



ISSN 1859-4794

TẠP CHÍ

KHOA HỌC & CÔNG NGHỆ Việt Nam

**Vietnam Journal of
Science and Technology - MOST**

B

Tập 62 - Số 12 - Tháng 12 năm 2020

HỘI ĐỒNG BIÊN TẬP

Nguyễn Văn Hiệu - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam
Nguyễn Việt Anh - Trường Đại học Xây dựng
Bùi Chí Bửu - Viện Khoa học Kỹ thuật Nông nghiệp Miền Nam
Vũ Dũng - Hội Tâm lý học Việt Nam
Trần Thọ Đạt - Trường Đại học Kinh tế Quốc dân
Nguyễn Đình Đức - Trường Đại học Công nghệ - Đại học Quốc gia Hà Nội
Vũ Minh Giang - Đại học Quốc gia Hà Nội
Trương Nam Hải - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam
Từ Quang Hiến - Trường Đại học Nông lâm Thái Nguyên
Phạm Huy Khang - Trường Đại học Giao thông Vận tải
Phạm Gia Khánh - Chủ tịch Hội Ghép tạng Việt Nam
Hồ Đắc Lộc - Trường Đại học Kỹ thuật Công nghệ TP Hồ Chí Minh
Nguyễn Thị Mỹ Lộc - Trường Đại học Giáo dục - Đại học Quốc gia Hà Nội
Bành Tiến Long - Trường Đại học Bách khoa Hà Nội
Lê Quan Nghiệm - Đại học Y Dược TP Hồ Chí Minh
Mai Trọng Nhuận - Đại học Quốc gia Hà Nội
Nguyễn Thanh Phương - Trường Đại học Cần Thơ
Nguyễn Thanh Thủy - Trường Đại học Công nghệ - Đại học Quốc gia Hà Nội
Phạm Hùng Việt - Trường Đại học Khoa học Tự nhiên - Đại học Quốc gia Hà Nội

TỔNG BIÊN TẬP

Đặng Ngọc Bảo

PHÓ TỔNG BIÊN TẬP

Nguyễn Thị Hải Hằng
Nguyễn Thị Hương Giang

TRƯỞNG BAN BIÊN TẬP

Phạm Thị Minh Nguyệt

TRƯỞNG BAN TRỊ SỰ

Lương Ngọc Quang Hưng

TRÌNH BÀY

Đinh Thị Luận

EDITORIAL COUNCIL

Nguyen Van Hieu - Vietnam Academy of Science and Technology
Nguyen Viet Anh - National University of Civil Engineering
Bui Chi Bui - Institute of Agricultural Science for Southern Vietnam
Vu Dung - Vietnam Association of Social Psychology
Tran Tho Dat - National Economics University
Nguyen Dinh Duc - University of Engineering and Technology - Vietnam National University, Hanoi
Vu Minh Giang - Vietnam National University, Hanoi
Truong Nam Hai - Vietnam Academy of Science and Technology
Tu Quang Hien - Thai Nguyen University of Agriculture and Forestry
Pham Huy Khang - University of Transport and Communications
Pham Gia Khanh - President of Vietnam Society of Organ Transplantation
Ho Duc Loc - Ho Chi Minh City University of Technology
Nguyen Thi My Loc - University of Education, Vietnam National University, Hanoi
Banh Tien Long - Hanoi University of Science and Technology
Le Quan Nghiem - University of Medicine and Pharmacy of Ho Chi Minh City
Mai Trong Nhuan - Vietnam National University, Hanoi
Nguyen Thanh Phuong - Can Tho University
Nguyen Thanh Thuy - University of Engineering and Technology - Vietnam National University, Hanoi
Pham Hung Viet - VNU University of Science

EDITOR-IN-CHIEF

Dang Ngoc Bao

DEPUTY EDITORS

Nguyen Thi Hai Hang
Nguyen Thi Huong Giang

HEAD OF EDITORIAL BOARD

Pham Thi Minh Nguyet

HEAD OF ADMINISTRATION

Luong Ngoc Quang Hung

ART DIRECTOR

Dinh Thi Luan

TÒA SOẠN

113 Trần Duy Hưng - Cầu Giấy - Hà Nội
Tel: (84.24) 39436793; Fax: (84.24) 39436794
Email: khcnvn@most.gov.vn
Tạp chí điện tử: b.vjst.vn

EDITORIAL OFFICE

113 Tran Duy Hung Str. - Cau Giay Dist. - Hanoi
Tel: (84.24) 39436793; Fax: (84.24) 39436794
Email: khcnvn@most.gov.vn
E-journal: b.vjst.vn

GIẤY PHÉP XUẤT BẢN

Số 1153/GP-BTTTT ngày 26/7/2011
Số 2528/GP-BTTTT ngày 26/12/2012
Số 592/GP-BTTTT ngày 28/12/2016
Giá: 18000^d

PUBLICATION LICENCE

No.1153/GP-BTTTT 26th July 2011
No.2528/GP-BTTTT 26th December 2012
No.592/GP-BTTTT 28th December 2016

Đánh giá khả năng cảm ứng tăng sinh và bảo vệ da của astaxanthin trước những điều kiện bất lợi *in vitro* và *in vivo*

Tô Minh Quân*, Trần Quang Diệu, Tạ Nguyễn Ái Trinh, Trần Thị Kiều Duyên

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh

Ngày nhận bài 4/5/2020; ngày chuyển phản biện 14/5/2020; ngày nhận phản biện 15/7/2020; ngày chấp nhận đăng 2/8/2020

Tóm tắt:

Astaxanthin (ASX) là một carotenoid có khả năng chống oxy hóa mạnh nhất hiện nay. Nguồn thu nhận ASX thường được sử dụng hiện nay là từ tảo *Haematococcus pluvialis*. Trong nghiên cứu này, các tác giả tiến hành chiết xuất ASX từ tảo *Haematococcus pluvialis* trong dung môi dầu Sacha Inchi. Sau đó, đánh giá khả năng của ASX trong cảm ứng tăng sinh, bảo vệ nguyên bào sợi (NBS) da khỏi tác động H_2O_2 *in vitro* và bảo vệ da khỏi tác động của tia UV *in vivo*. Kết quả cho thấy, ASX được tách tốt trong dầu Sacha Inchi với nồng độ $225,54 \pm 21,56 \mu\text{g/ml}$. ASX nồng độ $1 \mu\text{g/ml}$ không gây độc với NBS, kích thích NBS tăng sinh nhanh với mật độ $(6,05 \pm 0,24) \times 10^4$ tế bào/giếng ($n=3$) (cao gấp 1,44 lần so với đối chứng) và di cư nhanh vào vùng da tổn thương (sau 36 giờ) ($n=3$). ASX $1 \mu\text{g/ml}$ bảo vệ NBS da khỏi tác động oxy hóa của H_2O_2 . So với nhóm đối chứng dương (NBS chỉ tiếp xúc với H_2O_2), các tế bào nhóm thí nghiệm (tiếp xúc ASX $1 \mu\text{g/ml}$ trước, sau đó tiếp xúc H_2O_2) không biểu hiện dấu hiệu bị oxy hóa: diện tích nhân nhỏ ($259,6 \pm 29,1 \mu\text{m}^2$ so với $314,5 \pm 30,5 \mu\text{m}^2$ đối chứng dương), tỷ lệ tế bào pha G0/G1 thấp ($83,1 \pm 6,1\%$ so với $90,6 \pm 5,2\%$) và không biểu hiện β -galactosidase (đối chứng dương có biểu hiện). Đồng thời, ASX $200 \mu\text{g/ml}$ bảo vệ da chuột khỏi tác nhân tia UV khi chiếu ở cường độ cao. Sau 4 tuần chiếu UV liên tục, chuột được thoa ASX mỗi ngày không biểu hiện các dấu hiệu lão hóa như: da nhăn, lớp biểu bì dày, xuất hiện các vùng elastosis. Qua nghiên cứu có thể kết luận: ASX thu nhận trong dầu Sacha Inchi kích thích tăng sinh NBS da tăng sinh và di chuyển; bảo vệ NBS da khỏi tác nhân gây oxy hóa H_2O_2 và bảo vệ da khỏi tác hại gây lão hóa của tia UV.

Từ khóa: astaxanthin, chống oxy hóa, *Haematococcus pluvialis*, lão hóa da, mô hình chuột lão hóa.

Chỉ số phân loại: 3.1

Đặt vấn đề

ASX là chất thuộc nhóm xanthophyll, là một trong những chất chống oxy hóa hàng đầu hiện nay [1, 2]. ASX có cấu trúc phân tử là 3,3'-dihydroxy- β -carotene-4,4'-dione, bao gồm 2 vòng β -ionone ở 2 đầu và chuỗi polyene ở giữa [1, 2]. Cấu trúc đặc biệt này giúp ASX có khả năng chống oxy hóa mạnh và gắn kết vào màng sinh học để bảo vệ tế bào khỏi các gốc oxy hóa. Do đó, ASX được ứng dụng để chống oxy hóa, bệnh tim mạch, ung thư, tiểu đường... [3, 4].

Trong lĩnh vực mỹ phẩm, ASX được sử dụng theo đường uống để giúp trẻ hóa làn da, giúp da chống lại những tác nhân có hại từ môi trường. Da là cơ quan bao phủ bên ngoài cơ thể. Chức năng quan trọng nhất của da là bảo vệ cơ thể khỏi sự tiếp xúc trực tiếp với các tác nhân lý hóa sinh từ môi trường ngoài. Vì vậy, da thường xuyên tiếp xúc với các tác nhân bên ngoài như khói bụi, vi khuẩn... Một trong những tác nhân bên ngoài chính gây tổn hại và lão hóa da là tia UV tồn tại tự nhiên trong ánh sáng mặt trời. Dựa vào

độ dài bước sóng, tia UV được chia thành 3 loại: UVA (320-400 nm), UVB (280-320 nm), và UVC (200-280 nm) [5]. Các tia UV xâm nhập lớp biểu bì và trung bì của da, tạo ra các gốc tự do ROS. Các gốc tự do này phá hủy các phân tử protein chính của da như collagen, elastin và gây lão hóa hoặc chết thành phần tế bào chính của da như NBS, tế bào sừng [5-7]. Do đó, da tiếp xúc với tia UV nhiều sẽ trở nên khô, xuất hiện nhiều vết nứt, sạm màu... Để bảo vệ da khỏi tác hại của tia UV, người ta thường dùng các chất chống oxy hóa như ASX [8, 9]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi hướng tới tạo ra sản phẩm ASX dạng thoa để tăng cường hiệu quả của ASX trong lĩnh vực mỹ phẩm.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Quy trình tách ASX

Tảo *Haematococcus pluvialis* chứa ASX được đông khô và bảo quản trong tủ -20°C cho tới khi sử dụng. Tảo đông khô được rã đông, nghiền bằng chày và tách chiết trong dung môi dầu Saccha Inchi theo quy trình sau: dầu được đông vào cốc và nung ở 80°C trong 5 phút trước khi bắt đầu.

*Tác giả liên hệ: Email: tomquan@hcmus.edu.vn

Determining the ability of astaxanthin to induce proliferation and skin protection from harmful environmental factors *in vitro* and *in vivo*

Minh Quan To*, Quang Dieu Tran, Nguyen Ai Trinh Ta, Thi Kieu Duyen Tran

University of Science, Vietnam National University, Ho Chi Minh city

Received 4 May 2020; accepted 2 August 2020

Abstract:

Astaxanthin (ASX) is a carotenoid having the strongest antioxidant capacity. *Haematococcus pluvialis* is the most commonly used source of ASX today. In this study, the authors obtained ASX from *H. pluvialis* by using Sacha Inchi oil. Then, the ability of ASX on stimulating proliferation of skin cells, protecting skin fibroblasts from H_2O_2 *in vitro*, and protecting mice skin from UV irradiation *in vivo* was tested. The results showed that ASX could be extracted in Sacha Inchi oil with a concentration of 225.54 ± 21.56 $\mu\text{g/ml}$. ASX with a concentration of 1 $\mu\text{g/ml}$ was non-toxic to the fibroblasts, induced proliferation with a concentration of $(6.05 \pm 0.24) \times 10^4$ $\mu\text{g/ml}$ ($n=3$) (1.44 times higher than that of the control), and quick migrated to the affected areas (after 36 hours). ASX 1 $\mu\text{g/ml}$ protected the fibroblasts from the oxidative stress of H_2O_2 . Comparing to the positive control (fibroblasts exposed to H_2O_2 only), the experimental group cells (induced by ASX 1 $\mu\text{g/ml}$ first, then exposed to H_2O_2) did not express signs of oxidative stress: small nuclear size (259.6 ± 29.1 μm^2 vs 314.5 ± 30.5 μm^2), low G0/G1 ratio ($83.1 \pm 6.1\%$ vs $90.6 \pm 5.2\%$) and didn't express β -galactosidase. Furthermore, ASX 200 $\mu\text{g/ml}$ protected mice skin from UV irradiation. After 4 weeks of continuous UV irradiation, mice skin applied with ASX every day did not express any aging signs such as wrinkles, thick epidermis, and solar elastosis. In conclusion, ASX extracted in Sacha Inchi oil stimulated proliferation and migration of fibroblast cells, and protected skin from oxidative radical H_2O_2 *in vitro* and UV irradiation *in vivo*.

Keywords: aging mouse model, antioxidants, astaxanthin, *H. pluvialis*, skin aging.

Classification number: 3.1

Sau 5 phút, tảo đã nghiền được cho vào cốc với nồng độ 10 mg sinh khối/ml, tiếp tục nung và khuấy dung dịch trong 60 phút. Dịch sau đó được ly tâm 3000 v/ph trong 10 phút để thu dịch nổi, lặp lại quy trình cho đến khi dịch không có màu đỏ. Nồng độ ASX được đánh giá bằng phương pháp HPLC (thí nghiệm được lặp lại 5 lần).

Thí nghiệm đánh giá tăng sinh tế bào *in vitro*

Tế bào 3T3 được cấy lên đĩa 96 giếng với mật độ 5×10^3 tế bào/giếng. Sau 24 giờ, hút bỏ môi trường cũ, thêm môi trường mới chứa ASX với các nồng độ lần lượt là 0 (nhóm đối chứng), 0,1; 0,5; 1 $\mu\text{g/ml}$ (mỗi thí nghiệm tiến hành với 5 giếng). Thời gian thí nghiệm là 6 ngày. Tại mỗi mốc thời gian 2, 4, 6 ngày sau nuôi cấy, tiến hành thu nhận tế bào mỗi thí nghiệm (5 giếng/thí nghiệm) bằng Trypsin/EDTA và định lượng số lượng tế bào sống.

Thí nghiệm khảo sát sự kích thích lành vết thương *in vitro*

Tế bào 3T3 được cấy lên đĩa 24 giếng với mật độ 5×10^4 tế bào/giếng và ủ trong 24 giờ với môi trường. Sau 24 giờ, sử dụng dụng cụ để tạo vết rạch độ rộng 1 mm giữa đĩa tế bào. Sau đó, bổ sung môi trường nuôi có chứa ASX ở các nồng độ lần lượt là 0 (đối chứng); 0,1; 0,5; 1 $\mu\text{g/ml}$ (mỗi nhóm được tiến hành với 6 giếng). Quan sát sự di cư tế bào vào vết rạch trong 18 giờ. Đĩa tế bào được mang đi ủ, kiểm tra và chụp hình mỗi 6 giờ dưới kính hiển vi.

Thí nghiệm đánh giá khả năng bảo vệ tế bào của ASX khỏi tác nhân gây oxy hóa *in vitro*

Tế bào 3T3 được cấy lên đĩa 96 giếng với mật độ 5×10^3 /giếng. Sau 1 ngày, thay môi trường cũ bằng môi trường mới bổ sung ASX các nồng độ lần lượt là 0 (nhóm đối chứng), 1 $\mu\text{g/ml}$ (nhóm thí nghiệm) (mỗi nhóm tiến hành với 3 giếng). Sau 24 giờ, các giếng tế bào được xử lý với môi trường DMEM F12 5% FBS chứa H_2O_2 ở nồng độ 200 μM trong 2 giờ. Sau 1 ngày, tế bào được đánh giá bằng phương pháp nhuộm β -galactosidase và đánh giá diện tích tế bào bằng phương pháp nhuộm Hoechst, đánh giá bằng máy Cytell Cell.

Đánh giá khả năng ngăn ngừa lão hóa da của ASX trên mô hình chuột lão hóa

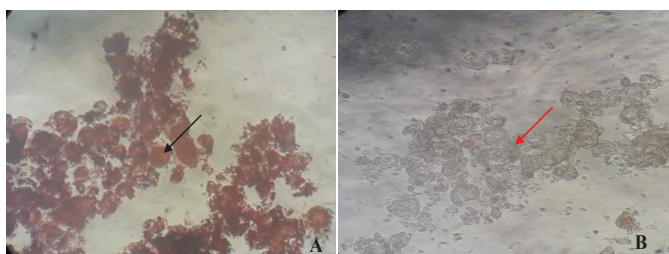
Chuột thí nghiệm *Mus musculus* var *Albino* gây lão hóa da bằng cách chiếu tia $\text{UVA}=360$ mJ/cm^2 , $\text{UVB}=60$ mJ/cm^2 mỗi ngày 60 phút và tiến hành liên tục trong 28 ngày (nhóm đối chứng dương, tiến hành với 3 con chuột). Đối với nhóm thí nghiệm (nhóm chuột vừa sử dụng ASX vừa chiếu UV để gây lão hóa), chuột vẫn được chiếu như trên nhưng được thoa ASX nồng độ 20 $\mu\text{g/ml}$ mỗi ngày trước khi chiếu 15 giờ (3 con). Chuột bình thường được sử dụng làm đối chứng

âm. Lão hóa da được đánh giá dựa trên hình thái bên ngoài (đánh giá theo tiêu chuẩn 6 điểm của Rumjhum Agrawal năm 2010 [10]) và cấu trúc bên trong da thông qua phương pháp nhuộm HE sau 4 tuần.

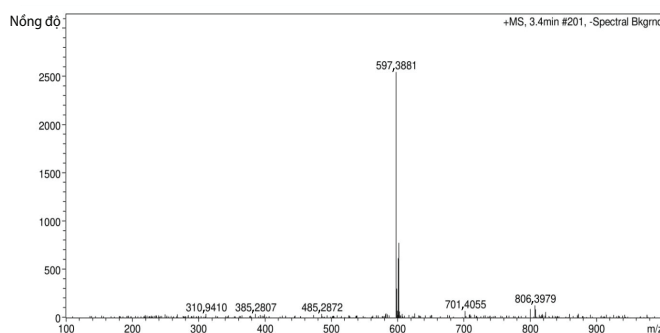
Kết quả nghiên cứu

Kết quả tách chiết ASX trong dung môi dầu thực vật

Kết quả tách chiết ASX được thể hiện trong hình 1 và 2. Sau khi cho tảo *H. pluvialis* vào dầu Saccha Inchi, dung dịch trở nên đỏ thẫm, xác tảo mất dần màu đỏ và trở thành không màu (hình 1). Kết quả phân tích HPLC cho thấy, nồng độ ASX trong dầu Saccha Inchi là $225,54 \pm 21,56$ $\mu\text{g/ml}$ ($n=5$). Như vậy, ASX được tách chiết tốt trong dầu Saccha Inchi (nồng độ gần tương đương với tách chiết ASX trong acetone là $237,25 \pm 16,46$ $\mu\text{g/ml}$).



Hình 1. Tảo *Haematococcus pluvialis* trước (A) và sau khi tách bằng dầu Saccha Inchi (B) (x200).



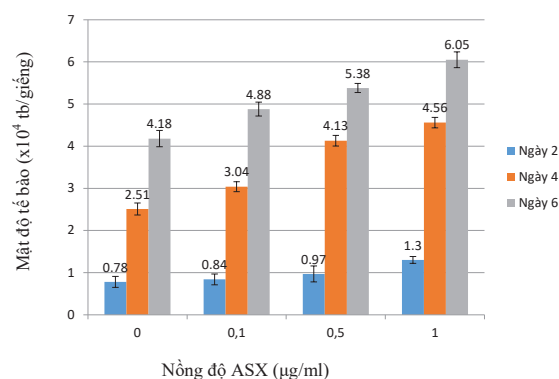
Hình 2. Kết quả đánh giá nồng độ ASX bằng HPLC.

Thí nghiệm đánh giá sự kích thích tăng sinh in vitro

Tế bào 3T3 được cấy lên các giếng với mật độ $0,5 \times 10^4$ tế bào/giếng, nuôi trong môi trường bổ sung ASX ở các nồng độ 0 (nhóm đối chứng); 0,1; 0,5 và 1 $\mu\text{g/ml}$ (mỗi nhóm 9 giếng). Kết quả cho thấy, ở tất cả các thí nghiệm, tế bào 3T3 đều tăng sinh trong 6 ngày (bảng 1, hình 3). Trong môi trường có chứa ASX, tế bào tăng trưởng nhanh hơn so với môi trường không có ASX; ở nồng độ ASX 1 $\mu\text{g/ml}$, tế bào tăng trưởng tốt nhất: tại ngày 6, mật độ tế bào (MĐTB) cao gấp 1,44 lần nhóm đối chứng và thời gian nhân đôi thấp hơn. Điều này chứng tỏ ASX nồng độ 0,1-1 $\mu\text{g/ml}$ không những không gây độc mà còn kích thích sự tăng sinh tế bào.

Bảng 1. Kết quả đánh giá sự tăng sinh tế bào trong môi trường chứa ASX.

Nồng độ ASX	0 $\mu\text{g/ml}$ (ĐC)	0,1 $\mu\text{g/ml}$	0,5 $\mu\text{g/ml}$	1 $\mu\text{g/ml}$
MĐTB ban đầu ($\times 10^4$ tb/giếng)	5000	5000	5000	5000
MĐTB ngày 6 ($\times 10^4$ tb/giếng)	$4,18 \pm 0,13$	$4,88 \pm 0,18$	$5,38 \pm 0,21$	$6,05 \pm 0,24$
Thời gian nhân đôi (giờ)	$47 \pm 1,46$	$43,8 \pm 1,61$	$42 \pm 1,63$	$40,2 \pm 1,59$
Số lần lặp lại (n)	5	5	5	5



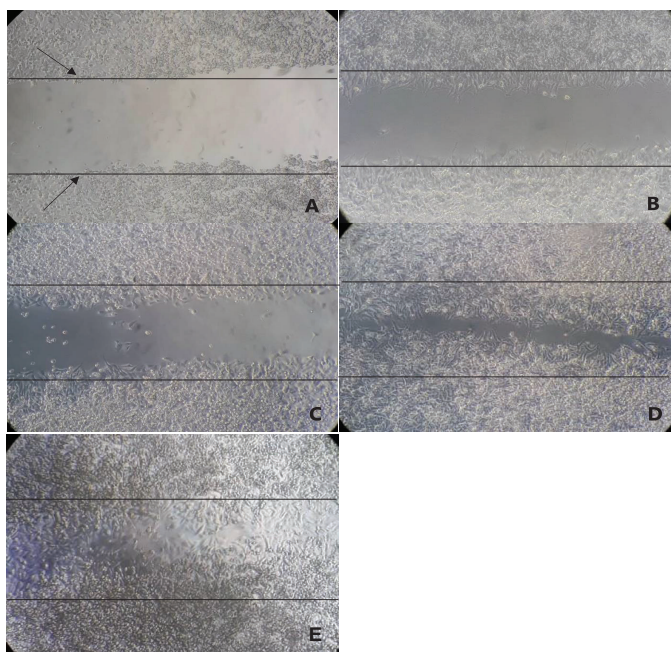
Hình 3. Đồ thị biểu diễn sự tăng sinh tế bào sau 6 ngày nuôi cấy.

Thí nghiệm khảo sát sự kích thích lành vết thương in vitro

Thí nghiệm này quan sát sự di cư của tế bào trong môi trường chứa ASX nồng độ 0,1; 0,5; 1 và 0 $\mu\text{g/ml}$ (nhóm đối chứng) ($n=6$) vào vùng không có tế bào trong 36 giờ (bảng 2). Sau 36 giờ, hiện tượng tế bào di cư vào vết rách xuất hiện rõ ràng trong nhóm thí nghiệm bổ sung ASX 0,5 và 1 $\mu\text{g/ml}$. Tuy nhiên, tế bào của nhóm ASX 1 $\mu\text{g/ml}$ cho kết quả di cư tốt nhất: tế bào bắt đầu di cư vào vết rách sau 6 giờ và lấp đầy hoàn toàn sau 36 giờ (hình 4).

Bảng 2. Kết quả đánh giá sự di cư tế bào trong môi trường chứa ASX.

Nồng độ ASX	0 $\mu\text{g/ml}$ (ĐC)	0,1 $\mu\text{g/ml}$	0,5 $\mu\text{g/ml}$	1 $\mu\text{g/ml}$
Khoảng cách 2 mép tế bào (mm)	1	1	1	1
Di cư trung bình sau 36 giờ (mm) (tính từ mép tế bào ban đầu)	$0,13 \pm 0,02$	$0,12 \pm 0,04$	$0,77 \pm 0,12$	Lấp kín hoàn toàn
Số lần lặp lại (n)	6	6	6	6



Hình 4. Sự di cư tế bào giữa hai mép của vết rạch. (A) Trước khi bổ sung ASX, **(B)** Mẫu đối chứng (ASX 0), **(C)** Bổ sung ASX 0,1 µg/ml, **(D)** Bổ sung ASX 0,5 µg/ml, **(E)** Bổ sung ASX 1 µg/ml. Lằn tế bào ban đầu (mũi tên đen) (x200).

Thí nghiệm đánh giá khả năng bảo vệ tế bào của ASX khỏi tác nhân gây oxy hóa in vitro

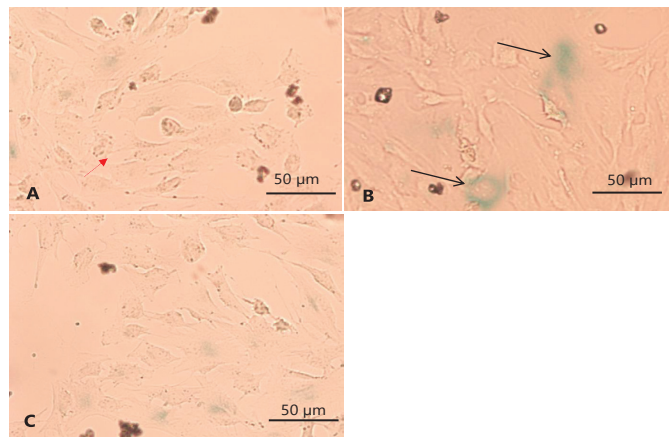
Thí nghiệm được chia làm 3 nhóm: nhóm đối chứng âm (ĐC âm - tế bào nuôi trong môi trường bình thường), nhóm đối chứng dương (ĐC dương - tế bào nuôi trong môi trường chứa 200 µM H_2O_2), nhóm thí nghiệm (nhóm đã ủ trước với ASX 1 µg/ml và sau đó nuôi trong môi trường 200 µM H_2O_2) (mỗi nhóm 6 giếng). Các chỉ tiêu đánh giá tỷ lệ G0/G1, diện tích nhân và sự biểu hiện β -galactosidase. Kết quả thí nghiệm được thể hiện tóm tắt trong bảng 3 và hình 5.

So với nhóm đối chứng âm, nhóm đối chứng dương có sự gia tăng tỷ lệ tế bào pha G0/G1 (độ tin cậy 95%), gia tăng diện tích nhân trung bình (độ tin cậy 95%) và biểu hiện β -galactosidase. Điều này chứng tỏ, xử lý với H_2O_2 (200 µM trong 2 giờ) đã tác động lên tế bào 3T3, làm tế bào xuất hiện những dấu hiệu lão hóa tế bào. Do đó, trong những nghiên cứu sau, quy trình xử lý H_2O_2 nồng độ 200 µM trong 2 giờ được sử dụng để tạo mô hình gây stress tế bào.

Bảng 3. Kết quả đánh giá khả năng bảo vệ tế bào khỏi gốc oxy hóa của ASX.

Mẫu tế bào	Tỷ lệ pha G0/G1 (%)	Diện tích nhân trung bình (µm ²)	Biểu hiện β -galactosidase
ĐC âm (n=6)	79,5±3,5	223,0±31,5	Không
ĐC dương (n=6)	90,6±5,2	314,5±30,5	Có
Thí nghiệm (n=6)	83,1±6,1	259,6±29,1	Không

Để chứng minh hiệu quả bảo vệ tế bào của ASX, tế bào được nuôi trong môi trường có ASX 1 µg/ml trước trong 24 giờ, sau đó loại bỏ môi trường và bổ sung môi trường có chứa H_2O_2 nồng độ 200 µM trong 2 giờ. Kết quả cho thấy, tế bào trong nhóm thí nghiệm có tỷ lệ G0/G1 và diện tích nhân nhỏ hơn đối chứng dương và không biểu hiện β -galactosidase. Điều đó chứng tỏ tác động của H_2O_2 lên tế bào đã bị hạn chế bởi ASX được hấp thụ từ môi trường nuôi cấy trước đó.



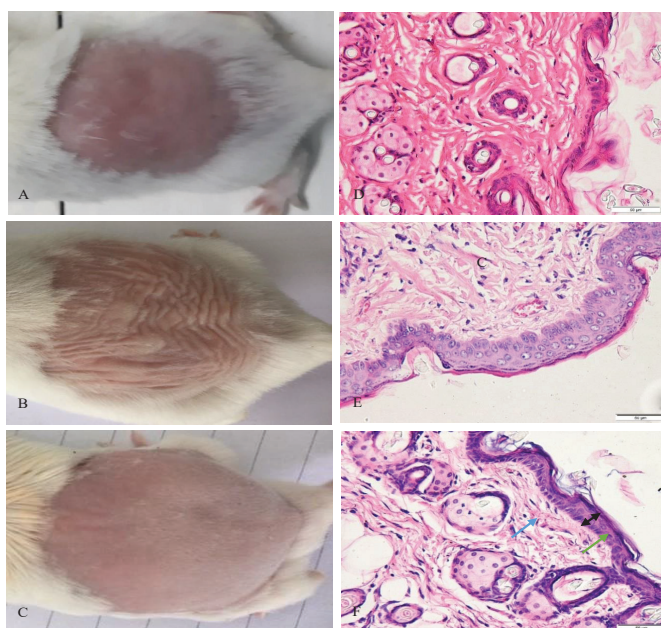
Hình 5. Tế bào nhuộm với thuốc nhuộm X-gal. (A) Đối chứng âm, **(B)** Đối chứng dương, **(C)** Nhóm thí nghiệm. Mũi tên đỏ: tế bào, mũi tên đen: vùng dương tính với β -galactosidase.

Kết quả đánh giá khả năng chống lão hóa da chuột

Thí nghiệm được chia thành 3 nhóm: đối chứng âm (chuột bình thường), đối chứng dương (chuột chiếu UV gây lão hóa da), chuột thí nghiệm (chuột thoa ASX trước 15 giờ, sau đó chiếu UV gây lão hóa da). Sau 4 tuần, tiến hành đánh giá hình dạng bên ngoài (đánh giá theo tiêu chuẩn 6 điểm của Rumjhum Agrawal năm 2010) và cấu trúc mô bên trong của da bằng phương pháp nhuộm mô học HE (hình 6 và bảng 4).

Đối với nhóm đối chứng âm, da chuột tương đối đồng nhất. Quan sát bên ngoài cho thấy da mịn, không có nốt sần, nốt sạm (hình 6A). Kết quả mô học (hình 6D) cho thấy lớp biểu bì mỏng, chứa 1-3 lớp tế bào, dày 14,22±2,28 µm, các tế bào xếp khít với nhau, nhân nhỏ. Lớp trung bì dày, sợi protein bắt màu tốt với thuốc nhuộm, không có hiện tượng sợi protein kết tụ.

Đối với nhóm đối chứng dương, sau 4 tuần chiếu UV liên tục, quan sát bên ngoài cho thấy tất cả chuột đều có hiện tượng da trở nên nhăn nheo, xuất hiện nhiều vết sần và nhiều đốm đậm màu (hình 6B). Kết quả nhuộm mô học (hình 6D) cho thấy lớp biểu bì trở nên dày hơn, chứa 5-7 lớp tế bào, dày 45,89±6,43 µm, các tế bào phân bố không theo quy tắc, nhân tế bào phình to, xuất hiện những tế bào nhân phân mảnh. Vùng trung bì, các sợi protein liên kết trở nên thưa hơn, ít bắt màu với thuốc nhuộm và xuất hiện sợi protein kết tụ thành sợi lớn.



Hình 6. Kết quả đánh giá hiệu quả chống tia UV của ASX. (A, B, C) Quan sát bằng mắt thường, (D, E, F) Nhuộm HE (x400), (A, D) Chuột đối chứng, (B, E) Chuột lão hóa do chiếu UV 28 ngày, (C, F) Chuột thoa ASX và chiếu UV 28 ngày.

Đối với nhóm thí nghiệm, quan sát bên ngoài cho thấy da chuột vẫn mịn, không có dấu hiệu trở nên nhăn nheo, không có nốt sần và nốt sạm màu (hình 6C). Cấu trúc mô học (hình 6F) cho thấy lớp biểu bì mỏng (1-4 lớp tế bào), dày $23,36 \pm 4,03 \mu\text{m}$, các tế bào xếp khít với nhau, nhân nhỏ tương tự như nhóm đối chứng âm. Vùng trung bì dày, các sợi protein đặc tương tự như đối chứng âm.

Từ những kết quả trên cho thấy, ASX đã bảo vệ da khỏi các tác động gây lão hóa của UV trong thời gian 4 tuần.

Bảng 4. Kết quả đánh giá hiệu quả ASX đối với chuột lão hóa do tia UV theo tiêu chuẩn Rumjhum Agrawal năm 2010.

	Nhóm ĐC âm	Nhóm ĐC dương	Nhóm thí nghiệm
Kết quả	Mức 0: 4 con	Mức 4: 2 con Mức 5: 2 con	Mức 1: 3 con Mức 2: 1 con

ĐC: đối chứng.

Bàn luận

ASX là một trong các chất chống oxy hóa hiệu quả nhất hiện nay. Với cấu trúc 2 đầu phân cực và vùng lõi không phân cực, ASX dễ dàng cố định vào màng của tế bào hoặc các bào quan trong tế bào, do đó ASX bảo vệ tế bào khỏi tác dụng của các gốc oxy hóa tạo ra từ bên trong và do môi trường bên ngoài. Hiện nay, ASX được sử dụng nhiều ở dạng thực phẩm, những nghiên cứu sử dụng ASX trong lĩnh vực mỹ phẩm dạng thoa vẫn chưa được chú trọng [11, 12].

Trong nghiên cứu này, ASX được tách chiết trong dung môi dầu thực vật để hướng tới ứng dụng làm mỹ phẩm dạng thoa. Dầu cây Sacha Inchi chứa nhiều vitamin E ($8,99 \pm 0,16 \text{ mg}/100 \text{ g}$) và tỷ lệ cân bằng giữa α -linolenic (50,8%) và linoleic (33,4%)

acids nên thích hợp làm nền dưỡng ẩm [13, 14]. Với mục đích hướng tới dạng thoa nên các chỉ tiêu sinh học quan trọng cần xác định là tác động của ASX lên tế bào da (đặc biệt là NBS), khả năng bảo vệ tế bào khỏi các tác nhân gây tổn thương như gốc oxy hóa (*in vitro*) và tia UV (*in vivo*). NBS là thành phần tế bào chính của lớp trung bì da. Trong lớp trung bì da, NBS tăng sinh và tổng hợp protein như collagen, elastin... để duy trì chức năng và tính chất cơ học của da. Khi có sự tổn thương trên da, NBS từ khu vực xung quanh di chuyển vào bên trong, tăng sinh và tổng hợp da mới [15]. Do đó, NBS luôn là đối tượng được sử dụng để khảo sát hoạt tính của hoạt chất. Phương pháp đánh giá tác động của ASX dựa theo tiêu chuẩn ISO 10993. NBS được cấy lên các giếng ban đầu với mật độ tương đương nhau và nuôi trong môi trường chứa ASX với nồng độ khác nhau, đối chứng là tế bào trong môi trường nuôi ban đầu. Nếu ASX gây độc cho da thì sẽ làm lượng tế bào giảm dần theo thời gian. Kết quả cho thấy, sự gia tăng nồng độ ASX đã làm rút ngắn thời gian nhân đôi tế bào và gia tăng mật độ tế bào tối đa. Điều này chứng tỏ ASX không gây độc mà còn kích thích tế bào tăng sinh. Ngoài ra, khả năng kích thích di cư tế bào của ASX cũng được khảo sát theo phương pháp wound closure assay [16]. Khi tạo vết rách trên vùng tế bào mật độ dày, tế bào có xu hướng di chuyển vào vết rách. Khi áp dụng trên đĩa nuôi NBS với các nồng độ ASX khác nhau, kết quả cho thấy sau 36 giờ, tế bào nuôi trong môi trường ASX 0,5 và 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ có sự di cư rõ rệt vào vùng tổn thương, trong khi tế bào trong đĩa đối chứng và đĩa nồng độ 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ không thấy rõ ràng sự di cư tế bào. Điều này chứng tỏ ASX hỗ trợ tốt cho sự di cư tế bào với nồng độ cao hơn 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Tổng hợp kết quả 2 thí nghiệm trên cho thấy, ASX không gây độc với NBS, đồng thời kích thích tế bào tăng sinh và di cư.

Đối với các tác nhân bên ngoài tác động lên da thì tia UV trong ánh sáng mặt trời đóng vai trò quan trọng. Khi tiếp xúc với da, tia UV tạo ra các gốc tự do ROS, phá hủy protein trong da như collagen, elastin... và phá hủy tế bào tổng hợp protein như NBS [17]. Do đó, tế bào NBS trở nên kém tăng sinh, giảm chức năng, lượng protein trong da giảm dần về số lượng và chất lượng, dẫn tới da xuất hiện nhiều dấu hiệu lão hóa như: trở nên mỏng hơn, ít đàn hồi, nhiều vết nhăn... Hoạt chất chống oxy hóa đóng vai trò quan trọng ngăn cản sự lão hóa da do tác nhân bên ngoài. Ngoài khả năng chống oxy hóa tốt, ASX còn có khả năng bám dính vào màng tế bào, nhân, ty thể... [18]. Trong nghiên cứu này, tác nhân gây stress tế bào được sử dụng *in vitro* là H_2O_2 , *in vivo* là tia UV. H_2O_2 là một trong những gốc oxy hóa do tia UV tạo ra trong da. Ngoài ra, H_2O_2 là tác nhân gây oxy hóa mạnh thường được sử dụng trong các nghiên cứu chống lão hóa trên da. H_2O_2 tác động lên tế bào làm cho tế bào xuất hiện dấu hiệu lão hóa, như diện tích nhân to hơn, tỷ lệ quần thể tế bào pha G0/G1 tăng lên và đặc biệt là tế bào biểu hiện β -galactosidase (một marker phổ biến được sử dụng để đánh giá sự lão hóa tế bào) [19, 20]. Do đó, ASX được thử nghiệm bảo vệ tế bào trước tác dụng của H_2O_2 . Đầu tiên, ASX được bổ sung vào môi trường nuôi tế bào, sau 24 giờ, loại bỏ hoàn toàn môi trường nuôi, rửa lại bằng dung dịch đệm PBS nhiều lần, sau đó bổ sung môi trường nuôi mới có chứa H_2O_2 . Việc rửa tế bào nhiều lần (trước

khi bổ sung môi trường chứa H_2O_2) để loại bỏ hoàn toàn ASX còn tồn đọng trong môi trường nuôi trước đó. Điều này chứng tỏ, kết quả chống oxy hóa là do ASX đã hấp thu vào tế bào. Nếu không tiếp xúc trước với ASX thì khi tiếp xúc với H_2O_2 , diện tích nhân tế bào tăng lên, tỷ lệ tế bào nằm ở pha G0/G1 tăng lên và tế bào biểu hiện marker lão hóa β -galactosidase. Khi đã tiếp xúc với ASX, tác động của H_2O_2 lên tế bào giảm đi so với nhóm đối chứng dương, diện tích nhân giảm xuống, tỷ lệ tế bào pha G0/G1 tăng lên và tế bào không biểu hiện β -galactosidase. Kết quả thí nghiệm này cho thấy, ASX hấp thu vào tế bào đã hạn chế được tác động bất lợi của H_2O_2 lên NBS *in vitro*.

Thử nghiệm khả năng của ASX trong việc bảo vệ da khỏi tác động của tia UV được tiến hành trên mô hình chuột. Chuột Mus musculus được cạo lông và chiếu UV để gây lão hóa da. Khi bị chiếu tia UV, da chuột xuất hiện những dấu hiệu lão hóa: lớp trung bì da trở nên mỏng đi, da trở nên mất sự đàn hồi, xuất hiện hiện tượng elastosis; lớp biểu bì da dày hơn, xuất hiện nhiều nốt sạm da, vết sần trên bề mặt. Ngoài ra, xuất hiện vết nhăn trên bề mặt chính là dấu hiệu rõ ràng của sự lão hóa, quá trình lão hóa càng lâu thì vết nhăn càng lớn. Do đó, trong nghiên cứu, sự lão hóa da được quan sát theo 2 chỉ tiêu: hình dạng ngoài và cấu trúc mô học [21, 22]. Với hình dạng ngoài, da được đánh giá theo thang điểm 6 dựa theo sự xuất hiện nếp nhăn, số 0 tương ứng với da bình thường, số 6 tương ứng với ung thư da [10]. Với cấu trúc mô học, da được nhuộm bằng phương pháp nhuộm HE. Thí nghiệm được thiết kế nhằm đánh giá khả năng bảo vệ da khỏi tia UV theo mô hình dưỡng da ban đêm, do đó da chuột được thoa ASX trước khi chiếu UV 8 giờ, tiến hành liên tục trong 4 tuần. Kết quả thí nghiệm cho thấy, da chuột ban đầu mềm, mịn, không có lớp sần, vết sạm và vết nhăn da, về cấu trúc mô học thì có lớp biểu bì mỏng với 1-3 lớp tế bào, các tế bào xếp khít nhau, lớp trung bì liên kết chặt chẽ, không có hiện tượng elastosis, đánh giá mức độ 0. Sau khi chiếu UV trong 4 tuần, chuột xuất hiện nếp nhăn da ở mức độ 3-4 theo thang (xuất hiện vết nhăn da trung bình và nặng), xuất hiện lớp sần ở một vài vị trí da và xuất hiện vết sạm da nhỏ. Về cấu trúc mô học, lớp biểu bì trở nên dày hơn, tăng số lớp biểu bì, tế bào có biểu hiện phình to nhân như trong thử nghiệm *in vitro*, xuất hiện hiện tượng elastosis ở tất cả mẫu thí nghiệm. Điều này chứng tỏ, da chuột bị ảnh hưởng gây lão hóa do tia UV. Đối với nhóm bôi ASX, kết quả quan sát bên ngoài cho thấy da vẫn mềm, mịn, đàn hồi, xuất hiện một ít vết nhăn nông, khó thấy khi quan sát, đánh giá mức điểm 1-2, cấu trúc mô học gần như tương đương với mẫu da bình thường của chuột: biểu bì mỏng, ít lớp tế bào, lớp trung bì không có hiện tượng elastosis trong tất cả các mẫu thí nghiệm. Kết quả này cho thấy, ASX hạn chế tác động có hại da của tia UV đối với da chuột khi tiến hành thoa ASX trước 8 giờ. Như vậy, hướng sử dụng ASX làm sản phẩm dưỡng da ban đêm hoàn toàn có tính khả thi.

Kết luận

Thí nghiệm được tiến hành với mục đích đánh giá hiệu quả của ASX trong mỹ phẩm dưỡng da. Kết quả cho thấy, ASX không gây độc cho tế bào, kích thích NBS tăng sinh, bảo vệ tế bào khỏi gốc oxy hóa H_2O_2 *in vitro* và bảo vệ da khỏi tia UV *in vivo*.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được tài trợ bởi Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh trong khuôn khổ đề tài mã số C2018-18-20. Chúng tôi xin trân trọng cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] R.R. Ambati, et al. (2014), "ASX: sources, extraction, stability, biological activities and its commercial applications - a review", *Mar. Drugs*, **12**(1), pp.128-152.
- [2] M.M. Shah, et al. (2016), "ASX-producing green microalga *haematococcus pluvialis*: from single cell to high value commercial products", *Front. Plant. Sci.*, **7**, DOI: 10.3389/fpls.2016.00531.
- [3] J. Li, et al. (2015), "ASX inhibits proliferation and induces apoptosis of human hepatocellular carcinoma cells via Inhibition of Nf-Kappab P65 and Wnt/beta-catenin *in vitro*", *Mar. Drugs*, **13**(10), pp.6064-6081.
- [4] J.Y. Wang, et al. (2015), "ASX protects steroidogenesis from hydrogen peroxide-induced oxidative stress in mouse Leydig cells", *Mar. Drugs*, **13**(3), pp.1375-1388.
- [5] M. Kim and H.J. Park (2016), "Molecular mechanisms of skin aging and rejuvenation", *Molecular Mechanisms of the Aging Process and Rejuvenation*, DOI: 10.5772/62983.
- [6] S. Bosset, et al. (2003), "Photoageing shows histological features of chronic skin inflammation without clinical and molecular abnormalities", *Br. J. Dermatol.*, **149**(4), pp.826-835.
- [7] J.H. Rabe, et al. (2006), "Photoaging: mechanisms and repair", *J. Am. Acad. Dermatol.*, **55**(1), pp.1-19.
- [8] T. Komatsu, et al. (2017), "Preventive effect of dietary ASX on UVA-induced skin photoaging in hairless mice", *PLOS ONE*, **12**(2), DOI: 10.1371/journal.pone.0171178.
- [9] J. Meephansan, et al. (2017), "Effect of ASX on cutaneous wound healing", *Clin. Cosmet. Investig. Dermatol.*, **10**, pp.259-265.
- [10] R. Agrawal, I.P. Kaur (2010), "Inhibitory effect of encapsulated curcumin on ultraviolet-induced photoaging in mice", *Rejuvenation Research*, **13**, pp.397-410.
- [11] S. Davinelli, M. Nielsen, G. Scapagnini (2018), "ASX in skin health, repair, and disease: a comprehensive review", *Nutrients*, **10**(4), DOI: 10.3390/nu10040522.
- [12] I. Higuera-Ciupara, L. Félix-Valenzuela, F.M. Goycoolea (2006), "ASX: a review of its chemistry and applications", *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **46**(2), pp.185-196.
- [13] L.F. Gutiérrez, L.M. Rosada, Á. Jiménez (2011), "Chemical composition of Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* L.) seeds and characteristics of their lipid fraction", *Grasas y Aceites*, **62**(1), DOI: 10.3989/gya044510.
- [14] A. Souza, et al. (2013), "Sacha inchi as potential source of essential fatty acids and tocopherols: multivariate study of nut and shell", *Acta Scientiarum - Technology*, **35**, pp.757-763.
- [15] H.E. desJardins-Park, D.S. Foster, M.T. Longaker (2018), "Fibroblasts and wound healing: an update", *Regenerative Medicine*, **13**(5), pp.491-495.
- [16] J.E.N. Jonkman, et al. (2014), "An introduction to the wound healing assay using live-cell microscopy", *Cell Adhesion & Migration*, **8**(5), pp.440-451.
- [17] M. Kulka (2013), *Mechanisms and Treatment of Photoaging and Photodamage*, DOI: 10.5772/56425.
- [18] R. Bosch, et al. (2015), "Mechanisms of photoaging and cutaneous photocarcinogenesis, and photoprotective strategies with phytochemicals", *Antioxidants (Basel)*, **4**(2), pp.248-268.
- [19] T. Kiyoshima, et al. (2012), "Oxidative stress caused by a low concentration of hydrogen peroxide induces senescence-like changes in mouse gingival fibroblasts", *Int. J. Mol. Med.*, **30**(5), pp.1007-1012.
- [20] J.J.P. Gille, H. Joenje (1992), "Cell culture models for oxidative stress: superoxide and hydrogen peroxide versus normobaric hyperoxia", *Mutation Research/ DNAging*, **275**(3), pp.405-414.
- [21] L.H. Kligman (1996), "The hairless mouse model for photoaging", *Clinics in Dermatology*, **14**(2), pp.183-195.
- [22] Y. Fan, et al. (2015), "An experimental model design for photoaging", *Journal of Craniofacial Surgery*, **26**(6), pp.e467-e471.

Đánh giá tính hướng đích của phức hệ nano curcumin gắn axit folic tới tế bào biểu hiện thụ thể folate

Trần Thị Ngọc Huyền¹, Bùi Thị Thu Hà¹, Đỗ Đức Quang¹, Lê Thị Thu Hường², Phạm Thị Thu Hường^{1*}

¹Phòng thí nghiệm trọng điểm Công nghệ Enzym và Protein,
Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

²Khoa Y Dược, Đại học Quốc gia Hà Nội

Ngày nhận bài 3/8/2020; ngày chuyển phản biện 7/8/2020; ngày nhận phản biện 15/9/2020; ngày chấp nhận đăng 21/9/2020

Tóm tắt:

Nano Curcumin (n-Cur) là một phytopolyphenol được tách chiết ra từ củ nghệ (*Curcuma longa*), đã được chỉ ra là cách cải thiện tính tan và những hạn chế của curcumin (Cur), song lại không tạo được tính hướng đích đặc hiệu. Trong nghiên cứu này, nhóm tác giả đã gắn thêm axit folic vào hệ n-Cur (n-Cur-Fl) giúp cho Cur đạt được tính hướng đích đặc hiệu tới các tế bào biểu hiện thụ thể folate. Việc gắn thêm axit folic vào n-Cur được thực hiện thông qua thí nghiệm hướng đích (boyden chamber assay) của các tế bào biểu hiện cao thụ thể folate (tế bào viêm hoặc ung thư). Kết quả cho thấy, n-Cur-Fl đã làm tăng khả năng hướng đích đặc hiệu tới tế bào viêm (RAW264.7 được cảm ứng bởi lypopolisaccharide) hoặc tế bào ung thư (Hela) biểu hiện cao thụ thể folate tương ứng là 70 hoặc 30 lần so với n-Cur thông thường. Trong khi tế bào không biểu hiện cao thụ thể folate (A549) không cho khả năng này. Dữ liệu phân tử này cho thấy dùng n-Cur-Fl có thể cải thiện tình trạng viêm một cách đặc hiệu nhờ Cur hướng đích tới vùng viêm.

Từ khóa: hệ nano hướng đích thụ thể folate, nano curcumin, nano curcumin gắn axit folic.

Chỉ số phân loại: 3.4

Đặt vấn đề

Cur là hợp chất sắc tố thuộc nhóm phytopolyphenol được tách chiết ra từ củ nghệ (*Curcuma longa*). Dựa vào cấu trúc trên vòng phenyl của Cur, nhóm methoxy có vai trò quan trọng cho tác dụng chữa trị bệnh. Cur được biết đến với tác dụng chống oxy hóa, chống viêm và chống lại khối u, được sử dụng làm dược phẩm trong thực phẩm chức năng, chất bổ sung và thuốc. Cur được các nhà khoa học khẳng định là có hiệu quả cao trong việc hỗ trợ điều trị một số bệnh lý về viêm loét dạ dày, viêm gan, viêm tá tràng, ung thư niêm mạc dạ dày, trực tràng... Tuy nhiên, do bị hạn chế về khả năng hòa tan trong các dung môi phân cực và dễ dàng bị phá hủy bởi các enzyme cũng như điều kiện pH axit trong dạ dày, Cur bị hạn chế rất nhiều trong hệ thống ống tiêu hóa [1-3].

Hiện nay, để giải quyết vấn đề Cur không tan trong nước, công nghệ vật liệu nano bao gói Cur đã được ứng dụng rộng rãi trong nước và trên thế giới [4-7]. Các nghiên cứu *in vitro* của A.K.T. Thulasidasan và cộng sự [1] đã chứng minh rằng, đóng gói Cur trong hạt nano PLGA (Poly(lactic-co-glycolic acid)) kết hợp với axit folic có thể làm tăng tiềm năng điều trị của Cur. Các sản phẩm này đã hạn chế được phần nào ảnh hưởng của các enzyme và pH acid trong dịch vị tới được tính của Cur; tuy nhiên, các nghiên cứu này vẫn chưa giải quyết được triệt để vấn đề đưa được lượng Cur

đến các tế bào gây viêm hoặc điểm đích một cách đặc hiệu.

Thụ thể folate alpha (FR α) là một protein màng gắn với licosyl-phosphatidylinositol. Các nhà khoa học đã tìm ra rằng FR α biểu hiện quá mức ở các tế bào viêm [8] hoặc khối u rắn như là ung thư biểu mô buồng trứng, phổi và vú [9-11], biểu hiện thấp và hạn chế trong các mô bình thường [12]. Sự biểu hiện quá mức của FR α có thể tạo điều kiện cho các tế bào ung thư tăng trưởng qua các cơ chế liên quan hoặc độc lập với lượng folate hấp thu [13-17].

Axit folic - một phối tử có ái lực cao của thụ thể folate, giữ lại các đặc tính liên kết của thụ thể khi được tạo dẫn xuất thông qua carboxyl. Với đặc tính kích thước nhỏ sẵn có, dễ tạo phản ứng, liên kết hóa học liên hợp đơn giản và hầu như không mang tính sinh miễn dịch của axit folic khiến nó trở thành một phối tử lý tưởng để phân phối thuốc đến các khối u hoặc vùng viêm. Việc nhắm mục tiêu thụ thể folate bằng cách sử dụng axit folic được coi như là một chiến lược đầy hứa hẹn cho điều trị viêm hoặc ung thư với nhiều loại thuốc đang được thử nghiệm lâm sàng [18-20]. Folate liên kết đặc biệt với axit folic tạo ra phức hợp thụ thể - phối tử nằm trên màng tế bào, nó được nội hóa thông qua con đường endosome. Khi pH của endosome đạt ngưỡng, folate sẽ tách ra khỏi thụ thể và thuốc được giải phóng [1]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đưa ra những minh chứng phân tử rõ ràng về hiệu quả của việc sử dụng axit folic (một phối tử đặc hiệu

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

Evaluation of the target effect of folic acid conjugated nano curcumin system on cells highly expressed folate receptors

Thi Ngoc Huyen Tran¹, Thi Thu Ha Bui¹, Duc Quang Do¹,
Thi Thu Huong Le², Thi Thu Huong Pham^{1*}

Key Laboratory of Enzyme and Protein Technology,
University of Science, Vietnam National University, Hanoi

²School of Medicine and Pharmacy, Vietnam National University, Hanoi

Received 3 August 2020; accepted 21 September 2020

Abstract:

Nano curcumin (n-Cur) is a phytopolyphenol extracted from turmeric (*Curcuma longa*), which has been shown to improve the solubility and limitations of curcumin (Cur) but failed to produce target specificity. In this study, the authors proved that the addition of folic acid to the n-Cur (n-Cur-Fl) helps Cur to achieve a specific target towards folate-receptor-expressing cells through the Boyden chamber assay of high folate receptors (inflammatory or cancer cells). Results showed that n-Cur-Fl increased the ability to target specifically to inflammatory cells (RAW264.7 induced by lipopolysaccharide) or cancer cells (Hela) highly expressing folate receptors, up to 70 or 30 times more than conventional n-Cur, respectively. While the authors could not see this ability in A549 cells, which did not express high folate receptors. These molecular data indicated the potential of using n-Cur-Fl to improve the blocking of inflammation by Cur targeting the inflammatory region specifically.

Keywords: nano curcumin, nano curcumin conjugates folic acid, nano curcumin specific targeting.

Classification number: 3.4

có ái lực mạnh với thụ thể folate), như một chất dẫn đường cho n-Cur có khả năng hướng đích tới các tế bào viêm hoặc tế bào ung thư biểu hiện cao thụ thể folate.

Nguyên liệu, hóa chất và phương pháp

Nguyên liệu

Nguyên liệu dùng trong nghiên cứu là 3 mẫu thử: Cur, n-Cur và n-Cur-Fl được cung cấp bởi nhóm nghiên cứu của TS Lê Thị Thu Hương (Khoa Y Dược, Đại học Quốc gia Hà Nội). Các dòng tế bào được sử dụng trong nghiên cứu này bao gồm: dòng đại thực bào chuột RAW264.7, dòng tế bào A549 và dòng tế bào ung thư cổ tử cung Hela được lưu trữ tại Phòng Công nghệ tế bào động vật, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội.

Hóa chất

Môi trường Modified Eagle của Dulbecco (DMEM, PAN, Germany) có bổ sung 10% Fetal Bovine Serum (FBS, Corning), 100 µg/ml penicillin, dung dịch rửa HBSS (PAN, Germany); dung dịch Trypsin/EDTA (PAN, Germany); dung dịch dimethyl sulfoxide (DMSO). Kit CellTiter 96® Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega, USA); kit tách RNA (Aurum Total RNA kit, Bio Rad, USA). Thiết bị: máy lắc tròn GFL; máy đo quang phổ UV-Vis LABOMED UV-2550, máy Nano drop one Thermo Fisher và các thiết bị chuẩn dùng trong nuôi cấy tế bào, hóa sinh và sinh học phân tử.

Phương pháp

Nuôi cấy tế bào: các dòng tế bào được nuôi trong môi trường Modified Eagle của Dulbecco (DMEM, PAN, Germany) có bổ sung 10% Fetal Bovine Serum (FBS, Corning), 100 µg/ml penicillin. Các tế bào được nuôi ở điều kiện 37°C, 5% CO₂ và độ ẩm 95%.

Đánh giá ảnh hưởng của các chất lên tốc độ sinh trưởng tế bào bằng kit Cell Titer: tế bào RAW264.7 (2,0×10⁴ tế bào/100 µl/giếng), A549 (1,0×10⁴ tế bào/100 µl/giếng), Hela (1,0×10⁴ tế bào/100 µl/giếng) được nuôi trong đĩa 96 giếng, ủ qua đêm ở 37°C và 5% CO₂. Sau đó, các tế bào được ủ ở các nồng độ khác nhau với Cur (0; 2,5; 5; 10; 20; 40; 100 µg/ml), n-Cur (0; 2,5; 5; 10; 20; 40; 100 và 1.000 µg/ml), n-Cur-Fl (0; 100; 2.000; 4.000; 6.000 và 8.000 µg/ml). Sau 24 h ủ với các chất, khả năng sinh trưởng của các dòng tế bào trong điều kiện có mặt của các phức hệ được đánh giá bằng Kit Celltiter (Promega, Mỹ). Đĩa 96 sẽ được lắc bằng máy lắc tròn GFL ở tốc độ 4.000 vòng/phút trong 10 phút tại nhiệt độ phòng, sau đó sẽ được đo ở bước sóng 535 nm bằng máy đo quang phổ UV-Vis LABOMED UV-2550. Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Kết quả được tính theo công thức:

$$\% \text{Tế bào sống} = \frac{Ac}{Ao \times 100} \times 100\%$$

Trong đó: A_c là độ hấp thụ OD của mẫu được bổ sung chất; A_o là độ hấp thụ OD của mẫu không được bổ sung chất.

Giá trị nồng độ của các chất Cur, n-Cur và n-Cur-FI không gây chết tế bào được tính dựa vào đồ thị log (liều dùng) và % ức chế.

Đánh giá khả năng hấp dẫn của các chất lên tế bào bằng thí nghiệm Boyden Chamber Assay: nuôi tế bào RAW 264.7 ($2,0 \times 10^5$ tế bào/transwell) và A549 ($2,5 \times 10^4$ tế bào/transwell), Hela ($2,5 \times 10^4$ tế bào/transwell) ở buồng phía trên transwell với môi trường nuôi cấy DMEM 4,5 mg/ml glucose bổ sung 4% FBS, 100 μ g/ml penicillin. Buồng phía dưới transwell được bổ sung thêm các chất với nồng độ Cur: 20 μ g/ml, n-Cur: 20 μ g/ml, n-Cur-FI: 200 μ g/ml. Sau 24 h ủ, tiến hành thu transwell, tế bào di chuyển xuống mặt dưới của đáy transwell được cố định lại bằng formaldehyde 4% trong 10 phút, sau đó được nhuộm bằng crystal violet. Các tế bào mặt trong của giếng nuôi được loại bỏ hoàn toàn bằng tăm bông để có thể nhận diện được các tế bào di chuyển xuống mặt dưới một cách rõ ràng nhất. Transwell được chụp ảnh và đếm dưới kính hiển vi soi ngược ở vật kính 10X. Tổng lượng tế bào di chuyển xuống mặt dưới (Σ) được tính theo công thức:

$$\Sigma = \frac{a \times 30}{0,8}$$

Trong đó: a là tổng lượng tế bào đếm được trên 0,8 mm² vi trường, 30 là diện tích bề mặt transwell (mm²) [15]. Chúng tôi đã phân tích và tính toán lượng tế bào bị hấp dẫn bằng cả chương trình Microsoft Office Excel và phần mềm OriginPro để tạo biểu đồ cho lượng tế bào ở mỗi mẫu.

Đánh giá biểu hiện của thụ thể folate bằng kỹ thuật Reverse Transcriptase PCR: tế bào RAW264.7 ($2,5 \times 10^5$ tế bào/ml), tế bào A549 ($1,0 \times 10^5$ tế bào/ml) được nuôi trên đĩa petri, ủ qua đêm trong DMEM glucose chứa 10% FBS, 100 μ g/ml penicillin. Sau 24 h, các tế bào được chuyển nuôi trong DMEM. RNA tổng số từ hai dòng tế bào được tách bằng kit Aurum Total RNA kit (Bio Rad, USA). Sau khi tách RNA tổng số, tiến hành tổng hợp cDNA bằng phản ứng sử dụng enzyme phiên mã ngược (Reverse Transcriptase) và kiểm tra chất lượng sản phẩm tạo cDNA thông qua phản ứng PCR với các cặp mồi sau: Mồi β -actin: Fw: 5'-CTGTCCCTGTATGCCTCTG-3', Rv: 5'-ATGTCACGCACGATTTC-3' (sản phẩm 218 bp), mồi mFOLR1: Fw: 5' CTGCATGGATGCCAAACACC 3', Rv: 5' GCACAGGGGAACATCAAGGA 3' trên trình tự tham chiếu NM_001252554.1 (sản phẩm 298 bp) và mồi hFOLR1: Fw: 5' GGAGGAAGAATGCCTGCTGT 3', Rv: 5' TTGCACAGAACAGTGGGTGT 3' trên trình tự tham chiếu NM_016724.2 (sản phẩm 391 bp), được thiết kế bằng phần mềm Primer 3. Gen β -actin được thực hiện song song đảm bảo lượng RNA tổng số đưa vào mỗi mẫu là như nhau. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1,5% và được

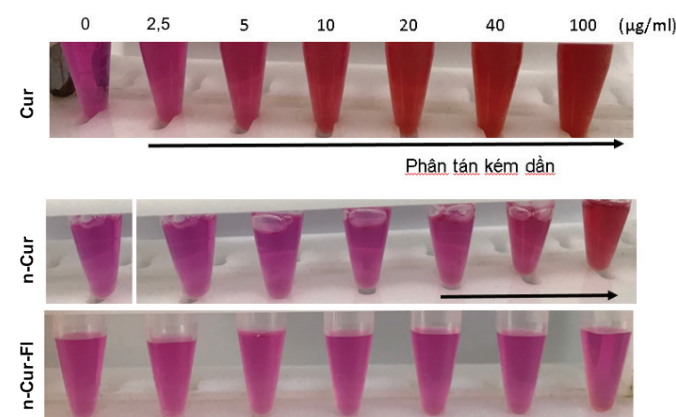
ghi lại hình ảnh.

Xử lý số liệu: các số liệu nghiên cứu được xử lý thống kê theo phương pháp t-test student sử dụng phần mềm Excel và SigmaPlot 10 (Systat Software Inc, Mỹ). Số liệu được biểu diễn dưới dạng $X \pm SD$. Sự khác biệt có ý nghĩa khi $p < 0,05$.

Kết quả và bàn luận

Ảnh hưởng của nồng độ các chất hệ n-Cur gắn axit folic tới khả năng sinh trưởng của tế bào

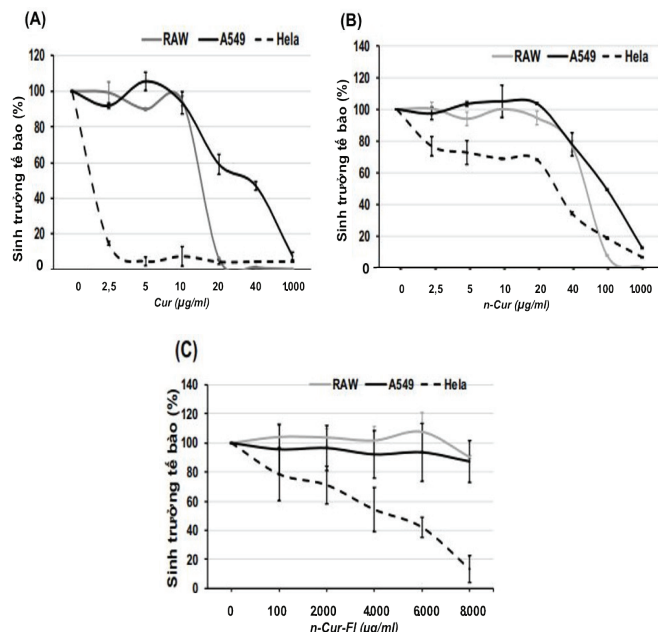
Như đã đề cập ở trên, Cur bị hạn chế về khả năng hòa tan trong các dung môi phân cực, dễ bị phân hủy trong ruột nên hiệu suất hấp thụ kém [1-3]. Do đó để đánh giá liệu việc gắn thêm axit folic có làm mất tính tan trong môi trường sinh học của chất hệ n-Cur, chúng tôi đã tiến hành thí nghiệm hòa các chất Cur, n-Cur và n-Cur-FI trong môi trường nuôi cấy tế bào DMEM ở cùng dải nồng độ 0; 2,5; 5; 10; 20; 40; 100 μ g/ml. Kết quả cho thấy, việc gắn axit folic vào n-Cur không những không ảnh hưởng tới khả năng tan của n-Cur mà còn làm tính tan của n-Cur được tăng lên rất nhiều. Trong khi Cur có độ phân tán kém dần ở các nồng độ cao (từ 10; 20; 40; 100 μ g/ml) thì các chất hệ n-Cur có độ phân tán tốt hơn. Với n-Cur, độ phân tán bị giảm xảy ra ở nồng độ 100 μ g/ml, trong khi với n-Cur-FI thì không thấy xuất hiện tủa ở nồng độ này, không thấy hiện tượng kém tan hay sự khác biệt giữa các nồng độ khác nhau (hình 1). Điều này cho thấy việc gắn axit folic vào hệ n-Cur còn giúp làm tăng tính tan của n-Cur trong môi trường nuôi cấy.



Hình 1. Mức độ phân tán của các dạng Cur, n-Cur và n-Cur-FI trong môi trường nuôi cấy DMEM.

Bên cạnh đó, để thử nghiệm liệu nồng độ các chất hệ n-Cur có gây độc cho tế bào hay không, chúng tôi đã kiểm tra tác động của các chất ảnh hưởng đến khả năng sinh trưởng của tế bào RAW264.7, A549 và Hela bằng Kit CellTiter. Kết quả cho thấy, số lượng tế bào của RAW264.7 và A549 trong các mẫu được ủ bằng Cur bắt đầu giảm ở nồng độ cao hơn 10 μ g/ml, riêng đối với tế bào Hela là 2,5 μ g/ml (hình 2A). Trong khi đó, các mẫu được ủ với hệ n-Cur và n-Cur-FI

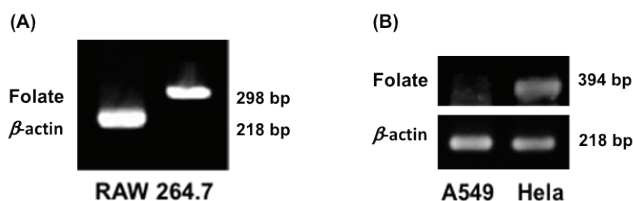
thì khả năng sống của tế bào RAW264.7 và A549 ổn định ở các nồng độ cao hơn lần lượt là 35 $\mu\text{g/ml}$ và trên 6.000 $\mu\text{g/ml}$, đồng thời n-Cur và n-Cur-FI cũng cải thiện ảnh hưởng của Cur lên tế bào Hela (hình 2B, 2C). Từ đó có thể thấy, việc nano hóa các sản phẩm Cur làm giảm khả năng gây độc cho các tế bào, đặc biệt là n-Cur gắn thêm axit folic.



Hình 2. Ảnh hưởng của nồng độ các chất lên khả năng sinh trưởng của các dòng tế bào. (A) Ảnh hưởng của Cur (0; 2,5; 5; 10; 20; 40; 100 $\mu\text{g/ml}$); (B) Ảnh hưởng của n-Cur (0; 2,5; 5; 10; 20; 40; 100 và 1.000 $\mu\text{g/ml}$); (C) Ảnh hưởng của n-Cur-FI (0; 100; 2.000; 4.000; 6.000; 8.000 $\mu\text{g/ml}$) lên khả năng sinh trưởng của các dòng tế bào RAW264.7 (2×10^5 tế bào/ml), tế bào A549 (1×10^5 tế bào/ml) và Hela (1×10^5 tế bào/ml) trong các giếng của đĩa 96 giếng sau 24 h. Lượng tế bào sống sau 24 h được xác định bằng cách bổ sung 60 μl dung dịch Cell Titer vào từng giếng. Dữ liệu được cung cấp dưới dạng giá trị trung bình $\pm$ SD ($n=3$).

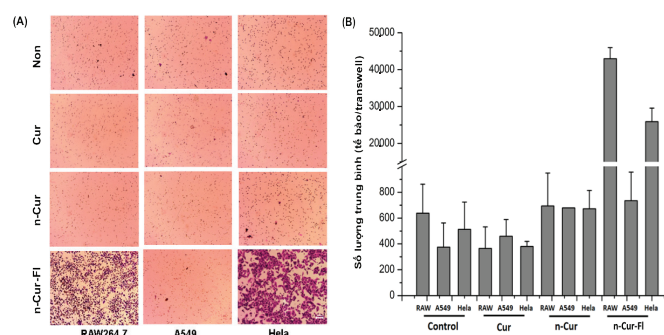
Đánh giá tính hướng đích của hệ n-Cur-FI tới tế bào có biểu hiện thụ thể folate

Như đã đề cập ở trên, axit folic là một tác nhân có ái lực mạnh với thụ thể folate trên bề mặt tế bào ung thư, viêm loét...[8]. Do đó, để đánh giá tính hướng đích của hệ n-Cur-FI tới tế bào biểu hiện thụ thể folate, chúng tôi xét biểu hiện folate ở mức độ mRNA trên dòng tế bào RAW264.7, A549 và tế bào Hela. Kết quả RT-PCR cho thấy sự xuất hiện các băng sản phẩm ở khoảng 298 bp đối với tế bào RAW264.7 (hình 3A) và ở khoảng 391 bp đối với tế bào Hela đúng như tính toán trước đó, chứng tỏ sự biểu hiện mạnh mRNA folate trên các dòng tế bào này. Trong khi gần như không thu được tín hiệu băng sản phẩm PCR ở dòng A549 (hình 3B). Điều này cho thấy việc dùng dòng RAW264.7 và Hela biểu hiện mạnh thụ thể folate để chứng tỏ khả năng hướng đích tới thụ thể folate của n-Cur-FI là lựa chọn hợp lý; tế bào A549 biểu hiện rất thấp hoặc hầu như không biểu hiện thụ thể này sẽ được dùng làm đối chứng âm trong thí nghiệm đánh giá khả năng hướng đích của n-Cur-FI.



Hình 3. Mức độ biểu hiện mRNA thụ thể folate trên các dòng tế bào: RAW264.7 (A), A549 và tế bào Hela (B). RNA tổng số được tách từ các tế bào RAW264.7, A549, tế bào Hela và được chuyển hoá thành cDNA, mức độ biểu hiện mRNA folate được kiểm tra bằng RT-PCR; beta actin được sử dụng làm nội chuẩn ở mỗi loại mẫu.

Kết quả nghiên cứu cũng cho thấy, không xuất hiện lượng tế bào đáng kể ở mặt dưới của giếng nuôi (transwell) trên cả 3 dòng tế bào thử nghiệm khi ủ với Cur, n-Cur hay không ủ với chất nào (Non) (hình 4A). Tuy nhiên đã có sự khác biệt lớn xảy ra đối với dòng tế bào biểu hiện thụ thể folate là RAW264.7 và Hela: có sự tập trung rất nhiều tế bào ở mặt dưới của giếng nuôi trong sự có mặt của n-Cur-FI, trong khi không thấy hiện tượng này trên mẫu có dòng tế bào A549 (hình 4A). n-Cur-FI đã tạo ra sự hướng hoá hấp dẫn các tế bào RAW264.7 và Hela lên tới tương ứng 70 và 30 lần so với dùng riêng n-Cur (hình 4B). Số lượng tế bào hướng đích vượt trội này có được là do sự có mặt của thụ thể folate trên bề mặt tế bào RAW264.7 và tế bào Hela đã hướng hoá tới vùng có axit folic trên các phân tử n-Cur-FI. Tế bào thiếu hụt thụ thể folate là A549 không có khả năng này trong điều kiện có n-Cur-FI hay không, đồng thời n-Cur hay Cur thông thường cũng không có khả năng hấp dẫn tế bào có thụ thể folate (RAW264.7 và Hela).



Hình 4. Khả năng hướng đích tới dòng tế bào biểu hiện mạnh thụ thể folate. (A) Ảnh tế bào tập trung mặt dưới của màng giếng nuôi (transwell) tiếp xúc với Cur, n-Cur hoặc n-Cur-FI; (B) Số lượng tế bào hướng đích đếm được (tế bào/transwell).

Rất nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng, thụ thể folate là đích để trị liệu một số ung thư. Một số công bố khác về hệ mang thuốc gắn axit folic cũng đã cho thấy khả năng hướng đích đặc hiệu tới tế bào biểu hiện thụ thể folate [18-20]. Sự kết hợp của hạt nano gắn với axit folic giúp tăng cường tiềm năng hóa trị liệu của Cur đối với paclitaxel (một loại thuốc hóa trị được sử dụng để điều trị một số loại ung thư),

làm giảm đáng kể sự phát triển của khối u *in vivo* với việc giảm chuyển vị vào nhân của các nhân tố phiên mã NF- κ B và AP-1 [1]. Các hạt nano PLGA-PEG gắn với axit folic của Cur thể hiện hoạt tính chống ung thư được tăng cường nhờ phân phối đặc hiệu điểm đích [21]. Phức hợp nano từ dịch triết lá cây *Withania somnifera* (i-Ex) nhắm mục tiêu thụ thể folate tiêu diệt một cách chọn lọc các tế bào ung thư. Trái ngược với i-Ex, phức hệ nano i-Ex hướng đích thụ thể folate (FRi-ExNC) cho thấy có sự hấp thu tế bào cao gấp 3 lần bởi các tế bào ung thư được làm giàu thụ thể folate này trong điều kiện *in vitro*. Các thử nghiệm khối u *in vivo* cũng cho thấy khả năng hỗ trợ ức chế khối u mạnh hơn của FRi-ExNC (chứng tỏ phức hệ này có vai trò là ứng cử viên mang thuốc tự nhiên hiệu quả và an toàn trong điều trị ung thư) [22]. Bên cạnh đó, các hạt nano PLGA kết hợp với axit folic làm tăng đáng kể tính thấm của paclitaxel hấp dẫn tế bào Caco-2 biểu hiện thụ thể folate [18]. Có thể thấy kết quả của chúng tôi hoàn toàn phù hợp với các nghiên cứu đã công bố về việc gắn thêm axit folic vào phức hệ bao gói thuốc đem lại hiệu quả hướng đích cao hơn nhiều lần khi không có mặt thành phần này.

Kết luận

Nghiên cứu này là bằng chứng phân tử xác đáng cho thấy, lần đầu tiên, phức hệ n-Cur khi được gắn thêm axit folic không chỉ giúp làm tăng tính hoà tan của n-Cur mà còn có tác dụng làm tăng tới 70 và 30 lần trong việc hướng đích tới các tế bào viêm biểu hiện cao thụ thể folate là RAW264.7 và tế bào ung thư Hela so với n-Cur thông thường. Điều này mở ra triển vọng sử dụng n-Cur gắn axit folic có tính hướng đích đặc hiệu cao, đặc biệt trên các đối tượng tế bào viêm như viêm loét dạ dày và một số tế bào ung thư khác.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] A.K.T. Thulasidasan, et al. (2017), "Folic acid conjugation improves the bioavailability and chemosensitizing efficacy of Cur-encapsulated PLGA-PEG nanoparticles towards paclitaxel chemotherapy", *Oncotarget*, **8**, pp.107374-107389.
- [2] A. Sarkar, R. De, and A.K. Mukhopadhyay (2016), "Cur as a potential therapeutic candidate for *Helicobacter pylori* associated diseases", *World J. Gastroenterol.*, **22**(9), pp.2736-2748.
- [3] S.A. Rajasekaran (2011), "Therapeutic potential of Cur in gastrointestinal diseases", *World J. Gastrointest Pathophysiol*, **2**(1), pp.1-14.
- [4] Anindita Mukerjee, I.K.V. Jamboor (2009), "Formulation, characterization and evaluation of Cur-loaded PLGA nanospheres for cancer therapy", *Anticancer Res.*, **29**, pp.3867-3875.
- [5] N.S. Rejinold, et al. (2011), "Biocompatible, biodegradable and thermo-sensitive chitosan-g-poly (N-isopropylacrylamide) nanocarrier for Cur drug delivery", *Int. J. Biolog.*, **49**, pp.161-172.
- [6] M.Y. Murali, J. Meena, C. Subhash, Chauhan (2010), "Poly (beta-cyclodextrin)/Cur self-assembly: a novel approach to improve Cur delivery

and its therapeutic efficacy in prostate cancer cells", *Macromol. Biosci.*, **10**, pp.1141-1151.

- [7] D. Sun, et al. (2010), "A novel nanoparticle drug delivery system: the anti-inflammatory activity of Curcumin is enhanced when encapsulated in Exosomes", *Molecular Therapy*, **18**(9), pp.1606-1614.
- [8] P.S. Low, W.A. Henne, and D.D. Doorneweerd (2008), "Discovery and development of Folic-Acid-Based receptor targeting for imaging and therapy of cancer and inflammatory diseases", *Acc. Chem. Res.*, **41**(1), pp.120-129.
- [9] G. Toffoli, et al. (1997), "Overexpression of folate binding protein in ovarian cancers", *Int. J. Cancer*, **74**, pp.193-198.
- [10] Huan Shi, et al. (2015), "A current review of folate receptor alpha as a potential tumor target in non-small-cell lung cancer", *Drug. Des. Devel. Ther.*, **9**, pp.4989-4996.
- [11] L.S.F. Boogerd, et al. (2016), "Concordance of folate receptor-alpha expression between biopsy, primary tumor and metastasis in breast cancer and lung cancer patients", *Oncotarget*, **7**(14), pp.17442-17454.
- [12] L.E. Kelemen (2006), "The role of folate receptor alpha in cancer development, progression and treatment: cause, consequence or innocent bystander?", *Int. J. Cancer*, **119**, pp.243-250.
- [13] D.J. O'Shannessy, et al. (2012), "Folate receptor alpha (FRA) expression in breast cancer: identification of a new molecular subtype and association with triple negative disease", *Springerplus*, **1**, p.22.
- [14] M.K.Y. Siu, et al. (2012), "Paradoxical impact of two folate receptors, FRalpha and RFC, in ovarian cancer: effect on cell proliferation, invasion and clinical outcome". *PLoS One*, **7**, pp.e47201.
- [15] G.L. Zwicke, G.A. Mansoori, and C.J. Jeffery (2012), "Utilizing the folate receptor for active targeting of cancer nanotherapeutics", *Nano Reviews*, **3**(1), pp.1-11.
- [16] Kukowska-Latallo, et al. (2005), "Nanoparticle targeting of anticancer drug improves therapeutic response in animal model of human epithelial cancer", *Cancer Research*, **65**(12), pp.5317-5324.
- [17] M. Fernández, F. Javida, and V. Chudasama (2018), "Advances in targeting the folate receptor in the treatment/imaging of cancers". *Chem. Sci.*, **9**, pp.790-810.
- [18] E. Roger, et al. (2012), "Folic acid functionalized nanoparticles for enhanced oral drug delivery", *Molecular Pharmaceutics*, **9**(7), pp.2103-2110.
- [19] Jianian Chen, Shaoshun Li, Qi Shen, Huijuan He, Yi Zhang (2011), "Enhanced cellular uptake of folic acid-conjugated PLGA-PEG nanoparticles loaded with vincristine sulfate in human breast cancer", *Drug. Dev. Ind. Pharm.*, **37**(11), pp.1339-1346.
- [20] Sang Joon Lee, Yong-Ho Shim, Jong-Suk Oh, Young-Il Jeong, In-Kyu Park, and Hyun Chul Lee (2015), "Folic-acid-conjugated pullulan/poly (DL-lactide-co-glycolide) graft copolymer nanoparticles for folate-receptor-mediated drug delivery", *Nanoscale Res. Lett.*, **10**, p.43.
- [21] J.J. Pillai, A.K.T. Thulasidasan, R.J. Anto, N.C. Devika, N. Ashwanikumar and G.S.V. Kumar (2015), "Cur entrapped folic acid conjugated PLGA-PEG nanoparticles exhibit enhanced anticancer activity by site specific delivery", *RSC Adv.*, **5**, pp.25518-25524.
- [22] Yue Yu, Jia Wang, S.C. Kaul, Renu Wadhwa and Eijiro Miyako (2019), "Folic acid receptor-mediated targeting enhances the cytotoxicity, efficacy, and selectivity of *Withania somnifera* leaf extract: *In vitro* and *in vivo*", *Evidence Front. Oncol.*, **9**, p.602.

Đánh giá khả năng phân loại của vùng gen ITS-rDNA đối với loài Hoàng liên ô rô lá dày (*Mahonia bealei* (Fortune) Pynaert) của Việt Nam

Nguyễn Thị Phương Trang^{1*}, Vũ Thị Huệ², Nguyễn Hùng Mạnh¹, Bùi Văn Thanh¹

¹Viện Sinh thái và Tài nguyên Sinh vật, Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam

²Trường Đại học Sư phạm Hà Nội

Ngày nhận bài 28/8/2020; ngày chuyển phản biện 7/9/2020; ngày nhận phản biện 21/10/2020; ngày chấp nhận đăng 6/11/2020

Tóm tắt:

Hoàng liên ô rô lá dày (*Mahonia bealei* (Fortune) Pynaert) là loài dược liệu quý có nhiều giá trị sử dụng và phạm vi phân bố hẹp, là một trong những vị thuốc được dùng nhiều trong y học cổ truyền. Trong tự nhiên, loài này trước đây khá phong phú nhưng do bị khai thác và buôn bán quá mức nên đã bị suy giảm mạnh cả về số lượng và chất lượng. Hoàng liên ô rô lá dày được Sách đỏ Việt Nam xếp ở mức nguy cấp (EN). Hiện nay, mã vạch DNA được xem là kỹ thuật phổ biến có tính chính xác cao trong xác định, nhận dạng loài bằng cách giải mã các đoạn DNA đặc trưng cho loài. Trong nghiên cứu này, các tác giả đã phân tích đặc điểm phân tử vùng gen *ITS-rDNA* và đánh giá khả năng phân loại của vùng gen này đối với loài Hoàng liên ô rô lá dày của Việt Nam. Kết quả cho thấy, vùng gen ITS dài 700 bp có chứa 24,1% Thymine, 28,4% Guanine, 23,4% Adenine và 24,1% Cytosine, là vùng gen phù hợp, có thể sử dụng như một mã vạch DNA để xác định loài *Mahonia bealei* và nghiên cứu mối quan hệ di truyền cho các loài thuộc họ *Berberidaceae*. Sự khác biệt di truyền trung bình giữa chi *Mahonia* và *Berberis* dựa trên phân tích trình tự gen ITS là 2,36%, trong khi với các chi khác là 17-22%. Cặp mồi đặc hiệu khuếch đại vùng gen ITS dài 300 bp loài *M. bealei* cũng đã được phát triển và tổng hợp, góp phần hữu ích cho công tác giám định và bảo tồn loài. Trình tự vùng gen ITS-300 của Hoàng liên ô rô lá dày cũng đã được gửi vào Ngân hàng gen thế giới (Genbank) với mã số truy cập là MT 008067.

Từ khóa: bảo tồn nguồn gen, Hoàng liên ô rô lá dày, ITS, *Mahonia bealei*.

Chỉ số phân loại: 3.4

Mở đầu

Hoàng liên ô rô lá dày hay còn gọi là hoàng mộc, hoàng liên ô rô, hoàng bá gai, mật gấu... là loài cây bụi thường xanh, cao 2-3 m, thuộc chi Mã hồ (*Mahonia* Nutt., 1818), họ Hoàng liên gai (*Berberidaceae*) đã được Fortune Robert mô tả và công bố vào năm 1850 với tên khoa học là *Berberis bealei* Fortune, 1850. Đến năm 1875, Pynaert Edouard-Christophe đã xác định lại loài này thuộc chi *Mahonia* và đặt lại tên khoa học là *M. bealei* (Fortune) Pynaert. Đến nay, họ Hoàng liên gai được xác định có 17 chi và gần 650 loài [1]. Các nghiên cứu về phân bố cho thấy, các loài thuộc họ Hoàng liên gai chủ yếu phân bố ở khu vực ôn đới phía bắc và vùng núi á nhiệt đới. Theo Bùi Văn Hường và cs (2017) [2], Hoàng liên ô rô lá dày được ghi nhận ở Trung Quốc (An Huy, Phúc Kiến, Quảng Đông...) và ở Việt Nam (Lào Cai, Hà Giang, Lai Châu).

Hoàng liên ô rô lá dày có tính thanh nhiệt, nên có tác

dụng thanh lọc và loại bỏ độc tố, được sử dụng làm thuốc điều trị các bệnh như tiêu chảy, kiết lỵ, vàng da, viêm loét dạ dày, áp xe, đau răng, viêm họng [3]. Trong tự nhiên, loài này phát triển ở những nơi có lượng mùn ít như dưới các tán rừng thưa, các trảng cây bụi hoặc sườn núi đá vôi, do vậy rất thích hợp để sử dụng trong công tác trồng rừng ở những khu vực nghèo dinh dưỡng hoặc địa hình hiểm trở (như ở các vách núi). Tuy nhiên hiện nay, loài này do bị khai thác và buôn bán quá mức nên đã bị suy giảm mạnh cả về số lượng và chất lượng. Sách đỏ Việt Nam 2007 xếp Hoàng liên ô rô lá dày ở mức nguy cấp (EN). Ở Việt Nam, chi *Mahonia* được biết đến với 3 loài gồm, *Mahonia japonica*, *Mahonia bealei* và *Mahonia nepalensis*, trong đó loài *Mahonia bealei* - Hoàng liên ô rô lá dày được coi là bị đe dọa ở mức độ cao nhất so với 2 loài còn lại do có số lượng cá thể của nó còn rất ít trong tự nhiên [4].

Đến nay, các nghiên cứu của Việt Nam về loài này chủ yếu chỉ tập trung vào mô tả hình thái, đặc điểm sinh học,

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

Assessment of classification ability of ITS-rDNA region on *Mahonia bealei* (Fortune) Pynaert in Vietnam

Thi Phuong Trang Nguyen^{1*}, Thi Hue Vu²,
Hung Manh Nguyen¹, Van Thanh Bui¹

¹Institute of Ecology and Biological Resources, VAST

²Hanoi National University of Education

Received 28 August 2020; accepted 6 November 2020

Abstract:

Mahonia bealei is a valuable medicinal plant with high economic value and a narrow range of distribution. It is one of the most widely used medicinal herbs in traditional medicine. In the past, this species was plentiful but due to over-exploitation and trading, it has sharply declined in both quantity and quality. At present, *M. bealei* is listed on Vietnam's Red List at the endangered level (EN). DNA barcoding is considered a popular technique with high accuracy for species identification by sequencing of specific DNA fragments. In this research, the authors studied molecular characteristics of the ITS-rDNA region and assessed of classification ability of this DNA marker on *M. bealei* in Vietnam. The result showed that the ITS with 700 bp in length contained 24.1% Thymine, 28.4% Guanine, 23.4% Adenine, and 24.1% Cytosine. The average genetic difference between the *Mahonia* genus and *Berberis* genus is 2.36% while other genera are from 17 to 22%. The result also demonstrated this ITS-rDNA region might be suitable for identification for *Mahonia bealei* as well as studying the phylogenetic of Berberidaceae. Specific primer to amplify the ITS genome in the length of 300 bp of *M. bealei* species has also been developed and synthesised, usefully contributing to *M. bealei* identification and conservation. The ITS-300 sequence of *M. bealei* was registered on the Genbank with accession number MT 008067.

Keywords: Berberidaceae, gene conservation, ITS, *Mahonia bealei*.

Classification number: 3.4

sinh thái, phân bố, giá trị tài nguyên và các phương pháp nhân giống... mà chưa hề có công trình nào nghiên cứu về đặc điểm phân tử, hệ thống học phân tử hay phát triển môi khuếch đại vùng gen đặc hiệu phục vụ cho công tác giám định và bảo tồn loài.

Mã vạch DNA (DNA barcoding) là kỹ thuật hiện đại, sử dụng đoạn DNA chứa thông tin đặc trưng cho loài để phân biệt [5, 6]. Chúng đã trở thành công cụ hiệu quả cho công tác phân loại loài, giám định mẫu vật, đánh giá mối quan hệ di truyền, phát hiện loài mới, quản lý nguồn gốc, xuất xứ, bản quyền của sản phẩm từ sinh vật [7].

Ở thực vật bậc cao, một số chỉ thị lục lạp (*matK*, *rbcL*, *psbA-trnH*, *atpF-atpH*...) và gen nhân (*ITS*, *18S*...) đã và đang được sử dụng rộng rãi trong việc phân loại loài, nghiên cứu về mối quan hệ di truyền và nhận dạng loài hay xác định/lựa chọn cây giống trên cơ sở phân tích các trình tự nucleotide.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi thực hiện giải mã trình tự nucleotide vùng gen *ITS* của loài Hoàng liên ô rô lá dày phân bố ở Việt Nam, với mục tiêu là tìm hiểu về đặc điểm phân tử cũng như đánh giá khả năng phân loại của vùng gen này, góp phần bổ sung cơ sở dữ liệu về di truyền cho loài; tiếp theo là phát triển cặp mồi đặc hiệu phục vụ cho công tác giám định, bảo tồn nguồn gen loài Hoàng liên ô rô lá dày của Việt Nam.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu

Hai mẫu lá loài Hoàng liên ô rô lá dày được nhóm nghiên cứu của Phòng Dân tộc học thực vật, Viện Sinh thái và Tài nguyên Sinh vật thu tại Hà Giang năm 2018 (ký hiệu mẫu SM02) và thu tại Bát Xát (Lào Cai) năm 2011 (ký hiệu mẫu BLC03). Ngoài ra, 4 mẫu khác thuộc họ Berberidaceae gồm:

- *B. hypoxantha* thu tại Sa Pa, Lào Cai năm 2016 (ký hiệu mẫu B1).
- *B. julianae* thu tại Sa Pa, Lào Cai năm 2007 (SB01).
- *M. jingxiensis* thu tại Hàm Yên, Tuyên Quang năm 2018 (C307).
- *M. klossii* thu tại Đà Lạt, Lâm Đồng năm 2017 (DL02).

4 mẫu trên được sử dụng để làm mẫu đối chứng cũng như để xây dựng cây phát sinh chủng loại nhằm so sánh về khoảng cách di truyền với loài *M. bealei* thu tại Hà Giang và Lào Cai.

Phương pháp nghiên cứu

Tách chiết DNA tổng số: DNA tổng số được tách chiết theo phương pháp của J.J. Doyle và J.L. Doyle (1990) [8]

(có hiệu chỉnh để phù hợp với điều kiện phòng thí nghiệm của Việt Nam).

Nhân bản gen ITS bằng kỹ thuật PCR: vùng gen ITS dài 700 bp của cả 6 mẫu nghiên cứu được nhân bản bằng PCR với cặp mồi ITS1/ITS2 (5'-CCCTTATCAYTTAGAGGAAGGAG-3'/5'-CCGCTTAKTGATATGCTTAAA-3' [9]. Mỗi phản ứng PCR có thể tích 30 μ l với các thành phần: 15 μ l PCR Master mix kit (2X), 0,5 μ l mồi xuôi (10 pmol/ μ l), 0,5 μ l mồi ngược (10 pmol/ μ l), 1 μ l ADN (10-20 ng) và cuối cùng là 13 μ l H₂O deion. Phản ứng được thực hiện trên máy PCR model SimpliAmp của Hãng Applied Biosystems-Life Technologies-Thermo Fisher Scientific (Hoa Kỳ). Chu trình nhiệt của phản ứng PCR với 35 chu kỳ gồm: biến tính DNA ở 94°C trong 3 phút; 94°C trong 45 giây, bắt cặp mồi ở 55°C trong 30 giây, kéo dài sợi DNA ở 72°C trong 30 giây; kết thúc phản ứng nhân gen ở 72°C trong 5 phút và giữ sản phẩm ở 15°C. Kiểm tra sản phẩm PCR bằng điện di trên gel agarose 1%.

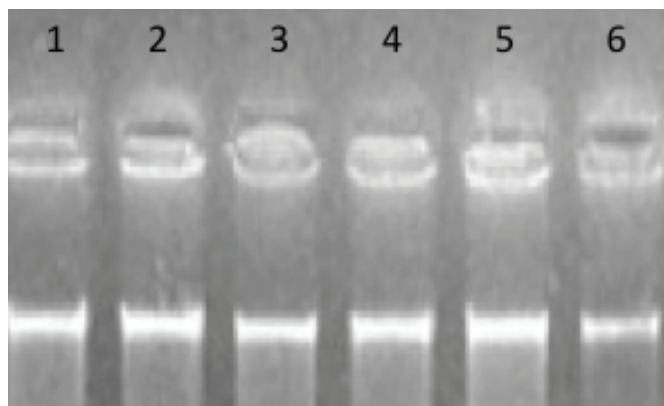
Giải trình tự và xử lý số liệu: quá trình xác định trình tự nucleotide được thực hiện tại Công ty Firstbase (Malaysia). Trình tự DNA thu được sau đó được kiểm tra và ghép nối bằng phần mềm Chromas-Pro2.1.6 (Technelysium Pty Ltd, Úc). Trình tự nucleotide vùng gen ITS của mẫu Hoàng liên ô rô lá dày (SM02 và BLC03) sau khi ghép nối và loại bỏ phần nhiễu được đưa vào BLAST (NCBI) để so sánh với các trình tự sẵn có trên Genbank nhằm kiểm tra tính chính xác của vùng gen được khuếch đại. Các trình tự phân tích được sắp xếp thẳng hàng bằng phần mềm Bioedit v7.0.5.2 [10]. Các vùng nucleotide bị nhiễu hoặc không tương ứng với nhau sẽ bị loại bỏ trước khi tiến hành phân tích.

Xây dựng cây phát sinh chủng loại: cây phát sinh chủng loại được xây dựng dựa trên phương pháp xác suất tối đa ML (Maximum Likelihood). Thực hiện với 1.000 lần lặp lại để xác định giá trị ủng hộ (bootstrap). Khoảng cách di truyền (*P*) giữa các loài trong chi được tính toán bằng phần mềm Mega 7.0 [11] theo mô hình Kimura hai tham số.

Kết quả và thảo luận

Kết quả tách chiết DNA tổng số

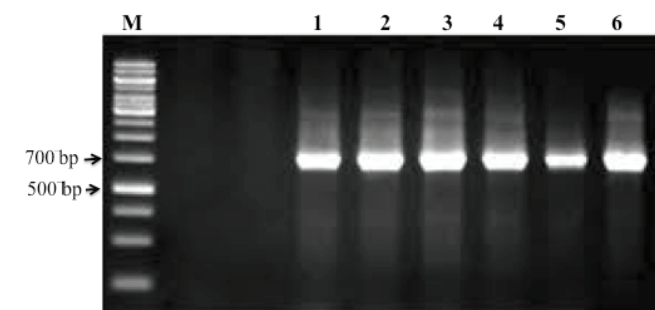
DNA tổng số của 6 mẫu nghiên cứu sau khi tách chiết được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1% (hình 1). Kết quả điện di kiểm tra cho thấy, vạch DNA thu được rõ nét chứng tỏ DNA tổng số ít bị đứt gãy và tương đối sạch. Kết quả đo OD cũng cho thấy chỉ số OD₂₆₀/OD₂₈₀ của các mẫu đều từ 1,81 đến 1,83, chứng tỏ hàm lượng DNA thu được có độ tinh khiết cao.



Hình 1. Kết quả kiểm tra DNA tổng số 6 mẫu nghiên cứu trên gel agarose 1% (giếng số 1-6: thứ tự các mẫu lần lượt là SM02, BLC03, B1, SB01, C307, DL02).

Kết quả nhân bản trình tự gen ITS bằng PCR

Kết quả điện di sản phẩm PCR cho thấy cả 6 mẫu đều xuất hiện 1 vạch rõ nét có kích thước khoảng 700 bp (hình 2), chứng tỏ cặp mồi ITS1/ITS2 đã nhân bản thành công ở nhiệt độ gắn mồi là 55°C cho cả 6 mẫu nghiên cứu. Sản phẩm PCR sáng đậm, rõ nét, đủ tiêu chuẩn để giải mã trình tự nucleotide trực tiếp.



Hình 2. Sản phẩm PCR 6 mẫu nghiên cứu khi kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1% (M: marker phân tử DNA 1 kb ladder; giếng 1-6: thứ tự các mẫu nghiên cứu lần lượt là SM02, BLC03, B1, SB01, C307, DL02).

Kết quả phân tích trình tự gen ITS

Kết quả kiểm tra tính tương đồng trình tự vùng gen ITS của mẫu Hoàng liên ô rô lá dày với các trình tự sẵn có trên Genbank cho thấy, trình tự vùng gen ITS của cả 2 mẫu *M. bealei* SM02 và BLC03 giống hệt nhau và đều cho kết quả tương đồng 100% với loài *B. bealei* mã số MG730545 (loài của Trung Quốc). Điều này chứng tỏ mẫu nghiên cứu là loài *B. bealei* và kết quả PCR đã nhân bản chính xác vùng gen ITS.

Thông thường, kết quả BLAST không cho kết luận chính xác về loài, nhưng với những trường hợp BLAST có độ bao phủ và tương đồng cao (trên 98%) thì có thể đưa ra

gợi ý về những loài gần gũi với mẫu nghiên cứu. Kết quả so sánh vùng gen ITS của 4 mẫu nghiên cứu còn lại trên Genbank cũng đều cho thấy sự gần gũi với các loài trong chi *Berberis*, cụ thể mẫu DL02 (*M. klossii*) gần gũi 93% với loài *B. bealei* (mã số MG730545); C307 (*M. jingxiensis*) gần gũi 97% với loài *B. dictyophylla* (mã số X83829.1); SB01 (*B. julianae*) gần gũi 97,27% với loài *B. hemsleyana* (mã số KY 624390); và B1 (*B. hypoxantha*) gần gũi 97,89% với loài *B. bealei* (mã số MG730545). Điều đó cho thấy chúng tôi đã khuếch đại thành công vùng gen ITS cho tất cả 6 mẫu nghiên cứu.

Kết quả kiểm tra trình tự nucleotide vùng gen ITS dài 700 bp của loài *M. bealei* cho thấy tỷ lệ phần trăm các nucleotide T, G, A và C lần lượt là 24,1, 28,4, 23,4 và 24,1%. Trong đó, có 59 vị trí biến đổi (variable) và 27 vị trí nucleotide có giá trị mang thông tin di truyền (Parsimony).

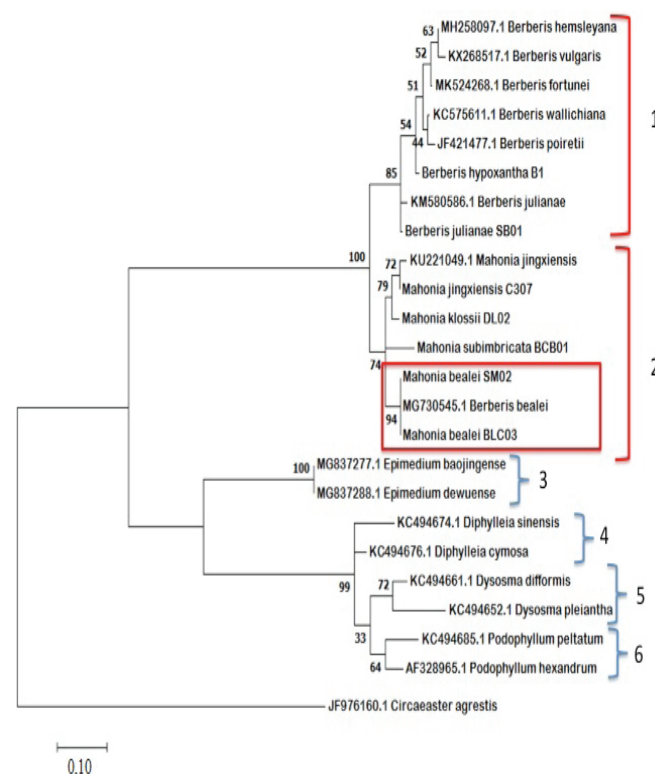
Khoảng cách di truyền và vị trí phân loại của loài Hoàng liên ô rô lá dày

Trình tự nucleotide vùng gen ITS của mẫu SM02 và BLC03 sau khi loại bỏ tất cả các vị trí trống thì được so sánh với 20 loài khác của họ *Berberidaceae*, trong đó có 17 loài lấy dữ liệu trên Genbank, gồm 16 loài họ *Berberidaceae* (7 loài thuộc chi *Berberis*, 1 loài thuộc *Mahonia*, 2 loài thuộc *Epimedium*, 2 loài thuộc *Diphylleia*, 2 loài thuộc *Dysosma*, 2 loài thuộc *Podophyllum*) và 1 loài Tinh diệp thảo (*Circaeaster agrestis*) được sử dụng là loài ngoài nhóm (bảng 1); 4 loài khác là các mẫu B1 (*B. hypoxantha*), SB01 (*B. julianae*), C307 (*M. jingxiensis*) và DL02 (*M. klossii*).

Bảng 1. Danh sách 17 loài lấy dữ liệu từ Genbank dùng để so sánh với 6 mẫu nghiên cứu.

TT	Tên loài	Mã số Genbank
1	<i>B. hemsleyana</i>	MH258097.1
2	<i>B. vulgaris</i>	KX268517.1
3	<i>B. fortunei</i>	MK524268
4	<i>B. wallichiana</i>	KC575611.1
5	<i>B. poiretii</i>	JF421477.1
6	<i>B. julianae</i>	KM580586.1
7	<i>M. jingxiensis</i>	KU221049.1
8	<i>B. bealei</i>	MG730545.1
9	<i>Epimedium baojingense</i>	MG837277.1
10	<i>Epimedium dewuense</i>	MG837288.1
11	<i>Diphylleia sinensis</i>	KC494674.1
12	<i>Diphylleia cymosa</i>	KC494676.1
13	<i>Dysosma difformis</i>	KC494661.1
14	<i>Dysosma pleiantha</i>	KC494652.1
15	<i>Podophyllum peltatum</i>	KC494685.1
16	<i>Podophyllum hexandrum</i>	AF328965.1
17	<i>Circaeaster agrestis</i>	AF328965.1

Sơ đồ mối quan hệ di truyền của 23 loài họ *Berberidaceae* đã được xây dựng theo phương pháp ML. Theo đó, 23 loài nghiên cứu chia thành 2 nhánh chính lớn: nhánh chính lớn 1 gồm các loài của chi *Berberis* và *Mahonia*; nhánh chính lớn 2 gồm các loài của chi *Epimedium*, *Diphylleia*, *Dysosma* và *Podophyllum*. Trong đó, nhánh chính lớn 1 lại chia thành 2 nhánh phụ, gồm nhánh phụ số 1 (các loài thuộc chi *Berberis*) và 2 (các loài thuộc chi *Mahonia*). Nhánh chính lớn 2 cũng chia thành 4 nhánh phụ nhỏ hơn tương ứng với các chi khác nhau (nhánh phụ số 3, 4, 5, 6) (hình 3). Điều đó cho thấy, *Berberis* và *Mahonia* là 2 chi có quan hệ rất gần gũi với nhau, cụ thể khoảng cách di truyền trung bình của 2 chi này là 0,0236 ($\approx 2,3\%$) (tính trung bình trên 7 mẫu *Mahonia* và 8 mẫu *Berberis* nghiên cứu), trong khi đó khoảng cách di truyền trung bình giữa chi *Mahonia* với *Dysosma* lên đến 0,223 ($\approx 22,3\%$), với chi *Epimedium* là 0,198 ($\approx 19,8\%$) và *Podophyllum* là 0,214 ($\approx 21,4\%$). Ở nhánh chính lớn số 2 kết quả phân tích bằng khoảng cách di truyền cho thấy, chi *Podophyllum* có quan hệ gần gũi với *Dysosma* với khoảng cách di truyền (P) là 0,041 ($\approx 4,1\%$) (tính trung bình trên 4 mẫu nghiên cứu) (hình 4).



Hình 3. Sơ đồ mối quan hệ di truyền của 6 mẫu nghiên cứu với 17 loài khác trên cơ sở phân tích trình tự nucleotide vùng gen ITS-rDNA bằng phương pháp ML [loài Tinh diệp thảo (*Circaeaster agrestis*) được sử dụng làm loài ngoài nhóm].

M:\P\Pairwise Distances\10Users\AJUMN-1\Apps\Tools\Local\emp\pairwise\analysis\Zmg

File Display Averages Options Help

(A) (B) (C) (D) (E) (F) (G) (H) (I) (J) (K) (L) (M) (N) (O) (P) (Q) (R) (S) (T) (U) (V) (W) (X) (Y) (Z) (AA) (AB) (AC) (AD) (AE) (AF) (AG) (AH) (AI) (AJ) (AK) (AL) (AM) (AN) (AO) (AP) (AQ) (AR) (AS) (AT) (AU) (AV) (AW) (AX) (AY) (AZ) (BA) (BB) (BC) (BD) (BE) (BF) (BG) (BH) (BI) (BJ) (BK) (BL) (BM) (BN) (BO) (BP) (BQ) (BR) (BS) (BT) (BU) (BV) (BW) (BX) (BY) (BZ) (CA) (CB) (CC) (CD) (CE) (CF) (CG) (CH) (CI) (CJ) (CK) (CL) (CM) (CN) (CO) (CP) (CQ) (CR) (CS) (CT) (CU) (CV) (CW) (CX) (CY) (CZ) (DA) (DB) (DC) (DD) (DE) (DF) (DG) (DH) (DI) (DJ) (DK) (DL) (DM) (DN) (DO) (DP) (DQ) (DR) (DS) (DT) (DU) (DV) (DW) (DX) (DY) (DZ) (EA) (EB) (EC) (ED) (EE) (EF) (EG) (EH) (EI) (EJ) (EK) (EL) (EM) (EN) (EO) (EP) (EQ) (ER) (ES) (ET) (EU) (EV) (EW) (EX) (EY) (EZ) (FA) (FB) (FC) (FD) (FE) (FF) (FG) (FH) (FI) (FJ) (FK) (FL) (FM) (FN) (FO) (FP) (FQ) (FR) (FS) (FT) (FU) (FV) (FW) (FX) (FY) (FZ) (GA) (GB) (GC) (GD) (GE) (GF) (GG) (GH) (GI) (GJ) (GK) (GL) (GM) (GN) (GO) (GP) (GQ) (GR) (GS) (GT) (GU) (GV) (GW) (GX) (GY) (GZ) (HA) (HB) (HC) (HD) (HE) (HF) (HG) (HH) (HI) (HJ) (HK) (HL) (HM) (HN) (HO) (HP) (HQ) (HR) (HS) (HT) (HU) (HV) (HW) (HX) (HY) (HZ) (IA) (IB) (IC) (ID) (IE) (IF) (IG) (IH) (II) (IJ) (IK) (IL) (IM) (IN) (IO) (IP) (IQ) (IR) (IS) (IT) (IU) (IV) (IW) (IX) (IY) (IZ) (JA) (JB) (JC) (JD) (JE) (JF) (JG) (JH) (JI) (JJ) (JK) (JL) (JM) (JN) (JO) (JP) (JQ) (JR) (JS) (JT) (JU) (JV) (JW) (JX) (JY) (JZ) (KA) (KB) (KC) (KD) (KE) (KF) (KG) (KH) (KI) (KJ) (KK) (KL) (KM) (KN) (KO) (KP) (KQ) (KR) (KS) (KT) (KU) (KV) (KW) (KX) (KY) (KZ) (LA) (LB) (LC) (LD) (LE) (LF) (LG) (LH) (LI) (LJ) (LK) (LL) (LM) (LN) (LO) (LP) (LQ) (LR) (LS) (LT) (LU) (LV) (LW) (LX) (LY) (LZ) (MA) (MB) (MC) (MD) (ME) (MF) (MG) (MH) (MI) (MJ) (MK) (ML) (MN) (MO) (MP) (MQ) (MR) (MS) (MT) (MU) (MV) (MW) (MX) (MY) (MZ) (NA) (NB) (NC) (ND) (NE) (NF) (NG) (NH) (NI) (NJ) (NK) (NL) (NM) (NN) (NO) (NP) (NQ) (NR) (NS) (NT) (NU) (NV) (NW) (NX) (NY) (NZ) (OA) (OB) (OC) (OD) (OE) (OF) (OG) (OH) (OI) (OJ) (OK) (OL) (OM) (ON) (OO) (OP) (OQ) (OR) (OS) (OT) (OU) (OV) (OW) (OX) (OY) (OZ) (PA) (PB) (PC) (PD) (PE) (PF) (PG) (PH) (PI) (PJ) (PK) (PL) (PM) (PN) (PO) (PP) (PQ) (PR) (PS) (PT) (PU) (PV) (PW) (PX) (PY) (PZ) (QA) (QB) (QC) (QD) (QE) (QF) (QG) (QH) (QI) (QJ) (QK) (QL) (QM) (QN) (QO) (QP) (QQ) (QR) (QS) (QT) (QU) (QV) (QW) (QX) (QY) (QZ) (RA) (RB) (RC) (RD) (RE) (RF) (RG) (RH) (RI) (RJ) (RK) (RL) (RM) (RN) (RO) (RP) (RQ) (RR) (RS) (RT) (RU) (RV) (RW) (RX) (RY) (RZ) (SA) (SB) (SC) (SD) (SE) (SF) (SG) (SH) (SI) (SJ) (SK) (SL) (SM) (SN) (SO) (SP) (SQ) (SR) (SS) (ST) (SU) (SV) (SW) (SX) (SY) (SZ) (TA) (TB) (TC) (TD) (TE) (TF) (TG) (TH) (TI) (TJ) (TK) (TL) (TM) (TN) (TO) (TP) (TQ) (TR) (TS) (TT) (TU) (TV) (TW) (TX) (TY) (TZ) (UA) (UB) (UC) (UD) (UE) (UF) (UG) (UH) (UI) (UJ) (UK) (UL) (UM) (UN) (UO) (UP) (UQ) (UR) (US) (UT) (UU) (UV) (UW) (UX) (UY) (UZ) (VA) (VB) (VC) (VD) (VE) (VF) (VG) (VH) (VI) (VJ) (VK) (VL) (VM) (VN) (VO) (VP) (VQ) (VR) (VS) (VT) (VU) (VV) (VW) (VX) (VY) (VZ) (WA) (WB) (WC) (WD) (WE) (WF) (WG) (WH) (WI) (WJ) (WK) (WL) (WM) (WN) (WO) (WP) (WQ) (WR) (WS) (WT) (WU) (WV) (WW) (WX) (WY) (WZ) (XA) (XB) (XC) (XD) (XE) (XF) (XG) (XH) (XI) (XJ) (XK) (XL) (XM) (XN) (XO) (XP) (XQ) (XR) (XS) (XT) (XU) (XV) (XW) (XX) (XY) (XZ) (YA) (YB) (YC) (YD) (YE) (YF) (YG) (YH) (YI) (YJ) (YK) (YL) (YM) (YN) (YO) (YP) (YQ) (YR) (YS) (YT) (YU) (YV) (YW) (YX) (YY) (YZ) (ZA) (ZB) (ZC) (ZD) (ZE) (ZF) (ZG) (ZH) (ZI) (ZJ) (ZK) (ZL) (ZM) (ZN) (ZO) (ZP) (ZQ) (ZR) (ZS) (ZT) (ZU) (ZV) (ZW) (ZX) (ZY) (ZZ)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
1. Mahonia bealei BLC03																								
2. Mahonia bealei SM02	0.000																							
3. MHST05451 Mahonia bealei	0.000	0.000																						
4. Mahonia bealei DUS	0.014	0.014	0.014																					
5. MHST05451 Mahonia japonensis	0.017	0.017	0.017	0.017																				
6. Mahonia japonensis C07	0.014	0.014	0.014	0.007	0.003																			
7. Mahonia adnigracoma B0301	0.021	0.021	0.021	0.017	0.021	0.017																		
8. MHST05361 Mahonia japonensis	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	
9. Mahonia japonensis S001	0.028	0.028	0.028	0.028	0.028	0.028	0.028	0.028	0.028	0.028	0.028	0.028	0.028	0.028	0.028	0.028	0.028	0.028	0.028	0.028	0.028	0.028	0.028	
10. MHST05361 Mahonia fortunei	0.035	0.035	0.035	0.035	0.035	0.035	0.035	0.035	0.035	0.035	0.035	0.035	0.035	0.035	0.035	0.035	0.035	0.035	0.035	0.035	0.035	0.035	0.035	
11. MHST05361 Mahonia vulgaris	0.042	0.042	0.042	0.042	0.042	0.042	0.042	0.042	0.042	0.042	0.042	0.042	0.042	0.042	0.042	0.042	0.042	0.042	0.042	0.042	0.042	0.042	0.042	
12. Mahonia japonensis B1	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	
13. Mahonia japonensis B2	0.018	0.018	0.018	0.018	0.018	0.018	0.018	0.018	0.018	0.018	0.018	0.018	0.018	0.018	0.018	0.018	0.018	0.018	0.018	0.018	0.018	0.018	0.018	
14. MHST05161 Mahonia henryana	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038	
15. MHST05161 Mahonia wallachiana	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038	
16. MHST05161 Mahonia pumila	0.042	0.042	0.042	0.042	0.042	0.042	0.042	0.042	0.042	0.042	0.042	0.042	0.042	0.042	0.042	0.042	0.042	0.042	0.042	0.042	0.042	0.042	0.042	
17. MHST05161 Mahonia pumila	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	
18. MHST05161 Mahonia pumila	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	
19. MHST05161 Mahonia pumila	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	
20. MHST05161 Mahonia pumila	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	
21. MHST05161 Mahonia pumila	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	
22. MHST05161 Mahonia pumila	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	
23. MHST05161 Mahonia pumila	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	
24. MHST05161 Mahonia pumila	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	

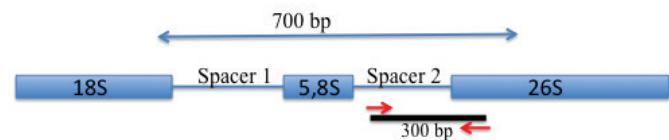
Hình 4. Bảng khoảng cách di truyền giữa 24 mẫu nghiên cứu.

Thiết kế cặp mồi khuếch đại đặc hiệu vùng gen ITS-300 cho loài *M. bealei*

Trình tự vùng gen ITS dài 700 bp của loài Hoàng liên ô rô lá dày sau khi được so sánh với trình tự gen ITS của 22 loài khác đã phát hiện ra một đoạn trình tự dài khoảng 300 nucleotide nằm giữa vùng Spacer 2 và 26S có chứa đến 35 vị trí biến đổi, trong đó có 19 vị trí nucleotide có giá trị mang thông tin di truyền (có ý nghĩa Parsimony) (hình 5). Điều này gợi ý cho chúng tôi có thể xác định được một vùng ITS đặc hiệu cho loài *M. bealei*.

Hình 5. Bảng tổng hợp các vị trí nucleotide biến đổi trong đoạn 300 nucleotide thuộc vùng gen ITS.

Chúng tôi đã tiến hành thiết kế cặp mồi theo nguyên tắc mồi xuôi có trình tự cùng trình tự với mạch gốc DNA, trong đó 2/3 trình tự mồi nằm trong vùng bảo thủ, 1/3 trình tự mồi nằm trong vùng siêu biến đổi (là vùng ITS dài 300 bp); mồi ngược có trình tự bổ sung với mạch DNA gốc, cũng có 2/3 đoạn trình tự nằm trong vùng bảo thủ bao 2 đầu của đoạn gen chứa nhiều vị trí biến đổi và 1/3 đoạn trình tự nằm trong vùng siêu biến đổi (hình 6). Hai đầu mỗi mồi đều có chứa G, C đảm bảo độ bắt cặp chắc chắn cho mồi trong quá trình khuếch đại gen bằng PCR. Mỗi mồi (xuôi và ngược) gồm 21 nucleotide, trong đó có 10 GC (chiếm 48%) và 11 AT (chiếm 52%).



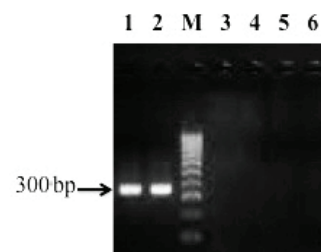
Hình 6. Sơ đồ đoạn mồi thiết kế để khuếch đại vùng chứa nhiều vị trí biến đổi dài 300 bp của gen ITS. Trình tự mồi thiết kế như sau (ký hiệu mồi ITS-300): mồi xuôi (F): 5'- GCA-ATT-CAC-ACC-AAG-TAT-CGC-3'; mồi ngược (R): 5'- GCG-ATA-CTT-GGT-GTG-AAT-TGC-3'.

Nhiệt độ bắt cặp Tm được tính theo công thức:

$T_m = 4(G+C) + 2(A + T)$, theo đó nhiệt độ bắt cặp lý thuyết của cả 2 mồi xuôi và mồi ngược đều 62°C.

Cặp mồi sau đó đã được kiểm tra bằng PCR cho 2 mẫu nghiên cứu SM02, BLC03 (*M. bealei*), và 4 mẫu đối chứng gồm B1 (*B. hypoxantha*), SB01 (*B. julianae*), DL02 (*M. klossii*) và C307 (*M. jingxiensis*). Phản ứng trùng hợp (PCR) khuếch đại gen ITS-300 được thực hiện với 35 chu kỳ, bắt cặp ở 58°C trong 30 giây.

Kết quả PCR sau đó được kiểm tra trên gel agarose 1% cho thấy 2 mẫu *M. bealei* (SM02 và BLC03) đều cho một vạch sắc nét có kích thước ≈ 300 bp, trong khi 4 mẫu đối chứng (gồm B1, SB01, DL02 và C307) đều không có vạch (hình 7). Điều đó cho thấy, khả năng cặp mồi ITS-300 là đặc hiệu cao cho loài *M. bealei*. Sản phẩm PCR này sau đó đã được đọc trình tự và kết quả so sánh trên BLAST cho thấy đây đúng là đoạn gen ITS của loài *M. bealei*. Trình tự đoạn gen ITS-300 này của loài *M. bealei* đã được chúng tôi đăng ký lên Genbank và được cấp mã số là MT 008067.



Hình 7. Kết quả PCR kiểm tra tính đặc hiệu của mồi ITS-300 trên 6 mẫu nghiên cứu (giếng số 1, 2: mẫu SM02, BLC 03, M: DNA 1 kb ladder, Lane 3, 4, 5, 6 lần lượt là các mẫu B1, SB01, DL02, C307).

Nghiên cứu của Y.D. Kim và cs năm 1996 [12] (dựa trên trình tự vùng gen *rbcl*, ITS) và nghiên cứu năm 2004 [13] (dựa trên trình tự gen *ndhF*) đều cho thấy, chi *Berberis* và *Mahonia* tách thành 2 nhóm riêng biệt dù có quan hệ rất gần gũi với nhau. Trong nghiên cứu này của chúng tôi, dựa trên phân tích trình tự vùng gen ITS cũng cho thấy mặc dù khoảng cách di truyền trung bình giữa các loài của chi *Berberis* và *Mahonia* chỉ là 0,0236 nhưng chúng vẫn sắp xếp thành các nhóm riêng rẽ, điều này hoàn toàn phù hợp với các nghiên cứu về hình thái và phân tử trước đó.

Việc phát triển cặp mồi khuếch đại được vùng gen ITS đặc hiệu sẽ giúp cho công tác giám định loài Hoàng liên ô rô lá dày ở Việt Nam trở nên nhanh chóng, bởi xác định loài với thông tin chính xác là một trong những chìa khóa để cải thiện công tác quản lý và bảo tồn loài [14].

Kết luận

Kết quả phân tích trình tự gen ITS loài *M. bealei* cho thấy vùng gen này không chỉ được sử dụng hiệu quả như một mã vạch để xác định các loài thuộc chi *Mahonia*, mà còn là vùng gen rất hữu ích cho phân tích phát sinh chủng loại các loài thuộc họ *Berberidaceae* nói chung, chi *Mahonia* nói riêng.

Việc phát triển cặp mồi khuếch đại vùng gen ITS dài 300 bp đặc hiệu của loài *M. bealei* góp phần đưa ra phương pháp nhanh chóng và chính xác để xác định loài này, đây là vấn đề rất hữu ích, góp phần quan trọng cho công tác bảo tồn nguồn gen một loài dược liệu quý.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được hỗ trợ kinh phí từ đề tài của Quỹ Phát triển Khoa học và Công nghệ Quốc gia (mã số 106-NN.03-2016.49) và của Viện Sinh thái và Tài nguyên Sinh vật (mã số IEBR ĐT.13-20). Các tác giả xin chân thành cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] J.M. He, Q. Mu (2015), "The medicinal uses of the genus *Mahonia* in traditional Chinese medicine: an ethnopharmacological, phytochemical and pharmacological review", *Journal of Ethnopharmacol.*, **175**, pp.668-683.

[2] Bui Van Huong, Ngo Duc Phuong, Nguyen Trung Thanh, Tran Van Tu, Nguyen Thai Son, Nguyen Thi Van Anh, Bui Van Thanh (2017), "Biological and ecological characteristics of *Mahonia bealei* (Fortune) Pynaert in Vietnam", *Journal of Science and Technology*, **33**, pp.51-57.

[3] Do Tat Loi (2004), *Vietnamese medicinal plants and herbs*, Medicine Publishing House.

[4] Bui Van Huong, Bui Van Thanh, Nguyen Thi Van Anh, Pham Huyen (2017), "Research on cutting propagation of *Mahonia bealei* (Fortune) Pynaert", *National conference on ecology and biological resources*.

[5] W.J. Kress (2005), "Use of DNA barcodes to identify flowering plants", *PNAS*, **102**, pp.8369-8374.

[6] R. Lahaye (2008), "DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots", *PNAS*, **105**, pp.2923-2928.

[7] S. Chen (2010), "Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species", *PLOS ONE*, **5**, p.e8613.

[8] J.J. Doyle, J.L. Doyle (1990), "Isolation of plant DNA from fresh tissue", *Focus*, **12**, pp.13-15.

[9] T. Cheng (2016), "Barcoding the kingdom plantae: new PCR primer for ITS region of plants with improved universality and specificity", *Molecular Ecology Resources*, **16**, pp.138-149.

[10] T.A. Hall (1999), "BioEdit v7.0.5.2: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT", *Nucleic Acids Symposium Series*, **41**, pp.95-98.

[11] S. Kumar, G. Stecher, K. Tamura (2016), "MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets", *Molecular Biology and Evolution*, **33**, pp.1870-1874.

[12] Y.D. Kim, K.J. Robert (1996), "Phylogenetic implications of rbcL and ITS sequence variation in the *Berberidaceae*", *Systematic Botany*, **21**, pp.381-396.

[13] Y.D. Kim (2004), "Phylogeny of *Berberidaceae* based on sequences of the chloroplast gene *ndhF*", *Biochemistry Systematics and Ecology*, **32**, pp.291-301.

[14] A.T. Blasi, M. Vorontsova (2015), "Plant identification is key to conservation", *Nature*, **521**, p.161.

Xây dựng đặc điểm vi học và mã vạch ADN phục vụ định danh cây cam thảo Đá Bia

Thái Hồng Đăng^{1,2,3*}, Hoàng Xuân Lâm¹, Bùi Ngọc Duy¹, Huỳnh Kim Quyên¹, Dương Nguyên Xuân Lâm²,
Huỳnh Thị Hồng Phượng⁴, Trần Thị Vân Anh²

¹Trung tâm Nghiên cứu và Sản xuất Dược liệu miền Trung

²Khoa Dược, Trường Đại học Y Dược TP Hồ Chí Minh

³Khoa Dược, Trường Đại học Công nghệ TP Hồ Chí Minh

⁴Công ty TNHH MTV Sinh hóa Phù Sa

Ngày nhận bài 21/7/2020; ngày chuyển phản biện 30/7/2020; ngày nhận phản biện 23/9/2020; ngày chấp nhận đăng 6/10/2020

Tóm tắt:

Cam thảo Đá Bia (CTĐB) *Jasminanthes tuyetanhiiae* T.B. Tran & Rodda, Apocynaceae là loài cây đặc hữu của vùng núi Đá Bia, Tuy Hòa, Phú Yên. Bộ phận thân và rễ của cây có vị ngọt, được các thầy thuốc địa phương sử dụng thay thế cam thảo bắc trong các bài thuốc cổ truyền. Với mục đích phát triển cây thuốc trong tương lai, các tác giả thực hiện nghiên cứu đặc điểm vi học và phân tích trình tự gen ITS, rbcL để làm cơ sở cho việc định danh cây thuốc này. CTĐB có cấu tạo vi phẫu đặc trưng của các cây họ Apocynaceae như ống nhựa mủ thật, libe quanh tủy và cụm tế bào sợi vách cellulose. Trình tự đoạn ITS1-5.8S rARN-ITS2 và rbcL của mẫu lá non CTĐB đã được công bố trên ngân hàng GenBank NCBI với mã MT084410.1 và MT089916, so sánh với trình tự ADN của mẫu đối chứng *Jasminanthes mucronata* (Blanco) W.D. Stevens & P.T.L có mức độ tương đồng lần lượt là 92,69 và 100%. Đây là lần đầu tiên trình tự gen cây CTĐB được nghiên cứu và công bố, đoạn ITS1-5.8S rARN-ITS2 và rbcL có tiềm năng làm mã vạch ADN dùng cho định danh CTĐB.

Từ khóa: ADN, cam thảo Đá Bia, ITS, *Jasminanthes tuyetanhiiae*, rbcL, vi học.

Chỉ số phân loại: 3.4

Đặt vấn đề

Hơn 30 năm trước, đoàn điều tra dược liệu của tỉnh Phú Khánh khi điều tra vùng núi Đá Bia, Đông Hòa, Phú Yên đã phát hiện một loài cây có vị ngọt như dược liệu cam thảo bắc nên đặt tên là CTĐB [1]. Do tác dụng độc đáo nên khi được công bố, CTĐB bị khai thác triệt để, dẫn đến chỉ còn vài cá thể ít ỏi và được đưa vào Sách đỏ Việt Nam năm 2007 với tên CTĐB *Telosma procumbens* (Blanco) Merr. Asclepiadaceae (EN B1+2B) [2]. Tháng 8/2017, nhóm nghiên cứu thuộc Trung tâm Nghiên cứu và Sản xuất Dược liệu miền Trung cùng với các chuyên gia và TS Trần Thế Bách thu được mẫu ra hoa CTĐB, CTĐB được định danh lại và mang danh pháp khoa học mới *Jasminanthes tuyetanhiiae* T.B. Tran & Rodda Apocynaceae, Asclepiadoideae [3].

Định danh chính xác thực vật là bước quan trọng đầu tiên trong nghiên cứu và kiểm nghiệm dược liệu, ngoài các đặc điểm về hình thái, còn cần kết hợp thêm chỉ tiêu về đặc điểm vi học, hóa học. Gần đây, việc áp dụng các phương pháp định danh dựa trên đặc điểm di truyền ngày càng được ứng dụng nhiều để việc định danh thực vật ngày một chính xác hơn. Trên thực vật, mã vạch ADN (DNA barcode) là phương pháp phổ biến nhất dựa trên những đoạn ADN ngắn, kém được bảo tồn, thay đổi nhiều trong tiến hóa nhưng không khác nhau quá mức giữa cá thể trong cùng loài, thường là

trình tự thuộc hệ gen lục lạp như rbcL, psbA-trnH, trnL-trnF, matK... hay các vùng trình tự không phiên mã nằm trong ADN của ribosome (rDNA) như internal transcribed spacer (ITS) [4].

Trong 8 loài thuộc chi *Jasminanthes*, chỉ có dữ liệu gen của loài *J. mucronata* (Blanco) W.D. Stevens & P.T. Li đã được công bố trên ngân hàng gen NCBI, bao gồm các gen trnL-trnF, matK, matR, AtpB, rbcL, ITS1-5.8S rARN-ITS2, G3pdh [5, 6]. Nhằm mục đích bảo tồn và phát triển một loại dược liệu quý, nhóm tác giả thực hiện nghiên cứu về đặc điểm vi học thực vật và giải trình tự gen ITS, rbcL, phục vụ cho việc định danh cây thuốc, làm tiền đề cho các nghiên cứu về hóa học và tác dụng dược lý.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu

Mẫu cây *Jasminanthes tuyetanhiiae* mọc tự nhiên được thu hái từ hệ sinh thái núi Đá Bia, Đông Hòa, Phú Yên vào tháng 8/2017, được định danh về mặt hình thái dựa trên công bố của TS Trần Thế Bách [3], lưu mẫu tại Trung tâm Nghiên cứu và Sản xuất Dược liệu miền Trung, Tuy Hòa, Phú Yên (hình 1). Các bộ phận rễ, thân, lá làm vật liệu khảo sát đặc điểm vi phẫu và vi học. Mẫu lá non làm vật liệu phân tích mã vạch ADN.

*Tác giả liên hệ: Email: th.dang@hutech.edu.vn

Plant anatomy and the DNA barcode for identification of Cam Thao Da Bia

Hong Dang Thai^{1,2,3*}, Xuan Lam Hoang¹, Ngoc Duy Bui¹,
Kim Quyen Huynh¹, Nguyen Xuan Lam Duong²,
Thi Hong Phuong Huynh⁴, Thi Van Anh Tran²

¹Middle Viet Nam Research and Manufacturing Medicinal Herb Centre

²Faculty of Pharmacy, University of Medicine and Pharmacy at Ho Chi Minh city

³Faculty of Pharmacy, Ho Chi Minh city University of Technology

⁴Phu Sa Biochem

Received 21 July 2020; accepted 6 October 2020

Abstract:

Cam Thao Da Bia (CTDB) *Jasminanthes tuyetanhiiae* T.B. Tran & Rodda, Apocynaceae is an endemic plant of the Da Bia mountainous region in Phu Yen province. The stems and roots of this plant with sweet taste are used as a substitution for licorice in traditional medicine. With the aim of developing this plant, the plant anatomy characteristics and the sequence of ITS and rbcL genes were analysed for establishing a method of identification of this medicinal plant. CTDB has the plant anatomy characteristics of the Apocynaceae family such as non-articulated laticifer, internal phloem, and a bunch of cellulose wall sclerenchyma fibers. The sequence of ITS1-5.8S rRNA-ITS2 and rbcL of CTDB young leaves were submitted in GenBank with code MT084410.1 and MT089916, respectively, in comparison with those of *Jasminanthes mucronata* (Blanco) W.D. Stevens & P.T. L., the similarity were 92.69 and 100%, respectively. This is the first time the gene sequence of this plant has been presented. The section ITS1-5.8S rRNA-ITS2 and rbcL offer great potential for establishing the DNA barcode to identify CTDB.

Keywords: Cam Thao Da Bia, DNA, ITS, *Jasminanthes tuyetanhiiae*, plant anatomy characteristics, rbcL.

Classification number: 3.4



Hình 1: Mẫu CTDB được trồng tại Trung tâm Nghiên cứu và Sản xuất Dược liệu miền Trung.

Hóa chất

Javel 50%, acid acetic 1%, lục iod 0,1%, dung dịch carmin 1%, glycerin 30%, đệm 2X CTAB, cloroform: isoamyl alcohol (24:1), dung dịch TAE 1X, PCR buffer (10X), EZ PCR mix (khô), nước DEPC, agarose, PHUSA loading buffer, loading dye 6x, ladder 1 kb plus, ADN marker, kit tinh sạch PCR purification kit (Jena Bioscience, Đức), ethanol 70%, ethanol 96%, các cặp mồi ITS (ITS1: TCCGTAGGTGAACCTGCGG/ITS4: TCCTCCGCTTATTGATATGC) [7] và rbcL (rbcL_F: ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC/rbcL_R: GAAACGGTCTCTCCAACGCAT) [8].

Phương pháp nghiên cứu

Khảo sát đặc điểm vi phẫu: cắt ngang rễ, thân, cuống lá và lá thành các lát mỏng, nhuộm bằng son phen và lục iod. Quan sát, mô tả và chụp ảnh các đặc điểm vi phẫu qua kính hiển vi quang học.

Khảo sát đặc điểm vi học: rễ, thân, lá được phơi khô, nghiền mịn và làm tiêu bản bột. Quan sát, mô tả và chụp ảnh các đặc điểm qua kính hiển vi.

Phân tích mã vạch ADN: tách chiết ADN tổng số từ mẫu lá tươi CTDB theo phương pháp sử dụng CTAB của J.J. Doyle và J.L. Doyle [9]. Kiểm tra mẫu ADN tách chiết được bằng phương pháp đo mật độ quang (OD) trên máy Nanodrop ở bước sóng 260 và 280 nm, đồng thời điện di kiểm tra trên thạch agarose 0,8% để xác định độ tinh sạch.

PCR được tiến hành để khuếch đại 2 vùng gen ITS1-ITS4 và rbcL_F-rbcL_R với dung tích 50 µl, các thành phần tham gia phản ứng gồm 2 µl ADN tách chiết, PCR

buffer 1X, EZ PCR mix (khô), 0,2 μ M mỗi xuôi, 0,2 μ M mỗi ngược và nước DEPC.

Chu trình nhiệt như sau: 95°C (3 phút), 35 chu kỳ [(95°C (30s), 59°C (30s), 72°C (45s), hoàn chỉnh ở 72°C (5 phút) và giữ sản phẩm ở 25°C (2 phút)]. Sau khi hoàn thành chương trình chạy, sản phẩm PCR được bổ sung thuốc nhuộm rồi tiến hành điện di kiểm tra trên thạch agarose 2%.

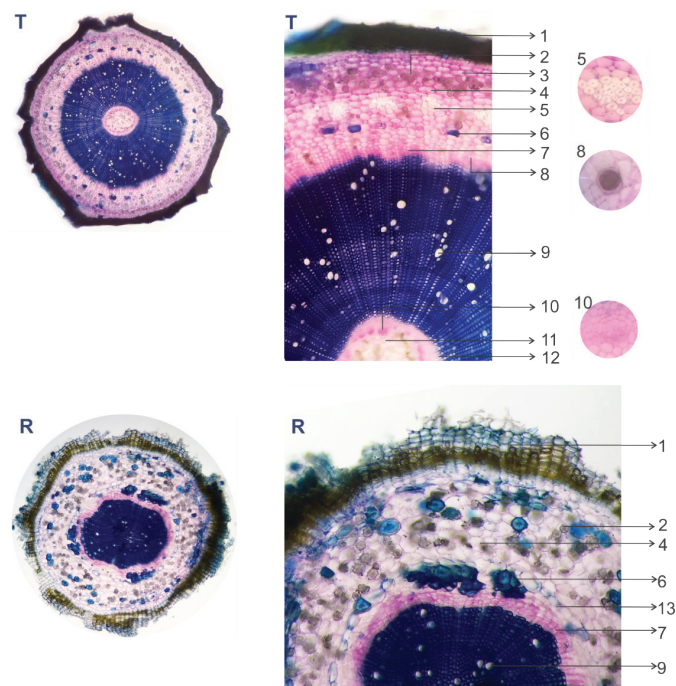
Những mẫu đúng kích thước được thu hồi bằng kit tinh sạch PCR purification kit (Jena Bioscience, Đức), thực hiện theo quy trình của nhà sản xuất: giải trình tự hai chiều sản phẩm PCR bằng phương pháp Sanger [10] trên hệ thống máy ABI 3130 (Applied Biosystems, Mỹ). Các trình tự sau khi thu nhận được lắp ráp và Blast so sánh với ngân hàng gen NCBI, xây dựng cây phát sinh loài bằng phần mềm Mega X.

Kết quả

Đặc điểm vi phẫu

Đặc điểm vi phẫu của thân: vi phẫu gần hình tròn, vùng vỏ chiếm 1/3 bán kính. Bần (T1) gồm các lớp tế bào hình chữ nhật, vách tằm bần và hơi uốn lượn, xếp thành dãy xuyên tâm, bên dưới là vài lớp mô dày góc (T3). Mô mềm vỏ (T4) tế bào hình bầu dục vách cellulose, kích thước không đều. Trong mô mềm vỏ rải rác có các tế bào mô cứng (T6), các bó sợi vách cellulose dày (T5) xếp thành một vòng không liên tục. Libe 1 xếp thành từng cụm, libe 2 (T7) gồm vài lớp tế bào hình đa giác hay chữ nhật, vách cellulose xếp thành dãy xuyên tâm, rải rác trong vùng libe có ống nhựa mù thật (T8). Gỗ 2 (T9) dày gấp 19-20 lần libe 2; mạch gỗ 2 tế bào hình đa giác, xếp lộn xộn hoặc thành dãy; mô mềm gỗ 2 hình đa giác, vách tằm gỗ, xếp thành dãy xuyên tâm. Tia tủy gồm 2-8 dãy tế bào. Bó gỗ 1 (T12) phân bố không đều, mỗi bó gồm 1-3 mạch gỗ hình đa giác; mô mềm gỗ 1 hình đa giác, vách cellulose, xếp lộn xộn. Libe quanh tủy (T10) xếp thành cụm to hay nhỏ, có cấu tạo giống libe 1. Mô mềm tủy đạo, tế bào hình gần tròn, vách cellulose, xếp lộn xộn. Tinh thể calci oxalat hình cầu gai (T2) có khá nhiều trong mô mềm vỏ, trụ bì và mô mềm tủy (hình 2).

Đặc điểm vi phẫu rễ: vi phẫu gần tròn, vùng vỏ chiếm 1/2 bán kính. Từ ngoài vào trong có bần (R1) gồm các lớp tế bào hình chữ nhật, vách tằm bần hơi uốn lượn và xếp dãy xuyên tâm. Mô mềm vỏ (R4) tế bào hình bầu dục vách cellulose, kích thước không đều. Nội bì đai caspary (R13) rõ. Trụ bì gồm vài lớp tế bào hình đa giác, hóa mô cứng (R6) xếp thành cụm hoặc riêng lẻ. Libe 2 (R7) tạo thành vòng quanh gỗ 2 chiếm tâm (R9); mạch gỗ 2 hình đa giác, xếp lộn xộn; mô mềm gỗ 2 tế bào hình đa giác, vách tằm chất gỗ, xếp xuyên tâm. Tia tủy 3-5 dãy tế bào đa giác. Tế bào mô cứng và tinh thể calci oxalat hình cầu gai (R2) khá nhiều trong mô mềm vỏ (hình 2).



Hình 2. Vi phẫu thân (T) và rễ (R) CTĐB.

(1): bần; (2): tinh thể calci oxalat cầu gai; (3): mô dày; (4): mô mềm vỏ; (5): cụm sợi vách cellulose; (6): tế bào mô cứng; (7): libe 2; (8): ống nhựa mù; (9): gỗ 2; (10): libe quanh tủy; (11): mô mềm tủy; (12): gỗ 1; (13): nội bì đai caspary.

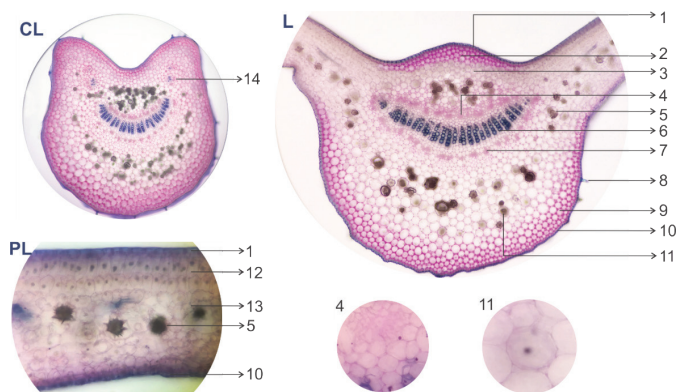
Đặc điểm vi phẫu lá:

Gân giữa: bề dày vùng gân giữa gấp 3 lần vùng phiến lá. Mặt dưới lõm nhiều hơn mặt trên. Biểu bì trên (L1) và biểu bì dưới (L10) có hình dạng và kích thước giống nhau, 1 lớp tế bào hình chữ nhật nằm hay hình đa giác, vách cellulose; lớp cutin dày và hơi nhấp nhô. Lông che chở (L8) đa bào một dãy gồm 4-8 tế bào, nằm rải rác ở lớp biểu bì dưới. Mô dày góc trên (L2) và mô dày góc dưới (L9) tế bào hình gần tròn, xếp lộn xộn. Mô mềm (L3) tế bào hình tròn hoặc đa giác, vách cellulose mỏng. Ống nhựa mù thật (L11) rải rác trong mô mềm. Hệ thống dẫn hình vòng cung với gỗ 1 (L6) ở trên, libe 1 (L7) ở dưới và trên gỗ có libe quanh tủy (L4). Mạch gỗ 1 hình đa giác; mô mềm gỗ 1 vách cellulose, xếp thành 1-2 (đôi khi 5) dãy xen kẽ mạch gỗ. Libe 1 và libe quanh tủy vách cellulose kích thước nhỏ, xếp lộn xộn thành cụm. Tinh thể calci oxalat (L5) hình cầu gai rải rác trong mô mềm (hình 3).

Cuống lá: vi phẫu có dạng hình bầu dục với mặt trên lõm chia 2 thùy. Cấu tạo tương tự gân giữa, dưới mỗi thùy phía trên cung libe gỗ có bó dẫn phụ cấu tạo như cung libe gỗ chính (hình 3).

Phiến lá: biểu bì trên (PL1) và biểu bì dưới (PL10) có cấu tạo giống nhau, gồm 1 lớp tế bào hình chữ nhật nằm hay đa giác; lớp cutin hơi dày và nhấp nhô; lỗ khí tập trung ở

biểu bì dưới. Mô mềm giậu (PL12) gồm 2 lớp tế bào nằm so le nhau. Mô mềm khuyết (PL13) có bề dày gấp 2 lần bề dày mô mềm giậu, tế bào hình dạng thay đổi; rải rác có các bó gân phụ bị cắt ngang hay cắt xéo, bó cắt ngang có ít mạch gỗ ở trên và libe ở dưới. Tinh thể calci oxalat (PL5) hình cầu gai rải rác trong mô mềm khuyết (hình 3).



Hình 3. Vi phẫu lá (L), cuống lá (CL) và phiến lá (PL).

(1): biểu bì trên; (2): mô dày trên; (3): mô mềm; (4): libe quanh tủy; (5): tinh thể calci oxalat cầu gai; (6): gỗ 1; (7): libe 1; (8): lông che chở; (9): mô dày dưới; (10): biểu bì dưới; (11): ống nhựa mủ; (12): mô mềm giậu; (13): mô mềm khuyết.

Đặc điểm vi học

Quan sát dưới kính hiển vi ở vật kính 10X, 40X (hình 4), bột được liệu có những đặc điểm sau:

Bột rễ: màu vàng nâu, không mùi, vị ngọt. Thành phần gồm mảnh bản (F1), mảnh mô mềm chứa hạt tinh bột (F2), sợi (F3), tế bào mô cứng (F4), tinh thể calci oxalat hình cầu gai (F5), hạt tinh bột (F6) hình cầu hay hình chuông, có thể có tế hình vệt dài hoặc không.



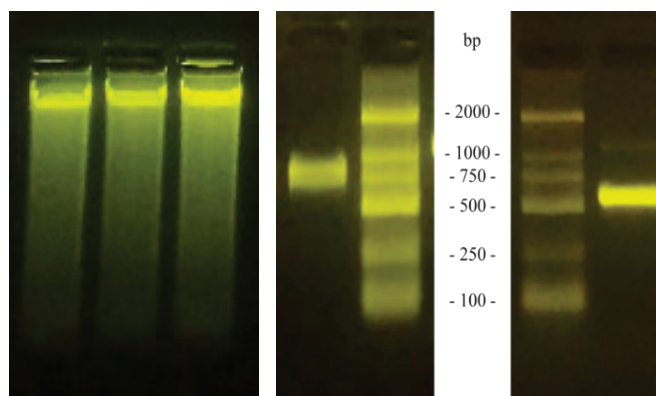
Hình 4. Cấu trúc bột rễ (F1-6), thân (G1-6) và lá (H1-5).

Bột thân: màu vàng nâu, nhiều xơ, không mùi, vị ngọt. Thành phần gồm mảnh bản (G1), sợi (G2), tế bào mô cứng (G3), mảnh mạch điểm (G4), tinh thể calci oxalat hình cầu gai (G5), hạt tinh bột (G6) hình cầu hay hình chuông, có thể có tế phân nhánh hoặc không.

Bột lá: màu xanh, không mùi, vị hơi đắng. Thành phần gồm mảnh biểu bì trên (H1), mảnh biểu bì dưới (H2) mang nhiều lỗ khí kiểu hỗn bào, biểu bì mang lông che chở (H3), lông che chở đa bào một dãy (H4), tinh thể calci oxalat hình cầu gai (H5).

Phân tích mã vạch ADN

Chiết tách và khuếch đại đoạn gen bằng kỹ thuật PCR thu được đoạn tinh sạch ITS1-5.8S rARN-ITS2 và rbcL của CTĐB (hình 5, 6), thành phần bốn loại nucleotide của mẫu nghiên cứu được trình bày ở bảng 1. Chi tiết về trình tự đoạn gen ITS1-5.8S rARN-ITS2 và rbcL của CTĐB đã được công bố trên ngân hàng gen NCBI với mã tương ứng là MT084410.1 và MT089916.



Hình 5. ADN tổng số **Hình 6. Kết quả PCR môi ITS1-ITS4**
trên agarose 0,8%. (trái) và môi rbcL_F-rbcL_R (phải).

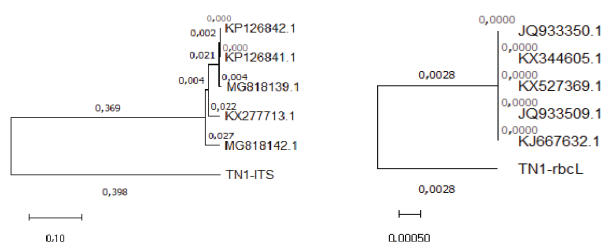
Bảng 1. Thành phần bốn loại nucleotide của mẫu CTĐB.

Mẫu	Tỷ lệ %						Tổng số nucleotide
	A	T	G	C	GC	AT	
TN1-ITS	13,7	19,1	34,1	33,1	67,2	32,8	577
TN1-rbcL	27,2	28,6	22,3	21,9	44,2	55,8	538

Bảng 2 trình bày kết quả BLAST có tỷ lệ bao phủ (%) / mức độ tương đồng (%) cao nhất của đoạn ITS và rbcL, tất cả đều thuộc họ Apocynaceae trong đó có loài cùng chi *J. mucronata* với kết quả lần lượt là (100/92,69) và (99/100). Cây phát sinh loài (hình 7) được xây dựng bằng phương pháp Maximum Likelihood.

Bảng 2. Kết quả BLAST đoạn gen ITS và rbcL của CTĐB.

Mẫu	Tên khoa học	Tỷ lệ bao phủ (%)	Mức độ tương đồng (%)	Mã truy cập
TN1-ITS	<i>Jasminanthes mucronata</i> isolate L	100	92,69	MG818142.1
	<i>Gymnema sylvestre</i> isolate I	100	91,82	MG818139.1
	<i>Gymnema sylvestre</i> isolate SBB-1363	99	91,46	KX277713.1
	<i>Gymnema sylvestre</i> isolate GS7	95	92,17	KP126842.1
	<i>Gymnema sylvestre</i> isolate GS6	95	92,17	KP126841.1
TN1-rbcL	<i>Gymnema sylvestre</i> isolate SBB-1307	99	100	KX344605.1
	<i>Jasminanthes mucronata</i>	99	100	KX527369.1
	<i>Gymnema sylvestre</i> isolate SBB-1256	99	100	KJ667632.1
	<i>Treutlera</i> sp. CHSL-2012	99	100	JQ933509.1
	<i>Gymnema sylvestre</i>	99	100	JQ933350.1



Hình 7. Cây phát sinh loài của gen ITS (trái) và rbcL (phải).

Bàn luận

Thân cây CTĐB có cấu tạo vi phẫu đặc trưng của các cây họ Apocynaceae như ống nhựa mủ thật [11], libe quanh tủy [12] và cụm tế bào sợi vách cellulose [13]; trong khi ở lá và cuống lá có ống nhựa mủ, libe quanh tủy. Ống nhựa mủ xuất hiện rải rác trong vùng libe ở thân, vùng mô mềm ở cuống lá và gân giữa nhưng số lượng không nhiều. Trên thực tế khi cắt ngang cuống lá, lá và thân cây cũng không thấy nhựa mủ chảy ra nhiều như một số cây khác cùng họ (dây thia canh, thiên lý).

Bộ phận mà người dân địa phương hay sử dụng gọi là “dây CTĐB” được phân tích vi học, kết quả cho thấy đây chính là bộ phận thân và rễ CTĐB, những đoạn thân đã hóa gỗ khi gặp điều kiện thuận lợi (đất, không khí ẩm ướt) có thể sinh ra rễ mới.

Kết quả BLAST cho thấy CTĐB có đoạn rbcL có mức độ tương đồng cao 100% so với các cây trong phân họ thiên lý Asclepiadoideae, vì vậy đoạn gen này có tính bảo tồn cao; đoạn ITS cũng cho kết quả tương tự nhưng mức độ tương đồng cao nhất ở cây cùng chi là *J. mucronata* (GenBank-MG818142.1) chỉ là 92,69%. Cây phát sinh loài xây dựng bằng phương pháp Maximum Likelihood cho thấy gen ITS và rbcL nằm ở nhóm riêng so với các loài khác, điều này giúp khẳng định sự khác biệt về gen ITS và rbcL của CTĐB so với các loài khác trong phân họ, có thể sử dụng đoạn ITS

và rbcL làm mã vạch ADN để định danh CTĐB.

Các vùng ADN tiềm năng được sử dụng làm mã vạch phải phù hợp với một số tiêu chí chính: tính phổ biến (dễ khuếch đại và giải trình tự), chất lượng trình tự và khả năng xác định loài (đoạn gen có nhiều thay đổi đặc trưng cho các loài, nhưng không khác nhau quá mức giữa cá thể trong cùng loài). Consortium for the Barcode of Life (CBOL) đánh giá rbcL là đoạn gen đặc trưng tốt nhất, mặc dù không phải là vùng thay đổi nhất, được sử dụng thường xuyên trong các tổ hợp để phân biệt loài [14], tổ hợp này bao gồm một vùng ADN bảo tồn về mặt phát sinh loài (rbcL) với một hoặc nhiều vùng thay đổi nhanh [15].

Trong một nghiên cứu đánh giá về tiềm năng của các loại mã vạch ADN trong việc định danh các loài thuộc họ Apocynaceae, đoạn ITS2 thuộc vùng ITS đã xác định thành công ở mức độ loài và chỉ với tỷ lệ tương ứng là 91 và 98%, tỷ lệ này ở psbA-trnH là 40 và 36% [16]. Việc lựa chọn những đoạn ADN đặc trưng để làm mã vạch và việc phối hợp giữa các đoạn mã vạch ADN là rất cần thiết và đem lại hiệu quả cao, một số tổ hợp khác được BOLD khuyến cáo như rpoC1+rpoB+matK hay rpoC1+matK+trnH-psbA; rbcL+trnH và atpF-H+psbK-I+matK để tăng hiệu quả giám định loài [17, 18].

CBOL đã đề xuất rbcL+matK là phối hợp chuẩn để định danh các loài thực vật [14], tuy nhiên kết quả sàng lọc của P. Mishra và cộng sự cho thấy cần phải bổ sung thêm vùng xen giữa không mã hóa psbA-trnH của hệ gen lục lạp và các vùng thuộc hệ gen nhân (ITS và ITS2). Cụ thể với tổ hợp rbcL+matK+ITS cho kết quả phân biệt 100% các loài thuộc chi *Decalepis* (Apocynaceae) [18].

Đoạn trình tự ITS1-5.8S rARN-ITS2 (mã truy cập MT084410.1) và rbcL (mã truy cập MT089916) được đăng tải lên ngân hàng gen NCBI. Còn các đoạn gen tiềm năng khác cần được giải mã như trnL-trnF, matK, matR, AtpB, G3pdh để xây dựng cơ sở dữ liệu ADN cho CTĐB, phục vụ cho công tác kiểm nghiệm, nghiên cứu, trồng trọt và bảo tồn được liệu.

Kết luận

Đề tài đã quan sát và mô tả đặc điểm vi phẫu, bột được liệu của rễ, thân và lá CTĐB, làm căn cứ để xây dựng chỉ tiêu vi học trong tiêu chuẩn nguyên liệu dược liệu CTĐB. Đoạn gen ITS1-5.8S rARN-ITS2 và rbcL của mẫu lá non CTĐB thu hái ở núi Đá Bia, tỉnh Phú Yên được phân tích và giải trình tự công bố trên ngân hàng gen NCBI với code là MT084410.1 và MT089916, so sánh với ADN của mẫu đối chứng *Jasminanthes mucronata* (Blanco) W.D. Stevens & P.T. Li được công bố trên ngân hàng gen cho thấy mẫu có độ tương đồng lần lượt là 92,69 và 100%. Như vậy đoạn ITS và rbcL có tiềm năng để sử dụng làm mã vạch ADN trong định

danh CTĐB. Tuy nhiên để xây dựng cơ sở dữ liệu ADN đầy đủ cho CTĐB, các đoạn gen trnL-trnF, matK, matR, AtpB, G3pdh cần được giải mã thêm.

Kết quả nghiên cứu góp phần trong việc định danh CTĐB, làm tiền đề cho các nghiên cứu về hóa thực vật và tác dụng sinh học của cây. Đây là lần đầu tiên trình tự gen cây CTĐB, một loài đặc hữu của Việt Nam được nghiên cứu và công bố, góp phần vào việc bảo tồn nguồn gen và khai thác phát triển các cây thuốc dân gian có giá trị.

TÀI LIỆU KHAM KHẢO

- [1] Đỗ Huy Bích và cộng sự (2006), “Phần 1 - Dược liệu”, *Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam*, **tập 1**, tr.331-332.
- [2] Bộ Khoa học và Công nghệ (2007), “Phần II - thực vật”, *Sách đỏ Việt Nam*, tr.14.
- [3] The Bach Tran, Xuan Lam Hoang, Ngoc Duy Bui, Thu Ha Bui, Eum Sangmi, Hong Quang Bui, Van Hai Do, Maxim Nuraliev, Andrey Kuznetsov, Svetlana Kuznetova, Michele Rodda (2018), “*Jasminanthes tuyetanhiiae* (Apocynaceae, Asclepiadoideae), a new species from Vietnam, and *J. pilosa* new for Vietnam”, *Annales Botanici Fennici*, **55(1-3)**, pp.163-169.
- [4] P. Mishra, A. Kumar, A. Nagireddy, D.N. Mani, A.K. Shukla, R. Tiwari, V. Sundaresan (2016), “DNA barcoding: an efficient tool to overcome authentication challenges in the herbal market”, *Plant Biotechnol J.*, **14(1)**, pp.8-21.
- [5] Z. Chen, T. Yang, L. Lin, et al. (2016), “Tree of life for the genera of Chinese vascular plants”, *Journal of Systematics and Evolution*, **54(4)**, pp.277-306.
- [6] H.B. Tsai (2018), *Molecular phylogenetic analysis of Asclepiadoideae (Apocynaceae s. l.) in Taiwan*, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MG818142.1>.
- [7] T.J. White, T.D. Bruns, S.B. Lee, J.W. Taylor (1990), “Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics”, *PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications*, **18(1)**, pp.315-322.
- [8] A. Fazekas, K. Burgess, P. Kesanakurti, S. Graham, S. Newmaster, B. Husband, D. Percy, M. Hajibabaei, S. Barrett (2008), “Multiple multilocus DNA barcodes from the plastid genome discriminate plant species equally well”, *PLOS ONE*, **3(7)**, p.e2802.
- [9] J.J. Doyle and J.L. Doyle (1987), “A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue”, *Phytochemical Bulletin*, **19(1)**, pp.11-15.
- [10] F. Sanger, S. Nicklen, A.R. Coulson (1977), “DNA sequencing with chain-terminating inhibitors”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **74(12)**, pp.5463-5467.
- [11] M.A. El-Fiki, A.M. El-Taher, A.G. EL-Gendy, M.I. Lila (2019), “Morphological and anatomical studies on some taxa of family Apocynaceae”, *Al-Azhar Journal of Agricultural Research*, **44(1)**, pp.136-147.
- [12] C.E.J. Botha, R.F. Evert, R.D. Walmsley (1975), “Observations of the penetration of the phloem in leaves of *Nerium oleander* (Linn.) by stylets of the aphid, *Aphis nerii* (B. de. F.)”, *Protoplasma*, **86(4)**, pp.309-319.
- [13] L.C. Baratto, M.R. Duarte, C. Santos (2010), “Pharmacobotanic characterization of young stems and stem barks of *Rauvolfia sellowii* Müll. Arg. Apocynaceae”, *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, **46(3)**, pp.555-561.
- [14] D. Selvaraj, R.K. Sarma, D. Shanmughanandhan, R. Srinivasan S. Ramalingam (2014), “Evaluation of DNA barcode candidates for the discrimination of the large plant family Apocynaceae”, *Plant Systematics and Evolution*, **301**, pp.1263-1273, DOI: 10.1007/s00606-014-1149-y.
- [15] W.J. Kress, D.L. Erickson (2007), “A two-locus global DNA barcode for land plants: the coding rbcL gene complements the non-coding trnH-psbA spacer region”, *PLOS ONE*, **2(6)**, p.e508, DOI: 10.1371/journal.pone.0000508.
- [16] C. Costion, A. Ford, H. Cross, D. Crayn, M. Harrington, A. Lowe (2011), “Plant DNA barcodes can accurately estimate species richness in poorly known floras”, *PLOS ONE*, **6(11)**, p.e26841, DOI: 10.1371/journal.pone.0026841.
- [17] CBOL Plant Working Group (2009), “A DNA barcode for land plants”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106 (31)**, pp.12794-12797, DOI: 10.1073/pnas.0905845106.
- [18] P. Mishra, A. Kumar, G. Sivaraman, A.K. Shukla, R. Kaliamoorthy, A. Slater, S. Velusamy (2017), “Character-based DNA barcoding for authentication and conservation of IUCN Red listed threatened species of genus *Decalepis* (Apocynaceae)”, *Sci. Rep.*, **7(1)**, p.14910, DOI: 10.1038/s41598-017-14887-8.

Hiệu quả của dịch chiết thực vật để kiểm soát nấm *Pyricularia grisea* gây bệnh đạo ôn trên lúa trong điều kiện *in vitro*

Phạm Thị Thu Hà^{1*}, Nguyễn Thị Ngọc Trâm¹, Châu Thanh Trúc²,
Nguyễn Thị Bảo Trân¹, Võ Hoàng Kha²

¹Viện Nghiên cứu Di truyền và Chọn giống, Trường Đại học Tôn Đức Thắng

²Khoa Khoa học ứng dụng, Trường Đại học Tôn Đức Thắng

Ngày nhận bài 3/8/2020; ngày chuyển phản biện 6/8/2020; ngày nhận phản biện 4/9/2020; ngày chấp nhận đăng 14/9/2020

Tóm tắt:

Nghiên cứu này được thực hiện nhằm xác định khả năng ức chế *Pyricularia grisea* của dịch chiết từ rau trai và húng quế. Hoạt tính kháng nấm của dịch chiết methanol từ rau trai với các nồng độ khác nhau (0,1; 0,5; 1,0; 5,0 và 10 mg/ml) đã được thử nghiệm trên 3 chủng nấm *P. grisea* (isolate 1, isolate 2 và isolate 3 được phân lập từ lúa hoang). Hoạt tính kháng nấm của dịch chiết methanol từ húng quế với các nồng độ khác nhau (10, 20, 30, 40 mg/ml) đã được thử nghiệm trên 2 chủng nấm *P. grisea* (isolate 4 và isolate 5 được phân lập từ lúa cao sản). Kết quả cho thấy dịch chiết rau trai và húng quế đều làm giảm sự phát triển của *P. grisea* ở tất cả các nồng độ được thử nghiệm. Với nồng độ cao nhất (10 mg/ml), dịch chiết lá rau trai có khả năng ức chế sự sinh trưởng và phát triển của 3 chủng nấm đạo ôn (isolate 1, 2 và 3) lần lượt là: 16,33; 29,67; 25,33 mm. Đối với dịch chiết lá húng quế, ở nồng độ 40 mg/ml, dịch chiết có khả năng ức chế với 2 chủng nấm isolate 4 và isolate 5 tốt nhất, lần lượt là 65,50 và 55,00 mm. Kết quả cũng chỉ ra rằng, ở giá trị IC₅₀=2,35 mg/ml của dịch chiết rau trai và IC₅₀=19,68 mg/ml của dịch chiết rau húng quế có thể ức chế sự phát triển của sợi nấm đạo ôn lần lượt là isolate 2 và isolate 5. Sử dụng dịch chiết rau trai và húng quế để ức chế sự sinh trưởng và phát triển của nấm bệnh đạo ôn trong *in vitro* bước đầu đã mang lại những kết quả khả quan. Do đó, cần tiếp tục tiến hành thí nghiệm trong điều kiện *in vivo* nhằm phát triển thuốc diệt nấm bệnh đạo ôn có nguồn gốc từ thực vật, góp phần giảm thiểu các tác hại do thuốc diệt nấm hóa học gây ra.

Từ khóa: dịch chiết thực vật, húng quế, lúa, *Pyricularia grisea*, rau trai.

Chỉ số phân loại: 4.1

Đặt vấn đề

Trước bối cảnh biến đổi khí hậu và diễn biến phức tạp của thời tiết, lúa là một trong những đối tượng dễ bị tác động bởi các yếu tố sinh học và phi sinh học, ảnh hưởng tới năng suất và chất lượng sản xuất lúa gạo [1]. Trong các loại bệnh hại lúa, đạo ôn là một trong những bệnh nhiễm nấm gây hại nặng nề nhất, với tổn thất lên tới 10-30% tổng sản lượng thu hoạch [2], thậm chí trong một số trường hợp tới 100% [3]. Nấm *P. grisea* là nguyên nhân gây ra bệnh đạo ôn trên lúa, có thể lây nhiễm và gây tổn thương hầu như tất cả các cơ quan của cây lúa và sự bùng phát của nó là mối đe dọa nghiêm trọng đối với sản xuất lúa gạo của Việt Nam nói riêng và trên toàn thế giới nói chung [4]. Ngày nay, bệnh đạo ôn ngày càng trở nên khó kiểm soát do mầm bệnh có khả năng tồn tại và sinh sôi trong điều kiện môi trường khắc nghiệt và dễ dàng lây lan sang các ruộng mới [5-7]. Có nhiều biện pháp để quản lý bệnh đạo ôn nhưng hầu hết nông dân ở các nước đang phát triển như Việt Nam chủ yếu vẫn dựa vào thuốc bảo vệ thực vật để loại trừ nấm bệnh [8-10]. Tuy mang lại hiệu quả nhanh chóng nhưng việc sử dụng quá mức các hóa chất đã gây ô nhiễm môi trường, phá vỡ

hệ sinh học tự nhiên, gây độc hại cho các sinh vật và ảnh hưởng đến sức khỏe của con người [11]. Đặc biệt, việc sử dụng thuốc hóa học đã vô tình dẫn đến sự kháng thuốc của nấm bệnh [12]. Một trong những phương pháp tốt nhất để giải quyết vấn đề này là tìm ra phương pháp trị liệu mới từ thực vật có chứa hoạt tính kháng nấm để chống lại vi sinh vật gây bệnh.

Gần đây, nhiều nhà nghiên cứu đã quan tâm đến việc ứng dụng các dịch chiết thực vật làm thuốc diệt nấm sinh học để giảm nấm bệnh, thay thế cho thuốc diệt nấm tổng hợp. Thuốc diệt nấm sinh học ít độc hơn và chúng không gây ra bất kỳ ảnh hưởng nào đến các sinh vật khác trong môi trường. Do đó, việc tìm kiếm các hợp chất chống nấm mới từ thực vật như một chất thay thế, an toàn, thân thiện với môi trường, rẻ và dễ phân hủy là rất cần thiết [13].

Trong nghiên cứu này, cây rau trai (tên khoa học là *Commelina communis* L.) và cây rau húng quế (tên khoa học là *Ocimum basilicum*) được sử dụng để khảo sát sự ảnh hưởng của dịch chiết của chúng bằng methanol đến sự phát triển của nấm gây bệnh đạo ôn trên lúa. Rau trai có vùng

*Tác giả liên hệ: Email: phamthithuha@tdtu.edu.vn

Efficacy of plant extracts to control *Pyricularia grisea* fungus causing rice blast *in vitro*

Thi Thu Ha Pham^{1*}, Thi Ngoc Tram Nguyen¹,
Thanh Truc Chau², Thi Bao Tran Nguyen¹, Hoang Kha Vo²

¹Genomic Research Institute and Seed, Ton Duc Thang University

²Faculty of Applied Science, Ton Duc Thang University

Received 3 August 2020; accepted 14 September 2020

Abstract:

This study was conducted to determine the resistance of *Pyricularia grisea* of dayflower (*Commelina communis*) and basil sweet (*Ocimum basilicum*) extracts. Antifungal activity of methanol extract from dayflower with different concentrations (0.1, 0.5, 1.0, 5.0, and 10 mg/ml) was tested on three isolates of *P. grisea* (isolate 1, isolate 2, and isolate 3). The antifungal activity of methanol extract from basil sweet with different concentrations (10, 20, 30, and 40 mg/ml) was tested on two isolates of *P. grisea* (isolate 4 and isolate 5). Results showed that both methanol extracts from dayflower and basil sweet reduced the growth of *P. grisea* at all tested concentrations. At the highest concentration (10 mg/ml), the leaf extract of dayflower inhibited the three strains of *P. grisea* (isolate 1, 2, and 3) with the zone of inhibition of 16.33; 29.67; 25.33 mm. For basil sweet at a concentration of 40 mg/ml, the extract was most resistant to *P. grisea* (isolate 4 and isolate 5) strains with the zone of inhibition of 65.50 and 55.00 mm, respectively. The results also indicate that the mycelial growth inhibition was high as IC₅₀=2.35 mg/ml at isolate 2 by dayflower and IC₅₀=19.68 mg/ml at isolate 5 by basil sweet. The extracts of dayflower and basil sweet used to inhibit the development of *P. grisea in vitro* initially brought positive results. Therefore, it is necessary to continue conducting experiments *in vivo* to gradually develop plant-based blast fungicides, contributing to minimising the harm caused by chemical fungicides.

Keywords: *Commelina communis*, *Ocimum basilicum*, plant extract, *Pyricularia grisea*, rice.

Classification number: 4.1

phân bố rất rộng, từ ôn đới đến nhiệt đới. Các chất được chiết xuất từ cây rau trai cũng được sử dụng như một nguyên liệu thực phẩm quan trọng trong phòng ngừa bệnh tiểu đường loại 2 [14]. Ngoài ra, dẫn xuất từ alkaloid của rau trai còn có khả năng kháng virus A/PR/8/34 (H1N1) [15]. Cây húng quế cũng được xem là một cây được liệu nổi tiếng và nhận được rất nhiều sự chú ý từ các nhà khoa học trong vài thập kỷ qua. Nhiều nghiên cứu cho thấy, dịch chiết từ húng quế có khả năng chống oxy hóa, kháng khuẩn và kháng nấm, bao gồm các loại vi khuẩn như: *A. niger*, *P. ultimum*, *X. campestris* và nấm bệnh như: *Aspergillus flavus*, *Penicillium*, *Rhizopus solanai* [16-19]. Những năm gần đây, các chiết xuất từ thực vật đã được nông dân sử dụng như một biện pháp phòng trừ nấm bệnh thân thiện với môi trường. Tuy nhiên cho đến nay vẫn chưa có nghiên cứu nào trên cây húng quế và rau trai có khả năng ức chế nấm *P. grisea* gây bệnh đạo ôn trên lúa. Do đó mục tiêu của nghiên cứu là đánh giá ảnh hưởng của các dịch chiết này đến sự phát triển của nấm bệnh đạo ôn trên lúa trong điều kiện *in vitro*.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Nguồn nấm *P. grisea*

Mẫu bệnh đạo ôn được thu thập một cách ngẫu nhiên từ cây lúa hoang và các giống lúa cao sản ở các tỉnh Đồng bằng sông Cửu Long.

Phân lập nấm *P. grisea*

Các chủng nấm *P. grisea* được phân lập theo phương pháp Hayashi và Fukuta [20]. Các mẫu nấm đạo ôn được thu thập và phân lập từ lá lúa mang biểu hiện của bệnh đạo ôn (như vết bệnh có màu nâu và có hình mắt én). Các bào tử nấm đơn bào được chọn trên môi trường thạch và ủ trong ba ngày, sau đó được chuyển sang môi trường cám gạo có giấy lọc để tiếp tục nghiên cứu.

Chuẩn bị dịch chiết lá rau trai và húng quế

Lá rau trai và húng quế được thu tại vườn thủy canh, Trường Đại học Tôn Đức Thắng. Sau khi được thu nhận và rửa với nước để loại bỏ bụi bẩn, lá được sấy khô ở nhiệt độ 55°C và được xay thành bột. 10g bột lá được ngâm với 100 ml methanol và lắc trong 48 giờ ở nhiệt độ phòng. Dịch chiết sau khi lọc được cô đặc và sấy khô, cao chiết thu được sau đó được hòa tan lại bằng methanol (99,5%) với nồng độ stock là 50 mg/ml [21].

Khảo sát hoạt tính kháng nấm *in vitro* của dịch chiết lá rau trai và húng quế

Khả năng ức chế *P. grisea* trong điều kiện *in vitro* của dịch lá rau trai và húng quế được đánh giá theo phương pháp của Toàn và cs [22]. *P. grisea* được phân lập trên môi trường thạch khoai tây (PDA) ở 28±2°C. 5 nồng độ dịch chiết lá rau

traí (0,1; 0,5; 1; 5 và 10 mg/ml) và 4 nồng độ dịch chiết lá húng quế (10, 20, 30, 40 mg/ml) được chuẩn bị bằng cách hòa stock (50 mg/ml) của từng dịch chiết với nước cất vô trùng. Sau đó, hòa 1 ml dung dịch chiết lá rau trai và húng quế vào đĩa Petri vô trùng chứa 10 ml môi trường PDA. Đặt 2 mm² thạch nấm đã chuẩn bị vào giữa đĩa Petri chứa dịch chiết và ủ đĩa ở 25±2°C. Đối với các mẫu đối chứng, mẫu nấm được cấy giữa đĩa Petri chứa nước cất thay vì dịch chiết. Sau 6 ngày, đường kính vùng phát triển của sợi nấm được đo bằng thước kẻ (cm).

Sự ức chế của dịch chiết rau trai và húng quế đối với nấm *P. grisea* được tính theo công thức sau:

$$I = \frac{C - T}{C} \times 100$$

Trong đó: I là sự ức chế (%); C là đường kính vùng phát triển sợi nấm của đối chứng (cm); T là đường kính đường vùng phát triển sợi nấm của nghiệm thức (cm).

Sự ức chế của các nồng độ khác nhau của dịch chiết cũng được so sánh với giá trị IC₅₀ - nồng độ (mg/ml) để ức chế 50% sự tăng trưởng sợi nấm *P. grisea*. Vùng ức chế và cấp độ kháng nấm bệnh của dịch chiết được thể hiện trong bảng 1 [22].

Bảng 1. Vùng ức chế và mức độ tương ứng hoạt động kháng nấm của dịch chiết.

Vùng ức chế (mm)	Mức độ ức chế
>17	+++ , kháng mạnh
12-16	++ , kháng
7-11	+ , ít kháng
0-6	– , không kháng

Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu được phân tích phương sai một yếu tố (ANOVA) với phần mềm thống kê SPSS 18. Sử dụng trắc nghiệm Duncan (Duncan's Multiple Range Test) với mức ý nghĩa 0,05 (p<0,05) để xếp hạng giá trị trung bình của các nghiệm thức trong thí nghiệm.

Kết quả và thảo luận

Các chủng nấm *P. grisea* được phân lập từ mẫu bệnh đạo ôn ở các vùng khác nhau

Sau khi phân lập các chủng nấm đạo ôn từ 46 mẫu lúa hoang thu được tại các tỉnh Tiền Giang và Vĩnh Long có tổng cộng 3 chủng nấm *P. grisea* được tìm thấy và đặt tên là isolate 1, isolate 2 và isolate 3. Đối với 15 mẫu trên các giống lúa cao sản được thu tại TP Cần Thơ và tỉnh An Giang,

kết quả là có 2 chủng nấm đạo ôn đã được phân lập và được đặt tên lần lượt là isolate 4 và isolate 5 (bảng 2).

Bảng 2. Các chủng nấm đạo ôn được phân lập ở vùng Đồng bằng sông Cửu Long.

STT	Khu vực	Ghi chú	Kí hiệu
1	Bình Phan, Chợ Gạo, Tiền Giang	Lúa hoang	Isolate 1
2	Ngãi Tứ, Tam Bình, Vĩnh Long	Lúa hoang	Isolate 2
3	Ngãi Tứ, Tam Bình, Vĩnh Long	Lúa hoang	Isolate 3
4	Ô Môn, Cần Thơ	Lúa cao sản	Isolate 4
5	An Giang	Lúa cao sản	Isolate 5

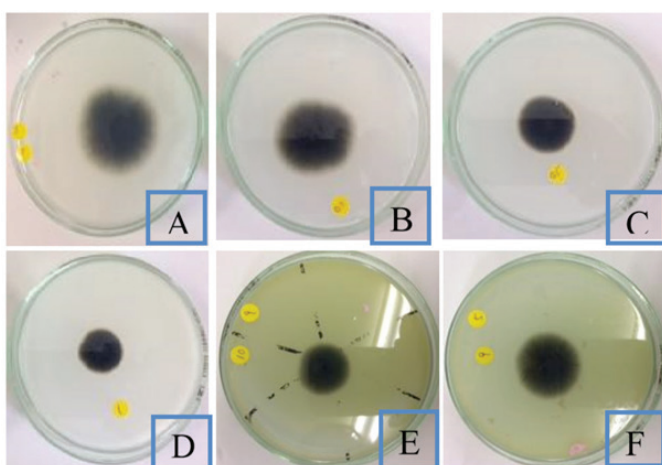
Hoạt tính kháng nấm của dịch chiết lá rau trai trong điều kiện in vitro

Hoạt tính kháng nấm của dịch chiết methanol từ rau trai với các nồng độ khác nhau (0,1; 0,5; 1,0; 5,0 và 10 mg/ml) đã được thử nghiệm trên 3 chủng nấm *P. grisea* (isolate 1, isolate 2 và isolate 3). Kết quả thí nghiệm cho thấy, dịch chiết từ rau trai có khả năng ức chế cả 3 chủng nấm đạo ôn. Ở nồng độ cao nhất (10 mg/ml), dịch chiết cho thấy sự ức chế nấm mạnh nhất (+++). Sau đó là nồng độ 0,5 mg/ml và 0,1 mg/ml cho thấy sự ức chế trung bình (++). Cuối cùng, nồng độ ở mức 1-5 mg/ml, dịch chiết rau trai ức chế sự phát triển của *P. grisea* ở mức thấp (bảng 3 và các hình 1, 2, 3). Các nghiên cứu trước đây cho rằng, dịch chiết cả phê Arabica [23] và dịch chiết thô của cây *Piper caninum* Blume (thuộc họ hồ tiêu) ức chế sự phát triển của nấm *P. grisea* [24]. Hiệu quả ức chế nấm *P. grisea* của dịch chiết càng tăng khi tăng nồng độ của dịch chiết. Tương tự như rau trai, các chất được xác định bởi GC-MS trong dịch chiết methanol từ lá tre cũng cho thấy sự ức chế mạnh mẽ nấm *P. grisea*, nhưng chúng không ức chế được sự tăng trưởng của *P. grisea* ở tất cả các nồng độ [25].

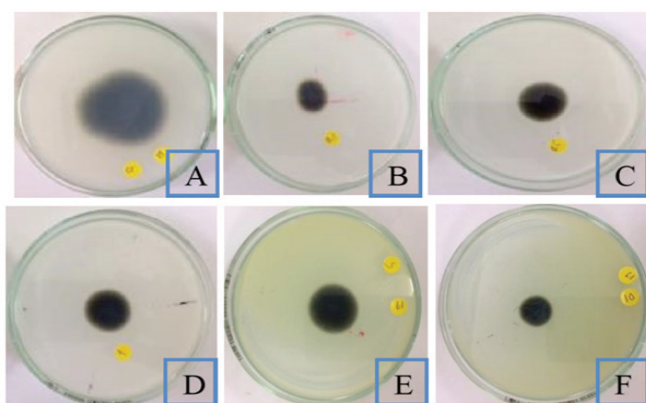
Bảng 3. Hoạt tính ức chế sợi nấm bằng dịch chiết lá rau trai.

Nồng độ (mg/ml)	Vùng ức chế của các chủng nấm (mm)					
	Isolate 1	Mức độ ức chế	Isolate 2	Mức độ ức chế	Isolate 3	Mức độ ức chế
0,1	9,00 ^a	(+)	26,00 ^c	(+++)	16,33 ^c	(++)
0,5	14,67 ^b	(++)	22,00 ^b	(+++)	21,00 ^d	(+++)
1	16,67 ^c	(++)	19,00 ^a	(+++)	8,67 ^a	(+)
5	9,67 ^a	(+)	21,33 ^b	(+++)	13,67 ^b	(++)
10	16,33 ^c	(+++)	29,67 ^d	(+++)	25,33 ^c	(+++)

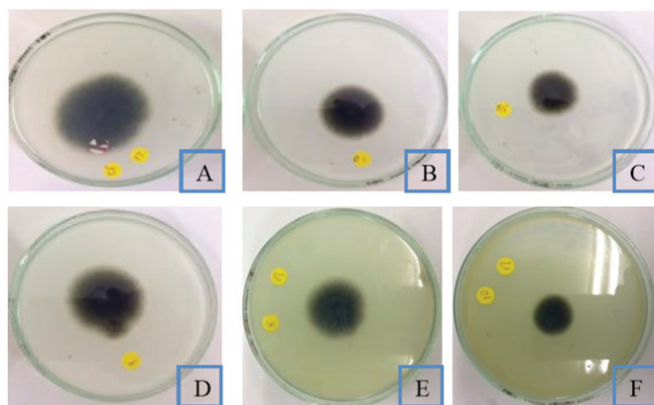
Chú thích: +++: kháng mạnh; ++: kháng trung bình; +: kháng yếu. Giá trị trung bình có các ký tự theo sau giống nhau biểu thị sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở p<0,05.



Hình 1. Ảnh hưởng của dịch chiết rau trai với các nồng độ khác nhau lên sự phát triển của isolate 1 trong điều kiện *in vitro*. (A) 0 mg/ml, (B) 0,1 mg/ml, (C) 0,5 mg/ml, (D) 1 mg/ml, (E) 5 mg/ml và (F) 10 mg/ml.



Hình 2. Ảnh hưởng của dịch chiết rau trai với các nồng độ khác nhau lên sự phát triển của isolate 2 trong điều kiện *in vitro*. (A) 0 mg/ml, (B) 0,1 mg/ml, (C) 0,5 mg/ml, (D) 1 mg/ml, (E) 5 mg/ml và (F) 10 mg/ml.



Hình 3. Ảnh hưởng của dịch chiết rau trai với các nồng độ khác nhau lên sự phát triển của isolate 3 trong điều kiện *in vitro*. (A) 0 mg/ml, (B) 0,1 mg/ml, (C) 0,5 mg/ml, (D) 1 mg/ml, (E) 5 mg/ml và (F) 10 mg/ml.

IC₅₀ (mg/ml) là nồng độ cần thiết để ức chế 50% sự phát triển của sợi nấm *P. grisea*. Đối với lá rau trai được chiết bằng methanol, sự ức chế sợi nấm hoàn toàn được tìm thấy ở giá trị IC₅₀ thấp nhất (2,35 mg/ml) bởi isolate 2, tiếp theo là isolate 3 (11,98 mg/ml) (bảng 4). Các giá trị trên cho thấy rằng sự phát triển của nấm ở các dòng phân lập này đã bị ức chế. Thông qua giá trị IC₅₀, isolate 2 bị ức chế một lượng nhỏ dịch chiết ở nồng độ IC₅₀=2,35 mg/ml và isolate 1 cần lượng dịch chiết cao nhất (IC₅₀=41,34 mg/ml). Chất chiết xuất từ lá rau trai đã cho thấy sự ức chế đáng kể đối với *P. grisea*. Mặc dù chiết xuất bằng methanol từ rau trai đã ức chế *P. grisea*, nhưng nó vẫn là một chiết xuất thô và có nhiều tạp chất. Nghiên cứu tiếp theo sẽ phân tích và xác định các thành phần hóa học trong dịch chiết một cách rõ ràng hơn.

Bảng 4. Ảnh hưởng của dịch chiết methanol từ lá rau trai đến các chủng nấm khác nhau.

Chủng nấm	IC ₅₀ (mg/ml)
Isolate 1	41,34 ^a ±0,24
Isolate 2	2,35 ^c ±0,09
Isolate 3	11,98 ^b ±0,12

Giá trị trung bình có các ký tự theo sau giống nhau biểu thị sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở $p < 0,01$. Giá trị trung bình $\pm$ SD (độ lệch chuẩn).

Hoạt tính kháng nấm của dịch chiết lá húng quế trong điều kiện *in vitro*

Hoạt tính kháng nấm *P. grisea* của dịch chiết lá húng quế với các nồng độ dịch chiết khác nhau (10, 20, 30, 40 mg/ml) đã được thử nghiệm trên 2 chủng nấm *P. grisea* (isolate 4 và isolate 5). Kết quả thử nghiệm cho thấy, dịch chiết từ lá húng quế có khả năng ức chế cả 2 chủng nấm *P. grisea* được thử nghiệm. Với nồng độ thấp nhất (10 mg/ml), dịch chiết methanol của lá húng quế ức chế sự phát triển của *P. grisea* ở mức thấp (+). Với các nồng độ còn lại (20, 30, 40 mg/ml), dịch chiết húng quế ức chế mạnh (+++) nấm đạo ôn. Khác với dịch chiết lá rau trai, khả năng kháng nấm đạo ôn của dịch chiết lá húng quế tăng dần theo nồng độ chúng. Trong đó, dịch chiết ở nồng độ 40 mg/ml có khả năng ức chế các chủng nấm *P. grisea* (isolate 4 và isolate 5) một cách mạnh mẽ nhất, với khả năng ức chế lần lượt là 94,67 và 83,61% (bảng 5, 6 và hình 4, 5). Tương tự như dịch chiết lá húng quế, Adebola và cs (2017) [25] đã báo cáo về hoạt tính kháng nấm của các dịch chiết lá thực vật bao gồm: *Carica papaya* (đu đủ), *Azadirachta indica* (sầu dầu), *Calotropis procera* (bông bông quí) và *Anacardium occidentale* (cây điều) cũng cho kết quả tương tự về hoạt tính kháng nấm *P. grisea*.

Bảng 5. Hoạt tính ức chế sợi nấm bằng dịch chiết húng quế.

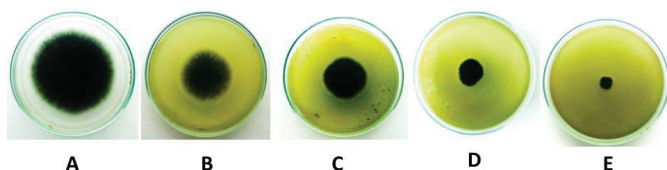
Nồng độ (mg/ml)	Vùng ức chế của các chủng nấm (mm)			
	Isolate 4	Mức độ ức chế	Isolate 5	Mức độ ức chế
10	8,33 ^d	(+)	23,33 ^d	(+++)
20	30,83 ^c	(+++)	32,50 ^c	(+++)
30	43,33 ^b	(+++)	43,33 ^b	(+++)
40	65,50 ^a	(+++)	55,00 ^a	(+++)

Chú thích: +++: kháng mạnh, ++: kháng, +: kháng yếu. Giá trị trung bình có các ký tự theo sau giống nhau biểu thị sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở $p < 0,05$.

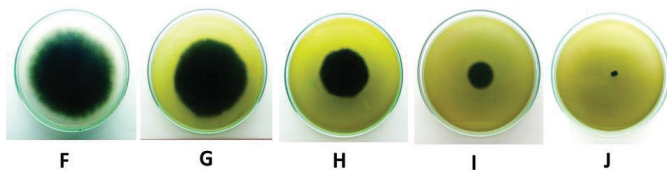
Bảng 6. Khả năng ức chế của dịch chiết lá húng quế (%) đến sự phát triển của hai chủng nấm *P. grisea*.

Nồng độ dịch chiết (mg/ml)	Chủng nấm	
	Isolate 4	Isolate 5
10	12,00 ^a ±3,55	35,44 ^a ±3,77
20	44,60 ^a ±2,96	49,36 ^a ±3,79
30	62,55 ^b ±4,26	65,84 ^b ±3,84
40	94,67 ^a ±1,62	83,61 ^a ±2,47

Chú thích: Giá trị trung bình có các ký tự theo sau giống nhau biểu thị sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở $p < 0,05$. Giá trị trung bình $\pm$ SD (độ lệch chuẩn).



Hình 4. Ảnh hưởng của dịch chiết húng quế với các nồng độ khác nhau lên sự phát triển của isolate 4 trong điều kiện *in vitro*. (A) Đối chứng, (B) 10 mg/ml, (C) 20 mg/ml, (D) 30 mg/ml, (E) 40 mg/ml.



Hình 5. Ảnh hưởng của dịch chiết húng quế với các nồng độ khác nhau lên sự phát triển của isolate 5 trong điều kiện *in vitro*. (F) Đối chứng, (G) 10 mg/ml, (H) 20 mg/ml, (I) 30 mg/ml, (J) 40 mg/ml.

IC₅₀ là nồng độ cần thiết để ức chế 50% sự tăng trưởng của *P. grisea*. Giá trị IC₅₀ càng thấp thì hoạt động kháng nấm của dịch chiết càng mạnh. Với nồng độ 23,70 mg/ml và 19,68 mg/ml dịch chiết húng quế ức chế 50% sự tăng trưởng của chủng isolate 4 và isolate 5 (bảng 7).

Ngoài ra, nhiều nghiên cứu còn cho thấy, húng quế có khả năng ức chế nhiều loại nấm khác nhau: với nồng độ 100% (w/v), dịch chiết húng quế ức chế 33,35% sự tăng trưởng của sợi nấm *Sclerotium rolfsii* - nguyên nhân gây ra bệnh thối hạch (thối gốc có tơ) trên cây cà chua trong điều kiện *in vitro* [26]. Nghiên cứu của Sunčica và cs [27]

Bảng 7. Giá trị IC₅₀ của dịch chiết húng quế ức chế sự phát triển của 2 chủng nấm *P. grisea*.

Chủng nấm	IC ₅₀ (mg/ml)
Isolate 4	23,70 ^a ±0,10
Isolate 5	19,68 ^b ±0,03

Giá trị trung bình có các ký tự theo sau giống nhau biểu thị sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở $p < 0,05$. Giá trị trung bình $\pm$ SD (độ lệch chuẩn).

cũng cho thấy, húng quế có khả năng ức chế các loài nấm *Fusarium*. Các loại nấm này thường có trên ngũ cốc, các sản phẩm làm từ ngũ cốc, trái cây và rau quả. Chúng sở hữu vật chất di truyền để sản xuất độc tố mycotoxin và việc tiêu thụ thực phẩm bị nhiễm độc tố mycotoxin có liên quan đến các bệnh khác nhau ở người, gia súc và vật nuôi như: gây độc tế bào, nhiễm độc gan, gây quái thai, gây đột biến, nhiễm độc thần kinh...

Kết luận

Kết quả nghiên cứu cho thấy, chiết xuất cây rau trai bằng methanol đã ức chế chủng nấm isolate 2 với IC₅₀=2,35 mg/ml; trong khi, dịch chiết húng quế ức chế chủng isolate 5 với IC₅₀=19,68 mg/ml và hoạt tính kháng nấm của dịch chiết húng quế phụ thuộc vào nồng độ dịch chiết và độc tính của các chủng nấm khác nhau.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] K.V.K. Kumar, S.K. Raju, M.S. Reddy, J.W. Kloepper, K.S. Lawrence, D.E. Groth, M.E. Miller, H. Sudini, and B. Du (2009), "Evaluation of commercially available for control of rice sheath blight caused by *Rhizoctonia solani*", *Journal of Pure and Applied Microbiology*, **3**, pp.485-488.
- [2] B. Valent (1990), "Rice blast as a model system for plant pathology", *Phytopathology*, **80**(1), pp.33-36.
- [3] C. Cruz-Vazquez, M. Ramos-Parra, I. Itela-Mendoza, Z. Garcia-Vazquez, and M.T. Quintero-Martinez (2007), "Relationships between stable fly infestation with some physical facility characteristics and sanitation practices in several dairy farms in the state of aguascalientes, Mexico", *Veterinary Parasitology*, **149**(3), pp.246-250.
- [4] J.C. Wang, Y. Jia, J.W. Wen, W.P. Liu, X.M. Liu, L. Li, J.H. Zhang, Z.Y. Jiang, X.L. Guo, and J.P. Ren (2013), "Identification of rice blast resistance genes using international monogenic differentials", *Crop Protection*, **45**, pp.109-116.
- [5] M.T. Le, A. Tsutomu and T. Tohru (2010), "Population dynamics and pathogenic races of rice blast fungus, *magnaporthe oryzae* in the Mekong Delta in Vietnam", *Journal of General Plant Pathology*, **76**(3), pp.177-182.
- [6] Nguyễn Thị Lang và Bùi Chí Bửu (2018), *Công nghệ tiên tiến chọn tạo giống lúa thuần chống chịu mặn - hạn thích nghi với điều kiện canh tác lúa vùng nhiễm mặn thuộc Đồng bằng sông Cửu Long*, Nhà xuất bản Giáo dục.
- [7] L.G.D. Araujo, A.S. Prabhu, and A.D.B. Freire (2000), "Development of blast resistant somaclones of the upland rice cultivar

Araguaia”, *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, **35**, pp.357-367.

[8] A. Meybeck (2012), *Building resilience for adaptation to climate change in the agriculture sector*, Proceedings of the a Joint FAO/OECD workshop, Rome, Italy, April 2012, pp.23-24.

[9] A. Anwar, G.N. Bhat, and G.S. Singhara (2002), “Management of sheath blight and blast in rice through seed treatment”, *Annals of Plant Protection Sciences*, **10(3)**, pp.285-287.

[10] N.M. Gohel, H.L. Chauhan, and A.N. Mehta (2008), “Bio-efficacy of fungicides against *Pyricularia oryzae* the incitant of rice blast”, *Journal of Plant Disease Sciences*, **3(2)**, pp.189-192.

[11] M.T. Zin, Z. Myo, S.A. Seint, P.O. Soe, and A.A.N. Tin (2018), “Evaluation of plant extracts against rice blast disease caused by *Pyricularia grisea*”, *Journal of Agricultural Research*, **5(1)**, pp.37-43.

[12] C.C. Onyeke and K.I. Ugwuoke (2011), “Effects of botanical extracts on the mycelial growth of seed-borne fungi of the african yam bean, *sphenostylis stenocarpa* (hochst ex a. Rich) Harms”, *Nigerian Journal of Biotechnology*, **22**, pp.1-7.

[13] M.Y. Yoon, B. Cha, and J.C. Kim (2013), “Recent trends in studies on botanical fungicides in agriculture”, *Plant Pathology Journal*, **29**, pp.1-9.

[14] M. Zaker (2016), “Natural plant products as eco-friendly fungicides for plant diseases control”, *The Agriculturists*, **14**, pp.134-141.

[15] M. Shibano, K. Kakutani, M. Taniguchi, M. Yasuda, and K. Baba (2008), “Antioxiant constituents in the dayflower (*Commelina communis* L.) and their β - glucosidase - inhibitory activity”. *Journal of Natural Medicines*, **62**, p.349.

[16] J.L. Fei-Hong Bing, Z. Li, G.B. Zhang, Y.F. Liao, J. Li, and C.Y. Dong (2009), “Anti-influenza-virus activity of total alkaloids from *Commelina communis* L.”, *Archives of Virology*, **154**, p.1837.

[17] H.P. Bais, T.S. Walker, H.P. Schweizer, and J.M. Vivanco (2002), “Root specific elicitation and antimicrobial activity of rosmarinic acid in hairy root cultures of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.)”, *Plant Physiology and Biochemistry*, **40**, pp.983-995.

[18] P. Balakrishnan, P.S. Ramalingam, S. Purushothaman, R.

Balu, G. Jolius, and S. Kumaran (2018), “A comprehensive review on *Ocimum basilicum*”, *Journal of Natural Remedies*, **18(3)**, pp.71-85.

[19] A. Khalil (2013), “Antimicrobial activity of ethanolic extracts of *Ocimum basilicum* leaf from Saudi Arabia”, *Biotechnology*, **12**, pp.4-61.

[20] N. Hayashi, and Y. Fukuta (2009), *Proposal for a new international system of differentiating races of blast (Pyricularia oryzae Cavara) by using LTH monogenic lines in rice (Oryza sativa L.)*, Japan International Research Center for Agricultural Sciences, Ibaraki, Japan.

[21] N.S. Kumar, and N. Simon (2016), “In vitro anti antibacterial activity and phytochemical analysis of *Gliricidia sepium* L. leaf extracts”, *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, **5**, pp.131-133.

[22] P.N. Toan, D.T. Xuan, T.T.P. Ha, T.T.T. Anh, and D.T. Khanh (2018), “Inhibitory effects of bamboo leaf on the growth of *Pyricularia grisea* fungus”, *Agriculture*, **8**, pp.92-100.

[23] J. Hubert, R. Mabagala, and D. Mamiro (2015), “Efficacy of selected plant extracts against *Pyricularia grisea*, causal agent of rice blast disease”, *American Journal of Plant Sciences*, **6**, pp.602-611.

[24] N.L. Suriani, D.N. Suprata, I.M. Sudana, and I.G.R.M. Temaja (2015), “Antifungal activity of piper canium against *Pyricularia oryzae* Cav. the cause of rice blast disease on rice”, *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare*, DOI:10.18517/IJASEIT.9.2.3226.

[25] M.O. Adebola, O.B. Ayeni and M.B. Aremu (2017), “Evaluation of leaf extracts of four plant species against rice blast pathogen (*Magnaporthe oryzae*)”, *Virology and Mycology*, **6(2)**, p.46.

[26] N. Cipto, M. Eka and J.R.C. Christian (2019), “Antifungal activities of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) aqueous extract against *Sclerotium rolfsii*, causal agent of damping-off on tomato seedling”, *Journal of Agricultural Science*, **41(1)**, pp.149-157.

[27] K.T. Sunčica, D. Gordana, L. Jelena, T. Ilija and T. Danijela (2011), “Antifungal activities of basil (*Ocimum basilicum* L.) extract on *Fusarium* species”, *African Journal of Biotechnology*, **10(50)**, pp.10188-10195.

Ảnh hưởng của nhiệt độ, pH và môi trường nuôi cấy đến sinh trưởng phát triển của chủng nấm sò (*Pleurotus* sp.) FH và PN20

Nguyễn Huy Thuận¹, Tạ Thị Huệ², Bùi Hương Lan², Vũ Thị Khánh Linh²,
Phạm Thị Thêu², Đỗ Tuấn Anh², Nguyễn Thị Bích Thùy², Nguyễn Văn Giang^{2*}

¹Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ cao, Trường Đại học Duy Tân

²Khoa Công nghệ sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

Ngày nhận bài 2/3/2020; ngày chuyển phản biện 6/3/2020; ngày nhận phản biện 20/4/2020; ngày chấp nhận đăng 28/5/2020

Tóm tắt:

Nấm sò (*Pleurotus* sp.) được trồng nhiều ở nước ta, không chỉ do chúng cung cấp nguồn thực phẩm sạch, các chất có giá trị dùng trong y tế mà còn đóng vai trò quan trọng trong chuyển hoá các loại phụ phẩm nông nghiệp thành các sản phẩm có giá trị, xử lý các hợp chất xenobiotic. Sinh trưởng, phát triển của sợi nấm chịu tác động của nhiệt độ, pH và môi trường nhân giống. Nghiên cứu này được tiến hành với mục đích đánh giá và tìm được điều kiện nhiệt độ, pH và môi trường nhân giống thích hợp với sự phát triển sợi nấm của 2 chủng nấm sò FH và PN20 để quá trình duy trì và sản xuất giống nấm đạt hiệu quả cao. Kết quả cho thấy, Potato dextrose agar (PDA) là môi trường tốt nhất cho sợi nấm sò FH và PN20 phát triển, tiếp theo là Sweet potato dextrose agar (SPDA) và Yam dextrose agar (YDA). Nhiệt độ và pH môi trường nuôi cấy tối ưu cho 2 chủng nấm này phát triển lần lượt là 25°C và 6,5.

Từ khóa: môi trường PDA, nấm sò, nhiệt độ, pH, SPDA, YDA.

Chỉ số phân loại: 4.1

Đặt vấn đề

Khoảng hơn 200 loài nấm ăn đã được sử dụng như thực phẩm chức năng trên toàn thế giới, nhưng chỉ khoảng 35 loài được nuôi trồng và thương mại hoá [1]. Các loài nấm ăn rất giàu protein, glycoproteins, peptides, triterpenoids, khoáng cũng như vitamin B, C và D [1-3]. Quả thể của nấm sò (*Pleurotus* sp.) chứa các thành phần có tính chất chống viêm, kích thích và điều hoà hệ miễn dịch, có hoạt tính chống ung thư [4]. Ngoài những ứng dụng trong chế biến làm thức ăn, thực phẩm chức năng và chiết xuất những hợp chất có tính chất dược liệu [5], nấm còn được sử dụng trong quá trình tái chế các phụ phẩm nông nghiệp, chuyển hoá các hợp chất lignocellulose thành các thành phần có giá trị hơn, phân huỷ sinh học các hợp chất xenobiotic, sản xuất enzyme... [3, 4, 6].

Tại các khu vực trồng nấm thuộc vùng nhiệt đới, người trồng nấm còn gặp cản trở bởi nhiệt độ trong ngày. Giai đoạn đầu tiên của quá trình sản xuất nấm là chuẩn bị giống nấm các cấp. Đây là giai đoạn cấy chuyển giống nấm từ môi trường này sang môi trường khác [7, 8]. Sinh trưởng của nấm chịu ảnh hưởng của nhiều yếu tố như giá thể trồng, môi trường nhân giống, nhiệt độ, pH môi trường, độ ẩm và cường độ chiếu sáng [1, 2, 9]. Mục đích của nghiên cứu này là đánh giá và tìm được điều kiện nhiệt độ, pH môi trường

và môi trường thích hợp với sự phát triển sợi nấm của 2 chủng nấm sò FH và PN20 để quá trình duy trì và sản xuất giống nấm đạt hiệu quả cao.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Hai chủng nấm sò FH và PN20 được lưu giữ tại Trung tâm Đào tạo, Nghiên cứu và Phát triển nấm, Khoa Công nghệ sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam. Chủng nấm PN20 được Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn cung cấp, chủng FH có nguồn gốc từ Thái Lan. Hai chủng nấm được cấy trong ống thạch nghiêng, không bị nhiễm, sợi nấm không có dấu hiệu già hoá.

Các môi trường, hoá chất dùng để nuôi cấy sợi nấm sò *Pleurotus* sp. gồm:

- PDA: 200 g khoai tây, 20 g dextrose, 15 g agar, 1000 ml nước cất.

- SPDA: 200 g khoai lang, 20 g dextrose, 15 g agar, 1000 ml nước cất.

- YDA: 200 g khoai sọ, 20 g dextrose, 15 g agar, 1000 ml nước cất.

Chuẩn bị môi trường: khoai đã gọt sạch vỏ được luộc với 1000 ml nước cất trong 30 phút, lọc lấy dịch. Dịch này được pha với các thành phần còn lại của từng loại môi trường và

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

Effects of temperature, pH, and cultural media on the growth of Oyster mushroom (*Pleurotus* sp.) FH and PN20

Huy Thuan Nguyen¹, Thi Hue Ta², Huong Lan Bui²,
Thi Khanh Linh Vu², Thi Theu Pham², Tuan Anh Do²,
Thi Bich Thuy Nguyen², Van Giang Nguyen^{2*}

¹Institute of Research and Development, Duy Tan University

²Faculty of Biotechnology, Vietnam National University of Agriculture

Received 2 March 2020; accepted 28 May 2020

Abstract:

Oyster mushrooms (*Pleurotus* sp.) are widely grown in Vietnam, because they not only provide clean food, and valuable pharmaceutical substances for medical use, but also play an important role in converting agricultural byproducts into valuable products, in biotreatment of xenobiotic compounds. The growth of mycelia is affected by temperature, pH, and culture medium. Therefore, the present study aimed at investigating the behaviour of oyster mushroom strains FH and PN20 under different media, temperature, and pH requirements for mycelial growth for the maintenance and production mushroom spawn with high efficiency. The results showed that the Potato dextrose agar (PDA) medium was the best culture for mycelial growth of FH and PN20 oyster mushrooms, followed by Sweet potato dextrose agar (SPDA) and Yam dextrose agar (YDA). The optimum culture temperature and pH for mycelium growth of FH and PN20 oyster mushrooms are 25°C, and 6.5, respectively.

Keywords: medium PDA, Oyster mushroom, pH, Sweet potato dextrose agar (SPDA), temperature, Yam deextrose agar (YDA).

Classification number: 4.1

hấp khử trùng 15 phút tại 121°C. Môi trường sau khi hấp được chuyển sang các đĩa petri và làm nguội xuống 40°C. Các chủng nấm được cấy tại trung tâm của các đĩa môi trường và nuôi trong các điều kiện thí nghiệm. Tốc độ phát triển của tản nấm được đo 2 ngày 1 lần trong 8 ngày [8].

Thí nghiệm 1 - Đánh giá ảnh hưởng của nhiệt độ đến sinh trưởng của chủng giống nấm sò FH và PN20: cắt lấy 0,5 x 0,5 cm mỗi chủng nấm và cấy tại trung tâm của các đĩa petri chứa 20 ml môi trường PDA và nuôi trong các điều kiện nhiệt độ 10, 15, 20, 25, 30 và 35°C. Tốc độ mọc của sợi nấm, đường kính tản nấm được quan sát và đo sau 2, 4, 6 và 8 ngày nuôi. Tốc độ mọc của sợi nấm (cm/ngày) được xác định theo [7].

Thí nghiệm 2 - Đánh giá ảnh hưởng của pH môi trường đến sinh trưởng của chủng giống nấm sò FH và PN20: sau khi tìm được nhiệt độ thích hợp, 2 chủng nấm sò được nuôi trên môi trường PDA với các giá trị pH (5,5; 6; 6,5) để tìm giá trị pH thích hợp. Tốc độ mọc của sợi nấm, đường kính tản nấm được quan sát và đo sau 2, 4, 6 và 8 ngày nuôi. Tốc độ mọc của sợi nấm (cm/ngày) được xác định theo [7, 10].

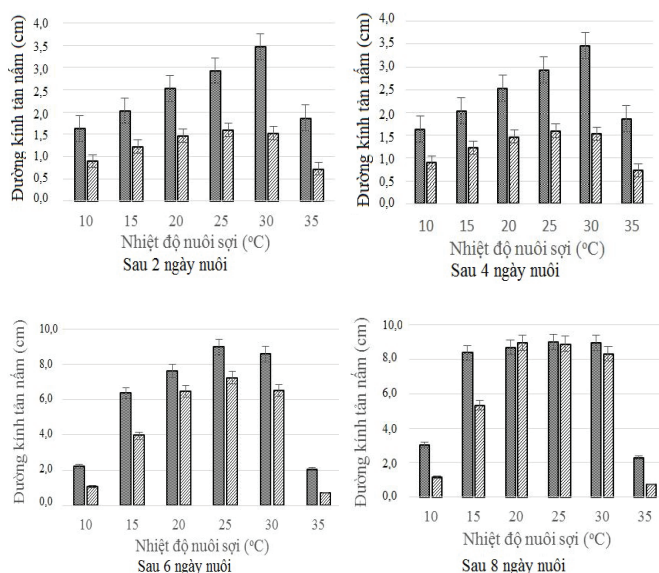
Thí nghiệm 3 - Đánh giá ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến sinh trưởng của chủng giống nấm sò FH và PN20: các chủng nấm sò được cấy vào trung tâm các đĩa petri chứa 20 ml môi trường PDA, SPDA và YDA với giá trị pH thích hợp (kết quả của thí nghiệm 2). Các đĩa petri được ủ tại nhiệt độ thích hợp với từng chủng nấm (kết quả thí nghiệm 1). Tốc độ mọc của sợi nấm được đo hàng ngày theo [7].

Mỗi thí nghiệm được bố trí lặp lại 3 lần, số liệu được xử lý bằng phần mềm Excel 2013 và IRRISTST 5.0. Mật độ hệ sợi được đánh giá bằng cách quan sát mức độ dày, mỏng của tản nấm và mức độ bám chắc của hệ sợi nấm vào môi trường.

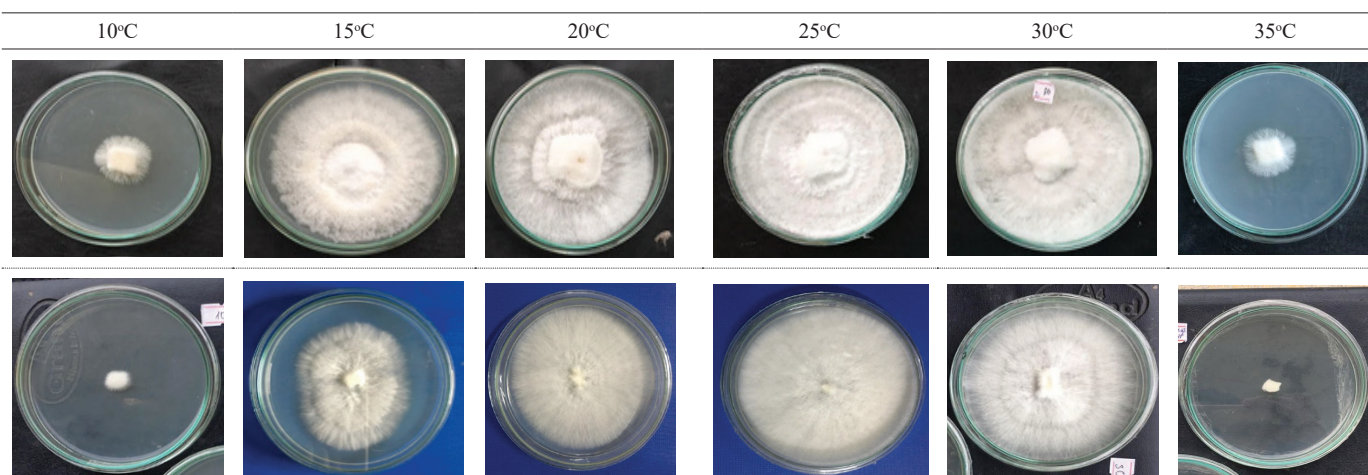
Kết quả và thảo luận

Ảnh hưởng của nhiệt độ đến sinh trưởng của sợi nấm sò FH và PN20

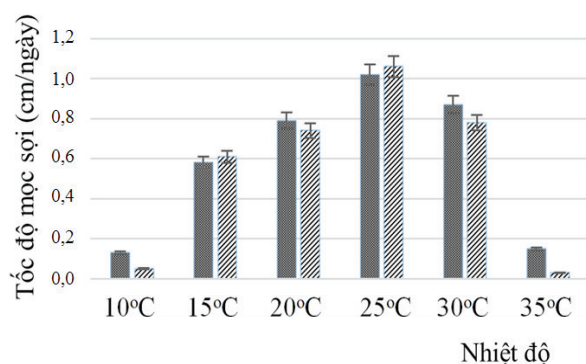
Nhiệt độ và pH môi trường nuôi ảnh hưởng rất lớn tới sự phát triển của sợi nấm, đặc biệt trong giai đoạn ra quả thể. Nhiệt độ trong ngày dao động từ 25 đến 35°C là một trở ngại lớn với người trồng nấm ở vùng nhiệt đới. Chính vì vậy, chọn được các chủng nấm sò có thể chịu được nhiệt độ cao là rất cần thiết để đảm bảo năng suất, chất lượng nấm [2]. Hai chủng nấm sò FH và PN20 được nuôi cấy trên đĩa petri chứa môi trường PDA với giá trị pH 6,5 tại các nhiệt độ 10, 15, 20, 25, 30 và 35°C. Tốc độ phát triển của tản nấm được quan sát và đo 2 ngày 1 lần, trong 8 ngày. Tốc độ mọc của 2 chủng nấm FH và PN20 có xu hướng giống nhau tại các nhiệt độ khác nhau (hình 1, 2 và 3). Sợi của 2 chủng nấm sò thí nghiệm phát triển được tại các nhiệt độ khảo sát, tuy nhiên tốc độ mọc sợi của chúng chịu ảnh hưởng trực tiếp bởi nhiệt độ.



Hình 1. Ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi cấy tới sự phát triển của sợi nấm sò FH (trái) và PN20 (phải).



Hình 2. Sinh trưởng của sợi nấm sò FH (hàng trên) và PN20 (hàng dưới) trên môi trường PDA sau 8 ngày nuôi ở các nhiệt độ khác nhau.



Hình 3. Tốc độ mọc sợi của chủng nấm sò FH (trái) và PN20 (phải) trên môi trường PDA tại các ngưỡng nhiệt độ thí nghiệm.

Sau 8 ngày nuôi sợi, ở các nhiệt độ 20, 25 và 30°C tốc độ mọc sợi của 2 chủng nấm sò FH và PN20 khá cao, sợi nấm phát triển tốt, hệ sợi mọc đều về các hướng. Tại các ngưỡng nhiệt độ 15, 20 và 30°C hệ sợi nấm mảnh, nhiều sợi khí sinh; khi nuôi tại nhiệt độ 25°C sợi nấm tạo hệ sợi dày, bám chắc vào môi trường nuôi sợi. Tốc độ mọc sợi của chủng nấm sò FH cao hơn tốc độ mọc sợi của PN20 (hình 1). Một số nhà nghiên cứu như Hasan Sardar và cs (2015) [2], Zharare và cs (2010) [7], Neelam và cs (2013) [11] cũng có kết luận, nhiệt độ thích hợp để sợi nấm sò phát triển là 20-30°C, nhiệt độ thích hợp nhất là 25°C. Trong nghiên cứu của Bùi Đoàn Phượng Linh và cs (2018) [10], sợi nấm bào ngư xám (*Pleurotus sajor-caju*) phát triển tốt tại ngưỡng nhiệt độ 23-30°C, tốt nhất trong khoảng 25-28°C. Sinh trưởng của sợi nấm và quá trình hình thành quả thể nấm của các chủng nấm sò chịu tác động của nhiệt độ và chúng có thể phát triển được ở nhiệt độ cao tại các vùng nhiệt đới [8]. Kết quả thí nghiệm này cho thấy, 2 chủng nấm sò FH và PN20 có khả năng sinh trưởng tốt trong điều kiện của các vùng nhiệt đới và cận nhiệt đới, tăng cơ hội sản xuất nấm ăn cho các hộ gia đình.

Tốc độ mọc của sợi nấm có ý nghĩa rất lớn trong quá trình trồng nấm, cụ thể tại pha ương sợi nấm sau khi cấy nấm vào bịch giá thể nuôi trồng, trước pha tạo quả thể nấm. Trong pha ương sợi này, tốc độ mọc của sợi nấm quyết định thời gian nuôi trồng và năng suất nấm. Tốc độ mọc sợi nhanh làm tăng tốc độ ăn sâu của sợi nấm vào trong giá thể nuôi trồng, thu nhận được nhiều dinh dưỡng để nuôi sợi. Bên cạnh đó, sợi nấm mọc nhanh sẽ dễ dàng loại trừ các vi sinh vật gây nhiễm. Nếu sợi nấm mọc chậm, cơ chất không được bao phủ bởi sợi nấm sẽ rất dễ bị nhiễm các loại nấm dại, vi khuẩn, kết quả làm giảm năng suất [7].

Tốc độ mọc sợi của 2 chủng nấm sò FH và PN20 thấp nhất và có xu hướng dừng lại tại nhiệt độ nuôi sợi 10 và 35°C; tốc độ mọc sợi của hai chủng nấm sò này sau 8 ngày

nuôi chỉ đạt lần lượt 0,22 cm/ngày và 0,03 cm/ngày. Tốc độ phát triển của sợi tăng dần khi nhiệt độ tăng từ 15°C đến 25°C và đạt giá trị cao nhất tại 25°C. Khi tăng nhiệt độ lên 30°C và 35°C tốc độ mọc sợi của chủng nấm FH chỉ đạt 85,3 và 14,7% và PN20 là 97,2 và 26,4% so với tốc độ mọc sợi tại 25°C. Như vậy, có thể kết luận chủng nấm sò PN20 mẫn cảm với nhiệt độ hơn là FH. 25°C cũng là nhiệt độ tối ưu để sợi của các chủng nấm sò trong nghiên cứu của Hasan Sardar và cs (2015) [2], Zharare và cs (2010) [7] phát triển. Bùi Đoàn Phượng Linh và cs (2018) [10] khi đánh giá ảnh hưởng của nhiệt độ đến sự phát triển của sợi nấm bào ngư xám cũng kết luận nhiệt độ cao hơn 30°C không thích hợp cho sợi nấm phát triển, sợi nấm mảnh. Kết quả này có khác với nghiên cứu của Ian và cs (2019) [9], các tác giả này cho rằng nhiệt độ 22°C thích hợp cho sợi nấm sò *P. ostreatus* phát triển.

Ảnh hưởng của pH môi trường nuôi cấy đến sinh trưởng của sợi nấm sò FH và PN20

Mỗi chủng nấm sò sẽ phát triển tốt trên môi trường nuôi cấy với giá trị pH thích hợp. Giá trị pH từ 4,0 đến 7,0 thích hợp cho sợi nấm phát triển, giá trị pH tối ưu là 6,5 [1]. Khi sợi nấm phát triển tốt sẽ đảm bảo quá trình hình thành quả thể diễn ra thuận lợi và đảm bảo năng suất nấm, do pH và nhiệt độ ảnh hưởng tới hoạt động của các enzyme thủy phân các hợp chất hữu cơ có trong cơ chất. Thí nghiệm này được tiến hành trên môi trường PDA với các pH (5,0; 6,0 và 6,5) tại nhiệt độ 25°C.

Bảng 1. Ảnh hưởng của pH tới tốc độ mọc sợi của hai chủng nấm sò FH và PN20 trên môi trường PDA.

pH	Đường kính tán nấm (cm)								Tốc độ mọc sợi (cm/ngày)	
	2 ngày nuôi		4 ngày nuôi		6 ngày nuôi		8 ngày nuôi			
	FH	PN20	FH	PN20	FH	PN20	FH	PN20	FH	PN20
5,5	1,4	1,03	3,7	2,97	5,73	6,03	8,0	8,97	0,93	1,06
6	1,83	1,03	4,03	2,97	6,07	6,03	8,67	8,97	1,02	1,06
6,5	2,93	1,6	5,67	4,13	8,97	7,23	9,0	8,9	1,06	1,05
LSD _{0,05}	0,15	0,14	0,58	0,18	0,49	0,2	0,54	0,3		

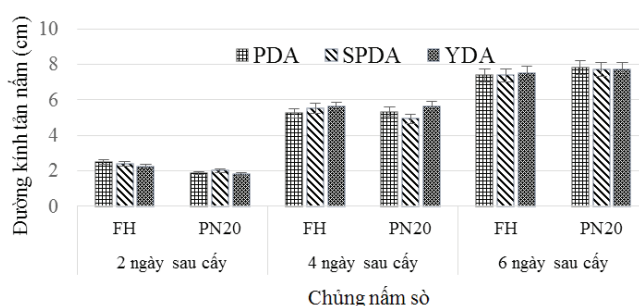
Kết quả bảng 1 cho thấy, sợi của 2 chủng nấm sò FH và PN20 đều phát triển trên môi trường PDA với các giá trị pH 5,5; 6 và 6,5. Sợi của chủng nấm sò FH và PN20 phát triển tương đương nhau, tốc độ mọc sợi của 2 chủng nấm này sau 8 ngày trên môi trường PDA đạt 0,93-1,06 cm/ngày. Không có sự khác biệt quá lớn về tốc độ mọc sợi của cùng một chủng nấm tại các giá trị pH thí nghiệm. Sau 8 ngày nuôi, đường kính tán nấm của 2 chủng đều đạt 8-9 cm. Tốc độ mọc sợi của 2 chủng này nhanh hơn tốc độ mọc sợi của các chủng nấm trong thí nghiệm của Valentin và cs (2016) [12]. Trong nghiên cứu của Hasan Sardar và cs (2015) [2], đa số các chủng nấm sò cũng phát triển tốt nhất tại pH 6, trừ chủng *P. sapidus* (FW-133) đạt tốc độ phát triển nhanh

nhất tại pH 6-7. Trong thí nghiệm của Bùi Đoàn Phượng Linh và cs (2018) [10], sợi nấm bào ngư xám phát triển tốt trên môi trường có pH 6. Karacanci năm 1997 đã thông báo, sinh trưởng của chủng nấm *P. ostreatus* đạt tối đa tại pH 6,5 (trích theo [2]). Các kết quả này có thể giải thích được do sự khác biệt di truyền của các loài khác nhau trong chi *Pleurotus*.

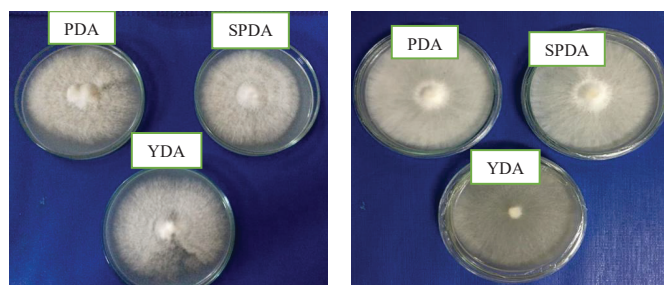
Từ kết quả trên cho thấy, pH 6,5 là phù hợp nhất cho sinh trưởng phát triển của nấm sò FH và PN20. Giá trị pH này được chúng tôi sử dụng trong thí nghiệm tiếp theo.

Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến sinh trưởng của chủng nấm sò FH và PN20

Hai chủng nấm FH và PN20 được nuôi trên môi trường PDA, SPDA và YDA tại 25°C, pH 6,5 để đánh giá ảnh hưởng của môi trường nuôi sợi tới sinh trưởng của sợi nấm sau 6 ngày. Kết quả hình 4 cho thấy, 3 môi trường đều ảnh hưởng tới sự phát triển của sợi nấm.



Hình 4. Đường kính tán nấm sò FH và PN20 trên môi trường PDA, SPDA và YDA.



Hình 5. Mật độ sợi nấm sò FH (trái) và PN20 (phải) trên các môi trường PDA, SPDA và YDA sau 6 ngày nuôi.

Hai chủng nấm sò FH và PN20 phát triển tốt trên cả 3 môi trường nuôi cấy. Đường kính tán nấm và tốc độ mọc sợi của chủng PN20 lớn nhất (7,83 và 1,22 cm/ngày) đạt được sau 6 ngày nuôi trên môi trường PDA. Tốc độ mọc sợi của sợi nấm sò PN20 trên môi trường PDA nhanh hơn trên các môi trường còn lại. Đường kính tán nấm và tốc độ mọc sợi của chủng nấm sò FH không có sự khác biệt trên cả 3 môi trường thí nghiệm (đạt 7,37 và 1,17 cm/ngày). Tuy nhiên, sợi của chủng FH và PN20 trên môi trường PDA

bám chặt vào môi trường nuôi và hệ sợi nấm dày hơn khi sợi nấm phát triển trên môi trường SPDA và YDA (hình 5). Sợi nấm sò được nuôi trên các môi trường khác nhau sẽ phát triển với tốc độ khác nhau do được cung cấp nguồn dinh dưỡng khác nhau, đặc biệt nguồn carbon. Sự phát triển của sợi nấm trên môi trường được cung cấp nguồn carbon là glucose và sucrose sẽ tốt hơn trên các môi trường chứa các nguồn carbon khác [13]. Kết quả thí nghiệm của chúng tôi tương tự với kết quả thí nghiệm của Thanh M. Nguyen và Senaratne L. Ranamukhaarachchi (2020) [14]; Hasan Sardar và cs (2015) [2]; Ha Thi Hoa và Chun Li Wang (2015) [8]; Hussain và cs (2004) [15]. Các tác giả này cũng khẳng định sợi nấm sò phát triển nhanh nhất trên môi trường PDA. Hasan Sardar và cs (2015) [2] cho rằng, môi trường PDA chứa nguồn carbon thích hợp với sợi nấm sò hơn các môi trường khác.

Kết luận

Tốc độ mọc sợi của hai chủng nấm sò thí nghiệm chịu tác động của điều kiện nuôi sợi. Các yếu tố nhiệt độ, pH, môi trường nuôi cấy đều có ảnh hưởng đến sự tăng trưởng sợi nấm của hai chủng nấm sò FH và PN20. Nhiệt độ thuận lợi cho sự mọc sợi của hai chủng nấm này từ 20 đến 30°C, tốt nhất tại 25°C. Sợi nấm phát triển mạnh trên môi trường có pH 6,5.

Môi trường PDA thích hợp với sự mọc sợi của hai chủng nấm sò FH và PN20 hơn môi trường SPDA và YDA. Trên môi trường PDA hệ sợi của hai chủng nấm sò thí nghiệm dày, sợi nấm mọc đều và bám chặt vào môi trường nuôi. Khi nuôi sợi của hai chủng nấm thí nghiệm trên môi trường YDA và SPDA, sợi nấm mảnh, không bám chắc vào môi trường nuôi sợi.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] M.B. Bellettini, et al. (2019), "Factors affecting mushroom *Pleurotus* spp.", *Saudi Journal of Biological Sciences*, **26**, pp.633-646.
- [2] Hasan Sardar, et al. (2015), "Effects of different culture media, temperature and pH levels on the growth of wild and exotic *pleurotus* species Pak", *J. Phytopathol.*, **27**, pp.139-145.
- [3] Yashvant Patel, et al. (2012), "Medicinal properties of

Pleurotus species (Oyster mushroom): a review", *World Journal of Fungal and Plant Biology*, **3(1)**, pp.1-12.

- [4] A.S. Sekan, et al. (2019), "Green potential of *Pleurotus* spp. in biotechnology", *PeerJ*, DOI: 10.7717/peerj.6664.
- [5] M.H.Z. Abidin, et al. (2017), "Therapeutic properties of *Pleurotus* species (Oyster mushrooms) for atherosclerosis: a review", *Int. J. of Food Proper.*, **20**, pp.1251-1261.
- [6] E.A. Adebayo, J.K. Oloke (2017), "Oyster mushroom (*pleurotus* species): a natural functional food", *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, **7**, pp.254-264.
- [7] G.E. Zharare, et al. (2010), "Effects of temperature and hydrogen peroxide on mycelial growth of eight *Pleurotus* strains", *Scientia. Hortic.*, **125**, pp.95-102.
- [8] Ha Thi Hoa, Chun Li Wang (2015), "The effects of temperature and nutritional conditions on mycelium growth of two Oyster mushrooms (*Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus cystidiosus*)", *Mycobiology*, **43**, pp.14-23.
- [9] F. Ian, et al. (2019), "Effect of temperature and growth media on mycelium growth of *Pleurotus ostreatus* and *Ganoderma lucidum* strains", *Cohesive J. Microbiol. Infect. Dis.*, **2**, DOI: 10.31031/CJMI.2019.02.000549.
- [10] Bùi Đoàn Phượng Linh, Nguyễn Thị Thủy Trúc, Bùi Hoàng Thiêm (2018), "Môi trường tối ưu cho nuôi cấy meo giống và nuôi trồng nấm bào ngư xám (*Pleurotus sajor-caju*) tại TP Biên Hòa", *Tạp chí Khoa học, Trường Đại học Đồng Nai*, **9**, tr.138-148.
- [11] S. Neelam, et al. (2013), "Comparative studies on growth parameters and physio-chemical analysis of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus florida*", *Asian J. Plant Sci. Res.*, **3**, pp.163-169.
- [12] Z. Valentin, et al. (2016), "Effect of nutritive media and pH on mycelial growth of some *Pleurotus eryngii* strains in vitro", *Bulletin UASVM Horticulture*, **73(2)**, DOI: 10.15835/buasvmcn-hort:12352.
- [13] C.M. Santiago (1983), "Basidiocarp production in volvariella volvacea in laboratory cultures", *Philippines Journal of Biology*, **12**, pp.70-76.
- [14] Thanh M. Nguyen, Senaratne L. Ranamukhaarachchi (2020), "Effect of different culture media, grain sources and alternate substrates on the mycelial growth of *Pleurotus eryngii* and *Pleurotus ostreatus*", *Pakistan Journal of Biological Sciences*, **23**, pp.223-230.
- [15] A. Hussain, N. Hussain (2004), "Evaluation of different media, spawn and substrates for the cultivation of *Pleurotus ostreatus* in Muzaffarabad (Pakistan)", *Mycopath.*, **2**, pp.67-69.

Kết quả khảo nghiệm 5 giống bơ trong nước ở thời kỳ kinh doanh tại Mộc Châu - Sơn La

Nguyễn Văn Lam*, Lê Tất Khương, Nguyễn Phương Tùng

Viện Nghiên cứu và Phát triển Vùng, Bộ Khoa học và Công nghệ

Ngày nhận bài 2/11/2020; ngày chuyển phản biện 6/11/2020; ngày nhận phản biện 3/12/2020; ngày chấp nhận đăng 8/12/2020

Tóm tắt:

Bơ (*Persea americana* Mills) là loại cây ăn quả lâu năm, có giá trị kinh tế cao, được coi là cây trồng truyền thống ở Tây Nguyên, như Đắk Lắk, Đắk Nông, Gia Lai, Kon Tum và có xu hướng phát triển rộng ra một số tỉnh phía Bắc, như Nghệ An, Thanh Hóa, Sơn La, Bắc Giang... Do vậy, rất cần thiết có bộ giống bơ chất lượng tốt, phù hợp với điều kiện các tỉnh phía Bắc. Từ năm 2012 đến 2016, Viện Nghiên cứu và Phát triển Vùng đã đưa 5 giống bơ (TA1, TA5, TA44, TA54 và Booth7) vào khảo nghiệm và đã đánh giá tính thích ứng của chúng ở thời kỳ chưa mang quả.

Ở nghiên cứu này, các tác giả tiến hành khảo nghiệm trong thời gian 2017-2020 trên cùng nguồn thực liệu và tập trung đánh giá ở thời kỳ cây cho quả trong điều kiện sinh thái vùng Mộc Châu - Sơn La với mục đích chọn lọc giống bơ tốt đưa vào sản xuất ở miền Bắc. Kết quả khảo nghiệm cho thấy, giống Booth7 và giống TA54 phù hợp với điều kiện ở Mộc Châu - Sơn La.

Từ khóa: cây bơ, chất lượng, đánh giá, khảo nghiệm, năng suất, tăng trưởng.

Chỉ số phân loại: 4.1

A study on the adaptability of locally cultivated varieties of avocado in bearing period in Moc Chau, Son La

Van Lam Nguyen*, Tat Khuong Le, Phuong Tung Nguyen

Institute of Regional Research and Development, Ministry of Science and Technology

Received 2 November 2020; accepted 8 December 2020

Abstract:

Avocado (*Persea americana* Mills), a perennially valuable fruit, is considered a traditional crop, in the Central Highlands of Vietnam that has been gradually developed in some northern provinces such as Nghe An, Thanh Hoa, Son La, Bac Giang, etc. It is, therefore, necessary to have avocado cultivars carefully screened to be suitably cultivated in the condition of the North of Vietnam. In the 2012 to 2016 period, 5 introduced cultivars of avocado coded TA1, TA5, TA44, TA54, and Booth7 had been evaluated in some areas of Vietnam by the Institute of Regional Research and Development and from which their adaptability in non-bearing duration was already recorded.

This study conducted from 2017 up to now was aimed at continuing to evaluate the above-mentioned cultivars in the bearing period. In Moc Chau condition for screening the good ones to be introduced in the large scale of production in the North of Vietnam. Results conducted from the study showed that among avocado cultivars tested, Booth7 and TA54 were considered to be promising indicated by healthy growth, high yield of good quality.

Keywords: avocado, evaluate, growth, productivity, quality, testing.

Classification number: 4.1

Đặt vấn đề

Cây bơ, tên khoa học *Persea americana* Mills, thuộc họ Lauraceae (Long não) có nguồn gốc từ vùng nhiệt đới Trung Mỹ. Bơ là loại quả có giá trị dinh dưỡng cao, với hơn 14 loại vitamin và khoáng chất [1]. Quả bơ không có Cholesterol, mà

lại chứa chất béo không bão hòa, có lợi cho sức khỏe [2]. Quả bơ có hàm lượng protein cao nhất so với các loại quả khác, gần tương đương với sữa [3] nên nhu cầu tiêu dùng cao và giá trị xuất khẩu tương đối lớn. Hiện nay, trên thế giới có hơn 70 quốc gia trồng bơ, trong đó 23 nước có diện tích và sản lượng

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

lớn, vị trí số một thuộc về Mehico (diện tích 188.723 ha, sản lượng 2.029.886 tấn) [4].

Ở Việt Nam, bơ được trồng nhiều và từ khá lâu đời ở một số tỉnh Tây Nguyên với diện tích khoảng 8.000 ha [5, 6]. Những năm gần đây, một số tỉnh phía Bắc và Bắc Trung Bộ như Quảng Trị, Nghệ An, Thanh Hóa, Sơn La... cũng đang chú ý đến việc phát triển cây bơ thành hàng hóa. Trên thực tế, một số cây/vườn bơ cũng đã thể hiện khả năng sinh trưởng phát triển khá tốt ở các địa phương này, dù số lượng còn rất khiêm tốn.

Tuy nhiên, cây bơ ở Việt Nam chưa trở thành cây hàng hóa chủ lực vì: cơ cấu giống thiếu đa dạng, trình độ sản xuất chưa đáp ứng được yêu cầu, còn nhiều yếu kém về bảo quản chế biến sau thu hoạch, chất lượng sản phẩm không đồng đều..., nên giá trị sản xuất bơ mang lại chưa cao. Để cây bơ trở thành cây hàng hóa chủ lực bền vững, mang lại hiệu quả kinh tế cao, cần phải có những giống bơ năng suất cao, chất lượng tốt, đáp ứng được yêu cầu và thị hiếu của người tiêu dùng.

Từ năm 2013 [7], Viện Nghiên cứu và Phát triển Vùng đã trồng thử nghiệm 11 giống bơ triển vọng tại Mộc Châu - Sơn La và Nghĩa Đàn - Nghệ An, trong đó có 6 giống bơ có nguồn gốc từ Cuba và 5 giống trong nước. Viện đã hoàn thành việc đánh giá các giống bơ trên ở giai đoạn kiến thiết cơ bản và bước đầu khẳng định một số giống có sức sinh trưởng tốt, phù hợp với điều kiện các tỉnh phía Bắc. Để khẳng định việc lựa chọn một số giống bơ tốt, Viện tiếp tục đánh giá các giống bơ này ở thời kỳ cây mang quả.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu nghiên cứu

5 giống bơ trong nước (bảng 1).

Bảng 1. Tên và nguồn gốc thu thập của các giống bơ.

TT	Giống	Nguồn gốc thu thập
1	TA1	Viện Khoa học Kỹ thuật Nông Lâm nghiệp Tây Nguyên thu thập tại Buôn Ma Thuột - Đắk Lắk
2	TA5	Viện Khoa học Kỹ thuật Nông Lâm nghiệp Tây Nguyên thu thập tại Buôn Ma Thuột - Đắk Lắk
3	TA44	Viện Khoa học Kỹ thuật Nông Lâm nghiệp Tây Nguyên thu thập tại Đắk Lắk
4	TA54	Viện Khoa học Kỹ thuật Nông Lâm nghiệp Tây Nguyên thu thập tại Cư Suê - Gia Lai
5	Booth7	Có nguồn gốc từ Mỹ, đã được công nhận giống trong nước

Thời gian và địa điểm nghiên cứu: nghiên cứu được thực hiện từ 1/2017 đến 11/2020 tại xã Đông Sang, huyện Mộc Châu, tỉnh Sơn La.

Phương pháp nghiên cứu

- Sử dụng phương pháp nghiên cứu thực vật học dựa trên bảng mô tả của Viện Tài nguyên Di truyền Thực vật.

- Cách chọn mẫu và các chỉ tiêu đánh giá của 5 giống bơ trên vườn cây bơ đã trồng từ năm 2012, chọn ngẫu nhiên

mỗi giống 5 cây thí nghiệm, đánh dấu 3 cây trong 5 cây đã chọn để đo đếm các chỉ tiêu:

+ Chiều cao cây: đo từ mặt đất đến chiều cao vút ngọn, đo 4 lần/năm vào các thời điểm tháng 2, 5, 8 và 11.

+ Đường kính gốc: đánh dấu vị trí đo cách mặt đất 10 cm, sử dụng thước Panme để đo, đo 4 lần/năm vào các thời điểm tháng 2, 5, 8 và 11.

+ Đường kính tán: xác định hình chiếu của tán cây trên mặt đất, sử dụng thước dây đo theo 4 hướng Đông, Tây, Nam, Bắc; sau đó lấy trị số trung bình.

+ Theo dõi các đợt lộc: theo dõi 3 cây/giống, thời gian xuất hiện lộc có khoảng 10% số cây xuất hiện cành lộc, xuất hiện rõ, kết thúc khoảng 80% số cây xuất hiện cành lộc. Sinh trưởng của các đợt lộc: đo chiều dài cành lộc, đường kính cành lộc thuần thực (đo cách gốc cành lộc 1 cm), chiều dài cành lộc (đo từ gốc cành đến đỉnh cành), số lá/cành lộc. Đo vào thời điểm tháng 2, 5 và 8.

- Phương pháp phân tích chất lượng quả:

+ Vật chất khô (%): theo TCVN 5084:2007.

+ Đường tổng số (%): phương pháp chuẩn độ theo TCVN 4594:1998.

+ Protein (%): phương pháp Kjeldahl theo TCVN 8125:2015.

+ Lipit (%): phương pháp chiết Soxhlet theo TCVN 10730:2015.

- Xử lý số liệu: phân tích, so sánh số liệu bằng phần mềm IRRISTAT 5.0.

Kết quả nghiên cứu và thảo luận

Đặc điểm hình thái lá của các giống bơ nghiên cứu

Đặc điểm hình thái lá là một trong những tính trạng thể hiện sự đặc trưng của giống, làm cơ sở để phân biệt sự khác nhau giữa các giống. Kết quả đánh giá đặc điểm hình thái lá của 5 giống bơ trong nước được tóm tắt trong bảng 2.

Bảng 2. Đặc điểm hình thái lá của 5 giống bơ nghiên cứu tại Mộc Châu - Sơn La.

Giống	Chiều dài phiến lá (cm)	Chiều rộng phiến lá (cm)	Chiều dài cuống lá (m)	Hình dạng lá	Hình dạng đầu lá
TA1	21,67	8,20	3,10	Elip	Nhọn mũi
TA5	21,60	8,73	4,10	Elip	Nhọn
TA44	21,50	11,07	3,17	Hình trứng	Nhọn mũi
TA54	20,17	8,50	3,10	Hình trứng	Nhọn mũi
Booth7	19,83	10,80	3,20	Hình trứng	Nhọn mũi
Nhỏ nhất	19,83	8,20	3,10	-	-
Lớn nhất	21,67	11,07	4,10	-	-

Số liệu bảng 2 cho thấy, chiều dài phiến lá của các giống dao động từ 19,83 đến 21,67 cm, trong đó giống Booth7 có chiều dài lá ngắn nhất (19,83 cm), giống TA1 có chiều dài lá lớn nhất (21,67 cm). Chiều rộng phiến lá của giống TA44 lớn nhất (11,07 cm). Chiều dài cuống lá của các giống dao động từ 3,10-4,10 cm, trong đó giống TA5 có chiều dài cuống lá lớn nhất (4,10 cm), giống TA54 và TA1 có chiều dài cuống lá bằng nhau (3,10 cm). Hình dạng lá của TA1 hình Elip, có đầu lá nhọn và dài hơn; TA5 cũng có lá hình Elip, đầu lá nhọn nhưng ngắn hơn, 3 giống còn lại đều có lá hình trứng và đầu lá nhọn.

Trong 5 chỉ tiêu về hình thái lá, 2 chỉ tiêu chiều dài và chiều rộng lá có sự thay đổi lớn hơn các chỉ tiêu còn lại, phụ thuộc vào điều kiện sinh thái nơi trồng và trình độ chăm sóc của chủ vườn, các chỉ tiêu hình dạng lá và chiều dài cuống ít thay đổi hơn, thể hiện đặc trưng của giống nhiều hơn.

Khả năng sinh trưởng của các giống bơ

Sinh trưởng của thân tán: cũng như các cây thân gỗ lâu năm khác, sự sinh trưởng của cây bơ thể hiện qua một số chỉ tiêu cơ bản, trong đó, chiều cao cây, đường kính gốc và chiều rộng của tán cây là 3 thông số có ý nghĩa quan trọng hơn cả. Kết quả theo dõi trên từng giống khảo nghiệm được trình bày ở bảng 3.

Bảng 3. Một số chỉ tiêu sinh trưởng của 5 giống bơ tại Mộc Châu - Sơn La (đến tháng 11/2020).

TT	Giống	Cao cây TB (cm)	Đường kính gốc (cm)	Chiều rộng tán (cm)
1	TA1	305,62	7,67	306,23
2	TA5	326,30	8,20	322,22
3	TA44	319,80	7,67	316,65
4	TA54	334,12	8,61	319,20
5	Booth7	309,08	8,12	329,00
Cv(%)		2,60	4,10	2,10
LSD _{0,05}		12,97	0,50	10,42

Bảng 3 cho thấy, chiều cao cây của các giống bơ dao động từ 305,62-334,12 cm, trong đó giống TA54 có chiều cao cây lớn nhất (334,12 cm), lớn hơn so với các giống Booth7, TA1, TA44 một cách chắc chắn ở mức tin cậy 95% nhưng sai khác không có ý nghĩa so với giống TA5 (<LSD_{0,05}). Chiều cao cây của giống TA44 lớn hơn so với các giống TA1 và Booth7 một cách chắc chắn ở mức tin cậy 95%, nhưng sai khác về chiều cao cây giữa hai giống TA44 và TA5 là không chắc chắn (<LSD_{0,05}). Giống TA1 có chiều cao thấp nhất trong 5 giống khảo nghiệm.

Đường kính gốc của các giống bơ khảo nghiệm dao động trong khoảng 7,67-8,61 cm, trong đó giống TA54 có đường kính thân lớn nhất (8,61 cm), lớn hơn so với giống TA1, TA44 một cách chắc chắn ở mức tin cậy 95%. Tuy nhiên, sự sai khác về đường kính gốc của giống TA54 so với giống Booth7 và TA5 là không có ý nghĩa (<LSD_{0,05}).

Sai khác về đường kính gốc giữa các giống TA1, TA44 và Booth7 là không có ý nghĩa, tương tự giữa các giống TA5, TA54 và Booth7 (<LSD_{0,05}).

Đường kính tán của các giống bơ khảo nghiệm dao động từ 306,23-329,00 cm, trong đó giống Booth7 có chiều rộng tán lớn nhất, sự sai khác về chiều rộng tán giữa giống Booth7 với TA1 và TA44 là chắc chắn ở mức tin cậy 95%, sự sai khác về chiều rộng tán giữa các giống TA54, TA44 và TA5 với TA1 là chắc chắn ở mức tin cậy 95%, sai khác về chiều rộng tán giữa TA54, TA44 và TA5 giữa Booth7 và TA5 là không chắc chắn (<LSD_{0,05}). Giống TA1 có chiều rộng tán nhỏ nhất.

Sinh trưởng các đợt lộc: theo dõi 3 đợt lộc: lộc xuân, lộc hè và lộc thu của 5 giống bơ khảo nghiệm, chúng tôi thu được kết quả ở bảng 4.

Bảng 4. Khả năng sinh trưởng các đợt lộc của các giống bơ tại Mộc Châu - Sơn La.

Chi tiêu CT	Lộc xuân			Lộc hè			Lộc thu		
	Chiều dài cành lộc (cm)	Đường kính cành lộc (cm)	Số lá/cành lộc	Chiều dài cành lộc (cm)	Đường kính cành lộc (cm)	Số lá/cành lộc	Chiều dài cành lộc (cm)	Đường kính cành lộc (cm)	Số lá/cành lộc
TA1	15,56	0,55	11,00	15,56	0,57	10,00	14,78	0,58	9,66
TA5	16,44	0,51	11,33	14,78	0,63	10,66	14,77	0,61	11,00
TA44	15,66	0,52	11,00	15,11	0,64	10,00	15,22	0,63	11,67
TA54	16,05	0,59	12,33	15,33	0,58	11,00	15,22	0,63	11,67
Booth7	16,11	0,54	11,33	15,22	0,64	9,33	14,67	0,59	11,33
Cv (%)	3,30	10,70	7,80	2,10	6,10	18,00	3,90	10,60	12,80
LSD _{0,05}	0,99	0,11	1,68	0,58	0,70	3,45	1,09	0,12	2,67

Số liệu bảng 4 cho thấy, chiều dài cành lộc xuân dao động từ 15,56-16,44 cm, sai khác về chiều dài cành lộc xuân giữa các giống không có ý nghĩa (<LSD_{0,05}). Chiều dài cành lộc hè dao động từ 14,78-15,56 cm, trong đó giống TA1 có chiều dài cành lộc hè dài nhất. Sai khác về chiều dài cành lộc hè của giống TA1 với giống TA5 là chắc chắn ở mức tin cậy 95%, sai khác giữa các giống TA1, TA44, TA54 và Booth7 không có ý nghĩa (<LSD_{0,05}). Chiều dài cành lộc thu của các giống dao động trong khoảng 14,67-15,22 cm, sai khác về chiều dài cành lộc thu giữa các giống không có ý nghĩa (<LSD_{0,05}).

Đường kính cành lộc xuân dao động trong khoảng 0,51-0,59 cm, đường kính cành lộc hè dao động trong khoảng 0,57-0,64 cm, đường kính cành lộc thu dao động trong khoảng 0,58-0,63 cm. Sai khác về đường kính cành lộc xuân, hè và thu là không có ý nghĩa (<LSD_{0,05}).

Số lá trên cành lộc xuân dao động từ 11,00-12,33 lá/cành, số lá trên cành lộc hè dao động từ 9,33-11,00 lá/cành, số lá trên cành lộc thu dao động từ 9,66-11,67 lá/cành, sai khác về số lá trên cành lộc xuân, hè và thu không có ý nghĩa (<LSD_{0,05}).

Khả năng ra hoa đậu quả, năng suất và chất lượng các giống bơ khảo nghiệm

Thời gian ra hoa và thời gian thu hoạch quả: giữa các giống bơ khảo nghiệm có sự chênh lệch về thời gian ra hoa, kết quả và thời gian thu hoạch, đây là điểm rất có lợi cho người sản xuất khi bố trí cơ cấu giống trồng cho thu hoạch rải vụ, tạo điều kiện cho việc tiêu thụ sản phẩm. Kết quả theo dõi thời gian ra hoa và thu hoạch của các giống bơ được thống kê trong bảng 5.

Bảng 5. Thời gian ra hoa, thời gian thu hoạch của các giống bơ tại Mộc Châu.

Giống	Thời gian ra hoa	Thời gian thu hoạch
TA1	Tháng 1-3	Tháng 7-9
TA5	Tháng 2-4	Tháng 7-9
TA44	Tháng 1-4	Tháng 6-8
TA54	Tháng 12-2	Tháng 6-8
Booth7	Tháng 1-3	Tháng 10-12

Bảng 5 cho thấy, thời gian ra hoa của các giống TA1, TA44 và Booth7 là tương đương nhau, giống TA5 ra hoa muộn hơn, giống TA54 ra hoa sớm hơn so với các giống còn lại. Thời gian thu hoạch của giống Booth7 muộn nhất, 2 giống TA44 và TA54 cho thu hoạch sớm nhất, 2 giống TA1 và TA5 cho thu hoạch chính vụ.

Năng suất và các yếu tố cấu thành năng suất: năng suất thực thu, số lượng quả trung bình/cây và khối lượng quả trung bình của các giống bơ trong nước tham gia khảo nghiệm được thể hiện ở bảng 6.

Bảng 6. Năng suất và các yếu tố cấu thành năng suất của các giống bơ khảo nghiệm tại Mộc Châu - Sơn La giai đoạn 2017-2020.

Giống	Khối lượng quả trung bình (kg/quả)	Số quả thu hoạch trung bình (quả/cây)				Năng suất thực thu trung bình (kg/cây)			
		Năm 2017	Năm 2018	Năm 2019	Năm 2020	Năm 2017	Năm 2018	Năm 2019	Năm 2020
TA1	0,50	12,33	24,33	40,67	49,00	6,17	12,17	20,33	24,50
TA5	0,45	13,00	19,00	24,33	47,67	6,54	9,56	12,25	23,99
TA44	0,56	9,00	10,00	17,33	25,00	5,07	5,63	9,76	14,08
TA54	0,66	15,67	18,33	41,67	49,33	10,34	12,10	27,50	32,56
Booth7	0,42	16,00	32,67	52,67	63,33	6,82	13,93	22,50	27,17
CV (%)	8,80	17,10	22,90	13,60	16,00	-	-	-	-
LSD _{0,05}	0,87	4,23	8,99	9,01	14,11	-	-	-	-

Bảng 6 cho thấy, khối lượng quả của các giống bơ tham gia khảo nghiệm dao động trong khoảng 0,42-0,66 kg/quả, sự sai khác giữa các giống nằm trong phạm vi sai số không có ý nghĩa thống kê ($<LSD_{0,05}$), trong đó giống TA54 có quả lớn nhất.



Giống bơ TA54 cho khối lượng quả lớn nhất trong 5 giống bơ khảo nghiệm.

Năng suất quả của các giống tham gia khảo nghiệm đều tăng lên qua các năm, đến niên vụ 2020 thì số lượng quả/cây trung bình dao động trong khoảng 25,00-63,33 quả/cây, tương đương với năng suất thực thu là 14,08-32,56 kg/cây. Sai khác về số lượng quả trên cây năm 2020 giữa giống Booth7 và các giống TA1, TA44, giữa các giống TA1, TA5, TA54 với giống TA44 là chắc chắn ở mức độ tin cậy 95%. Sai khác giữa các giống TA1, TA5, TA54 và Booth7 là không có ý nghĩa ($<LSD_{0,05}$).

Chất lượng quả của các giống bơ khảo nghiệm: chất lượng quả của các giống bơ thể hiện ở nhiều chỉ tiêu, song hàm lượng một số chất cơ bản trong quả bơ như: chất khô, lipid, đường tổng số và protein được dùng để đánh giá chất lượng giống bơ đó có tốt hay không.

Kết quả phân tích 4 chỉ tiêu (chất khô, lipid, đường tổng số và protein) có trong quả của 5 giống bơ khảo nghiệm được trình bày ở bảng 7.

Bảng 7. Một số chỉ tiêu chất lượng của 5 giống bơ khảo nghiệm tại Mộc Châu.

Giống	Hàm lượng chất khô (%)	Hàm lượng lipid (%)	Hàm lượng đường tổng số (%)	Hàm lượng protein (%)
TA1	21,24	8,74	1,49	2,10
TA5	25,40	9,75	1,27	2,47
TA44	23,13	9,72	1,50	2,28
TA54	23,41	10,90	0,67	2,26
Booth7	27,50	19,30	5,26	1,40
Giá trị nhỏ nhất	21,24	8,74	0,67	1,40
Giá trị lớn nhất	27,50	19,30	5,26	2,47

Bảng 7 cho thấy, hàm lượng chất khô của các giống bơ dao động từ 21,24-27,50%, trong đó giống Booth7 có hàm lượng chất khô cao nhất - đạt 27,50%, giống TA1 có hàm lượng chất khô thấp nhất - đạt 21,24%. Hàm lượng lipid của các giống dao động từ 8,74-19,30%, trong đó giống Booth7 có hàm lượng lipid cao nhất - đạt 19,30%, giống TA1 có hàm lượng lipid thấp nhất. Hàm lượng đường tổng số dao động



Giống bơ Booth7 có chất lượng quả vượt trội, đáp ứng yêu cầu xuất khẩu.

từ 0,67-5,26%, trong đó giống TA54 có hàm lượng đường tổng số thấp nhất, chỉ đạt 0,67%. Hàm lượng protein của các giống tham gia khảo nghiệm dao động từ 1,40-2,47%, trong đó giống TA5 có hàm lượng protein lớn nhất - đạt 2,47%, giống Booth7 có hàm lượng protein nhỏ nhất - 1,40%.

Kết luận

- Trong 5 chỉ tiêu về hình thái lá thì 2 chỉ tiêu về chiều dài và chiều rộng lá có sự thay đổi nhiều, tùy vào điều kiện chăm sóc và tiểu vùng sinh thái. Chỉ tiêu về hình dạng lá và chiều dài cuống ít thay đổi hơn, thể hiện tương đối rõ và ổn định tính đặc trưng của giống.

- Trong điều kiện sinh thái của Mộc Châu, tỉnh Sơn La, giống TA54 có sức sinh trưởng mạnh nhất so với các giống còn lại, biểu hiện ở các chỉ tiêu: chiều cao cây lớn nhất (334,12 cm), đường kính gốc lớn nhất (8,61cm,) đường kính tán tương đương với các giống Booth7 và TA5.

- Các giống khảo nghiệm nhìn chung đều có các đợt lộc khỏe, sự phát sinh và phát triển các đợt lộc giữa các giống không có sự khác nhau đáng kể.

- Trong 5 giống khảo nghiệm, các giống TA44 và TA54 thuộc nhóm chín sớm, hai giống TA1 và TA5 chín trung bình và giống Booth7 thuộc nhóm chín muộn với khoảng thời gian thu hoạch chênh nhau giữa các nhóm nằm trong khoảng 30 đến trên 60 ngày.

- Số lượng quả/cây và năng suất của các giống khảo nghiệm đều có xu hướng tăng dần theo độ tuổi ở những năm đầu của giai đoạn mang quả, trong đó giống TA54 có khối lượng quả lớn nhất và năng suất cao nhất, giống Booth7 tuy có số quả nhiều nhất nhưng khối lượng quả nhỏ nên năng suất chỉ xếp ở vị trí thứ hai.

- Giống Booth7 có chất lượng quả vượt trội, thể hiện qua các giá trị hàm lượng chất khô, hàm lượng lipid và hàm lượng đường tổng số cao nhất, đáp ứng yêu cầu xuất khẩu.

Đánh giá chung: sơ bộ nhận thấy giống TA54 và giống Booth7 là các giống phù hợp với điều kiện Mộc Châu - Sơn La, có triển vọng phát triển tốt.

Khuyến nghị

- Cần tiếp tục đánh giá thêm một số chỉ tiêu về năng suất, chất lượng quả bơ vùng nghiên cứu.

- Sử dụng 2 giống triển vọng TA54 và Booth7 để sản xuất đại trà tại Mộc Châu - Sơn La.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Hoàng Mạnh Cường (2015), *Nghiên cứu tuyển chọn giống bơ thích hợp cho một số tỉnh Tây Nguyên*, Luận án tiến sỹ nông nghiệp, Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội.
- [2] Hoàng Mạnh Cường (2001), *Điều tra, thu thập một số giống bơ năng suất cao, chất lượng tốt phục vụ tiêu dùng và xuất khẩu tại Đắk Lắk*, Báo cáo tổng kết 3 năm (1999-2001), Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn.
- [3] Nguyễn Hiền (1993), “Bơ - cây ăn quả quý”, *Thông tin KH&CN*, số 3, Sở Khoa học, Công nghệ và Môi trường tỉnh Gia Lai.
- [4] FAO (2020), *FAO Statistic Division*.
- [5] Hoàng Mạnh Cường (2010), *Nghiên cứu đặc tính nông sinh học các dòng, giống bơ phục vụ công tác chọn tạo giống ở Tây Nguyên*, Luận văn thạc sỹ nông nghiệp, Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội.
- [6] Lâm Thị Bích Lệ (2001), *Nghiên cứu đặc tính nông sinh học và kỹ thuật nhân giống vô tính một số cây bơ đầu dòng tại Đắk Lắk*, Luận án tiến sỹ nông nghiệp, Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội.
- [7] Lê Tất Khương, Phạm Văn Quân (2015), *Hợp tác, nghiên cứu phát triển cây bơ tại một số vùng sinh thái thích hợp*, Báo cáo đề tài cấp nhà nước, Viện Nghiên cứu và Phát triển Vùng.

Xác định liều lượng bón đạm, lân và kali thích hợp cho giống bơ Booth 7 giai đoạn kinh doanh trên đất bazan tại tỉnh Đắk Lắk

Nguyễn An Ninh^{1*}, Trịnh Đức Minh², Phan Văn Tân³, Nguyễn Hắc Hiền⁴

¹Trung tâm Khảo kiểm nghiệm giống, Sản phẩm cây trồng Tây Nguyên

²Hiệp hội cà phê Buôn Ma Thuột

³Trường Đại học Tây Nguyên

⁴Chi cục Trồng trọt và Bảo vệ thực vật tỉnh Đắk Lắk

Ngày nhận bài 12/10/2020; ngày chuyển phản biện 14/10/2020; ngày nhận phản biện 10/11/2020; ngày chấp nhận đăng 20/11/2020

Tóm tắt:

Mục tiêu của nghiên cứu là xác định liều lượng phân đạm, lân và kali hợp lý bón cho giống bơ Booth 7 giai đoạn kinh doanh trồng trên đất bazan tại tỉnh Đắk Lắk. Thí nghiệm gồm 3 mức phân bón bố trí theo kiểu khối đầy đủ ngẫu nhiên, 1 nhân tố với 3 lần nhắc lại, cho thấy công thức bón (NPK)3 = 300 kg N+150 kg P₂O₅+300 kg K₂O/ha/năm cho cây bơ Booth 7 sinh trưởng phát triển tốt, đạt năng suất cao nhất là 21,93 tấn quả/ha ở vụ thu hoạch năm 2017 và 23,6 tấn quả/ha ở vụ thu hoạch năm 2018. Các mức phân bón cao (NPK)2 = 200 kg N+100 kg P₂O₅+200 kg K₂O/ha/năm và (NPK)3 = 300 kg N+150 kg P₂O₅+300 kg K₂O/ha/năm làm tăng khối lượng quả bơ so với mức (NPK)1 = 100 kg N+50 kg P₂O₅+100 kg K₂O/ha/năm. Không nhận thấy sự ảnh hưởng của các mức bón NPK đến tỷ lệ hạt, vỏ, thịt quả bơ và các chỉ tiêu về chất lượng quả bơ.

Từ khóa: bơ Booth 7, Đắk Lắk, đất Bazan, liều lượng phân bón.

Chỉ số phân loại: 4.1

Đặt vấn đề

Bơ (*Persea americana* Mill.) là cây ăn quả có giá trị dinh dưỡng và kinh tế cao, được xem là đặc sản của vùng Tây Nguyên. Đắk Lắk là tỉnh có điều kiện sinh thái phù hợp cho sinh trưởng và phát triển của cây bơ. Từ năm 2000 trở lại đây diện tích cây bơ phát triển mạnh do thị trường tiêu thụ ngày càng mở rộng, giá bán khá cao và tương đối ổn định; cây bơ đã góp phần đa dạng hoá cơ cấu cây trồng, tăng nguồn thu cho người dân [1].

Mặc dù được du nhập vào Việt Nam từ khá lâu [2], nhưng việc nghiên cứu về cây bơ chỉ mới được bắt đầu thực hiện một cách có hệ thống từ năm 2001 tại Viện Khoa học Kỹ thuật Nông lâm nghiệp Tây Nguyên [3]. Các nghiên cứu chủ yếu tập trung vào điều tra, đánh giá, bình tuyển, chọn lọc cũng như kỹ thuật nhân giống.

Booth 7 là giống bơ nhập nội vào năm 2002 do Viện Khoa học Kỹ thuật Nông lâm nghiệp Tây Nguyên nghiên cứu đánh giá, khảo nghiệm và được Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn công nhận là giống chính thức vào năm 2016 cho khu vực Tây Nguyên. Đây là giống bơ thích nghi với điều kiện của địa phương, cho năng suất cao, chất lượng tốt, chín muộn, được thị trường ưa chuộng và đang

được phát triển mạnh trong những năm gần đây bên cạnh các giống bơ sập địa phương [4].

Những nghiên cứu về canh tác, sâu bệnh hại, công nghệ sau thu hoạch trên cây bơ còn rất ít, với mục đích thăm dò là chính. Thực tiễn sản xuất tại các vùng trồng bơ cho thấy, phần lớn người dân quan tâm đến việc sử dụng phân bón nhưng chưa có quy trình kỹ thuật chính thống [5], chủ yếu bón theo kinh nghiệm nên năng suất và chất lượng kém, chưa phát huy hết tiềm năng của giống. Do vậy xác định liều lượng đạm, lân và kali thích hợp cho giống bơ Booth 7 giai đoạn kinh doanh là rất cần thiết.

Đối tượng, vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng và vật liệu

Nghiên cứu được thực hiện trên vườn bơ Booth 7 giai đoạn 6-7 năm tuổi trồng tại vườn thí nghiệm ở thị xã Buôn Hồ, tỉnh Đắk Lắk. Mật độ trồng 278 cây/ha. Các biện pháp kỹ thuật như tía cành tạo tán, tưới tiêu, phòng trừ sâu bệnh, cỏ dại được áp dụng đồng nhất. Phân bón: urê (46% N), phân lân nung chảy (16% P₂O₅, 28-34% CaO, 15-18% MgO, 24-30% SiO₂), phân kali (60% K₂O), phân chuồng hoai mục.

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

Determine the appropriate dose of nitrogen, phosphorus, and potassium fertilisers for Booth 7 avocado variety in the commercial stage grown on basaltic soil in Dak Lak province

An Ninh Nguyen^{1*}, Duc Minh Trinh², Van Tan Phan³,
Hac Hien Nguyen⁴

¹Center for Testing of Varieties and Plant Products in Central Highlands

²Buon Ma Thuot Coffee Association

³Tay Nguyen University

⁴Department of Cultivation and Plant Protection of Daklak province

Received 12 October 2020; accepted 20 November 2020

Abstract:

The objective of this study was to determine the appropriate dosage of nitrogen, phosphorus, and potassium fertilisers for the Booth 7 avocado variety in the commercial stage on red-brown basaltic soil in Dak Lak province. The results showed that the formula (NPK)3 = 300 kg N+150 kg P₂O₅+300 kg K₂O/ha/year was suitable with the variety, made its growth tend to increase, as well as attain the highest yield, reaching 21.93 tons of fruit/ha in the 2017 harvest and 23.6 tons of fruit/ha in the 2018 harvest. High fertiliser levels (NPK)2 = 200 kg N+100 kg P₂O₅+200 kg K₂O/ha/year and (NPK)3 = 300 kg N+150 kg P₂O₅+300 kg K₂O/ha/year increased fruit weight compared with the level (NPK)1 = 100 kg N+50 kg P₂O₅+100 kg K₂O/ha/year. There was no evidence on the effect of NPK fertiliser levels on the percentage of seed, peel, flesh, and quality parameters.

Keywords: avocado Booth7, brown soil, Dak Lak province, fertiliser.

Classification number: 4.1

Phương pháp

Phương pháp bố trí thí nghiệm:

Thí nghiệm gồm 3 công thức (bảng 1), nhắc lại 3 lần được bố trí theo kiểu khối ngẫu nhiên đầy đủ (RCBD), giữa các ô được ngăn bằng tấm nilon từ mặt đất xuống độ sâu khoảng 30 cm.

Diện tích ô cơ sở 252 m² (thí nghiệm bố trí 7 cây theo hàng, theo dõi đánh giá 5 cây), có 3 công thức: 3 x 3 lần nhắc = 9 ô cơ sở. Tổng diện tích: 252 m² x 9 ô cơ sở = 2.268 m².

Bảng 1. Các công thức thí nghiệm.

Công thức	Lượng phân bón (kg/ha/năm)		
	N	P ₂ O ₅	K ₂ O
(NPK)1	100	50	100
(NPK)2	200	100	200
(NPK)3	300	150	300

Nền: phân chuồng 20 tấn/ha, bón trong năm đầu làm thí nghiệm.

Lượng phân bón được chia làm 3 lần/năm như sau:

- Lần 1 (tháng 11, sau khi thu hoạch): 100% phân chuồng + 40% phân đạm + 50% phân lân + 30% phân kali.

- Lần 2 (tháng 5, sau khi đậu quả): 30% phân đạm + 50% phân lân + 40% phân kali.

- Lần 3 (tháng 7, giai đoạn quả tăng trưởng mạnh nhất): 30% phân đạm + 30% phân kali.

Các chỉ tiêu nghiên cứu và phương pháp theo dõi:

Các chỉ tiêu sinh trưởng được xác định vào tháng 11 bao gồm: chiều cao cây (m), đường kính gốc (cm), đường kính tán (m), số cành mang quả, khối lượng quả (kg/quả), năng suất quả/cây (kg). Số cành mang quả được đếm khi thu hoạch quả bơ (tháng 9, tháng 10 hằng năm).

Chất lượng quả được xác định từng niên vụ khi thu hoạch, mỗi ô cơ sở lấy ngẫu nhiên 5 quả (mỗi cây lấy 1 quả trong số 3 quả theo dõi chỉ tiêu khối lượng), gửi đến phòng thí nghiệm của Viện Công nghệ sinh học thuộc Trường Đại học Tây Nguyên làm mẫu đại diện. Chỉ tiêu theo dõi gồm: tỷ lệ vỏ, hạt và thịt quả (%), hàm lượng chất khô (%), hàm lượng protein (%), hàm lượng lipit (%), hàm lượng đường (%).

Phương pháp xử lý số liệu:

Số liệu được xử lý thống kê bằng phần mềm Excel và SAS 9.1.

Kết quả và thảo luận

Ảnh hưởng của liều lượng phân NPK đến sinh trưởng của giống bơ Booth 7 giai đoạn kinh doanh

Đạm, lân và kali là 3 nguyên tố đa lượng cần nhiều nhất trong quá trình sinh trưởng và phát triển đối với cây trồng nói chung và cây bơ nói riêng. Các yếu tố này giúp cây sinh trưởng, gia tăng năng suất và chất lượng của quả bơ khi bón hợp lý [6].

Ảnh hưởng của phân đạm, lân và kali đến sinh trưởng của bơ Booth 7 giai đoạn kinh doanh thể hiện ở bảng 2 và bảng 3.

Bảng 2. Ảnh hưởng mức phân NPK đến chỉ tiêu sinh trưởng năm 2017.

Công thức	Các chỉ tiêu theo dõi			
	Chiều cao cây (m)	Đường kính gốc (cm)	Đường kính tán (m)	Số cành mang quả (cành)
(NPK)1	5,89 ^a	16,00 ^a	5,31 ^a	143,34 ^b
(NPK)2	6,39 ^a	16,47 ^a	5,83 ^a	152,02 ^{ab}
(NPK)3	6,08 ^a	16,20 ^a	5,72 ^a	162,53 ^a
CV (%)	7,87	2,29	6,56	3,89

Ghi chú: các trung bình cùng ký tự không khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p \leq 0,05$.

Bảng 3. Ảnh hưởng mức phân NPK đến chỉ tiêu sinh trưởng năm 2018.

Công thức	Các chỉ tiêu theo dõi			
	Chiều cao cây (m)	Đường kính gốc (cm)	Đường kính tán (m)	Số cành mang quả (cành)
(NPK)1	6,09 ^a	16,70 ^b	5,86 ^b	158,93 ^b
(NPK)2	6,49 ^a	17,29 ^a	6,16 ^a	173,93 ^a
(NPK)3	6,28 ^a	16,72 ^{ab}	6,11 ^a	177,34 ^a
CV (%)	7,88	2,93	10,97	15,88

Ghi chú: các trung bình cùng ký tự không khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p \leq 0,05$.

Số liệu bảng 2 và 3 cho thấy, bón phân có tác dụng thúc đẩy sự sinh trưởng, phát triển của cây bơ giai đoạn kinh doanh. Tuy nhiên, mức độ không rõ nét ở một số chỉ tiêu và ở thời điểm khác nhau. Trong điều kiện thí nghiệm, chỉ tiêu đường kính tán và số cành mang quả có sự thay đổi rõ rệt qua 2 năm thí nghiệm với độ tin cậy 95%, công thức (NPK)2 = 200 kg N+100 kg P_2O_5 +200 kg K_2O /ha/năm và công thức (NPK)3 = 300 kg N+150 kg P_2O_5 +300 kg K_2O /ha/năm cho đường kính tán và số cành mang quả cao hơn so với công thức (NPK)1, sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê.

Đường kính tán và số cành mang quả liên quan trực tiếp đến năng suất và chịu tác động của nhiều yếu tố, trong đó phân bón đóng vai trò quan trọng. Số liệu thống kê chỉ ra mối quan hệ giữa các mức phân bón với số cành mang quả,

theo đó, công thức (NPK)3 ở năm 2017 và (NPK)3 ở năm 2018 cho số cành mang quả cao nhất, tương ứng là 162,53 cành/cây và 177,34 cành/cây, cao hơn so với công thức (NPK)1 một cách có ý nghĩa tại xác suất $p \leq 0,05$.

Đường kính tán cây ở năm 2018 khác biệt có ý nghĩa thống kê ở công thức (NPK)2 và (NPK)3 so với công thức (NPK)1. Tuy nhiên, mức bón giữa công thức (NPK)2 và (NPK)3 không thấy sự sai khác có ý nghĩa thống kê tại xác suất $p \leq 0,05$.

Ngoài ra, đường kính gốc năm 2018 có sự tăng cao khi áp dụng công thức (NPK)2. Như vậy so với năm 2017, ngoại trừ chiều cao cây không khác biệt khi bón các mức khác nhau, các chỉ tiêu khác cho thấy sự tăng trưởng. Điều này có thể là do sự tích lũy các chất dinh dưỡng từ những năm trước khi điều kiện ngoại cảnh thuận lợi đã tác động tích cực lên quá trình sinh trưởng của cây bơ trong năm 2018.

Như vậy, qua 2 năm thí nghiệm cho thấy, việc bón phân với các mức khác nhau có ảnh hưởng đáng kể đến số cành mang quả. Điều này phù hợp với thực tế sản xuất đối với giống bơ Booth 7 trong những năm đầu của giai đoạn kinh doanh tại địa phương.

Ảnh hưởng của các mức bón phân NPK đến năng suất và chất lượng quả của giống bơ Booth 7

Ảnh hưởng của các mức phân NPK đến năng suất:

Bón phân ảnh hưởng trực tiếp đến năng suất của cây bơ thông qua việc tăng khối lượng quả và số cành mang quả.

Bảng 4 và bảng 5 cho thấy, năng suất quả/cây có xu hướng tăng theo lượng phân bón ở cả hai vụ thu hoạch, tuy nhiên mức độ tăng khác nhau tùy theo công thức bón.

Bảng 4. Ảnh hưởng mức phân NPK đến khối lượng quả và năng suất năm 2017.

Công thức	Các chỉ tiêu theo dõi		
	Khối lượng quả (kg)	Năng suất quả/cây (kg/cây)	Năng suất quả/ha (tấn/ha)
(NPK)1	0,44 ^a	67,74 ^b	18,76
(NPK)2	0,44 ^a	71,31 ^{ab}	19,82
(NPK)3	0,42 ^a	78,88 ^a	21,93
CV (%)	7,25	5,07	

Ghi chú: các trung bình cùng ký tự không khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p \leq 0,05$.

Trong 2 năm thí nghiệm, khối lượng quả trung bình của công thức bón (NPK)2 đạt tương ứng 0,44 kg/quả, không sai khác có ý nghĩa thống kê so với các công thức bón phân khác trong năm 2017. Tuy nhiên, năm 2018 bón theo công thức (NPK)2 và (NPK)3 cho khối lượng quả tương đương nhau và cao hơn có ý nghĩa so với ở công thức (NPK)1, với xác suất $p \leq 0,05$. Điều này chứng tỏ lượng bón theo công

thức (NPK)2 có thể đã đáp ứng đủ nhu cầu của cây, nhưng khi tăng lượng phân lên mức bón (NPK)3 chưa thấy có sự gia tăng về khối lượng quả. Như vậy, bón phân cho 1 ha hàng năm theo công thức (NPK)2 = 200 kg N+100 kg P_2O_5 +200 kg K_2O đối với giống bơ Booth 7 giai đoạn kinh doanh đạt khối lượng quả trung bình cao nhất ở năm 2017, nhưng thấp hơn công thức (NPK)3 năm 2018 trong điều kiện thí nghiệm. Tuy nhiên, sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê tại xác suất $p \leq 0,05$.

Bảng 5. Ảnh hưởng mức phân NPK đến khối lượng quả và năng suất năm 2018.

Công thức	Các chỉ tiêu theo dõi		
	Khối lượng quả (kg)	Năng suất quả/cây (kg/cây)	Năng suất quả/ha (tấn/ha)
(NPK)1	0,40 ^b	80,53 ^b	21,60
(NPK)2	0,44 ^a	83,39 ^{ab}	23,15
(NPK)3	0,46 ^a	85,49 ^a	23,76
CV (%)	3,44	11,95	

Ghi chú: các trung bình cùng ký tự không khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p \leq 0,05$.

Gia tăng lượng phân bón qua 2 năm đã làm tăng khối lượng quả và năng suất quả/cây. Số liệu bảng 4 và bảng 5 cho thấy, khi bón với công thức (NPK)2 cho năng suất quả/cây đạt tương ứng 71,31 kg/cây năm 2017, tương đương 19,82 tấn quả/ha; năm 2018 đạt 83,39 kg/cây, tương đương 23,15 tấn quả/ha và xử lý thống kê cho thấy không khác biệt so với bón theo công thức (NPK)3, nhưng cao hơn một cách ý nghĩa so với (NPK)1, đạt lần lượt là 18,76 tấn/ha và 21,60 tấn/ha với độ tin cậy 95%. Công thức bón (NPK)2 cho giống bơ Booth 7 giai đoạn kinh doanh đảm bảo cả về năng suất và hiệu quả kinh tế tại điều kiện thí nghiệm.

Trong vụ thu hoạch đầu tiên, không thấy ảnh hưởng của các mức phân NPK đến khối lượng quả bơ, nhưng ở vụ thu hoạch thứ hai các mức phân (NPK)2 và (NPK)3 khối lượng quả bơ cao hơn có ý nghĩa so với công thức (NPK)1. Như vậy, bón phân đầy đủ làm tăng khối lượng quả, từ đó làm tăng năng suất và tăng giá trị hàng hóa của quả bơ.

Ảnh hưởng của các mức phân NPK đến chất lượng quả bơ:

Chất lượng quả bơ gồm nhiều tiêu chí, trong đó độ bóng của vỏ, độ chắc của quả và các đặc điểm như tỷ lệ thịt quả, tỷ lệ vỏ, tỷ lệ hạt... được chú ý vì ảnh hưởng đến giá trị thương mại của sản phẩm bơ Booth 7.

Tuỳ theo mục đích sử dụng, các tỷ lệ trên được quan tâm khác nhau. Đối với giống bơ Booth 7, đặc điểm được nhiều người chú ý ngoài yếu tố chất lượng thịt quả ngon, dẻo thì đặc điểm vỏ dày giúp cho giống này tăng thời gian bảo quản và đảm bảo chất lượng khi vận chuyển lâu hơn các giống bơ khác.

Bảng 6. Ảnh hưởng mức phân NPK đến tỷ lệ vỏ, hạt và thịt quả.

Công thức	Các chỉ tiêu theo dõi					
	Tỷ lệ vỏ (%)		Tỷ lệ hạt (%)		Tỷ lệ thịt quả (%)	
	2017	2018	2017	2018	2017	2018
(NPK)1	13,83 ^a	14,31 ^a	19,81 ^a	20,68 ^a	66,31 ^a	65,01 ^a
(NPK)2	13,48 ^a	13,80 ^a	21,37 ^a	20,14 ^a	65,14 ^a	66,36 ^a
(NPK)3	13,99 ^a	13,49 ^a	20,64 ^a	21,25 ^a	65,37 ^a	64,95 ^a
TB	13,77	13,87	20,61	20,69	65,61	65,42

Ghi chú: các trung bình cùng ký tự không khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p \leq 0,05$.

Số liệu bảng 6 cho thấy, tỷ lệ vỏ giống bơ Booth 7 tương đối cao, trung bình từ 13,77% ở niên vụ năm 2017 đến 13,87% năm 2018. Tỷ lệ thịt quả trung bình tương ứng là 65,61% ở năm 2017 và 65,42% ở niên vụ năm 2018. Tỷ lệ hạt biến động không nhiều ở các công thức bón khác nhau. Nhìn chung với các liều lượng phân bón được áp dụng không làm thay đổi một số chỉ tiêu chất lượng quả trong điều kiện thí nghiệm.

Bảng 7. Ảnh hưởng mức phân NPK đến hàm lượng các chất trong thịt quả.

Công thức	Các chỉ tiêu theo dõi (%)					
	Hàm lượng protein		Hàm lượng lipid		Hàm lượng đường	
	2017	2018	2017	2018	2017	2018
(NPK)1	3,00 ^a	2,82 ^a	14,47 ^b	14,73 ^a	3,03 ^a	3,02 ^a
(NPK)2	3,35 ^a	3,13 ^a	14,55 ^b	15,22 ^a	2,93 ^a	3,01 ^a
(NPK)3	3,03 ^a	3,16 ^a	15,57 ^a	15,68 ^a	3,31 ^a	3,17 ^a
TB	3,13	3,04	14,86	15,21	3,09	3,07

Ghi chú: các trung bình cùng ký tự không khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p \leq 0,05$.

Số liệu tại bảng 7 cho thấy, hàm lượng các chất dinh dưỡng trong thịt quả của giống bơ Booth 7 có xu hướng tăng theo lượng bón đạm, lân và kali, nhưng sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê, ngoại trừ hàm lượng lipid năm 2017. Hàm lượng protein trung bình đạt 3,13% năm 2017 và 3,04% năm 2018, hàm lượng lipid trung bình là 14,86% năm 2017 và 15,21% ở năm 2018, hàm lượng đường đạt 3,09% năm 2017 và 3,07% vào năm 2018, xử lý thống kê cho thấy không có sự khác biệt có ý nghĩa với độ tin cậy 95%. Kết quả chỉ ra rằng, hàm lượng các chất dinh dưỡng trong thịt quả khá cao trong điều kiện thí nghiệm, nhất là hàm lượng lipid cao hơn trung bình so với kết quả nghiên cứu của Viện Khoa học Kỹ thuật Nông lâm nghiệp Tây Nguyên. Tuy nhiên, hiện chưa rõ mối liên hệ giữa hàm lượng các chất dinh dưỡng với các mức bón phân, vì khi tăng lượng phân thì khối lượng quả, năng suất quả có gia tăng nhưng chất lượng cơ bản của giống bơ Booth 7 chưa thấy sự khác biệt. Cần phải có thêm những nghiên cứu chuyên sâu về vấn đề này.

Kết luận và kiến nghị

Khi tăng lượng phân bón của các công thức từ (NPK)1 = 100 kg N+50 kg P_2O_5 +100 kg K_2O /ha/năm lên (NPK)3 = 300 kg N+150 kg P_2O_5 +300 kg K_2O /ha/năm, sinh trưởng của cây bơ có chiều hướng tăng theo. Đường kính gốc, đường kính tán và số cành mang quả ở 2 công thức (NPK)2 và (NPK)3 đều cao hơn công thức (NPK)1 một cách ý nghĩa, sự khác biệt giữa hai công thức (NPK)2 và (NPK)3 không có ý nghĩa thống kê.

Mức bón (NPK)1 luôn có năng suất thấp nhất và (NPK)3 luôn đạt năng suất cao nhất ở cả 2 vụ thu hoạch. Công thức (NPK)3 đạt năng suất là 21,93 tấn quả/ha ở vụ thu hoạch 2017 và 23,6 tấn quả/ha niên vụ 2018. Năng suất quả ở công thức bón (NPK)1 thấp hơn có ý nghĩa so với (NPK)3, giữa hai công thức (NPK)2 và (NPK)3 không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê.

Các mức phân bón cao (NPK)2 và (NPK)3 làm tăng khối lượng quả bơ so với mức bón ở công thức (NPK)1.

Không nhận thấy sự ảnh hưởng của các mức phân bón NPK đến tỷ lệ hạt, vỏ, thịt và các chỉ tiêu về chất lượng quả bơ.

Đối với giống bơ Booth 7 giai đoạn đầu kinh doanh trồng trên đất bazan, trên nền phân chuồng 20 tấn/ha/2 năm nên bón 200 kg N+100 kg P_2O_5 +200 kg K_2O .

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Chương trình phát triển MPI-GTZ-SME (2006), *Phân tích chuỗi giá trị bơ tại Đắk Lắk*, Fresh Studio Innovatin Ltd, 79 trang.
- [2] Nguyễn Minh Châu (2000), *Cây bơ*, Tài liệu kỹ thuật trồng cây ăn trái phục vụ nông dân, Viện Nghiên cứu Cây ăn quả miền Nam (SOFRI).
- [3] Trịnh Đức Minh, Đặng Bá Đàn và Hoàng Mạnh Cường (2007), *Nghiên cứu xây dựng vườn giống bơ nhằm bảo tồn và phát triển một số giống bơ có triển vọng tại Đắk Lắk*, Báo cáo đề tài KH&CN cấp tỉnh (Đắk Lắk).
- [4] Sở Nông nghiệp và Phát triển nông thôn Đắk Lắk (2017), *Báo cáo tổng kết sản xuất nông nghiệp năm 2017*.
- [5] Sở Nông nghiệp và Phát triển nông thôn Lâm Đồng (2012), *Quyết định số 1251/QĐ-SNN ngày 13/12/2012 ban hành Quy trình kỹ thuật canh tác cây bơ ghép*.
- [6] S. John Lynch, Seymour Goldweber and Clarence E. Rich (1954), *Some effects of nitrogen, phosphorus and potassium on the yield, tree growth, and leaf analysis of avocados*, Proc. Fla. State Hort. Soc. 67:220-224.

Ảnh hưởng của phương pháp tiêm FSH (Follicle - stimulating hormone) đến hiệu quả gây rụng trứng nhiều trên dê sữa Saanen

Nguyễn Khánh Vân¹, Quãn Xuân Hữu¹, Phan Trung Hiếu¹, Vũ Thị Thu Hương¹, Hoàng Thị Âu¹,
Phạm Thị Kim Yến¹, Đỗ Chiến Thắng², Phạm Doãn Lâm^{1*}

¹Phòng thí nghiệm trọng điểm công nghệ tế bào động vật, Viện Chăn nuôi

²Trung tâm Nghiên cứu dê và thỏ Sơn Tây, Viện Chăn nuôi

Ngày nhận bài 7/9/2020; ngày chuyển phản biện 10/9/2020; ngày nhận phản biện 19/10/2020; ngày chấp nhận đăng 4/11/2020

Tóm tắt:

Tổng số 12 dê sữa Saanen được sử dụng để đánh giá ảnh hưởng của việc tiêm FSH (Follicle - stimulating hormone) đến hiệu quả gây rụng trứng nhiều. Tất cả các dê thí nghiệm đều được đặt dụng cụ có chứa progesterone (CIRD) trong 14 ngày và được chia vào hai nhóm thí nghiệm: nhóm A: mỗi dê được nhận tổng số 200 mg FSH thông qua 6 lần tiêm (2 lần/ngày, mỗi lần cách nhau 12h) với liều lượng 33,33 mg FSH/lần tiêm; nhóm B: mỗi dê được nhận tổng số 200 mg FSH thông qua 6 lần tiêm (2 lần/ngày mỗi lần cách nhau 12h) với liều lượng giảm dần tương ứng: 50, 30 và 20 mg/lần tiêm. Đánh giá phản ứng của buồng trứng và số lượng phôi dê thu được ở ngày thứ 7 sau tháo CIRD. Tất cả các dê của 2 nhóm thí nghiệm A và B đều có phản ứng với FSH. Số nang trứng/dê, số thể vàng/dê của nhóm A thấp hơn có ý nghĩa so với nhóm B (tương ứng 18,5 và 10,2 so với 23 và 17,4, $p < 0,05$). Số nang trứng không rụng/dê của nhóm A cao hơn so với nhóm B (tương ứng 8,3 so với 5,6). Số phôi đầu, phôi nang/dê của nhóm A thấp hơn so với nhóm B (tương ứng 2,67 so với 4,25, $p < 0,05$). Mặc dù, số phôi nang/dê của nhóm B cao hơn có ý nghĩa so với nhóm A (tương ứng 3,33 so với 1,91, $p < 0,05$), nhưng không có sự khác nhau về số phôi đầu/dê giữa hai nhóm này ($p > 0,05$). Kết quả nghiên cứu cho thấy, việc sử dụng FSH với liều lượng giảm dần mang lại hiệu quả cao hơn khi sử dụng FSH với liều lượng bằng nhau trong quá trình gây rụng trứng nhiều trên dê sữa Saanen.

Từ khóa: dê sữa Saanen, FSH, gây rụng trứng nhiều, phản ứng của buồng trứng, phôi dê.

Chỉ số phân loại: 4.2

Đặt vấn đề

Gây rụng trứng nhiều là kỹ thuật cơ bản nhất để có thể thu được nhiều phôi và tăng số lượng phôi có chất lượng từ những động vật nuôi có giá trị. Tuy nhiên, hiệu quả của quá trình gây rụng trứng nhiều trên dê, đặc biệt là dê sữa thường không ổn định. Nguyên tắc gây rụng trứng nhiều ở dê cũng tương tự như ở bò hoặc cừu. Quá trình gây rụng trứng nhiều ở dê thường kết hợp việc xử lý progesterone (CIRD) với hormone sinh dục ngoại lai (gonadotrophins). Khi thực hiện, CIRD sẽ được đưa vào âm đạo của dê, progesterone trong CIRD được giải phóng từ từ khỏi CIRD thấm qua mạch máu âm đạo vào máu của dê thí nghiệm [1]. Gonadotrophin được sử dụng tại thời điểm 48-72h trước khi loại bỏ CIRD [2].

Các gonadotrophin được sử dụng cho quá trình gây rụng trứng nhiều bao gồm equine chorionic gonadotrophin (eCG) hoặc FSH [3]. eCG có ưu điểm là giá thành thấp, nhưng nhược điểm là thời gian tồn tại trong cơ thể lâu, số nang trứng rụng không nhiều, thể vàng thoái hóa sớm, dẫn đến làm giảm tỷ lệ thụ tinh và chất lượng phôi. FSH là một lựa chọn tốt cho quá

trình gây rụng trứng nhiều ở dê, bởi nó tạo ra số lượng trứng nhiều hơn một số hormone khác như eCG, Pregnant Mare Serum Gonadotropin (PMSG) [4]. Theo [4], việc sử dụng FSH trong quá trình gây rụng trứng nhiều cho số lượng phôi dê sữa cao hơn eCG. Tuy nhiên, các yếu tố khác như liều lượng FSH, cách xử lý FSH (tiêm một lần hay nhiều lần) có ảnh hưởng tới hiệu quả của quá trình tạo phôi dê *in vivo* [5].

Trong những năm gần đây, tại Việt Nam nhu cầu tiêu thụ các sản phẩm của ngành chăn nuôi dê tăng nhanh. Tuy nhiên, do chưa có nhiều hiểu biết về lợi ích của nó nên chăn nuôi dê ở nước ta vẫn chưa được phát triển đúng với tiềm năng. Dê Saanen là giống dê sữa chuyên dụng của Thụy Sĩ, có năng suất cao, được nuôi nhiều ở Pháp và châu Âu. Giống dê này có độ thuần nhất cao, năng suất sữa cao nhất và thường được các nhà tạo giống sử dụng làm giống dê cải tiến cho các giống khác về khả năng cho sữa. Dê Saanen đã được nhập về nuôi tại Việt Nam từ năm 2002, đến nay đàn dê sinh trưởng, phát triển tốt, dê con sinh ra khỏe mạnh, thích ứng với khí hậu và điều kiện nuôi dưỡng tại Việt Nam [6]. Việc nghiên cứu ứng dụng công

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

Effect of FSH (Follicle - stimulating hormone) injection on the superovulation in Saanen goats

Khanh Van Nguyen¹, Xuan Huu Quan¹,
Trung Hieu Phan¹, Thi Thu Huong Vu¹,
Thi Au Hoang¹, Thi Kim Yen Pham¹, Chien Thang Do²,
Doan Lan Pham^{1*}

¹Key Laboratory of Animal Cell Biotechnology,
National Institute of Animal Science

²Son Tay Goat and Rabbit Research Center

Received 7 September 2020; accepted 4 November 2020

Abstract:

A total of 12 Saanen goats were used to evaluate the effect of FSH on the superovulation. All goats were inserted CIRD for 14 days and divided into 2 groups: group A: each goat was received a total of 200 mg FSH through 6 equal injections (twice daily at 12 hours interval, 33.3 mg/injection); group B: each goat was received a total of 200 mg FSH through in 6 decreasing in jections (twice daily at 12 hours interval, 50 mg/injection, 30 mg/injection, and 20 mg/injection). Ovarian response and embryos recovery were evaluated on day 7 after CIRD removal. All of the goats of groups A, B responded to the FSH. Total of follicles per goat; corpus luteum per goat of group A was significantly lower than those of group B (respectively 18.5 and 10.2 together vs 23 and 17.4, respectively, $p < 0.05$). The total of anovulatory follicles per goat of group A was higher than that of group B (respectively 8.3 vs 5.6, $p < 0.05$). The number of morular, blastocyst/goat embryos of group A was lower than that of group B (2.67 vs 4.25, $p < 0.05$ respectively). Although the number of morular, blastocyst per goat of group B were higher than those of group A, there were no significant differences between group A and B for morular per goat ($p > 0.05$). The results showed that using FSH with decreasing dosages was more effective than equal dosages for superovulation in Saanen goats.

Keywords: embryo goat, FSH, ovarian response, Saanen goat, superovulation.

Classification number: 4.2

nghệ sinh sản như: gây rụng trứng nhiều, cấy truyền phôi... trên dê sữa sẽ giúp nhân nhanh và cải thiện chất lượng đàn dê sữa tại Việt Nam.

Trên thế giới đã có một số báo cáo về việc tạo phôi dê sữa bằng kỹ thuật gây rụng trứng nhiều [6, 7]. Tuy nhiên, tại Việt Nam chưa có tài liệu nào công bố về việc tạo phôi dê sữa Saanen *in vivo* bằng kỹ thuật gây rụng trứng nhiều. Xuất phát từ nhu cầu thực tế đó, chúng tôi tiến hành nghiên cứu “*Ảnh hưởng của phương pháp tiêm FSH đến hiệu quả gây rụng trứng nhiều trên dê sữa Saanen*” với mục đích cải thiện di truyền và nhân nhanh đàn dê sữa tại Việt Nam.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu và đối tượng nghiên cứu

Nghiên cứu sử dụng huyết thanh thai bê, TALP-HEPES của Sigma-Aldrich (Mỹ), kháng sinh của Gibco (Mỹ), thuốc gây mê Zoletil của Vibrac (Pháp), Gibco (Mỹ), Vibrac (Pháp), CIRD của Interag (Newzealand), FSH của Bioniche Animal Health (Canada).

12 dê sữa Saanen ở độ tuổi 8-9 tháng, có khối lượng cơ thể 25-35 kg được lựa chọn và nuôi dưỡng tại Trung tâm Nghiên cứu dê và thỏ Sơn Tây, Viện Chăn nuôi (hình 1).



Hình 1. Dê sữa Saanen.

Xử lý hormone

Dê thí nghiệm được chia ngẫu nhiên vào 2 nhóm (6 dê/nhóm): A) Gây rụng trứng nhiều với liều lượng FSH bằng nhau; B) Gây rụng trứng nhiều với liều lượng FSH giảm dần. Thí nghiệm gây rụng trứng nhiều được thực hiện như sau:

Nhóm A: mỗi dê được nhận tổng số 200 mg FSH thông qua 6 lần tiêm với liều lượng 33,33 mg FSH/lần tiêm.

Nhóm B: mỗi dê được nhận tổng số 200 mg FSH thông qua 6 lần tiêm với liều lượng giảm dần tương ứng: 50, 30 và 20 mg/lần tiêm/ngày.

Dê thí nghiệm được đặt CIRD 14 ngày trước khi tiêm FSH. Ngày đặt CIRD được tính là ngày 0. PGF2 α được tiêm ở ngày thứ 11 sau khi đặt CIRD. FSH được tiêm 2 lần/ngày, mỗi lần tiêm cách nhau 12h và bắt đầu 2 ngày trước khi loại bỏ CIRD. Tiêm 500 IU hCG/ngày tại thời điểm ngày 15, 16 sau đặt CIRD. Theo dõi sự động dục của dê tại thời điểm 24, 36 và 48h sau khi loại bỏ CIRD và tiêm hCG. Khi thấy dê có biểu hiện động dục như vẩy đuôi, đi tiểu thường xuyên thì đưa dê đực vào chuồng để phối giống bằng cách nhảy trực tiếp. Tất cả các dê được phối giống tự nhiên bởi 2 đực giống đã được lựa chọn.

Đánh giá phản ứng của buồng trứng

Tại ngày thứ 7 sau loại bỏ CIRD, đánh giá phản ứng của buồng trứng bằng phương pháp phẫu thuật. Tất cả các dê thí nghiệm đều được nhịn ăn và uống 15h trước khi phẫu thuật. Để gây mê cho dê, trong thí nghiệm này chúng tôi sử dụng Zoletil 50 mg (Virbac, Pháp) và được tiêm bắp.

Sau khi gây mê, dê được cố định lên giá mổ, làm sạch vô trùng vị trí mổ trên bụng dê. Rạch một đường giữa bụng dê, bóc lộ buồng trứng ra ngoài để đánh giá phản ứng của buồng trứng với FSH. Phản ứng của buồng trứng với FSH được đánh giá dựa trên số lượng thể vàng/dê và số nang trứng chưa rụng/dê.

Thu phôi dê bằng phương pháp phẫu thuật

Phôi được thu từ sừng tử cung dê ở ngày thứ 7 sau loại bỏ CIRD bằng phương pháp phẫu thuật (hình 2). Môi trường thu phôi dê là TALP-HEPES có bổ sung 10% huyết thanh thai bê và 1% kháng sinh. Tất cả các dê thí nghiệm đều được nhịn ăn và uống 15h trước khi phẫu thuật.



Hình 2. Thu phôi dê sữa bằng phương pháp phẫu thuật.

Để gây mê cho dê, trong thí nghiệm này chúng tôi sử dụng Zoletil 50 mg (Virbac, Pháp) và được tiêm bắp. Sau khi gây mê, dê được cố định lên giá mổ, làm sạch vô trùng vị trí mổ trên bụng dê. Rạch một đường giữa bụng dê, bóc lộ sừng tử cung dê ra ngoài. Tiêm 20 ml môi trường thu phôi dê vào vị trí ngã ba tử cung một cách nhẹ nhàng để truyền trực tiếp dịch

thu phôi vào sừng tử cung. Môi trường thu phôi có chứa phôi sẽ được chảy thông qua ống thông silicon foley và chuyển vào ống chứa dịch thu phôi.

Quá trình gội rửa được lặp đi lặp lại vài lần ở hai bên sừng tử cung. Soi tìm phôi trong dung dịch sau khi gội rửa dưới kính hiển vi soi nổi. Sau khi kết thúc quá trình gội rửa phôi, bơm kháng sinh vào tử cung, khâu vết mổ ở tử cung và vết mổ ở thành bụng dê. Tiêm PGF2 α , kháng sinh hậu phẫu cho dê sau thu phôi.

Phân tích số liệu

Số liệu được xử lý thống kê bằng phần mềm Microsoft Excell 2010, sự sai khác có ý nghĩa được kiểm tra bằng hàm ANOVA, sự sai khác có ý nghĩa với $p < 0,05$.

Kết quả và thảo luận

Đánh giá đáp ứng của buồng trứng dê sữa Saanen đối với việc xử lý FSH

Trong nghiên cứu này, chúng tôi chia 12 dê sữa Saanen vào 2 nhóm thí nghiệm (6 dê/nhóm):

- Nhóm A: tiêm 200 mg FSH với liều lượng bằng nhau.
- Nhóm B: tiêm 200 mg FSH với liều lượng giảm dần.

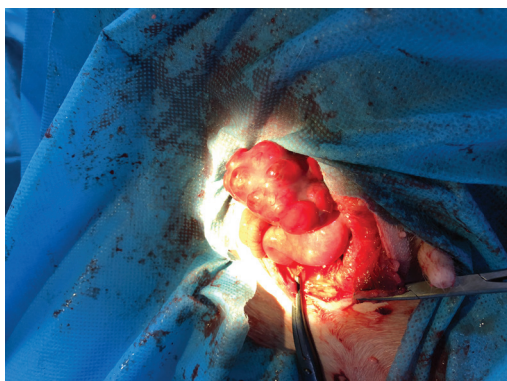
Kết quả đáp ứng của buồng trứng dê sữa Saanen đối với việc xử lý FSH thể hiện ở bảng 1.

Bảng 1. Ảnh hưởng của việc xử lý FSH đến khả năng rụng trứng của dê sữa Saanen.

Các chỉ tiêu đánh giá	Phương pháp tiêm FSH	
	Nhóm A	Nhóm B
Dê có biểu hiện động dục (n, %)	6 (100)	6 (100)
Nang trứng/dê (Mean $\pm$ SE)	18,5 $\pm$ 1,23 ^a	23 $\pm$ 0,64 ^b
Thể vàng/dê (Mean $\pm$ SE)	10,2 $\pm$ 0,72 ^a	17,4 $\pm$ 0,38 ^b
Tế bào trứng không rụng/dê (Mean $\pm$ SE)	8,3 $\pm$ 1,07 ^a	5,6 $\pm$ 0,31 ^b

Ghi chú: các giá trị trong cùng một cột có chữ cái khác nhau là sai khác có ý nghĩa ($p < 0,05$).

Kết quả bảng 1 cho thấy, tất cả các dê thí nghiệm đều có biểu hiện động dục sau khi được xử lý với FSH. Kết quả này của chúng tôi là tương tự như báo cáo của [6, 7]. Theo các tác giả này, 100% dê thí nghiệm đều có phản ứng động dục sau khi được đặt CIRD và gây rụng trứng nhiều bằng FSH. Trong khi đó [8] lại báo cáo rằng, chỉ có 85% dê thí nghiệm có biểu hiện động dục sau khi đặt CIRD và gây rụng trứng nhiều bằng eCG. Điều này cho thấy, việc sử dụng FSH mang lại hiệu quả cho quá trình gây rụng trứng nhiều trên dê. FSH là một gonadotrophin có thời gian bán hủy ngắn và nâng cao hiệu quả tạo phôi tốt hơn so với các gonadotrophin khác; do đó FSH thường được sử dụng như một tác nhân kích thích trong quá trình gây rụng trứng nhiều và cấy chuyển phôi ở một số loài động vật như bò, dê [9].



Hình 3. Buồng trứng dê sữa Saanen sau khi được xử lý FSH theo liều lượng giảm dần.

Trong nghiên cứu của chúng tôi, tất cả các buồng trứng của dê thí nghiệm đều có đáp ứng sau khi được xử lý với FSH (hình 3). Kết quả ở bảng 1 cho thấy, trung bình số nang trứng không rụng/dê của nhóm A cao hơn nhóm B (8,3 so với 5,6, $p<0,05$). Trung bình số nang trứng không rụng/dê ở nhóm B trong nghiên cứu này thấp hơn so với báo cáo của [7]. Theo [7], trung bình có 13,7 nang trứng không rụng/dê khi sử dụng FSH với liều lượng giảm dần.

Trung bình số nang trứng/dê, số thể vàng/dê của nhóm A thấp hơn nhóm B (bảng 1, tương ứng 18,5 so với 23 và 10,2 so với 17,4, $p<0,05$). Trung bình số nang trứng/dê ở nhóm B của chúng tôi là cao hơn so với [4]. Theo [4], việc sử dụng FSH với liều lượng giảm dần cho trung bình số lượng nang trứng/dê đạt 22,2 nang trứng/dê. Trung bình số thể vàng/dê của nhóm B trong nghiên cứu của chúng tôi cao hơn so với [4, 7] (tương ứng 17,4 so với 12,3 và 6,4).

Sự khác nhau về các kết quả nghiên cứu giữa các báo cáo có thể là do chất lượng dê thí nghiệm, giống dê thí nghiệm, điều kiện chăm sóc, mùa thí nghiệm... Các giống dê cao sản sẽ có đáp ứng với gonadotrophin tốt hơn các giống khác. Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng dê sữa Saanen làm dê thí nghiệm, trong khi đó [7] sử dụng dê lai Boer x Katjang, [4] sử dụng dê sữa. Đây có thể là một trong những nguyên nhân dẫn đến sự khác nhau giữa các kết quả nghiên cứu. Dê sữa Saanen có thể có đáp ứng với gonadotrophin ngoại lai tốt hơn so với một số giống dê khác. Tuy nhiên, để khẳng định điều này cần phải có thêm một số nghiên cứu khác chi tiết hơn.

Hiện tượng nang trứng không rụng sau gây rụng trứng nhiều cho đến nay vẫn chưa được hiểu rõ. Nguyên nhân có thể là do sự kết hợp của nhiều yếu tố như: chế độ dinh dưỡng, cơ chế sinh lý sinh sản của dê thí nghiệm, việc thêm FSH, quy trình tiêm, liều lượng gonadotrophin ngoại lai. Các nang trứng chưa thành thực hoặc các nang trứng phát triển sớm được thúc đẩy quá trình phát triển bằng cách xử lý với gonadotrophin có thể là một trong các nguyên nhân gây nên hiện tượng không rụng trứng [7]. Mặc dù các nang trứng không rụng này sẽ tiết ra một lượng estrogens, nhưng lượng estrogens này thường thấp và không ảnh hưởng đến khả năng sống của tế bào trứng/phôi từ các nang trứng đã rụng [10].

Số thể vàng thu được/dê là một trong những thông số quan trọng được sử dụng để đánh giá sự thành công của quá trình gây rụng trứng nhiều, và thông số này phụ thuộc vào một số yếu tố như: nguồn gốc gonadotrophin, quy trình gây rụng trứng nhiều, động vật thí nghiệm và mùa tiến hành nghiên cứu [11]. Trong nghiên cứu của chúng tôi, trung bình số thể vàng/buồng trứng của nhóm A thấp hơn so với nhóm B (10,2 so với 17,4, $p<0,05$). Kết quả này cũng tương tự như báo cáo của [12]. Theo [12], trung bình số thể vàng/dê của nhóm xử lý FSH với liều lượng bằng nhau là thấp hơn so với nhóm xử lý FSH với liều lượng giảm dần (tương ứng 11,6 so với 16,9). Điều này cho thấy, việc tiêm FSH nhiều lần với hàm lượng giảm dần trong quy trình gây rụng trứng nhiều ở dê cho hiệu quả cao hơn việc tiêm FSH với liều lượng bằng nhau.

Đánh giá ảnh hưởng tạo phôi dê sữa *in vivo* sau gây rụng trứng nhiều với FSH

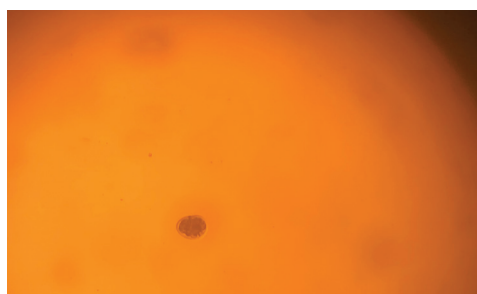
Hiệu quả tạo phôi dê sữa *in vivo* sau gây rụng trứng nhiều với FSH được đánh giá dựa trên số phôi dâu, phôi nang thu được của từng nhóm thí nghiệm. Kết quả thể hiện ở bảng 2.

Bảng 2. Ảnh hưởng của việc xử lý FSH đến hiệu quả tạo phôi dê sữa *in vivo*.

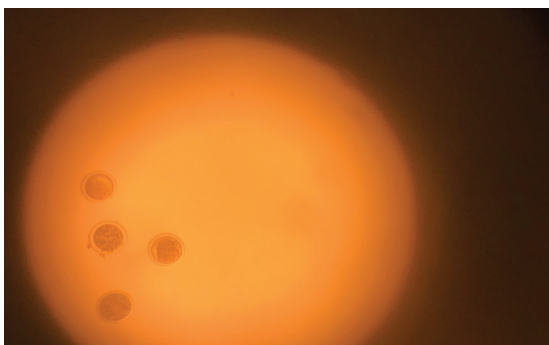
Các chỉ tiêu	Phương pháp tiêm FSH	
	Nhóm A	Nhóm B
Phôi dâu, nang/dê (Mean±SE)	2,67±0,28 ^a	4,25±0,35 ^b
Phôi dâu/dê (Mean±SE)	0,75±0,13 ^a	0,92±0,2 ^a
Phôi nang/dê (Mean±SE)	1,91±0,26 ^a	3,33±0,31 ^b

Ghi chú: các giá trị trong cùng một cột có chữ cái khác nhau là sai khác có ý nghĩa ($p<0,05$).

Trong thí nghiệm này, chúng tôi tiến hành thu phôi dê ở ngày thứ 7 sau rút CIRD. Phôi dê sữa *in vivo* chúng tôi thu được ở hai giai đoạn: phôi dâu (hình 4) và phôi nang (hình 5). Kết quả bảng 2 cho thấy, trung bình tổng số phôi dâu, nang/dê của nhóm xử lý FSH với liều lượng bằng nhau (nhóm A) thấp hơn so với nhóm xử lý FSH với liều lượng giảm dần (nhóm B) (tương ứng 2,67 so với 4,25, $p<0,05$). Kết quả này của chúng tôi là cao hơn so với [7, 12], nhưng thấp hơn so với [13]. Theo [7] trung bình số phôi thu được/dê đạt 2,0; [12] trung bình thu được 2,4 phôi/dê; còn [13] thu được trung bình 6,38 phôi/dê. Sự khác nhau này có thể là do giống dê thí nghiệm, kỹ thuật phối giống, chất lượng đực giống, mùa thí nghiệm, kỹ thuật thu phôi...



Hình 4. Phôi dâu dê sữa Saanen thu được ở ngày thứ 7 sau rút CIRD bằng phương pháp phẫu thuật.



Hình 5. Phôi nang dê sữa Saanen thu được ở ngày thứ 7 sau rút CIRD bằng phương pháp phẫu thuật.

Mặc dù số phôi dâu thu được của nhóm A (0,75) thấp hơn so với nhóm B (0,92), nhưng sự sai khác này là không có ý nghĩa ($p>0,05$). Tuy nhiên, trung bình số phôi nang thu được của nhóm A thấp hơn có ý nghĩa so với nhóm B (tương ứng 1,91 so với 3,33, $p<0,05$). Kết quả này cho thấy, việc xử lý FSH với liều lượng giảm dần trong quá trình gây rụng trứng nhiều trên dê sữa Saanen làm tăng số lượng phôi dê sữa *in vivo* thu được.

Hàm lượng progesterone có vai trò quan trọng trong việc duy trì sự phát triển tiếp theo của tế bào trứng sau thụ tinh. Hàm lượng progesterone tỷ lệ thuận với số thể vàng (số tế bào trứng rụng) [14]. Theo kết quả của nghiên cứu của chúng tôi, nhóm B có trung bình thể vàng/buồng trứng cao hơn so với nhóm A (bảng 1, tương ứng 17,4 so với 10,2). Sự gia tăng số lượng thể vàng sau gây rụng trứng nhiều sẽ làm tăng hàm lượng progesterone của các dê thí nghiệm nhóm B so với nhóm A. Đó là một trong những nguyên nhân giải thích tại sao trung bình số phôi dâu, phôi nang/dê và trung bình số phôi nang/dê của nhóm B cao hơn nhóm A.

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng phù hợp với báo cáo của [15, 16]. [15] nhận thấy nồng độ progesterone có mối tương quan với chất lượng và số lượng phôi thu được trong quá trình gây siêu bài noãn ở bò. Tương tự như vậy, [16] cũng cho rằng nồng độ progesterone có mối liên quan thuận với tỷ lệ rụng trứng, số lượng phôi thu được sau gây siêu bài noãn ở cừu.

Liều lượng FSH sử dụng cũng là một trong những nguyên nhân ảnh hưởng đến hiệu quả của quá trình gây rụng trứng nhiều. Liều lượng FSH quá cao sẽ làm giảm số lượng phôi thu được vì nó sẽ tạo ra một lượng lớn các nang trứng không rụng, qua đó là tăng nồng độ estrogens trong máu và giảm khả năng thụ tinh của tinh trùng. Ngược lại, khi liều lượng FSH quá thấp sẽ không đủ để kích thích sự hình thành nang trứng và sự thành thực của nang trứng. Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng FSH với hàm lượng 200 mg/dê cho quá trình gây rụng trứng nhiều trên dê. Hiện nay 200 mg là hàm lượng FSH thông thường sử dụng trong quá trình gây rụng trứng nhiều đối với dê có trọng lượng dao động từ 28 đến 68 kg [7, 16].

Kết luận

Việc sử dụng liều lượng FSH giảm dần trong quá trình gây rụng trứng nhiều ở dê sữa Saanen cho số phôi dê sữa

in vivo thu được cao hơn so với liều lượng FSH bằng nhau. Trung bình số phôi dâu, phôi nang/dê, số phôi dâu/dê và số phôi nang/dê thu được trong phương pháp tiêm FSH giảm dần tương ứng đạt 4,25, 0,92 và 3,33.

Đề nghị tiếp tục nghiên cứu và sử dụng nguồn phôi dê sữa Saanen *in vivo* làm nguồn nguyên liệu cho quá trình cấy chuyển phôi dê với mục đích cải thiện di truyền và nhân nhanh đàn dê sữa tại Việt Nam.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được thực hiện thông qua đề tài “Ứng dụng công nghệ phôi để sản xuất phôi dê sữa *in vivo* bằng kỹ thuật gây rụng trứng nhiều nhằm tăng nhanh đàn dê sữa chất lượng cao”. Các tác giả xin chân thành cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] C.G. Jackson, et al. (2014), “Efficacy of various five-day estrous synchronization protocols”, *Small Ruminant Res.*, **120**, pp.100-107.
- [2] A. Gonzalez Bulnes, et al. (2003), “Effects of ovarian follicular status on superovulatory response of dairy goats to FSH treatment”, *Small Ruminant Research*, **48**, pp.9-14.
- [3] K.C. Lehloeny (2013), “Preliminary results evaluating a simplified superovulation protocol in Boer goat”, *Samll Ruminant Res.*, **113**, pp.171-174.
- [4] A. Pampukidou, et al. (2011), “Superovulation and embryos transfer in goats by using PMSG or FSH”, *Agric. Sci. Tech.*, **3**, pp.94-97.
- [5] Y. Yuan, et al. (2011), “Effect of follicle stimulating hormone dosage, seasons and treatment frequency on superovulation in goats”, *Anim. Husb. Feed Sci.*, **3**, pp.20-22.
- [6] Trần Trang Nhung, Nguyễn Văn Bình, Hoàng Toàn Thắng, Đinh Văn Bình (2005), *Giáo trình chăn nuôi dê*, Nhà xuất bản Nông nghiệp.
- [7] M.R. Rahman, et al. (2014), “Comparison of superovulation effect of equine chorionic gonadotrophin and follicle stimulating hormone on embryo production in crossbred (Boer x Katjang) goats”, *Pakistan J. Zool.*, **46**, pp.819-826.
- [8] Z.C. Xiao, et al. (2013), “Effects of hormonal administration and locality influence on superovulatory responses in goats”, *Indian J. Anim. Sci.*, **83**, pp.927-929.
- [9] W. Holtz (2005), “Recent development in assisted reproduction in goat”, *Small Rumin. Res.*, **60**, pp.95-110.
- [10] A. Veiga-Lpoez, et al. (2006), “Causes, characteristics and consequences of anovulatory follicles in superovulated sheep”, *Domest. Anim. Endocrin.*, **30**, pp.76-87.
- [11] A. Garza, et al. (2015), “Status and implementation of reproductive technologies in goats in emerging countries”, *Review. Afr. J. Biotechnol.*, **14**, pp.719-727.
- [12] R.B. Abdullah, et al. (2012), “Ovarian response after superovulation with different dosages of FSH in goats”, *Mal. J. Anim. Sci.*, **15**, pp.21-25.
- [13] G. Juraj, et al. (2017), “Efficiency analysis of standard and day 0 superovulatory protocols in Boer breed goats”, *Veterinarski Arhiv.*, **87**, pp.473-486.
- [14] S. Panyaboriban, et al. (2018), “Asimplified superovulation protocol using split single administration of Folltropin®-V in hyaluronan: application to purebred sheep”, *Veterinari Medicina*, **63**, pp.321-328.
- [15] K. Goto, et al. (1988), “Endocrine profiles and embryo quality in superovulated Japanese black cattle”, *Theriogenology*, **29**, pp.615-629.
- [16] V. Sharma, et al. (1993), “Plasma progesterone profiles, ovarian response and embryo recovery in crossbred ewes superovulated during breeding and non-breeding seasons”, *Animal Reproduction Science*, **34**, pp.119-126.

Nghiên cứu liên kết trên toàn hệ gen (GWAS) về khả năng chuyển hóa đường từ rơm rạ của cây lúa

Dương Xuân Tú^{1*}, Nguyễn Thị Hương¹, Lê Thị Thanh¹,
Nguyễn Thế Dương¹, Simon McQueen Mason², Claire Halpin³

¹Viện Cây lương thực và Cây thực phẩm, Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam

²Đại học York, Vương quốc Anh

³Đại học Dundee, Vương quốc Anh

Ngày nhận bài 4/9/2020; ngày chuyển phản biện 11/9/2020; ngày nhận phản biện 16/10/2020; ngày chấp nhận đăng 21/10/2020

Tóm tắt:

Nghiên cứu liên kết trên toàn hệ gen (genome-wide association study - GWAS) là một công cụ hiện đại để xây dựng bản đồ di truyền liên kết các tính trạng số lượng (QTL) ở cây trồng. Trong nghiên cứu này, các tác giả đưa ra kết quả GWAS tính trạng khả năng đường hóa của cây lúa dựa trên cơ sở dữ liệu giải trình tự kiểu gen (GBS) và khả năng chuyển hóa đường từ rơm rạ của 170 mẫu giống lúa thuộc nhóm Indica được thu thập ở Việt Nam. Kết quả thu được 328.656 SNP trên 12 nhiễm sắc thể (NST), trung bình 1 SNP/1 kb. Khả năng đường hóa từ rơm rạ của 170 mẫu giống lúa dao động từ 27,92 đến 132,56 nmol/mg/h (vụ xuân 2017) và 31,98-148,63 nmol/mg/h (vụ mùa 2017). Kết quả GWAS, tại giá trị $\text{Log}_{10}(\text{P-value}) \geq 3$ đã xác định được 7 vị trí SNP trên NST số 6 với mức ý nghĩa $p < 0,001$ và tần số alen từ 23 đến 35% liên quan đến khả năng chuyển hóa đường từ rơm rạ của cây lúa. Tại vị trí của các SNP này (peak SNP), 24 gen đã được dự kiến nằm trong các vùng QTL liên quan đến khả năng đường hóa ở rơm rạ của cây lúa. Trong đó, 4 gen là LOC_Os06g39070 (GT1), LOC_Os06g39080 (GT1), LOC_Os06g39390 (AT10) và LOC_Os06g39470 (AT8) có các chức năng liên quan đến tổng hợp chất ở thành tế bào và khả năng phân hủy lignocellulose ở cây lúa. Các gen này được tiếp tục nghiên cứu để phát triển các chỉ thị phân tử sử dụng trong chọn tạo giống lúa theo hướng có rơm rạ chuyển hóa đường cao.

Từ khóa: chuyển hóa đường, liên kết không cân bằng, lúa, nghiên cứu trên hệ gen, rơm rạ.

Chỉ số phân loại: 4.6

Đặt vấn đề

Cây lúa (*Oryza sativa* L.) là nguồn cung cấp lương thực cho hơn một nửa dân số trên thế giới, đặc biệt là nguồn lương thực chủ yếu ở các quốc gia châu Á [1]. Tuy nhiên, sản xuất lúa hiện nay đang phải đối mặt với những hệ quả của biến đổi khí hậu như xâm nhập mặn và những diễn biến bất thường của thời tiết (hạn, úng, lũ lụt, nóng...). Mặt khác, sản xuất lúa cũng là một trong những tác nhân gây biến đổi khí hậu do tạo ra phát thải, đặc biệt là việc đốt rơm rạ sau khi thu hoạch lúa.

Khi rơm rạ bị đốt cháy sẽ giải phóng ra các chất khí CO_2 , CH_4 , các oxit ni tơ (NO_x) và một lượng tương đối nhỏ dioxit sulphur (SO_2). Các chất khí này thải ra bầu khí quyển là những chất gây hiệu ứng nhà kính [2, 3]. Tỷ lệ rơm rạ sau thu hoạch chiếm 50-70% tổng sinh khối, tùy thuộc vào giống và kỹ thuật canh tác [4, 5]. Hàng năm thế giới sản xuất được 780-800 triệu tấn lúa thì cũng đồng thời tạo ra 800-1.000 triệu tấn rơm rạ [1]. Theo Tổng cục Thống

kê (2016, 2017, 2018), sản lượng lúa của Việt Nam trong những năm gần đây đạt trung bình 43,3 triệu tấn/năm, tương đương với sản lượng rơm rạ tạo ra là 50-55 triệu tấn. Nguồn phế thải này nếu được khai thác hợp lý sẽ mang lại lợi ích không nhỏ, nhưng nếu chúng bị đốt ngay sau khi thu hoạch sẽ tạo ra một lượng phát thải đáng kể cho bầu khí quyển.

Chuyển hóa xenlulo thành đường trong rơm rạ là một yếu tố quan trọng quyết định đến chất lượng khai thác và sử dụng rơm rạ vào các mục đích như chế biến thức ăn chăn nuôi, nhiên liệu sinh học, sản xuất nấm, phân bón... Nhiều nhà khoa học trên thế giới đã tiến hành các nghiên cứu để kích thích việc sử dụng rơm rạ vào sản xuất ethanol sinh học [6, 7]. Để sản xuất ethanol từ rơm rạ, bước đầu cần phải chuyển hóa được chúng thành đường. Rơm rạ càng dễ phân hủy, càng tạo điều kiện thuận lợi và hiệu suất đạt được càng cao trong quá trình thủy phân thành đường [8]. Đây chính là điều cốt lõi để có thể tận dụng triệt để nguồn rơm rạ từ sản xuất lúa gạo. Từ đây một số hướng nghiên cứu đã được mở ra, trong đó nghiên cứu di truyền bằng công nghệ sinh học,

*Tác giả liên hệ: Email: duongtu390@hotmail.com

Genome-wide association study (GWAS) for digestibility in rice straw

Xuan Tu Duong^{1*}, Thi Huong Nguyen¹, Thi Thanh Le¹,
The Duong Nguyen¹, Simon McQueen Mason², Claire Halpin³

¹Field Crops Research Institute, VAAS

²York University, United Kingdom

³Dundee University, United Kingdom

Received 4 September 2020; accepted 21 October 2020

Abstract:

Genome-wide association study (GWAS) based on linkage disequilibrium (LD) of single nucleotide polymorphism (SNP) provides a promising tool for the detection and fine mapping of quantitative trait loci (QTL) in plants. In this study, the authors showed GWAS for saccharification (digestibility) trait of rice straw-based on genotyping by sequencing (GBS) and the ability of sugar released from the straw of 170 rice accessions of Indica rice subspecies that were collected in Vietnam. In the GBS result, the authors obtained a total of 328,656 SNPs stored in Hapmap on the 12 chromosomes. The average density of SNP markers in our panel was 1SNP/1 kb in the rice genome. The saccharification (sugar released) from the straw of 170 rice accessions ranged from 27.92-132.56 nmol/mg/hour (for straw harvested in Spring 2017) and from 31.98-148.63 nmol/mg/hour (for straw harvested in Summer season 2017). The results of GWAS for saccharification, at $\text{Log}_{10}(\text{P-value}) \geq 3$ with significant $p < 0.001$ the authors identified 7 peak SNPs on chromosome 6 with the frequency of minor allele from 23 to 35%. Based on the LD to search within ± 200 kb of peak SNP, and based on whether the function of the genes had been characterized before in rice, the authors identified 24 candidate genes on chromosome 6 for saccharification. Among them, 4 genes are LOC_Os06g39070 (GT1), LOC_Os06g39080 (GT1), LOC_Os06g39390 (AT10) and LOC_Os06g39470 (AT8) have functions related to cell wall synthesis and lignocellulose degradation in rice. These candidate genes are further researched to develop molecular markers used in rice breeding with the trait of high saccharification of straw and to detect genes for high saccharification rice straw.

Keywords: genome-wide association study, linkage disequilibrium, rice, saccharification, straw.

Classification number: 4.6

đặc biệt GWAS là công cụ hỗ trợ tốt cho các nhà chọn giống có cơ sở để chọn tạo được những giống lúa mới đáp ứng cho sản xuất, đồng thời rơm rạ có khả năng chuyển hóa đường cao sẽ kích thích việc khai thác và sử dụng rơm rạ, hạn chế tối đa việc đốt rơm rạ sau khi thu hoạch lúa.

GWAS dựa trên liên kết LD là một công nghệ mới cho việc xây dựng bản đồ các QTL kiểm soát các tính trạng trên toàn hệ gen với sự tiếp cận kiểu gen và kiểu hình mức phân giải cao [9]. GWAS đầu tiên được sử dụng ở người, sau đó đã trở thành một công cụ hiệu quả để xác định vị trí các gen quy định tính trạng ở nhiều loài cây trồng [10]. Giải trình tự kiểu gen với mật độ cao các SNP trên toàn hệ gen để tìm ra các trình tự đơn (haplotype) và từng vị trí SNP liên quan đến sự biến động hoặc sự sai khác của tính trạng ở các cá thể, từ đó xác định được các QTL kiểm soát tính trạng [11]. Trong những năm gần đây, sự phát triển của công nghệ hiện đại trong việc giải trình tự ADN với mật độ cao của các SNP trên toàn hệ gen, chi phí thấp đã tạo điều kiện cho sự phát triển của GWAS có hiệu quả hơn trên quần thể tự nhiên [12]. Trên thế giới cũng đã có một số công bố sử dụng GWAS để xác định các QTL kiểm soát khả năng chuyển hóa đường từ thân lá ở các loài cây trồng khác nhau như cỏ Miscanthus [13], ngô [14], cỏ alfalfa [15], lúa mạch [16]. Tuy nhiên, chuyển hóa đường từ lignocellulose là một tính trạng rất khó để đánh giá cả trên đồng ruộng và trong phòng thí nghiệm [17]. Đối với cây lúa, đã có thành công trong việc giải mã bộ gen lúa và nghiên cứu bộ gen của 3.010 mẫu giống lúa ở khu vực Đông - Nam châu Á [18], đồng thời lúa là loài tự thụ cao, có kích cỡ bộ gen nhỏ (khoảng 430 triệu gen) nên trong GWAS sẽ dễ đưa ra gen dự kiến [18]. Juan và cs (2018) [19] đã thành công trong sử dụng công nghệ GWAS để tìm ra các QTL kiểm soát các tính trạng quan trọng như thời gian sinh trưởng, chiều cao cây, số bông trên cây, số hạt trên bông và độ dài bông của 193 mẫu giống lúa thuộc loài phụ Japonica. Đối với nhóm giống lúa Indica, cũng đã có những ứng dụng thành công GWAS để xác định các QTL kiểm soát các tính trạng quan trọng của cây lúa [20, 21].

Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành GWAS trên 170 mẫu giống lúa thuộc loài phụ Indica để dự kiến các gen nằm trên vùng QTL kiểm soát khả năng đường hóa từ rơm rạ của cây lúa. Kết quả của nghiên cứu này sẽ được tiếp tục cho các nghiên cứu tiếp theo để tìm ra gen kiểm soát tính trạng khả năng đường hóa ở cây lúa và phát triển chỉ thị phân tử cho chọn tạo giống lúa có rơm rạ chuyển hóa đường cao, nâng cao chất lượng rơm rạ để tăng cường khai thác, hạn chế việc đốt rơm rạ sau khi thu hoạch, hạn chế phát thải trong sản xuất lúa gạo.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu nghiên cứu

170 mẫu giống lúa thuộc loài phụ Indica được thu thập tại các vùng sản xuất lúa của Việt Nam, bao gồm các giống

lúa bản địa, các giống lúa cải tiến và một số nguồn gen nhập nội đang được lưu giữ. Các mẫu giống lúa được trồng tại Viện Cây lương thực và Cây thực phẩm, được thu mẫu ADN trong vụ mùa 2014 và vụ xuân 2016 cho GBS và thu mẫu rơm rạ cho phân tích khả năng đường hóa trong vụ xuân và vụ mùa 2017.

Phương pháp nghiên cứu

Gieo trồng 170 mẫu giống lúa trên đồng ruộng để thu mẫu rơm rạ: được bố trí theo khối ngẫu nhiên hoàn chỉnh với 5 lần nhắc lại, diện tích ô thí nghiệm là 5 m², mật độ 45 cây/m². Kỹ thuật gieo trồng được áp dụng chung theo quy trình thí nghiệm của Viện Cây lương thực và Cây thực phẩm.

Tách chiết ADN: mẫu lá lúa được thu tại thời điểm 30 ngày tuổi để tách chiết ADN, 2 g/cây. Sử dụng kit tách chiết DNeasy plant mini kit-Qiagen (DNeasy Plant Mini Kit and DNeasy Plant Maxi Kit Handbook 8/2000).

Thu mẫu rơm rạ: thu của 10 cây mẫu trong mỗi ô thí nghiệm ngay sau khi thu hoạch hạt ở giai đoạn chín 90%; thu phần thân cây từ đốt thứ 2 tính từ mặt đất, loại bỏ đốt mang bông và lá. Các mẫu rơm rạ sau khi thu hoạch được sấy khô đến khối lượng không đổi, được khử trùng trước khi gửi sang Đại học York (Vương quốc Anh) phân tích.

Phân tích chuyển hóa đường từ rơm rạ: được thực hiện tại Trung tâm Sản phẩm Nông nghiệp mới (Center for Novel Agricultural Product - CNAP), Đại học York, Vương quốc Anh theo phương pháp tự động được miêu tả bởi Gomez và cs (2011) [22] (hình 1).



Hình 1. Các bước trong phân tích đường hóa từ rơm rạ của cây lúa [22].

Giải trình tự kiểu gen GBS: được thực hiện trên Illumina platform tại Đại học Cornell (Mỹ), theo phương pháp được miêu tả bởi Elshire và cs (2011) [23]. Số liệu sau giải trình tự được xử lý bằng phần mềm TASSEL 3.0 [24].

Phân tích GWAS: kết hợp dữ liệu GBS và kết quả phân tích đường hóa trong rơm rạ của 170 mẫu giống lúa theo [25], xác định các SNP trong liên kết LD cho khả năng đường hóa.

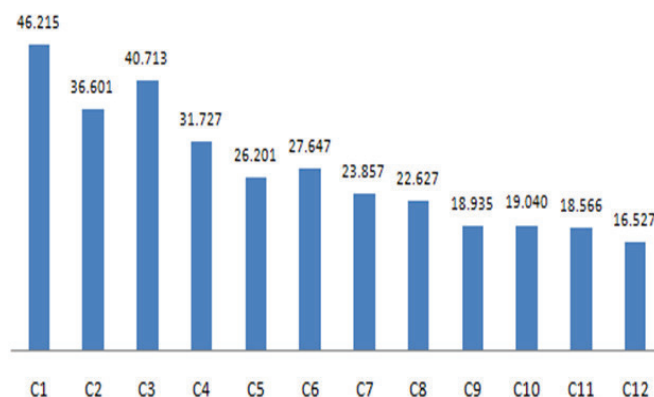
Dự kiến các QTL/gen: từ vị trí các SNP trong liên kết LD, tra cứu trong “Rice Genome Annotation Project” (<http://rice.plantbiology.msu.edu/>) và “3010 genome diversity” [18] để dự kiến các gen.

Kết quả và thảo luận

GBS của 170 mẫu giống lúa

Kết quả GBS đã đưa ra tổng số 328.656 SNP trên mạch đơn (HapMap) toàn bộ 12 NST của 170 mẫu giống lúa (hình

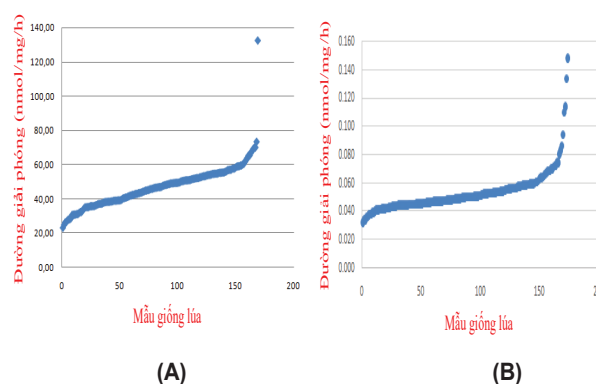
2) với mật độ trung bình là 1 SNP/1 kb trên toàn hệ gen. Mật độ SNP này là thấp hơn so với công bố của một số nghiên cứu gần đây là 1,7 SNP/kb [20] và 1,1 SNP/1 kb [21]. Các SNP này được sử dụng trong GWAS để tìm ra liên kết LD là nguyên nhân dẫn đến sự sai khác chuyển hóa đường trong rơm rạ của các mẫu giống lúa, từ đó dự kiến các gen nằm trong các vùng QTL liên quan đến chuyển hóa đường từ rơm rạ của cây lúa.



Hình 2. Số lượng các SNP được tìm ra trên 170 mẫu giống lúa nghiên cứu.

Phân tích chuyển hóa đường từ rơm rạ của 170 mẫu giống lúa

Kết quả phân tích mẫu rơm rạ của 170 mẫu giống lúa cho thấy sự khác nhau về khả năng chuyển hóa đường ở 2 thời vụ thu hoạch. Khả năng chuyển hóa đường từ rơm rạ của các mẫu giống thu hoạch trong vụ xuân 2017 dao động trong khoảng từ 22,9 nmol/mg/h (ở giống nếp đỏ đuôi trâu) đến 132,6 nmol/mg/h (ở giống U17). Trong khi các mẫu rơm rạ thu trong vụ mùa 2017 có khả năng chuyển hóa đường ở mức cao hơn, dao động từ 32,0 nmol/mg/h (ở giống Lúa nương-2) đến 148,6 nmol/mg/h (ở giống Khẩu munuog) (hình 3).



Hình 3. Khả năng đường hóa từ rơm rạ của 170 mẫu giống lúa. (A) Các mẫu rơm rạ thu hoạch trong vụ xuân 2017; (B) Các mẫu rơm rạ thu trong vụ mùa 2017.

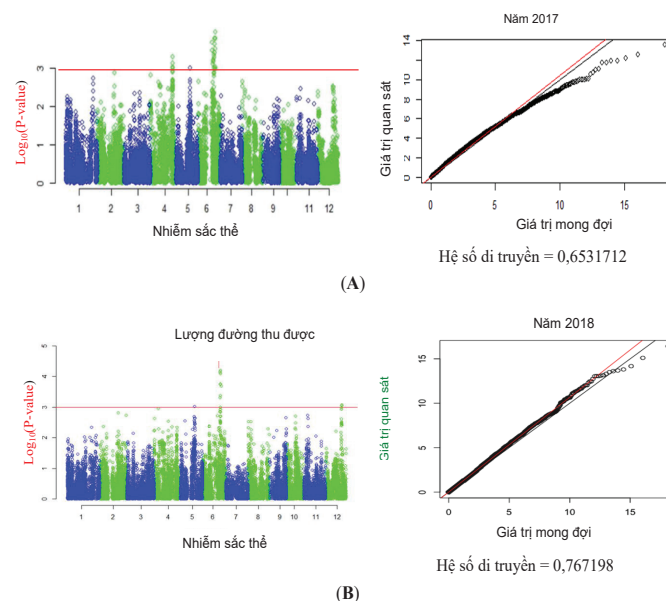
Có sự khác biệt về chuyển hóa đường từ rơm rạ của các giống lúa khác nhau trong cùng một thời vụ và cùng điều kiện canh tác. Sự khác biệt này cũng xảy ra đối với cùng một giống ở các thời vụ khác nhau (bảng 1).

Bảng 1. Danh sách mẫu giống cho khả năng chuyển hóa đường thấp nhất và cao nhất từ rơm rạ được thu hoạch trong vụ xuân và vụ mùa 2017.

TT	Tên mẫu giống	Khả năng chuyển hóa đường từ rơm rạ (nmol/mg/h)		
		Vụ xuân 2017	Vụ mùa 2017	Trung bình
Nhóm mẫu giống có rơm rạ cho khả năng chuyển hóa đường thấp				
1	Quế thơm	27,92	38,70	33,31
2	142m12	30,53	37,76	34,14
3	OM6377	35,31	36,22	35,76
4	SH4-11	30,94	42,29	36,61
5	IRBB3	30,63	43,65	37,14
6	Xi23	40,58	33,72	37,15
7	Lúa nương -2	42,74	31,98	37,36
8	10L142	37,65	39,12	38,38
9	OM2517	32,14	44,82	38,48
10	OM4325	27,79	50,22	39,00
Nhóm mẫu giống có rơm rạ cho khả năng chuyển hóa đường cao				
1	Tan nhe -1	54,62	72,13	63,38
2	IRBB7-196	44,22	83,35	63,78
3	AG-504	57,64	72,49	65,07
4	Khẩu lạn, gan mọn	37,84	94,28	66,06
5	Tẻ ka chằm pi	48,23	86,31	67,27
6	Khẩu lạn, gan mọn -1	35,57	110,15	72,86
7	AC5/149-13	73,26	80,50	76,88
8	Khẩu mumoong	38,06	133,90	85,98
9	Khẩu munuong	55,29	148,63	101,96
10	U17	132,56	114,00	123,28

Kết quả phân tích GWAS đã đưa ra hệ số tương quan di truyền khả năng chuyển hóa đường (phân hủy lignocellulose) từ rơm rạ của 170 mẫu giống lúa trong vụ xuân 2017 là 0,6531712 và trong vụ mùa 2017 là 0,767198 (hình 4). Sự khác biệt về khả năng chuyển hóa đường từ rơm rạ của cùng một giống tại các thời vụ khác nhau là do ảnh hưởng của điều kiện môi trường. Tuy vậy, mức độ sai khác này cũng thể hiện khác nhau giữa các mẫu giống, sự phản ứng khác nhau của yếu tố di truyền với môi trường dẫn đến sự khác nhau về thành phần và khả năng phân hủy của lignocellulose trên thành tế bào. Kết quả nghiên cứu này cũng phù hợp với kết quả nghiên cứu của Oakey và cs (2013) [17] đã được công

bố về sự khác biệt khả năng phân hủy lignocellulose trong chuyển hóa đường trong thành phần cellulose của cây lúa do ảnh hưởng của yếu tố môi trường qua các năm khác nhau.



Hình 4. GWAS khả năng đường hóa từ rơm rạ trên cơ sở dữ liệu của 170 mẫu giống lúa. (A) Mẫu rơm rạ được thu trong vụ xuân 2017; (B) Mẫu rơm rạ được thu trong vụ mùa 2017.

Ở các tỉnh phía Bắc, vụ lúa xuân (tháng 1-6) và vụ lúa mùa (tháng 6-10) có sự khác biệt về thời tiết với một số yếu tố như: nhiệt độ trung bình, độ ẩm không khí, thời gian chiếu sáng ngày và cường độ ánh sáng. Sự khác biệt này dẫn đến sự khác biệt về sinh trưởng, phát triển, tích lũy chất khô để hình thành sinh khối và các thành phần sinh khối. Đây cũng là nguyên nhân của sự khác biệt về thành phần của sinh khối, hàm lượng và khả năng phân hủy của lignocellulose dẫn đến sự khác nhau về khả năng đường hóa từ rơm rạ của các mẫu giống lúa. Bên cạnh đó, yếu tố di truyền của giống cũng sẽ quyết định đến mức độ phản ứng khác nhau với điều kiện môi trường. Điều này thể hiện rất rõ trong kết quả phân tích của chúng tôi ở trên.

GWAS xác định các SNP liên kết LD cho khả năng đường hóa

Phân tích GWAS được thực hiện bởi nhóm nghiên cứu gồm các thành viên của Viện Cây lương thực và Cây thực phẩm, Đại học York và Dundee, trên cơ sở dữ liệu kiểu gen (GBS) và kiểu hình (khả năng đường hóa từ rơm rạ) của 170 mẫu giống lúa trong vụ xuân 2017 và vụ mùa 2017 (hình 3).

Hệ số tương quan di truyền tính trạng khả năng đường hóa từ rơm rạ được tính trên sự sai kiểu gen và kiểu hình của các mẫu giống trong quần thể được đưa ra trong vụ xuân 2017 là 0,6531712 và vụ mùa 2017 là 0,767198. Tính trạng về khả năng chuyển hóa đường từ rơm rạ ở cây lúa có hệ

số tương quan di truyền là tương đối lớn, thể hiện được sự kiểm soát bởi kiểu gen di truyền trong mối tương tác giữa kiểu gen và môi trường để biểu hiện ra kiểu hình.

Kết quả GWAS tính trạng khả năng chuyển hóa đường từ rơm rạ của 170 mẫu giống lúa trong cả 2 vụ, tại giá trị $\text{Log}_{10}(\text{P-value}) \geq 3$ đã xác định được 7 vị trí SNPs liên kết LD có ý nghĩa ở mức $p < 0,001$ và tần số alen từ 23 đến 35% (bảng 2). Các SNP trong liên kết LD này có ý nghĩa là nguyên nhân cho sự sai khác về khả năng chuyển hóa đường giữa các giống lúa.

Bảng 2. Các SNP trong liên kết LD và các gen dự kiến về tính trạng khả năng đường hóa từ rơm rạ của cây lúa được tính ra trên toàn hệ gen.

Vị trí	Alen chính	Alen thay thế	Tần suất alen thay thế	Gen dự kiến
S6-23197325	C	T	0,23	LOC_Os06g39070 (GT1, enzyme UDP-glucuronosyl và UDP-glucosyl transferase)
S6-23205192	C	G	0,27	LOC_Os06g39080 (GT1, enzyme UDP-glucuronosyl và UDP-glucosyl transferase) LOC_Os06g39100 (biểu hiện protein) LOC_Os06g39110 (biểu hiện protein)
S6-23231889	A	G	0,35	LOC_Os06g39120 (biểu hiện protein) LOC_Os06g39130 (protein giả định) LOC_Os06g39140 (hemoglobin-like protein HbO) LOC_Os06g39200 (biểu hiện protein) LOC_Os06g39230 (biểu hiện protein) LOC_Os06g39240 (nhân tố biệt hóa màng)
S6-23297154	A	G	0,26	LOC_Os06g39260 (vận chuyển UDP glucose) LOC_Os06g39270 (chức năng vận chuyển Flavonoid glucosyl) LOC_Os06g39290 (biểu hiện protein) LOC_Os06g39330 (biểu hiện protein)
S6-23338130	T	C	0,29	LOC_Os06g39344 (enoyl-CoA hydratase/isomerase family protein) LOC_Os06g39370 (vùng protein mang OsFBK16 F) LOC_Os06g39380 (protein giả định) LOC_Os06g39390 (AT10, chức năng vận chuyển Transferase glucuronoarabinoxylan) LOC_Os06g39410 (biểu hiện protein) LOC_Os06g39420 (biểu hiện protein) LOC_Os06g39440 (chức năng enzyme amidophosphoribosyltransferase)
S6-23441394	A	G	0,33	LOC_Os06g39470 (AT8, enzyme Feruloyl transferase) LOC_Os06g39480 (protein mang SPOC)
S6-23451691	T	G	0,25	LOC_Os06g39500 (biểu hiện protein)

Dự kiến các gen cho khả năng chuyển hóa đường từ rơm rạ của cây lúa

Dựa vào kết quả nghiên cứu đã được công bố về phạm vi biến động trong liên kết LD ở cây lúa [26]; kết quả công bố từ “*Genomic variation in 3010 diverse accessions of Asian cultivated rice*” [18] và “*Rice Genome Annotation Project*” (<http://rice.plantbiology.msu.edu/>), chúng tôi đã dự kiến được 24 gen nằm trên các vùng QTL thuộc NST số 6 liên quan đến khả năng chuyển hóa đường từ rơm rạ của cây lúa (bảng 2) tại vị trí đỉnh của 7 SNP (peak SNP).

Các gen dự kiến được lựa chọn dựa vào các chức năng của gen đã được công bố hoặc trong nhóm gen tương tự đã được biết đến với vai trò trong sự tổng hợp hoặc biến đổi thành tế bào, liên quan đến phân hủy lignocellulose. Trong đó, LOC_Os06g39070 và LOC_Os06g39080 (GT1) được tìm ra trong vùng QTL có sự liên quan chặt chẽ đến khả năng chuyển hóa đường cao. Hai gen này cũng được tìm ra chức năng tham gia vào tổng hợp và vận chuyển UDP-glucuronosyl và UDP-glucosyl trong thành tế bào, liên quan đến khả năng phân hủy lignocellulose ở cây lúa [18]; LOC_Os06g39390 (AT10) có chức năng mã hóa một co-enzyme vận chuyển p-coumaroyl tới arabinosyl, liên quan đến quá trình tổng hợp thành tế bào và lignocellulose khả năng chuyển hóa đường ở cây lúa [24]. LOC_Os06g39470 (AT8) cũng đã được tìm ra với chức năng vận chuyển Feruloyl trong trao đổi chất thành tế bào của cây lúa [27]. Kết quả này tạo tiền đề cho các nghiên cứu tiếp theo để tìm ra gen kiểm soát tính trạng khả năng chuyển hóa đường (phân hủy lignocellulose) trong rơm rạ của cây lúa và phát triển chỉ thị cho chọn giống.

Kết luận

Kết quả phân tích trên 170 mẫu giống lúa thu thập ở Việt Nam cho thấy có sự biến động về khả năng chuyển hóa đường từ rơm rạ của các mẫu giống trong cùng một điều kiện canh tác và mùa vụ (từ 27,92-132,56 nmol/mg/h trong vụ xuân 2017 và 31,98-148,63 nmol/mg/h trong vụ mùa 2017). Kết quả cũng cho thấy có sự khác nhau về khả năng chuyển hóa đường từ rơm rạ trong cùng một giống được thu hoạch ở thời vụ khác nhau. Kết quả này góp phần khẳng định tính trạng chuyển hóa đường từ rơm rạ của cây lúa là do gen di truyền kiểm soát trong sự tương tác với điều kiện môi trường để hình thành tính trạng. Kết quả GBS trên 170 mẫu giống lúa, đã thu được 328.656 SNP trên 12 NST. GWAS về tính trạng chuyển hóa đường từ rơm rạ của cây lúa trong nghiên cứu này có hệ số tương quan di truyền 0,65-0,77 trong vụ xuân và vụ mùa. Kết quả GWAS đã xác định được 7 vị trí SNPs trên NST số 6 có ý nghĩa ở mức $p < 0,001$ và tần số alen từ 23 đến 35% trong liên kết LD là nguyên nhân dẫn đến sự sai khác cho khả năng đường hóa từ rơm rạ ở các giống lúa. 24 gen dự kiến chứa các SNP này

trên NST số 6. Trong đó, 4 gen LOC_Os06g39070 (GT1), LOC_Os06g39080 (GT1), LOC_Os06g39390 (AT10) và LOC_Os06g39470 (AT8) có các chức năng liên quan đến tổng hợp chất ở thành tế bào và khả năng phân hủy lignocellulose ở cây lúa. Kết quả nghiên cứu này rất có ý nghĩa cho việc khai thác (sử dụng cơ sở dữ liệu GBS cho GWAS một số tính trạng khác ở cây lúa) và sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo để tìm ra gen kiểm soát tính trạng khả năng chuyển hóa đường (phân hủy lignocellulose) trong rơm rạ của cây lúa và phát triển chỉ thị cho chọn giống.

LỜI CẢM ƠN

Công trình này được thực hiện thông qua đề tài “Nghiên cứu phát triển các nguồn gen lúa thích ứng với biến đổi khí hậu (Developing rice resources for resilience to climate change and carbon emission)” do Bộ Khoa học và Công nghệ và Quỹ Newton cấp kinh phí. Các tác giả xin chân thành cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] IRRI (2020), *The value of sustainable rice straw management* (retrieved from <https://www.irri.org/rice-straw-management>, on 17 Feb 2020).
- [2] Nguyễn Mậu Dũng (2012), “Ước tính lượng khí thải từ đốt rơm rạ ngoài đồng ruộng tại khu vực Đồng bằng sông Hồng”, *Tạp chí Khoa học và Phát triển*, **10**, tr.24-29.
- [3] L. Wang, R. Templer, R.J. Murphy (2012), “Environmental sustainability of bioethanol production from waste papers: sensitivity to the system boundary”, *Energy and Environmental Science*, **5**, pp.8281-8293.
- [4] Ministry of Economic Affairs (2013), *Rice straw and Wheat straw - Potential feedstocks for the biobased economy*.
- [5] Jiqin Ren, Peixian Yu, Xiaohong Xu (2019), “Review-straw utilization in China - status and recommendations”, *Sustainability*, **11**(6), p.1762.
- [6] P. Binod, et al. (2010), “Bioethanol production from rice straw: an overview”, *Bioresource Technology*, **101**, pp.4767-4774.
- [7] Satya Nagalakshmi, et al. (2013), “Bioethanol production from rice straw residues”, *Brazilian Journal of Microbiology*, **44**, pp.225-234.
- [8] L.D. Gomez, et al. (2008), “Sustainable liquid biofuels from biomass: the writing’s on the walls”, *New Phytol.*, **178**, pp.473-485.
- [9] A. Alqudah, et al. (2019), “GWAS: Fast-forwarding gene identification and characterization in temperate cereals: lessons from Barley - A review”, *Journal of Advance Research*, **22**, pp.119-135.
- [10] X. Huang, B. Han (2014), “Natural variations and genome-wide association studies in crop plants”, *Annu. Rev. Plant Biol.*, **65**, pp.531-551.
- [11] B. Brachi, et al. (2011), “Genome-wide association studies in plants: the missing heritability is in the field”, *Genome Biology*,

12(10), p.232.

- [12] S. Atwell, et al. (2010), “Genome-wide association study of 107 phenotypes in a common set of *Arabidopsis thaliana* inbred lines”, *Nature*, **465**, pp.627-631.
- [13] G. Slavov, et al. (2013), “Advances in the genetic dissection of plant cell walls: tools and resources available in *Miscanthus*”, *Frontiers in Plant Science*, **4**, p.217.
- [14] B.W. Penning, et al. (2014), “Genetic determinants for enzymatic digestion of lignocellulosic biomass are independent of those for lignin abundance in a maize recombinant inbred population”, *Plant Physiology*, **165**(4), pp.1475-1487.
- [15] Z. Wang, et al. (2016), “Association mapping for fiber-related traits and digestibility in alfalfa (*Medicago sativa*)”, *Plant Sciences*, **7**, p.331.
- [16] L.D. Gomez, et al. (2010), “Automated saccharification assay for determination of digestibility in plant materials”, *Biotechnol. Biofuels*, **3**, p.23.
- [17] H. Oakey, et al. (2013), “Identification of crop cultivars with consistently high lignocellulosic sugar release requires the use of appropriate statistical design and modelling”, *Biotechnology for Biofuels*, **6**, p.185.
- [18] W. Wang, et al. (2018), “Genomic variation in 3,010 diverse accessions of Asian cultivated rice”, *Nature*, **557**, pp.43-49.
- [19] Juan L. Reig-Valiente, et al. (2018), “Genome-wide association study of agronomic traits in rice cultivated in temperate regions”, *BMC Genomics*, **19**, DOI: 10.1186/s12864-018-5086-y.
- [20] X. Huang, et al. (2010), “Genome-wide association studies of 14 agronomic traits in rice landraces”, *Nat. Genet.*, **42**, pp.961-967.
- [21] Zhang Peng, et al. (2019), “Genome-wide association study of important agronomic traits within a core collection of rice (*Oryza sativa* L.)”, *BMC Plant Biology*, **19**, DOI: 10.1186/s12870-019-1842-7.
- [22] L.D. Gomez, et al. (2011), “High-throughput saccharification assay for lignocellulosic materials”, *Journal of Visualized Experiment*, **53**, DOI: 10.3791/3240.
- [23] R.J. Elshire, et al. (2011), “A robust, simple genotyping-by-sequencing (GBS) approach for high diversity species”, *PLOS ONE*, **6**(5), p.19379.
- [24] L.E. Bartley, et al. (2013), “Overexpression of a BAHD acyltransferase, OsAt10, alters rice cell wall hydroxycinnamic acid content and saccharification”, *Plant Physiology*, **161**, pp.1615-1633.
- [25] J.C. Glaubitz, et al. (2014), “TASSEL-GBS: A high capacity genotyping by sequencing analysis pipeline”, *PLOS ONE*, **9**(2), p.90346.
- [26] K.A. Mather, et al. (2007), “The extent of linkage disequilibrium in rice (*Oryza sativa* L.)”, *Genetics*, **177**(4), pp.2223-2232.
- [27] R.A.C. Mitchell, et al. (2007), “A novel bioinformatics approach identifies candidate genes for the synthesis and feruloylation of arabinoxylan”, *American Society of Plant Biologists*, **144**(1), pp.43-53.

Nghiên cứu lưu giữ *in vitro* nguồn gen khoai môn sọ bản địa *Colocasia esculenta* (L.) Schott

Vì Thị Xuân Thủy*, Vũ Thị Nụ, Phayvong Duangneun, Trần Thị Mừng, Trần Thị Hồng Xuân

Trường Đại học Tây Bắc

Ngày nhận bài 31/8/2020; ngày chuyển phản biện 4/9/2020; ngày nhận phản biện 8/10/2020; ngày chấp nhận đăng 15/10/2020

Tóm tắt:

Hiện nay, nuôi cấy *in vitro* được ứng dụng để tạo ra số lượng cá thể lớn, giống nhau về mặt di truyền, đồng đều về sinh trưởng, phát triển và sạch bệnh trong thời gian ngắn. Hơn nữa, phương pháp này còn có thể bảo quản lâu dài nguồn gen quý, hiếm, đặc biệt là với các đối tượng nhân giống vô tính và khó bảo quản như khoai môn sọ. Nghiên cứu trình bày kết quả lưu giữ nguồn gen khoai môn sọ bản địa Cụ Cang (Sơn La) bằng kỹ thuật nuôi cấy *in vitro*. Kết quả cho thấy, thời gian khử trùng củ con khoai môn sọ Cụ Cang tối ưu trong HgCl_2 0,2% là 11 phút kép (9 phút lần 1 và 2 phút lần 2), cho kết quả 62,83% lượng mẫu sạch và đảm bảo chồi sinh trưởng. Cây *in vitro* được bảo quản trong môi trường 1/2 MS + agar 8 g/l + mannitol 1 g/l là phù hợp nhất, cây vừa sinh trưởng chậm, thời gian cấy chuyển dài (11 tháng) và vẫn đảm bảo chồi sinh trưởng. Nuôi cấy chồi trong môi trường 1/2 MS + saccharose 90 g/l + agar 8 g/l là tối ưu cho khoai môn sọ Cụ Cang *in vitro* tạo củ, với khối lượng củ cao nhất đạt 1,58 g.

Từ khóa: bảo quản *in vitro*, cấy chuyển, khoai môn sọ Cụ Cang, nguồn gen.

Chỉ số phân loại: 4.6

Đặt vấn đề

Khoai môn sọ là một trong những cây nông nghiệp ngắn ngày có lịch sử trồng trọt lâu đời, được thuần hóa đầu tiên ở Ấn Độ và Đông Nam Á, sau đó phát triển ra khắp thế giới [1]. Ngoài là cây lương thực, khoai môn sọ còn là cây thực phẩm có hàm lượng dinh dưỡng cao, là cây trồng có khả năng chế biến thành nhiều loại sản phẩm khác nhau cũng như có giá trị dược liệu... [2]. Ở nước ta, khoai môn sọ là cây lấy củ quan trọng (chỉ đứng sau khoai tây, khoai lang và sắn) với diện tích trồng đạt khoảng 15.000 ha/năm [3], phân bố ở nhiều tỉnh/thành phố, đặc biệt là các tỉnh miền núi [4, 5].

Khoai môn sọ là cây thân củ (cây con được phát triển từ củ) nên củ con thường được dùng làm giống cho vụ sau. Với đặc điểm củ khoai môn sọ có hàm lượng dinh dưỡng cao nên gặp nhiều khó khăn trong bảo quản củ làm giống (củ dễ bị nhiễm mầm bệnh, gây hao tổn một lượng lớn giống) [6]. Hiện nay, phương pháp nuôi cấy *in vitro* được ứng dụng để trong một thời gian ngắn có thể tạo ra những cá thể giống nhau về kiểu gen, đồng đều về sinh trưởng, phát triển và sạch bệnh. Hơn nữa, phương pháp này còn có thể bảo quản lâu dài nguồn gen quý, hiếm, đặc biệt là với các đối tượng nhân giống vô tính và khó bảo quản như khoai môn sọ [4].

Trên thế giới, nhiều nhà khoa học đã nghiên cứu bảo quản *in vitro* khoai môn sọ. Trong đó, Zhou và cs (1999) [7] đã tạo được củ *in vitro* khi nuôi cấy cây khoai môn sọ trong môi trường cơ bản MS lỏng chứa saccharose ở nồng độ 8-10% và BAP 22-44 μM . Kết quả cho tỷ lệ chồi sống đạt 99-100%, khi đưa ra môi trường ngoài ống nghiệm và trong điều kiện nhiệt độ thấp (4°C) bảo quản được

10 tháng. Nghiên cứu của Hussain và cs (2006) [8] cho thấy, củ khoai môn *in vitro* trong môi trường nuôi cấy có bổ sung saccharose 8-10%, BAP 22 μM , α -NAA 0,6 μM và agar 0,8%, ở nhiệt độ 25°C có thể bảo quản lên đến 15 tháng. Cây *in vitro* khoai môn sọ được nuôi trong môi trường chứa saccharose 3% thời gian bảo quản được 6 tháng. Nghiên cứu của Bhuiyan và cs (2016) [9] cho biết, giống khoai môn Bilashi' (*Colocasia esculenta* var. *globulifera*) nuôi cấy trong môi trường MS cơ bản mô phân sinh và chồi bên có thể bảo quản tới 24 tháng mới phải cấy chuyển khi bổ sung vào môi trường lượng 4% manitol.

Ở Việt Nam, nghiên cứu nhân giống, lưu giữ *in vitro* khoai môn sọ đã được một số nhà khoa học quan tâm. Trần Thị Lệ và cs (2011) [6] đã nghiên cứu quy trình nhân giống *in vitro* hai giống khoai môn sọ Hà Tĩnh và Tây Nguyên, kết quả cho thấy, thời gian khử trùng thích hợp cho chồi khoai môn sọ là 12 phút với HgCl_2 0,2%, môi trường MS bổ sung BAP 3 mg/l thích hợp nhất cho quá trình tái sinh chồi từ mẫu và tạo đa chồi. Nghiên cứu lưu giữ *in vitro* nguồn gen khoai môn sọ bản địa thu thập từ Bắc Kạn của Vũ Ngọc Lan và cs (2015) [4] cho thấy, khi xử lý vật liệu khởi đầu trong HgCl_2 0,1% 7 phút + HgCl_2 0,1% 1 phút cho kết quả tỷ lệ mẫu nhiễm thấp nhất. Cây *in vitro* được nuôi trong môi trường cơ bản MS chứa agar 6 g/l và manitol 2 g/l cho kết quả bảo quản tốt nhất (quá trình sinh trưởng, phát triển diễn ra chậm, thời gian giữa các lần cấy chuyển dài và trạng thái sinh trưởng cây *in vitro* đảm bảo). Môi trường nuôi cấy cơ bản MS bổ sung saccharose 90 g/l, agar 6 g/l, thời gian chiếu sáng 16h/ngày cho kết quả tạo củ *in vitro* tốt nhất.

*Tác giả liên hệ: Email: xuanthuy@utb.edu.vn

Study on *in vitro* conservation of indigenous taro gene (*Colocasia esculenta* (L.) Schott)

Thi Xuan Thuy Vi*, Thi Nu Vu, Phayvong Duangneun,
Thi Mung Tran, Thi Hong Xuan Tran

Tay Bac University

Received 31 August 2020; accepted 15 October 2020

Abstract:

Currently, *in vitro* culture is used to produce a large number of plants that are genetically similar, uniform in growth, and disease-free in a short time. This method can preserve the precious and rare genetic resources in the long term, especially with asexual and difficult to preserve objects such as the taro plant. This study presents the results of the storage of native taro genome Cu Cang (Son La province) using *in vitro* culture techniques. The results showed that the optimal sterilization of root taro in the HgCl_2 0.2% was 11 minutes (9 minutes for the first time and 2 minutes for the second time), reaching 62.83% of clean samples and ensure shoots grow. *In vitro* taro plants preserved in 1/2 MS + agar 8 g/l + mannitol 1 g/l was the most suitable, plants grow slowly, transfer time was long, and still ensure shoots growth. *In vitro* Cu Cang taro shoots were cultured in 1/2 MS + saccharose 90 g/l + agar 8 g/l was the most suitable for tuber production, with the highest tuber weight reaching 1.58 g.

Keywords: Cu Cang taro, genetic resources, *in vitro* preservation, transplanted.

Classification number: 4.6

Các kết quả nghiên cứu nêu trên là cơ sở để chúng tôi tiến hành nghiên cứu bảo quản, lưu giữ *in vitro* khoai môn sọ bản địa *Colocasia esculenta* (L.) Schott thu thập từ Sơn La, gọi là khoai môn sọ Cù Cang - nguồn gen bản địa quý, có chất lượng cao, đã được đưa vào danh sách các loại nguồn gen cây trồng quý hiếm của Việt Nam hạn chế trao đổi với quốc tế, nhằm lưu giữ và cung cấp nguồn giống sạch bệnh phục vụ sản xuất ở quy mô lớn.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu

Củ con của cây khoai môn sọ Cù Cang (*Colocasia esculenta* (L.) Schott) được thu thập ở huyện Thuận Châu, tỉnh Sơn La thuộc nhóm khoai môn sọ [10] (hình 1).



Hình 1. Hình ảnh củ khoai môn sọ Cù Cang (Sơn La) sử dụng làm vật liệu nghiên cứu.

Phương pháp nghiên cứu

Nghiên cứu tạo vật liệu nuôi cấy khởi đầu: củ con khoai môn sọ Cù Cang không sâu bệnh được phơi nắng 3-4 ngày, sau đó rửa sạch dưới vòi nước chảy, rửa lại với xà phòng loãng trong 20 phút. Tiếp theo lắc trong cồn 70° trong 2 phút, rửa lại 3 lần với nước cất vô trùng. Sử dụng dung dịch HgCl_2 0,2% để thẩm dò khả năng khử trùng mẫu củ ở các khoảng thời gian khác nhau (5-16 phút), sau đó nuôi cấy trên môi trường MS [11]. Thí nghiệm được tiến hành với 30 bình/công thức, 1 mẫu cây/bình. Tiến hành theo dõi các chỉ tiêu: tỷ lệ mẫu nhiễm (%), tỷ lệ mẫu sống tạo cây (%), tỷ lệ mẫu chết (%).

Khử trùng kép: mẫu được xử lý trong dung dịch HgCl_2 0,2% trong thời gian xác định, được rửa lại nhiều lần trong nước cất vô trùng, sau đó tiếp tục xử lý mẫu trong dung dịch HgCl_2 0,2% lần 2.

Nghiên cứu ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến tốc độ sinh trưởng cây khoai môn sọ Cù Cang *in vitro*: chồi khoai môn sọ *in vitro* được nuôi cấy trên 3 môi trường tương ứng với 3 công thức: môi trường MS, môi trường 1/2 MS và môi trường 1/4 MS, các môi trường bổ sung agar 8 g/l. Thí nghiệm tiến hành với 30 bình/công thức, 1 cây/bình, các chỉ tiêu theo dõi gồm: thời gian bật mầm (ngày), số chồi/cây, chất lượng chồi, chiều cao cây (cm), số lượng lá (lá/cây).

Nghiên cứu ảnh hưởng của hàm lượng saccharose đến sinh trưởng của cây khoai môn sọ Cù Cang *in vitro*: chồi khoai môn sọ *in vitro* được nuôi cấy trong môi trường 1/2 MS + agar 8 g/l và bổ sung saccharose với 5 công thức tương ứng với các nồng độ (2, 3, 4, 5 và 6%). Thí nghiệm tiến hành với 30 bình/công thức, 1 cây/bình, các chỉ tiêu theo dõi: thời gian bật mầm (ngày), số chồi/cây, chất lượng chồi, chiều cao cây (cm), số lượng lá (lá/cây).

Nghiên cứu ảnh hưởng của hàm lượng mannitol đến sinh trưởng của cây khoai môn sọ Cù Cang *in vitro*: chồi khoai môn sọ *in vitro* được nuôi cấy trong môi trường 1/2 MS + agar 8 g/l bổ sung mannitol với các nồng độ: 0, 1, 2 và 3% tương ứng với các công thức thí nghiệm. Thí nghiệm tiến hành với 30 bình/công thức, 1 cây/bình, các chỉ tiêu theo dõi gồm: thời gian bật mầm (ngày), số chồi/cây, chất lượng chồi, chiều cao cây (cm), số lượng lá (lá/cây).

Nghiên cứu ảnh hưởng của hàm lượng saccharose đến khả năng tạo củ khoai môn sọ Cù Cang *in vitro*: cây khoai môn sọ *in vitro* được cấy trên môi trường 1/2 MS + agar 8 g/l + α -NAA 0,5 mg/l, sau 4 tuần nuôi cấy khi cây *in vitro* có bộ rễ đầy đủ bổ sung dung dịch saccharose (vô trùng) với các nồng độ: 0, 30, 60, 90, 120 và 150 g/l. Thí nghiệm tiến hành 10 bình/công thức, 6 cây/bình, chỉ tiêu theo dõi gồm: tỷ lệ mẫu tạo củ (%), khối lượng củ (g).

Điều kiện nuôi cấy: các mẫu nghiên cứu được nuôi trong điều kiện thời gian chiếu sáng 12h/ngày, ánh sáng có cường độ 2.000-2.500 lux, nhiệt độ phòng nuôi 22°C, pH môi trường nuôi cấy 5,8.

Kết quả và thảo luận

Khử trùng mẫu vật, tạo vật liệu khởi đầu *in vitro*

Khử trùng tạo vật liệu khởi đầu là giai đoạn rất quan trọng, quyết định đến thành công trong nuôi cấy *in vitro*. Thành công của giai đoạn khử trùng vật liệu ban đầu phụ thuộc vào đối tượng nghiên cứu, phương pháp lấy mẫu, giai đoạn lấy mẫu, chất khử trùng và thời gian khử trùng... Hơn nữa, ở bước khử trùng mẫu vật yêu cầu không chỉ đạt lượng mẫu nhiễm thấp mà còn cần tỷ lệ mẫu sống cao và sinh trưởng tốt [12]. Củ khoai môn sọ nằm dưới mặt đất, các mắt củ không được bảo vệ bởi các vảy đủ lớn, vỏ củ xù xì và độ nhớt lớn nên giai đoạn khử trùng dễ tạo vật liệu ban đầu gặp nhiều bất lợi, dễ nhiễm khuẩn, nấm [13] (tỷ lệ mẫu nhiễm có thể lên đến 60-70%) [14, 15].

Sử dụng $HgCl_2$ 0,2% để khử trùng củ con khoai môn sọ Cụ Cang ở các thời gian khác nhau. Kết quả sau 4 tuần nuôi cấy trên môi trường MS được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Ảnh hưởng của thời gian xử lý $HgCl_2$ 0,2% đến hiệu quả khử trùng mẫu củ con khoai môn sọ Cụ Cang sau 4 tuần nuôi cấy.

Thời gian khử trùng	Tỷ lệ mẫu nhiễm (%)	Tỷ lệ mẫu sạch (%)	
		Tỷ lệ mẫu sống tạo cây	Tỷ lệ mẫu chết
5 phút	76,46 ^a	22,32 ^a	1,22 ^a
8 phút	63,17 ^b	27,12 ^b	9,71 ^b
11 phút	40,06 ^c	40,33 ^c	19,61 ^c
Lần 1 trong 9 phút, lần 2 trong 2 phút (kép)	26,98 ^d	62,83 ^d	10,19 ^b
Lần 1 trong 11 phút, lần 2 trong 3 phút (kép)	12,28 ^e	58,64 ^e	29,08 ^d

Các chữ cái khác nhau trong cột biểu thị sự sai khác có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$ (Duncan's test).

Kết quả bảng 1 cho thấy, khi tăng thời gian ngâm mẫu từ 5 phút lên 14 phút (kép) thì lượng mẫu nhiễm giảm rõ rệt (từ 76,46 xuống còn 12,28%), điều này cho thấy $HgCl_2$ 0,2% có khả năng khử trùng mẫu tốt. Tuy nhiên, khi xử lý mẫu trong thời gian dài sẽ ảnh hưởng đến sức sống của mẫu, tỷ lệ mẫu chết khi khử trùng trong 5 phút là 1,22% nhưng khi kéo dài thời gian khử trùng lên 14 phút (kép) thì tỷ lệ mẫu chết tăng lên 29,08%. Khi khử trùng mẫu ở 11 phút đơn và 11 phút kép (9 phút lần 1 và 2 phút lần 2) thì tỷ lệ mẫu nhiễm lần lượt là 40,06 và 26,98%, tỷ lệ cây sống cũng khác nhau rõ rệt ở 11 phút đơn là 40,33%, trong khi đó ở 11 phút kép tăng lên 62,83%. Có thể thấy, dùng $HgCl_2$ 0,2% khử trùng kép có hiệu quả hơn hẳn khi khử trùng 1 lần, ít ảnh hưởng đến sức sống của mẫu. Khi tăng thời gian xử lý lên 14 phút (11 phút lần 1 và 3 phút lần 2), tỷ lệ mẫu nhiễm còn 12,28% nhưng tỷ lệ mẫu sống chỉ còn 58,64% và tỷ lệ mẫu chết sau 4 tuần nuôi cấy là 29,08%. Như vậy, khử trùng củ khoai môn sọ Cụ Cang bằng $HgCl_2$ 0,2% ở 11 phút kép (9 phút lần 1 và 2 phút lần 2) cho tỷ lệ mẫu nhiễm thấp, tỷ lệ sống cao và sinh trưởng tốt nhất.

Lưu giữ, bảo quản *in vitro* nguồn gen cây khoai môn sọ Cụ Cang

Trong lưu giữ, bảo quản nguồn gen *in vitro*, mục tiêu không

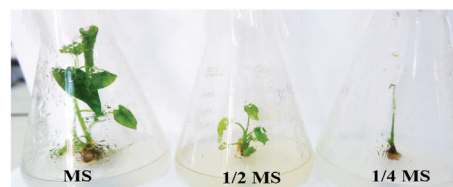
phải là nhân lên với lượng lớn cây con, bởi cây chuyển liên tục sẽ tăng chi phí, cây lại nhanh già hóa sinh lý. Mục tiêu của bảo quản, lưu giữ mẫu cây *in vitro* là làm chậm quá trình sinh trưởng của mẫu nhưng vẫn đảm bảo được độ sinh trưởng của cây [15]. Chính vì vậy, các môi trường dinh dưỡng khác nhau, các chất làm chậm sinh trưởng của cây *in vitro* đã được sử dụng trong nghiên cứu này.

Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến sinh trưởng cây khoai môn sọ Cụ Cang *in vitro*: để lựa chọn được môi trường nuôi cấy mà cây *in vitro* vừa sinh trưởng chậm nhưng vẫn đảm bảo chồi có khả năng tái sinh, các môi trường MS, 1/2 MS và 1/4 MS được sử dụng, kết quả được trình bày ở bảng 2 và hình 2.

Bảng 2. Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến khả năng sinh trưởng của cây khoai môn sọ Cụ Cang *in vitro* sau 8 tuần nuôi cấy.

Môi trường	Thời gian bật mầm (ngày)	Số chồi/cây (chồi)	Trạng thái chồi	Chiều cao cây (cm)	Số lá/cây (lá)
MS	6,12 ^a	3,16 ^a	***	12,08 ^a	6,73 ^a
1/2 MS	8,32 ^b	1,83 ^b	**	4,98 ^b	3,68 ^b
1/4 MS	11,46 ^c	0,91 ^c	*	4,12 ^c	1,02 ^c

***: chồi sinh trưởng tốt, mập, bẹ lá màu xanh, lá màu xanh thẫm, phiến lá lớn; **: chồi sinh trưởng trung bình, màu xanh, bẹ lá màu xanh, lá màu xanh, phiến lá trung bình; *: chồi sinh trưởng kém, nhỏ màu đen, bẹ lá màu trắng, lá màu vàng, phiến lá rất nhỏ. Các chữ cái khác nhau trong cột biểu thị sự sai khác có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$ (Duncan's test).



Hình 2. Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến sinh trưởng cây khoai môn sọ Cụ Cang *in vitro*.

Cây khoai môn sọ Cụ Cang *in vitro* được nuôi cấy ở môi trường 1/2 và 1/4 MS sinh trưởng chậm hơn so với môi trường MS (bảng 2 và hình 2). Cây *in vitro* nuôi trên môi trường MS sau 6,12 ngày đã bật mầm, sau 8 tuần nuôi cấy đạt 3,16 chồi/cây, chồi sinh trưởng tốt, mập, màu xanh, bẹ lá mập màu xanh, lá màu xanh thẫm, phiến lá to, cây cao 12,08 cm và có 6,73 lá/cây. Khi nuôi trên môi trường 1/2 MS cây bật mầm sau 8,32 ngày, sau 8 tuần nuôi cấy có 1,83 chồi/cây, chồi màu xanh, sinh trưởng trung bình, bẹ lá màu xanh, kích thước vừa phải, lá màu xanh, phiến lá trung bình, cây cao 4,98 cm (thấp hơn 2,42 lần so với cây trồng trên môi trường MS) và đạt 3,68 lá/cây. Cây nuôi trên môi trường 1/4 MS sau 11,46 ngày bật mầm (chậm hơn với cây nuôi trên môi trường MS 5,34 ngày), sau 8 tuần nuôi cấy có 0,91 chồi/cây, chồi sinh trưởng kém, màu đen, bẹ lá mảnh màu trắng, lá hơi vàng, phiến lá rất nhỏ, cây cao 4,12 cm và chỉ có 1,02 lá/cây (thấp hơn 6,59 lần so với cây nuôi trên môi trường MS và 3,61 lần so với cây nuôi trên môi trường 1/2 MS). Như vậy, môi trường 1/2 MS và 1/4 MS làm chậm quá trình sinh trưởng, tái sinh của cây khoai môn sọ Cụ Cang *in vitro*. Tuy nhiên, khi nuôi trên môi trường 1/4 MS do dinh dưỡng thấp nên cây sinh trưởng kém, chồi không đảm bảo chất lượng cho tái sinh sau bảo quản. Môi trường nuôi cấy 1/2 MS đã đáp ứng được mục đích là cây *in vitro* sinh trưởng chậm để tăng khoảng thời gian giữa các lần cấy chuyển, đồng thời chồi vẫn đảm bảo tái sinh cây sau

thời gian bảo quản. Do đó, các nghiên cứu tiếp theo chúng tôi sử dụng môi trường nuôi cấy 1/2 MS có bổ sung agar 8 g/l.

Ảnh hưởng của hàm lượng saccharose đến sinh trưởng cây khoai môn sọ Cù Cang *in vitro*: sinh trưởng của chồi khoai môn sọ Cù Cang *in vitro* được nuôi ở môi trường 1/2 MS + agar 8 g/l có bổ sung saccharose với các nồng độ 2, 3, 4, 5 và 6% tương ứng với 5 công thức thí nghiệm. Bảng 3 và hình 3 thể hiện kết quả sau 8 tuần nuôi cấy.

Bảng 3. Ảnh hưởng của hàm lượng saccharose đến khả năng sinh trưởng của cây khoai môn sọ Cù Cang *in vitro* sau 8 tuần nuôi cấy.

Hàm lượng saccharose (%)	Thời gian bắt mầm (ngày)	Số chồi/cây (chồi)	Trạng thái chồi	Chiều cao cây (cm)	Số lá/cây (lá)
2	8,26 ^a	1,92 ^a	***	6,17 ^a	2,98 ^a
3	8,58 ^a	1,83 ^a	***	5,86 ^a	3,01 ^b
4	10,42 ^b	1,64 ^b	**	4,12 ^b	2,87 ^{ab}
5	11,76 ^c	1,45 ^c	**	4,44 ^b	2,77 ^{ab}
6	13,52 ^d	1,01 ^d	*	3,43 ^c	2,65 ^c

***: chồi sinh trưởng trung bình, màu xanh, bẹ lá màu xanh, lá màu xanh, phiến lá trung bình; **: chồi sinh trưởng chậm, màu xanh nhạt, bẹ lá màu xanh nhạt, lá màu xanh, phiến lá trung bình; *: chồi sinh trưởng chậm, màu xanh nhạt, bẹ lá màu xanh nhạt, lá màu xanh nhạt, phiến lá nhỏ. Các chữ cái khác nhau trong cột biểu thị sự sai khác có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$ (Duncan's test).

Saccharose là nguồn carbon hữu cơ được sử dụng phổ biến trong nuôi cấy *in vitro*. Nhiều nghiên cứu cho thấy, nồng độ saccharose trong môi trường nuôi cấy thích hợp cho đa số các loại cây trồng nằm trong khoảng 2-3% [2, 4, 8]. Kết quả ở bảng 3 và hình 3 cho thấy, hàm lượng saccharose trong môi trường nuôi cấy có ảnh hưởng đến sinh trưởng, phát triển của khoai môn sọ Cù Cang *in vitro*. Trong môi trường nuôi cấy có nồng độ saccharose cao thì sinh trưởng của khoai môn sọ Cù Cang *in vitro* có xu hướng giảm, hàm lượng saccharose càng tăng thì càng ức chế sự sinh trưởng của cây. Ở nồng độ saccharose 2 và 3% các chỉ số sinh trưởng của cây *in vitro* không có sự sai khác về mặt thống kê với độ tin cậy 95%. Khi hàm lượng saccharose tăng lên, các chỉ số sinh trưởng có xu hướng giảm. Môi trường nuôi cấy chứa saccharose 6% thì cây *in vitro* sinh trưởng chậm một cách rõ rệt, cây bắt mầm sau 13,52 ngày (chậm hơn với nồng độ 2% là 5,26 ngày), chồi sinh trưởng chậm, lá màu xanh nhạt và phiến lá nhỏ, chiều cao cây đạt 3,43 cm, giảm 1,80 lần so với chiều cao cây nuôi trên môi trường saccharose 2%.



Hình 3. Ảnh hưởng của hàm lượng saccharose đến sinh trưởng cây khoai môn sọ Cù Cang *in vitro*.

Như vậy, môi trường nuôi cấy chứa hàm lượng saccharose trên 3% đều làm cây khoai môn sọ Cù Cang *in vitro* sinh trưởng chậm, tuy nhiên cây lại bị già sinh lý sớm, nên khả năng tái sinh của cây sau thời gian bảo quản bị ảnh hưởng. Kết quả nghiên cứu của Vũ Ngọc Lan và cs (2015) [4] khi nghiên cứu lưu giữ *in vitro*

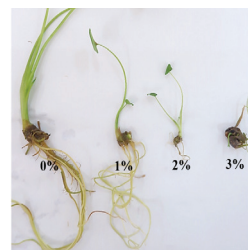
khoai môn bản địa Bắc Kạn cũng cho kết quả khi tăng hàm lượng saccharose trong môi trường nuôi cấy thì làm chậm sinh trưởng của cây *in vitro*, thậm chí khi hàm lượng đường tăng quá cao có thể làm cây trồng bị thoái hóa. Như vậy, sử dụng saccharose với hàm lượng cao để làm chậm sự sinh trưởng cây khoai môn sọ Cù Cang *in vitro* là không phù hợp.

Ảnh hưởng của hàm lượng mannitol đến sinh trưởng cây khoai môn sọ Cù Cang *in vitro*: mannitol là chất thường được sử dụng trong bảo quản, lưu giữ mẫu *in vitro* bởi nó có tác dụng kìm hãm sinh trưởng của mẫu cấy. Khi bổ sung mannitol vào môi trường nuôi cấy sẽ làm tăng áp suất thẩm thấu của môi trường, dẫn đến làm giảm khả năng hấp thu nước, chất dinh dưỡng từ môi trường của mẫu cấy và làm chậm quá trình phân chia của tế bào [14, 16]. Chính vì vậy, nghiên cứu tác động của nồng độ mannitol tới sinh trưởng cây khoai môn sọ Cù Cang *in vitro* đã được tiến hành với chồi *in vitro* được nuôi ở môi trường 1/2 MS + agar 8 g/l chứa mannitol với các nồng độ khác nhau. Kết quả sau 8 tuần nuôi cấy được trình bày ở bảng 4 và hình 4.

Bảng 4. Ảnh hưởng của hàm lượng mannitol đến khả năng sinh trưởng của cây khoai môn sọ Cù Cang *in vitro* sau 8 tuần nuôi cấy.

Hàm lượng mannitol (%)	Thời gian bắt mầm (ngày)	Số chồi/cây (chồi)	Trạng thái chồi	Chiều cao cây (cm)	Số lá/cây (lá)
0	7,96 ^a	2,09 ^a	***	6,67 ^a	3,58 ^a
1	8,58 ^b	1,53 ^b	***	3,16 ^a	2,21 ^b
2	10,42 ^c	1,04 ^c	**	2,92 ^b	1,87 ^{ab}
3	13,76 ^d	0,85 ^d	*	0,84 ^b	0,77 ^{ab}

***: chồi sinh trưởng trung bình, màu xanh, bẹ lá màu xanh, lá màu xanh, phiến lá trung bình; **: chồi sinh trưởng chậm, màu xanh nhạt, bẹ lá màu xanh nhạt, lá màu xanh nhạt, phiến lá nhỏ; *: chồi không sinh trưởng, màu đen, bẹ lá màu trắng, lá màu vàng, phiến lá rất nhỏ. Các chữ cái khác nhau trong cột biểu thị sự sai khác có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$ (Duncan's test).



Hình 4. Ảnh hưởng của hàm lượng mannitol đến sinh trưởng cây khoai môn sọ Cù Cang *in vitro*.

Kết quả bảng 4 và hình 4 cho thấy, môi trường nuôi cấy chứa mannitol có tác động lớn đến việc làm cây khoai môn sọ Cù Cang *in vitro* sinh trưởng chậm. Môi trường nuôi cấy bổ sung mannitol càng cao thì càng làm chậm quá trình sinh trưởng, phát triển của cây *in vitro*. Khi môi trường nuôi cấy chứa mannitol 1% thì chồi sinh trưởng trung bình, màu xanh, cao 3,16 cm với 2,21 lá/cây. Khi tăng nồng độ lên 2% thì chồi biểu hiện sự già hóa, sinh trưởng chậm, lá xanh nhạt và chiều cao đạt 2,92 cm. Khi nồng độ mannitol trong môi trường là 3% thì chồi thể hiện sự thoái hóa, chuyển sang màu đen và không sinh trưởng.

Như vậy, môi trường nuôi cấy chứa hàm lượng mannitol 1% là phù hợp nhất cho mục đích làm cây *in vitro* sinh trưởng chậm, chồi

vừa đảm bảo chất lượng cho tái sinh sau thời gian lưu giữ, có hệ số nhân đạt 1,53 chồi/cây, và đạt 2,21 lá/cây. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi thu được khác với Vũ Ngọc Lan và cs (2015) [4] nghiên cứu lưu giữ *in vitro* nguồn gen khoai môn bản địa Bắc Kạn cho kết quả môi trường MS bổ sung mannitol 2% là thích hợp nhất. Sự khác biệt này rất có thể liên quan đến hàm lượng dinh dưỡng của môi trường nuôi cấy, chúng tôi sử dụng môi trường 1/2 MS, trong khi Vũ Ngọc Lan và cs sử dụng môi trường MS đủ và giống khoai môn sọ khác nhau.

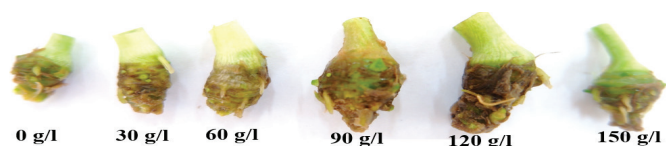
Tạo củ *in vitro* và lưu giữ, bảo quản nguồn gen cây khoai môn sọ Cù Cang

Trong lưu giữ bảo quản *in vitro* khoai môn sọ, tạo củ *in vitro* rất có ý nghĩa bởi củ *in vitro* có thể bảo quản được trong thời gian dài, thời gian bảo quản củ *in vitro* có thể lên đến 15 tháng, trong khi đó bảo quản chồi tối đa chỉ được 6 tháng [8]. Các nghiên cứu cho thấy, hàm lượng saccharose trong môi trường nuôi cấy có ảnh hưởng đến khả năng tạo củ *in vitro* khoai môn sọ [4]. Kết quả hình thành củ *in vitro* của khoai môn sọ Cù Cang (Sơn La) sau 8 tuần nuôi cấy trong môi trường chứa nồng độ saccharose khác nhau được trình bày ở bảng 5 và hình 5.

Bảng 5. Ảnh hưởng của hàm lượng saccharose đến hình thành củ *in vitro* của khoai môn sọ Cù Cang sau 8 tuần nuôi cấy.

Hàm lượng saccharose (g/l)	Tỷ lệ mẫu hình thành củ (%)	Khối lượng trung bình của củ (g)
0	69,85	0,26 ^a
30	100	0,59 ^b
60	100	0,89 ^c
90	100	1,58 ^d
120	100	1,46 ^c
150	100	0,92 ^c

Các chữ cái khác nhau trong cột biểu thị sự sai khác có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$ (Duncan's test).



Hình 5. Ảnh hưởng của hàm lượng saccharose đến hình thành củ *in vitro* của khoai môn sọ Cù Cang.

Kết quả hình 5 cho thấy, các chồi chỉ tạo củ cái, không tạo củ con (nhánh). Qua bảng 5 cho thấy, chồi *in vitro* khoai môn sọ được nuôi trong 1/2 MS số mẫu hình thành củ đạt 69,85%. Các môi trường bổ sung saccharose với các nồng độ khác nhau đều hình thành củ, cho thấy saccharose có ảnh hưởng rõ rệt lên sự tạo củ *in vitro* của khoai môn sọ. Khối lượng trung bình của củ khoai môn sọ *in vitro* tăng dần từ 0,26 đến 1,58 g khi nồng độ đường tăng dần từ 0 đến 90 g/l. Ở môi trường chứa saccharose 90 g/l khối lượng củ đạt 1,58 g, cao hơn khối lượng củ ở môi trường không bổ sung saccharose 6,08 lần. Khi tăng hàm lượng saccharose khối lượng củ *in vitro* có xu hướng giảm dần (từ 1,46 g ở hàm lượng 120 g/l giảm còn 0,92 g ở hàm lượng 150 g/l). Như vậy, khoai môn sọ Cù Cang được nuôi trong 1/2 MS bổ sung hàm lượng saccharose 90 g/l là môi trường thích hợp nhất để tạo củ *in vitro*.

Kết luận

Thời gian khử trùng củ con khoai môn sọ Cù Cang bằng $HgCl_2$ 0,2% phù hợp là 11 phút kép (9 phút lần 1 và 2 phút lần 2), lượng mẫu sạch và đảm bảo chồi sinh trưởng đạt 62,83%. Lưu giữ, bảo quản củ *in vitro* khoai môn sọ Cù Cang trong môi trường 1/2 MS + agar 8 g/l + mannitol 1 g/l là thích hợp, vừa làm cây sinh trưởng chậm, tăng thời gian giữa các lần cấy chuyển, đồng thời vẫn đảm bảo khả năng tái sinh chồi sau 11 tháng bảo quản. Môi trường thích hợp nhất để tạo củ *in vitro* khoai môn sọ Cù Cang là 1/2 MS + saccharose 90 g/l + agar 8 g/l, củ *in vitro* có khối lượng cao nhất đạt 1,58 g.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Ramanatha, V. Rao, et al. (2010), *The global diversity of taro: Enthnobotany and conservation*, Biodiversity International.
- [2] S. Lakhanpaul, et al. (2003), "Analysis of genetic diversity in Indian taro [*Colocasia esculenta* (L.) Schott] using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers", *Genetic Resources and Crop Evolution*, **50**, pp.603-609.
- [3] Nguyen Thi Ngoc Hue, Nguyen Van Viet, Vu Linh Chi, M.S. Prana (2010), *The global diversity of taro: Enthnobotany and conservation*, Biodiversity International.
- [4] Vũ Ngọc Lan, Nguyễn Thị Phương Dung, Nguyễn Văn Phú (2015), "Lưu giữ *in vitro* nguồn gen khoai môn bản địa (*Colocasia esculenta* (L.) Schott)", *Tạp chí Khoa học và Phát triển*, **13(4)**, tr.623-633.
- [5] Đặng Thị Thanh Mai, Nguyễn Xuân Việt (2011), "Nghiên cứu sự tạo củ *in vitro* và sinh trưởng ở cây trồng từ củ *in vitro* của một số giống khoai môn sọ", *Tạp chí Khoa học, Trường Đại học Sư phạm Hà Nội*, **3**, tr.51-58.
- [6] Trần Thị Lệ, Trần Thị Triệu Hà (2011), "Nghiên cứu quy trình nhân giống *in vitro* một số giống khoai sọ (*Colocasia antiquorum*)", *Tạp chí Khoa học, Đại học Huế*, **67**, tr.41-50.
- [7] Su P. Zhou, et al. (1999), "Induction and characterization of *in vitro* corms of diploid - taro", *Plant Cell, Tissue and Organ. Culture*, **57**, pp.173-178.
- [8] Z. Hussain, R.K. Tyagi (2006), "In vitro corm induction and genetic stability of regenerate plants in taro (*Colocasia esculenta* (L.) Schott)", *Indian of Journal Biotechnology*, **5**, pp.535-542.
- [9] M.K.R. Bhuiyan, M.J. Hossain, M.M. Haque (2016), "In vitro conservation of taro (*Colocasia esculenta* var. *globulifera*) as influenced by mannitol", *Bangladesh J. Agril. Res.*, **41**, pp.67-74.
- [10] Vũ Thị Nụ (2012), "Nghiên cứu ảnh hưởng của một số biện pháp kỹ thuật đến sinh trưởng, năng suất khoai sọ Cù Cang tại Thuận Châu, Sơn La", *Tạp chí Khoa học, Trường Đại học Tây Bắc*, **7**, tr.35-41.
- [11] T. Murashige, F. Skoog (1962), "A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures", *Physiol. Plant*, **15**, pp.473-497.
- [12] Duong Tan Nhut, Nguyen Thi Dieu Huong, Dinh Van Khiem (2003), *Study on tissue culture and its correlative factor of Colocasia esculenta*, Horticulture Digest.
- [13] M.B. Evelyn, et al. (2017), "Application of *in vitro* micropropagation technique for sustainable production of four local taro cultivars [*Colocasia esculenta* (L.) Schott] in Cameroon African", *Journal of Biotechnology*, **16**, pp.1638-1645.
- [14] J. Gopal, Nain Sukh Chauhan (2010), "Slow growth in vitro conservation of potato germplasm at low temperature", *Potato Research*, **53**, pp.141-149.
- [15] Vũ Ngọc Lan, Nguyễn Thị Lý Anh (2013), "Nhân giống *in vitro* loài lan bản địa *Dendrobium nobile* Lindl", *Tạp chí Khoa học và Phát triển*, **11(7)**, tr.917-925.
- [16] R.L. Jarret, N. Gawel (1991), "Chemical and environmental growth regulation of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) *in vitro*", *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, **2**, pp.153-160.

Tổng mục lục

TT	Tác giả	Tên bài	Số	Trang
Khoa học Tự nhiên				
1	Bùi Công Thành, Nguyễn Quang Uy...	Một số bộ dữ liệu kiểm thử phổ biến cho phát hiện xâm nhập mạng và đặc tính phân cụm.	1	1
2	Đoàn Hồng Quang, Lê Hồng Minh...	Nhận dạng khuôn mặt trong video bằng mạng nơ ron tích chập.	1	8
3	Vũ Mạnh Thuần, Doãn Hà Thắng...	Tính chất điện hóa của điện cực Fe ₂ O ₃ /Au trong dung dịch kiềm.	1	13
4	Lê Ngọc Thanh, Nguyễn Nghĩa Hùng...	Đánh giá hiện trạng hình thái lòng dẫn một số đoạn sông Tiền và sông Vàm Nao bằng tài liệu địa chấn nông phân giải cao.	1	17
5	Lê Tuấn Anh, Nguyễn Thị Uyên...	Biến đổi gen và cấu trúc protein fiber của virus HAdV-3 gây bệnh đau mắt đỏ ở Việt Nam.	1	24
6	Hoàng Ngọc Thảo, Ngô Đắc Chứng...	Thành phần loài lưỡng cư, bò sát vùng Bắc Trung Bộ.	1	28
7	Trương Thúy Hằng, Nguyễn Thị Thanh Chi	Phổ ¹ H NMR của dây phức chất [PtCl(eugenol-1H)(amin)] (amin: pyridin, 4-Me-pyridin, quinolin, p-cloanilin, p-toluidin).	3	1
8	Nguyễn Thị Quỳnh, Nguyễn Thúy Ngọc...	Hydrocacbon thơm đa vòng (PAHs) trong một số sản phẩm cà phê rang, cà phê hòa tan ở Việt Nam: Hàm lượng và đánh giá rủi ro đến sức khỏe con người.	3	6
9	Hà Quang Hải, Hoàng Thị Phương Chi	Tài liệu mới về địa tầng và địa mạo đảo Lý Sơn.	3	13
10	Phan Thị Tuyết Mai	Nghiên cứu điều kiện thích hợp cho quá trình phân hủy yếm khí sinh biogas từ phụ phẩm lá dứa.	3	20
11	Hà Danh Đức	Khảo sát sự phân hủy toluene và chlorotoluene bởi vi khuẩn <i>Comamonas testosterone</i> KT5 cố định trong alginate.	6	1
12	Lưu Thế Anh, Hoàng Thị Thu Duyên...	Đánh giá lượng phát thải khí CH ₄ trong canh tác lúa nước tại tỉnh Nam Định.	6	7
13	Lê Văn Thọ, Đặng Văn Sơn...	Thành phần loài và phân bố của các loài cua (Crustacea: Decapoda: Brachyura) ở rừng ngập mặn huyện Cù Lao Dung, Sóc Trăng.	6	13
14	Bùi Thị Thanh Phương, Nguyễn Phương Lan...	Ảnh hưởng của nano bạc đến khả năng nhân giống in vitro cây Trầu tiên (<i>Asarum glabrum</i> Merr.).	6	19
15	Nguyễn Thị Thắm, Nguyễn Văn Sử...	Phân chia địa tầng Pliocen - Đệ tứ ở phía đông thềm lục địa Việt Nam trên cơ sở tài liệu trùng lỗ và tảo vôi.	8	1
16	Nguyễn Văn Dũng, Trịnh Đình Huân...	Đánh giá sự biến đổi thành phần phóng xạ môi trường trong hoạt động khai thác, chế biến quặng đồng khu mỏ Sin Quyền, tỉnh Lào Cai.	8	8
17	Bùi Văn Bắc	Vai trò của rừng thứ sinh trong việc bảo tồn đa dạng quần xã bọ hung ở hệ sinh thái núi đá vôi Việt Nam.	8	13
18	Lê Quốc Phong, Nguyễn Hoàng Đăng Khoa...	Đánh giá hoạt tính kháng viêm, kháng khuẩn và ức chế enzyme α -glucosidase <i>in vitro</i> của nấm <i>Ophiocordyceps sinensis</i> giàu selen.	8	19
19	Lê Đức Mạnh, Đinh Thị Vân...	Biến tính vải sợi cotton bằng các copolyme alkylmethacrylate siêu kỵ nước.	11	1
20	Đặng Kim Tại, Nguyễn Thị Mộng Tuyền	Nghiên cứu khả năng hấp phụ Cu ²⁺ trong môi trường nước của composite polyaniline-gương sen.	11	7
21	Trần Hậu Khanh, Phạm Hồng Ban...	Thành phần hóa học tinh dầu loài Tiểu sim (<i>Rhodamnia dumetorum</i> (Poir.) Merr. & Perry) và Trâm tích lan (<i>Syzygium zeylanicum</i> (L.) DC.).	11	12
22	Huỳnh Thị Lan Hương, Nguyễn Xuân Hiến...	Đánh giá rủi ro do hạn hán cho khu vực Trung Trung Bộ.	11	17
23	Lê Anh Tuấn	Phân tích diễn biến lũ lụt và khô hạn ở Đồng bằng sông Cửu Long trong 20 năm gần đây.	11	22
24	Nguyễn Đức Thành, Nguyễn Thế Quyết...	Đặc điểm sinh học và định danh chủng vi khuẩn <i>Bacillus altitudinis</i> T1008 phân lập từ đất nhiễm mặn.	11	28
25	Nguyễn Thị Minh Khanh, Nguyễn Thị Trang...	Nghiên cứu khả năng sinh tổng hợp protease của một số chủng nấm mốc thuộc chi <i>Aspergillus</i> .	11	33
Khoa học Kỹ thuật và Công nghệ				
26	Nguyễn Ngọc Linh, Nguyễn Ngọc Tân...	Nghiên cứu lý thuyết và thực nghiệm xác định mô men uốn giới hạn của cấu kiện dầm BTCT theo mô hình biến dạng phi tuyến của bê tông.	1	36
27	Lê Thanh Cao, Huỳnh Văn Phương...	Phát triển phương pháp năng lượng biến dạng để chẩn đoán hư hỏng trong kết cấu tấm.	1	42
28	Nguyễn Như Thanh, Đào Tuấn Anh...	Nghiên cứu ứng dụng n-butylamin tái chế chất thải rắn thuộc da chứa crôm.	1	46
29	Nguyễn Kim Diện, Phạm Ngọc Sinh...	Nghiên cứu chế tạo sợi polystyrene bằng phương pháp kéo sợi ly tâm (centrifugal spinning).	1	50
30	La Lý Nguyên, Lâm Hoàng Hào...	Ứng dụng phương pháp tán xạ tia X góc nhỏ đánh giá ảnh hưởng thẳng đứng mật độ điện từ đến các cấu trúc vi mô của màng dẫn proton trong pin nhiên liệu.	1	54
31	Huỳnh Ngọc Minh, Huỳnh Thị Hồng Hoa...	Ảnh hưởng của sự bổ sung hydroxyapatite đến các tính chất của xi măng glass ionomer.	1	59
32	Đặng Kim Tại, Vũ Xuân Hồng	Điều chế tro trấu biến tính ứng dụng xử lý Cu ²⁺ trong nước.	1	66
33	Phạm Việt Đức, Lê Đức...	Nghiên cứu khả năng xử lý chất 2,4-D và 2,4,5-T bằng Fe ⁰ nano trong đất nhiễm da cam/dioxin tại sân bay Biên Hòa	1	70
34	Lưu Ngọc Lâm, Nguyễn Quang Phúc	Phân tích phương pháp thiết kế hỗn hợp bê tông nhựa theo Superpave và một số kết quả nghiên cứu thực nghiệm.	3	26
35	Nguyễn Quốc Hưng, Lê Đại Hiệp...	Nghiên cứu phát triển hệ thống ly hợp lưu chất điện - từ biến dùng điều khiển tốc độ tải được truyền động bằng động cơ điện.	3	31

36	Hà Lan Anh, Đặng Đức Nhận...	Nghiên cứu phương pháp phân tích đồng vị bền trong nước quá tảo sử dụng hệ phân tích phổ kế lazer để hỗ trợ xác thực nguồn gốc địa lý của sản phẩm.	3	36
37	Nguyễn Thái Hoàng, Nguyễn Thị Thùy Hương...	Chế tạo và khảo sát độ bền nhiệt của pin mặt trời chất màu nhạy quang.	3	42
38	Nguyễn Ngọc Phong, Đỗ Chí Linh...	Hiệu suất của bảo vệ catot bằng dòng điện ngoài cho công trình kim loại ngầm trong môi trường đất.	3	48
39	Huỳnh Xuân Phong, Nguyễn Minh Tiến...	Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn acetic chịu nhiệt từ hạt ca cao lên men.	3	54
40	Phạm Tuấn Đạt, Nguyễn Phương...	Nghiên cứu một số giải pháp kỹ thuật tách các hợp chất gây mùi, vị không mong muốn trong nước dừa già để sản xuất nước dừa ở quy mô công nghiệp.	3	60
41	Hà Mạnh Hùng, Trương Việt Hùng	Bài toán tối ưu kết cấu dàn phẳng sử dụng phân tích trực tiếp có xét đến điều kiện ràng buộc về tần số dao động riêng.	6	24
42	Vũ Bá Thao, Nguyễn Thành Công...	Nghiên cứu khả năng thu nước của ống lọc và bê tông rỗng dùng trong giếng khai thác nước ngầm bằng mô hình thí nghiệm vật lý.	6	29
43	Trần Thị Ngọc Mai	So sánh quá trình thu nhận cao chiết rong nâu <i>Sargassum</i> bằng các phương pháp chiết khác nhau và đánh giá khả năng kháng oxy hóa bằng phương pháp DPPH.	6	34
44	Đinh Ngọc Thức, Lê Nguyễn Thành	Phân lập một số hợp chất từ dịch chiết ethyl acetat của lá cây Dây lữa ít gân (<i>Rourea oligophlebia</i> Merr.).	6	39
45	Nguyễn Thị Kiều Duyên, Lê Phạm Phương Nam...	Tổng hợp và khảo sát tính chất điện hóa của vật liệu điện cực dương $\text{Na}_x\text{Fe}_{2/3}\text{Mn}_{1/3}\text{O}_2$ sử dụng cho pin Na-ion.	6	43
46	Đào Đình Thuần, Nguyễn Văn Dũng	Nghiên cứu chế tạo và ứng dụng vật liệu nano Fe_3O_4 pha tạp mangan (Mn) để xử lý nước ô nhiễm As(III).	6	48
47	Nguyễn Huy Thuần, Nguyễn Văn Giang...	Phân lập và tuyển chọn chủng vi khuẩn có khả năng khử màu nước thải dệt nhuộm.	6	52
48	Đào Thị Lương, Hà Thị Hằng...	Điều kiện nuôi thích hợp cho sinh trưởng của vi khuẩn probiotic <i>L. acidophilus</i> VTCC 12257 ở quy mô phòng thí nghiệm và thiết bị lên men 30 l.	6	58
49	Nguyễn Đình Kha, Nguyễn Huy Cung	Mô hình giải tích đáp ứng khí động học của kết cấu mảnh theo phương tác động của gió.	8	25
50	Hà Duy Khánh, Huỳnh Trung Hiếu	Quy trình áp dụng BIM trong giai đoạn tiền xây dựng của các dự án nhà công nghiệp tại TP Hồ Chí Minh.	8	30
51	Phan Thị Thu Hường, Hoàng Mai Hồng...	Nghiên cứu ảnh hưởng của tốc độ gió dàn ngưng đến hiệu quả năng lượng máy lạnh chiller.	8	35
52	Vũ Xuân Hoàn, Ngô Thúy Phương...	Nghiên cứu ảnh hưởng của tính chất nguyên liệu đến hiệu quả tăng propylen của phụ gia ZSM-5 trong quá trình xúc tác cracking tăng sôi.	8	39
53	Nguyễn Thị Thanh Xuân, Nguyễn Đình Thống	Nghiên cứu khả năng phối trộn biodiesel tổng hợp từ dầu mỡ cá thải tại các cơ sở chế biến thủy sản vào nhiên liệu diesel thỏa mãn tiêu chuẩn Việt Nam.	8	43
54	Nguyễn Chí Thiện, La Ngọc Thùy Vân...	Kỹ thuật chẩn đoán sốt rét tự động bằng phân tích hình ảnh xét nghiệm máu.	8	48
55	Trương Hữu Trí	Sử dụng amoni hydroxit trong tổng hợp cacbon nano ống biến tính bằng nitơ.	8	55
56	Vũ Kim Dung, Phan Thị Hòa...	Nghiên cứu sản xuất nước ép dứa (<i>Ananas comosus</i>) - Bì đao (<i>Benincasa hispida</i>) đóng chai.	8	59
57	Nguyễn Đức Mạnh, Hồ Sỹ An...	Nghiên cứu và ứng dụng học máy dự báo hệ số cô kết của đất yếu tại một số khu vực ven biển Bắc Bộ.	11	38
58	Nguyễn Trần Hải Minh, Nguyễn Cao Trí...	Hệ thống tự động giám sát và điều khiển trên nền công nghệ Wifi.	11	45
59	Phạm Đình Nam, Thái Hà Phi...	Nghiên cứu động lực học thiết bị thí nghiệm gôi cầu tải trọng 6.400 tấn.	11	49
60	Ngô Anh Vũ, Bùi Vũ Hùng	Đo lường kiểm tra biên dạng chi tiết phay CNC bằng ánh sáng cấu trúc.	11	54
61	Vũ Thanh Quang, Hà Ngọc Khoán...	Nghiên cứu điều chế được chất phóng xạ ^{18}F -Choline tại Bệnh viện Trung ương Quân đội 108.	11	59
62	Đường Quốc Lộ, Huỳnh Lê Thanh Nguyên...	Ảnh hưởng của phụ gia dẫn điện graphite đến khả năng điện hấp phụ NaCl của điện cực carbon hoạt tính.	11	64
63	Bùi Thị Hạnh, Trịnh Thị Hồng Vân...	Ứng dụng dịch chiết yến sào vào serum chống lão hóa.	11	69
Khoa học Y - Dược				
64	Nguyễn Quý Linh, Tạ Thành Đạt...	Nuôi cấy hoạt hóa, tăng sinh tế bào gamma delta T trên bệnh nhân ung thư phổi.	2	1
65	Nguyễn Đình Tào, Nguyễn Thị Thanh Nga...	Kết quả bước đầu ứng dụng quy trình chẩn đoán di truyền trước chuyển phôi bệnh teo cơ tủy tại Học viện Quân y.	2	6
66	Trần Huy Thịnh, Trần Văn Khánh...	Phân loại thể bệnh lâm sàng bệnh tăng sản thượng thận bẩm sinh thể thiếu 21-hydroxylase ở bệnh nhi điều trị tại Bệnh viện Nhi Trung ương.	2	10
67	Nguyễn Văn Tùng	Đánh giá kết quả cải thiện các triệu chứng thận âm hư và phục hồi vận động trên bệnh nhân đột quỵ sau 3 tháng của phác đồ phối hợp châm cứu cải tiến, vật lý trị liệu, Bỏ dương hoàn ngũ thang và Lục vị.	2	14
68	Nguyễn Thái Dương, Phạm Đình Duy	Tối ưu hóa các yếu tố ảnh hưởng đến việc điều chế tiểu phân nano poly-(D,L-lactid-co-glycolid) tại ethambutol.	2	22
69	Nguyễn Thị Xuân, Trần Thị Phương Thảo...	Nghiên cứu sự biểu hiện mRNA một số gen liên quan đến con đường <i>JAK/STAT</i> và biểu hiện viêm ở bệnh nhân ung thư hạch.	5	1
70	Hoàng Việt Hà, Bùi Nguyễn Hải Linh...	So sánh các kỹ thuật định danh vi khuẩn <i>B. pseudomallei</i> trong xét nghiệm chẩn đoán bệnh Whitmore.	5	6
71	Nguyễn Thanh Bình, Tống Xuân Thắng	Nghiên cứu đặc điểm lâm sàng, mô bệnh học u lympho ác tính không Hodgkin vùng đầu cổ.	5	13
72	Lê Văn Đoàn, Ngô Thái Hưng...	Kết quả phẫu thuật chuyển ngón chân phục hồi ngón tay cái.	5	17
73	Lê Quang Trí	Báo cáo kết quả 5 trường hợp phẫu thuật u tủy sống đoạn ngực - lưng tại Bệnh viện Quân y 7A.	5	22
74	Nguyễn Trọng Tuấn, Phạm Thị Sánh	Hoạt tính kháng oxy hóa của cao chiết ethanol thân rễ Ngải tím (<i>Kaempferia parviflora</i> Wall. Ex Baker), Ngải trắng (<i>Curcuma aromatica</i> Salisb.), Gừng giò (<i>Zingiber zerumbet</i> Sm.).	5	26
75	Dương Thanh Hiền, Phạm Cẩm Phương...	Phân tích đột biến EGFR trong mẫu mô phù paraffin và một số yếu tố liên quan ở bệnh nhân ung thư phổi không tế bào nhỏ trên 60 tuổi.	7	1

76	Phạm Ngọc Duy, Chế Quang Tuấn...	Đánh giá độ nhạy cảm phóng xạ của tế bào lympho máu ngoại vi người bằng kỹ thuật phân tích sai hình nhiễm sắc thể do tổn thương phân tử DNA ở pha G2.	7	6
77	Nguyễn Hữu Tuyển, Phan Thị Kim Ngân...	Chế tạo nano berberin và đánh giá khả năng kháng nấm <i>Candida albicans</i> .	7	12
78	Vũ Minh Hà, Nguyễn Thị Thanh Minh...	Phân tích thực trạng tuân thủ quy trình giám sát trị liệu áp dụng cho phác đồ methotrexat liều cao tại Bệnh viện K.	7	17
79	Nguyễn Thị Hồng Ngọc, Nguyễn Thị Hương Bình...	Phát triển kỹ thuật LAMP phát hiện sán lá gan lớn <i>Fasciola</i> spp.	7	23
80	Trần Thị Thanh Huyền, Đinh Đức Thọ...	Nghiên cứu ứng dụng kỹ thuật LAMP phát hiện nhanh vi khuẩn E. coli gây bệnh tiêu chảy ở người.	7	29
81	Lưu Thị Vũ Nga, Phạm Hồng Nhung...	Mối liên quan giữa mức độ kháng carbapenem và sự xuất hiện gen mã hóa carbapenemase của các chủng <i>Acinetobacter baumannii</i> phân lập tại một số bệnh viện.	7	35
82	Trần Quốc Đạt, Nguyễn Trọng Tuệ	Giảm biểu hiện gen <i>ABCC4</i> (ATP-binding cassette subfamily C) liên quan đến rối loạn tự kỷ trên mô hình ruồi giấm.	7	40
83	Trần Thị Phương Thảo, Bùi Kiều Trang...	Nghiên cứu nồng độ kháng nguyên CA125 ở bệnh nhân ung thư bạch cầu.	9	1
84	Hồ Viết Hiếu, Nguyễn Thị Hà...	Sử dụng kỹ thuật sinh học phân tử trong định danh loài bọ xít hút máu ở miền Trung Việt Nam.	9	5
85	Đoàn Thị Kim Phượng, Phan Văn Hường...	Phân tích mối liên quan giữa bạch cầu tinh dịch và một số chỉ số tinh dịch đồ ở nam giới vô sinh.	9	11
86	Hoàng Minh Ngân, Nguyễn Đình Tảo...	Đánh giá mối liên quan giữa hình thái phôi nang với bất thường nhiễm sắc thể.	9	15
87	Đào Việt Hằng, Lưu Thị Minh Huệ...	Đánh giá áp lực cơ thất hậu môn, ngưỡng cảm nhận trực tràng và phản xạ rặn ở những bệnh nhân có rối loạn về đại tiện.	9	20
88	Trần Thị Lệ Quyên, Nguyễn Thị Tinh...	Đánh giá kháng nguyên tái tổ hợp hemolysin co-regulated protein 1 (hcp1) trong chẩn đoán nhanh bệnh nhân nhiễm melioidosis (bệnh Whitmore) bằng kỹ thuật ELISA.	9	26
89	Tô Minh Quân, Trần Quang Diệu...	Đánh giá khả năng cảm ứng tăng sinh và bảo vệ da của astaxanthin trước những điều kiện bất lợi <i>in vitro</i> và <i>in vivo</i> .	12	1
90	Trần Thị Ngọc Huyền, Bùi Thị Thu Hà...	Đánh giá tính hướng đích của phức hệ nano curcumin gắn axit folic tới tế bào biểu hiện thụ thể folate	12	7
91	Nguyễn Thị Phương Trang, Vũ Thị Huệ...	Đánh giá khả năng phân loại của vùng gen ITS-rDNA đối với loài Hoàng liên ô rô lá dày (<i>Mahonia bealei</i> (Fortune) Pynaert) của Việt Nam.	12	12
92	Thái Hồng Đăng, Hoàng Xuân Lâm...	Xây dựng đặc điểm vi học và mã vạch ADN phục vụ định danh cây cam thảo Đá Bia.	12	18
Khoa học Nông nghiệp				
93	Nguyễn Thị Cẩm Tú, Nguyễn Thị Thùy Trang...	Đánh giá khả năng đối kháng của một số giống lúa (<i>Oryza sativa</i> L.) với 3 loại cây cỏ gây hại chính trong ruộng lúa ở Đồng bằng sông Cửu Long.	2	29
94	Vì Thị Xuân Thủy, Lò Thị Mai Thu...	Đánh giá khả năng chịu hạn ở giai đoạn nảy mầm của một số mẫu giống lúa cận địa phương thu thập tại tỉnh Sơn La.	2	35
95	Vũ Hoài Nam, Ma Thị Trang...	Nghiên cứu ảnh hưởng của môi trường nhân giống cấp 1 tới khả năng hình thành quả thể của nấm Đông trùng hạ thảo <i>Cordyceps militaris</i> .	2	40
96	Hoàng Thị Huyền Ngọc, Nguyễn Mạnh Hà...	Hàm lượng dinh dưỡng trong đất trồng cây ăn quả và cây dược liệu vùng tây Thanh Hóa - Nghệ An.	2	44
97	Nguyễn Đức Thành, Nguyễn Thế Quyết...	Phân lập, định danh chủng vi khuẩn chịu mặn, có hoạt tính phân giải lân vô cơ cho vùng Đồng bằng sông Cửu Long.	2	49
98	Trần Thị Thanh Thúy, Võ Công Thành...	Nghiên cứu chọn dòng lúa Nàng Tét mùa đột biến theo hướng ngắn ngày, chất lượng và chống chịu mặn bằng phương pháp sốc nhiệt.	2	54
99	Phí Thị Cẩm Miện, Nguyễn Minh Đức...	Nghiên cứu chuyển gen tạo rễ tơ cây xáo tam phân (<i>Paramignya trimera</i>) thông qua <i>Agrobacterium rhizogenes</i> K599.	2	59
100	Phan Thị Phương Thảo, Trần Thị Thu Hằng...	Ảnh hưởng của giống và vùng địa lý đến chất lượng hạt chè và dầu hạt chè <i>Camellia sinensis</i> O. Kuntze ở Việt Nam.	5	32
101	Nguyễn Hữu Quân, Nguyễn Thị Ngọc Lan...	Hàm lượng dinh dưỡng và enzyme của một số giống đậu Nho nhe (<i>Vigna umbellata</i>) thu tại tỉnh Điện Biên, Sơn La và Lai Châu.	5	38
102	Vũ Đức Cảnh, Phạm Thùy Linh...	Khả năng sinh sản và ưu thế lai của vịt bố mẹ (CT12xCT34).	5	44
103	Nguyễn Thị Thanh Giang, Nguyễn Đăng Quân...	Hiệu quả ức chế virus gây bệnh Gumboro của interferon trên gà thực nghiệm.	5	48
104	Hoàng Kim Chi, Nguyễn Đình Tuấn...	Sàng lọc và nghiên cứu một số chủng vi khuẩn vùng rễ kích thích sinh trưởng phân lập từ cây nghệ vàng (<i>Curcuma longa</i> L.) tại Việt Nam.	5	54
105	Trần Văn Tuấn, Vũ Xuân Tạo	Xây dựng mô hình chuyển gen thông qua vi khuẩn <i>Agrobacterium tumefaciens</i> cho nấm dược liệu <i>Cordyceps militaris</i> G12.	5	60
106	Phạm Thị Mỹ Phương, Nguyễn Ngọc Quý...	Nghiên cứu khả năng nhân giống bằng hạt và sinh trưởng của cây Riềng ẩm (<i>Alpinia Zerumbet</i> (Pers.)) có nguồn gốc từ Nhật Bản.	7	46
107	Nguyễn Văn Thanh, Nguyễn Thị Thu Trang	Ảnh hưởng của tính chất đất đến sinh trưởng loài cây Tai chua (<i>Garcinia cowa</i> Roxb.) tại vùng Tây Bắc Việt Nam.	7	50
108	Trịnh Hồng Sơn, Phạm Duy Phẩm	Năng suất sinh sản và một số yếu tố ảnh hưởng đến năng suất sinh sản của lợn nái YVN1 và YVN2.	7	54
109	Phạm Tiến Dũng, Lê Thị Như...	Thiết kế cấu trúc Polycistronic tRNA-gRNA để ứng dụng công nghệ CRISPR/Cas9 nhằm nghiên cứu chức năng gen một số gen mã hóa motif ankyrin liên quan đến cấu trúc bông lúa.	7	59
110	Tạ Hồng Linh, Dương Xuân Tú...	Khảo nghiệm và hoàn thiện quy trình canh tác giống lúa thuần HD11 phục vụ mục tiêu phát triển lúa gạo quốc gia.	9	32
111	Nguyễn Duy Trinh, Trần Thu Hà...	Tuyển chọn các chủng giống nấm đùi gà <i>Pleurotus eryngii</i> (DC.:Fr.) mới nhập nội nuôi trồng trên giá thể phụ phẩm nông nghiệp.	9	36
112	Công Hồng Hạnh, Nguyễn Hồng Nhung...	Hoạt tính kháng nấm của nano bạc đối với một số nấm gây bệnh trên cây trồng trong điều kiện <i>in vitro</i> .	9	42
113	Nguyễn Văn Hà, Nguyễn Hoài Châu...	Hiệu quả ứng dụng bentonit Tam Bó (Lâm Đồng) để cải tạo đất cát trồng măng tây và ngô.	9	48

114	Nguyễn Thị Mỹ Dung, Nguyễn Phú Hòa...	Nghiên cứu đặc điểm hình thái quần thể cá Măng sữa <i>Chanos chanos</i> (Forsskal, 1977) ở vùng biển đông nam Việt Nam.	9	53
115	Nguyễn Khánh Vân, Quán Xuân Hữu...	Ảnh hưởng của việc loại bỏ zona pellucida đến hiệu quả tạo phôi lợn Ỉ nhân bản.	9	59
116	Phạm Thị Thu Hà, Nguyễn Thị Ngọc Trâm...	Hiệu quả của dịch chiết thực vật để kiểm soát nấm <i>Pyricularia grisea</i> gây bệnh đạo ôn trên lúa trong điều kiện <i>in vitro</i> .	12	24
117	Nguyễn Huy Thuần, Tạ Thị Huệ...	Ảnh hưởng của nhiệt độ, pH và môi trường nuôi cấy đến sinh trưởng phát triển của chủng nấm sò (<i>Pleurotus</i> sp.) FH và PN20.	12	30
118	Nguyễn Văn Lam, Lê Tất Khương...	Kết quả khảo nghiệm 5 giống bơ trong nước ở thời kỳ kinh doanh tại Mộc Châu - Sơn La.	12	35
119	Nguyễn An Ninh, Trịnh Đức Minh...	Xác định liều lượng bón đạm, lân và kali thích hợp cho giống bơ Booth 7 giai đoạn kinh doanh trên đất bazan tại tỉnh Đắk Lắk.	12	40
120	Nguyễn Khánh Vân, Quán Xuân Hữu...	Ảnh hưởng của phương pháp tiêm FSH (Follicle - stimulating hormone) đến hiệu quả gây rụng trứng nhiều trên dê sữa Saanen.	12	45
121	Dương Xuân Tú, Nguyễn Thị Hương...	Nghiên cứu liên kết trên toàn hệ gen (GWAS) về khả năng chuyển hóa đường từ rom rạ của cây lúa.	12	50
122	Vì Thị Xuân Thủy, Vũ Thị Nụ...	Nghiên cứu lưu giữ <i>in vitro</i> nguồn gen khoai môn sọ bản địa <i>Colocasia esculenta</i> (L.) Schott.	12	56
Khoa học Xã hội và Nhân văn				
123	Nguyễn Anh Thu, Nguyễn Thị Minh Phương...	Thương mại biên giới của Việt Nam: Thực trạng và một số vấn đề đặt ra.	4	1
124	Trần Huy Tùng	Kiểu hồi và hàm ý chính sách: Nhìn từ góc độ cung - cầu.	4	6
125	Phạm Tiến Mạnh	Ảnh hưởng của tuổi đời, trình độ học vấn thành viên hội đồng quản trị đến hiệu quả tài chính của doanh nghiệp ngành bất động sản.	4	11
126	Phạm Thị Hương Dịu	Lại bàn về xây dựng nông thôn mới ở nước ta.	4	17
127	Đặng Thị Thanh Lê, Nguyễn Kỳ Phùng...	Hiện trạng kiến thức, nhận thức, thái độ và hành vi của học sinh trung học phổ thông về tiêu dùng bền vững.	4	23
128	Nguyễn Vinh Hưng	Luật Thuế thu nhập cá nhân: Một số bất cập và kiến nghị.	4	28
129	Đoàn Triệu Long, Nguyễn Văn Quang	Thực trạng niềm tin chính trị ở khu vực Trung Bộ hiện nay.	4	31
130	La Thế Phúc, Vũ Tiến Đức...	Phát hiện di tích thời Đá mới ở Hồ Tre, Đắk Lắk.	4	37
131	Trần Nho Thìn	Vấn đề hội nhập quốc tế qua lịch sử phê bình Truyện Kiều.	4	43
132	Đỗ Hải Ninh	Những đổi mới của Nguyễn Minh Châu trong dòng chảy văn học đương đại.	4	48
133	Lê Thời Tân	Từ tự sự chính sử đến tiểu thuyết diễn nghĩa - Nhận diện hình tượng Gia Cát Khổng Minh.	4	54
134	Lê Thị Lan Anh, Nguyễn Thị Hương	Định hướng giá trị cho đội ngũ cán bộ, công chức, viên chức ở nước ta hiện nay - Lý luận và thực tiễn.	4	59
135	Đỗ Hồng Nhung, Trần Thị Diệu Hương	Phát triển bền vững thị trường mua bán nợ doanh nghiệp tại Việt Nam: Góc nhìn từ Công ty TNHH Mua bán nợ Việt Nam.	10	1
136	Phạm Tiến Mạnh	Tăng cường cơ hội phát hành trái phiếu doanh nghiệp - Nghiên cứu thực nghiệm tại các công ty niêm yết trên thị trường chứng khoán Việt Nam.	10	7
137	Nguyễn Mạnh Toàn, Huỳnh Thị Diệu Linh...	Tác động của Hiệp định đối tác kinh tế Việt Nam - Nhật Bản đến nền kinh tế Việt Nam.	10	12
138	Tạ Minh Thảo, Lê Hương Linh	Ứng dụng thương mại điện tử trong doanh nghiệp nhỏ và siêu nhỏ do nữ làm chủ tiếp cận với thị trường quốc tế ở Việt Nam.	10	18
139	Nguyễn Xuân Trinh, Trịnh Văn Tiến...	Bảo hiểm nuôi trồng thủy sản ở Trung Quốc và hàm ý chính sách đối với Việt Nam.	10	23
140	Vũ Quỳnh Nam	Nghiên cứu thực trạng và đề xuất giải pháp phát triển cây thạch đen phục vụ phát triển nông nghiệp, nông thôn tại huyện Thạch An, tỉnh Cao Bằng.	10	29
141	Nguyễn Tiến Dũng, Lê Văn Nam...	Mức độ định hướng thị trường các sản phẩm nông nghiệp của hộ nghèo khu vực miền núi: Nghiên cứu trường hợp tại tỉnh Kon Tum.	10	33
142	Lưu Minh Sang	Nghĩa vụ thuế thu nhập cá nhân của nhà đầu tư trên thị trường chứng khoán Việt Nam.	10	40
143	Trần Cao Thành	Quy định về bảo hộ nhãn hiệu phi truyền thống của một số quốc gia và kinh nghiệm cho Việt Nam.	10	44
144	Lê Tùng Sơn, Trần Hậu Ngọc	Chính sách thông tin khoa học và công nghệ phục vụ nghiên cứu khoa học và đổi mới ở Việt Nam.	10	50
145	Nguyễn Khắc Sử, Lê Xuân Hưng...	Diễn trình văn hóa tiền sử hàng C6-1 qua tư liệu khảo cổ học.	10	56
146	Lê Hương Thủy	Truyện ngắn Lưu Quang Vũ: Bước chuyển từ thơ đến kịch.	10	61

QUY ĐỊNH VỀ BÀI VIẾT ĐĂNG TẢI TRÊN TẠP CHÍ

Yêu cầu chung

Bài viết gửi đăng trên Tạp chí phải là bài viết nguyên thủy (chưa được công bố trước đó). Tác giả không được gửi đăng bài viết 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 viết gửi về Tòa soạn dưới dạng file mềm và bản in; có thể gửi trực tiếp đến Tạp chí (Phòng 507, số 113 Trần Duy Hưng, Cầu Giấy, Hà Nội) hoặc qua hòm thư điện tử, địa chỉ: khcnvn@most.gov.vn.

Tên bài báo

- Tên bài báo được viết bằng tiếng Việt và tiếng Anh, trên trang đầu của bài báo, 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.

Tóm tắt

Tóm tắt bằng tiếng Việt và tiếng Anh. Nêu được mục đích, phương pháp nghiên cứu chính, kết quả nghiên cứu và kết luận chủ yếu. Từ khoá bằng cả tiếng Việt và tiếng Anh theo thứ tự alphabet. Chỉ số phân loại (theo hướng dẫn).

Dẫn nhập/đặt vấn đề

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.

Đối tượng và phương pháp

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...

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.

Phần kết quả nghiên cứu chỉ trình bày các kết quả nghiên cứu của đề tài, không giải thích, so sánh và bàn luận.

Bàn luận

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.

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.

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 1 hoặc [2, 5, 7-9] với nhiều số chỉ dẫn.

Tác giả (Năm xuất bản), "Tên tài liệu được trích dẫn", *Tên nguồn*, **tập (số)**, pp<trang đầu-trang cuối>

Tác giả: là tác giả/các tác giả của tài liệu được tham khảo, trích dẫn.

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...

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).

Tập (số): dành cho nguồn trích là tạp chí, sách hoặc các xuất bản phẩm khác (phần này in đậm).

Trang đầu-trang cuối là số thứ tự các trang phản ánh nơi cư trú của tài liệu được trích dẫn trong tài liệu nguồn.

Chú ý: nếu có ≥ 2 tài liệu tham khảo do cùng 1 tác giả/nhóm tác giả, cùng năm công bố, thì các tài liệu tham khảo này cần được đánh dấu a, b... sau năm xuất bản (ví dụ: 1986a).

Nếu có một số tài liệu tham khảo trong cùng 1 bài báo được trích dẫn có số trang khác nhau thì cần trích dẫn thêm số trang, ví dụ: Kitchen (1982, p 39).

Các yêu cầu khác

- Bài viết không đạt yêu cầu, Tòa 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.

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 Y - dược học

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 62 - Number 12 - December 2020

Đánh giá khả năng cảm ứng tăng sinh và bảo vệ da của astaxanthin trước những điều kiện bất lợi *in vitro* và *in vivo*.

Tô Minh Quân, Trần Quang Diệu, Tạ Nguyễn Ái Trinh, Trần Thị Kiều Duyên

Đánh giá tính hướng đích của phức hệ nano curcumin gắn axit folic tới tế bào biểu hiện thụ thể folate.

Trần Thị Ngọc Huyền, Bùi Thị Thu Hà, Đỗ Đức Quang, Lê Thị Thu Hường, Phạm Thị Thu Hường

Đánh giá khả năng phân loại của vùng gen ITS-rDNA đối với loài Hoàng liên ô rô lá dày (*Mahonia bealei* (Fortune) Pynaert) của Việt Nam.

Nguyễn Thị Phương Trang, Vũ Thị Huệ, Nguyễn Hùng Mạnh, Bùi Văn Thanh

Xây dựng đặc điểm vi học và mã vạch ADN phục vụ định danh cây cam thảo Đá Bia.

Thái Hồng Đăng, Hoàng Xuân Lâm, Bùi Ngọc Duy, Huỳnh Kim Quyên, Dương Nguyên Xuân Lâm, Huỳnh Thị Hồng Phượng, Trần Thị Văn Anh

Hiệu quả của dịch chiết thực vật để kiểm soát nấm *Pyricularia grisea* gây bệnh đạo ôn trên lúa trong điều kiện *in vitro*.

Phạm Thị Thu Hà, Nguyễn Thị Ngọc Trâm, Châu Thanh Trúc, Nguyễn Thị Bảo Trân, Võ Hoàng Kha

Ảnh hưởng của nhiệt độ, pH và môi trường nuôi cấy đến sinh trưởng phát triển của chủng nấm sò (*Pleurotus* sp.) FH và PN20.

Nguyễn Huy Thuần, Tạ Thị Huệ, Bùi Hương Lan, Vũ Thị Khánh Linh, Phạm Thị Thêu, Đỗ Tuấn Anh, Nguyễn Thị Bích Thủy, Nguyễn Văn Giang

Kết quả khảo nghiệm 5 giống bơ trong nước ở thời kỳ kinh doanh tại Mộc Châu - Sơn La.

Nguyễn Văn Lam, Lê Tất Khương, Nguyễn Phương Tùng

Xác định liều lượng bón đạm, lân và kali thích hợp cho giống bơ Booth 7 giai đoạn kinh doanh trên đất bazan tại tỉnh Đắk Lắk.

Nguyễn An Ninh, Trịnh Đức Minh, Phan Văn Tân, Nguyễn Hắc Hiền

Ảnh hưởng của phương pháp tiêm FSH (Follicle - stimulating hormone) đến hiệu quả gây rụng trứng nhiều trên dê sữa Saanen.

Nguyễn Khánh Vân, Quán Xuân Hữu, Phan Trung Hiếu, Vũ Thị Thu Hương, Hoàng Thị Âu, Phạm Thị Kim Yến, Đỗ Chiến Thắng, Phạm Doãn Lâm

Nghiên cứu liên kết trên toàn hệ gen (GWAS) về khả năng chuyển hóa đường từ rơm rạ của cây lúa.

Dương Xuân Tú, Nguyễn Thị Hường, Lê Thị Thanh, Nguyễn Thế Dương, Simon McQueen Mason, Claire Halpin

Nghiên cứu lưu giữ *in vitro* nguồn gen khoai môn sọ bản địa *Colocasia esculenta* (L.) Schott.

Vì Thị Xuân Thủy, Vũ Thị Nụ, Phayvong Duangngeun, Trần Thị Mừng, Trần Thị Hồng Xuân

1

Determining the ability of astaxanthin to induce proliferation and skin protection from harmful environmental factors *in vitro* and *in vivo*.

Minh Quan To, Quang Dieu Tran, Nguyen Ai Trinh Ta, Thi Kieu Duyen Tran

7

Evaluation of the target effect of folic acid conjugated nano curcumin system on cells highly expressed folate receptors.

Thi Ngoc Huyen Tran, Thi Thu Ha Bui, Duc Quang Do, Thi Thu Huong Le, Thi Thu Huong Pham

12

Assessment of classification ability of ITS-rDNA region on *Mahonia bealei* (Fortune) Pynaert in Vietnam.

Thi Phuong Trang Nguyen, Thi Hue Vu, Hung Manh Nguyen, Van Thanh Bui

18

Plant anatomy and the DNA barcode for identification of Cam Thao Da Bia.

Hong Dang Thai, Xuan Lam Hoang, Ngoc Duy Bui, Kim Quyen Huynh, Nguyen Xuan Lam Duong, Thi Hong Phuong Huynh, Thi Van Anh Tran

24

Efficacy of plant extracts to control *Pyricularia grisea* fungus causing rice blast *in vitro*.

Thi Thu Ha Pham, Thi Ngoc Tram Nguyen, Thanh Truc Chau, Thi Bao Tran Nguyen, Hoang Kha Vo

30

Effects of temperature, pH, and cultural media on the growth of Oyster mushroom (*Pleurotus* sp.) FH and PN20.

Huy Thuan Nguyen, Thi Hue Ta, Huong Lan Bui, Thi Khanh Linh Vu, Thi Theu Pham, Tuan Anh Do, Thi Bich Thuy Nguyen, Van Giang Nguyen

35

A study on the adaptability of locally cultivated varieties of avocado in bearing period in Moc Chau, Son La.

Van Lam Nguyen, Tat Khuong Le, Phuong Tung Nguyen

40

Determine the appropriate dose of nitrogen, phosphorus, and potassium fertilisers for Booth 7 avocado variety in the commercial stage grown on basaltic soil in Dak Lak province.

An Ninh Nguyen, Duc Minh Trinh, Van Tan Phan, Hac Hien Nguyen

45

Effect of FSH (Follicle - stimulating hormone) injection on the super-ovulation in Saanen goats.

Khanh Van Nguyen, Xuan Huu Quan, Trung Hieu Phan, Thi Thu Huong Vu, Thi Au Hoang, Thi Kim Yen Pham, Chien Thang Do, Doan Lan Pham

50

Genome-wide association study (GWAS) for digestibility in rice straw.

Xuan Tu Duong, Thi Huong Nguyen, Thi Thanh Le, The Duong Nguyen, Simon McQueen Mason, Claire Halpin

56

Study on *in vitro* conservation of indigenous taro gene (*Colocasia esculenta* (L.) Schott).

Thi Xuan Thuy Vi, Thi Nu Vu, Phayvong Duangngeun, Thi Mung Tran, Thi Hong Xuan Tran