]. Trên đối tượng vô sinh, chúng tôi thấy rất ít nghiên cứu về kiểu gen và phân tích tính đa hình gen *ompA* của *C. trachomatis*.

Do giới hạn về thời gian và kinh phí, nghiên cứu này mới chỉ xác định các kiểu gen bằng chỉ thị gen *ompA* mà chưa có điều kiện giải trình tự nhiều gen đích khác nhau (giải trình tự đa locus) để xác định các biến thể (dưới tuýp) của các kiểu gen của *C. trachomatis*. Nghiên cứu cũng chưa phân tích được mối liên quan giữa các kiểu gen của *C. trachomatis* với tiền sử, đặc điểm lâm sàng ở đối tượng nghiên cứu. Mặc dù vậy, các kết quả nghiên cứu đã góp phần bổ sung dữ liệu kiểu gen và đặc điểm đa hình gen *ompA* của *C. trachomatis* phân lập ở phụ nữ bị vô sinh tại Việt Nam. Đây còn là thông tin tham khảo có giá trị để các nghiên cứu tiếp theo có thêm căn cứ giải thích mối liên quan giữa nhiễm *C. trachomatis* và vấn đề vô sinh ở nữ giới.

5. Kết luận

Trong nghiên cứu này, 9 kiểu gen khác nhau của *C. trachomatis* đã được xác định bao gồm: E (25,93%), D/Da (22,22%), F (13,58%), G/Ga (12,35%), J (12,35%), H (6,17%), K (3,70%), B/Ba (2,47%) và I/Ia (1,23%). Trình tự gen *ompA* của các kiểu gen E, F và G/Ga có tỷ lệ tương đồng 100% với trình tự tham chiếu, trong khi các kiểu gen B/Ba, D/Da, H, I/Ia, J và K có từ 1 đến 10 vị trí thay đổi nucleotide với tổng số có 19 vị trí thay đổi khác nhau, 7 trong số này dẫn tới thay đổi axit amin.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] K.J.H. Janssen, J.A.M.C. Dirks, N.H.T.M.D. Muijers, et al. (2018), "Review of *Chlamydia trachomatis* viability methods: Assessing the clinical diagnostic impact of NAAT positive results", *Expert Review of Molecular Diagnostics*, **18**(8), pp.739-747, DOI: 10.1080/14737159.2018.
- [2] T. Darville, G.I.J.G. Rours (2018), "*Chlamydia trachomatis*", *Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases (Fifth Edition)*, Elsevier, pp.908-914.
- [3] S. Menon, P. Timms, J.A. Allan, et al. (2015), "Human and pathogen factors associated with *Chlamydia trachomatis*-related infertility in women", *Clinical Microbiology Reviews*, **28**(4), pp.969-985, DOI: 10.1128/CMR.00035-15.
- [4] C.M. Muvunyi, N. Dhont, R. Verhelst, et al. (2011), "*Chlamydia trachomatis* infection in fertile and subfertile women in Rwanda: Prevalence and diagnostic significance of IgG and IgA antibodies testing", *Human Reproduction*, **26**(12), pp.3319-3326, DOI: 10.1093/humrep/der350.
- [5] S. Niemi, E.H. Back, M. Puolakkainen (2011), "*Chlamydia trachomatis* genotypes and the Swedish new variant among urogenital *Chlamydia trachomatis* strains in Finland", *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*, **2011**, DOI: 10.1155/2011/481890.
- [6] M.B. Danielle, N.B. Bárbara, A.S.F. Wallax (2016), "Genotyping and prevalence of *Chlamydia trachomatis* infection among women in Belém, Pará, northern Brazil", *The Journal of Infection in Developing Countries*, **10**(2), pp.134-137, DOI: 10.3855/jidc.6474.
- [7] Y. Chen, J. Chen, L. Yang, et al. (2017), "Distribution of *Chlamydia trachomatis* genotypes in infective diseases of the female lower genital tract", *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, **23**, pp.4477-4481, DOI: 10.12659/MSM.902756.
- [8] M.O. Köksal, H. Beka, M. Demirci, et al. (2016), "Prevalence and genotyping of *Chlamydia trachomatis* in symptomatic male patients from Istanbul, Turkey", *SpringerPlus*, **5**(1), DOI: 10.1186/s40064-016-3370-3.
- [9] L.G. Vaulet, C. Entrocassi, A.I. Corominas, et al. (2010), "Distribution study of *Chlamydia trachomatis* genotypes in symptomatic patients in Buenos Aires, Argentina: Association between genotype E and neonatal conjunctivitis", *BMC Research Notes*, **3**, DOI: 10.1186/1756-0500-3-34.
- [10] M.J.V.D. Laar, Y.T.V. Duynhoven, J.S. Fennema, et al. (1996), "Differences in clinical manifestations of genital chlamydial infections related to serovars", *Genitourinary Medicine*, **72**(4), pp.261-265, DOI: 10.1136/sti.72.4.261.

- [11] B.T. Beni, H. Motamedi, M.R. Ardakani (2010), "Genotyping of the prevalent *Chlamydia trachomatis* strains involved in cervical infections in women in Ahvaz, Iran", *Journal of Medical Microbiology*, **59(9)**, pp.1023-1028, DOI: 10.1099/jmm.0.016717-0.
- [12] M.T. Le, T.L.N. Nguyen, D.D. Le, et al. (2019), "Is genital tract infection related to tubal diseases in infertile Vietnamese women?", *The Journal of Infection in Developing Countries*, **13(10)**, pp.906-913, DOI: 10.3855/jidc.11632.
- [13] T.V. Nguyen, K.N. Van, T.T.T. Le, et al. (2008), "Sexually transmitted infections and risk factors for *Gonorrhea* and *Chlamydia* in female sex workers in Soc Trang, Vietnam", *Sexually Transmitted Diseases*, **35(11)**, pp.935-940, DOI: 10.1097/OLQ.0b013e3181812d03.
- [14] Y. Tang, X. Yang, L. Duan, et al. (2022), "Genetic and clinical characteristics of genital *Chlamydia trachomatis* infection in Guangzhou, China", *Infection, Genetics and Evolution*, **101**, DOI: 10.1016/j.meegid.2022.105285.
- [15] J. Rawre, B. Dhawan, N. Malhotra, et al. (2016), "Prevalence and distribution of *Chlamydia trachomatis* genovars in Indian infertile patients: A pilot study", *APMIS*, **124(12)**, pp.1109-1115, DOI: 10.1111/apm.12622.
- [16] M.C. Hsu, P.Y. Tsai, K.T. Chen, et al. (2006), "Genotyping of *Chlamydia trachomatis* from clinical specimens in Taiwan", *Journal of Medical Microbiology*, **55(3)**, pp.301-308, DOI: 10.1099/jmm.0.46262-0.
- [17] M.D.J.D.H. Cruz, I.D. Rodriguez, M.R.E. Guerra, et al. (2011), "Genotyping of *Chlamydia trachomatis* from endocervical specimens of infertile Mexican women", *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.*, **29(2)**, pp.102-108, DOI: 10.1016/j.eimc.2010.08.014.
- [18] K. Wongworapat, P. Veeraseatakul, K. Jitvacharanun, et al. (2002), "Genotype distribution of genital *Chlamydia trachomatis* in Chiang Mai, Thailand", *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, **33(3)**, pp.133-138.
- [19] L.L. Liu, S. Sun, L. Zhang, et al. (2022), "Distribution of *Chlamydia trachomatis ompA* genotypes and its association with abnormal cervical cytology among women of reproductive age in Shenzhen, China", *Frontiers in Public Health*, **10**, DOI: 10.3389/fpubh.2022.1036264.
- [20] L.M.d. Santos, R.C. Vieira, L.B.D.L. Silva, et al. (2022), "High prevalence and circulant genotypes of *Chlamydia trachomatis* in vulnerable university women from four cities in the Brazilian Amazon", *Research Square*, Preprint version, DOI: 10.21203/rs.3.rs-2241892/v1.
- [21] D.B. Pham, V.E. Dang (2011), "Clinical characteristics of *Chlamydia trachomatis* types", *Journal of 108 - Clinical Medicine and Pharmacy*, **6(4)**, pp.64-70 (in Vietnamese).
- [22] M. Jurstrand, L. Falk, H. Fredlund, et al. (2001), "Characterization of *Chlamydia trachomatis omp1* genotypes among sexually transmitted disease patients in Sweden", *Journal of Clinical Microbiology*, **39(11)**, pp.3915-3919, DOI: 10.1128/JCM.39.11.3915-3919.2001.
- [23] B. Yang, H.P. Zheng, Z.Q. Feng, et al. (2010), "The prevalence and distribution of *Chlamydia trachomatis* genotypes among sexually transmitted disease clinic patients in Guangzhou, China, 2005-2008", *Jpn. J. Infect. Dis.*, **63(5)**, pp.342-345.

Biểu hiện và tính chế đoạn rút gọn peptide ngoại bào của enzyme chuyển đổi angiotensin 2 (trhACE2) có khả năng gắn với protein gai của SARS-CoV-2

Nguyễn Thị Lệ Thủy^{1*}, Nguyễn Minh Tuấn^{1,2}, Phạm Thị Kim Trâm¹, Nguyễn Đăng Quân¹

¹Trung tâm Công nghệ Sinh học TP Hồ Chí Minh, 2374 quốc lộ 1A, khu phố 2, phường Trung Mỹ Tây, quận 12, TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

²Trường Đại học Bách khoa, Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh, 268 Lý Thường Kiệt, phường 14, quận 10, TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

Ngày nhận bài 5/5/2023; ngày chuyển phản biện 8/5/2023; ngày nhận phản biện 30/5/2023; ngày chấp nhận đăng 2/6/2023

Tóm tắt:

SARS-CoV-2 xâm nhiễm vào tế bào thông qua tương tác giữa protein gai (spike protein) của virus với thụ thể ACE2 (Angiotensin converting enzyme 2) trên bề mặt tế bào. Do đó, ACE2 được xem là mấu chốt trong các nghiên cứu thuốc cho phòng và điều trị COVID-19. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tạo, thu nhận và đánh giá hoạt tính dạng rút gọn trình tự vùng peptidase của ACE2 (truncated recombinant human ACE2 - trhACE2) biểu hiện từ tế bào vi khuẩn *Escherichia coli* lên khả năng gắn protein gai của SARS-CoV-2. Vùng trình tự của ACE2 (18-119 axit amin (aa) được tạo dòng vào plasmid pET28a(+) và biến nạp vào tế bào *E. coli* DH5a để nhân dòng plasmid và tiếp tục được chuyển sang tế bào *E. coli* BL21 (DE3) để biểu hiện protein mục tiêu. trhACE2 được tinh sạch bằng sắc ký ái lực sử dụng cột HisTrap HP với độ tinh sạch đạt trên 95%. Năng suất thu nhận trhACE2 đạt 75 mg/l. Protein sau tinh sạch được loại urea tái gấp cuộn bằng quá trình thẩm tích. trhACE2 được đánh giá khả năng gắn với protein gai của virus bằng phương pháp sandwich ELISA và phân tích tương tác cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR). Các kết quả cho thấy, trhACE2 có khả năng gắn protein gai của SARS-CoV-2 với ái lực tương tác $K_d=15,7$ nM. Với quy trình biểu hiện và thu nhận khá đơn giản, ít tốn kém trên hệ thống tế bào *E. coli* cho thấy tiềm năng phát triển trhACE2 cho các liệu pháp phòng ngừa và hỗ trợ điều trị COVID-19.

Từ khóa: *E. coli*, protein gai, SARS-CoV-2, trhACE2.

Chỉ số phân loại: 3.1

1. Đặt vấn đề

Hội chứng suy hô hấp cấp (Severe acute respiratory syndrome - SARS) hay còn gọi là bệnh COVID-19 gây ra do chủng mới của virus corona là SARS-CoV-2 xuất hiện lần đầu tiên tại Vũ Hán (Trung Quốc) vào cuối năm 2019. Bệnh nhanh chóng lây lan ra các quốc gia và vùng lãnh thổ trên toàn thế giới. Theo thống kê của Tổ chức Y tế thế giới (WHO) tính tới ngày 26/4/2023, thế giới có hơn 764 triệu người nhiễm, trong đó có gần 7 triệu ca tử vong do virus này [1]. Tại Việt Nam, tính từ đầu đợt bùng phát dịch đến ngày 30/4/2023, số ca nhiễm COVID-19 là hơn 11,5 triệu người [2]. Vắc-xin phòng bệnh đã được các quốc gia nhanh chóng phát triển và đưa vào tiêm chủng, góp phần phòng chống dịch hiệu quả. Tuy nhiên, sự xuất hiện các biến chủng mới của virus có khả năng siêu lây nhiễm và giảm hiệu quả bảo vệ của vắc-xin vẫn là những thách thức trong quá trình ứng phó với dịch COVID-19 trên toàn cầu. Trước tình hình diễn biến phức tạp của dịch COVID-19 trên thế giới và ở Việt Nam, nhiều chuyên gia trong và ngoài nước đã dự đoán dịch bệnh sẽ còn tiếp tục kéo dài. Vì vậy, mở rộng nghiên cứu các biện pháp để ngăn chặn sự lây lan và xâm nhiễm của SARS-CoV-2 bên cạnh vắc-xin và các liệu pháp trị liệu đã có là rất cần thiết trong tình hình hiện nay.

ACE2 là một protein trên màng của nhiều loại tế bào khác nhau như tế bào biểu mô phế nang phổi, tim, thận, ruột, túi mật, tinh hoàn... [3, 4]. SARS-CoV-2 xâm nhiễm vào tế bào thông qua tương tác giữa protein gai (spike protein hay còn gọi là protein S) của virus với thụ thể ACE2 trên bề mặt tế bào [5, 6]. ACE2 không chỉ trung hoà SARS-CoV-2 thông qua khả năng gắn với protein S mà còn giúp giảm thiểu các tổn thương cho nhiều cơ quan bao gồm phổi, thận và tim, do sự tăng hoạt động hệ thống renin-angiotensin [7-10]. Việc bổ sung ACE2 tự do sẽ cạnh tranh liên kết của protein S với ACE2 trên màng tế bào, từ đó làm giảm khả năng xâm nhập vào tế bào của SARS-CoV-2 [11]. Như vậy việc tăng hàm lượng ACE2 tự do ngoại bào có thể là một phương thức giảm thiểu sự xâm nhiễm của SARS-CoV-2 vào tế bào.

Protein ACE2 dạng tự nhiên có kích thước đầy đủ là 805 aa, bao gồm vùng peptide tín hiệu (1-17 aa), vùng ngoại bào (18-740 aa), vùng xuyên màng (741-761 aa) và vùng nội bào (762-805 aa), trong đó vùng ngoại bào là vùng cấu trúc chính thực hiện hoạt động của enzyme. Vùng ngoại bào bao gồm vùng peptidase đầu N (peptidase domain - PD, 18-605 aa) và vùng giống collectrin ở đầu C (collectrin-like domain CLD, 606-740 aa). Nghiên cứu trước đây cho thấy, SARS-CoV hay SARS-CoV-2 liên kết với vùng peptidase

*Tác giả liên hệ: Email: lenacns2005@gmail.com

Expression and purification of truncated recombinant human angiotensin-converting enzyme 2 (trhACE2) capable of binding spike protein of SARS-CoV-2

Thi Le Thuy Nguyen^{1*}, Minh Tuan Nguyen^{1,2},
Thi Kim Tram Pham¹, Dang Quan Nguyen¹

¹Ho Chi Minh City Biotechnology Center,

2374 National Highway 1A, Quarter 2, Trung My Tay Ward, District 12, Ho Chi Minh City, Vietnam

²Ho Chi Minh City University of Technology, Vietnam National University - Ho Chi Minh City,

268 Ly Thuong Kiet Street, Ward 14, District 10, Ho Chi Minh City, Vietnam

Received 5 May 2023; revised 30 May 2023; accepted 2 June 2023

Abstract:

SARS-CoV-2 infects the host through the interaction between spike protein and the ACE2 (Angiotensin-converting enzyme 2) receptor on the host cell surface. Therefore, ACE2 is considered as a key target in drug development against COVID-19. In this study, we generated the truncated recombinant human ACE2 (trhACE2) expressed on *Escherichia coli* and evaluated its binding activity to spike protein of SARS-CoV-2. The sequence of ACE2 (18-119 aa) was cloned into pET28a(+) plasmid and transformed into *E. coli* DH5 α strain and finally was transferred to *E. coli* BL21 (DE3) cells for protein expression. Protein trhACE2 was purified by affinity chromatography using a HisTrap HP column. Protein purity was above 95% and production yield was 75 mg/l. The purified protein was refolded by dialysis method. trhACE2 was evaluated for its ability to bind the spike protein by sandwich ELISA assay and surface plasmon resonance (SPR). The results showed that trhACE2 has the ability to bind spike protein of SARS-CoV-2 with the equilibrium dissociation constant $K_d=15.7$ nM. With a relatively simple and inexpensive expression and purification process on *E. coli* system, there is the potential to develop trhACE2 for preventive and supportive therapies against COVID-19.

Keywords: *E. coli*, SARS-CoV-2, spike protein, trhACE2.

Classification number: 3.1

của ACE2 thông qua vùng liên kết thụ thể (receptor binding domain - RBD) trên protein S và tham gia vào quá trình xâm nhiễm của virus [12]. Nghiên cứu của A. Basit và cs (2021) [13] khi thực hiện đánh giá tương tác *in silico* bằng phương pháp docking và dự đoán sử dụng phần mềm máy tính cho thấy, trình tự rút gọn của vùng peptidase của ACE2 (21-119 aa) có ái lực tương tác với RBD mạnh hơn so với trình tự ACE2 dạng tự nhiên. Ngoài ra, trình tự ngắn gọn có thể giúp protein biểu hiện ở dạng tan, thuận lợi cho quá trình thu nhận. Do vậy, trong nghiên cứu này chúng tôi tạo, thu nhận và đánh giá hoạt tính dạng rút gọn trình tự vùng trhACE2 lên khả năng gắn với protein gai của SARS-CoV-2 từ tế bào vi khuẩn *E. coli*.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Chủng vi khuẩn *E. coli* dùng cho tạo dòng và biểu hiện trhACE2

Chủng vi khuẩn *E. coli* DH5 α mang plasmid pDONR221 mang gen mã hóa vùng ngoại bào của ACE2 (GenBank: BC048094) dùng cho khuếch đại trình tự gen mục tiêu được mua từ Ngân hàng plasmid DNASU (Viện Thiết kế Sinh học ASU, Hoa Kỳ, code: HsCD00829706).

Chủng *E. coli* DH5 α và *E. coli* BL21 (DE3) dùng cho tạo dòng và biểu hiện trhACE2 được tiếp nhận từ Phòng Công nghệ Sinh học y dược, Trung tâm Công nghệ Sinh học TP Hồ Chí Minh.

2.2. Tạo dòng *E. coli* mang vùng trình tự gen mã hoá trhACE2

Trình tự gen mã hoá cho trhACE2 được khuếch đại từ trình tự của ACE2 đầy đủ trên plasmid pDONR221 (DNASU) bằng phản ứng PCR với cặp mồi thiết kế (bảng 1), sử dụng enzyme Phusion high fidelity DNA polymerase (Thermo). Trình tự khuếch đại được gắn thêm trình tự của các enzyme cắt *NcoI* và *XhoI* để chèn vào plasmid pET-28a(+) (GenScript) sử dụng enzyme T4 DNA ligase (Thermo). Plasmid tái tổ hợp pET-28a(+)-trhACE2 sau đó được chuyển vào tế bào *E. coli* DH5 α và *E. coli* BL21 (DE3) để nhân dòng và biểu hiện bằng phương pháp hóa biến nạp. Tế bào *E. coli* mang plasmid pET28a(+)-trhACE2 được chọn lọc trên môi trường thạch LB (Luria-Bertani) bổ sung kháng sinh kanamycin 50 μ g/ml (Km50) và kiểm tra sự hiện diện của đoạn trình tự trhACE2 trên plasmid bằng PCR khuẩn lạc và giải trình tự DNA trên hệ thống máy giải trình tự 3500 Genetic Analyzer (Thermo). Dòng *E. coli* mang trình tự mục tiêu chính xác với trình tự gốc được chọn lọc và sử dụng cho đánh giá khả năng biểu hiện của protein mục tiêu.

Bảng 1. Trình tự mỗi sử dụng trong nghiên cứu.

Môi	Trình tự (5' - 3')
trhACE2-F	GCTCCATGGCTCAGTCTACCATCGAAGAA
trhACE2-R	TCAGCTCGAGGATGGTGTTCAGACGTTTGA

Gạch dưới: vị trí enzyme cắt giới hạn.

2.3. Biểu hiện và tinh sạch trhACE2 từ *E. coli* bằng sắc ký ái lực

Tế bào *E. coli* BL21 (DE3) mang plasmid tái tổ hợp pET28a(+)-trhACE2 được nuôi trong môi trường LB lỏng có bổ sung Km50 qua đêm và được tăng sinh thứ cấp trong môi trường LB + Km50 đến OD₆₀₀ đạt giá trị trong khoảng 0,6-0,8. Tế bào vi khuẩn được thu nhận sau ly tâm và chuyển sang môi trường LB lỏng bổ sung kháng sinh Km50 và Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) để cảm ứng biểu hiện protein mục tiêu. Điều kiện cảm ứng được khảo sát bao gồm các nồng độ IPTG 0, 0,1, 0,5, 1,0 mM ở các nhiệt độ 16°C (trong 16 giờ) và 37°C (trong 5 giờ). Sau thời gian cảm ứng, dịch tế bào được ly tâm ở 4.000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C. Phần cặn tế bào được hòa tan lại trong đệm ly giải (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 100 mM NaCl, 5 mM DTT, 1 mM PMSF); phá màng tế bào bằng sóng siêu âm với 50% biên độ, tổng thời gian là 3 phút. Dịch ly giải tế bào được ly tâm ở 13.000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C, thu nhận riêng dịch nổi và cặn tế bào để kiểm tra sự biểu hiện của protein mục tiêu bằng điện di SDS-PAGE.

Để thu nhận trhACE2, tiến hành cảm ứng biểu hiện protein ở quy mô 500 ml môi trường LB có bổ sung kháng sinh Km50 và chất cảm ứng IPTG nồng độ 0,1 mM ở 37°C, trong 5 giờ. Cặn tế bào *E. coli* được thu nhận, phá tế bào bằng sóng siêu âm, thu và rửa cặn trong đệm PBST (PBS có bổ sung Triton X-100 0,1%). Cặn tế bào sau đó được hoà trong NTA bind buffer (Ni-NTA buffer kit, Merck) có bổ sung urea 8M, lọc qua màng lọc 0,45 µm trước khi thực hiện quá trình tinh sạch bằng sắc ký ái lực trên hệ thống máy tinh sạch AKTA pure (GE Healthcare) với cột HisTrap HP 5ml (GE Healthcare) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Protein sau tinh sạch được loại urea tái gấp cuộn bằng quá trình thẩm tích (dialysis) qua đêm lần lượt trong các đệm PBS bổ sung urea với nồng độ giảm dần. Protein trhACE2 thu nhận sau tinh sạch được đánh giá bằng SDS-PAGE, phân tích độ tinh sạch của protein trên gel SDS-PAGE bằng phần mềm ImageJ. Sự hiện diện của protein mục tiêu được xác định bằng phương pháp Western blot với kháng thể sơ cấp kháng His (6*His, His-tag antibody, Hãng Proteintech) và kháng thể kháng ACE2 của người (ACE2 antibody, Hãng Proteintech); kháng thể thứ cấp là anti-mouse/rabbit IgG

(H+L) (Proteintech) tương ứng. Protein được định lượng bằng phương pháp Bradford sử dụng bộ kit Pierce™ Coomassie Protein Assay Kit (Thermo).

2.4. Phương pháp sandwich ELISA đánh giá khả năng gắn của trhACE2 với protein S

Sandwich ELISA được thực hiện lặp lại 3 lần trên đĩa ELISA 96 giếng. Đĩa ELISA được phủ với 100 µl protein S của SARS-CoV-2 (SARS-CoV-2 Spike S1+S2 protein, chủng delta B.1.617.2, Hãng Sino Biological) nồng độ 2 µg/ml pha trong PBS, được thêm vào từng giếng và ủ qua đêm ở 4°C, giếng đối chứng được ủ với 100 µl PBS. Các giếng sau khi ủ được rửa 3 lần bằng PBS-T (PBS có bổ sung 0,05% Tween-20) và được khoá (block) bằng 150 µl PBS bổ sung 5% huyết thanh bò (Bovine serum albumin - BSA) trong 4 giờ ở nhiệt độ phòng. Các giếng sau đó được rửa 2 lần với PBS-T. trhACE2 được pha loãng trong PBS ở các nồng độ khác nhau được cho vào mỗi giếng (100 µl/giếng) và ủ ở 4°C qua đêm. Các giếng được rửa lại 4 lần với PBS-T trước khi bổ sung 100 µl kháng thể sơ cấp kháng ACE2 của người (ACE2 antibody, Hãng Proteintech) được pha loãng trong PBS-T (tỷ lệ 1:1000) và ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng. Sau 4 lần rửa với PBS-T, phức hợp protein S-trhACE2-kháng thể sơ cấp được phát hiện bằng thêm vào mỗi giếng 100 µl kháng thể thứ cấp anti-rabbit IgG (H+L) được pha loãng trong PBS-T (tỷ lệ 1:5000) và ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng. Các giếng được rửa bốn lần bằng PBS-T, sau đó bổ sung 50 µl tetramethyl benzidine (TMB; ThermoFisher) và ủ tối trong 20 phút ở nhiệt độ phòng. Các phản ứng được kết thúc bằng cách thêm 50 µl HCl 3M và đo độ hấp thụ ở bước sóng 450 nm.

2.5. Đánh giá ái lực tương tác của trhACE2 với protein S bằng phân tích tương tác cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR)

Thí nghiệm SPR được thực hiện trên hệ thống Biacore X100 (Cytiva). Chip CM5 (Cytiva) được rửa bằng cách tiêm 3 lần (30 giây/lần) với buffer chứa NaCl 1M và NaOH 50 mM ở tốc độ 10 µl/phút trước khi cố định với protein S của SARS-CoV-2 (SARS-CoV-2 Spike S1+S2 protein, chủng delta B.1.617.2, Hãng Sino Biological). Tương tác của trhACE2 với protein S được phân tích ở 25°C bằng cách tiêm nhiều chu kỳ của trhACE2 ở các nồng độ khác nhau ở tốc độ 30 µl/phút với các thông số: thời gian gắn tiếp xúc 180 giây, tiếp theo là thời gian phân ly 480 giây, bề mặt được tái tạo sau mỗi lần tiêm bằng buffer chứa NaCl 2 M và NaOH 0,1 M với tốc độ 30 µl/phút trong thời gian 30 giây, sau đó là thời gian ổn định 120 giây. Dữ liệu đo được tính toán theo mô hình động học 1:1 bằng phần mềm đánh giá của hệ thống Biacore X100.

3. Kết quả và bàn luận

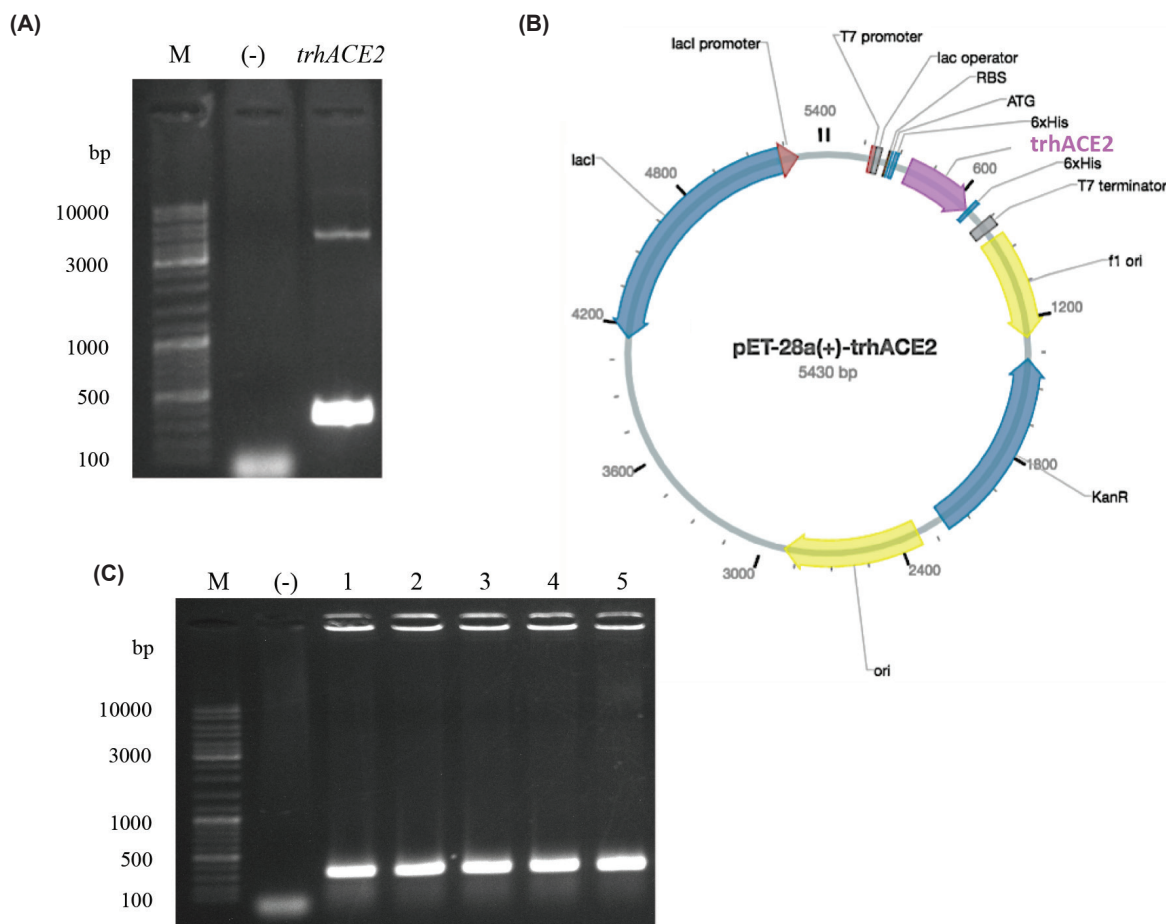
3.1. Tạo dòng *E. coli* mang vùng trình tự gen mã hoá *trhACE2*

Trình tự rút gọn của vùng ngoại bào của ACE2 người (18-119 aa) được khuếch đại từ trình tự của ACE2 đầy đủ trên plasmid pDONR221 (DNASU) bằng phản ứng PCR với cặp mồi thiết kế (bảng 1). Trình tự khuếch đại được gắn thêm trình tự của các enzyme cắt để chèn vào plasmid pET-28a(+) cho bước tạo dòng tiếp theo. Kết quả điện di sản phẩm PCR có kích thước khoảng 320 bp (hình 1A). Trình tự *trhACE2* sau khuếch đại được tinh sạch qua cột bằng bộ kit tinh sạch sản phẩm PCR (GeneJET PCR purification kit, Thermo) và cắt xử lý với enzyme *NcoI*, *XhoI* rồi chèn vào plasmid pET28a(+) đã được xử lý cắt với cùng 2 enzyme này sử dụng enzyme T4 DNA ligase. Plasmid tái tổ hợp sau khi ghép nối được đặt tên là pET28a(+)-*trhACE2* (hình 1B). Plasmid được chuyển vào tế bào *E. coli* DH5 α và BL21 (DE3) để nhân dòng và biểu hiện. Tế bào *E. coli* mang plasmid tái tổ hợp phát triển trên môi trường thạch LB có bổ

sung kháng sinh Km50 được kiểm tra sự hiện diện của đoạn trình tự *trhACE2* bằng PCR khuẩn lạc (hình 1C). Kết quả giải trình tự plasmid thu nhận từ tế bào vi khuẩn kháng định plasmid tái tổ hợp mang trình tự đúng trình tự của *trhACE2*. Như vậy, chúng tôi đã tạo được dòng tế bào *E. coli* BL21 (DE3) mang plasmid tái tổ hợp pET28a(+)-*trhACE2* để biểu hiện *trhACE2*.

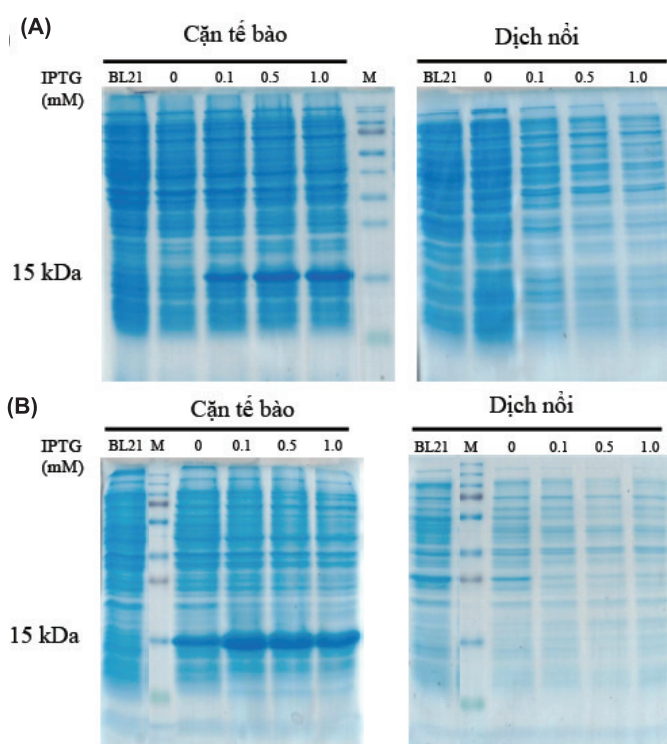
3.2. Biểu hiện và tinh sạch *trhACE2*

Plasmid pET28a(+) được sử dụng phổ biến để biểu hiện nhiều loại protein tái tổ hợp trên tế bào vi khuẩn *E. coli*. Gen mã hoá cho protein mục tiêu được kiểm soát mức độ biểu hiện bởi promoter T7 mạnh hiện diện trên plasmid, cho phép sự biểu hiện của protein mục tiêu nhiều chỉ trong thời gian ngắn. Bên cạnh đó, plasmid này còn mang thêm đuôi Histidine (His tag) ở đầu N và đầu C của protein mục tiêu, hỗ trợ cho quá trình tinh sạch thu nhận protein mục tiêu bằng sắc ký ái lực với nickel. Do vậy, trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng plasmid pET28a(+) để biểu hiện *trhACE2* trong tế bào *E. coli*. Sự biểu hiện của *trhACE2* được kiểm



Hình 1. Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm PCR khuếch đại đoạn trình tự *trhACE2* từ plasmid pDONR221 (A); cấu trúc plasmid tái tổ hợp pET28a(+)-*trhACE2* (B); kết quả điện di sản phẩm PCR khuẩn lạc kiểm tra sự hiện diện của đoạn *trhACE2* trên 5 khuẩn lạc *E. coli* BL21 (DE3) ngẫu nhiên mọc trên đĩa thạch LB bổ sung kháng sinh Km50 (C). M: thang DNA, (-): chứng âm.

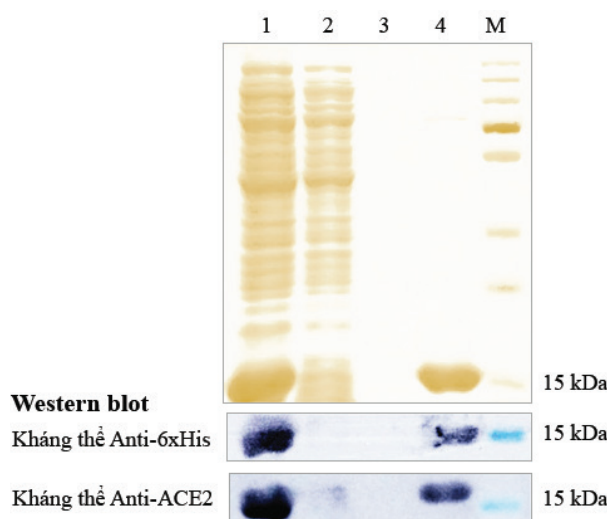
soát bởi promoter T7 hiện diện trên plasmid khi được cảm ứng bởi chất cảm ứng IPTG. Mức độ biểu hiện của trhACE2 được khảo sát ở các nồng độ IPTG khác nhau (0, 0,1, 0,5 và 1,0 mM) ở 2 điều kiện nhiệt độ cảm ứng là 16 và 37°C. Mặc dù điều kiện nhiệt độ thấp được cho là giúp cải thiện tính tan của protein mục tiêu, kết quả điện di SDS-PAGE cho thấy, trhACE2 (kích thước ~15 kDa) biểu hiện chủ yếu ở trong thể vùi (cặn tế bào) so với ở dạng tan (dịch nổi) ở cả 2 điều kiện nhiệt độ cảm ứng. Ở 37°C, mức độ biểu hiện của protein mục tiêu cao hơn so với mức độ biểu hiện ở 16°C. Không có sự khác biệt mức độ biểu hiện của trhACE2 với các nồng độ IPTG khảo sát ở điều kiện cảm ứng 37°C (hình 2). Do đó, điều kiện cảm ứng ở 37°C với nồng độ IPTG là 0,1 mM được áp dụng để biểu hiện và thu nhận trhACE2 ở quy mô lớn.



Hình 2. SDS-PAGE đánh giá sự biểu hiện của trhACE2 từ tế bào *E. coli* BL21 (DE3) được cảm ứng với IPTG ở 16°C trong 16 giờ (A) và 37°C trong 5 giờ (B). M: thang protein; BL21: *E. coli* BL21 (DE3) không mang plasmid tái tổ hợp.

Protein trhACE2 tiếp tục được cảm ứng biểu hiện ở quy mô lớn và được thu nhận để tinh sạch bằng sắc ký ái lực trên cột HisTrap HP. Cột HisTrap HP mang hạt nickel sepharose có khả năng bắt giữ mạnh nhóm histidine (His), ứng dụng cho tinh sạch protein mục tiêu mang nhóm His. Kết quả điện di SDS-PAGE nhuộm bạc và Western blot kiểm tra sự hiện diện của protein trhACE2 ở các phân đoạn thu nhận trong quá trình tinh sạch được trình bày trong hình 3. Kết

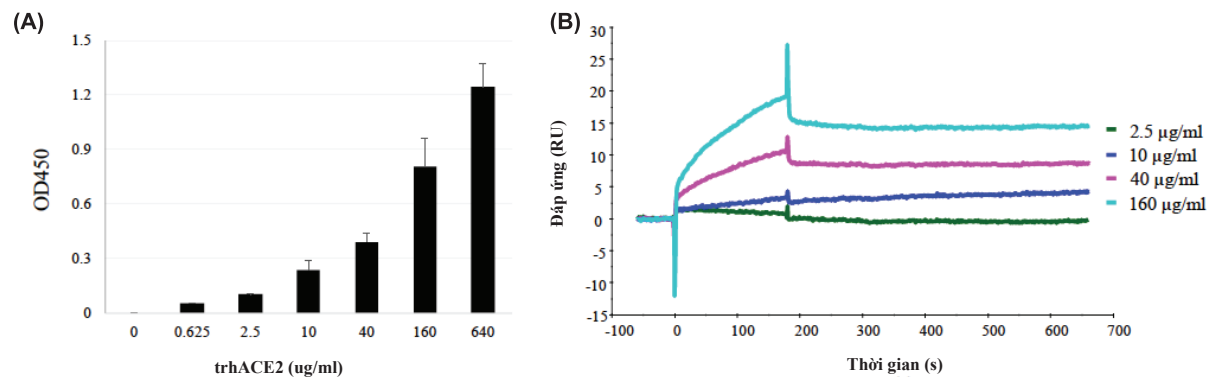
quả cho thấy, phần lớn protein mục tiêu được thu nhận trong phân đoạn thôi giải, với độ tinh sạch đạt >95% (phân tích bằng phần mềm ImageJ). Western blot với kháng thể kháng His và kháng thể đặc hiệu kháng ACE của người cho thấy tín hiệu lai đặc hiệu với protein trhACE2. Protein sau tinh sạch được loại urea tái gấp cuộn bằng quá trình thẩm tích. Hiệu suất thu nhận trhACE2 của toàn bộ quy trình đạt 75 mg/l, tương đương hiệu suất thu nhận các dạng khác nhau của ACE2 được biểu hiện từ *E. coli* đã công bố trong các nghiên cứu trước [14, 15].



Hình 3. Kết quả điện di SDS-PAGE nhuộm bạc và Western blot các phân đoạn thu nhận trong quá trình tinh sạch qua cột HisTrap HP của trhACE2. 1: mẫu trước khi qua cột; 2: phân đoạn qua cột; 3: phân đoạn rửa cột; 4: phân đoạn thôi giải; M: thang protein.

3.3. Khả năng gắn với protein gai của SARS-CoV-2 của trhACE2

Phương pháp sandwich ELISA được thực hiện để đánh giá khả năng gắn của trhACE2 với protein S của SARS-CoV-2. Đã ELISA được phủ với protein S (SARS-CoV-2 Spike S1+S2 protein, chủng delta B.1.617.2, Hãng Sino Biological). Tiếp theo đó, trhACE2 ở các nồng độ khác nhau được cho vào mỗi giếng đã phủ với protein S. Phức hợp protein S-trhACE2 được phát hiện và định lượng bằng kháng thể sơ cấp và kháng thể thứ cấp đặc hiệu với trhACE2. Kết quả cho thấy, khả năng gắn với protein S tương quan tỷ lệ với nồng độ tăng dần của protein trhACE2 (hình 4A). Ái lực tương tác của trhACE2 với protein S được xác định bằng tác động cộng hưởng plasmon bề mặt cho thấy, ái lực tương tác $K_d=15,7$ nM. Kết quả cho thấy, trhACE2 có ái lực với S protein mạnh hơn so với ACE2 dạng tự nhiên ($K_d=27,5$ nM) [16].



Hình 4. Đánh giá khả năng gắn của trhACE2 với protein S của SARS-CoV-2. (A) Sandwich ELISA đánh giá khả năng gắn trhACE2 với protein S, mức độ gắn tỷ lệ thuận với nồng độ của trhACE2, giá trị thể hiện là giá trị đo trung bình của 3 lần lặp lại $\pm$ độ lệch chuẩn (SD); **(B)** Biểu đồ tương tác (sensorgrams) của trhACE2 ở các nồng độ khác nhau với protein S được phân tích trên hệ thống Biacore X100.

4. Kết luận

Nghiên cứu đã tạo được protein tái tổ hợp cho vùng trhACE2 của người trên hệ thống tế bào *E. coli* khá đơn giản, nhanh chóng với hiệu suất thu nhận protein mục tiêu cao. Các kết quả thử nghiệm cho thấy, khả năng gắn với protein S của SARS-CoV-2 của trhACE2 được tạo ra. Kết quả của nghiên cứu là cơ sở cho các đánh giá tiếp theo về khả năng trung hoà và ức chế SARS-CoV-2 của trhACE2 trên mô hình tế bào cũng như đánh giá tiền lâm sàng, hứa hẹn nhiều tiềm năng phát triển các liệu pháp phòng ngừa và hỗ trợ điều trị COVID-19.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được tài trợ kinh phí bởi Sở Khoa học và Công nghệ TP Hồ Chí Minh. Các tác giả xin chân thành cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] World Health Organization (2023), *WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard*, <https://COVID19.who.int/>, accessed 20 March 2023.
- [2] Vietnam Ministry of Health (2023), "COVID-19 epidemic situation: Latest update from the Ministry of Health", *Vietnam Journal of Health and Life*, <https://suckhoedoisong.vn/tinh-hinh-dich-COVID-19-cap-nhat-moi-nhat-tu-bo-y-te-16921081215062562.htm>, accessed 20 March 2023 (in Vietnamese).
- [3] M. Donoghue, F. Hsieh, E. Baronas, et al. (2000), "A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin", *Circ. Res.*, **87**(5), pp.E1-E9, DOI: 10.1161/01.res.87.5.e1.
- [4] F. Hikmet, L. Méar, Å. Edvinsson, et al. (2020), "The protein expression profile of ACE2 in human tissues", *Mol. Syst. Biol.*, **16**(7), pp.1-16, DOI: 10.15252/msb.20209610.
- [5] I. Hamming, W. Timens, M.L.C. Bulthuis, et al. (2004), "Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis", *J. Pathol.*, **203**(2), pp.631-637, DOI: 10.1002/path.1570.

- [6] R. Yan, Y. Zhang, Y. Li, et al. (2020), "Structural basis for the recognition of SARS-CoV-2 by full-length human ACE2", *Science*, **367**(6485), pp.1444-1448, DOI: 10.1126/science.abb2762.
- [7] A. Zoufaly, M. Poglitsch, J.H. Aberle, et al. (2020), "Human recombinant soluble ACE2 in severe COVID-19", *Lancet Respir. Med.*, **8**(11), pp.1154-1158, DOI: 10.1016/S2213-2600(20)30418-5.
- [8] K. Kuba, Y. Imai, S. Rao, et al. (2005), "A crucial role of angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) in SARS coronavirus-induced lung injury", *Nat. Med.*, **11**(8), pp.875-879, DOI: 10.1038/nm1267.
- [9] D.W. Wong, G.Y. Oudit, H. Reich, et al. (2007), "Loss of angiotensin-converting enzyme-2 (ACE2) accelerates diabetic kidney injury", *Am. J. Pathol.*, **171**(2), pp.438-451, DOI: 10.2353/ajpath.2007.060977.
- [10] L. Samavati, B.D. Uhal (2020), "ACE2, much more than trust a receptor for SARS-COV-2", *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, **10**(317), pp.1-9, DOI: 10.3389/fcimb.2020.00317.
- [11] P. Rizzo, F.V.D. Sega, F. Fortini, et al. (2020), "COVID-19 in the heart and the lungs: Could we "Notch" the inflammatory storm?", *Basic Res. Cardiol.*, **115**(3), DOI: 10.1007/s00395-020-0791-5.
- [12] J. Damas, G.M. Hughes, K.C. Keough, et al. (2020), "Broad host range of SARS-CoV-2 predicted by comparative and structural analysis of ACE2 in vertebrates", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **117**(36), pp.22311-22322, DOI: 10.1073/pnas.2010146117.
- [13] A. Basit, T. Ali, S.U. Rehman (2021), "Truncated human angiotensin converting enzyme 2; a potential inhibitor of SARS-CoV-2 spike glycoprotein and potent COVID-19 therapeutic agent", *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **39**(10), pp.3605-3614, DOI: 10.1080/07391102.2020.1768150.
- [14] X. Gao, K. Liang, S. Mei, et al. (2021), "An efficient system to generate truncated human angiotensin converting enzyme 2 (hACE2) capable of binding RBD and spike protein of SARS-CoV2", *Protein Expr. Purif.*, **184**, DOI: 10.1016/j.pep.2021.105889.
- [15] S.Y. Xu, A. Fomenkov, T.H. Chen, et al. (2021), "Expression of human ACE2 N-terminal domain, part of the receptor for SARS-CoV-2, in fusion with maltose-binding protein, *E. coli* ribonuclease I and human RNase A", *Front. Microbiol.*, **12**, DOI: 10.3389/fmicb.2021.660149.
- [16] S. Kim, Y. Liu, Z. Lei, et al. (2021), "Differential interactions between human ACE2 and spike RBD of SARS-CoV-2 variants of concern", *J. Chem. Theory Comput.*, **17**(12), pp.7972-7979, DOI: 10.1021/acs.jctc.1c00965.

Đánh giá kết quả kỹ thuật nối tụy - ruột kiểu Blumgart theo Satoi cải biên trong phẫu thuật cắt khối tá tụy tại Bệnh viện Bạch Mai

Pisey Chantha¹, Nguyễn Thành Khiêm^{2*}, Nguyễn Hàm Hội², Nguyễn Ngọc Hùng², Trần Hiếu Học², Lương Tuấn Hiệp², Đỗ Văn Minh², Đỗ Hải Đăng³, Nguyễn Thế Duy⁴, Phạm Hồng Quảng⁵

¹Trường Đại học Y Hà Nội, 1 Tôn Thất Tùng, phường Trung Tự, quận Đống Đa, Hà Nội, Việt Nam

²Bệnh viện Bạch Mai, 78 Giải Phóng, phường Phương Mai, quận Đống Đa, Hà Nội, Việt Nam

³Bệnh viện Hữu nghị Việt Đức, 40 Tràng Thi, phường Hàng Bông, quận Hoàn Kiếm, Hà Nội, Việt Nam

⁴Trường Đại học VinUni, khu đô thị Vinhomes Ocean Park, xã Đa Tốn, huyện Gia Lâm, Hà Nội, Việt Nam

⁵Trường Đại học Y Dược Thái Bình, 373 Lý Bôn, phường Kỳ Bá, TP Thái Bình, tỉnh Thái Bình, Việt Nam

Ngày nhận bài 17/10/2023; ngày chuyển phản biện 20/10/2023; ngày nhận phản biện 10/11/2023; ngày chấp nhận đăng 14/11/2023

Tóm tắt:

Mục tiêu: Đánh giá kết quả kỹ thuật nối tụy - ruột kiểu Blumgart theo Satoi cải biên tại Bệnh viện Bạch Mai. **Đối tượng nghiên cứu:** 73 bệnh nhân (BN) được phẫu thuật cắt khối tá tràng đầu tụy, nối tụy - ruột kiểu Blumgart theo Satoi cải biên tại Khoa Phẫu thuật Tiêu hoá - Gan mật tụy, Bệnh viện Bạch Mai từ tháng 10/2020 đến tháng 4/2023. **Phương pháp nghiên cứu:** Nghiên cứu mô tả cắt ngang kết hợp hồi cứu và tiền cứu. Miệng nối Blumgart được cải biên theo hướng đơn giản hoá với 2 mũi khâu chữ U. **Kết quả:** Tuổi trung bình của BN là $58,49 \pm 12,69$; nhóm tuổi trên 60 chiếm >50%; tỷ lệ nam/nữ ~1. Ghi nhận biến chứng ở 22/73 BN, với tổng số biến chứng là 33, trong đó có 3 biến chứng độ III trở lên theo Clavien-Dindo (1 trường hợp có biến chứng rò tụy độ C gây chảy máu muộn từ thành động mạch gan chung cần can thiệp phẫu thuật, 1 trường hợp chảy máu từ động mạch vị tá tràng cần cầm máu bằng can thiệp mạch dưới chẩn đoán hình ảnh, 1 trường hợp áp xe tồn dư dưới gan cần đặt dẫn lưu dưới hướng dẫn của siêu âm), không có BN tử vong. **Kết luận:** Miệng nối tụy hồng tràng kiểu Blumgart theo Satoi cải biên là một kỹ thuật khả thi và an toàn.

Từ khoá: biến chứng, miệng nối tụy - ruột, phương pháp Blumgart cải biên, rò tụy.

Chỉ số phân loại: 3.2

1. Đặt vấn đề

Cắt khối tá tràng - đầu tụy là một trong những phẫu thuật chính để điều trị các bệnh lý vùng đầu tụy, tá tràng. Tuy nhiên, đây là một phẫu thuật phức tạp có tỷ lệ biến chứng cao nhất trong các phẫu thuật bụng (30-50%) [1]. Rò tụy được coi là một biến chứng thường gặp và nghiêm trọng nhất sau phẫu thuật cắt khối tá tràng - đầu tụy. Biến chứng thường gây những hậu quả nặng nề, tăng thời gian nằm viện cũng như chi phí điều trị. Có nhiều nguy cơ dẫn đến rò miệng nối tụy tiêu hóa, gồm: đặc điểm của tụy (cấu trúc nhu mô tụy, kích thước ống tụy), yếu tố người bệnh (tuổi, giới tính, tình trạng tắc mật trước phẫu thuật) và các yếu tố trong phẫu thuật (thời gian phẫu thuật, lượng máu mất, đặt stent ống tụy hoặc không, đặc biệt là kỹ thuật tái lập lưu thông tụy - tiêu hoá) [1]. Nhiều năm qua, các bác sĩ phẫu thuật đã thử nghiệm nhiều phương pháp khác nhau cũng như cải biên các kỹ thuật tái lập lưu thông để tìm ra phương án phẫu thuật tối ưu, như kỹ thuật nối tụy - ruột với mũi khâu chữ

U thực hiện lần đầu được cải biên theo Fuji (2014) sử dụng 1-3 mũi khâu chữ U và S. Satoi và cs (2019) [2] với 2 mũi khâu chữ U. Đây là một kỹ thuật cải biên theo hướng đơn giản hoá, được chứng minh là an toàn và giảm đáng kể các biến chứng sau phẫu thuật, đặc biệt là giảm tỷ lệ rò tụy [2]. Cho đến nay, Việt Nam có rất ít nghiên cứu về kỹ thuật miệng nối Blumgart cải biên theo Satoi. Tại Bệnh viện Bạch Mai, chúng tôi thực hiện kỹ thuật này để lập lại lưu thông tụy sau mổ cắt khối tá tràng đầu tụy và bước đầu cho thấy kết quả tốt. Nghiên cứu này nhằm mục đích đánh giá kết quả của miệng nối tụy - hồng tràng kiểu Blumgart theo Satoi cải biên và nhận xét một số yếu tố liên quan đến biến chứng rò tụy của kỹ thuật này.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng

Bao gồm toàn bộ BN được phẫu thuật cắt khối tá tràng đầu tụy với miệng nối tụy - ruột kiểu Blumgart theo Satoi cải biên tại Bệnh viện Bạch Mai từ tháng 10/2020 đến tháng 4/2023.

*Tác giả liên hệ: Email: nguyenthankhiemvd@gmail.com

Evaluation of the results of the modified Blumgart pancreatic-intestinal anastomosis technique according to Satoi in pancreaticoduodenectomy at Bach Mai Hospital

Pisey Chantha¹, Thanh Khiem Nguyen^{2*},
Ham Hoi Nguyen², Ngoc Hung Nguyen²,
Hieu Hoc Tran², Tuan Hiep Luong², Van Minh Do²,
Hai Dang Do³, The Duy Nguyen⁴, Hong Quang Pham⁵

¹Hanoi Medical University, 1 Ton That Tung Street, Trung Tu Ward, Dong Da District, Hanoi, Vietnam

²Bach Mai Hospital, 78 Giai Phong Street, Phuong Mai Ward, Dong Da District, Hanoi, Vietnam

³Viet Duc University Hospital,

40 Trang Thi Street, Hang Bong Ward, Hoan Kiem District, Hanoi, Vietnam

⁴VinUni University, Vinhomes Ocean Park Urban Area, Da Ton Commune, Gia Lam District, Hanoi, Vietnam

⁵Thai Binh University of Medicine and Pharmacy,

373 Ly Bon Street, Ky Ba Ward, Thai Binh City, Thai Binh Province, Vietnam

Received 17 October 2023; revised 10 November 2023; accepted 14 November 2023

Abstract:

Objectives: This study aims to research on the safety and effectiveness of the modified Blumgart pancreaticojejunostomy anastomosis by Satoi in Bach Mai Hospital. **Research subjects:** Seventy-three patients underwent modified Blumgart pancreaticojejunostomy anastomosis by Satoi after pancreaticoduodenectomy at Gastrointestinal and Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery Department, Bach Mai Hospital between October 2020 and April 2023. **Method:** Cross-sectional study combining retrospective and prospective studies. The Blumgart anastomosis was modified to simplify with 2 U-shaped sutures. **Results:** The average age of the study subjects was 58.49 ± 12.69 years; the age group over 60 accounted for over 50%; the male/female ratio was ~1. The number of patients with complications was 22/73; the total number of complications was 33, including 3 grade-III-or-above complications, according to Clavien-Dindo: 1 case had complications of grade C pancreatic fistula causing late hemorrhage, from the common hepatic artery wall, needs re-surgery, 1 case needs hemostasis under intervention radiology, 1 case needs to be drained under ultrasound guidance, and no patient deaths. **Conclusion:** The modified Blumgart pancreaticojejunostomy by Satoi is a safe and effective technique.

Keywords: complication, modified Blumgart pancreaticojejunostomy anastomosis, pancreatic fistula, pancreatic-intestinal junction.

Classification number: 3.2

Tiêu chuẩn lựa chọn: Được phẫu thuật cắt khối tá tràng đầu tụy với các chỉ định khác nhau (u bóng Vater, u đầu tụy, u phần thấp ống mật chủ, viêm tụy mạn, u nhú nhầy nội ống tụy...); được thực hiện miệng nối tụy - ruột kiểu Blumgart theo Satoi cải biên; hồ sơ bệnh án có đủ các thông tin cần thiết cho nghiên cứu.

Tiêu chuẩn loại trừ: BN cắt khối tá tụy với miệng nối Blumgart cổ điển hoặc cải biên theo phương pháp khác.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

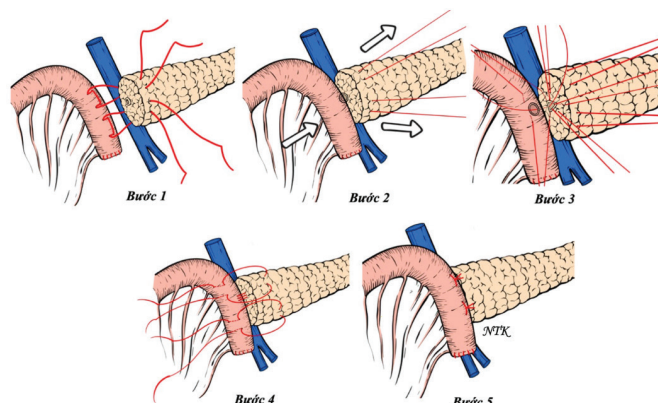
Thiết kế nghiên cứu: Mô tả cắt ngang bao gồm hồi cứu và tiền cứu.

Chọn mẫu: Toàn bộ.

2.3. Quy trình kỹ thuật

Các bước tiến hành:

- Cắt khối đầu tụy - tá tràng: Được tiến hành theo các bước kỹ thuật của phẫu thuật Whipple, BN có thể không được nạo vét hạch ở các mức độ khác nhau, cắt các tạng khác hoặc cắt tạo hình mạch máu kèm theo (hình 1).



Hình 1. Kỹ thuật lập lại lưu thông miệng nối tụy - hồng tràng theo Satoi. Nguồn: Tác giả.

- Chuẩn bị môm tụy: Sau khi cắt eo tụy, làm sạch diện cắt bằng gạc, cầm máu bằng dao điện hoặc khâu cầm máu, xác định ống tụy, di động môm tụy với chiều dài ít nhất 2 cm.

- Khâu 2 mũi chữ U bằng chỉ Prolene 2 đầu kim 3/0 hoặc 4/0 qua hết tiết diện của môm tụy và mặt thanh mạc mặt sau của quai ruột, cách môm tụy khoảng diện cắt tụy 0,5 cm, 2 mũi ở phía trên và phía dưới tụy, cách nhau bởi ống tụy chính, có đặt sonde số 6-10 Fr trong lòng ống tụy để tránh khâu vào ống tụy chính.

- Mở ruột tương đương với kích thước ống tụy chính, khâu ống tụy với ruột bằng các mũi Monosyl 5/0, có thể đặt stent qua ống tụy hoặc không.

- Tiếp tục khâu 2 đầu kim của mỗi sợi chỉ với mặt trước của quai ruột.

- Buộc chỉ sao cho bờ tự do của quai ruột ép vào toàn bộ môm tụy.

2.4. Các chỉ tiêu nghiên cứu

Đặc điểm BN: đặc điểm chung của người bệnh (tuổi, giới tính, BMI, tiền sử, triệu chứng lâm sàng, cận lâm sàng, mô bệnh học); đặc điểm kỹ thuật (dẫn lưu trước phẫu thuật, phẫu thuật cắt khối tá tụy, đặc điểm nhu mô tụy, kích thước ống tụy, thời gian phẫu thuật, cắt và tạo hình mạch máu, truyền máu trong phẫu thuật); các biến chứng (chảy máu sau phẫu thuật, áp xe tồn dư, rò đường chấp, rò miệng nối dạ dày, rò tụy) và các yếu tố liên quan đến biến chứng rò tụy sau phẫu thuật.

Biến chứng sau phẫu thuật bao gồm biến chứng tại chỗ và toàn thân. Biến chứng sau phẫu thuật được định nghĩa và phân độ theo Clavien-Dindo [3], trong đó: độ I bao gồm bất kỳ sự bất thường nào trong quá trình hậu phẫu mà không cần thay đổi kháng sinh hoặc phẫu thuật lại; độ II: cần thiết phải được điều trị các thuốc khác ngoài những thuốc được sử dụng trong biến chứng độ I, cần truyền máu và nuôi dưỡng đường toàn thân; độ IIIa: can thiệp không cần gây mê toàn thân, IIIb: can thiệp cần phải gây mê toàn thân; độ IV: biến chứng có đe dọa tính mạng; độ IVa: một tạng bị rối loạn chức năng (cần lọc máu); độ IVb: suy đa tạng; độ V: tử vong. Biến chứng từ độ III trở lên được xem là biến chứng nặng. Phân chia kích thước ống tụy [4], rò tụy được định nghĩa và phân độ theo Hiệp hội Nghiên cứu Phẫu thuật Tụy (International Study Group of Pancreatic Surgery - ISGPS 2016) [5], trong đó, độ A (theo định nghĩa trước): rò về sinh hoá, không có triệu chứng lâm sàng; độ B: rò độ A kéo dài >3 tuần, phải đặt thêm dẫn lưu ổ dịch qua da hoặc nội soi, can thiệp mạch do chảy máu, nhiễm khuẩn dịch rò nhưng chưa suy chức năng tạng; độ C: rò tụy phải mổ lại, suy chức năng cơ quan, rò dẫn đến tử vong. Rò đường chấp [6], chậm lưu thông dạ dày (Delayed gastric emptying - DGE) [7] và xuất huyết sau phẫu thuật cắt tụy (Post pancreaticoduodenectomy hemorrhage - PPH) [8] được định nghĩa và phân độ theo tiêu chuẩn của ISGPS. Rò mật được định nghĩa là dịch mật chảy qua dẫn lưu vào ngày thứ 3 sau phẫu thuật, hoặc phát hiện trên chẩn đoán hình ảnh, được phân độ theo Hiệp hội Nghiên cứu Phẫu thuật Gan (International Study Group of Liver Surgery - ISGLS) [9]. Nhiễm khuẩn vết mổ được định nghĩa là tình trạng chảy mủ từ vết thương cần phải tưới rửa hoặc phẫu thuật lại [10]. Tỷ lệ tử vong sau phẫu thuật được xác định là tử vong trong vòng 30 ngày sau phẫu thuật hoặc trong thời gian nằm viện nếu dài hơn. Trường hợp BN nặng, người nhà xin về được xem như một trường hợp tử vong.

2.5. Xử lý số liệu

Số liệu được xử lý theo thuật toán thống kê sử dụng phần mềm thống kê y học SPSS 20.0.

2.6. Đạo đức nghiên cứu

Số liệu được thu thập trung thực, khách quan. Các số liệu được mã hoá và bảo mật, thông tin cá nhân của người bệnh được giữ kín.

3. Kết quả

Nghiên cứu của chúng tôi được thực hiện trên 73 BN, qua phân tích các tác giả thu được một số kết quả dưới đây.

3.1. Đặc điểm chung của bệnh nhân nghiên cứu

Bảng 1. Đặc điểm chung của BN.

Tuổi (năm)	58,49±12,69 (12-83)	
Giới (nam/nữ)	39/34	
	n=73	Tỷ lệ (%)
BMI (kg/m²)		
<18	8	10,96
18-23	48	65,75
≥23	17	23,29
Tiền sử tăng huyết áp (n, %)	39	53,42
Tiền sử đái tháo đường (n, %)	40	54,79
Triệu chứng	n	%
Đau thượng vị	43	58,90
Đau hạ sườn phải	14	19,17
Buồn nôn/nôn	8	10,95
Chán ăn/dầy bụng	17	23,28
Gầy sút cân	27	36,98
Sờ thấy u	2	2,73
Vàng da	43	58,90
Albumin máu (g/l)	n	%
<35	24	32,88
≥35	49	67,12
PT (%)	n	%
<70%	63	86,30
≥70%	10	13,70
Nồng độ huyết sắc tố (g/l)	n	%
<120	24	32,87
≥120	42	57,53
Kết quả mô bệnh học	n=73	%
Nhóm ung thư		
Ung thư tụy	30	41,10
Ung thư bóng Vater	19	26,02
Ung thư phần thấp ống mật chủ	11	15,07
GIST tá tràng	3	4,11
U đặc giả nhú ung thư hoá	3	4,11
Nhóm không ung thư		
U đặc giả nhú	2	2,74
Viêm tụy mạn	4	5,48
Cystadenoma	1	1,37
U tụy nội tiết	0	0

Kết quả bảng 1 cho thấy, BN ung thư tụy chiếm chủ yếu trong nghiên cứu (41,10%), hầu hết BN đến viện đã có triệu chứng vàng da (58,90%).

3.2. Đặc điểm kỹ thuật

Bảng 2. Đặc điểm kỹ thuật.

Đặc điểm	n=73	Tỷ lệ %
Dẫn lưu mật trước phẫu thuật	10	13,70
Phẫu thuật cắt khối tá tụy		
Nạo vét hạch tiêu chuẩn	45	61,64
Nạo vét hạch mở rộng	18	24,66
Đặt stent ống tụy	69	94,52
Đặc điểm nhu mô tụy		
Mềm	40	54,79
Xơ	33	45,21
Kích thước ống tụy		
<3 mm	40	54,79
≥3 mm	33	45,21
Thời gian phẫu thuật		
<300 phút	48	65,75
≥300 phút	25	34,25
Cắt và tạo hình mạch máu	8	10,96
Truyền máu trong phẫu thuật	10	13,70

Kết quả bảng 2 cho thấy, 13,70% BN phải truyền máu trong phẫu thuật, tương ứng với 10,96% BN cần phải cắt và tạo hình mạch máu.

3.3. Biến chứng của phẫu thuật

Bảng 3. Các biến chứng phẫu thuật.

Biến chứng	Số BN - Tỷ lệ (%)	Cần can thiệp
Số BN có biến chứng	22 (30,14)	3*
Chảy máu sau phẫu thuật	6 (8,22)	2*
Áp xe tồn dư	3 (4,11)	0
Nhiễm khuẩn vết mổ	11 (15,07)	0
Rò đường chấp	3 (4,11)	0
Rò miệng nối dạ dày	1 (1,37)	0
Rò tụy		
Độ B	7 (9,59)	0
Độ C	2 (2,74)	2*
Phân độ biến chứng theo Clavien-Dindo		
Độ I	17 (23,29)	
Độ II	13 (17,81)	0
Độ IIIa	2 (2,74)	2*
Độ IIIb	1 (1,37)	1*
Tử vong sau phẫu thuật	0	0

*: 2 trường hợp có rò tụy độ C, có chảy máu thứ phát sau rò tụy. 1 BN chảy từ động mạch vị tá tràng được điều trị bằng nút mạch, 1 BN chảy từ động mạch gan chung được mổ lại cầm máu.

Kết quả bảng 3 cho thấy, tỷ lệ rò tụy chiếm 12,33%, biến chứng nặng (độ III trở lên) theo Clavien-Dindo chiếm 4,11%.

3.4. Các yếu tố liên quan đến biến chứng rò tụy sau phẫu thuật

Bảng 4. Các yếu tố liên quan đến biến chứng rò tụy sau phẫu thuật.

Đặc điểm	Đơn biến	
	95% CI	p
Tuổi (>60)	0,239-3,96	0,969
Giới (nam)	0,432-8,172	0,4
BMI (≥23)	0,396-8,061	0,451
Tiền sử tăng huyết áp	0,122-2,315	0,4
Tiền sử đái tháo đường	0,015-1,058	0,056
ALB (<35 g/dl)	0,528-38,168	0,169
PT (<70%)	0,085-6,86	0,81
Nồng độ Hb (<120 g/l)	0,022-1,579	0,123
Dẫn lưu mật trước phẫu thuật	0,088-2,841	0,434
Phương pháp nạo vét hạch (nạo vét hạch mở rộng hay tiêu chuẩn)	1,151-20,883	0,031
Đặt stent ống tụy	0,235-27,466	0,442
Bệnh lý ung thư biểu mô tuyến		0,948
Cắt và tạo hình mạch máu		0,702
Thời gian phẫu thuật (≥300 phút)	1,696-47,195	0,009
Truyền máu trong mổ	1,695-47,195	0,01
Đặc điểm nhu mô tụy (mềm)	0,395-6,547	0,5079
Kích thước ống tụy (≥3 mm)	0,237-3,931	0,961

Kết quả bảng 4 cho thấy, thời gian phẫu thuật kéo dài (>300 phút), phẫu thuật cắt khối tá tụy có nạo vét hạch mở rộng và truyền máu trong mổ là các yếu tố có liên quan đến biến chứng rò miệng nối tụy - ruột.

4. Bàn luận

Tuổi trung bình trong nghiên cứu của chúng tôi là 58,49 (12-83). Kết quả này thấp hơn so với trong nghiên cứu của G.V. Aranha và cs (2006) [11] với tuổi trung bình là 68 (21-90). Tỷ lệ nữ chiếm 46,58%, tương tự với nghiên cứu của S.K. Kamarajah (2018) [12] là 47,3%. Triệu chứng lâm sàng hay gặp nhất trong nhóm đối tượng nghiên cứu này là đau bụng và vàng da, phù hợp với đặc điểm tổn thương chủ yếu nằm ở đầu tụy.

Số BN có biến chứng trong nghiên cứu của chúng tôi là 22/73 (30,14%), tổng số biến chứng là 33, trong đó chủ yếu là độ I đến độ IIIa, có 1 trường hợp có biến chứng được phân loại độ IIIb theo phân độ Clavien-Dindo, 1 trường hợp rò tụy độ C gây chảy máu muộn do tổn thương thành động mạch gan chung phải mổ lại, 1 trường hợp chảy máu do tổn thương mạch vị tá tràng phải cầm máu dưới hướng dẫn

của chẩn đoán hình ảnh, 1 trường hợp áp xe tồn dư dưới gan phải đặt dẫn lưu dưới hướng dẫn của siêu âm và không có trường hợp nào tử vong. Tỷ lệ biến chứng trong nghiên cứu của chúng tôi thấp hơn nghiên cứu của S. Satoi và cs (2019) [2] về miệng nối tụy - ruột theo kiểu Kakita cải biên và Blumgart cải biên, tỷ lệ người bệnh biến chứng tương ứng là 54 và 47%. Tỷ lệ biến chứng nặng (từ độ III trở lên) theo Clavien-Dindo trong nghiên cứu của chúng tôi (4,11%) cũng thấp hơn so với kết quả của S. Satoi và cs (2019) [2] (20% với kiểu Kakita cải biên và 26% với kiểu Blumgart cải biên). Về biến chứng rò tụy độ B trở lên, nghiên cứu của chúng tôi cho tỷ lệ 12,33% thấp hơn phương pháp Kakita cải biên (12,33 với 19,53%), nhưng cao hơn so với phương pháp Blumgart cải biên (12,33 với 10,16%) trong nghiên cứu của S. Satoi và cs (2019) [2], tuy nhiên tỷ lệ chảy máu cũng như tỷ lệ cần mổ lại hoặc cần can thiệp cao hơn so với cả 2 phương pháp (chảy máu: 6,85, 0,7 và 1,69%; mổ lại hoặc can thiệp: 5,4, 1,6 và 0,9%). Điều này có thể giải thích là do trong nghiên cứu của chúng tôi phần lớn BN có tổn thương ác tính, tình trạng dinh dưỡng kém hơn cũng như khi phẫu thuật cần mở rộng tổn thương hơn. Kết quả tương đương với nghiên cứu của S. Satoi và cs (2019) [2] theo 2 phương pháp Kakita và Blumgart là 2,3 và 1,7%.

Trong nghiên cứu của chúng tôi có 6 BN có biến chứng chảy máu, trong đó 2 BN biến chứng chảy máu muộn do rò tụy, chỉ có 1 BN phải mổ lại để cầm máu. Kết quả của chúng tôi không ghi nhận trường hợp nào chảy máu miệng nối tụy - ruột. Các nghiên cứu trong và ngoài nước gần như không đề cập đến chảy máu các miệng nối tụy - ruột kiểu Blumgart. Nghiên cứu của D. Luu và cs (2020) [13] trên 34 BN làm miệng nối tụy - dạ dày trên BN cắt khối tá tràng đầu tụy cho rằng tỷ lệ chảy máu miệng nối là 5,9%. Nghiên cứu của T.A. Pham (2013) [14] trên 60 BN đã cắt khối tá tràng đầu tụy với miệng nối tụy - dạ dày cho rằng, tỷ lệ chảy máu miệng nối tụy - dạ dày là 6,7%. Các nghiên cứu cho thấy, miệng nối Blumgart rất an toàn trên khía cạnh chảy máu miệng nối sau mổ. Về các yếu tố liên quan đến rò miệng nối tụy - ruột, trong nghiên cứu của chúng tôi khi phân tích đơn biến cho thấy, 3 yếu tố có ảnh hưởng đến biến chứng này bao gồm truyền máu trong mổ (13,69%, $p=0,01$), nạo vét hạch mở rộng (24,65, $p=0,031$) và thời gian phẫu thuật >300 (34,25%, $p=0,009$). Phân tích cũng cho thấy, các yếu tố như tuổi, giới tính, BMI, đường kính ống tụy, mật độ nhu mô tụy, đặc điểm mô bệnh học, cắt và tạo hình mạch máu trong nghiên cứu không liên quan đến tình trạng rò miệng nối tụy - ruột sau phẫu thuật. Kết quả của chúng tôi tương tự với nghiên cứu của R.Yoshioka và cs (2010) [15] trên 100 BN đã được phẫu thuật cắt khối tá tụy từ tháng 5/2001 đến tháng 1/2009 cho thấy, nạo vét hạch mở rộng là yếu tố gây tình trạng rò tụy sau phẫu thuật ($p=0,008$; OR 4.773;

95% CI 1.504-15.145). Nghiên cứu cắt ngang trên 201 BN của Y.T. Li và cs (2019) [16] cho thấy, các yếu tố tuổi (54,54, $p=0,584$), giới tính (41/49, $p=0,172$), đài tháo đường (19,9%; $p=0,652$), tụy mềm (16,4%, $p=0,958$), đặc điểm mô bệnh học, bệnh tim mạch (24,9%, $p=0,269$) là những yếu tố không liên quan đến rò tụy, tuy nhiên thời gian phẫu thuật >300 phút ($p=0,028$) là yếu tố ảnh hưởng đến rò miệng nối tụy - ruột. M. Ates và cs (2020) [17] cũng cho rằng, truyền máu trong phẫu thuật là một biến độc lập gây nguy cơ rò tụy, có sự khác biệt về tỷ lệ rò miệng nối tụy - ruột giữa 2 nhóm truyền máu và không truyền máu ($p=0,003$). Tuy nhiên, một phân tích tổng quan ở 27 nghiên cứu với 24.740 BN của B. Zhang và cs (2022) [1] cho thấy, các yếu tố như giới tính, BMI, đường kính ống tụy, đặc điểm mô bệnh học, truyền máu trong mổ, cắt mạch, hóa xạ trị tiền phẫu là những yếu tố nguy cơ liên quan đến tình trạng rò tụy sau phẫu thuật cắt khối tá tràng và đầu tụy. Nghiên cứu của A.E. Nakeeb và cs (2013) [18] trên 471 BN cắt khối tá tụy cũng cho thấy, ống tụy không giãn, nhu mô tụy mềm còn là yếu tố nguy cơ của rò tụy nặng mức độ B và C. Trên thực tế lâm sàng, chúng tôi cũng nhận thấy ống tụy không giãn và nhu mô tụy mềm gây ra những khó khăn khi làm miệng nối, các mũi khâu dễ gây chảy máu và xé nhu mô, đây có thể là các yếu tố gây rò miệng nối tụy - ruột sau mổ, tuy nhiên có thể cỡ mẫu chưa đủ lớn để chứng minh được.

5. Kết luận

Qua nghiên cứu 73 trường hợp được phẫu thuật nối tụy - ruột kiểu Blumgart theo Satoi cải biên tại Bệnh viện Bạch Mai có thể thấy, đây là một kỹ thuật khả thi và an toàn. Miệng nối có thể được áp dụng rộng rãi trong phẫu thuật cắt khối tá tràng đầu tụy. Tuy vậy, vẫn cần những nghiên cứu đối chứng để đánh giá hiệu quả của kỹ thuật này so với các kỹ thuật khác.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] B. Zhang, Q. Yuan, S. Li, et al. (2022), "Risk factors of clinically relevant postoperative pancreatic fistula after pancreaticoduodenectomy: A systematic review and meta-analysis", *Medicine (Baltimore)*, **101**(26), DOI: 10.1097/MD.00000000000029757.
- [2] S. Satoi, T. Yamamoto, H. Yanagimoto, et al. (2019), "Does modified Blumgart anastomosis without intra-pancreatic ductal stenting reduce post-operative pancreatic fistula after pancreaticojejunostomy?", *Asian J. Surg.*, **42**(1), pp.343-349, DOI: 10.1016/j.asjsur.2018.06.008.
- [3] S. Miyamoto, J. Nakao, T. Higashino, et al. (2019), "Clavien-Dindo classification for grading complications after total pharyngolaryngectomy and free jejunum transfer", *PLOS ONE*, **14**(9), DOI: 10.1371/journal.pone.0222570.

- [4] F. Schuh, A.L. Mihaljevic, P. Probst, et al. (2023), "A simple classification of pancreatic duct size and texture predicts postoperative pancreatic fistula: A classification of the International Study Group of Pancreatic Surgery", *Ann. Surg.*, **277**(3), DOI: 10.1097/sla.0000000000004855.
- [5] C. Bassi, G. Marchegiani, C. Dervenis, et al. (2017), "The 2016 update of the international study group (ISGPS) definition and grading of postoperative pancreatic fistula: 11 years after", *Surgery*, **161**(3), pp.584-591, DOI: 10.1016/j.surg.2016.11.014.
- [6] M.G. Besselink, L.B.V. Rijssen, C. Bassi, et al. (2017), "Definition and classification of chyle leak after pancreatic operation: A consensus statement by the International Study Group on Pancreatic Surgery", *Surgery*, **161**(2), pp.365-372, DOI: 10.1016/j.surg.2016.06.058.
- [7] M.N. Wente, C. Bassi, C. Dervenis, et al. (2007a), "Delayed gastric emptying (DGE) after pancreatic surgery: A suggested definition by the International Study Group of Pancreatic Surgery (ISGPS)", *Surgery*, **142**(5), pp.761-768, DOI: 10.1016/j.surg.2007.05.005.
- [8] M.N. Wente, J.A. Veit, C. Bassi, et al. (2007b), "Postpancreatectomy hemorrhage (PPH): An International Study Group of Pancreatic Surgery (ISGPS) definition", *Surgery*, **142**(1), pp.20-25, DOI: 10.1016/j.surg.2007.02.001.
- [9] M. Koch, O.J. Garden, R. Padbury, et al. (2011), "Bile leakage after hepatobiliary and pancreatic surgery: A definition and grading of severity by the International Study Group of Liver Surgery", *Surgery*, **149**(5), pp.680-688, DOI: 10.1016/j.surg.2010.12.002.
- [10] K. Carvill, J. Cuddigan, J. Fletche, et al. (2008), "Wound infection in clinical practice: An international consensus", *Int. Wound J.*, **5**(SI3), pp.3-11, DOI: 10.1111/j.1742-481X.2008.00488.x.
- [11] G.V. Aranha, J.M. Aaron, M. Shoup (2006), "Critical analysis of a large series of pancreaticogastrostomy after pancreaticoduodenectomy", *Archives of Surgery*, **141**(6), pp.574-580, DOI: 10.1001/archsurg.141.6.574.
- [12] S.K. Kamarajah (2018), "Pancreaticoduodenectomy for periampullary tumours: A review article based on Surveillance, End Results and Epidemiology (SEER) database", *Clin. Transl. Oncol.*, **20**(9), pp.1153-1160, DOI: 10.1007/s12094-018-1832-5.
- [13] D. Luu, V.N. Pham (2020), "Research on clinical and paraclinical characteristics and evaluate early results of pancreaticoduodenectomy to treat tumors around the ampulla of Vater in Can Tho", *Can Tho Journal of Medicine and Pharmacy*, **28**, pp.9-15 (in Vietnamese).
- [14] T.A. Pham (2013), *Research on The Application of The Method of Reestablishing Gastrointestinal-Gastric Circulation in Pancreatic Head Duodenal Mass Resection*, Doctoral Thesis, Vietnam Military Medical University, pp.117-118 (in Vietnamese).
- [15] R. Yoshioka, A. Saiura, R. Koga, et al. (2010), "Risk factors for clinical pancreatic fistula after distal pancreatectomy: Analysis of consecutive 100 patients", *World J. Surg.*, **34**(1), pp.121-125, DOI: 10.1007/s00268-009-0300-3.
- [16] Y.T. Li, H.Y. Zhang, C. Xing, et al. (2019), "Effect of Blumgart anastomosis in reducing the incidence rate of pancreatic fistula after pancreatoduodenectomy", *World J. Gastroenterol.*, **25**(20), pp.2514-2523, DOI: 10.3748/wjg.v25.i20.2514.
- [17] M. Ates, M.E. Reis, A. Guner, et al. (2020), "Perioperative or intraoperative blood transfusion increases the risk of postoperative pancreatic fistula following pancreaticoduodenectomy", *Annals of Medical Research*, **27**(10), pp.2585-2591, DOI: 10.5455/annalsmedres.2020.07.693.
- [18] A.E. Nakeeb, T. Salah, A. Sultan, et al. (2013), "Pancreatic anastomotic leakage after pancreaticoduodenectomy risk factors, clinical predictors, and management (single center experience)", *World J. Surg.*, **37**(6), pp.1405-1418, DOI: 10.1007/s00268-013-1998-5.

Xây dựng mô hình đánh giá cơn tăng huyết áp trên chuột nhắt

Nguyễn Xuân Phúc¹, Đoàn Văn Viên^{1*}, Trần Mạnh Hùng²

¹Khoa Dược, Trường Đại học Lạc Hồng, 10 Huỳnh Văn Nghệ, phường Bửu Long, TP Biên Hòa, tỉnh Đồng Nai, Việt Nam

²Khoa Dược, Đại học Y Dược TP Hồ Chí Minh, 217 Hồng Bàng, phường 11, quận 5, TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

Ngày nhận bài 26/12/2022; ngày chuyển phản biện 29/12/2022; ngày nhận phản biện 23/1/2023; ngày chấp nhận đăng 26/1/2023

Tóm tắt:

Tăng huyết áp là nguyên nhân chủ yếu gây đột quỵ và các biến chứng tim mạch. Việc xây dựng mô hình đánh giá cơn tăng huyết áp cho phép thử nhanh tác động của các thuốc hạ huyết áp, đáp ứng nhu cầu nghiên cứu và phát triển các mô hình dược lý mạn tính. Mô hình tăng huyết áp được tiến hành bằng cách tiêm phúc mạc xylometazoline ở các liều khác nhau và atropine tiêm dưới da với liều 0,4 mg/kg. Nghiên cứu sử dụng máy đo huyết áp đuôi chuột CODA high throughput để xác định mô hình phù hợp. Kết quả cho thấy, huyết áp tâm thu ≥ 130 mmHg liên tục trên 15 chu kỳ trong vòng 20 phút. Tác động hạ huyết áp được tìm thấy khi cho uống các thuốc nifedipine (6 mg/kg), losartan (100 mg/kg), captopril (100 mg/kg). Tuy nhiên, chưa tìm thấy tác động hạ huyết áp của thuốc bisoprolol ở liều 50 mg/kg. Mô hình này có thể được áp dụng để sàng lọc và đánh giá hiệu quả điều trị của các thuốc hạ huyết áp.

Từ khoá: atropine, captopril, losartan, nifedipine, tăng huyết áp, xylometazoline.

Chỉ số phân loại: 3.4

1. Đặt vấn đề

Tăng huyết áp được biết đến với tình trạng áp lực mạch máu tăng cao, dai dẳng, được Tổ chức Y tế thế giới (WHO) đánh giá là một vấn nạn sức khỏe toàn cầu. Bên cạnh đó, các dấu hiệu tăng huyết áp xuất hiện còn là một cảnh báo nghiêm trọng cho việc can thiệp lối sống và can thiệp y tế [1]. Đi kèm với tăng huyết áp là biến chứng trên các cơ quan đích, trong đó, các biến chứng về thần kinh và tim mạch để lại những hậu quả hết sức nặng nề, thậm chí dẫn đến tử vong. Ngày nay, với sự phát triển trong thử nghiệm tiền lâm sàng, đã có nhiều mô hình tăng huyết áp được xây dựng mô phỏng trên động vật [2, 3] nhằm đáp ứng nhu cầu về thử nghiệm các thuốc mới, tạo tiền đề cho sự phát triển những thuốc điều trị hiệu quả và an toàn hơn. Tuy nhiên, các mô hình tăng huyết áp mạn tính thường có thời gian nghiên cứu kéo dài, nên việc xây dựng mô hình đánh giá cơn tăng huyết áp là cần thiết nhằm cho phép thử nhanh tác động hạ huyết áp của các thuốc mới, giúp sàng lọc các thuốc điều trị tăng huyết áp trước khi tiến hành thử nghiệm trên các mô hình tăng huyết áp mạn tính. Vì vậy, nghiên cứu được tiến hành với mục tiêu xây dựng mô hình đánh giá cơn tăng huyết áp trên chuột nhắt, ứng dụng trong sàng lọc các dược chất có tác dụng điều trị tăng huyết áp.

*Tác giả liên hệ: Email: vanviendoan@lhu.edu.vn

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Động vật thử nghiệm

Chuột nhắt trắng đực chủng *Swiss albino* được cung cấp bởi Viện Vắc xin và Sinh phẩm Y tế, 6-8 tuần tuổi có trọng lượng trung bình 20-25 g. Chuột khỏe mạnh, không dị tật, được nuôi ổn định ở nhiệt độ 20-27°C, độ ẩm không quá 70% đến khi đạt cân nặng 30-35 g sẽ được đưa vào thử nghiệm. Chuột được phân bố vào các lô khác nhau với số lượng trung bình 6 chuột mỗi lô, được cho ăn và uống nước đầy đủ.

2.2. Hoá chất và thuốc thử nghiệm

Xylometazoline hydrochlorid 0,1% (Otrivin-Novartis), số đăng ký VN-15561-12; atropine sulfat (Vemedim GMP), số đăng ký CT-180; losartan (Losartan STADA 50 mg), số đăng ký VD-20373-13; Bisoprolol (Bisoprolol STADA 5 mg), số đăng ký VD-23337-15; captopril (Captopril STADA 25 mg), số đăng ký VD-22668-15; nifedipine (Nifedipine T20 STADA retard), số đăng ký VD-24568-16.

2.3. Phương pháp thử nghiệm

2.3.1. Thiết bị và thông số

Máy đo huyết áp CODA high-throughput, model: 21088 do Kent Scientific (Mỹ) sản xuất và phần mềm CODA 4.1 để thu thập các chỉ số: huyết áp tâm trương, huyết áp tâm thu, huyết áp trung bình, nhịp tim, thể tích máu, lưu lượng

Building a model to evaluate hypertensive crisis in mice

Xuan Phuc Nguyen¹, Van Vien Doan^{1*},
Manh Hung Tran²

¹Faculty of Pharmacy, Lac Hong University,

10 Huynh Van Nghe Street, Buu Long Ward, Bien Hoa City, Dong Nai Province, Vietnam

²Faculty of Pharmacy, University of Medicine and Pharmacy at Ho Chi Minh City,
217 Hong Bang Street, Ward 11, District 5, Ho Chi Minh City, Vietnam

Received 26 December 2022; revised 23 January 2023; accepted 26 January 2023

Abstract:

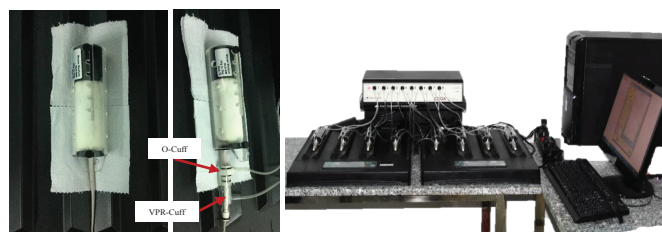
High blood pressure is a major cause of stroke and cardiovascular complications. The development of a hypertensive crisis model allows rapid testing of the effects of antihypertensive drugs, meeting the need for research and development of chronic pharmacological models. A model of acute hypertension was induced by intraperitoneal injections of xylometazoline at different doses and subcutaneous injections of atropine at a dose of 0.4 mg/kg. This study applied the CODA high-throughput hypertensive machine to determine a suitable model. The results of injecting xylometazoline at a dose of 1 mg/kg (IP) and atropine (0.4 mg/kg) (SC) showed induced hypertension with systolic >130 mmHg constantly with 15 circles in 20 minutes. The hypotensive effect was found when oral administration of nifedipine (6 mg/kg), losartan (100 mg/kg), and captopril (100 mg/kg). However, the hypotensive effect of bisoprolol was not found at a dose of 50 mg/kg. This mouse model can be applied for further screening and evaluating the therapeutic effect of hypotensive drugs.

Keywords: atropine, captopril, hypertension, losartan, nifedipine, xylometazoline.

Classification number: 3.4

máu ở đuôi chuột với 15 chu kỳ đo trong 20 phút, giữa 2 chu kỳ chuột được thư giãn 1 phút.

Quy trình đo: Khởi động máy đo huyết áp và để ổn định trong 15 phút, cài đặt chương trình CODA 4.1 với 15 chu kỳ đo, mỗi chu kỳ cách nhau 1 phút, cho chuột vào ống cố định, đặt trên bàn ủ ấm, gắn vào đuôi chuột theo thứ tự O-cuff, VPR-cuff và tiến hành đo. Huyết áp đuôi chuột được xác định dựa vào áp lực của máu ở động mạch đuôi tác động lên bóng cao su trong VPR-cuff và được ghi nhận thông qua cảm biến ở thân máy (hình 1).



Hình 1. Cơ định và đo huyết áp trên chuột nhắt.

2.3.2. Khảo sát huyết áp sinh lý

Khảo sát huyết áp sinh lý của 504 chuột thử nghiệm. Kết quả khảo sát chỉ số tim mạch sinh lý sẽ được sử dụng để chọn ngưỡng tăng huyết áp trên chuột và cho các thử nghiệm tiếp theo.

2.3.3. Khảo sát tác động tăng huyết áp với xylometazoline và atropine

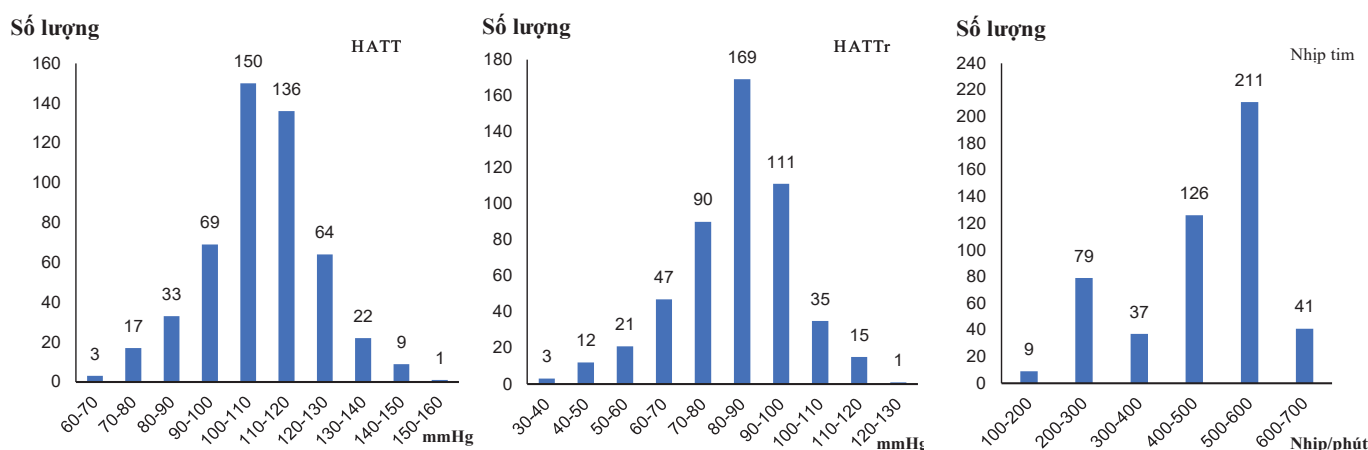
Chuột có huyết áp tâm thu ổn định 100-120 mmHg được chọn để đưa vào thử nghiệm và phân thành 4 lô, mỗi lô 6 chuột. Chuột được gây tăng huyết áp với atropine 0,4 mg/kg [4] tiêm dưới da kết hợp tiêm phúc mô xylometazoline với các liều 0,5, 1 và 1,5 mg/kg, thể tích tiêm 0,1 ml/10 g. Sau đó tiến hành đo chỉ số tim mạch.

2.3.4. Đánh giá tác động điều trị tăng huyết áp của các thuốc đối chứng

Chuột có huyết áp tâm thu ổn định 100-120 mmHg được chọn để đưa vào thử nghiệm và phân thành 6 lô, mỗi lô 6 chuột. Chuột được cho uống các thuốc đối chứng nifedipine 6 mg/kg, captopril 100 mg/kg, losartan 100 mg/kg trước 30 phút, bisoprolol 50 mg/kg trước 120 phút, sau đó gây tăng huyết áp với atropine 0,4 mg/kg tiêm dưới da kết hợp tiêm phúc mô xylometazoline 1 mg/kg, thể tích cho uống và tiêm 0,1 ml/10 g. Sau đó tiến hành đo các chỉ số tim mạch.

2.4. Phân tích kết quả và thống kê

Các số liệu được trình bày ở dạng số trung bình $\pm$ SD (sai số chuẩn) và so sánh sự khác biệt bằng phép kiểm Mann-Whitney với phần mềm Minitab, sự khác biệt có ý nghĩa khi $p < 0,05$.



Hình 2. Phân bố chỉ số tim mạch sinh lý. HATT: huyết áp tâm thu, HATTr: huyết áp tâm trương.

3. Kết quả

3.1. Khảo sát huyết áp sinh lý

Kết quả khảo sát phân bố huyết áp sinh lý trên 504 chuột cho thấy, huyết áp tâm thu, huyết áp tâm trương và nhịp tim lần lượt là 100-130 mmHg (83%), 70-100 mmHg (73%), 400-600 nhịp/phút (67%) (hình 2).

Bảng 1. Kết quả chỉ số tim mạch sinh lý trung bình.

Huyết áp tâm thu (mmHg)	Huyết áp tâm trương (mmHg)	Nhịp tim (nhịp/phút)
109±14	83±15	463±121

Kết quả bảng 1 cho thấy, huyết áp tâm thu trung bình là 109±14 mmHg, huyết áp tâm trương trung bình là 83±15 mmHg, nhịp tim 463±121 nhịp/phút. Như vậy, chỉ số huyết áp tâm thu sinh lý trên chuột nhắt trắng thấp hơn khoảng 10 mmHg so với trên người (120 mmHg), huyết áp tâm trương tương tự trên người (80 mmHg) và nhịp tim cao gấp 4-5 lần so với người (60-100 nhịp/phút) [1].

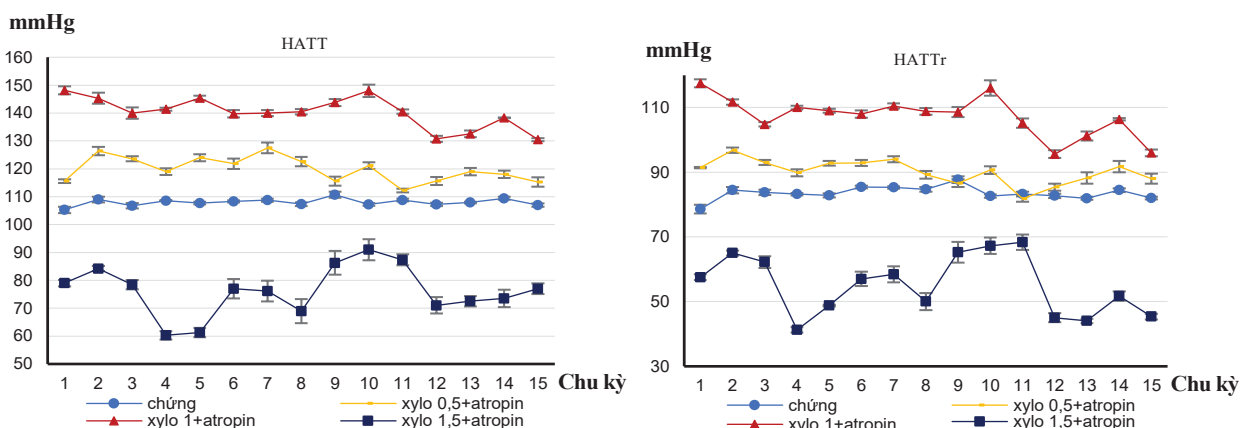
3.2. Khảo sát tác động tăng huyết áp với xylometazoline và atropine

Đồ thị có sự phân tầng rõ rệt giữa 4 lô thử, nằm ở cận trên với huyết áp tâm thu cao nhất là lô xylo 1 + atropine và cận dưới là lô xylo 1,5 + atropine (hình 3).

Ở lô xylo 0,5 + atropine, huyết áp tâm thu nằm trong khoảng 112-128 mmHg và bắt đầu tăng trên 120 mmHg từ chu kỳ 2, nhưng không liên tục ở chu kỳ 4 và sau đó giảm dần đều từ chu kỳ 7.

Ở lô xylo 1 + atropine, huyết áp tâm thu nằm trong khoảng 131-148 mmHg và bắt đầu tăng trên 130 mmHg từ chu kỳ 1. Sau đó, giảm dần đều từ chu kỳ 10 và có 15/15 chu kỳ đạt huyết áp tâm thu ≥ 130 mmHg.

Ở lô xylo 1,5 + atropine, huyết áp tâm thu giao động mạnh và nằm trong khoảng 60-91 mmHg, bắt đầu giảm dưới 100 mmHg từ chu kỳ 1.



Hình 3. Chỉ số huyết áp trong 15 chu kỳ khảo sát tác động tăng huyết áp với xylometazoline và atropine.

Bảng 2. Kết quả chỉ số tim mạch trung bình trong 15 chu kỳ khảo sát tác động tăng huyết áp với xylometazoline và atropine.

Nhóm	Chỉ số sinh lý			Chỉ số trung bình 15 chu kỳ đo		
	HATT (mmHg)	HATTr (mmHg)	Nhịp tim (nhịp/phút)	HATT (mmHg)	HATTr (mmHg)	Nhịp tim (nhịp/phút)
Chứng	104,84±7,41	76,58±10,42	478,38±72,93	108,13±1,29	83,66±2,07	474,35±23,20
Lô xylo 0,5 + atropine	111,01±2,00	87,45±2,47	452,96±34,41	119,83±3,46**	90,15±3,79**	422,62±63,97
Lô xylo 1 + atropine	105,74±6,22	80,76±5,43	425,61±57,47	140,34±5,58**	106,96±6,23**	441,34±40,94
Lô xylo 1,5 + atropine	106,90±3,98	80,76±3,87	544,34±51,20	76,26±13,87**	55,13±9,20**	52,41±60,73

** $p < 0,01$: khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô chứng. HATT: huyết áp tâm thu, HATTr: huyết áp tâm trương.

Kết quả bảng 2 cho thấy, trong thử nghiệm, chỉ số huyết áp tâm thu trung bình lớn nhất trong 15 chu kỳ đo được ghi nhận ở lô xylo 1 + atropine, ngược lại các chỉ số tim mạch thấp nhất được quan sát thấy ở lô xylo 1,5 + atropine. Ở lô xylo 1,5 + atropine nhận thấy có sự giảm mạnh trên cả 3 chỉ số, trong đó chỉ số huyết áp tâm thu và huyết áp tâm trương trung bình giảm so với lô chứng lần lượt là 31,87 và 28,53 mmHg, đồng thời nhịp tim trung bình giảm hơn 9 lần so với lô chứng và 8 lần so với các lô còn lại.

3.3. Huyết áp sau khi được điều trị bằng thuốc đối chứng

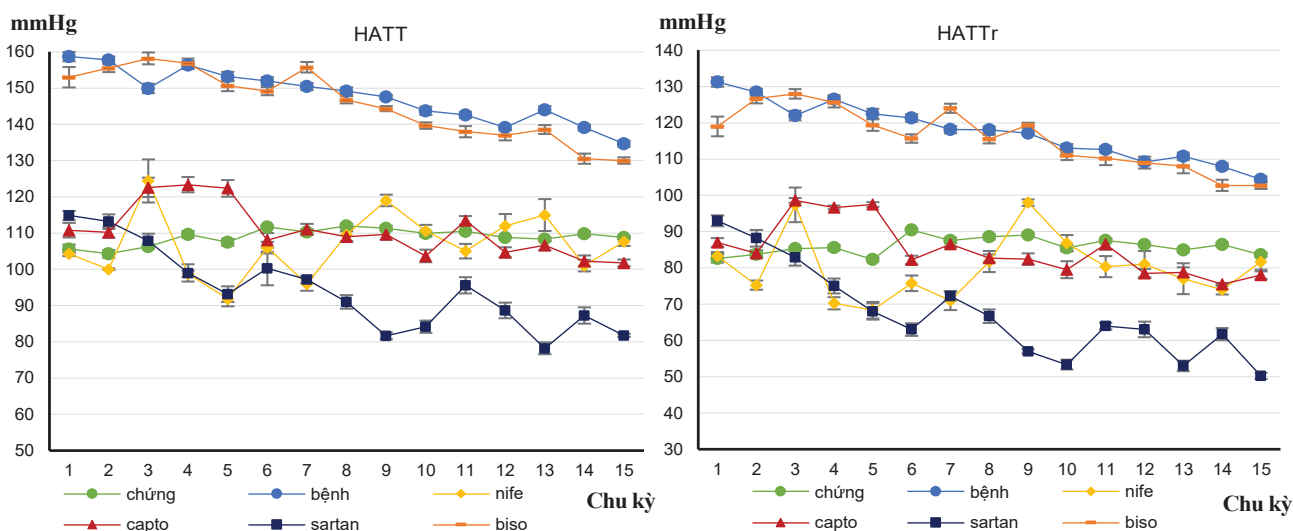
Kết quả thử nghiệm cho thấy, ở lô nife, huyết áp tâm thu giao động mạnh trong khoảng 92-124 mmHg, trong đó giao động lớn nhất được quan sát thấy ở chu kỳ 3 có huyết áp tâm thu là 124 mmHg, huyết áp tâm thu <120 mmHg chiếm 14/15 chu kỳ còn lại (hình 4).

Ở lô capto, huyết áp tâm thu >120 mmHg quan sát thấy ở chu kỳ 3-5, huyết áp tâm thu <120 mmHg là các chu kỳ còn lại chiếm 12/15 chu kỳ.

Ở lô sartan, huyết áp tâm thu phân bố khoảng 78-115 mmHg và giảm mạnh từ chu kỳ 1 đến chu kỳ 5, sau đó giảm liên tục đến chu kỳ 15, huyết áp tâm thu thấp nhất ghi nhận ở chu kỳ 13 là 78 mmHg.

Ở lô biso, huyết áp tâm thu gần như không có sự khác biệt so với lô bệnh nằm trong khoảng 130-158 mmHg, trong đó các chu kỳ có huyết áp tâm thu ≥ 120 mmHg chiếm 15/15 chu kỳ và không có chu kỳ nào có huyết áp tâm thu <120.

Kết quả bảng 3 cho thấy, ở lô nife, capto và sartan cả huyết áp tâm thu và huyết áp tâm trương trung bình đều giảm đáng kể so với lô bệnh, huyết áp tâm thu trung bình trên 15 chu kỳ giảm lần lượt là 41,25, 37,36 và 53,73 mmHg so với lô bệnh và huyết áp tâm trương trên 15 chu kỳ giảm



Hình 4. Chỉ số huyết áp trong 15 chu kỳ khảo sát tác động điều trị với thuốc đối chứng.

Bảng 3. Kết quả chỉ số tim mạch trung bình trên 15 chu kỳ trong đánh giá tác động điều trị tăng huyết áp bằng thuốc đối chứng.

Nhóm	Chỉ số sinh lý			Chỉ số trung bình 15 chu kỳ đo		
	HATT (mmHg)	HATTr (mmHg)	Nhịp tim (nhịp/phút)	HATT (mmHg)	HATTr (mmHg)	Nhịp tim (nhịp/phút)
Lô chứng	111,84±1,90	87,81±2,26	497,63±17,44	109,09±2,24	86,12±2,31	480,91±23,28
Lô bệnh	110,68±2,40	86,03±2,96	474,07±40,43	147,98±7,25 ^{##}	117,61±7,88 ^{##}	496,70±44,82
Lô nife	108,61±2,70	85,15±2,34	494,34±22,75	106,73±8,75 ^{**}	80,12±8,82 ^{**}	489,89±55,69
Lô capto	109,24±1,73	84,60±2,16	445,70±29,11	110,62±7,12 ^{**}	84,96±7,35 ^{**}	408,12±41,95
Lô sartan	108,61±2,82	84,17±2,32	486,33±34,55	94,25±11,35 ^{**}	67,41±12,81 ^{**}	254,13±65,16
Lô biso	105,64±3,20	81,48±3,46	487,79±29,70	146,45±9,95 ^{##}	116,28±8,05 ^{##}	436,33±30,87

^{**}: p<0,01: khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô bệnh, ^{##}: p<0,01: khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô chứng. HATT: huyết áp tâm thu, HATTr: huyết áp tâm trương.

lần lượt là 37,49, 32,65 và 50,20 mmHg. Đặc biệt, nhịp tim trên lô sartan giảm rất thấp, khoảng 50% so với các lô còn lại. Thử nghiệm chưa tìm thấy sự khác biệt trên các chỉ số tim mạch giữa lô biso và lô bệnh.

4. Bàn luận

Hiện nay, ở Việt Nam các mô hình được lý về thử nghiệm tăng huyết áp trên chuột đang rất được quan tâm. Để khảo sát tác động của một thuốc hạ huyết áp, đòi hỏi phải trải qua nhiều quá trình nghiên cứu, do vậy việc xây dựng được các mô hình tăng huyết áp trên chuột là một trong những thử nghiệm đóng vai trò quan trọng trong sàng lọc và đánh giá tác động của các thuốc trên tim mạch. Mô hình được xây dựng dựa trên tác động dược lý của các thuốc gây bệnh và các thuốc điều trị, từ đó quan sát sự thay đổi các chỉ số tim mạch trên chuột, đặc biệt là 3 chỉ số huyết áp tâm thu, huyết áp tâm trương và nhịp tim.

Kết quả khảo sát chỉ số tim mạch sinh lý trên 504 chuột nhất đực, chúng tôi thu được huyết áp tâm thu sinh lý là 109±14 mmHg, huyết áp tâm trương sinh lý là 83±15 mmHg và nhịp tim sinh lý là 463±121 nhịp/phút. Kết quả huyết áp tâm thu sinh lý có sự tương đồng với một số thử nghiệm trên chuột như: H. Duplain và cs (2001) [2] với huyết áp tâm thu sinh lý là 106±1 mmHg, P. Wiesel và cs (2001) [5] với huyết áp tâm thu sinh lý là 108±5 mmHg, V.T. Nguyen và cs (2014) [6] với huyết áp tâm thu sinh lý là 114±5,1 mmHg.

Bên cạnh đó, một số nghiên cứu có kết quả huyết áp tâm thu sinh lý khác biệt so với nghiên cứu của chúng tôi như: S. Rajagopalan và cs (1996) [7] với huyết áp tâm thu sinh

lý là 130±2 mmHg, G.C. Silva và cs (2016) [8] với huyết áp tâm thu sinh lý 128±4 mmHg, S. Sriramula và cs (2015) [9] với huyết áp tâm thu sinh lý 122±4 mmHg. Vì trong thử nghiệm của chúng tôi, vị trí đo huyết áp được thực hiện trên động mạch đuôi (ngoại vi) cách xa huyết áp trung tâm với thiết bị phát hiện huyết áp hoạt động trên cơ chế áp lực khí, nên có khác biệt với một số thiết bị hồng ngoại cho ngưỡng huyết áp lớn hơn.

Chúng tôi nhận thấy các chỉ số huyết áp tâm thu sinh lý trên chuột thấp hơn khoảng 10 mmHg so với trên người (120 mmHg), nhịp tim cao gấp 4-5 lần so với người (60-100 nhịp/phút) và huyết áp tâm trương tương tự trên người (80 mmHg). Theo hướng dẫn điều trị tăng huyết áp của các tổ chức như WHO, Ủy ban Liên Quốc gia lần thứ 7 (JNC7) thì mức huyết áp tâm thu bình thường là <120 mmHg, khi huyết áp tâm thu ≥140 mmHg (+20 mmHg) thì được chẩn đoán là tăng huyết áp. Từ đó, chúng tôi đưa ra mức tăng huyết áp trong thử nghiệm này là huyết áp tâm thu ≥130 mmHg.

Đồng thời, việc khảo sát tác động tăng huyết áp trên 15 chu kỳ có khoảng thời gian là 20 phút, tương tự với thời gian nghiên cứu gây tăng huyết áp cấp tính trên chuột bằng angiotensin II của M. Ye và cs (2012) [10] là 20 phút. Vì vậy, chúng tôi chọn 15 chu kỳ đo làm tiêu chuẩn thời gian khảo sát chỉ số tim mạch cho toàn bộ thử nghiệm.

Trong thử nghiệm điều trị tăng huyết áp bằng các thuốc đối chứng, tác động hạ huyết áp được nhận thấy ở các thuốc nifedipine, captopril [11], losartan đây là những thuốc tác động nhanh có cơ chế giãn mạch, còn bisoprolol là thuốc

tác động chậm với cơ chế giảm nhịp tim và giảm co bóp cơ tim, nên chưa tìm thấy tác động hạ huyết áp ở liều 50 mg/kg. Đặc biệt trên lô điều trị bằng losartan, nhịp tim giảm đáng kể, chứng tỏ ngoài cơ chế giãn mạch hạ huyết áp thì losartan còn có tác dụng làm giảm nhịp tim. Như vậy trong mô hình con tăng huyết áp với xylometazoline có vai trò gây co các tiểu động mạch kết hợp với atropine ngăn cơ chế bù trừ hạ nhịp tim đã gây tăng huyết áp tâm thu ≥ 130 mmHg và mô hình đáp ứng với các thuốc có tác động giãn mạch như nifedipine, captopril và losartan.

Việc xây dựng được mô hình đánh giá con tăng huyết áp, tạo nền tảng cho việc phát triển các mô hình tăng huyết áp khác ở Việt Nam, đồng thời tạo điều kiện nghiên cứu, bào chế, đánh giá một cách nhanh chóng tác động hạ huyết áp đối với các thuốc có nguồn gốc từ dược liệu và hóa dược. Mặc dù vậy, mô hình vẫn còn nhiều hạn chế như: liều atropine chưa được khảo sát ở các liều khác nhau, thời gian khảo sát các chỉ số tim mạch còn ngắn.

Từ kết quả nghiên cứu cho thấy, mô hình đánh giá con tăng huyết áp ở chuột nhắt gây bởi xylometazoline kết hợp với atropine đạt mức huyết áp tâm thu ≥ 130 mmHg trên cả 15 chu kỳ (20 phút) và có đáp ứng với các thuốc điều trị có cơ chế giãn mạch như nifedipine, captopril và losartan. Kết quả này cho phép mô hình tăng huyết áp cấp tính được sử dụng để nghiên cứu khảo sát thuốc điều trị tăng huyết áp ở Việt Nam.

5. Kết luận

Nghiên cứu khảo sát được chỉ số tim mạch sinh lý trên 504 chuột đực với kết quả huyết áp tâm thu là 109 ± 14 mmHg, huyết áp tâm trương là 83 ± 15 mmHg và nhịp tim là 463 ± 121 nhịp/phút.

Xây dựng được mô hình đánh giá con tăng huyết áp trên chuột nhắt với xylometazoline liều 1 mg/kg (IP) và atropine liều 0,4 mg/kg (SC) cho kết quả huyết áp tâm thu ≥ 130 mmHg liên tục trên 15 chu kỳ trong vòng 20 phút, phù hợp với điều kiện tăng huyết áp thực tế để ứng dụng khảo sát tác động hạ huyết áp của các thuốc điều trị.

Chứng minh được tác động hạ huyết áp của các thuốc nifedipine 6 mg/kg, losartan 100 mg/kg, captopril 100 mg/kg trong mô hình đánh giá con tăng huyết áp.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] World Health Organization (2013), "A global brief on hypertension: Silent killer, global public health crisis", *World Health Day 2013*, 40pp.
- [2] H. Duplain, R. Burcelin, C. Sartori, et al. (2001), "Insulin resistance, hyperlipidemia, and hypertension in mice lacking endothelial nitric oxide synthase", *Circulation*, **104**(3), DOI: 10.1161/01.cir.104.3.342.
- [3] S.A. Doggrel, L. Brown (1998), "Rat models of hypertension, cardiac hypertrophy and failure", *Cardiovasc. Res.*, **39**(1), pp.89-105, DOI: 10.1016/s0008-6363(98)00076-5.
- [4] J.A.K. Roy, J.B. Halter, S.M. Gordon, et al. (1990), "Role of the central nervous system in hemodynamic and sympathoadrenal responses to cocaine in rats", *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **255**(1), pp.154-160.
- [5] P. Wiesel, A.P. Patel, I.M. Carvajal, et al. (2001), "Exacerbation of chronic renovascular hypertension and acute renal failure in heme oxygenase-1-deficient mice", *Circulation Research*, **88**(10), pp.1088-1094, DOI: 10.1161/hh1001.091521.
- [6] V.T. Nguyen, T.T. Nguyen (2014), "Building a model of hypertension in experimental animals", *Journal of Practical Medicine*, **914**(3), pp.125-126 (in Vietnamese).
- [7] S. Rajagopalan, S. Kurz, M. Tarpey, et al. (1996), "Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone", *Journal of Clinical Investigation*, **97**(8), pp.1916-1923, DOI: 10.1172/JCI118623.
- [8] G.C. Silva, J.F. Silva, T.F. Diniz, et al. (2016), "Endothelial dysfunction in DOCA-salt-hypertensive mice: Role of neuronal nitric oxide synthase-derived hydrogen peroxide", *Clin. Sci. (Lond)*, **130**(11), pp.895-906, DOI: 10.1042/CS20160062.
- [9] S. Sriramula, H. Xia, P. Xu, et al. (2015), "Brain-targeted ACE2 overexpression attenuates neurogenic hypertension by inhibiting COX mediated inflammation", *Hypertension*, **65**(3), pp.577-586, DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.04691.
- [10] M. Ye, J. Wysocki, M. Salem, et al. (2012), "Murine recombinant angiotensin-converting enzyme", *Hypertension*, **60**(3), pp.730-740, DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.112.198622.
- [11] Y.M. Hardy, A.T. Jenkins (2011), "Hypertensive crises: Urgencies and emergencies", *U.S. Pharm.*, **36**(3), <https://www.uspharmacist.com/article/hypertensive-crises-urgencies-and-emergencies>, accessed 20 September 2022.

Ứng dụng màng collagen từ màng ối người làm giá thể nuôi cấy tế bào bám dính trong kỹ nghệ mô

Nguyễn Thanh Bình^{1,2}, Nguyễn Thị Thu Hiền¹, Ngô Thái Minh Quân², Dương Phương Thanh², Trần Thị Thanh Thủy³, Nhan Ngọc Hiền³, Nguyễn Khánh Hoà³, Hoàng KC Hương³, Nguyễn Tuấn Kiệt⁴, Nguyễn Minh Cần⁵, Huỳnh Duy Thảo^{3*}

¹Khoa Y Dược, Trường Đại học Thủ Dầu Một, 6 Trần Văn Ôn, phường Phú Hoà, TP Thủ Dầu Một, tỉnh Bình Dương, Việt Nam

²Trung tâm Nghiên cứu Y sinh, Trường Đại học Y khoa Phạm Ngọc Thạch, 2 Dương Quang Trung, phường 12, quận 10, TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

³Khoa Khoa học Cơ bản - Y học Cơ sở, Trường Đại học Y khoa Phạm Ngọc Thạch, 2 Dương Quang Trung, phường 12, quận 10, TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

⁴Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh, 227 Nguyễn Văn Cừ, phường 4, quận 5, TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

⁵Viện Phát triển Ứng dụng, Trường Đại học Thủ Dầu Một, 6 Trần Văn Ôn, phường Phú Hoà, TP Thủ Dầu Một, tỉnh Bình Dương, Việt Nam

Ngày nhận bài 16/1/2023; ngày chuyển phản biện 18/1/2023; ngày nhận phản biện 13/2/2023; ngày chấp nhận đăng 16/2/2023

Tóm tắt:

Màng ối người đã được sử dụng phổ biến trong lâm sàng để điều trị các loại tổn thương liên quan đến bề mặt biểu mô, tái cấu trúc biểu mô giác mạc, chấn thương chỉnh hình. Hiện tại, một khía cạnh ứng dụng khác của màng ối người được quan tâm rất lớn là sử dụng làm giá thể nuôi cấy tế bào bám dính *in vitro*. Trong nghiên cứu này, màng ối người được thu nhận trong điều kiện vô trùng tại phòng mổ, được xét nghiệm âm tính với HIV, HBV, HCV, VDRL và xử lý để loại bỏ lớp biểu mô, thu nhận màng collagen dùng làm giá thể nuôi cấy tế bào bám dính. Màng collagen được đánh giá cấu trúc bằng phương pháp nhuộm mô học (H&E), SEM, thử nghiệm làm giá thể nuôi cấy các nguyên bào sợi người và đánh giá sự bám dính, tăng trưởng và phát triển của tế bào bằng các hình ảnh mô học theo thời gian nuôi cấy. Các kết quả hình ảnh thu nhận trước và sau khi xử lý cho thấy, màng collagen có cấu trúc vô bào, vẫn duy trì được cấu trúc của lớp màng đáy. Kết quả nuôi cấy tế bào cho thấy, các nguyên bào sợi đã bám dính và phát triển tốt trên màng collagen này.

Từ khoá: giá thể collagen, giá thể nuôi tế bào, màng ối người, nguyên bào sợi.

Chỉ số phân loại: 3.5

1. Mở đầu

Màng ối người đã được sử dụng phổ biến trong lâm sàng để điều trị tổn thương bề mặt biểu mô như bong, tái cấu trúc bề mặt biểu mô giác mạc, hội chứng Stevens - Johnson, trong chuyên ngành nha khoa, chấn thương chỉnh hình [1-6]. Tuy nhiên thời gian gần đây, màng ối người lại được xử lý để làm giá thể nuôi cấy tế bào trong kỹ nghệ mô [7, 8].

Giá thể dùng để nuôi cấy tế bào phải thỏa mãn các tiêu chí sau. Giá thể cần phải hỗ trợ tế bào bám dính, cảm ứng tăng sinh và phát triển của tế bào. Ngoài ra, giá thể cũng hỗ trợ cho tế bào ghép tích hợp thuận lợi vào mô chủ [9]. Hiện tại, các loại giá thể được sử dụng phổ biến là các loại polymer tổng hợp như polyglycolic acid (PGA) và polylactic acid (PLLA) hay các loại polymer tự nhiên như collagen, alginate, hydrogel cũng được sử dụng rộng rãi. Tuy nhiên, cả 2 dạng polymer này đòi hỏi một quá trình chế tạo và xử lý phức tạp để dùng làm giá thể nuôi cấy tế bào *in vitro*. Ngoài ra, các loại giá thể này cũng thiếu lớp màng đáy và không thể tái lập được các “niche” của tế bào hay vi môi trường cho sự bám dính và tăng sinh của tế bào [10].

Để tìm một loại giá thể phù hợp cho các đặc tính trên thì màng ối người là một “ứng viên” nổi bật với nhiều đặc tính hấp dẫn như vật liệu vô bào, có tính tương hợp sinh học, phân hủy sinh học và quan trọng hơn màng ối người là một loại vật liệu sinh học tự nhiên được ứng dụng thành công trong cấy ghép mô từ rất sớm [6]. Việc loại bỏ tế bào biểu mô và tế bào của khung nền ngoại bào của lớp đáy làm giảm các đáp ứng miễn dịch nhưng vẫn giữ lại khung nền ngoại bào như collagen, glycosaminoglycan, fibronectin và vitronectin giúp tế bào nuôi cấy bám dính, tăng sinh và phát triển tốt trên màng [7, 11, 12]. Ngoài ra, màng ối người vô bào đã được xác định không gây độc cho tế bào trong điều kiện nuôi cấy *in vitro* [13]. Hiện nay, màng ối người đang được thử nghiệm để làm giá thể nuôi cấy tế bào gốc, tế bào rìa giác mạc và đặc biệt là tế bào sừng trong điều trị bỏng [3, 10, 14, 15]. Do đó, chúng tôi tiến hành nghiên cứu này với mục tiêu thiết lập được quy trình hiệu quả để thu nhận giá thể collagen và thử nghiệm dùng giá thể collagen để nuôi nguyên bào sợi da người.

*Tác giả liên hệ: Email: thaohuynhduy@pnt.edu.vn

Application of collagen membrane from amniotic membrane as a substrate for adherent cell culturing in tissue engineering

Thanh Binh Nguyen^{1,2}, Thi Thu Hien Nguyen¹,
Thai Minh Quan Ngo², Phuong Thanh Duong²,
Thi Thanh Thuy Tran³, Ngoc Hien Nhan³,
Khanh Hoa Nguyen³, KC Huang Hoang³,
Tuan Kiet Nguyen⁴, Minh Can Nguyen⁵, Duy Thao Huynh^{3*}

¹Faculty of Medicine and Pharmacy, Thu Dau Mot University,

6 Tran Van Street, Phu Hoa Ward, Thu Dau Mot City, Binh Duong Province, Vietnam

²Biomedical Research Center, Pham Ngoc Thach University of Medicine,

2 Duong Quang Trung Street, Ward 12, District 10, Ho Chi Minh City, Vietnam

³Faculty of Fundamental Sciences, Pham Ngoc Thach University of Medicine,

2 Duong Quang Trung Street, Ward 12, District 10, Ho Chi Minh City, Vietnam

⁴University of Science, Vietnam National University - Ho Chi Minh City,

227 Nguyen Van Cu Street, Ward 4, District 5, Ho Chi Minh City, Vietnam

⁵Faculty of Biology, Thu Dau Mot University,

6 Tran Van On Street, Phu Hoa Ward, Thu Dau Mot City, Binh Duong Province, Vietnam

Received 16 January 2023; revised 13 February 2023; accepted 16 February 2023

Abstract:

The human amniotic membrane has been widely used in clinical practice to treat all kinds of lesions related to the epithelial surface, corneal epithelial reconstruction, and orthopaedic trauma. Currently, another application aspect of the amniotic membrane of great interest is its use as an *in vitro* adherent cell culture medium. In this study, the human amniotic membranes were collected under sterile conditions in the operating room and tested negative for HIV, HBV, HCV, and VDRL. The amniotic membranes were then processed to remove the epithelial layer, to obtain a collagen membrane that can be used as a substrate for cell culture adhesion. Following that, the collagen membrane was structurally evaluated by Hematoxylin and eosin (H&E) staining, SEM. Next, we tested the use of collagen membranes as a culture medium for human fibroblasts and evaluated cell adhesion, growth, and development by histological images over time of cell culture. The image results obtained before and after processing showed that the collagen membrane has an acellular structure, maintaining the basement membrane's structure. Cell culture results exhibited that fibroblasts adhered and developed well on this collagen membrane.

Keywords: collagen membrane, fibroblasts, human amniotic membrane, scaffold cell culture.

Classification number: 3.5

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng

Màng ối người được thu nhận trong điều kiện vô trùng tại phòng mổ ngay sau khi mổ nhau. Màng ối được cho vào các chai Duran 500 ml có chứa PBS vô trùng. Sau đó, màng ối được chuyển về phòng thí nghiệm và giữ ở nhiệt độ 4°C để chờ thực hiện các xét nghiệm. Màng ối chỉ được xử lý thành màng collagen khi có các xét nghiệm âm tính với HIV, HBV, HCV và VDRL. Nguyên bào sợi da người được thu nhận, phân lập và nuôi cấy trong môi trường gồm DMEM/F12, 15% FBS và kháng sinh (Penicilline/Streptomycine).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

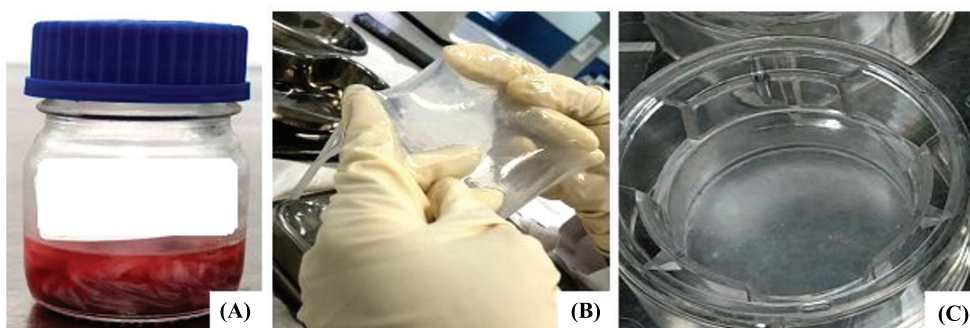
Thu nhận và xử lý màng ối người thành màng collagen: Màng ối được xử lý để thu nhận màng collagen theo quy trình ở bảng 1.

Bảng 1. Quy trình xử lý màng ối người để thu nhận màng collagen dùng làm giá thể nuôi cấy tế bào.

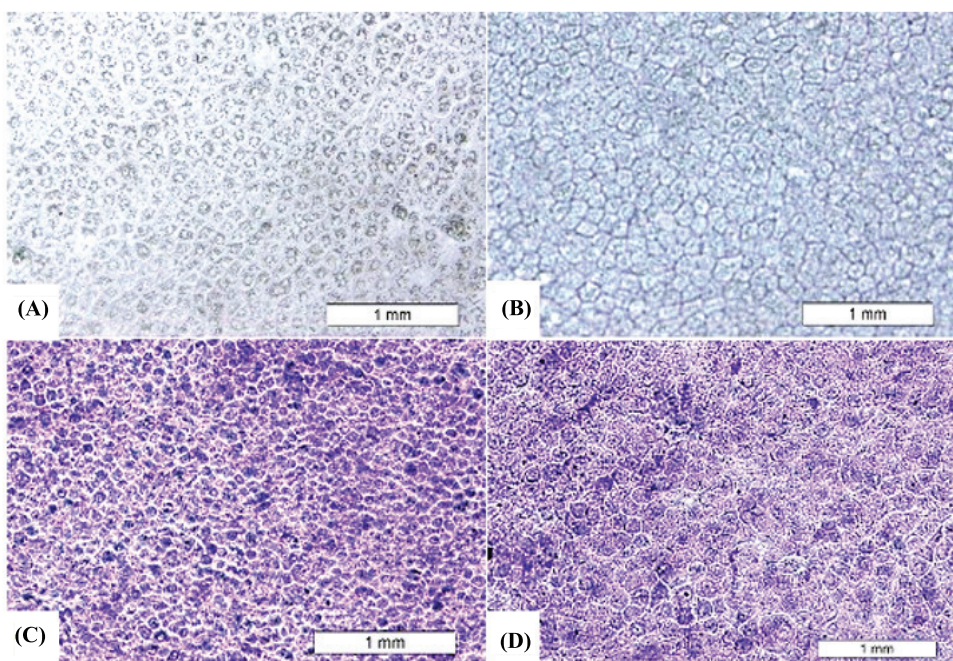
Thứ tự	Các bước thực hiện	Dụng cụ, hoá chất
1	Lắc và rửa sạch màng ối với dung dịch PBS để loại bỏ máu, mô thừa (lặp lại 3 lần)	PBS (Gibco), pH 7,4
2	Ủ với hỗn hợp dung dịch Trypsin-EDTA, 100 ml dung dịch enzyme cho một màng ối	Trypsin 0,25% (Gibco), EDTA 0,05% (Sigma)
3	Rửa sạch màng ối với dung dịch PBS để loại bỏ enzyme (lặp lại 3 lần)	PBS (Gibco), pH 7,4
4	Cạo bỏ lớp biểu mô	Dụng cụ xử lý gồm que, gạc, kéo
5	Rửa sạch lại màng ối với dung dịch PBS	PBS (Gibco), pH 7,4
6	Trải màng trên các đĩa lồng	Cell culture insert (Nunc™)
7	Đề khô qua đêm trong tủ thao tác vô trùng ở nhiệt độ phòng	Tủ thao tác an toàn sinh học (Class II)
8	Đóng gói, khử trùng bằng tia gamma với liều 25 kGy	Trung tâm Nghiên cứu và triển khai công nghệ bức xạ (VINAGAMMA)
9	Bảo quản màng collagen ở nhiệt độ phòng	

Đánh giá giá thể collagen: Giá thể collagen sau khi thu nhận được quan sát tươi và nhuộm Giemsa dưới kính hiển vi để so sánh với màng ối chưa xử lý về hiệu quả loại bỏ lớp biểu mô. Sau đó, giá thể collagen sẽ được làm tiêu bản mô học (nhuộm H&E) và quan sát dưới kính hiển vi điện tử quét (SEM) để đánh giá cấu trúc của giá thể.

Thử nghiệm dùng giá thể collagen nuôi cấy nguyên bào sợi: Nguyên bào sợi được nuôi trong môi trường DMEM/F12, 15% FBS và kháng sinh. Tế bào sau lần cấy chuyển thứ 2 được thu nhận bằng dung dịch Trypsin-EDTA (0,25-0,05%) và chuyển lên giá thể collagen với mật độ 10^4 nguyên bào sợi/cm² bề mặt giá thể collagen. Sau 3 ngày nuôi sẽ tiến hành thay môi trường nuôi mới. Việc nuôi cấy này sẽ tiến hành theo dõi trong thời gian 2 tuần, tế bào được theo dõi và quan sát dưới kính hiển vi đảo ngược. Tại các mốc thời gian nuôi cấy 1 và 2 tuần, tế bào được nuôi trên giá thể collagen được thu nhận lại để làm tiêu bản mô học (nhuộm H&E) nhằm đánh giá khả năng bám dính và phát triển của tế bào trên giá thể collagen.



Hình 1. Quá trình thu nhận màng collagen từ màng ối dùng làm giá thể nuôi cấy tế bào bám dính. (A) Màng ối người sau khi được thu nhận từ phòng mổ; (B) Màng collagen được thu nhận từ màng ối; (C) Màng collagen đã được trải trên đĩa lòng để sẵn sàng nuôi tế bào bám dính.



Hình 2. Màng ối người. (A, B) Màng ối được quan sát tươi dưới kính hiển vi (10X), (20X); (C, D) Màng ối được nhuộm Giemsa quan sát dưới kính hiển vi (10X), (20X).

2.3. Đạo đức nghiên cứu

Nghiên cứu đã được thông qua Hội đồng đạo đức trong nghiên cứu y sinh học theo quyết định số 219/QĐ-HĐTr ngày 7/2/2022 của Chủ tịch Hội đồng Trường Đại học Thủ Dầu Một (Số HĐĐĐ.22.06-001).

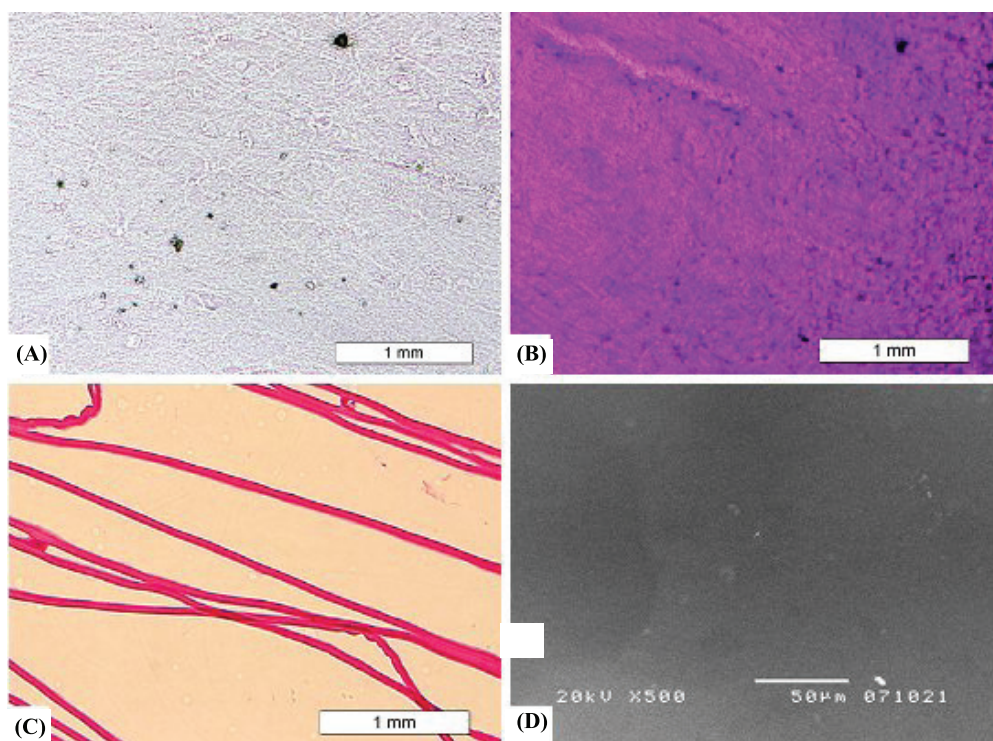
3. Kết quả

3.1. Kết quả thiết lập quy trình xử lý và thu nhận màng collagen

Màng ối sau khi được xử lý theo quy trình do nhóm nghiên cứu thiết lập tại bảng 1 đã loại bỏ được hoàn toàn lớp tế bào biểu mô bề mặt. Cấu trúc màng ối vẫn còn giữ được nguyên vẹn. Màng ối sau xử lý được xem như là màng collagen vì cấu trúc chủ yếu là khung nền collagen (thành phần cấu tạo chính của màng ối). Màng collagen này sẽ được trải lên trên các đĩa lòng để chuẩn bị làm giá thể nuôi tế bào (hình 1).

Màng ối sau khi được thu nhận và loại bỏ mô máu, mô thừa vẫn duy trì cấu trúc toàn vẹn, ổn định, lớp biểu mô bề mặt màng ối vẫn còn nguyên vẹn (hình 2).

Kết quả đánh giá hình thái và cấu trúc của màng collagen sau khi được thu nhận từ màng ối được mô tả ở hình 3. Kết quả cho thấy, màng ối sau khi được xử lý đã loại bỏ hoàn toàn lớp biểu mô, không còn xuất hiện bất kỳ một tế bào biểu mô màng ối khi quan sát tươi (hình 3A) cũng như sau khi nhuộm Giemsa (hình 3B). Điều này cũng được minh chứng thêm bằng kết quả mô học, màng collagen được đem đi làm tiêu bản và quan sát trên kính hiển vi cho thấy tất cả cấu trúc bề mặt lớp biểu mô đã được loại bỏ (hình 3C).



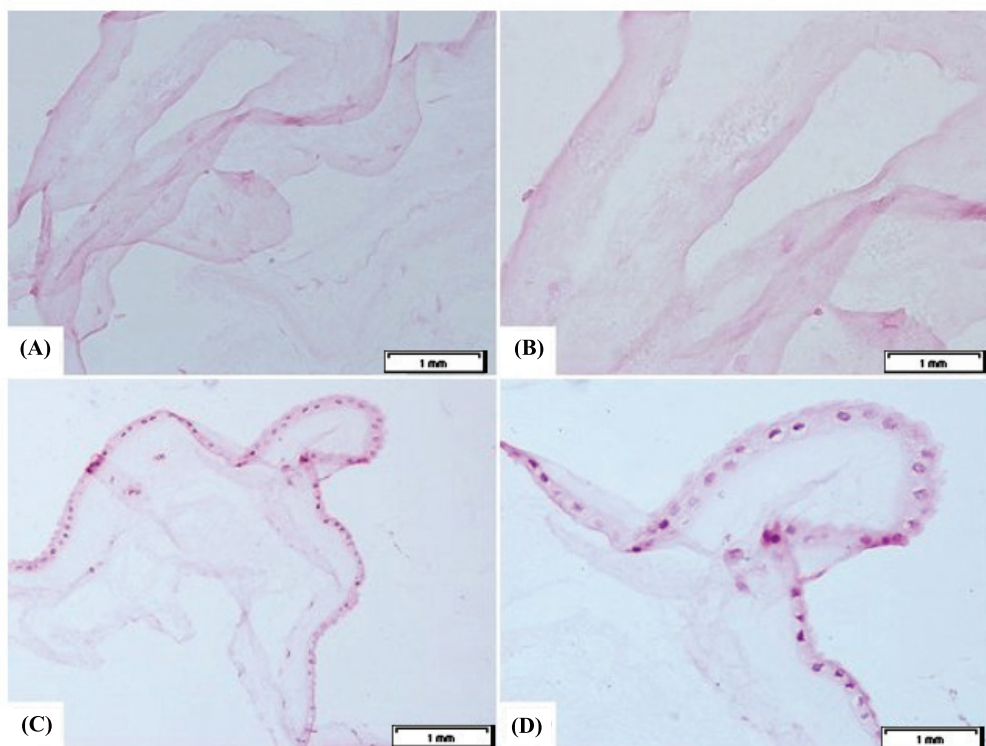
Hình 3. Kết quả đánh giá màng collagen sau khi thu nhận. (A) Màng collagen quan sát tươi dưới kính hiển vi sau khi xử lý (10X); (B) Màng collagen được nhuộm Giemsa (10X); (C) Màng collagen được nhuộm H&E (20X); (D) Màng collagen được chụp dưới SEM 50 μm.

Kết quả khẳng định lại khi quan sát màng collagen dưới SEM. Kết quả quan sát cho thấy, bề mặt của lớp biểu mô đã hoàn toàn được loại bỏ, cấu trúc màng ối chỉ còn giữ lại lớp đáy với cấu trúc nguyên vẹn và cũng không thấy sự hiện diện của các tế bào của mô liên kết trong khung nền của lớp đáy.

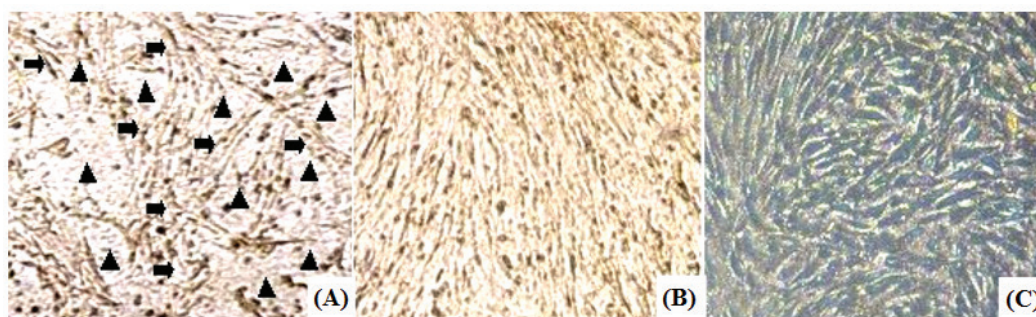
Kết quả thu nhận màng collagen cho thấy, quy trình mà nhóm nghiên cứu đã thiết lập có hiệu quả để loại bỏ lớp biểu mô màng ối nhưng vẫn giữ lại được cấu trúc khung ngoại bào của lớp màng đáy. Cấu trúc của màng collagen cho thấy đã loại bỏ sạch được lớp biểu mô cũng như các tế bào của mô liên kết trong lớp màng đáy.

3.2. Kết quả ứng dụng màng collagen dùng làm giá thể nuôi tế bào

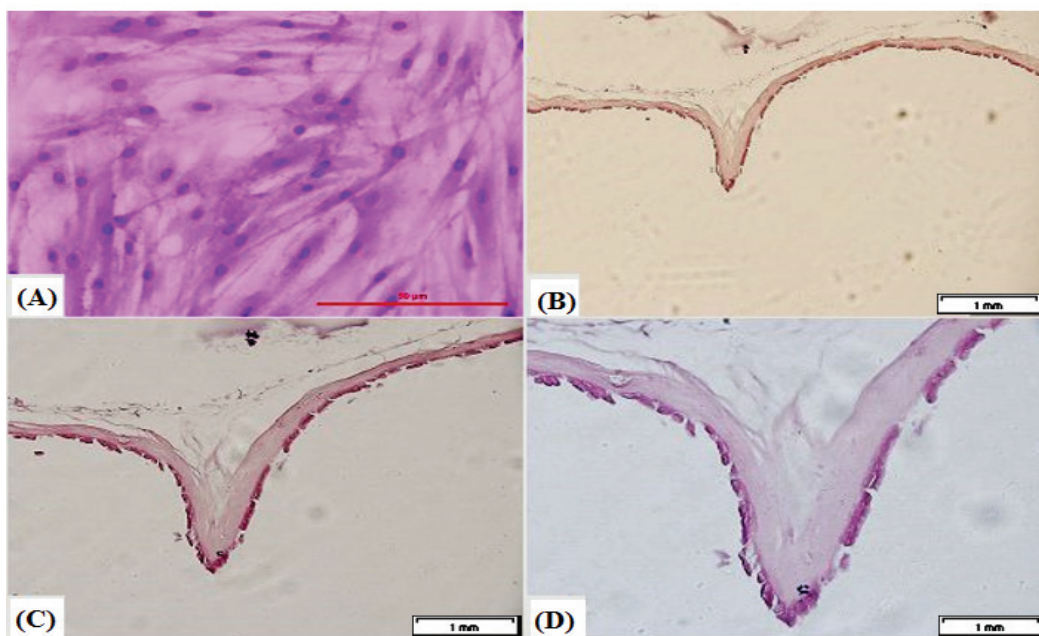
Kết quả nuôi cấy nguyên bào sợi trên màng collagen cho thấy, tế bào bám dính, tăng trưởng và phát triển tốt trên màng (hình 5). Nguyên bào sợi vẫn duy trì được hình thái thon dài đặc trưng của tế bào trung mô khi quan sát dưới kính hiển vi đảo ngược theo thời gian nuôi cấy, điều này minh chứng cho thấy màng collagen là một giá thể không gây độc cho tế bào nuôi cấy. Theo thời gian nuôi cấy, tế bào bám dính và tăng trưởng ngày càng nhiều trên giá thể collagen.



Hình 4. So sánh cấu trúc của màng collagen và màng ối khi được nhuộm H&E. (A, B) Màng collagen được quan sát lần lượt ở vật kính (20X), (40X); (C, D) Màng ối người được quan sát lần lượt ở vật kính (20X), (40X).



Hình 5. Kết quả nuôi cấy nguyên bào sợi trên màng collagen. (A) Nguyên bào sợi nuôi trên màng collagen sau 3 ngày nuôi cấy (20X), nguyên bào sợi (mũi tên màu đen) bám dính và phát triển được trên màng collagen (tam giác màu đen); (B) Nguyên bào sợi sau 7 ngày nuôi cấy (20X); (C) Nguyên bào sợi sau 14 ngày nuôi cấy (40X), khi quan sát dưới kính hiển vi đảo ngược pha, hình thái nguyên bào sợi vẫn được duy trì, tế bào bám dính và mật độ tế bào gia tăng theo thời gian nuôi cấy.



Hình 6. Kết quả nuôi nguyên bào sợi trên màng collagen sau 14 ngày nuôi cấy. (A) Nguyên bào sợi được phân lập và nuôi cấy tại lần cấy chuyển thứ hai (10X); (B-D) Nguyên bào sợi bám dính và phát triển trên màng collagen từ màng ối (10X, 20X và 40X).

Sau 14 ngày nuôi cấy, nguyên bào sợi trên giá thể collagen được thu nhận lại làm tiêu bản mô học và nhuộm H&E (hình 6). Kết quả cho thấy, tế bào bám dính và tăng trưởng được trên bề mặt giá thể collagen. Trong khi bám dính, tăng trưởng và di chuyển trên màng collagen thì tế bào vẫn duy trì hình dạng thon dài, bầu dục mang đặc trưng của tế bào trung mô.

4. Bàn luận

Màng ối người đã được sử dụng từ rất sớm trên lâm sàng trong nhiều chuyên ngành như hỗ trợ điều trị các tổn thương do bỏng gây ra cũng như sử dụng làm vật liệu che

phủ vết thương trong các tổn thương mất da, viêm loét. Sau đó, màng ối được sử dụng phổ biến hơn trong các chuyên ngành khác [1-6]. Màng ối người cho thấy là một loại vật liệu sinh học tự nhiên an toàn và hiệu quả để sử dụng trên lâm sàng [1, 2, 6]. Từ đó, màng ối có thể trở thành một vật liệu lý tưởng để phát triển làm giá thể nuôi cấy tế bào bám dính trong kỹ nghệ mô [3, 6, 8, 12, 14, 15]. Hiện tại, đang có nhiều nhóm nghiên cứu trên thế giới đã sử dụng màng ối làm giá thể nuôi cấy tế bào sừng người, tạo ra các mảnh ghép kỹ nghệ để điều trị các tổn thương bỏng [2, 15]; nuôi cấy tế bào rìa giác mạc để điều trị các bệnh lý về mắt; nuôi cấy tế bào gốc để phát triển ra các mảnh ghép hướng đến ứng dụng điều trị trong y học tái tạo [3, 14, 15].

Từ các phân tích trên cho thấy, màng ối có tính hiệu quả, an toàn và phù hợp để tạo ra giá thể collagen dùng để nuôi

cấy tế bào. Quy trình mà nhóm nghiên cứu thiết lập cho thấy đã loại bỏ hoàn toàn lớp biểu mô màng ối cũng như đã loại bỏ được các tế bào của mô liên kết trong lớp màng đáy (hình 3). Giá thể collagen là một màng vô bào, cấu trúc chỉ còn lại phần lớp đáy, chủ yếu là khung collagen có chứa các yếu tố tăng trưởng để hỗ trợ tế bào bám dính và tăng trưởng [7, 12] (hình 5).

Để minh chứng điều này, nhóm nghiên cứu đã sử dụng giá thể collagen để nuôi nguyên bào sợi (hình 5 và 6). Kết quả cho thấy, nguyên bào sợi bám dính và phát triển được trên giá thể theo thời gian nuôi cấy. Điều này chứng tỏ giá

thể collagen không những không gây độc mà còn hỗ trợ tế bào bám dính và tăng trưởng [11].

Từ các kết quả nghiên cứu đạt được, giá thể collagen sẽ bổ sung thêm một lựa chọn trong kỹ nghệ mô để phát triển ra nhiều loại mảnh ghép dùng trong y học tái tạo [7], các mảnh ghép này được tạo ra sẽ có tính sẵn sàng sử dụng, đáp ứng nhu cầu của người bệnh trong tương lai không xa.

5. Kết luận

Nhóm nghiên cứu đã thu nhận thành công giá thể collagen từ màng ối. Màng này được xử lý để hướng đến dùng làm giá thể trong nuôi cấy tế bào bám dính. Kết quả nuôi nguyên bào sợi cho thấy, tế bào bám dính, tăng trưởng và phát triển tốt trên giá thể collagen. Như vậy, màng collagen sẽ là một giải pháp thay thế hiệu quả để chọn lựa sử dụng làm giá thể. Đây sẽ là một trong những hướng nghiên cứu đầy tiềm năng và bắt kịp xu hướng ứng dụng của kỹ nghệ mô mà hiện tại thế giới đang triển khai nghiên cứu.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Trường Đại học Thủ Dầu Một trong đề tài mã số DT.22.1-035. Các tác giả xin chân thành cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] A. Abul, M. Karam, S. Rahman (2020), "Human amniotic membrane: A new option for graft donor sites - systematic review and meta-analysis", *Int. Wound J.*, **17(3)**, pp.547-554, DOI: 10.1111/iwj.13313.

[2] M. Eskandarlou, M. Azimi, S. Rabiee, et al. (2016), "The healing effect of amniotic membrane in burn patients", *World J. Plast Surg.*, **5(1)**, pp.39-44.

[3] H.J. Lee, S.M. Nam, S.K. Choi, et al. (2018), "Comparative study of substrate free and amniotic membrane scaffolds for cultivation of limbal epithelial sheet", *Sci. Rep.*, **8**, DOI: 10.1038/s41598-018-32914-0.

[4] K. Tsubota, Y. Satake, M. Ohya, et al. (1996), "Surgical reconstruction of the ocular surface in advanced ocular cicatricial pemphigoid and Stevens-Johnson syndrome", *Am. J. Ophthalmol.*, **122(1)**, pp.38-52, DOI: 10.1016/S0002-9394(14)71962-2.

[5] R. Mohan, A. Bajaj, M. Gundappa (2017), "Human amnion membrane: Potential applications in oral and periodontal field", *J. Int. Soc. Prev. Community Dent.*, **7(1)**, pp.15-21, DOI: 10.4103/jispcd.JISPCD_359_16.

[6] H.P. Huddleston, M.R. Cohn, E.D. Haunschild, et al. (2020), "Amniotic product treatments: Clinical and basic science evidence", *Curr. Rev. Musculoskelet Med.*, **13(2)**, pp.148-154, DOI: 10.1007/s12178-020-09614-2.

[7] M. Fenelon, S. Catros, C. Meyer, et al. (2021), "Applications of human amniotic membrane for tissue engineering", *Membranes (Basel)*, **11(6)**, DOI: 10.3390/membranes11060387.

[8] D. Shaghayegh, M. Barzegar, E.A. Taghavi, et al. (2022), "Applications of acellular human amniotic membrane in regenerative medicine", *Life Sciences*, **310**, DOI: 10.1016/j.lfs.2022.121032.

[9] A. Marchini, F. Gelain (2022), "Synthetic scaffolds for 3D cell cultures and organoids: Applications in regenerative medicine", *Crit. Rev. Biotechnol.*, **42(3)**, pp.468-486, DOI: 10.1080/07388551.2021.1932716.

[10] M. Gholipourmalekabadi, M. Sameni, D. Radenkovic, et al. (2016), "Decellularized human amniotic membrane: How viable is it as a delivery system for human adipose tissue-derived stromal cells?", *Cell Prolif.*, **49(1)**, pp.115-121, DOI: 10.1111/cpr.12240.

[11] S.P. Wilshaw, J. Kearney, J. Fisher, et al. (2008), "Biocompatibility and potential of acellular human amniotic membrane to support the attachment and proliferation of allogeneic cells", *Tissue Eng. Part A*, **14(4)**, pp.463-472, DOI: 10.1089/tea.2007.0145.

[12] S.P. Wilshaw, J.N. Kearney, J. Fisher, et al. (2006), "Production of an acellular amniotic membrane matrix for use in tissue engineering", *Tissue Eng.*, **12(8)**, pp.2117-2129, DOI: 10.1089/ten.2006.12.2117.

[13] I.S. Rahadian, J. Wahyuhadi, I.K. Sudiana, et al. (2021), "Cytotoxicity test for the use of freeze-dried amniotic membranes against viability, proliferation, and apoptosis on brain cell culture: An in vitro study", *Interdisciplinary Neurosurgery*, **23**, DOI: 10.1016/j.inat.2020.100947.

[14] N. Koizumi, T. Inatomi, A.J. Quantock, et al. (2000), "Amniotic membrane as a substrate for cultivating limbal corneal epithelial cells for autologous transplantation in rabbits", *Cornea*, **19(1)**, pp.65-71.

[15] A.O. Paggiaro, M.B. Mathor, W.R. Teodoro, et al. (2020), "Evaluation of radiosterilized glycerolated amniotic membranes as a substrate for cultured human epithelial cells", *Organogenesis*, **16(1)**, pp.27-41, DOI: 10.1080/15476278.2020.1723366.

Đánh giá bước đầu ứng dụng gel protein tự thân hỗ trợ ghép da trong điều trị vết thương mất da diện rộng

Lê Quang Trí^{1*}, Phan Hữu Hùng², Vũ Thị Thanh Tâm¹, Trương Gia Huy¹, Trần Nguyễn Như Hiếu¹, Hoàng Thị Diệu Thuần¹, Trần Lê Bảo Hà³, Tô Minh Quân³, Nguyễn Thị Ngọc Mỹ³, Đoàn Nguyên Vũ³

¹Bệnh viện Quân y 7A, 466 Nguyễn Trãi, phường 8, quận 5, TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

²Bệnh viện Quân dân y miền Đông, 50 Lê Văn Việt, phường Hiệp Phú, quận 9, TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

³Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh, 227 Nguyễn Văn Cừ, phường 4, quận 5, TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

Ngày nhận bài 18/12/2023; ngày chuyển phản biện 20/12/2023; ngày nhận phản biện 12/1/2024; ngày chấp nhận đăng 15/1/2024

Tóm tắt:

Mục tiêu: Xây dựng quy trình và đánh giá tác dụng điều trị tại chỗ bằng gel protein trên vết thương ghép da của bệnh nhân. **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** Nghiên cứu mô tả báo cáo loạt ca kết quả điều trị vết thương mất da có ứng dụng gel protein trên 5 bệnh nhân vào điều trị tại Khoa Chấn thương Chỉnh hình, Bệnh viện Quân y 7A trong thời gian từ tháng 8/2023 đến tháng 11/2023. **Kết quả:** Tại thời điểm tháo băng da ghép (ngày 7) ghi nhận tỷ lệ bám dính của da ghép vào nền ghép đạt 92-97%. Thời điểm 2 tuần sau ghép, tỷ lệ bám dính da ghép đạt 97-100%. Đến thời điểm 4 tuần sau ghép, da ghép bám dính 100% trên nền ghép ở cả 5 bệnh nhân và tất cả bệnh nhân đều ghi nhận kết quả đạt yêu cầu 100% sau ghép da. **Kết luận:** Việc sử dụng gel protein trong quy trình ghép da làm tăng khả năng bám dính của da ghép, có tác dụng giảm đau, giảm tiết dịch tại vết thương, tăng tỷ lệ da ghép sống.

Từ khóa: Bệnh viện Quân y 7A, điều trị mất da, gel protein tự thân, ghép da tự thân.

Chỉ số phân loại: 3.5

1. Đặt vấn đề

Da là cơ quan lớn nhất của cơ thể, đóng vai trò che phủ, bảo vệ cơ thể khỏi các tác động của môi trường bên ngoài. Các tổn thương trên da sẽ ảnh hưởng đến chức năng da, sinh lý cơ thể và chất lượng cuộc sống. Tác nhân gây tổn thương da khá đa dạng, như vết thương do va chạm cơ học, phẫu thuật, chấn thương do các tác động bên ngoài như áp suất, vết cắt, bỏng, hoặc do tác nhân gây bệnh như tiểu đường và các bệnh lý mạch máu [1, 2]. Thông thường, da có khả năng tự làm lành đối với các vết thương nhỏ. Tiến trình lành hóa bắt đầu từ sự viêm tại vị trí tổn thương, di cư và tăng sinh tế bào, hình thành mạch máu mới và phát triển mô hạt, sửa chữa mô liên kết, tái tạo chất nền ngoại bào. Ở giai đoạn tái cấu trúc mô, các nguyên bào sợi, chất nền ngoại bào và mạch máu mới được kích thích tăng sinh và lấp đầy vị trí tổn thương, các tế bào biểu bì sẽ di cư đến và phủ kín mô da [1]. Trong điều trị vết thương, vết bỏng, phương pháp cấy ghép da tự thân được xem là tiêu chuẩn vàng. Tuy nhiên, liệu pháp này còn gặp hạn chế về kích thước vùng da cho.

Hiện nay, các vật liệu thay thế da đã được chế tạo và ứng dụng trong lâm sàng, phần lớn là ở dạng màng điều trị vết thương. Chúng có nguồn gốc đa dạng, như mảnh ghép tự thân, đồng loài, dị loài, tổng hợp nhân tạo và cả các sản phẩm từ công nghệ mô [3-5]. Chất nền ngoại bào (Extra cellular matrix - ECM) có thành phần gồm các loại collagen, proteoglycan, glycosaminoglycan (GAG), hyaluronic acid (HA). ECM chiếm tỷ trọng lớn trong mô da, đặc biệt là

phần trung bì, quy định tính mềm dẻo, độ đàn hồi và chống chịu lực của da. Một trong các yếu tố tiên quyết của quá trình lành hóa là sự sản sinh một lượng ECM đủ lớn bồi đắp và tái cấu trúc mô. Do đó, việc bổ sung ECM ngoại sinh (không trực tiếp từ cơ thể bệnh nhân) đã trở thành tiền đề của các liệu pháp điều trị tổn thương mất da. Các chế phẩm gel từ ECM được hóa lỏng bằng enzyme giữ lại các protein kết dính tế bào (collagen và elastin), glycosaminoglycans và các yếu tố tăng trưởng [6]. ECM của lớp trung bì từ da là một loại vật liệu tự nhiên, chứa thành phần lý tưởng rất thích hợp cho việc tạo ra các sản phẩm thúc đẩy nhanh quá trình chữa lành các vết thương, vết bỏng. Ngoài ra, cấu trúc và chức năng của ECM đã được chứng minh qua nhiều nghiên cứu về khả năng hỗ trợ tăng sinh, di cư của tế bào.

Dựa trên nền tảng các kết quả nghiên cứu về thu nhận và xử lý tạo gel protein từ các mô của người và động vật, như mô mỡ, màng ối, màng tim, dây rốn, cũng như kinh nghiệm về điều trị vết thương, vết bỏng của chúng tôi, đề tài này được thực hiện nhằm chế tạo gel protein từ mảnh mô da. Sau khi tẩy/loại bỏ toàn bộ tế bào, ECM trung bì da sẽ được xử lý để chế tạo gel protein và được thử nghiệm như chế phẩm điều trị vết thương, vết bỏng. Để có thêm cơ sở ứng dụng rộng rãi sản phẩm trong điều trị người bệnh, chúng tôi tiến hành nghiên cứu này nhằm: i) Xây dựng quy trình ghép da tự thân có sử dụng gel protein trong điều trị vết thương, vết bỏng; ii) Đánh giá tác dụng điều trị tại chỗ bằng gel protein trên vết thương ghép da của bệnh nhân.

*Tác giả liên hệ: Email: lqtri@gmail.com

Initial evaluation of the application of autologous protein gel in the treatment of extensive skin loss wounds

Quang Tri Le^{1*}, Huu Hung Phan², Thi Thanh Tam Vu¹, Gia Huy Truong¹, Nguyen Nhu Hieu Tran¹, Thi Dieu Thuan Hoang¹, Le Bao Ha Tran³, Minh Quan To³, Thi Ngoc My Nguyen³, Nguyen Vu Doan³

¹7A Military Hospital,

466 Nguyen Trai Street, Ward 8, District 5, Ho Chi Minh City, Vietnam

²Eastern People Military Hospital,

50 Le Van Viet Street, Hiep Phu Ward, District 9, Ho Chi Minh City, Vietnam

³University of Science, Vietnam National University - Ho Chi Minh City,

227 Nguyen Van Cu, Ward 4, District 5, Ho Chi Minh City, Vietnam

Received 18 December 2023; revised 12 January 2024; accepted 15 January 2024

Abstract:

Objective: Develop a process and evaluate the effects of local treatment with protein gel on the patient's skin graft wound. **Subjects and methods:** The case series study reported the results of treating skin loss wounds with protein gel application on 5 patients at the Department of Orthopedics and Traumatology - 7A Military Hospital from August 2023 to November 2023. **Results:** At the time of removing the skin graft bandage (day 7), a very good adhesion rate of the skin graft to the graft base was recorded (from 92-97%). After 2 weeks of transplantation, the graft skin adhesion rate reached 97-100%. By 4 weeks after transplantation, the grafted skin adhered 100% to the graft base in all 5 patients and all patients reported good results after skin grafting. **Conclusion:** The use of protein gel in the skin grafting process increases the adhesion of the grafted skin, reduces pain, reduces exudate at the wound, and increases the survival rate of the grafted skin.

Keywords: autologous protein gel, autologous skin graft, treating skin loss, 7A Military Hospital.

Classification number: 3.5

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng

Bệnh nhân nhập viện điều trị có tổn thương mất da và được chỉ định điều trị ghép da mỏng che phủ vết thương.

2.1.1. Tiêu chuẩn chọn bệnh

- Bệnh nhân trên 18 tuổi đồng ý tham gia vào nghiên cứu.
- Bệnh nhân có tổn thương mất da có chỉ định điều trị ghép da mỏng che phủ vết thương.

- Nền ghép đủ tiêu chuẩn ghép da: cân nông, ao cơ lạnh, nền sạch, bảo đảm hết hoại tử, không chảy máu nhiều.

- Nếu ghép lên nền mô hạt (khi hoại tử bóng sâu đã được cắt lọc hoặc tự rụng, hình thành mô hạt): mô hạt đỏ, sạch không có hoại tử, phẳng, rớm máu nhẹ, mật độ vi khuẩn thấp (thường $<10^5$ vi khuẩn/cm² bề mặt mô hạt).

2.1.2. Tiêu chuẩn loại trừ

- Nền tổn thương là gân, xương hoại tử và các mốc tự nhiên.

- Bệnh nhân có diện tích bóng sâu, vết thương sâu thiếu hụt nguồn da lành tự thân.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Thiết kế nghiên cứu: Báo cáo loạt ca.

2.2.2. Vật liệu và trang thiết bị nghiên cứu: Gel protein được tạo từ ECM trung bì da, có các đặc tính: màu trắng đục ở trạng thái tiền gel, vô trùng, âm tính với Mycoplasma, nội độc tố <40 EU/ml, độ nhớt 0,28-0,29 Pa, pH 7-7,4, chứa collagen, elastin, glycosaminoglycan, không gây độc đối với nguyên bào sợi da người *in vitro*, kích thích tăng sinh và di cư đối với nguyên bào sợi da người *in vitro*, tương hợp sinh học *in vivo* trên chuột.

2.2.3. Phương pháp tiến hành: Nghiên cứu tiến hành theo quy trình sau:

- Xây dựng thuyết minh nghiên cứu.

- Lựa chọn bệnh nhân: tuyển chọn 5 bệnh nhân phù hợp tiêu chí đưa vào danh sách của nghiên cứu; giải thích và xin chấp thuận tham gia nghiên cứu từ bệnh nhân.

- Can thiệp lâm sàng:

Bước 1: Chăm sóc và đánh giá vết thương, vết bóng trước phẫu thuật tại Khoa Chuẩn thương Chính hình: lập phiếu theo dõi bệnh nhân, khai thác thông tin nền của bệnh nhân.

Bước 2: Phẫu thuật cắt lọc vết thương và thu thập mẫu da:

- + Chuẩn bị: phẫu thuật viên: 2 bác sỹ; kíp vô cảm: 1 bác sỹ gây mê, 1 điều dưỡng phụ gây mê, 1 điều dưỡng vô trùng.

- + Phương tiện: Tiến hành tại phòng phẫu thuật: đảm bảo các trang thiết bị cần thiết cho cuộc phẫu thuật như bộ đại phẫu, dao lấy da cầm tay kiểu Lagrot, Blair, Jean Gosset hoặc dụng cụ mắt lưới hay dao cạo có cán. Bơm tiêm vô khuẩn 5 hoặc 10 ml; thuốc gây tê Lidocain 1% 5-20 ml (trong trường hợp gây tê tại chỗ); băng gạc, sang vô trùng, chỉ khâu...

+ Người bệnh: khám và giải thích về bệnh tình cho người bệnh và người nhà người bệnh; làm các xét nghiệm thường quy; không có tình trạng nhiễm trùng; người bệnh phải được kiểm soát tốt đường huyết bằng insulin; nước tiểu không có ceton.

Bước 3: Chăm sóc vết thương sau phẫu thuật chờ ghép da: ghi nhận tình trạng bệnh nhân vào phiếu theo dõi; rửa vết thương; phẫu thuật cắt lọc vết thương nếu vết thương chưa sạch hoặc còn tổ chức hoại tử.

Bước 4: Thực hiện ghép da có kết hợp thoa gel protein trên vết thương, vết bỏng. Tư thế bệnh nhân: Người bệnh nằm trên bàn mổ để vùng khuyết da hướng lên trên.

Vị trí phẫu thuật viên: đứng đối diện vùng ghép da.

Các kỹ thuật: sát trùng vùng lấy da bằng betadin, sau đó bằng cồn trắng 70 độ; tê dưới da bằng Lidocain 1% 10-20 ml nếu không gây tê; ghép da và thoa gel protein; băng ép vừa chặt, bất động vùng ghép khoảng 1 tuần; theo dõi vết thương, vết bỏng ghi nhận vào phiếu theo dõi.

Bước 5: Điều trị theo dõi sau ghép da: kháng sinh toàn thân (theo kháng sinh đồ, chống viêm, giảm đau); thay băng vùng ghép (sau 24 giờ), thường xuyên kiểm tra tình trạng da ghép, màu sắc, dinh dưỡng, dịch ứ đọng, viêm nhiễm; thay băng vùng lấy da cách ngày; điều trị tích cực các bệnh lý kèm theo; nâng cao thể trạng: truyền máu, đạm và các chất dinh dưỡng (khi cần thiết); ghi nhận kết quả điều trị trên lâm sàng.

- Tổng hợp dữ liệu, báo cáo kết quả nghiên cứu.

2.2.4. Các chỉ tiêu theo dõi đánh giá

- Chỉ tiêu chung về đặc điểm bệnh nhân và tình trạng toàn thân như sau:

+ Tuổi, giới tính, nguyên nhân chấn thương, diện tích, vị trí vết thương (vết bỏng).

+ Diễn biến toàn thân trong quá trình điều trị: theo dõi mạch, nhiệt độ, huyết áp trước khi thay băng, theo dõi các biểu hiện rối loạn toàn thân khác, dị ứng.

+ Theo dõi tại chỗ các triệu chứng sau: tình trạng viêm nề mềp và da lành (được xác định khi có các biểu hiện da lành phù nề, nóng, đỏ, đau hoặc xuất hiện ban đỏ); tình trạng dịch tiết, dịch mủ thấm ra ngoài lớp băng gạc. Đánh giá tình trạng tiết dịch theo 4 mức độ: nhiều, vừa, ít và hết dịch; tình trạng dị ứng tại chỗ: biểu hiện chỗ ghép da nổi mẩn ngứa, nề; tính chất hoại tử: hoại tử ướt hay hoại tử khô; số ngày điều trị: tính từ ngày bắt đầu nghiên cứu đến khi vết thương khỏi hoàn toàn; kết quả ghép da: tốt - mảnh ghép da bám sống >90%; khá - mảnh ghép da bám sống 70-90%; trung bình - mảnh ghép da bám sống 50-70%; xấu - mảnh ghép da bám sống <50%.

- Các chỉ tiêu cận lâm sàng: chỉ tiêu huyết học và sinh hóa máu gồm:

+ Huyết học: xét nghiệm hồng cầu, huyết sắc tố, bạch cầu, tiểu cầu.

+ Sinh hóa: ure, glucose, creatinin, SGOT, SGPT, protein, albumin.

Các chỉ tiêu huyết học và sinh hóa máu được xét nghiệm tại thời điểm trước khi phẫu thuật ghép da và sau 7 ngày ghép da.

2.3. Đạo đức trong nghiên cứu y sinh

Nghiên cứu đã được chấp thuận về mặt y đức trong nghiên cứu từ Hội đồng Đạo đức nghiên cứu y sinh học của Bệnh viện Quân y 7A theo Quyết định số 28/HĐĐĐNCYSH ngày 24/8/2023.

3. Kết quả

Nghiên cứu tiến hành trên 5 bệnh nhân vào điều trị tại Khoa Chấn thương Chỉnh hình, Bệnh viện Quân y 7A thời gian từ tháng 8/2023 đến tháng 11/2023. Các đặc điểm về tình trạng lành vết thương được nhóm nghiên cứu ghi nhận lại và mô tả.

3.1. Đặc điểm chung nhóm nghiên cứu

Bảng 1. Đặc điểm chung (n=5).

Thứ tự	Tuổi	Giới	Nghề nghiệp	Địa chỉ
1	20	Nam	Bộ đội	TP Hồ Chí Minh
2	27	Nữ	Công nhân	Thanh Hóa
3	42	Nam	Bộ đội	Bình Thuận
4	20	Nam	Công nhân	Long An
5	45	Nữ	Nông dân	Lâm Đồng

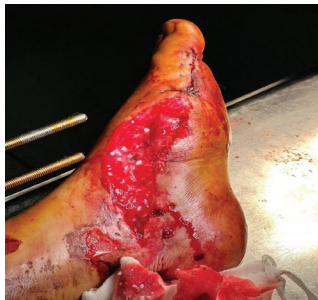
Kết quả bảng 1 cho thấy, bệnh nhân tham gia nghiên cứu có độ tuổi từ 20 đến 45 tuổi. Có 2 bệnh nhân nữ và 3 bệnh nhân nam. Có 2 bệnh nhân làm công nhân, 2 bệnh nhân là bộ đội và 1 bệnh nhân là nông dân. Địa chỉ bệnh nhân phân bố đa số ở các tỉnh thành phía Nam như TP Hồ Chí Minh, Long An, Bình Thuận, ngoài ra bệnh nhân cũng đến từ tỉnh Lâm Đồng và Thanh Hóa.

Bảng 2. Đặc điểm lâm sàng của bệnh nhân (n=5).

Thứ tự	Nguyên nhân	Vị trí vết thương	Diện tích vết thương (cm)	Thời gian từ khi bị thương đến khi phẫu thuật (ngày)	Thời gian điều trị (ngày)
1	Nhiễm trùng do bỏng	Cổ chân (P)	5x12	10	14
2	Tai nạn giao thông	Cẳng chân (T)	15x10	7	30
3	Tai nạn lao động	Cẳng tay (T)	10x18	6	20
4	Tai nạn giao thông	Cẳng tay (T)	4x6	4	18
5	Tai nạn giao thông	Bàn chân (P)	8x15	4	21



Hình 1. Vết thương tai nạn giao thông của bệnh nhân 5.



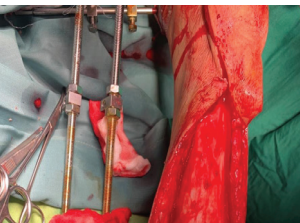
Hình 2. Vết thương nhiễm trùng do bỏng của bệnh nhân 1.

Kết quả bảng 2 cho thấy, đa số vết thương của bệnh nhân là do tai nạn, có 2 bệnh nhân bị tai nạn giao thông (hình 1), 2 bệnh nhân bị tai nạn lao động và 1 bệnh nhân tai nạn trong sinh hoạt (hình 2). Nghiên cứu tiến hành trên 5 BN có các đặc điểm vết thương khác nhau. Ca thứ nhất, bệnh nhân có vết thương kích thước 5x12 cm ở cổ chân (P), bệnh nhân bị thương 10 ngày trước khi phẫu thuật và điều trị trong 14 ngày. Ca thứ hai, bệnh nhân bị thương với kích thước 15x10 cm ở cẳng chân (T), bệnh nhân bị thương 7 ngày trước khi phẫu thuật và điều trị trong 30 ngày. Bệnh nhân thứ 3 có vết thương 10x18 cm ở cẳng tay (T), bệnh nhân đã bị thương 6 ngày trước khi phẫu thuật và tổng thời gian điều trị của bệnh nhân tại bệnh viện là 20 ngày. Bệnh nhân thứ 4 có vết thương kích thước xấp xỉ 4x6 cm từ 4 ngày trước khi phẫu thuật với tổng thời gian điều trị là 18 ngày. Bệnh nhân thứ 5 có vết thương kích thước xấp xỉ 8x15 cm từ 4 ngày trước khi phẫu thuật với tổng thời gian điều trị là 21 ngày.

3.2. Tác dụng của gel protein trong điều trị vết thương, vết bỏng

Bảng 3. Đặc điểm vết thương trước phẫu thuật của bệnh nhân (n=5).

Thứ tự	Mức độ sưng, nề tại vết thương	Dịch thấm băng	Nền vết thương	Mức độ đau
1	Nề	Trung bình	Mô hạt đỏ tươi, rướm máu, nhiều giả mạc	7
2	Nề	Trung bình	Mô hạt đỏ tươi, chảy máu, có giả mạc	9
3	Nề	Trung bình	Mô hạt đỏ tươi, chảy máu, có giả mạc	9
4	Nề ít	Ít	Mô hạt đỏ tươi, rướm máu, có giả mạc	6
5	Nề	Trung bình	Mô hạt đỏ tươi, chảy máu, có giả mạc	8



Hình 3. Vết thương trước mổ của bệnh nhân 2.

Kết quả bảng 3 và hình 3 cho thấy, các trường hợp đầu ghi nhận nề tại chỗ xung quanh vết thương, có 1/5 trường hợp nề ít. Tương ứng với đó là tình trạng tăng tiết dịch. Ghi nhận sự tương ứng của mức độ nề và lượng dịch tiết tại chỗ. Tất cả các vết thương đều được chăm sóc lên mô hạt tốt.

Bảng 4. Tình trạng tại chỗ ghép da sau khi thực hiện (n=5).

Thứ tự	Mức độ sưng, nề tại vết thương	Mức độ che phủ (%)	Mức độ đau	Tình trạng dịch thấm băng
1	Nề	93	6	ít
2	Nề	95	9	Trung bình
3	Nề	95	8	Trung bình
4	Nề ít	96	6	ít
5	Nề	99	7	Trung bình



Hình 4. Vết thương sau ghép của bệnh nhân 1.



Hình 5. Vết thương sau khi thực hiện ghép da của bệnh nhân 4.

Kết quả bảng 4, hình 4 và 5 cho thấy, sau phẫu thuật 24 giờ, tất cả vết thương của 5 bệnh nhân đều nề, với lượng dịch thấm băng từ ít đến trung bình. Mức độ đau theo thang điểm VAS của 5 bệnh nhân không có nhiều thay đổi so với thời điểm trước ghép da.

Bảng 5. Diễn biến các mảnh da ghép sau phẫu thuật ghép da 7 ngày (n=5).

Thứ tự	Mức độ sưng, nề tại vết thương	Màu sắc da	Mức độ đau	Tình trạng dịch xuất tiết	Mức độ che phủ (%)	Bóng khí, cuộn mép da ghép
1	Nề nhẹ	Như lúc ghép	4	Ít	93	Không
2	Nề nhẹ	Như lúc ghép	6	Ít	95	Có
3	Nề nhẹ	Như lúc ghép	5	Ít	95	Không
4	Nề nhẹ	Như lúc ghép	4	Ít	96	Không
5	Nề nhẹ	Như lúc ghép	6	Ít	99	Có



Hình 6. Vết thương sau phẫu thuật 7 ngày của bệnh nhân 2.



Hình 7. Vết thương sau phẫu thuật 7 ngày của bệnh nhân 5.

Kết quả bảng 5, hình 6 và 7 cho thấy, tất cả các trường hợp sau tháo băng chỗ da ghép đều ghi nhận da ghép sống tốt trên nền mô hạt, giữ được màu sắc tự nhiên như lúc vừa lấy da. Ghi nhận việc giảm đáng kể sự nề và lượng dịch tiết tại vết thương, kèm theo đó là cảm giác giảm đau đáng kể. Các trường hợp có ít bóng khí hoặc cuộn mép da ở vài vị trí đều được xử lý, không ghi nhận da chết do nguyên nhân trên làm thay đổi tỷ lệ che phủ vết thương.

Bảng 6. Diễn biến các mảnh da ghép sau phẫu thuật ghép da 2 tuần (n=5).

Thứ tự	Mức độ sưng, nề tại vết thương	Màu sắc da	Mức độ đau	Tình trạng dịch xuất tiết, dịch mủ	Mức độ che phủ (%)	Bóng khí, cuộn mép da ghép
1	Hết	Đỏ sẫm	3	không có dịch	94	Không
2	Ít	Đỏ sẫm	4	ít dịch	96	Không
3	Ít	Đỏ sẫm	2	không có dịch	97	Không
4	Hết	Đỏ sẫm	2	không có dịch	98	Không
5	Hết	Tươi	3	không có dịch	99	Không



Hình 8. Vết thương sau phẫu thuật 2 tuần của bệnh nhân 1.

Kết quả bảng 6 và hình 8 cho thấy, sau 2 tuần đều ghi nhận tại chỗ vết thương không còn hiện tượng nề. Có sự thay đổi màu sắc da theo diễn biến tự nhiên của da ghép, không ảnh hưởng đến khả năng sống và tiên lượng tại chỗ ghép da. Các vết thương gần như không ghi nhận hiện tượng tiết dịch hay nhiễm trùng tại chỗ. Mức độ đau giảm đáng kể. Mức độ che phủ của da ghép gần như hoàn toàn vết thương và không ghi nhận bóng khí, cuộn mép da hay chết da ghép. Mức độ che phủ vết thương có sự tăng lên nhưng không đáng kể.

Bảng 7. Diễn biến các mảnh da ghép sau phẫu thuật ghép da 4 tuần (n=5).

Thứ tự	Mức độ sưng, nề tại vết thương	Màu sắc da	Mức độ đau	Tình trạng dịch xuất tiết, dịch mủ	Mức độ che phủ (%)	Bóng khí, cuộn mép da ghép
1	Hết	Đỏ sẫm	2	không có dịch	100	Không
2	Hết	Đỏ sẫm	2	không có dịch	99	Không
3	Hết	Đỏ sẫm	1	không có dịch	100	Không
4	Hết	Đỏ sẫm	0	không có dịch	100	Không
5	Hết	Tươi	1	không có dịch	100	Không



Hình 9. Vết thương sau phẫu thuật 4 tuần của bệnh nhân 1.

Kết quả bảng 7 và hình 9 cho thấy, sau 4 tuần ghi nhận tại chỗ ghép da của 5 bệnh nhân da ghép sống tốt. Mức độ che phủ đạt 99-100% ở tất cả bệnh nhân. Mức độ đau của bệnh nhân giảm rất nhiều, có trường hợp hoàn toàn không thấy đau tại chỗ. Màu sắc da ghép chưa tương đồng với các vùng da lành xung quanh. Không có trường hợp nào có bóng khí hoặc cuộn mép da ghép.

Bảng 8. Tỷ lệ (%) bám dính trên nền ghép của mảnh ghép da (n=5).

Thứ tự	Thời điểm sau phẫu thuật (tỷ lệ %)		
	Ngày thứ 7	Ngày thứ 14	Ngày thứ 28
1	97	100	100
2	95	97	100
3	92	97	100
4	95	100	100
5	94	97	100

Kết quả bảng 8 cho thấy, tại thời điểm tháo băng da ghép (ngày thứ 7) ghi nhận tỷ lệ bám dính rất tốt của da ghép vào nền ghép (92-97%), các vị trí có bóng nước hoặc cuộn mép đều được xử lý kỹ thuật ngay lúc đó. Đến ngày thứ 14, gần như da ghép bám dính hoàn toàn vào nền (97-100%). Đến thời điểm 4 tuần sau ghép, da ghép bám dính 100% trên nền ghép ở cả 5 bệnh nhân.

Bảng 9. Kết quả ghép da tự thân (n=5).

Bệnh nhân	Kết quả ghép da
Bệnh nhân 1	Tốt
Bệnh nhân 2	Tốt
Bệnh nhân 3	Tốt
Bệnh nhân 4	Tốt
Bệnh nhân 5	Tốt

Kết quả bảng 9 cho thấy, tất cả các trường hợp đều ghi nhận kết quả tốt sau ghép da.

4. Bàn luận

4.1. Xây dựng quy trình ghép da tự thân có sử dụng gel protein trong điều trị vết thương, vết bỏng

ECM nói chung và ECM từ da nói riêng được ứng dụng nhiều trong lĩnh vực y sinh. Ngay từ năm 1995, D.J. Wainwright [7] lần đầu tiên kết hợp tấm da khỉ tế bào với lớp da tự thân làm mảnh ghép da tổng hợp và dán lên vết thương bỏng độ 3. Phương pháp này cho kết quả thành công khi vùng da tái tạo đàn hồi tốt, không có sẹo rõ ràng cũng như không bị đào thải. Kể từ đó, ECM ngày càng được ứng dụng rộng rãi trong điều trị vết thương mất da. Năm 2014, Y. Takami và cs [8] đã phát triển một loại da tương đương được tạo ra từ mô có thể cấy ghép bao gồm các tế bào keratinocytes được nuôi cấy tự thân, các nguyên bào sợi và lớp hạ bì dị sinh đã được khỉ tế bào, sau đó được cấy ghép theo quy trình một giai đoạn vào các vết thương bỏng cấp độ ba đã được cắt lọc của 4 bệnh nhân. Kết quả cho thấy, tỷ lệ sống sót của mảnh ghép trung bình là 96%, không thấy mảnh ghép bị mất chậm và mảnh ghép dễ vỡ.

Một phân tích tổng hợp cho thấy, ECM thúc đẩy đáng kể quá trình lành vết thương và giảm các biến chứng ở bệnh nhân bị vết thương do tiểu đường [9]. Ngoài ra, một nghiên cứu đa trung tâm có đối chứng, ngẫu nhiên, kéo dài 12 tuần cũng cho kết quả tỷ lệ lành vết loét ở nhóm bệnh nhân sử dụng ECM trong quá trình điều trị cao hơn 2,7 lần so với nhóm đối chứng [10]. Từ các nghiên cứu trên thế giới có thể thấy được lợi ích mà ECM đem lại trong quá trình điều trị vết thương mất da.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng gel protein được làm từ ECM trong điều trị vết thương mất da. Khung ngoại bào sau khi đã khỉ tế bào (ECM vô bào) bằng các phương pháp như vật lý, hóa học và enzyme sẽ được tiến hành đông khô, nghiền và hòa tan bằng enzyme để tạo thành gel. Hydrogel từ ECM có nhiều ưu điểm như thích hợp dùng để tiêm, lấp đầy các vị trí tổn thương có hình dạng bất thường, kèm theo đó các hoạt tính sinh học tối ưu vốn có của ECM. Trên cơ sở tham khảo các quy trình kỹ thuật ghép da tự thân sử dụng vật liệu y học tái tạo trong điều trị vết thương mất da trước đây [8, 11, 12] cũng như từ thực tế kết quả nghiên cứu, chúng tôi đã hoàn thành quy trình ghép da tự thân có sử dụng gel protein trong điều trị vết thương, vết bỏng. Trong đó, điều rất quan trọng là cần bảo quản dung dịch ECM ở 4°C. Trước khi ghép, dung dịch ECM được ủ ở 37°C tối thiểu 30 phút để tạo tiền gel. Sau khi ghép, gel sẽ hình thành ở nhiệt độ sinh lý của cơ thể và được cố định trên bề mặt vết thương, vết bỏng.

4.2. Hiệu quả của gel protein trong điều trị vết thương, vết bỏng

4.2.1. Diễn biến và khả năng bám dính của các mảnh da sau khi bôi gel protein trên nền ghép

Chữa lành vết thương trên da là một quá trình phức tạp và được chia thành 4 giai đoạn chồng chéo, đó là cầm máu, viêm, tăng sinh và tái tạo, qua đó mọi vết thương đều lành bình thường. Các chiến lược can thiệp dựa trên vật liệu sinh học ECM mang lại lợi ích điều trị trong hầu hết các giai đoạn của quá trình chữa lành vết thương. Thời gian bám sống của da tự thân kéo dài tạo điều kiện cơ thể phục hồi và lành vết thương. Nghiên cứu của chúng tôi cho thấy, tỷ lệ bám dính rất tốt của da ghép vào nền ghép sau 7 ngày ghép da (92-97%), các vị trí có bóng nước hoặc cuộn mép đều được xử lý kỹ thuật ngay lúc đó. Đến ngày thứ 14, gần như da ghép bám dính hoàn toàn vào nền (97-100%). Đến thời điểm 4 tuần sau ghép, da ghép bám dính 100% trên nền ghép ở cả 5 bệnh nhân. Kết quả này tương đồng với nghiên cứu của M. Meuli và cs (2019) [12] khi thử nghiệm ghép da giai đoạn I ở trẻ em. Trong nghiên cứu này, các tác giả sử dụng các mảnh ghép da dài 49 cm được thiết kế sinh học bằng cách sử dụng tế bào sừng và nguyên bào sợi tự thân được phân lập từ mẫu sinh thiết da nhỏ của bệnh nhân (4 cm), được tích hợp trong collagen hydrogel. Kết quả cho thấy, tỷ lệ da bám dính trên nền ghép sau 21 ngày là 78%. Nghiên cứu của tác giả A. Reyzelman và cs (2009) [10] cũng cho tỷ lệ bám dính da trên nền ghép khi có sử dụng ECM hỗ trợ là 69,6%, trong khi tỷ lệ bám dính da trên nền ghép theo chăm sóc tiêu chuẩn là 46,2% [8].

Từ các kết quả trên cho thấy, việc sử dụng gel protein trong quá trình ghép da làm tăng khả năng bám dính của da ghép, thuận tiện cho phẫu thuật viên trong quá trình dán da che phủ vết thương, băng cố định sau ghép da.

4.2.2. Tác dụng che phủ, bảo vệ của da ghép

Ngoài khả năng bám dính của da, gel protein còn hỗ trợ giảm tiết dịch tại vết thương, giảm đau, không gây kích ứng hoặc dị cảm cho bệnh nhân, không kích thích viêm hoặc phản ứng thải loại tại chỗ. Điều này được thể hiện rõ trong kết quả nghiên cứu của chúng tôi. Cụ thể, tất cả các trường hợp sau tháo băng chỗ da ghép đều ghi nhận da ghép sống tốt trên nền mô hạt, giữ được màu sắc tự nhiên như lúc vừa lấy da. Ghi nhận việc giảm đáng kể sự nề và lượng dịch tiết tại vết thương, kèm theo đó là cảm giác giảm đau đáng kể. Sau 4 tuần điều trị, ghi nhận tại chỗ ghép da của 5 bệnh nhân da ghép sống tốt, có sự tăng sinh da làm tăng tỷ lệ che

phủ có ý nghĩa. Mức độ đau của bệnh nhân giảm rất nhiều, có trường hợp hoàn toàn không thấy đau tại chỗ. Kết quả này tương đồng với nghiên cứu của J.S. Kim và cs (2016) [5] cho thấy rằng, vật liệu thay thế da từ lớp hạ bì không tế bào của con người là vật liệu ghép hiệu quả để thay thế các phương pháp phẫu thuật hiện có trong việc tái tạo chi dưới, giúp tránh quá trình thu hoạch vật, giảm thiểu sẹo ở vùng hiển vật, tăng cường độ đàn hồi của da so với các phương pháp thay thế da dày thông thường khác, giảm tỷ lệ nhiễm trùng và rút ngắn thời gian cấy ghép.

Bên cạnh đó, gel protein còn hỗ trợ tăng tỷ lệ da ghép sống và tỷ lệ sống của các vùng da bị cuộn mép hoặc có bóng khí sau khi được xử lý. Cụ thể, trong nghiên cứu của chúng tôi, các trường hợp có ít bóng khí hoặc cuộn mép da ở vài vị trí sau khi tháo băng sau 7 ngày ghép da đều được xử lý, không ghi nhận da chết do nguyên nhân trên làm thay đổi tỷ lệ che phủ vết thương. Sau 4 tuần ghi nhận màu sắc da ghép chưa tương đồng với các vùng da lành xung quanh. Mức độ che phủ gần như hoàn toàn vết thương, một trường hợp vùng mép da ghép đang liền da.

Theo một nghiên cứu lâm sàng được thực hiện tại Hoa Kỳ cho thấy, ECM hỗ trợ lành vết thương cho người bệnh đái tháo đường có vết loét và có khả năng che phủ vết thương rất tốt. Kết quả của nghiên cứu cho thấy thời gian lành vết thương hoàn toàn là 5 đến 7 tuần. Tỷ lệ vết loét được chữa lành giữa các nhóm có ý nghĩa thống kê. Nghiên cứu này khẳng định việc sử dụng vật liệu ECM như một phương pháp điều trị hiệu quả cho các vết thương mất da [8].

5. Kết luận

- Việc sử dụng gel protein trong quy trình ghép da làm tăng khả năng bám dính của da ghép, thuận tiện cho phẫu thuật viên trong quá trình dán da che phủ vết thương, băng cô định sau ghép da.

- Gel protein có tác dụng giảm đau, giảm tiết dịch tại vết thương, tăng tỷ lệ da ghép sống và tỷ lệ sống của các vùng da bị cuộn mép hoặc có bóng khí sau khi được xử lý.

- Gel protein không kích thích viêm hoặc phản ứng thái loại tại chỗ cũng như không gây kích ứng hoặc dị cảm cho bệnh nhân.

Kiến nghị: Phẫu thuật viên có thể cân nhắc sử dụng gel protein hỗ trợ trong phẫu thuật ghép da vết thương, vết bỏng; nên có thêm nhiều nghiên cứu với cỡ mẫu lớn hơn để tăng thêm bằng chứng về tính an toàn và hiệu quả của gel protein.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] H. Sorg, D.J. Tilkorn, S. Hager, et al. (2017), "Skin wound healing: An update on the current knowledge and concepts", *Eur. Surg. Res.*, **58(1-2)**, pp.81-94, DOI: 0.1159/000454919.
- [2] E.M. Tottoli, R. Dorati, I. Genta, et al. (2020), "Skin wound healing process and new emerging technologies for skin wound care and regeneration", *Pharmaceutics*, **12(8)**, DOI: 10.3390/pharmaceutics12080735.
- [3] S. Tavakoli, A.S. Klar (2020), "Advanced hydrogels as wound dressings", *Biomolecules*, **10(8)**, DOI: 10.3390/biom10081169.
- [4] S. John, M.R. Kesting, M. Stoeckelhuber, et al. (2019), "Evaluation of tissue-engineered skin on base of human amniotic membrane for wound healing", *Plastic and Reconstructive Surgery Global Open*, **7(7)**, DOI: 10.1097/GOX.0000000000002320.
- [5] J.S. Kim, A.J. Kaminsky, J.B. Summitt, et al. (2016), "New innovations for deep partial-thickness burn treatment with ACell MatriStem matrix", *Advances in Wound Care*, **5(12)**, pp.546-552, DOI: 10.1089/wound.2015.0681.
- [6] J.A.C. Rizo, J. Delgado, I.A.Q. Ortega, et al. (2018), "Decellularized ECM-derived hydrogels: Modification and properties", *Hydrogels*, **1**, pp.1-22, DOI: 10.5772/intechopen.78331.
- [7] D.J. Wainwright (1995), "Use of an acellular allograft dermal matrix (AlloDerm) in the management of full-thickness burns", *Burns*, **21(4)**, pp.243-248, DOI: 10.1016/0305-4179(95)93866-i.
- [8] Y. Takami, R. Yamaguchi, S. Ono, et al. (2014), "Clinical application and histological properties of autologous tissue-engineered skin equivalents using an acellular dermal matrix", *J. Nippon Med. Sch.*, **81(6)**, pp.356-363, DOI: 10.1272/JNMS.81.356.
- [9] H. Xiao, X. Chen, X. Liu, et al. (2023), "Recent advances in decellularised biomaterials for wound healing", *Mater. Today Bio.*, **19**, DOI: 10.1016/j.mtbio.2023.100589.
- [10] A. Reyzelman, R.T. Crews, J.C. Moore, et al. (2009), "Clinical effectiveness of an acellular dermal regenerative tissue matrix compared to standard wound management in healing diabetic foot ulcers: A prospective, randomised, multicentre study", *Int. Wound J.*, **6(3)**, pp.196-208, DOI: 10.1111/j.1742-481X.2009.00585.x.
- [11] M. Demircan, T. Cicek, M.I. Yetis (2015), "Preliminary results in single-step wound closure procedure of full-thickness facial burns in children by using the collagen-elastin matrix and review of pediatric facial burns", *Burns*, **41(6)**, pp.1268-1274, DOI: 10.1016/j.burns.2015.01.007.
- [12] M. Meuli, F.H. Fritsch, M. Hüging, et al. (2019), "A cultured autologous dermo-epidermal skin substitute for full-thickness skin defects: A phase I, open, prospective clinical trial in children", *Plast. Reconstr. Surg.*, **144(1)**, pp.188-198, DOI: 10.1097/PRS.0000000000005746.

Độ hữu thụ hạt phấn ở một số thời điểm nở hoa trong ngày khác nhau và ảnh hưởng đến khả năng kết hạt của một số giống khổ qua (*Momordica charantia* L.) trồng tại TP Hồ Chí Minh

Phan Đặng Thái Phương^{1*}, Nguyễn Thùy Dương¹, Vũ Văn Ba²

¹Khoa Khoa học Sinh học, Trường Đại học Nông Lâm TP Hồ Chí Minh, khu phố 6, phường Linh Trung, TP Thủ Đức, TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

²Viện Nghiên cứu Công nghệ Sinh học và Môi trường, Trường Đại học Nông Lâm TP Hồ Chí Minh, khu phố 6, phường Linh Trung, TP Thủ Đức, TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

Ngày nhận bài 30/5/2022; ngày chuyển phân biện 2/6/2022; ngày nhận phân biện 27/6/2022; ngày chấp nhận đăng 30/6/2022

Tóm tắt:

Trong quá trình lai giống, hạt phấn là vật liệu trực tiếp tham gia vào quá trình lai thông qua hoạt động thụ phấn hoa. Chất lượng hạt phấn quyết định đến khả năng đậu trái và sự hình thành hạt. Trong nghiên cứu này, hạt phấn của giống khổ qua địa phương (BD2) và giống thương mại (F1) được đánh giá độ hữu thụ ở 8 thời điểm nở hoa (từ 8-11 giờ 30 phút) trong vụ đông xuân 2020 tại TP Hồ Chí Minh. Tự thụ phấn cho 2 giống khổ qua trong khoảng thời gian 8-9 giờ để đánh giá khả năng kết hạt của chúng. Kết quả cho thấy, giống khổ qua địa phương (BD2) có độ hữu thụ hạt phấn cao nhất (61,26%) tại thời điểm thu hoa là 8 giờ 30 phút sáng và thấp nhất (46,22%) tại thời điểm 9 giờ sáng. Trong khi đó, giống thương mại F1 có độ hữu thụ cao nhất ở thời điểm 11 giờ (94,05%) và thấp nhất ở thời điểm 8 giờ (79,58%). Độ hữu thụ của giống BD2 là 60,21%, số hạt/quả trung bình là 33,50 và tỷ lệ hạt mẩy/quả trung bình là 71,72%. Tương tự, độ hữu thụ của giống thương mại F1 là 85,55%, số hạt/quả trung bình là 11,25 và tỷ lệ hạt mẩy/quả trung bình là 84,90%. Đây là thông tin tham khảo có giá trị, ứng dụng trong quá trình lai tạo giống khổ qua.

Từ khóa: độ hữu thụ hạt phấn, *Momordica charantia* L., thời gian nở hoa, tự phối.

Chỉ số phân loại: 4.1

1. Đặt vấn đề

Lai tạo giống cây trồng là một trong những phương pháp hiệu quả tạo ra những dòng/giống mới có các đặc tính nông học mong muốn như sinh trưởng tốt, năng suất và chất lượng cao, thời gian sinh trưởng và thu hoạch ngắn, có khả năng chống chịu tốt với sâu bệnh cũng như điều kiện bất lợi của môi trường... Trong quá trình lai tạo, hạt phấn là vật liệu trực tiếp tham gia vào quá trình lai thông qua hoạt động thụ phấn hoa. Chất lượng hạt phấn quyết định đến khả năng đậu trái và sự hình thành hạt. Hạt phấn chịu ảnh hưởng bởi nhiều yếu tố như nhiệt độ, ẩm độ, thời điểm nở hoa và đặc tính giống...

Thời điểm nở hoa trong ngày ảnh hưởng tới sức sống hạt phấn chủ yếu gây bởi điều kiện ngoại cảnh môi trường. Trong đó, yếu tố nhiệt độ ảnh hưởng trực tiếp đến chất lượng hạt phấn dẫn đến năng suất cây trồng bị ảnh hưởng đã được ghi nhận trên nhiều loại cây như lúa, đậu tây, mướp *Momordica* [1-4]. Ngoài ra, đặc tính di truyền của từng dòng/giống cũng quyết định đến chất lượng và sức sống của hạt phấn. Tại Việt Nam, một số tác giả trước đây cũng đã tiến hành đánh giá độ hữu thụ hạt phấn ở cây khổ qua [5], cây cóc [6], cây dưa hấu [7]. Các kết quả chỉ ra rằng, các loài khác nhau có độ hữu thụ hạt phấn khác nhau.

Cây khổ qua là cây giao phấn có thời gian nở hoa và giao phấn dài. Do vậy, hạt phấn khổ qua cũng chịu ảnh hưởng của nhiều yếu tố. Việc đánh giá chất lượng hạt phấn là rất cần thiết để sản xuất khổ qua và sản xuất hạt giống đạt kết quả cao. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành đánh giá độ hữu thụ hạt phấn của 2 giống khổ qua ở các thời điểm nở hoa trong ngày và đánh giá ảnh hưởng của chúng đến sự hình thành hạt khổ qua làm cơ sở phục vụ quá trình lai tạo và sản xuất hạt giống.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu, địa điểm và thời gian nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện từ tháng 7/2020 đến tháng 12/2020 trong nhà lưới tại Viện Nghiên cứu Công nghệ Sinh học và Môi trường, Trường Đại học Nông Lâm TP Hồ Chí Minh.

Vật liệu nghiên cứu: 2 giống khổ qua (*Momordica* L.) gồm 1 giống địa phương (BD2) được thu thập tại An Bình, Phú Giáo, Bình Dương có đặc tính chống chịu sâu, bệnh hại tốt và 1 giống thương mại F1 đang được trồng phổ biến tại vùng Đông Nam Bộ làm đối chứng.

Dụng cụ: Dụng cụ nghiên cứu mẫu, kim mũi mác, đĩa petri, bút lông, lam kính, lamén, bình nước, kính hiển vi quang học.

Hoá chất: Aceto-carmin 5%, nước cất, cồn 70°.

*Tác giả liên hệ: Email: thaiphuong@hcmuaf.edu.vn

Pollen fertility at different flowering times and its effect on seed setting of some bitter gourd (*Momordica charantia* L.) varieties in Ho Chi Minh city

Dang Thai Phuong Phan^{1*}, Thuy Duong Nguyen¹,
Van Ba Vu²

¹Faculty of Biological Sciences, Nong Lam University - Ho Chi Minh City,
Quarter 6, Linh Trung Ward, Thu Duc City, Ho Chi Minh City, Vietnam

²Research Institute for Biotechnology and Environment,
Nong Lam University - Ho Chi Minh City,
Quarter 6, Linh Trung Ward, Thu Duc City, Ho Chi Minh City, Vietnam

Received 30 May 2022; revised 27 June 2022; accepted 30 June 2022

Abstract:

In the hybridisation process, pollen grains directly participate in the process through flower pollination. Pollen grain quality determines fruit formation and seed setting. In this study, the pollen grains of the local bitter gourd variety (BD2) and F1 commercial variety were collected at 8 different flowering times (8-11h30) for fertility evaluation in the 2020 Spring-Winter crop season in Ho Chi Minh city. Self-pollinate the 2 varieties over 8-9 hours to evaluate their ability to set seeds. The obtained results indicated that the local variety (BD2) had the highest fertility pollen (61.26%) at 08:30 am and the lowest (46.22%) at 9:00 am. Meanwhile, the F1 commercial variety showed the highest fertility pollen (94.05%) at 11:30 am and the lowest (79.58%) at 8:00 am. The fertility of variety BD2 is 60.21%, resulting in an average of 33.50 seeds per fruit in which the percentage of mature seed is 71.72%. Similarly, the commercial variety found the pollen fertility is 85.55%, resulting in an average of 11.25 seeds per fruit in which the percentage of mature seeds is 84.90%. This information is useful for bitter gourd hybridisation.

Keywords: flowering time, *Momordica charantia* L., pollen fertility, self-pollination.

Classification number: 4.1

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Bố trí thí nghiệm: 2 giống khổ qua, gồm 1 giống địa phương và 1 giống thương mại F1 được trồng trong điều kiện nhà lưới từ tháng 7/2020 đến tháng 12/2020. Mỗi giống khổ qua được bố trí và trồng trên 3 luống riêng biệt, mỗi luống 9 cây. Cây cách cây 80 cm, hàng cách hàng 80 cm. Thí nghiệm được bố trí tuần tự ngẫu nhiên, không lặp lại. Diện tích ô thí nghiệm là 96 m² (12x8 m).

Thu và đánh giá hạt phấn:

- Ngoài đồng ruộng: Tại thời điểm hoa nở rộ (khoảng 60 ngày sau trồng), tiến hành thu mẫu hoa đực (ngày 7/9/2020) tại các thời điểm: 8 giờ, 8 giờ 30 phút, 9 giờ, 9 giờ 30 phút, 10 giờ, 10 giờ 30 phút, 11 giờ, 11 giờ 30 phút. Tại mỗi thời điểm thu 20 hoa/giống, hoa thu được đựng trong hộp có dán nhãn, đặt trong thùng đựng đá để giữ mát. Chọn 5 hoa tại mỗi thời điểm tiến hành tự thụ. Số hoa còn lại đem về phòng thí nghiệm tiến hành kiểm tra sự hữu thụ.

- Trong phòng thí nghiệm: Ngay sau khi thu hoa từ ngoài ruộng, các bao phấn được lấy từ hoa đực và đặt trên mặt lam kính, dùng đầu kim mũi mác đã khử trùng bằng cồn gát lấy các hạt phấn bám trên bao phấn cho vào lam kính.

Quan sát hình thái và xác định độ hữu thụ của hạt phấn: Tiến hành theo phương pháp của R.R. Rigamoto và cs (2002) [4]. Mẫu hạt phấn được nhuộm với acetocarmine 5% trong khoảng thời gian 10-15 phút. Đặt lamén và quan sát mẫu dưới kính hiển vi lần lượt với vật kính 10X và 40X.

Đánh giá độ hữu thụ của hạt phấn: Quan sát hình dạng, kích thước định tính của các loại hạt phấn ở vật kính 40X. Đếm số hạt phấn hữu thụ và các dạng hạt phấn khác (hạt phấn bất thụ) trên từng vi trường ở vật kính 10X. Các hạt phấn bắt màu đậm là hạt phấn hữu thụ, các hạt phấn không bắt màu hoặc bắt màu nhạt, hình dạng méo mó được quy về dạng hạt phấn bất thụ. Độ hữu thụ của hạt phấn là tỷ lệ phần trăm số hạt phấn hữu thụ trên tổng số hạt phấn đếm được trong vi trường. Kết quả mỗi mẫu tiêu bản là giá trị trung bình của 5 vi trường được chọn để quan sát.

Phương pháp tự thụ bắt buộc: Ngay sau khi thu hoa đực tại các thời điểm 8-8 giờ 30 phút và 9-9 giờ 30 phút (ngày 7/9/2020), lấy 5 hoa ở mỗi thời điểm để tự thụ bắt buộc cho 5 hoa cái. Tiến hành bỏ bao cách ly và nhẹ nhàng gỡ bao hoa cái ra tránh làm đứt, gãy, tổn thương nhụy hoa. Quét nhẹ bao phấn đã nở của hoa đực lên đầu nhụy của hoa cái cần được thụ sao cho phấn hoa bám được nhiều nhất trên nhụy, sau đó nhanh chóng bao cách ly hoa cái đã được thụ phấn bằng ống nhựa mỏng.

Đánh giá khả năng kết hạt: Quả khô qua (5 quả) từ kết quả tự thụ bắt buộc được thu ở giai đoạn chín sinh lý (vỏ quả bắt đầu chuyển vàng), tiến hành tách vỏ quả và đếm số hạt/quả (tất cả hạt chắc và lép), số hạt mảy/quả từ đó quy ra số hạt trung bình/quả và tỷ lệ hạt mảy/quả (%).

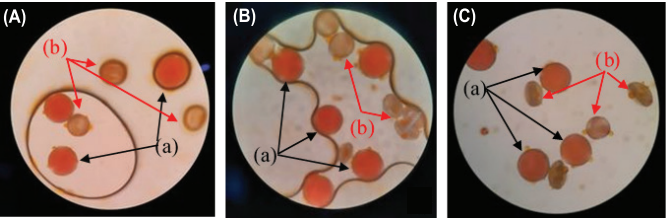
2.3. Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu được thu thập và xử lý thống kê bằng phần mềm Excel và Minitab 16.

3. Kết quả

3.1. Chất lượng hạt phấn ở các thời điểm nở hoa của cây khổ qua

Kết quả quan sát cho thấy, đặc điểm hình thái của các dạng hạt phấn giữa 2 giống khổ qua không có nhiều sự khác biệt. Hạt phấn hữu thụ bắt màu thuốc nhuộm tốt, hạt phấn to, tròn đều so với các hạt phấn khác trong vi trường. Hạt phấn bất thụ không bắt màu hoặc bắt màu rất nhạt, hạt nhỏ và méo mó. Từ hình ảnh chụp hạt phấn cho thấy phương pháp nhuộm hạt phấn khổ qua theo R.R. Rigamoto và cs (2002) [4] có thể được áp dụng để đánh giá chất lượng hạt phấn khổ qua (hình 1).



Hình 1. Hình thái hạt phấn của cây khổ qua sau khi nhuộm acetocarmine 5%. (A) Vi trường 1; (B) Vi trường 2; (C) Vi trường 3; a) Hạt phấn hữu thụ; b) Hạt phấn bất thụ.

Để đánh giá độ hữu thụ của hạt phấn ở các thời điểm nở hoa trong ngày, chúng tôi tiến hành thu hoa khổ qua của 2 giống và kiểm tra chất lượng của hạt phấn từ 8 giờ sáng đến 11 giờ 30 phút. Kết quả được trình bày ở bảng 1 cho thấy, hoa cây khổ qua bắt đầu nở và tung phấn từ 8 giờ sáng. Hoa nở kéo dài đến 11 giờ 30 phút. Một số ít hoa nở sớm hơn và muộn hơn thời gian này. Kết quả ở bảng 1 cũng cho thấy độ hữu thụ trung bình của hạt phấn không sai khác ở các thời điểm nở hoa từ 8 giờ tới 11 giờ 30 phút. Đây là khoảng thời gian rất thích hợp để tiến hành lai tạo cho hoa khổ qua. Trong đó, độ hữu thụ của hạt phấn ở giống BD2 cao nhất là 61,26% ở thời điểm 8 giờ 30 phút sáng và ở giống thương mại là 94,05 ở thời điểm 11 giờ. Kết quả này là thông tin quan trọng để tiến hành bước tiếp theo trong quá trình lai tạo hạt giống khổ qua.

Bảng 1. Đánh giá độ hữu thụ của hạt phấn ở các thời điểm nở hoa của cây khổ qua trong nhà lưới tại TP Thủ Đức, TP Hồ Chí Minh, vụ đông xuân 2020.

Thứ tự	Thời điểm (am)	Độ hữu thụ (%)	
		Giống địa phương (BD2) (n=5)	Giống thương mại (F1) (n=5)
1	8:00	59,16 ^a ±14,27	79,58±17,17
2	8:30	61,26 ^a ±13,29	85,53±19,85
3	9:00	46,22 ^b ±9,02	85,57±18,27
4	9:30	55,51 ^{ab} ±12,45	89,93±18,77
5	10:00	54,39 ^{ab} ±13,70	88,52±18,50
6	10:30	52,62 ^{ab} ±11,82	81,59±20,00
7	11:00	50,91 ^{ab} ±7,24	94,05±13,39
8	11:30	55,38 ^{ab} ±7,73	80,76±20,99
Prob		0,002	0,187

Các ký tự a, b có ý nghĩa là phân hạng khác biệt khi xử lý thống kê.

3.2. Ảnh hưởng độ hữu thụ tới khả năng kết hạt

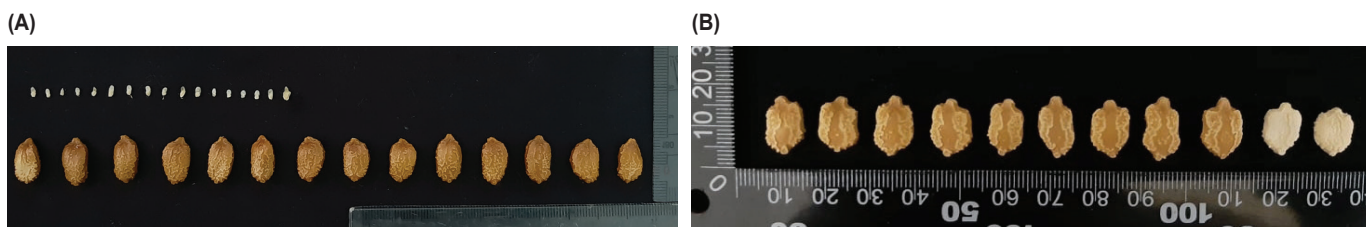
Để đánh giá độ hữu thụ của hạt phấn ảnh hưởng tới khả năng kết hạt, chúng tôi thu quả từ các phép lai tự thụ bắt buộc (5 quả/thời điểm), đếm tổng số lượng hạt được hình thành/quả và số lượng hạt mảy/quả. Kết quả thu được được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2. Ảnh hưởng độ hữu thụ hạt phấn đến khả năng kết hạt.

Thứ tự	Giống	Thời gian thụ phấn	Độ hữu thụ trung bình (%)	Số hạt/quả (TB)	Tỷ lệ hạt mảy/quả trung bình (%)
1	Địa phương (BD2)	8:00-8:30	60,21	33,50	71,72
		8:30-9:00	53,74	31,75	38,43
2	Thương mại F1	8:00-8:30	82,56	8,50	84,90
		8:30-9:00	85,55	11,25	84,90

Từ bảng 2 ta thấy, độ hữu thụ của hạt phấn tỷ lệ thuận với số lượng hạt thu được/quả và số hạt mảy ở cả 2 khoảng thời gian tiến hành. Độ hữu thụ hạt phấn của giống thương mại F1 là 82,56 và 85,55% khi tiến hành lai thu được số hạt trung bình/quả là 8,50 và 11,25, tỷ lệ hạt mảy/quả trung bình là 84,90%. Tương tự như vậy, độ hữu thụ của giống BD2 là 60,21 và 53,74% khi tiến hành tự thụ thu được số hạt lai trung bình/quả là 33,5 và 31,75, tỷ lệ hạt mảy/quả trung bình là 71,72 và 38,43%. Như vậy, kết quả này cho chúng ta thấy để thu được kết quả lai tốt nên có thông tin về thời điểm lai tạo thích hợp cho sự thụ phấn và chọn các dòng/giống có độ hữu thụ cao để tiến hành lai.

Với giống khổ qua BD2, thời gian khảo sát từ 8 giờ đến 8 giờ 30 phút cho giá trị độ hữu thụ trung bình cao hơn và kết quả lai tạo tốt hơn so với khoảng thời gian từ 8 giờ 30



Hình 2. Số hạt/quả và hình thái hạt của 2 giống khổ qua. (A) Giống khổ qua địa phương (BD2); (B) Giống khổ qua thương mại F1.

phút đến 9 giờ. Trong khi đó, độ hữu thụ giống thương mại tại thời điểm từ 8 giờ 30 phút đến 9 giờ cao hơn khoảng 10% so với giống địa phương từ 8 giờ đến 8 giờ 30 phút và kết quả của phép lai thu được cũng tốt hơn.

4. Bàn luận

Trong quá trình sản xuất hạt giống, một trong những mục tiêu quan trọng là sản xuất ra số lượng hạt lai nhiều và có chất lượng tốt. Quá trình lai tạo giống cây trồng, ngoài các yếu tố ngoại cảnh như nhiệt độ, độ ẩm, gió và côn trùng ảnh hưởng đến quá trình thụ phấn, thụ tinh, hình thành quả và hạt. Đặc tính di truyền trong đó độ hữu thụ của hạt phấn cũng là yếu tố rất quan trọng ảnh hưởng đến quá trình này [8, 9]. Hạt phấn là nơi mang các giao tử đực, bao gồm 3 phần khác biệt nhau về thành phần hoá học, cấu trúc hình thái, sinh học và sinh lý [10]. 3 phần này gồm lớp màng ngoài, màng trong và phần trung tâm chứa tế bào chất và nhân. Nhân hạt phấn là nơi chứa nhiều chất nhiễm sắc và bắt màu khi nhuộm bằng thuốc nhuộm [11-13]. Theo A. Tyagi và cs (1995, 1998) [14, 15], độ hữu thụ của hạt phấn có thể xác định theo sức sống hạt phấn. Các tác giả đã tiến hành thí nghiệm với 2 phương pháp. Trong đó, các tác giả đã thu hạt phấn của 3 loài cây ngập mặn ở Fiji tại thời điểm hoa nở và chia ra làm 2 phần. Một phần tiến hành phương pháp nhuộm hạt phấn bằng acetocamine 5%, phần còn lại tiến hành đánh giá sức sống hạt phấn bằng cách kiểm tra tỷ lệ nảy mầm của hạt phấn trên môi trường dinh dưỡng nhân tạo. Kết quả chỉ ra rằng, 2 phương pháp cho kết quả tương ứng nhau. Tuy nhiên, phương pháp nhuộm hạt phấn bằng acetocamine 5% đơn giản và dễ thực hiện. Vì vậy, nhiều nghiên cứu sau này đã sử dụng phương pháp nhuộm acetocamine để đánh giá độ hữu thụ của hạt phấn [4, 5-7, 16]. T.Q. Dung và cs (2011) [6] đánh giá độ hữu thụ hạt phấn của các quần thể mướp đắng (*M. charantia* L.) tại huyện Hương Trà, tỉnh Thừa Thiên Huế cho thấy, độ hữu thụ của quần thể mướp đắng trồng ở các địa điểm khác nhau trong huyện là không sai khác nhau (tại Hương Xuân là 80,66% và tại Hương Chữ là 81,68%). Tuy nhiên, khi các tác giả so sánh với độ hữu thụ hạt phấn của các loài cây khác như dưa hấu và cóc cho thấy độ hữu thụ của mướp đắng cao hơn.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã sử dụng phương pháp nhuộm acetocamine 5% để đánh giá độ hữu thụ của hạt phấn 2 giống khổ qua ở các thời điểm nở hoa khác nhau trong ngày. Kết quả thu được cho thấy, các dòng/giống khác nhau có độ hữu thụ hạt phấn khác nhau và độ hữu thụ hạt phấn cũng khác nhau ở từng thời điểm nở hoa khác nhau trong ngày. Đồng thời, kết quả đánh giá cho thấy độ hữu thụ của hạt phấn tỷ lệ thuận với số hạt thu được/quả và tỷ lệ hạt nảy.

5. Kết luận

- Giống khổ qua địa phương (BD2) có độ hữu thụ hạt phấn đạt cao nhất (61,26%) tại thời điểm thu hoa là 8 giờ 30 phút sáng và thấp nhất (46,22%) tại thời điểm 9 giờ sáng. Giống thương mại F1 có độ hữu thụ cao nhất ở thời điểm 11 giờ là 94,05% và thấp nhất ở thời điểm 8 giờ là 79,58%.

- Độ hữu thụ hạt phấn trên cây khổ qua tiến hành đánh giá tỷ lệ thuận với số hạt thu được và số hạt nảy. Độ hữu thụ của giống BD2 là 60,21%, số hạt/quả trung bình là 33,50 và tỷ lệ hạt nảy/quả trung bình là 71,72%.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được tài trợ bởi Sở Khoa học và Công nghệ TP Hồ Chí Minh thông qua đề tài mã số 19/2019/HĐ-QPTKHCN. Các tác giả xin chân thành cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] V. Rathod, T.K. Behera, A.D. Munshi, et al. (2018), "Pollen viability and in vitro pollen germination studies in *Momordica* species and their intra and interspecific hybrids", *International Journal of Chemical Studies*, **6**(6), pp.32-40.
- [2] N. Ledesma, N. Sugiyama (2005), "Pollen quality and performance in strawberry plants exposed to high-temperature stress", *Journal of The American Society for Horticultural Science*, **130**, pp.341-347, DOI: 10.21273/JASHS.130.3.341.
- [3] T. Matsui, O. Kenji, T. Horie (2000), "High temperature at flowering inhibits swelling of pollen grains, a driving force for thecae dehiscence in rice (*Oryza sativa* L.)", *Plant Production Science*, **3**(4), pp.430-434, DOI: 10.1626/pp.3.430.

- [4] R.R. Rigamoto, A.P. Tyagi (2002), "Pollen fertility status in coastal plant species of Rotuma island", *South Pacific Journal Nature Science*, **20**, pp.30-33.
- [5] T.Q. Dung, N.K. Lan (2009), *Determination of Size and Fertility of Pollen Grains of Lumnitzera Racemosa Wild. 1803*, Scientific Report on Ecology and Biological Resources, The 3rd National Science Conference, pp.1272-1274 (in Vietnamese).
- [6] T.Q. Dung, P. Nguyen (2011), *Pollen Fertility of Bitter Gourd (Momordica Charantia L.) Populations in Huong Tra District, Thua Thien Hue Province*, Scientific Report on Ecology and Biological Resources, The Fourth National Scientific Conference, pp.1090-1094 (in Vietnamese).
- [7] T.Q. Dung, P.T.H. Trang, L.Q. Nam (2015), *Pollen Fertility of Watermelon (Citrullus lanatus (Thumb.) Matsum. & Nakai) in Vinh My Commune, Phu Loc District, Thua Thien Hue Province*, Scientific Report on Ecology and Biological Resources, 6th National Scientific Conference, pp.1305-1309 (in Vietnamese).
- [8] C. Wilcock, R. Neiland (2002), "Pollination failure in plants: Why it happens and when it matters - Review", *Trends in Plant Science*, **7(6)**, pp.270-276, DOI: 10.1016/S1360-1385(02)02258-6.
- [9] M. Kjøl, A. Nielsen, N.C. Stenseth (2011), *Potential Effects of Climate Change on Crop Pollination*, Food and Agriculture Organization of the United Nations, 38pp.
- [10] R.B. Knox (1984), "Cellular interaction", *Plant Physiology*, **17**, pp.508-520.
- [11] M. Marutani, R.D. Sheffer, H. Kameto (1993), "Cytological analysis of *Arthuriium andraenum* (Araceae), its related taxa and their hybrids", *American Journal of Botany*, **80**, pp.93-103, DOI: 10.1002/j.1537-2197.1993.tb13772.x.
- [12] M.A. McKeller, K.H. Quesenberry (1992), "Chromosome pairing and pollen viability in *Desmodium ovalifolium* Wall x *Desmodium heterocarpon* (L.) DC hybrids", *Australian Journal of Botany*, **40(2)**, pp.243-247, DOI: 10.1071/BT9920243.
- [13] R. Weirman, S. Gubatz (1992), *Pollen Wall and Sporopollenium*, In *International Review of Cytology-Sexual Reproduction in Plants*, Harcourt Brace Jovanovich Publishers, pp.508-608, DOI: 10.1016/S0074-7696(08)61093-1.
- [14] A. Tyagi, C. Dass, S. Nathan, et al. (1995), "Pollen fertility status in some flowering plant species of Fiji", *South Pacific Journal of Natural Science*, **14**, pp.211-222.
- [15] A. Tyagi, V. Singh (1998), "Pollen fertility and intraspecific and interspecific compatibility in mangroves of Fiji", *Sexual Plant Reproduction*, **11**, pp.60-63, DOI: 10.1007/s004970050121.
- [16] S.J. Qureshi, M.A. Khan, M. Arshad, et al. (2009), "Pollen fertility (viability) status in *Asteraceae* species of Pakistan", *Trakia Journal of Sciences*, **7(1)**, pp.12-16.

Phân tích hệ gen ty thể và mối quan hệ phát sinh chủng loại của gà Móng

Giang Thị Thanh Nhân¹, Phạm Thị Phương Mai¹, Nguyễn Văn Ba¹, Trần Thị Thu Thủy¹,
Nguyễn Thị Quỳnh Châu¹, Trần Thị Hậu¹, Hoàng Thị Âu¹, Nguyễn Khánh Vân¹, Lưu Quang Minh², Phạm Doãn Lâm^{1*}

¹Phòng Thí nghiệm Trọng điểm Công nghệ Tế bào Động vật, Viện Chăn nuôi, 9 Tân Phong, phường Thụy Phương, quận Bắc Từ Liêm, Hà Nội, Việt Nam

²Vụ Khoa học và Công nghệ các ngành Kinh tế - Kỹ thuật, Bộ Khoa học và Công nghệ, 113 Trần Duy Hưng, phường Trung Hòa, quận Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 16/11/2023; ngày chuyển phản biện 20/11/2023; ngày nhận phản biện 10/12/2023; ngày chấp nhận đăng 16/12/2023

Tóm tắt:

Trong nghiên cứu này, trình tự nucleotide hoàn chỉnh hệ gen ty thể của gà Móng và một giống gà bản địa của Việt Nam được xác định bằng phương pháp giải trình tự Sanger, phân tích cấu trúc và sử dụng để xác định mối quan hệ phát sinh chủng loại giữa giống gà này với các giống gà khác. Dữ liệu trình tự nucleotide hoàn chỉnh hệ gen ty thể gà Móng được đăng ký trên Ngân hàng gen NCBI với mã số truy cập OR643716. Hệ gen ty thể của gà Móng có kích thước 16785 cặp bazơ (bp), bao gồm 22 gen RNA vận chuyển (tRNA), 2 gen RNA ribosome (rRNA), 13 gen mã hóa protein và 1 vùng điều khiển không mã hóa (D-loop). Tỷ lệ các loại nucleotide thành phần A, T, G và C lần lượt tương ứng là 30,28, 23,76, 13,48 và 32,48%. Kết quả phân tích quan hệ phát sinh chủng loại dựa trên 33 trình tự hoàn chỉnh hệ gen ty thể cho thấy, gà Móng có nguồn gốc tiến hóa từ gà rừng lông đỏ phân loài *Gallus gallus spadiceus*. Gà Móng có mối quan hệ gần với giống gà Đông Tảo và gà lùn Cao Sơn của Việt Nam; gà vàng Rugao (Rugao yellow) và gà Xiaoxiang của Trung Quốc.

Từ khóa: gà Móng, hệ gen ty thể, phát sinh chủng loại.

Chỉ số phân loại: 4.2, 4.6

1. Đặt vấn đề

Gà Móng là một giống gà bản địa của Việt Nam, có phát tích từ làng Móng, xã Tiên Phong, nay là xã Tiên Sơn, thị xã Duy Tiên, tỉnh Hà Nam. Giống gà Móng đã được phát hiện và đưa vào Chương trình “Bảo tồn nguồn gen vật nuôi quốc gia” từ năm 2001 [1]. Gà Móng được đánh giá có chất lượng thịt và trứng thơm ngon, da giòn, không có hoặc có ít mỡ khi gà béo [2, 3]. Về đặc điểm hình thái, gà Móng lúc 1 ngày tuổi có màu lông trắng ngà, lông bông, thân hình nhỏ gọn, mỏ và da chân có màu vàng. Ở 20 tuần tuổi, gà trống có màu lông nâu đỏ, đỏ tía (màu mã linh) còn gà mái có màu lông nâu nhạt (màu lá chuối khô). Gà Móng có thân hình khô, chắc chắn, chân to, mỏ nụ, tích phát triển có màu đỏ tươi [1]. Gà trống đạt khối lượng 1823,3±144,4 g, gà mái đạt khối lượng 1512,2±60,3 g ở 20 tuần tuổi [3].

Nhằm khai thác nguồn gen gà Móng phục vụ sản xuất, các nghiên cứu mô tả đặc điểm ngoại hình, đánh giá khả năng sản xuất cũng như chọn lọc, nhân thuần để tạo các dòng gà Móng thương phẩm phục vụ sản xuất đã được thực hiện [1, 4-6]. Tuy nhiên, những nghiên cứu tư liệu hóa thông tin di truyền nhằm lưu trữ các đặc điểm di truyền của giống gà Móng, hỗ trợ cho công tác quản lý, bảo tồn và khai thác nguồn gen gà Móng còn hạn chế. Một nghiên cứu của S.Q.

Do và cs (2019) [7] đã xác định một phần trình tự vùng điều khiển không mã hóa (D-loop) hệ gen ty thể với độ dài 525 bp cho 22 cá thể gà Móng để đánh giá đa dạng di truyền, xác định nguồn gốc dòng mẹ của gà Móng và tìm hiểu mối quan hệ di truyền giữa gà Móng với giống gà Tò, gà Sáu ngón của Việt Nam. Kích thước tương đối nhỏ so với toàn bộ hệ gen ty thể của vùng D-loop đã hạn chế độ phân giải trong phân tích phát sinh chủng loại [8], gần đây trình tự toàn bộ hệ gen ty thể đã được sử dụng để tái hiện lại mối quan hệ phát sinh chủng loại của một số động vật như gà, lợn, bò và ngựa [8-11]. Vì vậy, nghiên cứu này được thực hiện nhằm cung cấp trình tự toàn bộ hệ gen ty thể của gà Móng và sử dụng trình tự này để tìm hiểu nguồn gốc tiến hóa cũng như mối quan hệ di truyền của gà Móng với các giống gà khác. Đồng thời đăng ký trình tự hệ gen ty thể gà Móng trên Ngân hàng gen NCBI nhằm tư liệu hóa thông tin di truyền của gà Móng phục vụ các nghiên cứu bảo tồn cũng như hỗ trợ việc truy xuất giống gà bản địa.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Nghiên cứu được thực hiện trên vật liệu di truyền DNA của giống gà Móng. Một mẫu gà Móng được thu thập từ xã Tiên Sơn, thị xã Duy Tiên, tỉnh Hà Nam (nơi đang bảo tồn

*Tác giả liên hệ: Email: pdlanvn@yahoo.com

Analysis of the mitochondrial genome and phylogenetic relationships of Mong chicken

Thi Thanh Nhan Giang¹, Thi Phuong Mai Pham¹,
Van Ba Nguyen¹, Thi Thu Thuy Tran¹,
Thi Quynh Chau Nguyen¹, Thi Hau Tran¹,
Thi Au Hoang¹, Khanh Van Nguyen¹,
Quang Minh Luu², Doan Lan Pham^{1*}

¹Key Laboratory of Animal Cell Technology, National Institute of Animal Science,
9 Tan Phong Street, Thuy Phuong Ward, Bac Tu Liem District, Hanoi, Vietnam

²Ministry of Science and Technology,

113 Tran Duy Hung Street, Trung Hoa Ward, Cau Giay District, Hanoi, Vietnam

Received 16 November 2023; revised 10 December 2023; accepted 16 December 2023

Abstract:

In this study, the complete nucleotide sequence of the mitochondrial genome of the Mong chicken and an indigenous chicken breed of Vietnam, was determined by the Sanger sequencing method, structurally analysed and used to evaluate the phylogenetic relationship with different chicken breeds. The complete nucleotide sequence data of the Mong chicken' mitochondrial genome was registered on GenBank - National Center for Biotechnology Information (NCBI) with the accession number OR643716. The Mong chicken' mitochondrial genome has a size of 16785 base pair (bp) and includes twenty-two transfer RNA genes, two ribosomal RNA genes, thirteen protein-coding genes, and one non-coding control region (D-loop). A, T, G, and C nucleotide proportions were 30.28, 23.76, 13.48, and 32.48%, respectively. Results of the analysis of phylogenetic relationships based on 33 complete mitochondrial genome sequences showed that the Mong chicken has evolutionary origin from the red junglefowl subspecies *Gallus gallus spadiceus*. The Mong chicken is in close relationship with the Dong Tao chicken and Cao Son dwarf chicken in Vietnam, Rugao yellow chicken and Xiaoxiang chicken in China.

Keywords: mitochondrial genome, Mong chicken, phylogenetic relationships.

Classification numbers: 4.2, 4.6

và phát triển giống gà Móng). Cá thể gà Móng được lựa chọn để thu mẫu máu dựa trên đặc điểm hình thái đặc trưng cho giống đã được công bố trong cuốn *Át lát các giống vật nuôi Việt Nam* [12].

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Thu mẫu và tách chiết ADN tổng số: 1 mm máu gà Móng được lấy từ tĩnh mạch cánh và bảo quản trong ống có chứa chất chống đông EDTA 0,5 M ở 4°C. DNA tổng số được tách chiết từ máu bằng bộ kit GeneJET Genomic ADN Purification Kit (Thermo Scientific™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Mỹ) và bảo quản ở -20°C. Nồng độ DNA tổng số được xác định bằng thiết bị định lượng DNA Qubit 3.0 (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Mỹ). Tính toàn vẹn DNA được đánh giá bằng phương pháp điện di trên gel agarose 1,5%.

Nhân đặc hiệu và giải trình tự các phân đoạn hệ gen ty thể: Trình tự toàn bộ hệ gen ty thể của gà Móng được khuếch đại bằng phản ứng chuỗi trùng hợp (Polymerase chain reaction - PCR) với bộ mồi gồm 23 cặp mồi được thiết kế bởi H.G. Bao và cs (2008) [13]. Một phản ứng PCR có thể tích 25 µl chứa 12,5 µl đệm DreamTaq PCR Master Mix 2X (Thermo Scientific™, Thermo Fisher Scientific, Mỹ), 0,5 µl mỗi mồi (10 pM), 100 ng DNA tổng số và nước không chứa các enzyme nuclease. Chu trình nhiệt phản ứng PCR bắt đầu ở 94°C trong 3 phút; tiếp theo là 35 chu kỳ biến tính ở 94°C trong 30 giây, gắn mồi ở nhiệt độ (Ta°C) trong 30 giây (Ta°C phụ thuộc vào từng cặp mồi), kéo dài ở 72°C trong 1 phút; kéo dài cuối cùng ở 72°C trong 7 phút. Các sản phẩm PCR được trộn với dung dịch Loading Dye 6X trước khi kiểm tra kích thước bằng điện di trên gel agarose 1,5% trong 35 phút ở 100 V. Gel agarose được nhuộm bằng thuốc nhuộm RedSafe™ Nucleic Acid Staining Solution (iNtRON Biotechnology, Seongnam, Hàn Quốc) để có thể quan sát các sản phẩm PCR dưới máy soi UV. Các sản phẩm nhân đặc hiệu của các phản ứng PCR được tinh sạch bằng kit PureLink™ PCR Purification Kit (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Mỹ) và giải trình tự hai chiều trên máy ABI 3130 (Applied Biosystems, Foster, CA, Mỹ) sử dụng cùng 23 cặp mồi của phản ứng PCR.

Ghép nối trình tự các phân đoạn thành hệ gen ty thể hoàn chỉnh: Dữ liệu thô thu được sau giải trình tự sẽ được đánh giá bằng phần mềm BioEdit. Các phân đoạn trình tự nucleotide hệ gen ty thể được lắp ráp, ghép nối bằng phần mềm Unipro UGENE phiên bản 40.1 để thu được trình tự nucleotide hoàn chỉnh hệ gen ty thể ở định dạng file FASTA.

Phân tích cấu trúc hệ gen ty thể: Trình tự nucleotide hoàn chỉnh hệ gen ty thể được chú thích bằng công cụ trực tuyến MITOS (<http://mitos.bioinf.uni-leipzig.de/index.py>). Tần số các nucleotide A, C, G, T và hàm lượng A+T, G+C của hệ gen ty thể được tính toán bằng phần mềm DAMBE phiên bản 7.3.5.

Phân tích mối quan hệ phát sinh chủng loại: Trình tự nucleotide hoàn chỉnh hệ gen ty thể của gà Móng được đóng hàng đa trình tự với các trình tự nucleotide hoàn chỉnh hệ gen ty thể của các giống gà rừng và gà nhà truy xuất từ Ngân hàng gen NCBI bằng thuật toán MUSCLE trong phần mềm MEGA phiên bản X. Cây phát sinh chủng loại được xây dựng bằng phần mềm MEGA phiên bản X theo phương pháp Maximum likelihood với 1.000 lần lặp lại.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Đặc điểm hệ gen ty thể của gà Móng

Hệ gen ty thể của gà Móng có kích thước là 16785 bp. Trình tự nucleotide hoàn chỉnh hệ gen ty thể của gà Móng được xác định và đăng ký trên Ngân hàng gen NCBI với mã số truy cập là OR643716. Các nucleotide C, A, T và G trong hệ gen ty thể gà Móng có tỷ lệ tương ứng là 32,48, 30,28, 23,76 và 13,48%. Các tỷ lệ nucleotide này tương đồng với một số giống gà bản địa Trung Quốc: Longsheng Feng, Luhua, Piao, Taoyan, Huang-shan [14-18] và một số gà bản địa Việt Nam như: Lạc Sơn, Tò và gà lùn Cao Sơn đã được công bố [19-21]. Hệ gen ty thể gà Móng theo hướng giàu A/T với hàm lượng A+T (54,04%) lớn hơn hàm lượng G+C (45,96%), đây là một đặc điểm điển hình của hệ gen ty thể động vật có xương sống.

Kết quả chú giải hệ gen ty thể cho thấy, hệ gen ty thể gà Móng tương tự hệ gen ty thể điển hình của loài gà đã được P. Desjardins và cs (1990) [22] báo cáo, bao gồm 1 vùng D-loop, 2 gen mã hóa RNA ribosome (rRNA), 13 gen mã hóa protein, 22 gen mã hóa RNA vận chuyển (tRNA) (bảng 1). Vùng D-loop nằm trên chuỗi nặng, giữa gen tRNA-*Phe* và gen tRNA-*Glu*, có độ dài là 1232 bp. 2 gen *rRNA* 12S và 16S cũng nằm trên chuỗi nặng và có chiều dài lần lượt là 975 và 1622 bp. Các gen tRNA có chiều dài từ 65 đến 76 bp. 8 trong 22 gen tRNA ở trên chuỗi nhẹ. Tổng chiều dài của 13 gen mã hóa protein là 11394 bp, chiếm 67,88% chiều dài toàn bộ hệ gen. Các gen mã hóa protein có chiều dài dao động từ 165 (*ATP8*) đến 1818 bp (*ND5*) chủ yếu nằm trên chuỗi nặng, ngoại trừ gen *ND6* trên chuỗi nhẹ. Hầu hết các gen mã hóa protein có codon khởi đầu là ATG, ngoại trừ gen *COI*, sử dụng GTG làm codon khởi đầu. Đối với codon kết thúc, các gen mã hóa protein chủ yếu có codon kết thúc là TAA. Gen *COIII* và *ND4* kết thúc bằng codon không hoàn toàn (T--), codon kết thúc TAA sẽ hình thành sau khi trải qua quá trình polyadenyl hóa trong quá trình phiên mã [23]; gen *ND2* kết thúc bằng codon TAG; gen *COI* kết thúc bằng codon AGG. Trong hệ gen ty thể gà Móng, 17 đoạn trình tự không mã hóa được tìm thấy giữa các gen và có chiều dài dao động 1-9 bp. Ngoài ra còn xác định được 7 đoạn trình tự trùng nhau giữa các gen với kích thước 1-10 bp. Chú giải chi tiết cấu trúc hệ gen ty thể gà Móng được thể hiện ở bảng 1.

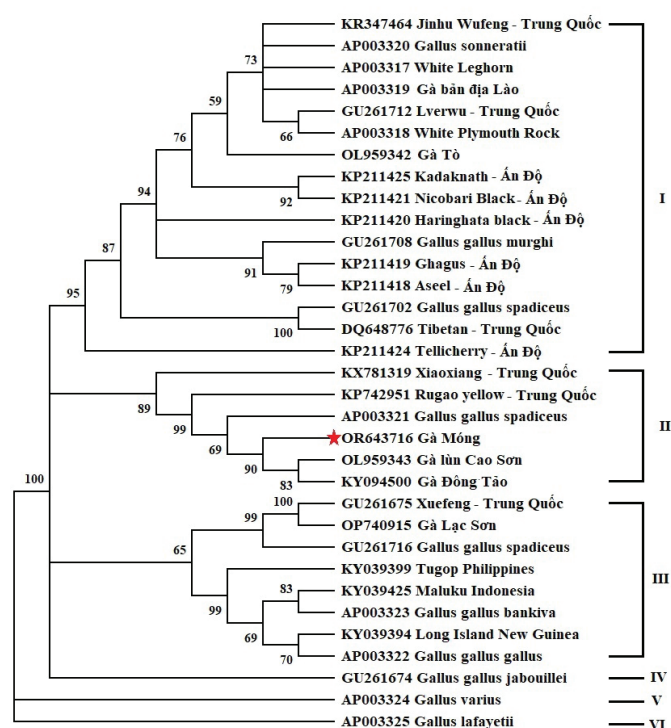
Bảng 1. Cấu trúc hệ gen ty thể gà Móng.

Tên gen	Chuỗi	Vị trí		Kích thước (bp)	Khoảng cách giữa 2 gen	Bộ ba khởi đầu	Bộ ba kết thúc	Bộ ba đối mã
		Khởi đầu	Kết thúc					
D-loop	H	1	1232	1232	0			
tRNA- <i>Phe</i>	H	1233	1302	70	0			GAA
12S <i>rRNA</i>	H	1303	2277	975	0			
tRNA- <i>Val</i>	H	2278	2350	73	0			TAC
16S <i>rRNA</i>	H	2351	3972	1622	0			
tRNA- <i>Leu</i> ²	H	3973	4046	74	+9			TAA
<i>ND1</i>	H	4056	5030	975	0	ATG	TAA	
tRNA- <i>Ile</i>	H	5031	5102	72	+5			GAT
tRNA- <i>Gln</i>	L	5108	5178	71	-1			TTG
tRNA- <i>Met</i>	H	5178	5246	69	0			CAT
<i>ND2</i>	H	5247	6287	1041	-2	ATG	TAG	
tRNA- <i>Trp</i>	H	6286	6361	76	+6			TCA
tRNA- <i>Ala</i>	L	6368	6436	69	+3			TGC
tRNA- <i>Asn</i>	L	6440	6512	73	+1			GTT
tRNA- <i>Cys</i>	L	6514	6579	66	-1			GCA
tRNA- <i>Tyr</i>	L	6579	6649	71	+1			GTA
<i>COI</i>	H	6651	8201	1551	-9	GTG	AGG	
tRNA- <i>Ser</i> ²	L	8193	8267	75	+2			TGA
tRNA- <i>Asp</i>	H	8270	8338	69	+1			GTC
<i>COII</i>	H	8340	9023	684	+1	ATG	TAA	
tRNA- <i>Lys</i>	H	9025	9092	68	+1			TTT
<i>ATP8</i>	H	9094	9258	165	-10	ATG	TAA	
<i>ATP6</i>	H	9249	9932	684	-1	ATG	TAA	
<i>COIII</i>	H	9932	10715	784	0	ATG	T--	
tRNA- <i>Gly</i>	H	10716	10784	69	0			TCC
<i>ND3</i>	H	10785	11136	352	+1	ATG	TAA	
tRNA- <i>Arg</i>	H	11138	11205	68	0			TCG
<i>ND4L</i>	H	11206	11502	297	-7	ATG	TAA	
<i>ND4</i>	H	11496	12873	1378	0	ATG	T--	
tRNA- <i>His</i>	H	12874	12942	69	+1			GTG
tRNA- <i>Ser</i> ¹	H	12944	13008	65	+1			GCT
tRNA- <i>Leu</i> ¹	H	13010	13080	71	0			TAG
<i>ND5</i>	H	13081	14898	1818	+4	ATG	TAA	
<i>Cytb</i>	H	14903	16045	1143	+3	ATG	TAA	
tRNA- <i>Thr</i>	H	16049	16117	69	0			TGT
tRNA- <i>Pro</i>	L	16118	16187	70	+6			TGG
<i>ND6</i>	L	16194	16715	522	2	ATG	TAA	
tRNA- <i>Glu</i>	L	16718	16785	68				TTC

"+"n": số nucleotide giữa 2 gen; "-n": số nucleotide trùng lặp giữa 2 gen; "0": 2 gen liền kề nhau; H: chuỗi nặng (Heavy strand); L chuỗi nhẹ (Light strand).

3.2. Mối quan hệ phát sinh chủng loại dựa trên trình tự hoàn chỉnh hệ gen ty thể

Dựa trên các trình tự nucleotide hoàn chỉnh hệ gen ty thể của các giống gà khác được truy xuất từ Ngân hàng gen NCBI và của gà Móng, cây phát sinh chủng loại thể hiện mối quan hệ giữa gà Móng với các loài gà rừng và các giống gà nhà phân bố ở Việt Nam, Trung Quốc, Ấn Độ, Lào, Philippines, Indonesia, New Guinea và châu Âu đã được xây dựng (hình 1).



Hình 1. Cây phát sinh chủng loại Maximum likelihood dựa vào trình tự nucleotide hoàn chỉnh hệ gen ty thể của gà Móng, các loài gà rừng và các giống gà nhà. Các giá trị bootstrap ước tính ($\geq 50\%$) với 1.000 lần lặp lại được thể hiện ở đầu các nhánh.

Hình ảnh cây phát sinh chủng loại cho thấy, các trình tự hệ gen ty thể của các giống gà được phân thành 6 nhánh chính. Trong đó, gà Móng được phân nhánh cùng với 2 giống gà bản địa của Việt Nam (gà Đông Tảo và gà lùn Cao Sơn), 2 giống gà bản địa của Trung Quốc (gà Xiaoxiang và gà vàng Rugao) cùng với gà rừng lông đỏ phân loài *Gallus gallus spadiceus* (nhánh II). Kết quả này thể hiện mối quan hệ gần gũi của gà Móng với gà rừng lông đỏ phân loài *Gallus gallus spadiceus*. Gà rừng lông đỏ (*Gallus gallus*) gồm có 5 phân loài phụ là *G.g. gallus*, *G.g. murghi*, *G.g. spadiceus*, *G.g. bankiva* và *G.g. jabouillei*, được xem là tổ tiên của gà nhà ngày nay. Trong khi A. Fumihito và cs (1996) [24] cho rằng, phân loài *G.g. gallus* (ở Thái Lan) là tổ tiên hoang dã duy nhất của gà nhà ngày nay, những nghiên cứu gần đây cho thấy, cả 5 phân loài của gà rừng lông đỏ đều là tổ tiên gà

nhà ngày nay [8, 25, 26]. Nghiên cứu của M.S. Wang và cs (2020) [27] trên toàn bộ hệ gen nhân của 863 con gà nhà, 4 giống gà rừng và 5 phân loài gà rừng lông đỏ đã chỉ ra phân loài *G.g. spadiceus* phân bố chủ yếu ở khu vực tây nam Trung Quốc, bắc Thái Lan và Myanmar ngày nay là phân loài tổ tiên chính của gà nhà châu Á hiện đại. Sau khi được thuần hóa, gà đã phân tán khắp Đông Nam Á, Nam Á và lai tạo với các phân loài gà rừng lông đỏ cũng như các loài gà rừng khác [27]. Như vậy, mối quan hệ gần gũi của gà Móng với phân loài *G.g. spadiceus* cho thấy, gà Móng có nguồn gốc từ phân loài gà rừng *G.g. spadiceus* và mối quan hệ này đã ủng hộ quan điểm nguồn gốc đa phân loài gà rừng lông đỏ của gà nhà.

Ngoài ra, cây phát sinh chủng loại còn cho thấy mối quan hệ gần gũi của gà Móng với 2 giống gà bản địa khác của Việt Nam là gà Đông Tảo (phân bố ở tỉnh Hưng Yên) và gà lùn Cao Sơn (phân bố ở tỉnh Quảng Ninh), nhưng có khoảng cách di truyền xa với gà Lạc Sơn (phân bố ở tỉnh Quảng Bình) và gà Tò (phân bố ở tỉnh Thái Bình). Trong nghiên cứu của S.Q. Do và cs (2019) [7], gà Móng cũng thể hiện mối quan hệ xa với gà Tò nhưng lại có quan hệ gần gũi với gà Sáu ngón. Cây phát sinh chủng loại cũng thể hiện mối quan hệ phát sinh giữa gà Móng với các giống gà ở các khu vực địa lý khác, cụ thể gà Móng có mối quan hệ gần với 2 giống gà bản địa Trung Quốc: gà vàng Rugao và Xiaoxiang hơn so với các giống gà ở khu vực quần đảo Đông Nam Á và Ấn Độ. Nghiên cứu của S.Q. Do và cs (2019) [7] cũng cho rằng, gà Móng có nguồn gốc đa dòng mẹ, trong đó có các dòng mẹ phân bố ở phía nam, tây nam Trung Quốc và các khu vực lân cận cũng như ở Đông Nam Á. Mối quan hệ gần gũi này có thể liên quan đến vị trí địa lý gần gũi giữa Việt Nam và Trung Quốc cũng như của lịch sử di dân của người Trung Quốc đến Việt Nam trong các thế kỷ trước [28].

4. Kết luận

Trình tự nucleotide và cấu trúc hệ gen ty thể gà Móng đã được xác định và đăng ký trên Ngân hàng gen NCBI. Gà Móng có nguồn gốc tiến hoá từ gà rừng lông đỏ phân loài *G.g. spadiceus*. Trong mối quan hệ phát sinh chủng loại với các giống gà bản địa Việt Nam, gà Móng có mối quan hệ gần với gà Đông Tảo, gà lùn Cao Sơn hơn so với gà Tò và gà Lạc Sơn. Ngoài ra, gà Móng có mối quan hệ gần với gà vàng Rugao và Xiaoxiang của Trung Quốc hơn so với các giống gà bản địa của Ấn Độ và quần đảo Đông Nam Á.

LỜI CẢM ƠN

Các tác giả xin chân thành cảm ơn sự hỗ trợ kinh phí từ Bộ Khoa học và Công nghệ cho Phòng Thí nghiệm Trọng điểm Công nghệ Tế bào Động vật để thực hiện nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] N.T.K. Cuc, P.D. Tien, N.H. Cuong, et al. (2016), "Selection of Mong chicken breed", *Journal of Animal Science and Technology*, **61**, pp.22-32 (in Vietnamese).
- [2] D.V. Dien (2004), "Result of conservation of Mong chicken breed", *Conference on Conservation of Animal Genetic Resources 1990-2004*, National Institute of Animal Sciences, pp.129-132 (in Vietnamese).
- [3] H.X. Tung, N.V. Dat, N.V. Dong, et al. (2009), "Evaluation of appearance characteristics, growth and reproduction performance of 3 chicken breeds: Ho, Mia and Mong (Tien Phong) at Lien Ninh experimental farm", *Scientific Reports 2008 - Genetic and Animal Breed Section*, National Institute of Animal Sciences, pp.286-295 (in Vietnamese).
- [4] N.T. Tuyen, N.T.K. Cuc, P.D. Tien, et al. (2016a), "Phenotypic characteristics and productivity of the Mong Tien Phong chicken breeding through three generations of selection", *Journal of Animal Science and Technology*, **69**, pp.38-47 (in Vietnamese).
- [5] N.T. Tuyen, N.T.K. Cuc, P.D. Tien, et al. (2016b), "Growth potential of the Mong Tien Phong chicken", *Journal of Animal Science and Technology*, **69**, pp.54-61 (in Vietnamese).
- [6] P.V. Son, N.T.T. Hien, D.V. Dung, et al. (2022), "Growth capacity of Mong chicken", *Journal of Animal Science and Technology*, **136**, pp.61-71 (in Vietnamese).
- [7] S.Q. Do, L.T.P. Nguyen, T.H. Nguyen, et al. (2019), "Genomic characterisation of three Vietnamese indigenous chicken varieties using mitochondrial D-loop sequences", *Canadian Journal of Animal Science*, **99**(4), pp.833-839, DOI: 10.1139/cjas-2019-0025.
- [8] Y.W. Miao, M.S. Peng, G.S. Wu, et al. (2013), "Chicken domestication: An updated perspective based on mitochondrial genomes", *Heredity*, **110**(3), pp.277-282, DOI: 10.1038/hdy.2012.83.
- [9] G.S. Wu, Y.G. Yao, K.X. Qu, et al. (2007), "Population phylogenomic analysis of mitochondrial DNA in wild boars and domestic pigs revealed multiple domestication events in East Asia", *Genome Biology*, **8**(11), DOI: 10.1186/gb-2007-8-11-r245.
- [10] A. Achilli, S. Bonfiglio, A. Olivieri, et al. (2009), "The multifaceted origin of taurine cattle reflected by the mitochondrial genome", *PLOS ONE*, **4**(6), DOI: 10.1371/journal.pone.0005753.
- [11] A. Achilli, A. Olivieri, P. Soares, et al. (2012), "Mitochondrial genomes from modern horses reveal the major haplogroups that underwent domestication", *Proceedings of The National Academy of Sciences*, **109**(7), pp.2449-2454, DOI: 10.1073/pnas.1111637109.
- [12] V.V. Su, P.C. Thieu (2016), *Atlas of Livestock Breeds in Vietnam*, Agriculture Publisher, 62pp (in Vietnamese).
- [13] H.G. Bao, C.J. Zhao, J.Y. Li, et al. (2008), "Sequencing and alignment of mitochondrial genomes of Tibetan chicken and two lowland chicken breeds", *Science in China Series C: Life Sciences*, **51**(1), pp.47-51, DOI: 10.1007/s11427-008-0005-0.
- [14] J. Gu, S. Li (2020a), "Complete mitochondrial genome of the Longsheng Feng chicken (*Gallus gallus*)", *Mitochondrial DNA Part B Resour.*, **5**(3), pp.2911-2912, DOI: 10.1080/23802359.2020.1791753.
- [15] J. Gu, S. Li (2020b), "The complete mitochondrial genome of the Luhua chicken (*Gallus gallus*)", *Mitochondrial DNA Part B Resour.*, **5**(3), pp.2832-2834, DOI: 10.1080/23802359.2020.1791021.
- [16] J. Gu, S. Li (2020c), "Next-generation sequencing of the complete mitochondrial genome of the Piao chicken (*Gallus gallus*)", *Mitochondrial DNA Part B Resour.*, **5**(3), pp.2870-2871, DOI: 10.1080/23802359.2020.1791755.
- [17] L.L. Liu, H.B. Xie, Q.F. Yu, et al. (2016), "Determination and analysis of the complete mitochondrial genome sequence of Taoyuan chicken", *Mitochondrial DNA Part A*, **27**(1), pp.371-372, DOI: 10.3109/19401736.2014.895991.
- [18] S. Jin, H. Zang, P. He, et al. (2021), "Complete mitochondrial genome and phylogenetic analysis of Huangshan Black chicken (*Gallus gallus*)", *Mitochondrial DNA Part B Resour.*, **6**(1), pp.243-244, DOI: 10.1080/23802359.2020.1860694.
- [19] G.T.T. Nhan, P.T.P. Mai, N.V. Ba, et al. (2023a), "The complete mitochondrial genome sequence and phylogenetic analysis of Lac Son chicken", *Journal of Animal Husbandry Sciences and Technics*, **284**, pp.2-7 (in Vietnamese).
- [20] L.D. Pham, T.T.N. Giang, V.B. Nguyen, et al. (2023), "The complete mitochondrial genome and phylogenetic analyses of To chicken in Vietnam", *Genes*, **14**(5), DOI: 10.3390/genes14051088.
- [21] G.T.T. Nhan, P.T.P. Mai, N.V. Ba, et al. (2023b), "The complete mitochondrial genome sequence and phylogenetic analysis of Lun Cao Son chicken", *Vietnam Journal of Agriculture and Rural Development*, **8**, pp.148-155 (in Vietnamese).
- [22] P. Desjardins, R. Morais (1990), "Sequence and gene organisation of the chicken mitochondrial genome: A novel gene order in higher vertebrates", *Journal of Molecular Biology*, **212**(4), pp.599-634, DOI: 10.1016/0022-2836(90)90225-B.
- [23] D.A. Clayton (1991), "Replication and transcription of vertebrate mitochondrial DNA", *Annual Review of Cell Biology*, **7**, pp.453-478.
- [24] A. Fumihito, T. Miyake, M. Takada, et al. (1996), "Monophyletic origin and unique dispersal patterns of domestic fowls", *Proceedings of The National Academy of Sciences*, **93**(13), pp.6792-6795, DOI: 10.1073/pnas.93.13.6792.
- [25] Y.P. Liu, G.S. Wu, Y.G. Yao, et al. (2006), "Multiple maternal origins of chickens: Out of the Asian jungles", *Molecular Phylogenetics and Evolution, Domestications*, **38**(1), pp.12-19, DOI: 10.1016/j.ympev.2005.09.014.
- [26] S. Kanginakudru, M. Metta, R.D. Jakati, et al. (2008), "Genetic evidence from Indian red jungle fowl corroborates multiple domestications of modern day chicken", *BMC Evolutionary Biology*, **8**(1), DOI: 10.1186/1471-2148-8-174.
- [27] M.S. Wang, M. Thakur, M.S. Peng, et al. (2020), "863 genomes reveal the origin and domestication of chicken", *Cell Research*, **30**, pp.693-701, DOI: 10.1038/s41422-020-0349-y.
- [28] N.T.K. Cuc, H. Simianer, L.F. Groeneveld, et al. (2011), "Multiple maternal lineages of Vietnamese local chickens inferred by mitochondrial DNA D-loop sequences", *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, **24**(2), pp.155-161, DOI: 10.5713/ajas.2011.10155.

Phát sinh hình thái *in vitro*, hoạt tính enzyme kháng oxy hóa và tích lũy hợp chất thứ cấp của mẫu lông thân cây Diệp hạ châu đắng (*Phyllanthus amarus*) dưới điều kiện Clinostat 2D

Lê Thế Biên^{1,2*}, Hoàng Thanh Tùng^{1,2*}, Nguyễn Thị Như Mai¹, Hoàng Đức Khải¹, Đỗ Mạnh Cường¹, Trương Hoài Phong¹, Vũ Quốc Luận¹, Bùi Văn Thế Vinh³, Dương Tấn Nhựt^{1*}

¹Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên, Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam, 116 Xô Viết Nghệ Tĩnh, phường 7, TP Đà Lạt, tỉnh Lâm Đồng, Việt Nam

²Học viện KH&CN, Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam, 18 Hoàng Quốc Việt, phường Nghĩa Đô, quận Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam

³Trường Đại học Công nghệ TP Hồ Chí Minh, 475A Điện Biên Phủ, phường 25, quận Bình Thạnh, TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

Ngày nhận bài 2/3/2023; ngày chuyển phản biện 10/3/2023; ngày nhận phản biện 13/3/2023; ngày chấp nhận đăng 28/3/2023

Tóm tắt:

Trong nghiên cứu này, mẫu lông thân của cây Diệp hạ châu đắng (*Phyllanthus amarus*) *in vitro* 4 tuần tuổi có chiều dài 1 cm được cắt đôi theo chiều dọc và nuôi cấy dưới điều kiện Clinostat 2D (điều kiện mô phỏng không trọng lực) và đối chứng nhằm đánh giá quá trình phát sinh hình thái *in vitro*, hoạt tính enzyme kháng oxy hóa và sự tích lũy hợp chất thứ cấp. Kết quả cho thấy, 34,33% mẫu cấy cảm ứng mô sẹo và 65,67% mẫu cấy hình thành rễ bất định dưới điều kiện Clinostat 2D so với 100% mẫu cấy cảm ứng mô sẹo dưới điều kiện đối chứng sau 4 tuần nuôi cấy. Ngoài ra, khối lượng tươi và khô của cụm mô sẹo (tương ứng là 792,00 và 79,17 mg) dưới điều kiện Clinostat 2D cao hơn so với khối lượng tươi và khô của cụm mô sẹo (tương ứng là 313,33 và 30,07 mg) ở điều kiện đối chứng. Hoạt tính superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) và phenolic ở điều kiện Clinostat 2D cao hơn so với điều kiện đối chứng. Đối với hypophyllanthin và phyllanthin, hàm lượng trong mô sẹo ở điều kiện Clinostat 2D đều cao hơn đối chứng. Ở điều kiện Clinostat 2D, hàm lượng hypophyllanthin trong mô sẹo (29,06 µg/g chất tươi) cao hơn trong rễ bất định (9,03 µg/g chất tươi), trong khi hoạt chất phyllanthin chỉ xuất hiện ở mô sẹo mà không có ở rễ bất định.

Từ khóa: Clinostat 2D, diệp hạ châu đắng, hoạt tính kháng oxy hóa, hợp chất thứ cấp, mô sẹo, rễ bất định.

Chỉ số phân loại: 4.6

1. Đặt vấn đề

Trọng lực đóng vai trò như một nguồn tín hiệu ổn định và bền vững nhất trên Trái đất trong hàng triệu năm tiến hóa của các sinh vật sống. Nghiên cứu sự thay đổi và sai khác của cơ thể sinh vật trong điều kiện không trọng lực mang lại nhiều hiểu biết cho con người về sự tương tác giữa trọng lực và sinh vật. Một số nghiên cứu liên quan đến lĩnh vực công nghệ sinh học thực vật như sự thay đổi ở cấp độ tế bào và phân tử của cây *Arabidopsis* [1], sự thay đổi tốc độ sinh trưởng của tế bào đơn cây Thuốc lá [2, 3] được ghi nhận dưới điều kiện không trọng lực. Ngoài ra, thực vật bậc cao đã sử dụng trọng lực như một nguồn tín hiệu đáng tin cậy nhất cho mục đích phát sinh hình thái [4]; tuy nhiên, sự phát sinh hình thái thực vật trong điều kiện trọng lực thay đổi vẫn là vấn đề chưa được quan tâm nghiên cứu nhiều. Mặt khác, nghiên cứu sự thay đổi các yếu tố hóa học hoặc vật lý là yêu cầu cần thiết [5]; một trong những yếu tố vật lý muốn được đề cập ở đây là trọng lực - một lực vật lý cơ bản tác động lên

mọi sinh vật sống trên Trái đất [6], nhưng điều này thường bị bỏ qua trong các nghiên cứu về khía cạnh ảnh hưởng đến sự phát sinh hình thái của thực vật. Do đó, nghiên cứu sự phát sinh hình thái của thực vật dưới điều kiện không trọng lực là một phương pháp tiếp cận nhằm tìm hiểu vai trò của trọng lực lên thực vật. Mặc dù bước đầu đã có một số nghiên cứu về chủ đề này [7, 8], tuy nhiên, nguồn mẫu thực vật được sử dụng cho các nghiên cứu phát sinh hình thái dưới điều kiện không trọng lực trước đây đều là phôi hợp tử đã trưởng thành (hạt giống), dẫn đến việc khó có thể đánh giá giai đoạn sớm của quá trình phát sinh hình thái trong điều kiện không trọng lực.

Cho đến nay, có một số nghiên cứu về sự phát sinh hình thái của thực vật dưới điều kiện không trọng lực mà vật liệu là hạt của cây Lúa [4], Đậu đỏ [7], Cải dầu [8], Dưa chuột [9]. Một số nghiên cứu ảnh hưởng của điều kiện mô phỏng không trọng lực lên khả năng nảy mầm, sinh trưởng, phát triển và tích lũy hợp chất thứ cấp của cây Bón nước, Dừa

*Tác giả liên hệ: Email: duongtannhut@gmail.com; tunght.stn@gmail.com

***In vitro* morphogenesis, antioxidant enzyme activity and secondary compound accumulation of stem internode sample of *Phyllanthus amarus* under 2D clinostat condition**

The Bien Le^{1,2}, Thanh Tung Hoang^{1,2*}, Thi Nhu Mai Nguyen¹,
Dac Khai Hoang¹, Manh Cuong Do¹, Hoai Phong Truong¹,
Quoc Luan Vu¹, Van The Vinh Bui³, Tan Nhut Duong^{1*}

¹Central Highlands Scientific Research Institute, Vietnam Academy of Science and Technology,
116 Xo Viet Nghe Tinh Street, Ward 7, Da Lat City, Lam Dong Province, Vietnam

²Graduate University of Science and Technology, Vietnam Academy of Science and Technology,
18 Hoang Quoc Viet Street, Nghia Do Ward, Cau Giay District, Hanoi, Vietnam

³Ho Chi Minh City University of Technology,

475A Dien Bien Phu Street, Ward 25, Binh Thanh District, Ho Chi Minh City, Vietnam

Received 2 March 2023; revised 13 March 2023; accepted 28 March 2023

Abstract:

In this study, 4-week-old internodes of *in vitro* *Phyllanthus amarus* with 1 cm in length were cut in a half longitudinal section and cultured under 2D clinostat and control conditions to evaluate *in vitro* morphogenesis, antioxidant enzyme activity and secondary compound accumulation. The results showed that 34.33% of explants induced callus and 65.67% of explants formed adventitious root under 2D clinostat compared with 100% explants induced callus under control after 4 weeks of culture. In addition, the fresh and dry weights of callus clusters (792.00 and 79.17 mg, respectively) under 2D clinostat were higher than those under control (313.33 and 30.07 mg, respectively). Superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and phenolic under 2D clinostat were higher than those of control. For hypophyllanthin and phyllanthin, the concentrations in the callus under 2D clinostat condition were higher than the control. The hypophyllanthin content in the callus (29.06 µg/g fresh weight) was higher than in the adventitious root (9.03 µg/g fresh weight) under 2D clinostat, while the phyllanthin only obtained in the callus that was absent in the adventitious root.

Keywords: adventitious root, antioxidant activity, callus, *Phyllanthus amarus*, secondary compounds, 2D clinostat.

Classification number: 4.6

cận và Diệp hạ châu đắng [10], chuyển hóa năng lượng và hormone nội sinh ở cây Thu hải đường [11], sự tăng cường các hợp chất kháng oxy hóa trong Đậu xanh [12], quá trình chuyển hóa chất kháng oxy hóa ở cây *Antehmis* trong họ Cúc [13]. Gần đây, sự kết hợp giữa nuôi cấy *in vitro* và điều kiện Clinostat 2D được sử dụng để nghiên cứu phát sinh hình thái *in vitro* cây Đậu tây, sự biến động hormone nội sinh, hoạt tính của enzyme kháng oxy hóa và sự sinh trưởng tiếp theo của cây con có nguồn gốc từ điều kiện Clinostat 2D [14]. Tuy nhiên, các nghiên cứu về quá trình phát sinh hình thái của cây trồng dưới điều kiện mô phỏng không trọng lực còn rất hạn chế. Trong nghiên cứu này, việc kết hợp nuôi cấy *in vitro* với điều kiện Clinostat 2D được tiến hành trên cây Diệp hạ châu đắng nhằm đánh giá quá trình phát sinh hình thái *in vitro* của mẫu lông thân, sự biến động các enzyme kháng oxy hóa (Superoxide dismutase - SOD, Catalase - CAT, Ascorbate peroxidase - APX, Phenolic) cũng như sự tích lũy hợp chất thứ cấp (flavonoid và lignan) của mẫu cây có nguồn gốc nuôi cấy dưới điều kiện Clinostat 2D so với mẫu cây *in vitro* ở điều kiện tĩnh (đối chứng).

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguồn mẫu thực vật

Mẫu lông của cây Diệp hạ châu đắng *in vitro* 4 tuần tuổi sinh trưởng và phát triển tốt đã được ổn định qua nhiều lần cấy chuyển trên môi trường MS [15] tại Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên (Lâm Đồng, Việt Nam) được sử dụng làm nguồn mẫu ban đầu.

2.2. Thiết bị Clinostat 2D và điều kiện nuôi cấy

Thiết bị Clinostat 2D (Advanced Engineering Services Co. Ltd., Nhật Bản) được sử dụng cho mục đích mô phỏng điều kiện không trọng lực. Clinostat 2D có trục quay nằm ngang vuông góc với vector trọng lực và bộ khuếch đại điều chỉnh tốc độ quay. Một mẫu cây được đặt ở vị trí trung tâm của đĩa petri (đường kính 60 mm, chiều cao 15 mm, Sigma-Aldrich, Darmstadt, Đức), tương ứng với gia tốc tác dụng lên mẫu luôn nhỏ hơn $2,8 \times 10^{-3} g$ [16]. Mẫu cây được cố định trên bộ phận quay của Clinostat 2D với tốc độ quay 2 vòng/phút, trong khi đó, mẫu cây được đặt dưới điều kiện tĩnh có trọng lực được xem như điều kiện đối chứng.

Mẫu cây được đặt trong phòng nuôi cấy ở nhiệt độ $25 \pm 2^\circ C$, độ ẩm tương đối 50-60% dưới ánh sáng đèn huỳnh quang (36 W, chiều dài 1,2 m) với cường độ ánh sáng $45 \mu mol m^{-2} s^{-1}$ và quang chu kỳ là 8 giờ sáng và 16 giờ chiều.

2.3. Phát sinh hình thái cây Diệp hạ châu dưới điều kiện Clinostat 2D

Mẫu lông thân (chiều dài 10 mm, đường kính 1 mm) được cắt đôi theo chiều dọc và đặt trên đĩa petri chứa 5 ml môi trường MS bổ sung 0,5 mg/l BA, 30 g/l sucrose và 8 g/l agar [17] được dán kín bởi màng parafilm M (Bemis, Mỹ) nhằm nghiên cứu quá trình phát sinh hình thái *in vitro* dưới điều kiện Clinostat 2D. Đối chứng là mẫu cây được nuôi cấy *in vitro* trong điều kiện tĩnh. Tỷ lệ cảm ứng mô sẹo (%), tỷ lệ hình thành rễ bất định (%), khối lượng tươi và khối lượng khô của mẫu cây được ghi nhận sau 2, 3 và 4 tuần nuôi cấy.

2.4. Hoạt tính enzyme kháng oxy hóa

Các mẫu tươi (300 mg) có nguồn gốc nuôi cấy ở điều kiện Clinostat 2D và đối chứng được thu nhận và đặt trong cối sứ; sau đó, được nghiền trong nitor lỏng thành bột mịn và đồng nhất mẫu trong 2 ml dung dịch đệm phosphate 0,1 M (pH 7,4) chứa 0,1 mM ethylene diamine-tetracetic acid. Hỗn hợp chứa mẫu được ly tâm ở tốc độ 15.000 vòng/phút khoảng 20 phút ở 4°C. Phần nổi phía trên sau đó được thu nhận và bảo quản ở 4°C trong khoảng 24 giờ để xác định hoạt tính của các enzyme kháng oxy hóa, bao gồm SOD, CAT, APX và Phenolic.

Hoạt độ SOD được xác định thông qua phản ứng pyrogallol với quá trình oxy hóa với sự hiện diện của oxy trong không khí, tạo ra sản phẩm và hấp thụ bước sóng 320 nm. SOD trong mẫu xúc tác phản ứng phân hủy các gốc peroxide, ngăn chặn quá trình tự oxy hóa của pyrogallol. Tỷ lệ ức chế phản ánh hoạt động của superoxide effutase trong mẫu. Một đơn vị hoạt độ của enzyme (U/g) là sự ức chế 50% quá trình tự oxy hóa pyrogallol, được xác định bởi sự thay đổi độ hấp thụ ở 320 nm theo công thức: Đơn vị enzyme (U/g) = (% bị ức chế/50) × tỷ lệ pha loãng [18].

Hoạt độ CAT trong mẫu thử được xác định bằng cách cho mẫu phản ứng với 100 μ l 65 mM H₂O₂ trong 2 phút, H₂O₂ còn lại sau khi phản ứng sẽ được kết hợp với 100 μ l ammonium molybdate (NH₄Mo₇O₂₄) tạo phức hợp màu vàng và hấp thụ ở bước sóng 405 nm. Đơn vị hoạt độ CAT (U/g) tương đương với 1 μ mol H₂O₂ thủy phân trong 1 phút [19].

Hoạt độ APX được kiểm tra theo phương pháp của Y. Nakano và cs (1981) [20]. Enzyme APX trong mẫu sẽ oxy hóa và làm giảm sự hấp thụ tối đa của ascorbate ở bước sóng 290 nm. Trong đó, đơn vị hoạt độ APX (U/g) được tính bằng cách ghi lại độ hấp thụ tối đa của ascorbate (290 nm) với sự hiện diện của 0,5 mM H₂O₂ trong 3 phút. Lượng ascorbate oxy hóa được tính trực tiếp với hệ số hấp thụ là 2,8 mM/cm. Một đơn vị hoạt độ enzyme (U/g) là lượng APX cần thiết để oxy hóa 1 μ mol ascorbate trong 1 phút ở điều kiện thí nghiệm.

Hàm lượng Phenolic tổng được xác định theo phương pháp của V.L. Singleton và cs (1999) [21]. Dịch chiết (0,2 ml) đã pha loãng ở nồng độ thích hợp trộn với 0,8 ml nước cất trong ống nghiệm, sau đó thêm 1 ml thuốc thử Folin-ciocalteu 10%. Hỗn hợp được trộn đều, sau 3-8 phút, thêm 2,5 ml Na₂CO₃ 7,5%. Lắc đều, hỗn hợp phản ứng được giữ ở nhiệt độ phòng trong 30 phút trước khi đi đo ở bước sóng 760 nm sử dụng máy quang phổ kế (UV-VIS Shimadzu V630, Nhật Bản). Kết quả được thể hiện bởi miligam acid Gallic tương đương (mg GAE)/g nguyên liệu khô. Cách tiến hành mẫu chuẩn và các mẫu thử là tương tự nhau, mỗi thí nghiệm lặp lại 3 lần để tính giá trị trung bình. Sử dụng acid Gallic làm chất chuẩn để xây dựng đường tuyến tính.

2.5. Hàm lượng hợp chất thứ cấp

Quá trình phân tách các hợp chất thứ cấp dựa vào phương pháp của V. Murugaiyah và cs (2007) [22] với một số điều chỉnh cho phù hợp. Cụ thể, cân chính xác 10 mg khối lượng tươi mỗi mẫu phân tích và nghiền nhỏ. Tiếp theo, sử dụng dung môi chiết MeOH (tỷ lệ 1/10), chiết trong thời gian 10 phút bằng hệ thống chiết siêu âm đầu dò, lọc dung dịch thu được. Sau đó, căn chiết tiếp tục chiết lặp lại 2 lần với dung môi chiết MeOH. Hỗn hợp dung dịch thu được cô loại dung môi bằng hệ thống cô quay chân không. Cao thu được hòa tan bằng MeOH và định mức trong bình 10 ml. Dung dịch mẫu được lọc qua màng lọc 0,45 μ m, sau đó tiêm vào hệ thống sắc ký lỏng siêu hiệu năng ghép đầu dò UV (UHPLC-UV Ultimate 3000 của Hãng Thermo, Mỹ), qua cột BDS Hypersil C-18 (250 mm × 4,6 mm, 5 μ m) để phân tách các hợp chất. Dung môi pha động gồm MeOH (A) và H₂O chứa 0,1% H₃PO₄ (B). Quá trình phân tách theo chế độ gradient như sau: từ 0 đến 0,5 phút 97% B, từ 0,5 đến 8,0 phút 97-83% B, từ 8,0 đến 10,0 phút 83-70% B, từ 10,0 đến 15,0 phút 70-55% B, từ 15,0 đến 20,0 phút 55-5% B, từ 20,0 đến 22,0 phút 5-97% B, từ 22,0 đến 23,0 phút 97% B. Tốc độ dòng 1,0 ml/phút với thời gian chạy mẫu 23 phút. Sử dụng đầu dò UV với bước sóng 265 nm, nhiệt độ cột 30°C, quá trình tiêm mẫu bằng hệ thống tự động với thể tích mẫu tiêm là 5 μ l. Tính toán kết quả dựa vào phương trình đường chuẩn của các chất chuẩn ở cùng điều kiện. Trong đó, các chất chuẩn (Rutin, quercetin, hypophyllanthin và phyllanthin) mua từ Hãng Sigma-Aldrich® (Mỹ).

2.6. Xử lý số liệu

Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần với 50 đĩa petri/nghiệm thức (mỗi mẫu cây trên một đĩa petri). Số liệu được phân tích thống kê bằng phần mềm SPSS phiên bản 20.0 để so sánh sự khác biệt đáng kể giữa các giá trị trung bình bằng phép thử Tukey với mức ý nghĩa $p \leq 0,05$. Các bảng số liệu được tạo bởi phần mềm MicroSoft Excel 2016.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Phát sinh hình thái của mẫu lông thân cây Diệp hạ châu trồng dưới điều kiện Clinostat 2D

Kết quả ghi nhận được cho thấy, thời gian cảm ứng mô sẹo của mẫu lông thân cây Diệp hạ châu trồng dưới điều kiện Clinostat 2D và đối chứng không có sự khác biệt. Tuy nhiên, tỷ lệ cảm ứng mô sẹo và hình thành rễ bất định cho thấy sự khác biệt giữa 2 điều kiện nuôi cấy (bảng 1). Sau 2 tuần nuôi cấy, mẫu lông thân nuôi cấy dưới điều kiện Clinostat 2D ghi nhận 93,33% cảm ứng mô sẹo và 6,67% hình thành rễ bất định, trong khi đó, tất cả mẫu lông thân đều cảm ứng mô sẹo dưới điều kiện đối chứng. Tỷ lệ cảm ứng mô sẹo giảm và tỷ lệ hình thành rễ bất định gia tăng ở điều kiện Clinostat 2D sau 3 và 4 tuần nuôi cấy (bảng 1). Sau 4 tuần nuôi cấy, tỷ lệ cảm ứng mô sẹo dưới điều kiện Clinostat 2D chỉ còn 34,33% và tỷ lệ hình thành rễ bất định tăng lên 65,67%. Dưới điều kiện đối chứng, không ghi nhận hình thành rễ bất định sau 4 tuần nuôi cấy (hình 1 và bảng 1).

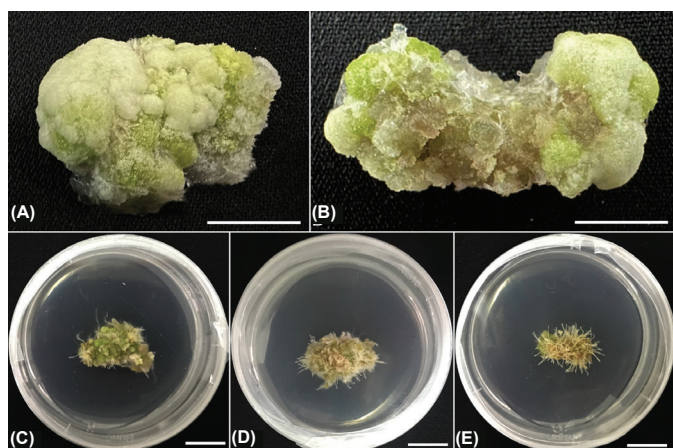
Sự thay đổi trọng lực ảnh hưởng đến sự tăng trưởng và tăng sinh không chỉ ở cấp độ tế bào mà còn ở cấp độ toàn bộ cơ thể sinh vật [23]. Kết quả nghiên cứu này cho thấy, khối lượng tươi của mẫu cấy cũng có sự khác biệt giữa 2 điều kiện nuôi cấy sau 2, 3 và 4 tuần nuôi cấy (bảng 1). Khối lượng tươi của cụm mô sẹo (792,00 mg) tăng 1,46 lần dưới điều kiện Clinostat 2D cao hơn khối lượng tươi cụm mô sẹo (313,33 mg) nuôi cấy dưới điều kiện đối chứng chỉ tăng 1,19 lần. Sự thay đổi về khối lượng khô của cụm mô sẹo cũng tương tự như khối lượng tươi (hình 1).

Dưới điều kiện Clinostat 2D, khối lượng khô cụm mô sẹo (79,17 mg) cao hơn so với khối lượng khô mẫu cấy dưới điều kiện đối chứng (30,07 mg). Kết quả gia tăng khối lượng tươi và khô của cụm mô sẹo dưới điều kiện Clinostat 2D tương tự kết quả thu được trên cây Thuốc lá [2, 3] và Lúa [4]. Những kết quả về sự tăng sinh của tế bào thực vật này có thể được giải thích bởi điều kiện không trọng lực duy trì nới lỏng thành tế bào thực vật [2, 23] hoặc tiết kiệm năng lượng dành cho các quá trình khác như sinh tổng hợp

Bảng 1. Sự phát sinh hình thái của mẫu lông thân cây Diệp hạ châu trồng dưới điều kiện Clinostat 2D và đối chứng sau 2, 3 và 4 tuần nuôi cấy.

Thời gian nuôi cấy (tuần)	Tỷ lệ cảm ứng mô sẹo (%)		Tỷ lệ hình thành rễ bất định (%)		Khối lượng tươi cụm mô sẹo (mg)		Khối lượng khô cụm mô sẹo (mg)	
	Clinostat 2D	Đối chứng	Clinostat 2D	Đối chứng	Clinostat 2D	Đối chứng	Clinostat 2D	Đối chứng
2	93,33 ^a		6,67 ^c		541,00 ^c	263,00 ^c	53,83 ^c	24,67 ^c
3	62,67 ^b	100,00 ^a	37,33 ^b	0,00 ^a	598,67 ^b	291,00 ^b	59,89 ^b	29,00 ^b
4	34,33 ^c		65,67 ^a		792,00 ^a	313,33 ^a	79,17 ^a	30,07 ^a

Các chữ cái khác nhau (a, b, c) trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$ (Tukey's test).



Hình 1. Phát sinh hình thái mẫu lông thân cây Diệp hạ châu trồng dưới điều kiện Clinostat 2D và đối chứng. (A) Mô sẹo ở điều kiện đối chứng sau 4 tuần nuôi cấy; (B) Mẫu mô sẹo ở điều kiện Clinostat 2D sau 4 tuần nuôi cấy; (C-E) Rễ bất định ở điều kiện Clinostat 2D sau 2, 3 và 4 tuần nuôi cấy. Thước đo A, B: 0,5 cm; C-E: 1 cm.

các chất chuyển hóa có lợi cho sự tăng trưởng của thực vật [3]. Ngoài ra, hình thái bên ngoài cụm mô sẹo nuôi cấy dưới Clinostat 2D và đối chứng sau 4 tuần khi quan sát dưới kính hiển vi soi nổi không có sự khác biệt. Trong nghiên cứu này, mẫu cấy lông thân nuôi cấy dưới điều kiện Clinostat 2D ghi nhận hình thành rễ bất định sau 2, 3 và 4 tuần nuôi cấy. Tỷ lệ hình thành rễ bất định tăng từ 6,67% sau 2 tuần nuôi cấy lên 65,67% sau 4 tuần nuôi cấy (bảng 1). Trong hầu hết các loài thực vật, sự hình thành rễ bất định đều được khởi phát bởi auxin. Auxin cần thiết cho sự phân chia và tăng trưởng của tế bào nên có vai trò quan trọng trong sự phát sinh hình thái thực vật. Auxin kích thích sự tạo rễ và hoạt hoá cơ quan, có vai trò chủ yếu trong sự cảm ứng tạo rễ [24]. Trong nghiên cứu này, sự hình thành rễ bất định ở cây Diệp hạ châu trồng đã được thúc đẩy có thể do điều kiện Clinostat 2D đã ảnh hưởng sớm lên sự thay đổi hàm lượng auxin [11].

3.2. Hàm lượng enzyme kháng oxy hóa của mô sẹo và rễ bất định cây Diệp hạ châu trồng dưới điều kiện Clinostat 2D

Hàm lượng hoạt tính của các enzyme kháng oxy hóa như SOD, APX, CAT và Phenolic ghi nhận có sự khác biệt ở điều kiện Clinostat 2D và đối chứng sau 2, 3 và 4 tuần nuôi cấy (bảng 2). Các hoạt tính enzyme kháng oxy hóa này đều tăng theo tỷ lệ từ 2 đến 4 tuần ở cả hai điều kiện nuôi cấy. Các hoạt tính SOD, CAT, APX và phenolic ở điều kiện Clinostat 2D cao hơn đối chứng. Tuy nhiên, hoạt tính APX của mẫu mô sẹo ở điều kiện đối chứng và Clinostat 2D sau 2, 3 và 4 tuần nuôi cấy là tương đương (bảng 1). Trong cùng điều kiện Clinostat 2D, các hoạt tính kháng oxy hóa này ở rễ luôn cao hơn ở mô sẹo tại tất cả thời gian ghi nhận.

Để khắc phục tổn thương do stress oxy hóa, thực vật có cơ chế kiểm soát và điều chỉnh mức ROS (Reactive oxygen species) một cách thích hợp, bao gồm tăng hoạt độ enzyme chống oxy hóa như APX, CAT và SOD [25]. M. Soleimani và cs (2019b) [3] cho thấy mối quan hệ tích cực giữa chất kháng oxy hóa và các thông số tăng trưởng trong tế bào cây Thuộc lá trong điều kiện Clinostat 2D. Trong nghiên cứu này, mẫu lông thân cảm ứng mô sẹo dưới điều kiện Clinostat 2D có khối lượng tươi và khô cao hơn đối chứng (bảng 1). Điều kiện nuôi cấy Clinostat 2D làm gia tăng hoạt tính của SOD, CAT và hàm lượng phenolic đã làm gia tăng tỷ lệ cảm ứng mô sẹo, khối lượng tươi và khô của mẫu cây [2]. Một nghiên cứu gần đây của H. Halimeh (2022) [13] trên cây Cúc La Mã cho thấy, hoạt tính của enzyme kháng oxy hóa tăng tỷ lệ thuận với thời gian nuôi cấy dưới điều kiện không trọng lực so với điều kiện đối chứng. Sự thay đổi này giúp tế bào có cơ chế thích nghi và tăng trưởng tốt hơn, cũng như tăng sản xuất các hợp chất có hoạt tính sinh học.

Bảng 2. Hoạt tính enzyme kháng oxy hóa của mô sẹo và rễ cây Diệp hạ châu trồng dưới điều kiện Clinostat 2D và đối chứng sau 2, 3 và 4 tuần nuôi cấy.

Thời gian nuôi cấy (tuần)	SOD (U/g)			CAT (U/g)			APX (U/g)			Phenolic (mg/100 g chất khô)		
	Clinostat 2D		Đối chứng	Clinostat 2D		Đối chứng	Clinostat 2D		Đối chứng	Clinostat 2D		Đối chứng
	Mô sẹo	Rễ	Mô sẹo	Mô sẹo	Rễ	Mô sẹo	Mô sẹo	Rễ	Mô sẹo	Mô sẹo	Rễ	Mô sẹo
2	51,23 ^c	75,79 ^c	23,28 ^c	181,05 ^c	227,70 ^c	174,95 ^c	0,24 ^c	0,63 ^b	0,28b	56,47 ^c	81,4 ^c	50,91 ^c
3	60,90 ^b	90,42 ^b	31,18 ^b	222,80 ^b	303,70 ^b	215,81 ^b	0,32 ^b	0,67 ^b	0,35b	77,19 ^b	97,3b	71,56 ^b
4	71,37 ^a	121,29 ^a	44,72 ^a	243,29 ^a	334,79 ^a	236,46 ^a	0,44 ^a	0,95 ^a	0,43a	99,24 ^a	126,24 ^a	92,31 ^a

Các chữ cái khác nhau (a, b, c) trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với p<0,05 (Tukey's test).

Bảng 3. Hợp chất thứ cấp của mô sẹo và rễ cây Diệp hạ châu trồng dưới điều kiện Clinostat 2D và đối chứng sau 4 tuần nuôi cấy.

Điều kiện nuôi cấy	Mẫu cây	Flavonoid (µg/g chất tươi)		Lignan (µg/g chất tươi)	
		Rutin	Quercetin	Hypophyllanthin	Phyllanthin
Clinostat 2D	Mô sẹo	1,79 ^a	3,25 ^b	29,06 ^a	16,01 ^a
	Rễ	1,19 ^b	9,54 ^a	9,03 ^c	—**
Đối chứng	Mô sẹo	—**	9,61 ^a	17,29 ^b	11,53 ^b

Các chữ cái khác nhau (a, b, c) trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với p<0,05 (Tukey's test); **: không ghi nhận số liệu.

3.3. Tích lũy hợp chất thứ cấp của mô sẹo và rễ cây Diệp hạ châu trồng dưới điều kiện Clinostat 2D

Kết quả phân tích HPLC cho thấy, hàm lượng flavonoid (rutin và quercetin), lignan (hypophyllanthin và phyllanthin) có sự khác biệt ở điều kiện Clinostat 2D và đối chứng (bảng 3). Hợp chất rutin xuất hiện trong cả mô sẹo và rễ ở điều kiện Clinostat 2D với hàm lượng ở mô sẹo cao hơn ở rễ; trong khi đó, hợp chất này không xuất hiện trong mô sẹo ở điều kiện đối chứng. Với hợp chất quercetin được phát hiện ở cả hai điều kiện nuôi cấy, hàm lượng hợp chất này cao nhất trong mô sẹo ở điều kiện đối chứng (9,61 µg/1 g chất tươi) và thấp nhất trong mô sẹo (3,25 µg/1 g chất tươi) ở điều kiện Clinostat 2D (bảng 3).

Đối với hoạt chất hypophyllanthin và phyllanthin, hàm lượng của chúng trong mô sẹo ở điều kiện Clinostat 2D đều cao hơn đối chứng. Ở điều kiện Clinostat 2D, hàm lượng hypophyllanthin trong mô sẹo (29,06 µg/1 g chất tươi) cao hơn trong rễ (9,03 µg/1 g chất tươi), trong khi hoạt chất phyllanthin chỉ xuất hiện ở mô sẹo mà không có ở rễ (bảng 3). Các hợp chất thứ cấp quyết định được tính của cây Diệp hạ châu trồng là rutin, quercetin, đây là các flavonoid với vai trò ngăn ngừa tế bào ung thư và hypophyllanthin, phyllanthin là các lignan có chức năng bảo vệ gan. Kết quả nghiên cứu này cho thấy, hàm lượng hypophyllanthin, phyllanthin ở điều kiện Clinostat 2D đều cao hơn đối chứng. Điều này tương tự với nghiên cứu của D.T. Nhut và cs (2022) [10] khi đã chứng minh ở điều kiện Clinostat 2D, sự tích lũy hàm lượng coumarin, saponin ở cây Sâm bố chính và phyllanthin ở cây Diệp hạ châu trồng được tăng cường. Ngoài ra, nghiên cứu của H. Halimeh (2022) [13] trên cây Cúc La Mã cho thấy điều kiện mô phỏng không trọng lực đã làm tăng sản xuất các hợp chất có hoạt tính sinh học.

4. Kết luận

Mẫu cây lông thân đã cảm ứng mô sẹo (34,33%) và rễ bất định (65,67%) dưới điều kiện Clinostat 2D và mô sẹo (100%) dưới điều kiện đối chứng. Sinh khối của cụm mô sẹo (khối lượng tươi và khối lượng khô lần lượt là 792,00 và 79,17 mg) dưới điều kiện Clinostat 2D cao hơn so với điều kiện đối chứng (tương ứng là 313,33 và 30,07 mg). Ngoài ra, hoạt tính SOD, CAT và Phenolic ở mô sẹo và rễ bất định dưới điều kiện Clinostat 2D cao hơn so với điều kiện đối chứng, trong khi đó, hoạt tính APX không có sự khác biệt về thống kê ở mô sẹo dưới cả 2 điều kiện sau 2, 3 và 4 tuần nuôi cấy. Bên cạnh đó, hàm lượng các hợp chất thứ cấp như rutin, quercetin, hypophyllanthin và phyllanthin trong mô sẹo và rễ bất định cũng có sự biến động ở cả 2 điều kiện nuôi cấy.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ Đổi mới sáng tạo Vingroup (VINIF) trong Dự án mã số VINIF.2023.DA075. Các tác giả xin chân thành cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] A.I. Manzano, I. Matía, F.G. Camacho, et al. (2009), "Germination of *Arabidopsis* seed in space and in simulated microgravity: Alterations in root cell growth and proliferation", *Microgravity Science and Technology*, **21**(4), pp.293-297, DOI: 10.1007/s12217-008-9099-z.
- [2] M. Soleimani, F. Ghanati, Z. Hajebrahimi (2019a) "The role of phenolic compounds in growth improvement of cultured tobacco cells after exposure to 2-D clinorotation", *Plant Physiology*, **9**(4), pp.2921-2929, DOI: 10.30495/IJPP.2019.668858.
- [3] M. Soleimani, F. Ghanati, Z. Hajebrahimi, et al. (2019b), "Energy saving and improvement of metabolism of cultured tobacco cells upon exposure to 2-D clinorotation", *Journal of Plant Physiology*, **234-235**, pp.36-43, DOI: 10.1016/j.jplph.2019.01.002.
- [4] T. Hoson, K. Soga, R. Mori, et al. (1999) "Morphogenesis of rice and *Arabidopsis* seedlings in space", *Journal of Plant Research*, **112**(4), pp.477-486, DOI: 10.1007/PL00013903.
- [5] C.M. Ramage, R.R. Williams (2002) "Mineral nutrition and plant morphogenesis", *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, **38**(2), pp.116-124, DOI: 10.1079/IVP2001269.
- [6] M. Nakamura, T. Nishimura, M.T. Morita (2019) "Gravity sensing and signal conversion in plant gravitropism", *Journal of Experimental Botany*, **70**(14), pp.3495-3506, DOI: 10.1093/jxb/erz158.
- [7] K. Soga, A. Kurita, S. Yano, et al. (2014) "Growth and morphogenesis of Azuki bean seedlings in space during SSAF2013 program", *Biological Sciences in Space*, **28**, pp.6-11, DOI: 10.2187/bss.28.6.
- [8] A. Frolov, A. Didio, C. Ihling, et al. (2018) "The effect of simulated microgravity on the *Brassica napus* seedling proteome", *Functional Plant Biology*, **45**(4), pp.440-452, DOI: 10.1071/FP16378.
- [9] H. Takahashi, M. Kamada, Y. Yamazaki, et al. (2000) "Morphogenesis in cucumber seedlings is negatively controlled by gravity", *Planta*, **210**, pp.515-518, DOI: 10.1007/s004250050039.
- [10] D.T. Nhut, H.D. Khai, N.X. Tuan, et al. (2022) "In vitro growth and development of plant under stimulated microgravity condition", *Plant Tissue Culture: New Techniques and Application in Horticultural Species of Tropical Region*, Springer, pp.343-382, DOI: 10.1007/978-981-16-6498-417.
- [11] H.D. Khai, L.T. Bien, N.Q. Vinh, et al. (2021), "Alterations in endogenous hormone levels and energy metabolism promoted the induction, differentiation and maturation of *Begonia* somatic embryos under clinorotation", *Plant Science*, **312**, DOI: 10.1016/j.plantsci.2021.111045.
- [12] S. Nakajima, Y. Ogawa, T. Suzuki, et al. (2019) "Enhanced antioxidant activity in mung bean seedlings grown under slow clinorotation", *Microgravity Science and Technology*, **31**, pp.395-401, DOI: 10.1007/s12217-019-9699-9.
- [13] H. Halimeh (2022) "Antioxidant metabolism and oxidative damage in *Anthemis gilanica* cell line under fast clinorotation", *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **150**(1), pp.710-719, DOI: 10.1007/s11240-022-02324-2.
- [14] L.T. Bien, H.T. Tung, N.T.N. Mai, et al. (2023) "Morphogenesis of *in vitro* strawberry leaf cultured under clinostat 2D condition", *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **152**(1), pp.1-12, DOI: 10.1007/s11240-023-02484-9.
- [15] T. Murashige, F. Skoog (1962) "A revised medium for rapid growth and bioassays with Tobacco tissue cultures", *Plant Physiology*, **1**(3), pp.473-497.
- [16] H. Wang, H.Q. Zheng, W. Sha, et al. (2006) "A proteomic approach to analysing responses of *Arabidopsis thaliana* callus cells to clinostat rotation", *Journal of Experimental Botany*, **57**(4), pp.827-835, DOI: 10.1093/jxb/erj066.
- [17] K.M. Nitnaware, D.G. Naik, T.D. Nikam (2011), "Thidiazuron-induced shoot organogenesis and production of hepatoprotective lignan phyllanthin and hypophyllanthin in *Phyllanthus amarus*", *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **104**, pp.101-110, DOI: 10.1007/s11240-010-9796-3.
- [18] S. Marklund, G. Marklund (1974) "Involvement of the superoxide anion radical in the autooxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase", *European Journal of Biochemistry*, **47**(3), pp.469-474.
- [19] L. Goth (1991) "A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range", *Clinica Chimica Acta*, **196**(2-3), pp.143-151, DOI: 10.1016/0009-8981(91)90067-M.
- [20] Y. Nakano, K. Asada (1981) "Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts", *Plant and Cell Physiology*, **22**(5), pp.867-880, DOI: 10.1093/oxfordjournals.pcp.a076232.
- [21] V.L. Singleton, R. Orthofer, R.M. Lamuela-raventos (1999), "Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-ciocalteu reagent", *Methods in Enzymology*, **299**, pp.152-178.
- [22] V. Murugaiyah, K.L. Chan (2007), "Determination of four lignans in *Phyllanthus niruri* L. by a simple high-performance liquid chromatography method with fluorescence detection", *Journal of Chromatography A*, **1154**, pp.198-204, DOI: 10.1016/j.chroma.2007.03.079.
- [23] J. Xie, H. Zheng (2020), "*Arabidopsis* flowering induced by photoperiod under 3-D clinostat rotational simulated microgravity", *Acta Astronautica*, **166**, pp.567-572, DOI: 10.1016/j.actaastro.2018.11.014.
- [24] L. Taiz, E. Zeiger (2002), *Plant Physiology (3rd Ed.)*, Sinauer Associates, Sunderland, USA, 675pp.
- [25] H.T.M. Ngan, D.M. Cuong, H.T. Tung, et al. (2020) "The effect of cobalt and silver nanoparticles on overcoming leaf abscission and enhanced growth of Rose (*Rosa hybrida* L. 'Baby Love') plantlets cultured *in vitro*", *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **145**, pp.1-13, DOI: 10.1007/s11240-020-01796-4.

Xác định mối quan hệ di truyền của một số dòng Keo lá tràm (*Acacia auriculiformis*) bằng chỉ thị ISSR

Dương Văn Đoàn, Trần Thị Thu Thảo, Bùi Tri Thức, Nguyễn Mạnh Tuấn, Nguyễn Tiến Dũng*

Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Thái Nguyên, xã Quyết Thắng, TP Thái Nguyên, tỉnh Thái Nguyên, Việt Nam

Ngày nhận bài 17/4/2023; ngày chuyển phản biện 20/4/2023; ngày nhận phản biện 2/5/2023; ngày chấp nhận đăng 8/5/2023

Tóm tắt:

Trong nghiên cứu này, 7 dòng Keo lá tràm (*Acacia auriculiformis*) đang trồng khảo nghiệm tại huyện Cam Lộ, tỉnh Quảng Trị được tiến hành đánh giá đa dạng di truyền bằng 15 môi ISSR. Kết quả cho thấy, 7 dòng keo có hệ số biến động di truyền ở mức độ trung bình. Trong đó, 4 môi gồm ISSR1, ISSR3, ISSR8 và ISSR15 cho chỉ số đa hình di truyền tốt hơn các môi còn lại. Trong tổng số 40 phân đoạn được khuếch đại có 30 phân đoạn đa hình, chiếm 75%. Chỉ số đa dạng di truyền PIC dao động trong khoảng 0,28-0,33. Trong đó, môi ISSR8 cho chỉ số đa dạng di truyền cao nhất (0,33), môi ISSR15 cho mức độ đa dạng di truyền thấp nhất (0,28). 7 dòng Keo lá tràm được chia thành 2 nhóm chính. Nhóm I gồm 4 dòng Clt7, Clt18, Clt19 và Clt26. Nhóm II gồm 3 dòng Clt25, Clt43 và Clt57. Sự khác biệt di truyền có mối tương quan với khả năng sinh trưởng của cây. Kết quả này cho thấy, chỉ thị ISSR là công cụ hỗ trợ hiệu quả trong công tác đánh giá và chọn lọc nguồn gen tốt trong chương trình chọn giống cây lâm nghiệp của Việt Nam.

Từ khóa: chỉ thị phân tử, ISSR, Keo lá tràm, quan hệ di truyền.

Chỉ số phân loại: 4.6

1. Đặt vấn đề

Keo lá tràm còn được gọi là cây Tràm bông vàng có nguồn gốc từ Australia, Papua New Guinea và Indonesia..., được nhập vào Việt Nam từ đầu thế kỷ XX [1, 2]. Cây Keo lá tràm có đặc tính sinh trưởng nhanh về đường kính, chiều cao và hình khối, khả năng chống chịu sâu bệnh hại tốt, có khả năng thích ứng với nhiều điều kiện sinh thái và các loại đất khác nhau [2]. Ngoài giá trị về mặt kinh tế, cây Keo lá tràm còn có giá trị về mặt môi trường vì có khả năng cải tạo đất, chống xói mòn [2].

Hiện nay, công tác nghiên cứu, chọn tạo giống Keo lá tràm theo hướng nâng cao khả năng chống chịu và cho năng suất, chất lượng tốt đang được nhiều nhà khoa học quan tâm [2]. Ở Việt Nam, việc nghiên cứu chọn tạo giống Keo lá tràm được tiến hành chủ yếu bằng các phương pháp chọn lọc từ các dòng nhân giống vô tính (*in vitro*) hay các dòng nhập nội. Từ năm 1990, Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam đã tiến hành Chương trình cải thiện giống Keo lá tràm và đến nay đã chọn lọc được một số dòng vô tính có khả năng sinh trưởng nhanh, chất lượng gỗ tốt [3]. Năm 2015, 9 dòng Keo lá tràm vô tính bao gồm Clt7, Clt18, Clt19, Clt25, Clt26, Clt43, Clt57, Clt98 và AA9 được đánh giá khảo nghiệm mở rộng tại huyện Cam Lộ, tỉnh Quảng Trị cho thấy, giữa các dòng keo lá tràm này có sự khác biệt rõ rệt về sinh trưởng và tính chất cơ học gỗ [4, 5]. Kết quả nghiên cứu cũng cho

thấy sự cần thiết phải có các nghiên cứu chi tiết hơn về mối quan hệ di truyền giữa các dòng Keo lá tràm với khả năng sinh trưởng của chúng.

Trong vài thập niên trở lại đây, các kỹ thuật đánh giá mối quan hệ di truyền bằng các chỉ thị phân tử (RAPD, SSR, ISSR...) đã được nghiên cứu và áp dụng cho hiệu quả cao để đánh giá mối quan hệ di truyền giữa các cá thể thực vật. V.D. Tuan (2011) [1] đã sử dụng 33 cặp môi SSR và 12 môi RAPD để nghiên cứu mối quan hệ di truyền của quần thể Keo lá tràm ở Đông Nam Bộ, kết quả cho thấy biến động giữa các cá thể thấp. A. Shanthi và cs (2013) [6] đã sử dụng 10 môi ISSR để nghiên cứu đánh giá đa dạng di truyền của 53 kiểu gen của quần thể Keo lá tràm. O.A. Attia và cs (2017) [7] đã nghiên cứu sự đa dạng di truyền của quần thể *Acacia* spp. bằng 20 môi ISSR. Các tác giả đều ghi nhận mức độ đa dạng di truyền giữa các quần thể ở mức cao. Các kết quả nghiên cứu trên cho thấy, chỉ thị ISSR có hiệu quả cao trong đánh giá đa dạng di truyền ở cây Keo lá tràm. Từ các kết quả nghiên cứu trên, 7 dòng Keo lá tràm Clt7, Clt18, Clt19, Clt25, Clt26, Clt43 và Clt57 do Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam chọn lọc đang trồng khảo nghiệm tại huyện Cam Lộ, tỉnh Quảng Trị được xác định mối quan hệ di truyền bằng chỉ thị ISSR. Kết quả nghiên cứu nhằm bổ sung cơ sở dữ liệu xác định mối tương quan giữa khả năng sinh trưởng và tính chất gỗ ở các dòng Keo lá tràm được nghiên cứu.

*Tác giả liên hệ: Email: dungnt@tuaf.edu.vn

Identification of genetic relationships of *Acacia auriculiformis* clones using ISSR markers

Van Doan Duong, Thi Thu Thao Tran, Tri Thuc Bui, Manh Tuan Nguyen, Tien Dung Nguyen*

Thai Nguyen University of Agriculture and Forestry, Thai Nguyen University, Quyet Thang Commune, Thai Nguyen City, Thai Nguyen Province, Vietnam

Received 17 April 2023; revised 2 May 2023; accepted 8 May 2023

Abstract:

In this study, seven clones of *Acacia auriculiformis*, collected in Cam Lo district, Quang Binh province were assessed for genetic diversity using 15 ISSR markers. The results showed that seven *Acacia* clones had an average level of genetic variation. In which, four ISSR markers including ISSR1, ISSR3, ISSR8, and ISSR15 showed higher polymorphism information content (PIC) value than the others. The results analysis indicated that 30 out of 40 DNA fragments were polymorphic (75%, $PIC=0.28-0.33$). The ISSR8 exhibited the highest genetic diversity index (0.33), while ISSR15 showed the lowest diversity (0.28). Seven clones of *A. auriculiformis* were divided into two main groups: group I comprised four clones: Clt7, Clt18, Clt19, and Clt26; group II included the remaining three clones: Clt25, Clt43, and Clt57. Genetic variation was correlated with plant growth ability. This result exhibited that the ISSR marker was an efficient tool in assessing and selecting the good genetic resource of *A. auriculiformis* for the forestry tree breeding program in Vietnam.

Keywords: *Acacia auriculiformis*, genetic relationships, ISSR, molecular markers.

Classification number: 4.6

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Nghiên cứu được tiến hành trên 7 dòng Keo lá tràm, gồm Clt7, Clt18, Clt19, Clt25, Clt26, Clt43 và Clt57 được thu thập ở huyện Cam Lộ, tỉnh Quảng Trị, sử dụng 15 mồi ISSR (bảng 1) để đánh giá mối quan hệ di truyền. Thông tin chi tiết về rừng trồng khảo nghiệm các dòng Keo lá tràm được trình bày trong các nghiên cứu trước của D.H. Son và cs (2021) [4], D.V. Duong và cs (2022) [5].

Bảng 1. Trình tự mồi ISSR sử dụng trong nghiên cứu.

STT	Tên mồi	Trình tự mồi (5' - 3')	Tm (°C)	Nguồn
1	ISSR1	CCACCACCACCACCA	51,6	S. Alansi và cs (2016) [8]
2	ISSR2	CACACCACACACACAGT	53,8	
3	ISSR3	CAGCAGCAGCAGCAG	51,6	
4	ISSR4	GAGAGAGAGAGAGAGAA	50,0	
5	ISSR5	GTCCTCTCTCTCTCTCT	57,3	
6	ISSR6	CACACACACACACAGT	48,2	
7	ISSR7	ACACACACACACACT	50,0	
8	ISSR8	AGAGAGAGAGAGAGAGYC	55,0	
9	ISSR9	AGAGAGAGAGAGAGAGYA	52,7	
10	ISSR10	GAGCACCACCACCACRC	58,4	
11	ISSR11	ATATATATATATATATGT	53,8	
12	ISSR12	GAGGAGGAGGC	38,0	
13	ISSR13	CTCTCTCTCTCTCTCTRC	55,0	
14	ISSR14	GAGAGAGAGAGAGAGAYG	55,0	
15	ISSR15	ACACACACACACACTG	53,8	

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Tách chiết DNA tổng số: DNA tổng số được tách từ lá của từng dòng Keo lá tràm được thu thập bằng bộ kit DNA e (RM301-02, Nanjing Vazyme Biotech). DNA tổng số được xác định nồng độ bằng máy đo quang phổ Nano DropOne của Hãng Thermo Fisher kết hợp với điện di trên gel Agarose 1%.

Thiết lập phản ứng PCR và kiểm tra kết quả: DNA tổng số của các mẫu được pha loãng với nước cất khử ion ở cùng nồng độ (50 ng/μl) để sử dụng làm khuôn cho phản ứng PCR. Mỗi phản ứng PCR được tiến hành ở thể tích 20 μl, bao gồm các thành phần sau: 10 μl PCR Master mix 2X, 1,5 μl mồi ISSR (10 pmol), 2 μl DNA và 6,5 μl nước khử ion. Phản ứng PCR được thực hiện bằng máy luân nhiệt PCR (Mastercycler nexus GX3, Eppendorf) trong 35 chu kỳ theo chu trình nhiệt như sau: 94°C 1 phút, 56°C 40 giây, 72°C 1 phút và kết thúc kéo dài mồi ở 72°C 5 phút. Sản phẩm PCR được kiểm tra trên gel Agarose 2,0% sử dụng thang chuẩn 1 kb plus DNA ladder của Hãng Thermo Fisher, hiển thị kết quả bằng máy soi gel UVP GelStudio của Hãng Analytik Jena.

Phân tích số liệu và xây dựng cây phát sinh chủng loại: Kết quả hiển thị của các băng DNA trên bản gel điện di được mã hóa dưới dạng nhị phân theo phương pháp của J.A. Anderson và cs (1993) [9], tất cả băng xuất hiện trên phổ điện di được mã hóa thành số theo dạng nhị phân (1 và 0), 1 tương ứng với locus được khuếch đại, 0 tương ứng với locus không được khuếch đại. Chỉ số đa hình di truyền PIC (Polymorphism information content) được tính toán theo J.D. Riek và cs (2001) [10] theo công thức sau:

$$PIC(i) = 2f_i(1 - f_i)$$

trong đó, f_i là tần số alen của mẫu thứ i với locus thứ i .

Kết quả chỉ số PIC sau cùng sẽ là chỉ số PIC trung bình cộng của tất cả locus được tính theo công thức trên. Bảng hệ số ma trận tương đồng di truyền và sơ đồ hình cây biểu thị mối quan hệ di truyền giữa các dòng Keo lá tràm được xây dựng dựa trên chỉ số tương ứng đơn giản SM (Simple matching) và phân nhóm UPGMA (Unweighted pair-group method with arithmetic mean) sử dụng phần mềm NTSYSpc 2.1 [11].

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Đánh giá tính đa hình của các chỉ thị ISSR

Để lựa chọn chỉ thị ISSR cho phân tích đa dạng di truyền ở các dòng keo, nghiên cứu tiến hành đánh giá tính đa hình của 15 môi ISSR (bảng 1). Kết quả cho thấy, trong 15 môi ISSR khảo sát, ISSR2 và ISSR6 cho duy nhất 1 phân đoạn DNA, các môi còn lại đều cho nhiều phân đoạn DNA trên bản gel điện di (hình 1). Sự đa hình của chỉ thị ISSR được

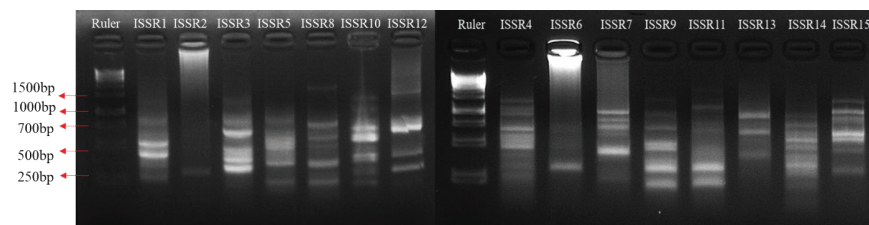
thể hiện qua các phân đoạn DNA và đánh giá thông qua chỉ số PIC. Kết quả cho thấy, trong tổng số 40 phân đoạn được khuếch đại có 30 phân đoạn DNA đa hình chiếm tỷ lệ 75% (bảng 2).

I.R. Ruiz và cs (2000) [12] cho rằng, chỉ số PIC phân chia thành 3 nhóm: (i) lớn hơn 0,5 có tính đa hình cao, (ii) từ 0 đến 0,5 có tính đa hình trung bình và (iii) dưới 0,2 là đa hình thấp. Dựa trên kết quả điện di, chúng tôi lựa chọn được 4 môi cho kết quả đa hình ở mức trung bình, bao gồm ISSR1, ISSR3, ISSR8 và ISSR15, chỉ số PIC từ 0,28 đến 0,33 (bảng 2). Các môi còn lại có mức độ đa hình thấp.

Môi ISSR1: Kết quả điện di thu được tổng số 9 phân đoạn có kích thước nằm trong khoảng từ 200 đến 1200 bp. Trong đó, có 6 phân đoạn đa hình chiếm 66,67%, chỉ số PIC đạt 0,31. Cụ thể, tại vị trí 200 bp, có 2 dòng Clt25 và Clt26 có hiển thị phân đoạn DNA, vị trí 250 bp có 1 phân đoạn ở dòng Clt57. Tại vị trí 1200 bp có 4 dòng Clt18, Clt19, Clt25 và Clt43 có hiển thị băng vạch. Các vị trí từ 300 đến 700 bp hầu hết các dòng đều có các phân đoạn DNA giống nhau (hình 2).

Môi ISSR3: Kết quả điện di thu được 8 phân đoạn DNA có kích thước nằm trong khoảng từ 300 đến 1200 bp. Trong đó, có 6 phân đoạn đa hình chiếm 75%, chỉ số PIC đạt 0,31. Cụ thể, tại vị trí khoảng 600 bp có Clt7, Clt18, Clt25, Clt26 và Clt57 hiển thị phân đoạn DNA, 2 dòng Clt9 và Clt43 không có băng vạch nào. Ở vị trí 700 bp có 2 dòng Clt7 và Clt45, vị trí 1000 bp dòng Clt18 không hiển thị phân đoạn DNA nào (hình 2).

Môi ISSR8: Kết quả điện di cho thấy, tổng số 13 phân đoạn được nhận bản, trong đó, 11 phân đoạn đa hình, chiếm 85%. Kích thước các băng dao động từ 200 đến 2000 bp. Cụ thể, tại vị trí 200 bp, hầu hết các dòng đều không cho băng vạch, ngoại trừ 2 dòng Clt57 và Clt43. Tại 2 vị trí 250 và 450 bp, chỉ có duy nhất dòng Clt25 không cho băng vạch. Tại 2 vị trí 375 và 800 bp, tất cả các dòng nghiên cứu đều cho băng vạch. Tại vị trí 500 bp, các dòng Clt7, Clt18, Clt19 và Clt26 không cho băng vạch. Tại vị trí 700 bp, chỉ có 2 dòng Clt19 và Clt25 cho băng vạch. Tại vị trí 1000 bp, có 3 dòng cho băng vạch (Clt18, Clt19 và Clt25). Tại vị trí 1500 bp, duy nhất chỉ có dòng Clt18 cho băng vạch. Tại vị trí 2000 bp, có 3 dòng không cho băng vạch (Clt7, Clt18 và Clt25) (hình 2).

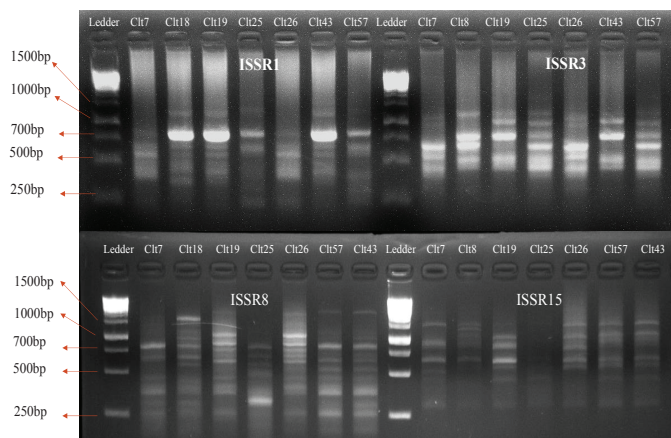


Hình 1. Kết quả khảo sát 15 môi ISSR ở cây Keo lá tràm (Clt25) sử dụng 1 kb plus DNA ladder.

Bảng 2. Chỉ số đánh giá tính đa hình của 7 dòng Keo lá tràm nghiên cứu được khuếch đại bằng chỉ thị ISSR.

Tên môi	Trọng lượng phân tử (bp)	Tổng số phân đoạn	Số phân đoạn đa hình	Tỷ lệ phân đoạn đa hình (%)	PIC
ISSR1	200-1200	9	6	66,67	0,31
ISSR3	300-1200	8	6	75	0,31
ISSR8	200-2000	13	11	85	0,33
ISSR15	310-1500	10	7	70	0,28
Tổng cộng		40	30	75	0,31

Mỗi ISSR15: Kết quả điện di cho thấy, 7 phân đoạn đa hình trên tổng số 10 phân đoạn được khuếch đại, chiếm 70%. Kích thước các phân đoạn dao động từ 310 đến 1500 bp. Cụ thể, tại các vị trí 310, 650 và 1500 bp tất cả các dòng đều cho băng vạch. Tại vị trí 450 bp, chỉ có 2 dòng Clt18 và Clt26 không cho băng vạch. Tại vị trí 500 bp, chỉ có dòng Clt7 cho băng vạch. Tại vị trí 575 bp, duy chỉ có dòng Clt7 không cho băng vạch. Tại vị trí 1000 bp, có 5 dòng cho băng vạch, gồm: Clt18, Clt19, Clt26, Clt57 và Clt43 (hình 2).



Hình 2. Kết quả điện di sản phẩm ISSR trên gel agarose 2%.

3.2. Đa dạng di truyền của các dòng Keo lá tràm

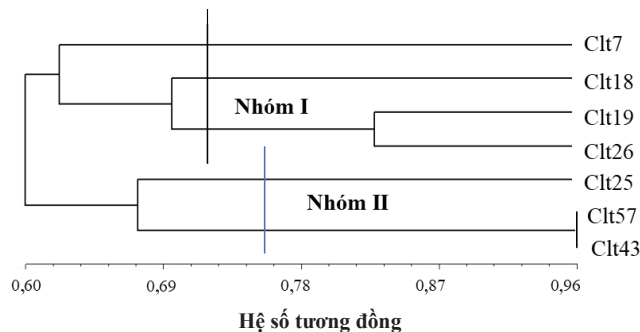
A. Shanthi và cs (2013) [6] đã sử dụng 10 môi ISSR để nghiên cứu đánh giá đa dạng di truyền của 53 kiểu gen của quần thể Keo lá tràm. Các tác giả ghi nhận 215 phân đoạn được khuếch đại, trong đó có 184 phân đoạn đa hình, chiếm tỷ lệ 85,5%. O.A. Attia và cs (2017) [7] đã nghiên cứu sự đa dạng di truyền của quần thể keo *Acacia* spp. sử dụng 20 môi ISSR, kết quả thu được 48 phân đoạn đa hình trên tổng số 60 phân đoạn được khuếch đại, ghi nhận tỷ lệ đa hình đạt 80,13%. Các kết quả này chỉ ra rằng, ISSR có thể sử dụng như một công cụ hiệu quả và chính xác để nghiên cứu và đánh giá mối quan hệ di truyền giữa các dòng Keo lá tràm.

Trong nghiên cứu này, dựa trên kết quả phân tích của 4 môi ISSR (ISSR1, ISSR3, ISSR8 và ISSR15) cho thấy, sự khác biệt về di truyền giữa 7 dòng Keo lá tràm (Clt7, Clt18, Clt19, Clt25, Clt26, Clt43 và Clt57) đang được trồng khảo nghiệm tại huyện Cam Lộ, tỉnh Quảng Trị. Sử dụng phần mềm NTSYSpc ver 2.1 dựa trên phương pháp UPGMA đã xây dựng được sơ đồ hình cây mối quan hệ di truyền và bảng hệ số tương đồng của 7 dòng Keo lá tràm nghiên cứu (hình 3, bảng 3).

Bảng 3. Hệ số tương đồng giữa 7 dòng Keo lá tràm dựa trên kết quả phân tích 4 chỉ thị ISSR.

	Clt7	Clt18	Clt19	Clt25	Clt26	Clt43	Clt57
Clt7	1,00						
Clt18	0,65	1,00					
Clt19	0,70	0,70	1,00				
Clt25	0,61	0,61	0,48	1,00			
Clt26	0,52	0,70	0,83	0,48	1,00		
Clt43	0,61	0,70	0,65	0,65	0,65	1,00	
Clt57	0,56	0,65	0,61	0,70	0,61	0,96	1,00

Kết quả bảng 3 cho thấy, hệ số tương đồng ở 7 dòng Keo lá tràm dao động từ 0,48 đến 0,96. Ở hệ số di truyền 0,6, 7 dòng Keo lá tràm được phân chia thành 2 nhóm chính (hình 3). Nhóm I gồm 4 dòng: Clt7, Clt18, Clt19 và Clt26, khoảng cách di truyền giữa các dòng trong nhóm dao động từ 0,52 đến 0,83. Trong đó, 2 dòng Clt7 và Clt26 có khoảng cách di truyền xa nhau, hệ số tương đồng 0,52. 2 dòng Clt19 và Clt26 có khoảng cách di truyền tương đối gần (hệ số tương đồng 0,83). Nhóm II gồm 3 dòng: Clt25, Clt43 và Clt57 có khoảng cách di truyền dao động 0,65-0,96. Trong đó, Clt25 và Clt43 có khoảng cách di truyền tương đối xa (hệ số tương đồng 0,65). 2 dòng Clt57 và Clt43 có khoảng cách di truyền gần nhất (hệ số tương đồng 0,96).



Hình 3. Mối quan hệ giữa 7 dòng Keo lá tràm nghiên cứu bằng phương pháp UPGMA dựa trên 4 chỉ thị ISSR.

Dựa trên kết quả đánh giá khả năng sinh trưởng của các dòng Keo lá tràm của D.H. Son và cs (2021) [4] nhận thấy có mối tương quan giữa hệ số di truyền với khả năng sinh trưởng của cây. Trong 7 dòng keo nghiên cứu, có 3 dòng thuộc nhóm I, gồm Clt7, Clt18 và Clt26 có các chỉ tiêu sinh trưởng vượt trội như chiều cao vút ngọn ($H_{vn}=11,9-13$ m), chiều cao dưới cành ($H_{DC}=7,9-8,5$ m) và năng suất ($14,9-20,1$ m³/ha/năm) [4]. Trong khi đó, các dòng nhóm II như Clt25, Clt43 và Clt57 có các chỉ số sinh trưởng thấp hơn: $H_{vn}=10,7-11,3$ m, $H_{DC}=6,3-6,7$ m và năng suất dao động $9,7-10,4$ m³/ha/năm [4]. Kết quả này cho thấy sự sai khác di truyền có tác động đến khả năng

sinh trưởng của các dòng Keo lá tràm trong nghiên cứu. Các dòng keo nhân giống vô tính bằng phương pháp nuôi cấy *in vitro* hoặc hữu tính thông qua lai tạo luôn có sự biến động về hệ số di truyền [13, 14]. Do vậy, sử dụng chỉ thị phân tử trong công tác đánh giá nguồn gen là công cụ hỗ trợ hiệu quả trong chương trình chọn giống cây lâm nghiệp của Việt Nam.

4. Kết luận

Kết quả đánh giá đa dạng di truyền của 7 dòng Keo lá tràm đang trồng khảo nghiệm tại huyện Cam Lộ, tỉnh Quảng Trị dựa trên chỉ thị ISSR đã xác định được 4 mồi ISSR1, ISSR3, ISSR8 và ISSR15 có chỉ số đa hình tốt, tỷ lệ đoạn đa hình trung bình 75% và phân tách rõ mối quan hệ di truyền giữa các dòng keo thành 2 nhóm chính: Nhóm I gồm 4 dòng: Clt7, Clt18, Clt19 và Clt 26 có khoảng cách di truyền 0,52-0,83. Nhóm II gồm 3 dòng Keo lá tràm còn lại: Clt25, Clt43 và Clt57.

Kết quả nghiên cứu này là cơ sở để xác định mối tương quan giữa sự khác biệt di truyền với khả năng sinh trưởng, năng suất và chất lượng của 7 dòng Keo lá tràm để từ đó tuyển chọn được các giống Keo lá tràm mới cho sản xuất.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được tài trợ bởi Quỹ Phát triển Khoa học và Công nghệ Quốc gia (NAFOSTED) cho đề tài mã số 106.06-2019.319. Các tác giả xin chân thành cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] V.D. Tuan (2011), "Study on genetic diversity of *Acacia auriculiformis* using RAPD and SSR markers", *Proceedings of The Conference on Forestry Science and Technology for Sustainable Development and Climate Change*, pp.13-22 (in Vietnamese).

[2] N.T. Nguyen, R.E.A. Maghaieb, H. Saneoka, et al. (2004), "RAPD markers associated with salt tolerance in *Acacia auriculiformis* and *Acacia mangium*", *Plant Science*, **167**(4), pp.797-805, DOI: 10.1016/j.plantsci.2004.05.016.

[3] T.G. Pham, C.T.M. Tran, H.T. Nguyen, et al. (2022), "Land evaluation for *Acacia* (*Acacia mangium* × *Acacia auriculiformis*) plantations in the mountainous regions of Central Vietnam", *Land*, **11**(12), DOI: 10.3390/land11122184.

[4] D.H. Son, V.D. Hai, N.D. Kien, et al. (2021), "Evaluation of growth of *Acacia auriculiformis* Cunn. Ex. Benth clones in an extended testing in Cam Lo, Quang Tri", *Journal of Agriculture and Rural Development*, **1**(2), pp.126-130.

[5] D.V. Duong, L.R. Schimleck, D.L. Tran, et al. (2022), "Radial and among-clonal variations of stress-wave velocity, wood density, and mechanical properties in 5-year-old *Acacia auriculiformis* clones", *Bioresources*, **17**(2), pp.2084-2096, DOI: 10.15376/biores.17.2.2084-2096.

[6] A. Shanthi, P. Gokula (2013), "ISSR marker analysis of *Acacia auriculiformis* in first generation orchard populations", *International Journal of Science and Research (IJSR)*, **4**(4), pp.57-59.

[7] O.A. Attia, S.D.E. Dessoky, M.S. Yassin (2017), "Genetic diversity and *in vitro* propagation of some *Acacia* spp. trees grown in Taif governorate", *Bioscience Research*, **14**(4), pp.924-933.

[8] S. Alansi, M. Tarroum, F.A. Qurainy, et al. (2016), "Use of ISSR markers to assess the genetic diversity in wild medicinal *Ziziphus spina-christi* (L.) Willd. collected from different regions of Saudi Arabia", *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, **30**(5), pp.942-947, DOI: 10.1080/13102818.2016.1199287.

[9] J.A. Anderson, G.A. Churchill, J.E. Autrique, et al. (1993), "Optimising parental selection for genetic linkage maps", *Genome*, **36**(1), pp.181-186, DOI: 10.1139/g93-024.

[10] J.D. Riek, E. Calsyn, I. Everaert (2001), "AFLP based alternatives for the assessment of distinctness, uniformity and stability of sugar beet varieties", *Theor. Appl. Genet.*, **103**, pp.1254-1265, DOI: 10.1007/s001220100710.

[11] F.J. Rohlf (2002), *NTSYSpc: Numerical Taxonomy System, Version 2.1*, Exeter Publishing, USA, 43pp.

[12] I.R. Ruiz, J. Dendauw, E. Vanbockstaele, et al. (2000), "AFLP markers reveal high polymorphic rates in ryegrasses (*Lolium* spp.)", *Mol. Breed.*, **6**, pp.125-134, DOI: 10.1023/A:1009680614564.

[13] A.A. Assoumane, A. Vaillant, A.Z. Mayaki, et al. (2009), "Isolation and characterization of microsatellite markers for *Acacia senegal* (L.) Willd., a multipurpose arid and semi-arid tree", *Molecular Ecology Resources*, **9**(5), pp.1-4, DOI: 10.1111/j.1755-0998.2009.02669.x.

[14] P.A. Butcher, G.F. Moran, H.D. Perkins (1998), "RFLP diversity in the nuclear genome of *Acacia mangium*", *Heredity*, **81**, pp.205-213, DOI:10.1046/j.1365-2540.1998.00392.x.

Thành phần và tần suất xuất hiện của nấm rễ nội cộng sinh (Arbuscular mycorrhizal fungi) trong đất vùng rễ và rễ cây rau trồng tại TP Hồ Chí Minh

Trương Phước Thiên Hoàng^{1*}, Lê Thị Thảo Như², Lê Hoàng Phúc³, Trần Trọng Nghĩa¹, Đào Uyên Trân Đa¹

¹Viện Nghiên cứu Công nghệ Sinh học và Môi trường, Trường Đại học Nông Lâm TP Hồ Chí Minh, khu phố 6, phường Linh Trung, TP Thủ Đức, TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

²Khoa Khoa học Sinh học, Trường Đại học Nông Lâm TP Hồ Chí Minh, khu phố 6, phường Linh Trung, TP Thủ Đức, TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

³Công ty TNHH Bio Nông Lâm, 428/5 quốc lộ 1A, khu phố 2, phường Tam Bình, TP Thủ Đức, TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

Ngày nhận bài 12/9/2022; ngày chuyển phản biện 15/9/2022; ngày nhận phản biện 3/10/2022; ngày chấp nhận đăng 6/10/2022

Tóm tắt:

Mục đích của nghiên cứu nhằm xác định sự hiện diện và thành phần nấm rễ nội cộng sinh (Arbuscular mycorrhizal fungi - AMF) có trong đất vùng rễ và rễ cây rau (14 loại rau ăn lá) được trồng tại các huyện Hóc Môn, Củ Chi và Bình Chánh, TP Hồ Chí Minh. Kết quả phân lập bào tử nấm nội cộng sinh dựa vào phương pháp rây ướm đã ghi nhận có sự hiện diện của AMF trong đất vùng rễ cây rau với trung bình mật số bào tử là 87,6 bào tử/50 g đất. Đối với tỷ lệ cộng sinh của AMF vào mô rễ không ghi nhận sự cộng sinh trong 4 loại cây rau (dền, cải xanh, cải ngọt, cải thìa) nhưng có cộng sinh trong 10 loại cây còn lại, với trung bình tỷ lệ cộng sinh là 6,6%. Định danh bào tử nấm nội cộng sinh dựa vào các đặc điểm hình thái học ghi nhận trong tất cả các mẫu đất thu được xuất hiện nhiều kiểu hình của 5 chi nấm gồm *Glomus*, *Acaulospora*, *Gigaspora*, *Scutellospora*, *Sclerocystis* và 3 kiểu hình chưa xác định. Trong đó, 2 chi *Glomus* và *Acaulospora* có tần suất xuất hiện nhiều nhất lần lượt là 43,9 và 39,6%.

Từ khóa: *Acaulospora*, cây rau, *Glomus*, nấm rễ nội cộng sinh (AMF).

Chỉ số phân loại: 4.6

1. Đặt vấn đề

Nấm cộng sinh vùng rễ (mycorrhiza) được đề cập đầu tiên vào năm 1881, đến 1957 các nghiên cứu cho thấy, vùng rễ có sự cộng sinh của nấm và cho kết quả hấp thụ photpho tốt hơn. Đặc biệt, trong đó có AMF là mối liên hệ cộng sinh giữa nấm và hệ thống rễ cây, nấm hiện diện phổ biến và cộng sinh với nhiều loài thực vật quan trọng trong hệ sinh thái đất [1]. Trong mối quan hệ này, nấm thu được nguồn carbohydrate và năng lượng từ thực vật, trong khi thực vật có được chất dinh dưỡng cần thiết cho sự tăng trưởng. Khi cây phát triển, rễ sẽ lan rộng và hút chất dinh dưỡng có trong đất nhưng ở mức độ vừa phải hoặc bị hạn chế do bị ảnh hưởng bởi nhiều yếu tố trong môi trường đất. Tuy nhiên, khi kết hợp với AMF rễ cây có thể hút các chất dinh dưỡng từ đất thông qua hệ sợi nấm có thể len lỏi vào mọi ngóc ngách giữa các hạt keo đất và ở những vùng mà rễ cây không vươn tới. Ngoài ra, rễ cây còn tận dụng nguồn dinh dưỡng từ chính hệ sợi của AMF khi các cấu trúc của nấm sẽ phân hủy và giải phóng nguồn dinh dưỡng cho cây ký chủ [2].

Ngoài khả năng hấp thụ các chất dinh dưỡng cung cấp cho cây chủ, AMF còn có thể giúp cây chống lại một số tác nhân gây bệnh cây trồng như tuyến trùng ký sinh, nấm bệnh và các sinh vật gây hại khác. AMF luôn có mặt trong đất và hiện diện xung quanh hay định cư bên trong trong vùng rễ thực vật. Hiện nay trên thế giới, AMF đã được nghiên cứu

nhiều trên các loại cây trồng từ cây rau, hoa, cây ăn trái đến cây rừng... càng làm rõ hơn về những lợi ích của AMF khi được sử dụng trong canh tác nông nghiệp [2].

Từ những ảnh hưởng có lợi của AMF đối với cây trồng trong nông nghiệp và đặc biệt trên nhóm cây rau, nghiên cứu này nhằm khảo sát đánh giá sự hiện diện của AMF trong đất vùng rễ và rễ cây rau được trồng tại TP Hồ Chí Minh. Nghiên cứu tạo tiền đề cho các nghiên cứu sản xuất, ứng dụng sản phẩm sinh học có AMF trong canh tác nông nghiệp theo hướng bền vững, thân thiện với môi trường tại TP Hồ Chí Minh nói riêng và cả nước nói chung.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Mẫu đất và mẫu rễ được thu thập tại các vườn trồng rau thuộc huyện Hóc Môn, Củ Chi và Bình Chánh, TP Hồ Chí Minh. Thời điểm thu mẫu từ tháng 10/2020-3/2021. Số mẫu thu thập: 118 mẫu (59 mẫu đất và 59 mẫu rễ) trên 14 loại rau (15-30 ngày sau gieo), gồm mồng tơi, xà lách, rau dền, cải ngọt, cải xanh, cải thìa, rau muống, é trắng, hành lá, hẹ, tía tô, quế, diếp cá và húng lủi. Mỗi vườn thu mẫu ở 5 vị trí khác nhau theo đường chéo góc, sau đó trộn đều mẫu và thu cỡ mẫu tối thiểu khoảng 1 kg đất và 200 g rễ/vườn. Mẫu đất và rễ sau khi thu về được lưu giữ tại phòng thí nghiệm ở điều kiện 4-10°C.

*Tác giả liên hệ: Email: hoangtp@hcmuaf.edu.vn

A survey on the composition and occurrence frequency of Arbuscular mycorrhizal fungi in rhizospheric soils and roots of vegetables grown in Ho Chi Minh city

Phuoc Thien Hoang Truong^{1*}, Thi Thao Nhu Le²,
Hoang Phuc Le³, Trong Nghia Tran¹,
Uyen Tran Da Dao¹

¹Research Institute for Biotechnology and Environment, Nong Lam University,
Quarter 6, Linh Trung Ward, Thu Duc City, Ho Chi Minh City, Vietnam

²Faculty of Biological Sciences, Nong Lam University,
Quarter 6, Linh Trung Ward, Thu Duc City, Ho Chi Minh City, Vietnam

³Bio Nong Lam Company Limited., 428/5 National Highway 1A,
Quarter 2, Tam Binh Ward, Thu Duc City, Ho Chi Minh City, Vietnam

Received 12 September 2022; revised 3 October 2022; accepted 6 October 2022

Abstract:

The study aimed to determine the presence and composition of Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) in the rhizospheric soils and roots of vegetable plants (14 species of leafy vegetables) grown in Hoc Mon, Cu Chi, and Binh Chanh districts, Ho Chi Minh city. The results of the isolation of AMF spores based on the wet sieving method showed the presence of AMF in the rhizospheric soils of vegetables with an average spore density of 87.6 spores/50 g of soil. For the symbiotic ratio of AMF to the root tissues, there was no symbiosis in 4 vegetable crops, including amaranth, mustard green, leaf mustard, and bok choy. Still, there was symbiosis in the remaining 10 plants, with an average symbiotic rate of 6.6%. Identification of AMF spores based on the morphological characteristics recorded in all the soil samples appeared spore phenotypes of 5 fungal genera including *Glomus*, *Acaulospora*, *Gigaspora*, *Scutellospora*, and *Sclerocystis*. However, 3 morphological types were not yet identified. From the obtained results, two genera, *Glomus* and *Acaulospora*, have the highest frequency at 43.9 and 39.6%, respectively.

Keywords: *Acaulospora*, Arbuscular mycorrhiza fungi, *Glomus*, vegetable.

Classification number: 4.6

2.2. Phương pháp phân lập bào tử AMF

Bào tử được tách khỏi đất theo kỹ thuật rây ướt kết hợp với ly tâm trong dung dịch sucrose (50%) của M. Brundrett và cs (1996) [3]. Tách bào tử trong 50 g đất, sau đó bào tử được sàng qua rây có kích thước 40 μ m, quan sát và đếm mật số bào tử dưới kính lúp soi nổi.

Nhận diện AMF dựa vào hình dạng bào tử theo mô tả của J.W. Gerdemann và cs (1963) [4], J.W. Gerdemann và cs (1974) [5] và INVAM [6].

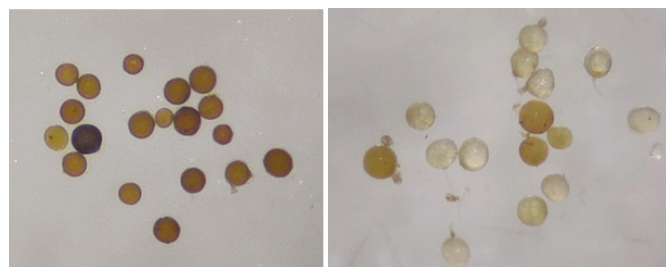
2.3. Phương pháp xác định sự hiện diện của AMF trong mô rễ

Sự hiện diện của AMF trong rễ được nhận diện bằng cách tiến hành nhuộm rễ theo phương pháp của J.M. Phillips và cs (1970) [7]. Mẫu rễ được cắt thành từng đoạn nhỏ 1 cm, sau đó ngâm qua dung dịch KOH 10% (w/v) trong 12 giờ và HCl 2% (v/v) trong 10 phút. Mẫu rễ tiếp tục được nhuộm trong Trypan blue 0,05% (w/v) trong 12 giờ nhằm quan sát các cấu trúc xâm nhiễm của AMF. Quan sát và nhận diện AMF dưới kính hiển vi với độ phóng đại 40X. Nhận dạng nấm nội cộng sinh dựa vào hình thái xâm nhiễm của sợi nấm túi, cấu trúc cộng sinh theo mô tả của M. Brundrett và cs (1996) [3]. Đánh giá tỷ lệ nhiễm nấm nội cộng sinh (AM) theo công thức = Tổng số đoạn rễ hiện diện nấm/Tổng số đoạn rễ quan sát x 100.

3. Kết quả

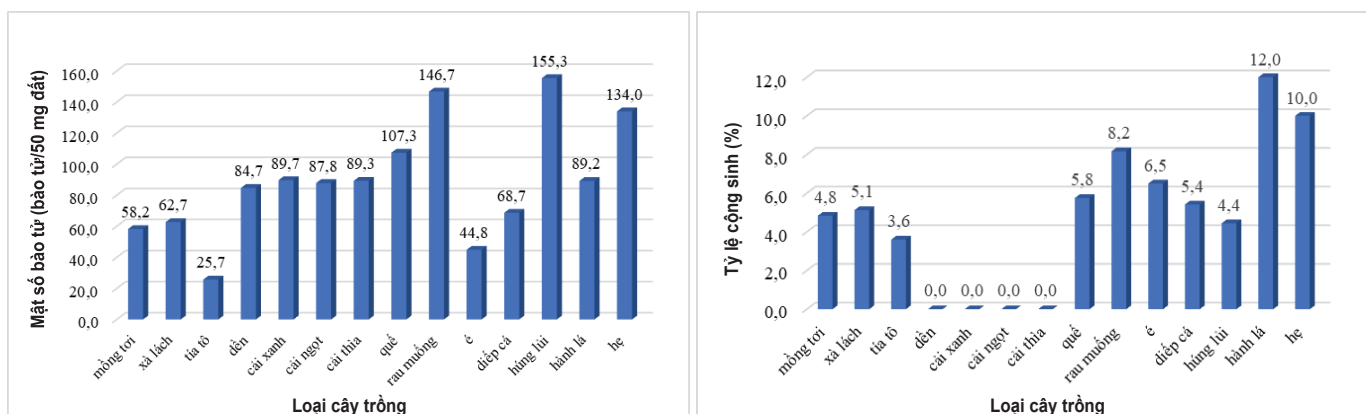
3.1. Khảo sát sự hiện diện của AMF có trong đất vùng rễ và rễ cây rau

Kết quả phân lập bào tử AMF (hình 1) cho thấy, có sự hiện diện trong đất vùng rễ cây rau được trồng tại Hóc Môn, Củ Chi và Bình Chánh thuộc TP Hồ Chí Minh. Trung bình mật số bào tử AMF (hình 2) là: 87,6 bào tử/50 g đất, trong đó nhóm cây có sự hiện diện của bào tử nhiều nhất (>100 bào tử/50 g đất) gồm: húng lủi, rau muống, hẹ và quế; nhóm cây có mật số bào tử thấp nhất (<50 bào tử/50 g đất), gồm tía tô và é trắng; số cây còn lại có mật số dao động 50-100 bào tử/50 g đất.



Hình 1. Bào tử AMF khi quan sát dưới kính lúp soi nổi.

Quan sát sự cộng sinh của AMF vào rễ của 14 loại rau cho kết quả có sự hiện diện của AMF ở 8 loại và không phát hiện ở 4 loại (dền, cải xanh, cải ngọt, cải thìa) (hình 2). Tỷ lệ cộng sinh của AMF vào rễ cây rau tương đối thấp,

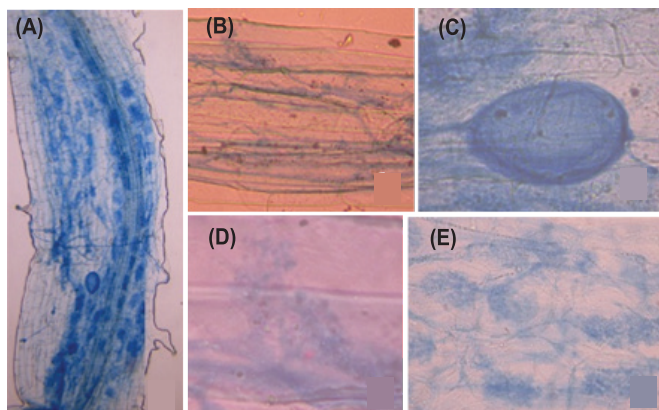


Hình 2. Đồ thị trung bình mật số bào tử nấm và tỷ lệ cộng sinh của AMF trong vùng đất và rễ trên một số loại rau tại TP Hồ Chí Minh.

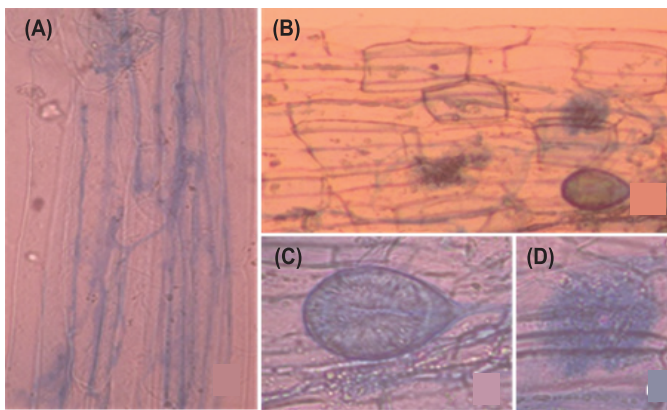
mật số trung bình là 6,6%, trong đó cây hành lá, hẹ có tỷ lệ cộng sinh cao nhất (lần lượt là 12,0 và 10,0%), thấp nhất ở cây tía tô (3,6%). Các dạng cấu trúc của AMF khi cộng sinh vào trong rễ phần lớn là dạng sợi nấm, dạng bụi và ở một số cây có sự hiện diện cấu trúc túi (xà lách, rau muống và mồng toi) (hình 3-5).

3.2. Định danh và xác định thành phần bào tử AMF có trong đất vùng rễ cây rau

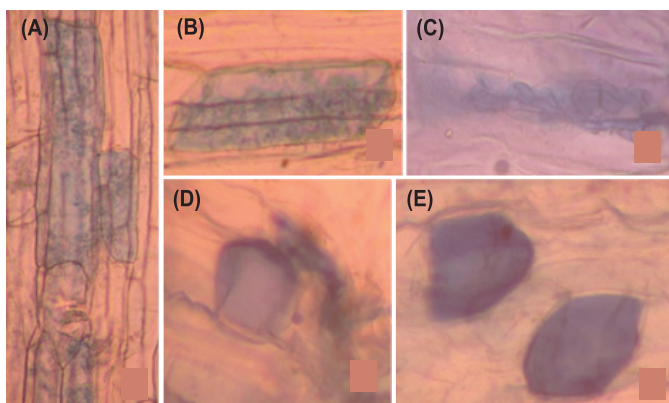
Kết quả bảng 1 cho thấy, đã định danh được bào tử của 5 chi AMF hiện diện trong đất vùng rễ trồng rau tại TP Hồ Chí Minh gồm: *Glomus* sp., *Acaulospora* sp., *Gigaspora*



Hình 3. AMF cộng sinh rễ cây xà lách. (A) Mô rễ có nấm cộng sinh; (B) Sợi nấm; (C) Dạng túi; (D) và (E) Dạng bụi.



Hình 4. AMF cộng sinh rễ cây rau muống. (A) Sợi nấm; (B) Mô rễ có nấm cộng sinh; (C) Dạng túi; (D) Dạng bụi.



Hình 5. AMF cộng sinh rễ cây mồng toi. (A) Mô rễ có nấm cộng sinh; (B) và (C) Dạng túi; (D) và (E) Dạng bụi.

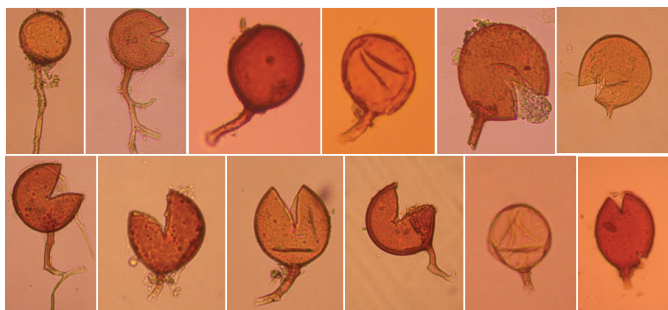
sp., *Scutellospora* sp. và *Sclerosysits* sp.. Ngoài ra, có 3 kiểu hình bào tử AMF vẫn chưa xác định. Tần suất xuất hiện bào tử AMF trong đất của từng loại rau cũng như thành phần các chi nấm xuất hiện trên cùng 1 loại cây cũng khác nhau. Nhìn chung, chi *Glomus* và *Acaulospora* có tần suất xuất hiện cao nhất so với các chi còn lại (43 và 39,6%), tiếp theo là nhóm chưa xác định (6,2%), chi *Sclerocystis* chiếm 5,1% và thấp nhất ở 2 chi *Scutellospora* và *Gigaspora* (2,8 và 2,5%). Ngoài ra, trong đất vùng rễ cây tía tô không phát hiện sự hiện diện của chi *Scutellospora* và *Gigaspora*; chi *Sclerocystis* không thấy xuất hiện trong đất vùng rễ cây quế và diếp cá.

Bảng 1. Tần suất xuất hiện (%) từng chi AMF xuất hiện trong đất.

Cây trồng	TB MSBT (bào tử/50 g đất)	Tần suất xuất hiện (%) của các chi AMF					
		<i>Glomus</i>	<i>Acaulospora</i>	<i>Gigaspora</i>	<i>Scutellospora</i>	<i>Sclerocystis</i>	CXD
Mồng tơi	59,7	44,6	35,7	2,2	3,3	9,4	4,8
Xà lách	62,7	42,5	40,3	2,7	2,2	5,4	6,9
Tía tô	25,3	47,8	43,2	0,0	0,0	5,6	3,4
Dền	65,6	41,7	37,5	3,2	4,1	10,4	3,1
Cải xanh	89,7	50,6	32,5	3,4	2,8	6,6	4,1
Cải ngọt	87,8	44,8	40,7	2,1	3,4	4,2	4,8
Cải thìa	89,3	44,2	41,4	1,7	3,1	5,1	4,5
Quế	107,3	44,5	38,3	4,3	3,2	0,0	9,7
Rau muống	146,7	45,5	39,7	2,4	2,4	5,2	4,8
É trắng	44,8	38,3	38,3	3,2	3,7	5,6	10,9
Diếp cá	68,7	45,3	43,9	1,4	4,1	0,0	5,3
Húng lủi	155,3	40,4	42,3	3,4	2,3	4,7	6,9
Hành lá	89,2	47,4	36,7	2,3	2,8	5,2	5,6
Hẹ	134,0	36,5	43,4	2,2	2,2	4,2	11,5
Trung bình		43,9	39,6	2,5	2,8	5,1	6,2

Ghi chú: TB MSBT: trung bình mật số bào tử; CXD: chưa xác định.

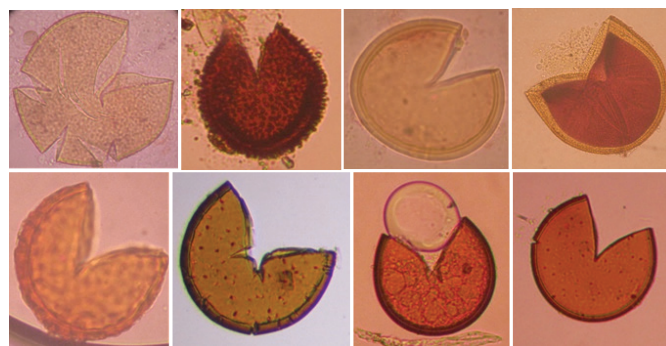
- Chi *Glomus*: Bào tử hình cầu, elip, hoặc gần cầu, bào tử mọc đơn lẻ hoặc thành chùm, kích thước bào tử trung bình 100-180 μm . Màu sắc bào tử có thể thay đổi theo độ tuổi, khi còn non có màu trắng và đến giai đoạn trưởng thành có màu cam hoặc nâu đỏ. Khi quan sát dưới kính hiển vi (40X) thành bào tử khá dày, càng về gần cuống thành càng dày và thường có 2 hoặc nhiều lớp. Cuống bào tử thường hình trụ, hoặc gần trụ và thường mọc vuông góc với bào tử (hình 6).



Hình 6. Bào tử chi *Glomus* trong đất vùng rễ cây rau trồng tại TP Hồ Chí Minh.

- Chi *Acaulospora*: Quan sát hình thái bào tử phát hiện chi có các đặc điểm như sau: bào tử có dạng cầu, bầu dục, mọc đơn lẻ, bên trong chứa nhiều chất dầu; màu sắc đa dạng

từ vàng nhạt đến đỏ cam. Bào tử được hình thành ở vị trí cổ túi và phát triển tăng dần, khi đó cấu trúc túi bị suy giảm trong thời gian phát triển của bào tử. Bề mặt bào tử có dạng trơn, dạng hạt hoặc lõm thành những hốc nhỏ, có 1-2 thành bào tử. Thành ngoài có chứa 1 lớp mỏng, trong suốt, thành trong có một hoặc nhiều lớp. Kích thước bào tử trung bình 100-200 μm (hình 7).



Hình 7. Bào tử chi *Acaulospora* trong đất vùng rễ cây rau trồng tại TP Hồ Chí Minh.

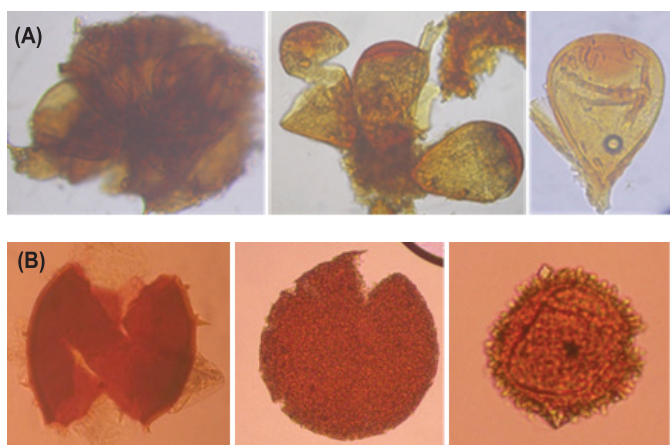
- Chi *Gigaspora*: Bào tử có kích thước lớn, màu vàng nhạt, có dạng hình cầu, bề mặt trơn láng. Thành bào tử có 2 lớp, cuống bào tử phình to dạng củ hành và hẹp tại vị trí tiếp giáp giữa cuống với bào tử (hình 8).



Hình 8. Bào tử chi *Gigaspora* (A) và *Scutellospora* (B) trong đất vùng rễ cây rau trồng tại TP Hồ Chí Minh.

- Chi *Scutellospora*: Bào tử dạng hình cầu, có kích thước lớn, màu vàng nhạt đến nâu đỏ. Vách bào tử mỏng, điểm gần cuống bào tử dày lên dần, bào tử có xuất hiện khiên mầm. Cuống bào tử phình to dạng củ hành (hình 8).

- Chi *Sclerocystis*: Bào tử màu nâu nhạt hoặc nâu đậm, bào tử đơn có dạng hình chùy, luôn mọc thành nhóm gắn kết nhau gọi là sporocarps (hình 9).



Hình 9. Bào tử chi *Sclerocystis* (A) và chưa xác định (B) trong đất vùng rễ cây rau trồng tại TP Hồ Chí Minh.

- Chưa xác định: Bào tử dạng hình cầu, gần cầu, có màu nâu đậm, không có cuống, bề mặt bào tử nhẵn có một vài gai nhỏ mọc trên thành bào tử hoặc bề mặt gồ ghề và không quan sát được các lớp trên thành bào tử (hình 9).

4. Bàn luận

Hiện nay, hơn 80% loài thực vật được ghi nhận có sự liên quan đến AMF ở tất cả các hệ sinh thái trên cạn, bao gồm cả nhiệt đới đến ôn đới rừng, núi cao, cồn cát, sa mạc, đồng cỏ, thực vật thủy sinh và hệ thống nông nghiệp cũng như đất ô nhiễm kim loại [8]. Đặc biệt, khi đánh giá vai trò của hệ vi sinh vật trong đất thì AMF giữ một vị trí rất quan trọng trong mối liên kết giữa thực vật - môi trường đất và giữa nấm - thực vật cũng được ghi nhận ở hầu hết các môi trường sống và điều kiện khí hậu khác nhau [9].

Qua kết quả phân lập đã xác định có sự hiện diện của AMF trong đất vùng rễ và rễ cây rau được trồng tại 3 huyện Hóc Môn, Củ Chi và Bình Chánh thuộc TP Hồ Chí Minh. Tuy nhiên, mật số bào tử nấm và tỷ lệ cộng sinh của các loại cây là khác nhau, điều này có thể giải thích do đặc điểm, cấu trúc bộ rễ của từng loại cây là khác nhau và còn ảnh hưởng bởi tầng đất canh tác trên từng loại cây rau. Vì đối với một số loại rau được trồng tại TP Hồ Chí Minh tầng đất mặt (5-20 cm) sẽ bị thay thế sau một khoảng thời gian canh tác. Ngoài ra, ở một số loại rau như: dền, cải ngọt, cải thìa và cải xanh không phát hiện sự cộng sinh của AMF vào rễ mặc dù trong đất vùng rễ xuất hiện bào tử. Điều này cũng phù hợp theo mô tả của R.L. Peterson và cs (2004) [8] trong một số loại cây thuộc họ cải (*Brassicaceae*) như: cải dầu, cải, bắp cải... và họ dền (*Chenopodiaceae*) như: củ cải đường, rau bina và phần lớn chi *Chenopodium* không hình thành sự cộng sinh của AMF.

Đánh giá về sự đa dạng của các chi AMF có trong đất vùng rễ thực vật, đặc biệt trong nhóm cây rau thì kết quả nghiên cứu cũng định danh được bào tử thuộc 5 chi nấm gồm: *Glomus*, *Acaulospora*, *Gigaspora*, *Scutellospora*, *Sclerocystis* và 3 chi chưa xác định. Trong đó, chi *Glomus* và *Acaulospora* có tần suất xuất hiện cao nhất trong đất vùng rễ của các loại cây rau được trồng tại TP Hồ Chí Minh. Trong nghiên cứu này đã phát hiện chi *Sclerocystis* xuất hiện trong đất vùng trồng rau tại vùng TP Hồ Chí Minh nhưng không tìm thấy chi *Entrophospora*. Kết quả nghiên cứu của T.T.D. Thao (2012) [10] cũng phát hiện 4 chi AMF gồm *Glomus*, *Acaulospora*, *Gigaspora*, *Scutellospora* và không có chi *Entrophospora* trong đất vùng rễ cây ngô ở vùng Đông Nam Bộ (Bà Rịa - Vũng Tàu, Tây Ninh và Đồng Nai). Điều này khác biệt so với các nghiên cứu về AMF trên nhóm cây rau màu được thu mẫu tại các tỉnh Đồng bằng sông Cửu Long là có sự hiện diện của chi *Entrophospora*, nhưng không có chi *Scutellospora* như theo công bố của D.T. Xuan và cs (2016) [11]. Các tác giả này phát hiện bào tử của 4 chi AMF gồm *Glomus*, *Acaulospora*, *Gigaspora*, *Entrophospora* và 3 chi chưa xác định có trong đất vùng rễ của 3 loại cây rau màu, gồm ớt, mè và bắp được trồng tại Cần Thơ. Trong đó, tỷ lệ cộng sinh vào rễ và trung bình mật số bào tử AMF trên 3 loại cây trồng cũng khác nhau, cây ớt 76,1% và 7 bào tử/50 g đất, cây mè là 88,6% và 80 bào tử/50 g đất, cây bắp là 97,5% và 142 bào tử/50 g đất. Theo T.V.T. Tu và cs (2017) [12], thành phần chi AMF xuất hiện trong đất vùng rễ và rễ của cây ngô được thu mẫu ở một số tỉnh thuộc Đồng bằng sông Cửu Long (Đồng Tháp, Cần Thơ, Hậu Giang, Sóc Trăng và Vĩnh Long) chỉ xác định được 3 chi AMF gồm *Glomus*, *Acaulospora*, *Entrophospora* và không thấy sự hiện diện của chi *Gigaspora*, *Scutellospora*.

Ngoài ra, chi *Entrophospora* cũng ghi nhận không xuất hiện trong đất vùng rễ và rễ trên cây hồ tiêu được thu mẫu ở các tỉnh Đông Nam Bộ và Tây Nguyên. Công bố của L.T.K. Duyen và cs (2019) [13] đã ghi nhận chỉ có 4 chi AMF gồm *Acaulospora*, *Glomus*, *Gigaspora* và *Scutellospora* có trong đất vùng rễ trồng tiêu Vĩnh Linh được trồng thuần, xen canh chuối, cà phê và điều tại xã Láng Lớn, Xã Bang và Kim Long, huyện Châu Đức, tỉnh Bà Rịa - Vũng Tàu. Còn theo nghiên cứu của V.P. Nguyen và cs (2021) [14] cũng định danh được 5 chi AMF, gồm *Acaulospora*, *Gigaspora*, *Glomus*, *Glomite* và *Scutellospora* hiện diện trong đất vùng rễ cây hồ tiêu được thu tại 3 tỉnh Bà Rịa - Vũng Tàu, Đồng Nai và Gia Lai.

Điều đặc biệt trong nghiên cứu này là phát hiện chi nấm *Sclerocystis* xuất hiện trong đất vùng rễ cây rau được trồng tại TP Hồ Chí Minh. Chi *Sclerocystis* cũng ghi nhận hiện diện trong mẫu đất vùng rễ cam non tại Quỳnh Hợp, Nghệ An theo công bố của N.T.K. Lien và cs (2012) [15]. Trong mẫu đất vùng rễ cây cam đã thể hiện sự đa dạng các chi AMF gồm 6 chi: *Acaulospora*, *Gigaspora*, *Glomite*, *Glomus*, *Scutellospora* và *Sclerocystis*. Sự đa dạng về các chi nấm có thể do nguồn mẫu đất thu ở các tầng đất khác nhau 0-20, 20-40 và 40-60 cm.

Kết quả của sự đa dạng giữa các chi AMF có trong đất vùng rễ thực vật nói chung và nhóm cây rau màu nói riêng có thể khác nhau do loại cây trồng và cấu trúc, đặc tính hóa lý từng loại đất của từng vùng miền khác nhau.

5. Kết luận

Kết quả nghiên cứu khảo sát trên 14 loại rau (nhóm rau ăn lá) được trồng tại các huyện Hóc Môn, Củ Chi và Bình Chánh thuộc TP Hồ Chí Minh đã ghi nhận có sự hiện diện của bào tử AMF trong đất vùng rễ ở tất cả các mẫu đất thu được. Đối với tỷ lệ cộng sinh của AMF trong mô rễ ghi nhận không có sự cộng sinh ở 4 loại rau: dền, cải thìa, cải ngọt và cải xanh nhưng có sự cộng sinh trong rễ ở các loại rau còn lại. Ngoài ra, nghiên cứu cũng ghi nhận sự đa dạng của bào tử AMF trong đất vùng rễ trồng rau với 5 chi nấm gồm: *Glomus*, *Acaulospora*, *Gigaspora*, *Scutellospora* và *Sclerocystis*. Trong đó, 2 chi *Glomus* và *Acaulospora* xuất hiện nhiều nhất trong tất cả các mẫu rau thu được.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] A. Schüßler, D. Schwarzott, C. Walker (2001), "A new fungal phylum, the Glomeromycota: Phylogeny and evolution", *Mycol. Res.*, **105**, pp.1413-1421, DOI: 10.1017/S0953756201005196.
- [2] L. Jeff (2017), *Teaming with Fungi: The Organic Grower's Guide to Mycorrhizae*, Timber Press Inc, 183pp.
- [3] M. Brundrett, N. Bougher, B. Dell, et al. (1996), *Introduction: Working with Mycorrhizas in Forestry and Agriculture*, Australian Center of International Agricultural Research (ACIAR), pp.1-41, DOI: 10.13140/2.1.4880.5444.
- [4] J.W. Gerdemann, T.H. Nicolson (1963), "Spores of mycorrhizal endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting", *Transactions of The British Mycological Society*, **46**(2), pp.235-244, DOI: 10.1016/S0007-1536(63)80079-0.
- [5] J.W. Gerdemann, J.M. Trappe (1974), "The Endogonaceae in the Pacific Northwest", *Mycologia Memoir*, **5**, 84pp.
- [6] The International Collection of Vesicular Arbuscular Mycorrhizal Fungi, *Species Descriptions*, <https://invam.ku.edu/species-descriptions>, accessed 15 July 2022.
- [7] J.M. Phillips, D.S. Hayman (1970), "Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection", *Transactions of The British Mycological Society*, **55**, pp.158-161, DOI: 10.1016/S0007-1536(70)80110-3.
- [8] R.L. Peterson, H.B. Massicotte, L.H. Melville (2004), *Mycorrhiza Anatomy and Cell Biology*, National Research Council of Canada, 182pp.
- [9] C.A. Aguilar, J.M. Barea (1997), "Applying mycorrhiza biotechnology to horticulture: Significance and potentials", *Scientia Horticulturae*, **68**, pp.1-24, DOI: 10.1016/S0304-4238(96)00954-5.
- [10] T.T.D. Thao (2012), *Research on The Symbiosis of Mycorrhiza Fungi on Corn (Zea mays L.) in The Southeast Region*, Nong Lam University, Ho Chi Minh City, 147pp.
- [11] D.T. Xuan, N.P.N.T. Vi, D.H.K. Diem (2016), "Investigating root colonization and presence of arbuscular mycorrhiza spores in rhizosphere of maize, sesame and chilli grown in Can Tho city", *CTU Journal of Science*, **46**, pp.47-53. DOI: 10.22144/ctu.jvn.2016.541 (in Vietnamese).
- [12] T.V.T. Tu, D. Minh (2017), "Distribution and infection of vesicular arbuscular mycorrhiza (VAM) in maize roots and maize soil rhizosphere in some provinces of the Mekong delta of Viet Nam", *CTU Journal of Science*, **53**, pp.105-111, DOI: 10.22144/ctu.jvn.2017.163 (in Vietnamese).
- [13] L.T.K. Duyen, T.T. Nghia, D.T. Hoang, et al. (2019), "Identification of mycorrhiza in black pepper roots", *Plant Protection Journal*, **2**, pp.3-7.
- [14] V.P. Nguyen, T.N. Vu, K. Tran, et al. (2021), "Characterisation of arbuscular mycorrhizal fungi community on black pepper (*Piper nigrum* L.) in Northern", *Vietnam Journal of Science and Technology - MOST*, **63**(9), pp.44-47, DOI: 10.31276/VJST (in Vietnamese).
- [15] N.T.K. Lien, L.T. Thuy, N.V. Hiep, et al. (2012), "A study on arbuscular mycorrhiza diversity in soil and orange roots sampled from Quy Hop, Nghe An", *Academia Journal of Biology*, **34**(4), pp.436-440, DOI: 10.15625/0866-7160/v34n4.2679.

Nghiên cứu nhân nhanh hai giống cúc đồng tiền cổ (*Gerbera jamesonii* Bolus) bằng kỹ thuật nuôi cấy *in vitro*

Phan Thị Thu Hiền¹, Nguyễn Thị Kim Anh¹, Lê Thị Tuyết Châm², Vũ Thị Thúy Hằng^{2*}

¹Khoa Sinh - Kỹ thuật Nông nghiệp, Trường Đại học Sư phạm Hà Nội 2, đường Nguyễn Văn Linh, phường Xuân Hoà, TP Phúc Yên, tỉnh Vĩnh Phúc, Việt Nam

²Khoa Nông học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam, thị trấn Trâu Quỳ, huyện Gia Lâm, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 2/9/2022; ngày chuyển phản biện 5/9/2022; ngày nhận phản biện 28/9/2022; ngày chấp nhận đăng 2/10/2022

Tóm tắt:

Nụ hoa cúc đồng tiền được khử trùng kép có, tỷ lệ tạo mẫu sạch lên đến 90% với cúc đồng tiền cánh vàng cổ và 92% với cúc đồng tiền cánh hồng cổ. Với môi trường bổ sung 1,5 mg/l BAP và 2 mg/l TDZ, giống cúc đồng tiền cánh vàng cổ thu được tỷ lệ tái sinh đạt 52,17%, giống cúc đồng tiền cánh hồng cổ thu được tỷ lệ tái sinh đạt 53,85%. Khi sử dụng IBA 1,5 mg/l kết hợp với BA 2 mg/l, giống cúc đồng tiền cánh vàng cổ thu được tỷ lệ tạo chồi là 44,45%, trung bình 5 chồi/mẫu; cúc đồng tiền cánh hồng cổ đạt tỷ lệ tạo chồi 46,15%, trung bình 6 chồi/mẫu. Môi trường có 0,05 mg/l NAA và 0,3 mg/l IBA tạo 6-7 rễ, chiều dài khoảng 2,5 cm; nhiệt độ 20-25°C thích hợp nhất để cho ra rễ ở 2 giống cúc đồng tiền cổ. Cây con sau khi tạo rễ được đưa ra ươm trồng với giá thể gồm 50% cát + 30% đất + 20% trấu hun, tỷ lệ cây sống sau 8 tuần đạt 98,26%, chiều cao đạt 14,8 cm với giống cúc đồng tiền cánh vàng cổ; 99,05%, chiều cao đạt 12,6 cm với giống cúc đồng tiền cánh hồng cổ.

Từ khóa: cúc đồng tiền cổ, *Gerbera jamesonii* Bolus, *in vitro*, nhân nhanh.

Chỉ số phân loại: 4.6

1. Đặt vấn đề

Cúc đồng tiền có tên khoa học là *Gerbera Jamesonii* Bolus có nguồn gốc từ Nam Phi. Đến nay, cúc đồng tiền được trồng ở nhiều nước trên thế giới, điển hình như Hà Lan, Mỹ, Đức, Nhật Bản, Trung Quốc... Cúc đồng tiền có nhiều chủng loại từ hình dáng thân cao, trung bình, thấp đến đa dạng với nhiều màu sắc khác nhau như đỏ, cam, vàng, trắng, phấn hồng, tím... Trên một bông hoa có thể có một màu đơn hoặc nhiều màu xen kẽ. Cúc đồng tiền có cuống hoa to, là hoa lý tưởng để làm bó hoa, lẵng hoa và cắm nghệ thuật rất được ưa chuộng [1]. Trong sản xuất, cây cúc đồng tiền là loài hoa có giá trị kinh tế cao. Trong các loài cúc đồng tiền đã và đang được trồng tại Việt Nam thì cúc đồng tiền kép nhập nội là một trong những cây cho hiệu quả kinh tế cao nhất. Loại cúc đồng tiền giống mới này khi chăm sóc đúng kỹ thuật có thể cho thu nhập gần 50 triệu đồng/sào/năm [2]. Hơn thế nữa, cúc đồng tiền có thể trồng một lần và cho thu hoạch quanh năm. Nếu tính giá trị trên từng bông, cúc đồng tiền không cao như hoa phăng, lily, lay ơn... Tuy nhiên, hiệu quả kinh tế thu được trên một đơn vị diện tích trồng loại cúc đồng tiền này lại khá cao.

Cho đến nay, có nhiều công trình nghiên cứu vi nhân giống cây hoa cúc đồng tiền đã được công bố [2-9]. Hoa cúc đồng tiền có thể được nhân nhanh bằng 2 phương pháp: hữu

tính và vô tính bằng phương pháp vi nhân giống trong điều kiện *in vitro*. Nhược điểm của phương pháp nhân hữu tính là mất nhiều thời gian, trong khi nhân nhanh trong điều kiện *in vitro* lại là giải pháp tạo ra lượng cây giống nhiều trong thời gian ngắn, sạch bệnh và đồng đều [1, 3]. Có nhiều vật liệu thực vật sử dụng để nhân nhanh, tái sinh trực tiếp từ đỉnh sinh trưởng hoặc chồi hoa, vật liệu cũng có thể là nụ hoa non, tạo ra mô sẹo sau đó tái sinh thành đa chồi trong điều kiện *in vitro* [8].

Trong quá trình nhân giống cây cúc đồng tiền, giai đoạn khó nhất là vào mẫu và ra ngôi ngoài vườn ươm. Do đó, giải quyết được 2 bước này sẽ giải quyết được bài toán hiệu quả sản xuất thực tế. Trên thế giới và Việt Nam đã có nhiều công bố về nhân giống *in vitro* ở các giống cúc đồng tiền khác nhau, tuy nhiên chưa có công bố nào nghiên cứu về việc nhân nhanh và lưu trữ các giống đồng tiền cổ được thu thập ở Việt Nam.

Nghiên cứu này sử dụng nụ hoa non làm vật liệu khởi đầu vào mẫu để nâng cao phẩm chất và khả năng nhân nhanh cây giống nhằm cung cấp lượng cây giống tốt, đồng đều và sạch bệnh. Ngoài ra, kết quả nghiên cứu cũng góp phần lưu giữ và bảo tồn nguồn gen các giống cúc đồng tiền cánh vàng cổ và cánh hồng cổ.

*Tác giả liên hệ: Email: vtthang.nh@vnua.edu.vn

***In vitro* rapid multiplication of two ancient gerbera varieties (*Gerbera jamesonii* Bolus)**

Thi Thu Hien Phan¹, Thi Kim Anh Nguyen¹,
Thi Tuyet Cham Le², Thi Thuy Hang Vu^{2*}

¹Faculty of Biology and Agricultural Engineering, Hanoi Pedagogical University 2,
Nguyen Van Linh Street, Xuan Hoa Ward, Phuc Yen City, Vinh Phuc Province, Vietnam

²Faculty of Agronomy, Vietnam National University of Agriculture,
Trau Quy Town, Gia Lam District, Hanoi, Vietnam

Received 2 September 2022; revised 28 September 2022; accepted 2 October 2022

Abstract:

Gerbera buds are double sterilised, the clean sample rate is up to 90% (ancient yellow gerbera daisies) and 92% (ancient pink gerbera daisies). With the medium supplemented with 1.5 mg/l BAP and 2 mg/l TDZ, the yellow gerbera daisy variety obtained a regeneration rate of 52.17%. Ancient pink gerbera daisies have a regeneration rate of 53.85%. When using 1.5 mg/l IBA combined with 2 mg/l BA, the gerbera daisies obtained a bud formation rate of 44.45% with an average number of 5 buds/sample; ancient pink gerbera daisies achieved a high bud formation rate of 46.15%, with an average number of 6 buds/sample. Media with 0.05 mg/l NAA and 0.3 mg/l IBA produced 6-7 roots, about 2.5 cm in length; the temperature of 20-25°C was most suitable for rooting in 2 varieties of gerbera daisy. After forming roots, the plantlets were planted in a substrate consisting of 50% sand + 30% soil + 20% smoked rice husks. The survival rate after 8 weeks, the height of the ancient yellow gerbera daisies and ancient pink gerbera daisies reached 98.26%, 14.8 cm and 99.05%, 12.6 cm, respectively.

Keywords: ancient gerbera daisies, *Gerbera jamesonii* Bolus, *in vitro*, rapid multiplication.

Classification number: 4.6

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Nụ hoa non của giống cúc đồng tiền cánh vàng cổ và cánh hồng cổ được cung cấp bởi Công ty TNHH Florist Việt Nam.

Các hóa chất thông dụng trong nuôi cấy mô tế bào thực vật như: các chất khử trùng (xà phòng, cồn 90°, $\text{Ca}(\text{OCl}_2)_2$ 10%, HgCl_2 ...), các hóa chất trong thành phần môi trường MS cơ bản, các chất điều hòa sinh trưởng (BAP, NAA...).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Nghiên cứu được tiến hành trong phòng thí nghiệm có các điều kiện môi trường vật lý như sau: số giờ chiếu sáng là 10 giờ/ngày, cường độ ánh sáng 2000-3000 lux, nhiệt độ phòng nuôi $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

Tạo mẫu sạch *in vitro*: Các mẫu được lựa chọn kỹ, loại bỏ các tế bào chết xung quanh và rửa sạch dưới vòi nước chảy trong 20 phút, ngâm trong nước tẩy rửa Lifeboy 10 phút, sau đó để dưới vòi nước chảy trong 4-6 giờ. Mẫu được đưa vào Box cấy, rửa lại 5-6 lần bằng nước cất vô trùng và lắc trong dung dịch $\text{Ca}(\text{OCl}_2)_2$ 10% trong 7-8 phút, sau đó rửa lại bằng nước cất vô trùng 3-5 lần, tiếp theo lắc trong dung dịch HgCl_2 0,1% trong 2-3 phút và cuối cùng rửa lại 6 lần bằng nước cất vô trùng. Mẫu cấy sau đó được sử dụng để đánh giá khả năng tạo mô sẹo phôi hóa và tái sinh cây trong điều kiện từ nụ hoa non [8].

Tối ưu hoá khả năng tái sinh chồi: Những nụ hoa có chiều cao 0,5-2 cm của các cây cúc đồng tiền khỏe mạnh, không bị biến dị, có màu sắc hoa đẹp... được tuyển chọn từ vườn ươm của Công ty TNHH Florist Việt Nam, sau khi khử trùng được đưa vào cấy trên môi trường cảm ứng tạo mô sẹo. Mẫu được nuôi cấy trên môi trường MS + BAP (3 mg/l) + NAA (0,5 mg/l) + TDZ (0,05 mg/l) trong điều kiện tối hoàn toàn, sau đó tiến hành theo dõi tỷ lệ tạo mô sẹo phôi hóa phát sinh từ nụ hoa non [8].

Tối ưu hoá khả năng ra rễ *in vitro*: Chồi đạt kích thước chiều cao 3-5 cm được chuyển sang môi trường kích thích tạo rễ: MS có bổ sung IBA, NAA nồng độ khác nhau, pH 5,8. Sau đó, cây được trồng trên giá thể ngoài môi trường [8].

Tối ưu hoá điều kiện rèn luyện, nhiệt độ đến khả năng sống của cây con: Nhiệt độ tối ưu quyết định khả năng sống của cúc đồng tiền trong khoảng nhiệt độ từ 12 đến 36°C .

Tối ưu hoá thành phần giá thể đến khả năng sống và phát triển của cây con: Chồi tạo rễ hoàn chỉnh được đưa ra ngoài môi trường vào các giá thể có thành phần với tỷ lệ khác nhau bao gồm: cát sông, trấu hun, xơ dừa.

Bảng 1. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của chất khử trùng $\text{Ca}(\text{OCl}_2)_2$ 10% và HgCl_2 0,1% đến khả năng tạo mẫu sạch.

Công thức thí nghiệm	Cách tiến hành	Cúc đồng tiền cánh vàng cổ				Cúc đồng tiền cánh hồng cổ			
		Số lượng mẫu ban đầu	Số mẫu nhiễm sau 4 tuần	Số mẫu sạch sau 4 tuần	Tỷ lệ tạo mẫu sạch (%)	Số lượng mẫu ban đầu	Số mẫu nhiễm sau 4 tuần	Số mẫu sạch sau 4 tuần	Tỷ lệ tạo mẫu sạch (%)
Đôi chứng	Xử lý sơ bộ	51	50	1	1,96	52	50	3	5,77
1	Xử lý sơ bộ, HgCl_2 0,1% 1 phút	53	44	9	16,98	52	40	12	23,07
2	Xử lý sơ bộ, HgCl_2 0,1% 2 phút	53	35	18	33,96	51	37	14	27,45
3	Xử lý sơ bộ, HgCl_2 0,1% 3 phút	50	32	18	36,00	53	32	21	39,62
4	Xử lý sơ bộ, $\text{Ca}(\text{OCl}_2)_2$ 10% 5-6 phút HgCl_2 0,1% 2 phút	51	30	21	41,17	50	31	19	38,00
5	Xử lý sơ bộ, $\text{Ca}(\text{OCl}_2)_2$ 10% 7-8 phút, HgCl_2 0,1% 2-3 phút	50	5	45	90,00	50	4	46	92,00

3. Kết quả và bàn luận

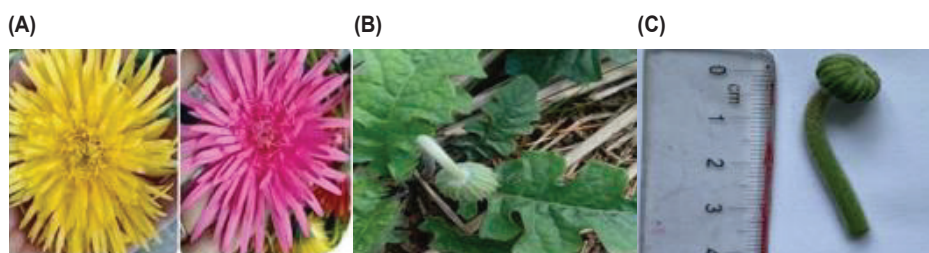
3.1. Kết quả nghiên cứu quá trình nhân nhanh 2 giống cúc đồng tiền cổ

3.1.1. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của chất khử trùng đến tỷ lệ sống của mẫu cấy

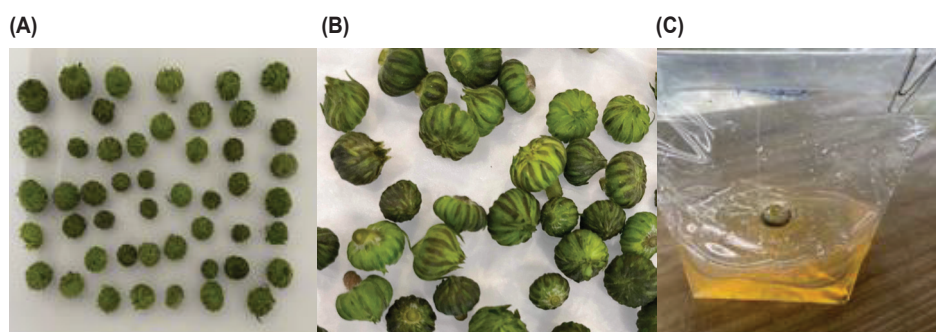
Mỗi loại hóa chất khử trùng có tác dụng tiêu diệt đối với những loại vi sinh vật (nấm, khuẩn) khác nhau. Tác dụng của mỗi loại hóa chất đối với vi sinh vật tùy thuộc vào nồng độ và thời gian khử trùng bằng hóa chất đó. Vì vậy, việc lựa chọn loại hóa chất, nồng độ và thời gian khử trùng là rất quan trọng. Nó quyết định đến sự thành công hay thất bại trong việc khử trùng. Nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành đánh giá hiệu quả khử trùng của một số hóa chất thường sử dụng để khử trùng ($\text{Ca}(\text{OCl}_2)_2$, HgCl_2 ...) trên 2 mẫu giống cúc đồng tiền cổ. Kết quả thể hiện ở bảng 1.

Kết quả bảng 1 cho thấy, công thức 5 cho kết quả tạo mẫu sạch cao nhất. Các nụ hoa đạt tiêu chuẩn sẽ được rửa sạch dưới vòi nước chảy trong 20 phút, ngâm trong nước tẩy rửa Lifeboy 10 phút, sau đó được để dưới vòi nước chảy trong 4-6 giờ. Mẫu sau khi xử lý sơ bộ được đưa

vào buồng cấy, rửa lại 5-6 lần bằng nước cất vô trùng và lắc trong dung dịch $\text{Ca}(\text{OCl}_2)_2$ 10% trong 7-8 phút, sau đó rửa lại bằng nước cất vô trùng 3-5 lần, tiếp theo lắc trong dung dịch HgCl_2 0,1% trong 2-3 phút, cuối cùng rửa lại 6 lần bằng nước cất vô trùng cho kết quả tạo mẫu sạch tốt nhất. Như vậy, công thức 5 là tối ưu nhất thu được tỷ lệ mẫu sạch lên đến 90% (cúc đồng tiền cánh vàng cổ) và 92% (cúc đồng tiền cánh hồng cổ) (hình 1 và 2).



Hình 1. Mẫu được sử dụng nuôi cấy. (A) 2 loại cúc đồng tiền cánh vàng cổ và cúc đồng tiền cánh hồng cổ; **(B)** Nụ đạt yêu cầu sử dụng vào mẫu; **(C)** Kích thước nụ khi thu mẫu.



Hình 2. Mẫu cấy sau khi đã khử trùng. (A) Mẫu sau khi xử lý sơ bộ; **(B)** Mẫu sau khi đã xử lý với $\text{Ca}(\text{OCl}_2)_2$ 10% 7-8 phút và HgCl_2 0,1% trong 2-3 phút; **(C)** Mẫu đưa vào nuôi trường tạo chồi mẫu ban đầu.

Bảng 2. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của một số chất điều tiết sinh trưởng đến khả năng tái sinh chồi (trực tiếp hoặc gián tiếp).

Công thức thí nghiệm	Chất điều tiết sinh trưởng		Cúc đồng tiền cánh vàng cổ			Cúc đồng tiền cánh hồng cổ				
	BAP (mg/l)	TDZ (mg/l)	Số lượng mẫu cấy chuyển	Số mẫu tạo chồi sau 4 tuần	Tỷ lệ tạo chồi sau 4 tuần (%)	Số lượng chồi/mẫu	Số lượng mẫu cấy chuyển	Số mẫu tạo chồi sau 4 tuần	Tỷ lệ mẫu tạo chồi sau 4 tuần (%)	Số lượng chồi/mẫu
Đối chứng	0	0	26	1	3,85	1	26	1	3,81	0
CT1	0,5	1	23	2	8,69	2	24	3	12,50	3
CT2	1	1,5	24	1	4,17	2	24	2	8,33	6
CT3	1,5	2	23	12	52,17	5	26	14	53,85	6
CT4	2	2,5	21	7	33,33	3	26	8	30,77	4
CT5	2,5	3	24	5	20,83	4	26	6	23,08	4

3.1.2. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của một số chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng tái sinh chồi (trực tiếp hoặc gián tiếp)

Tái sinh chồi là công đoạn rất quan trọng trong nhân giống cây trồng nói chung và nhân giống hoa cúc đồng tiền nói riêng. Kết thúc giai đoạn tạo callus tốt (có màu vàng, sáng) được cấy chuyển callus sang môi trường tái sinh chồi. Kết quả thử nghiệm ảnh hưởng của các chất điều tiết sinh trưởng như: BAP, TDZ đến sự tái sinh chồi từ mô sẹo được tổng hợp ở bảng 2.

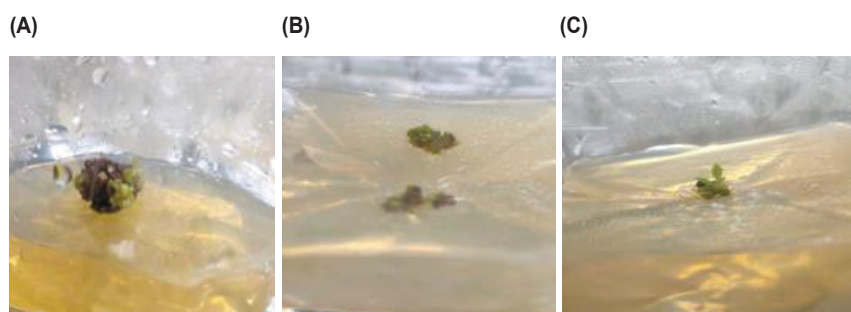
Kết quả bảng 2 cho thấy, các công thức thí nghiệm đều có tỷ lệ bật chồi cao hơn đối chứng không bổ sung chất điều tiết sinh trưởng (không bật chồi). Điều đó chứng tỏ BAP, TDZ có tác dụng thúc đẩy sự tái sinh chồi từ callus của cúc đồng tiền. Các công thức nhìn chung có tỷ lệ tái sinh chồi từ

callus không cao. Khi nồng độ BAP tăng từ 0,5 đến 2,5 mg/l và TDZ tăng từ 1 đến 3 mg/l cho tỷ lệ bật chồi tăng từ 4,17 lên 52,17% đối với giống cúc đồng tiền cánh vàng cổ và tăng từ 8,33 đến 53,85% đối với giống cúc đồng tiền cánh hồng cổ, số lượng chồi tăng từ 3 đến 6 chồi/mẫu. Công thức 3 có bổ sung 1,5 mg/l BAP và 2 mg/l TDZ có tỷ lệ bật chồi cao nhất đối với cả 2 giống là 52,17 và 53,85%, có số chồi tái sinh 12 chồi/mẫu đối với loại cúc đồng tiền cánh vàng cổ và 6 chồi/callus đối với cúc đồng tiền cánh hồng cổ.

Từ kết quả trên cho thấy, sử dụng BAP và TDZ có thể kích thích callus bật chồi. Nồng độ chất điều hòa sinh trưởng thích hợp nhất cho tái sinh chồi là 1,5 mg/l BAP và 2 mg/l TDZ đối với cả 2 giống cúc đồng tiền cổ nghiên cứu (hình 3 và 4).

3.1.3. Kết quả ảnh hưởng của một số chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng nhân nhanh của chồi cúc đồng tiền

Các cụm chồi thu được ở giai đoạn 1 được đưa vào để nhân nhanh. Các cụm chồi được cắt bỏ phần lá, giữ lại phần gốc có độ dài khoảng 1 cm, được tách nhỏ sao cho mỗi cụm chứa 3-5 chồi rồi tiến hành cấy vào môi trường đã chuẩn bị ở trên. Các mẫu được nuôi cấy trong điều kiện môi trường với quang chu kỳ 12 giờ/ngày, cường độ ánh sáng 1500 lux và nhiệt độ $25 \pm 2^\circ\text{C}$ để thu được các cụm chồi của cây cúc đồng tiền trong 4 tuần nuôi cấy. Quá trình được lặp lại đến khi đạt được số lượng mong muốn để tiến hành giai đoạn tạo cây con hoàn chỉnh. Kết quả thử nghiệm ảnh hưởng của các chất điều tiết sinh trưởng như: IBA, BA... đến khả năng nhân nhanh của chồi cúc đồng tiền được thể hiện ở bảng 3.



Hình 3. Mẫu cúc đồng tiền cánh vàng cổ tái sinh sau 4 tuần. (A) Đế hoa sau 6 tuần vào mẫu; **(B)** Mô sẹo tạo chồi; **(C)** Chồi tái sinh sau 4 tuần.



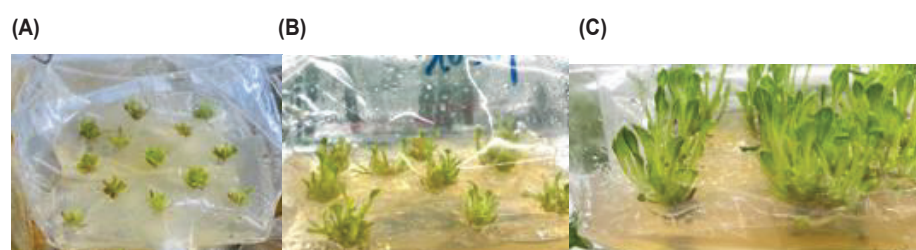
Hình 4. Mẫu cúc đồng tiền cánh hồng cổ tái sinh sau 4 tuần. (A) Mô sẹo sau 6 tuần; **(B)** Mô sẹo tạo chồi; **(C)** Chồi tái sinh sau 4 tuần.

Bảng 3. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của một số chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng nhân nhanh của chồi cúc đồng tiền.

Công thức thí nghiệm	Chất điều tiết sinh trưởng		Cúc đồng tiền cánh vàng cổ			Cúc đồng tiền cánh hồng cổ				
	IBA (mg/l)	BA (mg/l)	Số lượng mẫu ban đầu	Số mẫu tạo chồi sau 4 tuần	Tỷ lệ tạo chồi sau 4 tuần (%)	Số lượng chồi/ mẫu	Số lượng mẫu ban đầu	Số mẫu tạo chồi sau 4 tuần	Tỷ lệ mẫu tạo chồi sau 4 tuần (%)	Số lượng chồi/mẫu
Đối chứng	0	0	27	0	0	0	26	0	0	0
CT1	0,5	1	26	1	3,85	1	24	1	4,17	1
CT2	1	1,5	27	1	3,7	2	26	2	7,69	6
CT3	1,5	2	27	12	44,45	5	26	12	46,15	6
CT4	2	2,5	26	8	30,77	3	26	5	19,23	4
CT5	2,5	3	26	3	11,54	4	26	4	15,38	4

Kết quả nghiên cứu cho thấy, khi sử dụng chất điều hoà sinh trưởng IBA với nồng độ thay đổi từ 0,5 đến 2,5 mg/l kết hợp với nồng độ BA thay đổi từ 1 đến 3 mg/l cho thấy, tỷ lệ tạo chồi tốt nhất ở cả 2 giống cúc đồng tiền là khi sử dụng IBA 1,5 mg/l và BA 2 mg/l. Mẫu cúc đồng tiền cánh vàng cổ đạt tỷ lệ tạo chồi cao nhất sau 4 tuần là 44,45% với số lượng chồi/mẫu trung bình là 5 chồi. Còn đối với giống cúc đồng tiền cánh hồng cổ tỷ lệ tạo chồi cao nhất đạt 46,15% với số lượng chồi/mẫu trung bình đạt 6 chồi. Các chồi đều khoẻ mạnh và có thể sử dụng cắt nhân tiếp tục ra rễ (hình 5 và 6).

Như vậy, các chất điều hoà sinh trưởng được sử dụng để nhân nhanh 2 giống cúc đồng tiền cánh vàng cổ và cúc đồng tiền cánh hồng cổ đạt kết quả tốt nhất là IBA 1,5 mg/l kết hợp với BA 2 mg/l.



Hình 5. Mẫu cúc đồng tiền cánh vàng cổ sau 4 tuần nuôi cấy. (A) Mẫu mới cắt nhân; (B) Mẫu cắt nhân sau 1 tuần; (C) Mẫu cắt nhân sau 4 tuần.



Hình 6. Mẫu cúc đồng tiền cánh hồng cổ sau 4 tuần nuôi cấy. (A) Mẫu mới cắt nhân; (B) Mẫu cắt nhân sau 1 tuần; (C) Mẫu cắt nhân sau 4 tuần.

3.1.4. Kết quả ảnh hưởng của chất kích thích sinh trưởng đến khả năng ra rễ *in vitro*

Chồi cúc đồng tiền được chuyển sang môi trường ra rễ để tạo cây hoàn chỉnh và trồng vào bầu huấn luyện ngoài môi trường tự nhiên. Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng công thức ra rễ *in vitro* với thành phần: MS có bổ sung IBA, NAA với các nồng độ khác nhau: bổ sung nước dừa 10%, than hoạt tính 1,0 g/l, đường 30 g/l, thạch 6,5 g/l, độ pH 6,2 (bảng 4).

Kết quả bảng 4 cho thấy, các công thức thí nghiệm trên đều có tỷ lệ ra rễ cao hơn đối chứng không bổ sung chất điều hoà sinh trưởng (không ra rễ). Điều đó chứng tỏ, NAA và IBA có tác dụng thúc đẩy sự ra rễ của các chồi cây cúc đồng tiền. Tuy nhiên, số lượng, chiều dài và màu sắc của rễ phụ

thuộc vào từng nồng độ các chất điều hoà sinh trưởng được bổ sung. Khi nồng độ NAA tăng từ 0,03 đến 0,07 mg/l và IBA tăng từ 0,2 đến 0,4 mg/l thì số lượng rễ/chồi tăng từ 3 lên 6 đối với giống cúc đồng tiền cánh vàng cổ và tăng từ 3 đến 7 đối với giống cúc đồng tiền cánh hồng cổ. Chiều dài của rễ tăng lần lượt từ 1,1 và 1,2 đến 2,5 cm đối với cả 2 giống cúc đồng tiền. Các công thức 3-5 đều cho số lượng rễ và chiều dài trung bình rễ khá tốt. Tuy nhiên, quan sát màu sắc của rễ cho thấy, rễ khoẻ mạnh và phát triển nhanh nhất là khi rễ có màu trắng. Như vậy, công thức 3 có bổ sung 0,05

Bảng 4. Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng IBA, NAA đến khả năng tạo rễ *in vitro*.

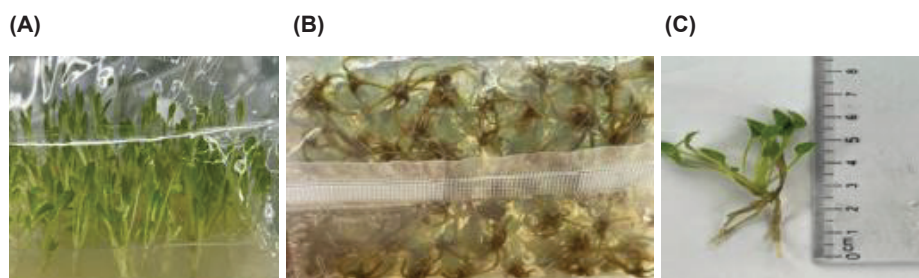
Công thức thí nghiệm	Chất điều tiết sinh trưởng		Cúc đồng tiền cánh vàng cổ			Cúc đồng tiền cánh hồng cổ				
	NAA (mg/l)	IBA (mg/l)	Tỷ lệ ra rễ (%)	Số rễ/cây	Chiều dài trung bình rễ sau 3 tuần (cm)	Màu sắc rễ	Tỷ lệ ra rễ (%)	Số rễ/cây	Chiều dài trung bình rễ sau 3 tuần (cm)	Màu sắc rễ
Đối chứng	0	0	23,32	3	1,2	Trắng	30,05	4	1,1	Trắng
CT1	0,03	0,2	95,08	3	1,3	Trắng	95,86	3	1,2	Trắng
CT2	0,04	0,25	96,83	5	1,5	Trắng	97,04	5	2,5	Trắng
CT3	0,05	0,3	98,75	6	2,5	Trắng	99,07	7	2,5	Trắng
CT4	0,06	0,35	97,03	6	2	Nâu	97,56	6	2,3	Nâu
CT5	0,07	0,4	95,98	5	2,3	Nâu	96,34	7	2,5	Nâu

mg/l NAA và 0,3 mg/l IBA là công thức cho ra rễ tốt nhất đối với cả 2 giống đồng tiền. Ở công thức này, số lượng rễ/chồi ở cúc đồng tiền cánh vàng cổ là 6 rễ và chiều dài trung bình của các rễ sau 3 tuần là 2,5 cm, rễ có màu trắng. Còn ở cúc đồng tiền cánh hồng cổ có số rễ/chồi là 7, chiều dài trung bình của rễ là 2,5 cm, màu trắng.

Từ kết trên cho thấy, việc sử dụng NAA và IBA có thể kích thích ra rễ tốt nhất. Nồng độ chất điều hoà sinh trưởng thích hợp nhất cho việc ra rễ là 0,05 mg/l NAA và 0,3 mg/l IBA đối với cả 2 giống cúc đồng tiền cổ nghiên cứu (hình 7 và 8).



Hình 7. Mẫu cúc đồng tiền cánh vàng cổ cho ra rễ sau 4 tuần nuôi cấy. (A) Mẫu bắt đầu cắt chuyển sang môi trường ra rễ; **(B)** Mẫu cho ra rễ sau 4 tuần; **(C)** Mẫu rễ trước khi cho ra giá thể.



Hình 8. Mẫu cúc đồng tiền cánh hồng cổ cho ra rễ sau 4 tuần nuôi cấy. (A) Mẫu bắt đầu cắt chuyển sang môi trường ra rễ; **(B)** Mẫu cho ra rễ sau 4 tuần; **(C)** Mẫu rễ trước khi cho ra giá thể.

3.2. Ảnh hưởng của các điều kiện rèn luyện và giá thể đến sinh trưởng phát triển của cây con sau nuôi cấy *in vitro*

3.2.1. Kết quả ảnh hưởng của điều kiện rèn luyện, nhiệt độ đến khả năng sống của cây con

Sau khi cây con đã được rửa sạch thì được đưa ra ươm trồng trên vỉ xốp, vỉ nhựa... có chứa giá thể xơ dừa (giá thể dùng cho việc ươm cây con). Cây được đặt trên giàn cao cách mặt đất 60-80 cm để trong nhà kính vườn ươm, với các điều kiện được điều chỉnh tối ưu: về nhiệt độ và độ ẩm

không khí, ánh sáng được điều chỉnh tăng dần phù hợp với từng giai đoạn độ tuổi của cây. Sau khi điều chỉnh nhiệt độ tối ưu quyết định khả năng sống của cúc đồng tiền thu được kết quả ở bảng 5.

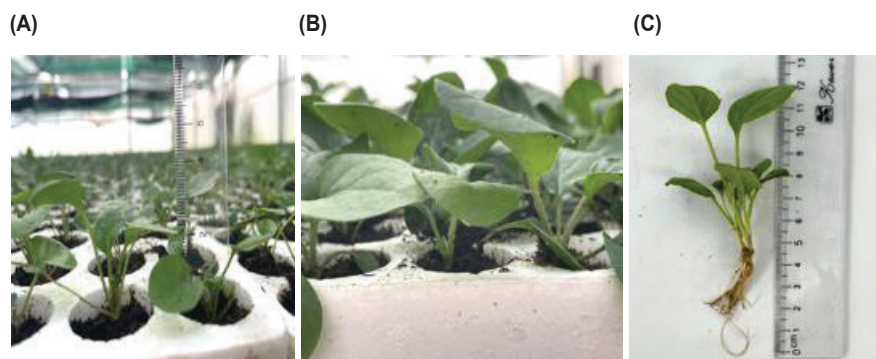
Kết quả bảng 5 cho thấy, nhiệt độ là nhân tố rất quan trọng, ảnh hưởng trực tiếp đến sự sinh trưởng và phát triển của cúc đồng tiền. Các công thức nhìn chung đều thể hiện, cây cúc đồng tiền có tỷ lệ sống cao khi đưa ra ngoài môi trường với các mức nhiệt độ của vùng nhiệt đới. Khi thay đổi nhiệt độ từ 10 lên 35°C cho thấy, tỷ lệ sống sót của các mẫu cúc đồng tiền thay đổi từ 80 đến 100%. Ngoài ra, chiều cao cây, chiều dài rễ và màu sắc của lá cũng thay đổi theo nhiệt độ. Ở công thức 3, khi nhiệt độ tăng từ 20 lên 25°C cho tỷ lệ sống cao nhất (đạt xấp xỉ 100%) và kích thước thân, rễ,

Bảng 5. Ảnh hưởng của điều kiện rèn luyện, nhiệt độ đến khả năng sống của cây con.

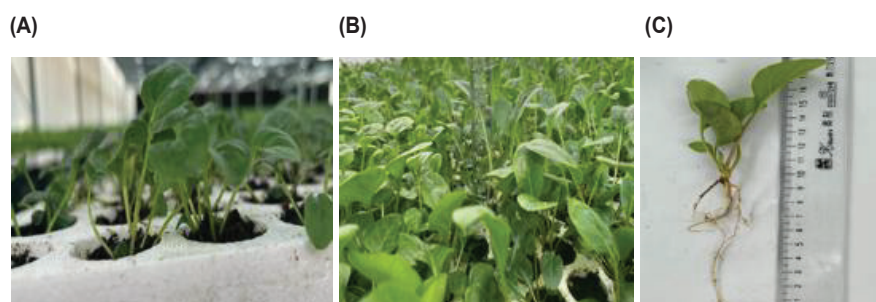
Công thức thí nghiệm	Nhiệt độ (°C)	Cúc đồng tiền cánh vàng cổ			Cúc đồng tiền cánh hồng cổ				
		Tỷ lệ sống sót (%)	Chiều cao cây trung bình sau 3 tuần (cm)	Chiều dài rễ trung bình sau 3 tuần (cm)	Màu sắc lá	Tỷ lệ sống sót (%)	Chiều cao cây trung bình sau 3 tuần (cm)	Chiều dài rễ trung bình sau 3 tuần (cm)	Màu sắc lá
Đối chứng	0	10,05	3,2	1,7	Xanh	14,87	2,5	1,4	Xanh
CT1	10-15	80,06	4,4	2,2	Xanh	91,98	3	1,5	Xanh
CT2	15-20	95,83	5,3	2,5	Xanh đậm	95,97	5	2,5	Xanh đậm
CT3	20-25	98,84	5,8	3,5	Xanh đậm	99,21	5	4,5	Xanh đậm
CT4	25-30	90,07	4,6	3,3	Xanh đậm	92,17	4	2,3	Xanh đậm
CT5	30-35	85,45	4,1	3,1	Vàng nhạt	86,24	4	2,5	Vàng nhạt

lá cũng đạt kết quả tốt nhất đối với cả 2 giống cúc đồng tiền cổ. Cúc đồng tiền cánh vàng cổ có chiều cao trung bình sau 3 tuần cho ra rễ là 5,8 cm, chiều dài rễ là 3,5 cm, lá màu xanh đậm; cúc đồng tiền cánh hồng cổ có chiều cao trung bình sau 3 tuần là 5 cm, chiều dài rễ là 4,5 cm, lá màu xanh đậm (hình 9 và 10).

Từ kết quả thí nghiệm thu được có thể kết luận, nhiệt độ 20-25°C là thích hợp nhất để cho ra rễ 2 giống cúc đồng tiền cánh vàng cổ và cánh hồng cổ.



Hình 9. Mẫu cúc đồng tiền cánh vàng cổ cho ra giá thể sau 3 tuần nuôi cấy. (A) Mẫu sau 1 tuần đưa ra giá thể; **(B)** Mẫu sau 4 tuần đưa ra giá thể; **(C)** Mẫu sau 5 tuần đưa ra giá thể.



Hình 10. Mẫu cúc đồng tiền cánh hồng cổ cho ra giá thể sau 3 tuần nuôi cấy. (A) Mẫu sau 1 tuần đưa ra giá thể; **(B)** Mẫu sau 4 tuần đưa ra giá thể; **(C)** Mẫu sau 5 tuần đưa ra giá thể.

3.2.2. Kết quả ảnh hưởng của thành phần giá thể đến khả năng sống và sinh trưởng của cây con

Đưa cây ra giá thể là giai đoạn cuối cùng của quá trình nhân giống, trong giai đoạn đưa cây từ môi trường nhân tạo sang môi trường tự nhiên việc lựa chọn giá thể thích hợp cho sinh trưởng phát triển của cây là rất quan trọng. Mỗi một giá thể có đặc tính khác nhau. Mỗi loài cây trồng khác nhau trong giai đoạn vườn ươm phụ có yêu cầu khác nhau đối với điều kiện ngoại cảnh. Nhìn chung, giá thể tốt là giá thể có khả năng giữ ẩm tốt, thoát nước tốt và có khả năng cung cấp dinh dưỡng cho cây con ở giai đoạn đầu tiếp cận với môi trường sống tự nhiên. Cúc đồng tiền sau nuôi cấy mô có yêu cầu rất chặt chẽ đối với điều kiện môi trường; độ ẩm phải lớn nhưng không bị úng; nhiệt độ môi trường không quá cao; giá thể sạch và có khả năng cung cấp dinh dưỡng cho giai đoạn cây con trong vườn ươm. Để xác định giá thể phù hợp, chúng tôi tiến hành thử nghiệm các loại giá thể với kết quả thu được ở bảng 6.

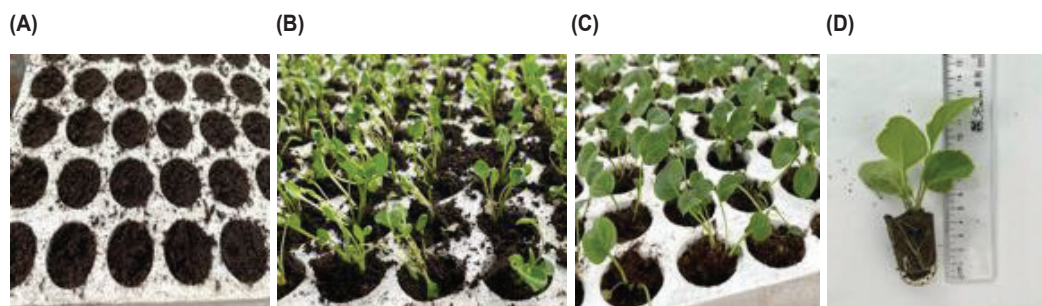
Kết quả bảng 6 cho thấy, giá thể cát (công thức 1) có khả năng thoát nước tốt, giữ nước kém không thích hợp với cúc đồng tiền con chiều dài rễ và số lá mang giá trị không cao, (tỷ lệ sống sau 30 ngày đạt thấp nhất 33,45% đối với giống cúc đồng tiền cánh vàng cổ và 38,46% đối với giống cúc đồng tiền cánh hồng cổ). Giá thể 50% cát + 50% đất thịt (công thức 2) mặc dù trong những ngày đầu tiên cây phát triển tương đối tốt do cát có khả năng

Bảng 6. Ảnh hưởng của thành phần giá thể đến khả năng sống và phát triển của cây con.

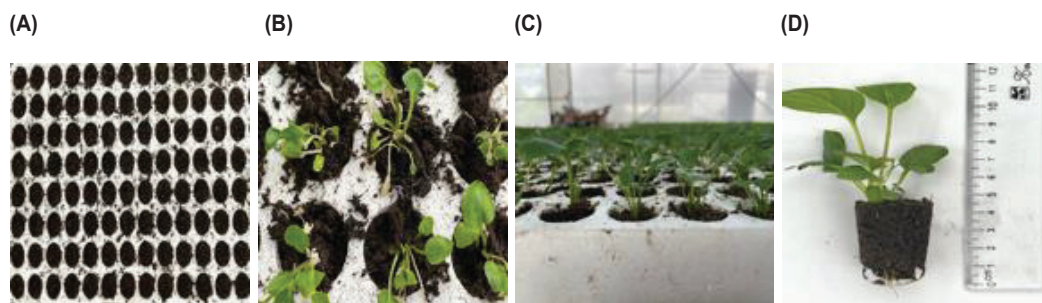
Công thức thí nghiệm	Giá thể	Cúc đồng tiền cánh vàng cổ			Cúc đồng tiền cánh hồng cổ		
		Tỷ lệ sống sót (%)	Chiều cao cây trung bình sau 4 tuần (cm)	Màu sắc lá	Tỷ lệ sống sót (%)	Chiều cao cây trung bình sau 4 tuần (cm)	Màu sắc lá
Đối chứng	0	0	0	-	0	0	-
CT1	100% cát	33,45	10,2	Xanh	38,46	11,6	Xanh
CT2	50% cát + 50% đất thịt	70,23	12,6	Xanh đậm	75,76	12,4	Xanh đậm
CT3	50% cát + 30% đất + 20% trấu hun	98,26	14,8	Xanh đậm	99,05	12,6	Xanh đậm
CT4	50% đất + 50% trấu hun	80,21	12,5	Xanh đậm	90,43	10,9	Xanh đậm
CT5	25% đất + 75% trấu hun	43,56	10,9	Vàng nhạt	45,24	9,7	Vàng nhạt

thoát nước tốt, song cũng giữ nước kém và dễ bị rửa trôi các chất dinh dưỡng nên cây con chết nhiều sau 30 ngày, đồng thời cây mảnh và yếu. Tỷ lệ sống chỉ đạt 70,23% đối với giống cúc đồng tiền cánh vàng cổ và 75,76% đối với giống cúc đồng tiền cánh hồng cổ. Giá thể ở công thức 3 (50% cát + 30% đất + 20% trấu hun) và công thức 4 (50% đất + 50% trấu hun) có tỷ lệ sống cao, nhưng cao nhất là công thức 3. Cây xuất hiện lá mới và tăng trưởng về chiều cao tốt, cho tỷ lệ mẫu sống đạt 98,26% (cúc đồng tiền cánh vàng cổ) và 99,05%

(cúc đồng tiền cánh hồng cổ). Giá thể này cung cấp đầy đủ dinh dưỡng cho cây con, có khả năng giữ và thoát nước tốt, vì sau 30 ngày cây trồng trên giá thể này phát triển khỏe mạnh, cứng cáp. Chiều cao cây trung bình sau 4 tuần là 14,8 cm (cúc đồng tiền cánh vàng cổ) và 12,6 cm (cúc đồng tiền cánh hồng cổ), bản lá mở rộng, màu xanh thẫm. Công thức còn lại có tỷ lệ sống sót giảm, lá chuyển sang vàng nhạt do môi trường quá nhiều trấu hun không phù hợp với sự sinh trưởng của cây cúc đồng tiền (hình 11 và 12).



Hình 11. Cây cúc đồng tiền cánh vàng cổ cho ra giá thể sau 4 tuần nuôi cấy. (A) Giá thể ra rễ; (B) Mẫu bắt đầu cho ra giá thể; (C) Mẫu cho ra giá thể sau 2 tuần; (D) Mẫu cho ra giá thể sau 5 tuần (cả 2 giống cúc đồng tiền cổ).



Hình 12. Mẫu cúc đồng tiền cánh hồng cổ cho ra giá thể sau 4 tuần nuôi cấy. (A) Giá thể ra rễ; (B) Mẫu bắt đầu cho ra giá thể; (C) Mẫu cho ra giá thể sau 2 tuần; (D) Mẫu cho ra giá thể sau 5 tuần (cả 2 giống cúc đồng tiền cổ).

Như vậy, giá thể thích hợp nhất cho cây cúc đồng tiền trong giai đoạn vườn ươm là giá thể gồm 50% cát + 30% đất + 20% trấu hun.

4. Kết luận

Kết quả nghiên cứu cho thấy, môi trường vào mẫu tối ưu là sử dụng dung dịch $\text{Ca}(\text{OCl}_2)_2$ 10% trong 7-8 phút và lắc trong dung dịch HgCl_2 0,1% trong 2-3 phút thu được tỷ lệ tạo mẫu sạch lên đến 90% (cúc đồng tiền cánh vàng cổ) và 92% (cúc đồng tiền cánh hồng cổ). Khả năng tái sinh chồi trực tiếp đạt kết quả tốt nhất khi bổ sung BAP và TDZ. Nồng độ chất điều

hoà sinh trưởng thích hợp nhất cho tái sinh chồi là 1,5 mg/l BAP và 2 mg/l TDZ đối với cả 2 giống cúc đồng tiền cổ nghiên cứu. Kết quả thu được là: tỷ lệ tái sinh đạt 52,17%, số chồi tái sinh là 5 chồi/mẫu đối với loại cúc đồng tiền cánh vàng cổ và tỷ lệ tái sinh là 53,85%, 6 chồi/mẫu đối với cúc đồng tiền cánh hồng cổ.

Các chất điều hoà sinh trưởng được bổ sung để nhân nhanh 2 giống cúc đồng tiền cánh vàng cổ và cúc đồng tiền cánh hồng cổ đạt kết quả tốt nhất là IBA 1,5 mg/l kết hợp với BA 2 mg/l. Kết quả thu được: mẫu cúc đồng tiền cánh vàng cổ đạt tỷ lệ tạo chồi cao nhất sau 4 tuần là 44,45% với số lượng trung bình là 5 chồi/mẫu; giống cúc đồng tiền cánh hồng cổ tỷ lệ tạo chồi cao nhất đạt 46,15% với số lượng trung bình đạt 6 chồi/mẫu. Các chồi đều rất khoẻ mạnh và đều có thể sử dụng cắt nhân tiếp tục ra rễ.

Sử dụng NAA và IBA có thể kích thích ra rễ tốt nhất. Nồng độ chất điều hoà sinh trưởng thích hợp nhất cho việc ra rễ là 0,05 mg/l NAA và 0,3 mg/l IBA đối với cả 2 giống cúc đồng tiền cổ nghiên cứu. Kết quả thu được: số lượng rễ/chồi ở cúc đồng tiền cánh cổ vàng cổ là 6, chiều dài trung bình của các rễ sau 3 tuần là 2,5 cm, rễ có màu trắng; cúc đồng tiền cánh hồng cổ có số rễ/chồi là 7, chiều dài trung bình của rễ là 2,5 cm, màu trắng.

Nhiệt độ 20-25°C là thích hợp nhất để cho ra rễ 2 giống cúc đồng tiền cánh vàng cổ và cánh hồng cổ. Ở nhiệt độ này 100% cây sống sót, kích thước thân, rễ, lá của 2 giống cúc đồng tiền cổ như sau: cúc đồng tiền cánh vàng cổ có chiều cao trung bình sau 3 tuần cho ra rễ là 5,8 cm, chiều dài rễ là 3,5 cm, lá màu xanh đậm; cúc đồng tiền cánh hồng cổ có chiều cao trung bình sau 3 tuần cho ra rễ là 5 cm, chiều dài rễ là 4,5 cm, lá màu xanh đậm.

Sau khi cây con đã được rửa sạch, đưa cây con ra ươm trồng trên vỉ xốp, vỉ nhựa... có chứa giá thể gồm 50% cát + 30% đất + 20% trấu hun. Tỷ lệ cây sống sau 8 tuần có thể đạt 98,26% đối với giống cúc đồng tiền cánh vàng cổ và 99,05% đối với giống cúc đồng tiền cánh hồng cổ. Cây phát triển khỏe mạnh, cứng cáp, chiều cao cây trung bình sau 4 tuần là 14,8 cm (đồng tiền cánh vàng cổ) và 12,6 cm (đồng tiền cánh hồng cổ), bản lá mở rộng, màu xanh thẫm.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này có sử dụng hóa chất, máy móc, trang thiết bị, cây giống của Khoa Sinh, Kỹ thuật Nông nghiệp, Trường Đại học Sư phạm Hà Nội 2 và Công ty TNHH Floris Việt Nam. Các tác giả xin chân thành cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] D.V. Dong, D.T. Loc (2003), *Gerbera Jamesonii Bolus*, Labour and Social Publisher Company Limited (in Vietnamese).
- [2] L.V. Hong, O.X. Phong, H.T. Quyen, et al. (2021), "Evaluation of the effects of magnetic field on the germination rates and early growth stage of the transvaal daisy *in vitro*", *Proceedings of 2021 Vietnam National Conference on Biotechnology*, pp.880-884.
- [3] D.T.T. Huong (2002), *Research on Breeding Gerbera Daisies Using In Vitro Culture Method*, Graduation internship report, Vietnam National University of Agriculture (in Vietnamese).
- [4] N.X. Linh (1998), *Flowers and Flower Growing Techniques*, Agricultural Publishing House, 140pp (in Vietnamese).
- [5] H.T.M. Ngan, T.D.H. Trinh, D.M. Cuong, et al. (2019), "Limitation of hyperdricity and enhanced survival rate of *Gerbera jamesonii* plantlets cultured *in vitro* on medium supplemented with silver nanoparticles", *Vietnam Journal of Biotechnology*, **17(1)**, pp.115-124 (in Vietnamese).
- [6] H.T. Tung, N.P. Huy, N.B. Nam, et al. (2016), "Effects of nano silver on growth of *Chrysanthemum morifolium* in microponic system", *Vietnam Journal of Biotechnology*, **14(3)**, pp.461-471 (in Vietnamese).
- [7] J.C. Cardoso, J.A.T.D. Silva (2013), "Gerbera micropropagation", *Biotechnology Advances*, **31(8)**, pp.1344-1357, DOI: 10.1016/j.biotechadv.2013.05.008.
- [8] G. Minerva, S. Kumar (2013), "Micropropagation of *Gerbera jamesonii* Bolus", *Protocols for Micropropagation of Selected Economically-Important Horticultural Plants*, DOI: 10.1007/978-1-62703-074-8_24.
- [9] K.A.A. Shabanpour, A. Sharifi, A. Bagheri, et al. (2011), "Effect of genotypes and culture medium on shoot regeneration and proliferation of *Gerbera jamesonii*", *Afr. J. Biotechnol.*, **10(57)**, pp.12211-12217.

Khả năng đối kháng của các chủng xạ khuẩn đối với nấm *Colletotrichum* sp. gây bệnh thán thư hại sầu riêng

Lê Minh Tường^{1*}, Lê Hồng Nhiêu², Lê Quốc Việt², Nguyễn Quang Dũng¹, Nguyễn Văn Tập³

¹Trường Nông Nghiệp, Trường Đại học Cần Thơ, khu 2, đường 3/2, phường Xuân Khánh, quận Ninh Kiều, TP Cần Thơ, Việt Nam

²Sinh viên ngành Bảo vệ Thực vật, Trường Đại học Cần Thơ, khu 2, đường 3/2, phường Xuân Khánh, quận Ninh Kiều, TP Cần Thơ, Việt Nam

³UBND huyện Bình Tân, thị trấn Tân Quới, huyện Bình Tân, tỉnh Vĩnh Long, Việt Nam

Ngày nhận bài 18/11/2022; ngày chuyển phản biện 22/11/2022; ngày nhận phản biện 14/12/2022; ngày chấp nhận đăng 16/12/2022

Tóm tắt:

Nghiên cứu được thực hiện tại Trường Đại học Cần Thơ với mục tiêu tìm ra các chủng xạ khuẩn có khả năng đối kháng cao với nấm *Colletotrichum* sp. gây bệnh thán thư hại sầu riêng. Kết quả cho thấy, trong số 28 chủng xạ khuẩn được đánh giá, 6 chủng có ký hiệu là BT19, BL10, TG19, BT16, ĐT15 và VL9 thể hiện khả năng đối kháng cao với nấm *Colletotrichum* sp., bán kính vòng vô khuẩn (BKVK) ghi nhận lần lượt là 12,4; 9,4; 10,1; 9,8; 9,7 và 9,2 mm, hiệu suất đối kháng (HSDK) lần lượt là 63,22, 58,62, 55,86, 53,56, 52,64 và 53,79% tại 7 ngày sau khi bố trí thí nghiệm. Khả năng phân giải β -glucanase của 6 chủng BT19, BL10, TG19, BT16, ĐT15 và VL9 được thực hiện trong điều kiện phòng thí nghiệm cho thấy, chủng BT19 có khả năng tiết ra enzyme β -glucanase cao nhất, với bán kính vòng phân giải β -glucan là 8,53 mm và hàm lượng β -glucanase tiết ra là 0,678 IU/ml ở thời điểm 14 ngày sau khi bố trí thí nghiệm. Kết quả của nghiên cứu này làm cơ sở cho những nghiên cứu tiếp theo nhằm góp phần tìm ra biện pháp phòng trị bệnh thán thư hại cây sầu riêng một cách có hiệu quả.

Từ khóa: bệnh thán thư, β -glucanase, *Colletotrichum* sp., xạ khuẩn.

Chỉ số phân loại: 4.6

1. Đặt vấn đề

Trong những năm gần đây, theo xu hướng chuyển dịch cơ cấu cây trồng, sầu riêng là loại cây ăn trái được bà con nông dân ở vùng Đồng bằng sông Cửu Long lựa chọn trồng nhiều do giá trị kinh tế cao. Bên cạnh sự gia tăng diện tích thì tình hình sinh vật hại trên cây sầu riêng cũng ngày càng phức tạp, trong đó có bệnh thán thư do nấm *Colletotrichum* spp. gây ra. Bệnh xuất hiện ở hầu hết các vườn trồng sầu riêng và gây hại quanh năm. Bệnh thán thư phát triển mạnh trong mùa mưa, điều kiện nhiệt độ, ẩm độ. Nấm bệnh gây hại chủ yếu trên lá, làm lá bị khô cháy từng phần và rụng sớm, cành trơ trụi, cành nhỏ chết khô làm ảnh hưởng đến năng suất và chất lượng trái sầu riêng [1].

Hiện nay, người nông dân quản lý bệnh này chủ yếu bằng biện pháp hóa học. Tuy nhiên, sử dụng thuốc hóa học liên tục sẽ dẫn đến mầm bệnh hình thành tính kháng, phát sinh loài mới, ảnh hưởng đến môi trường, sức khỏe con người [1, 2]. Vì vậy, việc nghiên cứu, áp dụng các biện pháp sinh học trong phòng trừ dịch hại đang được quan tâm [3-6]. Các nghiên cứu gần đây đã chỉ ra rằng, xạ khuẩn có tiềm năng rất lớn trong quản lý bệnh thán thư trên nhiều loại cây trồng như hồ tiêu [3, 4], sen [5, 7], khoai môn [6, 8], xoài [7-10], cây có múi [8, 11]... Do đó, nghiên cứu được thực hiện nhằm tìm ra chủng xạ khuẩn có khả năng đối kháng với nấm *Colletotrichum* sp. gây bệnh thán thư hại sầu riêng; tạo cơ sở cho những nghiên cứu tiếp theo nhằm tìm ra sản phẩm sinh học góp phần phòng trị bệnh thán thư hại sầu riêng một cách có hiệu quả.

*Tác giả liên hệ: Email: lmtuong@ctu.edu.vn

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

- Nguồn nấm: Dòng nấm *Colletotrichum* sp. (dòng Co.BT1) được cung cấp từ Phòng Thí nghiệm bệnh cây, Khoa Bảo vệ Thực vật, Trường Đại học Cần Thơ. Dòng nấm này được thu thập ở huyện Chợ Lách, tỉnh Bến Tre, trên triệu chứng điển hình của bệnh thán thư và có độc tính cao nhất trong tổng số 11 dòng nấm đã phân lập.

- Thu thập và phân lập xạ khuẩn: Thu mẫu đất tại những vườn trồng sầu riêng có diện tích lớn hơn 1.000 m², chọn mẫu đất ở những gốc cây khô (cùng vườn với thu mẫu bệnh), ở độ sâu 10-25 cm. Các mẫu đất ở vườn khác nhau được cho vào túi nilon riêng, sau đó mang về phòng thí nghiệm để phân lập theo phương pháp của S.C. Hsu và cs (1975) [9].

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Khảo sát khả năng đối kháng của các chủng xạ khuẩn đối với nấm *Colletotrichum* sp. gây bệnh thán thư hại sầu riêng trong phòng thí nghiệm

Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 5 lần lặp lại, mỗi nghiệm thức là một chủng xạ khuẩn thí nghiệm. Các chủng xạ khuẩn thử nghiệm được nuôi cấy trên môi trường MS trong 6 ngày, xác định mật số và chuyển về huyền phù với mật số xạ khuẩn cần dùng là 10⁸ cfu/ml. Dòng nấm *Colletotrichum* sp. được nuôi cấy trên môi trường PDA trong 6 ngày.

Antagonistic potential of actinomycete strains against *Colletotrichum* sp. causes anthracnose disease in durian

Minh Tuong Le^{1*}, Hong Nhiều Le², Quoc Viet Le²,
Quang Dung Nguyen¹, Van Tap Nguyen³

¹College of Agriculture, Can Tho University,

Campus 2, 3/2 Street, Xuan Khanh Ward, Ninh Kieu District, Can Tho City, Vietnam

²Undergraduate Students Majoring in Plant Protection, Can Tho University,

Campus 2, 3/2 Street, Xuan Khanh Ward, Ninh Kieu District, Can Tho City, Vietnam

³People's Committee of Binh Tan District,

Tan Quoi Town, Binh Tan District, Vinh Long Province, Vietnam

Received 18 November 2022; revised 14 December 2022; accepted 16 December 2022

Abstract:

The research was carried out at Can Tho University with the aim of investigating the ability of actinomycetes isolates to antagonise *Colletotrichum* sp. fungus causing anthracnose disease in durian. The results showed that among the 28 actinomycete strains evaluated, 6 actinomycetes including BT19, BL10, TG19, BT16, DT15, and VL9 had stronger antagonism with a radius of inhibition zone reaches 12.4, 9.4, 10.1, 9.8, 9.7, and 9.2 mm, respectively and antagonistic efficacy of 63.22, 58.62, 55.86, 53.56, 52.64, and 53.79%, respectively at 7 days after co-inoculation. The ability to degrade β -glucanase of 6 strains BT19, BL10, TG19, BT16, DT15, and VL9 performed under laboratory conditions showed that the BT19 isolate had the highest β -glucanolytic activity with the β -glucan lyse halo radius of 8.53 mm and secreted β -glucanase content reached 0.678 IU/ml at 14 days after testing. The results of this study will be the basis for further research to contribute to finding effective methods to control anthracnose disease in durian.

Keywords: actinomycetes, anthracnose disease, β -glucanase, *Colletotrichum* sp.

Classification number: 4.6

Khoanh khuẩn ty nấm *Colletotrichum* sp. có đường kính 5 mm được đặt vào giữa đĩa petri (có chứa 10 ml môi trường PDA). Khoanh giấy thấm có đường kính 5 mm được tẩm huyền phù chủng xạ khuẩn thí nghiệm được đặt đối xứng với khoanh khuẩn ty nấm và cách thành đĩa 1 cm (mỗi đĩa sử dụng 2 chủng xạ khuẩn đặt đối xứng với nấm). Ở nghiệm thức đối chứng thì thay khoanh giấy thấm tẩm xạ khuẩn bằng khoanh giấy thấm tẩm nước cất thanh trùng. Sau đó, các đĩa petri thí nghiệm được đặt ở điều kiện nhiệt độ 28°C.

Chỉ tiêu ghi nhận: Đo BKT_{VK} ở các thời điểm 3, 5 và 7 ngày sau khi bố trí thí nghiệm.

Tính HSDK ở các thời điểm 3, 5 và 7 ngày sau khi bố trí thí nghiệm theo công thức của S.A. Palaniyandi và cs (2013) [10] như sau:

$$\text{HSDK (\%)} = (\text{BKT}_{\text{dc}} - \text{BKT}_{\text{nk}}) / \text{BKT}_{\text{dc}} \times 100$$

trong đó BKT_{dc} là bán kính tán nấm phát triển về phía đối chứng; BKT_{nk} là bán kính tán nấm phát triển về phía xạ khuẩn.

2.2.2. Khảo sát khả năng phân giải β -glucanase của các chủng xạ khuẩn trên môi trường thạch

Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 5 lần lặp lại, mỗi nghiệm thức là một chủng xạ khuẩn thí nghiệm và mật số xạ khuẩn sử dụng trong thí nghiệm là 10⁸ cfu/ml. Thí nghiệm được thực hiện theo phương pháp của S. Gopalakrishnan và cs (2014) [11].

Dùng kẹp chuyên dụng cho các khoanh giấy thấm có đường kính 5 mm vào dung dịch huyền phù xạ khuẩn mật số 10⁸ cfu/ml. Sau đó, đặt các khoanh giấy thấm lên đĩa petri có chứa 10 ml môi trường glucan agar thành 2 điểm cách đều nhau. Mỗi điểm tương ứng một khoanh giấy thấm chứa một chủng xạ khuẩn. Sau đó, các đĩa petri thí nghiệm được đặt ở điều kiện nhiệt độ 28°C. Xác định khả năng phân giải glucan ở từng thời điểm ghi nhận chỉ tiêu bằng cách tráng dung dịch Congo-red 0,6% lên đĩa thạch, đổ bỏ phần dung dịch Congo-red thừa và tráng bề mặt agar lại với nước cất.

Chỉ tiêu ghi nhận: Đo bán kính vùng không bắt màu thuốc nhuộm Congo-red là vòng phân giải glucan ở các thời điểm 10, 12 và 14 ngày sau bố trí thí nghiệm.

2.2.3. Xác định hoạt độ của enzyme β -glucanase sản sinh từ các chủng xạ khuẩn

Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 5 lần lặp lại, mỗi nghiệm thức là một chủng xạ khuẩn thí nghiệm.

- Chuẩn bị dung dịch cơ chất nền 2% laminarin: Pha trong dung dịch 0,2 M Na-acetate (pH 5,4).

- Chuẩn bị dung dịch 2-hydroxy-3,5-dinitrobenzoic acid (DNS): Cân 10 g DNS cho vào bình, bổ sung thêm 300 ml nước cất, khuấy đều. Thêm từ từ 400 ml dung dịch NaOH 1 N vào và khuấy đều ở nhiệt độ khoảng 50°C. Thêm 300 g

Tartrat K Natri vào dung dịch trên, tiếp tục khuấy đều, để nguội về nhiệt độ phòng, thêm nước cất và khuấy đều để được dung dịch đạt 1000 ml.

- Chuẩn bị dung dịch xạ khuẩn chứa enzyme glucanase: 6 chủng xạ khuẩn được nuôi cấy trong môi trường MS trong 6 ngày, xác định mật số và chuyển về huyền phù bào tử xạ khuẩn là 10^8 cfu/ml. Cho 2 ml huyền phù xạ khuẩn đã chuẩn bị bên trên vào trong bình tam giác chứa 98 ml môi trường Czapek Dox có bổ sung 1% laminarin, sau đó đem nuôi lắc ở điều kiện nhiệt độ 28°C với tốc độ 100 vòng/phút trong 4 ngày. Tiến hành thu dịch enzyme thô bằng cách ly tâm ở tốc độ 4500 vòng/phút trong 15 phút, lấy phần dịch trong bên là dung dịch xạ khuẩn có chứa enzyme β -glucanase.

- Tiến hành thí nghiệm: Cho vào ống nghiệm hỗn hợp phản ứng gồm 1 ml dung dịch 2% laminarin và 1 ml dung dịch xạ khuẩn chứa enzyme glucanase và đem ủ ở nhiệt độ 40°C trong 5 phút. Tiếp theo, cho vào 0,1 ml dung dịch 2% laminarin, lắc đều và đem ủ ở nhiệt độ 40°C trong 60 phút; thêm 3 ml dung dịch DNS vào ống nghiệm, lắc đều và đun cách thủy ở 100°C trong 10 phút, sau đó để nguội ở điều kiện nhiệt độ phòng và đo mật độ quang (OD) ở bước sóng 530 nm. Đối với nghiệm thức đối chứng thì thay 1 ml dung dịch xạ khuẩn chứa enzyme chitinase bằng 1 ml nước cất thanh trùng.

- Chỉ tiêu ghi nhận: OD dịch phản ứng ở các thời điểm 10, 12 và 14 ngày sau khi nuôi lắc.

- Cách tính: Một đơn vị hoạt tính HT enzyme glucanase (IU/ml) là lượng enzyme cần thiết để giải phóng 1 μ mol glucose từ glucanase huyền phù trong thời gian 1 phút ở nhiệt độ phản ứng (40°C).

$$HT \text{ (IU/ml)} = \Delta OD_{\text{mẫu phân tích}} \times F \times (1000/180) \times (1/t) \times (1/v)$$
trong đó F là giá trị hệ số glucose trung bình (mg/ml); $\Delta OD_{\text{mẫu phân tích}} = OD_{\text{ống có dịch enzyme thô}} - OD_{\text{ống đối chứng}}$; 1000: hệ số chuyển đổi mg thành μ g; 180: trọng lượng phân tử của glucose (đổi từ μ g sang μ mol); t: thời gian phản ứng (60 phút); v: thể tích dung dịch enzyme (1 ml).

2.3. Xử lý số liệu

Số liệu được xử lý với phần mềm Microsoft office Excel và phân tích bằng phần mềm MSTATC qua phép thử Duncan.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Khả năng đối kháng của các chủng xạ khuẩn đối với nấm *Colletotrichum* sp. gây bệnh thán thư hại sầu riêng trong điều kiện phòng thí nghiệm

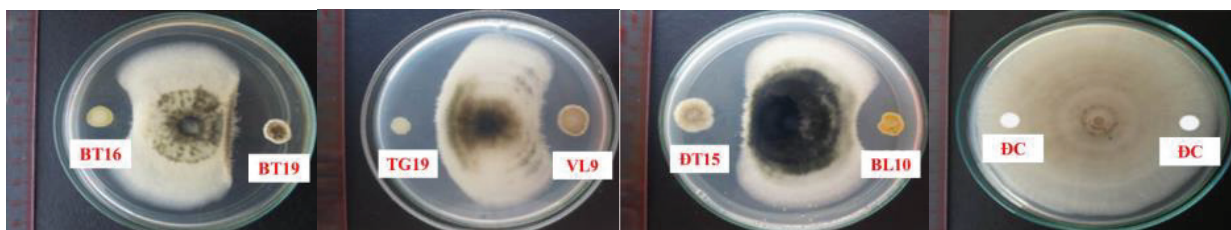
Bán kính vòng vô khuẩn (BKVVK): Kết quả thử nghiệm cho thấy, tại thời điểm 3 ngày sau bố trí thí nghiệm hầu hết các chủng xạ khuẩn đều thể hiện khả năng đối kháng với nấm *Colletotrichum* sp. gây bệnh thán thư hại sầu riêng

với nhiều mức độ khác nhau. Trong đó, 4 chủng xạ khuẩn TG19, VL9, BL10 và BL19 có BKVVK cao nhất lần lượt là 14,4, 15,4, 14,6 và 14,6 mm, có sự khác biệt ý nghĩa so với các chủng còn lại (bảng 1).

Bảng 1. BKVVK của các chủng xạ khuẩn đối với nấm *Colletotrichum* sp. gây bệnh thán thư hại sầu riêng.

Thứ tự	Chủng xạ khuẩn	BKVVK (mm) của các nghiệm thức qua các thời điểm khảo sát		
		3 NSBT	5 NSBT	7 NSBT
1	VL13	11,0 ^{c-f}	5,5 ^{gh}	5,1 ^{e-j}
2	VL11	12,0 ^{bcd}	7,0 ^{def}	5,0 ^{f-j}
3	VL18	11,8 ^{b-e}	7,6 ^{de}	5,2 ^{d-j}
4	VL17	10,8 ^{def}	4,8 ^{ghi}	2,1 ^{mn}
5	CT03	12,6 ^b	8,5 ^{cde}	7,3 ^{cd}
6	CT07	7,6 ^g	3,0 ^{ijk}	2,8 ^{k-n}
7	CT11	12,0 ^{bcd}	7,4 ^{def}	6,2 ^{d-h}
8	CT15	6,4 ^g	2,9 ^{ijk}	2,2 ^{mn}
9	CT17	11,2 ^{b-e}	6,9 ^{def}	3,9 ^{i-m}
10	BT02	10,8 ^{def}	5,6 ^{gh}	4,3 ^{h-l}
11	BT05	9,6 ^f	4,0 ^{h-k}	3,3 ⁱ⁻ⁿ
12	ĐT9	10,4 ^{ef}	4,6 ^{hij}	1,7 ⁿ
13	TG09	10,8 ^{def}	6,7 ^{efg}	5,7 ^{d-i}
14	TG19	14,4 ^a	9,9 ^c	10,1 ^b
15	TG22	11,2 ^{b-e}	2,2 ^k	1,7 ⁿ
16	ĐT24	11,7 ^{b-e}	8,6 ^{cde}	4,4 ^{g-k}
17	ĐT16	14,4 ^a	8,8 ^{cd}	7,2 ^{cde}
18	ST02	11,4 ^{b-e}	6,6 ^{efg}	5,5 ^{d-i}
19	BT16	12,1 ^{bcd}	12,0 ^b	9,8 ^b
20	ĐT15	12,10 ^{bcd}	9,9 ^c	9,7 ^b
21	AG4	9,6 ^f	3,6 ^{ijk}	2,3 ^{mn}
22	HG17	9,6 ^f	2,7 ^{jk}	2,3 ^{lmn}
23	VL9	15,4 ^a	11,8 ^b	9,2 ^b
24	HG21	12,4 ^{bc}	6,6 ^{efg}	5,3 ^{d-j}
25	BL10	14,6 ^a	12,2 ^b	9,4 ^b
26	BT19	14,6 ^a	14,0 ^a	12,4 ^a
27	ĐT5	10,9 ^{def}	8,6 ^{cde}	6,5 ^{e-g}
28	HG4	10,7 ^{def}	8,8 ^{cd}	6,7 ^{e-f}
Mức ý nghĩa		*	*	*
CV (%)		8,4	18,9	25,6

Các giá trị ở cùng một cột được theo sau bởi cùng một hoặc nhiều chữ cái giống nhau thì không khác biệt ở mức ý nghĩa 1% qua phép thử Duncan; *: khác biệt ở mức ý nghĩa 1; NSBT: ngày sau bố trí thí nghiệm.



Hình 1. Khả năng đối kháng của các chủng xạ khuẩn đối với nấm *Colletotrichum* sp. gây bệnh thán thư hại sầu riêng ở thời điểm 7 ngày sau khi bố trí thí nghiệm.

Bảng 2. HSDK của các chủng xạ khuẩn đối với *Colletotrichum* sp. gây bệnh thán thư hại sầu riêng.

Thứ tự	Chủng xạ khuẩn	HSDK (%) của các thí nghiệm thức qua các thời điểm khảo sát		
		3 NSBT	5 NSBT	7 NSBT
1	VL13	8,49 ^{hi}	28,39 ^{gh}	47,13 ^{g-k}
2	VL11	17,64 ^{cde}	30,32 ^{fg}	45,75 ^{i-l}
3	VL18	9,51 ^{ghi}	29,68 ^{gh}	45,29 ^{kl}
4	VL17	8,49 ^{hi}	27,10 ^{ghi}	42,53 ^{lmn}
5	CT03	10,52 ^{fgh}	27,74 ^{ghi}	47,82 ^{g-j}
6	CT07	4,43 ⁱ	16,13 ^j	38,62 ^{op}
7	CT11	13,57 ^{e-h}	34,19 ^{ef}	49,43 ^{i-j}
8	CT15	14,08 ^{d-g}	18,71 ^j	40,23 ^{mno}
9	CT17	9,51 ^{ghi}	23,23 ⁱ	42,76 ^{lm}
10	BT02	10,52 ^{fgh}	25,81 ^{ghi}	45,52 ^{i-l}
11	BT05	9,51 ^{ghi}	17,10 ^j	38,85 ^{nop}
12	ĐT9	11,54 ^{fgh}	25,16 ^{hi}	43,45 ^{klm}
13	TG09	15,61 ^{def}	33,55 ^{ef}	49,34 ^{g-j}
14	TG19	19,17 ^{cd}	38,06 ^{cde}	55,86 ^{bc}
15	TG22	21,2 ^{bc}	34,19 ^{ef}	38,85 ^{op}
16	ĐT24	22,73 ^{bc}	36,13 ^{de}	46,21 ^{h-l}
17	ĐT16	24,76 ^b	36,13 ^{de}	49,20 ^{f-j}
18	ST02	9,51 ^{ghi}	27,74 ^{ghi}	48,51 ^{g-j}
19	BT16	18,66 ^{cde}	41,94 ^{bc}	53,56 ^c
20	ĐT15	12,05 ^{fgh}	37,42 ^{cde}	52,64 ^c
21	AG4	9,51 ^{ghi}	14,84 ^j	37,47 ^{op}
22	HG17	15,61 ^{def}	14,19 ^j	36,09 ^p
23	VL9	22,72 ^{bc}	40,0 ^{cd}	53,79 ^c
24	HG21	9,51 ^{ghi}	25,16 ^{hi}	43,68 ^{klm}
25	BL10	21,71 ^{bc}	43,87 ^b	58,62 ^b
26	BT19	29,85 ^a	54,19 ^a	63,22 ^a
27	ĐT5	8,49 ^{hi}	35,16 ^{de}	49,88 ^{e-h}
28	HG4	10,52 ^{fgh}	36,13 ^{de}	49,20 ^{f-j}
Mức ý nghĩa		*	*	*
CV (%)		25,5	11,3	5,8

Các giá trị ở cùng một cột được theo sau bởi cùng một hoặc nhiều chữ cái giống nhau thì không khác biệt ở mức ý nghĩa 1% qua phép thử Duncan; *: khác biệt ở mức ý nghĩa 1%.

Ở thời điểm 5 ngày sau bố trí thí nghiệm (hình 1), chủng BT19 có BKVVK cao nhất là 14,0 mm, sau đó là 3 chủng BT16, VL9 và BT10 có BKVVK lần lượt là 12,0, 11,8 và 12,2 mm, khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các chủng còn lại. Ở thời điểm 7 ngày sau bố trí thí nghiệm, chủng BT19 vẫn cho khả năng đối kháng cao nhất với BKVVK là 12,4 mm; tiếp theo là 5 chủng TG19, BT16, ĐT15, VL9 và BT10 có BKVVK lần lượt là 11,1, 9,8, 9,7, 9,2 và 9,4 mm, cao hơn và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các chủng còn lại (bảng 1).

Hiệu suất đối kháng (HSDK): HSDK của các chủng xạ khuẩn thí nghiệm đối với nấm *Colletotrichum* sp. được thể hiện ở bảng 2. Ở thời điểm 3 ngày sau bố trí thí nghiệm, tất cả các chủng xạ khuẩn đều thể hiện HSDK đối với nấm, chủng BT19 có HSDK cao nhất là 29,85%, khác biệt ý nghĩa so với các chủng xạ khuẩn thí nghiệm còn lại. Ở thời điểm 5 ngày sau bố trí thí nghiệm, chủng BT19 vẫn có khả năng đối kháng cao nhất qua HSDK là 54,19%. Đến 7 ngày sau bố trí thí nghiệm, chủng BT19 có HSDK cao nhất là 63,22%, tiếp theo là 2 chủng BL10 và TG19 với HSDK lần lượt là 58,62 và 55,86%; sau đó là 3 chủng BT16, ĐT15 và VL9 có HSDK lần lượt là 53,56, 52,64 và 53,79%, cao hơn và khác biệt ý nghĩa thống kê so với các chủng xạ khuẩn thí nghiệm còn lại.

Từ kết quả bảng 1 và 2 cho thấy, 28 chủng xạ khuẩn thí nghiệm đều có khả năng đối kháng với nấm *Colletotrichum* sp. gây bệnh thán thư hại sầu riêng ở các mức độ khác nhau thể hiện qua BKVVK cao và HSDK. Trong đó, 6 chủng xạ khuẩn thuộc chi *Streptomyces* là BT19, BL10, TG19, BT16, ĐT15 và VL9 thể hiện khả năng đối kháng cao nhất và kéo dài đến thời điểm 7 ngày sau khi bố trí thí nghiệm.

3.2. Khả năng phân giải β -glucanase của các chủng xạ khuẩn trong môi trường thạch

Khả năng phân giải β -glucanase của các chủng xạ khuẩn thí nghiệm được trình bày tại bảng 3. Ở thời điểm 10 ngày sau bố trí thí nghiệm, chủng BT19 thể hiện khả năng phân giải β -glucanase cao nhất là 6,95 mm và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các chủng xạ khuẩn thí nghiệm còn lại (riêng chủng ĐT15 không thể hiện khả năng phân giải β -glucanase

với bán kính vòng phân giải (BKVPG) là 0 mm). Ở thời điểm 12 ngày sau bố trí thí nghiệm, chủng BT19 cho khả năng phân giải β -glucanase cao nhất với BKVPG là 7,73 mm. Đến thời điểm 14 ngày sau bố trí thí nghiệm, 2 chủng BT19 và BL10 cho BKVPG cao nhất lần lượt là 8,53 và 8,30 mm, cao hơn và khác biệt ý nghĩa thống kê so với các chủng xạ khuẩn thí nghiệm còn lại, riêng chủng ĐT15 vẫn không thể hiện khả năng phân giải β -glucanase với BKVPG là 0 mm.

Bảng 3. Bán kính vòng phân giải β -glucanase của 6 chủng xạ khuẩn.

Chủng xạ khuẩn	Bán kính (mm) vòng phân giải β -glucanase		
	10 NSNL	12 NSNL	14 NSNL
TG19	5,63 ^c	7,18 ^b	7,88 ^b
BT19	6,95 ^a	7,73 ^a	8,53 ^a
BT16	3,50 ^c	4,30 ^d	4,93 ^d
BL10	6,30 ^b	7,30 ^b	8,30 ^a
VL9	5,00 ^d	6,01 ^c	6,25 ^c
ĐT15	0,00 ^f	0,00 ^e	0,00 ^e
Mức ý nghĩa	**	**	**
CV (%)	4,10	2,43	2,01

Các giá trị ở cùng một cột được theo sau bởi cùng một hoặc nhiều chữ cái giống nhau thì không khác biệt ở mức ý nghĩa 1% qua phép thử Duncan. Số liệu được chuyển sang log(x) trước khi thống kê. **: khác biệt ở mức ý nghĩa 1%; NSNL: ngày sau khi nuôi cấy.

3.3. Hàm lượng enzyme β -glucanase sản sinh từ các chủng xạ khuẩn

Kết quả xác định hàm lượng enzyme β -glucanase của các chủng xạ khuẩn qua các thời điểm khảo sát được trình bày ở

Bảng 4. Hàm lượng enzyme β -glucanase (IU/ml) sản sinh từ các chủng xạ khuẩn.

Chủng xạ khuẩn	Hàm lượng enzyme β -glucanase (IU/ml)		
	10 NSNL	12 NSNL	14 NSNL
TG19	0,325 ^c	0,375 ^c	0,29 ^c
BT19	0,420 ^a	0,483 ^a	0,678 ^a
BT16	0,100 ^e	0,065 ^e	0,050 ^e
BL10	0,360 ^b	0,395 ^b	0,318 ^b
VL9	0,195 ^d	0,145 ^d	0,095 ^d
ĐT15	0,005 ^f	0,005 ^f	0,007 ^f
Mức ý nghĩa	**	**	**
CV (%)	3,38	2,63	3,01

Các giá trị ở cùng một cột được theo sau bởi cùng một hoặc nhiều chữ cái giống nhau thì không khác biệt ở mức ý nghĩa 1% qua phép thử Duncan. Số liệu được chuyển sang log(x) trước khi thống kê. **: khác biệt ở mức ý nghĩa 1%; NSNL: ngày sau khi nuôi cấy.

bảng 4. Ở thời điểm 10 ngày sau khi nuôi cấy, chủng BT19 thể hiện khả năng phân giải β -glucanase cao nhất thông qua hàm lượng enzyme β -glucanase tiết ra lớn nhất là 0,420 (IU/ml). Đến thời điểm 12 và 14 NSNL, chủng BT19 vẫn cho hàm lượng enzyme β -glucanase tiết ra lớn nhất lần lượt là 0,483 (IU/ml) ở 12 NSNL và 0,678 (IU/ml) ở 14 NSNL cao hơn và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các thí nghiệm còn lại ở cùng thời điểm thí nghiệm.

Kết quả bảng 3 và 4 cho thấy, cả 6 chủng xạ khuẩn thí nghiệm đều có khả năng phân giải và sản sinh enzyme β -glucanase với nhiều mức độ khác nhau. Trong đó, chủng BT19 thể hiện khả năng phân giải và sản sinh β -glucanase cao nhất thông qua bán kính vòng phân giải và hàm lượng enzyme.

Như vậy, khả năng đối kháng của các chủng xạ khuẩn thí nghiệm đối với nấm *Colletotrichum* sp. gây bệnh thán thư hại sầu riêng có thể được giải thích là do khả năng sản sinh các chất đối kháng với nấm bệnh như các enzyme phân hủy vách tế bào nấm gây bệnh (ví dụ như enzyme β -glucanase). β -glucan là thành phần quan trọng trong vách tế bào nấm thật, vì vậy, khả năng sản sinh enzyme β -glucanase phân giải β -glucan là chỉ tiêu quan trọng nhằm đánh giá triển vọng của xạ khuẩn trong phòng trị bệnh cây trồng do nấm gây ra. Xạ khuẩn thuộc chi *Streptomyces* là một tác nhân phòng trừ sinh học có khả năng đối kháng lại với nấm bệnh thông qua việc sản sinh các enzyme phân giải thành phần quan trọng của cấu tạo vách tế bào nấm như β -1,3-glucanase [3, 6]. Nghiên cứu cho thấy, enzyme β -glucanase được sinh tổng hợp từ chủng xạ khuẩn *Streptomyces hygroscopicus* có khả năng đối kháng cao thông qua khả năng phá hủy và làm biến dạng vách tế bào của nấm *Colletotrichum gloeosporioides* và *Sclerotium rolfsii* [12, 13]. Chủng xạ khuẩn *Streptomyces cavourensis* SY224 có khả năng quản lý bệnh thán thư hồ tiêu tiêu do nấm *Colletotrichum* sp. gây ra một phần là do sản sinh enzyme glucanase [13, 9]. Theo nghiên cứu của D.T. Ngọc và cs (2022) [14], chủng xạ khuẩn CT12-HG có khả năng ức chế được nấm *Phytophthora* sp. gây bệnh nứt thân, xì mủ trên cây mít thông qua khả năng tiết ra enzyme β -glucanase.

4. Kết luận

6 chủng xạ khuẩn ký hiệu BT19, BL10, TG19, BT16, ĐT15 và VL9 có khả năng đối kháng cao với nấm *Colletotrichum* sp. gây bệnh thán thư hại sầu riêng trong điều kiện phòng thí nghiệm.

Chủng xạ khuẩn BT19 có khả năng tiết enzyme β -glucanase cao nhất thể hiện qua bán kính vòng phân giải lớn và lượng enzyme sản sinh nhiều nhất.

Đề nghị nghiên cứu định danh các loài xạ khuẩn có tiềm năng, đánh giá an toàn sinh học và tiếp tục thử nghiệm khả năng kiểm soát bệnh trong điều kiện nhà lưới của chủng xạ khuẩn BT19.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] V.T. Man (2007), *Specialized Plant Disease Textbook*, Vietnam National University of Agriculture, 164pp (in Vietnamese).
- [2] P.A. Backman, M. Wilson, J.F. Murphy (1997), *Bacteria for Biological Control of Plant Diseases*, Lewis Publishers, pp.95-109.
- [3] L.M. Tuong, D.H. Thai, L.V. Giang, et al. (2016), *Actinomycetes and Their Roles in Plant Disease Management*, Environmentally Friendly Crop Pest Management, Cantho University, pp.203-215.
- [4] D.K. Hao, T.T.T. Thuy, L.M. Tuong (2021), “Evaluation antibacterial activity of actinomycetes isolates on *Colletotrichum* sp. causing anthracnose disease on pepper”, *Vietnam Journal of Agriculture And Rural Development*, **2**, pp.13-19 (in Vietnamese).
- [5] L.M. Tuong, N.P. Tien, T.X. Viet (2022), “The antagonistic ability of actinomycetes isolates against *Colletotrichum* sp. fungus causing anthracnose disease on lotus seed”, *Vietnam Journal of Agriculture and Rural Development*, **10**, pp.34-40 (in Vietnamese).
- [6] L.Y. Nhi, T.T.M. Hanh, L.M. Tuong (2020), “Assessment of antibacterial activity of actinomycetes isolates on *Colletotrichum* sp. causing anthracnose disease on taro”, *Vietnam Journal of Agriculture and Rural Development*, **22**, pp.60-67 (in Vietnamese).
- [7] N.H. Qui, L.M. Tuong (2016), “Determination of the actinomycete isolates as potential antagonistic ability in controlling anthracnose diseases caused by *Colletotrichum* sp. on mango”, *Can Tho University Journal of Science*, **3**, pp.120-127, DOI: 10.22144/ctu.jsi.2016.079.
- [8] N.H. Qui, L.M. Tuong (2018), “Determination antibacterial activity of actinomyces isolates on *Colletotrichum* sp. causing anthracnose disease on citrus in Mekong delta”, *Vietnam Journal of Agriculture and Rural Development*, **5**, pp.50-59 (in Vietnamese).
- [9] S.C. Hsu, J.L. Lockwood (1975), “Powdered chitin agar as a selective medium for enumeration of actinomycetes in water and soil”, *Apply Microbiology*, **29(3)**, pp.422-426, DOI: 10.1128/am.29.3.422-426.1975.
- [10] S.A. Palaniyandi, S.H. Yang, L. Zhang, et al. (2013), “Effects of actinobacteria on plant disease suppression and growth promotion”, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **97**, pp.9621-9636, DOI: 10.1007/s00253-013-5206-1.
- [11] S. Gopalakrishnan, S. Pande, M. Sharma, et al. (2014), “Evaluation of actinomycete isolates obtained from herbal vermicompost for the biological control of *Fusarium* wilt of chickpea”, *Crop Protection*, **30**, pp.1070-1078, DOI: 10.1016/j.cropro.2011.03.006.
- [12] B. Prapagdee, C. Kuekulvong, S. Mongkolsuk (2008), “Antifungal potential of extracellular metabolites produced by *Streptomyces hygroscopicus* against phytopathogenic fungi”, *International Journal of Biological Sciences*, **4**, pp.330-337, DOI: 10.7150/ijbs.4.330.
- [13] S.Y. Lee, H. Tindwa, Y.S. Lee, et al. (2012), “Biocontrol of anthracnose in pepper using chitinase, β -1,3 glucanase and 2-furancarboxaldehyde produced by *Streptomyces cavourensis* SY224”, *Journal Microbiology Biotechnology*, **22(10)**, pp.1359-1366, DOI: 10.4014/jmb.1203.02056.
- [14] D.T. Ngoc, L.M. Tuong (2022), “Evaluation of antagonistic activity of actinomycetes isolates on *Phytophthora* sp. causing decline disease on jackfruit”, *Vietnam Journal of Agriculture and Rural Development*, **13**, pp.29-36 (in Vietnamese).

QUY ĐỊNH VỀ BÀI BÁO ĐĂNG TẢI TRÊN TẠP CHÍ

Yêu cầu chung

Bài báo gửi đăng trên Tạp chí phải là bài báo nguyên thủy (chưa được công bố trước đó). Tác giả không được gửi đăng bài báo trên các tạp chí khác cho đến khi có quyết định xét duyệt của Ban Biên tập.

Bài báo dài không quá 10 trang (bao gồm cả bảng biểu, ghi chú, tài liệu tham khảo và phụ lục); font chữ: Times New Roman; cỡ chữ 13; khổ giấy A4, lề trên 2 cm, lề dưới 2 cm, lề trái 3 cm, lề phải 2 cm.

Bài báo gửi qua Hệ thống gửi bài trực tuyến tại địa chỉ https://b.vjst.vn/index.php/ban_b/about/submissions hoặc có thể gửi trực tiếp đến Tạp chí (Phòng 507, số 113 Trần Duy Hưng, phường Trung Hòa, quận Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam) hoặc qua hòm thư điện tử: khoahocvacaongnghevietnam@most.gov.vn.

Cấu trúc của các loại bài báo khác nhau có thể thay đổi tùy theo loại hình nghiên cứu và nội dung của bài báo. Sau đây là chi tiết các thành phần chính của bài báo.

Tên bài báo

- Tên bài báo được viết bằng tiếng Việt và tiếng Anh, trên trang đầu của bài báo, in đậm, không gạch chân hay viết nghiêng.
- Tên bài báo phải ngắn gọn, rõ ràng và phù hợp với nội dung bài báo.
- Phía dưới tên bài báo là tên tác giả không viết chức danh và học hàm, học vị. Nếu có nhiều tác giả làm việc ở các cơ quan khác nhau thì tên tác giả được đánh số ^(1,2,...) ở phía trên. Dấu hoa thị (*) chỉ tác giả liên hệ, được viết ở cuối trang đầu tiên của bài báo.
- Khi liệt kê cơ quan công tác của tác giả, cần nêu rõ tên cơ quan và địa chỉ cơ quan (số nhà, tên đường, phường, quận, thành phố, quốc gia) bằng tiếng Việt và tiếng Anh.

Tóm tắt

Tóm tắt bằng tiếng Việt và tiếng Anh (khoảng 160-250 từ). Nêu được mục đích, phương pháp nghiên cứu chính, kết quả nghiên cứu và kết luận chủ yếu. Từ khóa bằng cả tiếng Việt và tiếng Anh theo thứ tự alphabet (ít nhất 3 từ khóa). Chỉ số phân loại (theo hướng dẫn).

1. Đặt vấn đề/Dẫn nhập/Mở đầu

Định nghĩa vấn đề; tóm lược vấn đề nghiên cứu đã được công bố trong và ngoài nước, nêu mục tiêu nghiên cứu và giải thích sự lựa chọn đề tài và mục tiêu nghiên cứu để thấy được tính thời sự, tính khoa học và sự cần thiết của vấn đề nghiên cứu.

2. Đối tượng/Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu cần trình bày tiêu chuẩn lựa chọn, đặc điểm đối tượng nghiên cứu. Phương pháp nghiên cứu cần nêu rõ cách tiếp cận nghiên cứu, loại hình nghiên cứu, phương pháp đo lường, công thức tính cỡ mẫu, phương pháp xử lý số liệu, mô tả kỹ các kỹ thuật tiến hành trong nghiên cứu; các quan điểm, lập luận, ý kiến tranh luận, các dẫn chứng...

3. Kết quả

Trình bày đầy đủ, khách quan các kết quả thu được sau nghiên cứu, các kết quả này phải phục vụ cho mục tiêu nghiên cứu. Các số liệu phải chính xác và khớp với nhau.

Phân kết quả nghiên cứu chỉ trình bày các kết quả nghiên cứu của đề tài, không giải thích, so sánh và bàn luận.

4. Bàn luận (phần này có thể gộp với phần kết quả)

Chủ yếu bàn luận các vấn đề liên quan đến mục tiêu đề tài. Nhận xét, đánh giá một cách khách quan các kết quả nghiên cứu, có so sánh với các tác giả khác để khẳng định hoặc phủ định những hiểu biết đã có, qua đó nêu được những điểm mới và đóng góp của đề tài. Dự báo hướng nghiên cứu tiếp và khả năng ứng dụng các kết quả nghiên cứu vào thực tiễn.

5. Kết luận

Nêu kết quả nghiên cứu chủ yếu của đề tài có tính khái quát liên quan đến mục tiêu nghiên cứu, đề xuất các vấn đề tiếp tục nghiên cứu.

LỜI CẢM ƠN (nếu có)

Tác giả cảm ơn các tổ chức/cá nhân đã tài trợ kinh phí hoặc hỗ trợ cho nghiên cứu.

Phụ lục (nếu có)

Đăng tải bảng số liệu, thông tin để hỗ trợ thêm cho nội dung bài báo.

Chú thích và tài liệu tham khảo

Chú thích được đánh số theo thứ tự xuất hiện ^(1, 2, 3,...) và được trình bày ngay ở cuối trang viết (footnote). Các tài liệu tham khảo được đánh số theo thứ tự xuất hiện để chỉ dẫn chúng được trích dẫn ở đâu trong bài báo. Số thứ tự được đánh trong ngoặc vuông, ví dụ: [3] với một hoặc [2, 5, 7-9] với nhiều số chỉ dẫn.

- Lưu ý:
- Đối với trích dẫn trong bài báo: tài liệu tham khảo có nhiều hơn một tác giả chỉ để tên tác giả đầu tiên và cộng sự, viết tắt là cs, ví dụ: T.V. Nguyen và cs (năm xuất bản) [thứ tự trong danh mục tài liệu tham khảo].
 - Đối với danh mục tài liệu tham khảo cuối bài: tài liệu tham khảo bằng tiếng Anh, các tài liệu không phải tiếng Anh cần được dịch sang tiếng Anh và chú thích ở cuối câu, ví dụ: (in Vietnamese), (in French)...
 - Tài liệu tham khảo là các đường link cần bổ sung ngày truy cập.

Tác giả (Năm xuất bản), "Tên tài liệu được trích dẫn", *Tên nguồn*, **tập(số)**, trang/số trang/trang đầu-trang cuối (nếu có), số DOI (nếu có), URL (nếu có), ngày truy cập (ghi rõ ngôn ngữ nào nếu không phải tài liệu bằng tiếng Anh).

Tác giả: là tác giả/các tác giả của tài liệu được tham khảo, trích dẫn: liệt kê đầy đủ tên tác giả (chữ viết tắt đưa lên trước) với những tài liệu tham khảo có ≤3 tác giả; liệt kê 3 tác giả đầu tiên và theo sau là "et al." khi có từ 4 tác giả trở lên.

Năm xuất bản: năm xuất bản của tài liệu được tham khảo, trích dẫn.

Tên tài liệu được trích dẫn: là tên bài báo, chương/phần sách... (chỉ viết hoa chữ cái đầu, trừ tên riêng và sau dấu hai chấm), viết trong ngoặc kép.

Tên nguồn có thể là tên tạp chí, tên sách, hay tên tài liệu gốc của tài liệu được trích dẫn (phần này được *in nghiêng*), viết hoa chữ cái đầu tiên của mỗi từ chính.

Tập(số): dành cho nguồn trích là tạp chí, sách hoặc các xuất bản phẩm khác (phần này **in đậm**).

Trang/số trang/trang đầu-trang cuối phản ánh nơi cư trú của tài liệu được trích dẫn trong tài liệu nguồn.

Nếu có ≥2 tài liệu tham khảo do cùng tác giả đầu tiên và cùng năm công bố, thì các tài liệu tham khảo này cần được đánh dấu a, b... sau năm xuất bản (ví dụ: 1986a, 1986b...).

Nếu có một số tài liệu tham khảo có cùng 1 bài báo được trích dẫn có số trang khác nhau thì cần trích dẫn thêm số trang, ví dụ: A. Amber (1982, p.39).

Chi tiết vui lòng xem thêm tại: https://b.vjst.vn/index.php/ban_b/quy-dinh-bai-viet.

Các yêu cầu khác

- Bài viết không đạt yêu cầu, Toà soạn không trả lại bản thảo.
- Bài viết chỉ được đăng khi phản biện nhận xét về chất lượng bài báo đồng ý cho đăng.
- Bản quyền: tác giả đồng ý trao bản quyền bài viết (bao gồm cả phần tóm tắt) cho Ban Biên tập Tạp chí.

Quy định này áp dụng từ năm 2022 trở đi.

PHÂN LOẠI LĨNH VỰC KHOA HỌC

1. Khoa học tự nhiên

- 1.1. Toán học và thống kê
- 1.2. Khoa học máy tính và thông tin
- 1.3. Vật lý
- 1.4. Hóa học
- 1.5. Khoa học trái đất và môi trường
- 1.6. Khoa học sự sống
- 1.7. Khoa học nano
- 1.8. Khoa học tính toán
- 1.9. Các lĩnh vực khác của khoa học tự nhiên

2. Khoa học kỹ thuật và công nghệ

- 2.1. Kỹ thuật dân dụng; kỹ thuật kiến trúc; kỹ thuật xây dựng; kỹ thuật kết cấu và đô thị; kỹ thuật giao thông vận tải; kỹ thuật thủy lợi; kỹ thuật địa chất công trình
- 2.2. Kỹ thuật điện, kỹ thuật điện tử, kỹ thuật thông tin
- 2.3. Kỹ thuật cơ khí, chế tạo máy
- 2.4. Kỹ thuật hóa học
- 2.5. Kỹ thuật vật liệu và luyện kim
- 2.6. Kỹ thuật y học
- 2.7. Kỹ thuật môi trường
- 2.8. Công nghệ sinh học công nghiệp
- 2.9. Công nghệ nano
- 2.10. Kỹ thuật thực phẩm và đồ uống
- 2.11. Các lĩnh vực khác của khoa học kỹ thuật và công nghệ

3. Khoa học y - dược

- 3.1. Y học cơ sở
- 3.2. Y học lâm sàng
- 3.3. Y học dự phòng
- 3.4. Dược học
- 3.5. Các lĩnh vực khác của khoa học y - dược

4. Khoa học nông nghiệp

- 4.1. Trồng trọt
- 4.2. Chăn nuôi
- 4.3. Thú y
- 4.4. Lâm nghiệp
- 4.5. Thủy sản
- 4.6. Công nghệ sinh học trong nông nghiệp, thủy sản
- 4.7. Các lĩnh vực khác của khoa học nông nghiệp

5. Khoa học xã hội và nhân văn

- 5.1. Tâm lý học
- 5.2. Kinh tế và kinh doanh
- 5.3. Khoa học giáo dục
- 5.4. Xã hội học
- 5.5. Pháp luật
- 5.6. Khoa học chính trị
- 5.7. Địa lý kinh tế và xã hội
- 5.8. Thông tin đại chúng và truyền thông
- 5.9. Lịch sử và khảo cổ học
- 5.10. Ngôn ngữ học và văn học
- 5.11. Triết học, đạo đức và tôn giáo
- 5.12. Nghiên cứu về khu vực và quốc tế
- 5.13. Các lĩnh vực khác của khoa học xã hội và nhân văn

TẠP CHÍ KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

Vietnam Journal of Science and Technology - MOST

Volume 66 - Number 2 - February 2024

Xác định các kiểu gen và phân tích đa hình gen *ompA* của *Chlamydia trachomatis* phân lập từ đường sinh dục của phụ nữ Việt Nam bị vô sinh.

Nguyễn Hòa, Vũ Văn Du, Nguyễn Thị Như Quỳnh, Nguyễn Lê Văn, Đỗ Ngọc Ánh

Biểu hiện và tính chất đoạn rút gọn peptide ngoại bào của enzyme chuyển đổi angiotensin 2 (trhACE2) có khả năng gắn với protein gai của SARS-CoV-2.

Nguyễn Thị Lệ Thủy, Nguyễn Minh Tuấn, Phạm Thị Kim Trâm, Nguyễn Đăng Quân

Đánh giá kết quả kỹ thuật nối tụy - ruột kiểu Blumgart theo Satoi cải biên trong phẫu thuật cắt khối tá tụy tại Bệnh viện Bạch Mai.

Pisey Chantha, Nguyễn Thành Khiêm, Nguyễn Hàm Hội, Nguyễn Ngọc Hùng, Trần Hiếu Học, Lương Tuấn Hiệp, Đỗ Văn Minh, Đỗ Hải Đăng, Nguyễn Thế Duy, Phạm Hồng Quảng

Xây dựng mô hình đánh giá cơn tăng huyết áp trên chuột nhắt.

Nguyễn Xuân Phúc, Đoàn Văn Viên, Trần Mạnh Hùng

Ứng dụng màng collagen từ màng ối người làm giá thể nuôi cấy tế bào bám dính trong kỹ nghệ mô.

Nguyễn Thanh Bình, Nguyễn Thị Thu Hiền, Ngô Thái Minh Quân, Dương Phương Thanh, Trần Thị Thanh Thủy, Nhan Ngọc Hiền, Nguyễn Khánh Hoà, Hoàng KC Hương, Nguyễn Tuấn Kiệt, Nguyễn Minh Cẩn, Huỳnh Duy Thảo

Đánh giá bước đầu ứng dụng gel protein tự thân hỗ trợ ghép da trong điều trị vết thương mất da diện rộng.

Lê Quang Trí, Phan Hữu Hùng, Vũ Thị Thanh Tâm, Trương Gia Huy, Trần Nguyễn Như Hiếu, Hoàng Thị Diệu Thuần, Trần Lê Bảo Hà, Tô Minh Quân, Nguyễn Thị Ngọc Mỹ, Đoàn Nguyễn Vũ

Độ hữu thụ hạt phấn ở một số thời điểm nở hoa trong ngày khác nhau và ảnh hưởng đến khả năng kết hạt của một số giống khổ qua (*Momordica charantia* L.) trồng tại TP Hồ Chí Minh.

Phan Đăng Thái Phương, Nguyễn Thùy Dương, Vũ Văn Ba

Phân tích hệ gen ty thể và mối quan hệ phát sinh chủng loại của gà Móng.

Giang Thị Thanh Nhân, Phạm Thị Phương Mai, Nguyễn Văn Ba, Trần Thị Thu Thủy, Nguyễn Thị Quỳnh Châu, Trần Thị Hậu, Hoàng Thị Áu, Nguyễn Khánh Vân, Lưu Quang Minh, Phạm Doãn Lân

Phát sinh hình thái *in vitro*, hoạt tính enzyme kháng oxy hóa và tích lũy hợp chất thứ cấp của mẫu lông thân cây Diệp hạ châu đắng (*Phyllanthus amarus*) dưới điều kiện Clinostat 2D.

Lê Thế Biên, Hoàng Thanh Tùng, Nguyễn Thị Như Mai, Hoàng Đức Khải, Đỗ Mạnh Cường, Trương Hoài Phong, Vũ Quốc Luận, Bùi Văn Thế Vinh, Dương Tấn Nhựt

Xác định mối quan hệ di truyền của một số dòng Keo lá tràm (*Acacia auriculiformis*) bằng chỉ thị ISSR.

Dương Văn Đoàn, Trần Thị Thu Thảo, Bùi Tri Thức, Nguyễn Mạnh Tuấn, Nguyễn Tiến Dũng

Thành phần và tần suất xuất hiện của nấm rễ nội cộng sinh (Arbuscular mycorrhizal fungi) trong đất vùng rễ và rễ cây rau trồng tại TP Hồ Chí Minh.

Trương Phước Thiên Hoàng, Lê Thị Thảo Như, Lê Hoàng Phúc, Trần Trọng Nghĩa, Đào Uyên Trần Đa

Nghiên cứu nhân nhanh hai giống cúc đồng tiền cổ (*Gerbera jamesonii* Bolus) bằng kỹ thuật nuôi cấy *in vitro*.

Phan Thị Thu Hiền, Nguyễn Thị Kim Anh, Lê Thị Tuyết Châm, Vũ Thị Thúy Hằng

Khả năng đối kháng của các chủng xạ khuẩn đối với nấm *Colletotrichum* sp. gây bệnh thán thư hại sầu riêng.

Lê Minh Tường, Lê Hồng Nhiều, Lê Quốc Việt, Nguyễn Quang Dũng, Nguyễn Văn Tập

1 Genotype identification and genetic diversity of the *ompA* gene among *Chlamydia trachomatis* isolated from infertile Vietnamese women.

Hoa Nguyen, Van Du Vu, Thi Nhu Quynh Nguyen, Le Van Nguyen, Ngoc Anh Do

8 Expression and purification of truncated recombinant human angiotensin-converting enzyme 2 (trhACE2) capable of binding spike protein of SARS-CoV-2.

Thi Le Thuy Nguyen, Minh Tuan Nguyen, Thi Kim Tram Pham, Dang Quan Nguyen

14 Evaluation of the results of the modified Blumgart pancreatic-intestinal anastomosis technique according to Satoi in pancreaticoduodenectomy at Bach Mai Hospital.

Pisey Chantha, Thanh Khiem Nguyen, Ham Hoi Nguyen, Ngoc Hung Nguyen, Hieu Hoc Tran, Tuan Hiep Luong, Van Minh Do, Hai Dang Do, The Duy Nguyen, Hong Quang Pham

20 Building a model to evaluate hypertensive crisis in mice.

Xuan Phuc Nguyen, Van Vien Doan, Manh Hung Tran

26 Application of collagen membrane from amniotic membrane as a substrate for adherent cell culturing in tissue engineering.

Thanh Binh Nguyen, Thi Thu Hien Nguyen, Thai Minh Quan Ngo, Phuong Thanh Duong, Thi Thanh Thuy Tran, Ngoc Hien Nhan, Khanh Hoa Nguyen, KC Huong Hoang, Tuan Kiet Nguyen, Minh Can Nguyen, Duy Thao Huynh

32 Initial evaluation of the application of autologous protein gel in the treatment of extensive skin loss wounds.

Quang Tri Le, Huu Hung Phan, Thi Thanh Tam Vu, Gia Huy Truong, Nguyen Nhu Hieu Tran, Thi Dieu Thuan Hoang, Le Bao Ha Tran, Minh Quan To, Thi Ngoc My Nguyen, Nguyen Vu Doan

39 Pollen fertility at different flowering times and its effect on seed setting of some bitter gourd (*Momordica charantia* L.) varieties in Ho Chi Minh city.

Dang Thai Phuong Phan, Thuy Duong Nguyen, Van Ba Vu

44 Analysis of the mitochondrial genome and phylogenetic relationships of Mong chicken.

Thi Thanh Nhan Giang, Thi Phuong Mai Pham, Van Ba Nguyen, Thi Thu Thuy Tran, Thi Quynh Chau Nguyen, Thi Hau Tran, Thi Au Hoang, Khanh Van Nguyen, Quang Minh Luu, Doan Lan Pham

49 *In vitro* morphogenesis, antioxidant enzyme activity and secondary compound accumulation of stem internode sample of *Phyllanthus amarus* under 2D clinostat condition.

The Bien Le, Thanh Tung Hoang, Thi Nhu Mai Nguyen, Dac Khai Hoang, Manh Cuong Do, Hoai Phong Truong, Quoc Luan Vu, Van The Vinh Bui, Tan Nhut Duong

55 Identification of genetic relationships of *Acacia auriculiformis* clones using ISSR markers.

Van Doan Duong, Thi Thu Thao Tran, Tri Thuc Bui, Manh Tuan Nguyen, Tien Dung Nguyen

60 A survey on the composition and occurrence frequency of Arbuscular mycorrhizal fungi in rhizospheric soils and roots of vegetables grown in Ho Chi Minh city.

Phuoc Thien Hoang Truong, Thi Thao Nhu Le, Hoang Phuc Le, Trong Nghia Tran, Uyen Tran Da Dao

66 *In vitro* rapid multiplication of two ancient gerbera varieties (*Gerbera jamesonii* Bolus).

Thi Thu Hien Phan, Thi Kim Anh Nguyen, Thi Tuyet Cham Le, Thi Thuy Hang Vu

75 Antagonistic potential of actinomycete strains against *Colletotrichum* sp. causes anthracnose disease in durian.

Minh Tuong Le, Hong Nhieu Le, Quoc Viet Le, Quang Dung Nguyen, Van Tap Nguyen