



ISSN 1859-4794

TẠP CHÍ

KHOA HỌC & CÔNG NGHỆ Việt Nam

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

B

Tập 57 - Số 9 - Tháng 9 năm 2015

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 Nghiêm - 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

Giá: 18000^d

PUBLICATION LICENCE

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

Nghiên cứu sự thích nghi của cây lúa trong điều kiện mặn

Nguyễn Bích Hà Vũ^{1*}, Võ Công Thành²

¹Khoa Khoa học Cây trồng, Trường Đại học Cần Thơ

²Khoa Nông nghiệp và Sinh học Ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ

Ngày nhận bài 6.2.2015, ngày chuyển phản biện 13.2.2015, ngày nhận phản biện 8.4.2015, ngày chấp nhận đăng 14.4.2015

Nghiên cứu sự thích nghi của cây lúa chống chịu mặn nhằm tìm hiểu những biểu hiện cấu trúc tế bào giúp cây mạ thích nghi với điều kiện mặn ở 12,50; 15,63; 18,75 và 21,88 dS/m trong dung dịch dinh dưỡng [1]. Thí nghiệm được bố trí theo thể thức lô phụ với 2 lần lặp, lô chính gồm 5 nghiệm thức mức độ mặn và lô phụ là 5 giống lúa. Sau 8 ngày thử mặn, tiến hành đo độ mặn của giọt nước hình thành trên lá vào buổi sáng, quan sát lát cắt ngang mẫu lá và rễ, điện di protein ở rễ, bẹ lá và lá cây mạ. Kết quả cho thấy, nồng độ muối trên chóp lá của giống NQB mùa (chịu mặn) thấp hơn các giống còn lại (71,1 dS/m). Quá trình tẩm suberin và lignin ở rễ xảy ra nhanh khi trồng trong điều kiện mặn ở các giống. Đặc biệt ở vùng ngoại bì, sự tẩm suberin và lignin của các giống chống chịu mặn xảy ra ở vị trí 10 mm, trong khi ở giống IR28 là 25 mm. Hơn thế nữa, các giống lúa chống chịu mặn còn tăng tích lũy một số protein có trọng lượng phân tử 135,90 và 31,81 kDa ở bẹ lá và rễ; 115,58 kDa ở bẹ lá và 54 kDa ở lá.

Từ khóa: cấu trúc rễ và lá, chống chịu mặn, sự thích nghi.

Chỉ số phân loại 4.1

RESEARCH ON RICE ADAPTION TO SALT CONDITION

Summary

A research on rice adaption to salt condition from 12.50 to 21.88 dS/m in nutrient solution has been carried out to detect the variations on cell structure of seedlings. The experiment has been arranged under the split-plot design with two replications, in which the plot factor has been used for five salt concentrations, and the split factor has been conducted on five rice varieties. After eight days of testing, the salt concentration of water droplet on the top of leaf has been measured at early morning; cross sections of leaves and roots have been observed; protein extraction in root, leaf ochrea, and leaf laminae of seedlings has been checked by protein electrophoresis. The results have shown that traditional NQB variety (salt tolerance) has the lowest salt concentration of droplet on the top of leaf (about 71.1 dS/m). The process of suberin and lignin formation in root occurs faster in salt condition. Especially, deposition of suberin and lignin has been found at the 10 mm position in the salt tolerance varieties, while it has been at the 25 mm position in the IR28 variety. Moreover, the salt tolerant varieties have also been enhanced the accumulation proteins which are 135.90 and 31.81 kDa in both root and leaf ochrea; 115.58 kDa in leaf ochrea and 54 kDa in leaf.

Keywords: adaption, leaf and root structure, salt tolerance.

Classification number 4.1

Đặt vấn đề

Việt Nam có hai vùng sản xuất lúa chính là Đồng bằng sông Cửu Long (51%) và Đồng bằng sông Hồng (15%) [2]. Tuy nhiên, do ảnh hưởng của biến đổi khí hậu, cùng với sự dâng lên của nước biển thì diện tích đất canh tác lúa của các vùng ven biển đang ngày càng thu hẹp lại. Đồng bằng sông Cửu Long có khoảng 1,7 triệu ha (chiếm khoảng 45% diện tích) chịu ảnh hưởng của nước mặn [3].

Rễ là bộ phận của cây tiếp xúc với đất nên chịu ảnh hưởng trực tiếp từ điều kiện bất lợi của môi trường đất. Cây đã biến đổi các cấu trúc giải phẫu để thích nghi với đất mặn, đặc biệt là ở bộ rễ [4]. Sự hình thành và phát triển của vòng Casparian ở rễ có sự khác nhau giữa các

*Tác giả chính: Tel: 0918181475, Email: nguyenchicthav@tgu.edu.vn

giống lúa. Bằng kỹ thuật hiện đại, các nhà khoa học đã thanh lọc và tuyển chọn được nhiều giống lúa có khả năng chống chịu mặn cao và đang được sản xuất đại trà ở nhiều tỉnh của Đồng bằng sông Cửu Long. Tuy nhiên, hầu hết các nghiên cứu vẫn chưa quan tâm nghiên cứu về giải phẫu cây lúa trong điều kiện mặn. Vì vậy, đề tài được thực hiện nhằm tìm hiểu những đặc điểm thích nghi về hình thái và cấu trúc của cây lúa trong nhiều điều kiện mặn khác nhau để phục vụ cho công tác chọn giống.

Nội dung nghiên cứu

Hạt lúa được ngâm ủ nảy mầm và thử mặn theo phương pháp của IRRI [5]. Thí nghiệm được bố trí theo thể thức lô phụ 2 lần lặp lại với 2 nhân tố là mức độ mặn và giống. Lô chính gồm 5 nghiệm thức của mức độ mặn là 0; 12,50; 15,63; 18,75 và 21,88 dS/m. Lô phụ gồm 5 giống: IR28 (nhiễm mặn), CTUS4, Sỏi mùa, NQB-ĐB và NQB mùa (chống chịu mặn).

Sau 8 ngày thử mặn, lát cắt ngang mẫu lá ở đoạn 0-20 cm tính từ chóp lá được thu và ngâm trong javen 15 phút để tẩy nội dung tế bào, rửa lại với nước cất từ 3 đến 4 lần và ngâm vào acetic acid 5 phút để loại bỏ nước javen. Sau đó, rửa lại với nước cất từ 3 đến 4 lần và ngâm mẫu vào thuốc nhuộm son phenyl-luc iod từ 3 đến 5 phút để mẫu bắt màu. Rửa sạch thuốc nhuộm và quan sát mẫu trong giọt glycerin dưới kính hiển vi. Trong khi lát cắt ngang ở rễ được thu ở đoạn 0-30 mm tính từ đỉnh rễ. Cùng thời điểm này, điện di protein trong rễ, bẹ lá và lá cũng được tiến hành theo Sambrook và Russell [6].

Dùng thống kê mô tả để tính các giá trị trung bình và các số đo biến động. Phân tích phương sai ANOVA (phép thử F và Duncan) để so sánh các số liệu trung bình ở mức ý nghĩa 5%.

Kết quả và thảo luận

Đánh giá khả năng chống chịu mặn ở giai đoạn mạ

Bảng 1: kết quả đánh giá khả năng chống chịu mặn

STT	Giống/dòng	Cấp chống chịu mặn			
		12,50 dS/m	15,63 dS/m	18,75 dS/m	21,88 dS/m
1	IR28	7	7	9	9
2	CTUS4	5	5	7	9
3	Sỏi mùa	3	3	5	7
4	NQB-ĐB	5	5	7	7
5	NQB mùa	3	3	5	5

Sau 8 ngày thử mặn, giống NQB mùa có khả năng chống chịu mặn tốt nhất trong các giống đạt cấp 5 ở độ mặn 21,88 dS/m. Kế đến là giống Sỏi mùa có khả năng chống chịu mặn trung bình (cấp 5) ở 18,75 dS/m. Khả năng chống chịu mặn của CTUS4 và NQB-ĐB bằng nhau là cấp 5 ở 15,63 dS/m. Kết quả trên cũng phù hợp với kết quả nghiên cứu của Quan Thị Ái Liên [7].

Khảo sát khả năng tiết muối qua lá

Kết quả bảng 2 cho thấy, khi tăng nồng độ muối thì nồng độ mặn của giọt nước tiết qua lá cũng tăng theo. Thêm vào đó, giống có khả năng chống chịu mặn thì lại có nồng độ mặn của giọt nước nhỏ hơn giống nhiễm mặn. Pannaga và CTV cũng cho thấy sự xuất hiện của tinh thể muối ở bẹ lá, phiến lá và tai lá của giống chống chịu mặn ít hơn giống nhiễm mặn [8]. Điều này có thể là do giống chống chịu mặn có khả năng ngăn cản sự hấp thu muối vào cây nên lượng muối tiết qua giọt nước trên lá cũng ít hơn.

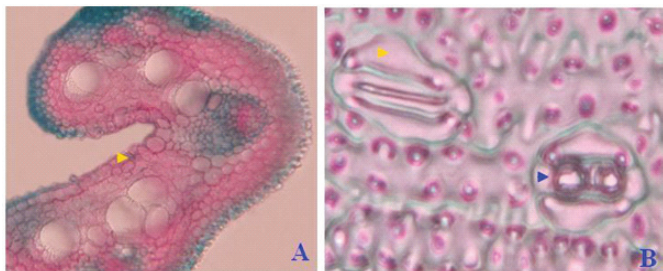
Bảng 2: nồng độ mặn của giọt nước ở lá sau 8 ngày thử mặn

Giống	Nồng độ mặn của giọt nước (dS/m)				Trung bình giống (A)
	12,50 dS/m	15,63 dS/m	18,75 dS/m	21,88 dS/m	
IR28	117,2bc	117,2bc	125,0b	148,4a	126,3a
CTUS4	78,1fg	125,0b	105,5bcd	113,3bcd	105,5b
Sỏi mùa	117,2bc	114,1bc	97,7cdef	105,5bcd	109,4b
NQB-ĐB	97,7cdef	113,3bcd	89,8defg	100cdef	100,2b
NQB mùa	72,7g	101,6cde	79,7efg	71,1g	81,3c
Trung bình mặn (B)	96,6c	114,2a	99,5bc	107,7ab	
F _A					*
F _B					*
F _{AB}					*
CV(%)					9,48

Quan sát lát cắt ngang phiến lá ở đoạn xuất hiện giọt nước mặn thì không tìm thấy tuyến tiết muối như các cây chịu mặn thuộc họ lúa. Tuy nhiên, tại vị trí này xuất hiện nhiều khí khổng (hình 1A). Bên cạnh đó, lớp biểu bì mặt dưới lá nơi xuất hiện giọt nước cho kết quả tương tự ở các giống. Biểu bì mặt dưới lá xuất hiện các khí khổng có hình dạng biến đổi khác hơn bình thường (hình 1B).

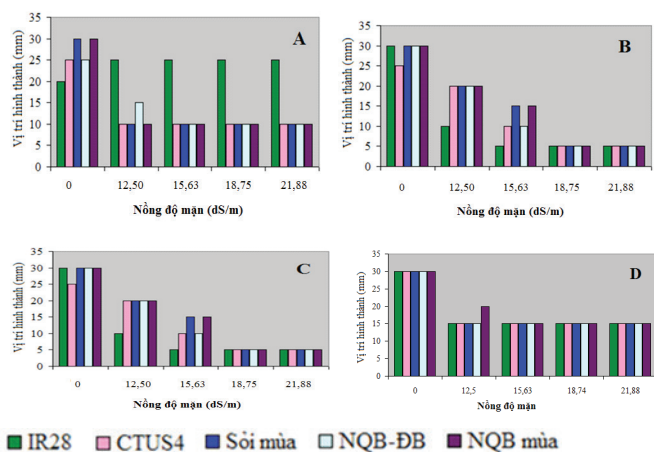
Theo Nguyễn Bá thì giọt nước xuất hiện ở chóp lá vào buổi sáng là do nước được tiết ra ngoài qua thủy khổng, là dạng biến đổi của khí khổng [9]. Một phần lượng muối được hấp thu từ rễ sẽ vận chuyển lên lá, dự trữ và tiết ra ngoài qua khí khổng [10]. Do đó, mỗi buổi

sáng có thể quan sát được những giọt nước mặn ứ đọng ở chóp lá và mặt dưới lá.



Hình 1: (A) lát ngang chóp lá, nơi xuất hiện giọt nước, vật kính 40X; (B) biểu bì mặt dưới lá ở vật kính 100X
Mũi tên vàng: khí khổng; mũi tên xanh: khí khổng biến đổi thành hai lỗ thoát nước ở giữa

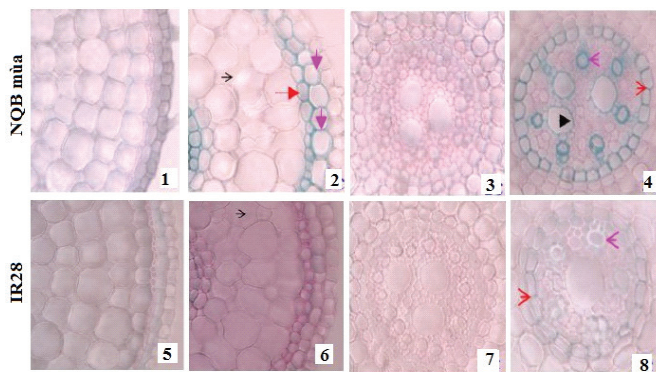
Sự biến đổi cấu trúc bộ rễ để thích nghi điều kiện mặn



Hình 2: vị trí tâm suberin và lignin ở ngoại bì (A), nội bì (B) và mạch gỗ (C) của rễ; (D) vị trí hình thành mô khí ở rễ

Trong điều kiện 0 dS/m, có sự khác nhau ở vị trí tâm suberin và lignin ở các giống lúa. Khi tăng nồng độ mặn lên thì vị trí hình thành suberin và lignin ở rễ giảm xuống (tế bào ngấm suberin và lignin gần đỉnh rễ hơn, hay quá trình suberin và lignin hóa xảy ra nhanh hơn) (hình 2, 3). Đặc biệt ở giống IR28, vị trí hình thành suberin ở ngoại bì vẫn không giảm khi tăng nồng độ mặn. Sự hình thành lớp tế bào ngấm suberin ở ngoại bì làm tăng khả năng chống chịu mặn của cây. Lớp tế bào này giúp ngăn cản sự hấp thu muối vào cây theo con đường apolast. Trong khi sự suberin và lignin hóa ở nội bì giúp hạn chế hấp thu các ion độc theo đường apolast [11]. Thêm vào đó, sự lignin hóa mạch gỗ giúp duy trì cấu trúc toàn vẹn của hệ thống mạch gỗ trong điều kiện mặn. Ngoài việc tăng cường tính bền vững cơ học, nó còn giúp cây giữ được nước trong điều kiện khô hạn [12]. Do đó, nó có khả năng giúp cây chống chịu với stress thâm thấu (thiếu nước) được gây ra bởi mặn.

Sự hình thành lớp suberin sẽ lấp đầy các khoảng gian bào và tăng cường cản trở con đường hấp thu apolast ở rễ. Sự ngăn cản này làm cho các chất và nước muốn hấp thu vào cây thì phải đi xuyên qua tế bào, hay xuyên qua màng tế bào trước khi vào mạch gỗ, vì vậy mà có tính chọn lọc cao hơn. Tính hấp thu có chọn lọc của màng tế bào sẽ làm giảm sự hấp thu Na^+ vào trong cây, giúp cây chống chịu với điều kiện mặn tốt hơn [13]. Một số nghiên cứu khác cũng cho rằng, môi trường mặn và các stress phi sinh học khác cũng cảm ứng hình thành nên những yếu tố ngăn cản con đường hấp thu apolast. Tuy nhiên, quá trình này thường xảy ra chậm và phải mất vài ngày [14, 15].



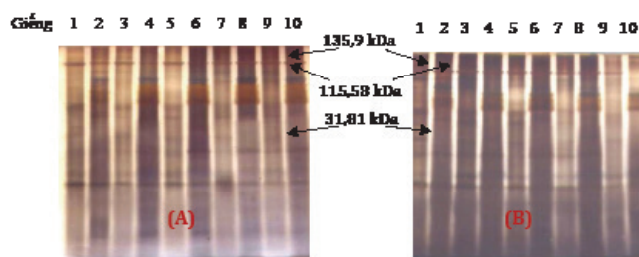
Lớp nội bì

Lớp ngoại bì

Hình 3: lát cắt ngang rễ ở đoạn 15 mm của IR28 và NQB mùa (40X)
1, 3, 5, 7: 0 dS/m; 2, 4, 6, 8: 21,88 dS/m; mũi tên hồng: suberin ở tế bào ngoại bì; mũi tên đỏ: suberin và lignin ở tế bào mạch gỗ; mũi tên đen: mô khí trong vùng vỏ rễ

Bên cạnh đó, vị trí hình thành mô khí (aerenchyma) ở các giống dường như không có khác biệt và khi tăng nồng độ mặn thì vị trí hình thành các mô khí này rút ngắn lại. Khi sống trong môi trường mặn, các tế bào nhu mô ở lớp ngoại bì hòa tan màng tế bào, tạo thành các mô khí nhanh hơn khi không có mặn [16]. Krishnamurthy và CTV cũng nhận thấy rằng, khi cây lúa được xử lý với mặn thì các aerenchyma sẽ được hình thành ở gần đầu rễ hơn cả ở 2 giống Pokkali (chống chịu) và IR20 (nhiễm mặn) [13].

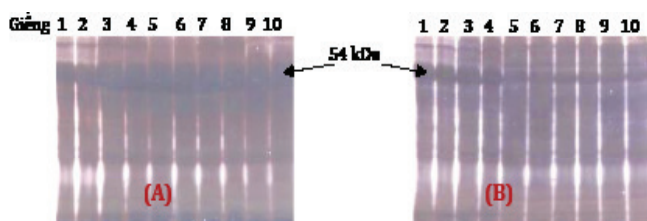
Sự tích lũy protein ở rễ, bẹ lá và lá



Hình 4: phổ điện di protein tổng số (A) NQB mùa và (B) IR28
Ghi chú: Giếng 1, 3, 5, 7, 9 rễ lúa ở các nồng độ tương ứng 0, 8, 10, 12 và 21,88 dS/m
Giếng 2, 4, 6, 8, 10 bẹ lá ở các nồng độ tương ứng 0, 8, 10, 12 và 21,88 dS/m

Quan sát kết quả điện di protein trong rễ và bẹ lá (hình 4) cho thấy, mức độ nhuộm màu của băng protein có khối lượng phân tử 135,90; 115,58 và 31,81 kDa đậm dần khi tăng nồng độ mặn ở các mức 0, 8, 10, 12 và 21,88 dS/m trên giống chống chịu mặn (NQB mùa), kết quả cũng tương tự ở những giống còn lại. Trong khi giống IR28 thì các band này nhạt dần khi tăng nồng độ mặn.

Ở kết quả điện di protein trên lá (hình 5), băng 54 kDa của các giống có khả năng chống chịu mặn (CTUS4, Sỏi mùa, NQB-ĐB, NQB mùa) ăn màu với thuốc nhuộm càng đậm khi tăng nồng độ mặn. Trái lại, band protein của giống IR28 thì lại nhạt dần khi nồng độ mặn tăng.



Hình 5: phổ điện di protein tổng số ở lá (A) NQB mùa và (B) IR28
Ghi chú: giếng 1, 2: 0 dS/m; 3, 4: 12,50 dS/m; 5, 6: 15,63 dS/m;
7, 8: 18,75 dS/m; 9, 10: 21,88 dS/m

Nhiều nghiên cứu cho thấy, sự tăng tích lũy một số chất tan trong tế bào như proline, polyamines, glycine betain, đường, polyols sẽ giúp cây tăng khả năng chống chịu khi trồng trong điều kiện mặn [17]. Taylor và CTV cho rằng, protein đáp ứng với mặn rất phức tạp trong việc làm thay đổi các quá trình trao đổi chất ở điều kiện mặn như loại bỏ gốc oxy hóa tự do, dẫn truyền tín hiệu, phiên mã, dịch mã ADN [18]. Sự thay đổi của các loại protein cũng như những thành phần của tế bào giúp cây thích nghi với điều kiện mặn phụ thuộc vào nồng độ mặn, thời gian xử lý mặn và giống cây trồng [19]. Thêm vào đó, các quá trình trao đổi chất và những loại protein liên kết với khả năng chống chịu mặn của cây vẫn chưa được biết rõ.

Kết luận

Để thích nghi với điều kiện mặn, cây lúa phát triển 3 chiến lược sau:

+ Cây lúa thải một lượng muối qua lá. Giống chống chịu mặn tốt thải muối qua lá thấp hơn giống nhiễm mặn. Ở nồng độ 21,88 dS/m, nồng độ muối của giọt nước trên lá của giống NQB mùa là 71,1 dS/m và giống IR28 là 148,4 dS/m.

+ Sự tẩm suberin và lignin được tìm thấy ở gần đầu rễ hơn trong điều kiện mặn. Riêng ở ngoại bì, các giống

chống chịu mặn có sự tẩm suberin và lignin ở gần đầu rễ hơn so với giống IR28.

+ Tăng hàm lượng một số protein như 135,90 kDa, 31,81 kDa ở rễ và bẹ lá; 115,58 kDa ở bẹ lá; 54 kDa ở lá.

Tài liệu tham khảo

- [1] Yoshida S, Forno D.A, Cock J.H and Gomez K.A (1976), *Laboratory Manual for Physiological Studies of Rice*, IRRI, Las Banos, Laguna, pp.83.
- [2] Pham Quang Ha and Nguyen Van Tuat (2010), *Rice production and climate change in Vietnam*, IAE.
- [3] Reiner W, Hien N.X, Hoanh C.T and Tuong T.P (2004), "Sea Level Rise Affecting the Vietnamese Mekong Delta: Water Elevation in the Flood Season and Implications of Rice Production", *Climatic Change*, **66**, pp.89-107.
- [4] Cai X, Tong C, QingYuan Z, Lei X, LeQing Q, XueJun H and JinXing L (2011), "Development of Casparian strip in rice cultivars", *Plant signaling & behavior*, **6**(1), pp.59-65.
- [5] IRRI (1997), "Screening rice for salinity tolerance", *IRRI discussion paper*, No.22, IRRI, P.O. Box 993, Manila 1099, Philippines.
- [6] Sambrook J and D.W Russell (2006), "SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Proteins", *Molecular Cloning*, Vol.3.
- [7] Quan Thị Ái Liên, Võ Công Thành và Nguyễn Thị Huyền Nhung (2012), "Đánh giá khả năng chịu mặn và phẩm chất của giống lúa Sỏi, Một bụi hồng và Nàng quýt biển", *Tạp chí Khoa học Đại học Cần Thơ*, số 24a, trang 281-289.
- [8] Pannaga K et al (2009), "The role of root apoplastic transport barriers in salt tolerance of rice (*Oryza sativa* L.)", *Planta*, **230**(1), pp.119-134.
- [9] Nguyễn Bá (2007), *Giáo trình thực vật học*, Nxb Giáo dục.
- [10] Singh R.K (2006), "Breeding for Salt Tolerance in Rice", *Plant breeding course*, IRRI.
- [11] Yeo A.R and Flowers T.J (1984), "Machensims of salinity resistance in rice and their role as physiological criteria in plant breeding In salinity tolerance in plants", *Wiley-Interscience*, New York, pp.151-170.
- [12] Hà Thị Lệ Anh (2006), *Giáo trình hình thái giải phẫu thực vật*, Tủ sách Đại học Cần Thơ.
- [13] Krishnamurthy P, Ranathunge K, Franke R, Prakash H.S, Schreiber L and Mathew M.K (2009), "The role of root apolastic transport barriers in salt tolerance of rice (*Oryza sativa* L.)", *Planta*, **230**(1), pp.119-134.
- [14] Reinhardt D.H and Rost T.L (1995), "Salinity accelerates endodermal development and induces an exodermis in cotton seedling roots", *Environ. Exp. Bot*, **35**, pp.563-574.
- [15] Shannon M.C, Grieve C.M and Francois L.E (1994), "Whole plant response to salinity", In: Wilkinson R.E. (ed) *Plant-environment interactions*, Marcel Dekker, N.Y, pp.199-244.
- [16] Lee M.H, et al (2013), "Divergences in morphological changes and antioxidant responses in salt-tolerant and salt-sensitive rice seedlings after salt stress", *Plant Physiology and Biochemistry*, **70**, pp.325-335.
- [17] Gupta B and Huang B (2014), "Review: Mechanism of salinity tolerance in plants: physiological biochemical and molecular characterization", *International J. of Genomics*, Vol.2014, pp.18.
- [18] Taylor N.L, Tan Y.F, Jacoby R.P and Millar A.H (2009), "Abiotic environmental stress induced changes in the Arabidopsis thaliana chloroplast, mitochondria and peroxisome proteomes", *J. Proteomics*, **72**, pp.367-378.
- [19] Liu Y, Du H, He X, Huang B and Wang Z (2011), "Identification of differentially expressed salt-responsive proteins in roots of two perennial grass species contrasting in salinity tolerance", *J. of Plant Physiology*, **169**(2), pp.117-126.

Ảnh hưởng của liều lượng chiếu xạ tia gamma Co^{60} đến khả năng tạo biến dị có lợi trong chọn giống đậu tương

Lê Đức Thảo*, Phạm Thị Bảo Chung, Nguyễn Văn Mạnh

Viện Di truyền Nông nghiệp, Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn

Ngày nhận bài 9.1.2015, ngày chuyển phản biện 12.1.2015, ngày nhận phản biện 25.3.2015, ngày chấp nhận đăng 30.3.2015

Nhằm chọn tạo giống đậu tương mới, khắc phục một số nhược điểm của giống đậu tương DT2008 như thời gian sinh trưởng dài, khả năng chống đổ trung bình (do bộ lá lớn, lá trụng nhọn rộng, cao cây), Viện Di truyền Nông nghiệp đã xử lý đột biến bằng phương pháp chiếu xạ tia gamma (Co^{60}) trên hạt khô giống DT2008 ở các liều lượng 100, 150, 200, 250, 300, 350 Gy. Kết quả cho thấy, liều lượng xử lý tạo ra nhiều đột biến có lợi là 150, 200, 250 Gy và đã thu được các cá thể mang đột biến có lợi cho chọn tạo giống đậu tương mới ở thế hệ M_6 như chiều cao cây thấp hơn từ 8-13 cm, năng suất cao hơn, chín sớm hơn từ 5-7 ngày so với giống DT2008, đặc biệt đã chọn được các dòng có vỏ hạt màu đen.

Từ khoá: chiếu xạ, đậu tương, đột biến, gamma.

Chỉ số phân loại 4.1

IMPROVING A SOYBEAN VARIETY BY Co^{60} GAMMA IRRADIATION ON DRY SEEDS

Summary

In order to create a new soybean variety and improve the soybean variety DT2008 which has a long growth duration, an average tolerance to lodging because of its high stem with a large foliage, Agricultural Genetics Institute has applied Co^{60} gamma irradiation on DT2008's dry seeds at doses of 0 (the control), 100, 150, 200, 250, 300, and 350 Gy. The results have shown that the effective doses creating beneficial mutants are 150, 200 and 250 Gy. The beneficial mutants which includes shorter stem (8-13 cm), higher yield, and shorter growth duration (by 5-7 days) as compared to the origin DT2008 have been selected in M_6 generation, especially some individuals having black seed skin.

Keywords: gamma, irradiation, mutant, soybean.

Classification number 4.1

Đặt vấn đề

Giống đậu tương DT2008 do Viện Di truyền Nông nghiệp chọn tạo đã được công nhận giống sản xuất thử năm 2010. Giống DT2008 có hoa tím, lông nâu, vỏ quả chín màu vàng, sinh trưởng và phát triển khỏe, trồng được 3 vụ/năm, khối lượng 1000 hạt lớn (từ 200-260 g), năng suất cao (25-40 tạ/ha, vượt DT84 là 24,3% trong khảo nghiệm quốc gia), chống chịu tốt với các loại sâu bệnh hại [1, 2], chịu hạn tốt, vượt giống chuẩn quốc tế W82 [3]. Tuy nhiên, DT2008 có khả năng chống đổ trung bình (do bộ lá lớn, lá trụng nhọn rộng, cao cây) với thời gian sinh trưởng dài (95-110 ngày), khó bố trí thời vụ nên khó khăn khi mở rộng diện tích trong sản xuất.

Với mục tiêu duy trì các đặc tính tốt, đồng thời khắc phục nhược điểm của giống DT2008, chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu cải tiến giống DT2008 bằng phương pháp chiếu xạ tia gamma trên hạt khô.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu nghiên cứu

Hạt khô giống đậu tương DT2008.

Phương pháp nghiên cứu

Gây đột biến: xử lý chiếu xạ tia gamma nguồn Co^{60} tại Trung tâm Chiếu xạ Hà Nội ở 6 liều lượng 100, 150, 200, 250, 300 và 350 Gy, công suất nguồn là 64,8 kCi, thời gian xử lý mẫu 30 phút, 600 hạt/liều lượng xử lý,

*Tác giả chính: Email: leducthao@agi.vaas.vn

đối chứng là mẫu 600 hạt không xử lý.

Bố trí thí nghiệm: theo phương pháp tuần tự không lặp lại, có đối chứng xen kẽ.

Phương pháp chọn lọc: áp dụng phương pháp chọn lọc phá hệ.

Các chỉ tiêu nghiên cứu theo Quy phạm khảo nghiệm QCVN 01-58/2011/BNNPTNT [4].

Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Thời gian nghiên cứu: từ tháng 10.2012 đến tháng 9.2014.

Địa điểm nghiên cứu: Khu ruộng thí nghiệm đậu tương, Viện Di truyền Nông nghiệp tại xã Song Phượng, Đan Phượng, Hà Nội.

Kết quả nghiên cứu

Ảnh hưởng của chiếu xạ tia gamma (Co^{60}) đến sinh trưởng và phát triển của giống đậu tương DT2008

Ảnh hưởng ở thế hệ M_1 :

Số liệu ở bảng 1 cho thấy, tỷ lệ nảy mầm ở các công thức chiếu xạ dao động từ 98-100%, không khác biệt rõ so với đối chứng (100%); tỷ lệ sống sót dao động từ 26,4-97,6%, có xu hướng giảm theo chiều tăng của liều lượng chiếu xạ, đạt thấp nhất ở công thức 350 Gy (26,4%) và đạt cao nhất ở công thức đối chứng (97,6%).

Bảng 1: ảnh hưởng của chiếu xạ đến tỷ lệ nảy mầm, tỷ lệ sống của giống đậu tương DT2008 ở thế hệ M_1

Liều lượng chiếu xạ (Gy)	Tỷ lệ nảy mầm (%)	Tỷ lệ sống sót (%)
0 (đ/c)	100	97,6
100	100	94,2
150	100	89,6
200	99	81,4
250	100	68,2
300	99	45,6
350	98	26,4

Ở thế hệ M_1 , tần số biến dị tăng theo chiều tăng của liều lượng chiếu xạ, dao động từ 0,4-58,8%, đạt cao nhất ở công thức 350 Gy (58,8%), thấp nhất ở công thức đối chứng (0,4%); đã thu được 11 dạng biến dị khác nhau như thân dẹt, phân cành đối xứng, phân cành chẻ đôi, phân cành sớm, phân thân chẻ đôi, thấp cây, cao cây, lá dị dạng, bạch tạng, cây bất dục và chín muộn. Ở cùng một liều lượng chiếu xạ, dạng biến dị

cây bất dục và biến dị chín muộn có tần số lớn nhất. Ở các công thức 150, 200 và 250 Gy có phổ biến dị rộng từ 6-9/11 dạng (bảng 2).

Bảng 2: ảnh hưởng của chiếu xạ đến tần số biến dị của giống đậu tương DT2008 ở thế hệ M_1

TT	Dạng biến dị	Liều lượng chiếu xạ (Gy)						
		Đ/C	100	150	200	250	300	350
1	Thân dẹt	-	-	-	0,2	-	-	-
2	Phân cành đối xứng	-	-	0,2	0,4	0,4	0,2	-
3	Phân cành chẻ đôi	-	-	-	0,2	0,2	-	-
4	Phân cành sớm	-	-	0,2	0,4	0,2	-	-
5	Phân thân chẻ đôi	-	-	-	0,2	0,2	-	-
6	Thấp cây	-	-	0,6	1,4	2,0	6,2	10,6
7	Cao cây	-	-	0,2	-	-	-	-
8	Lá dị dạng	-	-	-	0,2	0,4	-	-
9	Bạch tạng	-	-	-	-	-	0,2	0,2
10	Cây bất dục	0,2	0,2	1,8	3,4	7,6	19,2	22,6
11	Chín muộn	0,2	0,4	5,4	9,6	15,4	21,0	25,4
Cộng		0,4	0,6	8,4	16,0	26,4	46,8	58,8

Ảnh hưởng ở thế hệ M_2 :

Ở thế hệ M_2 , tần số biến dị tăng khi tăng liều lượng xử lý chiếu xạ từ 0 lên 350 Gy, dao động từ 0,8-36,1% và đã thu được 14 dạng biến dị. Các liều lượng có phổ biến dị rộng là 150 Gy (8/14 dạng), 200 Gy (13/14 dạng) và 250 Gy (10/14 dạng) (bảng 3).

Bảng 3: ảnh hưởng của chiếu xạ đến tần số biến dị của giống đậu tương DT2008 ở thế hệ M_2

TT	Dạng biến dị	Liều lượng (Gy)						
		Đ/C	100	150	200	250	300	350
1	Thân cong	-	-	-	0,11	-	-	0,31
2	Thân chẻ đôi	-	-	0,17	0,19	0,09	0,24	0,31
3	Cao cây	-	-	-	0,15	0,12	0,24	-
4	Thấp cây	-	-	0,11	0,11	0,14	-	-
5	Nhiều cành	-	-	0,15	0,32	0,26	0,24	-
6	Phân cành sớm	-	-	-	0,15	0,19	-	-
7	Phân cành kép đối xứng	-	-	-	0,19	0,14	-	0,31
8	Phân cành kép không đối xứng	-	-	-	0,15	0,17	-	-
9	Cành chẻ đôi	-	-	0,15	0,15	-	-	-
10	Màu vỏ hạt	-	-	-	0,06	-	-	-
11	Nhiều quả	-	-	0,11	0,11	0,19	-	-
12	Bất dục	-	1,32	2,22	1,90	2,81	8,46	11,42
13	Chín sớm	-	-	-	0,06	-	-	-
14	Chín muộn	0,8	4,82	3,62	4,01	8,99	24,51	23,77
Cộng		0,8	6,14	6,53	7,65	13,09	33,68	36,10

Tại thể hệ M_2 , đã chọn lọc được 73 cá thể có những biến dị có lợi cho chọn tạo giống đậu tương mới như thấp cây, năng suất, nhiều cành... tập trung chủ yếu ở các liều lượng chiếu xạ 150 Gy (17 cá thể, chiếm 23,3%), 200 Gy (31 cá thể, chiếm 42,5%) và 250 Gy (25 cá thể, chiếm 34,2%) (bảng 4). Trong đó, các cá thể nhiều cành có từ 6-8 cành/cây (đối chứng là 3,5 cành); các cá thể năng suất có khối lượng hạt/cây từ 23-26 g (đối chứng là 19,0 g/cây); các cá thể thấp cây có chiều cao cây từ 55-60 cm (đối chứng cao 75,3 cm). Đặc biệt, ở liều lượng 200 Gy đã chọn được 3 cá thể có vỏ hạt màu đen, ở liều lượng 200 Gy chọn được 3 cá thể chín sớm hơn so với đối chứng từ 5-7 ngày.

Bảng 4: số lượng cá thể ưu tú mang những biến dị có lợi ở thể hệ M_2

TT	Dạng biến dị	Liều lượng (Gy)						
		Đ/C	100	150	200	250	300	350
1	Nhiều cành	-	-	7	15	11	-	-
2	Thấp cây	-	-	5	5	6	-	-
3	Vỏ hạt đen	-	-	-	3	-	-	-
4	Năng suất	-	-	5	5	8	-	-
5	Chín sớm	-	-	-	3	-	-	-
Cộng		-	-	17	31	25	-	-

Ảnh hưởng ở thể hệ M_3 :

Kết quả nghiên cứu các dạng biến dị xuất hiện ở quần thể đậu tương M_3 cho thấy, tần số biến dị ở các công thức chiếu xạ ở mức rất thấp so với thể hệ M_2 , dao động từ 0,83-2,85%.

Kết quả đánh giá sự di truyền của các tính trạng định tính ở thể hệ M_2 sang thể hệ M_3 cho thấy: các biến dị thân cong, thân chẻ đôi, phân cành sớm, phân cành kép đối xứng, phân cành kép không đối xứng, cành chẻ đôi và bất dục không di truyền sang thể hệ M_3 . Dạng biến dị vỏ hạt màu đen di truyền hoàn toàn sang thể hệ M_3 . Điều này chứng tỏ đây là đột biến lặn ở M_2 .

Qua quá trình phân lập và chọn lọc đến thể hệ M_3 , đã chọn được 782 cá thể ưu tú mang những biến dị có lợi như thấp cây, nhiều cành, năng suất, chín sớm và vỏ hạt đen, tập trung ở 3 liều lượng chiếu xạ 150, 200 và 250 Gy (bảng 5).

Bảng 5: số lượng cá thể ưu tú chọn được ở thể hệ M_3

TT	Đột biến có lợi	Liều lượng chiếu xạ (Gy)		
		150	200	250
1	Thấp cây	70	70	84
2	Nhiều cành	21	45	33
3	Vỏ hạt đen	-	117	-
4	Năng suất	70	70	112
5	Chín sớm	-	90	-
Cộng		161	392	229

Đánh giá, chọn lọc các dòng đậu tương đột biến từ giống DT2008 có ý nghĩa cho chọn tạo giống đậu tương mới

Kết quả đánh giá, chọn lọc các dòng đậu tương ở thể hệ M_4 :

Phần lớn các dòng đột biến có vỏ hạt màu vàng và rón hạt màu đen như giống gốc DT2008, thời gian sinh trưởng từ 97-99 ngày, chiều cao cây dao động từ 46,1-49,5 cm, số đốt trên cây dao động từ 12,3-12,9 đốt, số cành cấp 1 từ 2,4-3,0 cành, tương đương giống gốc (thời gian sinh trưởng: 97 ngày, chiều cao: 46,1 cm, số đốt: 12,8, số cành: 2,6). Nhưng có 117 dòng có vỏ hạt màu đen ở liều lượng chiếu xạ 200 Gy, 54/782 dòng (19 dòng ở liều lượng 150 Gy, 17 dòng ở 200 Gy và 18 dòng ở 250 Gy) có chiều cao thấp hơn đối chứng từ 10,2-15,1 cm; 29/782 dòng (9 dòng ở 150 Gy, 11 dòng ở 200 Gy và 9 dòng ở 250 Gy) có số cành cấp 1 nhiều hơn so với giống gốc từ 1,8-2,3 cành; 19/589 dòng ở 200 Gy chín sớm hơn so với giống gốc từ 5-7 ngày; 61/782 dòng (18 dòng ở 150 Gy, 22 dòng ở 200 Gy và 21 dòng ở 250 Gy) có năng suất cao hơn so với giống gốc 2,0-2,4 g/cây.

Kết quả, đã chọn được 221 dòng đột biến gồm 46 dòng ở liều lượng 150 Gy, 136 dòng ở liều lượng 200 Gy và 39 dòng ở liều lượng 250 Gy. Trong đó có 54 dòng thấp cây (19 dòng ở 150 Gy, 17 dòng ở 200 Gy và 18 dòng ở 250 Gy), 20 dòng nhiều cành (9 dòng ở 150 Gy và 11 dòng ở 200 Gy), 67 dòng hạt đen, 19 dòng chín sớm và 61 dòng năng suất (bảng 6).

Bảng 6: số dòng được chọn ở thế hệ M_4

TT	Đột biến có lợi	Liều lượng chiếu xạ (Gy)			Cộng
		150	200	250	
1	Thấp cây	19	17	18	54
2	Nhiều cành	9	11	-	20
3	Vỏ hạt đen	-	67	-	67
4	Năng suất	18	22	21	61
5	Chín sớm	-	19	-	19
Cộng		46	136	39	221

Kết quả đánh giá, chọn lọc các dòng đậu tương ở thế hệ M_5 :

Kết quả đánh giá cho thấy, trong 221 đột biến có 154/221 dòng vỏ hạt vàng như giống gốc, còn 67/221 dòng vỏ hạt màu đen ở liều lượng 200 Gy; 10 dòng đột biến ở 200Gy có thời gian sinh trưởng ngắn hơn giống gốc từ 7-9 ngày, dao động từ 101-103 ngày; 35 dòng (10 dòng ở 150 Gy, 11 dòng ở 200 Gy và 14 dòng ở 250 Gy) thấp cây hơn so với giống gốc từ 10,1-12,8 cm, dao động từ 61,0-63,7 cm; 12 dòng có số cành cấp 1 nhiều hơn so với giống gốc từ 1,3-1,5 cành, dao động từ 4,8-5,0 cành; 32 dòng (10 dòng ở 150 Gy, 12 dòng ở 200 Gy và 10 dòng ở 250 Gy) năng suất cao hơn so với giống gốc từ 1,7-2,0 g/cây, dao động từ 18,1-18,4 g/cây ở thế hệ M_5 .

Đã chọn lọc được 111 dòng đột biến có lợi gồm 22 dòng ở liều lượng 150 Gy, 69 dòng ở liều lượng 200 Gy và 20 dòng ở liều lượng 250 Gy (bảng 7).

Bảng 7: số lượng các dòng đột biến được chọn lọc ở thế hệ M_5

Liều lượng (Gy)	150	200	250	Tổng
Thấp cây	7	8	10	25
Nhiều cành	5	7	-	12
Vỏ hạt đen	-	32	-	32
Chín sớm	-	10	-	10
Năng suất	10	12	10	32
Tổng	22	69	20	111

Kết quả đánh giá, chọn lọc các dòng đậu tương ở thế hệ M_6 :

Kết quả, trong 111 dòng đậu tương đột biến có 79 dòng vỏ hạt vàng như giống gốc và 32/111 dòng vỏ hạt

màu đen ở liều lượng 200 Gy; 10 dòng có thời gian sinh trưởng ngắn hơn giống gốc từ 7-8 ngày; 20 dòng thấp cây (4 dòng ở 150 Gy, 8 dòng ở 200 Gy và 8 dòng ở 250 Gy) so với giống gốc từ 8,4-13,7 cm; 8 dòng có số cành cấp 1 nhiều hơn so với giống gốc từ 1,4-1,8 cành; 25 dòng (8 dòng ở 150 Gy, 9 dòng ở 200 Gy và 8 dòng ở 250 Gy) có năng suất cao hơn so với giống gốc từ 2,2-2,5 g/cây, dao động từ 22,2-22,5 g/cây.

Đã chọn được 81 dòng đột biến có lợi gồm 14 dòng ở liều lượng 150 Gy, 51 dòng ở liều lượng 200 Gy và 16 dòng ở liều lượng 250 Gy. Trong đó, có 20 dòng thấp cây (4 dòng ở 150 Gy, 8 dòng ở 200 Gy và 8 dòng ở 250 Gy); 8 dòng nhiều cành (2 dòng ở 150 Gy và 6 dòng ở 200 Gy); 18 dòng hạt đen ở 200 Gy; 10 dòng chín sớm ở 200 Gy và 25 dòng năng suất (8 dòng ở 150 Gy, 9 dòng ở 200 Gy và 8 dòng ở 250 Gy) (bảng 8).

Bảng 8: số lượng các dòng đột biến được chọn lọc ở thế hệ M_6

Liều lượng (Gy)	150	200	250	Tổng
Thấp cây	4	8	8	20
Nhiều cành	2	6	-	8
Vỏ hạt đen	-	18	-	18
Chín sớm	-	10	-	10
Năng suất	8	9	8	25
Tổng	14	51	16	81

Kết luận và kiến nghị

Kết luận: tia gamma (Co^{60}) có tác dụng đối với sự sinh trưởng và phát triển của cây đậu tương (giống DT2008), gây ra hàng loạt biến dị kiểu hình khác nhau và có xu hướng tăng theo chiều tăng liều lượng chiếu xạ (cao nhất ở 350 Gy). Liều lượng chiếu xạ có phổ biến dị rộng là 200, 250 Gy. Liều lượng chiếu xạ tới hạn là 300 Gy. Liều lượng chiếu xạ tạo ra nhiều dòng đột biến có lợi nhất cho tạo giống đậu tương là 150, 200, 250 Gy.

Đã chọn lọc được 81 dòng đột biến của DT2008 gồm 20 dòng thấp cây (thấp hơn so với giống gốc khoảng 8-13 cm), 8 dòng nhiều cành (nhiều hơn giống gốc 1,5-2,0 cành), 18 dòng hạt đen, 10 dòng chín sớm (sớm hơn 5-7 ngày so với giống gốc) và 25 dòng năng suất.

Kiến nghị: cần tiếp tục nghiên cứu, so sánh, đánh giá chọn lọc các dòng đột biến có lợi của giống đậu

tương DT2008 ở các thế hệ tiếp theo nhằm chọn lọc được các dòng đậu tương đột biến triển vọng, tạo giống đậu tương đột biến mới.

Lời cảm ơn

Nội dung nghiên cứu trên được thực hiện với sự hỗ trợ của Chương trình khoa học và công nghệ cấp nhà nước “Nghiên cứu ứng dụng và phát triển công nghệ năng lượng” (mã số KC05/11-15) thông qua đề tài “Nghiên cứu ứng dụng công nghệ bức xạ kết hợp với công nghệ sinh học để tạo vật liệu khởi đầu cho chọn tạo giống hoa và giống đậu tương” (mã số KC05.08/11-15). Các tác giả xin trân trọng cảm ơn sự hỗ trợ quý báu của Ban Chủ nhiệm Chương trình và Văn phòng Các chương trình trọng điểm cấp nhà nước, Bộ Khoa học và Công nghệ.

Tài liệu tham khảo

- [1] Mai Quang Vinh, Phạm Thị Bảo Chung, Lê Thị Ánh Hồng (2010), “Kết quả nghiên cứu chọn tạo giống đậu tương chịu hạn DT2008”, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam*, **2(15)**, tr.46-50.
- [2] Mai Quang Vinh, Phạm Thị Bảo Chung, Lê Thị Ánh Hồng (2012), “Kết quả nghiên cứu tuyển chọn giống đậu tương chịu hạn, năng suất cao phù hợp với điều kiện sinh thái khó khăn do biến đổi khí hậu tại Tây Nguyên”, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam*, **2(15)**, tr.29-35.
- [3] Chien Ha Van, Dung Tien Le, Rie Nishiyama, Yasuko Watanabe, Uyen Thi Tran, Nguyen Van Dong, and Lam Son Phan Tran (2012), “Characterization of the Newly Developed Soybean Cultivar DT2008 in Relation to the Model Variety W82 Reveals a New Genetic Resource for Comparative and Functional Genomics for Improved Drought Tolerance”, *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, **Vol.2012**, pp.8.
- [4] Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn (2011), *Quy phạm kỹ thuật quốc gia về khảo nghiệm giá trị canh tác và sử dụng của giống đậu tương (QCVN 01-58/2011/BNNPTNT)*.

Những nguyên nhân gây suy thoái và rút ngắn chu kỳ kinh doanh của các vườn cà phê ở Tây Nguyên

Nguyễn Văn Ván^{1*}, Trần Duy Quý¹, Lê Đức Khánh², Lê Quang Khải²
Nguyễn Thị Thủy², Trần Thanh Toàn²

¹Viện Nghiên cứu sản phẩm sinh học nông nghiệp công nghệ cao

²Viện Bảo vệ thực vật

Ngày nhận bài 12.3.2015, ngày chuyển phản biện 16.3.2015, ngày nhận phản biện 20.4.2015, ngày chấp nhận đăng 29.4.2015

Sản xuất cà phê ở các tỉnh Tây Nguyên chiếm gần 90% diện tích và sản lượng của Việt Nam. Vấn đề đang gây bức xúc hiện nay là khoảng 20% diện tích cà phê đã già cỗi, suy thoái, không mang lại hiệu quả kinh tế, và còn rất nhiều diện tích khác cũng đang có nguy cơ dẫn tới hiện tượng này. Hơn nữa, hiện tượng suy thoái, già cỗi xảy ra với cả các vườn cà phê còn ít tuổi. Những nghiên cứu được thực hiện đã chỉ ra một số nhóm nguyên nhân chính gây ra hiện tượng trên. Trong đó, nguyên nhân thuộc về giai đoạn mới trồng chỉ để rút kinh nghiệm cho phát triển diện tích cà phê mới, gồm: phát triển cà phê không theo quy hoạch; giống và chất lượng cây giống cà phê và trồng cây che bóng. Các nguyên nhân còn lại vừa là nguyên nhân chủ quan và khách quan nhưng có thể chủ động quản lý được, bao gồm: đất và dinh dưỡng đất trồng cà phê; thành phần dịch hại và sự tích lũy dịch hại trong vườn cà phê; chăm sóc cà phê; sự khai thác một cách quá mức. Việc nghiên cứu, phân tích làm rõ những nguyên nhân trên giúp cho người trồng cà phê có thể chủ động quản lý theo hướng tích cực, góp phần cải thiện năng suất, chất lượng và kéo dài thời kỳ kinh doanh cho các vườn cà phê ở Tây Nguyên.

Từ khóa: dịch hại, già cỗi suy tàn, khai thác quá mức, không mang lại hiệu quả kinh tế, thời kỳ kinh doanh.

Chỉ số phân loại 4.1

Đặt vấn đề

Cà phê là mặt hàng nông sản xuất khẩu đứng thứ 2 sau lúa gạo, mang lại nguồn ngoại tệ lớn cho đất nước. Từ năm 2012, lần đầu tiên Việt Nam đã vươn lên ngang tầm với Brazil (nước ở ngôi vị thứ nhất về khối lượng cà phê xuất khẩu trong nhiều năm), và trở thành nước đứng thứ nhất thế giới về xuất khẩu cà phê với (Robusta), chiếm tới một nửa sản lượng Robusta toàn cầu [1-4].

Sản xuất cà phê của Việt Nam tập trung chính ở các tỉnh Tây Nguyên (chủ yếu là cà phê vối), chiếm tỷ lệ gần 90% diện tích cà phê của cả nước, thu hút gần 50% tổng số người lao động ở Tây Nguyên. Cây cà phê là cây xóa đói giảm nghèo và đã trở thành cây làm giàu cho nhiều hộ nông dân. Trồng cà phê không chỉ mang lại hiệu quả kinh tế cao, mà còn phủ xanh đất trống đồi núi trọc, bảo vệ môi trường sinh thái...

Phần lớn các vườn cà phê ở Tây Nguyên được trồng từ những năm 80, 90 của thế kỷ trước, đến nay các vườn trên dưới 20 năm, thậm chí 30 năm tuổi. Không ít vườn cà phê đã có những biểu hiện suy thoái, già cỗi, năng suất và sản lượng đang giảm dần theo từng niên vụ (trong đó khoảng 20% diện tích không còn khả năng

khai thác). Dự kiến, với tốc độ suy thoái như hiện nay, đến năm 2020 tỷ lệ các vườn cà phê già cỗi, khai thác kém hiệu quả sẽ lên tới 70% diện tích cà phê của toàn vùng. Đây là thực trạng báo động đối với một ngành sản xuất có tầm quan trọng trong phát triển kinh tế - xã hội tại Tây Nguyên và là một sản phẩm xuất khẩu chủ lực ở Việt Nam [5].

Vấn đề đang được quan tâm hiện nay là nhiều ý kiến cho rằng, chu kỳ kinh doanh của vườn cà phê ở Việt Nam so với thế giới là khá ngắn. Vườn cà phê chỉ sau trồng 15-20 năm đã có biểu hiện của sự già cỗi, suy thoái, xuống cấp. Những nguyên nhân nào dẫn tới thực trạng này và hướng giải quyết sẽ ra sao? Đã có nhiều cơ quan nghiên cứu; các nhà khoa học, nhà quản lý, chỉ đạo sản xuất đã và đang làm rõ từng vấn đề... Tuy nhiên, đây là vấn đề lớn mang tầm của cả một ngành sản xuất quan trọng ở nước ta, đặc biệt với vùng Tây Nguyên. Trong giới hạn của bài viết này, trên cơ sở tiến hành điều tra, đánh giá thực trạng sản xuất, kết hợp thực hiện một số chuyên đề nghiên cứu chuyên sâu về các lĩnh vực liên quan, nhóm tác giả mong muốn cung cấp thêm một số thông tin về những lý do ảnh hưởng đến sức khỏe của vườn cà phê có thể được xem

*Tác giả chính: Email: van.vaas@gmail.com

UNDERLYING REASONS CAUSING DEGENERATION AND SHORTENING THE ECONOMIC CYCLE OF COFFEE PLANTATIONS IN THE CENTRAL HIGHLANDS

Summary

Coffee production in the Central Highlands accounts for 90% of total area and yield in Vietnam (mainly Robusta coffee). The major constraint for coffee production industry is that currently more than 20% of total coffee growing area has been aging and declining, and bringing low economic profits. Moreover, degradation has also occurred with young coffee plantations. Studies have been conducted to indicate some main reasons for this phenomena. Among them, reasons occurring in the establishment stage to obtain lessons for new coffee establishment area include unplanned development of coffee growing area, seedling and seedling quality, planting shady trees for coffee. The remaining reasons are both subjective and objective but can be managed, including: soil and nutrition, pests and pest accumulation and care, coffee management overexploitation. Research and clarification of these reasons will help coffee growers be able to manage coffee trees in positive way, contribute to yield and quality improvement, and extend commercial period for coffee plantations.

Keywords: *aging, commercial period, low economic profits, pests, overexploitation.*

Classification number 4.1

là “Những nguyên nhân gây suy thoái và rút ngắn chu kỳ kinh doanh của các vườn cà phê ở Tây Nguyên”, với hy vọng thông qua những ý kiến tổng hợp, phân tích, thảo luận và nhận xét, đánh giá cũng phân nào làm rõ thêm những vấn đề đang được sản xuất quan tâm hiện nay.

Phương pháp nghiên cứu

Địa điểm nghiên cứu

Công tác điều tra, khảo sát, đánh giá hiện trạng được tiến hành tại các vùng sản xuất cà phê trọng điểm của 5 tỉnh Tây Nguyên là Đắk Lắk, Đắk Nông, Lâm

Đồng, Gia Lai và Kon Tum.

Phân tích, giám định dịch hại được thực hiện tại Viện Bảo vệ thực vật.

Phân tích giám định tuyến trùng hại rễ cà phê được thực hiện tại Viện Sinh thái và tài nguyên sinh vật.

Phân tích dinh dưỡng đất được thực hiện tại Viện Thổ nhưỡng nông hóa và Viện Khoa học kỹ thuật nông lâm nghiệp Tây Nguyên.

Thu thập thông tin, xử lý tài liệu

Điều tra, khảo sát, đánh giá thực trạng sản xuất cà phê ở Tây Nguyên theo phương pháp phỏng vấn bằng phiếu câu hỏi xác định, được thiết lập gồm 39 chỉ tiêu liên quan đến thực trạng sản xuất cà phê. Tổng số phiếu điều tra khoảng 500 (100 phiếu/tỉnh). Trong phiếu điều tra có những câu hỏi mở để thu thập thông tin bổ sung trong quá trình khảo sát, trao đổi thông tin, kinh nghiệm thực tế.

Tổng hợp, phân tích kết quả nghiên cứu từ các chuyên đề về phân tích dinh dưỡng đất, dinh dưỡng lá cà phê, nghiên cứu thành phần sinh vật hại và sự tích lũy sinh vật hại trên vườn cà phê...

Thu thập bổ sung tài liệu trong và ngoài nước phục vụ nghiên cứu, tổng hợp, phân tích, gồm: tình hình sản xuất cà phê trên thế giới và Việt Nam, định hướng phát triển cà phê của Việt Nam, các quy trình công nghệ, tiến bộ kỹ thuật mới được công nhận... phục vụ cho việc phân tích, đánh giá và so sánh.

Xử lý tài liệu theo các lĩnh vực: giống, đất đai khí hậu và dinh dưỡng, kỹ thuật canh tác, tưới nước, phòng trừ sâu bệnh, thu hoạch, bảo quản chế biến...

Nghiên cứu tổng hợp, phân tích theo phương pháp thống kê, tổng hợp, phân tích, so sánh, đối chiếu để làm rõ những yếu tố chính tác động đến sản xuất cà phê kinh doanh của các vườn cà phê tại Tây Nguyên.

Kết quả nghiên cứu và thảo luận

Thực trạng sản xuất và vấn đề thoái hóa, già cỗi của các vườn cà phê kinh doanh ở Tây Nguyên

Theo số liệu của Cục Trồng trọt năm 2012, các tỉnh Tây Nguyên có khoảng 120 ngàn ha cà phê già cỗi, thoái hóa, hết khả năng khai thác. Dự kiến đến năm 2020, diện tích cà phê già cỗi, thoái hóa, xuống cấp của toàn vùng sẽ tăng đến khoảng 200.000 ha [5] (chiếm khoảng 36%, tương đương với diện tích cà phê của cả tỉnh Đắk Lắk hiện nay). Liên tục các năm tiếp theo con số này lại tiếp tục tăng lên. Đây là thách thức lớn đối với sự ổn định của ngành cà phê Việt Nam.



Vườn cà phê 20 năm tuổi đang già cỗi

Ngoài các số liệu thống kê thu thập, đề tài đã tiến hành điều tra điểm đại diện về tỷ lệ vườn cà phê đang được đánh giá là bị già cỗi, suy thoái, xuống cấp. Kết quả được trình bày tại bảng 1.

Bảng 1: Kết quả điều tra điểm về tỷ lệ vườn cà phê kinh doanh bị suy thoái, già cỗi, năng suất thấp (năm 2013)

TT	Địa điểm điều tra	Số hộ	Diện tích cà phê (ha)	Cà phê đang phát triển tốt		Cà phê thoái hóa, già cỗi			Tỷ lệ thoái hóa, già cỗi (%)
				< 20 năm	> 20 năm	< 15 năm	16-20 năm	> 20 năm	
1	Quảng Tiến, Cư M'gar, Đắk Lắk	10	8,7	3,5	2,8	0	0,5	1,9	27,59
2	EaBhok, Cư Kuin, Đắk Lắk	10	7,4	2,6	3,1	0,5	0,2	1,0	22,97
3	Buôn Ki, TP Buôn Ma Thuột, Đắk Lắk	10	7,8	2,7	2,8	0,5	1,3	0,5	29,49
4	Công ty 706, Iagrai, Gia Lai	10	9,7	1,5	4,7	0,6	1,6	1,3	36,08
5	Alba', Chư sê, Gia Lai	10	8,1	1,8	3,8	0,6	0,3	1,6	30,86
	Tổng cộng	50	41,7	12,1	17,2	2,2	3,9	6,3	29,73

Số liệu điều tra ở bảng 1 cho thấy, trong số 50 hộ được chọn tại 5 vùng đại diện để điều tra, tỷ lệ vườn cà phê kinh doanh đang bị suy thoái, già cỗi, năng suất thấp chiếm 29,73%.

Theo quy luật sinh học, các vườn cà phê đã có tuổi thọ trên 20 năm như ở Tây Nguyên hiện nay, khả năng sinh trưởng, phát triển bắt đầu trở nên kém dần. Song, những điều cần quan tâm ở đây là: không phải tất cả các vườn cà phê già cỗi, hết khả năng khai thác đều giống nhau về độ tuổi. Trong số diện tích cà phê được cho là già cỗi, suy thoái, hết khả năng khai thác có cả những diện tích 20-30 năm, dưới 20 năm, thậm chí chỉ 15 năm tuổi. Ngược lại, trong thực tế vẫn có rất nhiều diện tích cà phê trên 20 năm, thậm chí là 30 năm tuổi vẫn rất “sung sức”, cho năng suất gần 20 tạ nhân/ha trở lên. Từ thực trạng trên cho thấy, sự suy thoái, già cỗi

của các vườn cà phê không hẳn là do tuổi của cây, mà còn có những lý do khác. Việc nghiên cứu, phân tích làm rõ những nguyên nhân sẽ góp phần vào việc quản lý được các yếu tố này một cách hợp lý, cải thiện được năng suất, chất lượng các vườn cà phê kinh doanh.

Thông qua kết quả điều tra đánh giá thực trạng, kết hợp với một số chuyên đề nghiên cứu chuyên sâu được thực hiện từ cuối năm 2012 đến nay, có thể rút ra một số yếu tố tác động đến sức khỏe của vườn cà phê, là những nguyên nhân thúc đẩy nhanh quá trình suy thoái, già cỗi, rút ngắn chu kỳ kinh doanh của các vườn cà phê ở Tây Nguyên, được tổng hợp và trình bày sau đây:

Những nguyên nhân chính thúc đẩy nhanh quá trình suy thoái, già cỗi, rút ngắn chu kỳ kinh doanh của các vườn cà phê tại Tây Nguyên

Phát triển cà phê không theo quy hoạch: Nhà nước và ngành cà phê đều quan tâm đến quy hoạch phát triển cà phê phù hợp với các điều kiện đất đai, khí hậu, môi trường và các yếu tố xã hội khác, đảm bảo cho cây phát triển thuận lợi. Tuy nhiên, khi nông dân thấy cà phê cho thu nhập và lợi nhuận cao nên đua nhau mở rộng diện tích trồng một cách ồ ạt. Trong đó, một số diện tích có nguy cơ phát sinh những hạn chế lớn đến phát triển bền vững cây cà phê như: đất có tầng canh tác mỏng, rất bất lợi cho cây cà phê trong điều kiện mưa nắng, khô hạn kéo dài, đất có địa hình dốc bị xói mòn, rửa trôi trong mùa mưa, đất bị khô hạn thiếu nguồn nước tưới trong khi ở Tây Nguyên, mùa khô bị thiếu nước tưới nghiêm trọng nên tại những vùng bị hạn, đất bị khô kiệt kéo dài, vườn cà phê khô héo, thậm chí bị chết khô. Theo thống kê của tỉnh Đắk Lắk, mùa khô năm 2013 đã có trên 26.000 ha cà phê bị khô hạn, thiếu nước tưới, làm giảm năng suất hoặc chết khô.

Từ năm 2008, các tỉnh đã bắt đầu triển khai thực hiện chỉ đạo của Thủ tướng Chính phủ về việc giảm diện tích cà phê để phát triển theo quy hoạch. Mặc dù vậy, khi giá cà phê tăng, một bộ phận nông dân, doanh nghiệp vẫn tự phát mở rộng diện tích ngoài vùng quy hoạch, dẫn đến diện tích cà phê vượt quá điều kiện cho phép. Cho đến thời điểm điều tra, tổng diện tích cà phê toàn vùng là 551.670 ha, trong khi diện tích theo quy hoạch đến năm 2020 là 447.000 ha (vượt 104.670 ha, tương đương 23,4%) [4, 5].

Để bổ sung cho những phân tích này, đề tài đã tiến hành điều tra điểm về tỷ lệ vườn cà phê trồng trên những diện tích hạn chế về điều kiện canh tác (bảng 2).

Bảng 2: kết quả điều tra điểm về tỷ lệ vườn cà phê kinh doanh trồng trên đất xấu (tầng canh tác mỏng, đất dốc bị xói mòn, rửa trôi, đất bị khô hạn thiếu nguồn nước tưới...)

TT	Địa điểm điều tra	Số hộ	Diện tích cà phê (ha)	Cà phê trên đất tốt (ha)	Cà phê trên đất xấu (ha)	Tỷ lệ cà phê trên đất xấu (%)	Ghi chú
1	Quảng Tiến, Cư M'gar, Đắk Lắk	10	8,7	6	2,7	31,03	Tầng canh tác mỏng, đất sỏi đá, thoát nước kém
2	EaBhok, Cư Kuin, Đắk Lắk	10	7,4	4,9	2,5	33,78	Tầng canh tác mỏng, đất sỏi đá
3	Buôn Ki, TP Buôn Ma Thuột, Đắk Lắk	10	7,8	4,4	3,4	43,59	Tầng canh tác mỏng, đất sỏi đá, thoát nước kém
4	Công ty 706, Iagrai, Gia Lai	10	9,7	7,8	1,9	19,59	Tầng canh tác mỏng, đất sỏi đá
5	Alba', Chư sê, Gia Lai	10	8,1	6,3	1,8	22,22	Thoát nước kém, đất xám nâu
	Tổng cộng	50	41,7	29,4	12,3	29,50	

Kết quả bảng 2 cho thấy, tại các điểm điều tra, điểm nào cũng có diện tích cà phê kinh doanh trồng trên đất xấu, hạn chế về điều kiện canh tác, tỷ lệ bình quân là 29,5%. Điểm có tỷ lệ cao nhất là Buôn Ki, TP Buôn Ma Thuột, Đắk Lắk (43,59%); thấp nhất là Iagrai, Gia Lai (19,59%).

Do được trồng ở cả những nơi bị hạn chế về điều kiện canh tác (thường những diện tích này không nằm trong quy hoạch của các địa phương). Trên những diện tích này, vườn cà phê chỉ phát triển tốt vào những năm đầu. Sau một số năm khai thác sẽ suy tàn sớm hơn so với những diện tích khác có cùng độ tuổi. Đây cũng là lý do thúc đẩy nhanh quá trình suy thoái, xuống cấp của các vườn cà phê kinh doanh.

Giống và chất lượng cây giống cà phê ở Tây Nguyên: nhà nông có câu “tốt giống tốt má, tốt mạ tốt lúa”. Tuổi thọ và sức dẻo dai của cây trồng liên quan đến rất nhiều yếu tố, nhưng trước hết, liên quan đến bản chất di truyền và sức khỏe của giống. Giống cà phê ở Tây Nguyên chủ yếu là cà phê vối (Robusta), chiếm tỷ lệ trên 90%, còn lại là cà phê chè và một lượng rất nhỏ (khoảng 2%) là cà phê mít. Trên 80% số người được hỏi đều cho rằng, những vườn cà phê hiện nay có tuổi 20-25 năm trở lên đều được trồng vào những năm 1984-1985 và thập kỷ 90 của thế kỷ trước. Thời gian này người nông dân hầu như không quan tâm đến tiêu chuẩn chất lượng giống. Hầu hết các cơ sở, hộ gia đình chưa có vườn cà phê chọn lọc để nhân giống, người dân tự lựa chọn hạt giống và tự ươm giống để trồng nên trong nhiều trường hợp, giống không đạt tiêu chuẩn. Do chất lượng cây giống cà phê chưa được kiểm soát chặt chẽ, dẫn tới hậu quả là sức sống của các vườn cà phê không đồng đều. Sau này, qua năm tháng, tuy cùng độ tuổi nhưng có vườn cà phê đã suy thoái xuống cấp, trong khi một số vườn khác đang độ sung sức vẫn cho năng suất cao là lẽ đương nhiên.

Theo đánh giá của Viện Khoa học kỹ thuật nông lâm nghiệp Tây Nguyên thì còn lý do nữa là, nông dân thường chọn hạt tốt làm giống, trong khi cà phê vối là cây thụ phấn chéo bắt buộc. Do vậy, không kiểm soát được hạt giống cà phê hội tụ đủ các yếu tố di truyền của bố mẹ. Chất lượng giống cà phê không đồng đều sẽ ảnh hưởng đến tuổi thọ vườn cà phê sau này.

Đất và dinh dưỡng đất trồng cà phê: đất trồng cà phê ở Tây Nguyên là các loại đất nâu đỏ, nâu vàng phát triển trên đá bazan, đất đỏ vàng trên phiến sét, đất xám trên granit, trong đó đất nâu đỏ và nâu vàng là chủ yếu. Các loại đất này thường phân bố ở địa hình cao, có độ dốc lớn dưới tác động của các yếu tố khí hậu như nhiệt độ cao, mưa lớn với cường độ mạnh vào mùa mưa, đất bị rửa trôi, xói mòn, bị thoái hóa, làm suy giảm độ phì, đất đai bị chua hóa đã và đang xảy ra ngày càng trầm trọng, đặc biệt là trên các vùng đất dốc, nếu canh tác không chú ý đến các biện pháp chống xói mòn [6]. Do vậy, việc lựa chọn đất trồng phù hợp cũng góp phần kéo dài thời kỳ kinh doanh của vườn cà phê.

Về dinh dưỡng, cà phê là loại cây công nghiệp lâu năm có nhu cầu dinh dưỡng rất cao. Số liệu phân tích của Viện Khoa học kỹ thuật nông lâm nghiệp Tây Nguyên cho thấy, để hình thành 1 tấn cà phê thương phẩm, cây cà phê cần 34-37 kg N, 6,5-7,5 kg P₂O₅, 35-40 kg K₂O. Ngoài ra, một lượng lớn các nguyên tố trung, vi lượng khác cũng được cây lấy đi từ đất.

Để tìm hiểu dinh dưỡng trong đất tại các vườn cà phê già cỗi, 90 mẫu đất tại các vùng trồng cà phê ở Đắk Lắk và Gia Lai đã được phân tích để đánh giá 11 chỉ tiêu chính, gồm: độ pH, mùn, N, P, K, Ca, Mg, S, Mn, Zn, B. Đối chứng là đất cà phê mới trồng trong vùng có điều kiện tương tự. Kết quả phân tích được trình bày tại bảng 3.

Bảng 3: kết quả phân tích hàm lượng dinh dưỡng trong đất cà phê già cỗi

TT	Chỉ tiêu dinh dưỡng	Lô cà phê	Khoảng biến động	Giá trị trung bình	Phân cấp
1	Trị số pH _{KCl}	Trồng mới	4,16-4,71	4,47±0,08	Chua mạnh
		Già	4,11-4,69	4,36±0,06	Chua mạnh
2	Mùn (%)	Trồng mới	3,62-6,02	4,47±0,08	Cao
		Già	4,08-6,92	5,67±0,29	Giàu
3	Nito (%)	Trồng mới	0,11-0,18	0,14±0,04	Trung bình
		Già	0,16-0,27	0,20±0,01	Trung bình
4	Photpho dễ tiêu (mg/100 g)	Trồng mới	2,54-11,27	6,80±0,95	Trung bình
		Già	3,81-19,70	7,12±1,47	Trung bình
5	Kali dễ tiêu (mg/100 g)	Trồng mới	7,84-21,07	14,56±1,27	Trung bình
		Già	12,30-30,29	22,90±2,26	Cao
6	Canxi trao đổi (ldl/100 g đất)	Trồng mới	1,2-3,7	2,2±0,3	Nghèo
		Già	1,2-3,4	2,2±0,2	Nghèo
7	Magie trao đổi (ldl/100 g đất)	Trồng mới	0,4-2,5	1,0±0,2	Cao
		Già	0,4-1,0	0,7±0,1	Cao
8	Lư huỳnh dễ tiêu (ppm)	Trồng mới	19,6-48,2	28,6±3,3	Nghèo
		Già	11,9-58,9	33,5±4,2	Nghèo
9	Mangan dễ tiêu (ppm)	Trồng mới	5,2-14,6	9,2±1,1	Cao
		Già	5,1-12,9	7,0±0,8	Trung bình
10	Kẽm dễ tiêu (ppm)	Trồng mới	1,4-2,8	2,2±0,2	Trung bình
		Già	1,6-2,4	2,0±0,1	Trung bình
11	Bo dễ tiêu (ppm)	Trồng mới	1,5-2,2	2,0±0,1	Nghèo
		Già	1,5-2,1	1,8±0,1	Nghèo

Kết quả phân tích tại bảng 3 cho thấy, số liệu về “khoảng biến động” và “giá trị trung bình” của 11 chỉ tiêu chính trong đất trồng cà phê đang ở giai đoạn già cỗi so với đất cà phê mới trồng không có sự khác nhau rõ rệt, và hầu như nằm trong cùng mức phân cấp. Điều này có thể lý giải rằng, hàng năm cà phê kinh doanh được bổ sung lượng dinh dưỡng khá đầy đủ, nên không có sự chênh lệch rõ về hàm lượng dinh dưỡng giữa đất cà phê lâu năm so với cà phê trồng mới. Do vậy, thành phần dinh dưỡng vườn cà phê vẫn đảm bảo yêu cầu, nhưng sử dụng dinh dưỡng của cây bị hạn chế, có thể do nhiều nguyên nhân tác động, các hoạt động sinh lý, hóa sinh bị giảm sút, cây cà phê suy yếu về mặt thể chất, cây cũng không còn khả năng trao đổi chất để sinh trưởng, phát triển như thời kỳ còn sung sức, càng đẩy nhanh tốc độ già hóa của cây.

Thành phần dịch hại và sự tích lũy dịch hại trong vườn cà phê: dịch hại cũng là một trong những nguyên nhân quan trọng ảnh hưởng đến sức khỏe vườn cà phê. Những vườn cà phê nhiều năm tuổi là môi trường cho sự tích lũy về thành phần cũng như số lượng quần thể dịch hại. Khi gặp điều kiện thuận lợi, chúng có thể bùng phát thành dịch, tàn phá vườn cây, làm cho vườn cây suy sụp. Hiện tượng này gặp tất cả ở những vườn cây có các độ tuổi khác nhau, song những vườn cây lâu năm là cơ hội cho dịch hại gây tác hại nặng nhiều hơn [7].

Năm 2012-2013, đề tài đã tiến hành điều tra nghiên cứu về thành phần và sự tích lũy dịch hại trong vườn cà phê tại Tây Nguyên. Kết quả được trình bày ở bảng 4.

Bảng 4: thành phần sâu, bệnh hại cà phê tại Tây Nguyên 2012-2013

TT	Loại dịch hại	Số loài	Bộ phận bị hại	Mức độ hại
I	Sâu hại	19		
	Bộ cánh đều/Homoptera			
1	Rệp hại	9	Rễ, gốc, thân, lá, chồi, búp, cành, quả	+++
2	Ve sầu	6	Rễ	+
	Bộ cánh cứng/Coleoptera			
3	Mọt đục cành, đục quả	2	Cành, quả	+
	Bộ cánh vảy/Lepidoptera			
4	Sâu hồng, sâu ăn lá	2	Thân, cành, lá	++
II	Bệnh hại	31		
1	Bệnh hại do nấm	4	Rễ, thân, lá, cành, quả	++
2	Bệnh do tuyến trùng hại rễ	27	Rễ	+++

Ghi chú: +++: mức độ hại nặng; ++: mức độ hại trung bình; +: mức độ hại nhẹ

Số liệu ở bảng 4 cho thấy, các vườn cà phê kinh doanh tại Tây Nguyên bị 19 loài sâu hại (thuộc 3 bộ) và 2 nhóm ký sinh gây bệnh (nhóm nấm hại có 4 loài và nhóm tuyến trùng gồm 27 loài). Ngoài ra còn xuất hiện 8 loại triệu chứng bệnh do các yếu tố môi trường như: bệnh thiếu nước, cháy nắng, thiếu đạm, thiếu lân, thiếu kali, thiếu canxi, thiếu bo, thiếu kẽm.

Nghiên cứu về sự tích lũy đối tượng dịch hại nguy hiểm trong đất đã ghi nhận 27 loài tuyến trùng ký sinh ở rễ cà phê. Tần suất bắt gặp của các loài tuyến trùng nốt sừng *Meloidogyne* spp. là 43%, gia tăng 21% so với kết quả được Viện Sinh thái và tài nguyên sinh vật khảo sát năm 2006. Các loài *Pratylenchus* spp. cũng bắt gặp khá nhiều so với điều tra năm 2006.

Điều nguy hiểm hơn là tuyến trùng thường là vật khởi đầu gây các vết thương cơ giới, tạo điều kiện cho các loại nấm, khuẩn, virus xâm nhập và nếu có sự phối hợp của các loại dịch hại này cùng hại rễ thì mức độ tác hại do chúng gây ra cho rễ cà phê rất nghiêm trọng, phá vỡ khả năng kháng bệnh của cây hay làm gia tăng sự thiệt hại so với khi chỉ có một mình tuyến trùng gây ra. Rễ bị hại nặng lên vườn cà phê suy yếu dần, trở nên già cỗi.

Chăm sóc cà phê: các biện pháp chăm sóc đặc biệt quan trọng đối với sức khỏe vườn cà phê. Số liệu điều tra về áp dụng các biện pháp kỹ thuật chăm sóc vườn cà phê kinh doanh tại Tây Nguyên phần nào phản ánh được tác động ảnh hưởng của các biện pháp này (bảng 5).

Bảng 5: tỷ lệ hộ nông dân áp dụng đúng các biện pháp kỹ thuật trong sản xuất cà phê

TT	Các biện pháp kỹ thuật		Tỷ lệ số hộ áp dụng (%)
1	Nước tưới	Thiếu	25,75
		Đủ	30,25
		Thừa	44,00
2	Cắt tỉa cành, tạo tán	Hợp lý	45,00
		Chưa hợp lý	55,00
3	Sử dụng phân bón	Thiếu	32,40
		Đủ	43,00
		Thừa	33,60
4	Phòng trừ sâu bệnh	Đúng kỹ thuật	57,50
		Không đúng kỹ thuật	42,50
5	Thu hoạch	Chín (> 70%) số quả	20,00
		Chín (< 70%) số quả	80,00

Số liệu bảng 5 cho thấy, trong 5 biện pháp kỹ thuật chăm sóc cơ bản, thông qua phỏng vấn số hộ nông dân áp dụng đúng kỹ thuật dao động 20-57%. Phần lớn nông dân làm theo kinh nghiệm, dẫn đến hậu quả là sức khỏe các vườn cà phê kinh doanh bị giảm sút, khi

gặp các điều kiện bất lợi như khô hạn, nắng nóng, sâu bệnh... sẽ làm cho vườn cà phê suy yếu, sớm già cỗi, cũng là nguyên nhân góp phần rút ngắn chu kỳ kinh doanh của vườn cà phê.

Trồng cây che bóng: cây che bóng tham gia vào quá trình điều hòa tiểu khí hậu vườn cà phê, nhất là trong điều kiện ngoại cảnh vùng Tây Nguyên vẫn còn những bất cập. Cà phê với thích hợp với khí hậu nhiệt đới nóng ẩm, trong khi khí hậu vùng Tây Nguyên mùa mưa và mùa khô tập trung cao điểm ở một vài tháng gây hiện tượng thừa nước và khô hạn kéo dài. Mùa khô nhiệt độ tới 35°C, làm hạn chế khả năng quang hợp của lá, không có cây che bóng lá cà phê có thể bị cháy. Mùa khô thiếu nước, cành lá khô héo, gặp gió mạnh làm rụng lá hàng loạt. Để hồi phục bộ lá sẽ mất nhiều năng lượng, ảnh hưởng đến sức khỏe của cây.

Cà phê với ưa ánh sáng trực xạ yếu, trong khi cường độ ánh sáng trong mùa nóng là quá lớn. Bộ rễ cà phê phát triển tập trung chủ yếu ở tầng đất mặt, có độ sâu 0-30 cm, chiếm tới > 70%. Nắng nóng trực xạ dễ làm bộ rễ bị tổn thương.



Cà phê thiếu vắng cây che bóng thì bộ rễ nổi trên bề mặt đất dễ bị tổn thương

Về mùa khô, khu vực Tây Nguyên được coi là nơi khô nhất ở phía Nam, bởi yếu tố địa hình đã gây ra hiệu ứng phơn, khiến cho độ ẩm giảm xuống < 50%, thậm chí có nơi chỉ còn > 20% (Pleiku).

Vườn cà phê có cây che bóng, khí hậu trong vườn được điều hòa, giảm nhiệt độ quá cao, ngăn ngừa ánh sáng trực xạ. Ánh sáng tán xạ từ cây che bóng còn có tác dụng nâng cao chất lượng sản phẩm cà phê, làm kéo dài thời gian chín của quả, tạo điều kiện để hạt tích lũy đầy đủ các hợp chất thơm cần thiết của hương vị cà phê. Cây che bóng còn điều hòa được độ ẩm trong vườn cà phê, giảm sự mất nước do bị khô nóng, chống

cỏ dại, chống xói mòn, bảo vệ được lớp rễ tầng đất mặt, tăng độ phì cho đất... ổn định sinh thái cho vườn cà phê.

Kết quả điều tra điểm về tỷ lệ vườn cà phê kinh doanh có cây che bóng cho thấy tỷ lệ này khá thấp, chỉ từ 6,17 đến 16,1% (bảng 6).

Bảng 6: kết quả điều tra điểm về tỷ lệ vườn cà phê kinh doanh có cây che bóng

TT	Địa điểm điều tra	Số hộ	Diện tích cà phê (ha)	Cà phê có cây che bóng (ha)	Cà phê không có cây che bóng (ha)	Tỷ lệ cây che bóng (%)
1	Quảng Tiến, Cư M'gar, Đắk Lắk	10	8,7	1,4	7,3	16,1
2	EaBhok, Cư Kuin, Đắk Lắk	10	7,4	0,5	6,9	6,76
3	Buôn Kì, TP Buôn Ma Thuột, Đắk Lắk	10	7,8	0,3	7,5	3,85
4	Công ty 706, Iagrai, Gia Lai	10	9,7	1,1	8,6	11,34
5	Alba', Chư sê, Gia Lai	10	8,1	0,5	7,6	6,17
	Tổng cộng	50	41,7	3,8	37,9	9,10

Vấn đề cây che bóng trong vườn cà phê ở Tây Nguyên hiện nay đang có những quan niệm khác nhau. Có người cho rằng, vườn cà phê không có cây che bóng cho năng suất cao hơn nên trong thực tế đã có những chủ hộ chặt phá bỏ cây che bóng. Ngược lại, có những vườn cà phê vùng Eapok, Thắng Lợi, với thiết kế chắn gió trồng xen đồng bộ, được chính các chủ vườn ghi nhận có thể năng suất cà phê sẽ kém hơn vườn cà phê trồng thuần, nhưng cây cà phê phát triển ổn định, tuổi thọ cây thể hiện dài hơn. Đã có nhiều mô hình trồng cây che bóng bằng trồng xen các loại cây ăn quả có giá trị kinh tế cao như sầu riêng, bơ sáp, mít nghệ... cho tổng thu nhập cao hơn nhiều so với vườn cà phê trồng thuần.

Với cách nhìn theo hướng phát triển cà phê bền vững, sự thiếu vắng của cây che bóng, ở một mức độ nào đó sẽ hạn chế đến ổn định sinh thái cho vườn cà phê, ví dụ với những vùng không đáp ứng đủ lượng nước trong mùa khô. Điều này không thể không ảnh hưởng đến sức khỏe vườn cà phê kinh doanh.

Sự khai thác một cách quá mức: năng suất cà phê bình quân của thế giới khoảng 6-7 tạ hạt/ha, trong khi năng suất bình quân của Việt Nam đã lên tới 20-23 tạ hạt/ha (gấp 3 lần) (bảng 7). Với năng suất bình quân như trên sẽ có rất nhiều diện tích năng suất 4-6 tấn/ha, cá biệt có một số điển hình đạt 8-10 tấn/ha. Việt Nam được đánh giá là nước có trình độ thâm canh cây cà phê cao, cũng là nước có năng suất cà phê bình quân cao nhất thế giới.

Bảng 7: năng suất, sản lượng cà phê Việt Nam từ mùa vụ 2010/11 đến 2013/14

Chỉ tiêu	Mùa vụ 2010/11	Mùa vụ 2011/12	Mùa vụ 2012/13	Mùa vụ 2013/14 (dự báo)
Thời gian bắt đầu	Tháng 10.2010	Tháng 10.2011	Tháng 10.2012	Tháng 10.2013
Sản lượng (nghìn tấn)	1.200	1.560	1.590	1.740
Năng suất (tấn/ha)	2,18	2,44	2,47	2,68

Nguồn: Bộ Nông nghiệp Hoa Kỳ (USDA)

Nếu chu kỳ kinh doanh của cà phê là 20 năm và năng suất bình quân cả chu kỳ là 1,5-1,8 tấn nhân trên 1 ha, thì 1 ha cà phê cho thu hoạch tới 30-36 tấn hạt, tương đương 150-180 tấn quả tươi. Ở những diện tích có năng suất 5-6 tấn hạt, thì con số này có thể tới 250-300 tấn quả tươi. Đây là lượng sản phẩm hết sức lớn do cây cà phê đã tạo ra. Để tạo ra lượng sản phẩm hữu cơ này, các hộ nông dân đã tác động các yếu tố kỹ thuật nhằm khai thác lợi nhuận trước mắt, nhưng để lại hậu quả là sức khỏe cây cà phê nhanh bị suy thoái, dẫn tới chu kỳ kinh doanh của cây cà phê giảm là một tất yếu.

Kết luận

Sản xuất cà phê là thế mạnh của vùng Tây Nguyên, đã góp phần phát triển kinh tế - xã hội, ổn định an ninh trật tự cho khu vực. Tuy nhiên, thực trạng sản xuất cà phê tại Tây Nguyên hiện đang gây bức xúc cho người sản xuất và ngành cà phê, là số diện tích cà phê nằm trong diện già cỗi, thoái hóa, năng suất thấp, kém hiệu quả tăng dần qua từng niên vụ. Song, không phải tất cả các vườn cà phê già cỗi hết khả năng khai thác đều có tuổi trên 20-30 năm, mà có cả những vườn dưới 20 năm, thậm chí chỉ 15 năm. Ngược lại, trong thực tế vẫn có rất nhiều diện tích cà phê trên 20 năm tuổi, thậm chí là 30 năm tuổi vẫn rất “sung sức”. Kết quả điều tra nghiên cứu đã ghi nhận các vườn cà phê kinh doanh ở Tây Nguyên chịu sự tác động tổng hợp của nhiều yếu tố tự nhiên, xã hội và môi trường, những yếu tố có thể

là những nguyên nhân khách quan và chủ quan, vừa là những hạn chế trước mắt, vừa là nguyên nhân tiềm tàng, cùng với sự tác động của biến đổi khí hậu đã làm cho nhiều vườn cà phê kinh doanh ở Tây Nguyên trở nên thiếu tính bền vững. Những nguyên nhân này đã tác động vào chu kỳ sản xuất của vườn cà phê (cũng có thể là một nguyên nhân, cũng có thể do nhiều nguyên nhân đồng thời), dẫn tới hậu quả là các vườn cà phê kinh doanh ở Tây Nguyên có sự phát triển không đồng đều.

Tài liệu tham khảo

[1] Báo cáo tình hình sản xuất cà phê của các Sở Nông nghiệp và Phát triển nông thôn Đắk Lắk, Đắk Nông, Lâm Đồng, Gia Lai, Kon Tum (2012), Hội nghị “Đánh giá chương trình tái canh cà phê năm 2012, phương hướng và giải pháp trong thời gian tới” tại Đà Lạt, Lâm Đồng.

[2] Báo điện tử Chính phủ nước Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (2012), “Cà phê Việt Nam vươn lên đứng đầu thế giới”, <http://baodientu.chinhphu.vn>.

[3] Cục Xúc tiến thương mại (2012), “Thị trường cà phê Việt Nam năm 2012 và một số dự báo”, <http://www.viettrade.gov.vn>.

[4] Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn (2012), “Quyết định Quy hoạch phát triển ngành cà phê Việt Nam đến năm 2020 và tầm nhìn đến năm 2030”.

[5] Cục Trồng trọt (2012), “Báo cáo hiện trạng sản xuất, giải pháp phát triển và trồng tái canh cà phê thời gian tới”, Hội nghị “Đánh giá chương trình tái canh cà phê năm 2012, phương hướng và giải pháp trong thời gian tới” tại Đà Lạt, Lâm Đồng.

[6] Nguyễn Chi Chiêm (1990), “Chẩn đoán nhu cầu dinh dưỡng khoáng của cây cà phê để có cơ sở bón phân hợp lý”, *đề tài cấp nhà nước Xây dựng vườn tập đoàn nghiên cứu giống cà phê chè, với và xác định các biện pháp kỹ thuật canh tác tổng hợp nhằm nâng cao năng suất, chất lượng trong việc kinh doanh cây cà phê*.

[7] Phạm Thị Vượng (2008), *Nghiên cứu ứng dụng thực tế quản lý dịch hại tổng hợp (IPM) và một số giải pháp nông học để nâng cao năng suất cà phê bền vững ở Đắk Lắk*, Báo cáo tổng kết đề tài.

Ảnh hưởng của môi trường nuôi trứng, nuôi phôi lên sự hình thành và phát triển phôi bò sữa cao sản

Nguyễn Thị Hương*, Quản Xuân Hữu, Nguyễn Khánh Vân, Đỗ Văn Hương, Vũ Thị Thu Hương, Nguyễn Thị Lệ Hương

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

Ngày nhận bài 1.6.2015, ngày chuyển phản biện 12.6.2015, ngày nhận phản biện 7.7.2015, ngày chấp nhận đăng 10.7.2015

Mục đích của nghiên cứu này là đánh giá ảnh hưởng của môi trường nuôi thành thực và môi trường nuôi phôi lên hiệu quả tạo phôi bò *in vitro*. Nguồn tế bào trứng sử dụng cho các thí nghiệm thu từ bò sống bằng phương pháp siêu âm; trong đó số tế bào trứng loại A, B đạt 7,2 tế bào trứng/buồng trứng. Tỷ lệ tế bào trứng thành thực, tế bào trứng phân chia, phôi dâu, phôi nang và phôi nang thoát màng của tế bào trứng nuôi thành thực *in vitro* trong môi trường TCM 199 + 10% FCS + 5 µg/ml FSH tương ứng là 89,31; 90,14; 47,65; 23,44 và 3,9%, cao hơn so với tế bào trứng nuôi trong các môi trường TCM 199 + 20% FCS hoặc Ham's F10 + 10% FCS + 5 µg/ml FSH hoặc Ham's F10 + 20% FCS ($p < 0,05$). Nuôi thành thực tế bào trứng bò trong môi trường TCM 199 + FCS + 5 µg/ml FSH và nuôi phôi sau thụ tinh trong môi trường SOFaa + 5% FCS cho hiệu quả tạo phôi bò *in vitro* cao hơn so với nuôi phôi trong môi trường CR1aa + 5% FCS. Mặc dù không có sự khác biệt về tỷ lệ tế bào trứng phân chia khi nuôi trong môi trường SOFaa và CR1aa nhưng tỷ lệ tạo phôi dâu, phôi nang, phôi nang thoát màng trong môi trường SOFaa cao hơn so với môi trường CR1aa (tương ứng là 59,72; 35,42 và 15,27% ở SOFaa và 47,65; 23,44 và 3,9% ở CR1aa). Kết quả nghiên cứu đã chỉ ra rằng, việc sử dụng môi trường nuôi thành thực *in vitro* TCM 199 + 10% FCS + 5 µg/ml FSH và môi trường nuôi phôi SOFaa có bổ sung 5% FCS mang lại hiệu quả cao cho quá trình tạo phôi bò *in vitro* tại Việt Nam.

Từ khóa: bò cao sản, phôi, trứng thành thực.

Chỉ số phân loại 4.2

Đặt vấn đề

Ngày nay, cùng với sự phát triển của khoa học và công nghệ, một kỹ thuật mới đã được sử dụng thay thế cho bước gây rụng trứng nhiều trong công nghệ cấy truyền phôi, đó là kỹ thuật thụ tinh trong ống nghiệm. Kỹ thuật này giúp người chăn nuôi rút ngắn được khoảng cách thế hệ, gia tăng số lượng cá thể trong một thế hệ lên rất nhiều lần. Theo Erickson và cs (1966), mỗi buồng trứng bò trưởng thành có khoảng 70.000 nang trứng nguyên thủy, tuy nhiên bò là động vật đơn thai nên mỗi lần chỉ có một trứng chín rụng, do đó số lượng con sinh ra trong vòng đời của một bò cái là vô cùng nhỏ so với tiềm năng sẵn có của nó [1]. Để khai thác triệt để nguồn tiềm năng này, Pieterse và cs (1988) đã nghiên cứu và công bố phương pháp thu tế bào trứng từ gia súc sống với sự hỗ trợ của hệ thống siêu âm qua âm đạo (OPU) [2]. Tại Việt Nam, Nguyễn Văn Lý và cs (2007) đã nghiên cứu và báo cáo thành

công trong việc sử dụng phương pháp này để thu trứng trên bò sống. Theo báo cáo, tác giả đã thu được trung bình 3,98 tế bào trứng/buồng trứng, tỷ lệ thu trứng là 71,03% [3].

Siêu âm thu tế bào trứng qua âm đạo là một kỹ thuật nhằm thu tế bào trứng chưa thành thực từ con cho còn sống. Tạo phôi trong ống nghiệm từ những con cho còn sống là một kỹ thuật rất linh hoạt bởi nó có thể áp dụng cho những con cho ở tất cả các giai đoạn tuổi, từ những con bê 2 tháng tuổi đến những con bò già. Kỹ thuật OPU có thể áp dụng cho những con bò cận sữa hay đang vắt sữa và thậm chí ở giai đoạn có chữa tháng thứ 3 hay thứ 4 [4]. Ưu điểm của kỹ thuật này là không làm ảnh hưởng tới trạng thái sinh lý của con cho bởi vì nó không đòi hỏi sự kích thích của hormone. OPU thường được áp dụng để thu tế bào trứng với tần suất 2 lần một tuần. Như vậy trong thời gian ngắn có thể tạo ra được nhiều phôi bằng cách cho trứng thụ

*Tác giả chính: Email: giadinhmun@gmail.com

THE EFFECTS OF CULTURE MEDIUM ON IN VITRO OOCYTE MATURATION AND EMBRYO DEVELOPMENT OF HIGH YIELD COW

Summary

The purpose of this study is to assess the influences of maturation and embryo culture media on the production of *in vitro* bovine embryos. Oocytes used in this study have been collected from live cattle by ultrasound method, in which the A, B oocytes have been estimated about 7.2 oocytes per ovary. Percentage of matured oocytes, cleavage, morula, blastocyst and hatched embryos produced from oocytes cultured in maturation medium including TCM 199 + 10% FCS + 5 µg/ml FSH have been 89.31, 90.14, 47.65, 23.44 and 3.9% respectively, which are significantly higher than those produced from oocytes in TCM 199 + 20% FCS or Ham's F10 + 10% FCS + 5 µg/ml FSH or Ham's F10 + 20% FCS ($p < 0.05$). The combination of oocytes matured in TCM 199 + 10% FCS + 5 µg/ml FSH and embryos cultured in SOFaa + 5% FCS has resulted in more effective production of *in vitro* bovine embryos than embryos cultured in CR1aa + 5% FCS. There was no difference in the proportion of cleavage between oocytes cultured in SOFaa (90%) and in CR1aa (90.14%). However, the rates of morula, blastocyst, and hatched embryos produced in SOFaa medium (59.72, 35.42 and 15.27% respectively) have been significantly higher than those produced in CR1aa medium (47.65, 23.44 and 3.9% respectively). This study has demonstrated that using TCM 199 + 10% FCS + 5 µg/ml FSH for oocyte maturation combined with SOFaa medium supplemented with 5% FCS for embryo culture could get more *in vitro* bovine embryos.

Keywords: bovine oocyte, embryo, high yield cow, maturation.

Classification number 4.2

tinh với tinh của những con đực giống mong muốn. Theo Merton và cs (2003), việc áp dụng kỹ thuật siêu âm thu tế bào trứng bò sữa kết hợp với tạo phôi *in vitro* mỗi năm có thể thu được 200 phôi/bò, cao hơn rất nhiều so với kết quả 50 phôi/bò/năm của kỹ thuật gây rụng trứng nhiều [5]. Để thu được phôi bò *in vitro* có chất lượng tốt, chúng tôi tiến hành so sánh một số môi trường nuôi trứng và nuôi phôi *in vitro* khác nhau trong điều kiện nghiên cứu của Việt Nam để tìm ra môi trường nuôi phù hợp nhất.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu

Bò dùng để siêu âm hút tế bào trứng là 4 bò sữa cao sản có năng suất sữa > 5.000 lít/chu kỳ.

Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp siêu âm hút tế bào trứng: quy trình siêu âm, hút tế bào trứng trên bò sữa được áp dụng dựa trên nghiên cứu của Nguyễn Văn Lý và cs (2007) [3].

Đánh giá chất lượng tế bào trứng: tất cả các tế bào trứng sau khi tìm được được tiến hành đánh giá phân loại trên kính hiển vi soi nổi theo phương pháp của Zeron và cs (2001) [6].

Nuôi thành thực *in vitro* tế bào trứng: tế bào trứng loại A, B được nuôi thành thực trong 4 môi trường (TCM 199 + 10% FCS + FSH; TCM 199 + 20% FCS; Ham's F10 + 10% FCS + FSH và Ham's F10 + 20% FCS, trong đó FSH bổ sung 50 µg FSH cho 10 ml môi trường) theo quy trình của Saito và cs (1995) [7]. Hoạt hóa tinh trùng được thực hiện theo quy trình của Saito và cs (1995) [7], trong môi trường BO (Bracket and Oliphant, 1975) [8].

Nuôi phôi *in vitro*: sau khi thụ tinh, các hợp tử giả định được nuôi trong 2 môi trường (SOFaa + 5% FCS và CR1aa + 5% FCS) theo quy trình của Saito và cs (1995) [7].

Đánh giá chất lượng phôi dâu và phôi nang: việc đánh giá chất lượng phôi được thực hiện theo Mapletoft và Bos (2013) [9], dựa trên tiêu chí đánh giá của FAO.

Số liệu được xử lý thống kê bằng phần mềm Excell, sự khác nhau có ý nghĩa được kiểm tra bằng χ^2 sử dụng

hàm CHITEST.

Kết quả và thảo luận

Kết quả thu tế bào trứng bằng siêu âm trên bò sữa cao sản

Nhóm nghiên cứu thu được 1.530 tế bào trứng từ bò sống bằng phương pháp siêu âm với tần suất 2 lần/tuần; trung bình thu được 8,5 tế bào trứng/buồng trứng bò, trong đó tỷ lệ tế bào trứng loại A, B đạt 84,64% (tương đương với 7,2 tế bào trứng loại A, B/buồng trứng) (bảng 1). Kết quả của chúng tôi phù hợp với báo cáo của Phan Lê Sơn (2013) khi tác giả này nghiên cứu ảnh hưởng của tần suất siêu âm tới số lượng tế bào trứng bò thu được. Theo Phan Lê Sơn (2013), tần suất siêu âm 1/2 tuần 1 lần mang lại hiệu quả cao nhất (thu được 8,56 tế bào trứng/buồng trứng), trong đó tế bào trứng loại A là 4 và tế bào trứng loại B là 4,11 [4].

Bảng 1: kết quả thu tế bào trứng bằng siêu âm trên bò sống

Số ca thu trứng	Số tế bào trứng thu được	Số tế bào trứng/buồng trứng	Số tế bào trứng loại A, B thu được	Số tế bào trứng A, B/buồng trứng
n	n	M±SE	n	%±SE
180	1.530	8,5±0,36	1.295	84,64±0,42

Ảnh hưởng của môi trường nuôi trứng đến hiệu quả thành thực in vitro của tế bào trứng bò

Quá trình thành thực nhân tế bào trứng gồm các giai đoạn phát triển chính: kỳ đầu I, tiền kỳ giữa I, kỳ giữa I, kỳ sau I, kỳ cuối I và thành thực nhân. Kỳ cuối I xảy ra khi một bộ nhiễm sắc thể (NST) được tách ra trong thể cực I (giai đoạn này diễn ra rất nhanh), sau đó sẽ hình thành eo thắt tách rời thể cực I ra khỏi tế bào trứng. Tế bào trứng chứa bộ NST đơn bội ở trạng thái kếp dừng ở kỳ giữa giảm phân II sẽ trở thành tế bào trứng thành thực. Như vậy sản phẩm của phân bào giảm nhiễm I là tế bào trứng thứ cấp (noãn bào II) và thể cực thứ nhất nằm ở xoang quanh noãn phía bên trong màng sáng. Do đó tiêu chí đánh giá sự thành thực của trứng dựa trên sự xuất hiện của thể cực thứ nhất là rất chính xác (hình 1). Sau khi nuôi thành thực tế bào trứng, chúng tôi loại bỏ hoàn toàn lớp tế bào nang (cumulus) bao xung quanh tế bào trứng để quan sát thể cực thứ nhất, qua đó đánh giá sự thành thực của tế bào trứng. Kết quả được thể hiện ở bảng 2.



Hình 1: tế bào trứng bò được nuôi thành thực in vitro với sự xuất hiện thể cực thứ nhất

Bảng 2: ảnh hưởng của môi trường nuôi in vitro tới sự thành thực tế bào trứng bò

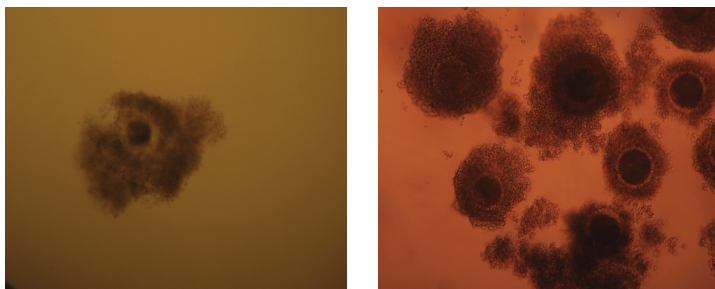
Môi trường	Số tế bào trứng nuôi	Số tế bào trứng thành thực	Tỷ lệ tế bào trứng thành thực
	N	n	%±SE
TCM 199 + FSH + FCS	131	117	89,31±4,15 ^a
TCM 199 + FCS	147	100	68,05±2,28 ^b
Ham F10 + FSH + FCS	157	121	77,07±1,94 ^b
Ham F10 + FCS	180	117	65±2,63 ^c

Các giá trị trong cùng một cột có chữ cái khác nhau là sai khác có ý nghĩa ($p < 0,05$)

Kết quả nghiên cứu cho thấy, tỷ lệ tế bào trứng bò thành thực in vitro trong bốn loại môi trường nuôi dao động từ 65 đến 89,31%. Kết quả này cao hơn so với Nguyễn Văn Lý (2006) [10], (65,61%); Nguyễn Hữu Đức và cs (2003) [11], (76,83%); Yang và cs (1998) [12], (65,61%); Otoi và cs (1997) [13], (77,23%). Sự khác nhau về các kết quả nghiên cứu là do nguồn gốc và chất lượng tế bào trứng. Trong nghiên cứu này chúng tôi sử dụng tế bào trứng thu từ bò sống bằng phương pháp siêu âm hút tế bào trứng, trong khi đó các tác giả trên đều sử dụng nguồn tế bào trứng thu từ buồng trứng ở lò mổ. Tế bào trứng thu từ buồng trứng bò lò mổ thường có chất lượng kém hơn so với tế bào trứng bò thu từ bò sống.

Trong nghiên cứu của chúng tôi, tế bào trứng bò khi được nuôi thành thực in vitro trong môi trường TCM 199 và Ham's F10 có bổ sung FSH cho tỷ lệ thành thực cao hơn so với môi trường TCM 199 và Ham's F10 không có FSH. Kết quả này là phù hợp với báo cáo của Neglia và cs (2001) (87% và 76%) [14]. Các

tác giả này cũng cho rằng việc sử dụng kết hợp FCS và hormone trong môi trường nuôi thành thực sẽ làm tăng tỷ lệ thành thực của tế bào trứng bò. Điều đó cho thấy, FSH có tác động tích cực đến quá trình thành thực *in vitro* của tế bào trứng. Quá trình thành thực của trứng chịu tác động mạnh mẽ của lớp tế bào nang bao xung quanh, bởi vì các tế bào nang chính là cầu nối trao đổi giữa tế bào trứng và môi trường nuôi trong quá trình nuôi thành thực *in vitro*. Sự có mặt của FSH trong môi trường nuôi thành thực sẽ làm tăng quá trình giãn nở của lớp tế bào nang, kích thích quá trình thành thực nhân của tế bào trứng, qua đó sẽ làm tăng tỷ lệ tế bào trứng thành thực sau nuôi *in vitro* (hình 2).



Trứng nuôi trong môi trường có FSH (a) Trứng nuôi trong môi trường không có FSH (b)

Hình 2: trứng sau khi nuôi thành thực

Kết quả thu được cho thấy, môi trường TCM 199 nâng cao được hiệu quả nuôi thành thực *in vitro* tế bào trứng bò hơn môi trường Ham's F10 khi bổ sung FCS hoặc cùng bổ sung FCS và FSH (bảng 2). Điều đó cho thấy, TCM 199 là môi trường phù hợp hơn Ham's F10 trong nuôi thành thực *in vitro* tế bào trứng bò. Trong nghiên cứu của chúng tôi, tỷ lệ tế bào trứng bò thành thực cao nhất là ở môi trường TCM 199 + FSH + FCS (đạt 89,31%, $p < 0,05$). Kết quả này cao hơn so với nghiên cứu của Akçay và cs (2008). Theo nhóm tác giả này, tỷ lệ tế bào trứng bò thành thực trong môi trường TCM 199 có bổ sung FCS và FSH đạt 82,4% [15].

Ảnh hưởng của môi trường nuôi thành thực *in vitro* đến hiệu quả thụ tinh *in vitro* tế bào trứng bò

Trứng bò sau khi được thụ tinh với tinh trùng bò sữa HF đông lạnh, các hợp tử giả định sẽ được nuôi trong môi trường nuôi phôi CR1aa để theo dõi và đánh giá quá trình phát triển. Kết quả thu được cho thấy, tế bào trứng bò được nuôi thành thực *in vitro* trong môi trường TCM 199 và Ham's F10 có bổ sung FCS và FSH cho tỷ lệ tế bào trứng phân chia; tỷ lệ tạo phôi đầu, phôi nang, phôi thoát màng là cao hơn so với môi trường TCM 199 và Ham's F10 bổ sung FCS (bảng 3). Tỷ lệ phân chia (90,14%) và phát triển tới phôi đầu

(47,65%), phôi nang (23,44%) và thoát màng (3,9%) của tế bào trứng được nuôi thành thực *in vitro* trong TCM 199 có bổ sung FCS và FSH là cao hơn so với các môi trường còn lại ($p < 0,05$).

Bảng 3: ảnh hưởng của môi trường nuôi thành thực *in vitro* đến hiệu quả tạo phôi bò *in vitro*

Môi trường	Số tế bào trứng thụ tinh		Số tế bào trứng phân chia		Phôi đầu		Phôi nang		Phôi thoát màng	
	n	N	%±SE		n	%±SE	n	%±SE	n	%±SE
TCM 199 + FSH + FCS	142	128	90,14±1,36		61	47,65±1,71	30	23,44±1,52	5	3,9±1,79
TCM 199 + FCS	115	87	76,65±2,43		29	33,33±1,54	11	12,64±1,83	0	0
Ham F10 + FSH + FCS	121	96	79,34±3,24		31	32,29±1,62	12	12,5±1,35	0	0
Ham F10 + FCS	104	63	60,58±1,71		11	17,46±1,83	2	3,17±2,95	0	0

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

Kết quả ở bảng 3 cho thấy việc bổ sung kết hợp huyết thanh và hormone vào môi trường nuôi thành thực cải thiện được hiệu quả tạo phôi bò *in vitro*. Tuy nhiên tỷ lệ tạo phôi đến giai đoạn cấy truyền (phôi nang) trong nghiên cứu này (23,44%) vẫn thấp hơn so với Saeki và cs (1991) (31%) [16]. Nguyên nhân có thể là do môi trường nuôi phôi của chúng tôi khác so với Saeki và cs (1991) [16]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng môi trường nuôi phôi là CR1aa, còn Saeki và cs (1991) sử dụng môi trường nuôi phôi là TCM 199 có bổ sung tế bào ống dẫn trứng [16]. Có nhiều yếu tố ảnh hưởng đến hiệu quả tạo phôi bò *in vitro* như: chất lượng tế bào trứng, môi trường nuôi thành thực, môi trường nuôi phôi. Để nâng cao được hiệu quả tạo phôi bò *in vitro*, trong nghiên cứu này chúng tôi tiếp tục tiến hành đánh giá ảnh hưởng của môi trường nuôi phôi *in vitro* đến hiệu quả tạo phôi bò *in vitro*.

Ảnh hưởng của môi trường nuôi phôi đến hiệu quả tạo phôi bò *in vitro*

Qua các kết quả thu được, chúng tôi sử dụng trứng nuôi thành thực trong môi trường TCM 199 có bổ sung FCS và FSH để thụ tinh *in vitro* cho thí nghiệm đánh giá ảnh hưởng của hai môi trường nuôi phôi bò là SOFaa và CR1aa cùng được bổ sung 5% FCS đến hiệu quả tạo phôi bò *in vitro*.

Bảng 4: ảnh hưởng của môi trường nuôi phôi đến hiệu quả tạo phôi bò *in vitro*

Môi trường	Số tế bào trứng thụ tinh	Số tế bào trứng phân chia		Phôi đầu		Phôi nang		Phôi thoát màng	
		N	%±SE	n	%±SE	n	%±SE	n	%±SE
SOFaa + FCS	160	144	90±1,65	86	59,72±1,48	51	35,42±1,82	22	15,27±1,79
CR1aa + FCS	142	128	90,14±1,36	61	47,65±1,71	30	23,44±1,52	5	3,9±1,79

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

Kết quả thu được ở bảng 4 cho thấy, không có sự khác nhau về tỷ lệ phân chia của các tế bào trứng ở hai lô thí nghiệm. Tuy nhiên, kết quả cho thấy nuôi phôi trong môi trường SOFaa cho tỷ lệ tạo phôi đầu, phôi nang và phôi nang thoát màng (hình 3) cao hơn so với môi trường CR1aa ($p < 0,05$). Kết quả này thể hiện ưu thế rõ rệt của môi trường SOFaa trong việc tạo phôi bò *in vitro* so với môi trường CR1aa.



Phôi đầu Phôi nang Phôi nang đang thoát màng

Hình 3: phôi bò ở các giai đoạn phát triển phôi đầu, phôi nang và thoát màng

Theo Campos (2010), khi bổ sung 5% FCS vào môi trường nuôi phôi bò sẽ làm tăng tỷ lệ phôi nang [17]. Cũng đồng quan điểm như vậy, Taraves và cs (2008) đã nuôi phôi trong môi trường SOFaa + 5% FCS và nhận thấy tỷ lệ phôi phân chia, phôi nang, phôi nang thoát màng (tương ứng là 83,37; 53,68 và 30,87%) cao hơn so với môi trường SOFaa + 10% FCS (tương ứng là 80,46; 28,15 và 21,85%). Theo Taraves và cs, việc bổ sung 5% FCS vào môi trường nuôi phôi sẽ làm cho hàm lượng lipid thấp, giảm sự tích lũy các giọt mỡ nội bào, qua đó làm thay đổi hoạt động của ty thể, dẫn tới những thay đổi trong trao đổi năng lượng của phôi trong môi trường nuôi phôi [18]. Những sự thay đổi này sẽ giúp nâng cao tỷ lệ tạo phôi so với môi trường nuôi phôi có bổ sung 10% FCS.

Kết luận

Môi trường nuôi thành thực *in vitro* TCM 199 + FCS + FSH mang lại hiệu quả cao cho quá trình nuôi

thành thực *in vitro* tế bào trứng bò.

Môi trường nuôi phôi *in vitro* SOFaa bổ sung 5% FCS cho hiệu quả tạo phôi bò *in vitro* tốt hơn môi trường CR1aa bổ sung 5% FCS trong điều kiện tại Việt Nam.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu được thực hiện với sự hỗ trợ kinh phí từ đề tài cấp nhà nước mã số ĐT-PTNTĐ.2011-G/11. Nhóm nghiên cứu cảm ơn Phòng thí nghiệm trọng điểm công nghệ tế bào động vật - Viện Chăn nuôi đã cho phép sử dụng các thiết bị phục vụ cho đề tài.

Tài liệu tham khảo

- [1] Erickson B.H (1966), "Development and senescence of the postnatal bovine ovary", *J Anim Sci*, **25**, pp.800-805.
- [2] Pieterse M.C, Kappen K.A, Kruip Th.A.M, Taverne M.A.M (1988), "Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries", *Theriogenology*, **30(4)**, pp.751-762.
- [3] Nguyễn Văn Lý, Lưu Công Khánh, Nguyễn Thị Thoa, Phan Lê Sơn, Chu Thị Yên, Nguyễn Thị Kim Anh, Vũ Ngọc Hiếu (2007), "Nghiên cứu ứng dụng kỹ thuật siêu âm hút tế bào trứng từ bò sông để tạo phôi trong ống nghiệm", *Tạp chí Khoa học công nghệ chăn nuôi*, **Số 1**, trang 54-58.
- [4] Phan Lê Sơn (2013), "Nghiên cứu một số yếu tố ảnh hưởng đến hiệu quả của kỹ thuật siêu âm hút tế bào trứng để tạo phôi trong ống nghiệm", *Luận án tiến sỹ khoa học nông nghiệp*.
- [5] Merton J.S, W De Roos A.P, Mullaart E, De Ruigh L, Kaal L, Vos P.L.A.M, Dieleman S.J (2003), *Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry*.
- [6] Zeron Y.A, Ocheretny O, Keda A, Borochoy D, Skla Arav A (2001), "Seasonal changes in bovine fertility: Relation to developmental competence of oocytes, membrane properties and fatty acid composition of follicles", *Reproduction*, **121**, pp. 447-454.
- [7] Saitoh N, Kanagawa H, Shimohira I (1995), "Manual of bovine embryo transfer", *Japan Livestock Technology association*.
- [8] Bracket B.G, Oliphant G (1975), "Capacitation of rabbit spermatozoa *in vitro*", *Biol Reprod*, **12**, pp.260-274.
- [9] Mapletoft R.J, Bos G.A (2013), "Evaluation and classification of bovine embryos Anim", *Reprod*, **10(3)**, pp.344-348.
- [10] Nguyễn Văn Lý (2006), "Nghiên cứu các yếu tố ảnh hưởng đến kết quả thụ tinh trong ống nghiệm ở bò tại Việt Nam", *Luận án tiến sỹ nông nghiệp*, Viện Chăn nuôi, trang 140-143.

[11] Nguyễn Hữu Đức, Nguyễn Thị Ước, Lê Văn Ty, Quản Xuân Hữu, Nguyễn Trung Thành, Bùi Linh Chi, Nguyễn Văn Hạnh, Nguyễn Thùy Anh, Nguyễn Việt Linh, Bùi Xuân Nguyên (2003), “Kết quả thụ tinh ống nghiệm và cấy phôi ở bò lai Sind”, *Hội nghị Công nghệ sinh học toàn quốc*, NXB Khoa học và Kỹ thuật, trang 699-702.

[12] Yang X, Kupota C, Suzuki H, Taneja M, Bols P.E.J, Presicce G.A (1998), “Control of oocyte maturation in cows - biological factors”, *Theriogenology*, **49**, pp.471-482.

[13] Otoi T, Yamamoto K, Koyama N, Tachikawa S, Suzuki T (1997), “Bovine oocyte diameter in relation to developmental competence”, *Theriogenology*, **48**, pp.769-774.

[14] Neglia G, Marin M, Di Palo R, Wilding M, Caracciolo di Brienza V, Dale B, Gasparrini B, Zicarelli L (2001), “A comparison of *in vitro* maturation in buffalo (*Bubalus hbulis*) and bovine oocytes using confocal microscopy”,

Theriogenology, **55**, pp.488.

[15] Akçay E, Uysal O, Yavas I and Ar U (2008), “The effects of serum, steroid and gonadotropins on *in vitro* maturation and fertilization of bovine oocytes”, *Journal of Animal and Veterinary Advances*, **7(2)**, pp.178-183.

[16] Saeiki K, Hoshi M, Leibfried-Ruthledge M.L, First N.L (1991), “*In vitro* fertilization and development of bovine oocytes matured in Serum-free medium”, *Biol Reprod*, **44**, pp.256-60.

[17] Campos J.M.A (2010), “Effects of serum addition to culture medium on gene expression in day - 7 and day - 14 bovine embryos”, *Thesis Master of Science*.

[18] Tavares L.M.T, Feitosa W.B, Mello M.R.B, Nicácio A.C, Lima A.S, Assumpção M.E.O.A, Visintin J.A (2008), “Is the early reduction of fetal calfserum concentration in bovine *in vitro* embryo culture beneficial, Anim”, *Reprod*, **5(1/2)**, pp.34-38.

Xác định giá trị năng lượng trao đổi của bột lá keo giậu trên gà thịt giống Lương Phượng

Từ Quang Hiến^{1*}, Từ Quang Trung², Trần Việt Hà³

¹Đại học Thái Nguyên

²Trường Đại học Sư phạm, Đại học Thái Nguyên

³Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Thái Nguyên

Ngày nhận bài 1.7.2015, ngày chuyển phản biện 7.7.2015, ngày nhận phản biện 10.8.2015, ngày chấp nhận đăng 14.8.2015

Thí nghiệm xác định năng lượng trao đổi (NLTD) của bột lá keo giậu (*Leucaena leucocephala*) được thực hiện trên gà thịt giống Lương Phượng ở giai đoạn 43-49 ngày tuổi. NLTD của bột lá keo giậu (BLKG) được xác định theo phương pháp có hiệu chỉnh theo lượng nitơ tích lũy trong cơ thể gà. Thí nghiệm được thực hiện trên tổng số 60 con gà, được chia thành 2 lô, lô 1 ăn khẩu phần cơ sở (KPCS) và lô 2 ăn khẩu phần thí nghiệm (KPTN), mỗi lô 30 con được nuôi trong 5 lồng (6 con x 5 lần lặp lại). KPCS không chứa BLKG, KPTN được phối hợp từ 80% KPCS + 20% BLKG, cả hai khẩu phần được bổ sung 1,5% khoáng không tan trong axit clohydric. Trên cơ sở xác định năng lượng thô và phân tích protein, khoáng không tan của 2 khẩu phần và chất thải của 2 lô gà, tính được NLTD của 2 khẩu phần và của BLKG. Kết quả cho thấy: NLTD có hiệu chỉnh theo lượng nitơ tích lũy trong cơ thể gà của BLKG là 2377,1 kcal/kg vật chất khô (VCK) và 2151,9 kcal/kg bột lá nguyên trạng (90,53% VCK).

Từ khóa: bột lá keo giậu, năng lượng trao đổi, nitơ tích lũy.

Chỉ số phân loại 4.2

DETERMINATION OF METABOLIC ENERGY VALUE OF LEUCEANA LEUCOCEPHALA LEAF MEAL ON LUONG PHUONG BROILER CHICKEN

Summary

A study on determining the metabolic energy of *L. leucocephala* leaf meal with corrected energy based on the nitrogen retention in chicken body was carried out on 60 Luong Phuong broiler chickens from 43 to 49 days of age, divided into 2 groups and 30 chickens per group. The chickens of group 1 was fed basal diet (BD); group 2 was fed experimental diet containing 80% of BD + 20% of *L. leucocephala* leaf meal; and both diets were supplemented 1.5% insoluble mineral. Crude energy and dry matter (DM), insoluble mineral, nitrogen in DM of diets and fecal of 2 groups were determined, and then the metabolic energy of two diets and *L. leucocephala* leaf meal were calculated. The results showed that the metabolic energy values of 1 kg DM and 1 kg *L. leucocephala* leaf meal with 90.53% DM content were 2377.0 kcal and 2151.9 kcal respectively.

Keywords: *Leucaena leucocephala* leaf meal, metabolic energy, nitrogen retention.

Classification number 4.2

Đặt vấn đề

Keo giậu là cây thân gỗ thuộc họ đậu (Fabaceae), được trồng phổ biến ở nhiều châu lục như: Á, Úc và Mỹ la tinh. Keo giậu được thu cắt nhiều lứa trong năm, có khả năng tái sinh tốt. Sản lượng lá, ngọn non của keo giậu có thể cho gia súc (trâu, bò, lợn, thỏ...) ăn tươi, cũng có thể chế biến thành bột lá để phối hợp vào thức ăn hỗn hợp, bột lá bảo quản trong vòng 6 tháng vẫn có chất lượng tốt.

BLKG khá giàu protein (25-30% trong VCK), giàu sắc tố (227-518 mg carotene/kg VCK, 741-865 mg xanthophyll/kg VCK) [1]. Sắc tố có ảnh hưởng đến tỷ lệ đậu thai, giảm thai chết lưu ở gia súc sinh sản, tăng tỷ lệ nuôi sống ở gia súc, gia cầm non và cá con, tăng độ đậm màu da, thịt gà, tăng tỷ lệ trứng có phôi ấp nở ở gia cầm

*Tác giả chính: Email: tqhien.dhtn@moet.edu.vn

[2]. Chính vì các ưu điểm này mà hàng năm, BLKG được sản xuất và sử dụng trong chăn nuôi với số lượng lớn ở nhiều nước trên thế giới. Ở nước ta, keo giầu cũng đã được nghiên cứu và sử dụng trong chăn nuôi. Tuy nhiên, hầu như chưa có nghiên cứu nào xác định giá trị NLTĐ của BLKG trên gà thịt. Do đó, chúng tôi thực hiện đề tài này nhằm tạo tiền đề cho các nghiên cứu tiếp theo và tạo cơ sở khoa học cho việc sử dụng BLKG trong chăn nuôi.

Nội dung và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu là BLKG và gà thịt giống Lương Phượng.

Thí nghiệm được tiến hành tại Trường Đại học Nông Lâm (Đại học Thái Nguyên). Thành phần hóa học của BLKG, thức ăn được phân tích tại Viện Khoa học Sự sống (Đại học Thái Nguyên).

Nội dung thí nghiệm là xác định giá trị NLTĐ của BLKG trên gà thịt giống Lương Phượng. Thí nghiệm được thực hiện theo phương pháp xác định giá trị NLTĐ có sự hiệu chỉnh theo lượng nitơ (N) tích lũy trong cơ thể gà. Nội dung chi tiết của phương pháp này được trình bày ở phần dưới đây.

Bố trí thí nghiệm: thí nghiệm với 2 khẩu phần: 1) KPCS không có BLKG; 2) KPTN có BLKG và được hình thành từ 80% KPCS + 20% BLKG.

Mỗi khẩu phần được thí nghiệm với 30 con gà (15 trống + 15 mái) ở giai đoạn 43-49 ngày tuổi, nuôi trong 5 lồng, mỗi lồng 6 con (3 trống, 3 mái).

KPCS được phối hợp như khẩu phần ăn của gà thịt lông màu ở giai đoạn 43-70 ngày tuổi (bảng 1).

Bảng 1: thành phần nguyên liệu của KPCS

TT	Thành phần nguyên liệu	Tỷ lệ (%)
1	Bột ngô	65,0
2	Cám mỳ	3,70
3	Khô dầu đậu tương	22,0
4	Bột cá	6,00
5	Methionin	0,10
6	Muối ăn	0,55
7	DCP	2,15
8	Premix vitamin	0,30
9	Premix khoáng	0,20

KPCS và KPTN đều được bổ sung 1,5% khoáng không tan trong axit chlohydric.

Cách tiến hành thí nghiệm: gà được nuôi 6 con (3 trống + 3 mái) trong một lồng thí nghiệm, dưới mỗi lồng đều lót tấm nilon để thu gom chất thải riêng của từng lồng. Gà được làm quen với thức ăn thí nghiệm 4 ngày, thời gian thí nghiệm 3 ngày, gà được ăn, uống tự do. Chất thải ở từng lồng được thu gom 2 lần/ngày. Chất thải của mỗi lần lặp lại của 1 lô trong 3 ngày được trộn đều và bảo quản ở -20°C cho đến khi phân tích mẫu.

Các chỉ tiêu theo dõi gồm: chất khô (DM) của khẩu phần và phân, năng lượng thô của VCK của khẩu phần và phân (GE_d và GE_c), tỷ lệ khoáng không tan trong VCK của khẩu phần và phân (AIA_d và AIA_c), tỷ lệ N trong VCK của khẩu phần và phân (N_d và N_c).

Lấy mẫu thức ăn, phân tích VCK, phân tích protein tổng số theo TCVN.

NLTĐ biểu kiến của khẩu phần ME_d (kcal/kg DM) được tính theo công thức sau:

ME_d (biểu kiến) = $GE_d - GE_c \times AIA_d/AIA_c$ (Scott và Hall, 1998) [3].

NLTĐ của ME_N (kcal/kg DM) được tính theo công thức sau:

$$ME_N (\text{hiệu chỉnh}) = ME_d - 8,22 \times NR$$

Trong đó: 8,22 là năng lượng của axit uric (kcal/g); NR là lượng N tích lũy (g/kg), được tính như sau:

$NR = (N_d - N_c \times AIA_d/AIA_c) \times 1000/100$ (Lammers và cs, 2008) [4].

Giá trị NLTĐ của 1 kg VCK BLKG được tính theo công thức sau:

$$ME_N = [ME_{N \text{ của KPTN}} - (ME_{N \text{ của KPCS}} \times 80\%)]/200 \times 1000$$

Giá trị ME_N của BLKG nguyên trạng được tính theo công thức:

$$ME_N \text{ của 1 kg VCK} \times \text{tỷ lệ VCK của BLKG} (\%).$$

Các số liệu thu thập được xử lý trên máy vi tính bằng phần mềm Excel, Version 7.0.

Kết quả và thảo luận

Kết quả phân tích khẩu phần và chất thải

Tỷ lệ VCK, protein, khoáng không tan của KPCS, KPTN và chất thải của 2 lô gà đã được phân tích trước khi tiến hành thí nghiệm, kết quả thể hiện trong bảng 2.

Bảng 2: kết quả phân tích các khẩu phần và chất thải (n = 5)

Chỉ tiêu		VCK (%)	Trong VCK		
			Protein (%)	Năng lượng thô (kcal/kg VCK)	AIA (%)
Thức ăn	KPCS	88,62	20,1421	4242,0	2,1861
	KPTN	89,03	21,5658	4374,3	2,1460
	BLKG	90,53	27,5931	4981,3	-
Chất thải	KPCS	28,02	27,5252	3317,5	5,8922
	KPTN	27,78	29,1681	3913,6	5,7771

Tỷ lệ VCK, protein và năng lượng thô của BLKG lớn hơn so với KPCS. Vì vậy, các chỉ tiêu này của KPTN (80% KPCS + 20% BLKG) cũng lớn hơn KPCS. Tỷ lệ VCK trong chất thải của KPTN nhỏ hơn KPCS. Tuy nhiên, tỷ lệ VCK của chất thải không chỉ phụ thuộc vào tỷ lệ tiêu hóa, hấp thu các chất dinh dưỡng của khẩu phần mà nó còn phụ thuộc vào lượng nước thu nhận của gà. Lượng nước uống vào nhiều sẽ làm cho tỷ lệ VCK của chất thải giảm.

Tỷ lệ protein và hàm lượng năng lượng thô/kg VCK trong chất thải của KPTN lớn hơn và tỷ lệ khoáng không tan trong chất thải của KPTN nhỏ hơn so với KPCS. Điều này chứng tỏ tỷ lệ tiêu hóa, hấp thu các chất dinh dưỡng của KPTN nhỏ hơn so với KPCS.

Kết quả xác định N trong VCK khẩu phần, chất thải và năng lượng hiệu chỉnh

Dựa vào kết quả phân tích protein trong khẩu phần, chất thải và công thức tính lượng N tích lũy trong cơ thể khi gà thu nhận 1 kg VCK thức ăn và công thức tính NLĐ hiệu chỉnh đã nêu trong mục nội dung và phương pháp nghiên cứu, chúng tôi tính được lượng N tích lũy và NLĐ của các khẩu phần (bảng 3).

Bảng 3: N trong khẩu phần, chất thải, tích lũy trong cơ thể gà và NLĐ cần hiệu chỉnh

Chỉ tiêu	Đơn vị tính	KPCS	KPTN
N trong VCK của khẩu phần	% VCK	3,2227	3,4505
N trong VCK của chất thải	% VCK	4,4040	4,6669
N tích lũy trong cơ thể gà	g/kg VCK	15,888	17,167
NLĐ cần hiệu chỉnh	kcal/kg VCK	130,6	141,1

Kết quả bảng 3 cho thấy, tỷ lệ N trong KPTN lớn hơn so với KPCS 0,2278%, và tỷ lệ N trong chất thải

của KPTN lớn hơn KPCS 0,2629%. Điều này chứng tỏ, tỷ lệ tiêu hóa, hấp thu protein của BLKG thấp hơn so với KPCS. Kết quả cuối cùng cho thấy, lượng N tích lũy khi gà ăn 1 kg VCK của KPCS và KPTN là 15,888 và 17,167 g. Theo Hồ Lê Quỳnh Châu và cs (2010), Phạm Tấn Nhã (2014), hàm lượng N tích lũy trong cơ thể gà khá rộng, dao động từ 8,09 đến 22,378 g/kg VCK tùy thuộc vào loại thức ăn và loại khẩu phần [5, 6]. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi nằm trong khoảng dao động này.

Căn cứ vào hàm lượng N tích lũy/kg VCK của KPTN và KPCS, chúng tôi đã tính được NLĐ cần phải hiệu chỉnh của 2 khẩu phần tương ứng là 130,6 và 141,1 kcal/kg VCK.

NLĐ của các khẩu phần và BLKG

Căn cứ vào hàm lượng năng lượng thô và khoáng không tan trong khẩu phần và chất thải của 2 lô gà, chúng tôi đã tính được NLĐ biểu kiến của 2 khẩu phần, cụ thể như sau:

$$ME_{N \text{ của KPCS}} = 3011,2 - 130,6 = 2880,6 \text{ kcal/kg VCK}$$

$$ME_{N \text{ của KPTN}} = 2921,0 - 141,1 = 2779,9 \text{ kcal/kg VCK}$$

Dựa vào NLĐ có hiệu chỉnh của 2 khẩu phần để tính NLĐ của BLKG như sau:

$$ME_{N \text{ của VCK BLKG}} = [2779,9 - (2880,6 \times 80\%)] \times 1000/200 = 2377,1 \text{ kcal/kg VCK}$$

$$ME_{N \text{ BLKG nguyên trạng}} = 2377,1 \times 90,53\% = 2151,9 \text{ kcal/kg VCK}$$

Kết quả tính toán ở trên được hệ thống lại trong bảng 4.

Bảng 4: NLĐ của các khẩu phần và BLKG

Chỉ tiêu	Đơn vị tính	KPCS	KPTN	BLKG
ME _d (NLĐ biểu kiến)	kcal/kg VCK	3011,2	2921,0	-
ME hiệu chỉnh theo NR	kcal/kg VCK	130,6	141,1	-
ME _N (NLĐ sau hiệu chỉnh)	kcal/kg VCK	2880,6	2779,9	-
ME _N của VCK bột lá	kcal/kg VCK	-	-	2377,1
ME _N bột lá nguyên trạng	kcal/kg bột lá	-	-	2151,9

Kết quả bảng 4 cho thấy, NLĐ biểu kiến và sau hiệu chỉnh của KPTN đều nhỏ hơn KPCS (2921,0 so với 3011,2 và 2779,9 so với 2880,6). Điều đó chứng tỏ, NLĐ của BLKG nhỏ hơn KPCS. Thực tế tính toán cho thấy: NLĐ của BLKG là 2377,1 kcal/kg VCK, nhỏ hơn KPCS là 634,1 kcal/kg VCK.

Kết luận

NLTĐ có sự hiệu chỉnh theo lượng N tích lũy của BLKG trong cơ thể gà thịt giống Lương Phượng là 2377,1 kcal/kg VCK và 2151,9 kcal/kg bột lá nguyên trạng (90,53% VCK).

Tài liệu tham khảo

[1] Từ Quang Hiền, Nguyễn Đức Hùng, Nguyễn Thị Liên, Nguyễn Thị Inh (2008), *Nghiên cứu sử dụng keo giậu trong chăn nuôi*, Nhà xuất bản Đại học Thái Nguyên.

[2] Từ Quang Hiền, Trần Văn Phùng, Phan Đình Thắm, Trần Thanh Vân, Từ Trung Kiên (2013), *Dinh dưỡng và thức ăn chăn nuôi*, Giáo trình sau đại học, Trường Đại học Nông Lâm Thái Nguyên.

[3] Scott T.A and Hall J.W (1998), “Using acid insoluble ash marker ratio (diet: digesta) to predict digestibility of wheat and barley metabolizable energy and nitrogen retention”, *Poultry Sci*, **67**, pp.145-148.

[4] Lammers P.I, Kerr B.T, Honeyman M.S, Stalder K, Dozier W.A, Weber T.E, Kidd M.T and Bregendahl K (2008), “Nitrogen - corrected apparent metabolizable energy value of crude glycerol for laying hens”, *Poultry Sci*, **87**, pp.104-107.

[5] Hồ Lê Quỳnh Châu, Vũ Chí Cường, Đàm Văn Tiễn (2010), “Giá trị NLTĐ có hiệu chỉnh N và tỷ lệ tiêu hóa các chất dinh dưỡng trong một số loại thức ăn cho gà”, *Báo cáo khoa học 2009, phần dinh dưỡng và thức ăn chăn nuôi*, Viện Chăn nuôi.

[6] Phạm Tấn Nhã (2014), “Nghiên cứu giá trị dinh dưỡng của một số loại thức ăn trong chăn nuôi gà Sao giai đoạn sinh trưởng ở Đồng bằng sông Cửu Long”, *Luận án tiến sĩ nông nghiệp*, Đại học Huế.

Tập tính ăn 3 loại lá rừng ngập mặn, hàm lượng dinh dưỡng trong lá và phân Ba khía tại Cà Mau

Võ Ngươn Thảo^{1*}, Nguyễn Vũ Minh², Trương Thị Nga²

¹Trung tâm Nghiên cứu thực nghiệm lâm nghiệp Tây Nam Bộ

²Khoa Môi trường và Tài nguyên thiên nhiên, Trường Đại học Cần Thơ

Ngày nhận bài 6.5.2015, ngày chuyển phản biện 8.5.2015, ngày nhận phản biện 19.6.2015, ngày chấp nhận đăng 22.6.2015

Nghiên cứu tập tính ăn lá cây rừng ngập mặn (RNM) của Ba khía (*Sesarma* sp.) tại xã Viên An, huyện Ngọc Hiển, tỉnh Cà Mau cho thấy: đối với lá đước, Ba khía ăn lá vàng nhiều hơn lá xanh; đối với lá mắm, không có sự chọn lựa giữa hai tình trạng lá xanh và lá vàng; đối với lá vẹt, Ba khía ăn lá vàng nhiều hơn lá xanh. Kết quả thí nghiệm về sự lựa chọn 3 loại lá cho thấy, đối với lá vàng thì Ba khía thích ăn lá mắm vàng nhiều nhất, tiếp đến lá vẹt vàng và ít nhất là lá đước vàng; đối với tình trạng lá xanh, Ba khía thích ăn lá mắm xanh nhiều nhất và không có sự chọn lựa giữa lá vẹt xanh với lá đước xanh. Hàm lượng dinh dưỡng (C, N, P) trong lá vàng đều thấp hơn trong lá xanh. Khi qua hệ thống tiêu hóa của Ba khía, tỷ lệ C/N đã giảm đi đáng kể. Đối với lá vẹt vàng, tỷ lệ C/N ở mẫu phân giảm 3,96 lần so với mẫu lá (từ 94,49 còn 23,88), tương tự ở lá mắm vàng giảm 3,43 lần (từ 68,33 còn 19,94); còn đối với lá xanh, tỷ lệ này giảm 2,49 lần ở lá vẹt xanh (từ 52,81 xuống 21,2) và 1,5 lần ở lá mắm xanh (từ 35,04 xuống 23,02). Hàm lượng dinh dưỡng khi qua hệ thống tiêu hóa của Ba khía tăng lên đáng kể đã chứng minh Ba khía có vai trò quan trọng trong chu trình chuyển hóa dinh dưỡng của RNM và là một trong những mắt xích quan trọng trong mạng lưới thức ăn của RNM.

Từ khóa: ba khía, chu trình dinh dưỡng, lá rừng, RNM.

Chỉ số phân loại 4.4

Mở đầu

RNM là nguồn tài nguyên thiên nhiên quý giá vùng ven biển, không những cung cấp các lâm sản có giá trị, là nơi nuôi dưỡng và sinh sản của nhiều loài thủy hải sản có giá trị kinh tế cao mà còn có tác dụng to lớn trong việc hạn chế gió, bão, sóng lớn, bảo vệ bờ biển, bờ sông, điều hòa khí hậu... [1]. Hiện nay, diện tích RNM ngày càng giảm sút do các tác động trực tiếp, gián tiếp của con người và do những biến cố môi trường. Chu trình dinh dưỡng trong nền RNM là yếu tố quan trọng góp phần vào sự sinh trưởng và phát triển của RNM. Trong đó, Ba khía tham gia vào chu trình dinh dưỡng của RNM thông qua việc tiêu thụ vật rụng góp phần bảo vệ và phát triển rừng. Tuy nhiên, tại các vùng ven biển, Ba khía đang chịu áp lực bị khai thác rất mạnh nên số lượng Ba khía đang suy giảm nhanh chóng. Từ những lợi ích của Ba khía đối với RNM và sự suy giảm nhanh chóng của loài này, cần có những nghiên cứu về tập tính ăn của Ba khía với các loại lá rừng nhằm tạo cơ sở để bảo vệ và duy trì Ba khía trong RNM Cà Mau. Do đó, chúng tôi đã thực hiện đề tài “Nghiên cứu tập tính ăn lá RNM của Ba khía” tại tỉnh Cà Mau.

Phương pháp nghiên cứu

Nghiên cứu được tiến hành từ tháng 10.2013 đến tháng 10.2014 tại xã Viên An, huyện Ngọc Hiển, tỉnh Cà Mau. Đối tượng nghiên cứu là loài Ba khía - đây là loài ưu thế trong khu vực nghiên cứu được chọn để tìm hiểu tập tính ăn lá của chúng.

Thực vật nghiên cứu là 3 loài cây RNM: đước đôi (*Rhizophora apiculata*.), mắm trắng (*Avicenia alba*) và vẹt (*Bruguiera parviflora*.) [2].

Bố trí thí nghiệm và thu mẫu

Mẫu lá: đước cân khối lượng trước, đo chiều dài, rộng của lá. Chọn những lá đồng cỡ. Mỗi mẫu lá sử dụng kéo cắt dọc theo gân chính của lá chia làm đôi (cắt bỏ phần gân chính), một phần được dùng cho Ba khía ăn, một phần làm mẫu đối chứng, cân xác định khối lượng tươi trước khi thí nghiệm.

Ba khía: chọn khu vực Ba khía phân bố nhiều trong RNM, đem cân khối lượng, chọn những con đực và cái có kích cỡ tương tự nhau. Để sau thời gian 24 giờ cho Ba khía thải hết phân từ việc ăn thức ăn ngoài môi

*Tác giả chính: Email: vnthaovnb@vaf.s.gov.vn

THE HABIT OF EATING THREE KINDS OF MANGROVE LEAVES, NUTRIENT CONTENT IN MANGROVES LEAVES AND FECES OF *SESARMA SP.* IN CA MAU PROVINCE

Summary

The study on feeding habit of *Sesarma sp.* in Vien An commune, Ngoc Hien district, Ca Mau province have shown that: for mangrove leaves, *Sesarma sp.* eats more yellow leaves than green leaves; for *Avicenia alba* leaves, *Sesarma sp.* eats no choice about yellow leaves and green leaves and for *Bruguiera sp.*, *Sesarma sp.* eats more yellow leaves than green leaves. The experimental results about the choice between three types of leaves of *Sesarma sp.* have shown that: for yellow leaves, *Sesarma sp.* likes *Avicenia alba* leaves most, followed by *Bruguiera sp.* leaves and *Rhizophora sp.* leaves; for green leaves, *Sesarma sp.* likes green *Avicenia alba* leaves most and has no choice about *Bruguiera sp.* and *Rhizophora sp.* leaves. The nutrient content (C, N, P) in yellow leaves is lower than that in green leaves. When food goes through the digestive system, nutrition (C/N) has been significantly reduced. As for yellow leaves, the C/N ratio in *Bruguiera sp.* has been decreased 3.96 times from 94.49 in feces to 23.88 in leaf, and this ratio in yellow *Avicenia alba* leaf has been reduced 3.43 times from 68.33 (feces) to 19.94 (leaf). The ratios in *Bruguiera sp.* and *Avicenia alba* green leaves has been reduced 2.49 times and 1.5 times respectively. The nutrient content goes to the digestive system of *Sesarma sp.* has significantly increased which shows that *Sesarma sp.* is very important in nutrient cycle of mangrove forest and is one of the important links in the nutrient network of mangrove forest.

Keywords: mangrove forests, mangrove forest leaf, nutrient cycle, *Sesarma sp.*

Classification number 4.4

trường rồi tiến hành thí nghiệm.

Khung nuôi: chuẩn bị các khung lưới có kích thước 40 x 40 x 40 cm. Đáy có lót 1 lớp gỗ mỏng. Thí nghiệm để trực tiếp trên nền rừng tự nhiên, ngập nước bán liên tục, dưới tán RNM, thủy triều lên xuống 2 lần/ngày, lúc thủy triều lên cao ngập khung khoảng 2-6 cm. Thời gian thực hiện thí nghiệm vào mùa khô (tháng 1.2014) nên trời nắng, không mưa.

Xác định loại lá ưa thích của *Ba khía*

Bố trí thí nghiệm có 4 nghiệm thức (NT), mỗi NT có 3 lần lặp lại, theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên. Trong đó, NT2 và NT4 làm NT đối chứng của các NT1 và NT3.

NT1: *Ba khía* + hỗn hợp lá xanh (đước, mắm, vẹt); NT2 (đối chứng): hỗn hợp lá xanh (đước, mắm, vẹt) (không *Ba khía*); NT3: *Ba khía* + hỗn hợp lá vàng (đước, mắm, vẹt); NT4 (đối chứng): hỗn hợp lá vàng (đước, mắm, vẹt) (không *Ba khía*).

Trong đó, mẫu lá: chọn những loại lá đồng cỡ (chiều dài: lá đước khoảng 11 cm, lá mắm khoảng 6 cm, lá vẹt khoảng 8 cm; chiều rộng: lá đước khoảng 3 cm, lá mắm khoảng 3 cm, lá vẹt khoảng 2 cm). *Ba khía*: chọn những con đực và cái có kích cỡ tương tự nhau (khoảng 150-170 g/con, kích thước mai 45 x 25 mm).

Thí nghiệm được thực hiện trong các khung nuôi ngoài môi trường tự nhiên, các lá thí nghiệm được cân trở lại sau 12, 24 và 48 giờ để khảo sát khả năng lựa chọn các loại lá cây RNM của *Ba khía*. Bảo quản trong bọc nylon kín.

Xác định các tình trạng lá chọn lựa của *Ba khía*

Bố trí thí nghiệm có 6 NT, mỗi NT có 3 lần lặp lại, theo kiểu ngẫu nhiên hoàn toàn đầy đủ. Trong đó, NT2, NT4, NT6 làm NT đối chứng của các NT1, NT3 và NT5.

NT1: *Ba khía* + lá đước vàng và lá đước xanh; NT2: lá đước vàng, lá đước xanh (không *Ba khía*); NT3: *Ba khía* + lá mắm vàng, lá mắm xanh; NT4: lá mắm vàng, lá mắm xanh (không *Ba khía*); NT5: *Ba khía* + lá vẹt xanh, lá vẹt vàng; NT6: lá vẹt xanh, lá vẹt vàng (không *Ba khía*).

Thí nghiệm được thực hiện trong các khung nuôi ngoài môi trường tự nhiên, các lá thí nghiệm được cân trở lại sau 12, 24 và 48 giờ để khảo sát khả năng lựa chọn các tình trạng lá RNM của *Ba khía*; bảo quản trong bọc nylon kín.

Thí nghiệm xác định hàm lượng C, N, P trong phân Ba khía

Thí nghiệm thực hiện có 6 NT, mỗi NT có 3 lần lặp lại nhưng cho ăn từng loại lá khác nhau: NT1: Ba khía + lá đước vàng; NT2: Ba khía + lá đước xanh; NT3: Ba khía + lá mắm vàng; NT4: Ba khía + lá mắm xanh; NT5: Ba khía + lá vệt xanh; NT6: Ba khía + lá vệt vàng.

Thu mẫu phân: sau 48 giờ bố trí thí nghiệm, Ba khía ăn các loại lá khác nhau nên thải ra những loại phân khác nhau, khối lượng phân trong các NT khoảng 5 g/NT, tiến hành thu mẫu phân trên miếng gỗ để tiến hành phân tích các chỉ tiêu dinh dưỡng C, N, P. Để khô trong điều kiện bình thường, sau đó bảo quản trong bọc nylon kín. Thí nghiệm có 6 NT x 3 lặp lại = 18 mẫu phân.

Xác định khối lượng lá đước Ba khía ăn

Mẫu lá đước cân khối lượng trước và sau khi cho Ba khía ăn trong các thí nghiệm. Sau đó, xác định trọng lượng lá đước Ba khía ăn trong thí nghiệm theo công thức: $Z = X - Y$

$X = d_{wa_{dc}} - d_{wb_{dc}}$ (sử dụng cho mẫu đối chứng).

$Y = d_{wa_{TN}} - d_{wb_{TN}}$ (sử dụng cho mẫu thí nghiệm).

Trong đó: b là khối lượng trước thí nghiệm của mẫu lá; a: khối lượng sau thí nghiệm của mẫu lá; X là khối lượng của lá mất đi tự nhiên sau thí nghiệm (mẫu đối chứng); Y là khối lượng của lá sau thí nghiệm (mẫu lá làm thí nghiệm); Z là khối lượng của mẫu lá do Ba khía ăn.

Phân tích mẫu

Thành phần dinh dưỡng trong các mẫu lá: xác định tổng lượng chất hữu cơ C theo phương pháp Walkley-Black. Xác định N tổng số bằng hỗn hợp H_2SO_4 - Salicyllic, H_2O_2 và sau đó chưng cất theo phương pháp Kjeldahl.

$$\text{Tính tỷ lệ C/N} = \frac{\%C}{\%N}$$

Phân tích tổng lân (TP) vô cơ bằng hỗn hợp H_2SO_4 - Salicyllic, H_2O_2 và sau đó chưng cất theo phương pháp so màu.

Hàm lượng dinh dưỡng trong phân Ba khía: mẫu phân mang về chuyển toàn bộ vào khay nhựa sạch, để khô trong không khí thoáng mát (không phơi trực tiếp ngoài nắng). Các mẫu được đem nghiền mịn trong

cối sứ bằng chày sứ bọc cao su, thao tác nhẹ nhàng. Mẫu sau khi nghiền trộn đều và đựng trong túi nylon, ghi nhãn và ký hiệu. Sau đó, tiến hành phân tích hàm lượng dinh dưỡng trong mẫu phân.

Xác định tổng lượng N vô cơ với H_2SO_{4dd} - $CuSO_4$ - Se và chưng cất theo phương pháp Kjeldahl. Xác định tổng lượng chất hữu cơ C theo phương pháp Walkley-Black. Xác định tỷ lệ C/N. Phân tích tổng lân với H_2SO_{4dd} - $HClO_4$, hiện màu của phosphomolybdate, so màu trên máy quang phổ.

Số liệu được xử lý bằng phần mềm MS Excel 2003 và chương trình SPSS Statistics 20.

Kết quả và thảo luận

Sự chọn lựa các loại lá của Ba khía

Lựa chọn loại lá xanh: kết quả 3 đợt thí nghiệm cho thấy, Ba khía ăn cả 3 loại lá (mắm xanh, đước xanh và vệt xanh), chứng tỏ Ba khía ăn có sự chọn lọc về 3 loại lá này. Trong đó, lá mắm xanh được Ba khía ăn nhiều nhất (198 mg sau 12 giờ, 198 mg sau 24 giờ và 250 mg sau 48 giờ), kế đến là vệt xanh (99,67 mg sau 12 giờ; 99,7 mg sau 24 giờ và 146 mg sau 48 giờ) và đước xanh (64,30 mg sau 12 giờ; 69,7 mg sau 24 giờ và 104,30 mg sau 48 giờ). Kết quả phân tích thống kê cho thấy không có sự lựa chọn loại thức ăn của 2 loại lá vệt xanh và đước xanh (bảng 1).

Bảng 1: khối lượng 3 loại lá xanh được Ba khía ăn sau 3 lần thí nghiệm

Loại lá	Khối lượng (mg)		
	12 giờ	24 giờ	48 giờ
Mắm xanh	198 ^a ± 19,43	198 ^a ± 33,65	250 ^a ± 17,78
Đước xanh	64,30 ^b ± 6,03	69,7 ^b ± 23,09	104,3 ^b ± 28,54
Vệt xanh	99,67 ^b ± 2,73	99,7 ^b ± 17,67	146 ^b ± 48,81

Ghi chú: các giá trị ở cùng một cột có cùng chữ cái a, b thì không khác biệt có ý nghĩa thống kê theo phương pháp Anova ($p > 0,05$)

Kết quả phân tích tỷ lệ C/N trong các loại lá RNM khá cao, các loài cây RNM khác nhau có sự khác biệt đáng kể về hàm lượng dinh dưỡng trong lá, tỷ lệ C/N cao nhất trong lá vệt xanh (52,81), tiếp đến là lá đước xanh (41,93) và thấp nhất trong lá mắm xanh (35,04). Như vậy, lá mắm xanh có tỷ lệ C/N thấp hơn 2 loại lá còn lại giúp cho Ba khía hấp thu đủ hàm lượng N và năng lượng để thỏa mãn nhu cầu thiết yếu của mình nên lá mắm xanh được ăn nhiều hơn và được Ba khía lựa chọn đầu tiên. Ngoài ra, theo Camilleri (1989) [3] thì lá mắm xanh có hàm lượng tanin thấp hơn hai loại

lá còn lại nên có thể hợp với khẩu vị của Ba khía.

Lựa chọn loại lá vàng: kết quả thí nghiệm về 3 loại lá vàng cho thấy, lá mầm vàng được Ba khía ăn nhiều nhất (392,53 mg sau 12 giờ; 451,5 mg sau 24 giờ và 307 mg sau 48 giờ), tiếp đến là lá vệt vàng (206,67 mg sau 12 giờ; 241 mg sau 24 giờ và 193,67 mg sau 48 giờ), ít nhất là lá đước vàng (230,33 mg sau 12 giờ; 99,5 mg sau 24 giờ và 155,33 mg sau 48 giờ) (bảng 2).

Bảng 2: khối lượng 3 loại lá vàng được Ba khía ăn sau 3 lần thí nghiệm

Loại lá	Khối lượng (mg)		
	12 giờ	24 giờ	48 giờ
Mầm vàng	392,53 ^a ± 79,98	451,5 ^a ± 0,50	307 ^a ± 39,23
Đước vàng	230,33 ^b ± 55,19	99,5 ^b ± 34,50	155,33 ^b ± 78,99
Vệt vàng	206,67 ^c ± 43,92	241 ^c ± 3,0	193,67 ^c ± 42,67

Ghi chú: các giá trị ở cùng một cột có cùng chữ cái a, b, c thì không khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$) theo phương pháp Anova

Thí nghiệm cho thấy, khi phải lựa chọn Ba khía thích ăn lá mầm vàng nhiều hơn lá vệt vàng và lá đước vàng, điều này tương tự với nghiên cứu của các tác giả Lee (1997) và Boon (2008) [4, 5]. Cũng tương tự như ở loại lá xanh, hàm lượng dinh dưỡng của lá mầm vàng (68,33) thấp hơn 2 loại lá vệt vàng (94,49) và đước vàng (68,41) nên được Ba khía ăn nhiều hơn. Ngoài ra, có thể do hàm lượng tanin có nhiều trong loài cây đước nên Ba khía chọn loại lá này là ít nhất [6].

Sự lựa chọn tình trạng lá ưa thích của Ba khía

Lá đước: kết quả thí nghiệm cho thấy, Ba khía thích ăn lá đước vàng hơn lá đước xanh (bảng 3). Tỷ lệ C/N trong lá đước xanh thấp hơn lá đước vàng nhưng Ba khía ăn lá đước vàng nhiều hơn nguyên nhân có thể do chất gây khó tiêu như tanin cản trở quá trình tiêu hóa của động vật có nhiều trong lá đước xanh và hàm lượng tanin giảm dần theo thời gian kể từ khi lá rụng khỏi cây, vì vậy trong 2 loại lá thì lá xanh chứa nhiều tanin hơn trong lá vàng do pha hòa tan [7]. Đối với thức ăn là lá cây rừng, một số nghiên cứu cho thấy sự già hóa của lá cây theo thời gian rất quan trọng đối với khẩu vị của Ba khía.

Bảng 3: khối lượng lá đước được Ba khía ăn sau 3 đợt thí nghiệm

Lá đước	Khối lượng (mg)		
	12 giờ	24 giờ	48 giờ
Xanh	76,67 ^a ± 55,08	47,67 ^a ± 23,97	80,33 ^a ± 5,51
Vàng	400 ^b ± 17,32	250 ^b ± 201,48	169,33 ^b ± 9,02

Ghi chú: các giá trị ở cùng một cột có cùng chữ cái a, b thì không khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$) theo phương pháp T-Test

Lá mầm: kết quả thống kê T-test cho thấy không có sự chọn lựa về hai tình trạng lá mầm xanh và lá mầm vàng của Ba khía (bảng 4).

Bảng 4: khối lượng lá mầm được Ba khía ăn sau 3 đợt thí nghiệm

Lá mầm	Khối lượng (mg)		
	12 giờ	24 giờ	48 giờ
Xanh	183,33 ^a ± 35,12	217,33 ^a ± 74,00	212,3 ^a ± 6,81
Vàng	233,33 ^a ± 85,05	243,67 ^a ± 17,95	384,00 ^a ± 21,28

Ghi chú: các giá trị ở cùng một cột có cùng chữ cái a thì không khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$) theo phương pháp T-Test

Lá vệt: kết quả thí nghiệm có sự chọn lựa tình trạng lá ưa thích trong lá vệt của Ba khía, chúng ăn lá vệt vàng nhiều hơn lá vệt xanh (bảng 5), có thể do lá vàng có vị thích hợp hơn so với lá xanh từ việc giảm đi đáng kể những hợp chất khó tiêu như tanin trong quá trình già hóa của lá cây rừng [8].

Bảng 5: khối lượng lá vệt được Ba khía ăn sau 3 đợt thí nghiệm

Lá vệt	Khối lượng (mg)		
	12 giờ	24 giờ	48 giờ
Xanh	86,67 ^a ± 20,82	45,33 ^a ± 12,74	82,67 ^a ± 9,29
Vàng	143,33 ^b ± 40,42	105,33 ^b ± 7,02	138,33 ^b ± 16,17

Ghi chú: các giá trị ở cùng một cột có cùng chữ cái a, b thì không khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$) theo phương pháp T-Test

Kết quả về tình trạng của 3 loại lá trên cho thấy, ngoại trừ lá mầm không có sự lựa chọn tình trạng lá ưa thích thì Ba khía thích ăn lá vàng nhiều hơn lá xanh. Tuy nhiên, tỷ lệ C/N trong lá xanh thấp hơn trong lá vàng cho thấy hàm lượng dinh dưỡng C, N chỉ ảnh hưởng một phần đến tập tính ăn của Ba khía. Ngoài ra, có thể do quá trình phân hủy lá do pha hòa tan, điều kiện tự nhiên của môi trường như thủy triều, nhiệt độ, độ ẩm... là những yếu tố quan trọng để loại bỏ dần các chất khó tiêu như tanin, flavologlycan trong lá, giúp tăng khẩu vị của lá đối với Ba khía.

Hàm lượng dinh dưỡng trong lá và phân Ba khía

Hàm lượng dinh dưỡng C, N, P trong lá rừng: kết quả phân tích cho thấy hàm lượng C trong lá vàng cao hơn lá xanh (lá mầm giảm từ 56,64 xuống 51,84%, lá vệt giảm từ 57,13 xuống 53,13%, lá đước giảm từ 55,03 xuống 54,26%). Lượng C tăng lên có thể do lá vàng rụng xuống nền rừng và điều kiện nền rừng ngập, trũng nên hàm lượng chất hữu cơ tăng lên do sự phân hủy chất hữu cơ kém và quá trình carbon hóa tự nhiên của lá [9].

Hàm lượng N trong lá xanh cao hơn trong lá vàng (lá mầm từ 0,84 đến 1,48%, lá vệt từ 0,61 đến 1,01% và lá đước từ 0,81 đến 1,30%) nguyên nhân có thể là do sự

phân hủy N trong quá trình phân hủy trên nền rừng và các điều kiện tự nhiên của môi trường [9].

Bảng 6: hàm lượng dinh dưỡng trong lá RNM

Tên lá	C %	N tổng %	C/N	P tổng %
Mắm xanh	51,84 ± 1,19	1,48 ± 0,02	35,04 ± 1,28	0,56 ± 0,04
Mắm vàng	56,64 ± 1,80	0,84 ± 0,08	68,33 ± 8,33	0,38 ± 0,00
Vet xanh	53,13 ± 0,70	1,01 ± 0,07	52,81 ± 4,36	0,30 ± 0,02
Vet vàng	57,13 ± 1,26	0,61 ± 0,02	94,49 ± 4,42	0,27 ± 0,04
Đước xanh	54,26 ± 0,03	1,30 ± 0,05	41,93 ± 1,44	0,29 ± 0,02
Đước vàng	55,03 ± 0,80	0,81 ± 0,04	68,41 ± 1,99	0,20 ± 0,03

Bảng 6 cho thấy, tỷ lệ C/N trong các loại lá RNM khá cao, tỷ lệ C/N trong lá vàng cao hơn lá xanh (lá mắm 68,33 và 35,04, lá vet 94,49 và 52,81, lá đước 68,41 và 41,93%) do hàm lượng N giảm xuống, quá trình rửa trôi của thủy triều hay các yếu tố tự nhiên trong môi trường như nhiệt độ, độ ẩm... và C tăng lên từ lá xanh và lá vàng trong quá trình phân hủy tự nhiên của lá. Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu của Thongtham (2003) [10] trên đối tượng *Neoepisesarma versicolor* cho ăn 2 dạng lá *Rhizophora apiculata* (lá xanh, lá vàng) hay kết quả nghiên cứu của Nordhaus (2003) [9] trên *Ucides cordatus*. Kết quả cũng cho thấy % hàm lượng C trong lá vàng cao hơn so với lá xanh được giải thích do quá trình phân hủy tự nhiên của lá trên nền rừng chậm và quá trình khoáng hóa tự nhiên làm giảm lượng N trong lá.

Để tăng trưởng và phát triển tốt, tỷ lệ C/N trong thức ăn của các loài không xương sống không được vượt quá 17 [10, 11], tỷ lệ này thấp hơn đáng kể so với tỷ lệ C/N của lá cây RNM. Qua kết quả phân tích tỷ lệ C/N của lá cây RNM vào khoảng 35-95 tùy theo loài cho thấy thức ăn vật rụng là loại thức ăn nghèo dinh dưỡng đối với những động vật sử dụng chúng như nguồn thức ăn chính. Do đó, Lee (1997) [4] cho rằng Ba khía phải thu nhận chất dinh dưỡng thiết yếu như N để bổ sung vào từ các nguồn khác chứ không chỉ là từ vật rụng. Ba khía chiếm thời gian hoạt động trên bề mặt trầm tích. Hoạt động này giúp Ba khía bổ sung N từ những thức ăn nhặt được trên bề mặt trầm tích như tảo, nấm hay vi khuẩn [9, 10].

Kết quả phân tích P cho thấy, lá xanh có hàm lượng P cao hơn lá vàng (lá mắm 0,56 > 0,38%, lá vet 0,3 > 0,27%, lá đước 0,29 > 0,20%). Nguyên nhân là do P là chất cần thiết cho nhu cầu năng lượng của vi khuẩn nên hoạt động của các loại vi khuẩn trên lá vàng làm giảm hàm lượng của P trên lá vàng.

Hàm lượng dinh dưỡng C, N, P trong phân Ba khía: khi cho ăn các loại lá khác nhau thì Ba khía thải ra một khối lượng phân khác nhau sau 3 đợt. Đối với NT là lá đước, Ba khía ăn lá rất ít và hầu như khối lượng phân thải ra là không có (bảng 7).

Bảng 7: hàm lượng dinh dưỡng trong phân Ba khía và đất rừng

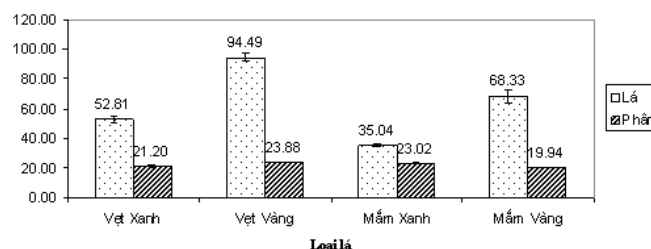
Tên mẫu	C %	N tổng %	C/N	P tổng %
Phân Ba khía ăn lá vet xanh	17,27 ± 0,65	0,82 ± 0,04	21,20 ± 1,82	0,38 ± 0,00
Phân Ba khía ăn vet vàng	27,54 ± 0,00	1,15 ± 0,00	23,88 ± 0,00	1,77 ± 2,31
Phân ba khía ăn mắm xanh	13,34 ± 0,20	0,58 ± 0,01	23,02 ± 0,86	0,27 ± 0,00
Phân ba khía ăn mắm vàng	22,31 ± 0,00	1,12 ± 0,00	19,94 ± 0,02	1,77 ± 0,00
Đất rừng	6,02 ± 0,18	0,24 ± 0,01	24,90 ± 0,37	0,11 ± 0,00

Khi cho thức ăn là lá vàng, hàm lượng C trong phân Ba khía cao hơn hàm lượng C khi cho ăn lá xanh (mắm 22,31 > 13,34% và vet 27,54 > 17,27%). Hàm lượng dinh dưỡng trong phân khi cho ăn các loại lá này đều cao hơn lượng C trong đất rừng tự nhiên.

Tương tự như C, hàm lượng N trong phân của Ba khía khi cho ăn lá vàng cao hơn hàm lượng N khi cho ăn lá xanh (mắm 1,12 > 0,58% và lá vet 1,15 > 0,82%), hàm lượng N trong phân Ba khía cao hơn hàm lượng N trong đất trên nền rừng tự nhiên.

Kết quả phân tích cho thấy, hàm lượng P trong phân Ba khía khi cho ăn lá vet vàng và mắm vàng là cao nhất (1,77%), tiếp đến là mẫu vet xanh (0,38%), mắm xanh (0,27%) và cuối cùng là mẫu đất rừng (0,11%). Kết quả phân tích hàm lượng dinh dưỡng trong phân Ba khía cho thấy khi ăn các loại thức ăn khác nhau thì Ba khía sẽ thải ra ngoài môi trường các dạng phân có hàm lượng dinh dưỡng khác nhau. Tỷ lệ C/N trong lá sau khi qua hệ thống tiêu hóa của Ba khía được thải ra môi trường dưới dạng phân giảm đi rõ rệt. Điều này cho thấy Ba khía có vai trò khá lớn trong chu trình dinh dưỡng của RNM, cũng như mạng lưới thức ăn trong nền RNM.

Vai trò chuyển hóa dinh dưỡng (C, N) của Ba khía: kết quả phân tích cho thấy, tỷ lệ C/N trong phân Ba khía bị giảm rất nhiều sau quá trình tiêu hóa, đặc biệt thức ăn là lá vàng. Đối với lá vet vàng, tỷ lệ C/N giảm đi 3,96 lần trong mẫu phân (94,49) so với mẫu lá (23,88), lá mắm vàng giảm 3,43 lần với 68,33 (phân) và 19,94 (lá), còn đối với lá xanh tỷ lệ này cũng giảm 2,49 lần đối với lá vet xanh với 52,81 (phân) và 21,2 (lá), lá mắm xanh giảm 1,5 lần với 35,04 (phân) và 23,02 (lá). Theo kết quả thống kê Independent Samples Test thì sự chênh lệch này đều có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức ý nghĩa 0,05.



Hình 1: biểu đồ tỷ lệ C/N trong lá và phân Ba khía

Sự giảm của tỷ lệ C/N trong phân khi thải ra môi trường là dấu hiệu cho thấy chất hữu cơ dễ dàng được khoáng hóa hơn, đồng thời các sinh vật đất sử dụng phân Ba khía để làm nguồn thức ăn, chất nền cũng thuận lợi hơn so với chúng trực tiếp sử dụng nguồn thức ăn là lá rụng. Sự giảm đi tỷ lệ C/N này cũng phù hợp với những kết quả nghiên cứu trước đây của Lee (1997), Nordhaus (2003), Thongtham (2005), Đỗ Thị Thu Hương (2011) [4, 9, 10, 12]. Việc giảm đi tỷ lệ C/N thông qua hệ thống tiêu hóa của Ba khía được giải thích có thể là do mật độ vi sinh vật trong bao tử Ba khía cũng như khả năng tiêu hóa hàm lượng C trong đường ruột của loài này.

Những nghiên cứu trước đây của Đỗ Thị Thu Hương (2011), Micheli (1993), Thong tham và Kristensen (2005) cho thấy mật độ vi sinh vật cao hơn trong phân so với mật độ vi sinh vật trong lá nên góp phần thúc đẩy việc phân hủy chất dinh dưỡng, giúp cho phân sau khi thải ra môi trường dễ dàng được phân hủy hơn so với nguồn thức ăn ban đầu. Nghiên cứu của Thongtham (2005) ghi nhận sự hiện diện của vi sinh vật trong mẫu phân của *Neopisesarma versicolor* cao hơn 5-10 lần so với mật độ vi sinh vật trong mẫu lá cây được *Rhizophora apiculata*. Hệ thống tiêu hóa của Ba khía đã tạo điều kiện thuận lợi cho vi sinh vật sinh trưởng và phát triển.

Kết quả nghiên cứu đã chứng minh Ba khía là một trong những mắt xích quan trọng trong dòng dinh dưỡng của RNM. Ba khía không chỉ tác động đến cấu trúc cũng như tính chất lý hóa của nền rừng thông qua việc đào hang làm đất tơi xốp, tăng tính hiếu khí cho đất... mà những hoạt động sống của chúng góp phần vào sự sinh trưởng và phát triển của cây rừng cũng như những sinh vật nhỏ hơn sống trong đất.

Kết luận

Qua kết quả thí nghiệm về loại lá ưa thích của Ba khía cho thấy, đối với lá vàng Ba khía thích ăn lá mầm vàng nhiều nhất, tiếp đến là lá vệt vàng và lá đước vàng; đối với tình trạng lá xanh, Ba khía thích ăn lá mầm xanh nhiều nhất và không có sự chọn lựa giữa lá vệt xanh và đước xanh. Thí nghiệm về tình trạng lá ưa thích cho thấy, đối với lá đước thì Ba khía chọn lựa lá vàng nhiều hơn lá xanh; đối với lá mầm không có sự lựa chọn giữa hai tình trạng lá vàng và xanh; còn đối với lá vệt Ba khía chọn lựa lá vàng nhiều hơn lá xanh.

Hàm lượng dinh dưỡng, hàm lượng N tổng số trong lá xanh cao hơn trong lá vàng, ngược lại, hàm lượng chất hữu cơ trong lá xanh thấp hơn lá vàng. Tỷ lệ C/N trong lá RNM tương đối cao (35-95) và cao hơn nhu cầu của Ba khía, hàm lượng dinh dưỡng của lá chỉ ảnh hưởng một phần đến tập

tính ăn của Ba khía.

Tỷ lệ C/N khi qua hệ thống tiêu hóa của Ba khía bị giảm đi đáng kể đã chứng minh Ba khía có vai trò quan trọng trong chu trình chuyển hóa dinh dưỡng của RNM và là một trong những mắt xích quan trọng trong mạng lưới thức ăn của RNM.

Trong thời gian tới cần tiếp tục khảo sát hàm lượng tanin trong lá trước và sau thí nghiệm; ảnh hưởng của giới tính, kích thước cơ thể Ba khía đối với khả năng tiêu thụ của chúng; thành phần loài và mật độ vi sinh vật trong bao tử và phân Ba khía để thấy được vai trò của nó trong việc giúp Ba khía tiêu hóa thức ăn.

Tài liệu tham khảo

- [1] Phan Nguyên Hồng (1997), *Vai trò của RNM Việt Nam, kỹ thuật trồng và chăm sóc*, NXB Nông nghiệp.
- [2] Ashton E.C (2002), "Mangrove sesarimid crab feeding experiments in Peninsular Malaysia", *Journal Experimental Marine Biology and Ecology*, **273**, pp.97-119.
- [3] Camilleri J.C (1989), "Leaf choice by crustacean in a mangrove forest in Queensland", *Marine Biology*, **102**, pp.453-459.
- [4] Lee S.Y (1997), "Potential tropic importance of the faecal material of the mangrove sesarimine crab *Sesarma messa*", *Marine Ecology Progress*, **159**, pp.275-284.
- [5] Boon P.Y, Yeo D.C.J, Todd P.A (2008), "Feeding ecology of two species of *Perisesarma* (Crustacea: Decapoda: Brachyura: Sesarimidae) in Mandai mangroves, Singapore", *Journal of Crustacean Biology*, **28**, pp.480-484.
- [6] Camilleri J.C (1992), "Leaf-litter processing by invertebrates in a mangrove forest in Queensland", *Marine Biology*, **114**, pp.144-145.
- [7] Rajendran N, Kathiresan K (2008), "Microbial flora associated with submerged mangrove leaf litter in India", *Revista de Biología Tropical*, **55**, pp.393-400.
- [8] Kristensen E (2008), "Mangrove crabs as ecosystem engineers; with emphasis on sediment processes", *Journal of Research*, **59**, pp.30-43.
- [9] Nordhaus (2003), "Feeding ecology of the semi-terrestrial crab *Ucides cordatus* (Decapoda: Brachyura) in a mangrove forest in northern Brazil", *PhD dissertation*, Bremen University - Germany, pp.1-5.
- [10] Thongtham N, Kristensen E (2005), *Physical and chemical characteristics of mangrove crab (*Neopisesarma versicolor*) burrows in the Bangrong mangrove forest*, pp.3-5.
- [11] Micheli F (1993), "Effect of mangrove litter species and availability on survival, moulting, and reproduction of the mangrove crab *Sesarma messa*", *Journal Experimental Marine Biology and Ecology*, **171**, pp.149-163.
- [12] Đỗ Thị Thu Hương (2011), "Nghiên cứu về thức ăn và vai trò trong chuyển hóa dinh dưỡng của loài còng *Perisesarma eumolpe* (De Man, 1895) tại khu vực gây đỏ RNM Cần Giờ", *Luận văn thạc sỹ sinh học*, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh.

Ảnh hưởng của thuốc bảo vệ thực vật chứa hoạt chất chlorpyrifos ethyl lên cholinesterase ở cá lóc giai đoạn giống

Nguyễn Anh Tuấn*, Nguyễn Văn Công, Châu Thành Tươi

Trường Đại học Cần Thơ

Ngày nhận bài 10.3.2015, ngày chuyển phản biện 13.3.2015, ngày nhận phản biện 15.4.2015, ngày chấp nhận đăng 18.4.2015

Nghiên cứu xác định độc cấp tính và ảnh hưởng của thuốc bảo vệ thực vật (BVTV) chứa hoạt chất chlorpyrifos ethyl (CE) lên enzyme cholinesterase (ChE) ở cá lóc (*Channa striata*) cỡ giống đã được thực hiện tại Trường Đại học Cần Thơ. Nồng độ gây chết 50% (LC50) cá lóc được thực hiện theo phương pháp nước tĩnh, không thay nước. Ảnh hưởng của hoạt chất CE lên ChE khi nồng độ thuốc BVTV thấp hơn ngưỡng gây chết cá được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên. Kết quả cho thấy, LC50-96 của CE đối với cá lóc cỡ giống là 27,1 ppb. Hoạt tính ChE trong não cá lóc rất nhạy cảm với CE, ở nồng độ 1,36 ppb đã gây ảnh hưởng đáng kể đến ChE. Cá bị ức chế cao nhất là 48-60 giờ sau khi tiếp xúc với thuốc, và sẽ phục hồi sau 2 ngày sống trong nước sạch. Nghiên cứu cho thấy, thuốc BVTV chứa hoạt chất CE rất độc đối với cá lóc. Những nghiên cứu thực nghiệm trên ruộng cần được thực hiện để có đánh giá đầy đủ về ảnh hưởng của hoạt chất này đến cá lóc sống trong tự nhiên.

Từ khoá: *channa striata*, *chlorpyrifos ethyl*, *cholinesterase*, *LC50*.

Chỉ số phân loại 4.5

EFFECTS OF INSECTICIDE CHLORPYRIFOS ETHYL ON CHOLINESTERASE ENZYME IN FINGERLING SNAKEHEAD FISH

Summary

Acute toxicity and effects of insecticide chlorpyrifos ethyl on cholinesterase (ChE) enzyme in fingerling snakehead fish (*Channa striata*) have been tested in Can Tho University. Median lethal concentration (LC50) has been carried out under the static and non-renewed water system. Effects this insecticide on ChE activity in the species were done by exposing fishes into sub-acute concentrations and then removing them into clean-water for ChE recovery monitoring. The result has shown that LC50-96 of Chlorpyrifos Ethyl for big fingerling snakehead fishes is 27.1 ppb. The ChE activity in the brain of snakehead fish is very sensitive with this pesticide; the significant inhibition has been seen at the concentration of 1.36 ppb. The highest ChE inhibition has been seen after 48 to 60 hours of exposure. ChE can have quick recovery after 2 days living in clean water. The study has shown that Chlorpyrifos Ethyl is very toxic to snakehead fishes. The field studies on this species and Chlorpyrifos Ethyl are recommended for fully understanding the impacts of using this pesticide in rice cultivation in the Mekong river delta on snakehead fishes in nature.

Keywords: *channa striata*, *chlorpyrifos ethyl*, *cholinesterase*, *LC50*.

Classification number 4.5

Đặt vấn đề

CE là một trong những hoạt chất chính của nhiều loại thuốc BVTV được bán phổ biến trên thị trường. Theo thống kê hiện nay, có khoảng 95 tên thương mại chứa hoạt chất CE như: Anboom 40EC, Mondeo 60EC, Sieu Sao E 500WP...; trong đó có khoảng 69 tên thương mại chứa hoạt chất CE được phối trộn với hoạt chất khác ở các mức tỷ lệ khác nhau như: Monifos 250EC, Paragon 555EC, Soddy 430EC... (www.ppd.gov.vn). Hoạt chất CE thuộc gốc lân hữu cơ, gây hại cho sinh vật chủ yếu là tác động lên hệ thần kinh thông qua việc ức chế hoạt tính của ChE. Khi ChE bị ức chế đến 70% sẽ làm chết hầu hết các loài thủy

*Tác giả chính: Email: tuants@ctu.edu.vn

sinh vật [1], và khi 30% bị ức chế được xem như giới hạn cho phép tối đa cho hầu hết sinh vật [2]. Khi sử dụng, chỉ có 50% thuốc BVTV bám trên cây trồng và sinh vật, phần còn lại đi vào đất, nước, không khí, gây nhiễm bẩn môi trường và tác hại đến sinh vật khác [3].

Cá lóc (có nơi gọi cá quả, cá tràu) là loài hô hấp khí trời bắt buộc [4], có khả năng thích ứng với những biến đổi rộng của điều kiện môi trường [5], phân bố ở nhiều loại hình thủy vực khác nhau như sông, ao, hồ, kênh, ruộng [6]. Do đó, loài cá này dễ bị phơi nhiễm và tác động khi người dân sử dụng hóa chất BVTV trong canh tác lúa.

Nghiên cứu này được thực hiện nhằm xác định được độc cấp tính và ảnh hưởng của CE lên ChE ở cá lóc để làm cơ sở cho nghiên cứu đánh giá ảnh hưởng của việc sử dụng thuốc BVTV chứa hoạt chất CE trên đồng ruộng đến loài cá này trong tự nhiên.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu

Thuốc Mondeo 60EC chứa 60% hoạt chất CE [O, O-diethyl O-(3,5,6-trichloro-2-pyridinyl) -phosphorothioate] do Công ty TNHH Meghmani Organic (Ấn Độ) sản xuất được sử dụng như nguồn độc chất chứa hoạt chất CE.

Hóa chất $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Merck), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Merck), Acetylcholine iodide (Merck) và $\text{C}_{14}\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_8\text{S}_2$ (Merck) sử dụng để đo cholinesterase. Aceton và nước cất dùng để rửa dụng cụ nghiên mẫu trước khi sử dụng nghiên mẫu tiếp theo.

Cá lóc được ương nuôi từ cỡ cá lóc con (1,3 cm). Cá được ương trong bể composite chứa nước máy, sục khí liên tục, mỗi ngày thay 50% nước. Cá được cho ăn bằng trùn chỉ với tỷ lệ cho ăn 3-5% trọng lượng cá. Khi cá đạt 2,5-3 g/con được chọn để bố trí thí nghiệm. Ngừng cho ăn một ngày trước khi bố trí thí nghiệm để hạn chế cá bài tiết làm ô nhiễm nước.

Phương pháp bố trí thí nghiệm

Xác định LC50-96: 6 nồng độ hoạt chất CE (16, 19, 23, 28, 33 và 40 ppb) và lô đối chứng được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên trong các bể composite 50 l chứa 20 l dung dịch, với 5 lần lặp lại; mỗi bể thả 10 cá thể. Không cho cá ăn, không sục khí và không thay nước trong suốt 96 giờ thí nghiệm. Mondeo 60EC được pha loãng 500 lần để tạo dung dịch mẹ. Tính nồng độ hoạt

chất CE trong dung dịch theo công thức:

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

Trong đó: C_1 là nồng độ hoạt chất CE có trong thuốc, V_1 là thể tích thuốc, C_2 là nồng độ CE cần chuẩn bị, V_2 là thể tích dung dịch cần pha.

Nhiệt độ, pH, DO được đo hàng ngày vào lúc 6-7 giờ và 14-15 giờ bằng máy đo DO và máy đo pH. Quan sát biểu hiện của cá thí nghiệm và ghi nhận số lượng cá chết vào các thời điểm 1, 3, 6, 9, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84 và 96 giờ sau khi bố trí thí nghiệm. Xác cá chết được vớt ra ngoài để hạn chế sự thối rữa làm giảm oxy hòa tan.

Xác định nhạy cảm của ChE trong não cá lóc đối với CE: 5 nồng độ CE (tương ứng với 1, 5, 10, 15 và 20% giá trị LC50-96 của CE) và lô đối chứng được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên trong bể composite 50 l với 3 lần lặp lại. Mỗi bể chứa 20 l dung dịch, thả 21 cá. Thí nghiệm kéo dài 4 ngày. Không thay nước, không sục khí và không cho cá ăn trong suốt thời gian thí nghiệm. Hàng ngày đo nhiệt độ, oxy hòa tan và pH vào lúc 6-7 giờ và 14-15 giờ bằng máy đo DO và máy đo pH. Cá được thu ở các thời điểm 1, 6, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84 và 96 giờ sau khi bố trí thí nghiệm để đo ChE; mỗi nồng độ thu 6 cá. ChE được đo trên máy so màu quang phổ ở bước sóng 412 nm theo phương pháp Ellman và cs (1961) [7].

Xác định thời gian phục hồi của ChE ở cá lóc sau khi tiếp xúc với CE: 5 nồng độ CE (tương ứng với 1, 5, 10, 15 và 20% của LC50-96) và đối chứng được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên trong vòng 48 giờ, lặp lại 3 lần. Mỗi bể chứa 20 l dung dịch và thả 25 cá. Sau 48 giờ tiếp xúc, cho cá ra nước sạch (thay 100% nước) để theo dõi sự phục hồi ChE. Mẫu cá được thu trước khi thay nước và sau 1, 3, 5, 7 ngày sau khi thay nước; mỗi nồng độ thu 6 cá để đo ChE.

Giá trị LC50 được ước tính theo phương pháp Probit [8] sử dụng phần mềm SPSS. Số liệu ChE được tính trung bình, phân tích phương sai và so sánh giữa các nghiệm thức bằng kiểm định Duncan. Sai khác có ý nghĩa thống kê được tính khi $p < 0,05$.

Kết quả và thảo luận

Xác định nồng độ CE gây chết 50% cá lóc đồng

Nhiệt độ, oxy hòa tan và pH trong thời gian thí nghiệm: nhiệt độ nước buổi sáng dao động

từ $27,7 \pm 1,29^{\circ}\text{C}$ đến $29,1 \pm 0,05^{\circ}\text{C}$; buổi chiều từ $29,3 \pm 0,55^{\circ}\text{C}$ đến $30,2 \pm 0,05^{\circ}\text{C}$. Chênh lệch nhiệt độ trong ngày cũng như sự khác biệt nhiệt độ giữa các bể thí nghiệm tương đối thấp và khá ổn định trong suốt thời gian thí nghiệm. Theo Lee và Peter (1994), cá lóc có thể sống ở nhiệt độ $11-40^{\circ}\text{C}$, phát triển tốt ở $20-30^{\circ}\text{C}$ [9]. Khoảng biến động nhiệt độ nước trong các bể thí nghiệm thích hợp với sự phát triển bình thường của cá.

Lượng oxy hòa tan vào buổi sáng dao động từ $4 \pm 0,05$ mg/l đến $5,4 \pm 0,11$ mg/l; buổi chiều dao động từ $4 \pm 0,06$ mg/l đến $5,66 \pm 0,04$ mg/l. Mặc dù lượng oxy hòa tan ở các bể thí nghiệm không thấp nhưng cá lóc có tập tính hô hấp khí trời bắt buộc [4] nên vẫn sử dụng oxy từ khí trời. Khi hàm lượng oxy hòa tan trong nước giảm cá sẽ tăng hoạt động hô hấp khí trời, có thể làm độc chất xâm nhập vào cơ thể chậm hơn bình thường.

Giá trị pH trong thí nghiệm biến động rất nhỏ, trong khoảng $6,7 \pm 0,03$ đến $7,1 \pm 0,02$. Theo Lee và Peter (1994), cá lóc có khả năng chịu đựng pH $4,25-9,4$; độ pH ổn định là điều kiện tốt cho cá lóc sinh sống và phát triển [5]. Giá trị pH trong thí nghiệm này thích hợp cho sự phát triển bình thường của cá lóc.

Nhìn chung các yếu tố môi trường trong thí nghiệm này nằm trong giới hạn sinh lý, sinh trưởng bình thường của cá lóc. Sự ổn định các yếu tố pH, lượng oxy hòa tan và nhiệt độ giữa các nghiệm thức cho thấy thí nghiệm có tính đồng nhất cao về mặt môi trường.

Tỷ lệ cá chết theo thời gian và LC50 của CE đối với cá lóc: tỷ lệ chết không xuất hiện ở nghiệm thức đối chứng trong suốt 96 giờ thí nghiệm. Các nghiệm thức chứa thuốc ở nồng độ khác nhau đều có tỷ lệ chết khác nhau (bảng 1).

Bảng 1: tỷ lệ chết (%) của cá ở các nồng độ CE khác nhau trong thời gian thí nghiệm

Thời gian (giờ)	Nồng độ CE (ppb)								LC50 (ppb)
	ĐC	13	16	19	23	28	33	40	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	
6	0	0	0	0	0	0	0	5,46	
9	0	0	0	0	0	1,82	10,92	27,28	
12	0	0	0	0	1,82	14,56	30,94	56,36	
24	0	3,64	5,46	7,28	23,66	49,1	72,7	81,8	29,1
36	0	7,28	12,74	10,92	34,56	56,34	74,52	89,08	27,7
48	0	7,28	12,74	10,92	34,56	56,34	78,16	94,54	27,4
60	0	7,28	14,56	10,92	34,56	58,16	78,16	94,54	27,3
72	0	7,28	14,56	10,92	34,56	59,98	79,98	96,36	27,1
84	0	7,28	14,56	10,92	34,56	59,98	79,98	96,36	27,1
96	0	7,28	14,56	10,92	34,56	59,98	79,98	96,36	27,1

Kết quả bảng 1 cho thấy, ở nồng độ CE càng cao thì tỷ lệ cá chết theo thời gian càng lớn. Giữa các nghiệm thức, cá chết tập trung trong khoảng thời gian từ 24 giờ đến 36 giờ, càng về sau tỷ lệ cá chết giảm dần và rải rác ở từng thời điểm. Từ tỷ lệ chết, bằng phương pháp Probit, giá trị LC50-96 tính được là 27,1 ppb. Qua đó cho thấy hoạt chất CE có độc tính rất cao đối với cá lóc vì có $\text{LC50-96} < 100$ ppb.

Theo chỉ dẫn của nhà sản xuất, liều phun trên ruộng của Mondeo 60EC là $0,6-0,8$ l/ha. Nếu mực nước trên ruộng là 10 cm và có 50% lượng thuốc rơi xuống nước sau khi phun, nồng độ CE trong nước trên ruộng dao động trong khoảng 180-240 ppb. Nồng độ này bằng 6,6 đến 8,9 lần giá trị LC50-96, vì vậy khi sử dụng thuốc theo liều chỉ dẫn có thể làm chết cá trên ruộng.

Xác định mức độ nhạy cảm của ChE ở cá lóc với CE

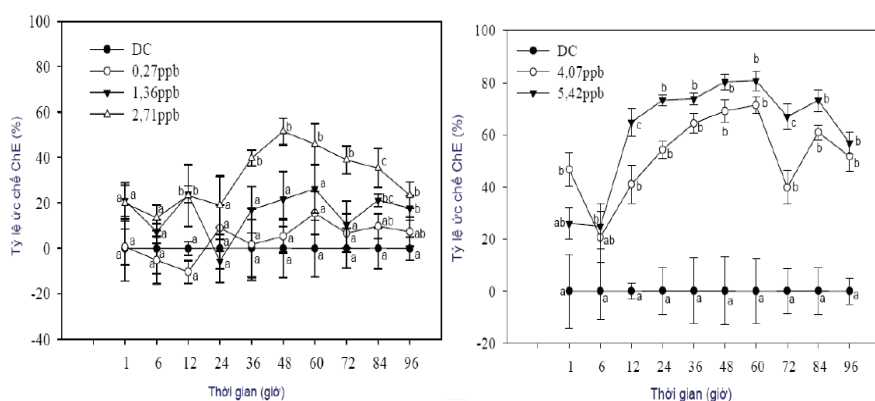
Nhiệt độ, oxy hoà tan và pH: nhiệt độ trung bình buổi sáng giữa các nghiệm thức trong thời gian thí nghiệm dao động từ $29 \pm 0,1$ đến $29,3 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$; buổi chiều trung bình nhiệt độ giữa các nghiệm thức dao động từ $29,9 \pm 0,1$ đến $30,3 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$. Theo Nguyễn Văn Công và cs (2006), nhiệt độ từ 23 đến 36°C không làm ảnh hưởng đến hoạt tính ChE của cá lóc [10]. Trong thí nghiệm này, chênh lệch nhiệt độ giữa sáng và chiều không quá 3°C nên không ảnh hưởng đến hoạt tính của ChE ở cá lóc.

Không có sự khác biệt lớn về oxy hòa tan giữa các nghiệm thức, buổi sáng lượng oxy hòa tan dao động từ $3,7 \pm 0,01$ đến $4,1 \pm 0,03$ mg/l và buổi chiều từ $3,9 \pm 0,06$ đến $4,1 \pm 0,12$ mg/l.

Giá trị pH tương đối đồng nhất giữa các nghiệm thức, dao động trong khoảng $6,4 \pm 0,02$ đến $6,8 \pm 0,01$ vào buổi sáng và $6,5 \pm 0,01$ đến $6,7 \pm 0,02$ vào buổi chiều.

Hoạt tính ChE của cá lóc đồng theo thời gian: trước khi tiếp xúc với thuốc, hoạt tính ChE trung bình là $6,5 \pm 1,4$ $\mu\text{M/g/phút}$ và khác biệt không có ý nghĩa thống kê giữa các nghiệm thức.

Tỷ lệ ức chế ở thời điểm 1 giờ của nghiệm thức 1, 5, 10, 15 và 20% LC50-96 lần lượt là 0,7; 21,1; 19,9; 46,6 và 26,0% (hình 1). Ở thời điểm 48 giờ, tỷ lệ ức chế ở các nghiệm thức 1, 5, 10, 15 và 20% LC50-96 lần lượt là 5,3; 21,6; 51,5; 69,1 và 80,3%. Ở thời điểm 60 giờ, tỷ lệ ức chế ở các nghiệm thức 1, 5, 10, 15



Hình 1: tỷ lệ (%) ức chế ChE so với đối chứng (trung bình $\pm$ SE) trong não cá lóc đồng trong 96 giờ tiếp xúc với CE. Trong cùng thời điểm thu mẫu, hoạt tính ở các nghiệm thức có chữ cái giống nhau thì sai khác không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$)

và 20% LC50-96 lần lượt là 15,5; 26,2; 45,9; 71,4 và 80,7%. Ở thời điểm kết thúc thí nghiệm (96 giờ), tỷ lệ ức chế ở các nghiệm thức 1, 5, 10, 15 và 20% LC50-96 lần lượt là 7,3; 17,7; 23,4; 51,7 và 56,8%.

Kết quả trên cho thấy, hoạt tính ChE trong não cá chịu ảnh hưởng bởi nồng độ và thời gian tiếp xúc với hoạt chất CE. Ở cùng thời điểm thu mẫu, nồng độ thuốc càng cao thì hoạt tính ChE bị ức chế càng nhiều. Tỷ lệ ức chế ChE cao nhất trong khoảng 48-60 giờ tiếp xúc, sau đó có khuynh hướng phục hồi dần. Tuy nhiên, ngoại trừ ở nồng độ 1% LC50-96, tại thời điểm 96 giờ hoạt tính của ChE ở tất cả các nghiệm thức đều chưa phục hồi hoàn toàn, với sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với đối chứng ($p < 0,05$).

Kết quả cho thấy, ở mức 5% LC50-96 là nồng độ thấp nhất mà hoạt chất CE ảnh hưởng đến ChE có ý nghĩa, tương đương 1,36 ppb. Nếu nồng độ CE nhỏ hơn hoặc bằng 1% LC50-96, tương đương 0,27 ppb, sẽ không tác động đến hoạt tính của ChE ($p < 0,05$). Các nồng độ này thấp hơn rất nhiều so với nồng độ lý thuyết tính toán dựa theo liều chỉ dẫn khi phun Mondeo 60EC cho ruộng lúa. Điều này cho thấy, hoạt tính ChE trong não cá lóc rất nhạy cảm với CE, ở nồng độ rất thấp (1,36 ppb) cũng thấy sự khác biệt rõ ràng so với đối chứng. Do đó, do hoạt tính ChE trong não cá lóc đồng có thể cho thấy cá đã phơi nhiễm môi trường có tồn tại hoạt chất CE.

Khi tiếp xúc với CE ở nồng độ $\geq 10\%$ LC50-96 (2,71 ppb), hoạt tính ChE ít nhất có 1 thời điểm thu mẫu bị ức chế cao hơn 30% so với đối chứng. Theo Aprea và cs (2002), khi ChE bị ức chế hơn 30% sẽ làm cho sinh vật bất bình thường và khi bị ức chế hơn 70% sẽ làm đa số sinh vật chết [1, 2]. Như ước tính, nồng độ

CE trên ruộng sau khi phun dao động 180-240 ppb, nồng độ này bằng 66 đến 89 lần giá trị 10% LC50-96. Qua đó cho thấy, khi sử dụng thuốc bằng liều chỉ dẫn có thể làm ChE bị ức chế hơn 70%. Dự đoán này cần được kiểm chứng thực tế để có kết luận cụ thể hơn.

Khả năng phục hồi ChE ở cá lóc đồng sau khi tiếp xúc với CE

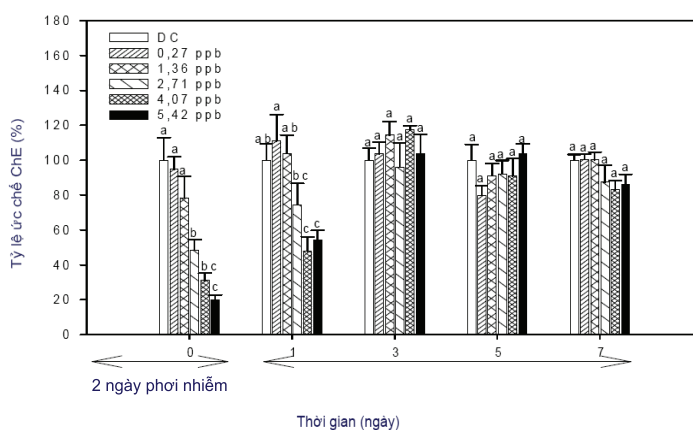
Nhiệt độ, oxy hòa tan và pH trong thời gian thí nghiệm: trung bình nhiệt độ buổi sáng đo được dao động từ $29,0 \pm 0,1$ đến $29,3 \pm 0,1^\circ\text{C}$. Các giá trị này buổi chiều dao động từ $30,0 \pm 0,1$ đến $30,2 \pm 0,1^\circ\text{C}$. Chênh lệch nhiệt độ tối đa trong ngày trong thời gian thí nghiệm khoảng 1°C .

Trung bình lượng oxy hòa tan vào buổi sáng dao động từ $3,6 \pm 0,03$ đến $4,0 \pm 0,05$ mg/l; buổi chiều dao động từ $4,0 \pm 0,01$ đến $4,2 \pm 0,03$ mg/l.

Giá trị pH nước trong thí nghiệm khá ổn định, dao động từ $6,5 \pm 0,04$ đến $6,7 \pm 0,03$ vào buổi sáng và từ $6,6 \pm 0,00$ đến $6,8 \pm 0,01$ vào buổi chiều. Sự chênh lệch giữa các nghiệm thức không quá một đơn vị.

Nhìn chung, các yếu tố môi trường trong thí nghiệm nằm trong giới hạn sinh lý, sinh trưởng của cá lóc đồng.

Khả năng phục hồi ChE ở cá lóc đồng theo thời gian: hoạt tính ChE trong não cá lóc đồng 2 ngày sống trong CE ở nghiệm thức 1%, 5%, 10%, 15%, 20% LC50-96 lần lượt bằng 94,7%, 78,4%, 48,5%, 30,9% và 19,8% so với đối chứng (hình 2).



Hình 2: hoạt tính ChE (% so với đối chứng) ở các nghiệm thức trong giai đoạn tiếp xúc thuốc và phục hồi trong nước sạch. Trong cùng thời điểm thu mẫu, ChE ở các nghiệm thức có cùng chữ cái thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$)

Sau 1 ngày (3 ngày sau khi bố trí) sống trong môi trường không có thuốc, hoạt tính ChE trong não cá lóc đồng đã có dấu hiệu phục hồi so với hoạt tính ChE đo được sau khi tiếp xúc với thuốc 48 giờ. Ở 2 nồng độ 1%, 5% LC50-96 hầu như đã phục hồi hoàn toàn, trong khi 3 nồng độ 10%, 15%, 20% LC50-96 thì tỷ lệ ức chế ChE lần lượt là 74,5%, 47,8%, 54,3% so với đối chứng.

Sau 3 ngày sống trong nước sạch (5 ngày sau bố trí), hoạt tính ChE ở các nghiệm thức phục hồi hoàn toàn, riêng nghiệm thức 10% LC50-96 thì ChE phục hồi được 96% so với đối chứng. Kể từ ngày thứ 5 trong nước sạch (7 ngày sau khi bố trí) trở về sau, hoạt tính ChE trong não cá lóc đồng ở tất cả các nghiệm thức dù có dao động nhưng luôn khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$) so với đối chứng.

Ảnh hưởng của diazinon lên hoạt tính ChE trên cá lóc sau 2 lần tiếp xúc trong 4 ngày rồi cho cá ra môi trường nước sạch thì hoạt tính ChE được phục hồi dần nhưng vẫn thấp hơn so với đối chứng ($p < 0,05$) dù cá đã sống trong nước sạch 36 ngày [10]. Qua đó cho thấy hoạt chất CE không gây ảnh hưởng lâu dài đến ChE như diazinon.

Aprea và cs (2002) cho rằng, hoạt tính ChE bị ức chế 30% là ngưỡng giới hạn sinh học, khi bị ức chế vượt ngưỡng sinh vật có thể bị ảnh hưởng bất lợi đến các hoạt động sống và sức khỏe, và chết khi tỷ lệ ức chế hơn 70% [2]. Khi kết thúc thí nghiệm trong 7 ngày (kể từ khi cho cá ra nước sạch), hoạt tính ChE trong não cá phục hồi $> 80\%$. Như vậy, ChE ở cá gần như đã phục hồi hoàn toàn, không còn ở mức có nguy cơ ảnh hưởng bất lợi cho sức khỏe cá lóc thí nghiệm.

Kết luận và kiến nghị

Thuốc Mondeo 60EC chứa 60% hoạt chất CE rất độc đối với cá lóc đồng, giá trị LC50-96 của hoạt chất CE là 27,1 ppb.

ChE ở cá lóc rất nhạy cảm với hoạt chất CE, nồng độ thấp có ảnh hưởng đến ChE là 1,36 ppb; tỷ lệ ức chế

cao nhất trong khoảng 48-60 giờ sau tiếp xúc và sau 2 ngày cho ra nước sạch đã phục hồi đến mức khác biệt không có ý nghĩa thống kê so với đối chứng.

Mặc dù ChE phục hồi khá nhanh nhưng thuốc Mondeo 60EC là loại thuốc rất độc đối với cá lóc đồng, nên cần sử dụng hợp lý Mondeo 60EC trong canh tác lúa.

Cần tiếp tục kiểm tra ảnh hưởng của sử dụng Mondeo 60EC trên ruộng đến cá lóc.

Tài liệu tham khảo

- [1] Fulton M.H, Key P.B (2001), "Annual review: Acetylcholinesterase inhibition in stuarine fish and invertebrates as an indicator of organophosphorus insecticide exposure and effects", *Environmental Toxicology and Chemistry*, **20(1)**, pp.37-45.
- [2] Aprea C, Colosio C, Mammone T, Minoia C, Maroni M (2002), "Biological monitoring of pesticide exposure: a review of analytical methods", *Journal of Chromatography*, **769B**, pp.191-219.
- [3] Lê Huy Bá và Lâm Minh Triết (2005), *Sinh thái môi trường*, NXB Đại học Quốc gia TP. Hồ Chí Minh.
- [4] Vivekanandan E (1977), "Ontogenetic developmant of surfacing bihaviour in the obligatory air - breathing fish *Channa striatus*", *Physiology and Behavior*, **18**, pp.559-562.
- [5] Lee P.G, Peter K.L.Ng (1994), "The systemayics and ecology of snakeheads", *Hydrologia*, pp.59-74.
- [6] Trương Thủ Khoa và Trần Thị Thanh Hương (1993), *Định danh các loài cá nước ngọt Đồng bằng sông Cửu Long, Việt Nam*, Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ.
- [7] Ellman G.L, Courtney D, Anderdres V.J, Featherstone R.M (1961), "A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity", *Biochemistry and Pharmacology*, **7**, pp.88-95.
- [8] Finney D (1971), *Probit Analysis*, Cambridge University Press.
- [9] Ngô Trọng Lư (2002), *Kỹ thuật nuôi cá quả, cá chình, chạch, bống bớp, lươn...*, NXB Hà Nội.
- [10] Nguyễn Văn Công, Lư Thị Hồng Ly, Nguyễn Xuân Lộc (2006), "Ảnh hưởng của Basudin 50EC lên hoạt tính enzyme cholinesterase và tăng trọng của cá lóc (*Channa striata*)", *Tạp chí Nghiên cứu Khoa học*, Trường Đại học Cần Thơ, pp.13-23.

Đặc điểm phân tử của gen *defensin 1* phân lập từ một số mẫu ngô có khả năng kháng một khác nhau

Vi Thị Xuân Thủy^{1*}, Hồ Mạnh Tường²
Lê Văn Sơn², Nguyễn Vũ Thanh Thanh³, Chu Hoàng Mậu⁴

¹Trường Đại học Tây Bắc

²Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

³Trường Đại học Khoa học, Đại học Thái Nguyên

⁴Trường Đại học Sư phạm, Đại học Thái Nguyên

Ngày nhận bài 2.7.2015, ngày chuyển phản biện 9.7.2015, ngày nhận phản biện 6.8.2015, ngày chấp nhận đăng 12.8.2015

Defensin thực vật là protein hình cầu nhỏ, giàu cystein (Cys), có tác dụng chống lại nấm, vi khuẩn và đặc biệt là một. Defensin liên kết với trung tâm hoạt động của α -amylase trong ruột một, do đó ức chế quá trình tiêu hóa tinh bột của một. Trong nghiên cứu này, các tác giả trình bày kết quả đánh giá khả năng kháng một, tách dòng và xác định trình tự nucleotide của gen *ZmDEF1* từ mARN của các mẫu ngô địa phương Maison, Laocai, Simacai, Luthan và giống ngô lai CP888. Trong đó, giống ngô lai CP888 có khả năng kháng một thấp nhất, cao nhất là mẫu Maison. Gen *ZmDEF1* phân lập được có kích thước 243 nucleotide, mã hoá protein defensin gồm 80 amino axit. Trình tự gen *ZmDEF1* của các mẫu nghiên cứu có sự sai khác ở 5 vị trí nucleotide. Trình tự amino axit suy diễn từ gen *ZmDEF1* của các mẫu ngô địa phương chứa 8 Cys tạo nên 4 cầu nối disulfide, giống ngô lai CP888 có 7 Cys. Gen *ZmDEF1* phân lập từ ADN có chiều dài 345 bp, gồm 2 exon và 1 intron. Gen *ZmDEF1* được sử dụng để tạo vector chuyển gen nhằm nâng cao khả năng kháng một của cây ngô.

Từ khóa: Cys, defensin, kháng một, một ngô, *Zea mays*, *ZmDEF1*.

Chỉ số phân loại 4.6

Mở đầu

Cây ngô (*Zea mays* L.) là một trong năm loài cây lương thực chính của thế giới. Ở Việt Nam, ngô là cây trồng quan trọng thứ hai sau lúa. Hạt ngô chứa gần như đầy đủ các chất dinh dưỡng cho người và gia súc. Trong những năm gần đây, sản xuất ngô ở Việt Nam tăng nhanh nhờ sự phát triển mạnh của ngành chăn nuôi và công nghiệp chế biến. Đặc biệt từ những năm 90 trở lại đây, diện tích, năng suất và sản lượng ngô tăng liên tục nhờ các giống ngô lai mới được đưa vào sản xuất trên diện rộng.

Hạt ngô cũng như các loại ngũ cốc khác dễ bị một xâm hại. Một ngô (*Sitophilus zeamais* Motsch.) là loại đa thực, chúng có thể ăn được hầu hết các loại ngũ cốc, đậu, hạt có dầu và nhiều sản phẩm thực vật khác. Thức ăn thích hợp nhất với một là hạt ngô và gạo. Một trưởng thành dùng vòi khoét một lỗ sâu vào hạt, rồi đẻ trứng ở đó và tiết ra một thứ dịch nhầy để bít kín lỗ đó lại. Khi sâu non nở ra trong hạt ngô, nó thường ăn phôi trước, sau đó mới đến nội nhũ và các bộ phận khác, làm cho hạt chỉ còn lại một lớp vỏ mỏng. Khi đầy sức,

sâu non đục những lỗ nhỏ lộ rõ trên hạt để vũ hóa bay ra ngoài [1, 2].

Defensin thực vật là peptide cation và thuộc về một siêu họ lớn của các peptide kháng khuẩn được tìm thấy trong các sinh vật gọi chung là defensin. Khi gen mã hóa defensin thực vật hoạt động sẽ tổng hợp protein ức chế, ảnh hưởng đến chức năng kênh protein màng, làm suy yếu vi sinh vật, tăng cường khả năng chống chịu, làm thay đổi trạng thái oxy hoá khử axit ascorbic và đặc biệt ức chế hoạt động của α -amylase ở côn trùng. Liu và cs (2006) đã phân lập *defensin1* từ cây đậu xanh và chứng minh được vai trò chống côn trùng, kháng một của protein defensin1 (VrD1) [3]. VrD1 ức chế hoạt động của α -amylase cho nên kìm hãm sự tiêu hóa tinh bột trong ruột một. Pelegrini và cs (2008) đã nghiên cứu chức năng của defensin trong sự ức chế hoạt động của α -amylase ở ấu trùng một khi phân lập defensin1 từ cây đậu đũa (VuD1) [4], tuy nhiên, sự ức chế đối với α -amylase của động vật có vú là rất thấp [5].

Các giống ngô lai ở Việt Nam cho năng suất cao nhưng sản lượng, giá thành, chất lượng bị giảm nhiều

*Tác giả chính: Tel: 0983484171; Email: xuanthuytbu@gmail.com

MOLECULAR CHARACTERISTICS OF *DEFENSIN1* GENE ISOLATED FROM SOME CORN SAMPLES WITH DIFFERENCE IN RESISTANT LEVELS TO WEEVILS

Summary

Plant defensins are small cysteine-rich globular proteins, and resist well against fungi, bacteria and weevils. Defensins bind to the active site of α -amylase in the weevil gut, thus inhibiting starch digestion in weevils. In this report, the authors present the results on the ability to resist the weevils, cloning and determining the *ZmDEF1* gene sequence of four local maize samples Maison, Laocai, Simacai, Luthan and a hybrid maize CP888. The CP888 performed lowest resistant ability to weevils, while Maison had highest one. The coding region of *ZmDEF1* gene isolated from some maize samples had the size of 243 nucleotides, encoding 80 amino acids. The nucleotide sequences of *ZmDEF1* gene of the samples have 5 positions that were different in nucleotide order. Deduced amino acid sequences of defensins of the local maize samples have 8 cysteines that made 4 disulfide bridges; hybrid maize CP888 had 7 cysteines. *ZmDEF1* gene isolated from DNA had the size of 345 bp and consisted of two exons and one in tron. The mRNA sequences of *ZmDEF1* gene could be used to create a transformation vector for gene transfer to improve the ability to resist weevils in maize.

Keywords: Cys, defensin, maize weevil, resistant to weevils, *Zea mays*, *ZmDEF1*.

Classification number 4.6

do hạt của các giống ngô này rất dễ bị một xâm hại. Các giống ngô địa phương miền núi phía Bắc nước ta tuy có năng suất thấp, hạt nhỏ nhưng có khả năng kháng một cao. Hiện nay, nhiều biện pháp bảo quản hạt ngô sau thu hoạch đã được áp dụng, nhưng tốn thời gian, hiệu quả thấp và tổn thất sau thu hoạch vẫn rất lớn. Do vậy, nghiên cứu ứng dụng công nghệ tạo giống ngô kháng một đang được nhiều nhà khoa học quan tâm, trong đó có chiến lược tạo cây ngô chuyển

gen kháng một. Trong bài báo này, chúng tôi trình bày kết quả đánh giá khả năng kháng một và xác định trình tự nucleotide của gen *defensin1* (cADN) của các mẫu ngô nhằm phát triển vector chuyển gen mang cấu trúc *defensin1* phục vụ tạo dòng ngô chuyển gen có khả năng kháng một cao.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Nghiên cứu này sử dụng 4 mẫu ngô địa phương thu thập ở các tỉnh Sơn La (VN1), Lào Cai (VN2, VN3, VN4) và giống ngô lai CP888 do Trung tâm Giống cây trồng Sơn La cung cấp (bảng 1).

Bảng 1: các mẫu/giống ngô sử dụng nghiên cứu

STT	Tên mẫu	Ký hiệu mẫu	Địa điểm thu mẫu	Khối lượng 1.000 hạt (g)	Màu sắc hạt
1	Maison	VN1	Mai Sơn - Sơn La	220,82±0,63	Tím
2	Laocai	VN2	Sì Ma Cai - Lào Cai	220,38±0,84	Trắng
3	Simacai	VN3	Sì Ma Cai - Lào Cai	340,38±0,68	Trắng vàng
4	Luthan	VN4	Sì Ma Cai - Lào Cai	350,02±0,78	Vàng đỏ
5	CP888	CP888	Giống ngô lai CP888	310,92±1,16	Đỏ

Đánh giá khả năng kháng một của các mẫu ngô bằng cách xác định các chỉ tiêu: khối lượng ngô hao hụt, hệ số gia tăng quần thể, chỉ số miễn cảm với một.

Khối lượng ngô hao hụt ở lô thí nghiệm được tính theo công thức:

$$P = X - P_t - P_0 \text{ (g)}$$

Trong đó: P là khối lượng thức ăn hao hụt ở công thức thí nghiệm (g); P_t là khối lượng thức ăn cân được sau thời gian thí nghiệm; P_0 là khối lượng thức ăn hao hụt ở công thức đối chứng; X là khối lượng thức ăn đưa vào thí nghiệm (g) [6].

Hệ số gia tăng quần thể (r) được xác định theo công thức: $N_t = N_0 \times e^{rt}$

Trong đó: N_t là số lượng cá thể một ở thời điểm t; N_0 là số lượng cá thể một đưa vào thí nghiệm ban đầu; r là hệ số gia tăng quần thể [6].

Tỷ lệ nhiễm một = (Số hạt bị nhiễm một/tổng số hạt thí nghiệm) x 100%

Chỉ số miễn cảm với một tương đối (S) được tính theo công thức:

$$S = \frac{1}{2} \sin \alpha (a_n.b_n + b_n.c_n + c_n.d_n + d_n.e_n + \dots + k_n.a_n)$$

Trong đó: S là chỉ số miễn cảm một tương đối; a là góc tạo bởi hai trục mang trị số liên nhau $a = 360^\circ/12$; a, b, c, d... k là các chỉ tiêu theo dõi; n là ký hiệu các mẫu/giống nghiên cứu.

ARN tổng số được tách chiết bằng Trizol Reagent KIT; cADN được tổng hợp theo quy trình Maxima® First Strand cADN Synthesis KIT; gen *defensin1* phân lập từ ngô (*ZmDEF1*) được khuếch đại bằng kỹ thuật PCR với cặp mồi đặc hiệu được tổng hợp tại hãng MacroGen (Hàn Quốc) với trình tự như sau:

ZmDEF-F: 5'ACGCGTCGACATGGCGCCGTCTCGACGCA3'

ZmDEF-R: 5'CCCAAGCTTGCAGATCTTCTTGCAGAAGCAC3'

Chu kỳ nhiệt của PCR là: 94°C/4 phút, lặp lại 30 chu kỳ, mỗi chu kỳ: 94°C/45 giây - 58°C/30 giây - 72°C/60 giây; 72°C/10 phút. Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 0,8%; tinh sạch sản phẩm PCR theo GeneJET PCR Purification KIT và gắn vào vector tách dòng pBT rồi biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* DH5α bằng sốc nhiệt (42°C trong 1 phút 30 giây). Vi khuẩn mang vector tái tổ hợp được chọn lọc trên môi trường LB đặc bổ sung X-gal, IPTG, kháng sinh carbenicilin và bằng colony-PCR với cặp mồi M13. Plasmid tái tổ hợp được thu nhận bằng cách tách chiết theo phương pháp tách dòng phân tử của Sambrook và Russell (2001) [7].

Trình tự gen *ZmDEF1* được xác định bằng thiết bị giải trình tự gen tự động ABI Prism 3130 - USA/ Japan. Số liệu được xử lý bằng phần mềm BioEdit và DNASTar.

Kết quả và thảo luận

Đánh giá khả năng kháng một của các mẫu ngô nghiên cứu

Để xác định được khả năng kháng một của các mẫu ngô nghiên cứu, khối lượng hao hụt, hệ số gia tăng quần thể một và tỷ lệ nhiễm một của các mẫu ngô nghiên cứu đã được xác định ở các thời điểm 15, 30, 45 và 60 ngày lây nhiễm một nhân tạo với 10 cặp một được thả, kết quả được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2: khối lượng ngô hao hụt, hệ số gia tăng quần thể một và tỷ lệ nhiễm một của các mẫu ngô nghiên cứu

Mẫu	15 ngày nhiễm một			30 ngày nhiễm một			45 ngày nhiễm một			60 ngày nhiễm một		
	P(g)	r	N	P(g)	r	N(%)	P(g)	r	%	P(g)	r	N(%)
Maison	0,67	0,023	4,34	1,83	0,048	10,23	2,41	0,066	32,76	5,78	0,061	88,03
Laocai	1,12	0,036	6,22	3,12	0,071	15,88	4,62	0,093	46,21	10,88	0,087	100
Simacai	1,10	0,034	2,43	2,43	0,067	11,86	4,49	0,086	36,08	9,38	0,081	96,26
Luthan	0,86	0,031	4,22	2,14	0,062	9,53	3,62	0,076	32,68	8,93	0,072	89,14
CP888	1,72	0,042	7,86	3,96	0,079	17,38	5,52	0,098	48,63	11,87	0,083	100

Ghi chú: P(g): khối lượng ngô hao hụt ở lô thí nghiệm; r: hệ số gia tăng quần thể một; N(%): tỷ lệ nhiễm một của các mẫu ngô

Kết quả ở bảng 2 cho thấy, trọng lượng hao hụt của các mẫu ngô nghiên cứu tăng dần từ ngày nhiễm một

thứ 15 đến 60. Ở ngày nhiễm một thứ 60, khối lượng hao hụt của giống ngô lai CP888 là cao nhất (11,87 g), tiếp đến là mẫu Laocai (10,88 g), Simacai (9,38 g), Luthan (8,93 g) và thấp nhất là mẫu Maison (5,78 g). Cùng với khối lượng thức ăn hao hụt ở lô thí nghiệm, hệ số gia tăng quần thể một ở các thời điểm 15, 30, 45 và 60 ngày nhiễm một nhân tạo đã được xác định. Hệ số gia tăng quần thể là đại lượng biểu thị số lượng cá thể một gia tăng trong đơn vị thời gian và trên một cá thể. Hệ số gia tăng quần thể một của các mẫu ngô nghiên cứu tăng dần từ 15 đến 45 ngày nhiễm một, ngày thứ 60 thì hệ số này bắt đầu giảm do lúc này lượng thức ăn còn ít, hơn nữa số lượng cá thể một tăng lên, nên không đủ thức ăn cho quần thể, vì thế hệ số tử vong tăng lên. Ở ngày nhiễm một thứ 45, hệ số gia tăng quần thể của các mẫu nghiên cứu là cao nhất, trong đó ở mẫu Maison hệ số đạt 0,066 (thấp nhất trong các mẫu nghiên cứu) và giống ngô lai CP888 có hệ số cao nhất, đạt 0,098.

Mỗi bình thí nghiệm có số hạt ngô của các mẫu nghiên cứu bằng nhau và được thả 10 cặp một, sau cùng thời gian lây nhiễm một xác định tỷ lệ số hạt bị nhiễm một. Kết quả bảng 2 cho thấy, các mẫu ngô nghiên cứu có tỷ lệ nhiễm một tăng dần và đến 60 ngày thì các mẫu CP888 và Laocai đã nhiễm một 100%, còn mẫu Simacai nhiễm 96,26%, mẫu Luthan nhiễm 89,14% và thấp nhất là mẫu Maison nhiễm 88,03%. Từ các chỉ tiêu phân tích trên, đã xác định được chỉ số miễn cảm một tương đối của các mẫu ngô nghiên cứu (bảng 3).

Bảng 3: chỉ số tương đối về sự miễn cảm một (S) của các mẫu ngô nghiên cứu

Mẫu	Maison	Laocai	Simacai	Luthan	CP888
S	836,036	1.408,678	1.022,977	845,979	1.528,041

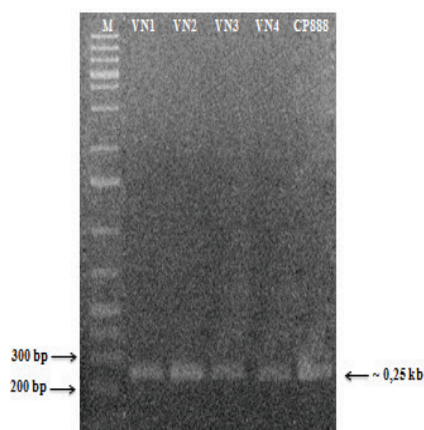
Kết quả ở bảng 3 cho thấy, giống ngô lai CP888 miễn cảm nhất với một, chỉ số miễn cảm với một tương đối là 1.528,041, tiếp đến là mẫu Laocai, Simacai, Luthan và thấp nhất là mẫu Maison (chỉ số miễn cảm với một tương đối là 836,036). Như vậy, trong các mẫu ngô nghiên cứu, mẫu Maison có khả năng kháng một cao nhất. Chúng tôi tiếp tục phân tích đặc điểm của gen *ZmDEF1* của các mẫu ngô nhằm tìm mối liên hệ với đặc tính kháng một của cây ngô.

Tách dòng và xác định trình tự gen *ZmDEF1* từ các mẫu ngô nghiên cứu

Dựa vào trình tự có mã số JF797205 trên Ngân hàng gen quốc tế, cặp mồi đặc hiệu *ZmDEF1-F*/

ZmDEF1-R đã được thiết kế để khuếch đại đoạn mã hoá của gen *ZmDEF1* với kích thước ước tính khoảng 0,25 kb.

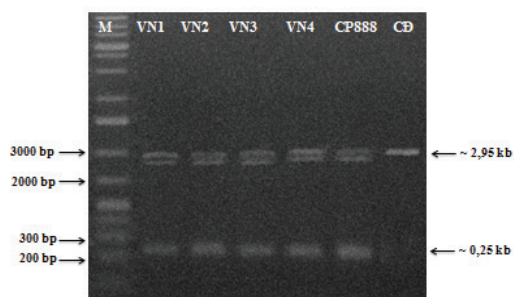
Ở ngô, *ZmDEF1* chỉ được phiên mã ở hạt non và hạt trưởng thành, còn các mô khác thì không hoạt động và hoạt động dưới sự cảm ứng của meja hoặc ABA [8]. Do đó, hạt các mẫu ngô được xử lý ABA, ngâm ủ cho nảy mầm và thu lá sau 5-7 ngày tuổi để tách ARN tổng số. ARN được sử dụng làm khuôn cho phản ứng phiên mã ngược tạo cADN. Phản ứng PCR nhân bản đoạn mã hóa của gen *ZmDEF1* với cặp mồi đặc hiệu, kết quả kiểm tra sản phẩm PCR bằng điện di trên gel agarose cùng thang ADN chuẩn 1 kb plus được thể hiện ở hình 1.



Hình 1: hình ảnh điện di sản phẩm RT-PCR nhân gen *ZmDEF1* của các mẫu ngô nghiên cứu (M: thang ADN chuẩn 1 kb plus; VN1, VN2, VN3, VN4: các mẫu ngô địa phương; CP888: giống ngô lai)

Kết quả thu được ở hình 1 cho thấy, cả 5 mẫu ngô đều cho sản phẩm PCR với một băng ADN với kích thước ước tính khoảng 0,25 kb, kích thước này phù hợp theo tính toán lý thuyết và tương ứng với kích thước của đoạn mã hoá của gen *ZmDEF1* ở ngô mang mã số JF797205 trên Ngân hàng gen quốc tế. Tuy nhiên, để khẳng định chính xác sản phẩm thu được là gen *ZmDEF1*, chúng tôi tiến hành tách dòng, xác định trình tự nucleotide và so sánh với trình tự gen *ZmDEF1* được công bố trên cơ sở dữ liệu NCBI.

Sản phẩm PCR được tinh sạch và gắn vào vector tách dòng pBT, sau đó biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* DH5α và chọn lọc khuẩn lạc trắng bằng phản ứng colony-PCR với cặp mồi M13. Những khuẩn lạc trắng dương tính với colony-PCR có khả năng mang vector tái tổ hợp pBT-*ZmDEF1*. Sau khi tách plasmid từ sinh khối vi khuẩn, chúng tôi thực hiện kiểm tra sự có mặt của gen *ZmDEF1* bằng cách sử dụng enzyme giới hạn *Bam*HI để cắt plasmid tái tổ hợp (hình 2).



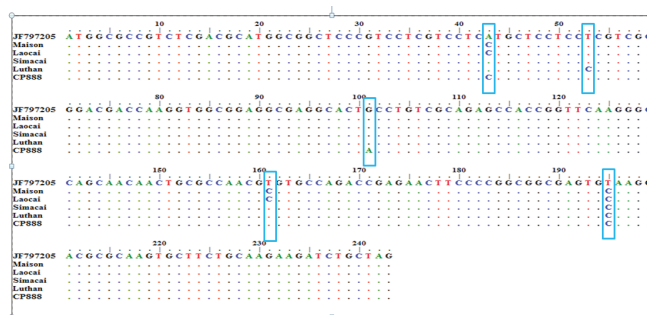
Hình 2: kết quả điện di kiểm tra plasmid tái tổ hợp cắt bằng *Bam*HI

(M: thang ADN chuẩn 1 kb plus; VN1, VN2, VN3, VN4, CP888: plasmid tái tổ hợp pBT-*ZmDEF1* cắt bởi *Bam*HI; DC: plasmid tái tổ hợp pBT-*ZmDEF1* không cắt bởi *Bam*HI)

Theo tính toán lý thuyết, vector pBT có kích thước 2,7 kb, sản phẩm PCR gen đích 0,25 kb thì plasmid tái tổ hợp có kích thước khoảng 2,95 kb. Kết quả điện di kiểm tra (hình 2) cho thấy, các dòng khuẩn lạc trắng dương tính với colony - PCR đều mang plasmid tái tổ hợp (pBT-*ZmDEF1*). Các plasmid tái tổ hợp được sử dụng để xác định trình tự nucleotide.

Xác định trình tự gen *ZmDEF1* từ mARN các mẫu ngô nghiên cứu

Kết quả xác định trình tự nucleotide của gen *ZmDEF1* phân lập từ mẫu ngô nghiên cứu cho thấy các trình tự gen thu được có kích thước 243 bp (hình 3).

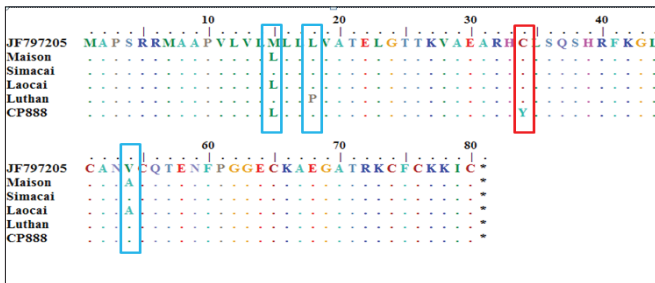


Hình 3: trình tự gen *ZmDEF1* của các mẫu ngô nghiên cứu và JF797205 trên Ngân hàng gen quốc tế

Kết quả so sánh trình tự nucleotide của gen *ZmDEF1* ở 5 mẫu nghiên cứu với trình tự nucleotide của gen *ZmDEF1* công bố trên Ngân hàng gen quốc tế (mã số JF797205) có độ tương đồng của các trình tự gen này là 98,8 đến 99,6%, như vậy đã phân lập và tách dòng thành công gen *ZmDEF1* (mARN) từ các mẫu ngô nghiên cứu. Giữa các trình tự gen *defensin1* có 5 vị trí nucleotide sai khác ở các vị trí nucleotide thứ 43, 53, 101, 161 và 195 (hình 3). Trong đó, mẫu Maison và CP888 khác nhau ở vị trí nucleotide thứ 53, 101 và 161. Đặc biệt ở vị trí thứ 101, thuộc bộ ba quy định amino axit thứ 34 của chuỗi polypeptide, ở mẫu Maison là G còn CP888 là A nên rất có thể dẫn đến

sự sai khác amino axit giữa hai trình tự, do đó tiếp tục phân tích trình tự amino axit suy diễn từ gen *ZmDEF1* của các mẫu nghiên cứu. Các trình tự gen *ZmDEF1* của các mẫu Maison, Laocai, Simacai, Luthan và Cp888 đã được đăng trên Ngân hàng gen quốc tế với mã số LN650982, LN650980, LN650983, LN650981, LN650979. Trong đó, trình tự gen của mẫu Maison được sử dụng để phát triển vector chuyển gen với mục đích tăng cường khả năng kháng một ở ngô.

Trình tự amino axit suy diễn từ gen *ZmDEF1* của các mẫu ngô nghiên cứu và JF797205 đều có 80 amino axit (hình 4). Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu của Baosheng và cs (2011) khi phân lập gen *ZmDEF1* từ giống ngô NongDa108 phục vụ chuyển gen với mục đích kháng nấm [8]. Hình 4 cho thấy, giữa các trình tự nghiên cứu có 4 vị trí amino axit khác nhau ở các vị trí thứ 15, 18, 34, 54 của protein defensin.



Hình 4: trình tự amino axit của defensin1 ở các mẫu nghiên cứu và JF797205 trên Ngân hàng gen quốc tế

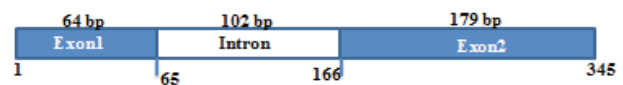
Cấu trúc của defensin thực vật gồm vùng tín hiệu dẫn ở đầu N và vùng chức năng nằm ở đầu C. Vùng chức năng thường chứa từ 45-55 amino axit. Ở ngô, vùng tín hiệu dẫn gồm 31 amino axit, vùng chức năng gồm 49 amino axit. Trong vùng chức năng có chứa 8 phân tử Cys ở các vị trí amino axit thứ 3, 14, 20, 24, 34, 43, 45 và 49, chúng tạo nên 4 cầu disulfide giữa các cặp Cys3 - Cys49, Cys14 - Cys34, Cys20 - Cys43, Cys24 - Cys45 giúp cho sự ổn định cấu trúc không gian của defensin [8]. Cầu nối disulfide giữa các Cys trong vùng chức năng của defensin giữ vai trò quan trọng trong quyết định ức chế α -amylase ở ruột một. Hình 4 cho thấy, trong vùng chức năng của protein suy diễn của các mẫu ngô nghiên cứu có 2 vị trí amino axit sai khác nhau là vị trí 3 và 23. Đặc biệt ở vị trí amino axit thứ 3, các mẫu ngô địa phương Maison, Laocai, Simacai, Luthan và JF797205 đều là Cys để tạo cầu nối disulfide với Cys thứ 49, còn giống ngô lai CP888 thì vị trí thứ 3 này là tyrosine (Y). Vì vậy, trong cấu trúc protein defensin1 của giống ngô lai CP888 sẽ chỉ

có 3 cầu nối disulfide, đặc điểm này có thể liên quan đến tính ổn định của protein và rất có thể làm giảm hoạt tính ức chế α -amylase, tăng tính miễn cảm với một của giống ngô này.

Về không gian ba chiều, defensin gồm 3 phiến gấp β và một chuỗi xoắn α . Trong đó giữa nếp gấp β thứ 2 và thứ 3 có vùng Loop 3, vùng này có chức năng quan trọng trong ức chế hoạt động của α -amylase của một. Do có sự liên kết giữa Loop 3 với trung tâm hoạt động (3 Loop: Loop A, Loop B, Loop C) của α -amylase ở một, đã ngăn cản cơ chất tinh bột đi vào [9]. Sự ức chế này biểu hiện thấp đối với α -amylase của động vật có vú, vì có sự sai khác về độ dài của 3 Loop trung tâm hoạt động của α -amylase của động vật rút ngắn và mở rộng hơn nên Loop 3 của defensin1 không liên kết vào được. Như vậy, có thể ứng dụng biện pháp nâng cao hàm lượng defensin1 trong hạt thực vật nhằm tăng cường khả năng kháng lại côn trùng gây hại ở ngô, lúa gạo và đậu xanh.

So sánh trình tự gen *ZmDEF1* phân lập từ ADN và cADN

Việc so sánh trình tự gen *ZmDEF1* phân lập từ ADN và phân lập từ cADN cho phép tìm ra đặc điểm cấu trúc của gen, đồng thời làm căn cứ để phân tích sự có mặt của gen chuyển trong hệ gen cây ngô chuyển gen. Chúng tôi tiến hành phân lập và giải trình tự gen *ZmDEF1* từ ADN tổng số của mẫu ngô Maison có khả năng kháng một cao nhất, kết quả thu được đoạn ADN có kích thước 345 bp. Trình tự gen *ZmDEF1* phân lập từ ADN của mẫu Maison đã được đăng ký trên Ngân hàng gen quốc tế với mã số LN809934. So sánh trình tự gen *ZmDEF1* tách dòng từ cADN với ADN của mẫu ngô Maison, gen có tổng chiều dài 345 bp, cấu tạo gồm 2 exon xen kẽ bởi intron có chiều dài là 102 bp (hình 5).



Hình 5: cấu trúc của gen *ZmDEF1* của mẫu ngô VN1

Phân lập thành công gen *ZmDEF1* từ ADN cho thấy, cặp mồi đặc hiệu *ZmDEF1*-F/*ZmDEF1*-R có thể dùng để phân biệt cây ngô mang gen chuyển với cây không mang gen chuyển *ZmDEF1* bằng phản ứng PCR. Đối với ngô mang gen chuyển, cặp mồi này có thể khuếch đại *ZmDEF1* nội tại cho kích thước đoạn ADN là 345 bp, đồng thời khuếch đại cả *ZmDEF1* ngoại lai cho kích thước đoạn ADN là 243 bp. Cây không mang gen

chuyển chỉ khuếch đại được một sản phẩm là *ZmDEF1* nội tại cho kích thước đoạn ADN là 345 bp.

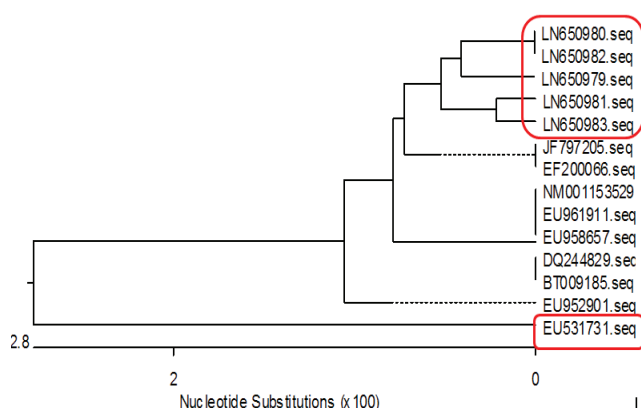
Sự đa dạng về trình tự vùng mã hoá của gen *ZmDEF1* ở cây ngô

Để xác định mức độ đa dạng trong trình tự nucleotide của gen *ZmDEF1*, chúng tôi thực hiện so sánh vùng mã hoá của gen *ZmDEF1* phân lập từ các giống ngô có mã số trên Ngân hàng gen quốc tế (bảng 4).

Bảng 4: thống kê một số trình tự gen *ZmDEF1* để phân tích đa dạng di truyền

STT	Mã số NCBI	Năm công bố	Vùng phân lập	Tác giả
1	LN650979	2014	Việt Nam	Vi T.X.T và cs
2	LN650980	2014	Việt Nam	Vi T.X.T và cs
3	LN650981	2014	Việt Nam	Vi T.X.T và cs
4	LN650982	2014	Việt Nam	Vi T.X.T và cs
5	LN650983	2014	Việt Nam	Vi T.X.T và cs
6	NM001153529	2013	Mỹ	Schnable P.S và cs
7	EU531731	2009	Italia	Padovan L và cs
8	EU961911	2008	Mỹ	Alexandrov N.N và cs
9	EU958657	2008	Mỹ	Alexandrov N.N và cs
10	EU952901	2008	Mỹ	Alexandrov N.N và cs
11	EF200066	2007	Trung Quốc	Wang B và cs
12	DQ244829	2006	Trung Quốc	Jia J và cs
13	BT009185	2003	Mỹ	Tingey S.V và cs
14	JF797205	2011	Trung Quốc	Wang B.S

Kết quả đánh giá sự đa dạng của trình tự gen *ZmDEF1* của các trình tự nghiên cứu được thể hiện trên sơ đồ hình cây ở hình 6.



Hình 6: sơ đồ hình cây thể hiện sự khác biệt di truyền về trình tự nucleotide đoạn mã hoá của gen *ZmDEF1*

Kết quả hình 6 cho thấy, 14 trình tự vùng mã hóa của gen *ZmDEF1* chia thành 2 nhóm lớn với khoảng cách di truyền là 2,8%. Nhóm lớn thứ nhất gồm 13 trình tự gen và chia thành 4 nhóm nhỏ (nhóm nhỏ thứ nhất gồm các trình gen có quan hệ gần gũi với nhau: LN650982, LN650980, LN650983, LN650981, LN650979 phân lập ở Việt Nam). Nhóm lớn thứ hai chỉ bao gồm duy nhất một trình tự gen mang mã EU531731 (Italia).

Kết luận

Trong các mẫu ngô nghiên cứu, mẫu Maison có khả năng kháng mọt cao nhất, thấp nhất là giống ngô lai CP888. Gen *ZmDEF1* phân lập từ mARN của các mẫu ngô địa phương và giống ngô lai CP888 có kích thước là 243 bp mã hóa chuỗi polypeptide dài 80 amino axit. Trình tự nucleotide của gen *ZmDEF1* của các mẫu nghiên cứu có sự sai khác ở 5 vị trí nucleotide. Trình tự amino axit suy diễn của defensin các mẫu ngô địa phương chứa 8 Cys tạo nên 4 cầu nối disulfide, giống ngô lai CP888 có 7 Cys. Trình tự nucleotide của gen *ZmDEF1* từ ADN có chiều dài 345 bp gồm 2 exon và 1 intron. Trình tự gen *ZmDEF1* thu nhận được từ các mẫu ngô nghiên cứu là cơ sở để tạo vector phục vụ chuyển gen nhằm cải thiện khả năng kháng mọt ở cây ngô.

Lời cảm ơn

Công trình được hoàn thành nhờ kinh phí của đề tài khoa học và công nghệ cấp Bộ Giáo dục và Đào tạo, mã số: B2014-TN06-04. Các tác giả xin cảm ơn sự hỗ trợ từ đề tài và trang thiết bị của Phòng thí nghiệm trọng điểm công nghệ gen (Viện Công nghệ Sinh học).

Tài liệu tham khảo

- [1] Gutierrez-Campos R, Torres-Acosta J.A, Saucedo-Arias L.J, Gomez-Lim M.A (1999), "The use of cysteine proteinase inhibitors to engineer resistance against potyviruses in transgenic tobacco plants", *Nat Biotechnol*, **17**, pp.1223-1226.
- [2] Throne J.E (1994), "Life history of immature maize weevils (*Coleoptera: Curculionidae*) on corn stored at constant temperatures and relative humidities in the laboratory", *Environmental Entomology*, **23**, pp.1459-1471.
- [3] Liu Y.J, Cheng C.S, Lai S.M, Hsu M.P, Chen C.S, Lyu P.C (2006), "Solution structure of the plant defensin VrD1 from mungbean and its possible role in insecticidal activity against bruchids", *Proteins*, **63**(4), pp.777-786.
- [4] Pelegrini P.B, Lay F.T, Murad A.M, Anderson M.A, Franco O.L (2008), "Novel insights on the mechanism of action of α -amylase inhibitors from the plant defensin family", *Proteins*, **73**, pp.719-729.
- [5] Pelegrini P.B, Franco O.L (2005), "Plant gamma-thionins: novel insights on the mechanism of action of a multifunctional class of defense proteins", *Int J Biochem Cell Biol*, **37**, pp.2239-2253.
- [6] Hà Quang Hùng (2005), *Giáo trình kiểm dịch thực vật và dịch hại nông sản sau thu hoạch*, NXB Nông nghiệp.
- [7] Sambrook J, Russell D.W (2001), *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, NY.
- [8] Baosheng W, Jinguan Y, Dengyun Z and Qian Z (2011), "Maize defensin ZmDEF1 is involved in plant response to fungal phytopathogens", *African Journal of Biotechnology*, **10**(72), pp.16128-16137.
- [9] Lin K.F, Lee T.R, Tsai P.H, Hsu M.P, Chen C.S, Lyu P.C (2007), "Structure-based protein engineering for α -amylase inhibitory activity of plant defensin", *Protein*, **68**, pp.530-540.

Thiết kế vector biểu hiện thực vật mang gen *ZmDREB2A-S* tổng hợp nhân tạo và biến nạp vào *Agrobacterium tumefaciens*

Huỳnh Thị Thu Huệ^{1*}, Bùi Mạnh Minh¹, Đoàn Thị Bích Thảo²
Nông Văn Hải¹, Bùi Mạnh Cường²

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

²Viện Nghiên cứu ngô, Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam

Ngày nhận bài 5.6.2015, ngày chuyển phản biện 10.6.2015, ngày nhận phản biện 8.7.2015, ngày chấp nhận đăng 13.7.2015

DREB2A (dehydration responsive element binding protein 2A) là một yếu tố phiên mã quan trọng tham gia vào phản ứng chịu hạn của thực vật nhờ khả năng tương tác với các tiểu đơn vị của ADN polymerase cũng như khả năng gắn bám đặc hiệu các yếu tố điều hòa dạng *cis* là DRE/CRT. Ở ngô, các biến đổi sau phiên mã sẽ tạo thành mARN *ZmDREB2A* dạng S, từ đó dịch mã tạo thành dạng protein có chức năng hoạt hóa các gen chống chịu hạn. Trong nghiên cứu này, đoạn gen tổng hợp nhân tạo *ZmDREB2A* dạng S có chứa vùng mang mã cho một protein đầy đủ gồm 318 axit amin đã được gắn vào vector pCAMBIA1300 để tạo vector chuyển gen có cấu trúc *ubi:: ZmDREB2A-S:: 35S terminator* nhằm mục đích biểu hiện gen liên tục trong cây, toàn bộ vector đã được biến nạp vào tế bào vi khuẩn *A. tumefaciens* tạo nguyên liệu cho các nghiên cứu chuyển gen nhằm nâng cao tính chịu hạn ở thực vật.

Từ khóa: *A. tumefaciens*, gen *ZmDREB2A-S*, kháng hạn, ngô, pCAMBIA1300.

Chỉ số phân loại 4.6

CONSTRUCTION OF BINARY VECTOR CONTAINED ARTIFICIAL ZMDREB2A-S GENE AND TRANSFORMATION INTO AGROBACTERIUM TUMEFACIENS

Summary

DREB2A (dehydration responsive element binding protein 2A) is an important transcription factor involved in drought-inducible gene expression in plant. DREB2A proteins are able to bind regulatory elements DRE/CRT specifically as well as interact with the DNA polymerase subunits to form transcriptional complex. In *Zea mays*, the mRNA splicing process will create *ZmDREB2A-S* mRNA form, thus induce drought tolerance genes. In this study, the artificial *ZmDREB2A-S* gene which contains complete coding region for a functional protein consisting of 318 amino acids has been designed. The expression cassette *ubi:: ZmDREB2A-S::35S ter* was cloned into the pCAMBIA1300 vector and then introduced into *A. tumefaciens* cells to produce materials for further plant drought tolerance researches.

Keywords: *A. tumefaciens*, drought tolerance, pCAMBIA1300, *Zea mays* L., *ZmDREB2A-S* gene.

Classification number 4.6

Đặt vấn đề

Ở thực vật, các yếu tố điều hòa *cis* dạng DRE đóng một vai trò quan trọng trong việc hoạt hóa các gen tham gia trong cơ chế cảm ứng chống hạn và lạnh. Sự biểu hiện của gen *DREB1A* và hai trình tự tương đồng của nó được cảm ứng bởi điều kiện nhiệt độ thấp, trong khi sự biểu hiện của gen *DREB2A* và các trình tự tương đồng của nó được cảm ứng bởi điều kiện khô hạn. Gen *DREB2A* được phân lập ở *Arabidopsis* là gen mã hóa cho protein bám trình tự DRE/CRT và được cảm ứng hoạt động bởi các stress áp suất thẩm thấu và điều kiện hạn [1]. Trong nghiên cứu gần đây, Sato và cộng sự đã công bố khả năng tương tác của protein *AtDREB2A* với tiểu đơn vị B3-1 của ADN polymerase II (DPB3-1) và các yếu tố nhân (NF-YA, NF-YB) để tạo nên phức hợp có thể hoạt hóa sự biểu hiện các gen đích của

*Tác giả chính: Email: hthue@igr.ac.vn; Tel: 0984630757

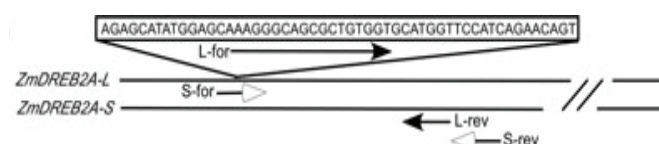
AtDREB2A tham gia vào quá trình chịu hạn [2].

Nghiên cứu DREB2 ở cây *Arabidopsis* cho thấy, vùng trung tâm của DREB2 có mang một vùng điều hòa âm tính và sự cắt bỏ vùng đó tạo nên protein DREB2A có hoạt tính (DREB2A-CA). Sự biểu hiện của DREB2A-CA ở cây *Arabidopsis* chuyển gen khi bị gây hạn cho thấy biểu hiện một loạt các gen chống hạn và chống stress nhưng cây có kiểu hình còi cọc. Khi DREB2A-CA được biểu hiện dung hợp với các protein phát huỳnh quang, chúng được quan sát thấy xuất hiện nhiều trong nhân [3]. Một số gen đích được hoạt hóa sau khi có sự hoạt động của DREB2A rất khác so với DREB1A, nguyên nhân là do sự khác nhau ở trình tự bám đặc hiệu của DREB2A so với DREB1A. Trình tự bám đặc hiệu của DREB1A là A/GCCGACNT trong khi DREB2A ưu tiên bám trình tự ACCGAC. Sự biểu hiện DREB2A-CA cũng cảm ứng biểu hiện một loạt các gen sốc nhiệt và làm tăng khả năng chống hạn của các cây chuyển gen [4]. Trong thập kỷ qua, các nghiên cứu chuyển gen *DREB2A* đã được nhiều nhóm nghiên cứu trên thế giới thực hiện trên nhiều đối tượng, với mục đích và quy mô khác nhau. Các nghiên cứu chuyển gen *ZmDREB2A* vào cây mô hình *Arabidopsis* đều mang lại kết quả nâng cao sức chịu hạn trên cây chuyển gen [5]. Năm 2014, Sadhukhan và cộng sự đã phân lập gen *VuDREB2A* trên đậu đũa (*Vigna unguiculata* L. Walp), tiến hành chuyển gen lên *Arabidopsis* và thu được các dòng cây chịu hạn [6].

Ở Việt Nam, trong thời gian qua đã có một số nghiên cứu chuyển gen nhằm nâng cao tính chịu hạn cho cây trồng như ngô, lúa, đậu tương. Nhóm nghiên cứu của chúng tôi đã thiết kế, tổng hợp và cải biến gen *CspB* có nguồn gốc từ vi khuẩn *Bacillus subtilis*, mã hóa cho protein ARN chaperone có chức năng giúp cho các sợi mARN tồn tại bền vững ở dạng sợi đơn trong điều kiện môi trường khắc nghiệt và chuyển gen vào 3 dòng ngô Việt Nam V152N, C436 và C7N. Qua kết quả phân tích và đánh giá khả năng hữu thụ của cây chuyển gen cho thấy, đã chuyển thành công gen chịu hạn *modiCspB* với tần số chuyển gen vào các nguồn vật liệu đạt tỷ lệ trung bình là 0,56% [7]. Ngoài ra, năm 2009, Phạm Xuân Hội và cộng sự đã tiến hành phân

lập và giải trình tự yếu tố phiên mã *OsRAP2.4A* trên cây lúa, có trình tự tương đồng với *ZmDBF* trên ngô [8]. Đồng thời, Cao Lệ Quyên và cộng sự cũng phân lập được gen *OsDREB2A* trên cây lúa Mộc Tuyền (*MtOsDREB2A*), chuyển gen này vào cây lúa Chanh Trụi dưới sự điều khiển của Ubiquitin promoter và đã thu được 16 dòng chuyển gen có gen đích trong hệ gen [9]. Nguyễn Văn Đồng và cộng sự đã biến nạp thành công gen *GmMyb* một yếu tố điều hòa phiên mã liên quan đến tính chịu hạn vào giống đậu tương DT22 [10].

Ở cây ngô, tồn tại hai dạng mARN là *ZmDREB2A-L* và *ZmDREB2A-S*. Dạng *ZmDREB2A-L* có chiều dài 1.336 bp, chỉ mã hóa cho đoạn peptide có chiều dài 89 axit amin, chuỗi peptide không có domain ERF/AP2 gắn với ADN và dẫn đến hình thành dạng không có chức năng. *ZmDREB2A-S* có chiều dài 1.283 bp, mã hóa cho protein gồm 318 axit amin có các domain ERF/AP2 điển hình của các loại DREB nên là dạng có chức năng. Dạng S ngắn hơn dạng L 53 bp (hình 1), khi cây chịu stress thì xảy ra quá trình xử lý sau phiên mã mARN dạng *ZmDREB2A-L* bị cắt đi 53 bp để thành dạng *ZmDREB2A-S* có hoạt tính và khi bình thường thì đa phần mARN *ZmDREB2A* không bị cắt 53 bp và ở dạng *ZmDREB2A-L* [5]. Do vậy, dạng *ZmDREB2A-S* mới có vai trò trong việc chống chịu hạn cho cây ngô và chỉ được xuất hiện khi điều kiện môi trường hạn hán. Tuy nhiên, trong điều kiện hạn hán sự xuất hiện và duy trì của mARN *ZmDREB2A* dạng S diễn ra rất nhanh nên việc phân lập đoạn gen này trên các mẫu bị hạn gặp nhiều khó khăn, do vậy, việc tổng hợp nhân tạo đoạn gen *ZmDREB2A* dạng S sẽ khắc phục được khó khăn trên.



Hình 1: sự khác biệt giữa *ZmDREB2A-L* và *ZmDREB2A-S* [5]

Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành thiết kế vector pCambia1300 mang gen *ZmDREB2A* dạng S tổng hợp nhân tạo trong cấu trúc biểu hiện có promoter ubiquitin và 35S terminator. Sau đó, vector tái tổ hợp

được biến nạp vào vi khuẩn *A. tumefaciens* để phục vụ cho mục đích chuyển gen.

Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

Nguyên liệu

Các vector được sử dụng gồm: vector pUC57 mang gen *ZmDREB2A-S* được tổng hợp từ hãng Genscript (Hồng Kông), vector tách dòng trung gian pRTRA mang ubiquitin promoter đã được thiết kế dựa trên vector gốc pRTRA7/3 tại Phòng Đa dạng sinh học hệ gen (Viện Nghiên cứu hệ gen), vector pCAMBIA1300, chủng *A. tumefaciens* LBA4404 đã được lưu trữ tại Phòng Đa dạng sinh học hệ gen.

Cặp mồi để nhân đoạn gen *ZmDREB2A-S* được chúng tôi thiết kế dựa trên trình tự đoạn gen *ZmDREB2A-S* mã số NM 001112406 và được tổng hợp từ hãng Genscript có trình tự như sau:

ZmDREB2AF1: 5' ACGGATCCATGACGCTGGATCAG 3'

ZmDREB2AR1: 5' ACTAGCGGCCGCGTTTAGCCGCTCC 3'

Phương pháp

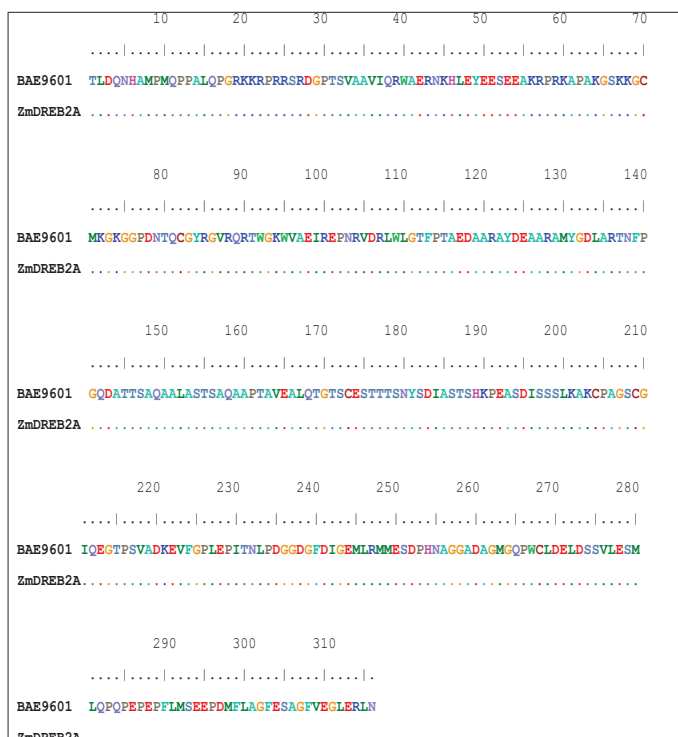
Các phương pháp sinh học phân tử như PCR, xử lý ADN plasmid với enzyme hạn chế, ghép nối gen với vector, biến nạp vector vào tế bào vi khuẩn được thực hiện theo hướng dẫn của sách Cẩm nang phòng thí nghiệm theo Sambrook và Russell (2001).

Kết quả và thảo luận

Đoạn gen *ZmDREB2A* dạng S được tổng hợp và tách dòng trong vector pUC57 tại hãng Genscript dựa theo công bố trên ngân hàng Genbank về gen *ZmDREB2A* dạng S với mã số NM 001112406. Đoạn gen tổng hợp có chứa đầy đủ nucleotide vùng CDS mã hóa cho 316 axit amin (hình 2) của protein chức năng *ZmDREB2A*. Trình tự amino axit suy diễn từ trình tự gen *ZmDREB2A* tổng hợp đã được so sánh với trình tự amino axit của *ZmDREB2A* trong Genbank (BAE9601) cho thấy, không có sự sai khác amino axit nào (hình 3) và đã tổng hợp được chính xác đoạn gen *ZmDREB2A* dạng S. Từ đó, chúng tôi tiến hành các thí nghiệm lắp ghép gen *ZmDREB2A-S* vào các vector trung gian (pRTRA chứa ubiquitin promoter) và vector biểu hiện thực vật (pCAMBIA1300).

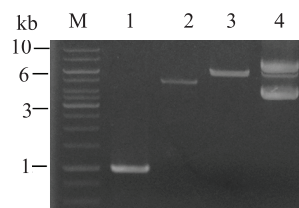
1	acg ctg gat cag aac cat gcc atg ccg atg cag ccc ccg gcc ctg
1	T L D Q M H A M P M Q P P A L
46	cag ccc gga agy aag aag cga cct cgc aga tca cga gat ggy cct
16	Q P G R R K R P R R S R D G P
91	acg tca gta gca gct gtc atc cag ccg tgg gct gag cgc aac aag
21	T S V A A V I Q R W A E R N R
136	cat ttg gag tat gag gaa tct gag gag gca aag cga cca aga aaa
46	H L E Y E E S E E A K R P R R
181	gca cct gca aag ggt tgg aag aag ggc tgt atg aag gga aaa ggg
61	A P A K G S K R G C M K G K G
226	ggy cct gac aat act cca tgt gga tgc cgt gga gty agy cag cgt
76	G P D N T Q C G Y R G V R Q R
271	act tgg ggy aag tgg gtt gct gaa ata aga gag cca aat cgt gtc
91	T W G K W V A E I R E P M R V
316	gac aga ctc tgg ctg ggt acc ttc cca acc ggg gag gat gca gct
196	D R L W L G T F P T A E D A A
361	agy gcc tat gac gag gca gcc aga ggg atg tat gga gac ttg gca
121	R A Y D E A A R A M Y G D L A
406	egy act aac ttc ccc gga cag gat gca aca acc tct gcc caa gct
136	R T M F P G Q D A T T S A Q A
451	gct cta gca tgg acc tct gcc cag gct gct cca aca gct gtc gaa
151	A L A S T S A Q A A P T A V E
496	gct ctt cag act ggc acg tca tgc gag tgg aca acg aca tca aat
166	A L Q T G T S C E S T T T S M
541	tac tgg gac atc gca tcc acc tca caa aag cct gaa gcc tct gac
181	T S D I A S T S H R P E A S D
586	atc tgg agc tcc cta aag gca aaa tgc cca gct gga tca tgt ggt
196	I S S S L K A R C P A G S C G
631	atc caa gag ggt aca ccc agt gta gct gac aag gag gtc ttt ggg
211	I Q E G T P S V A D K E V F G
676	ccg ttg gag cct atc aca aat ctt cca gat ggt ggt gat ggt ttt
226	P L E P I T M L P D G G D G F
721	gat atc ggt gag atg ctg agy atg atg gaa agc gat cca cat aat
241	D I G E M L R M M E S D P H M
766	gca ggt gga gct gac gct ggc atg ggy cag ccc tgg tgt ctt gat
256	A G G A D A G M G Q P W C L D
611	gag ctg gat tgg agt gtc ttg gag agc atg ctc cag cca cag cca
271	E L D S S V I E S M L Q P Q P
656	gag cca gag cca ttc ctg atg tct gaa gaa ccg gac atg ttt ctt
286	E P E P F L M S E E P D M F L
901	gct ggc ttc gaa agc gct ggt ttc gtc gag ggt ctg gag ccg cta
301	A G F E S A G F V E G I E R L
946	aac
316	N

Hình 2: trình tự nucleotide và amino axit suy diễn của gen *ZmDREB2A*



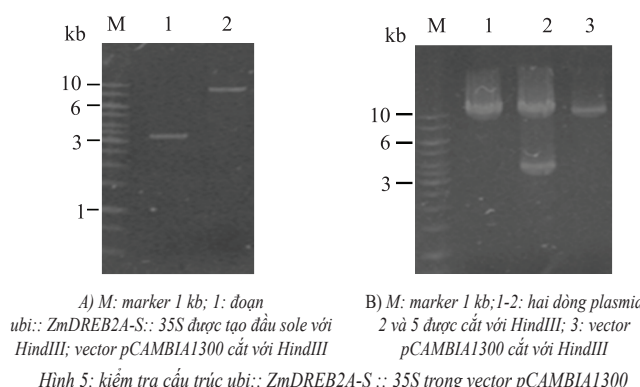
Hình 3: so sánh trình tự amino axit suy diễn của gen *ZmDREB2A* tổng hợp với trình tự amino axit của *ZmDREB2A* trong Genbank (BAE9601)

Với cặp mồi *ZmDREB2AF1* và *ZmDREB2AR1*, đoạn gen *ZmDREB2A-S* có kích thước 954 bp được nhân bằng phản ứng PCR sử dụng khuôn ADN là pUC57 tái tổ hợp mang gen *ZmDREB2A-S*. Sau đó, đoạn gen *ZmDREB2A-S* được tạo đầu so le nhờ cắt với enzyme *BamHI* và *NotI* để thích hợp cho việc chèn vào vector trung gian pRTRA có kích thước khoảng 5 kb đã có chứa ubiquitin promoter cũng được mở vòng với *BamHI* và *NotI*. Hình điện di kiểm tra ADN trên gel agarose cho thấy, với kích thước đoạn gen *ZmDREB2A-S* là khoảng trên 900 bp (hình 4, đường chạy 1) và vector pRTRA đã có chứa ubiquitin promoter và 35S terminator là khoảng 5 kb (hình 4, đường chạy 2), vector pRTRA tái tổ hợp nếu được gắn thêm gen *ZmDREB2A-S* sẽ có kích thước khoảng 6 kb (hình 4, đường chạy 3) hiển thị sản phẩm được cắt mở vòng với *BamHI* của vector *pRTRA ubi:: ZmDREB2A-S::35S* là phù hợp với tính toán lý thuyết. Điều này cho thấy, chúng tôi đã thiết kế được cấu trúc *ubi:: ZmDREB2A-S:: 35S* trong vector trung gian pRTRA. Toàn bộ cấu trúc *ubi:: ZmDREB2A-S:: 35S* đã được xác định trình tự và so sánh với các trình tự gốc của *ubi* promoter, gen *ZmDREB2A-S* và 35S terminator, kết quả cho thấy các đoạn đã được ghép đúng trật tự và không có sự sai khác về nucleotide so với các trình tự gốc.



Hình 4: kiểm tra đoạn gen *ZmDREB2A-S* trong vector *pRTRA7/3*
Ghi chú: M: marker 1 kb; 1: sản phẩm PCR nhân *ZmDREB2A-S*; 2: pRTRA chứa ubiquitin promoter mở vòng với *BamHI* và *NotI*; 3: vector *pRTRA ubi:: ZmDREB2A-S:: 35S* mở vòng với *BamHI*; 4: vector *pRTRA ubi:: ZmDREB2A-S:: 35S*

Để tạo vector biểu hiện thực vật mang gen *ZmDREB2A-S*, toàn bộ cấu trúc *ubi:: ZmDREB2A-S:: 35S* được cắt từ vector trung gian bằng *HindIII* có kích thước 3,2 kb và lai với vector pCAMBIA1300 cũng được mở vòng với *HindIII* có kích thước gần 9 kb (hình 5A). Sau khi biến nạp sản phẩm lai vào tế bào *E. coli*, chúng tôi thu được hai dòng plasmid số 2 và 5 cao hơn vector pCAMBIA1300 chưa tái tổ hợp. Hai dòng này được kiểm tra bằng cắt với *HindIII*, kết quả là dòng số 5 có đoạn chèn kích thước 3,2 kb tương ứng với tính toán về kích thước của cấu trúc *ubi:: ZmDREB2A-S:: 35S* (hình 5B). Sau đó, plasmid này được biến nạp vào tế bào *A. tumefaciens* để chọn tế bào tái tổ hợp với pCAMBIA1300 *ubi:: ZmDREB2A-S:: 35S*. Kết quả PCR nhân đoạn gen *ZmDREB2A-S* từ khuôn plasmid được tách từ 3 dòng *A. tumefaciens* sau biến nạp sử dụng cặp mồi *ZmDREB2AF1* và *ZmDREB2AR1* (hình 6) đã cho thấy, cả 3 dòng tế bào *A. tumefaciens* đều có chứa gen *ZmDREB2A-S* với kích thước khoảng 1 kb đúng theo tính toán lý thuyết.



A) M: marker 1 kb; 1: đoạn *ubi:: ZmDREB2A-S:: 35S* được tạo đầu sole với *HindIII*; vector pCAMBIA1300 cắt với *HindIII*
B) M: marker 1 kb; 1-2: hai dòng plasmid 2 và 5 được cắt với *HindIII*; 3: vector pCAMBIA1300 cắt với *HindIII*
Hình 5: kiểm tra cấu trúc *ubi:: ZmDREB2A-S:: 35S* trong vector pCAMBIA1300

Như vậy, gen *ZmDREB2A* dạng S đã được gắn vào trong cấu trúc có ubiquitin promoter và 35S terminator trong vùng T-ADN của vector pCAMBIA1300, vector chứa gen chỉ thị chọn lọc thực vật là hygromycin. Sơ đồ cấu trúc vector pCAMBIA1300 *ubi:: ZmDREB2A-S:: 35S* thể hiện ở hình 7.

Sử dụng chỉ thị phân tử SSRs để phân tích đa dạng di truyền các dòng/giống bưởi thu thập ở các vùng sinh thái khác nhau của Việt Nam

Nguyễn Phương Thúy^{1*}, Đỗ Thị Ngọc Hà², Trần Thị Oanh Yến¹, Đào Thị Bé Bảy¹

¹Viện Cây ăn quả miền Nam

²Trung tâm Nghiên cứu thực nghiệm lâm nghiệp Đông Nam Bộ

Ngày nhận bài 12.1.2015, ngày chuyển phản biện 22.1.2015, ngày nhận phản biện 2.3.2015, ngày chấp nhận đăng 16.3.2015

Phân tích mối quan hệ di truyền 15 giống/dòng bưởi thu thập ở các vùng khác nhau của Việt Nam bằng chỉ thị phân tử SSR cho thấy, có 18 mẫu cho sản phẩm khuếch đại phân đoạn ADN, trong đó có 3 mẫu xuất hiện phân đoạn ADN nhưng thể hiện trạng thái đơn hình và 15 mẫu còn lại thể hiện trạng thái đa hình (chiếm tỷ lệ 83,33%). Giá trị PIC dao động từ 0,31 đến 0,74 và giá trị PIC trung bình là 0,44. Tỷ lệ các alen dị hợp (H%) của các mẫu phân tích cao, trung bình là 38,46%. Kết quả phân tích đa dạng di truyền theo phương pháp UPGMA dựa vào chỉ số tương đồng giản đơn SM thu được hệ số tương đồng di truyền của 15 giống/dòng bưởi dao động từ 0,46 đến 0,87. Dựa trên giản đồ phân nhóm cho thấy, nếu xét mức độ tương đồng di truyền của 15 giống/dòng bưởi phân tích sẽ chia chúng thành 4 nhóm chính. Kết quả phân tích mối quan hệ di truyền trong nghiên cứu này là cơ sở cho việc lựa chọn các giống/dòng bưởi bố mẹ trong chương trình lai tạo giống.

Từ khóa: chỉ thị sinh học phân tử SSRs, giống/dòng bưởi, phân tích đa dạng di truyền, sơ đồ phả hệ hình cây.

Chỉ số phân loại 4.6

ASSESSMENT OF GENETIC DIVERSITY IN PUMMELO (*CITRUS MAXIMA* (BURM.) MERR.) ACCESSIONS IN VIETNAM BY UTILIZING SIMPLE SEQUENCE REPEAT (SSR) MARKERS

Summary

Genetic relationships among 15 pummelo (*Citrus maxima* (Burm.) Merr.) accessions collected from different areas of Vietnam have been investigated by using ADN-based simple sequence repeat (SSR) markers. A total of 18 SSR primers have been individually amplified to allow the differentiation of materials. The polymorphisms (83.33%) were obtained by simple sequence repeats (SSRs). The mean polymorphic information content (PIC) for each of these marker systems has been 0.44, which has suggested that all the marker systems have been effective in determining polymorphisms. The UPGMA dendrogram which has been constructed by using data of tow marker systems has separated the genotypes into four main clusters. These results have supported that germplasm studies have indicated a considerable genetic diversity.

Keywords: *citrus maxima* (Burm.) Merr, genealogy dendrogram genetic diversity, Pummelo accessions, SSR marker.

Classification number 4.6

Đặt vấn đề

Cây bưởi (*Citrus maxima* Merr.) có nguồn gốc ở vùng nhiệt đới, cận nhiệt đới thuộc châu Á và được trồng ở Trung Quốc cách nay hơn 2000 năm [1, 2]. Theo Barrett và Rhodes (1976) [3], cây bưởi là 1 trong 3 loài cây có múi không do quá trình lai tạo trong tự nhiên tạo ra và hầu hết các nghiên cứu sau này đều đồng ý với kết luận này [4-7]. Ngoài ra, cây bưởi còn là cây bố mẹ của nhiều loài cây có múi như: chanh, cam và bưởi chùm.

Ở nước ta, cây bưởi được trồng phổ biến từ Bắc tới Nam và giữ vị trí quan trọng trong nhóm cây trồng cho quả phục vụ xuất khẩu vì chất lượng quả ngon, vỏ dày, dễ dàng xử lý sau thu hoạch và vận chuyển. Các tỉnh phía Nam có nguồn gen cây bưởi rất

*Tác giả chính: Email: npthuy130583@gmail.com

đa dạng, trong đó có một số giống bưởi thương phẩm được ưa chuộng trên thị trường trong và ngoài nước như: bưởi Năm roi, bưởi Da xanh, bưởi Long cổ cò, bưởi Đường lá cam, bưởi Đường da láng... Bên cạnh đó, có những giống bưởi không được ưa chuộng trên thị trường do vị chua, chất lượng quả kém, nhiều hạt nhưng có hàm lượng lycopene cao là bưởi Huyết, bưởi Đỏ (Năm dừ)... được dùng làm nguồn vật liệu ban đầu cho công tác lai tạo, nhằm tạo ra giống bưởi phẩm chất ngon và hàm lượng lycopene cao. Việc phân loại về sự phát sinh loài cây có múi nói chung và cây bưởi nói riêng rất phức tạp, gây nhiều tranh cãi và dễ nhầm lẫn, chủ yếu là do quá trình lai tạo tự nhiên giữa các giống cùng loài hoặc khác loài, tần số cao của đột biến chèn, lịch sử canh tác lâu đời và phân bố rộng [5].

Sử dụng chỉ thị phân tử trong phân tích đa dạng di truyền có lợi thế hơn so với phân tích hình thái dựa vào đặc điểm kiểu hình, bởi vì chỉ thị phân tử nói chung không bị ảnh hưởng bởi tác động bên ngoài. Sử dụng chỉ thị phân tử có thể so sánh giống/dòng nguồn gen thu thập tại bất kỳ thời gian nào trong năm, trong khi đặc điểm kiểu hình có thể bị ảnh hưởng bởi môi trường, kỹ thuật canh tác (The citrus and date crop germplasm committee, USA, CDCGC, 2004). Một trong những chỉ thị phân tử có độ chính xác cao là SSRs (microsatellites hoặc simple sequence repeats), mức độ đa hình cao, nhiều alen, đồng trội, phân bố ngẫu nhiên trên bộ gen thực vật và được ứng dụng trong nghiên cứu di truyền của cây có múi [6, 8-16]. Yong và ctv (2006) sử dụng chỉ thị phân tử SSRs phân loại bưởi và kết luận loài bưởi là cây đơn phối và có tính đa hình cao [2]. Ngoài chỉ thị phân tử SSRs thì RAPD (random amplified polymorphic DNA) cũng được chọn trong phân tích đa dạng di truyền trên cây bưởi [1, 17].

Giải thích mối quan hệ di truyền, phân loại di truyền và đa dạng di truyền có vai trò quan trọng trong chiến lược chọn tạo giống, bảo tồn đa dạng sinh học và nâng cao hiệu quả chọn giống [6, 18] và là mục tiêu nghiên cứu quan trọng cần được đặt ra. Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng chỉ thị phân tử SSRs đánh giá đa dạng di truyền tập đoàn giống bưởi thu thập có thịt quả

màu vàng đến đỏ để có cơ sở khoa học và tạo đột phá mới trong chọn tạo giống bưởi.

Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

Nguyên liệu

Tập đoàn 15 giống/dòng bưởi do Viện Cây ăn quả miền Nam sưu tập (bảng 1).

23 cặp mỗi SSRs được sử dụng cho phân tích đa dạng di truyền. Trình tự chuỗi nucleotide của các đoạn mỗi được trình bày ở bảng 2.

Bảng 1: 15 giống/dòng bưởi được sử dụng phân tích đa dạng di truyền

STT	Tên giống	Nguồn gốc thu thập	STT	Tên giống	Nguồn gốc thu thập
1	Bưởi Da xanh	Tiền Giang	9	Bưởi Long hồng	Tiền Giang
2	Bưởi Da xanh	Bến Tre	10	Bưởi Long cổ cò	Tiền Giang
3	Bưởi Tứ quý	Bến Tre	11	Bưởi Năm roi đỏ	Tiền Giang
4	Bưởi Đỏ năm dừ	Tiền Giang	12	Bưởi Hà Nội gốc ghép bưởi Long cổ cò	Hà Nội
5	Bưởi Huyết	Bến Tre	13	Bưởi Hà Nội trồng từ hạt 1	Hà Nội
6	Bưởi Đường lá cam	Đồng Nai	14	Bưởi Hà Nội trồng từ hạt 2	Hà Nội
7	Bưởi Đường hồng	Vũng Tàu	15	Bưởi Hà Nội trồng từ hạt 3	Hà Nội
8	Bưởi Năm roi	Vĩnh Long			

Bảng 2: các đoạn mỗi SSRs được sử dụng cho phân tích đa dạng di truyền

STT	Các đoạn mỗi	Trình tự nucleotidic (5'-3')	Sản phẩm khuếch đại	Tài liệu tham khảo
1	TAA15	F: GAAAGGGTTACTTGACCAGGC R: CTTCAGCTGCACAAGC	+	Jannati M và ctv, 2009
2	TAA27	F: GGATGAAAAATGCTCAAAATG R: TAGTACCCACAGGGAAGAGAGC	-	Jannati M và ctv, 2009
3	TAA41	F: AGGTCTACATTGGCATTGTC R: ACATGCACTGTCTATAATGAATG	+	Jannati M và ctv, 2009
4	mCrCIR02A09	F: ACAGAAAGGTAGTATTTAGGG R: TTGTTTGGATGGGAAG	-	Snoussi H và ctv, 2012
5	mCrCIR03C08	F: CAGAGACAGCCAAGAGA R: GCTTCTTACATTCCTCAA	+	Snoussi H và ctv, 2012
6	mCrCIR03G05	F: CCACACAGGCAGACA R: CCTTGGAGGAGCTTTAC	+	Snoussi H và ctv, 2012
7	CAT01	F: GCTTTCGATCCCTCCACATA R: GATCCCTACAATCTGTTGCC	+	Jannati M và ctv, 2009
8	ATC09	F: TTCCTTATGTAATTGCTCTTTG R: TGTGAGTGTGTTGCGGTGTG	+	Jannati M và ctv, 2009
9	AG14	F: AAAGGGAAAGCCCTAATCTCA R: CTTCCTCTTGCGGAGTGTTC	+	Jannati M và ctv, 2009
10	CAC15	F: TAAATC TCC ACT CTG CAAAG C R: GAT AGG AAG CGT CGT AGA CCG	+	Jannati M và ctv, 2009
11	CAC33	F: GGT GAT GCT GCT ACT GAT GC R: CAA TTG TGA ATT TGT GAT TCC G	+	Jannati M và ctv, 2009
12	CT19	F: CGC CAA GCT TAC CAC TCA CTA C R: GCC ACG ATT TGT AGG GGG ATA G	+	Jannati M và ctv, 2009
13	CT21	F: CGA ACT CAT TAA AAG CCG AAA C R: CAA CAA CCA CCA CTC TCA CG	+	Jannati M và ctv, 2009
14	TAA3	F: AGA GAA GAA ACA TTT GCG GAG C R: GAG ATG GGA CTT GGT TCA CAC G	+	Golein B và ctv, 2005
15	TAA45	F: GCA CCT TTT ATA CCT GAC TCG G R: TTC AGC ATT TGA GTT GGT TAC G	+	Golein B và ctv, 2005
16	TAA52	F: GAT CTT GAC TGA ACT TAAAG R: ATG TAT TGT GTT GAT AAC G	-	Golein B và ctv, 2005
17	mCrCIR01C06a	F: GGA CCA CAA CAA AGA CAG R: TGG AGA CAC AAA GAA GAA	+	Snoussi H và ctv, 2012
18	mCrCIR01F04a	F: AAG CAT TTA GGG AGG GTC ACT R: TGC TGC TGC TGT TGT TGT TCT	+	Snoussi H và ctv, 2012
19	mCrCIR01D06a	F: GAT CAA AAC ATT ATT CCA A R: TTT TTC ATC AAC AAG ACT G	-	Snoussi H và ctv, 2012
20	CMS-23	F: CTA TGT GAC AGC ACT GAT GG R: TTT CCT ATC TCT CTT GAG ACA T	-	Ahmad R và ctv, 2003
21	CMS-26	F: TGA TGT CTT GAT CCA CAC TTC C R: ACT CAA AGC TCC GCT ACA GTG	+	Ahmad R và ctv, 2003
22	AMB5	F: CCC TGC ACA AAA ACT CAC AC R: TGG GGG TGT TGA ATG GTA AT	+	Golein B và ctv, 2006
23	GT03	F: GCC TTC TTG ATT TAC CGG AC R: TGC TCC GAA CTT CAT CAT TG	+	Khuất Hữu Trung và ctv, 2009

Phương pháp

Mẫu lá non của 15 giống/dòng bưởi được thu vào buổi sáng từ 8 đến 9 giờ, rửa sạch bằng nước cất vô trùng và làm khô bằng giấy thấm. Lá được nghiền thành bột mịn trong dung dịch nitor lỏng, sau đó tồn trữ ngay ở -20°C và dùng cho ly trích ADN.

Trích ADN: bằng bộ kit DNeasy Plant Mini của QIAGEN. Các bước trong quá trình ly trích ADN được thực hiện theo quy trình có sẵn trong bộ Kit DNeasy Plant Mini của QIAGEN.

Kiểm tra ADN sau khi ly trích: ADN sau khi ly trích được kiểm tra trên gel agarose 0,8%, điện di ở hiệu điện thế 50 V trong 45 phút.

Phân tích tính đa hình dựa vào chỉ thị phân tử SSRs: kỹ thuật SSRs được thực hiện theo Golein và đồng tác giả (2012) có hiệu chỉnh cho phù hợp: khuếch đại những đoạn SSRs từ bộ gen ADN được thực hiện trong phản ứng PCR (25 µl) gồm: 1 x PCR buffer, 0,2 mM dNTP, 0,3 µM primer, 2 mM MgCl₂, 1 unit *Taq* DNA polymerase và 50 ng ADN mẫu. Chu kỳ khuếch đại gồm các bước: tách sợi đôi ở 95°C trong 12 phút, theo sau là 35 chu kỳ 95°C trong 1 phút, 57-58°C trong 1 phút, 72°C trong 1,5 phút và giai đoạn kết thúc ở 72°C trong 15 phút.

Kiểm tra sản phẩm PCR: sản phẩm PCR được kiểm tra bằng cách điện di trên gel agarose 2%. Các sản phẩm PCR khuếch đại sau khi điện di được ghi nhận bằng cách có sự hiện diện của đoạn ADN khuếch đại trên gel là 1 và không có sự hiện diện là 0.

Phân tích thống kê: phân tích, đánh giá đa dạng di truyền các giống/dòng bưởi dựa trên hệ số tương đồng Jaccard và phương pháp UPGMA bằng phần mềm NTSYSpc 2.1. Hàm lượng thông tin tính đa hình PIC (polymorphic information content) của mỗi cặp mỗi SSRs được xác định theo công thức:

$$PIC_i = 1 - \sum P_i^2$$

Trong đó: P_i là tần số xuất hiện của alen thứ i. Phạm vi giá trị PIC từ 0 (không đa hình) tới 1 (đa hình hoàn toàn).

Tỷ lệ dị hợp tử (H%) của mỗi mẫu được tính theo công thức:

$$H\% = X/(M-Y)$$

Trong đó: X là tổng số mỗi có xuất hiện 2 alen/locus SSRs; M là tổng số mỗi được sử dụng trong

nguyên cứu; Y là tổng số mỗi không xuất hiện phân đoạn ADN.

Kết quả và thảo luận

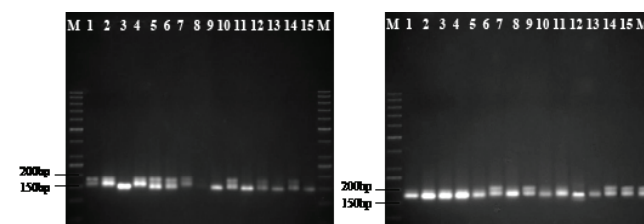
Phân tích tính đa hình giống bưởi dựa vào chỉ thị phân tử SSRs

Kết quả phân tích tính đa hình ADN trong tập đoàn 15 giống/dòng bưởi sử dụng chỉ thị phân tử SSRs cho đa hình được trình bày ở bảng 3.

Bảng 3: kết quả sử dụng mỗi trong phương pháp SSRs

STT	Mỗi	Số mẫu cho sản phẩm khuếch đại	Tổng số phân đoạn	Kích thước phân đoạn (bp)	Số phân đoạn đa hình (%)	PIC
1	CAT01	13	2	160-175	100	0,48
2	ATC09	14	1	180	100	0,00
3	AG14	13	3	140-190	100	0,59
4	TAA3	15	3	150-190	66,67	0,35
5	TAA15	14	1	160	100	0,00
6	TAA41	14	5	130-160	100	0,68
7	TAA45	9	3	85-140	100	0,31
8	CAC15	15	2	160-180	50	0,45
9	CAC33	14	3	175-210	100	0,63
10	CT19	14	3	150-180	100	0,63
11	CT21	14	3	140-190	100	0,64
12	GT03	15	2	175-200	50	0,37
13	AMB5	15	3	130-160	100	0,65
14	CMS-26	14	1	175	100	0,00
15	mCrCIR01C06a	14	4	160-200	100	0,74
16	mCrCIR01F04a	14	2	200-240	100	0,49
17	mCrCIR03G05	15	2	230-245	50	0,37
18	mCrCIR03C08	13	3	195-220	100	0,52
Hệ số PIC trung bình						0,44

23 cặp mỗi SSRs sử dụng trong thí nghiệm cho thấy: 5 mỗi TAA27, mCrCIR02A09, TAA52, mCrCIR01D06a và CMS-23 không xuất hiện phân đoạn ADN (allen). 18 mỗi cho sản phẩm khuếch đại phân đoạn ADN, trong đó có 3 mỗi ATC09, TAA15 và CMS-26 có xuất hiện phân đoạn ADN nhưng thể hiện trạng thái đơn hình (monomorphism) và 15 mỗi còn lại thể hiện trạng thái đa hình (polymorphism), chiếm tỷ lệ 83,33%.



Hình 1a: đoạn mỗi CT19 của các mẫu giống bưởi từ 1-15

Hình 1b: đoạn mỗi GT03 của các mẫu giống bưởi từ 1-15

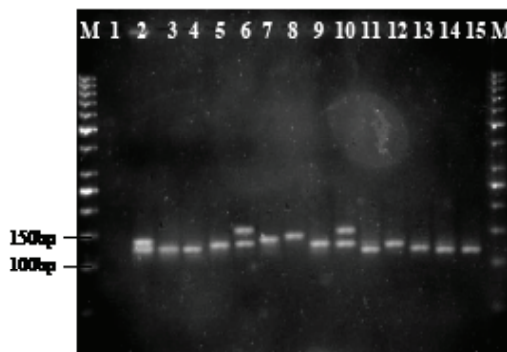
Ghi chú: M: thang ADN 50 bp; 1: bưởi Da xanh dòng 1 (Bến Tre); 2: bưởi Da xanh dòng 2 (Tiền Giang); 3: bưởi Tứ quý; 4: bưởi Đỏ; 5: bưởi Huyết; 6: bưởi Đường lá cam; 7: bưởi Đường hồng; 8: bưởi Năm roi; 9: bưởi Lông hồng; 10: bưởi Lông cổ cò; 11: bưởi Đỏ Hà Nội; 12: bưởi Năm roi ruột đỏ; 13: bưởi Đỏ Hà Nội trồng từ hạt (cây số 1); 14: bưởi Đỏ Hà Nội trồng từ hạt (cây số 2); 15: bưởi Đỏ Hà Nội trồng từ hạt (cây số 3)

Mỗi môi đa hình biểu hiện số lượng alen khác nhau giữa các locus. Trong thí nghiệm này, thu được tổng số là 43 alen từ 15 môi đa hình, trung bình có 2,87 alen trên một môi SSRs. Trong đó, môi có tính đa hình cao nhất là TAA41 (5 alen), kết quả này thấp hơn so với kết quả nghiên cứu của Trần Thị Oanh Yến và ctv (2003) [19] khi phân tích tính đa dạng di truyền nguồn gen cây có múi ở Việt Nam bằng chỉ thị Microsatelites cho 18 alen. Tổng số 344 alen đã được khuếch đại từ 18 môi SSRs, với kích thước của alen khuếch đại trong khoảng từ 85 bp đến 245 bp (hình 1a, 1b).

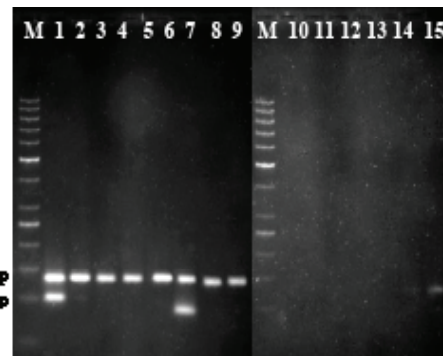
Mức độ đa dạng di truyền kiểu gen các giống/dòng bưởi phân tích được đánh giá thông qua giá trị PIC mỗi môi. Giá trị PIC dao động từ 0,31 (môi TAA45) đến 0,74 (môi mCrCIR01C06a), với giá trị PIC trung bình là 0,44. Tám môi (mCrCIR03C08, AG14, CAC33, CT19, CT21, AMB5, TTA41, mCrCIR01C06a) cho tính đa hình cao, với giá trị PIC > 0,5 (chiếm 53,3%) (bảng 3). Giá trị PIC = 0 là tại vị trí locus chỉ có 1 alen đơn hình. Theo DeWoody và ctv (1995), các môi SSRs có giá trị PIC lớn hơn hoặc bằng 0,5 sẽ cho sự phân biệt cao về tỷ lệ đa hình của môi đó.

Tỷ lệ các alen dị hợp (H%) của các mẫu phân tích cao, tỷ lệ dị hợp trung bình là 38,46%. Tỷ lệ alen dị hợp cao nhất là 52,9% ở mẫu bưởi Da xanh Bến Tre và thấp nhất là 27,78% ở mẫu bưởi Đỏ Hà Nội trồng từ hạt (cây số 3). Khuất Hữu Trung và ctv (2009) cũng ghi nhận được tỷ lệ dị hợp cao nhất thuộc giống bưởi Da xanh (51,66%) và tỷ lệ dị hợp trung bình trên 11 giống bưởi là 41,19% [20].

Qua kết quả nghiên cứu, chúng tôi nhận thấy cặp môi TAA41 có thể sử dụng để phân biệt giống bưởi Năm roi, bưởi Đường hồng với các giống bưởi khác, cặp môi TAA45 có thể phân biệt được bưởi Da xanh Tiền Giang, bưởi Đường lá cam với các giống bưởi khác (hình 2a, 2b).



Hình 2a: đoạn môi TAA41 của các mẫu giống bưởi từ 1-15



Hình 2b: đoạn môi TAA45 của các mẫu giống bưởi từ 1-15

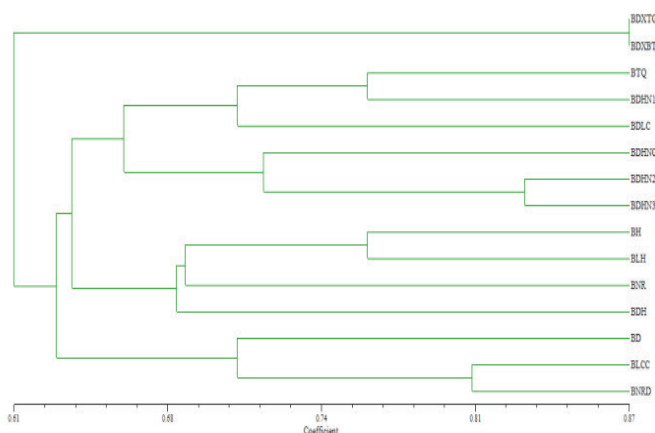
Ghi chú: M: thang ADN 50 bp; 1: bưởi Da xanh dòng 1 (Bến Tre); 2: bưởi Da xanh dòng 2 (Tiền Giang); 3: bưởi Tứ quý; 4: bưởi Đỏ; 5: bưởi Huyết; 6: bưởi Đường lá cam; 7: bưởi Đường hồng; 8: bưởi Năm roi; 9: bưởi Lông hồng; 10: bưởi Lông cổ cò; 11: bưởi Đỏ Hà Nội; 12: bưởi Năm roi ruột đỏ; 13: bưởi Đỏ Hà Nội trồng từ hạt (cây số 1); 14: bưởi Đỏ Hà Nội trồng từ hạt (cây số 2); 15: bưởi Đỏ Hà Nội trồng từ hạt (cây số 3)

Mối quan hệ di truyền của 15 giống/dòng bưởi

Kết quả phân tích đa dạng di truyền theo phương pháp UPGMA dựa vào chỉ số tương đồng giản đơn SM (simple matching coefficient) thu được mối tương quan di truyền giữa 15 giống/dòng bưởi thể hiện qua hệ số tương đồng di truyền (bảng 4) và biểu đồ hình cây (hình 3).

Bảng 4: hệ số tương đồng di truyền của 15 giống/dòng bưởi phân tích SSRs

	BDXTG	BDXBT	BTQ	BD	BH	BDLC	BDH	BNR	BLH	BLCC	BDHNG	BNRD	BDHN1	BDHN2	BDHN3
BDXTG	1														
BDXBT	0,87	1													
BTQ	0,70	0,74	1												
BD	0,65	0,61	0,57	1											
BH	0,61	0,65	0,70	0,65	1										
BDLC	0,59	0,63	0,72	0,54	0,67	1									
BDH	0,67	0,67	0,67	0,63	0,72	0,65	1								
BNR	0,57	0,57	0,65	0,61	0,70	0,59	0,67	1							
BLH	0,46	0,50	0,63	0,72	0,76	0,70	0,65	0,67	1						
BLCC	0,54	0,50	0,63	0,76	0,63	0,70	0,57	0,54	0,78	1					
BDHNG	0,59	0,54	0,67	0,63	0,67	0,57	0,65	0,63	0,70	0,70	1				
BNRD	0,70	0,65	0,61	0,65	0,61	0,67	0,50	0,57	0,67	0,80	0,72	1			
BDHN1	0,59	0,63	0,76	0,63	0,63	0,70	0,57	0,63	0,70	0,65	0,65	0,67	1		
BDHN2	0,67	0,67	0,63	0,63	0,63	0,65	0,65	0,54	0,65	0,61	0,74	0,67	0,74	1	
BDHN3	0,63	0,63	0,63	0,63	0,59	0,65	0,57	0,59	0,65	0,57	0,70	0,63	0,74	0,83	1



Hình 3: giản đồ đa dạng di truyền 15 giống/dòng bưởi theo hệ số di truyền giống nhau của Jaccard và kiểu phân nhóm UPGMA

Hệ số tương đồng di truyền của 15 giống/dòng bưởi dao động từ 0,46 đến 0,87. Trong đó, cặp giống/dòng có hệ số tương đồng di truyền cao nhất (0,87) là bưởi Da xanh Tiền Giang và bưởi Da xanh Bến Tre, cặp giống/dòng có hệ số tương đồng di truyền thấp nhất (0,46) là bưởi Da xanh Tiền Giang và bưởi Long hồng.

Dựa trên giản đồ phân nhóm cho thấy, nếu xét mức độ tương đồng di truyền của 15 giống/dòng bưởi phân tích ở 0,64 sẽ chia chúng thành 4 nhóm chính, gồm:

Nhóm I: bao gồm 3 giống: bưởi Năm roi đỏ, bưởi Long Cổ cò, bưởi Đỏ (Năm dù) với mức tương đồng di truyền dao động từ 0,65 đến 0,80. Tất cả các giống trong nhóm I được thu thập tại tỉnh Tiền Giang.

Nhóm II: là các giống bưởi Đường hồng, bưởi Năm roi, bưởi Long hồng, bưởi Huyết, có hệ số tương đồng di truyền dao động từ 0,65-0,76.

Nhóm III: gồm các giống: bưởi Đỏ Hà Nội trồng từ hạt (cây số 3), bưởi Đỏ Hà Nội trồng từ hạt (cây số 2), bưởi Đỏ Hà Nội ghép trên gốc ghép bưởi Long cổ cò, bưởi Đường Da láng, bưởi Đỏ Hà Nội trồng từ hạt (cây số 1), bưởi Tứ quý và ghi nhận hệ số tương đồng di truyền dao động từ 0,57-0,83. Từ kết quả trên đã chứng minh rằng, nếu bưởi được trồng từ hạt thì đời con sẽ phân ly tính trạng.

Nhóm IV: gồm 2 giống còn lại là bưởi Da xanh thu thập tại Bến Tre và bưởi Da xanh thu thập tại Tiền Giang giống nhau hoàn toàn và có hệ số tương đồng di truyền cao nhất là 0,87. Điều này chứng minh rằng, bưởi Da xanh Tiền Giang và bưởi Da xanh Bến Tre có cùng nguồn gốc.

Kết luận

Mối quan hệ di truyền của 15 giống/dòng bưởi được thu thập đã được xác định. Các giống/dòng phân tích được phân thành 4 nhóm chính.

Các giống/dòng bưởi trong nhóm III (0,57-0,83) có sự khác biệt về di truyền cao hơn các giống/dòng trong nhóm I (0,65-0,80), II (0,65-0,76), IV (0,87). Nếu sử dụng các giống/dòng bưởi trong nhóm III lai tạo với các nhóm còn lại thì sẽ thu được ưu thế lai, vì khoảng cách di truyền càng xa thì khả năng cho ưu thế lai càng cao.

Kết quả phân tích mối quan hệ di truyền trong nghiên cứu này có thể ứng dụng làm cơ sở cho việc lựa chọn các giống/dòng bưởi bố mẹ sử dụng trong chương trình lai tạo giống.

Tài liệu tham khảo

- [1] Corazza - Nunes M.J, Machado M.A, Nunes W.M.C, Cristofani M and Targon M.L.P.N (2002), "Assessment of genetic variability in grapefruits (*Citrus paradisi* Macf.) and pummelos (*C. maxima* Burm. Merr.) using RAPD and SSR markers", *Euphytica*, **126**, pp.169-176.
- [2] Yong L, De-Chun L, Bo W and Zhong-Hai S (2006), "Genetic diversity of pummelo (*Citrus grandis* Osbeck) and its relatives based on simple sequence repeat markers", *Chinese J. of Agr. Biotechnology*, **3**, pp.119-126.
- [3] Barrett H.C and Rhodes A.M (1976), "A numerical taxonomic study of affinity relationships in cultivated Citrus and its close relatives", *Syst. Bot.*, **1**, pp.105-136.
- [4] Federici C.T, Fang D.Q, Scora R.W and Roose M.L (1998), "Phylogenetic relationships within the genus Citrus (Rutaceae) and related genera as revealed by RFLP and RAPD analysis", *Theor. Appl. Genet.*, **96**, pp.812-822.
- [5] Nicolosi E, Deng Z.N, Gentile A, La Malfa S, Continella G and Tribulato E (2000), "Citrus phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular markers", *Theor. Appl. Genet.*, **100**, pp.1155-1166.
- [6] Barkley N.A, Roose M.L, Krueger R.R, Federici C.T (2006), "Assessing genetic diversity and population structure in a citrus germplasm collection utilizing simple sequence repeat markers (SSRs)", *Theor. Appl. Genet.*, **112**, pp.1519-1531.
- [7] Uzun A, Yesiloglu T, Aka-Kacar Y, Tuzcu O and Gulsen O (2009), "Genetic diversity and relationships within Citrus and related genera based on sequence related amplified polymorphism markers (SRAPs)", *Scientia Horticulturae*, **121**, pp.306-312.
- [8] Kijas J.M.H, Fowler J.C.S, Thomas M.R (1995), "An evaluation of sequence tagged microsatellite site markers for genetic analysis within citrus and related species", *Genome*, **38**, pp.349-355.
- [9] Kijas J.M.H, Thomas M.R and Fowler J.C.S (1997), "Integration of trinucleotide microsatellites into a linkage map of Citrus", *Theor. Appl. Genet.*, **94**, pp.701-706.

- [10] Gulsen O, Roose M.L (2001), “Lemons: diversity and relationships with selected Citrus genotypes as measured with nuclear genome markers”, *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **126**, pp.309-317.
- [11] Luro F, Rist D, Ollitrault P (2001), “Evaluation of genetic relationships in Citrus genus by means of sequence tagged microsatellites”, *Acta Horticulturae*, **546**, pp.237-242.
- [12] Pang X.M, Hu C.G and Deng X.X (2003), “Phylogenetic relationships among citrus and its relatives as revealed by SSR markers”, *Acta Genetica*, **30(1)**, pp.81-87.
- [13] Riaz A, Darushi S and Stephen M.S (2003), “Development and characterization of microsatellite markers in Citrus”, *J Amer Soc Hort. Sci*, **128(4)**, pp.584-590.
- [14] Ollitrault F, Terol J, Pina J.A, Navarro L, Talon M, Ollitrault P (2010), “Development of SSR markers from Citrus clementina (Rutaceae) BAC end sequences and interspecific transferability in Citrus”, *American Journal of Botany*, **97**, pp.124-129.
- [15] Wang F.S and Jiang D (2010), “Studies on Genetic Background of important germplasm resources among citrus Based on cpSSR and EST-SSR Marker”, *Journal of Horticulture (China)*, **37(3)**, pp.465-474.
- [16] Golein B, Nazeryan M, Babakhani B (2012), “Assessing genetic variability in male sterile and low fertile citrus cultivars utilizing simple sequence repeat markers (SSRs)”, *African Journal of Biotechnology*, **11(7)**, pp.1632-1638.
- [17] Ji Q.H, Zeng J.W and Guo Y.J (2011), “Using optimized random amplified polymorphic DNA (RAPD) marker to identify the category status of Citrus nobilis Gonggan”, *African Journal of Biotechnology*, **10(64)**, pp.13982-13990.
- [18] Herrero R, Asins M.J, Carbonell A.E and Navarro L (1996), “Genetic diversity in the orangsubfamily Aurantioideae. I Intraspecies and intragenus genetic variability”, *Tappl Genet*, **92**, pp.599-609.
- [19] Trần Thị Oanh Yến, Luro Francois và Nguyễn Ngọc Thi (2003), “Phân tích tính đa dạng di truyền nguồn gen cây có múi ở Việt Nam bằng Microsatellite marker”, *Kết quả nghiên cứu khoa học công nghệ rau quả 2002-2003*, Nhà xuất bản Nông nghiệp, pp.57-66.
- [20] Khuất Hữu Trung, Hà Trọng Huy, Nguyễn Trường Khoa, Ngô Hồng Bình, Nguyễn Thanh Bình, Đặng Trọng Lương, Lê Huy Hàm (2009), “Nghiên cứu đa dạng di truyền một số giống bưởi bản địa Việt Nam (*Citrus grandis*) bằng chỉ thị Microsatellite”, *Tạp chí Công nghệ sinh học*, **7(4)**, pp.485-492.

Nghiên cứu ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng thực vật lên sự phát sinh hình thái của cây Đẳng sâm trong điều kiện in vitro

Phạm Hương Sơn*, Nguyễn Thị Lại

Trung tâm Sinh học Thực nghiệm, Viện Ứng dụng Công nghệ, Bộ Khoa học và Công nghệ

Ngày nhận bài 9.3.2015, ngày chuyển phản biện 13.3.2015, ngày nhận phản biện 18.4.2015, ngày chấp nhận đăng 24.4.2015

Đẳng sâm (*Codonopsis javanica* (Blume)) thuộc họ Campanulaceae, là một loại thảo dược quý. Tuy nhiên, số lượng cây ngoài tự nhiên đang giảm nhanh do vùng phân bố bị thu hẹp cùng với sự gia tăng về nhu cầu khai thác và tỷ lệ hạt nảy mầm thấp. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng thực vật lên khả năng tạo chồi và rễ của Đẳng sâm trong điều kiện *in vitro* cho thấy: khử trùng bằng dung dịch 3% NaOCl trong 10 phút rồi cấy trên môi trường SH có bổ sung 3% đường + 0,8% thạch + 10% nước dừa cho tỷ lệ mẫu sống và vô trùng cao nhất, đạt 66,5% sau 2 tuần. Khả năng nhân nhanh chồi sau 6 tuần đạt cao nhất (19,28 chồi/mẫu, chiều cao chồi 4,67 cm) trên môi trường SH bổ sung 3% đường + 0,8% thạch + 10% nước dừa + 1,0 mg/l TDZ + 0,5 mg/l α NAA. Sau 4 tuần nuôi cấy chồi *in vitro* tạo rễ bất định và tăng trưởng tốt nhất (chiều cao 7,36 cm/chồi; 7,03 lá/chồi; 11,17 rễ/chồi) trên môi trường SH bổ sung 3% đường + 0,8% thạch + 10% nước dừa + 0,5 mg/l IBA.

Từ khóa: cây thuốc, chất điều hòa sinh trưởng, Đẳng sâm, nuôi cấy *in vitro*.

Chỉ số phân loại 4.6

EFFECTS OF PLANT GROWTH REGULATORS ON THE MORPHOGENESIS OF CODONOPSIS JAVANICA (BLUME) UNDER IN VITRO CONDITIONS

Summary

Codonopsis javanica (Blume) belongs to the Campanulaceae family and is an important medicinal plant. However, the number of this plant in the nature has been decreasing dramatically because of its narrow distribution, overexploitation and low germination of seeds. The results of studying the effects of plant growth regulators on the formation of shoots and roots of this species under *in vitro* conditions showed that: the explants sterilized with 3% NaOCl for 10 min and then cultured in SH medium supplemented with 3% saccharose + 0.8% agar + 10% coconut water (CW) yielded the highest survival and clean explants (66.5%) after 2 weeks of culture. After 6 weeks, the capability of *in vitro* shoot multiplication was the highest (19.28 shoots/explant, length of 4.67 cm/shoot) in SH medium supplemented with 3% saccharose + 0.8% agar + 10% CW + 1.0 mg/l TDZ + 0.5 mg/l α NAA. After 4 weeks of culture, *in vitro* shoots produced adventitious roots and grew best (length of 7.36 cm/shoot, 7.03 leaves/shoot and 11.17 roots/shoot) when being grown in SH medium supplemented with 3% saccharose + 0.8% agar + 10% CW + 0.5 mg/l IBA.

Keywords: *Codonopsis javanica* (Blume), growth regulators, *in vitro*, medicinal plant.

Classification number 4.6

Mở đầu

Đẳng sâm (*Codonopsis javanica* (Blume)) thuộc họ Campanulaceae, là một loại thảo dược quý trong y học cổ truyền của các nước châu Á như: Trung Quốc, Mianma, Ấn Độ, Lào, Nhật Bản, Việt Nam. Ở nước ta, Đẳng sâm thường phân bố ở Lai Châu, Lào Cai, Hà Giang, Hòa Bình, Lâm Đồng.

Theo y học cổ truyền, Đẳng sâm có tác dụng chữa tỳ vị suy kém, phế khí hư nhược, kém ăn, mệt mỏi, sa tử cung, tăng bạch cầu, viêm họng, dạ dày... [1]; kháng u, kháng khuẩn và tăng cường miễn dịch.... [2, 3]. Theo các tác giả Zhu E và cs (2001) [4] và Li C.Y và cs (2009)

* Tác giả chính, Email: phson2008@gmail.com

[5], trong rễ cây Đẳng sâm có chứa polysaccharides, saponins, alkaloids và phytosteroids...

Hiện nay, Đẳng sâm đang bị tàn phá nghiêm trọng, mặt khác, tỷ lệ này mầm từ hạt trong tự nhiên rất thấp nên loài cây này lâm vào tình trạng gần như tuyệt chủng và được đưa vào “Sách Đỏ Việt Nam” cần được bảo vệ. Nghiên cứu này được tiến hành nhằm tìm ra môi trường nuôi cấy thích hợp để có hệ số nhân chồi cao và tạo cây hoàn chỉnh trong thời gian ngắn, góp phần sản xuất giống cây được liệu quý này với quy mô lớn.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu nghiên cứu

- Vật liệu nghiên cứu là đoạn thân cây Đẳng sâm có mầm sinh trưởng được thu hái từ Hòa Bình.

- Chất khử trùng dùng trong thí nghiệm: NaOCl.

- Môi trường nuôi cấy: SH (Schenk and Hildebrandt, 1972) [6].

- Chất kích thích sinh trưởng được bổ sung vào môi trường là: KIN, TDZ, IBA, α NAA.

Phương pháp nghiên cứu

Nghiên cứu khử trùng mẫu: xác định nồng độ và thời gian khử trùng mẫu bằng NaOCl. Thí nghiệm bố trí ngẫu nhiên, 3 lần nhắc lại với nồng độ NaOCl (1%; 2%; 3%; 4%) và thời gian tương ứng (5; 10; 15; 20 phút).

Các bước tiến hành: mẫu được rửa dưới vòi nước chảy, sau đó cắt đoạn thân mang chồi ngủ có kích thước $1,5-2,0 \pm 0,2$ cm được khử trùng bằng 1-4% NaOCl trong 5-20 phút, rửa sạch lại bằng nước cất vô trùng khoảng 3 lần. Sau đó cấy trên môi trường SH, bổ sung 3% đường, 0,8% thạch, 10% nước dừa.

Nghiên cứu nhân nhanh chồi *in vitro*: nghiên cứu ảnh hưởng KIN, TDZ, α NAA đến quá trình nhân nhanh chồi. Thí nghiệm bố trí ngẫu nhiên, 3 lần nhắc lại với nồng độ KIN [0 (Đ/C); 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 mg/l] và TDZ với nồng độ [0 (Đ/C); 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 mg/l] bổ sung vào môi trường SH.

Thí nghiệm nghiên cứu ảnh hưởng α NAA đến quá trình nhân nhanh chồi: từ kết quả của thí nghiệm KIN, TDZ bổ sung nêu trên, thí nghiệm bổ sung α NAA với các nồng độ [0 (Đ/C); 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 mg/l] kết hợp với KIN và bổ sung α NAA với các nồng độ [0

(Đ/C); 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0 mg/l] kết hợp với TDZ bổ sung vào môi trường SH. Các thí nghiệm được bố trí ngẫu nhiên, 3 lần nhắc lại.

Các bước tiến hành: cây Đẳng sâm *in vitro* được cắt thành từng đoạn mang chồi ngủ có kích thước $1,5-2,0 \pm 0,2$ cm. Sau đó, mẫu được cấy trên môi trường SH có bổ sung KIN, TDZ, KIN + α NAA, TDZ + α NAA, 3% đường, 0,8% thạch, 10% nước dừa.

Nghiên cứu môi trường tạo *in vitro* cây hoàn chỉnh: nghiên cứu tạo rễ cây Đẳng sâm *in vitro*. Thí nghiệm bổ sung α NAA hoặc IBA với nồng độ (0,5; 1,0; 1,5; 2,0 mg/l) vào môi trường SH bổ sung 3% đường, 0,8% thạch, 10% nước dừa. Đối chứng: không bổ sung α NAA hoặc IBA.

Các bước tiến hành: các chồi *in vitro* của cây Đẳng sâm có kích thước $4,0 \pm 0,2$ cm được tách ra từ cụm chồi trên môi trường nhân nhanh được cấy trên môi trường SH bổ sung 3% đường, 0,8% thạch, 10% nước dừa, với các nồng độ từ 0,5-2,0 mg/l α NAA và 0,5-2,0 mg/l IBA để khảo sát khả năng hình thành rễ *in vitro*. Các thí nghiệm được bố trí ngẫu nhiên, 3 lần nhắc lại. Ở tất cả các thí nghiệm trên, mỗi công thức là 30 mẫu.

Chỉ tiêu theo dõi và xử lý số liệu thí nghiệm: nghiên cứu tiến hành theo dõi định kỳ 1 tuần/lần. Theo dõi các chỉ tiêu: tỷ lệ mẫu sống (%), mẫu nhiễm (%), khả năng sinh trưởng của chồi, số chồi/mẫu, chiều cao chồi (cm), số lá (lá/chồi), số rễ (rễ/chồi)... Các thí nghiệm được đặt trong phòng thí nghiệm có cường độ chiếu sáng 2.400 lux, thời gian chiếu sáng là 12 giờ/ngày, nhiệt độ phòng $24 \pm 2^\circ\text{C}$, độ ẩm phòng $55 \pm 5\%$. Các số liệu thu thập được phân tích thống kê bằng phần mềm IRRISTAT 5.0 và ANOVA.

Kết quả và thảo luận

Tạo vật liệu khởi đầu

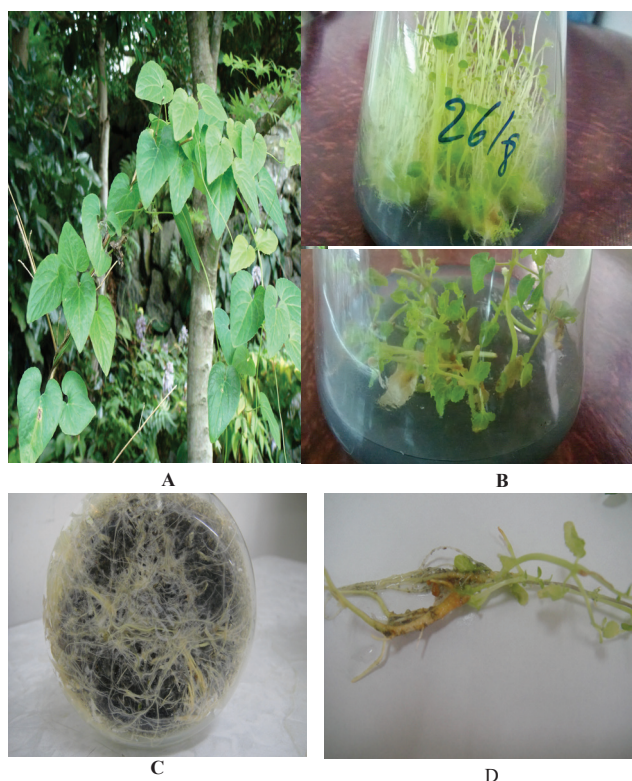
Vật liệu nghiên cứu là các đoạn thân của cây Đẳng sâm. Trước khi đưa vào nuôi cấy, mẫu được xử lý khử trùng bằng NaOCl với các nồng độ và thời gian khác nhau. Khử trùng đoạn thân của cây Đẳng sâm bằng dung dịch 3% NaOCl trong thời gian 10 phút tỷ lệ sống đạt cao nhất (66,5%). Khi tăng nồng độ và thời gian khử trùng lên, tỷ lệ mẫu sống giảm dần. Tỷ lệ sống thấp nhất khi xử lý ở nồng độ 4% NaOCl trong 20 phút, chỉ là 24,5% (bảng 1).

Bảng 1: ảnh hưởng của thời gian và nồng độ NaOCl đến mẫu Đàng sâm

Thời gian (phút)	Tỷ lệ % mẫu											
	Nồng độ 1%			Nồng độ 2%			Nồng độ 3%			Nồng độ 4%		
	Sống	Nhiễm	Chết	Sống	Nhiễm	Chết	Sống	Nhiễm	Chết	Sống	Nhiễm	Chết
5	26,5	66,2	7,3	29,1	58,6	12,3	36,9	54,6	8,5	26,5	46,2	27,3
10	35,2	50,4	14,4	52,1	31,9	16,0	66,5	20,5	13,0	40,1	21,8	38,1
15	40,3	39,6	20,2	50,0	20,6	29,4	52,0	21,5	26,5	32,3	15,7	52,0
20	35,6	34,2	30,2	42,0	22,8	35,2	48,0	33,8	19,0	24,5	12,8	62,7

Như vậy, khử trùng đoạn thân của cây Đàng sâm bằng dung dịch 3% NaOCl trong thời gian xử lý 10 phút là thích hợp nhất.

Giai đoạn nhân nhanh



Hình 1: Đàng sâm và các giai đoạn nhân giống
A- Đàng sâm (*Codonopsis javanica*); B- Giai đoạn nhân nhanh;
C, D- Giai đoạn tạo cây hoàn chỉnh

Ảnh hưởng của KIN đến quá trình nhân nhanh chồi: KIN thuộc nhóm cytokinin, chúng được bổ sung vào môi trường chủ yếu để kích thích sự phân chia tế bào và phân hóa chồi bất định, tăng cường khả năng tổng hợp chất diệp lục của cây. Để đánh giá ảnh hưởng của KIN lên quá trình hình thành cụm chồi, chúng tôi bổ sung KIN với nồng độ từ 0,5 đến 2,0 mg/l vào môi trường và kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của KIN được trình bày ở bảng 2. Kết quả ở bảng 2 cho thấy, KIN có

tác dụng không rõ rệt về làm gia tăng số chồi của Đàng sâm. Như vậy, nếu bổ sung đơn lẻ KIN sẽ có tác dụng thấp đến quá trình nhân nhanh chồi Đàng sâm.

Ảnh hưởng của TDZ đến quá trình nhân nhanh chồi: TDZ có tác động rất hiệu quả đến nhân chồi của nhiều loài cây. Để tìm hiểu ảnh hưởng của TDZ đến khả năng nhân chồi *in vitro* của Đàng sâm, chúng tôi bổ sung TDZ với nồng độ từ 0,5 đến 2,0 mg/l vào môi trường và kết quả được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2: ảnh hưởng của TDZ, KIN đến quá trình nhân nhanh chồi

Chất kích thích sinh trưởng (mg/l)		Số chồi/mẫu	Chiều cao chồi (cm)
KIN	TDZ		
0 (Đ/C)	-	1,72 c	2,92 d
0,5	-	3,36 a	3,24 a
1,0	-	2,86 ab	3,18 ab
1,5	-	2,50 b	3,06 bc
2,0	-	2,47 b	3,01cd
LSD 0,05		0,52	0,13
CV(%)		3,2	3,4
-	0 (Đ/C)	1,73 e	1,90 d
-	0,5	6,16 b	3,27 b
-	1,0	6,55 a	3,54 a
-	1,5	5,11 c	3,08 bc
-	2,0	4,04 d	2,93 c
LSD 0,05		0,13	0,21
CV(%)		3,0	4,8

Các chữ cái khác nhau trong cùng 1 cột chỉ sự sai khác có ý nghĩa thống kê ở $p < 0,05$

Bảng 2 cho thấy, TDZ có tác dụng kích thích mạnh đến quá trình nhân nhanh chồi ở cây Đàng sâm. Ở nồng độ 1,0 mg/l TDZ bổ sung vào môi trường, số chồi trên mẫu đã tăng lên 6,55 chồi/mẫu và chiều cao chồi đạt 3,54 cm, sai khác ở mức đáng tin cậy so với đối chứng và các nồng độ khác. Tuy nhiên, khi tăng nồng độ TDZ lớn hơn 1,0 mg/l, số chồi/mẫu, chiều cao chồi lại có xu hướng giảm dần và chồi có hiện tượng vàng.

Ảnh hưởng của tổ hợp KIN + α NAA, TDZ + α NAA đến quá trình nhân nhanh chồi: khi kết hợp auxin với cytokinin sẽ giúp sự tăng trưởng chồi non và khởi phát sự tạo mới mô phân sinh ngọn chồi từ nhu mô. Gaspar và cs (2003) [7] cho rằng, các thí nghiệm tạo chồi bất định thường cho kết quả cao khi sử dụng cytokinin nồng độ cao và auxin nồng độ từ thấp đến trung bình. Do đó, các auxin trong thí nghiệm này được sử dụng ở nồng độ thấp nhằm khảo sát tác động của sự phối hợp giữa auxin (α NAA) với KIN, TDZ lên sự tạo chồi cây Đàng sâm.

Kết quả nghiên cứu sau 6 tuần nuôi cấy được trình bày ở bảng 3 cho thấy: trên môi trường bổ sung tổ hợp KIN ở nồng độ 0,5 mg/l và α NAA nồng độ từ (0,2-1,0 mg/l) có tác dụng tích cực tới sự phát sinh cụm chồi, nhưng thích hợp nhất cho việc tăng hệ số nhân chồi, chiều cao chồi là môi trường bổ sung 0,5 mg/l KIN kết hợp với 0,2 mg/l α NAA so với công thức khác ở mức có ý nghĩa thống kê. Ở môi trường này, số lượng chồi đạt 12,10 chồi/mẫu, chiều cao chồi đạt 4,56 cm. Khi tăng nồng độ α NAA cao hơn 0,2 mg/l có xu hướng làm giảm khả năng tạo chồi của mẫu cấy. Như vậy, việc bổ sung α NAA vào môi trường kết hợp với KIN làm tăng hiệu quả tạo chồi, tuy nhiên số chồi vẫn còn thấp, chất lượng chồi chưa cao.

Khi kết hợp TDZ với α NAA ở nồng độ và tỷ lệ thích hợp có thể nâng cao hệ số nhân chồi và chất lượng chồi đối với một số cây trồng như cây *Cymbidium faberi* Rolfe (Jun Tao và cs (2011) [8]. Do vậy, TDZ ở nồng độ 1,0 mg/l (nồng độ cho hiệu quả nhân nhanh chồi tốt nhất) đã được sử dụng phối hợp với α NAA nồng độ từ 0,5-3,0 mg/l nhằm tăng hiệu quả nhân nhanh chồi Đẳng sâm. Trên môi trường có 0,5 mg/l α NAA và 1,0 mg/l TDZ sau 6 tuần nuôi cấy, số chồi đạt cao nhất là 19,28 chồi/mẫu, chiều cao chồi đạt 4,67 cm, chất lượng chồi rất tốt, chồi xanh và mập. Tuy nhiên, khi tăng nồng độ α NAA lớn hơn 0,5 mg/l thì số chồi có xu hướng giảm dần. Ở nồng độ 3,0 mg/l đã thể hiện ức chế sự phát sinh chồi *in vitro* (chỉ đạt 6,52 chồi/mẫu), chiều cao chồi đạt 3,83 cm, chồi có hiện tượng vàng úa.

Bảng 3: ảnh hưởng của tổ hợp KIN + α NAA, TDZ + α NAA đến quá trình nhân nhanh chồi

KIN (mg/l)	TDZ (mg/l)	α NAA (mg/l)	Số chồi/mẫu	Chiều cao chồi (cm)
0,5	-	0 (Đ/C)	3,38 e	3,91 d
0,5	-	0,2	12,10 a	4,56 a
0,5	-	0,4	7,79 b	4,16 b
0,5	-	0,6	6,15 c	3,81 c
0,5	-	0,8	6,10 c	3,52 d
0,5	-	1,0	5,41 cd	3,20 e
LSD 0,05			0,34	0,2
CV(%)			3,1	4,2
-	1,0	0 (Đ/C)	6,54 d	3,96 de
-	1,0	0,5	19,28 a	4,67 a
-	1,0	1,0	14,03 b	4,45 b
-	1,0	1,5	10,15 c	4,22 c
-	1,0	2,0	9,08 c	4,05 d
-	1,0	2,5	7,02 d	3,98 de
-	1,0	3,0	6,52 d	3,83 e
LSD 0,05			2,0	0,16
CV(%)			4,5	2,3

Các chữ cái khác nhau trong cùng 1 cột chỉ sự sai khác có ý nghĩa thống kê ở $p < 0,05$

Giai đoạn tạo cây hoàn chỉnh

Auxin được bổ sung vào môi trường để tăng cường khả năng tạo rễ (Tiwari và cs, 2000) [9]. Tuy nhiên, với các loài cây khác nhau thì loại auxin và nồng độ là khác nhau. Ở đây chúng tôi tiến hành nghiên cứu thí nghiệm với α NAA và IBA. Trong nghiên cứu này, IBA tỏ ra thích hợp hơn trong việc kích thích chồi Đẳng sâm tạo rễ so với α NAA. Mặc dù bổ sung α NAA vào môi trường nuôi cấy đã cải thiện được chất lượng bộ rễ Đẳng sâm so với đối chứng nhưng chiều cao cây, số lá, tỷ lệ chồi ra rễ vẫn còn thấp.

Trên môi trường có chứa IBA, thời gian xuất hiện rễ và chất lượng bộ rễ Đẳng sâm đã được cải thiện rõ rệt. Kết quả nghiên cứu ở bảng 4 cho thấy: sau 4 tuần nuôi cấy, môi trường có bổ sung IBA đã thúc đẩy quá trình hình thành và phát triển rễ từ chồi *in vitro*; số chồi ra rễ đạt từ 5,90 đến 11,17 rễ so với môi trường không bổ sung IBA. Tuy nhiên, ở các mức nồng độ khác nhau thì khả năng cảm ứng tạo rễ *in vitro* cũng khác nhau. Đặc biệt, ở môi trường bổ sung IBA nồng độ 0,5 mg/l, chiều cao chồi, số lá và khả năng hình thành rễ là tốt nhất: chiều cao chồi đạt 7,36 cm, số lá 7,03, số rễ 11,17. Khi tăng nồng độ IBA lớn hơn 0,5 mg/l thì chiều cao chồi, số lá và khả năng hình thành rễ *in vitro* giảm dần.

Bảng 4: ảnh hưởng của α NAA, IBA đến khả năng ra rễ của chồi

α NAA (mg/l)	IBA (mg/l)	Chiều cao chồi (cm)	Số lá/chồi	Số rễ/chồi
0 (Đ/C)	-	3,11 c	4,9 c	2,48 d
0,5	-	3,51 c	5,5 a	4,23 c
1,0	-	5,30 a	5,57 a	7,26 a
1,5	-	4,56 ab	5,25 b	6,28 b
2,0	-	4,42 b	4,13 d	6,10 b
LSD 0,05		0,25	0,19	0,23
CV(%)		2,7	3,1	4,0
-	0 (Đ/C)	3,21 d	4,70 d	3,42 e
-	0,5	7,36 a	7,03 a	11,17 a
-	1,0	6,50 b	6,84 a	9,55 b
-	1,5	6,42 b	6,58 b	6,50 c
-	2,0	5,58 c	5,51 c	5,90 d
LSD 0,05		0,22	0,24	0,15
CV(%)		2,1	3,2	2,3

Các chữ cái khác nhau trong cùng 1 cột chỉ sự sai khác có ý nghĩa thống kê ở $p < 0,05$

Trong nghiên cứu này, IBA ở nồng độ 0,5 mg/l được chứng minh là có hiệu quả nhất cho rễ, dẫn đến rễ dài và khỏe mạnh. Tác dụng kích thích khả năng

hình thành rễ *in vitro* của IBA cũng đã được báo cáo ở nhiều loài cây thuốc khác như: *Ocimum basilicum* (Sahoo và cs, 1997) [10], *Tylophora indica* (Faisal and Anis, 2003) [11].

Kết luận

1. Chế độ khử trùng mẫu thích hợp cho Đảng sâm được xác định là 3% NaOCl trong thời gian xử lý 10 phút. Công thức này cho tỷ lệ mẫu sống và vô trùng cao, đạt 66,5% sau 2 tuần theo dõi.

2. Môi trường tốt nhất cho nhân nhanh chồi Đảng sâm là bổ sung 1,0 mg/l TDZ + 0,5 mg/l α NAA bổ sung vào môi trường SH + 3% đường + 0,8% thạch + 10% nước dừa. Trên môi trường này sau 6 tuần nuôi cấy cho hệ số nhân chồi cao (19,28 chồi/mẫu), chiều cao chồi (4,67 cm), chất lượng chồi tốt, chồi xanh và mập.

3. Môi trường tạo cây *in vitro* hoàn chỉnh thích hợp là bổ sung 0,5 mg/l IBA vào môi trường SH + 3% đường + 0,8% thạch + 10% nước dừa. Trên môi trường này sau 4 tuần nuôi cấy, chiều cao chồi đạt 7,36 cm; số lá: 7,03; số rễ: 11,17, chất lượng chồi cao và xanh.

Tài liệu tham khảo

[1] Đỗ Huy Bích và cộng sự (2006), *Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam*, Tập I, NXB Khoa học và Kỹ thuật.

[2] Luo H, Lin S, Ren F, Wu L, Chen L, Sun Y (2007), "Antioxidant and antimicrobial capacity of Chinese medicinal herb extracts in raw sheep meat", *J Food Prot.*, **70**(6), pp.1440-5.

[3] Yongxu S, Jicheng L (2008), "Structural characterization of a watersoluble polysaccharide from the roots of *Codonopsis pilosula* and its immunity activity", *Int J Biol Macromol*, **43**(3), pp.279- 282.

[4] Zhu E, Wang Z, Xu G, Leung H, Yeung H (2001), "HPLC/MS fingerprint analysis of tangshenosides", *Zhong Yao Cai.*, **24**(7), pp.488-90.

[5] Li C.Y, Xu H.X, Han Q.B, Wu T.S (2009), "Quality assessment of *Radix Codonopsis* by quantitative nuclear magnetic resonance", *NCBI*, **1216**(11), pp.2124-9.

[6] Schenk R.H & Hildebrandt A.C (1972), "Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures", *Canadian Journal of Botany*, **50**, pp.199-204.

[7] Gaspar T, Kevers C, Faivre-Rampant O, Crèvecoeur M, Penel C, Gerppin H and Dommes J (2003), "Changing concept in plant hormone action", *In Vitro Cell Dev. Pl.*, **39**(2), pp.85-106.

[8] Jun Tao, Liqin Yu, Fen Kong and Daqiu Zhao (2011), "Effects of plant growth regulators on *in vitro* propagation of *Cymbidium faberi* Rolfe", *African Journal of Biotechnology*, **10**(69), pp.15639-15646.

[9] Tiwari V, Tiwari K.N and Singh B.D (2000), "Comparative studies of cytokinin on *in vitro* propagation of *Bacopa monnieri*.", *Plant Cel., Tissue Organ. Cult.*, **66**(1), pp.9-16.

[10] Sahoo Y, Pattnaik S.K, and Chand P.K (1997), "In vitro clonal propagation of an aromatic medicinal herb *Ocimum basilicum* L. (sweet basil) by axillary shoot proliferation", *In vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, **33**, pp.293-296.

[11] Faisal M and Anis (2003), "Rapid mass propagation of *Tylophora indica* Merrill via leaf callus culture", *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, **75**, pp.125-129.

Chuyển gen tăng chiều dài sợi gỗ (*EcHB1*) vào cây thuốc lá và đánh giá biểu hiện gen

Đỗ Thị Thực*, Đỗ Thị Thu, Trần Thị Thu Hà, Trần Hồ Quang

Viện Nghiên cứu giống và Công nghệ sinh học lâm nghiệp

Ngày nhận bài 2.3.2015, ngày chuyển phản biện 6.3.2015, ngày nhận phản biện 11.5.2015, ngày chấp nhận đăng 14.5.2015

Trong nghiên cứu này, các tác giả sử dụng cây thuốc lá như là cây mô hình để phục vụ các nghiên cứu cho chuyển gen tăng chiều dài sợi gỗ và làm cơ sở cho các nghiên cứu chuyển gen vào các loài cây trồng rừng quan trọng như bạch đàn và keo. Biến nạp gen tăng chiều dài sợi gỗ *EcHB1* vào cây thuốc lá thông qua *A. tumefaciens* chủng GV3101 mang vector nhị thể pGWB2/35S/*EcHB1*/NOS. Kết quả đã tạo được 69 dòng thuốc lá chuyển gen và kiểm tra ngẫu nhiên 8 dòng cây chuyển gen bằng phương pháp PCR đều cho kết quả dương tính. Sau 3 tháng trồng cây tại vườn ươm trong khu vực cách ly, 32 dòng cây thuốc lá chuyển gen có chiều cao trung bình (31,88 cm) lớn hơn 87,5% so với dòng thuốc lá đối chứng (17 cm) và chiều dài sợi gỗ của cây chuyển gen lớn hơn so với cây đối chứng 12%.

Từ khoá: *A. tumefaciens*, chiều dài sợi gỗ, chuyển gen, gen *EcHB1*, thuốc lá.

Chỉ số phân loại 4.6

STUDY ON GENETIC TRANSFORMATION OF FIBER LENGTH GENE (*EcHB1*) INTO TOBACCO AND EVALUATION OF GENE EXPRESSION

Summary

In this study, the authors have used tobacco as model plant for studying the expression of fiber length gene (*EcHB1*), and the results of this study are the fundamental basis for transferring genes into some important forest trees such as *Eucalyptus* and *Acacia* so far. The *EcHB1* gene has been transferred into Tobacco by *Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101 with binary vector pGWB2/35S/*EcHB1*/NOS. Sixty-nine Tobacco transgenic lines have been produced, and PCR tests for 8 randomized transgenic lines have shown positive. After three months in nursery, thirty-two transgenic lines have reached the average height of 31.88 cm, while the control is only 17 cm in height. The fiber length of transgenic clones is also 12% higher than that of the control.

Keywords: *Agrobacterium tumefaciens*, *EcHB1* gene, fiber length, tobacco, transgenic.

Classification number 4.6

Đặt vấn đề

Chuyển gen nhờ vi khuẩn *Agrobacterium* được nghiên cứu từ những năm 60-70 của thế kỷ trước. Việc phát hiện *A. tumefaciens* có khả năng chuyển gen vào thực vật vào đầu những năm 80 đã biến loài này trở thành một trong những công cụ quan trọng nhất của công nghệ chuyển gen thực vật với những ưu điểm nổi trội như số bản sao của gen biến nạp được chuyển vào tế bào thấp (khoảng 1-2 bản sao), trong khi sử dụng súng bắn gen là nhiều hơn, do vậy giảm thiểu sự không biểu hiện của gen được chuyển, tăng khả năng chuyển gen bền vững, hiệu quả chuyển gen cao; tránh được sự hình thành cây chuyển gen thể khảm. Ngoài ra, phương pháp chuyển gen nhờ *A. tumefaciens* có kỹ thuật đơn giản, dễ thực hiện, không đòi hỏi thiết bị đắt tiền.

Ở thực vật, các gen liên quan đến nhân tố phiên mã (transcription factor genes) có chức năng kiểm soát quá trình biểu hiện các gen mã hoá cho các enzyme trong con đường sinh tổng hợp thành tế bào. Đây là các gen chìa khoá có tác dụng tăng cường hoặc kìm hãm các hoạt động của các gen khác [1].

Protein HD-Zip là nhân tố phiên mã có

*Tác giả chính: Tel: 0913010902; Email: dothithuc@gmail.com

trong thực vật. HD-Zip có cấu tạo gồm miền ADN có chức năng liên kết chặt chẽ với motif khóa kéo leucine (leucine zipper motif) trong việc hình thành dimmer. Hai chuỗi polypeptide ở khóa kéo leucine được giữ với nhau bởi tương tác kỵ nước giữa axit amin leucine và sự lồng vào của 2 vòng xoắn α . Đây là loại homeodomain (miền đồng hình) chỉ có mặt trong thực vật và được coi là gen HD-Zip có nguồn gốc từ thực vật bằng cách trao đổi giữa một gen exon của miền đồng hình với một chuỗi khóa kéo leucine [2].

Protein HD-Zip bao gồm 4 phân nhóm (từ I đến IV) dựa trên 4 đặc điểm: (1) sự bảo thủ của domain HD-Zip mà xác định vị trí ADN gắn kết, (2) cấu trúc gen, (3) các motif bảo thủ phụ thêm (additional conserved motif) và (4) chức năng [3].

Mỗi nhân tố phiên mã kiểm soát sự hoạt động và phát triển của một vùng thực vật đặc biệt. Nhân tố phiên mã ATHB5 thuộc HD-Zip phân nhóm I có chức năng kiểm soát sự hình thành trụ dưới lá mầm và kéo dài rễ sơ cấp [4], ATHB2 thuộc HD-ZIP phân nhóm II có chức năng kiểm soát việc kéo dài tế bào liên quan đến chất lượng ánh sáng [5], ATHB8 thuộc phân nhóm III có chức năng kiểm soát sự phát triển của tầng tăng trong quá trình biệt hóa tế bào [6], ATHB10/GLABRA 2 thuộc phân nhóm IV có chức năng kiểm soát sự biệt hóa các dạng khác nhau của tế bào trichomes trên lá và thân, và tế bào lông rễ [7].

Gen *EcHBI* có chức năng chính trong việc hình thành và phát triển sợi gỗ và có ảnh hưởng đến quá trình hình thành xylem ở cây. Gen *EcHBI* thuộc nhóm nhân tố phiên mã HD-zip nhóm 2 (homeodomain leucine zipper) và có chức năng chính trong việc hình thành và phát triển sợi gỗ [8].

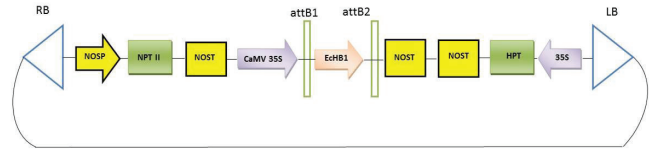
Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành biến nạp gen *EcHBI* vào cây thuốc lá thông qua *A. tumefaciens* với mục đích đánh giá biểu hiện của gen *EcHBI* trong cây. Kết quả nghiên cứu về biểu hiện của gen này trong cây thuốc lá là cơ sở để tiến hành các nghiên cứu chuyển gen tiếp theo cho các loài cây trồng rừng hiện nay như bạch đàn và keo để nâng cao chất lượng gỗ phục vụ ngành công nghiệp chế biến giấy và sản xuất đồ mộc...

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu nghiên cứu

Chủng *A. tumefaciens* (GV3101) có chứa vector

nhị thể (pGWB2) mang gen làm tăng chiều dài sợi gỗ (*EcHBI*) được phân lập từ bạch đàn trắng (*Eucalyptus camaldulensis*) và được thiết kế cấu trúc vector chuyển gen pGWB2/35S/*EcHBI*/NOS tại phòng thí nghiệm của Viện Nghiên cứu RIKEN (Nhật Bản).



Hình 1: sơ đồ cấu trúc đoạn T-ADN trong vector pGWB2/35S/*EcHBI*/NOS

Ghi chú: RB: right T-ADN border; LB: left T-ADN border; NPT: gen kháng kanamycin, NOSP: promoter nopaline synthase gene là vị trí khởi động phiên mã gen nptII, NOS: terminator nopaline synthase gene là vị trí kết thúc phiên mã gen, 35S: promoter CaMV 35S, *EcHBI*: gen liên quan đến tăng chiều dài sợi gỗ, HPT: gen kháng hygromycin

Dòng thuốc lá (*Nicotiana tabacum*) SNN do Phòng Công nghệ tế bào thực vật - Viện Công nghệ sinh học cung cấp.

Cặp môi đặc hiệu để xác định sự có mặt của gen *EcHBI* trong cây chuyển gen được mua của Công ty Biosystems [9].

Ký hiệu môi	Trình tự nucleotide của môi (5'-3')
EcHBI-F	ATGTGCCCTATCGATTTCGG
EcHBI-R	TTAACAAGCGGCTGATGGATGAGC

Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp chuyển gen vào cây thuốc lá nhờ *A. tumefaciens*: dùng lá có kích thước vừa phải ở các cây con khỏe mạnh 2 tuần tuổi. Dùng dao cắt 4 cạnh mép lá để gây tổn thương, tạo thành các mảnh lá có kích thước khoảng 1 cm². Các mảnh lá được sử dụng để lây nhiễm và đồng nuôi cây với *A. tumefaciens* được bổ sung thêm Acetosyringone (AS) với nồng độ 200 μ M. Đồng nuôi cây ở nhiệt độ 25°C, trong buồng tối với thời gian 48 giờ theo phương pháp của Topping có cải tiến [10].

Các mẫu sau khi đồng nuôi cây tiến hành rửa khuẩn bằng dung dịch 1/2 MS bổ sung 500 mg/l cefotaxime trong 10 phút và được cấy sang môi trường tái sinh gồm MS + 1 mg BAP. Sau 4 tuần thu được các cụm chồi, tiến hành tách các cụm chồi cây chuyển sang môi trường chọn lọc (MS + 1 mg BAP + 50 mg/l kanamycin). Các chồi chọn lọc thu được tiến hành cấy chuyển sang môi trường ra rễ chọn lọc (MS + 0,1 mg NAA + 50 mg/l kanamycin).

Phương pháp xác định sự có mặt của gen EcHB1 bằng PCR:

Tiến hành phản ứng nhân gen *EcHB1* theo bộ kit Kapa 3G Plant PCR (Kapa biosystems). Cắt mảnh lá mới sau 3 tháng trồng tại nhà lưới của 8 dòng thuốc lá chuyển gen và dòng đối chứng (không chuyển gen) cho vào ống PCR có thành phần như sau: 25 µl Kapa 2x; 0,5 µl MgCl₂; 1,5 µl EcHB1-F 10 pM; 1,5 µl EcHB1-R 10 pM; 0,5 µl Enhancer; 0,5 µl Taq ADN polymerase thêm nước khử ion đến thể tích 50 µl. Chu trình nhiệt: 95°C 10 phút; 35 chu kỳ (95°C 30 giây, 56°C 30 giây, 72°C 1 phút), 72°C trong 7 phút và sau đó duy trì ở 12°C.

Sản phẩm PCR được điện di trong gel agarose 1%, sau đó nhuộm bằng Ethidium bromide và phát hiện các băng ADN dưới tia sáng của đèn cực tím.

Phương pháp đánh giá biểu hiện của gen EcHB1:

Đánh giá biểu hiện của gen dựa vào tốc độ sinh trưởng của cây thuốc lá: sau khi chuyển ra bầu đất cây được chăm sóc, theo dõi tại vườn ươm trong khu vực cách ly rồi tiến hành đo chiều cao của các dòng thuốc lá đối chứng và dòng chuyển gen bằng thước sau 1, 2 và 3 tháng.

Đánh giá biểu hiện của gen dựa vào tiêu bản sợi gỗ: sau 3 tháng, cây thuốc lá đã hình thành 1 lớp gỗ mỏng. Chọn 7 dòng thuốc lá và đánh dấu theo số thứ tự. Trong đó có 6 dòng thuốc lá chuyển gen (gồm 3 dòng sinh trưởng tốt, 3 dòng sinh trưởng kém) và 1 cây đối chứng, ở mỗi dòng cắt 1 đoạn nhỏ dài 1,5 cm và cách góc 5 cm. Sau đó tước lớp vỏ và chẻ làm 4 phần bằng nhau theo chiều dọc. Mẫu được phân tích chiều dài sợi gỗ theo phương pháp FUJI 2003. Chiều dài sợi gỗ được đo bằng phần mềm Optika Vision pro 1.5.

Số liệu phân tích được thống kê và xử lý bằng phần mềm SPSS: phân tích phương sai một nhân tố, vẽ biểu đồ.

Kết quả và thảo luận

Kết quả tạo dòng thuốc lá chuyển gen

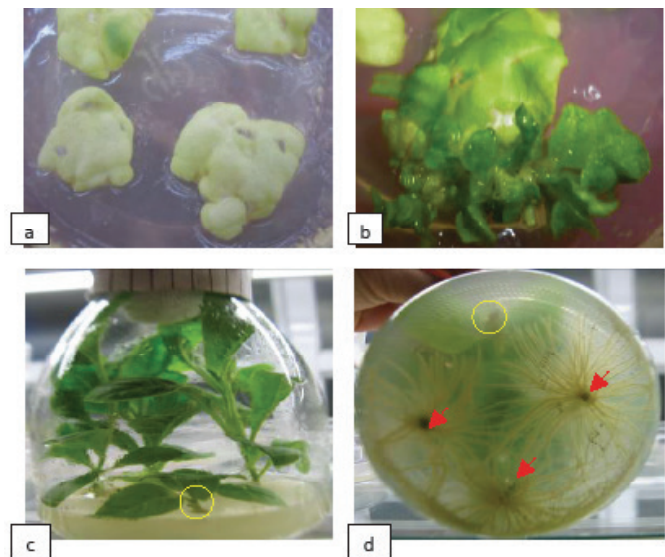
Sau 4 tuần chuyển gen, từ những khối mô viên quanh mép lá đã tạo ra một số lượng lớn cụm chồi. Lần biến nạp đầu tiên thu được 76 cụm chồi, lần 2 thu được 69 cụm chồi và lần 3 thu được 81 cụm chồi. Kết quả thí nghiệm cho thấy, số cụm chồi phát sinh trên mẫu dao động từ 2 đến 3, tuy nhiên, không phải tất cả các chồi này có mang gen cần chuyển. Để loại bỏ các chồi không được chuyển gen, trong cấu trúc vector đã

sử dụng gen chọn lọc là kanamycin và hygromycin. Trong nghiên cứu này, để loại bỏ các chồi không được chuyển gen, tiến hành tách các cụm chồi và nuôi cấy trên môi trường chọn lọc (MS + 1 mg BAP + 50 mg/l kanamycin), quá trình chọn lọc này được thực hiện 3 lần. Kết quả đã thu được tất cả 226 cụm chồi.

Sau 3 tuần, các chồi trên cụm chồi của các mẫu chuyển gen sống sót sau chọn lọc được tách ra và nuôi cấy trên môi trường kéo dài chồi, ra rễ... Với tổng số 181 chồi cấy trên môi trường chọn lọc, chỉ thu được 106 chồi ra rễ. Như vậy có thể đánh giá bước đầu rằng, một trong những nguyên nhân chính của việc gây chết và không ra rễ là các chồi không mang gen được chuyển hoặc ở dạng thể khảm. Kết quả cho thấy, hiệu quả biến nạp gen *EcHB1* vào giống thuốc lá SNN khá tốt (đạt 58,56%).

Bảng 1: kết quả theo dõi khả năng tái sinh, chọn lọc của quá trình chuyển gen *EcHB1*

Lần thí nghiệm	Số mảnh lá biến nạp	Số cụm chồi thu được	Số chồi cấy trên môi trường chọn lọc	Số chồi ra rễ	Tỷ lệ (%)
1	30	76	68	41	60,29
2	30	69	50	28	56
3	30	81	63	37	58,73
Tổng số	90	226	181	106	58,56



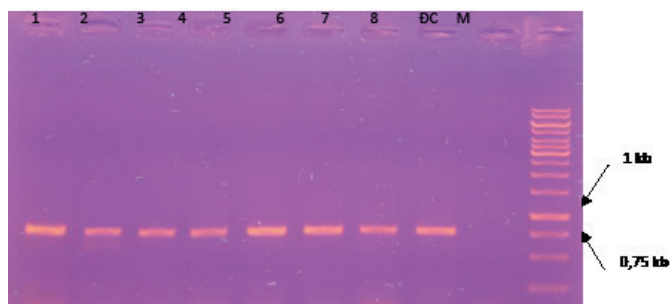
Hình 2: chồi thuốc lá chuyển gen tái sinh và ra rễ trên môi trường chọn lọc

Ghi chú: mũi tên màu đỏ chỉ cây chuyển gen, vòng tròn màu vàng chỉ cây không chuyển gen; mẫu biến nạp (a); chồi phát sinh sau biến nạp (b); chồi trên môi trường chọn lọc (c); chồi trên môi trường ra rễ (d)

Kết quả kiểm tra sự có mặt của gen bằng PCR

PCR là kỹ thuật được sử dụng để xác định sự có mặt của gen chuyển trong cây chuyển gen. Trong nghiên cứu này, 8 dòng cây thuốc lá chuyển gen *EcHB1* đã được phân tích PCR nhân gen *EcHB1* với cặp mồi đặc

hiệu. Lá mới của 8 dòng này được thu và sau đó được nhân gen *EcHb1* bằng bộ kit Kapa 3G Plant PCR của hãng Biosystems và được điện di kiểm tra trên gel agarose 1% để xác định sự có mặt của gen *EcHb1*.

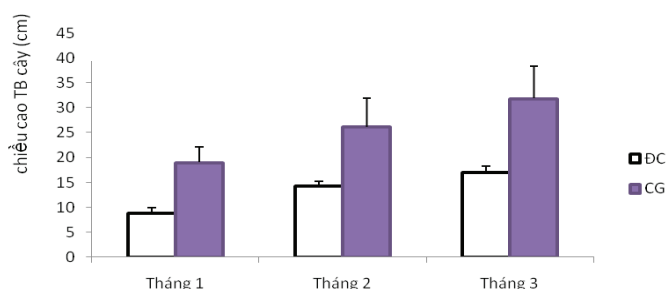


Hình 3: sản phẩm PCR nhân gen *EcHb1* điện di trên gel agarose 1%
Ghi chú: giếng M: marker ADN 1 kb; giếng 1-8: sản phẩm PCR nhân gen *EcHb1* từ 8 dòng chuyển gen; giếng DC: sản phẩm PCR nhân gen *EcHb1* từ dòng đối chứng

Kết quả điện di trên hình 3 cho thấy, cả 8 dòng chuyển gen đều xuất hiện một băng ADN duy nhất với kích thước khoảng 750 bp tương ứng với kích thước lý thuyết về thiết kế cặp môi nhân gen *EcHb1*, còn dòng đối chứng không xuất hiện băng ADN. Điều này chứng tỏ sự có mặt của gen *EcHb1* trong 8 dòng cây thuốc lá chuyển gen.

Kết quả về sinh trưởng của cây thuốc lá chuyển gen

32 dòng thuốc lá chuyển gen và 30 cây đối chứng được trồng và theo dõi sinh trưởng tại vườn ươm. Sinh trưởng của các dòng thuốc lá chuyển gen và đối chứng được theo dõi sau 1, 2 và 3 tháng trồng. Kết quả sinh trưởng được trình bày trong hình 4.



Hình 4: sinh trưởng của dòng thuốc lá đối chứng và chuyển gen sau 3 tháng
Ghi chú: cột màu trắng là các cây đối chứng không mang gen chuyển, cột màu xanh là cây mang gen chuyển *EcHb1*

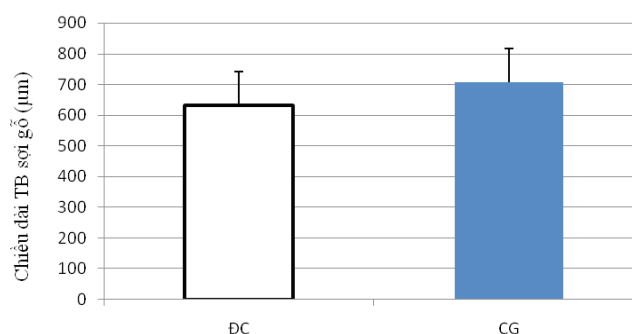
Kết quả ở hình 4 cho thấy, chiều cao của dòng đối chứng thấp hơn so với dòng chuyển gen và có sự sai khác về tốc độ sinh trưởng giữa dòng thuốc lá đối chứng và chuyển gen. Sau 3 tháng, chiều cao trung bình của dòng thuốc lá chuyển gen là 31,88 cm, lớn hơn 87,5% so với dòng thuốc lá đối chứng (17 cm).

Phân tích phương sai một nhân tố cho kết quả $F_1 = 299,01$; $F_2 = 122,23$; $F_3 = 143,06 > F_{crit} = 4,001$ chứng tỏ có sự sai khác về sinh trưởng giữa dòng thuốc lá đối chứng và dòng chuyển gen. Điều này cho thấy gen *EcHb1* đã biểu hiện rất rõ rệt trong quá trình biệt hóa xylem làm tăng chiều dài sợi gỗ.

Nghiên cứu về ảnh hưởng của các gen thuộc nhân tố phiên mã (transcription factors) đến quá trình tổng hợp thành tế bào của cây và ảnh hưởng đến sinh trưởng của cây đã được chứng minh trên cây ngô [11], cây *Arabidopsis* [12]. Các nghiên cứu này cho thấy, khi các gen thuộc nhóm nhân tố phiên mã hoạt động mạnh thì mức độ tổng hợp thành tế bào tăng lên, số lượng tế bào được hình thành nhiều hơn... và sinh trưởng của cây cũng tăng lên.

Kết quả về phân tích chiều dài sợi gỗ

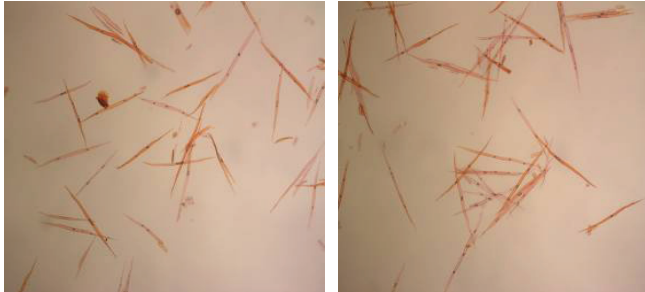
Sau 3 tháng, cây thuốc lá đã hình thành 1 lớp gỗ mỏng. Chọn 7 dòng thuốc lá, gồm 6 dòng thuốc lá chuyển gen (3 dòng sinh trưởng tốt, 3 dòng sinh trưởng kém) và 1 cây đối chứng, lấy mẫu đo chiều dài sợi gỗ trên kính hiển vi. Số liệu thu được được thể hiện trên hình 5.



Hình 5: chiều dài sợi gỗ của dòng thuốc lá đối chứng và chuyển gen

Qua số liệu thu được cho thấy, chiều dài trung bình sợi gỗ của cây đối chứng là 631,25 μm và cây chuyển gen là 707,53 μm. Chiều dài sợi gỗ của dòng thuốc lá chuyển gen dài hơn 12% so dòng đối chứng. Phân tích phương sai một nhân tố cho kết quả $F = 7,77 > F_{crit} = 3,9$ chứng tỏ sai khác có ý nghĩa. Như vậy, gen *EcHb1* sau khi chuyển vào cây thuốc lá đã có biểu hiện khá tốt trong việc biệt hóa các tế bào xylem làm tăng chiều dài sợi gỗ. Kết quả này cũng phù hợp với kết quả nghiên cứu của Sonoda và CTV [9]. Các tác giả này khi phân tích chiều dài sợi gỗ của dòng thuốc lá chuyển gen *EcHb1* thấy dài hơn các dòng đối chứng 1,2 lần.

Kết quả nghiên cứu trên khẳng định cấu trúc vector chuyển gen pGWB2/35S/EcHB1/NOS thiết kế hoạt động tốt và cấu trúc này là nguồn vật liệu di truyền để chuyển vào các đối tượng cây lâm nghiệp như keo, bạch đàn... tạo giống sinh trưởng nhanh, chất lượng gỗ tốt.



Dòng thuốc lá đối chứng

Dòng thuốc lá chuyển gen

Hình 6: tiêu bản chiều dài sợi gỗ của dòng thuốc lá đối chứng và chuyển dưới độ phóng đại 40x

Kết luận

1) Đã chuyển thành công cấu trúc gen tăng chiều dài sợi gỗ (gen *EcHB1*) vào dòng thuốc lá SNN thông qua *A. tumefaciens* và thu được 69 dòng chuyển gen ra rễ trên môi trường chọn lọc.

2) Đã kiểm tra sự có mặt gen *EcHB1* ở đại diện ngẫu nhiên 8 dòng thuốc lá chuyển gen bằng PCR, kết quả cả 8 dòng đều dương tính với gen *EcHB1*.

3) Các dòng thuốc lá chuyển gen *EcHB1* sinh trưởng cao hơn 87,5% so với cây đối chứng sau 3 tháng tuổi.

4) Các dòng thuốc lá chuyển gen có chiều dài sợi gỗ lớn hơn 12% so với dòng đối chứng sau 3 tháng tuổi.

Lời cảm ơn

Công trình được hoàn thành bởi kinh phí của đề tài “Nghiên cứu tạo giống bạch đàn lai biến đổi gen cho chiều dài sợi gỗ ở Việt Nam” thuộc Chương trình trọng điểm ứng dụng công nghệ sinh học trong lĩnh vực nông nghiệp và phát triển nông thôn đến năm 2020. Các tác giả xin trân trọng cảm ơn sự hỗ trợ của đề tài và Chương trình.

Tài liệu tham khảo

[1] Rueda E.C, Dezar C.A, Gonzalez D.H, Chan R.L (2005), “Hahb-10, a sunflower homeobox-leucine zipper gene, is regulated by light quality and quantity, and promotes early flowering when

expressed in *Arabidopsis*”, *Plant and cell physiology*, **46**, pp.1954-1963.

[2] Schena M, Davis R.W (1994), “Structure of homeobox-leucine zipper genes suggests a model for the evolution of gene families”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **91**, pp.8393-8397.

[3] Haake V, Cook D, Riechmann J, Pineda O, Thomashow M.F, Zhang J.Z (2002), “Transcription factor CBF4 is a regulator of drought adaptation in *Arabidopsis*”, *Plant Physiology*, **130**, pp.639-648.

[4] Johannesson H, Wang Y, Engström P (2001), “DNA-binding and dimerization preferences of *Arabidopsis* homeodomain-leucine zipper transcription factors in vitro”, *Plant Molecular Biology*, **45**, pp.63-73.

[5] Carabelli M, Morelli G, Whitelam G, Ruberti I (1996), “Twilight-zone and canopy shade induction of the *Athb-2* homeobox gene in green plants”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **93**, pp.3530-3535.

[6] Baima S, Nobili F, Sessa G, Lucchetti S, Ruberti I, Morelli G (1995), “The expression of the *Athb-8* homeobox gene is restricted to provascular cells in *Arabidopsis thaliana*”, *Development*, **121**, pp.4171-4182.

[7] Di Cristina M, Sessa G, Dolan L, Linstead P, Baima S, Ruberti I, Morelli G (1996), “The *Arabidopsis* *Athb-10* (GLABRA2) is an HD-Zip protein required for regulation of root hair development”, *The Plant Journal*, **10**, pp.393-402.

[8] Ariel F.D, Manavella P.A, Dezar C.A, Chan R.L (2007), “The true story of the HD-Zip family”, *Trends in Plant Science*, **12**, pp.419-426.

[9] Sonoda T, Koita H, Nakamoto-Ohta S, Kondo K, Suezaki T, Kato T, Ishizaki Y, Nagai K, Lida N, Sato S, Umezawa T, Hibino T (2009), “Increasing fiber length and growth in transgenic tobacco plants overexpressing a gene encoding the *Eucalyptus camaldulensis* HD-Zip class II transcription factor”, *Plant Biotechnology*, **26**, pp.115-120.

[10] Topping J (1998), “Tobacco Transformation”, In Foster G, Taylor S (Ed.) (Eds.) *Plant Virology Protocols*. ed. Humana Press, **81**, pp.365-372.

[11] Bosch M, Mayer C.D, Cookson A, Donnison I.S (2011), “Identification of genes involved in cell wall biogenesis in grasses by differential gene expression profiling of elongating and non-elongating maize internodes”, *Journal of Experimental Botany*, **62**, pp.3545-3561.

[12] Baima S, Possenti M, Matteucci A, Wisman E, Altamura M.M, Ruberti I, Morelli G (2001), “The *Arabidopsis* *ATHB-8* HD-zip protein acts as a differentiation-promoting transcription factor of the vascular meristems”, *Plant Physiology*, **126**, pp.643-655.

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

- 1 Research on rice adaption to salt condition.**
Nguyen Bich Ha Vu, Vo Cong Thanh
- 5 Improving a soybean variety by Co⁶⁰ gamma irradiation on dry seeds.**
Le Duc Thao, Nguyen Van Manh...
- 10 Underlying reasons causing degeneration and shortening the economic cycle of coffee plantations in the Central Highlands.**
Nguyen Van Van, Tran Thanh Toan...
- 17 The effects of culture medium on in vitro oocyte maturation and embryo development of high yield cow.**
Nguyen Thi Huong, Nguyen Thi Le Huong...
- 23 Determination of metabolic energy value of *Leuceana leucocephala* leaf meal on Luong Phuong broiler chicken.**
Tu Quang Hien, Tran Viet Ha...
- 27 The habit of eating three kinds of mangrove leaves, nutrient content in mangroves leaves and feces of *Sesarma sp.* in Ca Mau province.**
Vo Nguon Thao, Truong Thi Nga...
- 33 Effects of insecticide chlorpyrifos ethyl on cholinesterase enzyme in fingerling snakehead fish.**
Nguyen Anh Tuan, Chau Thanh Tuoi...
- 38 Molecular characteristics of *defensin1* gene isolated from some corn samples with difference in resistant levels to weevils.**
Vi Thi Xuan Thuy, Chu Hoang Mau...
- 44 Construction of binary vector contained artificial *ZMDREB2A-S* gene and transformation into *agrobacterium tumefaciens*.**
Huynh Thi Thu Hue, Bui Manh Cuong...
- 49 Assessment of genetic diversity in pummelo (*Citrus maxima* (Burm.) Merr.) accessions in Vietnam by utilizing simple sequence repeat (SSR) markers.**
Nguyen Phuong Thuy, Dao Thi Be Bay...
- 55 Effects of plant growth regulators on the morphogenesis of *Codonopsis javanica* (Blume) under in vitro conditions.**
Pham Huong Son, Nguyen Thi Lai
- 60 Study on genetic transformation of fiber length gene (*EchB1*) into tobacco and evaluation of gene expression.**
Do Thi Thuc, Tran Ho Quang...