



ISSN 1859-4794

TẠP CHÍ

KHOA HỌC & CÔNG NGHỆ Việt Nam

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

B

Tập 63 - Số 2 - Tháng 2 năm 2021

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

Nghiên cứu phát hiện đột biến kháng artemisinin trên gen *K13* ở ký sinh trùng sốt rét *Plasmodium falciparum*

Trần Thị Thu Huyền¹, Nguyễn Thị Lan Dung^{1,2}, Nguyễn Thùy Trang^{1,2},
Nguyễn Văn Ninh^{1,2}, Hồ Anh Sơn¹, Hoàng Văn Tổng^{1*}

¹Viện Nghiên cứu Y dược học Quân sự, Học viện Quân y
²Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

Ngày gửi bài 2/10/2020; ngày chuyển phản biện 8/10/2020; ngày nhận phản biện 24/11/2020; ngày chấp nhận đăng 2/12/2020

Tóm tắt:

Mục tiêu của nghiên cứu là xây dựng quy trình phát hiện đột biến trên gen *K13* và bước đầu xác định tần số đột biến trên gen này ở các mẫu lâm sàng. Phương pháp nghiên cứu: các mẫu ADN được tách chiết từ các mẫu máu của 50 bệnh nhân thất bại điều trị với artemisinin thu thập tại khu vực Tây Nguyên. Đoạn gene *K13* được nhân với các cặp mồi đặc hiệu, giải trình tự bằng phương pháp Sanger và phân tích đột biến sử dụng phần mềm Bioedit. Kết quả nghiên cứu: khuếch đại thành công đoạn gen *K13* có kích thước 799 bp ở chủng *P. falciparum*, sau khi giải trình tự phát hiện có sự thay thế nucleotide A>G tại vị trí 1740, dẫn tới sự thay đổi axit amin C>Y ở vị trí 580 tương ứng. Trong 50 mẫu bệnh phẩm, 41/50 (82%) mẫu xuất hiện đột biến C580Y và 9/50 (18%) mẫu không mang đột biến, ngoài ra không xuất hiện đột biến nào khác. Kết luận: đã thiết lập và tối ưu được quy trình phát hiện đột biến kháng artemisinin trên gen *K13* ở ký sinh trùng (KST) sốt rét *P. falciparum* và xác định tần số đột biến này trên gen *K13*.

Từ khóa: kháng artemisinin, *K13*, *P. falciparum*.

Chỉ số phân loại: 3.1

Đặt vấn đề

Sốt rét là một bệnh KST nguy hiểm gây tỷ lệ tử vong cao. Năm 2018, sốt rét được ước tính đã gây ra 405.000 ca tử vong trên toàn thế giới, hầu hết trong số đó do *P. falciparum* (Tổ chức Y tế thế giới - WHO, 2019). Theo WHO, liệu pháp điều trị kết hợp dựa trên artemisinin (ACT) là liệu pháp điều trị sốt rét do nhiễm KST *P. falciparum* hàng đầu hiện nay [1, 2], tuy nhiên trong năm 2008, những trường hợp đầu tiên có sự giảm hiệu quả điều trị của artemisinin đã được quan sát ở phía tây Campuchia [3]. Các nghiên cứu sau đó cho thấy sự lan truyền kháng thuốc khắp Đông Nam Á, đặc biệt hơn là ở phía tây Campuchia, Myanmar, Thái Lan, Lào và Việt Nam [4-8]. Sự xuất hiện kháng artemisinin ở Đông Nam Á cho thấy mối đe dọa nghiêm trọng trong công tác phòng chống sốt rét do *P. falciparum* trên phạm vi toàn cầu.

Gen *K13* là một đoạn exon mã hóa protein Kelch nằm trên nhiễm sắc thể số 13, hay còn gọi là protein Kelch 13. Tính kháng artemisinin liên quan chặt chẽ với các đột biến điểm đơn lẻ trong vùng propeller trên nhiễm sắc thể số 13 của *P. falciparum*, trong đó phổ biến nhất là đột biến C580Y, phân bố đặc trưng ở tiểu vùng phía đông sông Mê Kông. Việc xây dựng và hoàn thiện được quy trình xác định các chỉ điểm đột biến trên gen *K13* sẽ giúp mở ra một hướng tiếp cận mới để giám sát tình trạng kháng artemisinin, qua đó sẽ giúp ích cho công tác phòng chống sốt rét tại Việt Nam một cách hiệu quả hơn. Chính vì vậy, chúng tôi đã tiến hành nghiên

cứ phát hiện đột biến kháng artemisinin trên gen *K13* ở KST sốt rét *P. falciparum*.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu

Chúng tôi thực hiện nghiên cứu trên 50 mẫu bệnh phẩm đã thất bại trong việc điều trị với artemisinin được thu thập tại khu vực Tây Nguyên, Việt Nam để tối ưu quy trình phát hiện đột biến. Nghiên cứu được thực hiện tại Viện Nghiên cứu Y dược học Quân sự, Học viện Quân y. Chủng chuẩn KST *P. falciparum* (clone 3D7) được cung cấp bởi Viện Y học Nhiệt đới Tuebingen, CHLB Đức.

Phương pháp nghiên cứu

Tách DNA: mẫu chuẩn và 50 mẫu máu thu thập được tách bằng kit tách chiết DNA từ máu toàn phần GeneJET Whole Blood Genomic DNA Purification (Thermo Fisher Scientific, Mỹ) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Nồng độ DNA được đo bằng máy NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Mỹ), các mẫu DNA được bảo quản ở -30°C cho đến khi sử dụng cho phản ứng PCR.

Khuếch đại đoạn gen có chứa đột biến ở gen *K13* và giải trình tự: cặp mồi sử dụng cho phản ứng PCR và giải trình tự gen được đặt tổng hợp bởi Hãng IDT (Mỹ). Cặp mồi vòng 1 là: mồi xuôi 5'-GGG AAT CTG GTG GTA ACA GC-3' và mồi ngược 5'-CGG

*Tác giả liên hệ: Email: hoangvantong@vmmu.edu.vn

Detection of mutations associated with artemisinin resistance in *K13* gene of *Plasmodium falciparum* parasites

Thi Thu Huyen Tran¹, Thi Lan Dung Nguyen^{1,2},
Thuy Trang Nguyen^{1,2}, Van Ninh Nguyen^{1,2},
Anh Son Ho¹, Van Tong Hoang^{1*}

¹Institute of Biomedicine and Pharmacy,
Vietnam Military Medical University

²University of Science, Vietnam National University, Hanoi

Received 2 October 2020; accepted 2 December 2020

Abstract:

Objective: this study aims to develop a methodology for detecting mutations in the *K13* gene and determine mutation frequencies in clinical samples. **Method:** total DNAs were extracted blood samples collected from 50 patients in failure with artemisinin treatment in the Central Highlands region. A fragment of the *K13* gene was amplified, purified, and sequenced by the Sanger method. The *K13* sequences were analysed by using Bioedit and aligned with the reference sequence to determine *K13* mutations. **Results:** successfully amplified the *K13* gene segment with size 799 bp in *P. falciparum*. After sequencing, there was a nucleotide substitution of A>G at position 1740, leading to changes in amino acids C>Y at the respective position 580. In the 50 patient samples, 41/50 (82%) samples showed the C580Y mutation, 9/50 (18%) of the samples had no mutation, and there was no other mutation. **Conclusion:** the authors have successfully developed and optimised a procedure for detecting the mutation C580Y in *K13* in *P. falciparum* and determined the mutation frequency in the *K13* gene.

Keywords: artemisinin resistance, *K13*, *P. falciparum*.

Classification number: 3.1

AGT GAC CAA ATC TGG GA-3', cặp mồi vòng 2 là: mồi xuôi 5'-GCC TTG TTG AAA GAA GCA GA-3' và mồi ngược 5'-GCC AAG CTG CCA TTC ATT TG-3' [3].

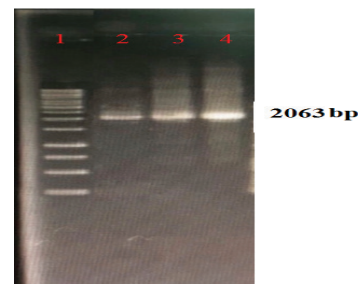
Thành phần phản ứng PCR nhân gen bao gồm phản ứng Nested-PCR vòng 1: master mix: 10 µl, primer K13-1F: 0,5 µl, primer K13-1R: 0,5 µl, nước: 7 µl, mẫu: 2 µl, tổng thể tích 20 µl. Phản ứng Nested-PCR vòng 2: master mix: 10 µl, primer K13-2F: 0,5 µl, primer K13-2R: 0,5 µl, nước: 7 µl, mẫu: 2 µl, tổng thể tích 20 µl. Chu trình nhiệt phản ứng PCR: phản ứng Nested-PCR vòng 1: 94°C trong 5 phút; tiếp theo 25 chu kỳ: 94°C trong 45 giây, 51°C trong 45 giây, 72°C trong 1 phút 25 giây. Cuối cùng 72°C

trong 5 phút. Phản ứng Nested-PCR vòng 2: 94°C trong 5 phút; tiếp theo 30 chu kỳ: 94°C trong 45 giây, 50°C trong 45 giây, 72°C trong 45 giây. Cuối cùng 72°C trong 5 phút. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1,5%, phân tích kết quả [3]. Sản phẩm nhân gen được tinh sạch bằng kit GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, Mỹ), giải trình tự gen bằng phương pháp Sanger trên máy giải trình tự gen tự động, thực hiện bởi Công ty thương mại Macrogen (Seoul, Hàn Quốc) và phân tích kết quả trên phần mềm Bioedit.

Kết quả nghiên cứu

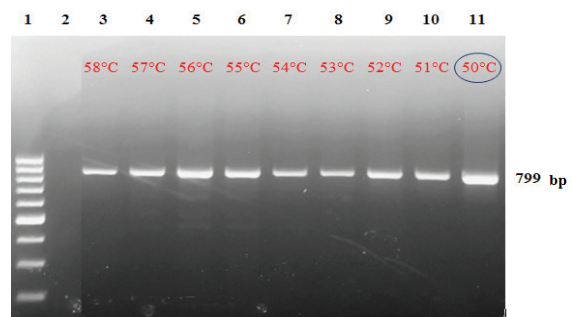
Kết quả tối ưu quy trình PCR

Thực hiện tối ưu các thành phần của quy trình Nested PCR nhân bản vùng gen *K13*: tối ưu nhiệt độ gắn mồi, nồng độ mồi cho cả 2 vòng của phản ứng. Kết quả tối ưu nhiệt độ gắn mồi vòng 1 (hình 1): phản ứng PCR được thực hiện theo chương trình chạy gradient nhiệt độ gắn mồi với dải nhiệt độ từ 50-57°C để nhiệt độ gắn mồi không quá thấp và phù hợp với Tm của mồi. Sản phẩm phản ứng được điện di trên gel agarose 1,5% nhuộm trong dung dịch ethidium bromide trong 20 phút, quan sát và chụp ảnh trên hệ thống chụp ảnh gel để phân tích kết quả.



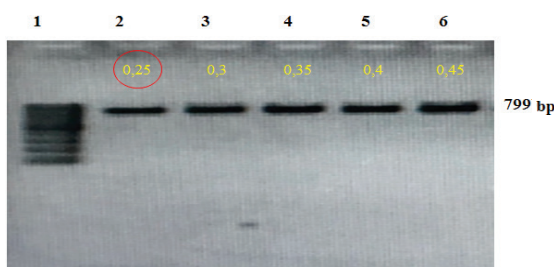
Hình 1. Kết quả tối ưu nhiệt độ gắn mồi vòng 1. Giếng 1: marker 1 kb; giếng 2-4: nhiệt độ gắn mồi 51°C.

Kết quả điện di cho thấy, ở nhiệt độ gắn mồi khác nhau cho các kết quả khác nhau. Tại nhiệt độ 51°C cho tín hiệu băng sáng và rõ nét nhất, nhiệt độ này không quá thấp và không cao hơn nhiều so với Ta của mồi nên nhiệt độ gắn mồi tối ưu được lựa chọn là 51°C. Thực hiện thí nghiệm tương tự quy trình tối ưu nhiệt độ gắn mồi vòng 1, kết quả tối ưu nhiệt độ gắn mồi vòng 2 được thể hiện trong hình 2.



Hình 2. Kết quả tối ưu nhiệt độ gắn mồi vòng 2. Giếng 1: thang DNA chuẩn 100 bp; giếng 2: ống đối chứng âm; giếng 3-11: sản phẩm PCR tại các nhiệt độ gắn mồi khác nhau lần lượt là 58°C, 57°C, 56°C, 55°C, 54°C, 53°C, 52°C, 51°C, 50°C.

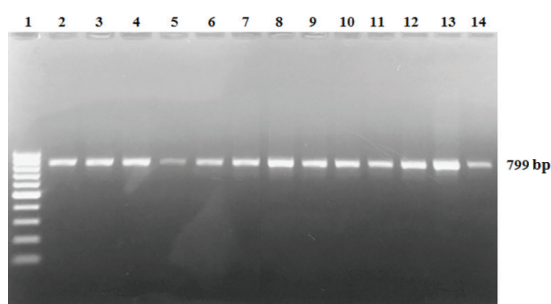
Tại nhiệt độ 50°C cho tín hiệu băng sáng, rõ nét, đậm nhất và là khoảng nhiệt độ thích hợp cho phản ứng PCR nên được lựa chọn cho các nghiên cứu tiếp theo. Tối ưu nồng độ môi: để chọn được nồng độ môi các cặp môi thích hợp cho phản ứng PCR cả 2 vòng, chúng tôi tiến hành thử nghiệm ở các dải nồng độ môi từ 0,25-0,45 μ M. Các nồng độ đều cho kết quả tốt, chúng tôi chọn nồng độ 0,25 μ M cho các lần chạy tiếp theo (hình 3).



Hình 3. Kết quả tối ưu nồng độ môi. Giếng 1: thang DNA chuẩn 100 bp; giếng 2-6: sản phẩm PCR tại các nồng độ môi lần lượt là 0,25; 0,3; 0,35; 0,4; 0,45 μ M.

Kết quả nhân gen K13

Sản phẩm Nested-PCR được điện di trên gel Agarose 1,5%, 120 V trong vòng 30 phút. Kết quả điện di sản phẩm PCR cho thấy các băng xuất hiện đều rõ nét, đúng kích thước 799 bp theo lý thuyết và không xuất hiện sản phẩm phụ (hình 4). Như vậy, điều kiện cho phản ứng nhân gen đã được tối ưu. Sản phẩm sẽ được tinh sạch sử dụng bộ kit GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Fisher, Mỹ) và giải trình tự.

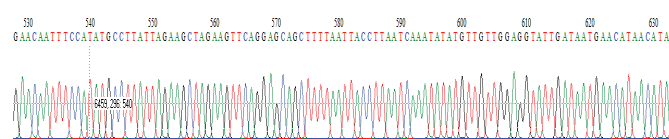


Hình 4. Kết quả điện di sản phẩm Nested-PCR. Giếng 1: thang DNA chuẩn 100 bp; giếng 2-14: sản phẩm DNA điện di sau tinh sạch.

Kết quả giải trình tự Sanger

Chúng tôi đã tiến hành giải trình tự 50 sản phẩm tinh sạch PCR từ 50 mẫu bệnh phẩm của bệnh nhân thất bại điều trị với artemisinin thu thập được ở khu vực Tây Nguyên, kết quả thu được thể hiện trong hình 5. Từ kết quả giải trình tự các mẫu thu được chúng tôi nhận thấy: các pick thu được có

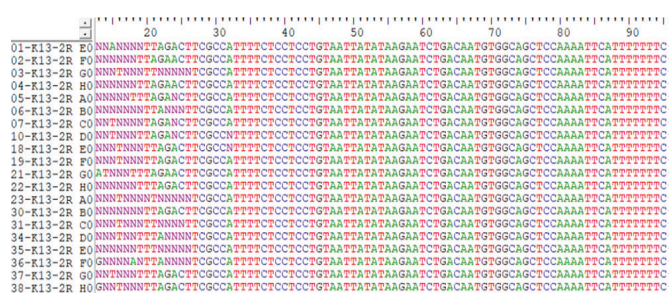
tín hiệu rõ ràng, không bị nhiễu, như vậy tất cả các mẫu của chúng tôi đã được giải trình tự thành công.



Hình 5. Kết quả giải trình tự đoạn gen K13 của mẫu bệnh.

Kết quả phân tích đột biến bằng phần mềm Bioedit

Sử dụng phần mềm Bioedit để so sánh trình tự đoạn gen K13 của mẫu bệnh phẩm thu được với trình tự tham chiếu gen K13 trên ngân hàng gen (mã số NC 004331.3), kết quả được thể hiện ở hình 6.

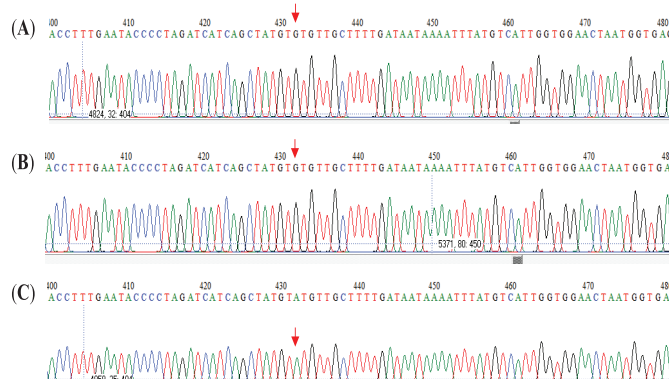


Hình 6. So sánh trình tự mẫu với trình tự tham chiếu trên GeneBank.

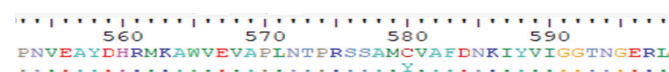
Phân tích 50 mẫu bệnh phẩm, chúng tôi thu được kết quả như hình 7, 8.



Hình 7. Vị trí xảy ra đột biến G>A.



Hình 8. Kết quả giải trình tự nhân gen K13. (A) chủng chuẩn, (B) mẫu không đột biến, (C) mẫu xảy ra đột biến thay thế nucleotide.



Hình 9. Đột biến C580Y.

Những mẫu có sự thay thế nucleotide A>G tại vị trí 1740 dẫn tới sự thay đổi axit amin C>Y ở vị trí 580 tương ứng, đột biến này được gọi là C580Y (hình 9). Trong tổng số 50 mẫu bệnh phẩm, chúng tôi thu được 41/50 (82%) mẫu xuất hiện đột biến C580Y này và chỉ có 9/50 (18%) mẫu không mang đột biến, không xuất hiện đột biến nào khác.

Bàn luận

Như vậy, trong nghiên cứu này của chúng tôi, đột biến C580Y chiếm ưu thế trong tổng số mẫu nghiên cứu, tỷ lệ này tương đương với nghiên cứu của B.Q. Phúc và cs (2017) [9] với tỷ lệ đột biến C580Y tại Việt Nam tăng từ 34,5 (năm 2015) đến 90,5% (năm 2017). Theo N.V. Thanh và cs (2017) [10], tỷ lệ đột biến C580Y tại Bình Phước năm 2015 xuất hiện trên 14/14 (100%) trường hợp thất bại điều trị với artemisinin. Nghiên cứu từ năm 2009 đến năm 2016 chỉ ra đột biến C580Y chiếm ưu thế cao, đặc biệt là 79,1% (34/43) phân lập ở tỉnh Bình Phước và 63% (17/27) phân lập ở tỉnh Gia Lai [10]. Theo nhiều nghiên cứu tổng hợp, tại Việt Nam có một số đột biến trên gen *K13* đó là: F446I, M476I, Y493H, R539T, I543T, P533L và C580Y, tuy nhiên không có bằng chứng cho thấy bất cứ KST nào mang nhiều hơn 1 đột biến và tần suất xuất hiện của các đột biến trên thay đổi theo từng giai đoạn. Tỷ lệ chủng KST có kiểu gen đột biến *K13* tăng từ 8,7 (20/231) năm 2009 lên 79,1% (34/43) năm 2016 ($p<0,001$). Tỷ lệ đột biến của C580Y tăng từ 1,7 (4/231) trong giai đoạn 2009-2010 lên 79,1% (34/43) trong giai đoạn 2015-2016 ($p<0,001$). Trái ngược với sự gia tăng về mức độ phổ biến của đột biến C580Y, đột biến I543T giảm tần số từ 10,2 (15/147) trong giai đoạn 2010-2011 xuống còn 2,1% (1/48) trong năm 2013-2014 và sau đó biến mất.

Đột biến *K13* được quan sát lần đầu tiên ở Pailin, miền tây Campuchia là C580Y và nó lan sang Thái Lan và Lào trong khoảng thời gian từ năm 2008 đến 2015. Hiện nay, đột biến này thường chiếm ưu thế ở Campuchia, Myanmar, Thái Lan, Lào và được coi là dấu hiệu phân tử mạnh đối với kháng artemisinin ở chủng *P. falciparum*. Nghiên cứu cũng cho thấy đột biến C580Y ở Campuchia, Thái Lan, Lào và Việt Nam có cùng nguồn gốc, trong khi đó đột biến C580Y ở Myanmar có nguồn gốc di truyền khác. C580Y cũng là đột biến duy nhất trên gen *K13* xuất hiện ở Nam Mỹ, tuy nhiên đột biến này được cho là có nguồn gốc độc lập so với đột biến C580Y ở Campuchia [11].

Nghiên cứu tại Việt Nam cho thấy sự gia tăng ưu thế của đột biến C580Y, tương tự như đã thấy ở các nước láng giềng Campuchia, Lào và Thái Lan. Một câu hỏi quan trọng là liệu các KST đột biến *K13*, và đột biến C580Y nói riêng được “nhập khẩu” từ các quốc gia khác trong khu vực hay chúng xuất hiện độc lập ở Việt Nam? Một nghiên cứu bao gồm một số KST từ tỉnh Bình Phước (có trong nghiên cứu hiện tại) cho thấy các mẫu của Việt Nam mang Y493H, I543T và đột biến C580Y có các dị dạng *K13* sườn dài giống hệt với các KST Campuchia [10]. Điều này cho thấy đột biến *K13* ở KST từ cả hai phía biên giới Việt Nam - Campuchia có chung một tổ tiên, mặc dù không thể xác định chắc chắn hướng nào của các chủng này đã lan rộng [12]. Mặt khác, đột biến C580Y trên gen *K13* ở Ninh Thuận và Gia Lai được quan sát thấy có các haplotypes lõi rất giống nhau và có sự khác biệt so với C580Y ở Bình Phước,

điều này cho thấy các đột biến ở hai địa điểm này có thể có nguồn gốc chung, đồng thời C580Y ở 2 tỉnh này có thể xuất hiện sớm hơn ở Bình Phước [13].

Theo S. Nair và cs (2018) [14], có đến 125 đột biến trên gen *K13* được phát hiện có liên quan đến tính kháng artemisinin, nhưng chỉ có đột biến C580Y được định hình và lan rộng tới các khu vực khác nhau, giả thuyết cho rằng đột biến C580Y giúp cho KST có sức đề kháng tốt hơn, khả năng chống chịu tác động tốt hơn, do đó giúp nó lan truyền mạnh mẽ hơn so với các đột biến khác.

Kết luận

Chúng tôi đã xây dựng và tối ưu thành công quy trình xác định đột biến trên gen *K13* ở KST sốt rét *P. falciparum* kháng artemisinin, và bước đầu xác định được tần suất đột biến C580Y trên gen *K13* là 82% trên các mẫu bệnh phẩm thu thập được.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] S. Yeung, et al. (2004), “Antimalarial drug resistance, artemisinin-based combination therapy, and the contribution of modeling to elucidating policy choices”, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **71**(2 Suppl.), pp.179-186.
- [2] L. Tilley, et al. (2016), “Artemisinin action and resistance in *Plasmodium falciparum*”, *Trends in Parasitology*, **32**(9), pp.682-696.
- [3] F. Arie, et al. (2014), “A molecular marker of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria”, *Nature*, **505**(7481), pp.50-55.
- [4] C. Wongsrichanalai, S.R. Meshnick (2008), “Declining artesunate-mefloquine efficacy against *falciparum* malaria on the Cambodia-Thailand border”, *Emerging Infectious Diseases*, **14**(5), pp.716-719.
- [5] H. Noedl, et al. (2008), “Evidence of artemisinin-resistant malaria in western Cambodia”, *New England Journal of Medicine*, **359**(24), pp.2619-2620.
- [6] R. Leang, et al. (2013), “Efficacy of dihydroartemisinin-piperaquine for treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* in Cambodia, 2008 to 2010”, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **57**(2), pp.818-826.
- [7] A.M. Dondorp, et al. (2009), “Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria”, *N. Engl. J. Med.*, **361**(5), pp.455-467.
- [8] N. Van Hong, et al. (2014), “Severe malaria not responsive to artemisinin derivatives in man returning from Angola to Vietnam”, *Emerging Infectious Diseases*, **20**(7), pp.1207-1210.
- [9] B.Q. Phuc, et al. (2017), “Treatment failure of dihydroartemisinin/piperaquine for *Plasmodium falciparum* malaria, Vietnam”, *Emerging Infectious Diseases*, **23**(4), pp.715-717.
- [10] N.V. Thanh, et al. (2017), “Rapid decline in the susceptibility of *Plasmodium falciparum* to dihydroartemisinin-piperaquine in the south of Vietnam”, *Malaria Journal*, **16**(1), pp.27-27.
- [11] L.C. Mathieu, et al. (2020), “Local emergence in Amazonia of *Plasmodium falciparum* *K13* C580Y mutants associated with in vitro artemisinin resistance”, *eLife*, DOI: 10.7554/eLife.51015.
- [12] M.T. Zaw, Z. Lin, N.A. Emran (2019), “Importance of *Kelch 13* C580Y mutation in the studies of artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* in greater Mekong subregion”, *J. Microbiol. Immunol. Infect.*, **53**(5), pp.676-681.
- [13] N. Thuy-Nhien, et al. (2017), “*K13* propeller mutations in *Plasmodium falciparum* populations in regions of malaria endemicity in Vietnam from 2009 to 2016”, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **61**(4), DOI: 10.1128/AAC.01578-16.
- [14] S. Nair, et al. (2018), “Fitness costs and the rapid spread of *Kelch13*-C580Y substitutions conferring artemisinin resistance”, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **62**(9), DOI: 10.1128/AAC.00605-18.

Đa hình đơn nucleotide rs1799794 của gen XRCC3 trên bệnh nhân ung thư vú

Nguyễn Thị Thu Thảo¹, Nguyễn Thu Thúy¹, Vương Vũ Việt Hà²,
Trần Huy Thịnh¹, Nguyễn Viết Tiến¹, Trần Văn Khánh^{1*}

¹Trường Đại học Y Hà Nội

²Bệnh viện Bưu điện

Ngày nhận bài 1/12/2020; ngày chuyển phản biện 7/12/2020; ngày nhận phản biện 22/1/2021; ngày chấp nhận đăng 25/1/2021

Tóm tắt:

Một số đa hình đơn nucleotide của gen XRCC3, trong đó có rs1799794, ảnh hưởng đến quá trình sửa chữa DNA và do đó ảnh hưởng đến nguy cơ mắc ung thư ở người. Nghiên cứu này có mục tiêu xác định sự phân bố của SNP rs1799794, đồng thời đánh giá mối liên quan giữa SNP này với nguy cơ mắc ung thư vú. Nghiên cứu được tiến hành trên 208 bệnh nhân ung thư vú và 208 phụ nữ khỏe mạnh có độ tuổi tương ứng. Kỹ thuật enzyme cắt giới hạn (PCR-RFLP) được áp dụng để xác định đa hình gen. Kết quả cho thấy: tỷ lệ alen A và G ở nhóm bệnh là 0,575 và 0,425, ở nhóm chứng là 0,548 và 0,452. Tỷ lệ kiểu gen AA, AG, GG ở nhóm bệnh là 34,6, 45,7 và 19,7%; ở nhóm chứng là 33,2, 43,3 và 23,5%. Kiểu gen AG có liên quan tới sự khởi phát sớm của ung thư vú, làm tăng nguy cơ mắc ung thư vú ở nhóm ≤ 45 tuổi. Kiểu gen GG có tác dụng bảo vệ, làm giảm nguy cơ mắc ung thư vú ở nhóm ≤ 45 tuổi.

Từ khóa: gen XRCC3, SNP rs1799794, ung thư vú.

Chỉ số phân loại: 3.1

Đặt vấn đề

Ung thư vú là bệnh lý ung thư phổ biến hàng đầu ở phụ nữ, đứng thứ hai trên thế giới sau ung thư phổi. Năm 2018, thế giới ghi nhận 2,09 triệu trường hợp mắc ung thư vú, chiếm 11,6% tổng số ca mắc ung thư mới. Căn bệnh này đứng thứ hai trong những nguyên nhân gây tử vong do ung thư ở phụ nữ [1].

Có nhiều cơ chế gây ung thư nói chung và ung thư vú nói riêng, trong đó hiện tượng đứt gãy cả 2 mạch của phân tử DNA do tác nhân gây ung thư là loại tổn thương nguy hiểm nhất, có vai trò trong hình thành và tiến triển của khối u, đồng thời gây mất ổn định bộ gen của tế bào [2, 3]. Để chống lại cơ chế này, cơ thể sản xuất ra họ protein RAD51 có vai trò bảo vệ và sửa chữa lại phân tử DNA, đảm bảo sự ổn định của phân tử [4]. XRCC3 là một trong những protein trong họ protein RAD51. Nhiều nghiên cứu đã chứng minh các đa hình đơn nucleotide (Single nucleotide polymorphism-SNP) của gen XRCC3 có thể làm thay đổi thành phần của protein được mã hóa, ảnh hưởng tới chức năng sửa chữa DNA và do đó ảnh hưởng đến sự xuất hiện của ung thư nói chung và ung thư vú nói riêng. Mối liên quan giữa SNP với nguy cơ sinh ung thư ở các cá thể khác nhau là khác nhau. SNP rs1799794 của gen XRCC3 đã được một số nghiên cứu trên thế giới phân tích về vai trò với bệnh lý ung thư vú [5-8]. Tuy nhiên, những kết quả thu được chưa

thống nhất: một số nghiên cứu cho thấy sự liên quan giữa SNP rs1799794 với bệnh lý ung thư vú có ý nghĩa thống kê [5-7], một số nghiên cứu khác cho rằng không có mối liên quan giữa SNP rs1799794 với nguy cơ mắc bệnh [8].

Tại Việt Nam, chưa có những nghiên cứu về đa hình đơn nucleotide của gen XRCC3 trên bệnh nhân ung thư vú. Do đó, nghiên cứu này được thực hiện với hai mục tiêu: 1) Xác định sự phân bố đa hình đơn nucleotide rs1799794 của gen XRCC3 trên bệnh nhân ung thư vú và nhóm đối chứng tại Việt Nam; 2) Đánh giá mối liên quan giữa đa hình này với nguy cơ mắc bệnh ung thư vú.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng

Nhóm bệnh: 208 bệnh nhân ung thư vú được điều trị tại Bệnh viện K. Các bệnh nhân được chẩn đoán xác định ung thư vú bằng lâm sàng, cận lâm sàng và mô bệnh học. Loại trừ những bệnh nhân mắc ung thư khác phối hợp, bệnh nhân không đồng ý tham gia nghiên cứu.

Nhóm chứng: 208 phụ nữ là những người khỏe mạnh thông qua các đợt khám sức khỏe định kỳ tại Bệnh viện Phụ sản Trung ương, tiền sử không mắc ung thư các loại, độ tuổi tương ứng với nhóm bệnh. Loại trừ những đối tượng từ chối tham gia nghiên cứu.

*Tác giả liên hệ: Email: tranvankhanh@hmu.edu.vn

Single nucleotide polymorphism rs1799794 in XRCC3 gene on breast cancer patients

Thi Thu Thao Nguyen¹, Thu Thuy Nguyen¹,
Vu Viet Ha Vuong², Huy Thinh Tran¹,
Viet Tien Nguyen¹, Van Khanh Tran^{1*}

¹Hanoi Medical University

²Hospital of Post and Telecommunications

Received 1 December 2020; accepted 25 January 2021

Abstract:

The single nucleotide polymorphisms of the XRCC3 gene including rs1799794 affect the DNA double-strand break/repair. Therefore, it plays a critical part in the initiation of carcinogenesis. This study aimed to investigate the distribution of rs1799794 and the association between rs1799794 and breast cancer risk. The study was performed in 208 Vietnamese females suffering from breast cancer and 208 age-matched normal healthy controls. DNA was extracted from whole blood whilst genotyping was conducted using PCR-RFLP. The results show that the frequency of the A and G allele in the case group are 0.575 and 0.425, in the control group are 0.548 and 0.452. The frequency of AA, AG, GG genotype in the case group are 34.6, 45.7, and 19.7%; in the control group are 33.2, 43.3, and 23.5%. AG genotype of rs1799794 associated with disease onset early of breast cancer, increasing the risk of breast cancer among those who were 45 years old and younger. The GG genotype has protective effects and reduces the risk of breast cancer in the age group ≤ 45 years.

Keywords: breast cancer, SNP rs1799794, XRCC3.

Classification number: 3.1

Phương pháp

Quy trình nghiên cứu:

Tách chiết DNA: DNA tổng số được tách chiết từ 2 ml mẫu máu chứa chất chống đông EDTA. Quy trình tách chiết được thực hiện theo hướng dẫn của công ty sản xuất kit Promega Wizard Genomic DNA Purification. Sử dụng máy NanoDrop 2000c để đo nồng độ DNA và độ tinh sạch thông qua tỷ lệ A260/280.

Xác định kiểu gen sử dụng kỹ thuật PCR-RFLP: đoạn DNA chứa SNP rs1799794 của gen XRCC3 được khuếch đại với cặp mồi có trình tự: mồi xuôi: 5'-TGAGGCGCCTAATCAGC-3'; mồi ngược: 5'-ACCTGACACAGTTCGTCGC-3'. Sản phẩm PCR thu được có kích thước 293 bp. Thành phần phản ứng PCR (thể tích 10 μ l) gồm: 1,8 μ l H₂O, 5 μ l Taq DNA polymerase, 0,6 μ l mồi xuôi, 0,6 μ l mồi ngược, 2 μ l DNA. Chu trình nhiệt của phản ứng: 94°C trong 5 phút, sau đó lặp lại 35 chu kỳ luân nhiệt: [94°C/30 giây, 55°C/30 giây, 72°C/30 giây], bước tiếp theo 72°C trong 10 phút. Bảo quản sản phẩm ở 4°C. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1,5% với điện thế 100 V trong 20 phút.

Xác định SNP rs1799794 của gen XRCC3 bằng kỹ thuật enzyme cắt giới hạn FokI. Sản phẩm sau khi cắt enzyme được điện di trên gel agarose 3%. Các kiểu gen khác nhau được xác định dựa vào số lượng và kích thước các băng điện di trên gel: kiểu gen AA cho 2 băng có kích thước lần lượt 100 bp và 193 bp, kiểu gen AG cho 3 băng có kích thước lần lượt 100 bp, 193 bp, 293 bp, kiểu gen GG cho 1 băng có kích thước 293 bp.

Ba mẫu DNA tách chiết bất kỳ đại diện cho ba kiểu gen được chọn giải trình tự để kiểm tra độ chính xác của phương pháp enzyme cắt giới hạn.

Xử lý số liệu: sử dụng phần mềm phân tích SPSS 20.0 để phân tích thống kê. Tỷ lệ kiểu gen và alen trong nhóm bệnh và nhóm chứng được so sánh bằng cách sử dụng kiểm định χ^2 hoặc test Fisher (kiểm định 2 phía). Tiến hành phân tích mối liên quan của kiểu gen với bệnh ung thư vú bằng hồi quy logistic đa biến để tính tỷ suất chênh (OR) với khoảng tin cậy 95% (CI). Đối tượng nghiên cứu được chia thành các nhóm dựa trên nhóm tuổi (≤ 45 , 45-54, > 54).

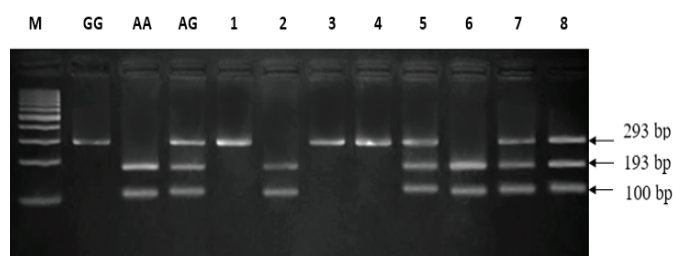
Đạo đức nghiên cứu

Đề tài đã được Hội đồng Đạo đức Trường Đại học Y Hà Nội chấp thuận theo Chứng nhận chấp thuận số 107/HĐĐĐĐHYHN. Các đối tượng tham gia nghiên cứu là hoàn toàn tự nguyện và có quyền rút khỏi nghiên cứu tại bất kỳ thời điểm nào. Các thông tin liên quan đến bệnh nhân được đảm bảo giữ bí mật.

Kết quả

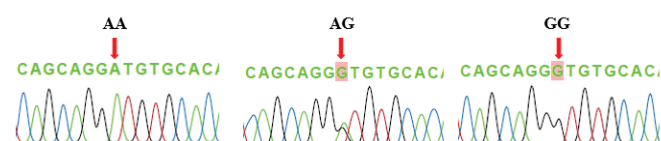
Độ tuổi phát hiện bệnh của nhóm bệnh từ 23 đến 73 tuổi, trung bình $47,36 \pm 9,72$ tuổi. Tỷ lệ bệnh nhân phát hiện bệnh trong độ tuổi ≤ 45 là nhiều nhất (44,7%), tỷ lệ phát hiện bệnh thấp hơn ở nhóm tuổi 45-54 (31,7%), và ít nhất ở nhóm >54 tuổi (23,6%).

Điện di sản phẩm cắt của SNPs cho thấy các băng DNA rõ nét, phân tách rõ ràng, kích thước phù hợp với từng kiểu gen (hình 1).



Hình 1. Kết quả điện di sản phẩm cắt đoạn gen XRCC3 bằng enzyme FokI ở bệnh nhân ung thư vú. M: marker 100 bp, GG: mẫu chứng mang kiểu gen GG, AA: mẫu chứng mang kiểu gen AA, AG: mẫu chứng mang kiểu gen AG; kiểu gen AA (2,6), kiểu gen AG (5,7,8), kiểu gen GG (1,3,4).

Sản phẩm PCR-RFLP của các kiểu gen AA, AG và GG được kiểm tra lại bằng phương pháp giải trình tự gen (hình 2) và so sánh với trình tự chuẩn của gen XRCC3 trên ngân hàng gen (Genebank) (NG_011516-c.316A>G). Kết quả giải trình tự thu được trùng khớp với kết quả xác định kiểu gen bằng phương pháp PCR-RFLP.



Hình 2. Kết quả giải trình tự sản phẩm PCR đoạn gen XRCC3 chứa SNP rs1799794 của các bệnh nhân mang kiểu gen AA, AG, GG.

Kết quả xác định đa hình nucleotide rs1799794 trên bệnh nhân ung thư vú bằng phương pháp RFLP được thể hiện ở bảng 1. Tỷ lệ allele A là 0,575 và allele G là 0,425 ở nhóm bệnh. Tỷ lệ này cũng tương tự ở nhóm chứng, allele A chiếm 0,548 và allele G là 0,452. Sự phân bố tỷ lệ allele giữa 2 nhóm khác biệt không có ý nghĩa thống kê với $p=0,442$. Tỷ lệ các kiểu gen AA, AG, GG lần lượt là 34,6, 45,7, 19,7% ở nhóm bệnh và tương ứng là 33,2, 43,3, 23,6% ở nhóm chứng. Sự phân bố các kiểu gen giữa 2 nhóm này không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p=0,634$.

Bảng 1. Phân bố của SNP rs1799794 và mối liên quan giữa SNP rs1799794 và nguy cơ mắc ung thư vú.

Kiểu alen, kiểu gen	Nhóm bệnh		Nhóm chứng		OR (95%CI)	p
	n	%	n	%		
Kiểu alen	A	239	57,5	228	1,113	0,442
	G	177	42,5	188	(0,847-1,464)	
Kiểu gen	AA	72	34,6	69	33,2	0,634
	AG	95	45,7	90	43,3	
	GG	41	19,7	49	23,6	
AA và GG	AA	72	63,7	69	58,5	0,414
	GG	41	36,3	49	41,5	
AA và AG	AA	72	43,1	69	43,4	0,959
	AG	95	56,9	90	56,6	
AG và GG	AG	95	69,9	90	64,7	0,367
	GG	41	30,1	49	35,3	
AA và AG+GG	AA	72	34,6	69	33,2	0,756
	AG+GG	136	65,4	139	66,8	
AA+AG và GG	AA+AG	167	80,3	159	76,4	0,341
	GG	41	19,7	49	23,6	
AG và AA+GG	AG	95	45,7	90	43,3	0,622
	AA+GG	113	54,3	118	56,7	

Khi phân tích sâu hơn bằng cách so sánh khả năng mắc bệnh của các kiểu gen theo mô hình di truyền khác như: đồng hợp (GG với AA), dị hợp (AG với AA và AG với GG), mô hình di truyền trội (GG+AG với AA), mô hình di truyền lặn (GG với AA+AG), mô hình siêu trội (AG với AA+GG) không thấy có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê.

Tuy nhiên, khi phân tích mối liên quan của SNP rs1799794 với nguy cơ mắc ung thư vú theo nhóm tuổi phát hiện bệnh của nhóm bệnh và nhóm tuổi tương ứng của nhóm chứng cho thấy: trong nhóm ≤ 45 tuổi, tỷ lệ các kiểu gen AA, AG, GG của nhóm bệnh và nhóm chứng khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p=0,043$. Tỷ lệ AG và GG của nhóm bệnh và nhóm chứng khác biệt có ý nghĩa thống kê, tỷ lệ GG ở nhóm bệnh thấp hơn nhóm chứng 2,793 lần với $p=0,013$, $OR=2,793$, khoảng tin cậy 95% của OR nhận giá trị từ 1,230 đến 6,340 không chứa 1. Tỷ lệ AA+AG và GG của nhóm bệnh và nhóm chứng khác biệt có ý nghĩa thống kê, tỷ lệ GG ở nhóm bệnh thấp hơn nhóm chứng 2,388 lần với $p=0,024$, $OR=2,388$, khoảng tin cậy 95% của OR nhận giá trị từ 1,105 đến 5,161 không chứa 1. Tỷ lệ AG và AA+GG của nhóm bệnh và nhóm chứng khác biệt có ý nghĩa thống kê, tỷ lệ AG ở nhóm bệnh cao hơn nhóm chứng 1,839 lần với $p=0,042$, $OR=1,839$, khoảng tin cậy 95% của OR nhận giá trị từ 1,018 đến 3,320 không chứa 1. Kết quả thể hiện trên bảng 2.

Bảng 2. Mối liên quan giữa SNP rs1799794 và nguy cơ mắc ung thư vú ở nhóm ≤45 tuổi.

Nhóm tuổi	Kiểu alen	kiểu gen	Nhóm bệnh		Nhóm chứng		OR (95%CI)	p
			n	%	n	%		
≤45	Kiểu alen	A	111	59,7	95	54	1,262 (0,832-1,914)	0,274
		G	75	40,3	81	46		
	Kiểu gen	AA	30	32,3	30	34,1		0,043
		AG	51	54,8	35	39,8		
		GG	12	12,9	23	26,1		
	AA và GG	AA	30	71,4	30	56,6	1,917 (0,809-4,539)	0,137
		GG	12	28,6	23	43,4		
	AA và AG	AA	30	37	30	46,2	0,686 (0,353-1,333)	0,266
		AG	51	63	35	53,8		
	AG và GG	AG	51	81	35	60,3	2,793 (1,230-6,340)	0,013
		GG	12	19	23	39,7		
	AA và AG+GG	AA	30	32,3	30	34,1	0,921 (0,496-1,710)	0,793
		AG+GG	63	67,7	58	65,9		
	AA+AG và GG	AA+AG	81	87,1	65	73,9	2,388 (1,105-5,161)	0,024
		GG	12	12,9	23	26,1		
	AG và AA+GG	AG	51	54,8	35	39,8	1,839 (1,018-3,320)	0,042
		AA+GG	42	45,2	53	60,2		

Tuổi phát hiện bệnh trung bình của các kiểu gen của SNP rs1799794 khác biệt không có ý nghĩa thống kê với $p=0,216$ (bảng 3). Tuy nhiên có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa cặp kiểu gen AG và GG trong ba nhóm tuổi phát hiện bệnh: tỷ lệ cặp kiểu gen AG và GG của nhóm ≤45 tuổi và nhóm 45-54 tuổi khác biệt nhau có ý nghĩa thống kê, tỷ lệ AG của nhóm ≤45 tuổi cao hơn nhóm 45-54 tuổi 2,72 lần. Tỷ lệ cặp kiểu gen AG và GG của nhóm ≤45 tuổi và nhóm >54 tuổi khác biệt nhau có ý nghĩa thống kê, tỷ lệ AG của nhóm ≤45 tuổi cao hơn nhóm >54 tuổi 2,908 lần.

Bảng 3. Mối liên quan giữa kiểu gen của SNP rs1799794 với tuổi phát hiện bệnh trung bình và giữa cặp kiểu gen AG và GG với các nhóm tuổi phát hiện bệnh.

rs1799794	AA		AG		GG		p
	n	Tuổi	n	Tuổi	n	Tuổi	
Tuổi phát hiện bệnh trung bình	72	47,76	95	46,21	41	49,29	0,216
Nhóm tuổi	AG và GG				OR		p
	AG		GG				
≤45	n	51	12				0,025
	%	81	19		2,720 (1,119-6,613)		
45-54	n	25	16				0,890
	%	61	39				
45-54	n	25	16				0,024
	%	61	39		1,069 (0,416-2,748)		
>54	n	19	13				
	%	59,4	40,6				
≤45	n	51	12				
	%	81	19		2,908 (1,130-7,482)		
>54	n	19	13				
	%	59,4	40,6				

Bàn luận

Tuổi phát hiện bệnh trung bình trong nghiên cứu là 47,36 tuổi, tương đồng với kết quả nghiên cứu trước đó của Ali và cs (2016) [6] cho kết quả tuổi phát hiện bệnh trung bình là 48 tuổi. Ung thư vú trong nghiên cứu gặp nhiều nhất ở nhóm tuổi tiền mãn kinh (≤45 tuổi), có sự khác biệt so với nghiên cứu của Dumitrescu và Cotarla (2005) [9] gặp nhiều nhất ở độ tuổi mãn kinh (45-54 tuổi). Sự khác biệt này có thể do sự khác biệt về gen, lối sống, thổ nhưỡng và các tác động ngoại cảnh. Tác động tổng hợp của các yếu tố này ảnh hưởng đến sự khởi phát ung thư vú, tuổi khởi phát bệnh trong nghiên cứu này xảy ra sớm hơn.

Kết quả nghiên cứu này cho thấy, không có mối liên quan giữa SNP rs1799794 của gen XRCC3 với nguy cơ mắc ung thư vú. Phân tích theo nhóm tuổi cho thấy, nhóm ≤45 tuổi có mối liên quan giữa các kiểu gen của SNP rs1799794 với nguy cơ mắc ung thư vú ($p=0,043$). Phân tích theo các mô hình di truyền cho thấy có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các cặp kiểu gen của nhóm bệnh và nhóm chứng: theo mô hình dị hợp, tỷ lệ mắc ung thư vú của nhóm kiểu gen GG thấp hơn 2,793 lần so với nhóm kiểu gen AG với $p=0,013$; theo mô hình di truyền lặn, tỷ lệ mắc ung thư vú ở nhóm kiểu gen GG thấp hơn 2,388 lần so với nhóm kiểu gen AA+AG với $p=0,024$; theo mô hình siêu trội, tỷ lệ mắc ung thư vú ở nhóm kiểu gen AG cao hơn 1,839 lần so với nhóm kiểu gen AA+GG với $p=0,042$. Như vậy, kiểu gen GG có tác dụng làm giảm nguy cơ ung thư vú, kiểu gen AG làm tăng nguy cơ mắc ung thư vú trước độ tuổi mãn kinh (≤45 tuổi). Các nghiên cứu trên thế giới về SNP rs1799794 cho kết quả không thống nhất giữa các loại ung thư khác nhau, và nghiên cứu trên cùng một loại ung thư cũng cho kết quả mâu thuẫn giữa các quần thể nghiên cứu khác nhau. Nghiên cứu về rs1799794 trên bệnh nhân ung thư vú trong quần thể người Đài Loan của Su và cs (2015) [10] cho kết quả rs1799794 không liên quan đến nguy cơ mắc ung thư vú với $p=0,5195$. Một nghiên cứu phân tích gộp của X.-F. He (2012) [8] trên quần thể đa chủng tộc cũng cho kết quả không có mối liên quan giữa rs1799794 với nguy cơ mắc ung thư vú. Một số nghiên cứu khác cho thấy có mối liên quan giữa rs1799794 với nguy cơ mắc ung thư vú: nghiên cứu của Ali và cs (2016) [6] cho kết quả SNP rs1799794 làm giảm nguy cơ ung thư vú, nhưng nghiên cứu của Al Zoubi và cs (2017) [7] cho kết quả rs1799794 làm tăng nguy cơ mắc ung thư vú. Đối với các loại ung thư khác, kết quả của các nghiên cứu về SNP rs1799794 vẫn tồn tại nhiều mâu thuẫn. Một nghiên cứu phân tích gộp được tiến hành trên quần thể người da trắng [11] cho kết quả rs1799794 có mối liên quan với nguy cơ mắc ung thư buồng trứng. Các nghiên cứu về ung thư phổi, ung thư phổi không tế bào nhỏ trong quần thể người Trung Quốc [12, 13] cho thấy rs1799794 lại có tác dụng làm giảm nguy cơ ung thư. Ngược lại, một nghiên cứu về ung thư tuyến giáp [14] trên quần thể người Pakistan cho thấy rs1799794 làm tăng nguy cơ ung thư. Một số nghiên

cứ về ảnh hưởng của rs1799794 với các phương pháp điều trị ung thư cũng cho kết quả khác nhau. Nghiên cứu tiến hành trên quần thể người Đức [15] cho thấy rs1799794 làm tăng hiệu quả điều trị hóa trị cho bệnh nhân ung thư thực quản - dạ dày. Bên cạnh đó, một nghiên cứu khác trên quần thể người Tây Ban Nha [16] cho thấy rs1799794 làm tăng nhiễm độc đường tiêu hóa sau xạ trị. Sự khác biệt trong kết quả nghiên cứu về rs1799794 trên các bệnh nhân ung thư có thể do trong những quần thể nghiên cứu khác nhau, sự phân bố của SNP có sự khác biệt, đồng thời cũng có sự khác biệt về mức độ và tính chất ảnh hưởng của tỷ lệ kiểu alen, kiểu gen của SNP đến sự phát triển bệnh. Ngoài ra, ung thư vú là một bệnh lý phức tạp với nhiều yếu tố nguy cơ, do đó SNP nói chung và SNP rs1799794 nói riêng chỉ đóng góp một phần tác động đến sự biểu hiện bệnh. Do vậy, nếu không xét trên tổng thể các yếu tố liên quan mang tính cá thể của từng bệnh nhân thì có thể dẫn đến những đánh giá kém chính xác về vai trò của SNP với bệnh lý ung thư.

Nghiên cứu này cho thấy, không có mối liên quan giữa SNP rs1799794 với tuổi phát hiện bệnh trung bình. Tuy nhiên, kiểu gen AG của SNP rs1799794 có liên quan với sự khởi phát sớm của ung thư vú, người có kiểu gen AG có tỷ lệ mắc ung thư vú trước tuổi mãn kinh (≤ 45 tuổi) cao hơn các nhóm tuổi khác (45-54 tuổi, > 54 tuổi).

Tóm lại, các quần thể khác nhau có tỷ lệ kiểu alen, kiểu gen của SNP khác nhau và đồng thời có sự khác biệt trong mối liên quan của SNP với sự tiến triển và điều trị bệnh. Do đó, nghiên cứu về SNP cần được tiến hành riêng biệt giữa các quần thể khác nhau để tìm ra markers đặc hiệu chẩn đoán bệnh của một quần thể nhất định. Những nghiên cứu về SNP góp phần phát triển y học cá thể với những chiến lược điều trị riêng cho từng người bệnh.

Kết luận

Nghiên cứu bước đầu xác định được sự phân bố SNP của rs1799794 gen XRCC3 trong nhóm bệnh lý ung thư vú và nhóm chứng tại Việt Nam. Kết quả phân tích cho thấy có mối liên quan giữa kiểu gen của SNP rs1799794 gen XRCC3 với nguy cơ mắc ung thư vú ở nhóm ≤ 45 tuổi. Kiểu gen AG của SNP rs1799794 có liên quan với sự khởi phát sớm ung thư vú, làm tăng nguy cơ mắc ung thư vú ở nhóm ≤ 45 tuổi. Kiểu gen GG có tác dụng làm giảm nguy cơ mắc ung thư vú ở nhóm ≤ 45 tuổi.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được thực hiện với sự hỗ trợ kinh phí của đề tài cấp Bộ Y tế: “Nghiên cứu xây dựng quy trình xác định đột biến và đa hình đơn nucleotid trên một số gen liên quan đến ung thư vú và ung thư buồng trứng”. Nhóm nghiên cứu trân trọng cảm ơn sự giúp đỡ của Bệnh viện K, Bệnh viện Phụ sản Trung ương, Bộ môn Hóa sinh - Trung tâm Nghiên cứu Gen - Protein, Trường Đại học Y Hà Nội.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] J. Ferlay, M. Colombet, I. Soerjomataram, et al. (2019), “Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods”, *Int. J. Cancer*, **144**(8), pp.1941-1953, DOI:10.1002/ijc.31937.
- [2] L.R. Ferguson, H. Chen, A.R. Collins, et al. (2015), “Genomic instability in human cancer: molecular insights and opportunities for therapeutic attack and prevention through diet and nutrition”, *Seminars in Cancer Biology*, **35**, pp.S5-S24, DOI:10.1016/j.semcancer.2015.03.005.
- [3] P.A. Jeggo, L.H. Pearl, A.M. Carr (2016), “DNA repair, genome stability and cancer: a historical perspective”, *Nature Reviews Cancer*, **16**(1), pp.35-42, DOI: 10.1038/nrc.2015.4.
- [4] F. Chai, Y. Liang, L. Chen, F. Zhang, J. Jiang (2015), “Association between XRCC3 Thr241Met polymorphism and risk of breast cancer: meta-analysis of 23 case-control studies”, *Med. Sci. Monit.*, **21**, pp.3231-3240.
- [5] A. Vral, P. Willems, K. Claes, B. Poppe, G. Perletti, H. Thierens (2011), “Combined effect of polymorphisms in Rad51 and Xrcc3 on breast cancer risk and chromosomal radiosensitivity”, *Mol. Med. Rep.*, **4**(5), pp.901-912, DOI: 10.3892/mmr.2011.523.
- [6] A.M. Ali, H. AbdulKareem, M. Al Anazi, et al. (2016), “Polymorphisms in DNA repair gene XRCC3 and susceptibility to breast cancer in Saudi females”, *Biomed. Res. Int.*, DOI:10.1155/2016/8721052.
- [7] M.S. Al Zoubi, K. Zavaglia, C. Mazanti, et al. (2017), “Polymorphisms and mutations in GSTP1, RAD51, XRCC1 and XRCC3 genes in breast cancer patients”, *Int. J. Biol. Markers*, **32**(3), pp.e337-e343, DOI: 10.5301/ijbm.5000258.
- [8] X.-F. He, W. Wei, J. Su, et al. (2012), “Association between the XRCC3 polymorphisms and breast cancer risk: meta-analysis based on case-control studies”, *Mol. Biol. Rep.*, **39**(5), pp.5125-5134, DOI: 10.1007/s11033-011-1308-y.
- [9] R.G. Dumitrescu, I. Cotarla (2005), “Understanding breast cancer risk - where do we stand in 2005?”, *J. Cell. Mol. Med.*, **9**(1), pp.208-221, DOI:10.1111/j.1582-4934.2005.tb00350.x.
- [10] C.-H. Su, W.-S. Chang, P.-S. Hu, et al. (2015), “Contribution of DNA double-strand break repair gene XRCC3 genotypes to triple-negative breast cancer risk”, *Cancer Genomics Proteomics*, **12**(6), pp.359-367.
- [11] C. Yuan, X. Liu, S. Yan, C. Wang, B. Kong (2014), “Analyzing association of the XRCC3 gene polymorphism with ovarian cancer risk”, *Biomed. Res. Int.*, DOI:10.1155/2014/648137.
- [12] F. He, S.-C. Chang, G.M. Wallar, Z.-F. Zhang, L. Cai (2013), “Association of XRCC3 and XRCC4 gene polymorphisms, family history of cancer and tobacco smoking with non-small-cell lung cancer in a Chinese population: a case-control study”, *J. Hum. Genet.*, **58**(10), pp.679-685, DOI: 10.1038/jhg.2013.78.
- [13] M. Huang, X. Chen, Y. Qiu, L. Fan, J. Chen, L. Cai (2011), “Relationship between XRCC3 gene polymorphisms and lung cancer”, *Wei Sheng Yan Jiu*, **40**(2), pp.187-190.
- [14] R. Sarwar, I. Mahjabeen, K. Bashir, S. Saeed, M.A. Kayani (2017), “Haplotype based analysis of XRCC3 gene polymorphisms in thyroid cancer”, *Cell. Physiol. Biochem.*, **42**(1), pp.22-33, DOI: 10.1159/000477109.
- [15] K. Ott, P.S. Rachakonda, B. Panzram, et al. (2011), “DNA repair gene and MTHFR gene polymorphisms as prognostic markers in locally advanced adenocarcinoma of the esophagus or stomach treated with cisplatin and 5-fluorouracil-based neoadjuvant chemotherapy”, *Ann. Surg. Oncol.*, **18**(9), pp.2688-2698, DOI: 10.1245/s10434-011-1601-y.
- [16] L. Fachal, A. Gómez-Caamaño, P. Peleteiro, et al. (2012), “Association of a XRCC3 polymorphism and rectum mean dose with the risk of acute radio-induced gastrointestinal toxicity in prostate cancer patients”, *Radiother. Oncol.*, **105**(3), pp.321-328, DOI:10.1016/j.radonc.2012.09.013.

Đánh giá độ chính xác và khả năng ứng dụng của phần mềm hỗ trợ khoanh đường Z tự động sử dụng thuật toán trí tuệ nhân tạo

Đào Việt Hằng^{1,2,3*}, Lê Quang Hưng³, Nguyễn Phúc Bình¹, Nguyễn Mạnh Hùng¹,
Mạnh Xuân Huy⁴, Nguyễn Hồng Anh⁴, Vũ Hải⁴

¹Viện Nghiên cứu và Đào tạo Tiêu hóa Gan mật

²Bộ môn Nội tổng hợp, Trường Đại học Y Hà Nội

³Trung tâm Nội soi, Bệnh viện Đại học Y Hà Nội

⁴Viện Nghiên cứu Quốc tế MICA, Trường Đại học Bách khoa Hà Nội

Ngày nhận bài 3/11/2020; ngày chuyển phản biện 6/11/2020; ngày nhận phản biện 21/12/2020; ngày chấp nhận đăng 28/12/2020

Tóm tắt:

Nghiên cứu nhằm khảo sát hiệu quả của công cụ phần mềm khi có/không có sự tương tác của các bác sĩ trong việc khoanh đường Z, được tiến hành từ 4/2019 đến 7/2020. Nhóm nghiên cứu thu thập 533 ảnh đường Z ở chế độ ánh sáng thường, đa dạng về hình thái, đảm bảo độ phân giải và chất lượng để xây dựng thuật toán xác định đường Z. Nhóm nghiên cứu đã xây dựng công cụ phần mềm khoanh đường Z với 4 chế độ bao gồm: chế độ thủ công, chế độ đánh dấu vùng, chế độ tự động toàn bộ, chế độ tích hợp giữa tự động và đánh dấu vùng có chọn lựa thông minh. Hai nhóm bác sĩ (nhóm có kinh nghiệm 1-2 năm và nhóm ≥ 5 năm) sử dụng phần mềm ở 4 chế độ để xác định đường Z trên tập kiểm thử gồm 30 ảnh độc lập với ảnh thu thập cho quá trình huấn luyện. So sánh kết quả thực hiện của các bác sĩ khi sử dụng công cụ có/không có tương tác thông qua các tiêu chí như: độ chính xác của đường Z, mức độ hài lòng, thời gian thực hiện ở các chế độ khoanh. Độ chính xác của mỗi kỹ thuật được đánh giá bằng chỉ số IoU (Intersection-over-Union). Kết quả nghiên cứu cho thấy mức điểm trung bình ở cả 4 chế độ đều cao, từ 86,7 đến 90,8%. Chỉ số IoU trên tập ảnh thực nghiệm của 2 chế độ đánh dấu vùng và tích hợp trung bình là 88% và không có sự khác biệt về thống kê so với chế độ khoanh vùng bằng tay. Tương tự, không có sự khác biệt về thời gian các bác sĩ khoanh vùng xác định đường Z ở chế độ đánh dấu vùng và chế độ tích hợp so với chế độ khoanh vùng bằng tay. Trung vị của số lần tương tác ở chế độ đánh dấu vùng và chế độ tích hợp lần lượt là 24,5 và 15,5 lần. Phần mềm được các bác sĩ đánh giá khá tốt, với mức điểm trung bình là 7,2, 7,3 và 7,2 tương ứng với chế độ tự động, chế độ đánh dấu vùng và chế độ tích hợp. Xây dựng phần mềm hỗ trợ xác định mốc giải phẫu ảnh nội soi là một hướng nghiên cứu rất mới và khả thi tại Việt Nam, hướng tiếp theo có thể tập trung là phát hiện, khoanh vùng cho một số loại tổn thương theo vị trí giải phẫu.

Từ khóa: học sâu, nội soi dạ dày, trí tuệ nhân tạo, xác định đường Z.

Chỉ số phân loại: 3.5

Đặt vấn đề

Tỷ lệ bỏ sót tổn thương ung thư đường tiêu hóa trên (bao gồm ung thư thực quản, ung thư dạ dày) trong các nghiên cứu trên thế giới dao động từ 11-26% và tỷ lệ sống sau 5 năm thấp, lần lượt là 13 và 17% [1-3]. Tuy nhiên, nếu được phát hiện ở giai đoạn sớm trong quá trình nội soi, tỷ lệ sống sau 5 năm có thể lên đến 80% [4]. Do vậy, việc chẩn đoán sớm và chính xác tổn thương đóng vai trò quan trọng quyết định thời gian sống thêm của bệnh nhân. Không đảm bảo đủ thời gian nội soi, không quan sát ở tất cả các vị trí theo quy trình nội soi chuẩn, không phát hiện được hoặc có ghi nhận nhưng không mô tả chi tiết, không sinh thiết tổn thương kể

cả khi đã thấy có hình ảnh nghi ngờ, không hện theo dõi lại là những yếu tố được ghi nhận có liên quan đến tình trạng bỏ sót tổn thương trong quá trình nội soi [5]. Tại Việt Nam, một nghiên cứu tiến hành năm 2016 bởi Bệnh viện Đại học Y Dược TP Hồ Chí Minh cho thấy, có tới 64,5% trong 141 bệnh nhân ung thư dạ dày từng được nội soi với kết quả chẩn đoán không phải ung thư [6]. Đặc biệt, có tới 58,2% số bệnh nhân có lần nội soi gần nhất trong vòng 2 năm với trung vị số lần nội soi là 2 lần và 46,2% số bệnh nhân có lần nội soi gần nhất trong vòng 6 tháng [6]. Thực trạng đáng báo động trên đặt ra nhu cầu cấp thiết trong cải thiện chất lượng quy trình nội soi nói chung và nâng cao kỹ

*Tác giả liên hệ: Email: hangdao.fsh@gmail.com

Accuracy and applicability of the artificial intelligence integrated software in Z-line segmentation

Viet Hang Dao^{1,2,3*}, Quang Hung Le³, Phuc Binh Nguyen¹, Manh Hung Nguyen¹,
Xuan Huy Manh⁴, Hong Anh Nguyen⁴, Hai Vu⁴

¹Institute of Gastroenterology and Hepatology

²Hanoi Medical University

³Endoscopy Center, Hanoi Medical University Hospital

⁴MICA Institute, Hanoi University of Science and Technology

Received 3 November 2020; accepted 28 December 2020

Abstract:

Conducted from April 2019 to July 2020, this study aimed to assess the software accuracy in assisting Z-line segmentation by comparing with medical doctors' detection results and by recording doctors' satisfaction in scale, time-of-implementation in interactive mode, and integrated mode. For the development of the Z-line detection algorithm, a dataset of 533 high-definition endoscopic WLI (white-light) images in diverse forms of Z-line were collected. The software was subsequently developed in 4 modes, including manual mode, interactive mode (using Superpixels-BPT), automatic mode (using AI algorithm), and integrated mode (the combination of BPT and U-Net). 30 endoscopic images were assigned to 2 groups of doctors (under 2-year experience and over 5-year experience) for the Z-line detection using the software in 4 modes. Time-of-implementation, number of mouse clicks, satisfaction in scales, and IoU (Intersection over Union) metric with expert's ground-truth are used for assessment. The results showed that IoU metrics of interactive and integrated modes in the experimental dataset was 88% with no statistical difference to the IoU value of manual mode, and mean IoU metrics from the results of 4 modes were high, from 86.7 to 90.8%. The mean values of time-of-implementation in interactive mode and integrated mode were not statistically different from manual mode. The median number of mouse-clicks each use in the interactive mode and the integrated mode were 24.5 and 15.5 times, respectively. The software received good feedbacks from the doctors, with the mean values of satisfaction scores of automatic mode, interactive mode and integrated mode are 7.2, 7.3, and 7.2 respectively. The development of the software for detecting endoscopic anatomy landmarks is a novel and feasible research direction in Vietnam. Further studies could focus on detecting some specific lesions classified according to anatomy landmarks.

Keywords: artificial intelligence, deep learning, gastric endoscopy, Z-line segmentation.

Classification number: 3.5

năng của bác sĩ nội soi nói riêng. Công tác nghiên cứu và ứng dụng các kỹ thuật mới đóng góp một phần cốt yếu trong giải quyết nhu cầu trên, mà một trong số đó là ứng dụng trí tuệ nhân tạo trong công tác đào tạo nội soi đường tiêu hóa.

Những năm gần đây, trí tuệ nhân tạo trong y tế đã được nghiên cứu và phát triển với nguồn dữ liệu ngày càng phong phú và đồ sộ. Trong lĩnh vực nội soi, năm 2019, nhóm nghiên cứu thuộc Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh [7] đã sử dụng tập dữ liệu ảnh KVASIR và BioMedia trên 4900 ảnh nội soi đại tràng để huấn luyện các mô hình học sâu phát hiện tổn thương và ghi nhận độ chính xác đạt từ 93,04% và thời gian xử lý ảnh ở mức chấp nhận được là 23,19 khung ảnh trên giây (frame per second - fps). Năm

2019, nhóm nghiên cứu của chúng tôi [8] đã xây dựng thuật toán sử dụng mạng nơ-ron tích chập để xác định vị trí giải phẫu của dạ dày qua nội soi đường tiêu hóa trên từ 3128 ảnh nội soi dạ dày được gán nhãn. Kết quả cho thấy, thuật toán đã hỗ trợ rút ngắn thời gian phân loại của 3 chuyên gia (3,86 phút), ngắn hơn nhiều so với phân loại bằng tay (12,82 phút) với độ chính xác trung bình là 92,48%. Trên cơ sở đó, chúng tôi đã tiến hành xây dựng một phần mềm thông minh khoanh vùng xác định đường Z là đường ranh giới giữa niêm mạc thực quản và dạ dày. Phần mềm được xây dựng trên cơ sở ứng dụng các thuật toán học máy và xử lý ảnh nhằm đánh giá tính khả thi và tính hiệu quả của mỗi kỹ thuật trong việc xác định đường Z. Chúng tôi xây dựng

phần mềm với các chế độ khoan vùng như: thủ công, tự động toàn bộ và chế độ bán tự động (cần thêm sự hiệu chỉnh tương tác của bác sĩ) nhằm ứng dụng cho công tác đào tạo. Xác định đúng vị trí và đánh giá đặc điểm đường Z là bước rất quan trọng trong quy trình chẩn đoán một số bệnh lý đang có xu hướng tăng lên như viêm thực quản trào ngược, Barrett thực quản, ung thư tâm vị. Kết quả của mỗi chế độ khoan được thể hiện thông qua các đánh giá về độ chính xác của vùng khoan khi so sánh với dữ liệu khoan chuẩn; ghi nhận mức độ hài lòng; số lần tương tác của bác sĩ (nếu có); thời gian thực hiện ở các chế độ.

Phương pháp nghiên cứu

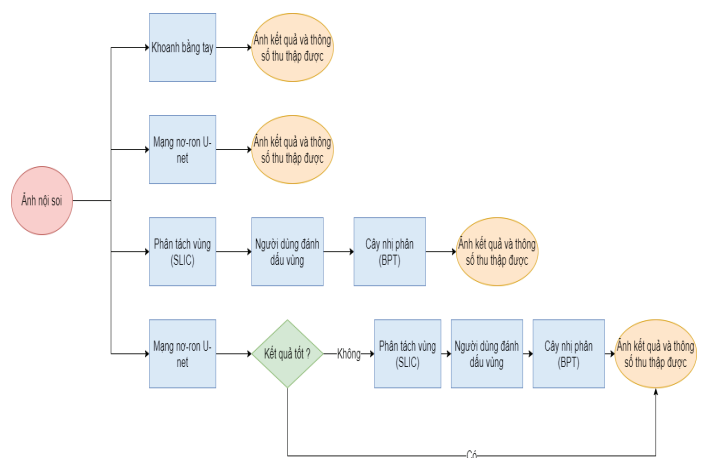
Nghiên cứu được thực hiện tại Viện Nghiên cứu và Đào tạo Tiêu hóa, Gan mật từ tháng 4/2019 đến tháng 7/2020. Hình ảnh nội soi thực quản được thu thập trên 3 hệ thống nội soi độ phân giải cao của Fujifilm bao gồm 600, 7000 và LASEREO ở chế độ ánh sáng thường. Các hình ảnh thu thập được nhóm nghiên cứu xóa toàn bộ thông tin định danh của người bệnh, đồng thời đảm bảo chất lượng rõ nét, không bị tối, mờ và độ sạch đảm bảo không phải bơm rửa.

Phương pháp xây dựng và huấn luyện thuật toán

Hình 1 minh họa 4 chế độ khoan vùng được nghiên cứu và phát triển, trong đó chế độ khoan vùng thủ công hoàn toàn thực hiện bởi bác sĩ. Một số đặc điểm của các chế độ khoan vùng tự động và bán tự động như sau:

Chế độ khoan vùng tự động (toàn bộ): chúng tôi đã triển khai mô hình mạng nơ-ron U-net [9]. Đây là mạng nơ-ron đã thành công trong nhiều bài toán khoan vùng ảnh y tế. Trong nghiên cứu này, mạng U-net đã được lựa chọn và xây dựng với mục đích phân đoạn đường Z thông qua việc xác định vùng thực quản và dạ dày trong ảnh nội soi. Mạng được huấn luyện bởi 533 ảnh của 100 bệnh nhân đã được các chuyên gia khoan vùng. Sau khi các tham số của mạng được huấn luyện và lựa chọn tối ưu, mô hình mạng sẽ được kiểm chứng thêm bằng 121 ảnh độc lập.

Chế độ khoan vùng bán tự động: nhóm nghiên cứu đã lựa chọn thuật toán SLIC (Simple Linear Iterative Clustering) [10]. Thuật toán này đề xuất kỹ thuật để phân cụm bức ảnh ra thành nhiều vùng, trong đó mỗi vùng có sự đồng nhất về màu sắc cũng như cấu trúc của các điểm ảnh bên trong. Các vùng này (super-pixel) được liên kết với nhau thông qua 1 cây nhị phân nhiều tầng BPT (Binary partition tree) [11]. Khi bác sĩ đánh dấu vùng (thực quản, dạ dày) bằng nét vẽ sử dụng chuột, cây nhị phân sẽ dựa vào các gợi ý đó để tạo ra đường phân tách (đường Z) bằng cách truy ngược nhãn tương tự (với vùng đã đánh dấu) từ vùng ở tầng thấp lên vùng ở tầng cao, tiếp theo truy xuôi nhãn đánh dấu từ tầng cao xuống.

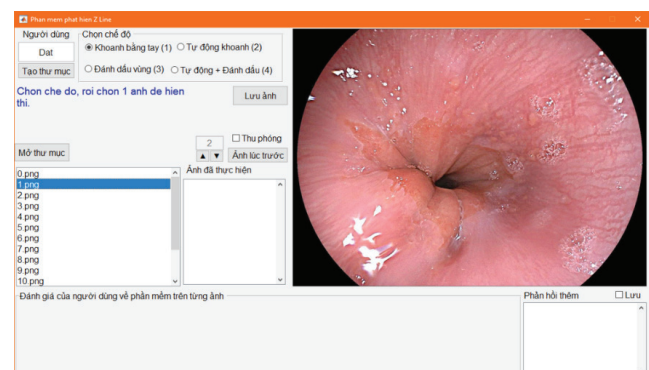


Hình 1. Sơ đồ khối cách vận hành của phần mềm so sánh 4 chế độ khoan đường Z.

Xây dựng phần mềm so sánh các phương pháp khoan vùng đường Z

Hình 2 minh họa giao diện phần mềm khoan vùng đường Z được phát triển bằng MATLAB. Phần mềm có giao diện trực quan, dễ hiểu, hỗ trợ 4 chế độ khoan đường Z bao gồm:

- Chế độ khoan vùng bằng tay: các bác sĩ sau khi hoàn thành bước chọn ảnh sẽ sử dụng chuột trái để tô viền, xác định đường Z mà không có bất kỳ sự hỗ trợ nào của phần mềm.
- Chế độ khoan vùng tự động: ảnh sẽ được tự động khoan vùng đường Z bằng mô hình mạng nơ-ron đã được huấn luyện.
- Chế độ đánh dấu vùng (bán tự động - mode 1): cho phép bác sĩ đánh dấu khu vực nằm trong và nằm ngoài đường Z, phần mềm sẽ tự động xác nhận và hiển thị ranh giới trên giao diện. Bác sĩ sẽ tiếp tục sử dụng chuột trái và chuột phải để xác định lại 2 vùng nếu kết quả hiển thị đường Z chưa chính xác.
- Chế độ khoan vùng tích hợp (bán tự động - mode 2): là chế độ kết hợp giữa 2 phương pháp đánh dấu vùng và tự động khoan đường Z bằng mô hình mạng nơ-ron. Theo đó, sau khi lựa chọn ảnh, bác sĩ sẽ đợi cho đến khi đường Z xuất hiện trên giao diện phần mềm rồi sử dụng chuột trái và chuột phải để tiếp tục xác định lại các khu vực trong và ngoài đường Z.

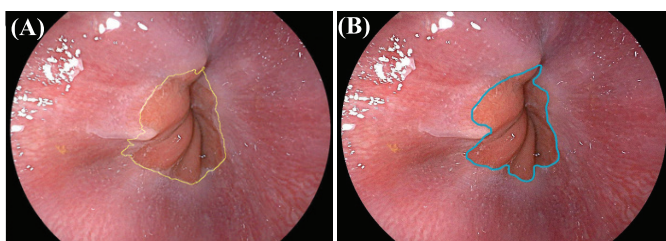


Hình 2. Giao diện phần mềm khoan vùng để xác định đường Z.

Trong quá trình khoan, phần mềm sẽ ghi nhận số lần bấm chuột trong mỗi ảnh, thời gian để thực hiện và ảnh kết quả khoan. Đồng thời, các bác sĩ sẽ tiến hành đánh giá phần mềm trên thang điểm từ 0 đến 10 và ghi lại các góp ý phản hồi sau mỗi lần hoàn thành quá trình khoan vùng.

Đánh giá độ chính xác của thuật toán và quá trình khoan vùng bằng phần mềm của bác sĩ

Chúng tôi thu thập 30 ảnh nội soi tại vùng phân tách dạ dày - thực quản ở phân đoạn thực quản trên làm tập thực nghiệm. Phần mềm sẽ được đánh giá dựa trên kết quả khoan vùng của 30 ảnh trên trên 2 nhóm bác sĩ, bao gồm nhóm 3 bác sĩ có kinh nghiệm nội soi từ 1-2 năm và nhóm 3 bác sĩ có kinh nghiệm nội soi ≥ 5 năm. Tập ảnh thực nghiệm được 2 nhóm bác sĩ thực hiện xác định đường Z bằng phần mềm khoan vùng. Đồng thời, tập ảnh thực nghiệm cũng được chuyển tới chuyên gia để khoan vùng đường Z làm dữ liệu chuẩn (ground-truth). Hình 3 minh họa sự khác biệt giữa dữ liệu chuẩn (hình 3A) và kết quả từ chế độ khoan tự động (hình 3B). Độ chính xác của vùng khoan được đánh giá thông qua chỉ số IoU (Intersection-over-Union).



Hình 3. Minh họa dữ liệu khoan chuẩn (A) và khoan tự động (B).

Chỉ số IoU là tỷ lệ % giữa phần giao của 2 vùng khoan với phần hợp, giúp đánh giá mức trùng khớp của mỗi ảnh thuộc tập thực nghiệm so với ảnh tương ứng ở tập mẫu (ground-truth) [12]. Mức độ trùng khớp của ảnh được khoan bởi thuật toán và so với ảnh mẫu thường được xếp hạng “Kém” khi chỉ số IoU $< 50\%$, “Trung bình” ở mức 50-75%, “Tốt” khi chỉ số IoU ở mức 75-90%, “Rất tốt” ở mức $> 90\%$ [13].

Kết quả nghiên cứu

Nghiên cứu được tiến hành từ tháng 4/2019 đến tháng 7/2020 tại Viện Nghiên cứu và Đào tạo Tiêu hóa, Gan mật. Bảng 1 trình bày các giá trị thống kê của chỉ số IoU với tập 30 ảnh kiểm thử ở 4 chế độ khoan. Kết quả này cho thấy sự sai khác giữa chế độ khoan tự động (toàn bộ) với khoan bằng tay là 4,1%. Mức độ trùng khớp ở cả 3 nhóm đều rất cao, với kết quả kiểm định t (t-test) của các điểm IoU trung bình ở 4 chế độ đều trên 85% với p-value nhỏ hơn 0,05. Bảng 1 cũng cho thấy, chỉ số IoU ở chế độ khoan bằng tay và chế độ tích hợp có giá trị nhỏ nhất đều thấp hơn 50%.

Bảng 1. Chỉ số IoU của từng ảnh được khoan bởi phần mềm ở 4 chế độ.

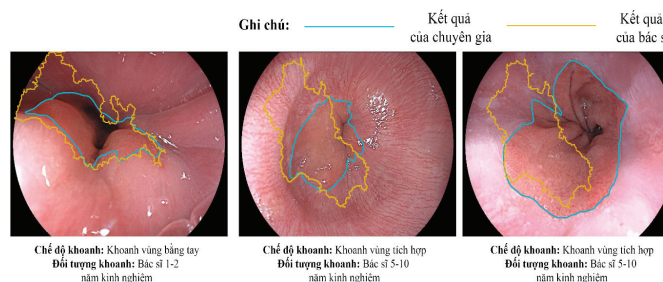
	Điểm trung bình (%)	Độ lệch chuẩn	Giá trị lớn nhất (%)	Trung vị (%)	Giá trị nhỏ nhất (%)	p-value
Chế độ khoan bằng tay	90,8	7,3	97,7	93,6	48,7	0,00
Chế độ tự động	86,7	9,5	95,9	90,8	57,2	0,02
Chế độ đánh dấu vùng	88,0	7,5	96,8	90,5	55,4	0,00
Chế độ tích hợp	88,0	9,0	96,4	90,9	33,2	0,00

Bảng 2 xếp hạng mức độ trùng khớp của ảnh được bác sĩ khoan vùng bằng phần mềm ở các chế độ so ảnh được khoan bởi chuyên gia (ground-truth) giữa 2 nhóm bác sĩ và chế độ khoan vùng tự động.

Bảng 2. Chỉ số IoU của 2 nhóm bác sĩ trên các chế độ khoan vùng.

	Bác sĩ 1-2 năm kinh nghiệm			Bác sĩ ≥ 5 năm kinh nghiệm			Tự động
	Khoan vùng bằng tay	Đánh dấu vùng	Tích hợp	Khoan vùng bằng tay	Đánh dấu vùng	Tích hợp	
Kém	1 (1,1%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (2,2%)	0 (0%)
Trung bình	0 (0%)	5 (5,6%)	5 (5,6%)	4 (4,4%)	4 (4,4%)	5 (5,6%)	18 (10%)
Tốt	26 (28,9%)	39 (43,3%)	33 (36,7%)	20 (22,2%)	37 (41,1%)	33 (36,7%)	66 (36,7%)
Rất tốt	63 (70%)	46 (51,1%)	52 (57,7%)	66 (73,4%)	49 (54,5%)	50 (55,5%)	96 (53,3%)

Phần mềm ghi nhận độ chính xác khá cao, với $\geq 90\%$ số ảnh đều có chỉ số IoU được xếp hạng “Tốt” và “Rất tốt”. 3 ảnh có chỉ số IoU dưới 50% được khoan bởi 2 chế độ “Khoan vùng bằng tay” và chế độ “Tích hợp”. Hình 4 minh họa trường hợp 3 ảnh được xếp hạng IoU “Kém”. Kết quả phân đoạn (màu cam) được vẽ cùng với vùng do chuyên gia khoan (màu xanh).



Hình 4. Một số minh họa kết quả khoan vùng của bác sĩ so với chuyên gia ở các ảnh có chỉ số IoU < 50 (kết quả khoan kém).

Chi tiết các kết quả thực hiện của hai nhóm bác sĩ, thực hiện ở các chế độ khác nhau được trình bày trong bảng 3. Riêng chế độ khoan tự động, kết quả không có sự khác biệt giữa hai nhóm bác sĩ. Đồng thời, không có giá trị thống kê ở chế độ này. Tiêu chí đánh giá về số lần thao tác chuột cũng không có kết quả với chế độ này.

Bảng 3. So sánh quá trình thực hiện của 2 nhóm bác sĩ.

	Bác sĩ 1-2 năm kinh nghiệm	Bác sĩ ≥5 năm kinh nghiệm	Chung
Thời gian thực hiện (giây)			
Khoanh vùng bằng tay, <i>Trung vị (Q1-Q3)</i>	66,5 (38-151)	36,5 (29-68)	45,5 (31-110,5)
Tự động, <i>Trung vị (Q1-Q3)</i>	0,5 (0,5-0,5)		
Đánh dấu, <i>Trung vị (Q1-Q3)</i>	83 (43-127)	97,5 (52-163)	88,5 (44,5-137)
Tích hợp (tự động và đánh dấu), <i>Trung vị (Q1-Q3)</i>	68,5 (34-132)	85 (44-147)	78,5 (39,5-139)
Thao tác chuột (số lần)			
Đánh dấu, <i>Trung vị (Min-Max)</i>	24 (4-87)	25 (2-78)	24,5 (2-87)
Tích hợp (tự động và đánh dấu), <i>Trung vị (Min-Max)</i>	15 (3-93)	16,5 (3-109)	15,5 (3-109)
Độ hài lòng (điểm)			
Tự động, <i>Trung bình (Min-Max)</i>	7,0 (4-9)	7,4 (1-9)	7,2 (1-9)
Đánh dấu, <i>Trung bình (Min-Max)</i>	7,1 (4-9)	7,4 (1-9)	7,3 (1-9)
Tích hợp (tự động và đánh dấu), <i>Trung bình (Min-Max)</i>	6,8 (4-9)	7,6 (1-9)	7,2 (1-9)

Trung vị thời gian thực hiện của nhóm bác sĩ có 1-2 năm kinh nghiệm ở chế độ khoanh vùng bằng tay, chế độ đánh dấu vùng và chế độ tích hợp lần lượt dao động từ 66,5 giây đến 83 giây, ở nhóm bác sĩ kinh nghiệm tương ứng từ 36,5 đến 97,5 giây. Trong khi đó, thời gian hoàn thành khoanh vùng bằng chế độ tự động của phần mềm ghi nhận thời gian là 0,5 giây ở tất cả các ảnh. Kết quả so sánh 2 trung bình sử dụng kiểm định t ghép cặp cho thấy sự khác biệt có ý nghĩa thống kê trong thời gian khoanh vùng bằng chế độ tự động và 3 chế độ còn lại, đồng thời cũng có sự khác biệt trong thời gian thực hiện chế độ khoanh vùng bằng tay ở 2 nhóm bác sĩ với mức ý nghĩa 95%. Trung vị số lần bấm chuột ở chế độ đánh dấu vùng và chế độ tích hợp lần lượt là 24 và 15 ở nhóm bác sĩ có 1-2 năm kinh nghiệm, 25 và 16,5 ở nhóm bác sĩ trên 5 năm kinh nghiệm. Số lần bấm chuột trung bình ở chế độ tích hợp thấp hơn so với chế độ đánh dấu vùng, khác biệt có ý nghĩa thống kê với mức ý nghĩa 95%. Điểm hài lòng của các bác sĩ ở 3 chế độ: tự động, đánh dấu vùng và tích hợp lần lượt là 7,2, 7,3 và 7,2. Không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các chế độ khoanh vùng.

Bàn luận

Nội soi đường tiêu hóa là thủ thuật xâm lấn và đóng vai trò quan trọng trong chẩn đoán cũng như can thiệp đối với các bệnh lý của đường tiêu hóa. Do vậy, việc đào tạo các bác sĩ nội soi cần đảm bảo các tiêu chí về cả kiến thức, kỹ năng và thái độ [14, 15]. Tuy nhiên, mô hình đào tạo truyền thống ở nhiều nước (trong đó có Việt Nam) vẫn là hình thức cầm tay chỉ việc, thực hành trực tiếp trên bệnh nhân dưới sự hướng dẫn và giám sát của các bác sĩ nội soi có kinh nghiệm. Hội Nội soi Tiêu hóa Hoa Kỳ năm 2019 nhấn mạnh khía cạnh đào tạo nội soi cần dựa trên các phản hồi và tiêu chí đánh giá năng lực rõ ràng giúp tạo động lực cho cả giảng

viên và học viên cũng như tích hợp chương trình đã được chuẩn hóa với tình hình thực tế của đơn vị [16]. Như vậy, bài toán đặt ra cho các đơn vị có nguồn lực hạn chế như ở nước ta là cần tìm mô hình đào tạo phù hợp với tình hình thực tế nhưng vẫn đảm bảo được chất lượng cho bác sĩ nội soi. Hiện tại ở nước ta, các khóa học nội soi với hình thức giảng dạy là cầm tay chỉ việc có thời gian từ 03-06 tháng [14-16]. Tuy nhiên, tùy thuộc vào điều kiện của đơn vị đào tạo và cơ cấu dịch tễ bệnh tật của bệnh nhân đến khám, tính đa dạng về hình ảnh tổn thương nội soi mà học viên được quan sát trong thời gian học và cách nhận định có thể sẽ có sự khác biệt lớn. Cho đến nay vẫn chưa có danh mục cụ thể cũng như tài liệu chuẩn về chương trình đào tạo nội soi đường tiêu hóa áp dụng cho tất cả các đơn vị đào tạo nội soi trong cả nước cũng như phản hồi đánh giá chất lượng đào tạo khi học viên trở về các tuyến. Vì vậy, việc xây dựng các thuật toán và công cụ tự động, bán tự động có khả năng tương tác với bác sĩ trong xác định vị trí giải phẫu và phát hiện tổn thương là một hướng đi mới và cần được đánh giá tính khả thi trong thực tiễn, vì giúp giải quyết vấn đề về tính đa dạng hình ảnh, tiết kiệm được nguồn lực đào tạo.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi ghi nhận không có sự khác biệt đáng kể về mức độ chính xác (thông qua độ đo là chỉ số IoU) trong khoanh vùng đường Z giữa nhóm bác sĩ mới, bác sĩ có kinh nghiệm và thuật toán tự động. Điều này cũng phù hợp với một số nghiên cứu trên thế giới và tại Việt Nam ghi nhận các thuật toán trí tuệ nhân tạo được xây dựng có khả năng xác định chính xác các vị trí giải phẫu của đường tiêu hóa trên [8, 17]. Kết quả nghiên cứu của nhóm chúng tôi năm 2019 [8] cũng ghi nhận thuật toán xác định vị trí giải phẫu dạ dày đã hỗ trợ rút ngắn thời gian phân loại của 3 chuyên gia xuống 3,86 phút, ngắn hơn nhiều so với phân loại bằng tay (12,8 phút) với độ chính xác trung bình là 92,5%. Như vậy, việc ứng dụng trí tuệ nhân tạo trong nội soi sẽ góp phần hỗ trợ các bác sĩ nội soi trong việc phân tích nhận định hình ảnh với thời gian ngắn hơn và độ chính xác cao.

Ở nghiên cứu này, chúng tôi cũng ghi nhận có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về thời gian khoanh vùng bằng tay giữa nhóm bác sĩ mới và bác sĩ có kinh nghiệm. Như vậy, chế độ khoanh tự động của công cụ đảm bảo được độ chính xác gần tương đương, mức độ hài lòng xấp xỉ 7/10 và có ưu thế về mặt thời gian. Đây có thể là bước khởi đầu cho thấy tính khả thi, khả năng chấp nhận khi ứng dụng công cụ sang bài toán phát hiện, đánh dấu tổn thương để phục vụ công tác đào tạo. Năm 2019, Bergman và cs [18] đã phát triển công cụ đào tạo dựa trên nền tảng website để hỗ trợ bác sĩ nội soi nâng cao khả năng phát hiện và khoanh vùng các tổn thương Barrett thực quản có nghi ngờ ác tính. Các kết quả nghiên cứu bước đầu ghi nhận đào tạo bằng công cụ này giúp tăng khả năng phát hiện tổn thương lên >30% cũng như tăng tính đồng thuận giữa các bác sĩ khi nhận định. Điểm đặc biệt là chỉ số cải thiện đều tăng đối với các bác sĩ nội soi thuộc nhiều quốc gia và ở nhiều trình độ khác biệt.

Về mặt kỹ thuật, kết quả của chế độ tự động toàn bộ cho thấy việc sử dụng mạng U-net trong khoanh vùng đường Z (phân tách thực quản - dạ dày) là phù hợp. Kết quả của U-net đã được cải thiện ở hai chế độ khoanh vùng bán tự động. Kết quả này cho thấy có sự khác biệt về thời gian và độ chính xác khi áp dụng mô hình mạng nơ-ron kết hợp với các tương tác của con người. Mạng U-net đã xây dựng có ưu điểm là số lượng tham số nhỏ, chạy nhanh, trên cấu hình máy thông thường (không có GPU). Trong các thử nghiệm cho thấy mạng được huấn luyện đã học theo những nét khoanh vùng của bác sĩ có nhiều năm kinh nghiệm. Từ kết quả khoanh của mạng nơ-ron đã giúp cho những bác sĩ ít kinh nghiệm giảm được phần lớn thời gian khoanh mà vẫn giữ được độ chính xác ở mức cao và ổn định. Từ kết quả này, nhóm nghiên cứu hy vọng việc áp dụng mạng nơ-ron trong tương lai sẽ giúp đẩy nhanh quá trình đào tạo các bác sĩ còn ít kinh nghiệm. Tuy nhiên, hai thuật toán SLIC và BPT có mục đích là giúp hội tụ nhanh quá trình tương tác của bác sĩ chưa cho thấy hiệu quả, mặc dù kết quả có được cải thiện. Chúng tôi sẽ tiếp tục thử nghiệm và cải tiến hướng tiếp cận này trong các nghiên cứu tiếp theo.

Kết luận

Xây dựng phần mềm hỗ trợ xác định mốc giải phẫu ảnh nội soi là một hướng nghiên cứu rất mới và khả thi tại Việt Nam. Hướng nghiên cứu tiếp theo là phát hiện, khoanh vùng cho một số loại tổn thương xung quanh vị trí đường Z.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] A.R. Pimenta-Melo, et al. (2016), "Missing rate for gastric cancer during upper gastrointestinal endoscopy: a systematic review and meta-analysis", *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.*, **28**(9), pp.1041-1049.
- [2] M.E. Voutilainen, M.T. Juhola (2005), "Evaluation of the diagnostic accuracy of gastroscopy to detect gastric tumours: clinicopathological features and prognosis of patients with gastric cancer missed on endoscopy", *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.*, **17**(12), pp.1345-1349.
- [3] S. Yalamarthy, et al. (2004), "Missed diagnoses in patients with upper gastrointestinal cancers", *Endoscopy*, **36**(10), pp.874-879.
- [4] Menon, Shyam, Trudgill, Nigel (2014), "How commonly is upper gastrointestinal cancer missed at endoscopy? a meta-analysis", *Endoscopy International Open*, **2**(2), pp.E46-E50.
- [5] P.G. Delgado Guillena, et al. (2019), "Gastric cancer missed at esophagogastroduodenoscopy in a well-defined Spanish population", *Dig. Liver Dis.*, **51**(8), pp.1123-1129.
- [6] Hà Văn Đến và Quách Trọng Đức (2018), "Tần suất và đặc điểm carcinôm dạ dày giai đoạn tiền triển ở bệnh nhân đã từng được nội soi dạ dày nhưng chưa xác định bệnh", *Y học TP Hồ Chí Minh*, **22**(6), tr.56-62.
- [7] Hoang Trung-Hieu, et al. (2019), "Enhancing endoscopic image classification with symptom localization and data augmentation", *Proceedings of the 27th ACM International Conference on Multimedia*, Association for Computing Machinery, Nice, France, pp.2578-2582.
- [8] Đào Việt Hằng và các cs (2019), "Xác định vị trí giải phẫu của dạ dày qua nội soi đường tiêu hóa trên sử dụng mạng nơ-ron tích chập", *Tạp chí Y học Thực hành*, **1120**(12), tr.10-12.
- [9] Ronneberger, Olaf, Fischer, Philipp, Brox, Thomas (2015), "U-net: convolutional networks for biomedical image segmentation", *Medical Image Computing and Computer-Assisted Intervention - MICCAI 2015*, Springer International Publishing, Cham, pp.234-241.
- [10] Achanta, Radhakrishna, et al. (2010), "SLIC superpixels", *EPFL Technical Report 149300*, 15pp.
- [11] P. Salembier, L. Garrido (2000), "Binary partition tree as an efficient representation for image processing, segmentation, and information retrieval", *IEEE Transactions on Image Processing*, **9**(4), pp.561-576.
- [12] M.A. Rahman, Wang Yang (2016), "Optimizing intersection-over-union in deep neural networks for image segmentation", *International Symposium on Visual Computing Conference*, pp.234-244, DOI: 10.1007/978-3-319-50835-1_22.
- [13] PYImageSearch (2016), *Intersection over Union (IoU) for Object Detection*, <https://www.pyimagesearch.com/2016/11/07/intersection-over-union-iou-for-object-detection/>, 08/24/2020.
- [14] S.G. Patel, et al. (2015), "Status of competency-based medical education in endoscopy training: a nationwide survey of US ACGME-accredited gastroenterology training programs", *Am. J. Gastroenterol.*, **110**(7), pp.956-962.
- [15] Sonnenberg, Amnon (2017), "Limitations of teaching endoscopy", *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, **30**(3), DOI: 10.1097/MEG.0000000000001041.
- [16] A. Waschke Kevin, et al. (2019), "ASGE principles of endoscopic training", *Gastrointestinal Endoscopy*, **90**(1), pp.27-34.
- [17] H. Takiyama, et al. (2018), "Automatic anatomical classification of esophagogastroduodenoscopy images using deep convolutional neural networks", *Sci. Rep.*, **8**(1), DOI: 10.1038/s41598-018-25842-6.
- [18] J.J.G.H.M. Bergman, et al. (2019), "An interactive web-based educational tool improves detection and delineation of barrett's esophagus-related neoplasia", *Gastroenterology*, **156**(5), pp.1299-1308.e3, DOI: 10.1053/j.gastro.2018.12.021.

Phát hiện đột biến gen *UGT1A1* gây hội chứng Gilbert ở bệnh nhân Việt Nam

Nguyễn Thị Thanh Hoa¹, Đậu Quang Liêu², Nguyễn Đăng Tôn^{1,3},
Nguyễn Hải Hà^{1,3*}, Trần Ngọc Ánh²

¹Viện Nghiên cứu hệ gen, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (VAST)

²Bệnh viện Đại học Y Hà Nội

³Trường Đại học Khoa học và Công nghệ Hà Nội, VAST

Ngày nhận bài 28/12/2020; ngày chuyển phản biện 30/12/2020; ngày nhận phản biện 25/1/2021; ngày chấp nhận đăng 28/1/2021

Tóm tắt:

Hội chứng Gilbert (GS) là một rối loạn chuyển hóa bilirubin di truyền phổ biến nhất, không gây hại, được tìm thấy trong khoảng 3-12% dân số. Các biến thể di truyền của gen mã hóa UDP-glucuronosyltransferase 1A1 (*UGT1A1*) có thể làm giảm hoạt động phiên mã của gen và mức độ biểu hiện của enzyme này, từ đó ảnh hưởng đến khả năng liên hợp glucuronide hóa ở gan. Nghiên cứu này nhằm phát hiện biến thể gen *UGT1A1* ở hai nam bệnh nhân là anh em ruột, nhập viện với các biểu hiện vàng da nghi do rối loạn chuyển hóa bilirubin. Mẫu máu ngoại vi của bệnh nhân (GS1) và anh trai (GS2) được sử dụng để tách chiết ADN tổng số, giải trình tự toàn bộ vùng enhancer, promoter và toàn bộ 5 exon của gen *UGT1A1*. Hai biến thể c.-3279T>G trong mô đun tăng cường đáp ứng phenobarbital của enhancer và A(TA)₇TAA tại hộp TATA trong vùng promoter của gen đã được phát hiện. Đây là các biến thể gen gây bệnh thường gặp trên đối tượng có nồng độ bilirubin máu cao đã công bố trước đây. Kết quả thu được hỗ trợ cho việc chẩn đoán chính xác nguyên nhân gây bệnh, đồng thời đưa ra cảnh báo cho bệnh nhân cần thận trọng với việc sử dụng được phẩm trong tương lai.

Từ khóa: gen *UGT1A1*, hội chứng Gilbert, vàng da.

Chỉ số phân loại: 3.5

Đặt vấn đề

Hội chứng Gilbert là một rối loạn chuyển hóa bilirubin di truyền phổ biến nhất, không gây hại, được đặc trưng bởi tăng bilirubin máu không liên hợp nhẹ khoảng 1-5 mg/dl, mạn tính trong trường hợp không có bất thường về chức năng gan hoặc tan huyết và được tìm thấy trong khoảng 3-12% dân số [1, 2]. Các biến thể di truyền của gen UDP-glucuronosyltransferase 1A1 (*UGT1A1*) có thể làm giảm hoạt động phiên mã của gen và nồng độ enzyme *UGT1A1*, ảnh hưởng đến khả năng liên hợp (glucuronide hóa gan), cuối cùng dẫn đến hội chứng Gilbert [2]. Liên quan đến tình trạng bilirubin không liên hợp trong máu cao do di truyền còn có hội chứng Crigler-Najjar type II (CN-2) với tỷ lệ mắc là khoảng 0,6-1 phần triệu dân số [3]. Thông thường, đường giới hạn giữa Gilbert và CN-2 là 6,0 mg/dl (102,6 µM), điều này có thể gây khó khăn trong chẩn đoán phân biệt Gilbert và CN-2 ngay cả sau giai đoạn sơ sinh, bởi vì một số lượng đáng kể bệnh nhân có nồng độ bilirubin huyết thanh trung gian giữa hai hội chứng. Do đó, các tiêu chuẩn chẩn đoán cho chứng tăng bilirubin không liên hợp nên được xem xét lại dựa trên các biểu hiện lâm sàng và phân tích kiểu gen của *UGT1A1* [4].

Gen *UGT1A1* nằm tại vị trí 2q37.1 của nhiễm sắc thể số 2 với chiều dài 13052 bp gồm 5 exon mã hóa cho phân tử

protein chứa 533 acid amin. Cho đến nay, có hơn 130 đột biến đã được xác định trên gen *UGT1A1*, trong đó có khoảng 8 đột biến (6,1%) nằm trên vùng không mã hóa như promoter, enhancer và các intron [5]. Phổ biến nhất là 2 đột biến chèn TA trong hộp TATA [A(TA)₇TAA] (*UGT1A1**28) và thay đổi nucleotide c.211G>A (p.G71R) trong exon 1 (*UGT1A1**6) [6]. Các đột biến gây hội chứng Gilbert làm giảm 30% hoạt động của enzyme *UGT1A1* so với bình thường. Mức độ chuyển hóa bilirubin thấp của enzym cũng có thể làm tăng tác dụng phụ của một số loại thuốc vì nó tham gia đào thải các loại thuốc này khỏi cơ thể. Những loại thuốc này gồm có irinotecan (Camptosar) dùng phổ biến trong liệu pháp hóa trị ung thư và một số chất ức chế protease được sử dụng để điều trị HIV...[7]. Phân tích kiểu gen *UGT1A1* nhằm xác định nguyên nhân gây vàng da do hội chứng Gilbert, nhờ đó hạn chế các xét nghiệm/thủ tục không cần thiết khác như sinh thiết gan, đồng thời là yếu tố quan trọng cho dự đoán và phòng ngừa tác dụng phụ bất lợi ở những người này [8]. Các kỹ thuật đã được sử dụng để xác định đột biến gen gây hội chứng Gilbert bao gồm: giải trình tự gen trực tiếp, biến tính sắc ký lỏng hiệu suất cao, phản ứng chuỗi polymerase (PCR) kết hợp điện di gel polyacrylamide, phân tích đường cong nóng chảy có độ phân giải cao (HRM) và Realtime PCR [2, 9-12]. Nghiên cứu này sử dụng kỹ thuật giải trình tự gen trực tiếp

*Tác giả liên hệ: Email: nguyenhaiha@igr.ac.vn

Identifying *UGT1A1* gene mutations in Vietnamese patients with Gilbert syndrome

Thi Thanh Hoa Nguyen¹, Quang Lieu Dau²,
Dang Ton Nguyen^{1,3}, Hai Ha Nguyen^{1,3*}, Ngoc Anh Tran²

¹Institute of Genome Research,
Vietnam Academy of Science and Technology

²Hanoi Medical University Hospital

³Graduate University of Science and Technology,
Vietnam Academy of Science and Technology

Received 28 December 2020; accepted 28 January 2021

Abstract:

Gilbert's syndrome (GS) is the most common inherited disorder of bilirubin metabolism, non-lethal, affecting 3-12% of the population. The genetic variants of the UDP-glucuronosyltransferase 1A1 (*UGT1A1*) gene might reduce the gene transcription activity and its enzyme expression, which affects the ability to conjugate glucuronidation in the liver. This study aimed to identify genetic variants of *UGT1A1* in two Vietnamese sibling brothers with jaundice manifestations suspected GS. The peripheral blood samples of patients were used to extract genome DNA and sequence the enhancer, promoter, and coding all five exons of *UGT1A1*. Two pathogenic variants c.-3279T>G located in the phenobarbital responsive enhancer module (gtPBREM) and A(TA)₇TAA of the TATA box in the promoter region were identified. They are twice common pathogenic variants that were reported in almost hyperbilirubinemia individuals from different populations. The obtained results improved the accuracy of medical diagnosis and warned the patients to be cautious in case they have to use medical drugs in the future.

Keywords: Gilbert syndrome, jaundice, *UGT1A1* gene.

Classification number: 3.5

để xác định đột biến tại gen *UGT1A1* trên hai nam thanh niên Việt Nam có đặc điểm lâm sàng của hội chứng Gilbert.

Đối tượng và phương pháp

Đối tượng nghiên cứu

Hai nam thanh niên là anh em ruột quê ở Thái Bình, khám tại Khoa Nội tổng hợp, Bệnh viện Đại học Y Hà Nội, chẩn đoán trên lâm sàng và cận lâm sàng hướng tới mắc hội chứng Gilbert. Bệnh nhân được tư vấn xét nghiệm di truyền liên quan đến rối loạn chuyển hóa bilirubin bẩm sinh. Sau khi được giải thích và tư vấn, bệnh nhân đã đồng ý cung cấp mẫu máu để xét nghiệm gen và tình nguyện tham gia nghiên cứu này.

Phân tích gen được tiến hành tại Viện Nghiên cứu hệ gen, thuộc Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam trong năm 2018. Kết quả xét nghiệm gen và đánh giá tương quan với kiểu hình được thực hiện bởi các thành viên tham gia nghiên cứu này.

Tách chiết ADN tổng số

Mẫu máu ngoại vi của các bệnh nhân sau khi lấy vô trùng được đưa vào ống chứa mẫu tiêu chuẩn có EDTA và bảo quản ở -20°C cho đến khi sử dụng. Bộ sinh phẩm EZNA blood DNA mini (Promega, Hoa Kỳ) được sử dụng để tách chiết ADN tổng số từ máu ngoại vi theo hướng dẫn của nhà sản xuất. ADN sau khi tách chiết đã được điện di kiểm tra trên gel agarose và đo nồng độ để kiểm tra chất lượng trước khi giữ ở -20°C.

Phản ứng khuếch đại gen (PCR)

Các cặp mồi sử dụng được thiết kế dựa trên trình tự chuẩn của gen *UGT1A1* mang accession number NG_033238.1 trong ngân hàng GenBank. Mồi được tổng hợp tại Công ty Sinh hóa Phù Sa (Cần Thơ, Việt Nam). Trình tự mồi và kích thước sản phẩm PCR theo tính toán tương ứng được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Thông tin về các cặp mồi sử dụng trong nghiên cứu.

Tên mồi	Trình tự	Kích thước sản phẩm (bp)
gtPBREM_F	CTGGGGATAAACATGGGATG	606
gtPBREM_R	CACCACCACTTCTGGAACCT	
E1F	TCCTGCTACCTTTGTGGAC	1096
E1R	GCTTGCTCAGCATATATCTGGG	
E2F	ACACGCATGCCTTTAATCA	363
E2R	GCAGGGAAAAGCCAAATCTA	
E3F	CAAACAAGATGCCGGAAGT	450
E3R	TTACTCACATGCCCTTGCAG	
E4F	TGGGGTATCTCAACCCACAT	469
E4R	GAAACAACGCTATTAATGCTACG	
E5F	TTCTTAAGCAGCCATGAGCA	643
E5R	CTGTCTGCACGTCCTCTGAA	

Mỗi phản ứng khuếch đại gen (20 μ l) bao gồm các thành phần: 10 μ l taq 2X master Mix của New England Biology (Anh); 0,5 μ l mỗi loại mồi (10 pM/ μ l); 1 μ l ADN (20 ng/ μ l) và 8 μ l nước. Kỹ thuật PCR được tiến hành trên máy luân nhiệt với chu trình nhiệt như sau: 95°C 2 phút; 38 chu kỳ (95°C 30 giây, 58°C hoặc 60°C 30 giây, 68°C 30-60 giây), 68°C 5 phút; giữ ở 4°C. Sản phẩm PCR được phát hiện bằng điện di trên thạch agarose 1,2% có nhuộm ethidium bromide và quan sát dưới ánh sáng UV. Sản phẩm PCR sau đó được tinh sạch bằng kit JETTM PCR purification (Thermo Scientific) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Thực hiện giải trình tự chuỗi ADN

Sản phẩm PCR sau khi tinh sạch sẽ được thực hiện phản ứng cycle sequencing với Bigdye Terminator V3.1 từ Applied Biosystems (Hoa Kỳ), theo chiều xuôi và ngược cho mỗi đoạn cần đọc. Sản phẩm sau đó được kết tủa bằng ethanol, biến tính trong Hi-Di formamide ở 95°C trong 2 phút trước khi làm lạnh đột ngột. Trình tự ADN được đọc bằng máy ABI PRISM 3100 Genetics Analyzer (Applied Biosystems, Hoa Kỳ). Kết quả được phân tích bằng phần mềm sinh học Bioedit.

Kết quả và bàn luận

Đặc điểm lâm sàng của hai bệnh nhân

Bệnh nhân thứ nhất là người em trai (GS1), sinh năm 1996, nhập viện với dấu hiệu mệt mỏi, biểu hiện vàng da và mắt nặng hơn thấy rõ. Nồng độ bilirubin toàn phần trong máu đo được là 91,8 μ mol/l, bilirubin gián tiếp là 54,7 μ mol/l. Trước đó, tại cơ sở y tế tuyến tỉnh, bệnh nhân đã được khám và xét nghiệm loại trừ các viêm gan virus bao gồm HBV, HCV, HAV, HEV và một số loại virus gây tổn thương gan hiếm gặp như HSV, EBV cũng như viêm gan tự miễn, viêm gan ứ mật tiên phát..., thậm chí đã được tiến hành sinh thiết gan. Tiếp cận với trường hợp tăng bilirubin, bệnh nhân được tiến hành làm xét nghiệm men gan (GOT/GPT) và photphatase kiềm (ALP). Với trường hợp men gan và ALP bình thường, các nguyên nhân tổn thương gan và đường mật được loại trừ. Mặt khác, bệnh nhân tăng chủ yếu bilirubin gián tiếp, gợi ý các nguyên nhân bao gồm: tan máu, các rối loạn chuyển hóa bilirubin bẩm sinh, và trường hợp ít gặp hơn là bệnh Wilson. Xét nghiệm sâu hơn cho thấy bệnh nhân không có thiếu máu, thậm chí xét nghiệm Coomb trực tiếp và gián tiếp tìm bằng chứng tan máu đều âm tính, xét nghiệm thăm dò bệnh lý Wilson hoàn toàn bình thường. Bước tiếp cận tiếp theo chúng tôi đặt ra là thăm dò các đột biến gen hiếm gặp, gây ra các rối loạn chuyển hóa bilirubin bẩm sinh.

Bệnh nhân thứ 2 (GS2) là anh trai của bệnh nhân GS1,

đến khám với biểu hiện vàng da nhẹ hơn GS1. Chỉ số bilirubin toàn phần và gián tiếp của bệnh nhân là 97,6 và 48,5 μ mol/l. Chỉ số này cũng cao tương đương chỉ số của bệnh nhân GS1. Ngoài ra, các chỉ số sinh hóa và huyết học khác của bệnh nhân đều bình thường. Bệnh nhân âm tính với virus viêm gan B và C. Các xét nghiệm cho 2 bệnh nhân được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2. Kết quả xét nghiệm cận lâm sàng của bệnh nhân.

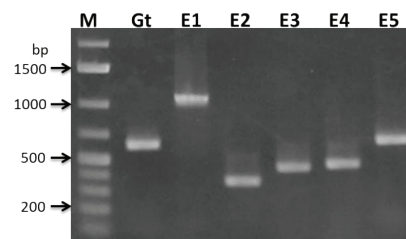
Xét nghiệm	GS1	GS2	Giá trị tham chiếu
GOT (U/l)	17	17	<40
GPT (U/l)	20	19	<41
ALP (U/l)	79	-	25-100
GGT (U/l)	42	32	8-61
Bilirubin toàn phần (μ mol/l)	91,8	97,6	<24
Bilirubin gián tiếp (μ mol/l)	54,7	48,5	<12,7
Hồng cầu (T/l)	5,07	5,38	4-5,9
Hemoglobin (g/l)	157	159	125-175
Ceruloplasmin (μ mol/l)	15	-	5-40
Đông niệu (ug/l)	9,79	-	10-60

Số in đậm trong bảng chỉ các chỉ số tăng bất thường.

Thiết kế các cặp mồi và khuếch đại gen UGT1A1

Một cặp mồi được thiết kế để khuếch đại đặc hiệu vùng ADN chứa yếu tố tăng cường của gen *UGT1A1* nằm cách vị trí của gen hơn 3000 bp. Năm cặp mồi khác cho phép khuếch đại đặc hiệu 5 exon của gen, trong đó đoạn chứa exon 1 bao gồm cả vùng điều khiển chính của gen.

ADN tổng số được tách từ máu ngoại vi của hai bệnh nhân GS1 và GS2 có nồng độ tương ứng là 35 μ g/ μ l và 37,5 ng/ μ l được sử dụng làm khuôn để nhân gen. Điều kiện PCR đã được xác lập để khuếch đại đặc hiệu vùng enhancer, promoter và toàn bộ 5 exon của gen *UGT1A1* với các cặp mồi đặc hiệu. Các phản ứng PCR cho bằng đặc hiệu tương ứng với các sản phẩm có kích thước từ 363 đến 1096 bp (hình 1). Các sản phẩm PCR này sẽ được tinh sạch cho các phản ứng giải trình tự tiếp theo.



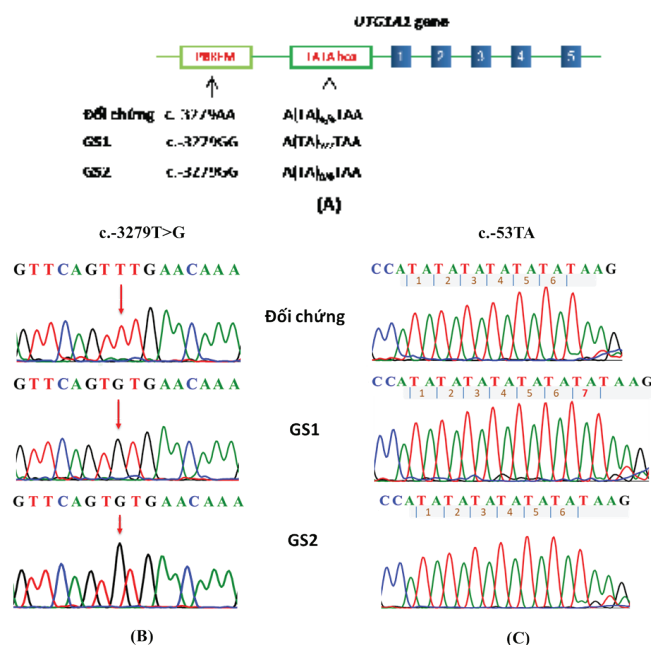
Hình 1. Hình ảnh khuếch đại các đoạn gen *UGT1A1* bằng PCR.

M: thang marker chuẩn (1 kb plus); Gt: vùng enhancer chứa mô đun tăng cường đáp ứng phenobarbital; E1: vùng promoter và exon 1; E2-E5: các exon từ 2 đến 5.

Xác định đột biến gen *UGT1A1* bằng giải trình tự trực tiếp

Toàn bộ vùng enhancer, promoter và 5 exon của gen *UGT1A1* đã được giải trình tự thành công. Trình tự gen thu được của 2 bệnh nhân nghi ngờ mắc GS được so sánh với trình tự chuẩn của gen *UGT1A1* lưu trong ngân hàng gen với mã số NG_033238.1 và trình tự gen người chuẩn (GRCh37/hg19).

Kết quả phân tích cho thấy, cả 2 bệnh nhân GS1 và GS2 đều mang 1 biến thể gen ở dạng đồng hợp tử, tại vị trí c.-3279A>G, nằm trong yếu tố tăng cường enhancer tham gia điều khiển mức độ biểu hiện gen. Biến thể này được định danh là *UGT1A1**60. Ngoài ra, mẫu GS1 còn mang cả biến thể gen A(TA)₇TAA dạng đồng hợp tử tại hộp TATA trong vùng promoter của gen. Biến thể này được định danh là *UGT1A1**28. Ở người mang gen kiểu dại, trình tự hộp TATA thường có 6 cặp nucleotide TA lặp lại liên tiếp, ký hiệu A(TA)₆TAA. Vị trí các biến thể này trên sơ đồ gen và hình ảnh sắc ký đồ giải trình tự gen được thể hiện trên hình 2.



Hình 2. Kết quả giải trình tự trên các mẫu nghiên cứu. (A) Vị trí các biến thể gen phát hiện ở 2 bệnh nhân; PBREM: yếu tố phản ứng thuốc phenobarbital nằm trong vùng enhance; TATA box: vùng điều khiển lõi của gen (promoter); các hộp ký hiệu 1-5: các exon; mũi tên chỉ vị trí của hai biến thể gen phát hiện được. (B, C) Ảnh sắc ký đồ giải trình tự gen vị trí c.-3279 và vùng promoter của gen *UGT1A1*; đối chứng: mẫu của người khỏe mạnh mang gen kiểu dại.

Xác định kiểu gen *UGT1A1* là bước chẩn đoán di truyền hiệu quả, cho phép xác định chính xác nguyên nhân gây bệnh của các đối tượng nghi mắc hội chứng Gilbert, nhờ đó hạn chế các xét nghiệm không cần thiết khác như sinh

thiết gan, đồng thời là yếu tố quan trọng cho dự đoán và phòng ngừa tác dụng phụ bất lợi ở những người này [13]. Cho đến nay, chưa có công bố nào về việc đánh giá kiểu gen *UGT1A1* cho những bệnh nhân được chẩn đoán trên lâm sàng hướng tới GS ở Việt Nam. Hai biến thể gen phát hiện được trong nghiên cứu này đã được phát hiện phổ biến ở các đối tượng có nồng độ bilirubin máu cao trên thế giới [14, 15]. Đối với các nghiên cứu trên người châu Âu và châu Phi [16], hầu như tất cả các bệnh nhân GS đều mang kiểu gen đồng hợp tử của *UGT1A1**28. Trong khi đó khu vực Đông Á, bao gồm Nhật Bản, Trung Quốc và Hàn Quốc thì kiểu gen *UGT1A1**60 và *UGT1A1**6 (p.G71R) đồng hợp tử và một số đột biến sai nghĩa khác ít gặp hơn như *UGT1A1**7, *UGT1A1**27 là nguyên nhân chủ yếu gây ra GS [17].

Đối với bệnh nhân GS1 mang kiểu gen *UGT1A1**28 cũng cần thận trọng hết sức khi sử dụng một số loại thuốc điều trị bệnh trong tương lai. Một ví dụ điển hình là thuốc điều trị ung thư phổ biến irinotecan. Enzyme *UGT1A1* tham gia chuyển hóa irinotecan thành chất ký hiệu SN-38G tại gan, và cá nhân mang kiểu gen *UGT1A1**28 có nguy cơ cao gặp phản ứng phụ khi sử dụng thuốc trên. Một nghiên cứu đã chỉ ra: khoảng 10% dân số Bắc Mỹ mang kiểu gen *UGT1A1**28 đồng hợp tử và có nguy cơ cao mắc bệnh tiêu chảy và giảm bạch cầu sau khi tiêm irinotecan [18]. Tỷ lệ giảm bạch cầu nặng ở bệnh nhân có kiểu gen *UGT1A1**28 đồng hợp tử cao tới 36% và có liên quan chặt chẽ với tỷ lệ nhập viện cao hơn [19]. Mặt khác, bệnh nhân có kiểu gen đồng hợp tử *UGT1A1**28 có khả năng bị giảm bạch cầu trung tính nghiêm trọng gấp 3,5 lần so với các người có kiểu gen kiểu dại [20]. Do đó, bệnh nhân GS1 cần thông báo tình trạng di truyền của mình với bác sĩ trong trường hợp phải sử dụng thuốc này. Nghiên cứu này chưa kiểm tra chính xác kiểu gen *UGT1A1* của bố mẹ 2 bệnh nhân do việc thu mẫu không thể thực hiện được bởi yếu tố khách quan. Tuy vậy, nguồn gốc kiểu gen *UGT1A1**28 và *60 xuất hiện ở 2 bệnh nhân có khả năng cao là do được truyền lại từ cha mẹ của họ.

Kết luận

Đây là báo cáo đầu tiên về chẩn đoán di truyền cho bệnh nhân nghi mắc hội chứng Gilbert tại Việt Nam. Cả hai bệnh nhân đều mang các biến thể gen gây hội chứng rối loạn chuyển hóa bilirubin thể di truyền. Đó là các biến thể c.-3279T>G trong enhancer và A(TA)₇TAA trong vùng promoter của gen *UGT1A1*. Kết quả chẩn đoán gen này giúp bác sĩ khẳng định chính xác nguyên nhân gây hội chứng Gilbert vốn rất khó để phân biệt trên lâm sàng, đồng thời hạn chế các xét nghiệm/thăm dò không cần thiết khác. Ngoài ra, đối với bệnh nhân GS1, chúng tôi cũng đã đưa ra khuyến cáo với bệnh nhân cần thông báo với bác sĩ điều trị

về tình trạng di truyền của mình khi cần sử dụng các thuốc chuyển hóa qua gan trong tương lai.

LỜI CẢM ƠN

Chúng tôi chân thành cảm ơn các bệnh nhân đã tham gia nghiên cứu này. Chúng tôi cũng cảm ơn sự hỗ trợ của Viện Nghiên cứu hệ gen, VAST và Bệnh viện Đại học Y Hà Nội.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Elísio Costa, Emília Vieira, Marcia Martins, Jorge Saraiva, Eugénia Cancela, Miguel Costa, Roswitha Bauerle, Teresa Freitas, João R. Carvalho, Ermelinda Santos-Silva, José Barbot, Rosário dos Santos (2006), "Analysis of the UDP-glucuronosyltransferase gene in Portuguese patients with a clinical diagnosis of Gilbert and Crigler-Najjar syndromes", *Blood Cells Mol. Dis.*, **36**(1), pp.91-97.
- [2] P.J. Bosma, J.R. Chowdhury, C. Bakker, S. Gantla, A. de Boer, B.A. Oostra, D. Lindhout, G.N. Tytgat, P.L. Jansen, R.P. Oude Elferink, et al. (1995), "The genetic basis of the reduced expression of bilirubin UDP-glucuronosyltransferase 1 in Gilbert's syndrome", *N. Engl. J. Med.*, **333**(18), pp.1171-1175.
- [3] P. Berk and A. Wolkoff (2001), "Bilirubin metabolism and the hyperbilirubinemias", *Harrison's Principles of Internal Medicine 15th*, New York: McGraw-Hill, pp.1715-1720.
- [4] Yoshihiro Maruo, Sayuri Nakahara, Takahide Yanagi, Akitaka Nomura, Yu Mimura, Katsuyuki Matsui, Hiroshi Sato, Yoshihiro Takeuchi (2016), "Genotype of *UGT1A1* and phenotype correlation between Crigler-Najjar syndrome type II and Gilbert syndrome", *J. Gastroenterol. Hepatol.*, **31**(2), pp.403-408.
- [5] G. Canu, A. Minucci, C. Zuppi, E. Capoluongo (2013), "Gilbert and Crigler Najjar syndromes: an update of the UDP-glucuronosyltransferase 1A1 (*UGT1A1*) gene mutation database", *Blood Cells Mol. Dis.*, **50**(4), pp.273-280.
- [6] W.T. Foulk, H.R. Butt, C.A. Owen, F.F. Whitcomb, H.L. Mason (1959), "Constitutional hepatic dysfunction (Gilbert's disease): its natural history and related syndromes", *Medicine (Baltimore)*, **38**(1), pp.25-46.
- [7] I.M. Arias and I.M. London (1957), "Bilirubin glucuronide formation in vitro; demonstration of a defect in Gilbert's disease", *Science*, **126**(3273), pp.563-564.
- [8] P.J. O'Dwyer and R.B. Catalano (2006), "Uridine diphosphate glucuronosyltransferase (UGT)1A1 and irinotecan: practical pharmacogenomics arrives in cancer therapy", *J. Clin. Oncol.*, **24**(28), pp.4534-4538.
- [9] N. Marziliano, E. Pelo, B. Minuti, I. Passerini, F. Torricelli, L. Da Prato (2000), "Melting temperature assay for a *UGT1A* gene variant in Gilbert syndrome", *Clin. Chem.*, **46**(3), pp.423-425.
- [10] J.R. Harraway and P.M. George (2005), "Use of fully denaturing HPLC for *UGT1A1* genotyping in Gilbert syndrome", *Clin. Chem.*, **51**(11), pp.2183-2185.
- [11] C.S. Huang, G.A. Luo, M.L. Huang, S.C. Yu, S.S. Yang (2000), "Variations of the bilirubin uridine-diphosphoglucuronosyl transferase 1A1 gene in healthy Taiwanese", *Pharmacogenetics*, **10**(6), pp.539-544.
- [12] F.L. Wong, M.K. Wang, N.Y. Boo, N.H. Hamidah, B.O. Ainoon (2007), "Rapid detection of the *UGT1A1* single nucleotide polymorphism G211A using real-time PCR with Taqman minor groove binder probes", *J. Clin. Lab. Anal.*, **21**(3), pp.167-172.
- [13] K.H. Wagner, R.G. Shiels, C.A. Lang, N. Seyed Khoei, A.C. Bulmer (2018), "Diagnostic criteria and contributors to Gilbert's syndrome", *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.*, **55**(2), pp.129-139.
- [14] Yoshihiro Maruo, Carlos D'Addario, Asami Mori, Masaru Iwai, Hiroko Takahashi, Hiroshi Sato, Yoshihiro Takeuchi (2004), "Two linked polymorphic mutations (A(TA)_nTAA and T-3279G) of *UGT1A1* as the principal cause of Gilbert syndrome", *Hum. Genet.*, **115**(6), pp.525-526.
- [15] Junko Sugatani, Kasumi Yamakawa, Kouich Yoshinari, Takashi Machida, Hitoshi Takagi, Masatomo Mori, Satoru Kakizaki, Tatsuya Sueyoshi, Masahiko Negishi, Masao Miwa (2002), "Identification of a defect in the *UGT1A1* gene promoter and its association with hyperbilirubinemia", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **292**(2), pp.492-497.
- [16] G. Monaghan, M. Ryan, R. Seddon, R. Hume, B. Burchell (1996), "Genetic variation in bilirubin UDP-glucuronosyltransferase gene promoter and Gilbert's syndrome", *Lancet*, **347**(9001), pp.578-581.
- [17] Y. Maruo, H. Sato, T. Yamano, Y. Doida, M. Shimada (1998), "Gilbert syndrome caused by a homozygous missense mutation (Tyr486Asp) of bilirubin UDP-glucuronosyltransferase gene", *J. Pediatr.*, **132**(6), pp.1045-1047.
- [18] D. Hall, G. Ybazeta, G. Destro-Bisol, M.L. Petzl-Erler, A. Di Rienzo (1999), "Variability at the uridine diphosphate glucuronosyltransferase 1A1 promoter in human populations and primates", *Pharmacogenetics*, **9**(5), pp.591-599.
- [19] M.C. Etienne-Grimaldi, J.C. Boyer, F. Thomas, S. Quaranta, N. Picard, M.A. Lorient, C. Narjoz, D. Poncet, M.C. Gagnieu, C. Ged, F. Broly, V. Le Morvan, R. Bouquie, M.P. Gaub, L. Philibert, F. Ghiringhelli, C. Le Guellec (2015), "UGT1A1 genotype and irinotecan therapy: general review and implementation in routine practice", *Fundam. Clin. Pharmacol.*, **29**(3), pp.219-237.
- [20] G.E. Palomaki, L.A. Bradley, M.P. Douglas, K. Kolor, W.D. Dotson (2009), "Can *UGT1A1* genotyping reduce morbidity and mortality in patients with metastatic colorectal cancer treated with irinotecan? an evidence-based review", *Genet. Med.*, **11**(1), pp.21-34.

Đánh giá sự biểu hiện của các gen tự thực (autophagy) trong quá trình hoạt hóa *in vitro* của các tế bào hình sao từ gan chuột

Đặng Minh Thành^{1,2}, Lê Văn Trình¹, Đỗ Quang Huy¹, Trần Thị Hằng¹, Cao Lê Trâm Anh¹, Đặng Thị Tùng Loan¹, Phan Lữ Chính Nhân¹, Phạm Văn Phúc¹, Ai Xuan Le Holterman³, Nguyễn Văn Thuận², Lê Minh Huy⁴, Trương Hải Nhung^{1,5*}

¹Phòng Thí nghiệm Nghiên cứu và Ứng dụng Tế bào gốc,

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

²Khoa Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Quốc tế, Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh

³Bộ môn Nhi khoa, Trường Y khoa, Đại học Illinois, Chicago, Mỹ

⁴Bộ môn Giải phẫu bệnh, Trường Đại học Y Dược TP Hồ Chí Minh

⁵Khoa Sinh học - Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh

Ngày nhận bài 8/12/2020; ngày chuyển phản biện 14/12/2020; ngày nhận phản biện 20/1/2021; ngày chấp nhận đăng 25/1/2021

Tóm tắt:

Nghiên cứu này nhằm đánh giá sự thay đổi biểu hiện các gen liên quan đến sự tự thực trong quá trình hoạt hóa của các tế bào hình sao *in vitro*. Tế bào hình sao phân lập từ gan chuột được nuôi cấy *in vitro* trong 7 ngày. Mức độ hoạt hóa của tế bào hình sao được đánh giá thông qua hình thái, mức độ dự trữ các giọt mỡ nội bào bằng nhuộm dung dịch oil red o (ORO); biểu hiện của các gen hoạt hóa α -sma, collagen I và *lrat* bằng qRT PCR và nhuộm ICC (immunocytochemistry) (α -SMA). Sự biểu hiện của các gen tự thực *lc3b*, *beclin 1*, *atg12* được đánh giá bằng qRT PCR và nhuộm ICC (LC3). Kết quả cho thấy, tế bào hình sao hoạt hóa khi nuôi cấy *in vitro* sau 3 và 7 ngày thể hiện thông qua sự thay đổi hình dạng giống nguyên bào sợi cơ, mất dần khả năng tích trữ các giọt mỡ, tăng sự biểu hiện của các gen hoạt hóa α -sma và collagen I, giảm sự biểu hiện của gen *lrat*. Thêm vào đó, sự biểu hiện của các gen tự thực *lc3b*, *beclin 1* và *atg12* tăng lên ở các tế bào hình sao hoạt hóa khi nuôi cấy *in vitro* sau 3 và 7 ngày. Đây là kết quả ban đầu trong nghiên cứu tìm ra vai trò của sự tự thực trong quá trình hoạt hóa của tế bào hình sao, hướng tới các liệu pháp điều trị xơ gan nhắm vào sự tự thực.

Từ khóa: sự hoạt hóa, sự tự thực, tế bào hình sao.

Chỉ số phân loại: 3.5

Mở đầu

Tế bào hình sao (hepatic stellate cell - HSC) còn được gọi là tế bào dự trữ mỡ (fat - storing cell) hay tế bào Ito. Đây là một loại tế bào trong gan, chiếm 5-8% tổng số tế bào. Khi gan khỏe mạnh, các tế bào này tồn tại ở dạng không hoạt hóa, chúng dự trữ vitamin A trong các giọt mỡ ở tế bào chất [1, 2]. Khi gan bị tổn thương, các tế bào này chuyển dạng trở thành các tế bào giống nguyên bào sợi cơ [3]. Quá trình này được gọi là sự hoạt hóa, được thể hiện thông qua sự giảm khả năng tích trữ các giọt mỡ nội bào, sự biểu hiện của phân tử protein α -SMA (alpha - smooth muscle), tăng cường tiết collagen. Các nghiên cứu gần đây đã chứng minh sự hoạt hóa của các tế bào hình sao là yếu tố chính trong quá trình xơ hóa ở gan [4-7]. Chính vì vậy, nghiên cứu về cơ chế của sự hoạt hóa là rất cần thiết cho việc phát triển các liệu pháp điều trị xơ hóa gan. Thêm vào đó, đã có rất nhiều con đường và tác nhân được chứng minh tham gia vào sự hoạt hóa của tế bào hình sao như: stress ty thể, stress oxy hóa, sự biến dưỡng của vitamin A, các tương tác tín hiệu thông

qua thụ thể [5]. Bên cạnh một số con đường tín hiệu hoạt hóa tế bào hình sao đã được nghiên cứu từ lâu, gần đây sự tự thực được phát hiện là một yếu tố liên quan đến quá trình hoạt hóa.

Sự tự thực là một quá trình nội bào có vai trò phân giải và tái sử dụng các vật chất bên trong tế bào như: các cơ quan bị hư hỏng, phân tử protein gấp cuộn sai... Đây là một quá trình thiết yếu cho sự sống của tế bào, diễn ra trong gan, đặc trưng bởi quá trình hình thành các thể tự thực (autophagosome) bao bọc lấy vật chất, sau đó kết hợp với tiêu thể (lysosome) để phân giải [8]. Quá trình này được thực hiện thông qua một bộ máy chặt chẽ với sự tham gia của các gen liên quan đến sự tự thực (autophagy) như: *lc3*, *beclin 1*, *atg12*. Một số nghiên cứu [9, 10] cho thấy mối liên hệ của sự tự thực trong cơ chế bệnh lý của bệnh xơ hóa gan. Các nghiên cứu *in vivo* trên mô hình chuột xơ gan do CCl₄ và thất mật cho thấy, sự tự thực được kích hoạt trong quá trình xơ hóa. Ngược lại, các nghiên cứu khác [11, 12] chỉ ra rằng, có sự cải thiện tình trạng tổn thương của gan khi kích

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

Investigating the expression of autophagy genes during the *in vitro* activation of mouse hepatic stellate cells

Minh Thanh Dang^{1,2}, Van Trinh Le¹, Quang Huy Do¹, Thi Hang Tran¹, Le Tram Anh Cao¹,
Thi Tung Loan Dang¹, Lu Chinh Nhan Phan¹, Van Phuc Pham¹, Ai Xuan Le Holterman³,
Van Thuan Nguyen², Minh Huy Le⁴, Hai Nhung Truong^{1,5*}

¹Laboratory of Stem Cell Research and Application, University of Science, Vietnam National University, Ho Chi Minh city, Vietnam

²School of Biotechnology, International University, Vietnam National University, Ho Chi Minh city, Vietnam

³Department of Pediatrics, University of Illinois College of Medicine, USA

⁴Department of Anatomic-Pathology, Medicine and Pharmacy University, Ho Chi Minh city, Vietnam

⁵Faculty of Biology and Biotechnology, University of Science, Vietnam National University, Ho Chi Minh city, Vietnam

Received 8 December 2020; accepted 25 January 2021

Abstract:

This study aims to evaluate the expression level of autophagy genes during the activation of mouse hepatic stellate cells (HSCs) *in vitro*. The HSCs isolated from the mouse liver were cultured *in vitro* for 7 days. The activation of HSCs was evaluated by their morphology, the storage of lipid droplets by oil red O (ORO) staining, the expression of activation-related genes *α-sma*, *collagen I*, and quiescence-related gene *lrat* by qRT PCR and ICC staining (*α-SMA*). The expression of autophagy genes *lc3b*, *beclin 1*, *atg12* were assessed by qRT PCR and ICC staining (LC3). The results showed that the isolated HSCs were activated after 3 days and 7 days of the culture *in vitro*. The activation was indicated by the morphological change of HSCs to myofibroblast-like cells, loss of lipid droplets, and increased expression of fibrotic genes *α-sma* and *collagen I*, decreased expression of *lrat*. Additionally, the expression of autophagy genes *lc3b*, *beclin 1*, and *atg12* were significantly increased in the activated HSCs after the culture *in vitro* for 3 and 7 days. This study contributes the preliminary results to further studies on the role of autophagy during the activation of HSCs, which may be exploited for the development of the antifibrotic therapy targeting autophagy.

Keywords: autophagy, hepatic stellate cells (HSCs), hepatic stellate cell activation.

Classification number: 3.5

hoạt quá trình tự thực. Sự khác biệt giữa các kết quả nghiên cứu trước đây cho thấy vai trò của sự tự thực không giống nhau trên các loại tế bào khác nhau và mối quan hệ này rất phức tạp. Do đó, các nghiên cứu tiếp theo cần phải đánh giá trên từng loại tế bào gan riêng biệt, đặc biệt là vai trò của sự tự thực trong quá trình hoạt hóa của các tế bào hình sao - nhân tố chính của sự xơ hóa gan. Một số nghiên cứu trước đây cũng đã chỉ ra mối liên hệ giữa sự tự thực và sự hoạt hóa của tế bào hình sao: miR-96-5p ức chế sự hoạt hóa của tế bào hình sao bằng cách khóa sự tự thực trên dòng tế bào hình sao bắt từ LX-2 [13]; giảm biểu hiện *beclin 1* bằng microRNA (miRNA) ức chế sự tự thực đồng thời sự hoạt hóa trên dòng tế bào hình sao LX-2 và T6 [14]; sự giảm quá trình xơ hóa trên dòng tế bào LX-2 bất hoạt gen *lc3* khi xử lý với hóa chất gây xơ gan [15]. Tuy nhiên, việc thực hiện nghiên cứu trên dòng tế bào hình sao bắt từ còn tồn tại nhiều bất cập do các tế bào này đã được chỉnh sửa và như vậy không còn phản ánh đúng những đặc tính ban đầu của loại tế bào này trong gan. Chính vì vậy, các nghiên cứu về vai trò

của sự tự thực đối với sự hoạt hóa trên các tế bào hình sao được phân lập sơ cấp là rất cần thiết để bổ sung cho các kết quả nghiên cứu trước đây và là cơ sở để nghiên cứu các liệu pháp điều trị xơ gan nhắm vào sự tự thực.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành đánh giá hoạt động tự thực thông qua sự thay đổi biểu hiện của các gen liên quan đến sự tự thực: *lc3b*, *beclin 1*, *atg12* trong quá trình hoạt hóa của các tế bào hình sao được phân lập từ gan chuột.

Phương pháp nghiên cứu

Đối tượng thí nghiệm

Chuột Balb/c 4-5 tháng tuổi, được nuôi trong lồng sạch ở điều kiện nhiệt độ 25°C, 12 giờ sáng/tối, cho ăn bằng cám viên và uống nước sạch tự do.

Phân lập tế bào hình sao từ gan chuột

Quy trình phân lập tế bào hình sao được tham khảo từ

quy trình của Mederacke và cs (2015) [1]. Về cơ bản, quy trình phân lập tế bào hình sao trải qua 3 giai đoạn chính: (A) truyền các dung dịch enzyme vào mô gan chuột (Perfusion *in vivo*), (B) phân cắt mô gan thành tế bào đơn bằng enzyme (*in vitro* digestion), (C) phân tách tế bào hình sao bằng dung dịch ly tâm đẳng tỷ trọng Nycodenz 9,6%. Cụ thể, gan được phân cắt bằng cách truyền dung dịch enzyme pronase E (Merck, Đức), collagenase D (Roche Diagnostics, Đức). Tiếp theo, gan được xé nhỏ và tiếp tục được phân cắt bằng cách ủ với hỗn hợp enzyme gồm pronase E, collagenase D và DNase I (Roche, Đức). Gan sau khi phân cắt được lọc thông qua màng lọc tế bào đơn 70 μ m và ly tâm ở tốc độ thấp (50 g trong 2 phút) để loại bỏ các tế bào nhu mô gan (hepatocytes). Sau đó, hỗn hợp tế bào đơn được trộn với dung dịch Nycodenz (Axis-shield, Scotland) để đạt nồng độ 9,6% và ly tâm ở 1400 g trong 20 phút. HSCs được thu nhận từ phân lớp màu trắng đục và được rửa với dung dịch GBSS/B. HSCs mới thu nhận được đánh giá ở mốc thời gian ngày 0.

Nuôi cấy tế bào hình sao

Tế bào hình sao được nuôi cấy trong môi trường DMEM (Sigma, Mỹ), 10% FBS (Sigma, Mỹ), kháng sinh penicillin/streptomycin 1x (Gibco, Mỹ) ở mật độ 4×10^5 tế bào/cm² trong đĩa nuôi (SPL Life Sciences, Hàn Quốc) trong vòng 7 ngày. Môi trường được thay 2 ngày/lần.

Đánh giá mức độ dự trữ giọt mỡ bằng phương pháp nhuộm ORO

Mức độ dự trữ giọt mỡ của tế bào hình sao được đánh giá bằng cách nhuộm với ORO (Sigma, Mỹ). Tế bào được cố định bằng paraformaldehyde 4% (Merck, Đức) trong ít nhất 15 phút, rửa 2 lần bằng PBS. Dung dịch ORO 0,5% được pha trong isopropanol (Merck, Đức). Trước khi sử dụng, dung dịch ORO được pha loãng với nước cất theo tỷ lệ 3:2 và để ở nhiệt độ phòng trong 10 phút. Tế bào được nhuộm với dung dịch ORO pha loãng trong 20 phút ở nhiệt độ phòng, sau đó rửa 3 lần với PBS. Nhân tế bào được nhuộm kép với hematoxylin (Sigma, Mỹ) trong 1 phút trước khi quan sát dưới kính hiển vi. Diện tích bắt màu với thuốc nhuộm ORO được định lượng bằng cách sử dụng phần mềm Image J (NIH, Mỹ).

Đánh giá mức độ biểu hiện gen ở mức phiên mã (qRT PCR)

Tế bào hình sao thu nhận từ gan được đông lạnh nhanh trong nitơ lỏng. Sau đó, tiến hành tách chiết RNA bằng bộ kit tách chiết RNA tổng số Easy Blue (iNtRON, Hàn Quốc). Nồng độ và độ tinh sạch của mẫu tách chiết được xác định bằng cách đo độ hấp thụ ở bước sóng 260 và 280 nm bằng máy quang phổ Nanodrop (Thermo Fisher, Mỹ).

cDNA được tổng hợp từ 1000 ng RNA tổng số bằng bộ kit tổng hợp cDNASensiFAST™ (Bioline, Anh). 1 μ l cDNA được dùng cho phản ứng PCR định lượng bằng bộ kit

SensiFAST™ Real-Time PCR Kits (Bioline, Anh), sử dụng hệ thống luân nhiệt LightCycler 480 (Roche, Thụy Điển). Trình tự các cặp mồi sử dụng được liệt kê trong bảng 1.

Bảng 1. Trình tự các mồi dùng để khuếch đại các gen mục tiêu tương ứng trong phản ứng qRT PCR.

Gen	Mồi xuôi (5' - 3')	Mồi ngược (5' - 3')	Sản phẩm (bp)	Tham khảo
<i>lc3b</i>	TTCTTCCTCTGGTGAATGG	GTGGGTGCCTACGTTCTCAT	251	[16]
<i>becn1</i>	ATGGAGGGGTCTAAGGCGTC	TGGGCTGTGGTAAGTAATGGA	149	[12]
<i>atg12</i>	TTAAACTGGTGGCCTCGGAA	CTTCCCACAGCACCGAAATG	218	[17]
<i>a-sma</i>	GCATCCACGAAACCACTA	CACGAGTAACAATCAAAAGC	418	[18]
<i>collagen 1</i>	CAATGGCAGGCTGTGTGCG	AGCACTCGCCCTCCGCTCTT	83	[19]
<i>lrat</i>	CTGACCAATGACAAGGAACGCACTC	CTAATCCCAAGACAGCCGAAGCAAGAC	370	[20]
<i>gapdh</i>	AAGTTGTCATGGATGACC	TCACCATCTCCAGGAGC	283	[21]

Nhuộm hóa miễn dịch tế bào (ICC)

Tế bào sau thu nhận được nhuộm với kháng thể anti-desmin (PA516705, Thermo Fisher Scientific, Mỹ) trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng. Tế bào sau nhuộm desmin được rửa 2 lần với PBS để loại kháng thể thừa bằng phương pháp ly tâm: 2000 g trong 5 phút ở 4°C. Tiến hành nhuộm kháng thể thứ cấp Alexafluor 488 (ab150077, Abcam, Hoa Kỳ) trong 30 phút ở nhiệt độ phòng. Tế bào sau nhuộm được rửa 2 lần với PBS để loại kháng thể thừa bằng phương pháp ly tâm: 2000 g trong 5 phút ở 4°C. Mẫu tế bào không nhuộm kháng thể được sử dụng làm đối chứng. Tế bào nuôi cấy được cố định với paraformaldehyde 4% trong vòng 15 phút, rửa 2 lần với PBS. Tiếp theo, tế bào được xử lý với dung dịch đục lỗ màng trong 15 phút. Sau đó, tế bào được ủ với dung dịch khóa liên kết không đặc hiệu trong 30 phút ở nhiệt độ phòng. Ủ kháng thể thứ cấp Desmin (ab8592, 1:200) hoặc α -SMA (ab15734, 1:300) trong 1 giờ, sau đó rửa 2 lần với PBS. Kháng thể thứ cấp gắn huỳnh quang Alexa fluor 488 được thêm vào (ab150077, 1:500) và để ở nhiệt độ phòng 1 giờ, sau đó rửa 2 lần với PBS. Nhân tế bào được nhuộm với DAPI. Hình ảnh huỳnh quang được chụp bằng hệ thống Cytell TM Cell Imaging (GE Healthcare, Anh).

Xử lý thống kê

Tất cả số liệu được trình bày dưới dạng giá trị trung bình $\pm$ SEM (SEM: sai số chuẩn của giá trị trung bình). Phân tích thống kê được thực hiện bằng phần mềm Graphpad Prism 6.05. Sự khác biệt thống kê được kiểm tra bằng Student's t-test với giá trị $p < 0,05$ được xem là khác biệt có ý nghĩa.

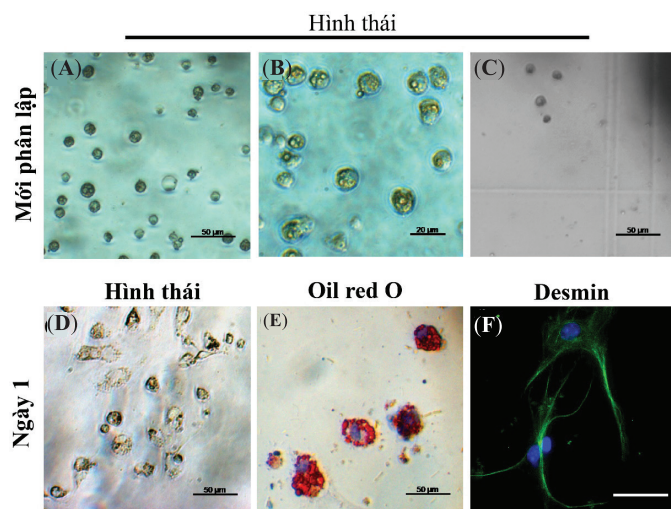
Kết quả và thảo luận

Sự hoạt hóa của tế bào hình sao trong nuôi cấy

Trên phương diện điều trị bệnh xơ hóa gan, các tế bào hình sao nuôi cấy sơ cấp trở thành một công cụ cần thiết cho nghiên cứu sàng lọc thuốc. Đặc biệt, các nghiên cứu về sự hoạt hóa của tế bào hình sao được xem là cách tiếp cận trực diện và cơ bản nhất hướng tới điều trị và phòng ngừa

xơ gan. Gần đây, nhiều nghiên cứu đã bước đầu chỉ ra được mối liên hệ giữa sự tự thực trong cơ chế kích hoạt các tế bào hình sao hoạt hóa [9, 22, 23]. Điều này mở ra một hướng tiếp cận mới về liệu pháp điều trị xơ gan nhằm vào sự tự thực. Tuy nhiên, để thực hiện được, cần làm rõ vai trò của sự tự thực trong cơ chế hoạt hóa của các tế bào hình sao. Trong đó, nghiên cứu thực hiện trên các tế bào hình sao phân lập sơ cấp từ gan chuột là cần thiết, vì các tế bào này chưa bị chỉnh sửa như các dòng tế bào hình sao bắt từ, nhờ đó việc đánh giá sẽ chính xác hơn.

Tế bào hình sao sau phân lập có hình thái tròn không đều do chứa nhiều giọt mỡ bên trong tế bào chất, kích thước từ 12 đến 20 μm (hình 1A, 1B). Khi quan sát dưới điều kiện phản xạ ánh sáng khác, bề mặt của các tế bào có nhiều vết lõm (hình 1C). Sau một ngày nuôi cấy, tế bào bám vào bề mặt đĩa nuôi, bắt đầu trải rộng và xuất hiện các tua (hình 1D). Các tế bào hình sao này chứa nhiều giọt mỡ với nhiều kích thước khác nhau, tập trung xung quanh nhân tế bào, bắt màu với thuốc nhuộm ORO (hình 1E). Các đặc điểm này tương đồng với các nghiên cứu trước đây [1, 24]. Kết quả nhuộm hóa miễn dịch tế bào (ICC) cho thấy các tế bào này dương tính với kháng thể Desmin (hình 1F). Đây là một dấu chuẩn thường được sử dụng để định danh các tế bào hình sao [25-27]. Điều này giúp chứng minh quần thể tế bào phân lập được từ gan chuột trong nghiên cứu này chính là các tế bào hình sao.



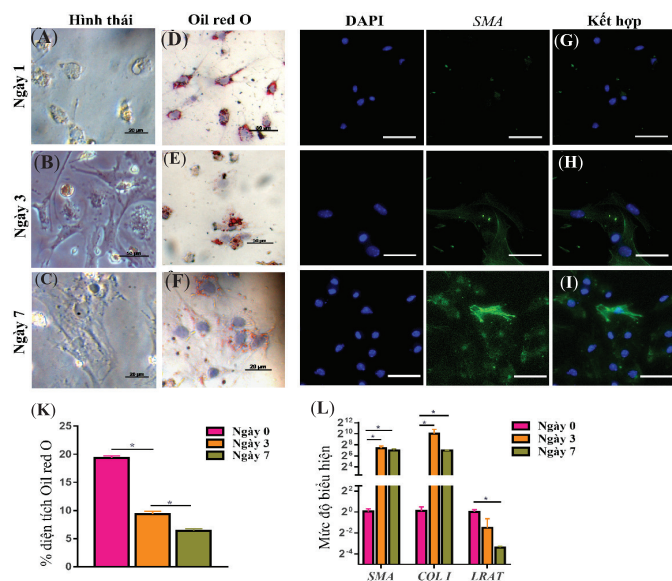
Hình 1. Định danh tế bào hình sao phân lập từ gan chuột. Tế bào hình sao mới phân lập từ gan chuột được đánh giá hình thái dưới kính hiển vi (A, B, C). Sau một ngày nuôi cấy, các tế bào hình sao được đánh giá hình thái (D), sự tích lũy các giọt mỡ thông qua nhuộm với ORO (E), và sự biểu hiện của marker Desmin (F). Thước kẻ: 50 μm nếu không có chú thích trên hình.

Trong thời gian nuôi cấy, hình ảnh chụp bằng kính hiển vi cho thấy có sự thay đổi về hình dạng của các tế bào hình sao. Sau 7 ngày nuôi cấy, các tế bào này mất dần các tua, nhánh; trải rộng phần thân tế bào và có hình dạng giống

nguyên bào sợi cơ (hình 2A, 2B, 2C). Hình ảnh nhuộm ORO cho thấy, các giọt mỡ mất dần ở ngày 3 và gần như không còn ở ngày 7 (hình 2D, 2E, 2F). Kết quả định lượng ORO cho thấy, có sự giảm đáng kể diện tích giọt mỡ tích trữ trong tế bào hình sao sau 3 và 7 ngày nuôi cấy (hình 2K).

Kết quả đánh giá sự biểu hiện các gen cho thấy, có sự tăng mạnh biểu hiện của các gen liên quan đến sự hoạt hóa $\alpha\text{-sma}$ (dấu chuẩn cho các nguyên bào sợi cơ), *collagen I* trên tế bào hình sao khi nuôi cấy trong 3 và 7 ngày (hình 2L). Ngược lại, sự biểu hiện của *lrat* (gen biểu hiện mạnh trên tế bào HSC không hoạt hóa) giảm đáng kể trên tế bào hình sao sau 3 và 7 ngày nuôi cấy (hình 2L). Kết quả nhuộm ICC một lần nữa cho thấy $\alpha\text{-SMA}$ biểu hiện mạnh trên tế bào hình sao nuôi cấy trong 3 và 7 ngày so với ngày 1 (hình 2G, 2H, 2I).

Quá trình nuôi cấy đã làm kích hoạt sự chuyển dạng của các tế bào hình sao từ dạng không hoạt hóa (hay ‘im lặng’) sang trạng thái hoạt hóa. Sự hoạt hóa của các tế bào hình sao được thể hiện thông qua sự thay đổi hình dạng từ dạng hình sao sang giống nguyên bào sợi cơ và mất dần các giọt mỡ theo thời gian (hình 2A-2F). Tương tự như quan sát từ các nghiên cứu trước [28-30], sự hoạt hóa của HSC được khẳng định thông qua sự tăng biểu hiện của các gen xơ hóa $\alpha\text{-sma}$, *collagen I* và sự giảm biểu hiện của gen *lrat*. Tất cả các kết quả trên cho thấy, HSC phân lập từ gan chuột ở nghiên cứu này có thể được sử dụng như một mô hình để nghiên cứu cơ chế của sự hoạt hóa.



Hình 2. Sự hoạt hóa của các tế bào hình sao in vitro. Sự hoạt hóa của các tế bào hình sao *in vitro* được đánh giá thông qua sự thay đổi hình thái (A, B, C); sự tích trữ giọt mỡ bằng nhuộm ORO (D, E, F); định lượng mức độ dự trữ giọt mỡ (K); sự biểu hiện mRNA của các gen $\alpha\text{-sma}$ (SMA), *collagen I* (COL 1) và *lrat* (LRAT) (L); sự biểu hiện của $\alpha\text{-SMA}$ thông qua nhuộm ICC (G, H, I). Thước kẻ: 50 μm nếu không có chú thích trên hình. * $p < 0,05$.

Sự thay đổi biểu hiện của các gen liên quan đến sự tự thực ở tế bào hình sao hoạt hóa

Một trong các nhân tố gần đây được chứng minh có liên quan đến sự hoạt hóa của các tế bào hình sao đó là sự tự thực. Cụ thể, các nghiên cứu *in vivo* trên mô hình chuột xơ gan do CCl₄ và thắt mật [10, 31] cho thấy sự tự thực được kích hoạt trong quá trình xơ hóa. Các nghiên cứu *in vitro* cũng cho thấy ức chế sự tự thực làm giảm sự hoạt hóa của các tế bào hình sao, tuy nhiên các nghiên cứu này [13, 15] chủ yếu được thực hiện trên các dòng tế bào hình sao bất tử. Chính vì vậy, vai trò của sự tự thực đối với sự hoạt hóa của tế bào hình sao chưa hoàn toàn được hiểu rõ và cần được nghiên cứu thêm.

Ở gan, sự tự thực diễn ra dưới dạng hình thành các thể tự thực nhờ vào sự tham gia của các gen quan trọng: *lc3*, *beclin 1*, *atg12*. Do đó, hoạt động tự thực cũng được phản

ánh thông qua mức độ biểu hiện của các gen tự thực. Cụ thể, *beclin 1* tham gia vào phức hợp PtdIns3K, cần thiết trong giai đoạn đầu hình thành thể tự thực. *atg12* tham gia vào giai đoạn kéo dài màng của thể tự thực. *lc3* là phân tử protein gắn lên màng của thể tự thực, điều hòa kích thước và sự đóng mở của thể tự thực [8]. Để nghiên cứu vai trò của sự tự thực trong quá trình hoạt hóa của các tế bào hình sao, chúng tôi tiến hành đánh giá sự biểu hiện của các gen chủ chốt tham gia vào bộ máy tự thực trên các tế bào hình sao mới phân lập và các tế bào hình sao đã hoạt hóa sau khi nuôi cấy sơ cấp. Kết quả từ nghiên cứu này cho thấy có sự tăng biểu hiện của các gen tự thực: *lc3b*, *beclin1*, *atg12* trên tế bào hình sao đã hoạt hóa tại thời điểm 3 và 7 ngày nuôi cấy (hình 3D). Hình ảnh nhuộm ICC cũng thể hiện có sự tăng cường biểu hiện của protein LC3 trên tế bào hình sao sau 3 và 7 ngày nuôi cấy (hình 3A, 3B, 3C). Kết quả này tương ứng với kết quả đánh giá sự biểu hiện gen và cũng phù hợp với các nghiên cứu trước đây: giảm biểu hiện gen *beclin 1* bằng miRNA làm giảm sự hoạt hóa trên dòng tế bào T6 và LX-2 [14]; bất hoạt gen *lc3* làm giảm sự xơ hóa trên tế bào LX-2 [15]. Đáng chú ý, sự biểu hiện của các gen tự thực ở ngày 3 cao hơn ở ngày 7 (hình 3D). Điều này chỉ ra rằng, quá trình tự thực có thể đã được kích hoạt mạnh mẽ tại thời điểm các tế bào hình sao mới hoạt hóa.

Kết luận

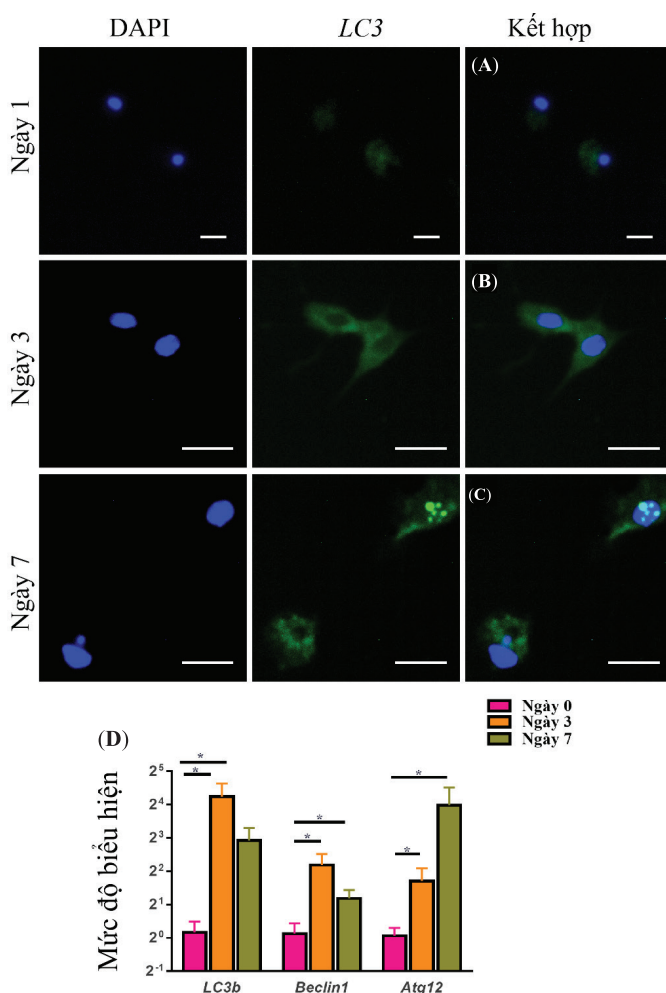
Các gen tự thực *lc3b*, *beclin 1* và *atg12* tăng biểu hiện trên tế bào hình sao đã hoạt hóa sau khi nuôi cấy *in vitro* trong 3 và 7 ngày. Các kết quả này là cơ sở để tiến hành các nghiên cứu sâu hơn về cơ chế của sự tự thực đối với sự hoạt hóa của các tế bào hình sao. Bên cạnh đó, các tế bào hình sao phân lập sơ cấp từ gan chuột ở nghiên cứu này là một công cụ quan trọng để tiến hành các nghiên cứu về cơ chế hoạt hóa.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ phát triển khoa học và công nghệ quốc gia (NAFOSTED) thông qua đề tài mã số 108.05-2017.30. Chúng tôi xin trân trọng cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] I. Mederacke, D.H. Dapito, S. Affò, H. Uchinami, R.F. Schwabe (2015), "High-yield and high-purity isolation of hepatic stellate cells from normal and fibrotic mouse livers", *Nature Protocols*, **10**, pp.305-315.
- [2] D.N. D'Ambrosio, J.L. Walewski, R.D. Clugston, P.D. Berk, R.A. Rippe, W.S. Blanter (2011), "Distinct populations of hepatic stellate cells in the mouse liver have different capacities for retinoid and lipid storage", *PLOS ONE*, **6**(9), DOI: 10.1371/journal.pone.0024993.
- [3] F. Tacke and R. Weiskir Chen (2012), "Update on hepatic stellate cells: pathogenic role in liver fibrosis and novel isolation techniques", *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology*, **6**(1),



Hình 3. Sự thay đổi biểu hiện của các gen tự thực trên tế bào hình sao hoạt hóa. Các tế bào HSCs hoạt hóa khi nuôi cấy *in vitro* được đánh giá mức độ biểu hiện mRNA của các gen tự thực *lc3b*, *beclin 1*, *atg12* (D); sự biểu hiện của protein LC3 bằng nhuộm ICC (A, B, C). Thước kẻ: 20 μ m nếu không có chú thích trên hình. *p < 0,05.

pp.67-80.

[4] T. Higashi, S.L. Friedman, Y. Hoshida (2017), "Hepatic stellate cells as key target in liver fibrosis", *Advanced Drug Delivery Reviews*, **121**, pp.27-42.

[5] T. Tsuchida and S.L. Friedman (2017), "Mechanisms of hepatic stellate cell activation", *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, **14**(7), pp.397-411.

[6] F. Yu, S. Ji, L. Su, L. Wan, S. Zhang, C. Dai, et al. (2015), "Adipose-derived mesenchymal stem cells inhibit activation of hepatic stellate cells in vitro and ameliorate rat liver fibrosis in vivo", *Journal of the Formosan Medical Association*, **114**(2), pp.130-138.

[7] R. Safadi and S. Friedman (2002), "Hepatic fibrosis--role of hepatic stellate cell activation", *Med. Gen. Med.*, **4**(3), DOI: 10.1002/jgm.242.

[8] Y. Feng, D. He, Z. Yao, D.J. Klionsky (2014), "The machinery of macroautophagy", *Cell Research*, **24**(1), pp.24-41.

[9] Y.-Q. Mao and X.-M. Fan (2015), "Autophagy: a new therapeutic target for liver fibrosis", *World Journal of Hepatology*, **7**(16), pp.1982-1986.

[10] H.M. Ni, A. Bockus, N. Boggess, H. Jaeschke, W.X. Ding (2012), "Activation of autophagy protects against acetaminophen-induced hepatotoxicity", *Hepatology*, **55**(1), pp.222-232.

[11] J. Feng, K. Chen, Y. Xia, L. Wu, J. Li, S. Li, et al. (2018), "Salidroside ameliorates autophagy and activation of hepatic stellate cells in mice via NF- κ B and TGF- β 1/Smad3 pathways", *Drug Des. Devel. Ther.*, **12**, pp.1837-1853.

[12] J. Li, K. Chen, S. Li, J. Feng, T. Liu, F. Wang, et al. (2016), "Protective effect of fucoidan from *Fucus vesiculosus* on liver fibrosis via the TGF- β 1/Smad pathway-mediated inhibition of extracellular matrix and autophagy", *Drug Design, Development and Therapy*, **10**, pp.619-630.

[13] K. Yu, N. Li, Q. Cheng, J. Zheng, M. Zhu, S. Bao, et al. (2018), "miR-96-5p prevents hepatic stellate cell activation by inhibiting autophagy via ATG7", *J. Mol. Med. (Berl.)*, **96**(1), pp.65-74.

[14] P.C.A. Benitez, A.I.P. Viglietti, C.K. Herrmann, V.A. Dennis, D.J. Comerici, G.H. Giambartolomei, et al. (2018), "Brucella abortus promotes a fibrotic phenotype in hepatic stellate cells, with concomitant activation of the autophagy pathway", *Infect. Immun.*, **86**(1), DOI: 10.1128/IAI.00522-17.

[15] W. He, B. Wang, J. Yang, Y. Zhuang, L. Wang, X. Huang, et al. (2014), "Chloroquine improved carbon tetrachloride-induced liver fibrosis through its inhibition of the activation of hepatic stellate cells: role of autophagy", *Biol. Pharm. Bull.*, **37**(9), pp.1505-1509.

[16] J.H. Kim, Y.H. Huh, H.R. Kim (2016), "Induction of autophagy in the striatum and hypothalamus of mice after 835 MHz radiofrequency exposure", *PLOS ONE*, **11**(4), DOI: 10.1371/journal.pone.0153308.

[17] S. Bang, H. Shin, H. Song, C.S. Suh, H.J. Lim (2014), "Autophagic activation in vitrified-warmed mouse oocytes", *Reproduction*, **148**(1), DOI: 10.1530/REP-14-0036.

[18] A.M. Sousa, T. Liu, O. Guevara, J. Stevens, B.L. Fanburg,

M. Gaestel, et al. (2007), "Smooth muscle α -actin expression and myofibroblast differentiation by TGF β are dependent upon MK2", *J. Cell Biochem.*, **100**(6), pp.1581-1592.

[19] L. Wu, Q. Zhang, W. Mo, J. Feng, S. Li, J. Li, et al. (2017), "Quercetin prevents hepatic fibrosis by inhibiting hepatic stellate cell activation and reducing autophagy via the TGF- β 1/Smads and PI3K/Akt pathways", *Scientific Reports*, **7**(1), pp.1-13.

[20] L. Liu and L. Gudas (2005), "Disruption of the lecithin: retinol acyltransferase gene makes mice more susceptible to vitamin A deficiency", *J. Biol. Chem.*, **280**(48), pp.40226-40234.

[21] N.T.M. Dan, T.H. Nhung, N.T. Linh, L.T. Thanh, P. Van Phuc (2017), "Evaluation of effects of Lingzhi mushroom (*Ganoderma lucidum*) on neural stem cells isolated from embryonic mouse brain (*Mus musculus* var. albino)", *Asia-Pacific Journal of Science and Technology*, **19**, pp.181-189.

[22] V. Hernández-Gea, Z. Ghiassi-Nejad, R. Rozenfeld, R. Gordon, M.I. Fiel, Z. Yue, et al. (2012), "Autophagy releases lipid that promotes fibrogenesis by activated hepatic stellate cells in mice and in human tissues", *Gastroenterology*, **142**(4), pp.938-946.

[23] W. Chen, Z. Zhang, Z. Yao, L. Wang, F. Zhang, J. Shao, et al. (2018), "Activation of autophagy is required for Oroxylin A to alleviate carbon tetrachloride-induced liver fibrosis and hepatic stellate cell activation", *International Immunopharmacology*, **56**, pp.148-155.

[24] S. Weiskirchen, C.G. Tag, S. Sauer-Lehnen, F. Tacke, R. Weiskirchen (2017), "Isolation and culture of primary murine hepatic stellate cells", *Methods Mol. Biol.*, pp.165-191, DOI: 10.1007/978-1-4939-7113-8_11.

[25] P. Maschmeyer, M. Flach, F. Winau (2011), "Seven steps to stellate cells", *Journal of Visualized Experiments*, **51**, DOI: 10.3791/2710.

[26] D.O. Minchenko, D. Tsymbal, O. Yavorovsky, N. Solokha, O.H. Minchenko (2017), "Expression of genes encoding IGFBPs, SNARK, CD36, and PECAM1 in the liver of mice treated with chromium disilicide and titanium nitride nanoparticles", *Endocr. Regul.*, **51**(2), pp.84-95.

[27] M. Nitou, K. Ishikawa, N. Shiojiri (2000), "Immunohistochemical analysis of development of desmin-positive hepatic stellate cells in mouse liver", *J. Anat.*, **197**(4), pp.635-646.

[28] L. Atzori, G. Poli, A. Perra (2009), "Hepatic stellate cell: a star cell in the liver", *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **41**(8-9), pp.1639-1642.

[29] H.L. Reeves and S.L. Friedman (2002), "Activation of hepatic stellate cells - a key issue in liver fibrosis", *Frontiers in Bioscience: a Journal and Virtual Library*, **7**(4), pp.808-826.

[30] Y. Yokoi, T. Namihisa, H. Kuroda, I. Komatsu, A. Miyazaki, S. Watanabe, et al. (1984), "Immunocytochemical detection of desmin in fat-storing cells (Ito cells)", *Hepatology*, **4**(4), pp.709-714.

[31] L. Gao, Lv Gang, X. Guo, Y. Jing, Z. Han, S. Zhang, et al. (2014), "Activation of autophagy protects against cholestasis-induced hepatic injury", *Cell & Bioscience*, **4**(1), DOI: 10.1186/2045-3701-4-47.

Nghiên cứu khả năng chịu hạn liên quan đến hình thái rễ và cấu trúc khí khổng của 12 giống lúa mùa (*Oryza sativa* L.) trong điều kiện hạn nhân tạo

Trần Ngọc Sơn*, Võ Công Thành, Võ Lan Hương, Đặng Thị Yến Nhi,
Trần Thị Thùy Dương, Nguyễn Lam Đình, Từ Thị Diễm My

Khoa Nông nghiệp, Trường Đại học Cần Thơ

Ngày nhận bài 25/9/2020; ngày chuyển phản biện 29/9/2020; ngày nhận phản biện 13/11/2020; ngày chấp nhận đăng 20/11/2020

Tóm tắt:

Chọn giống lúa chịu hạn để canh tác là biện pháp hiệu quả nhất hiện nay nhằm tránh những ảnh hưởng do hạn hán đang có những diễn biến phức tạp. Thí nghiệm được bố trí kiểu khối hoàn toàn ngẫu nhiên một nhân tố, gồm 12 giống lúa mùa trong điều kiện gây hạn nhân tạo, 3 lần lặp lại. Các chỉ tiêu được đánh giá qua hình thái, cấu trúc giải phẫu rễ và khí khổng cây lúa phù hợp với môi trường hạn. Kết quả cho thấy 3 giống (Sophinh, Xương gà đỏ và Bằng nâu) có khả năng chịu hạn tốt nhất trong giai đoạn sinh trưởng dinh dưỡng (28 ngày sau khi ngắt nước). Giống Sophinh có mật độ và diện tích khí khổng nhỏ nhất (tương ứng 529,3 kk/mm^2 và 88,6 μm^2), giúp giảm mất nước qua quá trình thoát hơi nước khi cây thiếu nước. Giống Xương gà đỏ có tỷ lệ rễ sâu cao nhất (58,7%), có thể tăng khả năng lấy nước từ tầng đất sâu. Giống Bằng nâu có đường kính rễ dày 876,3 μm và diện tích lỗ lớn (đạt 54,4 $\times 10^3 \mu\text{m}^2$), chứa nhiều hậu môc và tổng diện tích hậu môc lớn nhất (tương ứng 5,6 và 12 $\times 10^3 \mu\text{m}^2$), giúp tăng lực dẫn nước lên chồi. Mối quan hệ giữa số rễ, số mạch hậu môc và mật độ khí khổng là tương quan nghịch; trong khi tương quan giữa đường kính rễ, số hậu môc và tổng diện tích hậu môc là tương quan thuận. Kết quả này sẽ giúp định hướng phát triển giống lúa theo cơ chế chịu hạn.

Từ khóa: chịu hạn, khí khổng, lúa mùa, rễ.

Chỉ số phân loại: 4.1

Đặt vấn đề

Được dự báo là một trong số những quốc gia bị ảnh hưởng nhiều nhất của biến đổi khí hậu, Việt Nam nói chung và Đồng bằng sông Cửu Long (ĐBSCL) nói riêng đã phải gánh chịu những tổn thất nặng nề do hạn hán và lũ lụt gây ra. Kể từ năm 2000 đến nay, tình trạng hạn hán đã liên tục xảy ra vào các năm 2002, 2004, 2005, 2006, 2009, 2015 và 2016 [1]. Đặc biệt, đợt hạn hán và xâm nhập mặn năm 2016 đã gây thiệt hại nặng nề nhất, toàn vùng ĐBSCL có đến 208.000 ha lúa bị thiệt hại, trong đó 60% bị thiệt hại nặng và nhiều vùng mất trắng.

Từ thực tế cho thấy, chọn tạo và sử dụng giống lúa chịu hạn trong canh tác là một trong những giải pháp hiệu quả và bền vững đối với những vùng sinh thái thường xuyên bị hạn hán như ĐBSCL. Tuy có tiềm năng đa dạng về số lượng và chủng loại giống lúa mùa địa phương nhưng việc đánh giá cải tiến giống lúa chịu hạn còn rất ít, chưa đáp ứng kịp yêu cầu sản xuất hiện nay. Đối với cây lúa, thiếu nước có ảnh hưởng lớn đến hình thái ở giai đoạn sinh trưởng và sinh sản. Tuy nhiên, nhiều báo cáo đã cho rằng, để chống chịu hạn, một số giống lúa đã phát triển kiểu hình có bộ rễ dài ăn sâu,

giúp tăng cường khả năng hút nước từ tầng đất sâu và giảm mất nước qua lá bằng cách thay đổi cấu trúc khí khổng [2, 3]. Để nâng cao chất lượng và sản lượng nhằm giảm thiệt hại do hạn hán gây ra, việc nghiên cứu chọn tạo giống lúa chịu hạn mới dựa trên hình thái nhằm bổ sung vào nguồn vật liệu di truyền lúa chịu hạn là vấn đề cấp thiết hiện nay. Nghiên cứu này nhằm đánh giá những đặc điểm hình thái rễ và khí khổng trên nhiều giống lúa mùa khác nhau để chọn ra giống mang tính trạng thích nghi với môi trường hạn, phục vụ công tác lai tạo và chọn giống lúa chịu hạn tốt cho vùng ĐBSCL.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu, địa điểm, thời gian nghiên cứu

Nghiên cứu sử dụng 12 giống lúa mùa có nguồn gốc tại Tây Ninh (Xương gà đỏ, Xương gà trắng, Ông từng đỏ, Lãng nhây trắng, Bằng nâu, Tiêu mỡ đỏ) và An Giang (Một bụi đỏ, Thái Lan, Sophinh, Macri 1, Bông gừng trắng, Nàng coi) được trồng từ tháng 8/2019 tại nhà lưới có mái che thuộc Bộ môn Di truyền và Chọn giống cây trồng, Trường Đại học Cần Thơ.

* Tác giả liên hệ: Email: ngocsonbiotech5011@gmail.com

Drought tolerance related to root morphology and stomatal structure of the 12 seasonal rice varieties (*Oryza sativa* L.) under artificial drought conditions

Ngoc Son Tran*, Cong Thanh Vo, Lan Huong Vo, Thi Yen Nhi Dang, Thi Thuy Duong Tran, Lam Dinh Nguyen, Thi Diem My Tu

College of Agriculture and Applied Biology, Can Tho University

Received 25 September 2020; accepted 20 November 2020

Abstract:

Drought-tolerant rice varieties are one of the best choices to avoid the effects of drought. A Randomized Complete Block Design (RCBD) with three replications was used for the experiment. 12 seasonal rice were tested under artificial drought conditions. The criteria were assessed through the morphology, root anatomical structure, and stomatal leaves that were suitable for the drought environment. The results showed that 3 seasonal rice were well adapted to this condition. Sophinh had the smallest density and area of stomata (529.3 stomata/mm² and 88.6 μm² respectively), they helped reduce water loss. Xuong ga do had the highest ratio of deep roots 58.7% which could increase the ability to take water from the deep soil layer. Bang nau had a thick root diameter of 876.3 μm and a stele root area of 54.4x10³ μm² containing a high number and more areas of late metaxylems (5.6 and 12x10³ μm² respectively). These factors helped increase water flux from root to shoot. Correlation among the density of stomata, number of roots, and the number of late metaxylem were negative while correlation among diameter of roots, number of late metaxylem, and total areas of late metaxylem were positive. These results were useful for developing drought-tolerant rice varieties.

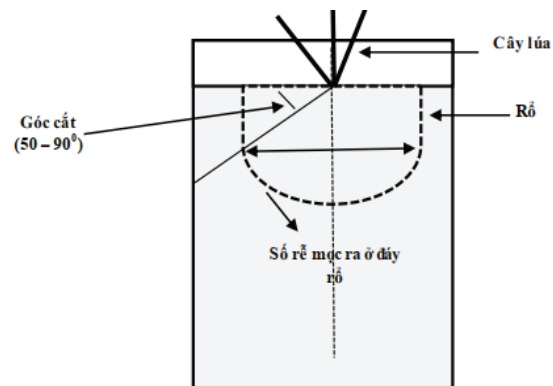
Keywords: drought avoidance, root, seasonal rice, stomata.

Classification number: 4.1

Phương pháp nghiên cứu

Bố trí thí nghiệm:

Thí nghiệm được bố trí theo kiểu khối hoàn toàn ngẫu nhiên một nhân tố (giống lúa), 3 lần lặp lại. Tiến hành ngắt nước xử lý hạn sau 40 ngày gieo bằng cách ngưng tưới nước đến khi 50% số lá bị khô thì tưới nước phục hồi. Thí nghiệm được thực hiện theo phương pháp rổ nhựa (basket) (hình 1) [4, 5].



Hình 1. Sơ đồ mô tả phương pháp rổ nhựa (basket).

Đất được phơi khô, làm nhuyễn, rây loại bỏ tạp chất, sau đó bổ sung thêm cát (tỷ lệ 6 đất/4 cát). Hỗn hợp đất cát pha được cho vào chậu kích thước 28x22x30 cm, đặt rổ nhựa cách mặt chậu 2 cm, các chậu sau đó được làm ẩm bằng cách tưới 4 ngày một lần với lượng nước đồng nhất đủ độ ẩm đồng ruộng (độ ẩm >80%) cho đến 40 ngày sau gieo. Hạt lúa sau khi ủ nảy mầm được gieo vào chậu, 1 cây/chậu. Các chậu được bổ sung lượng phân bón 20 g urea, 35 g super lân và 10 g KCl tại 2 thời điểm bón lót và 15 ngày sau khi gieo.

Chỉ tiêu theo dõi:

Độ ẩm đất được đo 7 ngày 1 lần ở tất cả các chậu vào giờ trưa mỗi ngày bằng máy Takemura.

Tổng số rễ (T_R) được tính dựa trên tổng số rễ chính của một bụi xuyên qua rổ nhựa. Tỷ lệ rễ sâu (RDR) được định nghĩa là số rễ xuyên qua phần mắt lưới 2 mm của rổ nhựa (tức là phần được xác định bởi một góc 50-90° theo phương ngang mặt đất tính từ gốc lúa) chia cho tổng số rễ. Thời điểm ghi nhận sau khi cây được tưới nước phục hồi 14 ngày.

Cấu trúc rễ và các mạch xylem rễ được quan sát ($n=5$ rễ) phân tích theo phương pháp Terashima, et al. (1987) [6]. Quan sát mặt cắt ở vị trí cách gốc 3 cm để đo đường kính rễ (D_R), số mạch hậu mộc (latemetaxylem - LMX), diện tích lõi (S_{stele}) và tổng diện tích hậu mộc (S_{LMX}).

Mật độ và kích thước khí khổng trên biểu bì lá lúa được khảo sát theo phương pháp Baloch, et al. (2013) [7] khi cây có biểu hiện cuộn lá trên thị trường vật kính 40X. Quan sát sự phân bố và đếm số lượng khí khổng thấy được trong

diện tích tại 3 vị trí đầu, giữa và chóp lá của 2 mặt lá. Mật độ khí khổng (D_{kk}) được tính theo số lượng khí khổng/mm². Đo kích thước chiều dài (L_{kk}) và chiều rộng (W_{kk}) tế bào khí khổng (n=30 khí khổng). Diện tích khí khổng tính bằng cách nhân chiều dài và rộng trung bình của khí khổng.

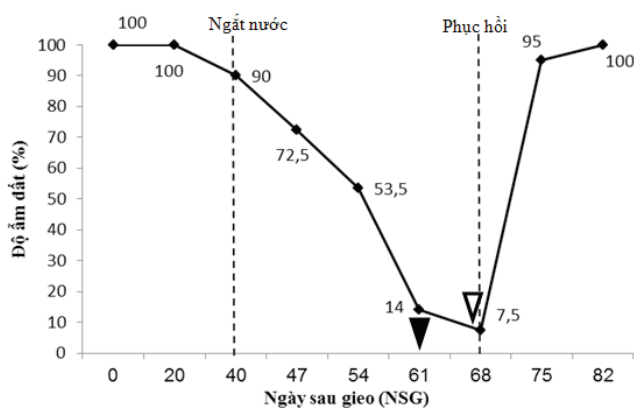
Phân tích thống kê:

Số liệu giải phẫu khí khổng và rễ được đo bằng phần mềm OptikalSview. Dữ liệu được phân tích thống kê bằng SPSS 23.0 dùng kiểm định Duncan ở mức ý nghĩa 5% để so sánh các giá trị trung bình và phân tích hệ số tương quan Pearson.

Kết quả và thảo luận

Diễn biến độ ẩm đất

Diễn biến độ ẩm của đất được trình bày ở hình 2.



Hình 2. Diễn biến giá trị trung bình độ ẩm đất.

Ghi chú: ▼: Thời điểm cuộn lá; ▽: Thời điểm cháy lá.

Kết quả ở hình 2 cho thấy, diễn biến giá trị trung bình độ ẩm đất giữa các chậu thay đổi giảm dần tại thời điểm ngắt nước kể từ 40 NSG. Theo đó, độ ẩm bắt đầu giảm nhanh xuống còn 72,5% vào 47 NSG, sau đó độ ẩm tiếp tục giảm đến mức thấp nhất ghi nhận được là 7,5% tại thời điểm 68 NSG. Trong đó với mức độ ẩm đạt 14% cây bắt đầu cho thấy có biểu hiện cuộn lá. Đến mức độ ẩm còn 7,5% sự tổn thương do hạn gây ra các vết cháy lá trên cây lúa biểu hiện thấy rõ. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Trần Nguyên Thập (2001) [8] khi thực hiện thí nghiệm hạn trên lúa, rằng cây biểu hiện stress hạn bằng biểu hiện cuộn lá khi độ ẩm dưới 14%. So sánh kết quả nghiên cứu lúa chịu hạn, Zu, et al. (2017) [9] cũng thấy rằng khi độ ẩm đất đạt 15% những giống lúa rẫy bắt đầu cuộn lá, đạt 10% lá héo khô và lá tổn thương nặng khi độ ẩm đất đạt 5%. Độ ẩm đất có vai trò quan trọng trong việc kiểm soát hạn hán, khi độ ẩm đất thấp hơn một giới hạn nào đó, thực vật không hút đủ nước thì sẽ bị hạn [1]. Giới hạn này phụ thuộc vào khả năng giữ nước của đất và khả năng lấy nước của cây.

Cấu trúc khí khổng lá lúa trong điều kiện hạn

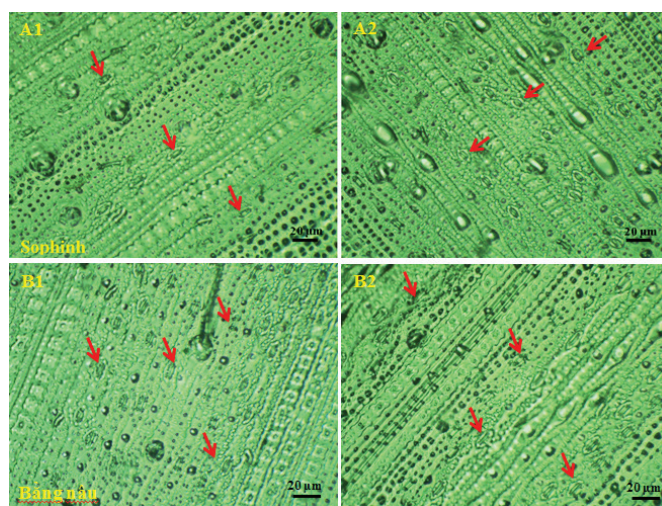
Cấu trúc khí khổng lá lúa trong điều kiện hạn được thể hiện ở bảng 1.

Bảng 1. Mật độ phân bố và kích thước khí khổng của 12 giống lúa mùa trong điều kiện hạn.

TT	Giống	D_{kk} (kk/mm ²)	L_{kk} (μm)	W_{kk} (μm)	S_{kk} (μm ²)
1	Xương gà đỏ	577,3 ^{def}	14,6 ^{bcd}	6,3 ^c	91,6 ^{de}
2	Xương gà trắng	547,0 ^{ef}	14,3 ^{cd}	6,4 ^{de}	91,3 ^{de}
3	Ông từng đỏ	662,3 ^{abc}	14,1 ^d	6,5 ^{cde}	91,5 ^{de}
4	Lăng nhây trắng	616,7 ^{a-d}	16,2 ^a	6,9 ^{ab}	109,6 ^{ab}
5	Bằng nâu	620,3 ^{a-d}	15,5 ^{ab}	6,7 ^{bcd}	103,4 ^{bc}
6	Tiểu mỡ đỏ	604,3 ^{cde}	16,4 ^a	6,8 ^{bc}	110,8 ^{ab}
7	Sophinh	529,3 ^f	14,3 ^{cd}	6,3 ^c	88,6 ^e
8	Một bụi đỏ	675,7 ^{ab}	15,0 ^{bcd}	6,7 ^{bcd}	98,8 ^{cd}
9	Thái Lan	608,7 ^{b-e}	15,2 ^{bc}	6,6 ^{cde}	99,1 ^{cd}
10	Năng coi	644,0 ^{a-d}	16,2 ^a	7,1 ^a	114,8 ^a
11	Macri 1	683,0 ^a	14,5 ^{bcd}	6,9 ^{ab}	100,1 ^c
12	Bông gừng trắng	652,0 ^{abc}	16,4 ^a	7,1 ^a	115,6 ^a
F		*	*	*	*
CV(%)		5,9	3,5	2,7	4,2

Chú thích: *: khác biệt mức ý nghĩa 5%. Trong cùng một cột, các số theo sau có cùng ký tự chữ cái thì khác biệt không ý nghĩa qua phép thử Duncan. D_{kk} : mật độ khí khổng, L_{kk} : dài khí khổng, W_{kk} : rộng khí khổng, S_{kk} : diện tích khí khổng.

Kết quả ở bảng 1 cho thấy, mật độ và kích thước khí khổng khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 5% giữa các giống lúa. Mật độ khí khổng trung bình phân bố trên bề mặt lá dao động từ 529,3-683 kk/mm². Giống có mật độ phân bố khí khổng cao nhất là Macri 1 (683 kk/mm²) và ít nhất là Sophinh (529,3 kk/mm²), khác biệt có ý nghĩa so với các giống còn lại (hình 3).



Hình 3. Cấu trúc khí khổng mặt trên (A1-B1) và mặt dưới (A2-B2) lá của Sophinh và Bằng nâu.

Nghiên cứu của Xiong, et al. (2002) [10] cho rằng, trong điều kiện hạn lá cây cần giảm bớt việc thoát hơi nước khi đóng mở khí khổng, vì vậy giảm số lượng khí khổng ở 2 mặt biểu bì lá góp phần hạn chế mất nước khi cây đang trong điều kiện thiếu nước. Sự gia giảm mật độ khí khổng để đối phó với hạn hán khác nhau giữa các loài thực vật và phụ thuộc vào mức độ nghiêm trọng của tình trạng thiếu nước [11]. Để đối phó với sự thay đổi môi trường, thực vật có thể điều chỉnh sự phát triển của khí khổng ở những chiếc lá mới [12]. Khi lá trưởng thành cảm nhận được điều kiện môi trường thay đổi, mật độ khí khổng sẽ được điều chỉnh ngay trong quá trình phát triển lá [13]. Đã có nhiều báo cáo cho rằng, những đột biến làm giảm mật độ khí khổng đã giúp tăng cường khả năng chịu hạn của thực vật [14, 15]. Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu của Lưu Hoài Nam (2019) [16], sự giảm khí khổng ở biểu bì trên và dưới lá giúp cho lá lúa hạn chế được sự mất nước qua khí khổng, đồng thời tích trữ nước cung cấp cho hoạt động trao đổi chất của lá.

Xét về kích thước khí khổng ở bảng 1 cho thấy, trung bình chiều dài khí khổng biến thiên từ 14,1-16,4 μm và chiều rộng từ 6,3-7,1 μm . Trong đó 2 giống Bông gừng trắng và Nàng coi có chiều dài khí khổng dài nhất (tương ứng 16,4 và 16,2 μm) và chiều rộng cũng lớn nhất (7,1 μm). Chính vì vậy mà cả 2 giống có diện tích khí khổng (tương ứng 115,6 và 114,8 μm^2) lớn hơn so với các giống còn lại. Riêng giống Sophinh, bên cạnh mật độ khí khổng thấp là kích thước chiều dài, chiều rộng (tương ứng 14,3 và 6,3 μm) và cả diện tích khí khổng đạt nhỏ nhất (88,6 μm^2) so với các giống lúa mùa được khảo sát.

Sự trao đổi khí qua lá bị ảnh hưởng rất lớn bởi số lượng cũng như kích thước khí khổng [17]. Độ ẩm trong đất giảm, làm giảm lượng nước trong lá, các tế bào bảo vệ bị mất nước gây mất áp lực sức trương, từ đó làm cho kích thước khí khổng giảm xuống hoặc gây đóng khí khổng [18]. Sự suy giảm kích thước khí khổng là sự thích nghi của thực vật để đáp ứng với sự thiếu hụt nước và nhiệt độ cao [19]. Theo Gupta (1997) [20], thực vật trong điều kiện khô hạn thường có khí khổng nhỏ hơn so với thực vật sống trong điều kiện đủ nước. Như vậy, để tối đa hóa hoạt động quang hợp đồng thời giảm thiểu sự mất nước trong điều kiện khô hạn, cây trồng cần phải điều chỉnh cả về số lượng và kích thước của khí khổng cũng như khả năng đóng mở [21]. Có thể thấy Sophinh có đặc điểm khí khổng gần như phù hợp trong việc hạn chế mất nước trong điều kiện hạn khi có mật độ và kích thước khí khổng nhỏ nhất so với các giống khác.

Hình thái rễ lúa trong điều kiện hạn

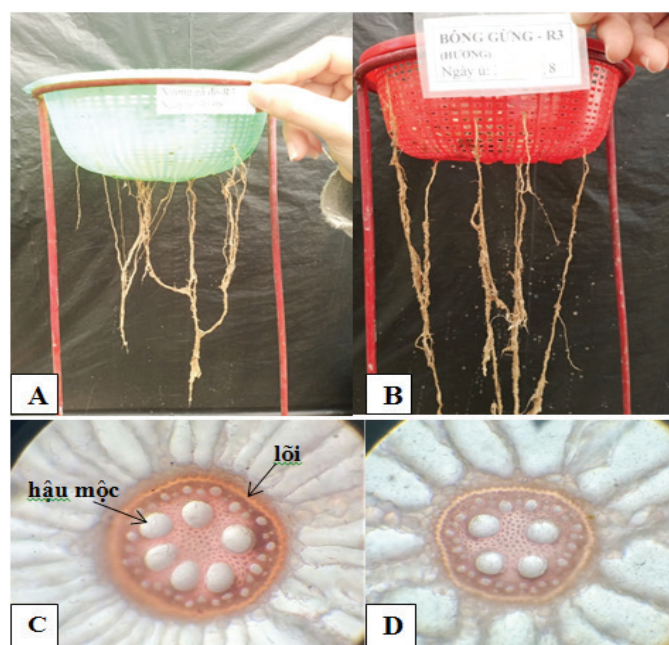
Hình thái cũng như số lượng và sự phân bố rễ của các giống lúa mùa trong điều kiện hạn được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2. Số lượng, sự phân bố và hình thái giải phẫu rễ của 12 giống lúa mùa trong điều kiện hạn.

TT	Giống	T_R	RDR (%)	D_R (μm)	S_{stele} ($\times 10^3 \mu\text{m}^2$)	LMX	S_{LMX} ($\times 10^3 \mu\text{m}^2$)
1	Xương gà đỏ	19,3 ^{bc}	58,7 ^a	867,7 ^a	41,2 ^{cd}	4,5 ^{bc}	7,9 ^{def}
2	Xương gà trắng	19,7 ^{bc}	45,8 ^{bc}	389,9 ^c	29,5 ^c	5,6 ^a	3,9 ^b
3	Ông từng đỏ	11,0 ^e	33,5 ^d	888,2 ^a	42,7 ^{cd}	4,5 ^{bc}	7,6 ^{ef}
4	Lăng nháy trắng	21,0 ^b	50,7 ^b	827,5 ^a	41,7 ^{cd}	5,1 ^{ab}	8,8 ^{cd}
5	Bằng nâu	25,3 ^a	23,8 ^e	876,3 ^a	54,4 ^a	5,6 ^a	12,0 ^a
6	Tiểu mỡ đỏ	14,0 ^d	35,8 ^d	703,4 ^b	38,1 ^{de}	4,4 ^c	8,4 ^{de}
7	Sophinh	18,3 ^c	25,5 ^e	844,5 ^a	47,4 ^{ab}	5,1 ^{ab}	11,4 ^a
8	Một bụi đỏ	8,0 ^f	37,9 ^{cd}	906,1 ^a	49,7 ^{abc}	4,4 ^c	9,8 ^{bc}
9	Thái Lan	14,7 ^d	45,6 ^{bc}	851,3 ^a	45,6 ^{abc}	4,6 ^{bc}	9,9 ^b
10	Nàng coi	19,3 ^{bc}	44,9 ^{bc}	866,3 ^a	41,7 ^{cd}	4,3 ^c	7,1 ^f
11	Macri 1	14,7 ^d	25,0 ^e	709,4 ^b	33,6 ^{de}	3,3 ^d	6,1 ^g
12	Bông gừng trắng	16,0 ^d	21,0 ^e	911,5 ^a	45,3 ^{abc}	4,3 ^c	7,9 ^{def}
F		*	*	*	*	*	*
CV(%)		6,7	11,6	7,7	13,1	8,1	7,4

Chú thích: *: khác biệt mức ý nghĩa 5%. Trong cùng một cột, các số theo sau có cùng ký tự chữ cái thì khác biệt không ý nghĩa qua phép thử Duncan. T_R : tổng số rễ, RDR: tỷ lệ rễ sâu, D_R : đường kính rễ, LMX: số mạch hậu mội, S_{stele} : diện tích lõi, S_{LMX} : tổng diện tích mạch hậu mội.

Kết quả bảng 2 cho thấy, các đặc điểm hình thái rễ có sự khác biệt ý nghĩa thống kê ở mức 5%. Tổng số rễ ghi nhận trong môi trường hạn biến thiên từ 8,0-25,3, giống lúa Bằng nâu có nhiều rễ nhất với số rễ đạt 25,3 và Một bụi đỏ có số rễ ít nhất là 8,0. Tuy nhiên, sự phân bố rễ sâu lại có sự khác biệt nhau, cụ thể Xương gà đỏ có sự phân bố rễ sâu nhiều nhất với tỷ lệ 58,7%, riêng nhóm Bằng nâu (23,8%), Sophinh (25,5%), Macri 1 (25%) và Bông gừng trắng (21%) có mức độ phát triển rễ sâu thấp (hình 4).



Hình 4. Hình thái rễ giống lúa Xương gà đỏ (A), Bông gừng trắng (B) và cấu trúc giải phẫu rễ giống lúa Bằng nâu (C), Một bụi đỏ (D).

Nghiên cứu cho thấy, cấu trúc và sự phát triển của hệ thống rễ lúa quyết định phần lớn chức năng của cây lúa khi bị hạn [22]. Để tránh hạn, nhiều cây trồng đã thay đổi sự phân bố rễ cận thành rễ sâu để có thể lấy nước từ các lớp đất sâu hơn [23]. Nguyễn Thị Bích Vân (2018) [24] đánh giá sự thích nghi môi trường hạn về tỷ lệ rễ sâu của 4 giống lúa cao sản cho thấy, cây lúa khi thiếu nước sẽ tập trung phát triển rễ theo chiều sâu tạo một góc 50-90° tính từ gốc rễ nhiều hơn môi trường đủ nước. Ngoài ra, Price, et al. (1999) [25] nhận thấy lúa mùa ở vùng cao có hệ thống rễ sâu có thể góp phần tăng khả năng chịu hạn nhờ tăng khả năng hút nước. Một gen kiểm soát tỷ lệ rễ sâu đã được phát hiện trên nhiễm sắc thể số 9 bằng cách sử dụng 117 dòng RILs từ tổ hợp lai IR64 x Kinanang Patong [26]. Kết quả cho thấy, gen Dro1 liên quan đến việc vận chuyển auxin tới đầu rễ, giúp kéo dài những tế bào ở đây, chính sự biểu hiện cao của Dro1 làm rễ phát triển theo chiều sâu và những dòng mang gen đều tăng tỷ lệ rễ sâu nên tránh được hạn và duy trì được năng suất [27]. Như vậy, đặc điểm phát triển nhiều rễ sâu của Xương gà đỏ sẽ có nhiều thuận lợi trong môi trường thiếu nước so với những giống khác.

Kết quả về cấu trúc giải phẫu ở bảng 2 cho thấy, đường kính rễ các giống dao động từ 389,9-911,5 μm , riêng Xương gà trắng có đường kính rễ nhỏ nhất là 389,9 μm , kế đến là Tiêu mỡ đỏ và Macri 1 lần lượt 703,4 và 709,4 μm . Lõi là nơi chứa toàn bộ mạch dẫn và là vị trí quan trọng của cây. Kết quả bảng 2 cho thấy, diện tích lõi biến thiên từ 29,5-54,4 μm^2 , trong đó diện tích lõi lớn nhất là Bằng nâu (54,4x10³ μm^2) và nhỏ nhất là Xương gà trắng (29,5x10³ μm^2). Xét về số hậu mộc và tổng diện tích hậu mộc cho thấy, với kích thước lõi lớn nên Bằng nâu có số hậu mộc nhiều và tổng diện tích hậu mộc lớn nhất (tương ứng 5,6 và 12x10³ μm^2) (hình 4). Ngoài ra, Sophinh cũng có tổng diện tích hậu mộc lớn (11,4x10³ μm^2) tương đương với Bằng Nâu. Đặc biệt, riêng Xương gà trắng tuy có kích thước lõi nhỏ nhưng số hậu mộc nhiều (5,6) và tổng diện tích hậu mộc nhỏ (3,9x10³ μm^2). Có thể thấy ở Xương gà trắng có sự phát triển nhiều mạch hậu mộc nhưng do giới hạn bởi lõi nên kích thước các mạch sẽ nhỏ.

Độ dày rễ là một trong những tính trạng quan trọng trong cơ chế tránh hạn của cây trồng, vì rễ có đường kính lớn hơn có liên quan đến khả năng xuyên sâu vào đất [28, 29], phân nhánh, có cấu trúc mạch dẫn lớn và có công suất lớn cho sự hấp thu nước từ các lớp đất sâu [30]. Tuy nhiên, nhiều nghiên cứu cây trồng chịu hạn chỉ tập trung vào độ dày rễ hơn là cấu trúc lõi và mạch hậu mộc bên trong. Uga, et al. (2008) [31] cho rằng, không giống với độ dày rễ, đặc điểm cấu trúc lõi và mạch hậu mộc khác biệt ở những giống khác nhau bởi sự kết hợp nhiều allens trên những QTL khác nhau. Kích thước và số lượng mạch hậu mộc ảnh hưởng lớn đến vận chuyển nước lên chồi [32]. Đường kính hậu mộc lớn ảnh hưởng đến dòng chảy dẫn nước trong cây, giúp tăng cường hấp thu nước [33]. Như vậy, đối với tính trạng giải phẫu rễ, Bằng nâu và Sophinh cho thấy có những đặc điểm độ dày cũng như cấu trúc lõi và mạch hậu mộc tốt, phù hợp với khả năng tăng cường vận chuyển nước trong điều kiện hạn.

Mối tương quan giữa hình thái rễ và khí khổng

Mối tương quan giữa hình thái rễ và khí khổng của các giống lúa được trình bày ở bảng 3.

Bảng 3. Hệ số tương quan Pearson giữa đặc điểm hình thái rễ và khí khổng của 12 giống lúa mùa trong điều kiện hạn.

	T_R	D_R	LMX	S_{stale}	S_{LMX}	D_{kk}	L_{kk}	W_{kk}	S_{kk}
T_R	1,00								
D_R	-0,14 ^{ns}	1,00							
LMX	0,52 ^{**}	-0,17 ^{ns}	1,00						
S_{stale}	0,08 ^{ns}	0,71 ^{**}	0,15 ^{ns}	1,00					
S_{LMX}	0,11 ^{ns}	0,63 ^{**}	0,24 ^{ns}	0,75 ^{**}	1,00				
D_{kk}	-0,42 [*]	0,31 ^{ns}	-0,52 ^{**}	0,03 ^{ns}	-0,09 ^{ns}	1,00			
L_{kk}	0,21 ^{ns}	0,21 ^{ns}	-0,05 ^{ns}	0,11 ^{ns}	0,11 ^{ns}	0,10 ^{ns}	1,00		
W_{kk}	-0,02 ^{ns}	0,23 ^{ns}	-0,35 [*]	0,03 ^{ns}	-0,13 ^{ns}	0,49 ^{**}	0,56 ^{**}	1,00	
S_{kk}	0,14 ^{ns}	0,22 ^{ns}	-0,20 ^{ns}	0,07 ^{ns}	-0,01 ^{ns}	0,28 ^{ns}	0,93 ^{**}	0,81 ^{**}	1,00

Chú thích: **: khác biệt mức ý nghĩa 1%; *: khác biệt mức ý nghĩa 5%; ns: khác biệt không ý nghĩa. T_R : tổng số rễ, D_R : đường kính rễ, LMX: số mạch hậu mộc, S_{stale} : diện tích lõi, S_{LMX} : tổng diện tích mạch hậu mộc, D_{kk} : mật độ khí khổng, L_{kk} : dài khí khổng, W_{kk} : rộng khí khổng, S_{kk} : diện tích khí khổng.

Kết quả bảng 3 cho thấy, có mối quan hệ tương quan có ý nghĩa thống kê giữa đặc điểm hình thái rễ và khí khổng cây lúa trong điều kiện hạn. Đối với rễ cho thấy, có sự tương quan thuận cao giữa tổng số rễ với số hậu mộc ($r=0,52^{**}$), đường kính rễ với diện tích lõi ($r=0,71^{**}$) và tổng diện tích hậu mộc ($r=0,63^{**}$), diện tích lõi với tổng diện tích hậu mộc ($r=0,75^{**}$). Đối với khí khổng có thể thấy sự tương quan thuận cao giữa diện tích với chiều dài ($r=0,93^{**}$) và chiều rộng ($r=0,81^{**}$), chiều dài với chiều rộng ($r=0,56^{**}$), riêng mật độ với chiều rộng ($r=0,49^{**}$) có sự tương quan thuận trung bình. Xét cả hình thái rễ và khí khổng cho thấy, có sự tương quan nghịch cao giữa mật độ khí khổng với số hậu mộc ($r=-0,52^{**}$) và tương quan nghịch trung bình giữa tổng số rễ với mật độ khí khổng ($r=-0,42^{*}$) và số hậu mộc với chiều rộng khí khổng ($r=-0,35^{*}$).

Khả năng chịu hạn là một tính trạng số lượng kết hợp nhiều tính trạng liên quan và không phải giống nào cũng có tất cả những đặc điểm thích nghi với hạn hán. Việc đánh giá mức độ tương quan có thể giúp định hướng cho việc lai tạo và chọn giống mang nhiều đặc điểm thích nghi tốt với hạn hán. Nhiều nghiên cứu cho rằng, rễ phát triển sâu hơn giúp tăng khả năng hút nước từ những tầng đất sâu, từ đó cải thiện thể năng nước bên trong chồi tại thời điểm hạn hán [34, 35]. Phát triển rễ nhiều cũng đã được chứng minh là tương quan với tình trạng nước trong chồi dưới áp lực hạn hán [36]. Do đó, sự tương quan nghịch giữa hình thái rễ với cấu trúc khí khổng cho thấy cây lúa thay đổi để tăng khả năng lấy nước từ đất và giảm mất nước để đáp ứng với môi trường hạn hán.

Kết luận

Nghiên cứu đã chọn ra được 3 giống lúa mùa có khả năng chịu hạn tốt, mỗi giống có đặc tính nổi bật riêng, nhất là hệ rễ. Giống Xương gà đỏ có hệ rễ phát triển ăn sâu, phù

hợp cho việc tăng cường khả năng lấy nước từ tầng đất sâu; trong khi 2 giống Bằng nân và Sophinh có đường kính rễ dày và diện tích lõi rễ lớn, chứa nhiều mạch hậu mộc lớn, giúp tăng lực dẫn nước từ rễ lên chồi. Ngoài ra, cấu trúc lá cũng góp phần vào tính chịu hạn, giống Sophinh có mật độ và cấu trúc khí khổng nhỏ, có thể hạn chế mất nước qua quá trình thoát hơi nước, giúp duy trì sức trương tế bào và thể năng nước trong cây. Kết quả nghiên cứu này là cơ sở quan trọng để các nhà khoa học chọn tạo các giống lúa mới có khả năng chống chịu hạn hán, đáp ứng nhu cầu của người dân vùng ĐBSCL.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Lê Huy Bá, Lương Văn Liệt và Nguyễn Xuân Hoàng (2017), *Khô hạn, xâm nhập mặn ở ĐBSCL: cơ sở lý luận và thực tiễn*, Nhà xuất bản Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh.
- [2] J.C. O'Toole, and T.T. Chang (1979), "Drought resistance in cereal. Rice: a case study", *Stress Physiology in Crop Plants*, Wiley, New York, pp.374-405.
- [3] J.S. Boyer (1996), "Advances in drought tolerance in plants", *Avances in Agronomy*, **56**, pp.187-218.
- [4] A. Oyanagi, T. Nakamoto and M. Wada (1993), "Relationship between root growth angle of seedlings and vertical distribution of roots in the field in wheat cultivars", *Japanese Journal of Crop Science*, **62**, pp.565-570.
- [5] Y. Uga, K. Ebana, J. Abe, S. Morita, K. Okuno and M. Yano (2009), "Variation in root morphology and anatomy among accessions of cultivated rice (*Oryza sativa* L.) with different genetic backgrounds", *Breeding Science*, **59**, pp.87-93.
- [6] K. Terashima, H. Hiraoka and I. Nishiyama (1987), "Varietal difference in the root of rice plant", *Jpn. J. Crop Sci.*, **56**, pp.521-529.
- [7] M.J. Baloch, J. Dunwell, N.U. Khan and W.A. Jatoti (2013), "Morpho-physiological characterization of spring wheat genotypes under drought stress", *International Journal of Agriculture and Biology*, **15**(5), pp.945-950.
- [8] Trần Nguyễn Tháp (2001), *Nghiên cứu xác định một số đặc trưng của các giống lúa chịu hạn và chọn tạo giống lúa chịu hạn CH5*, Luận án tiến sĩ nông nghiệp ngành chọn và nhân giống, Viện Khoa học Kỹ thuật Nông nghiệp, Hà Nội.
- [9] X. Zu, Y. Lu, Q. Wang, P. Chu, W. Miao, H. Wang and H. La (2017), "A new method for evaluating the drought tolerance of upland rice cultivars", *The Crop Journal*, **5**(6), pp.488-498.
- [10] L. Xiong, K.S. Schumaker and J.K. Zhu (2002), "Cell signaling during cold, drought and salt stress", *Plant Cell*, **14**, pp.165-183.
- [11] E.T. Hamanishi, B.R. Thomas and M.M. Campbell (2012), "Drought induces alterations in the stomatal development program in populus", *Journal of Experimental Botany*, **63**(13), pp.4959-4971.
- [12] S.A. Casson and A.M. Hetherington (2010), "Environmental regulation of stomatal development", *Curr. Opin. Plant Biol.*, **13**, pp.90-95.
- [13] J.A. Lake, W.P. Quick, D.J. Beerling and F.I. Woodward (2001), "Plant development: signals from mature to new leaves", *Nature*, **411**, p.154.
- [14] H. Yu, X. Chen, Y.Y. Hong, Y. Wang, P. Xu, S.D. Ke, H.Y. Liu, J.K. Zhu, D.J. Oliver, and C.B. Xiang (2008), "Activated expression of an Arabidopsis HD-START protein confers drought tolerance with improved root system and reduced stomatal density", *The Plant Cell*, **20**, pp.1134-1151.
- [15] P.J.W. Franks, T. Doheny-Adams, Z.J. Britton-Harper and J.E. Gray (2015), "Increasing water-use efficiency directly through genetic manipulation of stomatal density", *New Phytologist*, **207**, pp.188-195.
- [16] Lưu Hoài Nam (2019), *Khả năng chịu hạn của 6 giống lúa mùa giai đoạn sinh trưởng sinh dưỡng trong điều kiện hạn nhân tạo*, Luận án thạc sĩ ngành di truyền và chọn giống cây trồng, Trường Đại học Cần Thơ.
- [17] L.S. Meng, and S.Q. Yao (2015), "Transcription co-activator arabidopsis ANGUSTIFOLIA3 (AN3) regulates water-use efficiency and drought tolerance by modulating stomatal density and improving root. architecture by the transrepression of YODA (YDA)", *Plant Biotechnol. J.*, **13**, pp.893-902.
- [18] W. Tezara, V. Mitchell, S.P. Driscoll and D.W. Lawlor (2002), "Effects of water deficit and its interaction with CO₂ supply on the biochemistry and physiology of photosynthesis in sunflower", *Journal of Plant Biology*, **53**, pp.1781-1791.
- [19] E.C. Silva, R.J.M.C. Nogueira, F.H.A. Vale, F.P. de Araújo and M.A. Pimenta (2009), "Stomatal changes induced by intermittent drought in four umbu tree genotypes", *Braz. J. Plant Physiol.*, **21**(1), pp.33-42.
- [20] U.S. Gupta (1997), "Stress tolerance", *Crop Improvement*, **2**, p.303.
- [21] D.C. Bergmann (2004), "Integrating signals in stomatal development", *Curr. Opin. Plant Biol.*, **7**, pp.26-32.
- [22] T.C. Hsiao and L.K. Xu (2000), "Sensitivity of growth of roots versus leaves to water stress: biophysical analysis and relation to water transport", *Journal of Experimental Botany*, **51**, pp.1595-1616.
- [23] V.R.P. Gowda, A. Henry, A. Yamauchi, H.E. Shashidhar and R. Serraj (2011), "Root biology and genetic improvement for drought avoidance in rice", *Field Crops Res.*, **122**(1), pp.1-13.
- [24] Nguyễn Thị Bích Vân (2018), *Nghiên cứu sự thích nghi của 4 giống/ dòng lúa (*Oryza sativa* L.) trong điều kiện khô hạn nhân tạo*, Luận án thạc sĩ ngành di truyền và chọn giống cây trồng, Trường Đại học Cần Thơ.
- [25] A. Price and B. Courtois (1999), "Mapping QTLs associated with drought resistance in rice: progress, problems, and prospects", *Plant Growth Regulation*, **29**, pp.123-133.
- [26] Y. Uga, K. Okuno and M. Yano (2011), "Dro1 a major QTL involved in deep rooting of rice under upland field conditions", *J. Exp. Bot.*, **62**, pp.2485-2494.
- [27] Y. Uga, K. Sugimoto, S. Ogawa, J. Rane, M. Ishitani, N. Hara, Y. Kitomi, Y. Inukai, K. Ono, N. Kanno, H. Inoue, H. Takehisa, R. Motoyama, Y. Nagamura, J. Wu, T. Matsumoto, T. Takai, K. Okuno and M. Yano (2013), "Control of root system architecture by DEEPER ROOTING 1 increases rice yield under drought conditions", *Nature Genetics*, **45**(9), pp.1097-1102.
- [28] H.T. Nguyen, C.R. Babu and A. Blum (1997), "Breeding for drought in rice, physiology and molecular genetic consideration", *Crop Science*, **37**, pp.1426-1434.
- [29] L.J. Clark, A.H. Price, K.A. Steele and W.R. Whalley (2008), "Evidence from near-isogenic lines that root penetration increases with root diameter and bending stiffness in rice", *Functional Plant Biology*, **35**(11), pp.1163-1171.
- [30] E.B. Yambao, K.T. Ingram and J.G. Real (1992), "Root xylem influence on the water relations and drought resistance of rice", *J. Exp. Bot.*, **43**(7), pp.925-932.
- [31] Y. Uga, K. Okuno and M. Yano (2008), "QTLs underlying natural variation in stele and xylem structures of rice root", *Breeding Science*, **58**, pp.7-14.
- [32] M. Kondo, M.V.R. Murty and D.V. Aragones (2000), "Characteristics of root growth and water uptake from soil in upland rice and maize under water stress", *Soil Sci. Plant Nutr.*, **46**, pp.721-732.
- [33] S. Fukai and M. Cooper (1995), "Development of drought-resistant cultivars using physiomorphological traits in rice", *Field Crops Res.*, **40**, pp.67-86.
- [34] S. Yoshida and S. Hasegawa (1982), "The rice root system, its development and function", *Drought resistance in crops with the emphasis on rice*, IRRI, pp.83-96.
- [35] B. Mambani and R. Lal (1983), "Response of upland rice varieties to drought stress", *Plant and Soil*, **73**, pp.59-72.
- [36] I.J. Ekanayake, D.P. Garrity, T.M. Masajo and J.C. O'Toole (1985), "Root pulling resistance in rice: inheritance and association with drought tolerance", *Euphytica*, **34**, pp.905-913.

Nghiên cứu ảnh hưởng của tích hợp vi khuẩn endophyte *Bacillus subtilis* GB03 với vật liệu nano silica đến sự phát triển của cây dưa lưới (*Cucumis melo*)

Đinh Thị Hiền¹, Phạm Trung Hiếu¹, Trần Đại Lâm², Lê Thế Tâm³, Vũ Thị Thoa⁴,
Nguyễn Thị Phương Thảo⁵, Lê Đăng Quang^{1,4*}

¹Trung tâm Phát triển công nghệ cao, Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam

²Viện Kỹ thuật Nhiệt đới, Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam

³Trường Đại học Vinh

⁴Viện Hóa học Công nghiệp Việt Nam

⁵Viện Sinh học Nhiệt đới, Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam

Ngày nhận bài 7/9/2020; ngày chuyển phản biện 11/9/2020; ngày nhận phản biện 14/10/2020; ngày chấp nhận đăng 11/11/2020

Tóm tắt:

Nano silica có kích thước 20-50 nm, được chế tạo bằng phương pháp sol-gel kết hợp siêu âm, được sử dụng nhằm mục đích thử nghiệm tác động của nano silica đối với sự phát triển của vi khuẩn *Bacillus subtilis* GB03 trong phòng thí nghiệm. Đồng thời, đánh giá hiệu quả của nano silica tích hợp vi khuẩn *B. subtilis* GB03 đến sự sinh trưởng của cây dưa lưới (*Cucumis melo*). Kết quả cho thấy, nano silica ở nồng độ 10 µg/ml có tác động tích cực đối với sự phát triển của vi khuẩn *B. subtilis* GB03. Trong thí nghiệm *in vivo*, nhóm nghiên cứu đã quan sát được hiện tượng các phân tử nano SiO₂ bám vào bề mặt vi khuẩn và sự xâm nhập của vi khuẩn vào rễ cây. Đồng thời, sự tích hợp của vi khuẩn và nano silica ở nồng độ 10 µg/ml cũng cho thấy tác động tốt đến tỷ lệ và tốc độ nảy mầm, sự phát triển của bộ rễ, thời gian sinh trưởng, chiều cao và khả năng phân nhánh của cây dưa lưới. Nghiên cứu mở ra hướng phát triển chế phẩm kết hợp nano silica-vi khuẩn endophyte có nguồn gốc tự nhiên thay thế cho các loại thuốc hóa học để phát triển cây dưa lưới nói riêng và cây trồng nói chung.

Từ khóa: *Bacillus subtilis*, cây dưa lưới, *Cucumis melo*, nano silica, sol-gel.

Chỉ số phân loại: 4.1

Giới thiệu

Vi khuẩn nội cộng sinh thực vật (vi khuẩn endophyte) được tìm thấy ở hầu hết các loài thực vật. Nghiên cứu vi khuẩn endophyte cho thấy chúng giúp thúc đẩy thực vật tăng trưởng, tăng năng suất và đóng vai trò là một tác nhân điều hòa sinh học. Ngoài ra, chúng còn có tiềm năng loại bỏ các chất gây ô nhiễm trong đất bằng cách tăng cường khả năng khử độc trên thực vật, làm cho đất trở nên màu mỡ. Hiện nay, nhiều nhà khoa học quan tâm phát triển các ứng dụng công nghệ sinh học của vi khuẩn endophyte để phát triển các giống cây trồng có khả năng khử độc, đồng thời có khả năng sản xuất sinh khối và nhiên liệu sinh học [1, 2].

Những năm gần đây, công nghệ nano đã trở thành một lĩnh vực nghiên cứu hấp dẫn và được ứng dụng nhiều trong các ngành y sinh và nông nghiệp. Trong nông nghiệp, năng suất của cây trồng được cải thiện đáng kể nhờ sử dụng các chất dinh dưỡng trung - vi lượng thiết yếu dưới dạng phân bón nano. Silica tồn tại phong phú trong đất và được hấp thụ từ đất thông qua rễ của cây và lưu lại trong thân của thực

vật. Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng, các hạt nano silica rất có ý nghĩa trong việc phát triển khả năng đề kháng ở thực vật [3, 4]. Silica được coi như một vi chất thiết yếu và được biết đến với vai trò giúp tăng cường sự phát triển của thực vật. Ứng dụng của silica đối với thực vật đã được ghi nhận trong nhiều nghiên cứu trước đây [5, 6].

Các nghiên cứu tích hợp vật liệu nano với vi khuẩn endophyte mới xuất hiện gần đây và chỉ có một số ít báo cáo được công bố [7, 8]. Do đó trong công trình này, chúng tôi tiến hành nghiên cứu ảnh hưởng của sự tích hợp vi khuẩn endophyte (*Bacillus subtilis* GB03) với nano silica được chế tạo bằng phương pháp sol-gel kết hợp siêu âm nhằm mục đích phát triển chế phẩm có nguồn gốc tự nhiên, an toàn khi sử dụng.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Hóa chất và vi sinh vật

Các hóa chất được sử dụng để tạo nano silica bao gồm: tetraethyl orthosilicat (TEOS) - Si(OC₂H₅)₄ 98% (Sigma -

* Tác giả liên hệ: Email: ledangquang2011@gmail.com

Study on the effect of integrating endophyte *Bacillus subtilis* GB03 and silica nanoparticles on the growth of melon crop (*Cucumis melo*)

Thi Hien Dinh¹, Trung Hieu Pham¹, Dai Lam Tran²,
The Tam Le³, Thi Thoa Vu⁴, Thi Phuong Thao Nguyen⁵,
Dang Quang Le^{1,4*}

¹Center for High Technology Development,
Vietnam Academy of Science and Technology (VAST)

²Institute for Tropical Technology, VAST

³Vinh University

⁴Vietnam Institute of Industrial Chemistry

⁵Institute of Tropical Biology Ho Chi Minh city, VAST

Received 7 September 2020; accepted 11 November 2020

Abstract:

Nano silica of size 20-50 nm prepared by the sol-gel method was used to test the effect on the growth of *Bacillus subtilis* GB03 in *in vitro* bioassay and evaluate the effectiveness of integrating nano silica and *B. subtilis* GB03 for the growth of melon crop (*Cucumis melo*). The results showed that nanosilica at a concentration of 10 µg/ml had a good effect on the growth of *B. subtilis* GB03. In the *in vivo* experiment, not only the incident of silica nanoparticles adhering to the bacterial surface but also bacterial invasion and penetration on the roots were observed. Besides, the mixture of *B. subtilis* GB03-nano silica at 10 µg/ml also showed a good impact on the rate and speed of germination, the development of the roots, growth time, height, and branching of the melon plant. The study suggested the development of natural-derived nano silica-endophytic bacteria preparations to replace synthetic chemical pesticides used in agriculture.

Keywords: *Bacillus subtilis*, *Cucumis melo*, melon plant, nanosilica, sol-gel.

Classification number: 4.1

Aldrich, Đức), polyethylene glycol 400 (PEG 400) 99% (Merck, Đức), amoniac (NH₃) 25% (Merck, Đức) và một số dung môi như ethanol, methanol, nước cất hai lần.

Chủng vi khuẩn endophyte sử dụng trong nghiên cứu là *Bacillus subtilis* GB03 ở dạng sinh khối khô do TS Chang Ho Chung thuộc Viện Vật liệu Sinh học Jeonju - Hàn Quốc cung cấp. Môi trường nuôi cấy vi khuẩn được sử dụng trong nghiên cứu là Luria-Bertani (LB) có thành phần (g/l): peptone 10, cao nấm men 5, NaCl 10.

Phương pháp

Tổng hợp nano silica: nano silica được điều chế dựa trên phương pháp sol-gel kết hợp siêu âm. Sử dụng 2,0 g TEOS hòa vào 50 ml ethanol thu được dung dịch tiền chất - dung dịch 1. Hòa tan 1,0 ml H₂O vào 50 ml ethanol thu được dung dịch 2. Hòa 100 ml PEG 400 vào 400 ml ethanol, cùng với đó thêm NH₃ vào hỗn hợp trên đến khi pH~13 thu được dung dịch 3 là môi trường phản ứng. Sau khi đã thu được ba dung dịch trên, tiến hành nhỏ đồng thời dung dịch 1 và dung dịch 2 liên tục vào dung dịch 3 với tốc độ 0,5 ml/phút trong 4 giờ, cốc phản ứng được đặt trong bể siêu âm 37 kHz, nhiệt độ 80°C, khuấy cơ 350 vòng/phút. Sau khi nhỏ hết dung dịch 1 và dung dịch 2, tiếp tục siêu âm hỗn hợp thêm 15 giờ. Trong quá trình phản ứng bổ sung ethanol, NH₃ để duy trì môi trường phản ứng. Sau khi dừng bổ sung ethanol, tiếp tục tiến hành gia nhiệt, siêu âm và khuấy cơ để loại bỏ ethanol trong cốc phản ứng, thu sản phẩm. Kết quả thu được là dung dịch nano silica sử dụng trong thực nghiệm.

Đánh giá cấu trúc hạt:

Đo tán xạ ánh sáng động học - Dynamic Light Scattering (DLS): phân bố kích thước hạt và gián đồ thể zeta của dịch phân tán nano silica được xác định bằng phương pháp DLS trên máy ZS-100 của hãng Horiba.

Đo phổ FT-IR và chụp ảnh TEM, SEM: xác định nhanh đặc trưng cấu trúc của mẫu nano silica bằng phương pháp đo phổ FT-IR trên máy phân tích quang phổ hồng ngoại FT-IR TENSOR II (Bruker, Đức). Kích thước hạt nano silica được xác định bằng phương pháp TEM và phương pháp SEM. Ảnh TEM được đo trên thiết bị kính hiển vi điện tử truyền qua JEM 2100 (JEOL - Nhật Bản) và ảnh SEM được đo trên thiết bị kính hiển vi điện tử quét phát xạ trường Hitachi S-4800 (Nhật Bản), đặt tại Viện Khoa học Vật liệu, Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam.

Nuôi cấy vi khuẩn: chủng vi khuẩn *B. subtilis* GB03 ban đầu được lưu trữ ở dạng sinh khối khô. Vi khuẩn được hoạt hóa trên môi trường LB lỏng, tiến hành nuôi lắc 200 vòng/phút ở nhiệt độ 35-37°C trong vòng 24 giờ. Sau 24

giờ, dùng que cấy vòng thao tác vô trùng, nhúng vào dịch mẫu để có các vi khuẩn muốn phân lập. Rĩa các đường trên đĩa petri có chứa môi trường thạch LB. Sau mỗi đường rĩa liên tục đốt khử trùng que cấy và làm nguội trước khi thực hiện thao tác tiếp theo và giữ trong tủ ẩm $32^{\circ}\text{C}/24$ giờ để xác định hình thái khuẩn lạc. Tiến hành quan sát hình thái khuẩn lạc của chủng vi khuẩn xác định độ thuần. Chuyển một khuẩn lạc thuần từ đĩa mới nhân vào bình tam giác chứa 50 ml môi trường LB nhân giống dịch thể. Nuôi trên máy lắc 200 vòng/phút ở $35-37^{\circ}\text{C}$ trong 24 giờ. Xác định mật độ vi khuẩn trong bình nuôi bằng phương pháp đếm khuẩn lạc trên đĩa thạch. Cấy 15 ml dung dịch vi khuẩn có mật độ 10^5 cfu/ml vào bình chứa 150 ml môi trường nuôi cấy (tỷ lệ 10%). Lặp lại quá trình nuôi trên máy lắc với các chế độ như trên trong 24 giờ.

Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ nano silica đến sự phát triển của vi khuẩn *B. subtilis* GB03: ảnh hưởng của nồng độ nano silica đối với sự phát triển của vi khuẩn theo thời gian đã được thực hiện trong nghiên cứu. Tiến hành trộn nano silica ở các nồng độ (0; 10; 30 và 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) với 50 ml môi trường LB được pha sẵn trong các trong ống nghiệm. Sau đó, 5 ml vi khuẩn *B. subtilis* GB03 đạt mật độ 10^5 cfu/ml được thêm vào mỗi ống môi trường LB chứa nano silica nồng độ khác nhau. Tiến hành nuôi lắc 200 vòng/phút ở nhiệt độ 37°C . Cứ sau bốn giờ, lấy 100 μl môi trường pha loãng trong ống đưa lên trên bề mặt các đĩa thạch bằng que thủy tinh vô trùng và tiến hành đếm khuẩn lạc trên đĩa ở 37°C bằng kỹ thuật cấy bề mặt.

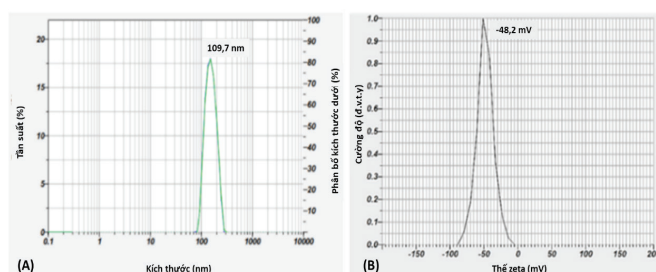
Khảo sát ảnh hưởng của nano SiO_2 -vi khuẩn đến khả năng sinh trưởng và phát triển của cây dưa lưới: hạt giống dưa F1 Kim Cô Nương được sản xuất bởi Công ty TNHH KNOWN-YOU SEED, Đà Loan. Tuyển chọn hạt (hạt to, mẩy, chắc) và đem 30 hạt ngâm trong 20 ml nước cất đối với mẫu đối chứng và 30 hạt trong 20 ml hỗn dịch nano SiO_2 -vi khuẩn *B. subtilis* GB03 ở nồng độ 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, mật độ vi khuẩn đạt $\sim 10^9$ đối với công thức thử nghiệm ở nhiệt độ $25-30^{\circ}\text{C}$ trong 2 giờ, ủ cho nứt mầm rồi gieo 1 hạt/lỗ vào khay loại 50 lỗ/khay. Sau đó tưới dung dịch nano-vi khuẩn lên bề mặt khay giống, tưới 2 lần vào lúc mọc mầm đều và 5 ngày sau mọc. Sau khoảng 10-12 ngày ươm, lúc này cây đã cho ra 2 lá chính, tiến hành di chuyển cây con sang chậu bầu đất (60% xơ dừa; 10% tro trấu hun; 30% phân trùn quế; trộn đều các thành phần của giá thể, sau đó dùng màng phủ dày kín và tưới nước ẩm trước khi trồng 1 tuần). Cứ 7 ngày tưới dung dịch nano-vi khuẩn 1 lần. Tiến hành khảo sát các chỉ tiêu: tỷ lệ và tốc độ nảy mầm, khả năng bám dính vi khuẩn lên rễ cây, sự phát triển của bộ rễ, tăng trưởng chiều cao cây (cm). Thí nghiệm được bố trí theo kiểu ngẫu nhiên

hoàn toàn với 2 công thức nêu trên, giữa 2 công thức có giải phân cách với 3 lần nhắc lại, mỗi lần nhắc lại trồng 3 cây, xử lý số liệu bằng phần mềm MS Excel 2016.

Kết quả và thảo luận

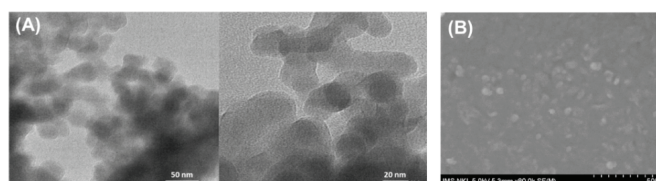
Khảo sát cấu trúc hạt nano silica điều chế được

Kết quả phân tích bằng phương pháp tán xạ ánh sáng động DLS (hình 1) cho thấy, mẫu nano silica thu được có kích thước hạt trung bình là 109,7 nm và thế zeta là -48,2 mV. Điều này cho thấy mẫu có độ ổn định cao, hệ phân tán sẽ chống lại sự keo tụ (thế zeta trong khoảng $\pm 40 \div \pm 60$ mV).



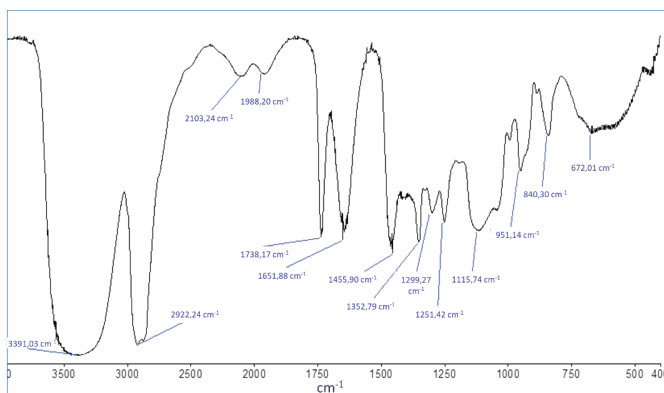
Hình 1. Kết quả phân tích mẫu nano SiO_2 . (A) phân bố kích thước hạt; (B) thế zeta.

Ảnh TEM (hình 2A) của mẫu nano silica cho thấy, các tiểu phân SiO_2 đạt kích cỡ 20-50 nm và phân bố khá đều trong môi trường phân tán. Trên ảnh SEM (hình 2B), các hạt SiO_2 có kích cỡ khoảng 40-70 nm, lớn hơn so với kết quả đo được qua phân tích TEM.



Hình 2. Kết quả phân tích mẫu nano SiO_2 . (A) ảnh TEM; (B) ảnh SEM.

Kết quả đo phổ hồng ngoại biến đổi Fourier (FT-IR) (hình 3) cho thấy, peak tại 1115 cm^{-1} với vai nhỏ ở 1200 cm^{-1} và peak ở 840 cm^{-1} tương ứng với dao động hóa trị bất đối xứng và dao động hóa trị đối xứng của nhóm Si-O. Dao động uốn Si-O-Si xuất hiện ở peak hấp phụ 460 cm^{-1} . Dải peak hấp phụ cường độ thấp ở 672 cm^{-1} ứng với tín hiệu của vòng siloxane trong mạng [9-12]. Peak 951 cm^{-1} được gán cho dao động liên kết Si-O [13]. Dải peak cường độ rộng tại 3450 cm^{-1} và 1640 cm^{-1} tương ứng với dao động hóa trị và dao động uốn của phân tử nước hydrat hóa. Bên cạnh đó là các peak đặc trưng cho tín hiệu của PEG 400. Peak $\sim 2870\text{ cm}^{-1}$ và 1455 cm^{-1} lần lượt tương ứng với dao động hóa trị và dao động uốn của nhóm C-H. Peak tại 1298 cm^{-1} tương ứng với dao động hóa trị nhóm C-O. Các peak tín hiệu ở 951

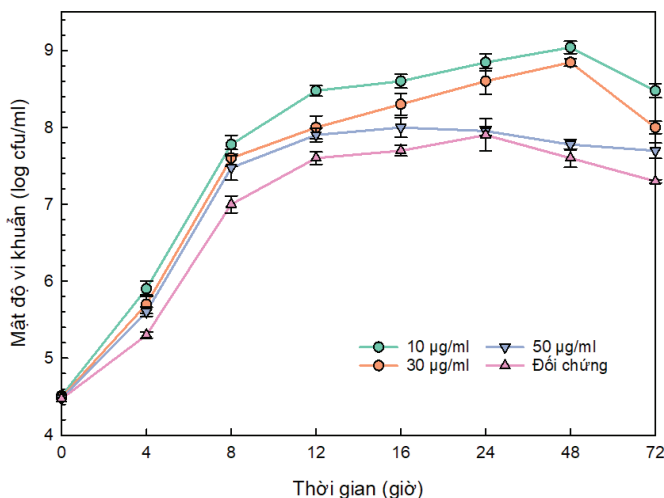


Hình 3. Phổ IR của mẫu nano SiO₂.

cm⁻¹ và 3450 cm⁻¹ cho thấy sự hình thành liên kết hydro giữa nhóm -OH các tiểu phân nano và nguyên tử O hoặc -OH của PEG 400 [14]. Kết quả kiểm tra IR cho thấy có sự tương tác giữa chất bọc và các tiểu phân SiO₂, tuy nhiên tương tác còn yếu, các tiểu phân nano có xu hướng hình thành các tiểu phân đồng dạng với mức năng lượng hình thành mạng thấp hơn mức năng lượng của các tiểu phân với polymer bọc. Có thể khẳng định các hợp chất polymer cho vào trong quá trình tổng hợp chỉ mang tính chất là nền cho quá trình phản ứng, giúp ổn định các tiểu phân hình thành ở kích thước đã định trước.

Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ nano silica đến sự phát triển của vi khuẩn *B. subtilis* GB03

Kết quả (hình 4) cho thấy ảnh hưởng của các nồng độ nano silica khác nhau đến sự phát triển của vi khuẩn *B. subtilis* GB03. Sự phát triển của vi khuẩn phụ thuộc vào nồng độ nano silica và thời gian nuôi. Trong 24 giờ đầu, vi khuẩn phát triển và sinh trưởng bình thường, mật độ vi khuẩn tăng tuyến tính theo thời gian. Sau 48 giờ thí nghiệm,



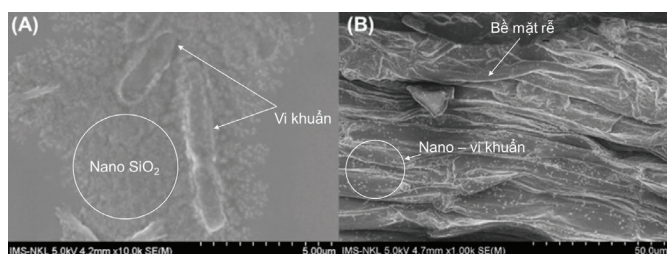
Hình 4. Đồ thị biểu diễn mối quan hệ giữa mật độ vi khuẩn và nồng độ nano SiO₂.

mật độ vi khuẩn đạt giá trị cao nhất ($1,1 \times 10^9$ cfu/ml) tại nồng độ nano SiO₂ (10 µg/ml) thấp nhất trong ba nồng độ thí nghiệm, trong khi đó vi khuẩn ở mẫu đối chứng chỉ đạt 6×10^7 cfu/ml. Từ 48 đến 72 giờ, mật độ vi khuẩn bắt đầu giảm ở tất cả các mẫu thí nghiệm. Trong toàn bộ quá trình thí nghiệm, mật độ vi khuẩn *B. subtilis* GB03 ở mẫu chứa nano SiO₂ (10 µg/ml) luôn đạt giá trị cao nhất so với tất cả các mẫu còn lại. Sự thay đổi của mật độ vi khuẩn theo nồng độ nano silica trong nghiên cứu này phù hợp với nghiên cứu trước đây của nhóm tác giả Boroumand và cộng sự (2020) [15]. Nghiên cứu của nhóm tác giả này đã cho thấy ảnh hưởng của nồng độ nano silica đối với sự phát triển của chủng vi khuẩn endophyte *Pseudomonas stutzeri*. Theo đó, kết quả nghiên cứu cho thấy ở nồng độ nano silica 0,07 µg/ml, vi khuẩn *P. stutzeri* phát triển có mật độ cao nhất, theo sau là nồng độ 0,05 µg/ml tại thời điểm 48 h. Trong khi đó, tại nồng độ nano silica là 0,1 µg/ml, mật độ vi khuẩn *P. stutzeri* thấp hơn so với hai nồng độ trên ở mọi thời điểm so sánh [15]. Như vậy, vi khuẩn sẽ phát triển tốt nhất ở một nồng độ silica thích hợp, nồng độ silica quá cao có thể gây ra ức chế vi khuẩn. Do đó, chúng tôi lựa chọn nồng độ nano SiO₂ 10 µg/ml cho các thử nghiệm trên cây dưa lưới tiếp theo.

Ảnh hưởng của nano SiO₂-vi khuẩn đến khả năng sinh trưởng và phát triển của cây dưa lưới

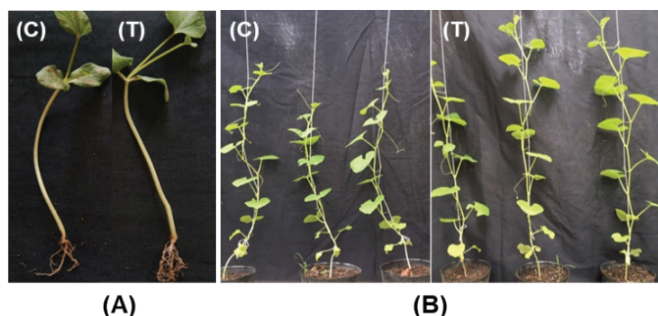
Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã ngâm ủ trực tiếp hạt giống cây dưa lưới trong hỗn hợp nano-vi khuẩn *B. subtilis* GB03 cho đến khi nảy mầm. Sau đó trồng thủy canh có tưới dung dịch hỗn hợp nano-vi khuẩn để tiến hành chụp SEM và quan sát sự phát triển của bộ rễ. Sau khi trồng vào bầu đất, chúng tôi sử dụng phân bón bình thường mà không tiếp thêm dung dịch tích hợp và quan sát sự sinh trưởng của cây. Qua quan sát các mẫu thí nghiệm xử lý hạt giống với nano silica-vi khuẩn *B. subtilis* GB03 cho thấy, sau 48 h tất cả các hạt thử nghiệm (100%) đều nảy mầm tương tự như các hạt đối chứng. Một số nghiên cứu trước đây cho thấy silica hay nano silica có tác dụng kích thích sự nảy mầm của hạt giống do tác dụng sinh hóa có thể làm giảm sản xuất axit abisicic và tăng mức gibberellin [16, 17]. Li và Ma (2002) [18] đã báo cáo rằng, khi hàm lượng silica trong đất có nồng độ trong khoảng 55 đến 203 mg/kg, hoạt tính của protease, lipase trong hạt và tốc độ hô hấp tăng lên, thúc đẩy quá trình nảy mầm của hạt cây dưa chuột, sức sống của hạt giống cũng được tăng lên đáng kể. Nghiên cứu của Rathinam và cộng sự (2011) [19] cho thấy, tỷ lệ nảy mầm của hạt ngô cao hơn (từ 2-11%) khi chúng được trồng trong đất có trộn với vật liệu nano silica ở nồng độ 100 đến 400 µg/g so với mẫu đối chứng và mẫu đất trộn với silica thông thường.

Khi tiến hành nghiên cứu các mẫu rễ cây dưa lưới được xử lý với nano silica-vi khuẩn *B. subtilis* GB03 trong điều kiện nồng độ nano silica 10 µg/ml và ủ hạt nảy mầm, chúng tôi đã quan sát được hiện tượng các phân tử nano SiO₂ bám vào bề mặt vi khuẩn và sự xâm nhập của vi khuẩn vào rễ cây.



Hình 5. Hình ảnh hiển vi điện tử quét (SEM) của nano SiO₂ và vi khuẩn *B. subtilis*: (A) nano SiO₂ bám vào vi khuẩn *B. subtilis* GB03 trong môi trường nuôi cấy LB sau 48 h thử nghiệm; (B) nano SiO₂-vi khuẩn *B. subtilis* GB03 trên rễ của mẫu cây dưa lưới trước khi được trồng vào bầu đất.

Hình 5A cho thấy, nano silica bám lên bề mặt của vi khuẩn, từ đó tạo điều kiện thuận lợi cho rễ cây hấp thu được silica trong quá trình vi khuẩn xâm nhập vào sâu qua vỏ rễ (hình 5B). Quan sát ảnh SEM các mẫu rễ thí nghiệm có thể thấy hỗn hợp nano-vi khuẩn *B. subtilis* GB03 bám trên bộ rễ, từ đó có những tác động tới hoạt động của bộ rễ, ảnh hưởng tới khả năng sinh trưởng và phát triển của cây trồng. Qua theo dõi, mẫu cây dưa lưới được thử nghiệm với hỗn hợp nano silica-vi khuẩn *B. subtilis* GB03 có số lượng rễ và chiều dài rễ nhỉnh hơn so với công thức đối chứng (hình 6).



Hình 6. Ảnh hưởng của hỗn hợp nano SiO₂-vi khuẩn *B. subtilis* GB03 đến sự phát triển rễ và chiều cao cây dưa lưới Kim Cô Nương: hình ảnh mẫu đối chứng (C) và mẫu thí nghiệm (T). (A) bộ rễ cây dưa lưới trước khi trồng vào bầu đất; (B) chiều cao thân sau trồng 28 ngày.

Kết quả theo dõi sự phát triển chiều cao của các mẫu dưa lưới được thể hiện ở bảng 1.

Bảng 1. Chiều cao trung bình của các mẫu cây dưa lưới theo thời gian (cm).

Công thức	Số ngày sau trồng (ngày)		
	14	21	28
Thí nghiệm	22,93 ^a	63,63 ^a	107,04 ^a
Đối chứng	21,53 ^b	60,70 ^b	101,20 ^b
LSD _{0,05} [*]	1,08	1,52	3,83
CV% ^{**}	1,39	0,69	1,05

Trong cùng một dòng, các số có cùng chữ cái theo sau giống nhau thì không khác biệt ở mức ý nghĩa p=0,05. *: giá trị sai khác nhỏ nhất có ý nghĩa; **: hệ số biến thiên.

Bảng 1 cho thấy tốc độ tăng trưởng chiều dài thân chính ở các giai đoạn sinh trưởng khác nhau là khác nhau. Ban đầu, các cây trong thử nghiệm có chiều cao tương đương nhau (~5 cm). Giai đoạn 14 ngày sau trồng, các mẫu dưa thí nghiệm có tốc độ tăng trưởng chiều dài thân chính chậm do cây dưa phải trải qua quá trình hồi xanh bén rễ 2-5 ngày, khả năng hút nước và dinh dưỡng hạn chế. Ở giai đoạn tiếp theo từ 14-21 ngày sau trồng, sự tăng trưởng của cây, đặc biệt là sự kéo dài của các lóng rất rõ rệt. Lúc này cây vừa sinh trưởng sinh dưỡng vừa sinh trưởng sinh thực nên cần tác động các biện pháp kỹ thuật hợp lý để cây phát triển chiều dài, khối lượng thân lá tối ưu nhằm tích lũy vật chất để cây ra hoa, kết quả. Giai đoạn sau trồng từ 21-28 ngày, tốc độ tăng trưởng chiều dài thân của các giống dưa lưới rất mạnh, trong đó ở công thức chứa nano silica có chiều dài thân chính trung bình đạt (107,04 cm), cao hơn khá rõ rệt so với công thức đối chứng (101,20 cm) (hình 6B). Kết quả này cho thấy, các cây thử nghiệm phát triển bình thường và tốt hơn mẫu đối chứng.

Nghiên cứu của Rathinam và cộng sự (2011) [19] về ảnh hưởng của nồng độ nano silica (100-400 µg/g) trong đất đến sự phát triển sinh trưởng của cây ngô cho thấy, ở một nồng độ phù hợp (100, 200 µg/g trong đất), nano silica có tác động tích cực đến sự sinh trưởng của cây ngô so với mẫu cây trồng trong đất không chứa nano silica hay chứa silica thông thường. Thí nghiệm trên cây cải xoong của tác giả Boroumand cùng cộng sự (2020) [15] cho thấy nồng độ nano silica tối ưu sử dụng giúp thu hoạch được trọng lượng khô thực vật cao nhất là ở 100 µg/ml. Một số báo cáo trước đây cũng chỉ ra rằng, việc cung cấp silic, silica hay nano silica vào trong đất trồng có tác động tích cực làm tăng sản lượng, năng suất của nhiều loại cây trồng trong nông nghiệp. Như vậy, đã có khá nhiều nghiên cứu liên quan đến thử nghiệm ảnh hưởng trực tiếp của silica, nano silica hay các hợp chất của silic ảnh hưởng đến sự phát triển của thực vật. Tuy nhiên, những nghiên cứu về tác động của tích hợp vật liệu nano-vi khuẩn endophyte lên thực vật còn khá ít. Ví dụ như báo cáo của tác giả Palmqvist và cộng sự (2015) [7] đã chỉ ra rằng, nano titan có khả năng làm tăng cường sự phát triển của vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* và tích hợp nano-vi khuẩn của chúng có tác động tích cực lên rễ của cây cải dầu (*Brassica napus*), giúp cây chống tại bệnh đốm nâu (*Alternaria brassicae*) trong quá trình sinh trưởng. Một nghiên cứu khác của Luciana và cộng sự (2019) [20] thử nghiệm đối kháng vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* (gây bệnh héo xanh) trên khoai tây của tích hợp vi khuẩn endophyte với hỗn hợp nano silica và than chì đã chỉ ra, hỗn hợp nano silica và than chì có tác động làm tăng nhanh sự phát triển của 3 chủng vi khuẩn endophyte (*Lysinibacillus*, *P. fluorescens* và *B. subtilis*), trong đó mật độ vi khuẩn *B. subtilis* đạt cao nhất. Bên cạnh đó, tích hợp

vi khuẩn *B. subtilis*-nano silica và than chì cũng cho thấy hiệu quả ức chế cao nhất đối với sự phát triển của vi khuẩn *R. solanacearum* trong thí nghiệm *in vitro*.

Kết luận

Nghiên cứu đã chế tạo được nano SiO₂ 20-50 nm bằng phương pháp sol-gel kết hợp siêu âm. Bên cạnh đó, các phương pháp đo phân tích cấu trúc hạt SEM, TEM, DLS, IR đã chỉ ra cấu trúc và những liên kết cơ bản của hạt nano silica được tổng hợp. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã quan sát được hiện tượng các hạt nano silica bám lên trên bề mặt vi khuẩn và thấy sự xâm nhập của vi khuẩn vào trong rễ cây. Nghiên cứu bước đầu đã khảo sát ảnh hưởng của tích hợp vi khuẩn *B. subtilis* GB03-nano silica ở nồng độ 10 µg/ml đến cây dưa lưới và cho thấy, tích hợp có tác dụng làm tăng khả năng phát triển của bộ rễ, chiều cao, thời gian sinh trưởng và khả năng phân nhánh của cây theo thời gian. Đây là tiền đề để tiếp tục nghiên cứu, phát triển các chế phẩm bảo vệ thực vật sạch và an toàn với môi trường có chứa tích hợp vi khuẩn-nano silica sử dụng trên cây dưa lưới nói riêng và cây trồng nói chung.

LỜI CẢM ƠN

Tập thể tác giả xin trân trọng cảm ơn Ủy ban Nhân dân TP và Sở KH&CN TP Hồ Chí Minh đã hỗ trợ thực hiện nghiên cứu thông qua đề tài: “Nghiên cứu ứng dụng chế phẩm nano-vi khuẩn PGPR nhằm phòng trừ bệnh giả sương mai trên cây dưa lưới”.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] E. Eymard-Vernain, S. Luche, T. Rabilloud, C. Lelong (2018), “Impact of nanoparticles on the *Bacillus subtilis* GB03(3610) competence”, *Scientific Report*, **8**, p.2984.
- [2] P.R. De Gregorio, G. Michavila, L. Ricciardi Muller, C. de Souza Borges, M.F. Pomares, E.L. Saccol de Sá, C. Pereira, P.A. Vincent (2017), “Beneficial rhizobacteria immobilized in nanofibers for potential application as soybean seed bioinoculants”, *PLoS One*, **12**, p.e0176930.
- [3] E. Epstein (1999), “Silicon”, *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **50**, pp.641-664.
- [4] J.F. Ma, N. Yamaji (2006), “Silicon uptake and accumulation in higher plants”, *Trends in Plant Science*, **11**, pp.392-397.
- [5] H.A. Currie, C.C. Perry (2007), “Silica in plants: biological, biochemical and chemical studies”, *Annals of Botany*, **100**, pp.1383-1389.
- [6] D.W. Galbraith (2007), “Silica breaks through in plants”, *Nature Nanotechnology*, **2**, pp.272-273.
- [7] N.G.M. Palmqvist, S. Bejai, J. Meijer, G.A. Seisenbaeva, V.G. Kessler (2015), “Nano titania aided clustering and adhesion of

beneficial bacteria to plant roots to enhance crop growth and stress management”, *Science Report*, **5**, p.10146.

- [8] S. Timmusk, G. Seisenbaeva, L. Behers (2018), “Titania (TiO₂) nanoparticles enhance the performance of growth-promoting rhizobacteria”, *Science Report*, **8**, p.617.

- [9] M.J. Adeogun, J.N. Hay (2001), “Structure control in sol-gel silica synthesis using ionene polymers. 2: evidence from spectroscopic analysis”, *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, **20**, pp.119-128.

- [10] P. Innocenzi (2003), “Infrared spectroscopy of sol-gel derived silica-based films: a spectra microstructure overview”, *Journal of Non-Crystalline Solids*, **316**, pp.309-319.

- [11] J.M. Nedelec, L.L. Hench (1999), “Ab initio molecular orbital calculations on silica rings”, *Journal of Non-Crystalline Solids*, **255**, pp.163-170.

- [12] Y. Hiroyuki, K. Kanichi, N. Hiroyuki (1990), “IR study on the structural evolution of sol-gel derived SiO₂ gels in the early stage of conversion to glasses”, *Journal of Non-Crystalline Solids*, **126**, pp.68-78.

- [13] V. Simon, D. Eniu, A. Gritco, S. Simon (2007), “Thermal and spectroscopic investigation of sol-gel derived aluminosilicate bioglass matrices”, *Journal of Optoelectronics and Advanced Materials*, **9**, pp.3368-3371.

- [14] M. Catauro, F. Bollino, F. Papale, M. Gallicchio, S. Pacifico (2015), “Influence of the polymer amount on bioactivity and biocompatibility of SiO₂/PEG hybrid materials synthesized by sol-gel technique”, *Materials Science and Engineering C*, **48**, pp.548-555.

- [15] N. Boroumand, M. Behbahani, G. Dini (2020), “Combined effects of phosphate solubilizing bacteria and nano silica on the growth of land cress plant”, *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, **20**, pp.232-243.

- [16] S.C.C. Cassandra, E.T. Peter, W.M.H. Henk, E.F.S. William (2006), “Gene expression profiles of Arabidopsis Cvi seeds during dormancy cycling indicate a common underlying dormancy control mechanism”, *Plant J.*, **46**, pp.805-822.

- [17] K. Birgit, A.C. Marc, L. Gerhard (2005), “Plant hormone interactions during seed dormancy release and germination”, *Seed Sci. Res.*, **15**, pp.281-307.

- [18] Q.F. Li, C.C. Ma (2002), “Effect of available silicon in soil on cucumber seed germination and seedling growth metabolism”, *Acta Horti Sinica.*, **29**, pp.433-437.

- [19] Y. Rathinam, E. Viswanathan, R. Venkatachalam, S.K. Narayana, P. Periasamy (2011), “Influence of nano silica powder on the growth of maize crop (*Zea Mays* L.)”, *International Journal of Green Nanotechnology*, **3**, pp.180-190.

- [20] D. Luciana, N.I. Hersantia, H. Sri, J.I. Made (2019), “In vitro study of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) and endophytic bacteria antagonistic to *Ralstonia solanacearum* formulated with graphite and silica nano particles as a biocontrol delivery system (BDS)”, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, **19**, p.101153.

Ảnh hưởng của điều kiện nuôi cấy đến sinh trưởng hệ sợi của nấm *Phellinus linteus*

Nguyễn Văn Giang¹, Nguyễn Thị Bích Thủy¹, Vũ Thị Khánh Linh¹, Nguyễn Duy Trinh², Trần Thu Hà^{2*}

¹Học viện Nông nghiệp Việt Nam

²Viện Di truyền Nông nghiệp

Ngày nhận bài 20/11/2020; ngày chuyển phản biện 24/11/2020; ngày nhận phản biện 29/12/2020; ngày chấp nhận đăng 4/1/2021

Tóm tắt:

Nấm *Phellinus linteus* (Berk. & Curt.) Teng thuộc chi nấm *Phellinus* spp. là loại nấm có giá trị dược liệu cao. Nghiên cứu này đánh giá ảnh hưởng của nguồn dinh dưỡng cacbon, nitơ, pH và nhiệt độ đến sinh trưởng hệ sợi của chủng giống *P. linteus* nhập nội. Glucose và casein với nồng độ lần lượt là 2,0 và 0,2% được xác định là nguồn dinh dưỡng cacbon, nitơ thích hợp nhất cho nấm *P. linteus*. Ngược lại, hệ sợi nấm *P. linteus* không có khả năng mọc trên môi trường sử dụng urê. Sợi nấm *P. linteus* sinh trưởng tốt tại các điều kiện pH 7-10 và nhiệt độ nuôi sợi 30°C. Ở điều kiện này, tốc độ phát triển của hệ sợi nấm *P. linteus* đạt 5,0 mm/ngày, mật độ hệ sợi dày, phân bố đều, bám chắc vào chất nền.

Từ khóa: nguồn cacbon, nguồn nitơ, nhiệt độ, pH, *Phellinus linteus*, *Phellinus* spp.

Chỉ số phân loại: 4.1

Đặt vấn đề

Nấm *Phellinus linteus* (Berk. & Curt.) Teng thuộc chi nấm *Phellinus* spp. có khoảng 200 loài khác nhau, chúng thường xuất hiện trên các loại cây lá rộng như sồi, dẻ [1]. Nấm *P. linteus* được biết đến là loại nấm có giá trị dược liệu cao, có khả năng phòng chống ung thư tuyến tụy, bạch cầu, tế bào biểu mô, vòm họng, đại tràng hay ung thư biểu mô thận [2, 3]. Tại Hàn Quốc, sản xuất nấm *Phellinus* spp. được xem là lĩnh vực sản xuất có tiềm năng, có thể phát triển thành ngành công nghiệp thực phẩm chức năng trong tương lai gần [4].

Nấm ăn và nấm dược liệu đang ngày càng trở nên quan trọng trong đời sống kinh tế - xã hội. Nhu cầu sử dụng các loại nấm, đặc biệt là các loại nấm có giá trị dược liệu như một loại thực phẩm bồi bổ sức khỏe đang là xu thế của người dân trên thế giới nói chung và Việt Nam nói riêng. Ngoài một số loại nấm chủ lực như linh chi, vân chi, đầu khi hay đông trùng hạ thảo thì các nghiên cứu về nhân giống và nuôi trồng nấm *P. linteus* ở Việt Nam mới chỉ ở giai đoạn sơ khai. Các sản phẩm nấm *P. linteus* xuất hiện trên thị trường hiện nay chủ yếu là sản phẩm nhập nội với giá thành rất cao. Vì vậy, việc tối ưu hóa các điều kiện nuôi cấy hệ sợi giống nấm *P. linteus* phù hợp với điều kiện Việt Nam là hết sức cần thiết, góp phần tạo nguồn giống nấm tốt phục vụ cho các nghiên cứu sau này.

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

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Nguồn giống nấm

Chủng giống nấm *P. linteus* được Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn cung cấp, hiện đang được lưu giữ tại Trung tâm Đào tạo, nghiên cứu và phát triển nấm ăn và nấm dược liệu, Khoa Công nghệ sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam ở nhiệt độ 4°C trên môi trường PDA.

Ảnh hưởng của nguồn dinh dưỡng cacbon

Chủng nấm *P. linteus* được nhân nuôi trên môi trường PA (200 g/l khoai tây, 16 g/l agar) và có bổ sung thêm 8 nguồn cacbon khác nhau (glucose, fructose, maltose, sucrose, dextrin, lactose, xylose và tinh bột tan) với nồng độ 2,0%. Môi trường nhân giống được hấp khử trùng ở nhiệt độ 121°C trong 60 phút và được chia vào các đĩa petri vô trùng (đường kính 9,0 cm). Mỗi đĩa petri chứa 20 ml môi trường và được cấy 1 miếng giống gốc nấm *P. linteus* có kích thước 0,5x0,5 cm tại vị trí trung tâm đĩa. Hệ sợi nấm *P. linteus* được nuôi ở điều kiện không có ánh sáng, độ ẩm không khí 65-70%, nhiệt độ 30°C trong thời gian 12 ngày [4].

Ảnh hưởng của nguồn dinh dưỡng nitơ

Chủng giống nấm *P. linteus* nuôi trên môi trường PGA (200 g/l khoai tây, 20 g/l glucose, 16 g/l agar) được bổ sung 7 nguồn nitơ khác nhau gồm NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, NH_4NO_3 , casein, pepton và urê để khảo sát sự sinh trưởng hệ

The effect of culture conditions for the mycelium growth of *Phellinus linteus*

Van Giang Nguyen¹, Thi Bich Thuy Nguyen¹,
Thi Khanh Linh Vu¹, Duy Trinh Nguyen², Thu Ha Tran^{2*}

¹Vietnam National University of Agriculture

²Agricultural Genetics Institute

Received 20 November 2020; accepted 4 January 2021

Abstract:

Phellinus linteus (Berk. & Curt.) Teng mushroom belonging to the genus *Phellinus* spp., has high medicinal value. This study was carried out with the aim to evaluate the effects of carbon, nitrogen sources, pH, and temperature on the mycelial growth of the *P. linteus* strain. The experimental results showed that glucose and casein with concentrations of 2.0 and 0.2% respectively are identified as the most suitable carbon and nitrogen nutrient sources for *P. linteus*. Conversely, the mycelia of *P. linteus* are not able to grow on the urea media. Mycelium of *P. linteus* grows well at 7-10 pH and temperature at 30°C. When mycelia are incubated in these conditions, the rate of mycelial growth of *P. linteus* reaches 5.0 mm/day with thick density even distribution, and adherence to the substrate firmly.

Keywords: carbon source, nitrogen source, pH, *Phellinus linteus*, *Phellinus* spp., temperature.

Classification number: 4.1

sợi của chủng giống. Mỗi nguồn nitơ được bổ sung vào môi trường với nồng độ 0,2%. Hệ sợi nấm *P. linteus* được nuôi ở điều kiện không có ánh sáng, độ ẩm không khí 65-70%, nhiệt độ 30°C trong thời gian 12 ngày [4].

Ảnh hưởng của pH

Chủng giống nấm *P. linteus* được nhân nuôi trên môi trường PGA có bổ sung 0,2% casein. Trước khi hấp khử trùng sử dụng dung dịch NaOH 1N hoặc HCl 1N để hiệu chỉnh giá trị pH môi trường nhân giống bằng 5, 6, 7, 8, 9 và 10. Ươm sợi nấm *P. linteus* trong điều kiện không có ánh sáng, độ ẩm không khí 65-70%, nhiệt độ 30°C, thời gian nuôi sợi 12 ngày [4].

Ảnh hưởng của nhiệt độ

Chủng giống nấm *P. linteus* được nhân nuôi trên môi trường dinh dưỡng tối ưu nhất gồm khoai tây, glucose, casein và agar. Sau khi cấy giống, các đĩa petri được nuôi trong điều kiện không có ánh sáng, độ ẩm không khí 65-70% và 5 ngưỡng nhiệt độ khác nhau (15, 20, 25, 30 và 35°C) trong thời gian 12 ngày.

Các chỉ tiêu theo dõi

Khả năng sinh trưởng hệ sợi của chủng nấm *P. linteus* được đánh giá qua các chỉ tiêu sau:

Đường kính hệ sợi (mm): là đường kính phần sợi nấm *P. linteus* sinh trưởng trên bề mặt môi trường thạch sau 12 ngày nuôi sợi.

Tốc độ sinh trưởng hệ sợi của chủng nấm *P. linteus* được đánh giá theo phương pháp của Nguyễn Thị Bích Thùy và cs (2016) [5], đơn vị tính mm/ngày.

Mật độ hệ sợi: quan sát hệ sợi nấm và đánh giá mật độ hệ sợi theo phương pháp của Jo và cs (2006) [4]: C (compact) - sợi dày, bám chặt; SC (somewhat) - sợi phân bố không đều; T (thin) - sợi nấm mỏng.

Phương pháp xử lý số liệu

Kết quả nghiên cứu được xử lý thống kê bằng phần mềm Excel 2010 và phân tích Anova bằng phần mềm IRRISTAT 5.0 tại mức ý nghĩa $p < 0,05$ cho thí nghiệm một nhân tố.

Kết quả và thảo luận

Ảnh hưởng của nguồn dinh dưỡng cacbon

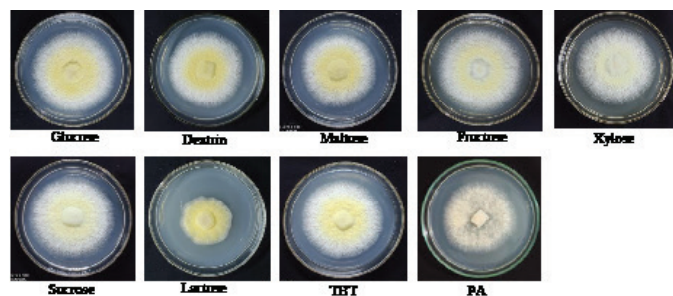
Cacbon đóng vai trò quan trọng với tế bào, tham gia vào các hợp chất cấu trúc và dự trữ trong tế bào như monosaccharides, disaccharides và polysaccharides [6]. Nguồn dinh dưỡng cacbon thích hợp sẽ kích thích hệ sợi nấm sinh trưởng nhanh, tạo sinh khối lớn. Kết quả bảng 1 cho thấy, khả năng sinh trưởng hệ sợi nấm *P. linteus* trên các môi trường có bổ sung glucose, fructose, xylose và sucrose

là không có sự sai khác có ý nghĩa ($p < 0,05$), tốc độ mọc sợi đạt 4,29 đến 4,5 mm/ngày. Tốc độ mọc sợi của nấm *P. linteus* trên môi trường maltose, dextrin và tinh bột tan là như nhau (4,23 mm/ngày). Hệ sợi nấm *P. linteus* sinh trưởng chậm nhất trên môi trường có bổ sung lactose (2,53 mm/ngày). Mật độ hệ sợi nấm *P. linteus* trên các môi trường được bổ sung glucose, fructose, sucrose, maltose, dextrin, tinh bột tan dày, phân bố đồng đều, sợi nấm màu vàng tươi, bám chắc vào môi trường thạch (hình 1).

Bảng 1. Ảnh hưởng của nguồn cacbon đến sinh trưởng hệ sợi nấm *P. linteus*.

Nguồn cacbon (2%)	Đường kính hệ sợi ở các ngày khác nhau (mm)				Tốc độ mọc sợi	Mật độ hệ sợi
	2	4	6	8		
PA	13,75	23,50	40,50	65,25 ^d	4,04 ^c	SC
Glucose	13,08	26,58	47,00	72,88 ^a	4,50 ^a	C
Fructose	12,92	26,83	49,67	72,91 ^a	4,43 ^{ab}	C
Sucrose	12,78	28,92	50,00	71,42 ^a	4,29 ^{ab}	C
Maltose	11,23	23,75	46,17	67,67 ^c	4,23 ^{bc}	C
Dextrin	12,12	26,58	46,67	66,67 ^{cd}	4,23 ^{bc}	C
Xylose	11,85	25,83	50,17	69,58 ^b	4,30 ^{ab}	T
Lactose	9,75	19,42	31,50	41,92 ^c	2,53 ^d	SC
TBT	11,58	25,08	44,83	65,75 ^d	4,23 ^{bc}	C

Ghi chú: C (compact): sợi dày, bám chặt; SC (somewhat compact): sợi phân bố dày, mỏng không đều; T (thin): sợi nấm mỏng; PA: potato agar; TBT: tinh bột tan. Các chữ cái trong cùng một cột ứng với mỗi giá trị sai khác giữa các giá trị trung bình tại mức ý nghĩa $p < 0,05$.



Hình 1. Hình thái hệ sợi nấm *P. linteus* trên môi trường chứa các nguồn cacbon khác nhau sau 6 ngày nuôi sợi ở nhiệt độ 30°C.

Ảnh hưởng của các nguồn cacbon khác nhau đến sinh trưởng của hệ sợi nấm *Phellinus* spp. cũng đã được nhiều nhà nghiên cứu đánh giá. Jo và cs (2006) [4] khi nghiên cứu ảnh hưởng của dinh dưỡng cacbon đến sinh trưởng hệ sợi của *Phellinus* spp. đã kết luận đường glucose và mannose hỗ trợ hệ sợi nấm *Phellinus* sinh trưởng tốt nhất. Hur và cs (2008) [7] cũng chứng minh glucose, fructose, sucrose và dextrose là tối ưu cho sinh trưởng hệ sợi của nấm *Phellinus* spp., lactose, maltose và galactose ít ảnh hưởng hơn đến

tăng trưởng của hệ sợi. Dựa trên kết quả đánh giá tốc độ mọc sợi, khả năng bám của hệ sợi vào môi trường, mật độ hệ sợi, chúng tôi chọn glucose cho các thí nghiệm tiếp theo.

Ảnh hưởng của nguồn dinh dưỡng nitơ

Nitơ là nguyên tố thiết yếu cần thiết cho tất cả các loại nấm để tổng hợp các hợp chất quan trọng như purin, pyrimidine, protein và N-acetylglucosamine, thành phần tham gia cấu tạo nên chitin, hợp chất của thành tế bào [8]. Trong nghiên cứu này, ảnh hưởng của một số nguồn nitơ hữu cơ và nitơ vô cơ đối với sự phát triển của hệ sợi nấm *P. linteus* đã được khảo sát. Kết quả bảng 2 cho thấy, các nguồn nitơ được sử dụng đều tác động tới sinh trưởng của hệ sợi nấm *P. linteus*. Tốc độ mọc sợi của nấm *P. linteus* nhanh nhất trên môi trường có casein (4,91 mm/ngày); trên môi trường bổ sung urê, sợi nấm *P. linteus* không sinh trưởng (hình 2). Sinh trưởng hệ sợi nấm *P. linteus* là như nhau khi sử dụng dinh dưỡng NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pepton, NH_4NO_3 , tốc độ mọc sợi trung bình từ 3,98 đến 4,09 mm/ngày.

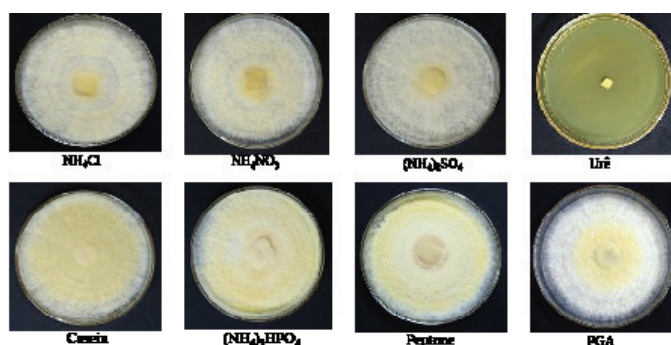
Bảng 2. Ảnh hưởng của nguồn nitơ đến sinh trưởng hệ sợi nấm *P. linteus*.

Nguồn nitơ (0,2%)	Đường kính hệ sợi ở các ngày khác nhau (mm)				Tốc độ mọc sợi	Mật độ sợi
	2	4	6	8		
PGA	13,75	26,58	47,58	72,88 ^c	4,50 ^a	C
NH_4Cl	13,58	29,25	59,17	78,08 ^b	4,03 ^b	T
NH_4NO_3	13,92	31,50	63,25	77,75 ^b	3,98 ^b	T
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	12,92	27,92	64,08	79,00 ^b	3,98 ^b	T
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	13,83	27,58	55,58	73,58 ^c	3,75 ^c	C
Casein	13,58	29,42	68,00	85,5 ^a	4,91 ^a	C
Pepton	12,5	30,17	63,58	79,33 ^b	4,09 ^b	C
Urê	0	0	0	0	0 ^d	-

Ghi chú: C (compact): sợi dày, bám chặt; T (thin): sợi nấm mỏng. Các chữ cái trong cùng một cột ứng với mỗi giá trị sai khác giữa các giá trị trung bình tại mức ý nghĩa $p < 0,05$.

Mật độ hệ sợi nấm *P. linteus* trên các môi trường có bổ sung nguồn nitơ khác nhau cũng có sự sai khác. Hệ sợi nấm *P. linteus* dày nhất và phân bố đều trên môi trường bổ sung casein, tiếp đến là môi trường sử dụng PGA, peptone. Độ dày hệ sợi, hình thái của hệ sợi nấm *P. linteus* trên các môi trường NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4NO_3 không có sự khác biệt.

Hur và cs (2008) [7] cũng khẳng định dinh dưỡng nitơ ảnh hưởng đến tốc độ phát triển của hệ sợi nấm *P. linteus*. Nghiên cứu của Chi và cs (1996), Hwang và cs (2003), Li và cs (2020) [9-11] đều ghi nhận các nguồn nitơ hữu cơ như bột ngô hay nhộng tằm cũng là dinh dưỡng phù hợp nhất cho sinh trưởng hệ sợi của nấm *Phellinus*.



Hình 2. Hình thái hệ sợi nấm *P. linteus* trên môi trường có chứa các nguồn nitơ khác nhau sau 10 ngày nuôi ở nhiệt độ 30°C.

Ảnh hưởng của pH

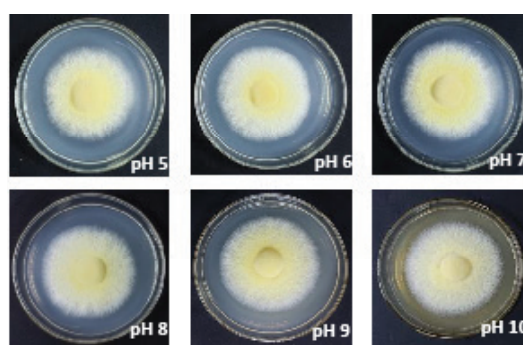
Mỗi loài nấm đều sinh trưởng, phát triển thuận lợi ở giá trị pH nhất định. pH có ảnh hưởng đến sự tiết các enzym ngoại bào trong chất nền. Các enzym ngoại bào thường thể hiện hoạt động trong một phạm vi pH hẹp và có ảnh hưởng trực tiếp đến quá trình chuyển hóa chất dinh dưỡng của nấm [8]. Zagrean và cs (2016) [12] cho rằng, tốc độ phát triển của hệ sợi nấm *P. eryngii* phụ thuộc vào bản chất môi trường và pH của nó.

Kết quả theo dõi đặc điểm sinh trưởng hệ sợi của chủng nấm *P. linteus* trên môi trường với giá trị pH thay đổi từ 5 đến 10 (bảng 3, hình 3) cho thấy, chủng nấm *P. linteus* sinh trưởng tốt khi pH môi trường có giá trị từ 7 đến 10, tốc độ mọc hệ sợi đạt từ 4,83 đến 5,0 mm/ngày. Tại pH 5 và 6, tốc độ sinh trưởng sợi của nấm *P. linteus* chậm hơn so với pH từ 7 đến 10. Mật độ sợi nấm *P. linteus* trên các môi trường nuôi cấy tại pH 7, 8, 9, 10 dày, phân bố đều, bám chặt môi trường và có màu vàng đặc trưng.

Bảng 3. Ảnh hưởng của pH đến sinh trưởng hệ sợi nấm *P. linteus*.

pH	Đường kính hệ sợi ở các ngày khác nhau (mm)				Tốc độ mọc sợi	Mật độ sợi
	2	4	6	8		
5	14,46	28,88	63,96	83,25 ^d	4,36 ^b	SC
6	15,21	29,92	66,08	83,83 ^d	4,58 ^b	C
7	14,75	32,04	66,92	85,63 ^b	4,91 ^a	C
8	16,00	32,30	67,50	85,00 ^b	4,83 ^a	C
9	16,10	32,60	67,83	84,58 ^c	4,92 ^a	C
10	16,75	33,30	67,81	87,10 ^a	5,00 ^a	C

Ghi chú: C (compact): sợi dày, bám chặt; SC (somewhat compact): sợi phân bố dày, mỏng không đều. Các chữ cái trong cùng một cột ứng với mỗi giá trị sai khác giữa các giá trị trung bình tại mức ý nghĩa $p < 0,05$.



Hình 3. Hình thái hệ sợi nấm *P. linteus* trên các môi trường có pH khác nhau sau 6 ngày nuôi ở nhiệt độ 30°C.

Nghiên cứu của Hur (2008) [13] kết luận rằng, pH 6-7 là thích hợp nhất cho sự sinh trưởng của 13 chủng nấm *Phellinus* spp., trong đó chủng *P. linteus* sinh trưởng sợi nhanh nhất khi pH môi trường 7-9. Lee và cs (2008) [14] cho biết, pH 5,5 là phù hợp cho sinh trưởng hệ sợi chủng nấm *P. linteus* IY003 trong môi trường dịch thể. Như vậy, giá trị pH môi trường phụ thuộc vào từng chủng nấm *P. linteus* thí nghiệm.

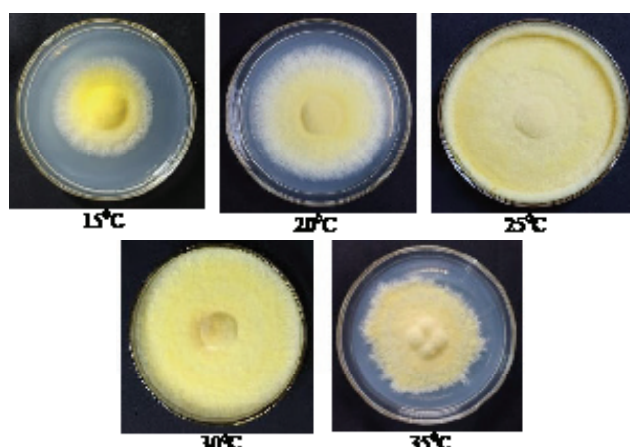
Ảnh hưởng của nhiệt độ

Nhiệt độ là yếu tố môi trường quan trọng nhất đối với sự phát triển của sợi nấm [6]. Mỗi chủng nấm sẽ phát triển và biểu hiện các đặc điểm sinh học tốt nhất tại ngưỡng nhiệt độ thích hợp, vì tại ngưỡng nhiệt độ này các phản ứng trao đổi chất, hoạt động của enzym diễn ra mạnh. Khả năng sinh trưởng hệ sợi nấm *P. linteus* tại 5 ngưỡng nhiệt độ 15, 20, 25, 30 và 35°C có sự sai khác có ý nghĩa thống kê $p < 0,05$ (bảng 4). Tốc độ mọc sợi của *P. linteus* nhanh nhất tại nhiệt độ 30°C (5,0 mm/ngày) và chậm nhất tại nhiệt độ 15°C (2,01 mm/ngày). Nhiệt độ quá cao ảnh hưởng bất lợi đến các hoạt động trao đổi chất của tế bào, do đó tốc độ sinh trưởng giảm, tốc độ mọc sợi của nấm *P. linteus* tại ngưỡng nhiệt độ 35°C là 3,07 mm/ngày, mật độ hệ sợi nấm mỏng (hình 4).

Bảng 4. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến sinh trưởng hệ sợi nấm *P. linteus*.

Nhiệt độ (°C)	Đường kính hệ sợi ở các ngày khác nhau (mm)				Tốc độ mọc sợi	Mật độ sợi
	2	4	6	8		
15	9,58	14,08	18,75	25,92 ^e	2,01 ^e	SC
20	10,92	17,83	30,50	42,83 ^d	2,87 ^d	SC
25	16,00	29,58	54,50	74,25 ^b	3,65 ^b	C
30	16,75	33,29	69,17	87,08 ^a	5,00 ^a	C
35	11,75	27,92	45,50	52,30 ^c	3,07 ^c	T

Ghi chú: C (compact): sợi dày, bám chặt; SC (somewhat compact): sợi phân bố dày, mỏng không đều; T (thin): sợi nấm mỏng. Các chữ cái trong cùng một cột ứng với mỗi giá trị sai khác giữa các giá trị trung bình tại mức ý nghĩa $p < 0,05$.



Hình 4. Hình thái hệ sợi nấm *P. linteus* sau 10 ngày nuôi ở các nhiệt độ khác nhau.

Báo cáo của Hur (2008) [13] khẳng định 25-30°C là ngưỡng nhiệt độ thích hợp nhất cho sinh trưởng hệ sợi nấm *P. linteus*; khi nhiệt độ nuôi sợi vượt quá 30°C, sinh trưởng hệ sợi kém, tốc độ mọc sợi giảm. Heo và cs (2004) [15] thông báo nhiệt độ nuôi cấy tối ưu của chủng giống *P. baumii* và *P. ignarius* trong khoảng 25-30°C. Jo và cs (2006) [4] kết luận nhiệt độ thích hợp nhất cho sinh trưởng hệ sợi *Phellinus* spp. là 30°C và sự sinh trưởng bị ức chế một cách nhanh chóng ở nhiệt độ cao hơn 30°C và thấp hơn 20°C.

Kết luận

Cacbon và nitơ rất cần thiết cho sự sinh trưởng hệ sợi của nấm *P. linteus*. Glucose là dinh dưỡng cacbon phù hợp nhất cho nhân nuôi sợi nấm *P. linteus*. Sử dụng glucose với nồng độ 2,0%, tốc độ mọc sợi của nấm *P. linteus* đạt 4,5 mm/ngày. Nitơ hữu cơ cho hiệu quả nhân giống nấm *P. linteus* cao hơn nitơ vô cơ, trong đó casein là nguồn dinh dưỡng nitơ tối ưu nhất. Trên môi trường nuôi cấy được bổ sung casein, sợi nấm *P. linteus* mọc nhanh nhất (4,91 mm/ngày), hệ sợi dày, bám chắc vào môi trường, lan đều về các hướng. Sợi nấm *P. linteus* không mọc trên môi trường nuôi cấy được bổ sung urê.

Giá trị pH và nhiệt độ thích hợp cho nuôi sợi nấm *P. linteus* là pH 7-10 và 30°C, tại điều kiện này hệ sợi nấm *P. linteus* phát triển nhanh nhất, mật độ hệ sợi dày, bám chắc vào chất nền, hệ sợi phân bố đều.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Trịnh Tam Kiệt (2012), *Nấm lớn ở Việt Nam*, Tập 2, Nhà xuất bản Khoa học Tự nhiên và Công nghệ.
- [2] M. Lemieszek, W. Rzeski (2012), "Anticancer properties of polysaccharides isolated from fungi of the basidiomycetes class", *Contemp. Oncol.*, **4**, pp.285-289.
- [3] T. Zhu, et al. (2018), "Polysaccharide isolated from *Phellinus linteus* mycelia exerts anti-inflammatory effects via MAPK and PPAR signaling pathways", *Carbohydr. Polym.*, **200**, pp.487-497.
- [4] W.S. Jo, et al. (2006), "The culture conditions for the mycelial growth of *Phellinus* spp.", *Mycobiology*, **34**, pp.200-205.
- [5] Nguyễn Thị Bích Thùy và cs (2016), "Đánh giá sinh trưởng và năng suất của nấm sò vua (*Pleurotus eryngii*) (DC.:Fr.) Quel trên nguyên liệu nuôi trồng khác nhau", *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*, **14**, tr.816-823.
- [6] Ha Thi Hoa, C.L. 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.
- [7] H. Hur, et al. (2008), "Suitable conditions for mycelial growth of *Phellinus* spp.", *Mycobiology*, **36**, pp.152-156.
- [8] P.G. Miles, S.T. Chang (1997), *Mushroom biology: concise basics and current developments*, World Scientific.
- [9] J.H. Chi, et al. (1996), "Studies on the main factors affecting the mycelial growth of *Phellinus linteus*", *Korean J. Mycol.*, **24**, pp.214-222.
- [10] H.J. Hwang, et al. (2003), "Production and characterization of exopolysaccharides from submerged culture of *Phellinus linteus* KCTC 6190", *Enzyme Microbiol. Technol.*, **33**, pp.309-319.
- [11] Z.N. Li, et al. (2020), "Defatted silkworm pupae hydrolysates as a nitrogen source to produce polysaccharides and flavonoids using *Phellinus baumii*", *Biomass Conversion and Biorefinery*, DOI: 10.1007/s13399-020-00800-3.
- [12] V. Zagrean, et al. (2016), "Effect of nutritive media and pH on mycelial growth of some *Pleurotus eryngii* strains in vitro", *Research Institute for Vegetable and Flower Growing Vidra, Ilfov County, Romania*, **73**, pp.276-278.
- [13] H. Hur (2008), "Cultural characteristics and logmediated cultivation of the medicinal mushroom, *Phellinus linteus*", *Mycobiology*, **36**, pp.81-87.
- [14] J.W. Lee, et al. (2008), "Submerged culture of *Phellinus linteus* for mass production of polysaccharides", *Mycobiology*, **36**, pp.178-182.
- [15] B.S. Heo, et al. (2004), "Cultural conditions for the mycelial growth of *Phellinus* spp.", *Korean J. Mycol.*, **32**, pp.134-137.

Đặc điểm sinh học, sinh thái và phòng chống loài rệp sáp giả *Rastrococcus chinensis* (Hemiptera: Pseudococcidae) hại cây ba kích tím (*Morinda officinalis* How.)

Trịnh Xuân Hoạt^{1*}, Lưu Thị Xuyên², Trần Lê Bích Hồng², Lê Xuân Vị¹, Lê Thị Tuyết Nhung¹

¹Viện Bảo vệ Thực vật

²Trường Đại học Nông Lâm Thái Nguyên

Ngày nhận bài 10/11/2020; ngày chuyển phản biện 13/11/2020; ngày nhận phản biện 17/12/2020; ngày chấp nhận đăng 23/12/2020

Tóm tắt:

Cây ba kích tím (*Morinda officinalis* How.) được trồng phổ biến tại một số tỉnh miền núi phía Bắc Việt Nam với mục đích sử dụng làm thuốc. Loài rệp sáp giả *Rastrococcus chinensis* (Hemiptera: Pseudococcidae) được xem là đối tượng gây hại nguy hiểm đối với cây ba kích tím tại Việt Nam. Loài rệp này phát triển và sinh sản thuận lợi ở điều kiện 25°C, nhưng không sinh sản khi nhiệt độ tăng lên mức 30°C. Ở điều kiện nhiệt độ 25°C, vòng đời là 75,19 ngày, tuổi thọ của rệp trưởng thành là 81 ngày, thời gian sống là 110 ngày. Trong khi ở điều kiện nhiệt độ 30°C, tuổi thọ của rệp trưởng thành rút ngắn còn khoảng 26 ngày và không có khả năng sinh sản. Hiệu lực của hỗn hợp hoạt chất azadirachtin + matrine (thuốc Golmec 9EC) đối với loài rệp sáp giả *R. chinensis* là 73,44% tại thời điểm 7 ngày sau khi phun và hiệu lực kéo dài đến 14 ngày.

Từ khóa: ba kích tím (*Morinda officinalis* How.), hiệu lực phòng trừ, *Rastrococcus chinensis*, rệp sáp giả.

Chỉ số phân loại: 4.1

Đặt vấn đề

Cây ba kích tím thuộc chi *Morinda*, họ Rubiaceae. Chi *Morinda* có vài chục loài khác nhau với phần lớn là những cây bụi, gỗ nhỏ hoặc dây leo, phân bố chủ yếu ở vùng nhiệt đới. Đa số các loài thuộc chi này bắt nguồn từ Borneo, New Guinea, phía bắc nước Úc và New Caledonia [1]. Tại Việt Nam, ba kích tím được trồng nhiều tại các tỉnh miền núi phía Bắc với mục đích làm dược liệu chữa bệnh phong thấp, giúp giảm huyết áp [2], điều trị vô sinh cho nam giới và suy nhược thể lực [3, 4].

Trên thế giới, chưa có nhiều nghiên cứu về sâu bệnh hại đối với ba kích tím. Tại Trung Quốc, nấm *Fusarium oxysporium* được xác định là nguyên nhân gây bệnh chết héo cây ba kích tím [5]. Tại Ấn Độ, nấm *Colletotrichum* spp. được xác định là nguyên nhân gây bệnh thán thư [6]. Tại Việt Nam, đã có một số nghiên cứu xác định nấm *Fusarium* spp. là nguyên gây ra các triệu chứng như héo vàng trên cây ba kích tím từ giai đoạn cây con đến giai đoạn hình thành củ tại Quảng Ninh và Thanh Hóa [7], vàng lá, thối rễ cây ba kích tím tại huyện Ba Chẽ [8]. Ngoài ra, nấm *Rhizoctonia solani* được xác định là nguyên nhân gây bệnh chết rạp cây con tại Thanh Hóa [9]. Tuy nhiên, chưa có công trình nghiên cứu nào liên quan đến sâu hại trên cây ba kích tím tại Việt Nam. Trong quá trình nghiên cứu quản lý sâu bệnh hại trên

cây ba kích tím tại Quảng Ninh, chúng tôi đánh giá loài rệp sáp giả *Rastrococcus chinensis* là đối tượng gây hại quan trọng có khả năng bùng phát thành dịch. Rệp sáp giả là một trong những họ lớn và đa dạng nhất, trong đó có nhiều loài đa thực, gây hại trên nhiều loại cây trồng khác nhau [10]. Ngoài gây hại trực tiếp, rệp sáp giả còn tiết ra độc tố gây hiện tượng vàng, héo và rụng lá; cũng như tiết dịch mật là môi trường thuận lợi cho nấm muội đen phát triển gây ảnh hưởng trực tiếp đến quá trình quang hợp của cây. Một số loài rệp sáp giả có khả năng truyền một số bệnh vi rút [11].

Trong bài báo này, chúng tôi công bố một số kết quả nghiên cứu về đặc điểm sinh học, sinh thái, diễn biến mật độ quần thể loài rệp sáp giả *R. chinensis* và đánh giá hiệu lực của một số loại thuốc đối với rệp phục vụ sản xuất bền vững ba kích tím.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Nghiên cứu đặc điểm sinh học của loài rệp sáp giả R. chinensis

Cây ba kích tím được trồng trong nhà lưới để làm thức ăn nuôi sâu, cây làm thức ăn đảm bảo sạch, không sử dụng thuốc bảo vệ thực vật và cây được trồng liên tục tạo nguồn thức ăn luôn dồi dào. Nguồn thức ăn có thể được thu trực tiếp ngoài tự nhiên, cũng đảm bảo các điều kiện vệ sinh và

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

Biological, ecological characteristics, and management of mealybug species *Rastrococcus chinensis* (Hemiptera: Pseudococcidae) of Indian mulberry (*Morinda officinalis* How.)

Xuan Hoat Trinh^{1*}, Thi Xuyen Luu²,
Le Bich Hong Tran², Xuan Vi Le¹, Thi Tuyet Nhung Le¹

¹Plant Protection Research Institute (PPRI)

²Thai Nguyen University of Agriculture and Forestry

Received 10 November 2020; accepted 23 December 2020

Abstract:

Indian mulberry (*Morinda officinalis* How.), locally known as ba kích, is widely planted in many mountainous provinces in Northern Vietnam for medicinal uses. The mealybug species *Rastrococcus chinensis* (Hemiptera: Pseudococcidae) is considered as the most dangerous insect pest for the Indian mulberry in Vietnam. *R. chinensis* developed and reproduced normally at 25°C, but did not reproduce when the temperature reached 30°C. At 25°C, the life cycle was 75.19 days, the adult's lifespan was about 81 days, the longevity was about 110 days. While at 30°C, the adult's lifespan shortened to about 26 days with no fertility. The efficacy of azadirachtin + matrine (Golmec 9EC) with *R. chinensis* was 73.44% at 7 days and prolonged until 14 days after treatment.

Keywords: efficacy, Indian mulberry (*Morinda officinalis* How.), mealybug, *Rastrococcus chinensis*.

Classification number: 4.1

đảm bảo tiêu chuẩn thức ăn. Tiến hành thu thập lượng lớn sâu từ ngoài đồng về phòng thí nghiệm. Tiến hành nuôi cá thể hoặc tập thể trong nhà lưới và phòng thí nghiệm để thu nhộng sâu non. Hàng ngày, theo dõi tiến độ phát dục của sâu để thu trưởng thành và ghép cặp. Khi có trứng tiến hành thu trứng phục vụ việc nghiên cứu các đặc điểm sinh học sinh thái của loài.

Sâu hại được nuôi ở 2 mức nhiệt độ là 25 và 30°C, độ ẩm 80%. Số cá thể theo dõi là 120-150. Thức ăn được đặt trong hộp petri hoặc hộp nhựa có bông giữ ẩm. Dùng bút lông nhẹ nhàng bắt từng cá thể sâu mới nở, chuyển vào các hộp có chứa thức ăn. Hàng ngày, vào những giờ nhất định theo dõi tập tính hoạt động, quá trình lột xác chuyển tuổi và bổ sung thức ăn cho sâu vào một giờ nhất định.

Chỉ tiêu theo dõi: quan sát tập tính hoạt động sống của các pha phát triển của sâu. Thời gian phát triển các pha, tuổi sâu, vòng đời, khả năng đẻ của sâu qua các ngày và tuổi thọ của sâu trưởng thành. Thời gian phát triển các pha và vòng đời được tính theo công thức:

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i n_i}{N} \pm S$$

Trong đó: Xi là thời gian phát triển của cá thể thứ i (ngày); ni là số cá thể có thời gian như cá thể thứ i; N là số cá thể theo dõi; S là độ lệch chuẩn.

Khả năng sinh sản: số trứng đẻ ra (trứng/trưởng thành cái) và tỷ lệ nở (số ấu trùng nở ra/tổng số trứng theo dõi).

Quy luật phát sinh, phát triển của loài rệp sáp giả *R. chinensis*

Mỗi vườn điều tra 10 điểm chéo góc, mỗi điểm 10 cây, điều tra 7 ngày 1 lần (4 kỳ điều tra/tháng). Chỉ tiêu theo dõi:

$$\text{Tỷ lệ cây bị hại} = \frac{\text{Số cây bị hại}}{\text{Tổng số cây điều tra}}$$

Hiệu lực của một số loại thuốc đối với loài rệp sáp giả *R. chinensis*

Đối với thuốc có nguồn gốc sinh học: thí nghiệm được bố trí theo khối ngẫu nhiên hoàn chỉnh, 3 lần nhắc lại, diện tích ô thí nghiệm 50 m². Thí nghiệm được tiến hành trên vườn ba kích tím 2 năm tuổi bao gồm:

CT1: azadirachtin + matrine (Golmec 9EC), liều lượng sử dụng 500 ml/ha, lượng nước phun 500 l/ha.

CT2: *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (Comazol (16000 IU/mg) WP), liều lượng sử dụng 2 kg/ha, lượng nước phun 500 l/ha.

CT3: garlic juice (Biorepel 10SL), liều lượng sử dụng 1500 ml/ha, lượng nước phun 500 l/ha.

CT4: abamectin (Tervigo® 020SC), liều lượng sử dụng 4500 ml/ha, lượng nước phun 500 l/ha.

CT5: *beauveria bassiana* + *metarhizium anizopliae* (TKS-Nakisi WP), liều lượng sử dụng 1,5 kg/ha, lượng nước phun 500 l/ha.

CT6: đối chứng (phun nước lã).

Chỉ tiêu theo dõi: mật độ sâu hại ở trước và sau xử lý 1, 3, 5, 7 và 14 ngày. Hiệu lực của thuốc trừ sâu được tính theo công thức Henderson - Tilton:

$$E = \left(1 - \frac{T_a \times C_b}{T_b \times C_a}\right) \times 100$$

Trong đó: E là hiệu lực của thuốc tính bằng %; T_a là số cá thể sâu sống ở ô thí nghiệm sau xử lý; T_b là số cá thể sâu sống ở ô thí nghiệm trước xử lý; C_a là số cá thể sâu sống ở ô đối chứng sau xử lý; C_b là số cá thể sâu sống ở ô đối chứng trước xử lý.

Xử lý số liệu

Số liệu được tổng hợp bằng phần mềm Microsoft Office Excel và xử lý theo phương pháp ANOVA trong phần mềm SAS.

Kết quả và thảo luận

Trên cây ba kích tím, loài rệp sáp giả *R. chinensis* có khả năng gây hại lớn nhất, chúng tập trung chủ yếu ở mặt dưới của các lá bánh tẻ và di chuyển xuống, gây hại bộ phận gốc rễ vào giai đoạn cuối năm khi cây ba kích tím rụng lá. Rệp chích hút dịch làm cho cây biến vàng, ảnh hưởng đến sinh trưởng, phát triển và khi mật độ cao dẫn đến hiện tượng rụng hết lá và cây có thể bị chết. Do đó, loài rệp này là đối tượng cần được nghiên cứu và tìm ra các giải pháp phòng trừ hiệu quả.

Ngoài tác động gây hại trực tiếp là tiêu thụ dinh dưỡng của cây, rệp sáp giả còn tiết ra độc tố chích vào cây, gây hiện tượng vàng lá, héo và rụng lá, tiết dịch mật tạo điều kiện cho nấm muội đen phát triển, làm ảnh hưởng trực tiếp tới quá trình quang hợp của cây. Rệp sáp giả thường di chuyển chậm chạp, hình thành các quần tụ rệp ở mặt dưới lá, thân, xung quanh cuống lá, cành, ở những điểm có tán lá dày, hoặc vị trí tiếp giáp giữa quả, gần nụ hoa hoặc đỉnh sinh trưởng của cây. Rệp sáp giả gây hại trên cỏ hoặc các loài thực vật trong họ này, rệp thường tồn tại trong bẹ lá.

Tuy nhiên, tính đến thời điểm hiện nay, *R. chinensis* là loài rệp sáp giả được phát hiện đầu tiên trên cây ba kích tím tại Việt Nam. Các loài rệp thuộc họ Pseudococcidae gây hại trên nhiều họ cây ký chủ khác nhau [10]. Tại Việt Nam, nhiều loài rệp sáp giả đã được phân loại và công bố. Trên cây ăn quả và cây có múi, đã xác định được 4 loài rệp sáp

giả khác nhau [12], 9 loài gây hại trên cây có múi, 4 loài trên cây thanh long và 4 loài trên cây xoài [13], 8 loài hại cây na ở các tỉnh phía Nam [14].

Đặc điểm hình thái của loài rệp sáp giả *R. chinensis*

Kết quả nghiên cứu về các đặc điểm hình thái, sinh học của loài ở điều kiện nhiệt độ 25-30°C và ẩm độ 80% trong phòng thí nghiệm cho thấy có sự khác biệt khá rõ giữa rệp sáp giả đực và cái. Trong khi rệp sáp giả cái thuộc loại biến thái không hoàn toàn với 3 pha phát dục thì rệp sáp giả đực lại thuộc loại biến thái hoàn toàn với 4 pha phát dục. Thời gian phát dục của pha trứng là rất ngắn, thời gian từ sau đẻ đến khi nở chỉ kéo dài từ 3 đến 9h tùy thuộc vào điều kiện nhiệt độ.

Trứng: trứng của rệp sáp giả có kích thước khá nhỏ (khoảng 0,2 mm), hình trụ, có màu vàng nâu.

Rệp tuổi 1: rệp sáp giả mới nở, cơ thể có màu vàng xanh, kích thước 0,4-0,5 mm. Cuối cơ thể gần bộ phận sinh dục có một đôi tua sáp màu trắng, dài bằng 1/5 chiều dài cơ thể. Đến giữa và cuối tuổi 1, cơ thể rệp sáp giả và các tua xung quanh cơ thể được phủ một lớp phấn trắng, đôi tua dài nhất nằm ở phía cuối cơ thể (giáp với đôi tua gần bộ phận sinh dục), rệp non tuổi 1 hầu như không di chuyển.

Rệp tuổi 2: cơ thể rệp sáp giả có màu xanh vàng, kích thước 0,6-0,7 mm. Đến giữa và cuối tuổi, cơ thể được phủ một lớp phấn trắng, xung quanh cơ thể có 15 đôi tua khá dài và một đôi tua ngắn ở gần bộ phận sinh dục, các đôi tua ở phía cuối cơ thể dài hơn chiều dài cơ thể, rệp sáp giả non rất ít di chuyển. Cuối tuổi 2, giới tính đực và cái được phân biệt rõ. Tuy kích thước rệp sáp giả đực và cái không khác nhau, nhưng giới tính được phân biệt nhờ lớp phấn và màu sắc của cơ thể. Rệp sáp giả cái cơ thể màu vàng xanh, các đôi tua sáp và mặt lưng có rất nhiều phấn trắng; rệp đực cơ thể màu hơi nâu đỏ, các đôi tua sáp và mặt lưng có rất ít phấn trắng.

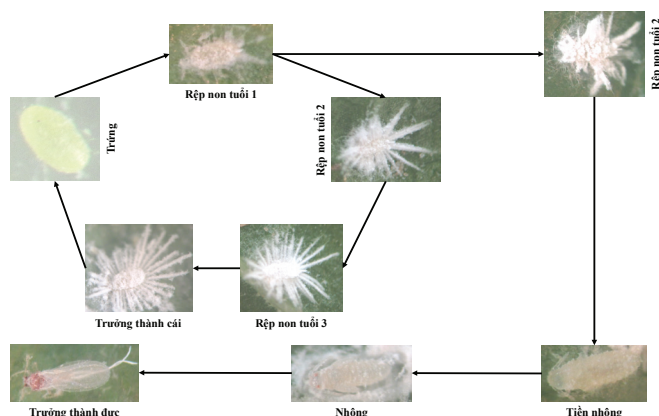
Rệp tuổi 3 (đối với con cái): về hình thái rệp sáp giả tuổi 3 không khác so với tuổi 2, chúng chỉ tăng về kích thước, rệp sáp giả tuổi 3 dài 0,8-0,9 mm.

Tiền nhộng: rệp sáp giả tạo kén và nằm trong kén, cơ thể màu vàng nhạt, dài khoảng 1 mm, các đôi chân mập, không còn giác bám. Nhìn từ mặt lưng, cơ thể rệp sáp giả chưa phân biệt rõ 3 phần: đầu, ngực và bụng.

Nhộng: cơ thể nhộng màu vàng nhạt, đã phân biệt rõ đầu, ngực và bụng, mầm cánh, râu đầu và mắt đã hình thành. Nhộng dài khoảng 1 mm.

Trưởng thành: trưởng thành đực có cơ thể màu đỏ nâu, dài khoảng 0,9 mm, râu đầu dài gần bằng chiều dài cơ thể, đôi tua sáp màu trắng ở cuối cơ thể dài hơn chiều dài cơ thể. Trưởng thành cái có cơ thể rệp dài 1,1-1,3 mm, các đôi tua sáp ở phần đầu cơ thể dài gần bằng 2/3 chiều dài cơ thể,

các đôi tua sáp ở phía cuối cơ thể dài hơn chiều dài cơ thể ngoại trừ đôi tua sáp nằm gần bộ phận sinh dục, rệp rất ít di chuyển (hình 1).



Hình 1. Đặc điểm hình thái và vòng đời của loài rệp sáp giả *R. chinensis*.

Một số đặc điểm sinh học của loài rệp sáp giả *R. chinensis*

Loài rệp sáp giả sinh trưởng, phát triển và sinh sản bình thường ở điều kiện nhiệt độ 25°C, khi nhiệt độ tăng lên 30°C, rệp không có khả năng sinh sản (không đẻ trứng). Khi nuôi ở điều kiện nhiệt độ 25 và 30°C, thời gian phát dục của các pha tương ứng như sau: pha trứng 7 và 5h; rệp non (3 tuổi) là 33,93±0,77 và 26,53±0,78 ngày. Thời gian tiền đẻ trứng rất dài, trung bình 40,21±1,00 ngày. Vòng đời của rệp ở điều kiện 25°C là 75,19±1,27, thời gian đẻ trứng 39,93±2,11 và tuổi thọ của trưởng thành là 81,57±2,67 ngày. Rệp không sinh sản ở điều kiện nhiệt độ 30°C. Điều kiện nhiệt độ có ảnh hưởng khá rõ tới thời gian sống của rệp sáp giả. Ở nhiệt độ 25°C, thời gian sống trung bình là 110,44 ngày, dài gấp 2 lần so với khi nuôi ở điều kiện nhiệt độ 30°C (52,93 ngày) (bảng 1).

Bảng 1. Một số đặc điểm sinh học chính của loài rệp sáp giả *R. chinensis* (Viện Bảo vệ Thực vật, 2018).

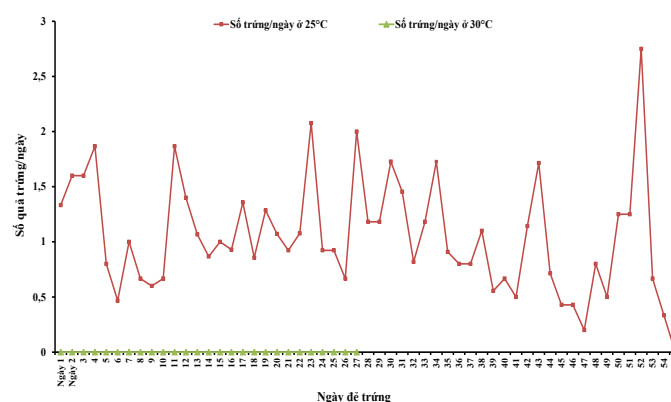
Chỉ tiêu theo dõi	Thời gian phát dục (ngày)			
	Đợt thí nghiệm I		Đợt thí nghiệm II	
	Biến động	Trung bình	Biến động	Trung bình
Trứng	7 giờ		5 giờ	
Tuổi 1	9-19	13,02±0,29	7-16	9,35±0,32
Tuổi 2	6-14	9,40±0,28	5-13	7,63±0,29
Tuổi 3	8-19	11,95±0,44	6-13	9,33±0,39
Rệp non	20-45	33,93±0,77	21-39	26,53±0,78
Tiền đẻ trứng	28-52	40,21±1,00	Không đẻ	-
Vòng đời	56-86	75,19±1,27	-	-
Thời gian đẻ trứng	15-58	39,93±2,11	-	-
Tuổi thọ của trưởng thành cái	51-106	81,57±2,67	18-38	26,18±1,17
Vòng đời	56-137	110,44±3,73	41-73	52,93±1,63
	Nhiệt độ trung bình: 25°C Âm độ trung bình: 80%		Nhiệt độ trung bình: 30°C Âm độ trung bình: 80%	

Tỷ lệ sống sót của rệp sáp giả khá cao, phạm vi biến động không lớn (79,17-100,0%). Đặc biệt là trứng, ở cả 2 mức nhiệt độ theo dõi tỷ lệ sống sót đều là 100%. Rệp tuổi 1 có tỷ lệ sống sót thấp nhất: 85,19 và 79,17% ở mức nhiệt độ tương ứng là 25 và 30°C (bảng 2). Như vậy, dựa trên tỷ lệ sống sót qua các pha phát dục trước trưởng thành của rệp sáp giả có thể tính được tỷ lệ chết của các pha phát dục ở 25 và 30°C lần lượt là 32,86 và 37,24%.

Bảng 2. Tỷ lệ sống sót (%) của loài rệp sáp giả *R. chinensis* ở các mức nhiệt độ khác nhau.

Chỉ tiêu theo dõi	Trứng	Rệp non		
		Tuổi 1	Tuổi 2	Tuổi 3
25°C	100	85,19	86,96	95,0
30°C	100	79,17	89,47	94,12

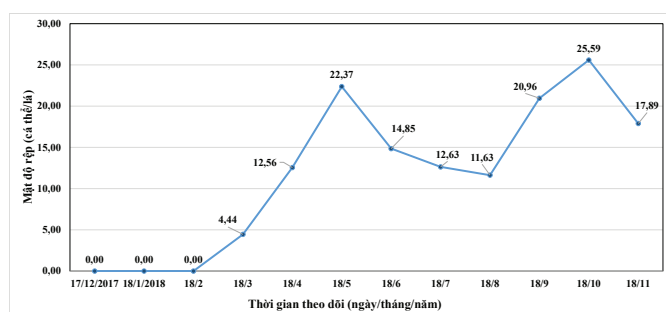
Số lượng trứng biến động từ 20 đến 79 trứng, trung bình 43,47 trứng/trưởng thành cái, tỷ lệ nở đạt 100%. So với các loài rệp sáp giả khác thì khả năng sinh sản của loài này là khá thấp. Thời gian đẻ trứng của rệp sáp khá biến động (15-58 ngày, trung bình là 39,93 ngày). Sự mất mát này nhỏ hơn rất nhiều so với một số loài rệp sáp giả đã được đề cập ở trên (khả năng đẻ trứng của chúng 15-38 trứng/ngày) (hình 2).



Hình 2. Nhịp điệu đẻ trứng của loài rệp sáp giả *R. chinensis*.

Quy luật phát sinh, phát triển của loài rệp sáp giả *R. chinensis*

Loài rệp sáp giả có xu hướng phát sinh mạnh vào giai đoạn đầu và cuối mùa mưa, thấp nhất vào giai đoạn mùa đông khi cây ba kích tím rụng lá. Khi nhiệt độ thấp, rệp qua đông ở bộ phận thân, rễ cây và hầu như không phát triển. Khi nhiệt độ tăng, cây bắt đầu ra chồi và lá mới, rệp sẽ bắt đầu sinh sản và gây hại. Quần thể rệp tăng mạnh vào giai đoạn tháng 4-5 và 10-11 với mật độ dao động 20-25 cá thể/lá. Cá biệt có những thời điểm mật độ cao nhất đạt tới 40-50 cá thể/lá (tháng 4-5). Mật độ rệp giảm rõ rệt vào giai đoạn giữa mùa mưa và mùa khô, sau đó lại tăng lên vào giai đoạn đầu và cuối mùa mưa (hình 3). Mặc dù mật độ rệp xuất hiện khá cao trên cây khi bị nhiễm nhưng rệp chỉ xuất hiện và gây hại cục bộ từng khu vực 5-10 cây. Rệp chủ yếu xuất hiện và gây hại ở mặt dưới của các lá bánh tẻ, trên các bộ phận sát mặt đất; rệp rất ít khi di chuyển, do đó sự lây lan và phát tán loài của rệp bị hạn chế.



Hình 3. Diễn biến mật độ của loài rệp sáp giả *R. chinensis* trên ba kích tím.

Hiệu lực của một số loại thuốc sinh học đối với loài rệp sáp giả *R. chinensis*

Trong khuôn khổ thí nghiệm, hầu hết các loại thuốc bảo vệ thực vật có nguồn gốc sinh học có hiệu lực đối với loài rệp sáp giả vào thời điểm 5 ngày sau xử lý; trong đó, hỗn hợp hoạt chất azadirachtin + matrine cho hiệu quả phòng trừ cao nhất (52,95%), các công thức còn lại đều cho hiệu lực thấp hơn 50%. Ở thời điểm 7 ngày sau phun, hầu hết các công thức đều có hiệu lực phòng trừ cao, trong đó hỗn hợp azadirachtin + matrine đạt hiệu lực phòng trừ cao nhất (73,44%), tiếp đến là abamectin đạt 66,92%. Công thức sử dụng chế phẩm nấm có ích *beauveria bassiana* + *metarhizium anizopliae*, garlic juice và *bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* cho hiệu lực thấp hơn, đạt từ 45,34 đến 56,24%. Hiệu lực của tất cả các loại thuốc bắt đầu giảm dần sau thời điểm 7 ngày sau xử lý. Như vậy, hiệu lực của hỗn hợp azadirachtin + matrine đối với loài rệp sáp giả cao nhất ở thời điểm 7 ngày và tiếp tục kéo dài tới thời điểm 14 ngày sau xử lý (bảng 3).

Bảng 3. Hiệu lực của một số thuốc trừ loài rệp sáp giả *R. chinensis* trên cây ba kích tím.

Công thức	Mật độ rệp trước phun	Hiệu lực (%)				
		1 NSP	3 NSP	5 NSP	7 NSP	14 NSP
Azadirachtin + matrine (Golmec 9EC)	29,55	22,68 ^a	38,65 ^a	52,95 ^a	73,44 ^a	61,92 ^a
<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> (Comazol (16000 IU/mg) WP)	29,13	11,86 ^b	23,37 ^{bc}	38,27 ^b	56,24 ^{bc}	51,02 ^{abc}
Garlic juice (Biorepel 10SL)	27,91	9,79 ^b	24,97 ^{bc}	35,88 ^b	53,48 ^{bc}	47,96 ^{bc}
Abamectin (Tervigo® 020SC)	28,77	20,62 ^a	27,40 ^b	46,02 ^{ab}	66,92 ^{ab}	53,94 ^{ab}
<i>Beauveria bassiana</i> + <i>Metarhizium anizopliae</i> (TKS-Nakisi WP)	28,20	12,84 ^b	15,93 ^c	34,34 ^b	45,34 ^c	39,47 ^c
Đôi chứng (nước lã)	29,32	-	-	-	-	-
P		<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05

Ghi chú: các chữ cái cùng cột khác nhau có ý nghĩa khác nhau; NSP: ngày sau phun.

Kết luận

Loài rệp sáp giả *R. chinensis* phát triển và sinh sản thuận lợi ở điều kiện 25°C, nhưng không sinh sản khi nhiệt độ tăng lên mức 30°C. Ở điều kiện nhiệt độ 25°C, vòng đời là 75,19 ngày, tuổi thọ của trưởng thành khoảng 81 ngày, thời gian sống của rệp khoảng 110 ngày, thời gian đẻ trứng khoảng gần 40 ngày. Trong khi ở điều kiện nhiệt độ 30°C,

tuổi thọ của trưởng thành rút ngắn còn khoảng 26 ngày và không có khả năng sinh sản. Hiệu lực của hỗn hợp hoạt chất azadirachtin + matrine có hiệu lực cao đối với rệp sáp giả *R. chinensis* ở thời điểm 7 ngày và tiếp tục kéo dài tới thời điểm 14 ngày sau phun.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] S.G. Razafimandimbison, et al. (2009), "Molecular phylogenetics and genetic assessment in the tribe Morindeae (Rubiaceae-Rubioideae): how to circumscribe Morinda L. to be monophyletic?", *Mol. Phylogen. Evol.*, **52**, pp.879-886.
- [2] Đỗ Huy Bích, Đặng Quang Chung, Bùi Xuân Chương, Nguyễn Thuận Dong, Đỗ Trung Đàm, Phạm Văn Hiền, Vũ Ngọc Lộ, Phạm Duy Mai, Phạm Kim Mân, Đoàn Thị Nhu, Nguyễn Tập, Trần Toàn (2004), *Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam*, **Tập 2**, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật.
- [3] N. Cui, et al. (2013), "Screening the effective components and mechanism of *Morinda officinalis* on tonifying kidney and nourishing Yang", *Chinese Tradit. Patent Med.*, **35**(10), pp.2256-2258.
- [4] Y.F. Li, et al. (2003), "Inhibition of the oligosaccharides extracted from *Morinda officinalis*, a Chinese traditional herbal medicine, on the corticosteron induced apoptosis in PC12 cells", *Life Sci.*, **72**, pp.933-942.
- [5] X. Shi, P. Chi (1988), "Identification of the pathogen causing Wilt disease of the medicinal herb Indian mulberry (*Morinda officinalis* How.)", *Acta Phytopathol. Sin.*, **18**(3), pp.137-142.
- [6] S.A. Firdousi, T.A. Khan (2015), "Two new fungal diseases of trees of manudevi forest of Jalgaon, district", *Flora and Fauna (Jhansi)*, **21**(2), pp.158-160.
- [7] Đặng Thị Hà, Chu Thị Mỹ, Phan Thúy Hiền, Nguyễn Thị Bình, Trần Hữu Khánh Tân (2017), "Nghiên cứu tác nhân gây bệnh héo vàng trên cây ba kích (*Morinda officinalis* How.)", *Tạp chí Bảo vệ Thực vật*, **2**, tr.9-13.
- [8] Ngô Quang Huy, Mai Văn Quân, Lê Quang Mẫn, Lê Xuân Vĩ, Dương Thị Nguyên, Lê Đức Trung, Trịnh Xuân Hoạt (2018), "Kết quả giám định và một số đặc điểm của nấm *Fusarium fujikuroi* Nirenberg gây bệnh vàng lá thối rễ cây ba kích tại Quảng Ninh", *Tạp chí Bảo vệ Thực vật*, **5**, tr.68-73.
- [9] Chu Thị Mỹ, Đặng Thị Hà, Đào Thị Kim Nhung, Lê Thị Thu, Hoàng Diệu Linh, Phan Thúy Hiền (2019), "Nghiên cứu tác nhân gây bệnh chết rạp cây con ba kích (*Morinda officinalis* How.) tại Việt Nam", *Tạp chí Bảo vệ Thực vật*, **6**, tr.32-39.
- [10] M. García Morales, et al. (2016), *ScaleNet: A literature-based model of scale insect biology and systematics*, Oxford University, DOI: 10.1093/database/bav118.
- [11] A.N. Shylesha, M. Mani (2016), *Natural enemies of mealybugs*, Springer.
- [12] Phạm Văn Lâm (1994), "Thành phần rệp sáp hại cây ăn quả có múi đã phát hiện ở Việt Nam", *Tạp chí Bảo vệ Thực vật*, **2**, tr.10-15.
- [13] Cục Bảo vệ Thực vật (2010), *Danh lục sinh vật hại trên một số cây trồng và sản phẩm cây trồng sau thu hoạch ở Việt Nam*, Nhà xuất bản Nông nghiệp.
- [14] Nguyễn Thị Chất, Vũ Thị Nga, Trần Thành Tân, Lê Thị Tuyết Nga, Trần Thị Quế Trân, Lê Minh Tâm, Lê Quang Tùng, Nguyễn Thị Hồng Thủy (2005), "Kết quả điều tra thành phần rệp sáp (Coccinea) gây hại cây trồng ở một số tỉnh phía Nam trong các năm 1999-2004", *Kỷ yếu Hội nghị côn trùng học toàn quốc lần thứ 5*, Nhà xuất bản Nông nghiệp, tr.19-24.

Khả năng kháng khuẩn và phòng bệnh hoại tử gan tụy cấp ở tôm thẻ chân trắng (*Penaeus vannamei*) của tỏi (*Allum sativum*) lên men

Nguyễn Thị Hạnh, Phan Thị Vân, Phạm Thị Yến, Lê Thị Mây, Trương Thị Mỹ Hạnh*

Viện Nghiên cứu nuôi trồng thủy sản 1

Ngày nhận bài 16/11/2020; ngày chuyển phản biện 20/11/2020; ngày nhận phản biện 2/1/2021; ngày chấp nhận đăng 6/1/2021

Tóm tắt:

Nghiên cứu được tiến hành nhằm kiểm tra khả năng kháng khuẩn của tỏi lên men đối với các chủng vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* KC.13.14.2 và *Vibrio harveyi* KC.13.17.5 gây bệnh hoại tử gan tụy cấp (Acute hepatopancreatic necrosis disease - AHPND), đồng thời đánh giá khả năng phòng AHPND cho tôm thẻ chân trắng (*Penaeus vannamei*) trong điều kiện phòng thí nghiệm. Kết quả chỉ rõ, sản phẩm tỏi lên men có độ nhạy cao đối với cả 2 chủng vi khuẩn gây AHPND khi thử nghiệm ở 25 µl và 30 µl. Khi bổ sung dịch tỏi lên men với liều 15 ml/kg thức ăn/ngày vào thức ăn để cho tôm ăn trong 10 ngày liên tục đã có khả năng phòng AHPND cho tôm. Thức ăn trộn dịch tỏi lên men bao ngoài bằng dầu mực có hiệu quả cao nhất khi nâng tỷ lệ sống của tôm lên 53%, cao hơn so với không sử dụng chất bao ngoài (51%), bao ngoài bằng bột nếp (42%) và không sử dụng dịch tỏi lên men (14%).

Từ khóa: AHPND, dịch tỏi lên men, kháng khuẩn, phòng bệnh, tôm thẻ chân trắng.

Chỉ số phân loại: 4.5

Đặt vấn đề

Trong những năm gần đây, AHPND là một trong những bệnh phổ biến, gây ảnh hưởng nghiêm trọng đến nghề nuôi tôm trên thế giới, trong đó có Việt Nam. Tác nhân gây AHPND được xác định là do vi khuẩn *V. parahaemolyticus* [1]. Kết quả nghiên cứu sâu về tác nhân gây AHPND cho thấy, bản chất gây ra AHPND là vi khuẩn mang Plasmid có chứa gen độc lực gây hoại tử gan tụy cấp [2, 3]. Ở Việt Nam, đã xác định có ít nhất 2 chủng vi khuẩn (*V. parahaemolyticus* và *V. harveyi*) gây AHPND ở tôm nuôi nước lợ, trong đó có tôm thẻ chân trắng [4, 5].

Tỏi có vai trò kích thích tiêu hóa, tăng cường hệ miễn dịch, gia tăng kiểm soát tác nhân gây bệnh, đặc biệt là vi khuẩn và nấm [6-8]. Một số nghiên cứu về hiệu quả của dịch chiết tỏi, tỏi tươi ép, tỏi bột đối với phòng trị bệnh nhiễm khuẩn ở động vật thủy sản đã được thực hiện [6-8]. Tuy nhiên, mỗi phương pháp đều có hạn chế, cụ thể phương pháp tách chiết đòi hỏi trang thiết bị và hóa chất chuyên dùng, người thực hiện cần được đào tạo bài bản, chi phí thực hiện cao, dẫn đến giá thành sản phẩm cao, ngoài ra còn không thuận tiện trong cách bảo quản lẫn sử dụng tại các nông hộ. Đối với tỏi bột, cần có đầu tư về hệ thống máy sấy, nghiền bột. Bên cạnh đó, bột tỏi dễ trộn vào thức ăn thường bám dính kém và mùi đặc trưng của

tỏi đã không kích thích cho động vật thủy sản bắt mồi. Đối với tỏi tươi ép, mùi đặc trưng của tỏi không kích thích động vật thủy sản bắt mồi. Phương pháp lên men tỏi đã khắc phục được các hạn chế nêu trên. Phương pháp này thực hiện không quá cầu kỳ, giá thành rẻ, thuận lợi cho bà con nông dân khi sử dụng cho động vật thủy sản nuôi, đặc biệt sản phẩm có mùi thơm kích thích động vật thủy sản bắt mồi. Đây là một hướng nghiên cứu đầy hứa hẹn, có giá trị ứng dụng cao.

Mục tiêu của nghiên cứu này là đánh giá khả năng kháng vi khuẩn gây AHPND và hiệu quả phòng AHPND trên tôm thẻ chân trắng trong điều kiện phòng thí nghiệm của sản phẩm tỏi lên men.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu nghiên cứu

Củ tỏi ta (*Allium sativum* L.) thu tại Hải Dương, bóc bỏ lớp vỏ lụa bên ngoài, sau đó cắt nhỏ các tép tỏi, phối trộn cùng với rượu và mật ong theo tỷ lệ 10 kg tỏi : 10 lít rượu : 1 lít mật ong. Chuyển nguyên liệu đã phối trộn vào thùng/xô nhựa có nắp đậy ủ cho lên men trong thời gian 25-30 ngày ở 30-35°C. Sau thời gian ủ, lọc bỏ phần bã của củ tỏi, phần dịch tỏi lên men được sử dụng để thử khả năng kháng khuẩn

* Tác giả liên hệ: Email: tmhanh@ria1.org

Antimicrobial activity and prevention acute hepatopancreatic necrosis disease in brackish whiteleg shrimp (*Penaeus vannamei*) of the fermented garlic (*Allium sativum*)

Thi Hanh Nguyen, Thi Van Phan, Thi Yen Pham,
Thi May Le, Thi My Hanh Truong*

Research Institute for Aquaculture No 1

Received 16 November 2020; accepted 6 January 2021

Abstract:

The study was conducted to screen the antibacterial activity of fermented garlic against *V. parahaemolyticus* KC.13.14.2 and *V. harveyi* KC.13.17.5, the causal agent of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND). The results showed that fermented garlic products had a high sensitivity to both strains of screened bacteria at concentrations of 25 and 30 μ l. Then the effect of fermented garlic as an agent for the prevention of AHPND was evaluated *in vivo*. When adding fermented garlic at a dose of 15 ml/kg food/day to feed shrimp for 10 consecutive days, it was possible to prevent AHPND disease for shrimp. Food mixed with fermented garlic with squid oil was the most effective when it increased the survival rate of shrimp to 53%, significantly higher than treatment using supplementary feed without a coating of 51%, coated with glutinous rice of 42%, and no fermented garlic of 14%.

Keywords: AHPND, antibacterial, disease prevention, fermented garlic, whiteleg shrimp.

Classification number: 4.5

và hiệu quả phòng AHPND cho tôm.

Các chủng vi khuẩn thử nghiệm bao gồm *V. parahaemolyticus* KC.13.14.2 và *V. harveyi* KC.13.17.5 gây AHPND ở tôm nuôi nước lợ tại Nghệ An. Các chủng này hiện đang được lưu giữ tại Trung tâm Quan trắc môi trường và bệnh thủy sản miền Bắc (CEDMA), Viện Nghiên cứu nuôi trồng thủy sản 1.

Tôm thẻ chân trắng có khối lượng khoảng 3-4 g/con, kích thước đồng đều, phản xạ nhanh, ruột đầy thức ăn, có kết quả âm tính với vi rút gây bệnh đốm trắng và các loài vi khuẩn gây AHPND.

Bể composit có thể tích 200 l/bể, muối biển nhân tạo dùng để pha nước nuôi tôm ở độ mặn 15‰.

Phương pháp nghiên cứu

Đánh giá khả năng kháng khuẩn của sản phẩm tỏi lên men:

Chuẩn bị vi khuẩn thử nghiệm: các chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* KC.13.14.2 và *V. harveyi* KC.13.17.5 từ tủ -80°C được nuôi cấy thuần lại trên đĩa TCBS (Thiosulfate citrate bile salts), chọn 1 khuẩn lạc đơn đem nuôi cấy tăng sinh trong môi trường NB có bổ sung 2% NaCl để thu dịch vi khuẩn. Mật độ vi khuẩn được xác định bằng phương pháp đo mật độ quang (OD) ở bước sóng 600 nm, mật độ vi khuẩn sử dụng để khảo sát hoạt tính kháng khuẩn là 10^8 cfu/ml, tương ứng với OD=0,1.

Khảo sát hoạt tính kháng khuẩn của sản phẩm tỏi lên men bằng phương pháp kháng sinh đồ khuếch tán trên đĩa thạch Kirby-Bauer [9]. Nhỏ sản phẩm tỏi lên men lên các khoanh giấy vô trùng với 6 thể tích để tiến hành thử nghiệm bao gồm 5, 10, 15, 20, 25 và 30 μ l/khoanh giấy. Khoanh giấy tẩm kháng sinh Doxycyclin (30 μ g) được sử dụng như đối chứng dương, khoanh giấy nhỏ nước cất được sử dụng như đối chứng âm. Dùng que trang trang đều 100 μ l vi khuẩn ở mật độ 10^8 cfu/ml lên thạch Mueller Hinton, đặt các đĩa giấy đã thấm sản phẩm tỏi lên men và đối chứng vào, sau đó ủ trong tủ ẩm ở 29°C. Sau 24h nuôi cấy, đĩa thạch được lấy ra để đo đường kính vòng vô khuẩn. Đường kính vòng vô khuẩn ≥ 16 mm: nhạy (dịch tỏi lên men có độ nhạy với vi khuẩn) [10].

Đánh giá hiệu quả phòng AHPND: thí nghiệm đánh giá hiệu quả phòng bệnh đối với tôm gây nhiễm vi khuẩn gây AHPND được mô tả chi tiết trong bảng 1.

Bảng 1. Thí nghiệm đánh giá hiệu quả phòng bệnh đối với tôm gây nhiễm vi khuẩn gây AHPND.

	CT1	CT2	CT3	Đối chứng dương	Đối chứng âm
Cách bổ sung tòi lên men cho tôm	Thức ăn trộn cùng tòi lên men có bao ngoài bằng bột nếp	Thức ăn trộn cùng tòi lên men có bao ngoài bằng dầu gan mực	Thức ăn trộn cùng tòi lên men không bao ngoài	Thức ăn thường không có chất bổ sung	Thức ăn thường không có chất bổ sung
Cách cho ăn và liều lượng bổ sung	Trộn 15 ml dịch tòi lên men/kg thức ăn/ngày cho tôm ăn liên tục trong vòng 10 ngày, từ ngày thứ 11 cho ăn thức ăn viên công nghiệp không có tòi lên men			Cho ăn thức ăn thường công nghiệp không bổ sung dịch tòi lên men	
Mật độ vi khuẩn ngấm khi công cường độc	1x10 ⁶ (cfu/ml)			Không có bất kỳ tác động nào của vi khuẩn. Tôm nuôi bình thường	
Thời điểm ngấm vi khuẩn	Ngày thứ 11			Không ngấm vi khuẩn	
Thời gian ngấm tôm trong vi khuẩn	1 ngày, sau đó thay toàn bộ nước trong tất cả các bể thí nghiệm				
Thí nghiệm được bố trí kéo dài 21 ngày, các nghiệm thức thí nghiệm được bố trí lặp lại 3 lần, mỗi bể 30 con tôm có kích cỡ khoảng 3-4 g và được theo dõi ghi chép số tôm chết tích lũy theo thời gian, tái phân lập tác nhân vi khuẩn gây AHPND					

Tôm trước khi thí nghiệm được kiểm tra âm tính với AHPND.

Thí nghiệm được bố trí trong khoảng nhiệt độ 25-28°C, pH 7,3-7,9, sục khí hoạt động liên tục ở các bể trong quá trình thí nghiệm, độ mặn 15‰.

Sản phẩm tòi lên men do chúng tôi tạo ra trước đó đã được thử tại nông hộ nuôi tôm với mục đích để phòng bệnh cho tôm nuôi. Kết quả được nông hộ phản ánh, các ao nuôi tôm khi sử dụng dịch tòi lên men bổ sung vào thức ăn cho tôm ăn với liều lượng 15 ml/kg thức ăn/ngày, cho ăn 10 ngày liên tục là có hiệu quả phòng bệnh so với các ao nuôi tôm không sử dụng dịch tòi lên men. Chính vì vậy, để kiểm chứng lại kết quả một cách có ý nghĩa khoa học chúng tôi đã chọn liều lượng 15 ml tòi lên men/kg thức ăn/ngày, cho ăn 10 ngày liên tục để phòng AHPND cho tôm trong thí nghiệm này.

Công cường độc vi khuẩn bằng hình thức ngấm, vi khuẩn sử dụng để gây nhiễm là chủng *V. parahaemolyticus* KC.13.14.2 gây AHPND đã được chúng tôi sử dụng làm vật liệu nghiên cứu cho nhiều nghiên cứu trước đó. Mật độ vi khuẩn khi ngấm là 1x10⁶ cfu/ml [9, 11]. Xác định mật độ vi khuẩn ban đầu theo phương pháp đo OD ở bước sóng $\lambda=600$ nm, khi đo OD=0,1 tương đương với mật độ vi khuẩn ban đầu là 10⁸ cfu/ml.

Sử dụng thức ăn tôm cao cấp của Công ty Thức ăn thủy sản Việt Nam, bổ sung sản phẩm tòi lên men thấm đều vào thức ăn. Nghiệm thức sử dụng chất bao ngoài, dùng dầu gan

mực nhỏ từng giọt một cho đến khi thấm đều các viên thức ăn, đối với bột nếp đun chín rồi trộn từng thìa một cho đến khi đủ bao ngoài các viên thức ăn. Thức ăn sau đó được rải mỏng ra giấy rồi để khô nửa ngày trong tủ lạnh trước khi cho tôm ăn.

Trong quá trình thí nghiệm, tôm vừa chết hoặc yếu không phản xạ bơi khi có vật chạm vào được thu để tái phân lập lại tác nhân gây nhiễm bằng phương pháp nuôi cấy và định danh vi khuẩn theo phương pháp của Nicky B. Buller [12], sử dụng bộ kit API 20E để thử sinh hóa, sau đó tra kết quả bằng phần mềm: <https://apiweb.biomerieux.com/servlet/Authenticate?action=prepareLogin>. Đồng thời, xác định tác nhân gây AHPND bằng kỹ thuật PCR: sử dụng cặp mồi AP3 (F: ATGAGTAACAATAAAACATGAAAC; R: GTGGTAATATTGTACAGAA) được công bố bởi Sirikharin và cs [13]. Cặp mồi AP3 để khuếch đại đoạn gen 336 bp của gen Toxin gây AHPND ở tôm, chu kỳ nhiệt của phản ứng PCR được áp dụng như sau: 95°C (5 phút), [35 chu kỳ (94°C trong 1 phút, 53°C trong 30 giây và 72°C trong 40 giây)], 72°C (5 phút) và 4°C (∞). Sản phẩm PCR được điện di trên thạch agarose 1% trong dung dịch 1X TBE và đọc kết quả dưới đèn UV, sản phẩm xuất hiện vạch có kích thước 336 pb.

Kết thúc thí nghiệm tôm còn sống ở các nghiệm thức cũng được thu để định danh vi khuẩn *V. parahaemolyticus* KC.13.14.2 trong gan tụy tôm và kiểm tra AHPND.

Phương pháp xử lý số liệu

Các thí nghiệm được bố trí ngẫu nhiên và lặp lại 3 lần. Số liệu được xử lý bằng phần mềm Excel 2010 và xử lý thống kê bằng phần mềm SPSS với sự sai khác có ý nghĩa $p<0,05$.

Kết quả nghiên cứu và thảo luận

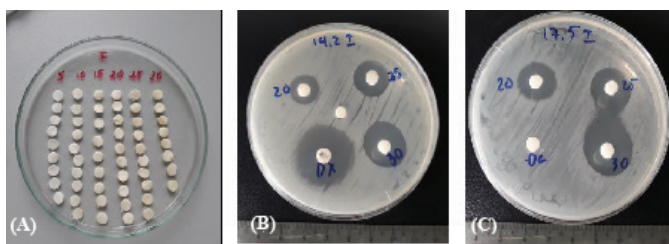
Khả năng diệt khuẩn của tòi lên men đối với các chủng vi khuẩn gây AHPND

Kết quả thử nghiệm ở nồng độ 5 μ l, sản phẩm tòi lên men không tạo được vòng vô khuẩn đối với cả 2 chủng vi khuẩn thử nghiệm là *V. parahaemolyticus* KC.13.14.2 và *V. harveyi* KC.13.17.5. Khi thử nghiệm ở các nồng độ cao hơn là 10, 15 và 20 μ l, sản phẩm tòi lên men tạo ra vòng kháng khuẩn trung bình dao động từ 7,2-13,8 mm (chủng *V. parahaemolyticus* KC.13.14.2) và 8,0-14,6 mm (chủng *V. harveyi* KC.13.17.5). Chỉ khi nâng nồng độ thử nghiệm lên 25 và 30 μ l thì sản phẩm tòi lên men mới tạo ra vòng kháng khuẩn có độ nhạy cao đối với cả 2 chủng vi khuẩn thử nghiệm. Đường kính vòng vô khuẩn trung bình đạt được lần lượt là 16,8-18,2 mm (*V. parahaemolyticus* KC.13.14.2) và 17,2-18,8 mm (*V. harveyi* KC.13.17.5). Trong khi đó, đối chứng Doxycyclin cũng chỉ tạo ra đường kính vòng vô khuẩn trung bình 22,8-24,0 mm giữa hai chủng (bảng 2, hình 1).

Bảng 2. Khả năng diệt khuẩn của sản phẩm tòi lên men đối với các chủng gây AHPND.

Nồng độ thử nghiệm (μl)	Đường kính vòng vô khuẩn (mm)	
	<i>V. parahaemolyticus</i> KC.13.14.2	<i>V. harveyi</i> KC.13.17.5
5	0	0
10	7,2±0,8 ^a	8,0±0,7 ^a
15	11,4±0,9 ^b	9,8±0,8 ^b
20	13,8±1,3 ^c	14,6±0,9 ^c
25	16,8±1,6 ^d	17,2±0,8 ^d
30	18,2±1,4 ^e	18,8±1,1 ^d
Đối chứng (nước cất)	0	0
Doxycyclin (30 μg)	24,0±1,2	22,8±1,1

Ghi chú: a, b, c, d, e: trên cùng một cột chỉ ra sự khác nhau có ý nghĩa về mặt thống kê $p < 0,05$.



Hình 1. Khả năng diệt khuẩn của tòi lên men đối với vi khuẩn gây AHPND trên tôm. (A) Đĩa giấy tẩm dịch chiết tòi; (B) Đường kính vòng vô khuẩn của tòi lên men khi thử với vi khuẩn *V. parahaemolyticus* KC.13.14.2 gây AHPND; (C) Đường kính vòng vô khuẩn của tòi lên men khi thử với vi khuẩn *V. harveyi* KC.13.17.5 gây AHPND; ĐC: đối chứng âm; Dx: Doxycyclin (30 μg).

Đối với chủng *V. parahaemolyticus* KC.13.14.2 khi nâng nồng độ thử nghiệm từ 25 lên 30 μl, đường kính vòng vô khuẩn tăng từ 16,8 lên 18,2 mm, khoảng cách này tạo ra sự sai khác có ý nghĩa về mặt thống kê ($p < 0,05$). Trong khi đó, khi nâng nồng độ thử nghiệm từ 25 lên 30 μl đối với chủng *V. harveyi* KC.13.17.5, đường kính vòng vô khuẩn tạo ra từ 2 nồng độ lại không có sự sai khác có ý nghĩa thống kê (bảng 2, hình 1).

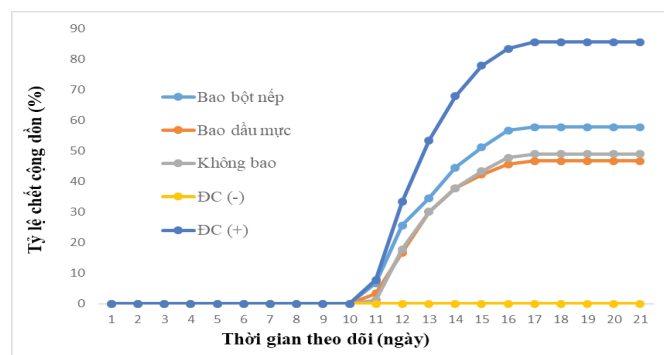
Kết quả thử nghiệm này của chúng tôi cũng tương đồng với một số kết quả của các công trình nghiên cứu trước về khả năng kháng khuẩn của dịch chiết tòi đối với tác nhân vi khuẩn gây bệnh trên động vật thủy sản. Theo Nguyễn Anh Tuấn (2009) [11], dịch ép tòi tươi có tác dụng diệt khuẩn rất tốt đối với vi khuẩn *V. harveyi* ở nồng độ thử nghiệm là 100% với đường kính vòng vô khuẩn trung bình là $22,1 \pm 3,11$ mm. Cao khô tòi có khả năng diệt khuẩn cao với 2 chủng vi khuẩn *A. hydrophila* gây bệnh trên cá trắm cỏ ở nồng độ thử nghiệm là 30 μg/μl với đường kính vòng vô khuẩn trung bình lần lượt là $18,33 \pm 1,57$ mm và $18,33 \pm 1,53$ mm [9].

Cũng nghiên cứu và thử nghiệm đối với các chủng vi khuẩn gây AHPND trên tôm Nguyễn Thị Hạnh và Đặng Thị Lụa (2016) cho rằng, cao khô tòi tách chiết bằng dung môi

là cồn 70° khi thử nghiệm ở 5 nồng độ (10, 15, 20, 25 và 30 μl) đều không có khả năng diệt khuẩn đối với các chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* (KC.12.020, KC.13.14.2) gây AHPND trên tôm [14]. Trong khi đó, nghiên cứu này lại cho thấy tòi lên men có tính nhạy đối với cả 2 chủng vi khuẩn gây AHPND là *V. harveyi* KC.13.17.5 và *V. Parahaemolyticus* KC.13.14.2 khi thử nghiệm ở thể tích ≥ 25 μl (đường kính vòng vô khuẩn > 16 mm) (bảng 2).

Khả năng phòng bệnh của tòi lên men đối với AHPND trên tôm thẻ chân trắng

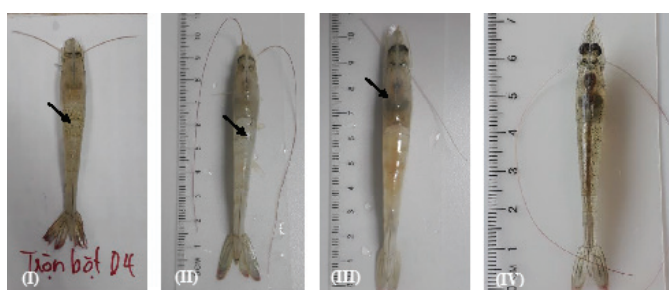
Trong 10 ngày đầu, tôm thẻ chân trắng ở các thí nghiệm được ăn thức ăn có bổ sung dịch tòi lên men để phòng AHPND, từ ngày thứ 11 đến cuối thí nghiệm tôm ăn thức ăn viên công nghiệp không bổ sung dịch tòi lên men, các bể ở thí nghiệm đối chứng tôm ăn thức ăn viên công nghiệp không trộn dịch tòi lên men trong suốt thời gian thí nghiệm. Riêng các bể đối chứng âm và dương tôm ăn thức ăn viên công nghiệp, không bổ sung dịch tòi lên men. Kết quả cho thấy, tôm ở tất cả các nghiệm thức thí nghiệm đều ăn hết thức ăn, phản xạ nhanh nhẹn, màu sắc sáng và không thấy có tôm chết. Đến ngày thứ 11 (ngày đầu tiên gây nhiễm), tất cả các nghiệm thức thí nghiệm có gây nhiễm vi khuẩn đều có tôm chết với tỷ lệ chết từ 1,1 đến 7,7%. Tôm chết nhanh sau 2-4 ngày gây nhiễm và dừng chết sau 7 ngày gây nhiễm. Cuối thí nghiệm, tỷ lệ tôm chết cao nhất là nghiệm thức đối chứng dương với tỷ lệ chết cộng dồn là 86%. Tiếp đến là nghiệm thức tôm bổ sung sản phẩm tòi lên men vào thức ăn có dùng bột nếp để bao ngoài với tỷ lệ chết cộng dồn là 58%. Nghiệm thức tôm ăn thức ăn có bổ sung dịch tòi lên men bao ngoài bằng dầu gan mực và nghiệm thức không sử dụng chất bao ngoài có tỷ lệ chết cộng dồn lần lượt là 47 và 49%. Trong khi đó, nghiệm thức đối chứng âm tôm không có hiện tượng chết (hình 2). Kết quả này cho thấy, sản phẩm tòi lên men có hiệu quả trong việc kiểm soát độc lực của vi khuẩn *V. parahaemolyticus* KC.13.14.2 gây AHPND trên tôm.



Hình 2. Tỷ lệ chết cộng dồn của tôm trong thí nghiệm đánh giá khả năng phòng AHPND của tòi lên men.

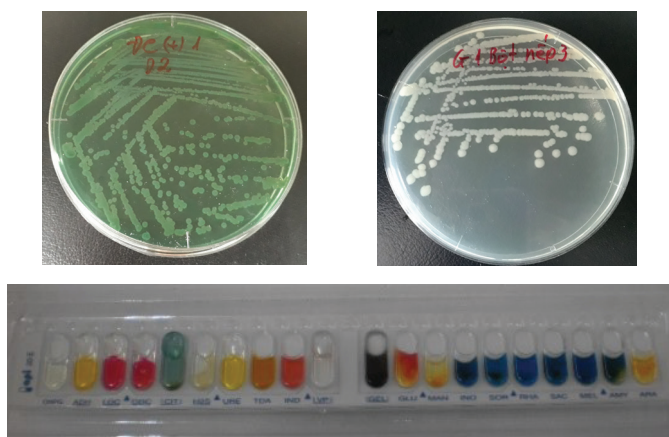
Kết quả thí nghiệm cũng chỉ rõ, khi bổ sung sản phẩm tòi lên men vào thức ăn cho tôm với liều lượng 15 ml/kg thức ăn/ngày liên tục trong 10 ngày đã có tác dụng nâng cao tỷ lệ sống

của tôm khi công cường độc vi khuẩn gây AHPND. Trong đó, hình thức sử dụng dầu gan mực để bao ngoài có hiệu quả cao nhất, tỷ lệ sống của tôm ở nghiệm thức này là 53%, ở nghiệm thức không sử dụng chất bao ngoài là 51%, còn ở nghiệm thức sử dụng bột nếp để bao ngoài là 42% so với tôm ở nghiệm thức đối chứng dương có tỷ lệ sống chỉ đạt 14% và đối chứng âm là 100%. Khi so sánh tỷ lệ sống của tôm giữa hai nghiệm thức có hiệu quả cao nhất khi sử dụng sản phẩm tòi lên men để phòng AHPND là nghiệm thức sử dụng dầu gan mực để bao ngoài và nghiệm thức không sử dụng chất bao ngoài cho thấy không có sự khác nhau có ý nghĩa thống kê ($p>0,05$). Tuy nhiên, lại có sự khác nhau có ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức đối chứng dương của thí nghiệm ($p<0,05$).



Hình 3. Biểu hiện của tôm sau khi gây nhiễm vi khuẩn gây AHPND. (I) Tôm chết ở nghiệm thức sử dụng bột nếp để bao ngoài; (II) Tôm chết ở nghiệm thức sử dụng dầu mực để bao ngoài; (III) Tôm chết ở nghiệm thức đối chứng dương; (IV) Tôm ở nghiệm thức đối chứng âm.

Tôm chết ở các nghiệm thức sau khi công cường độc vi khuẩn gây AHPND có các biểu hiện bệnh như gan tụy chuyển màu trắng hoặc đỏ (mũi tên chỉ ở hình 3-III), vỏ mềm (mũi tên chỉ ở hình 3-II), màu sắc nhợt nhạt và ruột tôm không có thức ăn (mũi tên chỉ ở hình 3-I). Trong khi đó, tôm ở lô đối chứng âm màu sắc tươi sáng, gan tụy đen, ruột đầy thức ăn (hình 3-IV). Những biểu hiện của tôm sau gây nhiễm này hoàn toàn giống với những biểu hiện của tôm bị nhiễm AHPND đã được công bố [15].



Hình 4. Khuẩn lạc và đặc điểm sinh hóa của vi khuẩn *V. parahaemolyticus* tái phân lập lại từ tôm chết/yếu ở các nghiệm thức thí nghiệm.

Bảng 3. Kết quả tái phân lập vi khuẩn gây AHPND trong quá trình thí nghiệm.

TT	Ngày thí nghiệm	Tần xuất tái phân lập vi khuẩn <i>V. parahaemolyticus</i> ở các nghiệm thức thí nghiệm				
		Đối chứng (-)	Đối chứng (+)	Không bao ngoài	Bao ngoài dầu gan mực	Bao ngoài bột nếp
1	12	KT	2/2	2/2	2/2	2/2
2	15	KT	2/2	2/2	2/2	2/2
3	21	0/5	0/1	0/1	0/1	0/1

KT: không thu mẫu.

Trong quá trình thí nghiệm, tôm chết ở các nghiệm thức được thu để nuôi cấy và tái phân lập lại vi khuẩn gây nhiễm. Kết quả nuôi cấy và định danh vi khuẩn cho thấy, 100% mẫu thu khi tôm vừa mới chết/yếu vào ngày thứ 12 và 15 của thí nghiệm (sau 2 và sau 5 ngày công cường độc) đều dương tính với vi khuẩn *V. parahaemolyticus*. Các chủng vi khuẩn phân lập được đều có phản ứng sinh hóa trùng khớp với chủng *V. parahaemolyticus* KC.13.14.2 ban đầu đem gây nhiễm. Điều đó khẳng định, tôm trong các nghiệm thức gây nhiễm vi khuẩn bị chết là do độc lực của vi khuẩn gây nhiễm. Trong khi đó, 100% mẫu tôm sống thu ở các nghiệm thức vào ngày thứ 21 (ngày cuối) của thí nghiệm lại cho kết quả âm tính với vi khuẩn *V. parahaemolyticus*. (hình 4, bảng 3).

Kết quả kiểm tra tác nhân gây AHPND trên tôm bằng kỹ thuật PCR cũng đã khẳng định, tôm chết sau khi công cường độc vi khuẩn ở các nghiệm thức thí nghiệm là do nhiễm vi khuẩn *V. parahaemolyticus* gây AHPND (bảng 4).

Bảng 4. Kết quả kiểm tra AHPND bằng phương pháp PCR.

TT	Ngày thí nghiệm	Tần xuất bắt gặp tôm nhiễm AHPND ở các nghiệm thức thí nghiệm				
		Đối chứng (-)	Đối chứng (+)	Không bao ngoài	Bao ngoài dầu gan mực	Bao ngoài bột nếp
1	11	KKT	1/1	1/1	1/1	1/1
2	12	KKT	2/2	2/2	2/2	2/2
3	15	KKT	2/2	2/2	2/2	2/2
4	21	0/5	0/1	0/1	0/1	0/1

KKT: không kiểm tra.

Các mẫu tôm chết thu được sau 1 ngày gây nhiễm (ngày thứ 11 của thí nghiệm) đều cho kết quả dương tính với AHPND (4/4 mẫu). Kết quả kiểm tra các mẫu tôm thu sau 2 và 5 ngày gây nhiễm ở các nghiệm thức vẫn tiếp tục cho kết quả dương tính với AHPND, tỷ lệ nhiễm đều là 100% ở các ngày thu mẫu để kiểm tra.

Trước khi kết thúc thí nghiệm, tôm còn sống ở các nghiệm thức được thu để kiểm tra AHPND, tất cả các mẫu kiểm tra đều âm tính với AHPND. Điều đó cho thấy,

gan tụy tôm còn sống trong thí nghiệm đã đào thải hết vi khuẩn *V. parahaemolyticus* gây nhiễm ban đầu (bảng 4).

Kết luận

Ở các nồng độ 5, 10, 15 và 20 µl, sản phẩm tỏi lên men không có hiệu quả diệt khuẩn cao. Ở nồng độ 25 và 30 µl, sản phẩm tỏi lên men có độ nhạy cao đối với cả 2 chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* KC.13.14.2 và *V. harveyi* KC.13.17.5 gây AHPND.

Trong điều kiện phòng thí nghiệm, bổ sung tỏi lên men với liều 15 ml/kg thức ăn/ngày vào thức ăn rồi bao ngoài bằng dầu mực cho tôm ăn trong 10 ngày liên tục có khả năng nâng cao tỷ lệ sống của tôm lên 53%, cao hơn nghiệm thức không sử dụng chất bao ngoài (51%), bao ngoài bằng bột nếp (42%) và cao hơn so với đối chứng dương tôm chỉ ăn thức ăn thường không bổ sung sản phẩm tỏi lên men (14%). Tỷ lệ sống của tôm ở các nghiệm thức bổ sung dịch tỏi lên men vào thức ăn so với tỷ lệ sống của tôm ở nghiệm thức đối chứng không bổ sung tỏi lên men vào thức ăn là có sự sai khác có ý nghĩa thống kê.

Kết quả nghiên cứu mở ra tiềm năng ứng dụng sản phẩm tỏi lên men để phòng trị AHPND cho tôm nuôi nước lợ.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] L. Tran, et al. (2013), "Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp", *Disease of Aquatic Organisms*, **105**, pp.45-55.
- [2] C.F. Lo, et al. (2014), "Recent Advances in the newly emergent acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND)", *Symposium on Diseases in Asian Aquaculture (DAA9)*, p.72.
- [3] L.T. Kwai, E.H. Ung, S.W. Choo, S.M. Yew, W.Y. Wee, K.P. Yap (2014), "An AP1, 2 & 3 PCR Positive non - *Vibrio parahaemolyticus* bacteria with AHPND histopathology", *Diseases in Asian Aquaculture (DAA9)*, p.77.
- [4] Đặng Thị Lua, Nguyễn Viết Khuê, Phan Thị Vân (2016), "Non-

Vibrio parahaemolyticus gây bệnh hoại tử gan tụy cấp (AHPND) trên tôm nuôi", *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*, **14**, tr.690-698.

- [5] H. Kondo, et al. (2015), "Draft genome sequence of non-*Vibrio parahaemolyticus* acute hepatopancreatic necrosis disease strain KC13.17.5, isolated from diseased shrimp in Vietnam", *Genome Announc.*, **3**(5), DOI:10.1128/genomeA.00978-15.
- [6] L.P. Rees, et al. (1993), "Aquantitative assessment of the antimicrobial activity of garlic (*Allium sativum*)", *World J. Microbiol Biotechnol.*, **9**(3), pp.303-307.
- [7] M.A. Adetumbi, B.H.S. Lai (1986), "Inhibition of in-vitro germination and spherulation of *Coccidioides immitis* by *Allium sativum*", *Curr. Microbiol.*, **13**, pp.73-76.
- [8] M. Corzo-Martinez, N. Corzo, M. Villamiel (2007), "Biological properties of onions and garlic", *Trends in Food Science & Technology*, **18**, pp.609-625.
- [9] Nguyễn Thị Hạnh, Đặng Thị Lua (2016), "Đánh giá khả năng kháng khuẩn của dịch chiết tỏi (*Allium sativum* L.) đối với một số vi khuẩn gây bệnh trên cá nuôi nước ngọt", *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*, **22**, tr.100-104.
- [10] Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI (2006), *Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests of bacteria isolate from aquatic animals*.
- [11] Nguyễn Anh Tuấn (2009), "Thử nghiệm một số loại thảo dược trong phòng trị bệnh nhiễm khuẩn trên tôm thẻ chân trắng (*Penaeus vannamei*)", *Kỷ yếu hội nghị khoa học và công nghệ tuổi trẻ các trường đại học và cao đẳng khối nông lâm ngư thủy toàn quốc*.
- [12] Nicky B. Buller (2004), *Bacteria from Fish and Other Aquatic Animals: A Practical Identification Manual*, CABI Publishing.
- [13] <https://enaca.org/?id=96>.
- [14] Nguyễn Thị Hạnh, Đặng Thị Lua (2016), "Đánh giá khả năng diệt khuẩn của dịch chiết tỏi (*Allium sativum* L.) đối với một số vi khuẩn gây bệnh trên tôm", *Khoa học công nghệ trong phát triển nuôi trồng thủy sản*, Nhà xuất bản Nông nghiệp.
- [15] NACA (2012), *Asia pacific emergency regional consultation on the emerging shrimp disease: Early mortality syndrome (EMS)/ Acute hepatopancreatic necrosis syndrome (AHPNS)*.

Chọn lọc các cá thể F_2 đồng hợp tử mang *QTL9* liên quan đến cấu trúc bông lúa bằng chỉ thị phân tử CAPS

Phạm Thị Mai¹, Lê Thị Như¹, Stefan Jouannic², Không Ngân Giang^{1*}

¹Phòng thí nghiệm trọng điểm công nghệ tế bào thực vật, Viện Di truyền Nông nghiệp, Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam

²Viện Nghiên cứu phát triển Montpellier, Đại học Montpellier (Pháp)

Ngày nhận bài 28/9/2020; ngày chuyển phản biện 1/10/2020; ngày nhận phản biện 30/10/2020; ngày chấp nhận đăng 19/11/2020

Tóm tắt:

QTL9 là một tính trạng số lượng tiềm năng mới liên quan đến cấu trúc bông lúa, được xác định thông qua phân tích liên kết trên toàn hệ gen (GWAS) quần thể lúa bản địa Việt Nam. Các quần thể lai tái tổ hợp đã được phát triển từ 2 giống lúa bố mẹ G6 và G189 thuộc 2 haplotype tương phản về số gié thứ cấp/bông và số hạt/bông, nhằm nghiên cứu chức năng của *QTL9*. Bên cạnh đó, sử dụng công nghệ gen capture kết hợp với giải trình tự thế hệ mới đã xác định được 1.002 biến thể di truyền trong vùng *QTL9* của 2 giống bố mẹ, trong đó 12 điểm đột biến đa hình đơn nucleotide (SNPs) được tìm thấy nằm trong vùng cắt của 5 enzyme giới hạn. Trong nghiên cứu này, 12 cặp mồi đã được thử nghiệm để nhân chỉ thị CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences), được phát triển dựa vào 12 SNPs trên, nhằm ứng dụng để chọn lọc các dòng F_2 đồng hợp tử mang kiểu gen *QTL9* của bố và của mẹ. Phân tích sản phẩm PCR và cắt enzyme giới hạn chọn lọc được 4 chỉ thị CAPS cho sự đa hình giữa 2 giống bố mẹ và phân bố bao phủ vùng *QTL9*. Kết quả đánh giá quần thể F_2 gồm 275 cá thể bằng 3 chỉ thị CAPS thu được 74 dòng đồng hợp tử mang kiểu gen *QTL9* của mẹ, 66 dòng đồng hợp tử mang kiểu gen *QTL9* của bố và 135 dòng dị hợp tử. Các dòng đồng hợp tử sẽ được sử dụng để phát triển quần thể F_3 , đánh giá kiểu hình cấu trúc bông của quần thể F_3 để làm sáng tỏ vai trò của *QTL9* liên quan đến cấu trúc bông lúa.

Từ khóa: cấu trúc bông lúa, chỉ thị phân tử CAPS, đồng hợp tử, năng suất, QTL, quần thể F_2 .

Chỉ số phân loại: 4.6

Đặt vấn đề

Cấu trúc bông là một trong những tính trạng quan trọng hàng đầu quyết định năng suất lúa. Từ những năm 1960, các nhà khoa học đã tập trung nghiên cứu nhằm tối ưu hóa kích thước cấu trúc bông lúa, trong đó chiều dài bông, số lượng các gié/bông và số lượng hạt/bông là những đặc điểm thu hút sự quan tâm nhiều nhất. Rất nhiều gen liên quan đến chiều dài trục bông, sự phân nhánh và số hạt/bông đã được tìm ra bằng phương pháp lập bản đồ QTL (quantitative trait loci) và phân tích đột biến: *Ghd7*, *Ghd7.1*, *Ghd8/DTH8* [1-3], *LAX1* [4], *DEP1* [5]... Ngoài ra, một số lượng nhỏ gen được xác định liên quan đến sự phân nhánh bậc cao (số gié thứ cấp/bông, tam cấp/bông) và số hạt/bông: *Gn1a* [6], *LRK1*, *LAX2*, *TAW1* [7-9].

Những năm gần đây, phân tích GWAS trở thành một công cụ hữu ích để nghiên cứu sự đa dạng của quần thể và phát hiện thêm nhiều hơn các loci quan trọng, đặc biệt là các loci liên kết với các tính trạng nông học phức tạp như tính trạng năng suất. Nhiều QTL liên quan đến các tính trạng năng suất như: trọng lượng 1.000 hạt, số lượng bông/cây, số gié sơ cấp/bông, số gié thứ cấp/bông, chiều dài trục bông, số nhánh/bông, số hạt/bông

đã được công bố trong vài năm gần đây [10-14]. Những thành tựu này phản ánh sự phổ biến, mức độ đáng tin cậy cũng như tiềm năng to lớn của các nghiên cứu bằng GWAS trên các tính trạng nông học ở lúa. Tuy nhiên, kết quả phân tích GWAS dựa vào các thuật toán thống kê để khai thác được các QTL mới vào các chương trình chọn tạo giống nên chúng cần phải được kiểm chứng vai trò thông qua các quần thể lai và phân tích bằng chỉ thị phân tử kết hợp với đánh giá kiểu hình.

Trong số các quần thể được sử dụng để lập bản đồ QTL như quần thể F_2 , Doubled haploids (DHs) hoặc quần thể các dòng lai tái tổ hợp (Recombinant Inbred Lines - RILs) thì quần thể RILs là lựa chọn chính cho cây tự thụ phấn như lúa, *Arabidopsis* [15], nhờ những lợi thế thu được từ sự đồng hợp tử và tái tổ hợp có hiệu quả của chúng. RILs được phát triển từ một hạt F_2 duy nhất: từ mỗi cây F_2 một hạt giống duy nhất được trồng thành cây F_3 , từ đó một hạt giống duy nhất trồng thành cây F_4 ... Các quần thể RILs được sử dụng để lập bản đồ QTL rất hiệu quả bởi ảnh hưởng của môi trường đến đặc điểm định lượng có thể giảm đi nhiều bằng cách đánh giá một số cây có cùng kiểu gen thay vì chỉ một cây duy nhất. Hơn nữa, việc

* Tác giả liên hệ: Email: ngangiang.khong2010@gmail.com

Selection of F_2 homozygous plants over the *QTL9* related to rice panicle structure by using CAPS markers

Thi Mai Pham¹, Thi Nhu Le¹, Stefan Jouannic²,
Ngan Giang Khong^{1*}

¹National Key Laboratory of Plant Cell Biotechnology,
Agricultural Genetics Institute, Vietnam Academy of Agricultural Sciences

²University of Montpellier, UMR DIADE, IRD, Montpellier, France

Received 28 September 2020; accepted 19 November 2020

Abstract:

QTL9 is a new potential quantitative trait locus related to rice panicle structure, identified through a GWAS analysis of Vietnamese local rice panel. To validate the *QTL9*, a biparental population was developed using the low branching (G6) and the high branching (G189) accessions from two haplotypes characterised by a contrasting phenotype for the secondary branch number and spikelet number traits. In parallel, using Gene capture technology combined with new generation sequencing identified 1,002 genetic variants in the *QTL9* region between two parents, of which 12 SNPs were found in the cleavage site of 5 restriction enzyme. In this study, 12 primer pairs were tested to amplify the CAPS markers, based on the 12 SNPs, in order to be applied to select homozygous F_2 lines over the *QTL9* region for both haplotypes. 4 CAPS markers were selected distributing over the *QTL9* region and displaying polymorphism between two parents. 275 F_2 plants were genotyped using 3 CAPS markers leading to the selection of 74 homozygotes plants over the *QTL9* region for haplotype 1, 66 homozygotes plants over the *QTL9* region for haplotype 2, and 153 heterozygous plants. Homozygous lines will be used to develop the F_3 population, phenotyping of two F_3 haplotypes will lead to discovering the role of *QTL9* related to rice panicle structure.

Keywords: CAPS maker, F_2 population, homozygote, QTL, rice panicle structure, yield.

Classification number: 4.6

ứng dụng các chi thị phân tử cho phép chọn lọc các dòng đồng hợp từ ngay ở thế hệ F_2 , rút ngắn thời gian thu được quần thể RILs đồng hợp từ xuống còn 3 thế hệ thay vì 8. Quần thể RILs có nguồn gốc từ cặp lai chéo giữa 2 giống *Indica* Minghui 63 và Zhenshan 97 đã được sử dụng rộng rãi để lập bản đồ QTL cấu trúc bông [16-18]. Các QTL liên quan đến hình dạng hạt (*GS3*), số hạt/bông, ngày ra hoa và chiều cao cây (*Ghd7*) đã được phân lập thành công [1, 19].

Các quần thể lập bản đồ có thể được đánh giá kiểu gen với bất kỳ chi thị phân tử nào, như SSR, CAPS, hoặc các chi thị được xây dựng từ các dữ liệu giải trình tự như: SNPs, INDELs (Inserts/Deletions) [15]. Cùng với sự phát triển của các thế hệ giải trình tự mới, hàng triệu SNPs đã được tìm thấy ở hàng trăm giống lúa khác nhau trên thế giới, tạo điều kiện cho việc phát triển chi thị phân tử CAPS, được ứng dụng rộng rãi không chỉ trong nghiên cứu lập bản đồ QTL mà còn hỗ trợ công tác chọn tạo giống [20-23]. Nguyên tắc của chi thị này là dựa vào sự đa hình của SNPs trong vùng trình tự cắt của enzyme giới hạn. Ở những cá thể xảy ra đột biến trong vị trí cắt của enzyme giới hạn (thường là SNPs) thì enzyme sẽ không nhận ra để cắt. Từ đó, mỗi được thiết kế để nhận đoạn DNA chứa vị trí cắt của enzyme giới hạn. Sản phẩm PCR sau đó được cắt bởi enzyme giới hạn sẽ cho các đoạn DNA có chiều dài khác nhau giữa giống có đột biến trong vị trí cắt của enzyme giới hạn (chỉ có 1 đoạn DNA dài vì enzyme không cắt sản phẩm PCR) và giống không có đột biến (sản phẩm PCR được cắt thành 2 mảnh DNA ngắn hơn). Đa hình của sản phẩm cắt bằng enzyme giới hạn dễ dàng quan sát được trên gel agarose. Tính di truyền đồng trội của CAPS là một trong những đặc tính quan trọng nhất của loại chi thị này dẫn đến cả cá thể đồng hợp tử và dị hợp tử có thể dễ dàng phân biệt được.

Trong các nghiên cứu trước đây của chúng tôi nhằm nghiên cứu chức năng của *QTL9* liên quan đến cấu trúc bông [24], các quần thể lai tái tổ hợp đã được phát triển bằng cách lai 2 giống bố mẹ G6 và G189 thuộc 2 haplotype đối lập về cấu trúc bông (bông to và nhỏ) [25]. Bên cạnh đó, 12 SNPs nằm trong vùng cắt của 5 enzyme giới hạn (*SacI*, *DraI*, *EcoRV*, *BamHI*, *Sall*) thuộc vùng *QTL9* đã được xác định thông qua ứng dụng công nghệ chụp gen kết hợp với giải trình tự thế hệ mới [26]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi phát triển, thử nghiệm chi thị phân tử CAPS nhằm phân tích sự phân ly kiểu gen của *QTL9* trong quần thể F_2 , góp phần tạo cơ sở để làm sáng tỏ vai trò của *QTL9* liên quan đến cấu trúc bông lúa.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu nghiên cứu

275 cây F_2 tự thụ được phát triển từ quần thể F_1 của cặp lai G6 x G189 [25], trong đó G6 (bông nhỏ, haplotype 1) là cây mẹ và G189 (bông to, haplotype 2) là cây bố.

12 chi thị CAPS được giới thiệu trong bảng 1 và 5 enzyme cắt giới hạn được giới thiệu trong bảng 2 [26].

Bảng 1. Danh sách 12 chỉ thị phân tử CAPS và trình tự mỗi.

Ký hiệu CAPS	Vị trí SNP	Tên Locus	Đặc điểm vị trí	Trình tự mỗi
CAPS #1	16748183	LOC_Os02g28334	UTR_3'	F- CTCCAGCATCTCACCTCTC R- CTCCACCATGAATAACCTGCA
CAPS #2	16805351	LOC_Os02g28410	Promoter	F- GTTACTCCATCCGTCACAAA R- GAATGCTCTCGTCGGATGAT
CAPS #3	16882053	LOC_Os02g28530	Intron	F- TGGTTTGGGTTACTCGGAAG R- TTACCTGGAGTGAAGGTCC
CAPS #4	16919772		Intragenic	F- TTGTTCTGTGATTCGACGG R- CGTGCGAACCACGAAG
CAPS #5	16961918	LOC_Os02g28670	Promoter	F- GGCAGCATCAGCAAGCATAC R- GGATTAGCTCCCTACCACGC
CAPS #6	17035526	LOC_Os02g28810	Promoter	F- CTGAATCCGTCAGCAAGGT R- TCGGAGAGGAACGAACGAA
CAPS #7	17039753	LOC_Os02g28820	Promoter	F- TGGTGATTACGGCGTTTGGT R- TTCGCGAATACGTCACACTA
CAPS #8	17124682	LOC_Os02g28910	Promoter	F- CACGCGATTTAGCATGACGG R- TTCCCGTACTCTCGTCACCT
CAPS #9	17161487	LOC_Os02g28980	UTR_3'	F- TGAGAAGCGAAACGACCTT R- GCTTCTCTGCTGCGGTAA
CAPS #10	17205540	LOC_Os02g29040	Intron	F- GTCTGCGCCACATTTAGT R- GCCTTCTCTCACCTTGAC
CAPS #11	17254246	LOC_Os02g29130	Intron	F- TGGATTGCATGGTTTACTG R- ATGCATTGAGAGGACCTTG
CAPS #12	17271258	LOC_Os02g29150	UTR_3'	F- TGGTGGATTAATGCTGTGGA R- GCCACATTAGATGTGTA

Bảng 2. Danh sách 5 enzym giới hạn sử dụng để cắt chỉ thị phân tử CAPS.

Enzym	Chỉ thị phân tử CAPS	SNP (H1/H2)	Trình tự vị trí cắt của enzym giới hạn		Kích thước sản phẩm cắt bằng enzym giới hạn	
			G6 (H1)	G189 (H2)	G6 (H1)	G189 (H2)
SacI	CAPS#1	G/A	GAGCTC	AAGCTC	134 & 223	357
	CAPS#2	T/G	TTTAAA	TTGAAA	346 & 531	877
	CAPS#3	A/T	TTA AAA	TTTAAA	689	473 & 216
	CAPS#4	T/TA	TTTAAA	TTA AAA	601 & 251	852
DraI	CAPS#8	TA/T	TTTAAA	TTT TAA	273 & 779	1052
	CAPS#9	TA/T	TTTAAA	TTT TTA	1027 & 683	1710
	CAPS#11	T/A	TTTAAA	TTTAA T	226 & 333 & 339	559 & 339
EcoRV	CAPS#5	A/T	GATATC	G TATC	643 & 394	1037
	CAPS#7	T/C	GATATC	GATAC C	1321 & 127	1358
SaI	CAPS#10	A/T	GTCGAC	GTCGTC	886 & 1023	1909
BamHI	CAPS#6	G/A	GAATCC	GGATCC	577	304 & 273
	CAPS#12	G/C	GGATGC	GGATCC	1103	1041 & 62

Chữ gạch chân: điểm đột biến trong vị trí cắt của enzym giới hạn.

Phương pháp nghiên cứu

Thiết kế mỗi: các mỗi thiết kế dựa trên trình tự của giống Nipponbarre trên trang MSU Rice Genome Annotation (Osa1) Release 7 (<http://rice.plantbiology.msu.edu>), sử dụng phần mềm Primer3 plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>).

Tách chiết DNA: DNA tổng số được tách chiết từ lá lúa

20-25 ngày tuổi theo phương pháp CTAB của Doyle (1991) [27] có cải tiến.

Phản ứng PCR với cặp mỗi CAPS: phản ứng PCR được thực hiện trong 10 µl, gồm 20 ng DNA, 0,2 µl dNTPs 10X (#R0182, Fermentas), 0,5 µl mỗi CAPS xuôi và ngược, 0,8 µl MgCl₂, 2 µl GoTaq Buffer 10X (#R0971, Fermentas), 0,05 µl GoTaq DNA polymerase 5 u/µl (#EP0702, Fermentas) và 5,2 µl nước Milli Q khử trùng. Chu trình nhiệt: 95°C trong 2 phút, 35 chu kỳ, 95°C - 30 giây, 57°C - 30 giây (nhiệt độ gắn mỗi), 72°C - 1 phút và giữ 7 phút ở 72°C. Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 2,5%, rồi được soi trong buồng UV (Uvltect, Cambridge), phần mềm Fire Reader. Các thí nghiệm điện di sử dụng thang chuẩn DNA Low Gene Ruler 100 bp (#SM1163, Fermentas).

Cắt sản phẩm PCR bằng enzym giới hạn: các phản ứng cắt sản phẩm PCR bằng enzym giới hạn được thực hiện với các kit của Hãng Thermo Fisher Scientific, mỗi phản ứng được thực hiện trong thể tích 20 µl bao gồm DNA, enzym giới hạn và dung môi. Hỗn hợp phản ứng được ủ ở 37°C qua đêm, sau đó được kiểm tra bằng cách điện di trên gel agarose 2%.

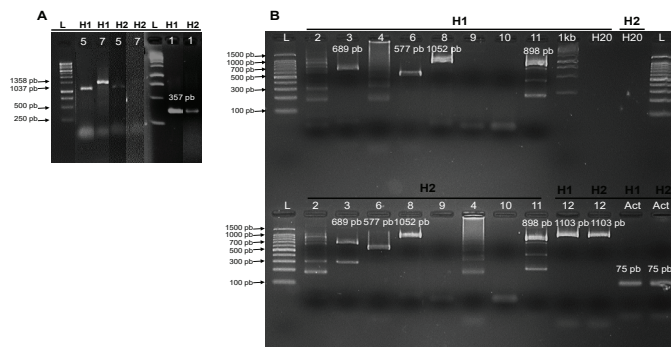
Kết quả và thảo luận

Khảo sát sự đa hình của chỉ thị CAPS ở hai giống bố mẹ

Trước khi sử dụng mỗi CAPS để chọn lọc các dòng đồng hợp tử mang *QTL9* trong quần thể F₂, các mỗi cần được kiểm tra độ đặc hiệu và sau đó là sự đa hình ở hai giống bố mẹ (2 haplotype) bằng phản ứng PCR và cắt enzym giới hạn.

Kiểm tra độ đặc hiệu của mỗi CAPS

Kết quả điện di sản phẩm phản ứng PCR với 12 mỗi CAPS ở 2 giống mẹ và bố (H1 và H2) thu được 6 cặp mỗi CAPS cho kết quả đặc hiệu chỉ một băng DNA duy nhất, đúng với kích thước mong đợi ở cả 2 giống bố mẹ: CAPS#1 (357 bp), CAPS#5 (1.037 bp), CAPS#7 (1.358 bp), CAPS#8 (1.052 bp) (hình 1A), CAPS#6 (577 bp), CAPS#12 (1.103 bp) (hình 1B). Kết quả PCR với mỗi CAPS#2 không đặc hiệu, xuất hiện nhiều băng DNA với kích thước khác nhau nhưng không có băng nào đúng với kích thước mong đợi (877 bp) ở cả 2 giống bố mẹ (hình 1B). Mỗi CAPS#3 đặc hiệu ở giống mẹ (H1), thu được một băng duy nhất đúng kích thước mong đợi (689 bp), tuy nhiên ở giống bố (H2), ngoài băng đúng kích thước mong đợi còn xuất hiện một băng không đặc hiệu, có kích thước nhỏ hơn (khoảng gần 300 pb, hình 1B). Mỗi CAPS#4 cho hai băng có kích thước khoảng 200 và 300 bp, không đúng với kích thước mong đợi (852 bp). Phản ứng PCR với mỗi CAPS#9 và CAPS#10 không thu được băng nào ở cả 2 giống bố mẹ (hình 1B). Mỗi CAPS#11 không đặc hiệu, xuất hiện nhiều băng DNA với kích thước khác nhau nhưng trong đó có băng đúng với kích thước mong đợi (898 bp) đậm và rõ nét nhất, kết quả giống nhau ở cả hai giống bố mẹ (hình 1B).



Hình 1. Hình ảnh điện di phản ứng PCR với 12 mồi CAPS ở 2 giống mẹ G6 và bố G189. A: 1: CAPS#1; 5: CAPS#5; 7: CAPS#7; L: promega 1 kb ladder; B: 2: CAPS#2; 3: CAPS#3; 4: CAPS#4; 6: CAPS#6; 8: CAPS#8; 9: CAPS#9; 10: CAPS#10; 11: CAPS#11; 12: CAPS#12; L: promega 100 pb DNA ladder, Act: actin.

Như vậy, kết quả PCR với 12 mồi CAPS thu được 8 mồi CAPS có băng đúng với kích thước mong đợi ở cả 2 giống bố mẹ bao gồm: CAPS#1, CAPS#3, CAPS#5, CAPS#6, CAPS#7, CAPS#8, CAPS#11, CAPS#12. 4 cặp mồi CAPS#2, CAPS#4, CAPS#9, CAPS#10 không đặc hiệu hoặc không hoạt động.

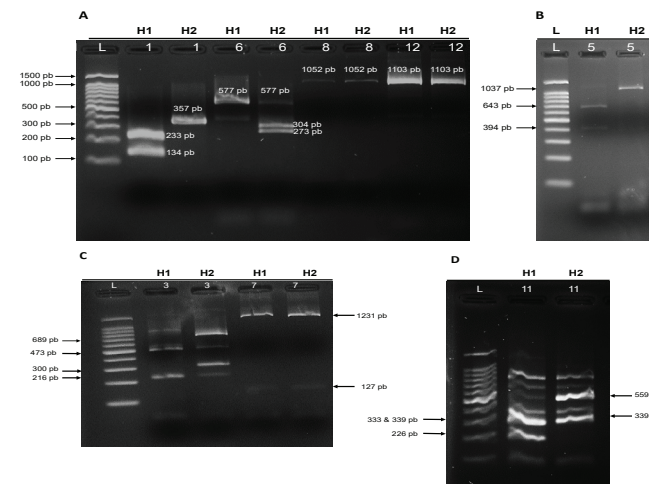
Khảo sát sự đa hình của mồi CAPS ở 2 giống bố mẹ bằng cắt enzym giới hạn

Sản phẩm phản ứng PCR của 8 cặp mồi CAPS#1, CAPS#3, CAPS#5, CAPS#6, CAPS#7, CAPS#8, CAPS#11, CAPS#12 tiếp tục được xử lý cắt bằng các enzym giới hạn tương ứng (bảng 1) để kiểm tra sự đa hình giữa hai giống bố mẹ. Phân tích hình ảnh điện di sản phẩm cắt enzym giới hạn cho thấy, có 4 chỉ thị CAPS cho sự đa hình có thể phân biệt rõ ràng giữa 2 giống bố mẹ là CAPS#1, CAPS#5, CAPS#6 và CAPS#11. CAPS#1 được cắt bằng enzym giới hạn *SacI*, vị trí cắt của *SacI* trong giống mẹ không có đột biến nên sản phẩm PCR bị cắt thành 2 mảnh đúng với kích thước mong đợi (134 và 233 bp), ngược lại, đột biến xảy ra trong vị trí cắt của *SacI* trong giống bố nên sản phẩm PCR không bị cắt (357 bp) (hình 2A). CAPS#5 được cắt bằng enzym giới hạn *EcoRV*, ở giống mẹ quan sát thấy 2 băng DNA đúng với kích thước mong đợi (394 và 643 bp), trong khi ở giống bố xảy ra đột biến trong vị trí cắt của *EcoRV* nên sản phẩm PCR không bị cắt, do đó chỉ có 1 băng DNA duy nhất (1.037 bp) (hình 2B). Hình ảnh điện di sản phẩm cắt của CAPS#6 bằng enzym giới hạn *BamHI* thu được 2 băng DNA đúng với kích thước mong đợi (304 và 273 bp) ở giống bố, trong khi ở giống mẹ H1 (577 bp) không bị cắt (hình 2A). CAPS#11 chứa 2 vị trí cắt của enzym *DraI*, trong đó ở giống mẹ không có đột biến nào nên sản phẩm PCR của giống mẹ bị cắt thành 3 mảnh có kích thước là 226, 333 và 339 pb. Tuy nhiên, vì độ dài của 2 băng sau chỉ sai khác có 6 pb nên trên hình ảnh điện di chỉ quan sát thấy 2 băng DNA. Một vị trí cắt của *DraI* trong giống bố xảy ra đột biến nên sản phẩm PCR được cắt thành 2 băng có kích thước là 559 và 339 bp (hình 2D). Đối với CAPS#3 và CAPS#7, enzym cắt cả 2 giống mặc dù dự đoán có đột biến xảy ra ở giống bố (hình 2C). Ngược lại, CAPS#8 và CAPS#12 lại không bị cắt bởi enzym giới hạn, chỉ có 1 băng DNA duy nhất cùng kích thước 1.052 và 1.103 bp ở cả 2 giống bố mẹ (hình 2A).

Kết quả cắt bằng enzym giới hạn của 8 chỉ thị CAPS cho thấy,

có 4 chỉ thị CAPS cho sự đa hình giữa 2 giống bố mẹ và bao phủ vùng *QTL9* là CAPS#1 (cắt bằng *SacI*), CAPS#5 (cắt bằng *EcoRV*), CAPS#6 (cắt bằng *BamHI*) và CAPS#11 (cắt bằng *DraI*). Các chỉ thị này có thể được sử dụng để xác định các cây F_2 mang *QTL9* đồng hợp tử (hình 2).

Trong số 4 chỉ thị CAPS#1, CAPS#5, CAPS#6 và CAPS#11 cho sự đa hình giữa giống bố mẹ thì vị trí của chỉ thị CAPS#5, CAPS#6 gần nhau (16961918 và 17035526) và đều nằm ở giữa vùng *QTL9*, trong khi chỉ thị CAPS#1 (16748183) và CAPS#11 (17254246) nằm ở 2 đầu của *QTL9*.

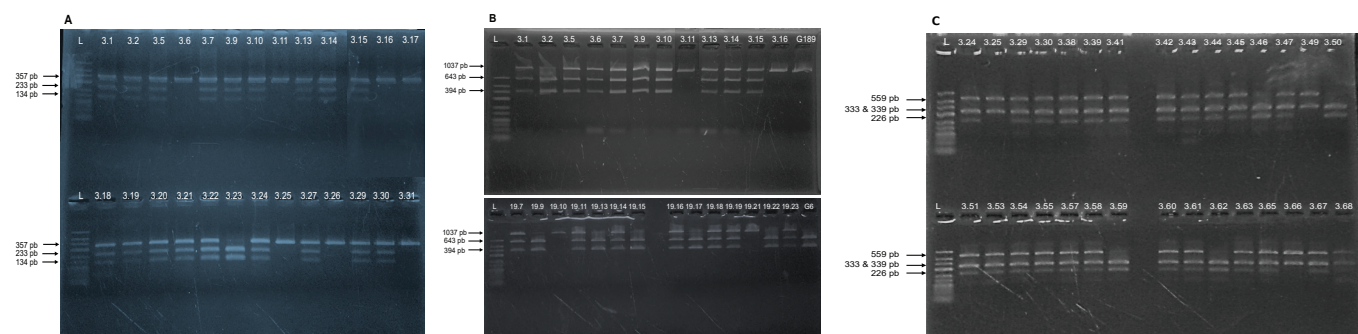


Hình 2. Hình ảnh điện di sản phẩm cắt bằng enzym giới hạn ở 2 giống mẹ G6 và bố G189. A: kết quả cắt enzym giới hạn của sản phẩm PCR với mồi CAPS#1, CAPS#6, CAPS#8 và CAPS#12; B: kết quả cắt enzym giới hạn của sản phẩm PCR với mồi CAPS#5; C: kết quả cắt enzym giới hạn của sản phẩm PCR với mồi CAPS#3, CAPS#7; D: kết quả cắt enzym giới hạn của sản phẩm PCR với mồi CAPS#11 (ghi chú các giống: 1-CAPS#1, 3-CAPS#3, 5-CAPS#5, 6-CAPS#6, 7-CAPS#7, 8-CAPS#8, 11-CAPS#11, 12-CAPS#12; L: thang chuẩn DNA promega 1 kb ladder).

Chọn lọc các dòng F_2 mang *QTL9* đồng hợp tử bằng chỉ thị phân tử CAPS

Trong 4 chỉ thị phân tử CAPS (CAPS#1, CAPS#5, CAPS#6, CAPS#11) cho sự đa hình giữa 2 giống bố mẹ và bao phủ vùng *QTL9*, CAPS#5 và CAPS#6 có vị trí gần nhau nên chỉ sử dụng 3 chỉ thị CAPS (CAPS#1, CAPS#5 và CAPS#11) để chọn lọc các cây F_2 đồng hợp tử.

DNA của 275 cây F_2 được tách chiết, chạy phản ứng PCR lần lượt với 3 cặp mồi của CAPS#1, CAPS#5 và CAPS#11, sau đó cắt bằng enzym giới hạn tương ứng (*SacI*, *EcoRV* và *DraI*). Kết quả hình ảnh điện di của CAPS#1 cho thấy, có 3 kiểu gen trong quần thể F_2 , các cá thể cho 2 băng DNA kích thước 134 và 233 bp là những cây đồng hợp tử mang *QTL9* của mẹ, những cây chỉ có băng DNA duy nhất với kích thước 357 bp là cây đồng hợp tử mang *QTL9* của bố, còn lại cây có cả 3 băng DNA là cây dị hợp tử (hình 3A). Kết quả trong tổng số 275 cây F_2 có 74 cây đồng hợp tử kiểu gen *QTL9* của mẹ (G6), 66 cây đồng hợp tử kiểu gen *QTL9* của bố (G189) và 135 cây dị hợp tử mang cả 2 kiểu gen *QTL9* của bố và mẹ. Tương tự, khi phân tích quần thể F_2 với CAPS#5 và CAPS#11 cũng thu được kết quả hoàn toàn trùng lặp với CAPS#1 (hình 3B, C).



Hình 3. Hình ảnh điện di sản phẩm cắt enzyme giới hạn của một số cây F₂ với các chỉ thị phân tử CAPS. A: kết quả phân tích cây F₂ với chỉ thị CAPS#1; các cây đồng hợp từ: 3.11, 3.23, 3.25, 3.26, 3.31; B: kết quả phân tích cây F₂ với chỉ thị CAPS#5; các cây đồng hợp từ: 3.11, 3.16, 3.17, 19.10, 19.13, 19.15, 19.17, 19.21, 19.22; C: kết quả phân tích cây F₂ với chỉ thị CAPS#11; các cây đồng hợp từ: 3.25, 3.46, 3.50, 3.59, 3.62.

Kết luận

Sự phân ly kiểu gen của *QTL9* trong quần thể F₂ đã được đánh giá thành công nhờ sử dụng 3 chỉ thị phân tử CAPS.

Phân tích 275 cá thể F₂ với 3 chỉ thị phân tử CAPS#1 CAPS#5 và CAPS#11 thu được 74 cây F₂ đồng hợp từ mang kiểu gen *QTL9* của mẹ (G6), 66 cây F₂ đồng hợp từ mang kiểu gen *QTL9* của bố (G189), chiếm tỷ lệ 50,9%. Các cây F₂ đồng hợp từ sẽ được phát triển tạo quần thể F₃, phân tích kiểu hình cấu trúc bông của quần thể F₃ so sánh với 2 giống bố mẹ để làm sáng tỏ được vai trò của *QTL9* liên quan đến cấu trúc bông và năng suất lúa.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] W. Xue, et al. (2008), "Natural variation in Ghd7 is an important regulator of heading date and yield potential in rice", *Nature Genetics*, **40**, pp.761-767.
- [2] W.H. Yan, et al. (2011), "A Major QTL, Ghd8, plays pleiotropic roles in regulating grain productivity, plant height, and heading date in rice", *Molecular Plant*, **4**, pp.319-330.
- [3] W. Yan, et al. (2013), "Natural variation in Ghd7.1 plays an important role in grain yield and adaptation in rice", *Cell Research*, **23**, pp.969-971.
- [4] K. Komatsu, et al. (2003), "LAX and SPA: major regulators of shoot branching in rice", *PNAS*, **100**, pp.11765-11770.
- [5] X. Huang, et al. (2009), "Natural variation at the DEP1 locus enhances grain yield in rice", *Nature Genetics*, **41**, pp.494-497.
- [6] M. Ashikari, et al. (2005), "Cytokinin oxidase regulates rice grain production", *Science*, **309**, pp.741-745.
- [7] X. Zha, et al. (2009), "Over-expression of the rice LRK1 gene improves quantitative yield components", *Plant Biotechnology Journal*, **7**, pp.611-620.
- [8] H. Tabuchi, et al. (2011), "LAX PANICLE2 of rice encodes a novel nuclear protein and regulates the formation of axillary meristems", *The Plant Cell*, **23**, pp.3276-3287.
- [9] A. Yoshida, et al. (2012), "TAWAWA1, a regulator of rice inflorescence architecture, functions through the suppression of meristem phase transition", *PNAS*, **110**, pp.767-772.
- [10] J. Yonemaru, et al. (2014), "Genomic regions involved in yield potential detected by genome-wide association analysis in Japanese high-yielding rice cultivars", *BMC Genomics*, **346**, 12p.
- [11] W. Yang, et al. (2015), "Genome-wide association study of rice (*Oryza sativa* L.) leaf traits with a high-throughput leaf scorer", *Journal of Experimental Botany*, **66**, pp.5605-5615.
- [12] K. Zhao, et al. (2011), "Genome-wide association mapping reveals a rich genetic architecture of complex traits in *Oryza sativa*", *Nature Communications*, **2**, p.467.
- [13] S. Crowell, et al. (2016), "Genome-wide association and high-resolution phenotyping link *Oryza sativa* panicle traits to numerous trait-specific QTL clusters", *Nature Communications*, **7**, DOI: 10.1038/ncomms10527.
- [14] X. Bai, et al. (2016), "Genome-wide association analysis reveals different genetic control in panicle architecture between and rice", *The Plant Genome*, **9**, DOI: 10.3835/plantgenome2015.11.0115.
- [15] C. Alonso Blanco, et al. (1998), "Analysis of natural allelic variation at flowering time loci in the landsberg erecta and cape verde islands ecotypes of *Arabidopsis thaliana*", *Genetics*, **149**, pp.749-764.
- [16] S.B. Yu, et al. (1997), "Importance of epistasis as the genetic basis of heterosis in an elite rice hybrid", *PNAS*, **94**, pp.9226-9231.
- [17] Y.F. Tan, et al. (2000), "Genetic bases of appearance quality of rice grains in Shanyou 63, an elite rice hybrid", *Theoretical and Applied Genetics*, **101**, pp.823-829.
- [18] Y. Xing, et al. (2002), "Characterization of the main effects, epistatic effects and their environmental interactions of QTLs on the genetic basis of yield traits in rice", *Theoretical and Applied Genetics*, **105**, pp.248-257.
- [19] C. Fan, et al. (2006), "GS3, a major QTL for grain length and weight and minor QTL for grain width and thickness in rice, encodes a putative transmembrane protein", *Theoretical and Applied Genetics*, **112**, pp.1164-1171.
- [20] A. Cheng, et al. (2012), "Simple and rapid molecular techniques for identification of amylose levels in rice varieties", *International Journal of Molecular Sciences*, **13**, pp.6156-6166.
- [21] R. Yang, et al. (2012), "A putative gene sbe3-rs for resistant starch mutated from SBE3 for starch branching enzyme in rice (*Oryza sativa* L.)", *PLOS ONE*, **7**, DOI: 10.1371/journal.pone.0043026.
- [22] Y.Y. Tan, et al. (2013), "Functional molecular markers and high-resolution melting curve analysis of low phytic acid mutations for marker-assisted selection in rice", *Molecular Breeding*, **31**, pp.517-528.
- [23] S.H. Lim, S.H. Ha (2013), "Marker development for the identification of rice seed color", *Plant Biotechnology Reports*, **7**, pp.391-398.
- [24] Kim Nhung Ta, Ngan Giang Khong, Thi Loan Ha, Dieu Thu Nguyen, Duc Chung Mai, Thi Giang Hoang, Thi Phuong Nhung Phung, Isabelle Bourrie, Brigitte Courtois, Thi Thu Hoai Tran, Bach Yen Dinh, Tuan Nghia La, Nang Vinh Do, Michel Lebrun, Pascal Gantet, Stefan Jouanic (2018), "A genome-wide association study using a Vietnamese landrace panel of rice (*Oryza sativa*) reveals new QTLs controlling panicle morphological traits", *BMC Plant Biology*, **18**, p.282.
- [25] Vũ Thị Nhiên, Tạ Kim Nhung, Stefan Jouanic, Lê Hùng Linh, Phạm Xuân Hội, Trần Khánh Vân, Trần Vũ Hằng, Phạm Thị Mai, Lê Thị Như, Không Ngân Giang (2018), "Tạo quần thể lai F1 làm vật liệu khởi đầu để đánh giá vai trò của QTL9 liên quan đến các tính trạng năng suất của tập đoàn lúa bản địa Việt Nam", *Tạp chí Khoa học Công nghệ Nông nghiệp*, **11**, tr.15-21.
- [26] Stefan Jouanic, Phạm Thị Mai, Lê Thị Như, Phạm Xuân Hội, Không Ngân Giang (2020), "Ứng dụng công nghệ gene capture để xác định SNP trong vùng QTL9 liên quan đến cấu trúc bông lúa", *Hội nghị Công nghệ sinh học toàn quốc 2020*, tr.162-167.
- [27] J. Doyle (1991), *DNA Protocols for Plants (Molecular Techniques in Taxonomy)*, Springer.

Đặc điểm và sự phát sinh của phân họ gen *DREB* ở đậu tương [*Glycine max* (L.) Merrill]

Nguyễn Thị Ngọc Lan¹, Phutthakone Vaciaxa^{1,2}, Nguyễn Thành Chung¹, Nguyễn Hữu Quân¹,
Phạm Thị Thanh Nhân¹, Vũ Thị Thu Thủy¹, Chu Hoàng Mậu^{1*}

¹Khoa Sinh học, Trường Đại học Sư phạm Thái Nguyên

²Bộ môn Sinh học, Trường Cao đẳng Sư phạm Khang Khay, Xiêng Khoảng, Lào

Ngày nhận bài 18/9/2020; ngày chuyển phản biện 25/9/2020; ngày nhận phản biện 27/10/2020; ngày chấp nhận đăng 18/11/2020

Tóm tắt:

Nhân tố phiên mã DREB (Dehydration responsive element binding protein) liên kết với yếu tố tác động *cis* của vùng kích hoạt (promoter) có vai trò điều chỉnh sự hiện thị các gen phản ứng với stress phi sinh học của thực vật. Trong nghiên cứu này, 69 trình tự gen *DREB* của cây đậu tương từ cơ sở dữ liệu NCBI đã được xác định thuộc về 18 gen *GmDREB* (*Glycine max* DREB). Các gen *GmDREB* có từ 1 đến 8 bản copy, phân bố trên 17 nhiễm sắc thể (NST), trong đó *GmDREB3* có 8 copy, còn lại các gen *GmDREB* khác có 1-4 copy. Miền AP2 của protein DREB phổ biến là motif PTPEMAARAYDVAALALKGPSARLNFPEL, chứa 11 điểm liên kết với promoter của các gen chức năng, với 4 dạng và phổ biến là RGRRWKERRWT (có ở 13/18 protein DREB). Cây phát sinh dựa trên trình tự nucleotide của các gen *GmDREB* và trình tự amino acid của miền AP2 trong protein DREB thể hiện sự tiến hóa và mối quan hệ của phân họ DREB ở đậu tương. Kết quả nghiên cứu cung cấp thông tin toàn diện về phân họ gen *DREB*, làm cơ sở cho các phân tích thực nghiệm nhằm làm rõ hơn chức năng của một số thành viên trong phân họ gen này.

Từ khóa: điểm liên kết DNA, *Glycine max*, miền AP2, phân họ DREB, phân tích phát sinh.

Chỉ số phân loại: 4.6

Đặt vấn đề

Đậu tương [*Glycine max* (L.) Merrill] là cây trồng quan trọng không chỉ ở Việt Nam mà còn ở nhiều quốc gia trên thế giới. Hạt đậu tương là nguồn thức ăn giàu đạm cho con người và là nguyên liệu quan trọng sử dụng trong công nghiệp thực phẩm, đồng thời có tác dụng tốt trong cải tạo đất. Đậu tương được xem là cây trồng nhạy cảm với các yếu tố bất lợi từ ngoại cảnh và được xếp vào nhóm cây chống chịu kém.

Đặc tính chống chịu các yếu tố phi sinh học của cây đậu tương do nhiều gen quy định và sản phẩm của mỗi gen có thể liên quan trực tiếp đến khả năng chống chịu (gen chức năng) hoặc điều hòa nhóm gen chức năng (gen điều hòa). Một số gen của đậu tương có phản ứng với các stress phi sinh học như hạn, mặn, lạnh, nóng... ở mức phiên mã, trong đó có nhóm gen mã hóa nhân tố phiên mã DREB, một phân họ thuộc họ AP2/ERF (APETALA2/Ethylene-Responsive) của thực vật [1]. Các protein DREB chứa miền AP2 phổ biến có khoảng 58-59 amino acid và bao gồm một số amino acid liên quan đến yếu tố phản ứng khử nước DRE (dehydration responsive element) hoặc hộp GCC box [2, 3]. Trình tự *cis* và nhân tố *trans* giữ vai trò quan trọng trong sự biểu hiện gen đáp ứng các stress phi sinh học. Việc nghiên cứu nhân tố phiên mã DREB - yếu tố có tác động *trans* liên kết với trình tự *cis* để kích hoạt sự biểu hiện của các gen mục tiêu khi có tín hiệu stress ở thực vật sẽ mang lại ứng dụng hữu ích trong việc cải thiện tính kháng của thực vật thông qua kỹ thuật chuyển gen [4].

Đến nay, người ta đã xác định một số gen *GmDREB* (*Glycine*

max DREB) như *GmDREB1*, *GmDREB2*, *GmDREB3*, *GmDREB5* [5] có trong hệ gen đậu tương, các sản phẩm dịch mã của chúng có chức năng chịu hạn và chịu mặn [6-8]. Vấn đề đặt ra là trong hệ gen đậu tương có bao nhiêu thành viên của phân họ gen *DREB* và những gen *GmDREB* nào chưa được nghiên cứu làm rõ chức năng? Công tác nghiên cứu và minh chứng qua thực nghiệm nhằm phân tích dữ liệu gen *GmDREB* bằng công cụ tin sinh học là rất cần thiết để giải quyết vấn đề này. Dữ liệu gen và kết quả khai thác các gen *GmDREB* trên toàn bộ hệ gen đậu tương không những cung cấp cơ sở cho phân tích tiến hóa phân tử mà còn tạo cơ sở cho nghiên cứu tìm kiếm chức năng sinh học của một số gen *GmDREB* liên quan đến khả năng chống chịu các yếu tố bất lợi phi sinh học của cây đậu tương. Nghiên cứu này trình bày kết quả xác định và phân tích sự tiến hóa của các thành viên trong phân họ gen *DREB* ở đậu tương nhằm tạo cơ sở cho thực nghiệm chứng minh chức năng gen *GmDREB* và ứng dụng vào việc cải thiện tính chống chịu các stress phi sinh học.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu

Dữ liệu trình tự gen *GmDREB* và vùng AP2 của protein DREB được khai thác từ cơ sở dữ liệu NCBI [9], trong đó có các trình tự gen *GmDREB1*, *GmDREB2*, *GmDREB5*, *GmDREB6*, *GmDREB7* được phân lập từ các giống đậu tương Việt Nam [10-12].

Xác định các gen DREB trong hệ gen đậu tương

Các protein thành viên phân họ DREB chỉ chứa một miền AP2,

* Tác giả liên hệ: Email: chuhoangmau@tnu.edu.vn

Characteristics and phylogeny of *DREB* gene subfamily in soybeans [*Glycine max* (L.) Meril]

Thi Ngoc Lan Nguyen¹, Phutthakone Vaciaya^{1,2}, Thanh Chung Nguyen¹, Huu Quan Nguyen¹,
Thi Thanh Nhan Pham¹, Thi Thu Thuy Vu¹, Hoang Mau Chu^{1*}

¹Faculty of Biology, Thai Nguyen University of Education

²Department of Biology, Khangkhay Teacher Training College, Xiangkhoang, Laos

Received 18 September 2020; accepted 18 November 2020

Abstract:

Dehydration responsive element binding proteins (DREB) are transcription factors linked to *cis*-acting elements of the promoter region, which regulate plant gene expression in response to abiotic stress. In this study, 69 *DREB* gene sequences of soybean from NCBI belonging to 18 *GmDREB* (*Glycine max DREB*) genes of 1 to 8 copies distributed on 17 chromosomes were identified in which *GmDREB3* has 8 copies and the rest consisted of 1 to 4 ones. The motif PTPMAARAYDVAALALKGPSARLNFPEL containing 11 points associated with the promoter of functional genes existed in 4 main types with the most popular one RGRRWKERRWT found in 13/18 *DREB* proteins was regarded as the popular AP2 domain of *DREB* protein. The phylogenetic tree based on the nucleotide sequences of *GmDREB* genes and the amino acid sequences of the AP2 domain expresses the evolution and relationship of the *DREB* subfamily in soybean. This study provides comprehensive information about the *DREB* subfamily, which formed the basis for experimental analyses to clarify the function of some members of this subfamily.

Keywords: AP2 domain, DNA binding site, *DREB* subfamily, *Glycine max*, phylogenetic analysis.

Classification number: 4.6

do vậy xác định các thành viên của phân họ gen *DREB* trong hệ gen đậu tương được tra cứu trên cơ sở dữ liệu NCBI [9], kết hợp kiểm tra vùng AP2 của protein *DREB* trên cơ sở dữ liệu họ protein Pfam.

Phân tích phát sinh phân họ gen *DREB* ở đậu tương

Phân tích phát sinh chủng loại phân tử thực hiện bằng phần mềm MEGAX theo phương pháp Maximum Likelihood và mô hình Tamura-Nei với bootstrap được lặp lại 1.000 lần trong MEGAX [13, 14]. Các trình tự gen *DREB* đã xác định được phân tích bằng ClustalW và một cây phát sinh được thiết lập thể hiện sự tiến hóa của phân họ gen *DREB* ở đậu tương.

Phân tích phát sinh miền AP2 trong phân họ protein *DREB* ở đậu tương

Lịch sử tiến hóa của miền AP2 trong phân họ nhân tố phiên mã *DREB* ở đậu tương được suy luận theo phương pháp Maximum Likelihood và mô hình JTT matrix-based [15] với bootstrap được lặp lại 1.000 lần trong MEGAX [13]. Trình tự amino acid của miền AP2 được phân tích bằng ClustalW và sơ đồ cây được thiết lập dựa trên 69 trình tự amino acid của miền AP2 [13].

Kết quả và thảo luận

Xác định các gen trong phân họ gen *DREB* ở đậu tương

Kết quả khai thác cơ sở dữ liệu [9] giúp xác định được 41

gen *DREB* của đậu tương, phân tích mở rộng những bản copy gen *DREB* và trình tự gen *GmDREB*, chúng tôi đã phân lập và xác định được 69 trình tự gen *GmDREB* khác nhau từ một số giống đậu tương Việt nam (bảng 1).

Bảng 1. Dữ liệu trình tự gen *GmDREB* và protein thuộc phân họ *DREB* của đậu tương sử dụng trong phân tích (cập nhật ngày 9/5/2020).

TT	Gen/gen ID	Tên gen <i>DREB</i> của đậu tương	Vị trí trên NST	Mã số của gen trên GenBank	Mã số của protein trên GenBank
1	DREB/100499747	<i>GmDREB</i>	13	BT089389	ACU13469
2	DREB/100527471	<i>GmDREB</i>	13	BT092314	ACU16563
3	DREB/100499747	<i>GmDREB</i>	13	AY244760	AAP83131
4	DREB/100499747	<i>GmDREB</i>	13	NM_001248537	NP_001235466
5	<i>GmDREB*</i>	<i>GmDREB</i>	13	<i>GmDREB</i> , DT2008	<i>DREB</i> DT2008
6	AP2-2/100813069	<i>GmAP2-2</i>	4	NM_001252765	NP_001239694
7	AP2-Ile-DBDP/100819565	<i>GmAP2-Ile-DBDP</i>	16	NM_001280575	NP_001267504
8	DREB1/547622*	<i>GmDREB1</i>	9	HE647687; PB	CCF23018; PB
9	DREB1/547622	<i>GmDREB1</i>	9	FJ965342	ACR44232
10	DREB1/547622*	<i>GmDREB1</i>	9	FR822736; XBB	CBZ41764; XBB
11	DREB1/547622*	<i>GmDREB1</i>	9	HE647688; VNS	CCF23019; VNS
12	DREB1/547622*	<i>GmDREB1</i>	9	HE647689; YS	CCF23020; YS
13	DREB1/547622	<i>GmDREB1</i>	14	NM_001248850	NP_001235779
14	DREB1B/100813230	<i>GmDREB1B</i>	10	XM_003536997	XP_003537045
15	DREB1D/100778541	<i>GmDREB1D</i>	13	XM_006594135	XP_006594198
16	DREB1E/100789097	<i>GmDREB1E</i>	1	XM_003517407	XP_003517455
17	DREB1E/100797582	<i>GmDREB1E</i>	10	XM_003536435	XP_003536483
18	DREB1E/100779318	<i>GmDREB1E</i>	17	XM_003550832	XP_003550880

19	DREB1F/100810401	GmDREB1F	12	XM_003540738	XP_003540786
20	DREB1F/100795696	GmDREB1F	5	XM_003525492	XP_003525540
21	DREB1F/100793751	GmDREB1F	11	XM_003539131	XP_003539179
22	DREB1F/100815039	GmDREB1F	12	XM_003539412	XP_003539460
23	DREB1F/100803317	GmDREB1F	13	XM_003541928	XP_003541976
24	DREB2/732579	GmDREB2	6	DQ208968	ABB36645
25	DREB2/732579	GmDREB2	6	FJ965341	ACR44231
26	DREB2/732579*	GmDREB2	6	HG965097; CB	CDO19437_CB
27	DREB2/732579	GmDREB2	6	DQ054363	AAV89658
28	DREB2/732579*	GmDREB2	6	LK936508; DT51	CDU32446_DT51
29	DREB2/732579*	GmDREB2	6	LK936509; DT26	CDU32447_DT26
30	DREB2/732579*	GmDREB2	6	HG965098; DVN5	CDO19438_DVN5
31	DREB2/732579*	GmDREB2	6	HG965099; CBD	CDO19439_CBD
32	DREB2/732579*	GmDREB2	6	HG965100; BG	CDO19440_BG
33	DREB2/732579*	GmDREB2	6	HG965101; BS	CDO19441_BS
34	DREB2/100801528	GmDREB2	4	JF946769	AEQ61581
35	DREB2/100801528*	GmDREB2	4	LK936507; DT2008	CDU32445_DT2008
36	DREB2/100801528	GmDREB2	4	XM_026128165	XP_025983950
37	DREB2/732579	GmDREB2	6	NM_001250325	NP_001237254
38	DREB2A2/100800134	GmDREB2A2	14	NM_001254013	NP_001240942
39	AP2-8/100798277	GmDREB2C-like	2	NM_001253076	NP_001240005
40	DREB2C-like/100783729	GmDREB2C-like	6	XM_006580923	XP_006580986
41	DREB2D/10079005	GmDREB2D	4	XM_003523515	XP_003523563
42	DREB2D/100797850	GmDREB2D	6	XM_003527831	XP_003527879
43	DREB2F/100808363	GmDREB2F	2	XM_003518062	XP_003518110
44	DREB2F/100819966	GmDREB2F	3	XM_003520476	XP_003520524
45	DREB2F/100808719	GmDREB2F	10	XM_003525116	XP_003525164
46	DREB2F/100801311	GmDREB2F	19	XM_003553372	XP_003553420
47	DREB3/732559	GmDREB3	4	NM_001250024	NP_001236953
48	DREB3/732559	GmDREB3	4	DQ055133	AAZ03388
49	DREB3/732656	GmDREB3	17	NM_001251571	NP_001238500
50	DREB3(AP2-1)/100794316	GmDREB3-like	3	NM_001254427	NP_001241356
51	DREB3/100804801	GmDREB3	1	XM_003517021	XP_003517069
52	DREB3/100804056	GmDREB3	7	XM_003529711	XP_003529759
53	DREB3/100783790	GmDREB3	9	XM_003534380	XP_003534428
54	DREB3/100817503	GmDREB3	11	XM_003538700	XP_003538748
55	DREB3/100784419	GmDREB3	13	XM_003542042	XP_003542090
56	DREB3-like/100786075	GmDREB3-like	1	XM_003516413	XP_003516461
57	DREB5/100101898*	GmDREB5	12	HE648567; XBB	CCF23312_XBB
58	DREB5/100101898*	GmDREB5	12	HE648568; BGI	CCF23313_BGI
59	DREB5/100101898	GmDREB5	12	EF583447	ABO53928
60	DREB5/100809887*	GmDREB5	13	FR822737; XTD	CBZ41765_XTD
61	DREB5/100809887*	GmDREB5	13	HE598783; PB	CCD42020_PB
62	DREB5/100809887*	GmDREB5	13	HE647690; NS	CCF23021_NS
63	DREB5/100101898	GmDREB5	12	NM_001248171	NP_001235100
64	DREB6/100101914	GmDREB6	5	EF551166	ABQ42205
65	DREB6/100101914	GmDREB6	5	NM_001248412	NP_001235341
66	DREB6*	GmDREB6	5	GmDREB6; DT2008	DREB6_DT2008
67	DREB7/100101894	GmDREB7	20	NM_001248108	NP_001235037
68	DREBa/100788110	GmDREBa	12	NM_001358347	NP_001345276
69	DREBa/100788110	GmDREBa	12	AY542886	AAT12423

Ghi chú: *: gen *GmDREB* được phân lập từ các giống đậu tương Việt Nam của nhóm tác giả [10-12].

Kết quả bảng 1 cho thấy, 69 trình tự gen *DREB* ở đậu tương khai thác từ cơ sở dữ liệu NCBI thuộc về 18 gen *GmDREBi*, trong khi Phang và cs (2008) [5] cho rằng, có hơn 10 gen *DREB* trong hệ gen đậu tương. Các kết quả nghiên cứu chức năng gen *DREB* rất

có thể sẽ phát hiện thêm các gen *GmDREB* mới và các bản copy của chúng. Trong nghiên cứu này, các gen *GmDREB* có từ 1 đến 8 copy (bảng 2), phân bố trên 17 NST số 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 19 và 20. Gen *GmDREB3* có 8 copy phân bố trên các NST 1, 3, 4, 7, 9, 11, 13, 17, hai gen *GmDREB1F* và *GmDREB2F* có 4 copy, gen *GmDREB1E* có 3 copy, các gen còn lại có 1-2 copy. Nhân tố phiên mã *DREB* liên quan đến khả năng chống chịu các stress phi sinh học.

Bảng 2. Số bản copy và vị trí của mỗi gen *GmDREB* trong hệ gen cây đậu tương.

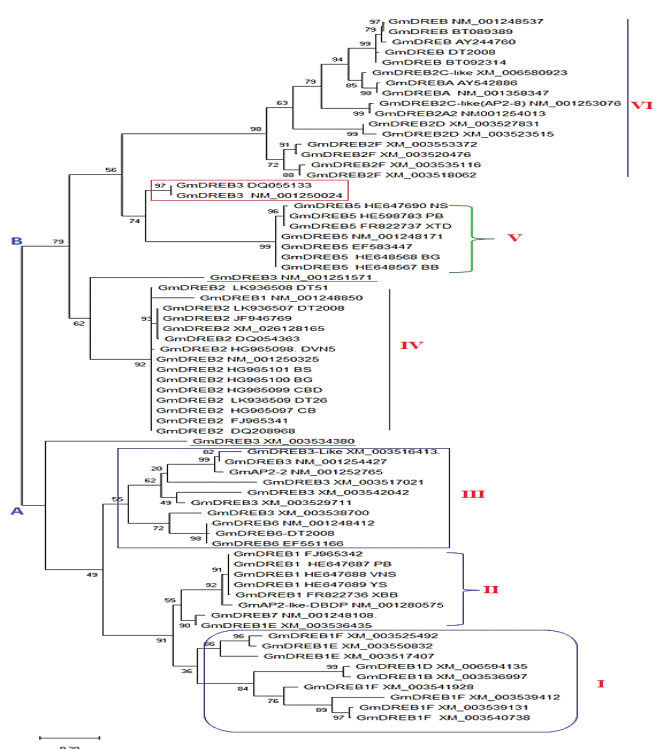
TT	Tên gen	Số bản copy	Vị trí trên NST số
1	<i>GmDREB</i>	1	13
2	<i>GmDREB1</i>	2	9, 10
3	<i>GmDREB1B</i>	1	10
4	<i>GmDREB1D</i>	1	13
5	<i>GmDREB1E</i>	3	1, 10, 17
6	<i>GmDREB1F</i>	4	5, 11, 12, 13
7	<i>GmDREB2</i>	2	4, 6
8	<i>GmDREB2A2</i>	1	14
9	<i>GmDREB2C-like</i>	2	2, 6
10	<i>GmDREB2D</i>	2	4; 6
11	<i>GmDREB2F</i>	4	2; 3; 10; 19
12	<i>GmDREB3</i>	8	1, 3, 4, 7, 9, 11, 13, 17
13	<i>GmDREB5</i>	2	12, 13
14	<i>GmDREB6</i>	1	5
15	<i>GmDREB7</i>	1	20
16	<i>GmDREBa</i>	1	12
17	<i>GmAP2-2</i>	1	4
18	<i>GmAP2-Ile-DBDP</i>	1	16

Trong số 18 gen *GmDREB* ở bảng 2, một số gen đã được làm rõ chức năng, như *GmDREB1*, *GmDREB2*, *GmDREB3*, *GmDREB6*. Trong đó, *GmDREB1* có chức năng chịu nóng, hạn và lạnh [16]; *GmDREB2* được xác nhận làm tăng khả năng chịu hạn, chịu mặn của cây chuyển gen [6, 7, 17]; *GmDREB3* làm tăng cường khả năng chịu lạnh, hạn và mặn ở cây *Arabidopsis* biến đổi gen [18]; *GmDREB5* liên quan đến khả năng chịu mặn [19]. Tăng cường biểu hiện gen *GmDREB6* đã làm tăng sự tích lũy proline và khả năng chịu muối của cây đậu tương biến đổi gen [8]. Tuy nhiên, còn một số thành viên trong phân họ gen *DREB* ở đậu tương chưa rõ chức năng về đặc tính chống chịu cụ thể đối với các stress phi sinh học cần tiếp tục làm sáng tỏ.

Sự phát sinh của các thành viên trong phân họ gen *GmDREB* ở đậu tương

Kết quả phân tích phát sinh gen thuộc phân họ *DREB* ở hình 1 cho thấy, 69 gen *GmDREB* được chia thành hai nhánh A, B với 6 nhóm được ký hiệu là I, II, III, IV, V, VI. Nhóm I gồm các gen *GmDREB1* (B, D, E, F), nhóm II gồm các gen *GmDREB1* và *GmDREB7*, nhóm III gồm các gen *GmDREB3* và *GmDREB6*, nhóm IV có các gen *GmDREB2* và *GmDREB1*, nhóm V gồm các gen *GmDREB5*, nhóm VI gồm các gen *GmDREB* và *GmDREB2*. Như vậy, có 4 nhóm chứa các cặp gen *GmDREB1-GmDREB7* (nhóm II), *GmDREB3-GmDREB6* (nhóm III), *GmDREB2-GmDREB1* (nhóm IV) và *GmDREB-GmDREB2* (nhóm VI). Điểm chú ý là

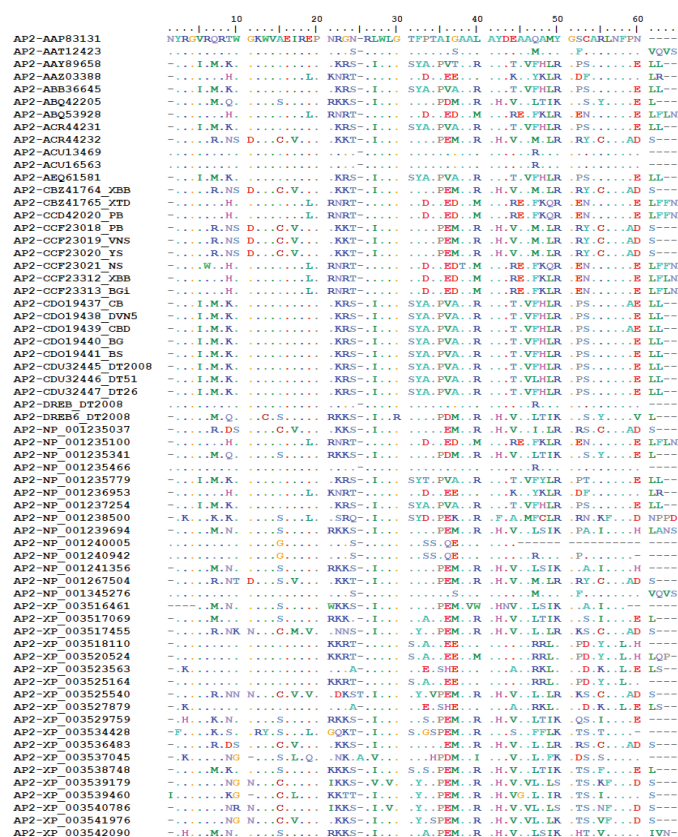
một số trình tự *GmDREB3* phân bố ở những nhánh riêng trong sơ đồ cây. Trình tự *GmDREB3* mang mã số XM_003534380 là một nhánh phụ của nhánh A, *GmDREB3* (NM_001251571) là một nhánh tách riêng khỏi nhóm IV, 2 gen *GmDREB3* (DQ055133 và NM_001250024) phân bố trong một nhánh, tách khỏi nhóm IV. Gen *GmDREB3* có 8 copy trên các NST khác nhau (bảng 2), trong đó gen *GmDREB3* (XM_003534380) có vị trí trên NST số 9, *GmDREB3* (NM_001251571) trên NST 17 và *GmDREB3* (DQ055133 và NM_001250024) trên NST số 4 (bảng 1). Trong quá trình tiến hóa, các NST khác nhau có tốc độ đột biến phân tử khác nhau, cho nên có thể các bản copy của gen *GmDREB3* đã dần tách xa nhau trong cây phát sinh của phân họ gen DREB ở đậu tương.



Hình 1. Cây phát sinh và quan hệ tiến hóa giữa các thành viên của phân họ gen *DREB* ở đậu tương được thiết lập dựa trên 69 trình tự gen *GmDREB* theo phương pháp Maximum Likelihood và JTT matrix-based model trong MEGAX [13].

Đặc điểm của miền AP2 trong phân họ DREB ở đậu tương

Hình 2 thể hiện sự khác nhau cơ bản về trình tự amino acid miền AP2 ở protein DREB suy diễn từ 18 gen *GmDREB* của đậu tương. Sự sai khác giữa các trình tự amino acid miền AP2 biểu hiện ở thành phần và số lượng amino acid. Miền AP2 trong các protein thuộc phân họ nhân tổ phiên mã DREB phổ biến từ 59 đến 60 amino acid, tuy nhiên một số protein DREB chứa miền AP2 có tới 62 amino acid (DREB5), 63 (DREBA), hoặc chỉ có 43 amino acid (DREB2C-like) (hình 2). Motif PTPEMAARAYDVAALALKGPSARLNFPEL của miền AP2 có ở tất cả các protein DREB của đậu tương. Miền AP2 của các thành viên trong phân họ protein DREB có các điểm liên kết với promoter của gen chức năng mà nhân tổ phiên mã DREB kích hoạt phiên mã. Kết quả so sánh ở bảng 3 cho thấy, trong miền



Hình 2. So sánh trình tự amino acid miền AP2 của các protein trong phân họ DREB ở đậu tương.

AP2 của 18 protein DREB ở đậu tương đều có 11 amino acid liên kết với sợi ADN ở vùng promoter (ADN binding site) với 4 dạng và phổ biến là RGRRWKERRWT, có mặt ở 13 trong tổng số 18 protein DREB. Hai dạng KGRRNKERRWT và KGRRWKERRWT xuất hiện ở 2 protein DREB, còn dạng RGRRTKERRWT chỉ có ở một loại protein DREB (bảng 3).

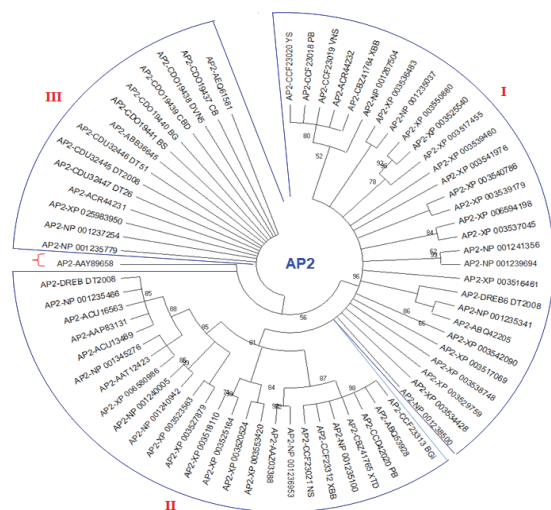
Bảng 3. So sánh các điểm liên kết trong miền AP2 với sợi DNA vùng promoter của 18 thành viên trong phân họ nhân tố phiên mã DREB ở dâu tằm.

TT	Tên gen	Các dạng amino acid liên kết với sợi ADN của promoter (DNA binding site)	TT	Tên gen	Các dạng amino acid liên kết với sợi ADN của promoter (DNA binding site)
1	<i>GmDREB</i>	RGRRWKERRWT	10	<i>GmDREb6</i>	RGRRWKERRWT
2	<i>GmDREb1</i>	RGRRWKERRWT	11	<i>GmDREba</i>	RGRRWKERRWT
3	<i>GmDREb1E</i>	RGRRWKERRWT	12	<i>GmAP2-2</i>	RGRRWKERRWT
4	<i>GmDREb1F</i>	RGRRWKERRWT	13	<i>GmDREb7</i>	RGRRWKERRWT
5	<i>GmDREb2</i>	RGRRWKERRWT	14	<i>GmAP2-1le</i>	RGRRTKERRWT
6	<i>GmDREb2A2</i>	RGRRWKERRWT	15	<i>GmDREb1B</i>	KGRRNKERRWT
7	<i>GmDREb2C</i>	RGRRWKERRWT	16	<i>GmDREb1D</i>	KGRRNKERRWT
8	<i>GmDREb3</i>	RGRRWKERRWT	17	<i>GmDREb2D</i>	RGRRWKERRWT
9	<i>GmDREb5</i>	RGRRWKERRWT	18	<i>GmDREb2F</i>	KGRRWKERRWT

Cây phát sinh miễn AP2 ở đầu tương

Phân tích tiến hóa protein DREB dựa trên trình tự amino acid của miền AP2 trong 69 protein DREB của đậu tương bằng phương

pháp Maximum Likelihood và mô hình JTT matrix-based [15] trong MEGAX [13]. Sơ đồ cây được thiết lập dựa trên 69 trình tự amino acid của miền AP2 theo tỷ lệ và chiều dài nhánh được đo bằng số lần thay thế trên mỗi vị trí amino acid. Tất cả các vị trí chứa khoảng trống và dữ liệu bị thiếu đã được loại bỏ. Bộ dữ liệu cuối cùng có tổng cộng 38 vị trí amino acid.



Hình 3. Cây phát sinh miền AP2 của phân họ protein DREB ở đậu tương được thiết lập dựa trên 69 trình tự amino acid miền AP2 theo phương pháp Maximum Likelihood trong MEGAX [13] và JTT matrix-based model [15] với bootstrap được lặp lại 1.000 lần.

Phân tích tiến hóa miền AP2 trong protein DREB của đậu tương thực hiện theo MEGAX [13], kết quả cho thấy, cây phát sinh thiết lập từ 69 trình tự amino acid của miền AP2 phân thành 4 nhánh, trong đó có 1 nhánh chỉ có một trình tự AP2 của protein DREB2 (AAY89658) và 3 nhánh còn lại, mỗi nhánh có một nhóm ký hiệu là I, II, III (hình 3). Nhóm I gồm 29 trình tự AP2 của các loại protein DREB1, DREB1B, DREB1D, DREB1E, DREB1F, DREB3, DREB6, AP2-2, AP2-Ile-DBDP; nhóm II gồm 25 trình tự AP2 của các loại protein DREB, DREBA, DREB2A2, DREB2C-like, DREB3, DREB5; nhóm III gồm 14 trình tự AP2 của các loại protein DREB2 (13 trình tự) và DREB1 (1 trình tự).

Kết luận

Khai thác dữ liệu từ NCBI đã xác định được 18 gen *GmDREB* thuộc phân họ *DREB* trong hệ gen đậu tương với các bản copy phân bố trên 17 NST, trong đó *GmDREB3* có 8 copy, các gen còn lại có 1-4 copy.

Miền AP2 phổ biến có 59-60 amino acid và motif PTPEMAARAYDVAALALKGPSARLNFP_{EL} có ở tất cả các protein DREB của đậu tương. AP2 chứa 11 điểm liên kết với promoter của các gen chức năng, với 4 dạng và phổ biến là RGRRWKERRWT (có ở 13/18 protein DREB).

Sự tiến hóa của phân họ DREB và miền AP2 ở đậu tương thể hiện trên cây phát sinh thiết lập dựa trên trình tự nucleotide của các gen *GmDREB* và trình tự amino acid của miền AP2 trong protein DREB.

Kết quả nghiên cứu đã cung cấp thông tin toàn diện về phân ho

gen *DREB*, tạo cơ sở cho các phân tích thực nghiệm tiếp theo để làm rõ chức năng của một số thành viên trong phân họ gen này.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ phát triển khoa học và công nghệ quốc gia (NAFOSTED) thông qua đề tài mã số 106.01-2018.27. Các tác giả xin chân thành cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Z.S. Xu, et al. (2011), "Functions and application of the AP2/ERF transcription factor family in crop improvement", *J. Integr. Plant Biol.*, **53**, pp.570-585.
- [2] D. Kizis, et al. (2001), "Role of AP2/EREBP transcription factors in gene regulation during abiotic stress", *FEBS Letters*, **498**, pp.187-189.
- [3] M. Tang, et al. (2007), "Isolation and functional characterization of the JcERF gene, a putative AP2/EREBP domain-containing transcription factor, in the woody oil plant *Jatropha curcas*", *Plant Mol. Bio.*, **63**, pp.419-428.
- [4] C. Lata, M. Prasad (2011), "Role of DREBs in regulation of abiotic stress responses in plants", *Journal of Experimental Botany*, **62**, pp.4731-4748.
- [5] T.H. Phang, et al. (2008), "Salt tolerance in soybean", *J. Integr. Plant Biol.*, **50**, pp.1196-1212.
- [6] Dao Xuan Tan, Ho Manh Tuong, Vu Thi Thu Thuy, Le Van Son, Chu Hoang Mau (2015), "Cloning and overexpression of *GmDREB2* gene from a Vietnamese drought-resistant Soybean variety", *Braz. Arch. Biol. Technol.*, **58**, pp.651-657.
- [7] Thi Thanh Nhan Pham, Huu Quan Nguyen, Thi Ngoc Lan Nguyen, Xuan Tan Dao, Danh Thuong Sy, Van Son Le, Hoang Mau Chu (2020), "Overexpression of the *GmDREB2* gene increases proline accumulation and tolerance to drought stress in soybean plants", *Australian Journal of Crop Science*, **14**, pp.495-503.
- [8] Huu Quan Nguyen, Thi Kim Lien Vu, Thi Ngoc Lan Nguyen, Thi Thanh Nhan Pham, Thi Hai Yen Nguyen, Van Son Le, Hoang Mau Chu (2019), "Overexpression of the *GmDREB6* gene enhances proline accumulation and salt tolerance in genetically modified soybean plants", *Scientific Reports*, **9**, DOI: 10.1038/s41598-019-55895-0.
- [9] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=Glycine+max+gene+for+dehydration-responsive+element-binding+protein> (updated on 9 May 2020).
- [10] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/?term=Soybean+gene+for+DREB2%2C+Chu+MH/> (updated on 9 May 2020).
- [11] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/?term=Glycine+max+gene+for+DREB1%2C+Chu+HM/> (updated on 9 May 2020).
- [12] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/?term=Soybean+gene+for+DREB5%2C+Chu+MH/> (updated on 9 May 2020).
- [13] S. Kumar, et al. (2018), "MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms", *Molecular Biology and Evolution*, **35**, pp.1547-1549.
- [14] K. Tamura, M. Nei (1993), "Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees", *Molecular Biology and Evolution*, **10**, pp.512-526.
- [15] D.T. Jones, et al. (1992), "The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences", *Computer Applications in the Biosciences*, **8**, pp.275-282.
- [16] S. Kidokoro, et al. (2015), "Soybean DREB1/CBF-type transcription factors function in heat and drought as well as cold stress-responsive gene expression", *Plant J.*, **81**, pp.505-518.
- [17] M. Chen, et al. (2007), "GmDREB2, a soybean DRE-binding transcription factor, conferred drought and high-salt tolerance in transgenic plants", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **353**, pp.299-305.
- [18] M. Chen, et al. (2009), "Cold-induced modulation and functional analyses of the DRE-binding transcription factor gene, *GmDREB3*, in soybean (*Glycine max* L.)", *Journal of Experimental Botany*, **60**, pp.121-135.
- [19] N. Rahmawati, et al. (2019), *Evaluation of resistance improvement of soybean (*Glycine max* (L) Merr.) against salinity using mass selection and gene expression of salinity tolerant*, Proceedings of the International Conference on Natural Resources and Technology (ICONART).

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 63 - Number 2 - February 2021

Nghiên cứu phát hiện đột biến kháng artemisinin trên gen *K13* ở ký sinh trùng sốt rét *Plasmodium falciparum*.

Trần Thị Thu Huyền, Nguyễn Thị Lan Dung, Nguyễn Thùy Trang, Nguyễn Văn Ninh, Hồ Anh Sơn, Hoàng Văn Tổng

Đa hình đơn nucleotide rs1799794 của gen *XRCC3* trên bệnh nhân ung thư vú.

Nguyễn Thị Thu Thảo, Nguyễn Thu Thúy, Vương Vũ Việt Hà, Trần Huy Thịnh, Nguyễn Viết Tiến, Trần Văn Khánh

Đánh giá độ chính xác và khả năng ứng dụng của phần mềm hỗ trợ khoanh đường Z tự động sử dụng thuật toán trí tuệ nhân tạo.

Đào Việt Hằng, Lê Quang Hưng, Nguyễn Phúc Bình, Nguyễn Mạnh Hùng, Mạnh Xuân Huy, Nguyễn Hồng Anh, Vũ Hải

Phát hiện đột biến gen *UGT1A1* gây hội chứng Gilbert ở bệnh nhân Việt Nam.

Nguyễn Thị Thanh Hoa, Đậu Quang Liêu, Nguyễn Đăng Tôn, Nguyễn Hải Hà, Trần Ngọc Ánh

Đánh giá sự biểu hiện của các gen tự thực (autophagy) trong quá trình hoạt hóa *in vitro* của các tế bào hình sao từ gan chuột.

Đặng Minh Thành, Lê Văn Trình, Đỗ Quang Huy, Trần Thị Hằng, Cao Lê Trâm Anh, Đặng Thị Tùng Loan, Phan Lữ Chính Nhân, Phạm Văn Phúc, Ai Xuan Le Holterman, Nguyễn Văn Thuận, Lê Minh Huy, Trương Hải Nhung

Nghiên cứu khả năng chịu hạn liên quan đến hình thái rễ và cấu trúc khí khổng của 12 giống lúa mùa (*Oryza sativa* L.) trong điều kiện hạn nhân tạo.
Trần Ngọc Sơn, Võ Công Thành, Võ Lan Hương, Đặng Thị Yến Nhi, Trần Thị Thùy Dương, Nguyễn Lam Đình, Từ Thị Diễm My

Nghiên cứu ảnh hưởng của tích hợp vi khuẩn endophyte *Bacillus subtilis* GB03 với vật liệu nano silica đến sự phát triển của cây dưa lưới (*Cucumis melo*).

Đinh Thị Hiền, Phạm Trung Hiếu, Trần Đại Lâm, Lê Thế Tâm, Vũ Thị Thoa, Nguyễn Thị Phương Thảo, Lê Đăng Quang

Ảnh hưởng của điều kiện nuôi cấy đến sinh trưởng hệ sợi của nấm *Phellinus linteus*.

Nguyễn Văn Giang, Nguyễn Thị Bích Thủy, Vũ Thị Khánh Linh, Nguyễn Duy Trình, Trần Thu Hà

Đặc điểm sinh học, sinh thái và phòng chống loài rệp sáp giả *Rastrococcus chinensis* (Hemiptera: Pseudococcidae) hại cây ba kích tím (*Morinda officinalis* How.).

Trịnh Xuân Hoạt, Lưu Thị Xuyên, Trần Lê Bích Hồng, Lê Xuân Vị, Lê Thị Tuyết Nhung

Khả năng kháng khuẩn và phòng bệnh hoại tử gan tụy cấp ở tôm thẻ chân trắng (*Penaeus vannamei*) của tỏi (*Allium sativum*) lên men.

Nguyễn Thị Hạnh, Phan Thị Vân, Phạm Thị Yến, Lê Thị Mỹ, Trương Thị Mỹ Hạnh

Chọn lọc các cá thể F_2 đồng hợp tử mang *QTL9* liên quan đến cấu trúc bông lúa bằng chỉ thị phân tử CAPS.

Phạm Thị Mai, Lê Thị Như, Stefan Jouannic, Không Ngân Giang

Đặc điểm và sự phát sinh của phân họ gen *DREB* ở đậu tương [*Glycine max* (L.) Meril].

Nguyễn Thị Ngọc Lan, Phutthakone Vaciaxa, Nguyễn Thành Chung, Nguyễn Hữu Quân, Phạm Thị Thanh Nhân, Vũ Thị Thu Thủy, Chu Hoàng Mậu

1

Detection of mutations associated with artemisinin resistance in *K13* gene of *Plasmodium falciparum* parasites.

Thi Thu Huyen Tran, Thi Lan Dung Nguyen, Thuy Trang Nguyen, Van Ninh Nguyen, Anh Son Ho, Van Tong Hoang

5

Single nucleotide polymorphism rs1799794 in *XRCC3* gene on breast cancer patients.

Thi Thu Thao Nguyen, Thu Thuy Nguyen, Vu Viet Ha Vuong, Huy Thinh Tran, Viet Tien Nguyen, Van Khanh Tran

10

Accuracy and applicability of the artificial intelligence integrated software in Z-line segmentation.

Viet Hang Dao, Quang Hung Le, Phuc Binh Nguyen, Manh Hung Nguyen, Xuan Huy Manh, Hong Anh Nguyen, Hai Vu

16

Identifying *UGT1A1* gene mutations in Vietnamese patients with Gilbert syndrome.

Thi Thanh Hoa Nguyen, Quang Lieu Dau, Dang Ton Nguyen, Hai Ha Nguyen, Ngoc Anh Tran

21

Investigating the expression of autophagy genes during the *in vitro* activation of mouse hepatic stellate cells.

Minh Thanh Dang, Van Trinh Le, Quang Huy Do, Thi Hang Tran, Le Tram Anh Cao, Thi Tung Loan Dang, Lu Chinh Nhan Phan, Van Phuc Pham, Ai Xuan Le Holterman, Van Thuan Nguyen, Minh Huy Le, Hai Nhung Truong

27

Drought tolerance related to root morphology and stomatal structure of the 12 seasonal rice varieties (*Oryza sativa* L.) under artificial drought conditions.

Ngoc Son Tran, Cong Thanh Vo, Lan Huong Vo, Thi Yen Nhi Dang, Thi Thuy Duong Tran, Lam Dinh Nguyen, Thi Diem My Tu

33

Study on the effect of integrating endophyte *Bacillus subtilis* GB03 and silica nanoparticles on the growth of melon crop (*Cucumis melo*).

Thi Hien Dinh, Trung Hieu Pham, Dai Lam Tran, The Tam Le, Thi Thoa Vu, Thi Phuong Thao Nguyen, Dang Quang Le

39

The effect of culture conditions for the mycelium growth of *Phellinus linteus*.

Van Giang Nguyen, Thi Bich Thuy Nguyen, Thi Khanh Linh Vu, Duy Trinh Nguyen, Thu Ha Tran

44

Biological, ecological characteristics, and management of mealybug species *Rastrococcus chinensis* (Hemiptera: Pseudococcidae) of Indian Mulberry (*Morinda officinalis* How.).

Xuan Hoat Trinh, Thi Xuyen Luu, Le Bich Hong Tran, Xuan Vi Le, Thi Tuyet Nhung Le

49

Antimicrobial activity and prevention acute hepatopancreatic necrosis disease in brackish whiteleg shrimp (*Penaeus vannamei*) of the fermented garlic (*Allium sativum*).

Thi Hanh Nguyen, Thi Van Phan, Thi Yen Pham, Thi May Le, Thi My Hanh Truong

55

Selection of F_2 homozygous plants over the *QTL9* related to rice panicle structure by using CAPS markers.

Thi Mai Pham, Thi Nhu Le, Stefan Jouannic, Ngan Giang Khong

60

Characteristics and phylogeny of *DREB* gene subfamily in soybeans [*Glycine max* (L.) Meril].

Thi Ngoc Lan Nguyen, Phutthakone Vaciaxa, Thanh Chung Nguyen, Huu Quan Nguyen, Thi Thanh Nhan Pham, Thi Thu Thuy Vu, Hoang Mau Chu