



ISSN 1859-4794

TẠP CHÍ

KHOA HỌC & CÔNG NGHỆ Việt Nam

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

B

Tập 61 - Số 7 - Tháng 7 năm 2019

HỘI ĐỒNG BIÊN TẬP

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

TỔNG BIÊN TẬP

Đặng Ngọc Bảo

PHÓ TỔNG BIÊN TẬP

Nguyễn Thị Hải Hằng
Nguyễn Thị Hương Giang

TRƯỞNG BAN BIÊN TẬP

Phạm Thị Minh Nguyệt

TRƯỞNG BAN TRỊ SỰ

Lương Ngọc Quang Hưng

TRÌNH BÀY

Đinh Thị Luận

EDITORIAL COUNCIL

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

EDITOR-IN-CHIEF

Dang Ngoc Bao

DEPUTY EDITORS

Nguyen Thi Hai Hang
Nguyen Thi Huong Giang

HEAD OF EDITORIAL BOARD

Pham Thi Minh Nguyet

HEAD OF ADMINISTRATION

Luong Ngoc Quang Hung

ART DIRECTOR

Dinh Thi Luan

TÒA SOẠN

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

EDITORIAL OFFICE

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

GIẤY PHÉP XUẤT BẢN

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

PUBLICATION LICENCE

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

Đặc điểm đột biến EGFR phát hiện trong huyết tương ở bệnh nhân ung thư phổi không tế bào nhỏ điều trị tại Bệnh viện Bạch Mai năm 2017-2018

Phạm Cẩm Phương¹, Nguyễn Thuận Lợi¹, Nguyễn Hữu Thắng², Lê Thị Luyến^{2*}

¹Trung tâm Y học hạt nhân và Ung bướu, Bệnh viện Bạch Mai

²Khoa Y - Dược, Đại học Quốc gia Hà Nội

Ngày nhận bài 8/5/2019; ngày gửi phản biện 10/5/2019; ngày nhận phản biện 11/6/2019; ngày chấp nhận đăng 18/6/2019

Tóm tắt:

Xét nghiệm đột biến thụ thể yếu tố tăng trưởng biểu bì (epidermal growth factor receptor - EGFR) huyết tương trong ung thư phổi không tế bào nhỏ (UTPKTBN) gần đây được sử dụng rộng rãi nhằm đánh giá khả năng thích hợp sử dụng thuốc ức chế EGFR tyrosine kinase (TKIs) và theo dõi đáp ứng điều trị. Mục tiêu của nghiên cứu này nhằm mô tả tình trạng đột biến EGFR phát hiện ở mẫu huyết tương và phân tích một số yếu tố liên quan. Phương pháp nghiên cứu: phát hiện đột biến EGFR bằng kỹ thuật real-time PCR ở 136 mẫu huyết tương của bệnh nhân UTPKTBN tại Bệnh viện Bạch Mai năm 2017-2018. Kết quả nghiên cứu: 56/136 mẫu (41,2%) có đột biến EGFR; đột biến T790M chiếm 24% trong tổng số 75 đột biến được phát hiện; tỷ lệ đột biến EGFR huyết tương ở nữ cao hơn ở nam ($p=0,045$), cao hơn ở nhóm người không hút thuốc lá so với nhóm người hút thuốc lá ($p=0,027$), nhóm thuộc giai đoạn IV cao hơn các giai đoạn còn lại ($p=0,003$); tỷ lệ đột biến T790M ở nhóm đã hoặc đang điều trị TKIs cao hơn nhóm chưa từng điều trị TKIs ($p=0,001$). Kết luận: xét nghiệm đột biến EGFR huyết tương có giá trị trong phát hiện đột biến EGFR và đột biến kháng thuốc T790M; ngoài ra, xét nghiệm EGFR huyết tương cũng giúp theo dõi tiến triển của bệnh.

Từ khóa: ctDNA, đột biến gen EGFR, ung thư phổi không tế bào nhỏ.

Chỉ số phân loại: 3.1

Đặt vấn đề

Ung thư phổi là nguyên nhân gây tử vong hàng đầu tại Việt Nam và nhiều nước trên thế giới. Dựa vào mô bệnh học, có tới 85% các trường hợp ung thư phổi nguyên phát là UTPKTBN [1]. Hiện nay, có nhiều phương pháp điều trị ung thư phổi như phẫu thuật, hoá trị, xạ trị, điều trị đích; trong đó nhiều nghiên cứu đã chứng minh các thuốc TKIs có thể giúp trì hoãn bệnh tiến triển và cải thiện chất lượng sống tốt hơn so với hoá trị ở những bệnh nhân có đột biến thụ thể yếu tố tăng trưởng biểu bì [1].

EGFR là một yếu tố ảnh hưởng đến sự phát triển của ung thư, trong đó có ung thư phổi, được Carpenter và cộng sự nghiên cứu phát hiện vào năm 1978 [2]. Đột biến trên vùng tyrosine kinase của EGFR là rất quan trọng đối với việc xác định độ nhạy thuốc TKIs. Hiện nay, kỹ thuật giải trình tự chuỗi DNA dựa trên mẫu mô ung thư được xem là tiêu chuẩn vàng trong phát hiện đột biến gen EGFR. Tuy nhiên, phương pháp xét nghiệm đột biến EGFR trên mẫu mô trong một số trường hợp không khả thi: không đủ điều kiện cho phép sinh thiết, hoặc mẫu sinh thiết quá nhỏ không đủ để giải trình tự gen, hoặc cần kiểm tra lại bằng mẫu huyết tương khi tín hiệu đột biến thấp [3-5].

Phương pháp phát hiện đột biến gen EGFR bằng cách sử dụng

ctDNA (circulating tumor DNA) có trong huyết tương bệnh nhân UTPKTBN có nhiều ưu điểm vượt trội [4, 5], cho phép bệnh nhân có thêm cơ hội để làm xét nghiệm chẩn đoán, đồng thời có thể làm xét nghiệm lặp lại nhiều lần để theo dõi điều trị mà không cần can thiệp sâu như sinh thiết. Bên cạnh đó, phương pháp này khá đơn giản, dễ thực hiện, giảm được chi phí và thời gian cho bệnh nhân, không gây biến chứng [6].

Như vậy, việc phân tích, đánh giá tình trạng đột biến EGFR mẫu huyết tương rất cần thiết, giúp các bác sĩ lâm sàng trong việc điều trị nhằm kéo dài thời gian sống và nâng cao chất lượng sống của bệnh nhân. Mục tiêu của nghiên cứu này nhằm mô tả được tình trạng đột biến gen EGFR phát hiện ở mẫu huyết tương và phân tích được một số yếu tố liên quan trên bệnh nhân UTPKTBN điều trị tại Bệnh viện Bạch Mai năm 2017-2018.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu

Đối tượng trong nghiên cứu này gồm 136 bệnh nhân được chẩn đoán UTPKTBN có chỉ định xét nghiệm đột biến gen EGFR huyết tương, điều trị tại Trung tâm Y học hạt nhân và Ung bướu, Bệnh viện Bạch Mai từ tháng 5/2017 đến tháng 8/2018 đáp ứng các tiêu

*Tác giả liên hệ: Email: luyenle66@gmail.com

Characteristics of EGFR mutations in plasma samples from non-small cell lung cancer patients at Bach Mai Hospital during 2017-2018

Cam Phuong Pham¹, Thuan Loi Nguyen¹,
Huu Thang Nguyen², Thi Luyen Le^{2*}

¹The Nuclear Medicine and Oncology Center, Bach Mai Hospital
²School of Medicine and Pharmacy, Vietnam National University, Hanoi

Received 8 May 2019; accepted 18 June 2019

Abstract:

EGFR mutation plasma analysis on non-small cell lung cancer (NSCLC) has recently been widely used to assess the suitability of targeted therapy by TKIs and follow treatment responses. This study aims to describe EGFR mutation status detected in plasma samples and analyse some related factors. The study was conducted by detecting EGFR mutations using real-time PCR technique in 136 plasma samples of NSCLC patients at Bach Mai Hospital during 2017-2018. Results: EGFR mutations were detected in 56/136 (41.2%) plasma samples; the T790M mutation accounted for 24% of 75 mutations detected; the rate of EGFR mutations, respectively, in females was higher than in males ($p=0.045$), in non-smokers was higher than in smokers ($p=0.027$), and in the stage IV group was higher than in other stages ($p=0.003$); the T790M mutation ratio in treated patients with TKIs was more common than in non-treated patients ($p=0.001$). Conclusions: EGFR mutation plasma analysis is valuable in the detection of EGFR mutations, especially T790M mutations; in addition, EGFR mutation plasma tests help to monitor the disease progression.

Keywords: ctDNA, EGFR mutations, non-small cell lung cancer.

Classification number: 3.1

chẩn chọn lựa và tiêu chuẩn loại trừ.

Tiêu chuẩn chọn lựa:

- Bệnh nhân đã được chẩn đoán xác định UTPKTBN dựa vào kết quả mô bệnh học.
- Bệnh nhân có đầy đủ hồ sơ bệnh án bao gồm thông tin hành chính, kết quả mô bệnh học, giai đoạn bệnh.
- Bệnh nhân được chỉ định xét nghiệm EGFR huyết tương.

Tiêu chuẩn loại trừ: không xác định được đột biến EGFR huyết tương do chất lượng mẫu kém.

Phương pháp nghiên cứu

Thiết kế nghiên cứu: nghiên cứu được tiến hành theo phương pháp mô tả hồi cứu.

Mẫu nghiên cứu: được chọn theo phương pháp chọn mẫu thuận tiện.

Các biến số, chỉ số trong nghiên cứu: thông tin chung của đối tượng nghiên cứu (tuổi, giới, địa chỉ, tiền sử hút thuốc lá, tiền sử điều trị thuốc đích, kết quả xét nghiệm mô bệnh học, giai đoạn bệnh); kết quả xét nghiệm đột biến gen EGFR huyết tương (có hay không có đột biến, loại đột biến, vị trí đột biến).

Kỹ thuật tách chiết DNA: 5 ml mẫu máu được thu thập trong ống EDTA, sau đó ly tâm ở $4000 \times g$ trong 10 phút để tách huyết tương ra khỏi máu, khoảng 2 ml huyết tương được thu thập sẽ sử dụng để tách ctDNA bằng bộ kit cobas® Sample Preparation (Roche - Mỹ).

Phát hiện, phân tích kết quả đột biến EGFR huyết tương bằng kỹ thuật real-time PCR: nghiên cứu sử dụng bộ kit Cobas® EGFR mutation Test v2 (Roche - Mỹ) để phát hiện và phân tích đột biến EGFR trong mẫu huyết tương.

Phân tích thống kê: số liệu được thu thập, nhập và mã hoá bằng phần mềm Excel 2010. Dữ liệu được phân tích bằng phần mềm SPSS 20.0 với các test thống kê y học, các yếu tố liên quan đến đột biến gen EGFR có ý nghĩa khi giá trị $p < 0,05$.

Kết quả nghiên cứu

Từ tháng 5/2017 đến tháng 8/2018, chúng tôi chọn được 136 bệnh nhân đủ tiêu chuẩn vào nghiên cứu và thu nhận được 136 mẫu huyết tương.

Đặc điểm lâm sàng - giải phẫu bệnh của nhóm bệnh nhân nghiên cứu (bảng 1)

Bảng 1. Đặc điểm lâm sàng - giải phẫu bệnh của nhóm bệnh nhân nghiên cứu.

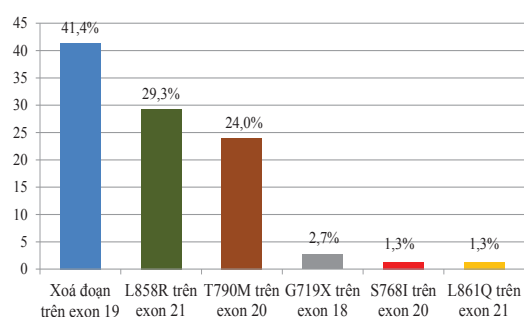
Đặc điểm		Số lượng	Tỷ lệ (%)
Giới tính	Nam	77	56,6
	Nữ	59	43,4
Nhóm tuổi	<60	47	34,6
	≥60	89	65,4
Tiền sử hút thuốc lá	Chưa từng	77	56,6
	Đã hoặc đang hút	59	43,4
Tiền sử điều trị TKIs	Chưa từng	48	35,3
	Đã hoặc đang	88	64,7
Mô bệnh học	Ung thư biểu mô tuyến	131	96,3
	Ung thư biểu mô vảy	5	3,7
Giai đoạn	I	2	1,5
	II	2	1,5
	III	21	15,4
	IV	111	81,6

Tỷ lệ nam/nữ trong nghiên cứu khoảng 1,3/1; tỷ lệ nhóm chưa từng hút thuốc lá cao hơn nhóm hút thuốc lá (bao gồm cả hút thụ động), đã hoặc đang điều trị TKIs cao hơn nhóm chưa từng điều trị.

Ung thư biểu mô tuyến chiếm đa số với tỷ lệ 96,3%, còn lại là ung thư biểu mô vảy - 3,7%; nhóm bệnh nhân ở giai đoạn IV là chủ yếu - 81,6%; giai đoạn III chiếm 15,4%, còn lại giai đoạn II và I - cùng chiếm 1,5%.

Đặc điểm đột biến EGFR mẫu huyết tương

Trong 136 bệnh nhân nghiên cứu, 56/136 bệnh nhân mang đột biến gen EGFR mẫu huyết tương (41,2%); 19 bệnh nhân mang 2 đột biến (14,0%). Phân bố các loại đột biến được trình bày ở hình 1.



Hình 1. Phân bố các đột biến trên exon 18-21 của gen EGFR.

Trong 75 đột biến được phát hiện, đột biến xóa đoạn trên exon 19 và đột biến L858R trên exon 21 chiếm tỷ lệ cao nhất, đáng chú ý là tỷ lệ đột biến T790M khá cao (24%).

Một số yếu tố liên quan giữa đột biến EGFR huyết tương, đột biến T790M với đặc điểm lâm sàng (bảng 2)

Bảng 2. Mối liên quan giữa đột biến EGFR huyết tương, đột biến T790M với lâm sàng.

Đặc điểm	N	EGFR (+)			T790M (+)		
		n	%	p	n	%	p
Nhóm tuổi	<60	47	17	36,2	4	8,5	0,237
	≥60	89	39	43,8	14	15,7	
Giới tính	Nam	77	26	33,8	9	11,7	0,543
	Nữ	59	30	50,8	9	15,3	
Tiền sử hút thuốc lá	Chưa từng	77	38	49,4	10	13,0	0,922
	Đã hoặc đang	59	18	30,5	8	13,6	
Tiền sử điều trị TKIs	Chưa từng	48	6	12,5	0	0,0	<0,001
	Đã hoặc đang	88	50	56,8	18	20,5	

Tỷ lệ đột biến EGFR huyết tương ở nữ cao hơn nam ($p=0,045$), tỷ lệ đột biến EGFR ở người chưa từng hút thuốc lá cao hơn người đã hoặc đang hút ($p=0,027$), tỷ lệ đột biến EGFR ở người đã hoặc đang điều trị đích cao hơn người chưa từng điều trị đích ($p<0,001$).

Tỷ lệ đột biến T790M ở người đã hoặc đang điều trị TKIs cao hơn so với người chưa từng điều trị bằng TKIs ($p=0,001$).

Một số yếu tố liên quan giữa đột biến EGFR huyết tương, đột biến T790M với mô bệnh học - giai đoạn bệnh (bảng 3)

Bảng 3. Một số yếu tố liên quan giữa đột biến EGFR huyết tương, đột biến T790M với mô bệnh học - giai đoạn bệnh.

Đặc điểm	N	EGFR (+)			T790M (+)		
		n	%	p	n	%	p
Mô bệnh học	Ung thư biểu mô tuyến	137	56	42,7	18	13,7	0,374
	Ung thư biểu mô vảy	5	0	0,0	0	0,0	
Giai đoạn	I	2	0	0	0	0,0	0,505
	II	2	0	0	0	0,0	
	III	21	2	9,5	1	4,8	
	IV	111	54	48,6	17	15,3	

Tất cả những bệnh nhân có đột biến EGFR huyết tương đều nằm trong nhóm ung thư biểu mô tuyến (42,7%); tỷ lệ bệnh nhân đột biến EGFR ở giai đoạn IV chiếm tỷ lệ cao hơn giai đoạn III (48,6% so với 9,5%), trong khi không có bệnh nhân đột biến gen ở giai đoạn I, II.

Đột biến T790M cũng chỉ gặp ở nhóm ung thư biểu mô tuyến (13,7%); tỷ lệ đột biến T790M ở nhóm bệnh nhân giai đoạn IV (15,3%) cao hơn các giai đoạn khác nhưng sự khác biệt về tỷ lệ chưa có ý nghĩa thống kê ($p=0,374$ và $p=0,505$).

Bàn luận

Đặc điểm lâm sàng - giải phẫu bệnh của đối tượng nghiên cứu

Trong 136 bệnh nhân được nghiên cứu, độ tuổi từ 60 trở lên chiếm 65,4%. Đây là độ tuổi có nguy cơ tiếp xúc và tích lũy với các yếu tố sinh bệnh cao hơn so với các lứa tuổi khác. Kết quả này phù hợp với một số nghiên cứu trong và ngoài nước [7-9]. Tỷ lệ nam/nữ trong nghiên cứu khoảng 1,3/1 và tỷ lệ nhóm bệnh nhân chưa từng hút thuốc lá cao hơn nhóm đã hoặc đang hút (56,6% so với 43,4%); điều này cho thấy tỷ lệ đột biến EGFR gặp ngày càng nhiều ở nữ giới, không hút thuốc, tương đương với các nghiên cứu trong và ngoài nước khác [6, 7]. Tỷ lệ bệnh nhân trong nghiên cứu đã hoặc đang điều trị đích cao hơn nhóm chưa từng điều trị đích (64,7% so với 35,3%), tương đương với nghiên cứu ngoài nước [10].

Dựa trên kết quả mô bệnh học cho thấy, tỷ lệ bệnh nhân ung thư biểu mô tuyến chiếm đa số (96,3%), bệnh nhân ở giai đoạn IV chiếm tỷ lệ cao hơn các giai đoạn khác (81,6%), tương đương với các nghiên cứu trong và ngoài nước [11, 12].

Đặc điểm đột biến EGFR mẫu huyết tương

Kết quả phân tích đột biến gen EGFR huyết tương cho thấy 56/136 (41,2%) bệnh nhân có đột biến. Trong đó, 19 bệnh nhân

(14,0%) mang đột biến kép. Nhiều nghiên cứu cũng ghi nhận kết quả đột biến tương đương [6, 12].

Tỷ lệ đột biến xóa đoạn trên exon 19 và đột biến L858R trên exon 21 chiếm đa số (41,4% và 29,3%); tỷ lệ đột biến T790M chiếm 24,0%. Sự xuất hiện tỷ lệ cao của đột biến kháng thuốc T790M có thể được lý giải bằng việc trong đối tượng nghiên cứu của chúng tôi có một số lượng lớn bệnh nhân đã được điều trị bằng TKIs trước đó, dẫn đến tình trạng kháng thuốc thứ phát.

Mối liên quan giữa đột biến EGFR, đột biến T790M với lâm sàng - giải phẫu bệnh

Về đặc điểm giới tính và tiền sử hút thuốc lá, kết quả có ý nghĩa thống kê về tỷ lệ đột biến EGFR ở nữ cao hơn nam ($p=0,045$) và ở nhóm không hút thuốc so với nhóm hút thuốc ($p=0,027$), tương đương với một số nghiên cứu trước đó [8].

Xét về giai đoạn bệnh, tỷ lệ đột biến EGFR huyết tương ở giai đoạn IV cao hơn các giai đoạn còn lại và sự khác biệt là có ý nghĩa thống kê ($p=0,003$). Kết quả này phù hợp với nhận định chung là ung thư phổi thường phát hiện ở giai đoạn muộn. Hơn nữa, đối với những bệnh nhân ở giai đoạn tiến triển, nồng độ ctDNA lưu hành trong máu cao nên dễ dàng hơn trong việc phát hiện đột biến EGFR huyết tương ở những đối tượng này [13].

Những bệnh nhân đã hoặc đang điều trị TKIs có tỷ lệ đột biến EGFR huyết tương và tỷ lệ đột biến T790M cao hơn so với nhóm chưa từng điều trị TKIs ($p<0,001$ và $p=0,001$). Điều này cũng phù hợp với nhận định rằng điều trị ung thư phổi bằng TKIs cũng là một trong những nguyên nhân dẫn đến tình trạng kháng thuốc thứ phát [14].

Kết luận

Nghiên cứu xác định đột biến gen EGFR trong mẫu huyết tương thực hiện trên 136 bệnh nhân UTPKTBN tại Trung tâm Y học hạt nhân và Ung bướu - Bệnh viện Bạch Mai từ tháng 5/2017 đến tháng 8/2018 cho thấy:

- Đột biến gen EGFR thường gặp ở độ tuổi trên 60, nữ nhiều hơn nam, chủ yếu ở người không hút thuốc, giai đoạn IV gặp nhiều hơn các giai đoạn còn lại.

- Trong tất cả các đột biến EGFR huyết tương, tỷ lệ đột biến xóa đoạn trên exon 19 và đột biến L858R trên exon 21 vẫn thường gặp nhất, ngoài ra có một tỷ lệ lớn đột biến kháng thuốc T790M do một số lượng lớn bệnh nhân đã điều trị đích trước đó.

- Những bệnh nhân đã hoặc đang điều trị TKIs có tỷ lệ đột biến kháng thuốc T790M cao hơn hẳn những người chưa từng điều trị bằng TKIs.

LỜI CẢM ƠN

Nhóm nghiên cứu trân trọng cảm ơn TS Nguyễn Thuận Lợi, ThS Nguyễn Tiến Lung cùng toàn thể các bác sỹ, điều dưỡng, kỹ thuật viên Đơn vị Gen - Tế bào gốc, Trung tâm Y học hạt nhân và Ung bướu - Bệnh viện Bạch Mai đã hỗ trợ nhóm tác giả thực hiện nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Nguyễn Văn Hiếu (2015), *Ung thư học*, Nhà xuất bản Y học.
- [2] G. Carpenter, L. King, S. Cohen (1978), "Epidermal growth factor stimulates phosphorylation in membrane preparations in vitro", *Nature*, **276**(5686), pp.409-410.
- [3] Y.I. Elshimali, H. Khaddour, M. Sarkissyan, et al. (2013), "The clinical utilization of circulating cell free DNA (CCFDNA) in blood of cancer patients", *International Journal of Molecular Sciences*, **14**(9), pp.18925-18958.
- [4] J. Luo, L. Shen, D. Zheng (2014), "Diagnostic value of circulating free DNA for the detection of EGFR mutation status in NSCLC: a systematic review and meta-analysis", *Scientific Reports*, **4**, Doi: 10.1038/srep06269.
- [5] K. Guo, Z.P. Zhang, L. Han, et al. (2015), "Detection of epidermal growth factor receptor mutation in plasma as a biomarker in Chinese patients with early-stage non-small cell lung cancer", *Oncotargets and Therapy*, **8**, pp.3289-3296.
- [6] Nguyễn Thị Lan Hương, Phan Thanh Thăng, Hồ Trọng Toàn và cộng sự (2017), "Phát hiện đột biến gen EGFR trong mẫu huyết tương bệnh nhân UTPKTBN tại bệnh viện Chợ Rẫy", *Thời sự Y học*, tr.82-88.
- [7] S. Zhang, L. Zhu, X. Chen, et al. (2018), "ctDNA assessment of EGFR mutation status in Chinese patients with advanced non-small cell lung cancer in real-world setting", *Journal of Thoracic Disease*, **10**(7), pp.4169-4177.
- [8] X. Zhao, R.B. Han, J. Zhao, et al. (2013), "Comparison of epidermal growth factor receptor mutation statuses in tissue and plasma in stage I-IV non-small cell lung cancer patients", *Respiration*, **85**(2), pp.119-125.
- [9] Nguyễn Thị Lan Anh (2017), *Nghiên cứu đặc điểm đột biến gen EGFR và mối liên quan với lâm sàng, cận lâm sàng ở bệnh nhân ung thư phổi biểu mô tuyến*, Luận án tiến sĩ y học, Học viện Quân y.
- [10] T. Takahama, K. Sakai, M. Takeda, et al. (2016), "Detection of the T790M mutation of EGFR in plasma of advanced non-small cell lung cancer patients with acquired resistance to tyrosine kinase inhibitors (West Japan Oncology group 8014LTR study)", *Oncotarget*, **7**(36), pp.58492-58499.
- [11] Trần Đình Hà, Mai Trọng Khoa, Phạm Cẩm Phương, Nguyễn Tiến Lung, Nguyễn Tuấn Anh và cộng sự (2016), "Xác định đột biến gen EGFR trên bệnh nhân UTPKTBN tại Bệnh viện Bạch Mai", *Tạp chí Ung thư học Việt Nam*, **3**, tr.271-277.
- [12] H. Bai, L. Mao, H.S. Wang, et al. (2009), "Epidermal growth factor receptor mutations in plasma DNA samples predict tumor response in Chinese patients with stages IIIB to IV non-small-cell lung cancer", *Journal of Clinical Oncology*, **27**(16), pp.2653-2659.
- [13] S.A. Leon, B. Shapiro, D.M. Sklaroff, et al. (1977), "Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy", *Cancer Res.*, **37**(3), pp.646-650.
- [14] S.G. Wu, J.Y. Shih (2018), "Management of acquired resistance to EGFR TKI-targeted therapy in advanced non-small cell lung cancer", *Molecular Cancer*, **17**(1), Doi: 10.1186/s12943-018-0777-1.

Kết quả điều trị nhổ rễ thần kinh C5, C6, $\pm$ C7 đám rối cánh tay bằng phẫu thuật chuyển thần kinh

Nguyễn Văn Phú*, Lê Văn Đoàn, Vũ Hữu Trung,
Bùi Việt Hùng, Nguyễn Huy Cảnh và cộng sự

Bệnh viện Trung ương quân đội 108

Ngày nhận bài 16/4/2019; ngày chuyển phản biện 19/4/2019; ngày nhận phản biện 20/5/2019; ngày chấp nhận đăng 28/5/2019

Tóm tắt:

Nghiên cứu được thực hiện nhằm đánh giá kết quả phục hồi gấp khuỷu, giang và xoay ngoài khớp vai cho 30 bệnh nhân (BN) bị tổn thương nhổ rễ C5, C6, $\pm$ C7 do tai nạn xe máy. Các BN được điều trị bằng phẫu thuật chuyển thần kinh (TK) kép, chuyển TK đầu dài cơ tam đầu cho nhánh trước TK mũ và TK XI cho TK trên vai từ tháng 7/2015 đến 10/2016. Thời gian theo dõi sau mổ trung bình là 31,8 tháng (24-40 tháng). Kết quả cho thấy, gấp khuỷu trung bình 11,0 kg: 24/30 BN đạt rất tốt ($\geq$ M4, nâng tạ $\geq$ 10 kg); 6/30 đạt tốt (M4, nâng tạ <10 kg). Giang vai trung bình là 129,7°: 15/30 BN đạt rất tốt ($\geq$ M4, giang vai $\geq$ 180°); 10/30 đạt tốt (M4, giang vai $\geq$ 60°); 1/30 trung bình; 4/30 mức kém. Xoay ngoài trung bình là 108,0°: 23/30 BN đạt rất tốt; 4/30 đạt tốt; 3/30 mức kém; 0/30 trung bình. Phẫu thuật chuyển TK để phục hồi gấp khuỷu, giang và xoay ngoài khớp vai trong tổn thương liệt cao đám rối cánh tay (ĐRCT) mang lại kết quả cao nhất cho đến nay.

Từ khóa: chuyển thần kinh, giang và xoay ngoài khớp vai, liệt cao đám rối cánh tay, phục hồi gấp khuỷu.

Chỉ số phân loại: 3.2

Đặt vấn đề

Tổn thương ĐRCT không hiếm gặp, nguyên nhân do tai nạn xe máy chiếm trên 92% [1]. Tổn thương liệt cao (rễ C5, C6, $\pm$ C7) chiếm tới 30% các trường hợp tổn thương ĐRCT [2, 3]. Khi bị tổn thương này, BN mất giang, xoay ngoài khớp vai và gấp khuỷu. Điều trị bằng phẫu thuật chuyển TK là hiệu quả nhất [4, 5].

Năm 1994, Oberlin và cs [4] đề xuất phương pháp chuyển một phần TK trụ cho TK cơ nhị đầu để làm gấp khuỷu (Oberlin I). Tuy nhiên, một số trường hợp phục hồi sức gấp khuỷu chỉ đạt mức $\leq$ M3, phải bổ sung bằng phẫu thuật chuyển gân Stiedler. Năm 2005, Mackinnon và cs [5] chuyển thêm một phần TK giữa cho TK cơ cánh tay, gọi là chuyển TK kép (Oberlin II). Kết quả phục hồi gấp khuỷu khỏe hơn, phần lớn các trường hợp đạt $\geq$ M4, không để lại di chứng nơi cho TK. Năm 2003, Leechavengvongs và cs [6] chuyển TK đầu dài cơ tam đầu cho nhánh trước TK mũ, đồng thời chuyển TK XI cho TK trên vai để phục hồi giang và xoay ngoài khớp vai. Kết quả giang vai trung bình là 124°, không có trường hợp nào để lại di chứng nơi TK cho.

Từ năm 2010, Bệnh viện Trung ương quân đội 108 bắt đầu ứng dụng phẫu thuật chuyển TK điều trị liệt cao ĐRCT. Nghiên cứu này được thực hiện với 2 mục tiêu: i) Đánh giá

kết quả phẫu thuật chuyển TK kép để phục hồi gấp khuỷu, chuyển TK theo Leechavengvongs để phục hồi giang và xoay ngoài khớp vai; ii) Xác định mức độ ảnh hưởng sau lấy TK XI, TK đầu dài cơ tam đầu, một bó sợi TK giữa, TK trụ.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng

30 BN bị nhổ các rễ TK C5, C6, $\pm$ C7, không còn khả năng nổi hoặc ghép, từ khi chấn thương đến khi phẫu thuật là dưới 12 tháng. Không liệt cơ thang và cơ tam đầu, không bị tổn thương xương - khớp vai, khuỷu cùng bên. Các BN này được phẫu thuật chuyển TK kép để phục hồi gấp khuỷu, chuyển TK theo Leechavengvongs để phục hồi giang và xoay ngoài khớp vai từ tháng 7/2015 đến 10/2016 tại Bệnh viện Trung ương quân đội 108. Thời gian theo dõi sau mổ trên 24 tháng.

Phương pháp

Nghiên cứu tiền cứu, mô tả lâm sàng, không đối chứng, theo dõi dọc và cắt ngang tại các thời điểm sau mổ 3 tháng cho đến thời điểm trên 24 tháng. Các chỉ tiêu nghiên cứu được xây dựng theo biểu mẫu thống nhất. Phân tích, xử lý số liệu bằng phần mềm SPSS 20.0.

Mô tả kỹ thuật mổ:

*Tác giả liên hệ: Email: bspu108@gmail.com

Results on the treatment of C5, C6, ±C7 nerve root avulsion injuries with combined nerve transfers

Van Phu Nguyen*, Van Doan Le, Huu Trung Vu, Viet Hung Bui, Huy Canh Nguyen, et al.

108 Military Central Hospital

Received 16 April 2019; accepted 28 May 2019

Abstract:

This study aims to evaluate the results of combined nerve transfers for restoration of elbow flexion, shoulder abduction and external rotation for 30 patients (29 males, 01 female) with the average age of 31.6 with C5, C6, ±C7 root avulsion of brachial plexus due to motor-bike accidents (100%). The mean time of preoperative delay was 3.9 months. 30 patients were treated with double nerve transfers for restoration of elbow flexion with the spinal accessory nerve to suprascapular nerve combined the long head of triceps to anterior branch of axillary nerve transfers for restoration of shoulder abduction and external rotation from July 2015 to October 2016. All patients were observed during the mean time of 31.8 months (range: 24 to 40 months). The average elbow flexion recovery was 11.0 kg lift: 24/30 patients had very good results, score $\geq$ M4 (could lift $\geq$ 10 kg); 6/30 patients had good results, score M4 (could lift <10 kg). The average recovery shoulder abduction angle was 129.7°: 15/30 patients obtained very good results; 10/30, 1/30, and 4/30 patients got good, fair, and poor results, respectively. The mean value of recovery shoulder external rotation was 108.0°: 23/30 patients obtained very good results; 4/30 and 3/30 patients got good and poor results, respectively. Combined nerve transfers for restoration of elbow flexion, shoulder abduction and external rotation in upper brachial plexus injuries exhibited good results.

Keywords: nerve transfer, restoration of elbow flexion, shoulder abduction and external rotation, upper brachial plexus injury.

Classification number: 3.2

Chuyển TK XI cho TK trên vai, chuyển TK đầu dài cơ tam đầu cho nhánh trước TK mũ (theo kỹ thuật của Leechavengvongs và cs [6]): chuyển TK XI cho TK trên vai; đi đường trên đòn: lấy nhánh TK XI đi vào cơ thang chuyển trực tiếp cho TK trên vai; đi đường sau vai: lấy TK đầu dài cơ tam đầu chuyển trực tiếp cho nhánh trước TK mũ.

Chuyển TK kép (theo mô tả của Livernaux và cs [7]): lấy một hoặc vài bó sợi vận động của TK trụ (tìm bó vận động cơ trụ trước bằng máy kích thích điện TK) để chuyển cho nhánh vận động của cơ nhị đầu. Lấy một hoặc vài bó sợi vận động của TK giữa (tìm bó vận động cho cơ gan tay lớn, gan tay bé, cơ gấp chung nông) để chuyển cho nhánh vận động của cơ cánh tay.

Phương pháp đánh giá kết quả:

Đánh giá sức cơ: theo thang điểm của Hội đồng nghiên cứu y học Anh từ M0 đến M5 (M0: không co cơ, M1: máy co, M2: vận động chi thể nhưng không thắng được trọng lực; M3: thắng trọng lực nhưng không thắng được sức cản; M4: thắng sức cản, M5: gần bình thường).

Đánh giá kết quả phục hồi gấp khuỷu: rất tốt (gấp khuỷu $\geq$ 135°, sức cơ $\geq$ M4, nâng tạ $\geq$ 10 kg); tốt (gấp khuỷu từ 90-135°, sức cơ M4, nâng tạ <10 kg); trung bình (gấp khuỷu $\leq$ 90°, sức cơ M3); kém (sức cơ M0, M1, M2).

Đánh giá kết quả phục hồi giạng vai: rất tốt (giạng vai 180°, sức cơ Delta $\geq$ M4); tốt (giạng vai $\geq$ 60°, sức cơ Delta M4); trung bình (giạng vai đến 60°, sức cơ Delta M3); kém (sức cơ Delta M0, M1, M2).

Đánh giá kết quả phục hồi xoay ngoài khớp vai: rất tốt (xoay ngoài 120°, sức cơ $\geq$ M4); tốt (xoay ngoài từ $\geq$ 90-120°, sức cơ M4); trung bình (xoay ngoài từ $\geq$ 30-90°, sức cơ M3, duy trì cẳng tay ở tư thế nằm ngang $\geq$ 10 giây); kém (xoay ngoài <30°, sức cơ M0, M1, M2, không duy trì được cẳng tay nằm ngang $\geq$ 10 giây).

Đánh giá di chứng nơi cho TK bằng cách: đo lực duỗi khuỷu, lực nâng vai, lực nắm bàn tay, lực kẹp ngón tay, đo cảm giác (sử dụng test phân biệt 2 điểm tại vị trí mặt gan đốt 3 ngón II, V), đánh giá chức năng đối chiếu ngón cái, giạng khớp các ngón ở các thời điểm trước mổ, ngay sau mổ và mỗi 3 tháng sau mổ cho đến thời điểm cuối.

Kết quả

Đặc điểm đối tượng

- Số lượng: 30 BN (29 nam, 1 nữ), tuổi từ 15 đến 56, trung bình là 31,6 ($\pm$ 9,8).

- Nguyên nhân chấn thương: tai nạn xe máy là 30/30 BN.

- Thời gian từ khi chấn thương đến khi phẫu thuật: 3 tuần

đến 12 tháng, trung bình là 3,9 ($\pm 2,5$) tháng.

- Mức độ tổn thương: 17 BN nhỏ rỗ TK C5, C6; 13 BN nhỏ rỗ TK C5, C6, C7.

- Thời gian theo dõi sau mổ từ 24 đến 40 tháng, trung bình là 31,8 ($\pm 5,2$) tháng.

Phục hồi gấp khuỷu

Bảng 1. Kết quả phục hồi sức cơ gấp khuỷu.

Thời gian Sức cơ	3 tháng	6 tháng	9 tháng	12 tháng	18 tháng	≥ 24 tháng
M0	7	0	0	0	0	0
M1	15	0	0	0	0	0
M2	4	0	0	0	0	0
M3	3	7	1	0	0	0
M4	1	23	29	30	30	30
M5	0	0	0	0	0	0
n	30	30	30	30	30	30

Kết quả bảng 1 cho thấy, 23/30 BN (76,7%) có dấu hiệu phục hồi gấp khuỷu ở thời điểm 3 tháng sau mổ. Đến thời điểm 6 tháng, 100% phục hồi từ M3 trở lên. Đến thời điểm 12 tháng, 100% phục hồi từ M4 trở lên. Gấp khuỷu trung bình là 138,2 ($\pm 4,6$)°. Nâng tạ trung bình là 11,0 ($\pm 3,1$) kg.

Phân loại kết quả phục hồi gấp khuỷu: i) Loại rất tốt: 24 BN, chiếm 80%; ii) Loại tốt: 6 BN, chiếm 20%; iii) Loại trung bình và kém: 0.

Phục hồi giạng vai

Bảng 2. Kết quả phục hồi sức cơ Delta.

Thời gian Sức cơ Delta	3 tháng	6 tháng	9 tháng	12 tháng	18 tháng	≥ 24 tháng
M0	28	16	5	1	1	0
M1	2	12	9	4	1	0
M2	0	2	6	5	4	4
M3	0	0	8	9	6	1
M4	0	0	2	11	18	25
M5	0	0	0	0	0	0
n	30	30	30	30	30	30

Kết quả bảng 2 cho thấy, ở thời điểm 3 tháng sau mổ, gần như chưa có sự phục hồi. 6 tháng thì bắt đầu có sự phục hồi ở 14 BN (46,7%). 9 tháng mới có sự phục hồi giạng vai rõ rệt với 25 BN (83,3%), trong đó có 10 BN phục hồi với sức cơ M3, M4. Đến thời điểm 12 tháng, số BN phục hồi là 29 BN (96,7%) và đồng thời tăng dần về sức mạnh của cơ Delta với 20 BN đạt M3, M4. Sau mổ trên 24 tháng, số BN phục hồi là hoàn toàn, trong đó 25 BN (83,3%) đạt sức cơ M4.

Giạng vai trung bình là 129,7 ($\pm 57,9$)°. Phân loại kết quả phục hồi giạng vai như sau: i) Loại rất tốt: 15 BN, chiếm 50%; ii) Loại tốt: 10 BN, chiếm 33,4%; iii) Loại trung bình: 1 BN, chiếm 3,3%; iv) Loại kém: 4 BN, chiếm 13,3%.

Phục hồi xoay ngoài khớp vai

Bảng 3. Kết quả phục hồi sức cơ xoay ngoài khớp vai.

Thời gian Sức cơ	3 tháng	6 tháng	9 tháng	12 tháng	18 tháng	≥ 24 tháng
M0	25	13	4	1	1	0
M1	5	10	8	4	1	0
M2	0	5	3	3	1	3
M3	0	2	13	9	6	0
M4	0	0	2	13	21	27
M5	0	0	0	0	0	0
n	30	30	30	30	30	30

Kết quả bảng 3 cho thấy, ở thời điểm 3 tháng sau mổ, gần như chưa có sự phục hồi. 6 tháng thì bắt đầu có sự phục hồi ở 17 BN (56,7%). 9 tháng mới có sự phục hồi giạng vai rõ rệt với 26 BN (86,7%), trong đó có 15 BN phục hồi với sức cơ M3, M4. Đến thời điểm 12 tháng, số BN phục hồi là 29 BN (96,7%) và đồng thời tăng dần về sức mạnh của cơ trên gai, dưới gai với 22 BN đạt M3, M4. Sau mổ trên 24 tháng, số BN phục hồi là hoàn toàn, trong đó 27 BN (90%) đạt sức cơ M4.

Xoay ngoài khớp vai trung bình là 108,0 ($\pm 28,6$)°. Phân loại kết quả phục hồi xoay ngoài khớp vai như sau: i) Loại rất tốt: 23 BN, chiếm 76,7%; ii) Loại tốt: 4 BN, chiếm 13,3%; iii) Loại trung bình: 0%; iv) Loại kém: 3 BN, chiếm 10,0%.

Mức độ ảnh hưởng nơi TK cho

Bảng 4. Thay đổi sức cơ và cảm giác nơi TK cho.

TG	Trước mổ	Ngày sau mổ	3 tháng	6 tháng	9 tháng	12 tháng	18 tháng	≥ 24 tháng
SC, CG								
Grip	14,5 $\pm$ 7,2	8,6 $\pm$ 5,2	14,3 $\pm$ 6,1	17,1 $\pm$ 6,4	19,1 $\pm$ 6,4	20,5 $\pm$ 6,3	21,7 $\pm$ 6,7	23,7 $\pm$ 7,1
Pinch	4,6 $\pm$ 1,8	2,7 $\pm$ 1,5	4,2 $\pm$ 1,4	5,0 $\pm$ 1,5	5,5 $\pm$ 1,5	5,9 $\pm$ 1,5	6,2 $\pm$ 1,4	6,5 $\pm$ 1,4
Duỗi khuỷu	5,9 $\pm$ 3,1	3,1 $\pm$ 2,0	4,5 $\pm$ 2,4	5,8 $\pm$ 2,8	6,9 $\pm$ 2,8	7,4 $\pm$ 3,1	7,6 $\pm$ 3,4	8,8 $\pm$ 3,6
Nâng vai	34,0 $\pm$ 5,9	22,4 $\pm$ 4,6	30,9 $\pm$ 4,7	33,9 $\pm$ 4,0	36,3 $\pm$ 4,5	36,5 $\pm$ 4,6	37,6 $\pm$ 4,4	37,6 $\pm$ 5,2
2PD test ngón II	6,6 $\pm$ 3,4	9,0 $\pm$ 3,7	7,6 $\pm$ 3,7	7,1 $\pm$ 3,5	6,8 $\pm$ 3,2	6,5 $\pm$ 3,1	6,1 $\pm$ 2,9	5,6 $\pm$ 2,4
2PD test ngón V	5,6 $\pm$ 1,0	7,6 $\pm$ 2,1	6,4 $\pm$ 2,2	6,2 $\pm$ 2,1	6,0 $\pm$ 1,7	5,7 $\pm$ 1,3	5,5 $\pm$ 1,0	5,3 $\pm$ 1,1

Ghi chú: TG là thời gian; SC là sức cơ; CG là cảm giác; Grip là lực nắm bàn tay; Pinch là lực kẹp ngón tay; 2PD test là test phân biệt cảm giác 2 điểm.

Kết quả bảng 4 cho thấy, thay đổi của các giá trị trung bình sức cơ, cảm giác từ thời điểm trước mổ đến các thời điểm sau mổ gần như diễn biến theo quy luật chung, đó là giảm ở thời điểm ngay sau mổ, dần phục hồi trở lại ở các thời điểm sau mổ khác nhau và tiếp tục tăng lên theo thời gian cho đến thời điểm theo dõi cuối cùng. Lực nắm bàn tay phục hồi trở lại gần với mức trước mổ ở thời điểm 3 tháng

sau mổ. Sớm nhất trong các chỉ số. Lực kẹp ngón tay phục hồi trở lại với mức trước mổ ở thời điểm trong khoảng thời gian từ 3 đến 6 tháng sau mổ. Lực duỗi khuỷu, lực nâng vai cùng phục hồi trở lại với mức trước mổ ở thời điểm 6 tháng sau mổ. Cảm giác ở đầu ngón II, V giảm ngay sau mổ và cũng trở lại với mức trước mổ ở thời điểm 12 tháng sau mổ.

Kết quả điều trị được thể hiện ở hình 1.



Hình 1. BN 29 T, bị nhổ rể TK C5, C6 bên trái do tai nạn xe máy tháng thứ 10. BN được phẫu thuật chuyển TK kép, chuyển TK đầu dài cơ tam đầu - nhánh trước TK mũ, TK XI - TK trên vai ngày 29/4/2016. Kết quả sau mổ 26 tháng: gấp khuỷu 11 kg, giang vai 180° , xoay ngoài khớp vai 120° .

Bàn luận

Nguyên nhân của tổn thương ĐRCT phần lớn là do tai nạn xe máy [1, 2, 8], do đó, tổn thương này hay gặp ở các nước đang phát triển, có mật độ xe máy tham gia giao thông cao như Thái Lan, Ấn Độ, Việt Nam... Đối tượng bị tai nạn phần lớn là nam thanh niên, trong báo cáo này 29/30 BN là nam, tuổi trung bình là 31,6, tất cả đều do tai nạn xe máy gây ra. Tổn thương nhổ rể TK thì không thể nối hoặc ghép lại được. Do vậy, các tác giả trên thế giới đều thống nhất phẫu thuật chuyển TK để điều trị tổn thương này nếu BN đến trước 12 tháng [8, 9]. Trong phẫu thuật chuyển TK, nếu nối trực tiếp và chuyển chọn lọc TK thì kết quả đạt được sẽ là cao nhất [4, 5]. Các BN trong nghiên cứu này đều đạt được cả 2 tiêu chí trên.

Kết quả phục hồi gấp khuỷu trong nghiên cứu của chúng tôi (xem bảng 1): sau mổ 3 tháng, có dấu hiệu phục hồi gấp khuỷu là 76,7%. Sau mổ 6 tháng, 100% số BN phục hồi gấp khuỷu đạt từ M3 trở lên, trong đó 76,7% đạt sức cơ M4. Đến thời điểm sau mổ 12 tháng, 100% phục hồi mức từ M4 trở lên. Sau thời gian theo dõi trung bình là 31,8 tháng, trung bình nâng được 11,0 kg (khỏe nhất là 17 kg). Theo Leechavengvongs, với phương pháp Orberlin I, đạt M3 là 7 tháng, 13/15 đạt M4 sau mổ 17 tháng và trung bình nâng được 2,6 kg. Báo cáo của Bhandari và cs [8] cho thấy, với phương pháp Oberlin II, đạt M3 là 6,5 tháng. Các báo cáo sử dụng chuyển TK ngoài đám rối, thời gian đạt M3 kéo dài rõ rệt từ 10 đến 17 tháng, sức gấp khuỷu đạt M4 là 70%. Có 3 nguyên nhân làm cho phương pháp chuyển TK kép (Oberlin II) đạt được kết quả phục hồi gấp khuỷu sớm và khỏe hơn so với phương pháp khác như Oberlin I, chuyển TK ngoài

đám rối là: i) Khoảng cách từ vị trí mỗi nối TK đến cơ đích ngắn, nối trực tiếp; ii) Lựa chọn được những bó sợi TK vận động làm nguồn cho và được nối chọn lọc vào bó vận động của cơ đích; iii) Chuyển TK cho cả 2 cơ ở khu trước cánh tay là cơ nhị đầu và cơ cánh tay, do vậy sức gấp khuỷu thu được lớn hơn so với phương pháp Orberlin I.

Về phục hồi giang và xoay ngoài khớp vai trong nghiên cứu này, chúng tôi thấy có sự khá tương đồng về thời gian và mức độ phục hồi đối với cơ Delta và nhóm cơ trên gai, dưới gai (bảng 2 và 3): tại thời điểm 3 tháng sau mổ, gần như chưa có sự phục hồi. Đến thời điểm 6 tháng sau mổ, cơ Delta đạt mức M1, M2 là 14/30 BN (46,7%), cơ trên gai, cơ dưới gai đạt mức M1, M2, M3 là 17/30 BN (56,7%). Đến thời điểm 9 tháng sau mổ, số BN phục hồi là 25/30 BN đối với cơ Delta và 26/30 BN đối với cơ trên gai, dưới gai và bắt đầu xuất hiện một số BN phục hồi sức cơ ở mức M4. Đến thời điểm sau mổ 12 tháng, số BN phục hồi gần như hoàn toàn là 29/30 BN (96,7%), trong đó số BN đạt sức cơ M3, M4 là 20/30 BN đối với cơ Delta và 22/30 BN đối với cơ trên gai, cơ dưới gai. Sức cơ này khỏe dần lên theo thời gian và phải đến thời điểm trên 24 tháng sau mổ sự phục hồi là 100%, trong đó sức cơ đạt M4 là 25/30 BN (83,3%) đối với cơ Delta và 27/30 BN (90%) đối với cơ trên gai, dưới gai. Chúng tôi chưa lý giải được vì sao thời gian phục hồi của cơ Delta, cơ trên gai, dưới gai lại dài hơn so với thời gian phục hồi gấp khuỷu (đạt 100% sức cơ $\geq M3$ ở thời điểm sau mổ 6 tháng), mặc dù khoảng cách từ vị trí mỗi nối TK đến cơ đích không khác biệt nhiều, cũng được chuyển nối trực tiếp và chọn lọc. Tham khảo y văn trong các báo cáo [9, 10], chúng tôi cũng chưa thấy tác giả nào đề cập và giải thích vấn đề này. Có lẽ TK cơ bì có khả năng phục hồi tốt hơn so với TK mũ, TK trên vai giống như TK quay phục hồi tốt hơn so với TK giữa và TK trụ sau khi được nối. Biên độ phục hồi giang vai trung bình là $129,7^\circ$, trong đó có 50% giang vai đạt tối đa 180° . Biên độ phục hồi xoay ngoài khớp vai trung bình là $108,0^\circ$, trong đó có 23/30 BN (76,7%) đạt mức xoay ngoài tối đa 120° . Phục hồi giang vai ở mức kém là 4/30 BN (13,3%) và 3/30 BN (10%) phục hồi xoay ngoài ở mức kém. Chúng tôi nhận thấy rằng, *thứ nhất* là phục hồi xoay ngoài khớp vai thường đi đôi với phục hồi giang vai, những BN phục hồi giang vai tốt thì xoay ngoài khớp vai cũng tốt và ngược lại vì 2 động tác này là đồng vận và có mối quan hệ tương hỗ với nhau; *thứ hai* những BN đạt kết quả rất tốt và tốt hầu hết là những trường hợp trẻ tuổi, có sức nâng vai và duỗi khuỷu khỏe, được phẫu thuật sớm; còn những BN phục hồi kém lại rơi vào những trường hợp trên 45 tuổi và có điểm chung là sức duỗi khuỷu và nâng vai ở thời điểm trước mổ yếu, thời điểm phẫu thuật muộn hơn. Trong báo cáo của Bhandari và cs [8], gồm 23 BN, thời gian phục hồi giang vai đạt M3 từ 7 đến 20 tháng. Tuy nhiên, sau theo dõi 32 tháng, tỷ lệ giang vai trung bình đạt 123° . Theo Leechavengvongs và cs [6], phục hồi cơ Delta M2 trong thời gian từ 6 đến 9 tháng và ở thời điểm theo dõi cuối cùng 13/15 BN đạt M4, giang vai trung bình là 115° . Như vậy, kết quả nghiên cứu

của chúng tôi cũng tương đồng với hai tác giả trên.

Một trong những vấn đề đáng quan tâm là di chứng vận động và cảm giác của bàn tay sau khi cắt một vài bó sợi của TK giữa, TK trụ. Về mặt cảm giác, chúng tôi nhận thấy tất cả 30 BN đều có rối loạn, giảm cảm giác, thể hiện ở khả năng phân biệt 2 điểm giảm ở thời điểm ngay sau mổ, nhưng thật may mắn là không gặp trường hợp nào có tổn thương bông buốt. Tuy nhiên, các tổn thương về cảm giác này thường giảm dần và trở lại trạng thái như thời điểm trước mổ sau 12 tháng (bảng 4, hàng 6, 7). Và điều đặc biệt là ở giai đoạn tiếp theo, cảm giác vùng bàn ngón tay lại có chiều hướng cải thiện hơn, cho đến thời điểm theo dõi cuối cùng khoảng cách phân biệt 2 điểm còn thu hẹp hơn so với thời điểm trước mổ. Tương tự như vậy, khi đánh giá về vận động, kết quả theo dõi sức nắm bàn tay, sức kẹp ngón tay qua các thời điểm cho thấy sự giảm, phục hồi và cải thiện theo 3 pha. Pha đầu ở những tuần đầu sau mổ, sức nắm bàn tay yếu hơn so với trước; pha thứ hai (khoảng từ tháng thứ 3 trở đi), sức nắm bàn tay trở lại thời điểm trước mổ và cải thiện rất ít cho đến khi có sự phục hồi gấp khuỷu; pha thứ 3 (khi có sự phục hồi gấp khuỷu M4), sức nắm bàn tay cải thiện rõ và tăng hơn so với thời điểm trước mổ (bảng 4, hàng 2 và 3). Nghiên cứu của các tác giả [1, 2, 8, 10] cũng cho thấy chiều hướng thay đổi tương tự.

Hiện tượng giảm về cảm giác và vận động ngay sau mổ là rất hợp logic bởi việc cắt đi một phần TK trụ, TK giữa và sang chấn TK trong quá trình phẫu tích riêng rẽ từng bó sợi TK. Hiện tượng tăng dần sức nắm bàn tay, sức kẹp ngón tay và cảm giác ở vùng bàn ngón tay trở về như thời điểm trước mổ và điều đặc biệt là lại tăng hơn ở thời điểm theo dõi cuối cùng (trên 24 tháng), theo chúng tôi có 2 lý do: thứ nhất là khi phục hồi động tác gấp khuỷu BN sẽ sử dụng tay này trong lao động, sinh hoạt hàng ngày nên sức của bàn ngón tay dần được cải thiện và ngày càng tăng lên; thứ hai là TK giữa, TK trụ bị tổn thương một phần do tai nạn xe máy, do sang chấn trong mổ (phẫu tích, tách các bó sợi TK trong khi tìm sợi vận động), do vậy càng về sau TK giữa, TK trụ càng tự phục hồi khỏe dần lên và trở về gần như bình thường.

Theo dõi sức nâng vai, duỗi khuỷu tại thời điểm trước và sau mổ, chúng tôi thấy: tại thời điểm ngay sau mổ, sức cơ này yếu, giảm rõ rệt ở tất cả 30 BN. Tuy nhiên, sau mổ 6 tháng, chúng đã trở lại như thời điểm trước mổ và thậm chí còn tăng dần lên cho tới thời điểm trên 24 tháng (bảng 4, hàng 4 và 5). Các tác giả Leechavengvongs và cs [6], Bhandari và cs [8], Ren và cs [9], Kostas Agnantis và cs [10] đều khẳng định không để lại di chứng sau khi lấy đi TK đầu dài cơ tam đầu và TK XI. Mặc dù TK XI đã bị cắt để chuyển cho TK trên vai nhưng cơ thang vẫn không bị mất đi chức năng vì có sự bù trừ từ các nhánh TK vận động của đám rối cổ, của các rễ TK ngực. Cơ tam đầu chỉ bị cắt TK của đầu dài nên sức cơ được bù trừ bởi đầu ngoài và đầu trong do vậy cũng ít để lại ảnh hưởng.

Kết luận

Chuyển TK kép phục hồi gấp khuỷu 100% đạt mức M3 ở thời điểm 6 tháng, M4 ở thời điểm 12 tháng sau mổ. Gấp khuỷu trung bình là 11,0 kg. Kết quả rất tốt là 80%; tốt là 20%. Chuyển TK theo Leechavengvongs phục hồi giạng và xoay ngoài khớp vai ở thời điểm 24 tháng sau mổ đạt mức M4 là 83,3% đối với cơ Delta và 90% đối với cơ trên gai, dưới gai. Giạng vai trung bình là 129,7°. Xoay ngoài khớp vai trung bình là 108,0°.

Ảnh hưởng nơi TK cho: 100% BN giảm vận động, cảm giác bàn ngón tay và sức nâng vai, duỗi khuỷu ở thời điểm ngay sau mổ. Trở về như trước mổ ở thời điểm từ 3 đến 12 tháng sau mổ. 100% BN tăng về vận động và cảm giác nơi TK cho so với thời điểm trước mổ ở thời điểm theo dõi cuối cùng trên 24 tháng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Nguyễn Văn Phú, Lê Văn Đoàn, Nguyễn Việt Nam và cs (2017), “Đánh giá kết quả điều trị liệt cao đám rối cánh tay bằng phẫu thuật chuyển thần kinh”, *Tạp chí Chấn thương Chính hình Việt Nam*, **Số đặc biệt**, tr.411-416.
- [2] Lê Văn Đoàn, Chế Đình Nghĩa, Nguyễn Viết Ngọc và cs (2012), “Kết quả bước đầu chuyển thần kinh kép phục hồi gấp khuỷu điều trị liệt các thân trên đám rối thần kinh cánh tay”, *Tạp chí Chấn thương Chính hình Việt Nam*, **Số đặc biệt**, tr.295-302.
- [3] Nguyễn Văn Phú, Trương Anh Dũng, Vũ Hữu Trung và cs (2014), “Kết quả bước đầu chuyển thần kinh để phục hồi giạng và xoay ngoài khớp vai trong điều trị nhỏ, đứt sát lỗ ghép các rễ trên của đám rối cánh tay”, *Tạp chí Y dược lâm sàng 108*, **Tập 9, Số đặc biệt**, tr.118-123.
- [4] C. Oberlin, et al. (1994), “Nerve transfer to biceps muscle using a part of ulnar nerve for C5-C6 avulsion of the brachial plexus: Anatomical study and report of four cases”, *J. Hand Surg.*, **19A**, pp.232-237.
- [5] E.S. Mackinnon, et al. (2005), “Results of reinnervation of the biceps and brachialis muscles with a double fascicular transfer for elbow flexion”, *J. Hand Surg.*, **30A**, pp.978-985.
- [6] S. Leechavengvongs, et al. (2003), “Nerve transfer to deltoid muscles using the nerve to the long head of triceps, part II: A report of 7 cases”, *J. Hand Surg.*, **28A**, pp.633-638.
- [7] P.A. Livernaux, et al. (2006), “Preliminary Results of Double Nerve Transfer to Restore Elbow Flexion in Upper Type Brachial Plexus Palsies”, *Plast. Reconstr. Surg.*, **117**, pp.915-919.
- [8] P.S. Bhandari, P. Deb (2013), “Posterior approach for both spinal accessory nerve to suprascapular nerve and triceps branch to axillary nerve for upper plexus injuries”, *J. Hand Surg.*, **38A**, pp.168-172.
- [9] G.H. Ren, et al. (2013), “Reconstruction of shoulder abduction by multiple nerve fascicle transfer through posterior approach”, *Injury. Int. J. Care Injured*, **44**, pp.492-497.
- [10] I. Kostas Agnantis, et al. (2013), “Shoulder abduction and external rotation restoration with nerve transfer”, *Injury Int. J. Care Injured*, **44**, pp.299-304.

Ứng dụng kỹ thuật PCR tổ định loài giun móc *Ancylostoma* spp. và giun mỏ *Necator americanus* ở người nhiễm bệnh

Luu Thanh Liêm¹, Lê Quốc Hùng², Lê Đức Vinh³, Nguyễn Kim Thạch^{3*}, Phan Văn Trọng⁴

¹Bệnh viện Bệnh nhiệt đới TP Hồ Chí Minh

²Bệnh viện Chấn thương chỉnh hình TP Hồ Chí Minh

³Trường Đại học Y khoa Phạm Ngọc Thạch

⁴Trường Đại học Tây Nguyên

Ngày nhận bài 3/5/2019; ngày chuyển phản biện 6/5/2019; ngày nhận phản biện 6/6/2019; ngày chấp nhận đăng 20/6/2019

Tóm tắt:

Trong nghiên cứu này, nhóm tác giả đã ứng dụng kỹ thuật PCR tổ (nested PCR) để xác định giun móc *Ancylostoma* spp. và giun mỏ *Necator americanus* trong phân người nhiễm bệnh ở cộng đồng dân cư xã Đức Lập Thượng, huyện Đức Hoà, tỉnh Long An. 80 mẫu ADN tách chiết từ 80 mẫu ấu trùng giun từ phân người bệnh được phân lập bằng phương pháp Sasa đã cho kết quả dương tính. Kết quả PCR tổ đặc hiệu vùng gen 28S rRNA-ITS2 thu được tỷ lệ nhiễm *Necator americanus* có 66 mẫu (82,5%), *Ancylostoma* spp. có 5 mẫu (6,25%) và đồng nhiễm cả 2 loài có 9 mẫu (11,25%). Từ kết quả nghiên cứu cho thấy, kỹ thuật này là một công cụ bổ sung có giá trị trong chẩn đoán và kiểm soát nhiễm bệnh ký sinh trùng ở các tỉnh/thành phố của Việt Nam.

Từ khóa: *Ancylostoma* spp., ấu trùng, *Necator americanus*, PCR tổ, phân người, phương pháp Sasa.

Chỉ số phân loại: 3.3

Đặt vấn đề

Hiện nay, tỷ lệ nhiễm giun móc và giun mỏ ở người vẫn ở mức cao, trong khi tỷ lệ nhiễm các loài giun khác có chiều hướng giảm. Tại Việt Nam, loài giun móc gây bệnh ở người có tên là *Ancylostoma duodenal* chiếm tỷ lệ thấp, còn loài giun mỏ *Necator americanus* gây bệnh chiếm tỷ lệ cao hơn. Do chu kỳ phát triển, cách thức gây bệnh và kỹ thuật chẩn đoán giống nhau nên 2 loài giun này thường được ghép chung với nhau bằng danh từ giun móc/mỏ [1-3].

Trong chẩn đoán thường dựa vào hình thể trứng và ấu trùng của 2 loài giun từ bệnh phẩm. Chúng chỉ có vài điểm khác biệt nhỏ nên rất khó định danh. Do vậy, việc chẩn đoán hiện nay mới chỉ dừng lại ở chẩn đoán chung chung và chưa có định loài. Với sự phát triển của kỹ thuật sinh học phân tử, kỹ thuật PCR tổ đã giúp việc chẩn đoán định loài có cơ sở khoa học chính xác và toàn diện hơn. Điểm hạn chế của kỹ thuật này là giá thành còn cao. Ngoài ra, kỹ thuật này có nhiều triển vọng trong xác định tỷ lệ nhiễm các loài giun móc *Ancylostoma ceylanicum* và *Ancylostoma duodenalis* gây bệnh ở người Việt Nam [3-5].

Với ý nghĩa đó, ở nghiên cứu này kỹ thuật PCR tổ được

sử dụng nhân lượng vùng gen 28S rRNA-ITS2 định loài *Ancylostoma* spp. và *Necator americanus* gây bệnh ở cộng đồng dân cư xã Đức Lập Thượng, huyện Đức Hoà, tỉnh Long An, là địa phương có tỷ lệ nhiễm các loài giun nêu trên tương đối cao.

Phương pháp nghiên cứu

Đối tượng và thời gian nghiên cứu

Ấu trùng giun móc/mỏ được thu thập từ 80 mẫu xét nghiệm phân từ tháng 12/2017 đến tháng 12/2018. Nghiên cứu được thực hiện tại Phòng thí nghiệm, Bộ môn Ký sinh y học, Trường Đại học Y khoa Phạm Ngọc Thạch.

Thiết kế nghiên cứu: thực nghiệm phòng thí nghiệm.

Mẫu bệnh phẩm: thu thập 80 mẫu phân của người dân đồng ý tham gia và cư ngụ tại xã Đức Lập Thượng, huyện Đức Hoà, tỉnh Long An.

Các kỹ thuật xét nghiệm

Xác định hình thể ấu trùng và trứng của giun móc hoặc giun mỏ bằng soi trực tiếp dưới kính hiển vi: 80 mẫu phân được cấy bằng phương pháp Sasa thu thập được 80 mẫu

*Tác giả liên hệ: nguyengkimthach@pnt.edu.vn

Application of nested PCR to detect *Ancylostoma* spp. and *Necator americanus* infections in human

Thanh Liem Luu¹, Quoc Hùng Le², Duc Vinh Le³,
Kim Thach Nguyen^{3*}, Van Trong Phan⁴

¹Hospital for Tropical Diseases, Ho Chi Minh city

²Hospital for Traumatology and Orthopaedics, Ho Chi Minh city

³Pham Ngoc Thach University of Medicine

⁴Tay Nguyen University

Received 3 May 2019; accepted 20 June 2019

Abstract:

In the present study, a nested PCR based approach was applied for the specific detection of *Necator americanus* and *Ancylostoma* spp. in human faeces in Duc Lap Thuong commune, Duc Hoa district, Long An province. A total of 80 DNA larva samples were extracted from 80 positive human faecal samples using the Sasa method. The results of the nested PCR based method amplifying a fragment of the 28S rRNA-ITS2 region exhibited that, the infection with *Necator americanus* was found in 66 (82.5%) samples, the infection with *Ancylostoma* spp. was found in 5 (6.25%) samples, and 9 (11.25%) samples represented the co-infection with both species. The results showed that the present PCR approach is a valuable complementary tool for the diagnosis of *Necator americanus* and *Ancylostoma* spp. infections in human and for monitoring the parasitic infection control programs in Vietnamese provinces and cities.

Keywords: *Ancylostoma* spp., human faeces, larva, *Necator americanus*, nested PCR, Sasa method.

Classification number: 3.3

ấu trùng giai đoạn I, II và soi trực tiếp dưới kính hiển vi để xác định mẫu dương tính khi tìm thấy trứng giun móc hoặc trứng giun mỏ [1]. Phương pháp Sasa (*Harada mori* cải tiến): 10 g phân cấy sau 3 ngày sẽ thu thập được ấu trùng giun. Ly tâm với tốc độ 3.000 vòng/phút trong 5 phút. Lấy cặn lắng soi dưới kính hiển vi tìm ấu trùng giai đoạn I, II của giun móc hoặc giun mỏ. Cố định ấu trùng giun bằng dung dịch cồn 70°.

Tách chiết ADN khuôn mẫu: tách chiết ADN của 10 ấu trùng giun bằng kit tách chiết và kỹ thuật PCR của Hãng Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Đức. ADN thu được sau tách chiết được lưu trữ ở -20°C. ADN được sử dụng làm khuôn tổng hợp cho kỹ thuật PCR tổ gồm 2 bước [3]:

- Bước 1: PCR nhân lượng đoạn ADN đích có kích thước bằng mỗi NC1 F và mỗi NC2 R đặc hiệu cho *Ancylostoma* spp. và *Necator americanus* của vùng trình tự gen 28S rRNA-ITS2 (bảng 1). Thành phần phản ứng PCR trong thể tích 20 µl chứa 4 µl đệm Taq (10X), 4,8 µl MgCl₂ (25 mM), 1,5 µl mỗi loại dNTP's (10 mM), 0,5 µl mỗi loại mỗi đặc hiệu, 0,2 µl enzyme Taq polymerase (5 U/µl), 4 µl ADN mẫu pha loãng (20 ng). Bổ sung nước khử ion tới thể tích 20 µl theo hướng dẫn của Hãng Promega, Mỹ.

Phản ứng được thực hiện theo chu kỳ nhiệt như sau: bước 1 (94°C, 3 phút); bước 2 (94°C, 30 giây); bước 3 (55°C, 30 giây); bước 4 (72°C, 30 giây); bước 5 (72°C, 7 phút). Từ bước 2 đến bước 4 lặp lại 30 chu kỳ và bước 6 ở điều kiện 4°C, bảo quản mẫu [3, 6, 7]. Sản phẩm PCR được điện di trên thạch agarose 1,5%, nhuộm bản thạch trong dung dịch Ethidium bromide. Chỉ dùng các sản phẩm PCR nhân lượng thành công ở bước 1 để thực hiện PCR nhân lượng bước 2.

- Bước 2: PCR nhân lượng đoạn ADN đích có kích thước bằng mỗi NA F, mỗi AD1 F và mỗi NC2 R đặc hiệu cho *Ancylostoma* spp. và *Necator americanus* của vùng trình tự gen 28S rRNA-ITS2 (bảng 1). Thành phần phản ứng PCR trong thể tích 50 µl chứa 8 µl đệm Taq (10X), 5,6 µl MgCl₂ (25 mM), 1,5 µl mỗi loại dNTP's (10 mM), 0,5 µl mỗi loại mỗi đặc hiệu, 0,2 µl enzyme Taq polymerase (5 U/µl), 2 µl sản phẩm PCR nhân lượng bước 1. Bổ sung nước khử ion tới thể tích 50 µl theo hướng dẫn của Hãng Promega, Mỹ.

Phản ứng được thực hiện theo chu kỳ nhiệt như sau: bước 1 (94°C, 5 phút); bước 2 (94°C, 1 phút); bước 3 (55°C, 1 phút); bước 4 (72°C, 1 phút); bước 5 (72°C, 7 phút). Từ bước 2 đến bước 4 lặp lại 35 chu kỳ và bước 6 ở điều kiện 4°C, bảo quản mẫu [3, 6, 7]. Sản phẩm PCR được điện di trên thạch agarose 1,5%, nhuộm bản thạch trong dung dịch Ethidium bromide.

Bảng 1. Các đoạn môi vùng trình tự gen 28S rRNA-ITS2.

Tên môi	Trình tự môi	PCR nhân lượng đoạn ADN	Tài liệu tham khảo
NC1 F	5'-ACG TCT GGT TCA GGG TTC TT-3'	<i>Ancylostoma</i> spp.: 310 bp	Gasser và cs [8]; Ngui và cs [9]
NC2 R	5'-TTA GTT TCT TTT CCT CCG CT-3'	<i>Necator americanus</i> : 420 bp	
NA F	5'-ATG TGC ACG TTA TTC ACT-3'	<i>Necator americanus</i> : 250 bp	Verweij và cs [10]
AD1 F	5'-CGA CTT TAG AAC GTT TCG GC-3'	<i>Ancylostoma</i> spp.: 130 bp	De Gruijter và cs [5]
NC2 R	5'-TTA GTT TCT TTT CCT CCG CT-3'		

Phân tích và xử lý số liệu: số liệu được nhập vào phần mềm Excel V16.0.

Kết quả nghiên cứu

Hình thể ấu trùng, trứng của loài giun móc và giun mỡ

Trong nghiên cứu xác định được 80 bệnh nhân nhiễm giun móc hoặc giun mỡ bằng cả 2 kỹ thuật nuôi cấy Sasa tìm ấu trùng giun và kỹ thuật soi trực tiếp tìm trứng giun. 80 mẫu ấu trùng dài 0,2-0,5 mm, màu trắng ánh vàng, có xoang miệng dài, mở và đuôi nhọn. Rất khó phân biệt ấu trùng giữa *Ancylostoma* spp. và *Necator americanus* (hình 1A và 1B).



Hình 1A. Ấu trùng giai đoạn I của giun móc hoặc giun mỡ. **Hình 1B.** Ấu trùng giai đoạn II của giun móc hoặc giun mỡ.

80 mẫu trứng của 2 loài *Ancylostoma* spp. và *Necator americanus* rất giống nhau. Có hình bầu dục, vỏ mỏng, màu xám đen. Kích thước 60x40 µm và có 4-8 phôi bào (hình 2).

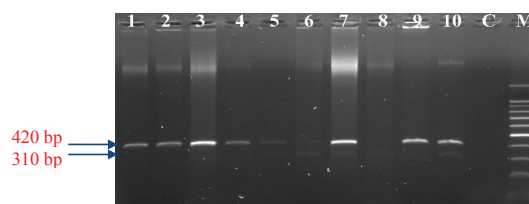


Hình 2. Trứng của giun móc hoặc giun mỡ.

Kết quả PCR tổ định loài *Ancylostoma* spp. và *Necator americanus* đặc hiệu vùng trình tự gen 28S rRNA-ITS2

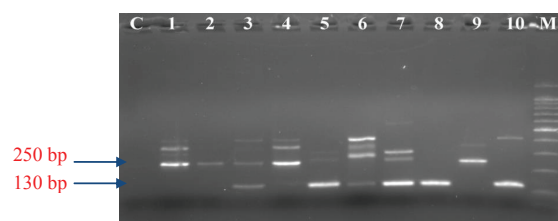
ADN tách chiết từ 80 mẫu ấu trùng được sử dụng làm khuôn tổng hợp trong PCR tổ 2 bước đặc hiệu *Ancylostoma* spp. và *Necator americanus* vùng trình tự gen 28S rRNA-ITS2.

Ở PCR bước 1, bộ môi NC1-NC2 được sử dụng nhân lượng các mảnh ADN kích thước 310 bp của loài *Ancylostoma* spp. và các mảnh ADN kích thước 420 bp của loài *Necator americanus*. Sản phẩm PCR được điện di trên bản thạch agarose 1,5% (hình 3).



Hình 3. Kết quả khảo sát mức độ biểu hiện gen vùng trình tự 28S rRNA-ITS2 của PCR tổ bước 1 với 10 mẫu ADN ấu trùng *Ancylostoma* spp. và *Necator americanus* bằng điện di agarose 1,5%. M: thang DNA 100 bp, giếng 1-10: 10 mẫu ấu trùng và giếng C: chứng H₂O.

Ở PCR bước 2, sử dụng kết hợp các môi AD1 với NC2 để nhân lượng các mảnh ADN kích thước 130 bp của loài *Ancylostoma* spp. và kết hợp các môi NA với NC2 để nhân lượng các mảnh ADN kích thước 250 bp của loài *Necator americanus*. Sản phẩm PCR được điện di trên bản thạch agarose 1,5% (hình 4). Ở bước này, do tiếp tục sử dụng môi ngược NC2 nên một số mẫu có xuất hiện các mảnh ADN mờ kích thước 310 bp hoặc 420 bp còn dư thừa từ sản phẩm PCR bước 1, như tại vị trí giếng thứ 1, 3, 4, 5, 6, 7, 9 và 10 của hình 4.



Hình 4. Kết quả khảo sát mức độ biểu hiện gen vùng trình tự 28S rRNA-ITS2 của PCR tổ bước 2 với 10 mẫu ADN ấu trùng *Ancylostoma* spp. và *Necator americanus* bằng điện di agarose 1.5%. M: thang DNA 100 bp, giếng 1-10: 10 mẫu ấu trùng và giếng C: chứng H₂O.

Sau khi đối chiếu kết quả PCR tổ ở cả 2 bước, có 66 mẫu (82,5%) được xác định nhiễm *Necator americanus* như tại vị trí giếng thứ 1, 2, 4, 9 của hình 3 và hình 4; 5 mẫu (6,25%) nhiễm *Ancylostoma* spp. như tại vị trí giếng thứ 8 của hình 3 và 4; có 9 mẫu (11,25%) đồng nhiễm cả 2 loài như tại vị trí giếng thứ 3, 5, 6, 7, 10 của hình 3 và hình 4 (bảng 2).

Bảng 2. Tỷ lệ loài *Necator americanus* và *Ancylostoma* spp. được xác định bằng kỹ thuật PCR tổ.

Loài	Số lượng	Tỷ lệ%
<i>Necator americanus</i>	66	82,5
<i>Ancylostoma</i> spp.	5	6,25
<i>N. americanus</i> và <i>Ancylostoma</i> spp.	9	11,25
Tổng	80	100

Bàn luận

Nghiên cứu này đã thu được 80 mẫu phân dương tính của người dân cư ngụ tại xã Đức Lập Thượng, huyện Đức Hoà, tỉnh Long An. Khảo sát về hình thể cho thấy các ấu trùng khá đồng nhất. Tất cả ấu trùng, trứng được định danh là ấu trùng và trứng của giun móc *Ancylostoma* spp. và giun mỏ *Necator americanus*. Như vậy, dù được chẩn đoán nhiễm giun móc hoặc giun mỏ nhưng về hình thể ấu trùng vẫn còn nhiều trường hợp không thể phân loài, bởi vì trong quá trình thực hiện cấy bằng phương pháp Sasa có nhiều yếu tố ảnh hưởng như thời gian cấy, nhiễm nấm, pH... làm biến đổi, mất đi hình dạng điển hình của ấu trùng. Đây là một trong các lý do mà phần lớn các nghiên cứu trên cộng đồng hoặc thực hiện tại bệnh viện chỉ kết luận chung là nhiễm giun móc hoặc giun mỏ.

Ở bảng 2 cho thấy, 80 mẫu ADN tách chiết từ nguồn ấu trùng làm khuôn tổng hợp cho kỹ thuật PCR tổ có khả năng phát hiện giun móc và giun mỏ là 100%, tương đồng với chẩn đoán hình thể ấu trùng và trứng. Với kết quả này cho thấy, bước đầu kỹ thuật PCR tổ có khả năng định loài khá tốt. Tỷ lệ nhiễm *Necator americanus* có 66/80 mẫu (82,5%), chiếm phần lớn các ca nhiễm dương tính ở cộng đồng dân cư khảo sát. Điều này cũng chứng minh khả năng phát hiện giun mỏ *Necator americanus* của kỹ thuật trong nghiên cứu tốt hơn so với kỹ thuật chẩn đoán hình thể truyền thống của các tác giả M. Papaïakovou tại Ghana [7] và Hoàng Thúy Hằng tại Việt Nam [11]. Tỷ lệ nhiễm loài giun móc *Ancylostoma* spp. có 5/80 mẫu (6,25%) và đồng nhiễm cả 2 loài có 9/80 mẫu (11,25%).

Kỹ thuật PCR tổ với các đoạn mồi được thiết lập giúp phân biệt được 2 loài giun móc *Ancylostoma* spp. và giun mỏ *Necator americanus*. Theo các báo cáo gần đây, đã ghi nhận có sự xuất hiện nhiễm giun móc *Ancylostoma ceylanicum* ở người song song với nhiễm giun móc *Ancylostoma duodenale*. Vì lý do đó, trong nghiên cứu này chỉ ghi nhận ở mức độ loài *Ancylostoma* spp. Những sản phẩm PCR tổ của *Ancylostoma* spp. thu được sẽ được giải trình tự phân biệt 2 loài trong những nghiên cứu sắp tới.

Trong nghiên cứu này, tỷ lệ nhiễm giun mỏ *Necator americanus* cao (85%) tương đương tỷ lệ nhiễm ở châu Á trong các nghiên cứu đã công bố [3, 12]. Khi nghiên cứu nhiễm giun móc và giun mỏ ở người, thông thường đều nghĩ đến vai trò chính của *Necator americanus* mà bỏ qua vai trò gây bệnh của *Ancylostoma* spp. Tỷ lệ đồng nhiễm cả 2 loài cao (11,25%) càng cho thấy vai trò ưu việt của kỹ thuật PCR tổ [4, 7].

Kết luận

Nghiên cứu đã thực nghiệm thành công kỹ thuật chẩn đoán PCR tổ đặc hiệu vùng gen trình tự 28S rRNA-ITS2. Tỷ lệ nhiễm *Necator americanus* chiếm 82,5%, nhiễm *Ancylostoma* spp. chiếm 6,25% và đồng nhiễm cả 2 loài chiếm 11,25%. Kỹ thuật này có thể thực hiện với các ấu trùng đông lạnh -20°C hoặc lưu trữ trong ethanol.

Nghiên cứu cần mở rộng áp dụng quy trình chẩn đoán PCR tổ từ ADN tách chiết trực tiếp từ phân người, nhằm khắc phục nhược điểm về thời gian trong quá trình cấy của phương pháp Sasa. Đồng thời sử dụng các sản phẩm PCR tổ của *Ancylostoma* spp. trong nghiên cứu này để giải trình tự gen, định tỷ lệ thành phần của loài *Ancylostoma* spp. tại Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] S. Norhidayu, A.L.L. Yvonne (2015), "Hookworm infections among migrant workers in Malaysia: molecular identification of *Necator americanus* and *Ancylostoma duodenale*", *Acta Tropica*, **173**, pp.109-111.
- [2] Lê Đức Vinh và cs (2017), *Ký sinh trùng y học*, Giáo trình thực tập, Nhà xuất bản Y học, TP Hồ Chí Minh, tr.17-19, tr.55-57.
- [3] Trần Thị Hồng và cs (2017), "Bệnh do giun móc ở người", *Ký sinh trùng y học*, Nhà xuất bản Y học, TP Hồ Chí Minh, tr.141-145.
- [4] S. Brooker, J. Bethony, P.J. Hotez (2004), "Human hookworm infection in the 21st century", *Adv. Parasitol.*, **58**, pp.197-288.
- [5] J.M. De Grijter, L. van Lieshout, R.B. Gasser, J.J. Verweij, E.A. Brien, J.B. Ziem (2005), "Polymerase chain reaction-based differential diagnosis of *Ancylostoma duodenale* and *Necator americanus* infections in human in northern Ghana", *Trop. Med. Int. Health*, **10**, pp.574-580.
- [6] R.A. Lawrence, C.O. Thomas (2007), *Atlas of human parasitology*, 5th ed., pp.217-231.
- [7] M. Papaïakovou, et al. (2017), "A novel, species-specific, real-time PCR assay for the detection of the emerging zoonotic parasite *Ancylostoma ceylanicum* in human stool", *PLOS Negl. Trop. Dis.*, <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005734>.
- [8] R.B. Gasser, N.B. Chilton, H. Hoste, I. Beveridge (1993), "Rapid sequencing of rDNA from single worms and eggs of parasitic helminths", *Nucleic Acids Research*, **21**, pp.2525-2526.
- [9] R. Ngui, L.S. Ching, T.T. Kai, M.A. Roslan, Y.A.L. Lim (2012), "Molecular identification of human hookworm infections in economically disadvantaged communities in Peninsular Malaysia", *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **86**(5), pp.837-842.
- [10] J.J. Verweij, D.S. Pit, L. van Lieshout (2001), "Determining the prevalence of *Oesophagostomum bifurcum* and *Necator americanus* infections using specific PCR amplification of DNA from faecal samples", *Tropical Medicine and International Health*, **6**, pp.726-731.
- [11] Hoàng Thúy Hằng (2016), *Giá trị chẩn đoán của các kỹ thuật xét nghiệm phân trong việc xác định nhiễm giun móc ở học sinh cấp 1 huyện Củ Chi, TP Hồ Chí Minh năm 2016*, Luận văn thạc sĩ y học.
- [12] M. Papaïakovou (2018), "A comparative analysis of preservation techniques for the optimal molecular detection of hookworm DNA in a human fecal specimen", *PLOS Negl. Trop. Dis.*, <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006130>.

Xây dựng công thức gel nhũ tương dầu dừa (coconut oil) ứng dụng trong mỹ phẩm

Phạm Đình Duy*, Đoàn Duy Quốc

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

Ngày nhận bài 18/3/2019; ngày chuyển phản biện 22/3/2019; ngày nhận phản biện 3/5/2019; ngày chấp nhận đăng 10/5/2019

Tóm tắt:

Nghiên cứu này nhằm xây dựng công thức gel có cấu trúc nhũ tương (gel nhũ tương) chứa dầu dừa (coconut oil). Nghiên cứu được tiến hành theo phương pháp như sau: tỷ lệ phối hợp của từng chất nhũ hóa và trong công thức gel nhũ tương được xác định dựa trên hệ số cân bằng dầu - nước yêu cầu (Required Hydrophilic Lipophilic Balance - RHLB) của dầu dừa. Công thức gel nhũ tương được tối ưu hóa bằng phần mềm Design-Expert với 25 công thức thực nghiệm theo thiết kế IV-Optimal. Thiết kế này dựa trên các biến độc lập gồm: lượng dầu dừa, lượng Carbopol, lượng triethanolamin, lượng hỗn hợp chất nhũ hóa, lượng nước cất. Các biến phụ thuộc được khảo sát như pH, kích thước hạt trung bình, diện tích dàn mỏng, độ bền vật lý. Công thức tối ưu được kiểm chứng bằng thực nghiệm và khảo sát một số chỉ tiêu chất lượng. Kết quả cho thấy, giá trị RHLB của gel nhũ tương dầu dừa là 5,5, từ đó suy ra tỷ lệ phối hợp giữa 2 chất nhũ hóa (span 80:tween 80) là 89:11. Design-Expert đã chỉ ra công thức tối ưu có chỉ số mong muốn (desirability) cao (0,99) với tỷ lệ dầu dừa 5%, hỗn hợp chất nhũ hóa 4,5%, Carbopol 940 0,39%, triethanolamin 0,36%, lượng nước 81,59%. Kết quả thực nghiệm kiểm chứng trên công thức tối ưu cho thấy không có sự sai khác với dự đoán của phần mềm. Như vậy, công thức gel nhũ tương dầu dừa được xây dựng là ổn định, có thể tạo ra sản phẩm kem dưỡng đến công dụng dưỡng da.

Từ khóa: dầu dừa, gel nhũ tương, thiết kế thực nghiệm.

Chỉ số phân loại: 3.4

Đặt vấn đề

Dừa (*Cocos nucifera*) là một loài cây trong họ Cau, thân hình trụ, có thể cao tới 20 m. Cây dừa mọc và phát triển nhiều ở nhiều vùng nông thôn Việt Nam, xung quanh ao hồ, ruộng rạch, lạch sông. Ở nước ta có các giống dừa quý như dừa Dâu, dừa Xiêm, dừa Lửa, dừa lai Maoa [1]. Theo tổ chức FAO, Việt Nam là 1 trong 10 quốc gia có sản lượng dừa lớn nhất thế giới, trong đó Bến Tre là một trong những vùng trồng dừa nổi tiếng. Dầu dừa (coconut oil) là dầu thu được từ cùi của quả dừa [2]. Nó được sử dụng trong nhiều lĩnh vực như thực phẩm, dược phẩm, và công nghiệp. Dầu dừa cung cấp nguồn nhiệt rất ổn định, do đó nó thích hợp trong các cách nấu ăn ở nhiệt độ cao như chiên hay rán. Do tính ổn định, nên nó ít bị ôxy hóa, và do hàm lượng chất béo no cao nên có thể cất giữ lâu (đến hơn 6 tháng) trong điều kiện bảo quản thường [3].

Trong lĩnh vực làm đẹp, dầu dừa được coi là “mỹ phẩm số 1” của tự nhiên. Dầu dừa đem lại hiệu quả làm đẹp vượt trội trên da và tóc. Dầu dừa được chiết xuất đúng quy cách, đạt chất lượng tốt có thể giúp xử lý triệt để các vấn đề về

tóc: tóc hư tổn, chẻ ngọn, xơ xác, dễ gãy, xỉn màu, gàu, ngứa da đầu... Tương tự như vậy với các vấn đề về da: nhiễm trùng bề mặt da, da khô, nứt nẻ, mụn, nhọt, nám, rạn da, nấm da, chốc vi khuẩn trên da [4-7]. Trên thế giới gần đây xuất hiện nhiều sản phẩm mỹ phẩm từ dầu dừa được bào chế ở nhiều dạng khác nhau. Tuy vậy, ở Việt Nam với nguồn dầu dừa lớn từ các khu vực, đặc biệt vùng dừa Bến Tre vốn đã có thương hiệu nổi tiếng từ lâu, nhưng mỹ phẩm từ dầu dừa còn đơn giản, chủ yếu là dầu dừa nguyên chất. Vì vậy, đề tài này được thực hiện với mục đích đa dạng hóa các mỹ phẩm từ dầu dừa, tạo một dạng bào chế ổn định và có tính ứng dụng cao, tận dụng được nguồn dừa dồi dào của nước ta.

Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

Nguyên liệu

Dầu dừa đạt tiêu chuẩn TCVN 7597:2013, ethanol 96% đạt tiêu chuẩn Dược điển Việt Nam IV (Việt Nam); Olivem 1000 (Cetearyl Olivat và Sorbitan Olivat), Carbopol đạt tiêu chuẩn USP 38 (Ấn Độ); benzalkonium clorid đạt tiêu chuẩn BP 2010 (Ấn Độ); butyl hydroxy toluen-BHT đạt tiêu chuẩn USP 37 (Tây Ban Nha); span 80, tween 80, triethanolamin,

*Tác giả liên hệ: Email: duyphamding1981@gmail.com

Formulation of emulgel containing coconut oil

Dinh Duy Pham*, Duy Quoc Doan

Department of Pharmaceutics, Faculty of Pharmacy,
University of Medicine and Pharmacy in Ho Chi Minh City

Received 18 March 2019; accepted 10 May 2019

Abstract:

The study aims at formulating an emulsion-structured gel (emulgel) containing coconut oil. The methodology of the study is as follows: the ratio of each emulsifier and the composition in the emulgel formula were determined based on the required hydrophilic lipophilic balance (RHLB). IV-Optimal design which has 25 experiments was designed by Design-Expert v8.0.6 software to determine the optimal formula. This design was based on independent variables, including the percentage of coconut oil, the percentage of Carbopol, the percentage of triethanolamine, the percentage of emulsifier mixture, and the percentage of distilled water; and dependent variables such as pH, average particle size, spreadability, and physical stability. The results showed that the RHLB value of the resulting coconut oil emulgel was 5.5. Therefore, the ratio of span 80:tween 80 was 89:11. Through the analysis of experimental data, Design-Expert software proposed the optimal formula with the highest desirability (0.99). The formula included 5% coconut oil, 4.5% mixture of emulsifiers, 0.39% Carbopol, 0.36% triethanolamine, and 81.59% water. The experimental results of the optimal formula exhibited no difference from the prediction of the software. In conclusion, the coconut oil emulgel was successfully prepared and proved its stability so that it can be used for preparing skincare cream products.

Keywords: coconut oil, emulgel, experimental design.

Classification number: 3.4

glycerol, propylen glycol, ethylen diamin tetra acetic acid-EDTA đạt tiêu chuẩn Dược điển Trung Quốc 2010 (Trung Quốc). Phần mềm Design-Expert phiên bản 8.0.6 (Hoa Kỳ).

Phương pháp nghiên cứu

Xác định giá trị RHLB của dầu dừa:

Giá trị RHLB của dầu dừa được xác định bằng cách khảo sát thời gian và mức độ tách lớp của nhũ tương. Các nhũ tương được điều chế bằng cách lắc rung trong ống ly tâm 3 phút với tỷ lệ pha dầu:pha nước:hỗn hợp chất nhũ hóa được giữ cố định. Tỷ lệ giữa hai chất nhũ hóa trong hỗn hợp được thay đổi để đạt các giá trị HLB (là hệ số cân bằng dầu - nước được sử dụng cho chất nhũ hóa hay hỗn hợp chất nhũ hóa) từ 5 đến 14. Khoảng giá trị HLB từ 5 đến 14 được lựa chọn dựa vào sự tham khảo các giá trị RHLB của một số dầu thông dụng được sử dụng trong mỹ phẩm và dược phẩm [8]. Pha nước sử dụng nước cất pha xanh methylen, giúp dễ dàng phát hiện sự tách lớp. Các nhũ tương được để yên và ghi nhận mức độ tách lớp sau 1, 3 và 24 giờ. Mỗi thử nghiệm đều thực hiện 3 lần liên tiếp để chứng minh tính ổn định và lặp lại.

Giá trị HLB của hỗn hợp chất nhũ hóa được tính theo công thức:

$$HLB = a_1.x_1 + a_2.x_2 + \dots + a_n.x_n \quad (1)$$

Với $a_1, a_2, \dots, a_n$: giá trị HLB của chất nhũ hóa 1, 2, ..., n; $x_1, x_2, \dots, x_n$: tỷ lệ % của chất nhũ hóa 1, 2, ..., n trong hỗn hợp chất nhũ hóa.

Dựa vào giá trị RHLB của dầu dừa thu được, tính toán tỷ lệ span 80 và tween 80 sao cho RHLB của dầu dừa bằng HLB của hỗn hợp chất nhũ hóa.

Pha chế gel nhũ tương:

Carbopol được phân tán trong nước cất, chờ khoảng 3 giờ cho polymer trương nở hoàn toàn. Hỗn hợp trên được khuấy đều và thêm triethanolamin vào, tiếp tục khuấy đều trong 3 phút để tạo gel (1). Hòa tan EDTA, benzalkonium clorid và chất nhũ hóa pha nước vào propylen glycol và lượng nước còn lại, đun nóng đến 75°C (2). Hỗn hợp gồm dầu dừa, chất nhũ hóa pha dầu và BHT được đun đến nhiệt độ 70°C, khuấy trộn để các thành phần đồng nhất (3). Cho từ từ (2) vào (3), khuấy đều với tốc độ 3400 vòng/phút trong 5 phút, sau đó đồng nhất hóa bằng máy Ultra turrax với tốc độ 7800 vòng/phút trong 10 phút. Thêm từ từ ethanol 96% vào hỗn hợp (4). Cho (4) vào (1), khuấy đều bằng máy khuấy MK-GB1 trong 5 phút với tốc độ 400 vòng/phút. Đóng tuýp và dán nhãn.

Thiết kế và tối ưu hóa công thức gel nhũ tương:

Mô hình IV-Optimal được thiết kế bằng phần mềm Design-Expert phiên bản 8.0.6 gồm 25 công thức. Năm yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến tính chất của gel nhũ tương được thiết lập bao gồm: tỷ lệ % dầu dừa (A), tỷ lệ % hỗn hợp chất nhũ hóa (B), tỷ lệ % Carbopol (C), tỷ lệ % triethanolamin (D), tỷ lệ % nước cất (E). Trong đó, các tính chất của gel nhũ tương được chọn khảo sát để tối ưu hóa các biến độc lập bao gồm pH (R1), kích thước hạt trung bình (μm) (R2), diện tích dàn mỏng (cm^2) (R3) và độ bền vật lý (R4).

Việc xem xét sự có ý nghĩa về mặt thống kê của các yếu tố bằng phân tích phương sai thông qua việc so sánh giá trị P cũng như giá trị độ chính xác thích hợp (Adequate precision), đây là tỷ lệ giữ tín hiệu và nhiễu. Giá trị độ chính xác thích hợp so sánh khoảng các giá trị dự đoán tại các điểm thiết kế với sai số dự đoán trung bình. Giá trị này lớn hơn 4 cho thấy mô hình có khả năng dự đoán thích hợp. Việc lựa chọn công thức tối ưu dựa vào chỉ số mong muốn được gợi ý từ phần mềm Design-Expert, chỉ số này càng cao thì các giá trị dự đoán càng có khả năng sát với giá trị thực tế nhất.

Xác định các tính chất của gel nhũ tương:

- Cảm quan: gel nhũ tương có màu trắng đục như sữa, thể chất mềm mịn, có mùi đặc trưng, không biến màu, không cứng lại hoặc tách lớp ở điều kiện thường, không được chảy lỏng ở nhiệt độ 37°C , phải bắt dính được trên da khi bôi.

- Độ đồng nhất: gel nhũ tương phải đồng nhất, không vón cục, không có cấu tử lạ. Lấy 4 mẫu gel nhũ tương, mỗi mẫu khoảng 0,02 đến 0,03 g, trải đều trên 4 phiến kính. Đặt lên mỗi phiến kính bằng một phiến kính thứ 2 và ép mạnh cho tới khi tạo thành vết tròn có đường kính khoảng 2 cm. Quan sát vết thu được bằng mắt thường (cách mắt khoảng 30 cm), ở 3 trong 4 tiêu bản không được nhận thấy các tiểu phân. Nếu có các tiểu phân nhìn thấy ở trong phần lớn số các vết thì phải làm lại với 8 mẫu kem. Trong số các tiêu bản này, các tiểu phân cho phép nhận thấy không được vượt quá 2 tiêu bản.

- pH: cân 10 g gel nhũ tương vào cốc becher 100 ml, cho vào 50 ml nước cất đun sôi để nguội. Khuấy kỹ, sau đó lọc qua giấy lọc và tiến hành đo giá trị pH của dịch lọc. Thực hiện đo 3 lần cho mỗi mẫu và lấy giá trị trung bình.

- Độ dàn mỏng: cân 1 g gel nhũ tương cho vào giữa tấm kính, đặt tấm kính còn lại có khối lượng khoảng 250 g lên

trên, để yên trong trong 1 phút. Đo đường kính vòng tròn của gel nhũ tương tán ra, đo 2 chiều và lấy giá trị trung bình. Diện tích dàn mỏng được tính theo công thức: $S = (d^2 \times \pi) / 4$ (trong đó, d là đường kính trung bình của 2 lần đo).

- Kích thước tiểu phân: tiến hành đo phân bố kích thước tiểu phân bằng máy Malvern Mastersizer 3000. Ghi nhận các giá trị kích thước hạt trung bình.

- Độ ổn định vật lý: cân 10 g gel nhũ tương cho vào ống nghiệm có nắp đậy. Đặt ống nghiệm này lần lượt ở các điều kiện nhiệt độ 40°C trong 24 giờ, 4°C trong 24 giờ. Tiếp tục lặp lại các chu kỳ tương tự. Sau mỗi 24 giờ quan sát và ghi nhận thời gian tách lớp bằng cách đưa ống nghiệm ngang tầm mắt, đối diện với ánh sáng đèn. Mẫu được cho là tách lớp khi gel nhũ tương bị tách thành 2 pha rõ rệt. Thực hiện 12 chu kỳ [9].

Kết quả và bàn luận

Kết quả khảo sát mức độ tách lớp của các công thức nhũ tương từ A1 đến A10 có giá trị HLB tương ứng từ 5 đến 14 được trình bày ở bảng 1. Công thức nhũ tương A1 có giá trị HLB tương ứng là 5,0 bền vững nhất sau 24 giờ. Tiếp tục thu hẹp miền giá trị HLB quanh giá trị này để xác định công thức nhũ tương ổn định nhất. Nếu công thức nhũ tương có giá trị HLB là 5,0 vẫn bền nhất thì cần khảo sát thêm công thức có HLB là 4,0 và 4,5 để so sánh. Tuy nhiên, kết quả khảo sát trình bày ở bảng 2 cho thấy công thức nhũ tương B2 có HLB tương ứng là 5,5 bền vững nhất. Cả 3 lần thử nghiệm đều cho kết quả lặp lại. Vậy giá trị RHLB của dầu dừa là 5,5.

Bảng 1. Kết quả khảo sát mức độ tách lớp của các công thức nhũ tương với giá trị HLB ở khoảng rộng.

Công thức	HLB	Mức độ tách lớp		
		Sau 1 giờ	Sau 3 giờ	Sau 24 giờ
A1	5,0	-	-	+
A2	6,0	-	-	++
A3	7,0	-	+	+++
A4	8,0	+++	+++	++++
A5	9,0	+++	+++	++++
A6	10,0	+++	++++	++++
A7	11,0	+++	++++	++++
A8	12,0	+++	++++	++++
A9	13,0	++++	++++	++++
A10	14,0	++++	++++	++++

(-): không hoặc gần như không tách lớp.

(+) (++) (+++) (++++): tách lớp, mức độ tách tăng dần.

Bảng 2. Kết quả khảo sát mức độ tách lớp của các công thức nhũ tương với giá trị HLB ở khoảng hẹp.

Công thức	HLB	Mức độ tách lớp		
		Sau 1 giờ	Sau 3 giờ	Sau 24 giờ
B1	5,0	-	-	++
B2	5,5	-	-	+
B3	6,0	-	-	++
B4	6,5	-	+	+++
B5	7,0	-	++	+++
B6	7,5	+	+++	++++

Giá trị RHLB của công thức B2 giúp tính toán tỷ lệ các chất nhũ hóa phù hợp, phục vụ quá trình tối ưu hóa công thức. Với RHLB pha dầu là 5,5, tỷ lệ giữa span 80:tween 80 được xác định dựa trên công thức (1) là 89:11.

Kết quả thiết kế và tối ưu hóa công thức

Sau khi đã xác định giá trị RHLB của dầu dừa, công thức gel nhũ tương được đề nghị như trong bảng 3.

Bảng 3. Công thức gel nhũ tương dầu dừa đề nghị.

Thành phần		Tỷ lệ (%)
Pha dầu	Dầu dừa	5-15
	Chất nhũ hóa pha dầu*	3-10
	BHT	0,05
Pha nước	Chất nhũ hóa pha nước**	2-7
	Glycerol	5,00
	EDTA	0,10
	Benzalkonium clorid	0,02
Carbopol 940		0,25-0,75
TEA		0,12-0,36
Ethanol 96%		3,00
Nước cất		Vừa đủ 100%

*chất nhũ hóa pha dầu được khảo sát: span 80.

**chất nhũ hóa pha nước được khảo sát: tween 80.

Dựa trên sự thay đổi tỷ lệ của một số thành phần trong công thức gel nhũ tương dầu dừa ở bảng 3, phần mềm Design-Expert đã được sử dụng để thiết kế mô hình thực nghiệm IV-Optimal gồm 25 công thức được trình bày ở bảng 4. Các công thức được bào chế theo cùng điều kiện và quy trình, mỗi công thức có khối lượng 100 g.

Bảng 4. Mô hình IV-Optimal và dữ liệu thực nghiệm.

Công thức	Mô hình IV-Optimal					Dữ liệu thực nghiệm			
	A	B	C	D	E	R1 (n=3)	R2 (n=5)	R3 (n=2)	R4
1	11,67	15,00	0,75	0,20	64,21	4,75±0,02	8,81±0,11	33,17±1,02	0
2	5,00	3,00	0,42	0,36	83,05	5,79±0,07	1,22±0,02	33,17±0,00	12
3	11,67	15,00	0,75	0,20	64,21	4,87±0,02	1,18±0,04	28,26±0,94	0
4	11,67	15,00	0,25	0,36	64,55	6,78±0,03	0,56±0,03	50,24±2,51	12
5	7,50	12,00	0,38	0,18	71,78	5,48±0,02	3,38±0,03	38,47±2,20	9
6	5,00	3,00	0,75	0,28	82,80	4,82±0,02	1,20±0,03	22,05±0,17	12
7	5,00	3,00	0,25	0,12	83,46	5,72±0,03	0,67±0,00	78,50±0,16	5
8	15,00	15,00	0,58	0,36	60,89	5,57±0,02	1,14±0,01	36,30±0,00	0
9	15,00	3,00	0,75	0,12	72,96	4,65±0,02	133,40±6,56	28,26±0,94	0
10	5,00	15,00	0,25	0,24	71,34	6,34±0,00	8,91±0,03	52,78±0,26	12
11	7,50	6,00	0,38	0,18	77,78	5,29±0,01	0,59±0,04	44,16±0,12	7
12	11,67	7,00	0,75	0,36	72,05	5,16±0,02	0,21±0,00	28,26±0,09	0
13	11,67	11,00	0,25	0,12	68,79	5,54±0,01	0,27±0,00	56,72±0,27	0
14	10,00	15,00	0,25	0,12	66,46	5,80±0,00	0,71±0,01	63,59±0,28	3
15	5,00	11,00	0,58	0,12	75,13	4,65±0,01	0,33±0,00	28,26±0,09	12
16	5,00	3,00	0,75	0,28	82,80	4,77±0,03	0,24±0,03	33,17±0,20	12
17	15,00	11,00	0,25	0,12	65,46	5,50±0,01	6,88±0,03	66,44±1,44	0
18	10,00	9,00	0,50	0,24	72,09	5,26±0,01	0,24±0,01	38,47±0,00	3
19	15,00	3,00	0,42	0,28	73,13	5,56±0,02	0,70±0,01	40,69±0,00	0
20	10,00	9,00	0,50	0,24	72,09	5,15±0,02	0,54±0,09	30,18±0,49	0
21	8,33	3,00	0,25	0,12	80,13	5,36±0,02	21,54±0,24	70,85±0,30	0
22	10,00	9,00	0,50	0,24	72,09	5,29±0,02	1,20±0,34	28,26±0,00	0
23	5,00	15,00	0,75	0,36	70,72	5,30±0,02	0,25±0,01	30,18±0,97	0
24	11,67	3,00	0,42	0,12	76,63	4,90±0,04	13,26±0,24	44,16±0,00	0
25	5,00	11,00	0,58	0,12	75,13	4,54±0,00	0,23±0,00	38,47±0,00	9

A: tỷ lệ % dầu dừa; B: tỷ lệ % hỗn hợp chất nhũ hóa; C: tỷ lệ % Carbopol; D: tỷ lệ % triethanolamin; E: tỷ lệ % nước cất; R1: pH; R2: kích thước hạt trung bình (μm); R3: diện tích dàn mỏng (cm²); R4: độ bền vật lý.

Khi phân tích phương sai, kết quả ở bảng 5 cho thấy rằng, các hàm số thể hiện mối quan hệ giữa các biến số độc lập A, B, C, D, E với các biến phụ thuộc R1, R2, R3, R4 là có ý nghĩa (P-value<0,05). Giá trị độ chính xác thích hợp (Adequate precision) đo tỷ lệ giữa “tín hiệu” và “nhiều”. Tỷ lệ này >4 được cho là phù hợp, vì vậy mô hình thiết kế có thể được sử dụng để định hướng cho không gian thiết kế. Bên cạnh đó, các giá trị R², R² hiệu chỉnh, R² dự đoán đều

lớn hơn 0,7 cho thấy khả năng dự đoán chính xác các tính chất của gel nhũ tương. Các giá trị này càng lớn thì sự sai lệch giữa các giá trị dự đoán và giá trị thực nghiệm sẽ nhỏ, hay nói cách khác là khả năng đạt được các tính chất của gel nhũ tương như kết quả dự đoán sẽ càng lớn.

Bảng 5. Kết quả phân tích phương sai các yếu tố R1, R2, R3, R4.

Yếu tố	R1	R2	R3	R4
Tổng bình phương	6,73	118,12	5291,07	606,52
Độ tự do	10	12	13	12
Độ lệch chuẩn	0,088	0,57	4,97	1,93
F-value	87,42	30,06	16,45	13,5
P-value	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
R ²	0,98	0,97	0,95	0,93
R ² hiệu chỉnh	0,97	0,94	0,89	0,86
R ² dự đoán	0,92	0,90	0,72	0,72
Adequate precision	36,67	26,28	13,00	9,89
Phương trình tương quan hồi quy	R1 = +0,24A +6,72B +1828,40C +101,03D +5,55E -1,65AB -1877,31AC -1937,92BC -1,02BE -3119,96CD -1921,05CE +340,77CE -9122,35DE	Sqrt(R2) = +18,52A +1,73B -253,96C +9076,70D +0,88E -27,88AB +1027,17AC -10607,34AD -23,01AE -8443,68BD -21376,37CD -21,45BE -19898,50CD -89180,11CE -2422,60DE	R3 = +101,70A +61,19B +85364,30C +127,55D +76,21E -61,40AB -89197,38AC -71,74AE -88259,80BC -1329,95BD -21318,24BD -97094,24CD -7913,86CE -20750,04DE	R4 = -9,44A +12,11B +8262,59C +21333,61D +6,02E -8326,07AC -19646,40AD -25,59AE -8746,06BC -21318,24BD -97094,24CD -7913,86CE -20750,04DE

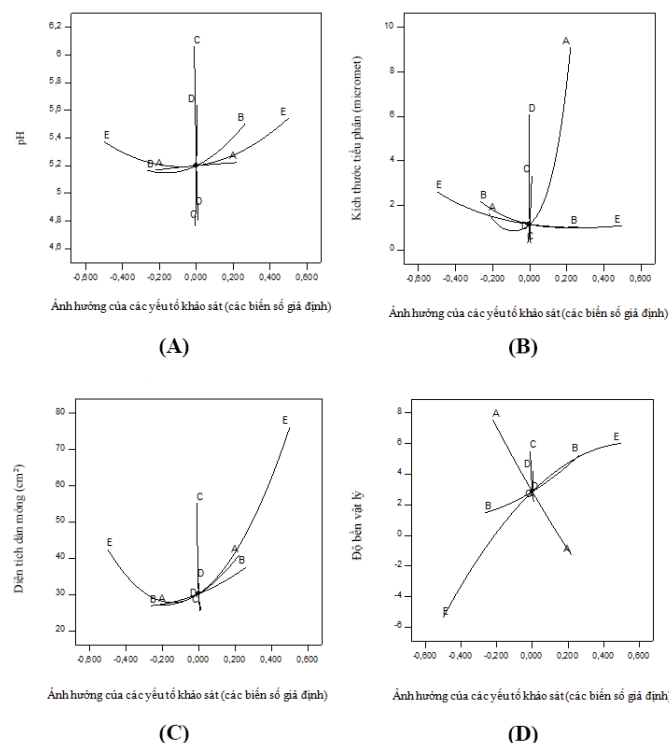
Các phương trình hồi quy ở bảng 5 còn được thể hiện một cách trực quan hơn ở hình 1. Trong hình, từng tính chất của gel nhũ tương chịu sự ảnh hưởng của các yếu tố khảo sát ở các mức độ khác nhau:

- pH (R1) phụ thuộc chủ yếu vào yếu tố tỷ lệ % Carbopol (C), tỷ lệ % TEA (D) có trong công thức và ít phụ thuộc vào các yếu tố khác. Do Carbopol phân tán vào nước có tính acid, khi trung hòa trở thành dạng gel. TEA là một amin bậc ba có nhiều nhóm hydroxyl, được sử dụng trong công thức này với vai trò trung hòa Carbopol và điều chỉnh cho gel nhũ tương đạt pH thích hợp. Nếu giữ nguyên lượng các thành phần khác, khi C tăng thì R1 sẽ giảm, còn tăng D thì R1 sẽ tăng. Sự thay đổi của R1 có dao động lớn khi tỷ lệ giữa C và D chênh lệch nhau nhiều.

- Kích thước hạt trung bình (R2) bị ảnh hưởng từ cả 5 yếu tố: tỷ lệ % dầu dừa (A), tỷ lệ % chất nhũ hóa (B), tỷ lệ % Carbopol (C), tỷ lệ % TEA (D) và tỷ lệ % nước (E) trong công thức gel nhũ tương. Đặc biệt, các yếu tố A, C, D có ảnh hưởng rất lớn đến R2. Khi tỷ lệ % dầu dừa tăng dần nhưng lượng chất nhũ hóa bị giới hạn thì kích thước hạt trung bình chỉ có thể giảm ở một mức độ nhất định và sau đó sẽ tăng lên tỷ lệ thuận với lượng tăng của dầu dừa. Bên cạnh đó, tỷ lệ % Carbopol và tỷ lệ % TEA quyết định đến độ nhớt của môi trường phân tán, khi môi trường phân tán càng nhớt thì kích thước hạt phân tán sẽ lớn và ngược lại.

- Diện tích đàn mỏng (R3) cũng phụ thuộc vào nhiều yếu tố, trong đó phụ thuộc lớn vào tỷ lệ % Carbopol (C), tỷ lệ % TEA (D) và tỷ lệ % nước (E) có trong công thức. Gel Carbopol được trung hòa có độ nhớt lớn nhất ở pH 6-11, độ nhớt giảm đáng kể khi pH<3 hoặc pH>12, hoặc khi có sự hiện diện của các chất mang điện tích. R3 có xu hướng tăng lên khi C và D giảm.

- Độ bền vật lý (R4) bị ảnh hưởng bởi cả 5 yếu tố. Tỷ lệ % dầu dừa càng cao công thức càng khó bền, cùng 1 lượng Carbopol nếu tăng lượng TEA trong khoảng giới hạn thì R4 tăng, hỗn hợp chất nhũ hóa ảnh hưởng tới sự tách lớp của 2 pha dầu và nước.



Hình 1. Sự ảnh hưởng của các biến độc lập lên từng biến phụ thuộc: pH - R1 (A), kích thước tiểu phân - R2 (B), diện tích đàn mỏng - R3 (C) và độ bền vật lý - R4 (D).

Điều kiện ràng buộc cho biến độc lập và biến phụ thuộc

Trong giới hạn không gian thiết kế và một số yêu cầu đối với các thành phần gel nhũ tương cũng như các mong muốn về các tính chất của gel nhũ tương dầu dừa nên một số ràng buộc cho các biến số đã được thiết lập và được trình bày ở bảng 6.

Bảng 6. Điều kiện ràng buộc cho các biến số.

Biến số	Mục tiêu	Khoảng giới hạn
A	Trong khoảng giới hạn	5-15 (%)
B	Trong khoảng giới hạn	3-15 (%)
C	Trong khoảng giới hạn	0,25-0,75 (%)
D	Trong khoảng giới hạn	0,12-0,36 (%)
E	Trong khoảng giới hạn	60,72-83,46 (%)
R1	Hướng đến 6,0	5,50-6,50
R2	Trong khoảng giới hạn	0-10 (μm)
R3	Trong khoảng giới hạn	25-40 (cm^2)
R4	Hướng đến 12	12

Dựa trên các điều kiện ràng buộc đối với các biến số, phần mềm Design-Expert đưa ra các công thức đề nghị với các chỉ số mong muốn (Desirability) khác nhau. Công thức với chỉ số mong muốn cao nhất (0,99) được lựa chọn và được trình bày song song với kết quả thực nghiệm kiểm chứng trong bảng 7.

Bảng 7. Kết quả tối ưu, giá trị dự đoán và thực nghiệm kiểm chứng.

Biến độc lập	Tên	Tỷ lệ (%)	Biến phụ thuộc	Tên	Dự đoán	Thực nghiệm (n=3)	Bias (%)
A	Dầu dừa	5	R1	pH	5,90	6,04 $\pm$ 0,04	2,37
B	Hỗn hợp chất nhũ hóa	4,5	R2	Kích thước hạt trung bình (μm)	2,19	2,48 $\pm$ 0,58	13,24
C	Carbopol 940	0,39	R3	Diện tích đàn mỏng (cm^2)	34,02	34,54 $\pm$ 0,61	1,52
D	Triethanolamin	0,36	R4	Độ bền vật lý	12	12	0
E	Nước cất	81,59					
A+B+C+D+E = 91,84%			Mức độ mong muốn: 0,99				

Kết quả thực nghiệm kiểm chứng

Kết quả pH, độ đàn mỏng và độ bền vật lý của hệ gel nhũ tương dầu dừa có sự lặp lại tốt giữa 3 lô kiểm chứng (CV% lần lượt là 0,6%, 1,76% và 0%); đồng thời sự sai lệch giữa giá trị dự đoán và giá trị thực nghiệm trung bình thấp (Bias lần lượt là 2,37%, 1,52% và 0%). Các mẫu chứng có độ bền vật lý ổn định qua 12 chu kỳ nhiệt biến đổi, không có sự tách pha cũng như không có sự thay đổi về cảm quan như màu sắc, sự đồng nhất so với mẫu đối chứng được để ở điều kiện nhiệt độ phòng. Vậy gel nhũ tương bền dưới tác động

của nhiệt độ trong khoảng cho phép, có pH và diện tích đàn mỏng ổn định. Kết quả giá trị kích thước hạt có sự dao động nhiều giữa các lô kiểm chứng và có sự sai lệch lớn giữa giá trị dự đoán và giá trị thực nghiệm, nhưng vẫn nằm trong khoảng cho phép.

pH sinh lý của da người bình thường nằm trong khoảng từ 4-6 [10, 11]. Nhiều tác giả chấp nhận giá trị từ 5,4-5,9 [12]. Giá trị pH hơi acid này đảm bảo cho hoạt tính kháng khuẩn, tạo hàng rào bảo vệ cũng như cần thiết cho sự toàn vẹn của lớp sừng [10, 13]. Giá trị thực nghiệm (pH=6,04) và giá trị dự đoán (pH=5,9) của nghiên cứu đảm bảo cho các hoạt động chức năng bình thường của da.

Kích thước hạt có ảnh hưởng đáng kể đến đặc tính hấp thu qua da của gel nhũ tương: với kích thước $>10 \mu\text{m}$ chủ yếu được giữ lại trên bề mặt da, các hạt từ $3-10 \mu\text{m}$ có thể vào các nang lông, khi kích thước $<3 \mu\text{m}$ thì các hạt có thể qua các nang lông và lớp sừng [13]. Gel nhũ tương dầu dừa với tác dụng chăm sóc và giữ ẩm cho da nên kích thước hạt trung bình $2,48 \mu\text{m}$ là phù hợp.

Khi tiến hành bào chế các công thức trong mô hình thực nghiệm, những công thức có độ đàn mỏng từ $30-40 \text{ cm}^2$ cho thể chất phù hợp, có khả năng đóng tuýp và sử dụng dễ dàng. Do đó, độ đàn mỏng của 3 lô kiểm chứng cho thấy khả năng có thể đưa vào sản xuất công nghiệp.

Khi đánh giá độ bền vật lý của gel nhũ tương, sau 12 chu kỳ nhiệt các mẫu không có sự tách pha, không có sự thay đổi về cảm quan như màu sắc, sự đồng nhất so với mẫu đối chứng được để ở điều kiện nhiệt độ phòng. Vậy công thức tối ưu bền dưới tác động của nhiệt độ.

Kết luận

Công thức gel nhũ tương dầu dừa tối ưu đã được thiết lập thành công bằng phần mềm Design-Expert phiên bản 8.0.6 với mô hình thực nghiệm IV-Optimal. Đồng thời, công thức

tối ưu này đã đạt các tính chất đề ra và có thể được ứng dụng để tạo ra các sản phẩm mỹ phẩm có công dụng dưỡng da với sự kết hợp với các thành phần từ thiên nhiên như mật ong, sữa ong chúa, phấn hoa... nhằm góp phần làm phong phú hóa, cải thiện chất lượng và hiệu quả cùng với các sản phẩm chăm sóc da khác trên thị trường.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Võ Văn Chi (2011), *Từ điển cây thuốc Việt Nam*, **Tập 1**, Nhà xuất bản Y học.
- [2] E.V. Carandang (2008), "Health benefits of virgin coconut oil", *Indian Coconut Journal Cochin*, **38(9)**, pp.8-12.
- [3] N.H. Jayadas, K.P. Nair (2006), "Coconut oil as base oil for industrial lubricants-evaluation and modification of thermal, oxidative and low temperature properties", *Tribology International*, **39(9)**, pp.873-878.
- [4] A. Novilla, P. Nursidika, W. Mahargyani (2017), "Komposisi Asam Lemak Minyak Kelapa Murni (Virgin Coconut Oil) yang Berpotensi sebagai Anti Kandidiasis", *EduChemia (Jurnal Kimia dan Pendidikan)*, **2(2)**, pp.161-173.
- [5] D.O. Ogbolu, A.A. Oni, O.A. Daini, A.P. Oloko (2007), "In vitro antimicrobial properties of coconut oil on Candida species in Ibadan, Nigeria", *Journal of Medicinal Food*, **10(2)**, pp.384-387.
- [6] N.A.M.M. Nasir, A.A. Jalaludin, Z. Abllah, et al. (2018), *Virgin Coconut Oil and Its Antimicrobial Properties against Pathogenic Microorganisms: A Review, Proceedings of the International Dental Conference of Sumatera Utara 2017*, Atlantis Press.
- [7] M. Shilling, L. Matt, E. Rubin, et al. (2013), "Antimicrobial effects of virgin coconut oil and its medium-chain fatty acids on Clostridium difficile", *Journal of Medicinal Food*, **16(12)**, pp.1079-1085.
- [8] Lê Quan Nghiê, Huỳnh Văn Hóa (2007), *Bào chế và sinh dược học*, **Tập 2**, Nhà xuất bản Giáo dục.
- [9] Brazil National Health Surveillance Agency (2005), *Cosmetic Products Stability Guide*, Brazil National Health Surveillance Agency Press.
- [10] D.J. Panther, S.E. Jacob (2015), "The Importance of Acidification in Atopic Eczema: An Underexplored Avenue for Treatment", *Journal of Clinical Medicine*, **4(5)**, pp.970-978.
- [11] S. Schreml, M. Kemper, C. Abels (2014), "Skin pH in the elderly and appropriate skin care", *European Medical Journal*, **2(1)**, pp.86-94.
- [12] O. Braun-Falco, H.C. Korting (1986), "Der normale pH - Wert der Haut", *Hautarzt*, **37(3)**, pp.126-129.
- [13] A. Rolland (1993), *Pharmaceutical Particulate Carriers: Therapeutic Applications*, Informa Healthcare, pp.367-421.

Phân lập và tối ưu hoá điều kiện nuôi cấy vi khuẩn lactic có khả năng kháng vi khuẩn *Propionibacterium* spp. được phân lập trên da người

Bùi Hoàng Đăng Long*, Nguyễn Thị Tuyết Mai, Huỳnh Xuân Phong,
Phạm Thúy Vi, Nguyễn Ngọc Thanh

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

Ngày nhận bài 1/4/2019; ngày chuyển phản biện 5/4/2019; ngày nhận phản biện 20/5/2019; ngày chấp nhận đăng 29/5/2019

Tóm tắt:

Nghiên cứu được thực hiện nhằm phân lập các chủng vi khuẩn *Propionibacterium* spp. từ da người, tuyển chọn chủng vi khuẩn lactic có khả năng kháng vi khuẩn *Propionibacterium* spp. đã phân lập và xác định điều kiện thích hợp nuôi cấy vi khuẩn lactic này bằng môi trường nước chua tàu hũ. Kết quả đã phân lập được hai chủng vi khuẩn *Propionibacterium* spp. (PO và PM) là vi khuẩn Gram dương, tế bào hình que ngắn, không di chuyển, khuẩn lạc tròn, bìa nguyên và răng cưa, oxidase dương tính, catalase âm tính. Trong thử nghiệm kháng khuẩn, 10 chủng vi khuẩn lactic đều có khả năng sinh bacteriocin ức chế vi khuẩn *Propionibacterium* spp. Trong đó, chủng L39 có khả năng kháng khuẩn tốt nhất với đường kính vòng kháng PO và PM đạt lần lượt là 10,16 và 14,16 mm. Điều kiện thích hợp để tăng sinh vi khuẩn lactic bằng nước chua tàu hũ tạo chất kháng khuẩn được xác định ở môi trường bổ sung sucrose 2% (w/v), peptone 1% (w/v) và K_2HPO_4 2% (w/v), hàm lượng đường từ 5,73-5,87% (w/v), pH 6,09-6,14 và mật số giống chủng 10^7 (tế bào/ml). Ở điều kiện thích hợp trên quy mô 2 lít, chủng L39 có khả năng kháng vi khuẩn chỉ thị với đường kính vòng kháng chủng PO và PM đạt 11,33 và 5,5 mm. Kết quả giải trình tự 16S rRNA cho thấy, chủng vi khuẩn PO và L39 tương đồng với *Propionibacterium acnes* DNF00413 với độ tương đồng 99% và *Lactobacillus plantarum* 7.11E với độ tương đồng 98%.

Từ khóa: bacteriocin, điều kiện thích hợp, kháng khuẩn gây mụn, nước chua tàu hũ, vi khuẩn lactic.

Chỉ số phân loại: 3.5

Đặt vấn đề

Vi khuẩn lactic (LAB) là nhóm vi sinh vật được phát hiện, ứng dụng và phát triển gắn liền với công nghệ lên men thực phẩm [1]. Vi khuẩn lactic có khả năng biến đổi đường thành các sản phẩm có ứng dụng trong bảo quản thực phẩm, trong đó có acid lactic và bacteriocin, nhóm protein kháng khuẩn.

Nghiên cứu về bacteriocin là một trong những hướng đi nhằm đối phó với tình trạng đề kháng kháng sinh tổng hợp gây ra bởi thực trạng lạm dụng thuốc kháng sinh ở hầu hết các quốc gia đang phát triển trên thế giới [2]. *Propionibacterium* spp. được xem là một trong các nguyên nhân gây ra mụn trứng cá. Liệu pháp kháng sinh trong điều trị mụn trứng cá thường kéo dài nhiều tháng và sự thất bại trong điều trị có liên quan đến chủng *Propionibacterium* spp. kháng thuốc [3]. Đặc tính đề kháng kháng sinh của *Propionibacterium* spp. được xem là một trong các nguyên

nhân gây ra mụn trứng cá.

Trước viễn cảnh trên, việc điều trị bằng các biện pháp thay thế mang tính bền vững như vi khuẩn đối kháng vi khuẩn và ứng dụng bacteriocin, một nhóm kháng sinh tự nhiên, đang ngày càng được quan tâm. Về bản chất, bacteriocin là nhóm chất kháng khuẩn có tính đặc hiệu, ít gây đề kháng và không mang tác dụng phụ cho con người [4]. Tuy nhiên, để có thể thu nhận bacteriocin, cần thiết phải chọn lựa những chủng vi khuẩn có hiệu suất tổng hợp cao tiến tới sản xuất bằng kỹ thuật sinh học với các chủng mới thích hợp cho sản xuất công nghiệp.

Nước chua tàu hũ là sản phẩm của công nghệ lên men lâu đời tại nước ta. Nước chua tàu hũ có chứa isoflavon, oligosaccharide, peptide và saponin vốn tương đồng các thành phần protein, đường và dinh dưỡng có trong môi trường nuôi cấy vi sinh vật [5]. Việc ứng dụng nước chua tàu hũ trong sản xuất sinh khối vi khuẩn lactic có tiềm năng

*Tác giả liên hệ: bhdlong@ctu.edu.vn

Isolation and optimisation for culture conditions of lactic acid bacteria for antibacterial properties against *Propionibacterium* spp. isolated from human skin

Hoang Dang Long Bui*, Thi Tuyet Mai Nguyen, Xuan Phong Huynh, Thuy Vi Pham, Ngoc Thanh Nguyen

Biotechnology Research and Development Institute, Can Tho University

Received 1 April 2019; accepted 29 May 2019

Abstract:

This study aimed to isolate strains of *Propionibacterium* spp. from human skin, select lactic acid bacteria having antibacterial properties against the isolated *Propionibacterium* spp. strains, and identify the suitable conditions to culture lactic acid bacteria from tofu sour liquid. As a result, the two strains of *Propionibacterium* spp. were isolated (PO and PM), which had following properties: Gram-positive, rod shape, non-mobilized, round colony with entire or undulate margin, positive oxidase and negative catalase activities. In antibacterial property test, the L39 strain of lactic acid bacteria produced the largest antibacterial zone with the zone diameters against PO and PM at 10.16 mm and 14.16 mm, respectively. In tofu sour liquid, the suitable culture conditions for the antibacterial property of the strain L39 were determined with the addition of 2% (w/v) sucrose, 1% (w/v) peptone and 2% (w/v) K_2HPO_4 , 5.73-5.87% (w/v) sugar content, pH 6.09-6.14, and inoculum density at 10^7 (cell/ml). At the suitable conditions in 2-litre scale, L39 could produce 11.33 and 5.5 mm inhibitory zones against the indicator strains PO and PM. Strains PO and L39 were molecularly identified as *Propionibacterium acnes* DNF00413 with 99% identity and *Lactobacillus plantarum* 7.11E with 98% identity, respectively.

Keywords: antibacterial, bacteriocin, lactic acid bacteria, suitable conditions, tofu sour liquid.

Classification number: 3.5

làm giảm giá thành sản xuất. Xác định được điều kiện tối ưu để nuôi cấy sao cho sinh khối vi khuẩn thu được có khả năng kháng khuẩn tốt mang tính quyết định đến ứng dụng và chuyển giao công nghệ.

Nghiên cứu này được thực hiện nhằm mục đích tìm được chủng vi khuẩn gây ra mụn *Propionibacterium* spp. trên da và tuyển chọn chủng vi khuẩn lactic cùng điều kiện nuôi cấy chúng trên môi trường nước chua tàu hủ cho khả năng sinh ra bacteriocin tốt để ức chế hoạt động của vi khuẩn *Propionibacterium* spp., qua đó hỗ trợ điều trị bệnh da liễu.

Nội dung nghiên cứu

Đối tượng và phương pháp

Mười chủng vi khuẩn lactic được phân lập, tuyển chọn và lưu trữ tại Phòng thí nghiệm công nghệ sinh học thực phẩm, Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ sinh học, Trường Đại học Cần Thơ. Vi khuẩn lactic được nuôi cấy bằng môi trường MRS (De Man, Rogosa và Sharpe, Merck) [6].

Mẫu nhân mụn được thu trên 5 tình nguyện viên nhằm phân lập vi khuẩn *Propionibacterium* spp. bằng cách phân lập trên môi trường BHI (Brain Heart Infusion, Merck) và được nuôi cấy trong môi trường TSB và TSA (Tryptic Soy Broth và Tryptic Soy Agar, Merck). Mẫu nước chua tàu hủ được thu tại cơ sở sản xuất tương chao Vĩnh Trân (phường An Hòa, quận Ninh Kiều, TP Cần Thơ).

Phân lập và định danh vi khuẩn *Propionibacterium* spp. từ da người

Phân lập vi khuẩn *Propionibacterium* spp. từ mẫu nhân mụn: tiến hành sát khuẩn xung quanh vị trí mụn trên da với ethanol 70% (v/v). Dùng dụng cụ nặn mụn thu mẫu nhân mụn từ da mặt của 5 tình nguyện viên và tăng sinh trong 100 ml môi trường BHI broth trong 72 giờ ở điều kiện kỵ khí. Tiến hành cấy trải lặp đi lặp lại nhiều lần trên đĩa chứa môi trường BHI agar đến khi thu được khuẩn lạc thuần. Kiểm tra hình thái khuẩn lạc đặc trưng cho vi khuẩn *Propionibacterium* spp.

Xác định các đặc tính sinh lý sinh hoá các chủng phân lập (nhằm xác định các đặc điểm hình thái, sinh lý và sinh hoá của các chủng vi khuẩn đã phân lập): các chủng vi khuẩn thuần có hình que, không chuyển động được chọn mẫu nhân mụn, sau đó tiến hành nhuộm Gram, thử catalase, oxidase để xác định các chủng vi khuẩn phân lập được thuộc nhóm vi khuẩn *Propionibacterium* spp.

Định danh vi khuẩn *Propionibacterium* spp. tuyển chọn được: qua kết quả định danh sơ bộ chọn được chủng

vi khuẩn có đặc điểm hình thái, sinh lý, sinh hóa phù hợp với các đặc tính của các loài thuộc chi *Propionibacterium* spp. Mẫu được gửi định danh ở Malaysia với cặp mồi được sử dụng để khuếch đại 16S RNA vi khuẩn bao gồm 27F: 5'-ACGGTTACCTTGTACGACT-3' và 1492R 5'-AGAGTTTGATCCT GGCTC-3' [7].

Khảo sát khả năng kháng khuẩn *Propionibacterium* spp. của vi khuẩn lactic

Khảo sát hoạt tính kháng khuẩn của vi khuẩn lactic (nhằm tuyển chọn chủng vi khuẩn lactic có hoạt tính kháng khuẩn và sinh bacteriocin tốt): tính kháng khuẩn được kiểm tra bằng phương pháp khuếch tán trên giếng thạch [8]. Vi khuẩn chi thị *Propionibacterium* spp. được phân lập và xác định với các đặc tính sinh lý sinh hoá phù hợp. Chủng chi thị *Propionibacterium* spp. đã phân lập được nuôi tăng sinh trong môi trường TSB trong 72 giờ đến mật số 10^7 tế bào/ml. Trải 50 μ l dịch môi trường nuôi cấy trên đĩa môi trường TSA. Tạo những giếng nhỏ có đường kính 5 mm với thanh kim loại vô trùng. Chuẩn bị dịch bacteriocin thô từ 10 chủng vi khuẩn lactic bằng cách ly tâm (10.000 vòng/phút, 15 phút) dịch tăng sinh vi khuẩn lactic sau khi nuôi ở môi trường MRS broth trong 48 giờ. Thu phần dịch sau ly tâm và chuẩn độ pH đến 6,5 bằng NaOH 0,1N. Cho 80 μ l dịch bacteriocin thô nhỏ vào mỗi giếng của đĩa thạch đã cấy trải vi khuẩn chi thị và ủ ở 37°C trong 48 giờ. Ghi nhận sự hình thành vòng kháng khuẩn xung quanh các giếng trên đĩa thạch.

Giải trình tự và định danh vi khuẩn lactic có khả năng kháng khuẩn tốt: trình tự gene 16S RNA của chủng vi khuẩn lactic có hoạt tính kháng khuẩn tốt nhất đã tuyển chọn được khuếch đại bằng cặp mồi 27F và 1492R. Mẫu khuếch đại được giải trình tự tại Đại học Kyushu (Nhật Bản). Trình tự được giải được so sánh đối chiếu với cơ sở dữ liệu NCBI (National Center for Biotechnology Information, Hoa Kỳ) sử dụng công cụ nucleotide BLAST.

Điều kiện nuôi cấy vi khuẩn lactic trên nước chua tàu hủ cho khả năng kháng khuẩn *Propionibacterium* spp.

Nguồn carbon, nitơ và khoáng thích hợp cho khả năng sinh chất kháng khuẩn của chủng vi khuẩn lactic từ nước chua tàu hủ: chủng 1 ml dịch tăng sinh vi khuẩn lactic vào ống nghiệm chứa 9 ml môi trường nước chua tàu hủ có bổ sung các yếu tố dinh dưỡng: 2% (w/v) nguồn carbon (sucrose, glucose, maltose), 1% (w/v) nguồn nitơ (peptone, tryptone, yeast extract) và 2% (w/v) nguồn khoáng (KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , MgSO_4). Tăng sinh vi khuẩn trong 36 giờ và khảo sát hoạt tính kháng khuẩn của dịch tăng sinh có bổ sung thành phần khác nhau tương tự [8].

Nồng độ giống chủng, hàm lượng đường và pH thích hợp cho khả năng sinh chất kháng khuẩn của các chủng vi khuẩn lactic: tăng sinh vi khuẩn lactic trong môi trường nước chua tàu hủ được bổ sung các thành phần đã xác định và điều chỉnh hàm lượng đường (5%, 6% và 7% w/v), nồng độ giống chủng (10^5 , 10^6 và 10^7 tế bào/ml), pH (5,0; 6,0 và 7,0). Thu dịch sau tăng sinh và khảo sát hoạt tính kháng khuẩn ở các điều kiện nuôi cấy khác nhau theo phương pháp khuếch tán giếng thạch [8].

Khả năng nuôi cấy vi khuẩn lactic sinh chất kháng khuẩn từ nước chua tàu hủ ở quy mô 2 lít (nhằm kiểm tra tính thích ứng với điều kiện sản xuất quy mô phòng thí nghiệm): chuẩn bị dịch nước chua tàu hủ có bổ sung các thành phần carbon, nitơ và khoáng thích hợp xác định qua thí nghiệm trước. Điều chỉnh điều kiện pH và hàm lượng đường theo nghiệm thức thích hợp đã tuyển chọn. Chủng 1% (w/v) dịch tăng sinh vi khuẩn lactic (mật số 10^9 tế bào/ml) vào 2 lít dịch nước chua tàu hủ đã chuẩn bị và tiến hành tăng sinh trong 36 giờ. Thu mẫu dịch tăng sinh, ly tâm và tiến hành khảo sát hoạt tính kháng khuẩn như các nội dung trên nhằm xác định khả năng kháng khuẩn.

Các số liệu về đường kính vòng kháng khuẩn của mỗi chủng *Lactobacillus* spp. được xử lý thống kê bằng phần mềm Statgraphics Centurion version XV để tìm sự khác biệt ý nghĩa giữa các nghiệm thức.

Kết quả và thảo luận

Phân lập và định danh vi khuẩn *Propionibacterium* spp. từ da người

Kết quả phân lập 8 mẫu nhân mụn thu từ các tỉnh nguyên viên đã thu được 4 chủng có đặc điểm hình thái đặc trưng của vi khuẩn *Propionibacterium* spp, gồm PO, PI, PL và PM.

Trên môi trường TSB agar ủ ở 37°C sau 72 giờ nuôi cấy, tất cả các chủng có dạng khuẩn lạc hình tròn, bìa răng cưa (chủng PL, PM, PI) và bìa nguyên (chủng PO). Khuẩn lạc màu trắng đục, bóng, khuẩn lạc lồi (chủng PL, PI) hoặc khuẩn lạc mô cao (PO, PM). Kích thước khuẩn lạc 5,0x1,0 mm (chủng PI, PM và PL) và 0,5x1,0 mm (chủng PO). Tế bào hình que, kích thước khoảng 1,0x5,0 μ m (chủng PI, PL, PM) và 0,6x5,0 μ m (chủng PO). Đặc điểm hình thái của các chủng vi khuẩn phân lập được tổng hợp ở bảng 1 cho thấy phù hợp với công bố của một số nghiên cứu về đặc điểm của chi *Propionibacterium* spp. [9, 10]. Trong các nghiên cứu này, *Propionibacterium* spp. có khuẩn lạc dạng hình tròn, bìa răng cưa, bìa nguyên, tế bào có dạng hình que, không có khả năng di động, không hình thành bào tử.

Bảng 1. Đặc điểm hình thái của các chủng vi khuẩn phân lập.

STT	Chủng vi khuẩn	Đặc điểm sinh hóa			Đặc điểm khuẩn lạc			Đặc điểm tế bào		
		Gram	Oxidase	Catalase	Màu sắc	Hình dạng	Bìa	Độ nổi	Khả năng di động	Hình thái tế bào
1	PL	-	+	-	Trắng đục	Tròn	Răng cưa	Lài	-	Que ngắn
2	PI	+	+	+	Trắng đục	Tròn	Răng cưa	Lài	-	Que ngắn
3	PO	+	+	-	Trắng đục	Tròn	Nguyên	Mô	-	Que ngắn
4	PM	+	+	-	Trắng đục	Tròn	Răng cưa	Lài	-	Que ngắn

*Chú thích: (-) không di động.

Đặc tính sinh hoá tế bào cho thấy hai chủng PO và PM là vi khuẩn Gram dương, có hoạt tính catalase nhưng không có hoạt tính oxidase. Các đặc điểm này phù hợp với miêu tả đặc tính sinh hoá tế bào vi khuẩn *Propionibacterium* spp. như mô tả của Amini và Richetti (2015): vi khuẩn Gram dương, kỵ khí không tạo bào tử [11]. Theo Butler-Wu (2011) và Ulrika (2012), *Propionibacterium* spp. là nhóm vi khuẩn kỵ khí có hoạt tính catalase và không có enzyme oxidase [12, 13]. Hơn nữa, các đặc tính sinh hóa của các chủng PO và PM phân lập phù hợp với vi khuẩn *Propionibacterium* spp. theo khóa phân loại của Bergey với các đặc tính cơ bản bao gồm: vi khuẩn Gram dương, có hình que, có enzyme catalase và không có hoạt tính oxidase [14]. Vì vậy, có thể kết luận được rằng 2 chủng vi khuẩn PO và PM phân lập được từ các mẫu nhân mụn trên da thuộc chi *Propionibacterium*.

Chủng PO có tổng số nucleotide được giải là 634 và cho kết quả đồng hình với chủng *Propionibacterium acnes* DNF00413 tỷ lệ 99%, không có vị trí bị ngắt quãng trên chuỗi, mức độ sai lệch không đáng kể (1%).

Khả năng kháng khuẩn *Propionibacterium* spp. của vi khuẩn lactic

Hoạt tính kháng khuẩn và sinh bacteriocin của các chủng vi khuẩn lactic: tất cả 10 chủng vi khuẩn lactic được kiểm tra khả năng hình thành bacteriocin bằng phương pháp khuếch tán giếng thạch (bảng 2), tính kháng khuẩn được biểu hiện khi đường kính vòng vô khuẩn lớn hơn 5 mm [15]. Mười chủng vi khuẩn lactic đã phân lập đều có khả năng tạo vòng vô khuẩn ức chế vi khuẩn *Propionibacterium* spp., trong đó chủng L39 tạo đường kính vòng vô khuẩn lớn nhất là 10,16 mm đối với chủng PO và 14,16 mm đối với chủng PM.

Bảng 2. Khả năng ức chế vi khuẩn *Propionibacterium* spp. của các chủng LAB.

LAB	Đường kính vòng kháng khuẩn PO ¹ (mm)	Đường kính vòng kháng khuẩn PM ¹ (mm)	LAB	Đường kính vòng kháng khuẩn PO ¹ (mm)	Đường kính vòng kháng khuẩn PM ¹ (mm)
L26	5,50 ^d	6,50 ^d	L52	6,00 ^d	5,50 ^{ef}
L2	5,50 ^d	5,16 ^f	L37	7,50 ^c	6,00 ^{de}
L30	5,83 ^d	8,00 ^c	L7	8,50 ^b	5,50 ^{ef}
L11	6,00 ^d	13,33 ^b	L54	9,16 ^b	13,33 ^b
L9	6,00 ^d	13,16 ^b	L39	10,16 ^a	14,16 ^a
CV (%)	6,76	4,50	CV (%)	6,76	4,50

Ghi chú: ¹Giá trị trong bảng là giá trị trung bình của 3 lần lặp lại. Các giá trị trung bình trong cùng một cột theo sau có các mẫu tự giống nhau thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê với độ tin cậy 95%.

Định danh vi khuẩn lactic có khả năng kháng *Propionibacterium* spp: kết quả giải trình tự và truy vấn cơ sở dữ liệu NCBI cho thấy trình tự chủng L39 tương đồng với *L. plantarum* chủng 7.11E với mức tương đồng 98%. Khi khảo sát các đặc tính hình thái, sinh lý và sinh hoá tế bào của chủng L39 sau phân lập cho thấy, chủng L39 là trực khuẩn Gram dương, không có hoạt tính oxidase và catalase, có khả năng sinh acid phân giải CaCO₃ [16]. So với đặc điểm sinh hoá, kết quả giải trình tự tương đồng với vi khuẩn *L. plantarum* là phù hợp. Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu đi trước trên *L. plantarum* là loài vi khuẩn lactic có tiềm năng sinh chất kháng khuẩn mạnh như acid hữu cơ, hydrogen peroxide, diacetyl, bacteriocin [17, 18].

Điều kiện nuôi cấy vi khuẩn lactic trên nước chua tàu hũ cho khả năng kháng khuẩn *Propionibacterium* spp.

Nguồn carbon, nitơ và khoáng thích hợp cho khả năng sinh chất kháng khuẩn của chủng *L. plantarum* L39 từ nước chua tàu hũ: kết quả cho thấy, đường kính vòng kháng khuẩn đạt cao nhất ở nghiệm thức 2 khi môi trường nước chua tàu hũ bổ sung sucrose 2% (w/v), peptone 1% (w/v) và K₂HPO₄ 2% (w/v) (bảng 3). Tính kháng khuẩn yếu khi môi trường bổ sung maltose 2% (w/v) và có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê. Kết quả này tương ứng với thí nghiệm của Todorov về khả năng sinh chất kháng khuẩn biến động theo hàm lượng và thành phần carbon của môi trường ảnh hưởng đến khả năng sinh trưởng của tế bào vi khuẩn [19]. Trong thí nghiệm của Todorov, *Lactobacillus* spp. không sinh nhiều bacteriocin ST22Ch khi môi trường được bổ sung maltose và gluconate.

Bảng 3. Tác động của nguồn carbon, nitơ và khoáng thích hợp cho sinh chất kháng khuẩn của vi khuẩn lactic từ nước chua tàu hủ.

STT	Nhiệm thức	Đường kính vòng kháng khuẩn chủng PO (mm) ¹	STT	Nhiệm thức	Đường kính vòng kháng khuẩn chủng PO (mm) ¹
1	Glucose-Peptone-K ₂ HPO ₄	10,83 ^{bc}	15	Maltose-Tryptone-MgSO ₄	0,00 ^k
2	Glucose-Peptone-KH ₂ PO ₄	6,67 ^{ghi}	16	Maltose-Yeast Extract-K ₂ HPO ₄	0,00 ^k
3	Glucose-Peptone-MgSO ₄	0,00 ^k	17	Maltose-Yeast Extract-KH ₂ PO ₄	6,00 ^{ghi}
4	Glucose-Tryptone-K ₂ HPO ₄	9,50 ^{cd}	18	Maltose-Yeast Extract-MgSO ₄	11,33 ^{ab}
5	Glucose-Tryptone-KH ₂ PO ₄	11,17 ^{ab}	19	Sucrose-Peptone-K ₂ HPO ₄	12,67 ^a
6	Glucose-Tryptone-MgSO ₄	7,33 ^{ghi}	20	Sucrose-Peptone-KH ₂ PO ₄	9,00 ^{bc}
7	Glucose-Yeast Extract-K ₂ HPO ₄	7,50 ^{de}	21	Sucrose-Peptone-MgSO ₄	0,00 ^k
8	Glucose-Yeast Extract-KH ₂ PO ₄	0,00 ^k	22	Sucrose-Tryptone-K ₂ HPO ₄	5,50 ^j
9	Glucose-Yeast Extract-MgSO ₄	6,67 ^{ghi}	23	Sucrose-Tryptone-KH ₂ PO ₄	0,00 ^k
10	Maltose-Peptone-K ₂ HPO ₄	6,33 ^{ghi}	24	Sucrose-Tryptone-MgSO ₄	5,83 ^{ji}
11	Maltose-Peptone-KH ₂ PO ₄	6,67 ^{ghi}	25	Sucrose-Yeast Extract-K ₂ HPO ₄	7,67 ^{de}
12	Maltose-Peptone-MgSO ₄	7,33 ^{ghi}	26	Sucrose-Yeast Extract-KH ₂ PO ₄	5,83 ^{ji}
13	Maltose-Tryptone-K ₂ HPO ₄	9,50 ^{cd}	27	Sucrose-Yeast Extract-MgSO ₄	0,0 ^k
14	Maltose-Tryptone-KH ₂ PO ₄	9,833 ^{bcd}			

Ghi chú: ¹Giá trị trong bảng là giá trị trung bình của 3 lần lặp lại. Các giá trị trung bình trong cùng một cột theo sau có các ký tự giống nhau thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê với độ tin cậy 95%; CV=12,97 (%).

Kết quả cho thấy, nghiệm thức tối ưu được xác định ở môi trường có bổ sung sucrose là nguồn carbon chính cũng phù hợp với nghiên cứu gần đây của Lê Ngọc Thùy Trang và Phạm Minh Nhật trên môi trường chứa 2% w/v sucrose [20]. Về tính kinh tế, sucrose có nhiều trong các nhóm sản phẩm đường sản xuất như đường mía và đường củ cải vốn đa dạng về nguồn cung. Giá thành rẻ giúp sản xuất hoạt chất sinh học như bacteriocin ở quy mô công nghiệp có tính khả thi cao hơn. Từ đó, việc thích ứng với đường sucrose giúp tăng tiềm năng ứng dụng chủng *L. plantarum* L39 trong thực tế. Nguồn đạm phổ biến như peptone được sản xuất từ nhiều nguyên liệu khác nhau có giá thành rẻ, dễ sản xuất và có tính khả thi khi ứng dụng ở quy mô công nghiệp. Peptone cũng là một trong những thành phần của môi trường MRS nên có khả năng tương tác tốt trong chính môi trường của nó. So với các nguồn khoáng khác, kết quả thí nghiệm cho thấy K₂HPO₄ có khả năng hỗ trợ sinh bacteriocin tốt nhất cho *Lactobacillus* spp. tương tự kết quả nghiên cứu của Todorov và Dicks, mức sản xuất bacteriocin của chủng *L. plantarum* ST23LD khi môi trường bổ sung 0,2, 0,5 và 1,0 g/l KH₂PO₄ cao hơn khi bổ sung 0,2 g/l K₂HPO₄ [21].

So với tăng sinh kháng khuẩn trong môi trường MRS với đường kính vòng kháng *B. subtilis* của *L. plantarum* L54 (13,67 mm) [22], đường kính vòng kháng khuẩn sinh ra khi nuôi cấy chủng *L. plantarum* L39 trong môi trường

nước chua tàu hủ bổ sung sucrose-peptone-K₂HPO₄ (12,67 mm) là thấp hơn. Thực tế, MRS là môi trường chuyên nuôi cấy *Lactobacillus* spp. với các thành phần dinh dưỡng chọn lọc đặc biệt phù hợp với giá thành cao. Việc tận dụng nước chua tàu hủ là nguồn phụ phẩm phẩm trong nuôi cấy chủng *L. plantarum* L39 mang tính kinh tế và bảo vệ môi trường với đường kính kháng khuẩn thấp hơn (12,67 mm so với 13,67 mm của MRS) là chấp nhận được.

Các nghiệm thức 19, 20, 21, 23 và 26 cũng sử dụng sucrose như nghiệm thức tối ưu nhưng lại không tạo chất kháng khuẩn. Tương tự, nghiệm thức 23 và 24 đối với peptone và nghiệm thức 27 đối với K₂HPO₄ cũng không tạo chất kháng khuẩn mặc dù đơn lẻ sử dụng các thành phần như nghiệm thức tối ưu. Bên cạnh đó, khả năng sinh chất kháng khuẩn theo thành phần và điều kiện môi trường của *Lactobacillus* spp. là sự phản ứng của biểu hiện gene, kích thích sản xuất protein kháng khuẩn. Vì vậy, việc tối ưu hoá một số yếu tố như hàm lượng đường, pH và mật số giống chủng ở nội dung tiếp theo có thể giúp cải thiện khả năng tạo bacteriocin của *L. plantarum* L39.

Nồng độ giống chủng, hàm lượng đường và pH thích hợp cho khả năng sinh chất kháng khuẩn của chủng *L. plantarum* L39 được trình bày ở bảng 4.

Bảng 4. Ảnh hưởng của nồng độ giống chủng, hàm lượng đường và pH thích hợp cho khả năng sinh chất kháng khuẩn của chủng L39.

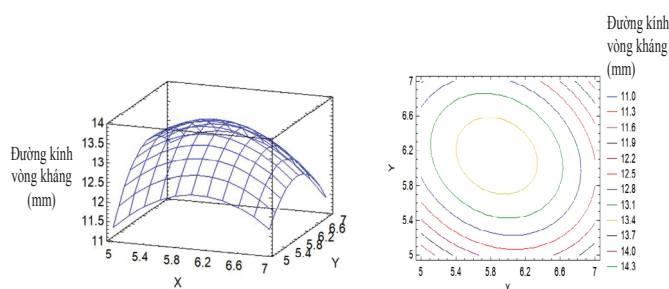
STT	Hàm lượng đường % (w/v)-pH- Mật số chủng (log tế bào/ml)	Đường kính trung bình vòng kháng khuẩn chủng PO ¹ (mm)	Đường kính trung bình vòng kháng khuẩn chủng PM ¹ (mm)	STT	Hàm lượng đường % (w/v)-pH- Mật số chủng (log tế bào/ml)	Đường kính trung bình vòng kháng khuẩn chủng PO ¹ (mm)	Đường kính trung bình vòng kháng khuẩn chủng PM ¹ (mm)
1	5-5-5	10,50	5,50	15	6-6-7	13,00	8,33
2	5-5-6	10,67	6,17	16	6-7-5	10,50	7,16
3	5-5-7	11,00	6,33	17	6-7-6	12,67	7,50
4	5-6-5	12,00	7,50	18	6-7-7	14,00	8,50
5	5-6-6	12,00	8,17	19	7-5-5	10,33	7,50
6	5-6-7	15,33	7,17	20	7-5-6	12,17	6,83
7	5-7-5	11,33	6,00	21	7-5-7	11,83	7,00
8	5-7-6	12,33	6,67	22	7-6-5	12,17	7,33
9	5-7-7	11,33	6,33	23	7-6-6	12,83	6,83
10	6-5-5	12,00	5,33	24	7-6-7	11,17	5,67
11	6-5-6	11,83	6,17	25	7-7-5	11,67	5,50
12	6-5-7	13,00	6,67	26	7-7-6	12,67	5,50
13	6-6-5	13,00	7,16	27	7-7-7	11,17	5,50
14	6-6-6	13,67	8,50				

Ghi chú: ¹Giá trị trong bảng là giá trị trung bình của 3 lần lặp lại.

Số liệu của thí nghiệm được ghi nhận và phân tích bằng phần mềm thống kê Statgraphic Centurion XV nhằm thiết lập phương trình hồi quy nhiều biến (hình 1 và hình 2), dựa

vào phương trình này có thể xác định được nghiệm thức tối ưu cho việc sản xuất bacteriocin từ chủng *L. plantarum* L39 kháng chủng chỉ thị.

Khả năng kháng khuẩn chủng PO: đồ thị mặt đáp ứng và đồ thị đường định mức của đường kính vòng kháng khuẩn chủng PO (hình 1) của vi khuẩn lactic cho thấy, với hàm lượng đường 5,87% (w/v), pH 6,14 và mật số giống chủng log 7 (10^7 tế bào/ml) là điều kiện tối ưu cho khả năng sinh chất kháng khuẩn kháng chủng chỉ thị. Đường kính vòng kháng theo kiểm chứng đạt 14,00 mm. Điều kiện dinh dưỡng theo nghiệm thức tối ưu cao hơn so với kết quả nghiệm thức 19 ở bảng 3 (12,67 mm). Kết quả kháng khuẩn cũng tương ứng với nghiên cứu gần đây của Sabrina Sabo và cộng sự, khi cải thiện sản xuất bacteriocin từ vi khuẩn *L. plantarum* ST16Pa từ phế phẩm sữa bột, hoạt tính kháng khuẩn kháng *Literia innocua* 6A CLIST2865 với đường kính 13,23 mm [23].



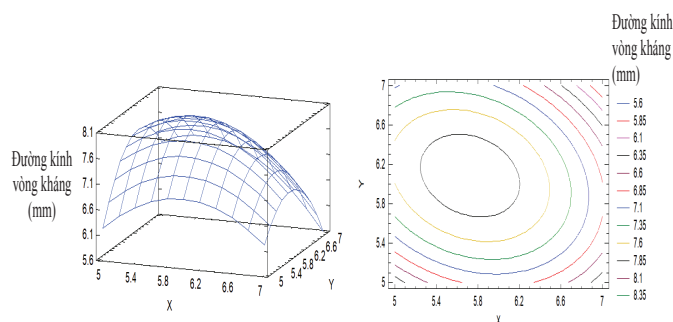
Hình 1. Đồ thị mặt đáp ứng và đường định mức của đường kính vòng kháng khuẩn PO theo mật độ giống chủng = log 7 tế bào/ml, hàm lượng đường = X và pH = Y.

$$\begin{aligned} \text{Đường kính vòng kháng khuẩn PO} = & -44,6111 + 5,87963 \cdot X - 2,43068 \cdot 10^{-11} \cdot 7 + 6,06481 \cdot Y - \\ & 0,861111 \cdot X \cdot X + 0,902778 \cdot X \cdot 7 + 0,972222 \cdot X \cdot Y - \\ & 0,416667 \cdot 7 \cdot 7 + 1,125 \cdot 7 \cdot Y - 0,972222 \cdot Y \cdot Y - \\ & 0,1875 \cdot X \cdot 7 \cdot Y. \end{aligned}$$

Nhiều nghiên cứu cho thấy, pH là yếu tố hết sức quan trọng đối với quá trình sinh trưởng và phát triển của vi sinh vật. Khalid kết luận sự tăng trưởng tối ưu cho LAB là ở mức pH acid nhẹ 5,0-6,0 [24]. Từ kết quả cho thấy, chủng *L. plantarum* L39 được kích thích sản xuất bacteriocin ở pH 6,14 là phù hợp với nghiên cứu trên.

Khả năng kháng khuẩn chủng PM: từ đồ thị mặt đáp ứng và đồ thị đường định mức của đường kính vòng kháng khuẩn PM (hình 2) của vi khuẩn lactic cho thấy, với hàm lượng đường X=5,73% (w/v), pH=6,09 và mật số giống chủng log 7 (tế bào/ml) là điều kiện tối ưu cho khả năng sinh chất kháng khuẩn kháng chủng chỉ thị PM. Vòng kháng khuẩn ở

nghiệm thức tốt nhất đạt 8,5 mm (bảng 4), kiểm chứng điều kiện tối ưu đạt đường kính 8,5 mm. So với nghiên cứu đi trước về nuôi cấy trên môi trường MRS trên *L. plantarum* kháng *B. subtilis* tạo đường kính vòng kháng đạt 10,33 mm [25], kết quả này thấp hơn. Tuy nhiên, việc sử dụng nước chua tàu hủ để nuôi cấy vi khuẩn lactic mang lại ý nghĩa về kinh tế hơn so với môi trường MRS chuyên dùng, tiềm năng cao trong sản xuất chất kháng khuẩn ở quy mô công nghiệp.



Hình 2. Đồ thị mặt đáp ứng và đường định mức của đường kính vòng kháng khuẩn PM theo mật độ giống chủng = log 7 tế bào/ml, hàm lượng đường = X và pH = Y.

$$\begin{aligned} \text{Đường kính vòng kháng PM} = & -114,951 + 17,5741 \cdot X + 8,91667 \cdot 7 + 18,9259 \cdot Y - 0,731481 \cdot X \cdot X - 1,0 \cdot X \cdot 7 - \\ & 1,23611 \cdot X \cdot Y - 0,231481 \cdot 7 \cdot 7 - 0,75 \cdot 7 \cdot Y - \\ & 0,953704 \cdot Y \cdot Y + 0,125 \cdot X \cdot 7 \cdot Y \end{aligned}$$

Onwuakor phát hiện rằng, sản xuất bacteriocin tối ưu bởi bốn loài *Lactobacillus*: *L. lactis*, *L. fermentum*, *L. casei* và *L. plantarum*, hoạt tính kháng *Salmonella typhimurium* xảy ra ở pH 5,0-6,0 [26]. Như vậy, pH tối ưu của thí nghiệm (6,09) là tương đối phù hợp. Bên cạnh đó, mật số giống chủng 10^7 (tế bào/ml) được sử dụng trong bố trí nghiên cứu thu được kết quả cao ở hầu hết các nghiệm thức. Mục đích của quá trình nuôi cấy chủng *L. plantarum* lactic L39 là thu nhận tế bào có hoạt tính kháng chủng chỉ thị mạnh, mật số vi khuẩn cao, giúp cho việc thích nghi với môi trường và sinh sản tế bào diễn ra tốt hơn [27].

Từ kết quả nghiên cứu cho thấy, hàm lượng đường tối ưu sinh chất kháng khuẩn kháng chủng chỉ thị PO và PM tương đối gần nhau, lần lượt là 5,87 và 5,73% (w/v). Mặc dù các điều kiện hàm lượng đường, pH và nồng độ giống chủng khác nhau nhưng hoạt tính kháng khuẩn đều được thể hiện qua các vòng kháng khuẩn ở hầu hết các giếng thạch, thí nghiệm cho thấy hoạt tính của các thành phần kháng khuẩn có sẵn trong tế bào chủng *L. plantarum* L39 có tác động đến chủng chỉ thị ở mức độ mạnh hay yếu phụ thuộc vào các điều kiện dinh dưỡng và môi trường [28].

Khả năng nuôi cấy vi khuẩn lactic sinh chất kháng khuẩn từ nước chua tàu hủ ở quy mô 2 lít

Từ kết quả thí nghiệm tối ưu với hàm lượng đường từ 5,73-5,87% (w/v), pH 6,09-6,14 và mật số giống chủng log 7 (tế bào/ml) được đánh giá là điều kiện thích hợp để *L. plantarum* L39 sinh chất kháng khuẩn. Khi tăng sinh chủng *L. plantarum* L39 trong môi trường nước chua tàu hủ quy mô 2 lít ở điều kiện tối ưu thì hoạt tính kháng khuẩn thấp hơn so với vòng kháng tối ưu PO và PM kiểm chứng ở quy mô 100 ml trong thí nghiệm trước (14,00 và 8,50 mm) với đường kính vòng kháng khuẩn ở chủng chỉ thị PO và PM lần lượt là 11,33 mm và 5,50 mm. Callewaert và De Vuyst đã tăng quy mô sản xuất bacteriocin và ghi nhận sự suy giảm hoạt tính kháng khuẩn riêng của bacteriocin sinh ra bởi *Lactobacillus amylovorus* DCE 471, qua đó minh chứng sự giảm hoạt tính là do sự tích tụ acid lactic khi lên men quy mô lớn [27].

Như vậy, khả năng kháng khuẩn của *L. plantarum* L39 với vi khuẩn gây mụn *Propionibacterium* spp. cho thấy tiềm năng ứng dụng rất lớn của chủng này trong sản xuất mỹ phẩm, nhằm đảm bảo an toàn sức khỏe con người. Suda (2012) đã có kết luận, bacteriocin của *L. plantarum* gồm enterocin AS-48 và lacticin 3147 là an toàn và có độ bền cao phù hợp với sản xuất công nghiệp [29]. Do đó, triển vọng sản xuất bacteriocin từ *L. plantarum* L39 ứng dụng trong công nghiệp mỹ phẩm trị mụn là phù hợp.

Kết luận

Nghiên cứu đã phân lập được 2 chủng vi khuẩn *Propionibacterium* spp. (PO và PM) từ 8 mẫu nhân mụn. Trong 10 chủng vi khuẩn lactic thử nghiệm, chủng L39 có khả năng sinh bacteriocin kháng chủng chỉ thị PO và PM tốt nhất với đường kính vòng kháng đạt lần lượt 10,16 mm và 14,16 mm. Kết quả giải trình tự 16S rRNA và so sánh tương đồng cơ sở dữ liệu gene NCBI cho thấy, PO và L39 tương đồng vi khuẩn *P. acnes* DNF00413 với độ tương đồng 99% và *L. plantarum* chủng 7.11E với độ tương đồng 98%. Điều kiện thích hợp cho nuôi cấy chủng *L. plantarum* L39 từ nước chua tàu hủ sinh chất kháng khuẩn được xác định ở môi trường bổ sung sucrose 2% (w/v), peptone 1% (w/v) và K_2HPO_4 2% (w/v), hàm lượng đường từ 5,73-5,87% (w/v), pH từ 6,09-6,14 và mật số giống chủng log 7 (tế bào/ml). Khi nuôi cấy ở quy mô 2 lít với điều kiện thích hợp, đường kính vòng kháng chủng PO và PM đạt lần lượt 11,33 mm và 5,5 mm, mở ra triển vọng ứng dụng trong lĩnh vực làm đẹp và chăm sóc sức khỏe con người.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] S.J. Rhee, J.E. Lee and C.H. Lee (2011), "Importance of lactic acid bacteria in Asian fermented foods", *Microbial Cell Factories*, doi: 10.1186/1475-2859-10-S1-S5.
- [2] J.A. Ayukekbong, M. Ntemgwa, and A.N. Atabe (2017), "The threat of antimicrobial resistance in developing countries: causes and control strategies", *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, **6**, p.47.
- [3] J.K. Swanson (2003), "Antibiotic resistance of *Propionibacterium acnes* in acne vulgaris", *Dermatology Nursing*, **15**(4), pp.359-362.
- [4] W.P. Bowe, J.C. Filip, J.M. DiRienzo, A. Volgina, and D.J. Margolis (2006), "Inhibition of *Propionibacterium acnes* by bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS) produced by *Streptococcus salivarius*", *Journal of Drugs in Dermatology*, **5**(9), pp.868-870.
- [5] K.R. Sanjay, R. Subramanian, A. Senthil and G. Vijayalakshmi (2008), "Use of natural coagulants of plant origin in production of soycurd (Tofu)", *International Journal of Food Engineering*, **4**(8), pp.45-50.
- [6] J.D. De Man, M. Rogosa and M.E. Sharpe (1960), "A Medium for the Cultivation of Lactobacilli", *Journal Applied Bacteriology*, **23**, pp.30-135.
- [7] G. William, M. Barns Susan, A. Pelletier Dale and J. Lane David (1991), "16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study", *Journal of Bacteriology*, **173**, pp.697-703.
- [8] D. Hernández, E. Cardell and V. Zárate (2004), "Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from Tenerife cheese: Initial characterization of plantaricin TF711, a bacteriocin-like substance produced by *Lactobacillus plantarum* TF711", *Journal of Applied Microbiology*, **99**, pp.77-84.
- [9] K. Piwowarek, E. Lipińska, E. Hać-Szymańczuk, M. Kieliszek and I. Ścibisz (2018), "*Propionibacterium* spp. - source of propionic acid, vitamin B12, and other metabolites important for the industry", *Applied Microbiology and Biotechnology*, **10**, pp.515-538.
- [10] H. Charles (1974), "Properties of *Corynebacterium acnes* bacteriophage and description of an interference phenomenon", *American Society for Microbiology*, **14**, pp.1268-1273.
- [11] M.H. Amini and E.T. Richetti (2015), "Periprosthetic infection in shoulder and elbow joints", *Management of Periprosthetic Joint Infections*, **40**, pp.239-446.
- [12] S.M. Butler-Wu (2011), "Optimization of periprosthetic culture for the diagnosis of *Propionibacterium acnes* prosthetic joint infection", *Journal of Clinical Microbiology*, **49**, pp.2490-2495.
- [13] T. Ulrika, C. Stéphane, B. Bertrand, Z. Werner and T. Andrej (2012), "Role of rifampin against *Propionibacterium acnes* biofilm in vitro and in an experimental foreign-body infection model", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **56**(4), pp.1885-1891.
- [14] J.G. Holt, N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Stanley, and S.T. Williams (1994), *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9th Ed. Williams and Wilkins, Baltimore, USA.

- [15] Ngô Thị Phương Dung, Huỳnh Thị Yến Ly và Huỳnh Xuân Phong (2011) “Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn lactic có khả năng sinh chất kháng khuẩn”, *Tạp chí Nghiên cứu khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, **19a**, tr.176-184.
- [16] Lương Liễu Như (2014), *Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn lactic chịu nhiệt từ trái cây*, Luận văn đại học chuyên ngành công nghệ sinh học, Trường Đại học Cần Thơ.
- [17] M.A. Herreros, H. Sandoval, L. González, J.M. Castro, J.M. Fresno and M.E. Tornadijo (2005), “Antimicrobial activity and antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese (a Spanish goats’ milk cheese)”, *Food Microbiology*, **22**, pp.455-459.
- [18] N. Tharmaraj and P.N. Shah (2009), “Antimicrobial effects of probiotics against selected pathogenic and spoilage bacteria in cheese-based dips”, *International Food Research Journal*, **16**, pp.261-276.
- [19] S.D. Todorov, M. Vaz-Velho and B.D.G.M. Franco (2013), “Partial characterization of bacteriocins produced by three strains of *Lactobacillus sakei*, isolated from salpicão, a fermented meat product from North-West of Portugal”, *Food Control*, **30**, pp.111-121.
- [20] Lê Ngọc Thùy Trang và Phạm Minh Nhứt (2014), “Phân lập và khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến khả năng sinh hợp chất kháng khuẩn của *Lactobacillus plantarum*”, *Tạp chí Sinh học*, **36(1se)**, tr.97-106.
- [21] S.D. Todorov and L.M.T. Dicks (2006), “Effect of medium components on bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* strains ST23LD and ST341LD, isolated from spoiled olive brine”, *Microbiological Research*, **161(2)**, pp.102-108.
- [22] Huỳnh Nguyễn Như Thu, Bui Hoàng Đăng Long, Huỳnh Xuân Phong, Takeshi Zendo, Kenji Sonomoto and Ngô Thị Phương Dung (2017), “Selection of thermotolerant lactic acid bacteria producing high antibacterial activity and production of biomass from tofu sour liquid”, *Can Tho University Journal of Science*, **07**, pp.51-57.
- [23] S. Sabrina Sabo, Attilio Converti, Simone Ichiwaki and Ricardo P.S. Oliveira (2018), “Bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* ST16Pa in supplemented whey powder formulations”, *Journal of Dairy Science*, **102(1)**, pp.87-99.
- [24] K. Khalid, R. Siddiqi and N. Mojgani (1999), “Detection and characterization of a heat stable bacteriocin (lactocin LC-09) produced by a clinical isolate of lactobacilli”, *Medical Journal of Islamic World Academy of Sciences*, **12(3)**, pp.67-71.
- [25] Bùi Hoàng Đăng Long, Huỳnh Xuân Phong, Nguyễn Ngọc Thanh và Ngô Thị Phương Dung (2018), “Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn lactic chịu nhiệt từ phụ phẩm nông nghiệp”, *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Đồng Tháp*, **31**, tr.91-97.
- [26] C.E. Onwuakor, V.O. Nwaugo, C.J. Nnadi and J.M. Emetole (2014), “Effect of varied culture conditions on crude supernatant (bacteriocin) production from four *Lactobacillus* species isolated from locally fermented maize”, *American Journal of Microbiology Research*, **2**, pp.125-130.
- [27] R. Callewaert, and L. De Vuyst (2000), “Bacteriocin production with *Lactobacillus amylovorus* DCE 471 is improved and stabilized by fed-batch fermentation”, *Applied and Environmental Microbiology*, **66(2)**, pp.606-613.
- [28] M. Mataragas, E.H. Drosinos, E. Tsakalidou and J. Metaxopoulos (2004), “Influence of nutrients on growth and bacteriocin production by *Leuconostoc mesenteroides* L124 and *Lactobacillus curvatus* L442”, *Antonie van Leeuwenhoek*, **85**, pp.191-198.
- [29] S. Suda, P.D. Cotter, C. Hill and P. Ross (2012), “Lactacin 3147-biosynthesis, molecular analysis, immunity, bioengineering and applications”, *Current Protein & Peptide Sciences*, **13**, pp.193-204.

Biểu hiện của protein TIF-1A và sự sinh tổng hợp RNA ribosome tăng cao ở khối u của bệnh nhân ung thư đại - trực tràng

Võ Nguyễn Thanh Thảo¹, Hoàng Đình Hòa², Huỳnh Vũ¹, Hồ Hữu Đức³,
Nguyễn Lê Xuân Trường^{1,2}, Nguyễn Đăng Quân^{1*}

¹Trung tâm Công nghệ Sinh học TP Hồ Chí Minh

²Trung tâm Y khoa City of Hope, Duarte, California, Hoa Kỳ

³Bệnh viện Thống Nhất TP Hồ Chí Minh

Ngày nhận bài 14/3/2019; ngày chuyển phản biện 15/3/2019; ngày nhận phản biện 19/4/2019; ngày chấp nhận đăng 6/5/2019

Tóm tắt:

Ung thư đại - trực tràng là một trong năm loại ung thư phổ biến trên thế giới và là nguyên nhân gây tử vong thứ hai sau ung thư phổi. Bệnh ung thư đại - trực tràng thường diễn tiến âm thầm và không có các triệu chứng rõ ràng. Biện pháp chủ yếu hiện nay được sử dụng để điều trị ung thư đại - trực tràng là phẫu thuật, cùng với đó là hoá trị, xạ trị và thuốc sinh học nhắm trúng đích. Tuy nhiên, tình trạng tái phát bệnh sau điều trị rất phổ biến. Do vậy, rất cần thực hiện các nghiên cứu để hiểu rõ hơn về cơ chế phân tử của bệnh, từ đó phát triển các liệu pháp điều trị hữu hiệu hơn. Trong nghiên cứu này, các tác giả phân tích mức độ tăng biểu hiện của protein TIF-1A ở mô ung thư đại - trực tràng so với mô bình thường lân cận, đồng thời đánh giá mối liên hệ giữa sự tăng biểu hiện của protein TIF-1A với mức độ sinh tổng hợp RNA ribosome bằng kỹ thuật PCR định lượng (qRT-PCR) và Western blot. Kết quả cho thấy, protein TIF-1A biểu hiện cao hơn rõ rệt trong mẫu mô ung thư đại - trực tràng so với mẫu mô bình thường lân cận, và lượng rRNA được tổng hợp cũng cao hơn tương ứng với mức độ biểu hiện TIF-1A. Các kết quả này cho thấy TIF-1A đóng vai trò quan trọng trong hoạt động của các tế bào ung thư đại - trực tràng.

Từ khóa: ribosomal RNA, TIF-1A, ung thư đại - trực tràng.

Chỉ số phân loại: 3.5

Tổng quan

Ung thư đại - trực tràng là một trong năm loại ung thư phổ biến trên thế giới, tính tới năm 2018 toàn thế giới có 881.000 người chết vì ung thư đại - trực tràng, là nguyên nhân gây tử vong thứ hai sau ung thư phổi. Trong đó, số ca mới mắc tăng lên 1,8 triệu, đứng thứ ba chỉ sau ung thư phổi, vú [1].

Ung thư đại - trực tràng khởi phát từ các tế bào bất thường ở niêm mạc đại - trực tràng hình thành các polyp. Đa số polyp là lành tính, tuy nhiên cũng có một số polyp có thể phát triển thành ung thư trong những điều kiện nhất định. Ung thư đại - trực tràng thường diễn tiến âm thầm và sự phát triển của nó có liên quan đến môi trường sống, lối sống và cả yếu tố di truyền. Phẫu thuật là phương pháp phổ biến để điều trị ung thư đại - trực tràng; bên cạnh đó các phương pháp hoá trị, xạ trị hoặc sử dụng các thuốc sinh học nhắm trúng đích cũng được áp dụng trong điều trị bệnh. Tuy nhiên, nguy cơ tái phát bệnh cao và tiên lượng bệnh xấu vẫn khá cao, hơn 50% bệnh nhân tái phát sau điều trị và chết vì di căn [2]. Do vậy, rất cần thực hiện các nghiên cứu để hiểu rõ hơn về cơ chế phân tử của bệnh, từ đó phát triển các liệu

pháp điều trị hữu hiệu hơn.

Quá trình tế bào chuyển dạng từ bình thường sang ác tính xảy ra song hành với sự gia tăng hoạt động của tế bào như biến dưỡng, sinh tổng hợp các thành phần của tế bào để phân bào. Trong đó, quá trình sinh tổng hợp protein là nền tảng quan trọng. Quá trình tổng hợp protein phụ thuộc vào sự tổng hợp ribosome và quá trình phiên mã của RNA ribosome (rRNA) xảy ra trong hạch nhân tế bào và được điều khiển bởi RNA Polymerase I (Pol I) [3-5]. Ngoài ra, một số yếu tố gây ung thư bao gồm sự biểu hiện vượt mức protein, sự đột biến, sự chuyển vị của protein làm thay đổi các con đường tín hiệu của tế bào và tác động trực tiếp trên các protein quan trọng đối với sự phiên mã rRNA. Do đó, sự tổng hợp rRNA là yếu tố rất quan trọng đối với sự phát triển của tế bào ung thư [6].

Yếu tố khởi đầu phiên mã I (TIF-1A) là một yếu tố điều hòa quan trọng của quá trình tổng hợp rRNA thông qua việc thúc đẩy sự gắn kết của phân tử RNA Polymerase I (Pol I) với promoter của ribosome DNA [7]. TIF-1A được chứng minh là biểu hiện cao trong nhiều dòng tế bào ung thư và đóng vai trò quan trọng trong việc điều hòa sinh tổng hợp

*Tác giả liên hệ: Email: ndquan.snn@tphcm.gov.vn

Expression of TIF-IA protein and biosynthesis of ribosomal RNA highly increase in colorectal cancer patients' tumors

Nguyen Thanh Thao Vo¹, Dinh Hoa Hoang²,
Vu Huynh¹, Huu Duc Ho³,
Le Xuan Truong Nguyen^{1,2}, Dang Quan Nguyen^{1*}

¹Biotechnology Center of Ho Chi Minh city

²City of Hope Medical Center, Duarte, California, USA

³Thong Nhat Hospital - Ho Chi Minh city

Received 14 March 2019; accepted 6 May 2019

Abstract:

Colorectal cancer is amongst the five most common cancers worldwide, and has the second highest fatality rate behind lung cancer. The signs and symptoms of this disease are often difficult to detect in early stages. The current treatment methods generally are surgery, chemotherapy, radiation therapy, and targeted bio-drugs. However, many patients suffer the relapse after treatment. A better understanding of the cellular and molecular mechanisms of colorectal cancer is required for developing more effective therapies. In this study, the authors investigated the expression of TIF-IA protein in colorectal cancer tissues in comparison with adjacent non-neoplastic tissues and also evaluated its effect in regulation of rRNA biosynthesis by real-time quantitative PCR (qRT-PCR) and Western-blotting analysis. Results showed that the expression of TIF-IA in colorectal cancer tissue samples was significantly higher than in the adjacent non-neoplastic samples. Moreover, the expression levels of TIF-IA was highly correlated to the amount of rRNA synthesized. These results suggest that TIF-IA plays an important role in the activities of colorectal cancer cells.

Keywords: colorectal cancer, ribosomal RNA, TIF-IA.

Classification number: 3.5

rRNA cũng như sự tăng sinh tế bào. Mặc dù vậy, cho đến nay chưa có bằng chứng trực tiếp về sự tăng sinh tổng hợp rRNA và TIF-IA ở mô ung thư đại - trực tràng của bệnh nhân. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đánh giá mức độ biểu hiện của protein TIF-IA ở mẫu mô ung thư đại - trực tràng của bệnh nhân người Việt Nam và xác định mối liên hệ giữa mức độ biểu hiện của protein TIF-IA với mức độ tổng hợp rRNA trong các mẫu ung thư thu nhận được.

Vật liệu, phương pháp nghiên cứu

Thu thập khối u sơ cấp đại - trực tràng và mô đại - trực tràng bình thường từ bệnh nhân

Khối u sơ cấp và mô bình thường lân cận của 30 bệnh nhân ung thư đại - trực tràng người Việt Nam được thu nhận sau khi bệnh nhân được tiến hành phẫu thuật loại bỏ khối u theo chỉ định điều trị tại Bệnh viện Thống Nhất TP Hồ Chí Minh. Bệnh nhân ung thư đại - trực tràng được chẩn đoán và phân loại theo quy trình được thực hiện thường quy tại bệnh viện. Sau phẫu thuật, một phần khối u và mô bình thường sẽ được lưu trữ ngay lập tức vào một ống ly tâm vô trùng 15 ml có chứa dung dịch PBS lạnh cùng kháng sinh và vận chuyển đến Trung tâm Công nghệ Sinh học TP Hồ Chí Minh, mô được lưu trữ ở nhiệt độ -80°C.

Tách chiết RNA và protein tổng

RNA tổng được tách chiết bằng bộ kit RNAeasy Plus kit (Qiagen) theo quy trình của nhà sản xuất. Đối với tách chiết protein tổng, 300 mg mô được cắt nhuyễn bằng kéo, ủ với dung dịch ly giải (RIPA buffer, Thermo Fisher) có chứa 1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride và 10 mM hỗn hợp chất ức chế protease, ủ ở 25°C trong 5 phút, thu dịch nổi sau ly tâm 16.000 g trong 3 phút, nhiệt độ phòng.

Phân tích mức độ tổng hợp rRNA

1 µg RNA tổng thu nhận từ các mẫu mô được chuyển thành cDNA sử dụng Superscript III first strand cDNA reverse transcription kit (Invitrogen). Phản ứng PCR định lượng (qRT-PCR) rRNA trong mẫu cDNA được thực hiện với cặp mồi chuyên biệt cho vùng 5'ETS (external transcribed spacer) của phân tử tiền-rRNA: 5'ETS pre-RNA-F 5'-gaacgggtgtgtctgttc-3', 5'ETS pre-RNA-R 5'-gcgtctcgtctcgtctcact-3'. Phản ứng qRT-PCR định lượng gene giữ nhà Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNA trong mẫu cũng được thực hiện để làm đối chứng nội với cặp mồi GAPDH-F 5'-ccccttcattgacctcaactacat-3', GAPDH-R 5'-cgctcctggaagatggtga-3'. Mức độ biểu hiện tương đối của rRNA trong mẫu mô ung thư và mô bình thường lân cận so với mRNA của chứng nội GAPDH có trong cùng 1 mẫu được xác định bằng giá trị $2^{-(Ct\ rRNA - Ct\ GAPDH)}$. Mỗi mẫu được thực hiện qRT-PCR 3 lần, giá trị biểu hiện tương đối của

rRNA/mRNA GAPDH là giá trị trung bình của 3 lần lặp lại.

Phân tích sự biểu hiện của protein TIF-1A bằng Western blot

50 µg protein dịch ly giải tế bào được phân tách bằng gel polyacrylamide 10%. Sau đó, protein từ gel sẽ được chuyển lên màng PVDF (GE) bằng phương pháp bán ẩm, màng PVDF lần lượt được khóa trong dung dịch TBST 5% sữa gầy, ủ với kháng thể kháng TIF-1A và với kháng thể kháng IgG có gắn HRP (Thermo Fisher Scientific), đọc tín hiệu với hóa chất ECL (Thermo Fisher Scientific). β-actin được sử dụng như chứng nội.

Phương pháp phân tích số liệu

Thí nghiệm được lặp lại 3 lần và số liệu được phân tích thống kê bằng phần mềm Graphpad Prism. Hệ số tương quan R được tính bằng phần mềm Excel.

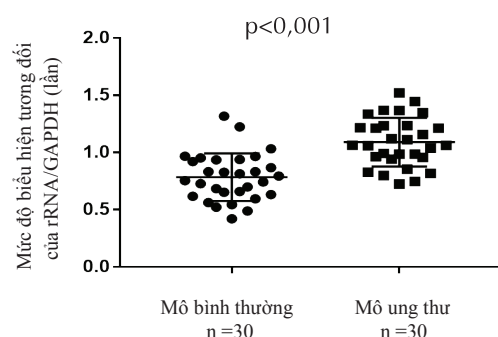
Kết quả và thảo luận

So sánh mức độ tổng hợp rRNA giữa mẫu mô ung thư đại - trực tràng và mẫu mô bình thường lân cận

Quá trình sinh tổng hợp protein đóng vai trò nền tảng cho hoạt động sống và phát triển của tế bào. Tế bào ung thư có đặc tính hoạt động và phân bào rất mạnh, điều này dẫn đến giả thiết là hoạt động sinh tổng hợp protein của chúng sẽ cao hơn các tế bào bình thường. Do đó, sinh tổng hợp protein ở tế bào ung thư là cơ chế quan trọng mà những hiểu biết cận kề về nó có thể giúp phát triển các liệu pháp tiêu diệt tế bào ung thư hữu hiệu nhưng ít tác động đến tế bào bình thường. Quá trình sinh tổng hợp protein cao đòi hỏi nhiều ribosome hình thành trong tế bào. Trong phức hợp ribosome, ribosomal RNA đóng vai trò thiết yếu. Vì vậy, ở các tế bào ung thư đang phân chia mạnh, mức độ tổng hợp rRNA có thể tăng cao hơn so với tế bào bình thường. Để chứng minh nhận định trên, chúng tôi đánh giá so sánh mức độ biểu hiện của rRNA trong 30 cặp mẫu khối u ung thư đại - trực tràng và mô bình thường lân cận. Lượng rRNA hiện diện trong mẫu mô ung thư và mô bình thường được xác định trực tiếp qua số lượng phân tử tiền-rRNA bằng phản ứng qRT-PCR sử dụng cặp primer khuếch đại đặc hiệu vùng 5'ETS của tiền-rRNA. Trong thí nghiệm này, chúng tôi sử dụng mRNA của gene giữ nhà GAPDH làm chứng nội, mức độ biểu hiện tương đối của rRNA trong một mẫu mô được đánh giá dựa trên chứng nội này.

Kết quả trình bày ở hình 1 cho thấy, các mẫu mô ung thư đại - trực tràng có mức độ biểu hiện rRNA cao hơn so với các mẫu mô bình thường lân cận. Ở 30 mẫu mô ung thư, trung bình lượng rRNA (so sánh với chứng nội là mRNA gene giữ nhà GAPDH) biểu hiện là 1,1 lần trong khi trung bình lượng rRNA ở mẫu mô bình thường lân cận là 0,75 lần. Như vậy có thể thấy, trung bình các tế bào trong mô

ung thư đại - trực tràng biểu hiện lượng rRNA cao gấp 1,47 lần tế bào trong mô bình thường lân cận. Sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê ở mức $p < 0,001$. Kết quả này phù hợp với các nhận định rằng, ở tế bào ung thư quá trình sinh tổng hợp rRNA tăng cao hơn ở tế bào bình thường và từ đó có thể thúc đẩy sự sinh tổng hợp protein của tế bào ung thư. Kết quả của chúng tôi là bằng chứng đầu tiên và trực tiếp chứng minh có sự tăng tổng hợp của rRNA ở khối u ung thư đại - trực tràng của bệnh nhân Việt Nam so với mô bình thường.



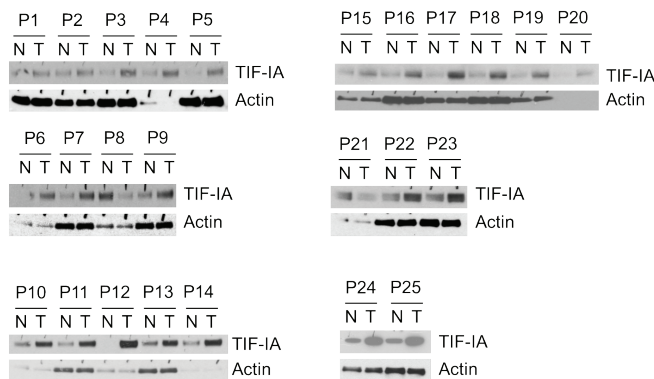
Hình 1. So sánh mức độ tổng hợp rRNA giữa các mẫu ung thư đại - trực tràng và mẫu mô bình thường. 30 cặp mẫu mô ung thư đại - trực tràng và mô bình thường lân cận được tách chiết RNA tổng và thực hiện phản ứng qRT-PCR với mỗi đặc hiệu cho vùng 5'ETS pre-rRNA và GAPDH. Mức độ biểu hiện tương đối của rRNA so với GAPDH trong từng mẫu được xác định và thể hiện trên đồ thị. Giá trị trung bình và độ lệch chuẩn mức độ biểu hiện tương đối rRNA/GAPDH của 30 mẫu được xác định và so sánh ý nghĩa thống kê giữa nhóm mô ung thư và nhóm mô bình thường lân cận.

Protein TIF-1A biểu hiện cao ở mẫu mô ung thư đại - trực tràng

Sau khi xác định có sự gia tăng tổng hợp rRNA ở mô ung thư đại - trực tràng, chúng tôi tiến hành tìm hiểu nguyên nhân của hiện tượng này. Yếu tố đầu tiên chúng tôi chọn để khảo sát là yếu tố khởi đầu phiên mã I (TIF-1A). TIF-1A là yếu tố trung gian quan trọng lôi kéo phức hợp Pol I đến vùng promoter của rDNA và khởi đầu quá trình phiên mã tạo ra rRNA [7]. Sự tăng tổng hợp rRNA có thể có liên quan đến sự tăng biểu hiện và/hoặc tăng hoạt động của protein TIF-1A. Các kết quả nghiên cứu trước đây của chúng tôi cho thấy TIF-1A biểu hiện cao và đóng vai trò quan trọng trong việc tăng mức độ tổng hợp rRNA trong các tế bào lympho T [8]. Do đó, chúng tôi so sánh mức độ biểu hiện của protein TIF-1A ở các mẫu mô ung thư đại - trực tràng và mô bình thường lân cận.

Kết quả phân tích Western blot từ 25 mẫu khối u và mô bình thường lân cận thu nhận từ bệnh nhân ung thư đại - trực tràng cho thấy, protein TIF-1A biểu hiện cao hơn rõ rệt ở khối u so với mô bình thường trong hầu hết mẫu khảo

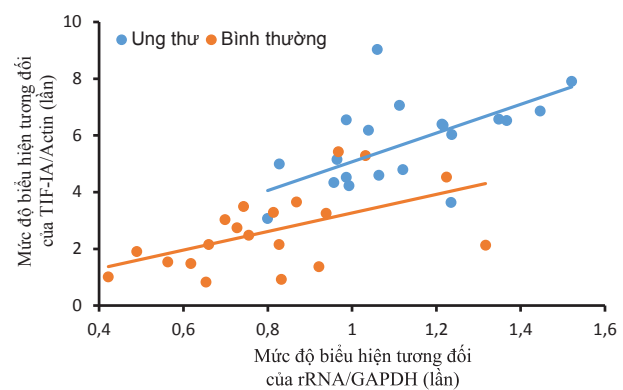
sát (hình 2). Trong 25 cặp mẫu khảo sát, có 2 cặp mẫu cho kết quả TIF-IA biểu hiện ở mô ung thư thấp hơn ở mô bình thường lân cận (mẫu 8 và 21). Chúng tôi chưa giải thích được lý do của 2 trường hợp ngoại lệ này. Mức độ biểu hiện TIF-IA trong các mẫu mô ung thư này cũng khá đa dạng, thể hiện qua cường độ tín hiệu khác nhau trên màng lai. Kết quả cho thấy, protein TIF-IA được biểu hiện mạnh trong các mô ung thư đại - trực tràng và protein này có thể giữ vai trò quan trọng trong hoạt động của các tế bào ung thư.



Hình 2. Phân tích sự biểu hiện của TIF-IA ở các cặp mẫu mô ung thư và mô bình thường lân cận. 50 μ g protein tổng của dịch ly giải từ 25 cặp mô ung thư (T) và mô bình thường lân cận (N) được phân tích SDS-PAGE và Western blotting với các kháng thể kháng TIF-IA và Actin (chứng nội).

Tương quan giữa mức độ tổng hợp rRNA và biểu hiện TIF-IA ở mô ung thư đại - trực tràng

Như đã đề cập, quá trình sinh tổng hợp rRNA phụ thuộc vào hiệu quả của sự hình thành phức hợp khởi đầu phiên mã Pol I mà yếu tố khởi đầu phiên mã TIF-IA là thành phần quan trọng. Khi phân tích mối liên hệ giữa sự biểu hiện TIF-IA và mức độ tổng hợp rRNA trong 20 mẫu mô ung thư đại - trực tràng, chúng tôi nhận thấy về cơ bản 2 yếu tố này có tương quan tỷ lệ thuận với nhau với hệ số tương quan R là 0,54. Những mẫu mô ung thư có protein TIF-IA biểu hiện càng mạnh thì lượng rRNA được tổng hợp càng cao (hình 3). Mối tương quan thuận giữa sự tăng biểu hiện TIF-IA và tăng tổng hợp rRNA cũng quan sát được ở các mẫu mô lành lân cận với hệ số tương quan R là 0,53 (hình 3). Điều này cho thấy, tương quan giữa TIF-IA và rRNA xảy ra ở cả mô ung thư cũng như mô bình thường. Đáng lưu ý là ở các mẫu mô ung thư đại - trực tràng, sự tăng biểu hiện tương ứng của TIF-IA và rRNA cao hơn rõ rệt so với ở các mẫu mô bình thường lân cận. Kết quả này cho thấy khả năng TIF-IA có thể giữ vai trò quan trọng trong việc thúc đẩy mạnh sự sinh tổng hợp rRNA trong tế bào ung thư đại - trực tràng. Đây có thể là một đặc điểm khác biệt quan trọng trong hoạt động của tế bào ung thư so với tế bào bình thường.



Hình 3. Mối tương quan giữa sự biểu hiện TIF-IA và mức độ tổng hợp rRNA ở mẫu mô ung thư và mô bình thường lân cận. Mức độ biểu hiện tương đối của rRNA so với GAPDH được xác định bằng kỹ thuật qRT-PCR. Mức độ biểu hiện tương đối của TIF-IA so với Actin được đo bằng giá trị cường độ tín hiệu vạch protein trên màng lai Western blot bằng phần mềm GeneSys (Syngene, United Kingdom). Mối tương quan giữa mức độ biểu hiện tương đối TIF-IA và mức độ biểu hiện tương đối rRNA ở 20 cặp mẫu mô ung thư và mô lành lân cận được so sánh. 20 cặp mẫu mô được chọn phân tích là những mẫu có kết quả Western blot đủ chất lượng để phân tích tín hiệu bằng phần mềm.

Quá trình sinh tổng hợp ribosomal RNA (rRNA) là quá trình thiết yếu cho việc tăng sinh của tế bào. Yếu tố khởi đầu phiên mã protein TIF-IA hoạt động như một yếu tố trung gian để lôi kéo phức hợp Pol I đến promoter của rDNA và khởi đầu quá trình phiên mã. Số lượng và độ phức tạp của các tương tác protein-protein liên quan đến sự khởi đầu và kéo dài của quá trình phiên mã rRNA là rất quan trọng đối với việc điều hòa tăng sinh tế bào ở cả tế bào bình thường và tế bào ung thư. TIF-IA được xem như một protein quan trọng trong nhiều loại tế bào ung thư. Chúng tôi đã chứng minh rằng, việc kích hoạt protein Akt làm gia tăng sự tổng hợp rRNA và tăng sinh của tế bào ung thư máu thông qua quá trình điều hòa biểu hiện protein TIF-IA và kích hoạt TIF-IA [9]. Gần đây, chúng tôi cũng chứng minh TIF-IA đóng vai trò như một yếu tố hỗ trợ cho một protein gắn kết với thụ thể ErbB3 (Ebp1) trong việc điều khiển sự tăng sinh của tế bào T thông qua kiểm soát sự biểu hiện protein p53 và protein kháng nguyên tăng sinh trong nhân tế bào (PCNA) [10]. Các kết quả trên cho thấy, TIF-IA đóng vai trò thiết yếu trong việc điều hòa sự tăng sinh tế bào ở cả tế bào bình thường và tế bào ung thư. Chúng tôi đã phát hiện ra TIF-IA đồng tồn tại với dạng đồng phân TIF-90 và hiện diện cùng vị trí với Pol I ở vị trí tổng hợp rRNA. Biểu hiện vượt mức TIF-90 cũng làm gia tăng sự gắn kết của Pol I vào rDNA thông qua thử nghiệm kết tủa miễn dịch nhiễm sắc thể (ChIP assay). Kết quả này phù hợp với việc gia tăng sự tổng hợp của tiền-rRNA khi biểu hiện vượt mức TIF-90. Ngược lại, khi sự biểu hiện của TIF-90 bị kim hãm thì sẽ dẫn đến sự giảm mạnh của quá trình tổng hợp tiền-rRNA cũng như sự

bám dính của Pol I vào rDNA. TIF-90 phối hợp với Akt để thúc đẩy quá trình tổng hợp rRNA cùng với sự tăng sinh tế bào bằng cách bám trực tiếp vào sản phẩm phân cắt của Filamin A và ức chế tác động của sản phẩm phân cắt này lên quá trình tổng hợp rRNA trên tế bào ung thư bạch cầu cấp [8]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi thấy rằng, protein TIF-IA biểu hiện cao hơn rõ rệt trong mẫu mô ung thư đại - trực tràng so với mẫu mô bình thường lân cận, và lượng rRNA được tổng hợp cũng cao hơn tương ứng với mức độ biểu hiện TIF-IA. Các kết quả này cho thấy khả năng TIF-IA đóng vai trò quan trọng trong hoạt động của tế bào ung thư đại - trực tràng.

Kết luận và khuyến nghị

Đây là dữ liệu trực tiếp và đầu tiên cho thấy có sự gia tăng biểu hiện của yếu tố khởi đầu phiên mã TIF-IA và sự sinh tổng hợp ribosomal RNA ở mô ung thư đại - trực tràng của bệnh nhân. Kết quả nghiên cứu này góp phần củng cố nhận định rằng TIF-IA giữ vai trò quan trọng trong ung thư đại - trực tràng và nhiều dạng ung thư khác. Cần phải thực hiện thêm nhiều nghiên cứu để hiểu rõ cơ chế phân tử của TIF-IA trong thúc đẩy hoạt động của tế bào ung thư đại - trực tràng phân lập trực tiếp từ khối u của bệnh nhân. Đây có thể là nền tảng quan trọng để phát triển các liệu pháp mới và hiệu quả cho việc điều trị bệnh ung thư đại - trực tràng tại Việt Nam.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ Phát triển Khoa học và Công nghệ Quốc gia (NAFOSTED) thông qua đề tài mã số 106-YS.02-2015.60. Nhóm tác giả xin trân trọng cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] F. Bray, J. Ferlay, I. Soerjomataram, R.L. Siegel, L.A. Torre, A. Jemal (2018), "Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries", *CA: A Cancer J. Clin.*, **68**, pp.394-424.
- [2] P. Bastos, H. Cardoso, F. Ferreira, P. Pimentel-Nunes, C. Bartosch, C. Souto-Moura, A. Ribeiro, and G. Macedo (2010), "Adenocarcinoma of the colon associated with hyperplastic polyposis", *Gastroenterol. Hepatol.*, **33**, pp.470-471.
- [3] L. Comai (2004), "Mechanism of RNA polymerase I transcription", *Adv. Protein Chem.*, **67**, pp.123-155.
- [4] J.R. Haag and C.S. Pikaard (2007), "RNA polymerase I: a multifunctional molecular machine", *Cell*, **131**, pp.1224-1225.
- [5] J. Russell and J.C. Zomerdijsk (2006), "The RNA polymerase I transcription machinery", *Biochem. Soc. Symp.*, **73**, pp.203-216.
- [6] R.J. White (2005), "RNA polymerases I and III, growth control and cancer", *Nat. Rev. Mol. Cell Bio.*, **6**, pp.69-78.
- [7] X.T. Nguyen Le, A. Raval, J.S. Garcia, and B.S. Mitchell (2015), "Regulation of ribosomal gene expression in cancer", *J. Cell Physiol.*, **230**, pp.1181-1188.
- [8] X.T. Nguyen Le, S.M. Chan, T.D. Ngo, A. Raval, K.K. Kim, R. Majeti, and B.S. Mitchell (2014), "Interaction of TIF-90 and filamin A in the regulation of rRNA synthesis in leukemic cells", *Blood*, **124**, pp.579-589.
- [9] X.T. Nguyen Le and B.S. Mitchell (2013), "Akt activation enhances ribosomal RNA synthesis through casein kinase II and TIF-IA", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, pp.20681-20686.
- [10] X.T. Nguyen Le, Y. Lee, L. Urbani, P.J. Utz, A.W. Hamburger, J.B. Sunwoo, and B.S. Mitchell (2015), "Regulation of ribosomal RNA synthesis in T cells: requirement for GTP and Ebp1", *Blood*, **125**, pp.2519-2529.

Kết quả phân tích tương quan giữa một số chỉ tiêu sinh trưởng cành quả và năng suất quả trên cây bưởi Da xanh tại Thái Nguyên

Chu Thúc Đạt^{1*}, Nguyễn Thị Thu Hà², Nguyễn Tiến Dũng³, Nguyễn Thị Tình³, Bùi Trí Thức³,
Tống Hoàng Huyền¹, Nguyễn Văn Liễu¹, Ngô Xuân Bình³

¹Bộ KH&CN

²Trường Cao đẳng Kinh tế Kỹ thuật, Đại học Thái Nguyên

³Trường Đại học Nông lâm, Đại học Thái Nguyên

Ngày nhận bài 22/4/2019; ngày chuyển phản biện 25/4/2019; ngày nhận phản biện 22/5/2019; ngày chấp nhận đăng 29/5/2019

Tóm tắt:

Nghiên cứu phân tích mối tương quan giữa một số chỉ tiêu sinh trưởng cành quả và năng suất quả trên cây bưởi Da xanh được thực hiện tại vườn thí nghiệm ở xã Tứ Tranh, huyện Phú Lương, tỉnh Thái Nguyên trong năm 2017-2018. Kết quả phân tích tương quan giữa chỉ tiêu sinh trưởng cành quả (đường kính, chiều dài, số lá) với năng suất quả bưởi Da xanh cho thấy, hệ số tương quan r lần lượt là: 0,31; 0,21 và 0,04, qua đó khẳng định có sự tương quan không chặt giữa các chỉ tiêu sinh trưởng nêu trên với năng suất quả. Điều này cho thấy, cành quả chủ yếu đóng vai trò mang quả và vận chuyển dinh dưỡng nuôi quả, năng suất quả sẽ do sức sống của toàn bộ cây quyết định. Vì vậy, để tăng năng suất quả của bưởi Da xanh trồng tại Thái Nguyên cần có các biện pháp kỹ thuật nâng cao sức sống của toàn bộ cây.

Từ khóa: bưởi Da xanh, cành quả, năng suất, sinh trưởng, tương quan.

Chỉ số phân loại: 4.1

Đặt vấn đề

Bưởi (*Citrus grandis*) là một trong những loài cây ăn quả có múi có giá trị dinh dưỡng cao. Cây bưởi có khả năng thích nghi tốt, có thể trồng được ở nhiều vùng sinh thái khác nhau, tạo nên những vùng quả đặc sản như bưởi Phúc Trạch, Năm Roi, Phú Diễn, Đoan Hùng.

Thái Nguyên là một tỉnh thuộc vùng trung du miền núi phía Bắc, có điều kiện sinh thái phù hợp với nhiều loại cây trồng khác nhau, vì thế có tiềm năng phát triển nhiều loại cây ăn quả có múi nói chung và cây bưởi nói riêng. Trong những năm gần đây, bưởi Da xanh đã được người dân đưa về trồng ở một số nơi trên địa bàn tỉnh. Cây bưởi Da xanh cũng giống như các loài cây ăn quả khác, có các đặc điểm sinh học điển hình như quá trình phân hóa lộc, hoa, mối liên hệ sinh trưởng giữa các đợt lộc, đặc điểm sinh trưởng của cành quả và khả năng cho năng suất quả. Để thấy được mối liên hệ giữa các đặc điểm sinh trưởng của cành quả với năng

suất quả của bưởi Da xanh tại Thái Nguyên, việc nghiên cứu các đặc điểm sinh học, mối tương quan giữa chỉ tiêu sinh trưởng cành quả và năng suất quả, đồng thời xác định được các yếu tố ảnh hưởng để làm luận cứ khoa học cho việc xây dựng các biện pháp kỹ thuật nâng cao năng suất, chất lượng quả bưởi Da xanh là rất cần thiết. Bài báo này tập trung phân tích mối tương quan giữa một số chỉ tiêu sinh trưởng cành quả và năng suất quả trên cây bưởi Da xanh trồng tại Thái Nguyên.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu

Nghiên cứu được thực hiện trên vườn bưởi Da xanh 7 năm tuổi trồng tại vườn thí nghiệm ở xã Tứ Tranh, huyện Phú Lương, tỉnh Thái Nguyên. Các biện pháp kỹ thuật như bón phân, phòng trừ sâu bệnh, cỏ dại được tiến hành đồng đều trên khu thí nghiệm. Thời gian thực hiện thí nghiệm trong năm 2017, 2018.

*Tác giả liên hệ: chuthucdat@gmail.com.

Results of correlative analysis between some growth criteria of fruit bearing branches and fruit yield of Da xanh pummelo (*C. grandis*)

Thuc Dat Chu¹, Thi Thu Ha Nguyen²,
Tien Dung Nguyen³, Thi Tinh Nguyen³, Tri Thuc Bui³,
Hoang Huyen Tong¹, Van Lieu Nguyen¹, Xuan Binh Ngo³

¹Ministry of Science and Technology

²College of Economics and Techniques, Thai Nguyen University

³Thai Nguyen University of Agriculture and Forestry

Received 22 April 2019; accepted 29 May 2019

Abstract:

The study was carried out to determine the relationship between some growth criteria of fruit bearing branches and the fruit yield of Da xanh pummelo (*C. grandis*) cultivated in Tuc Tranh commune, Phu Luong district, Thai Nguyen province during 2017-2018. The correlative analysis between the growth criteria of fruit bearing branches (diameter, length, and total leaves) and the fruit yield exhibited the correlation coefficient (r) as 0.31, 0.21, and 0.04, respectively, which reveals that there was a low correlation between the growth criteria of fruit bearing branches and theirself fruit yield. This also showed that the fruit bearing branches almost played roles as bearing fruits and carrying nutrients for fruit growth, while the fruit yield would be determined by the vitality of the whole tree. Therefore, it is necessary to apply the technique solution to improving the tree's vitality in order to improve the fruit yield of Da xanh pummelo in Thai Nguyen province.

Keywords: correlation, Da xanh pummelo, fruit bearing branch, fruit yield, growth.

Classification number: 4.1

Phương pháp bố trí thí nghiệm và các chỉ tiêu theo dõi

Phương pháp bố trí thí nghiệm: chọn ngẫu nhiên 10 cây thí nghiệm. Cây làm thí nghiệm đồng đều, đại diện cho sức sinh trưởng bình thường của cây trong khu vườn thí nghiệm, cây không bị sâu bệnh phá hoại. Trên mỗi cây chọn 4 cành ngang tán đều về 4 phía - là những cành trên 1 năm tuổi. Chọn cành có đường kính khoảng 3,0 cm, tiến hành đánh dấu cành phân sát với thân chính, theo dõi khả năng ra lộc, sinh trưởng của cành mẹ, tuổi cành mẹ ở phần đánh dấu trở lên, khi cành ra lộc, tiến hành đánh dấu lộc trong đó ghi rõ ngày tháng ra lộc, theo dõi liên tục các đợt lộc mọc trên cành thí nghiệm trong thời gian 1 năm. Tổng số cành thí nghiệm ban đầu là 30 cành, được theo dõi các chỉ tiêu sinh trưởng của các cành quả và năng suất quả, trên cơ sở đó sử dụng phép toán học để phân tích mối tương quan giữa các chỉ tiêu sinh trưởng của cành quả và năng suất quả.

Các chỉ tiêu và phương pháp theo dõi: các chỉ tiêu sinh trưởng của cành quả gồm: chiều dài, đường kính, số lá, được đo đếm riêng rẽ trên các cành quả thí nghiệm; các chỉ tiêu về năng suất quả của cành quả cũng được đo đếm riêng cho từng cành mang quả. Các số liệu được phân tích bằng phần mềm thống kê để xác định mối tương quan giữa sinh trưởng cành quả và năng suất. Mức độ tương quan tuyến tính giữa các chỉ tiêu sinh trưởng (biến x) và năng suất quả (biến y) được xác định theo giá trị hệ số tương quan (r) như sau: $r > 0,8$: tương quan chặt chẽ; $r = 0,6 - < 0,8$: tương quan mức tương đối chặt chẽ; $r = 0,4 - < 0,6$: tương quan mức trung bình; $r < 0,4$: tương quan không chặt chẽ.

Kết quả và thảo luận

Khả năng sinh trưởng của cành quả và năng suất quả

Trong quá trình sinh trưởng và ra hoa kết quả, tiến hành phân tích theo chức năng. Cành cây thuộc họ cam quýt nói chung và cây bưởi nói riêng gồm ba loại cành: cành dinh dưỡng có vai trò quang hợp và tạo bộ khung tán; cành mẹ có vai trò sinh ra cành quả và các loại cành khác; cành quả là cành trực tiếp mang hoa, mang quả. Kết quả đánh giá một số chỉ tiêu sinh trưởng cành quả, năng suất quả và mối tương quan giữa các chỉ tiêu với năng suất quả được trình bày ở bảng 1 và các đồ thị 1, 2, 3.

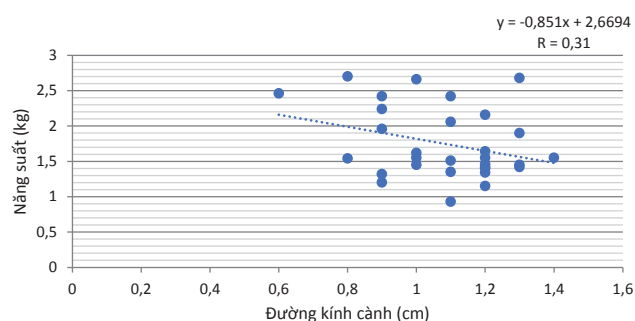
Bảng 1. Một số chỉ tiêu sinh trưởng cành quả và năng suất quả của bưởi Da xanh

Cành quả	Đường kính (cm)	Chiều dài (cm)	Số lá (lá)	Năng suất (kg quả/cành)
1	1,0	10,5	1,0	2,66
2	0,9	8,5	0,0	1,20
3	1,3	6,4	0,0	1,45
4	1,1	9,5	0,0	0,93
5	0,8	12,3	2,0	2,70
6	0,6	12,5	1,0	2,46
7	1,3	10,5	0,0	1,42
8	1,4	12,0	1,0	1,55
9	1,1	13,5	2,0	1,51
10	1,2	10,5	1,0	1,34
11	0,9	13,5	3,0	2,42
12	1,2	14,0	2,0	2,16
13	0,8	11,0	2,0	1,54
14	1,1	14,5	2,0	2,06
15	1,2	12,5	1,0	1,55
16	0,9	13,0	2,0	1,96
17	1,2	12,4	2,0	1,46
18	1,3	14,5	2,0	2,68
19	1,1	13,5	1,0	2,42
20	1,2	15,5	2,0	1,42
21	0,9	16,5	3,0	1,32
22	1,2	15,0	3,0	1,64
23	1,3	14,5	1,0	1,90
24	1,0	17,0	5,0	1,62
25	1,2	11,0	1,0	1,15
26	0,9	18,0	2,0	2,24
27	1,2	14,5	3,0	1,40
28	1,0	12,5	5,0	1,55
29	1,1	14,5	3,0	1,35
30	1,0	17,0	4,0	1,45
Trung bình	1,1	13,2	1,9	1,75
Cv%	9,3	12,4	9,1	10,2

Đường kính cành quả dao động từ 0,6 đến 1,4 cm, số lượng cành mẹ có đường kính nhỏ hơn 1 cm chiếm tỷ lệ 26,67%, những cành có đường kính lớn hơn 1 cm chiếm tỷ lệ 73,33%.

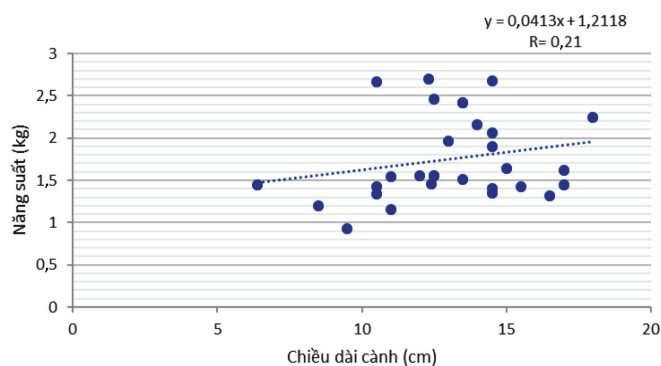
Mối quan hệ giữa các chỉ tiêu đánh giá

Kết quả phân tích mối tương quan tuyến tính giữa đường kính cành quả với năng suất quả trên cành quả (đồ thị 1) cho thấy, hệ số tương quan $r=0,31$ thể hiện sự tương quan giữa đường kính cành quả với năng suất quả ở mức không chặt (độ tin cậy 95%).



Đồ thị 1. Mối tương quan giữa đường kính cành quả và năng suất quả.

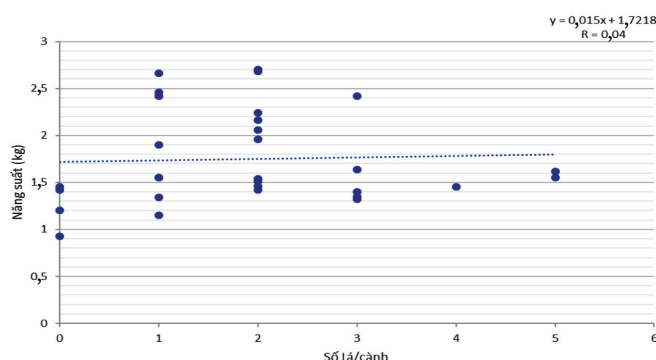
Chiều dài cành quả dao động từ 6,4 đến 18 cm (trung bình là 13,2 cm), kết quả phân tích mối tương quan tuyến tính giữa chiều dài cành quả với năng suất quả được thể hiện qua đồ thị 2, hệ số tương quan $r=0,21$ thể hiện sự tương quan giữa chiều dài cành và năng suất quả ở mức không chặt (độ tin cậy 95%).



Đồ thị 2. Mối tương quan giữa chiều dài cành quả và năng suất quả.

Số lá/cành quả dao động từ 0 đến 5 lá, đạt trị số trung bình là 1,9 lá/cành. Mối tương quan tuyến tính giữa số lá của cành quả và năng suất quả được thể hiện qua đồ thị 3, với hệ số tương quan $r=0,04$ thể hiện mức tương quan không chặt. Thực tế qua quá trình nghiên cứu nhiều năm về cây bưởi chúng tôi nhận thấy: sinh trưởng của cành quả, đặc biệt là số lá/cành quả hầu như không liên quan đến quá trình ra hoa và kết quả ở cây bưởi. Những năm cây ít hoa, cành quả mọc từ mầm bất định trên thân chính thành các chùm hoa lớn không có lá vẫn có thể đậu quả rất tốt. Sự quan sát

trên cũng trùng lặp với nhiều ý kiến cho rằng: tỷ lệ đậu quả và năng suất quả phụ thuộc nhiều vào sự thuần thực (tuổi) của cành mẹ và sức sinh trưởng của toàn cây hơn là đặc điểm sinh trưởng cụ thể của cành mẹ hay cành quả [1, 2].



Đồ thị 3. Mối tương quan giữa số lá của cành quả và năng suất quả.

Một số tác giả cho rằng, số lá/cành mẹ và cành quả không hoặc rất ít ảnh hưởng đến năng suất quả, nhưng tổng số lá của cây tính trung bình cho một quả là một chỉ tiêu rất quan trọng (Wakana, 1998 [2]; Walter Reuther, 1989 [3, 4]; M. Wendell, 1997 [5]). Tác giả Turrell (1961) [6] cũng chỉ ra rằng: ở cây cam quýt 9 năm tuổi cần phải có ít nhất 2,3 m² lá để sản xuất 1 kg quả. Tác giả Trần Như Ý và cộng sự (2000) [7] trong giáo trình cây ăn quả đã trích dẫn một số kết quả nghiên cứu của nước ngoài cho thấy, giống cam Navel (Mỹ) khi có trung bình 10 lá/quả, khối lượng quả đạt 70 g; 35 lá/quả, khối lượng quả đạt 120 g; 50 lá/quả, khối lượng quả đạt trung bình 180 g.

Theo Wakana (1998) [2], để quýt Ôn Châu có năng suất cao thì ít nhất phải có 40 lá trung bình cho 1 quả. Kết quả nghiên cứu về mối liên hệ sinh trưởng cành quả đến năng suất trình bày trong bài báo này có thể được giải thích theo các kết quả nghiên cứu vừa trình bày ở trên, đó là: năng suất quả phụ thuộc vào tổng diện tích lá, số lá/quả hoặc có thể phụ thuộc vào sức sinh trưởng của toàn bộ cây. Từ yêu cầu số lá trung bình/quả phải đạt một ngưỡng nhất định thì cây mới có khả năng cho năng suất

cao, việc giữ bộ lá của toàn cây luôn xanh tốt, bón phân cân đối, đầy đủ là điều kiện rất cần thiết để nâng cao năng suất, chất lượng quả ở cây họ cam quýt nói chung và cây bưởi Da xanh nói riêng.

Kết luận và kiến nghị

Trong điều kiện thời tiết, khí hậu của Thái Nguyên, các đặc điểm chiều dài, đường kính cành quả và số lá/cành quả của giống bưởi Da xanh có tương quan không chặt với năng suất quả. Tương quan tuyến tính giữa đường kính cành quả và năng suất quả có hệ số tương quan $r=0,31$, chiều dài cành quả và năng suất quả có hệ số tương quan $r=0,21$, số lá của cành quả và năng suất quả có hệ số tương quan $r=0,04$, giá trị của hệ số r đều ở mức tương quan không có ý nghĩa. Sự sinh trưởng và các chỉ tiêu sinh trưởng của cành quả như chiều dài, đường kính, số lá của cành quả hầu như không liên quan đến năng suất quả; cành quả chỉ đóng vai trò mang quả và vận chuyển dinh dưỡng nuôi quả, năng suất quả là do sức sống của toàn bộ cây quyết định.

Để tăng năng suất cho bưởi Da xanh trồng ở các tỉnh phía Bắc nói chung và tỉnh Thái Nguyên nói riêng, cần có các biện pháp kỹ thuật để nâng cao sức sống của toàn bộ cây.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] P.P. Raymond (1979), *Horticulture: Principle and Practical Applicatins*, Prentice - Hall, Inc., USA.
- [2] A.K. Wakana (1998), *The citrus production in the world*, Tokyo - Japan.
- [3] Walter Reuther (1989a), *The citrus industry*, **V2**, Puplication of University of California, USA.
- [4] Walter Reuther (1989b), *The citrus industry*, **V3**, Puplication of University of California, USA.
- [5] M. Wendell (1997), *Horticulture practise*, Springer - Verlag, Berlin.
- [6] F.M. Turrel (1961), "Growth of photosynthesis area of Citrus", *Bot. Gaz*, **122**, pp.284-298.
- [7] Trần Như Ý và cộng sự (2000), *Giáo trình cây ăn quả*, Trường Đại học Nông lâm Thái Nguyên, Nhà xuất bản Nông nghiệp.

Sinh trưởng hệ sợi và hình thành quả thể của nấm sò vua *Pleurotus eryngii* (DC.: Fr.) chủng E2

Nguyễn Thị Bích Thùy, Ngô Xuân Nghiễn, Lê Văn Vẽ*, Nguyễn Thị Luyến,
Nguyễn Thị Huyền Trang, Phan Thu Huyền

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

Ngày nhận bài 25/2/2019; ngày chuyển phản biện 28/2/2019; ngày nhận phản biện 27/3/2019; ngày chấp nhận đăng 2/4/2019

Tóm tắt:

Nghiên cứu này nhằm đánh giá ảnh hưởng của một số nhân tố đến sự sinh trưởng hệ sợi, hình thành và phát triển quả thể nấm sò vua chủng E2. Kết quả nghiên cứu cho thấy, chủng E2 có thể sinh trưởng tốt trên môi trường PGA cải tiến có pH từ 5 đến 12. Môi trường nuôi cấy thuần khiết tối ưu cho hệ sợi nấm sò vua sinh trưởng là môi trường PGA có bổ sung cao nấm men. Trong 5 môi trường nhân giống cấp 2 thử nghiệm, MT1 (99% thóc lứt + 1% CaCO_3) là môi trường cho hệ sợi sinh trưởng tốt nhất với tốc độ là 6,14 mm/ngày. Chủng E2 có thể hình thành mầm và phát triển quả thể ở cả 5 giá thể nuôi trồng. Trong đó, GT3 (59% mùn cưa + 20% lõi ngô + 20% cám mạch + 1% CaCO_3), GT2 (79% lõi ngô + 20% cám mạch + 1% CaCO_3) và GT1 (79% mùn cưa + 20% cám mạch + 1% CaCO_3) cho năng suất sinh học cao lần lượt là 54,37%, 51,84% và 48,85%.

Từ khóa: hệ sợi, lõi ngô, mùn cưa, nấm sò vua, sự hình thành quả thể.

Chỉ số phân loại: 4.1

Đặt vấn đề

Pleurotus eryngii (DC.: Fr.) Quél. thuộc họ Pleurotaceae, bộ Agaricales, lớp Agaricomycetes, ngành Basidiomycota [1]. Dựa trên tính tương hợp bắt cặp, nấm sò vua có thể được chia thành 3 loài chính: var. *eryngii*, var. *ferulae*, và var. *nebrodensis* [2]. Do có thể tiết ra các enzyme ngoại bào (cellulases, hemicellulases, pectinase, ligninase, protease và peptidases) trong quá trình sinh trưởng nên nấm sò vua là một trong hai loài thuộc chi nấm sò *Pleurotus*, có thể mọc và phát triển trên rễ hoặc gốc của một số loài thực vật họ *Apiaceae* [3-5].

Nấm sò vua có giá trị dinh dưỡng và dược liệu cao, được ứng dụng nhiều trong lĩnh vực y học [6-7]. Giá trị dinh dưỡng và dược liệu của nấm sò vua phụ thuộc vào chủng, giai đoạn phát triển và cơ chất nuôi trồng [8]. Theo Manzi và các cộng sự (1999; 2004) [9, 10], nấm sò vua chứa 9,4% carbohydrates, 0,5% chitin và 0,41% polysaccharides tính theo trọng lượng tươi. Hàm lượng nitrogen tổng số khoảng 5,30%, protein khoảng 1,88 đến 2,65%. Nấm sò vua có nhiều vitamin C, A, B2, B1, D, niacin, chất khoáng và hàm lượng lipid thấp (0,8%) [9]. Nấm sò vua có khả năng tổng hợp nhiều hợp chất có hoạt tính sinh học, trong đó, polysaccharides là hợp chất chính, giúp tăng cường hệ miễn dịch. Bên cạnh polysaccharides, nhiều hoạt chất sinh học được tìm thấy ở nấm sò vua như lovastatin giúp giảm cholesterol trong máu [11], pleureryn giúp ức chế quá trình phiên mã ngược của virus HIV [12] và eryngeolysin chống tăng sinh các tế bào bạch cầu, kháng vi

khẩn *Bacillus* spp. [13].

Nấm sò vua bắt đầu được nuôi trồng thương mại ở Italy vào những năm 1970 [14]. Ở Hàn Quốc, nấm sò vua là một trong những loài nấm ăn được nuôi trồng phổ biến và có giá trị thương mại cao [15]. Nhiệt độ thích hợp để nấm sò vua sinh trưởng hệ sợi là 25°C [16]. Độ ẩm giá thể tối ưu để nuôi trồng nấm sò vua từ 65-68% [17, 18]. Theo Zhang và các cộng sự (2014) [19], nấm sò vua có thể được nuôi trồng trên một số loại cơ chất như bông phế loại, mùn cưa, bã mía, vỏ đậu tương và bổ sung thêm các chất phụ gia như cám gạo, bột ngô. Bên cạnh đó, vỏ trấu có thể được sử dụng để làm giá thể nuôi trồng nấm sò vua [20]. Vỏ trấu được xử lý bằng methanol với nồng độ 20 mg/ml giúp kích thích hệ sợi nấm sò vua phát triển. Hỗn hợp bã mía và cám gạo có thể được sử dụng làm giá thể nuôi trồng với năng suất trung bình 74,3 g/lọ trong lần ra quả thể đầu tiên [21]. Theo Rodriguez Estrada và Royse (2007) [22], năng suất và hàm lượng các chất khoáng (N, P, Mg, Fe, B và Zn) có trong nấm sò vua phụ thuộc vào hàm lượng bột đậu tương được bổ sung vào cơ chất nuôi trồng. Bổ sung Mn với nồng độ 50 µg/g vào giá thể nuôi trồng giúp hiệu suất sinh học nấm sò vua đạt cao nhất. Nấm sò vua cần nhiệt độ lạnh khoảng 10-15°C trong một số ngày để kích thích hình thành mầm quả thể. Ở giai đoạn phát triển quả thể, nhiệt độ thích hợp là 13-15°C [23]. Nghiên cứu của Ryu và các cộng sự (2015) [18] cho thấy, giá thể tối ưu để kéo dài chu kỳ phát triển và tăng năng suất nấm sò vua là mùn cưa cây chi dương *Populus* 18,46%, lõi ngô 18,46%, lõi củ

*Tác giả liên hệ: vanvecnshk53@gmail.com

Mycelial growth and fruiting body formation of the king oyster mushroom *Pleurotus eryngii* (DC.: Fr.) strain E2

Thi Bích Thủy Nguyễn, Xuan Nghiên Ngô, Van Ve Lê*,
Thi Luyen Nguyễn, Thi Huyền Trang Nguyễn,
Thu Huyền Phan

Faculty of Biotechnology, Vietnam National University of Agriculture

Received 25 February 2019; accepted 2 April 2019

Abstract:

The aim of this study is to evaluate the influence of some factors on mycelial growth and fruiting body formation of the king oyster mushroom strain E2. Based on obtained results, the strain E2 is able to grow well on the modified PGA (Potato, Glucose, Agar) medium in a wide pH range from 5 to 12. The optimal pure culture medium for mycelial growth is the PGA supplemented with yeast extract. Among of 5 mother spawn media, MT1 (99% grain of rice + 1% CaCO_3) could be considered as the best medium with growth rate of 6.14 mm/day. The strain E2 is capable of growing to form and develop primordia in all five substrate mixtures. In addition, GT3 (59% sawdust + 20% corn cob + 20% wheat bran + 1% CaCO_3), GT2 (79% corn cob + 20% wheat bran + 1% CaCO_3), and GT1 (79% sawdust + 20% wheat bran + 1% CaCO_3) showed a high biological efficiency with 54.37%, 51.84%, and 48.85%, respectively.

Keywords: corn cob, fruiting body formation, king oyster mushroom, mycelium, sawdust.

Classification number: 4.1

cải đường (beet pulp) 9,23%, vỏ đậu tương 9,23%, hạt bông xay (cottonseed meal) 3,08%, bột đậu tương 9,23%, cám gạo 1,54%, gluten ngô (corn gluten feed) 7,69%, bột mạch nha 4,62%, bột ngô 3,08% và cám mì 15,38%. Thời gian hình thành mầm quả thể của nấm sò vua từ 26,2 đến 44,2 ngày, phụ thuộc vào loại cơ chất và tỷ lệ chất phụ gia [24]. Độ ẩm không khí phù hợp trong giai đoạn hình thành mầm và giai đoạn phát triển quả thể lần lượt là 95-100%, 85-90% [25].

Ở Việt Nam, nuôi trồng nấm sò vua vẫn còn nhiều hạn chế về giống và công nghệ nuôi trồng [26]. Công thức nguyên liệu tối ưu cho sự phát triển hệ sợi và quả thể của nấm sò

vua chủng E1 là 40% rom, 20% lõi ngô, 19% mùn cưa, 20% cám gạo và 1% bột nhẹ [26]. Các chương trình chọn và lai tạo giống nấm sò vua cho năng suất cao, kháng bệnh mới chỉ được khởi động và thực hiện trong thời gian gần đây. Để tạo nguồn vật liệu phục vụ cho các chương trình chọn tạo giống, việc thu thập và tối ưu quy trình nhân giống, nuôi trồng nấm sò vua cần được thực hiện. Mục tiêu của nghiên cứu này nhằm tối ưu một số nhân tố trong nhân giống và nuôi trồng chủng nấm sò vua E2 nhập nội.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu

Giống nấm sò vua E2 được thu thập từ Trung Quốc, lưu giữ và bảo quản trên môi trường PGA cải tiến (khoai tây: 200 g/l, giá đỗ: 200 g/l, glucose: 20 g/l, agar: 15 g/l).

Phương pháp

Sinh trưởng hệ sợi nấm sò vua chủng E2 trên môi trường nuôi cấy thuần khiết ở các ngưỡng pH khác nhau: chủng E2 được nuôi cấy trên môi trường PGA cải tiến. Phương pháp chuẩn bị môi trường theo B.T. Nguyễn và các cộng sự (2018) [27]. Môi trường được hiệu chỉnh pH với các ngưỡng khác nhau từ 5-12 bằng NaOH 1N hoặc HCl 1N.

Sinh trưởng hệ sợi nấm sò vua chủng E2 trên một số môi trường nuôi cấy thuần khiết: chủng nấm sò vua E2 được nhân giống trên 5 môi trường khác nhau. Thành phần môi trường nuôi cấy được thể hiện ở bảng 1.

Bảng 1. Thành phần môi trường nuôi cấy thuần khiết.

Công thức	Thành phần (g/l)					
	Khoai tây	Giá đỗ	Nấm tươi	Pepton	Cao nấm men	Glucose
CT1	200	-	-	-	-	20
CT2	200	200	-	-	-	20
CT3	200	-	50	-	-	20
CT4	200	-	-	5	-	20
CT5	200	-	-	-	5	20

Sinh trưởng hệ sợi của chủng nấm sò vua E2 trên một số môi trường nhân giống cấp 2: 5 môi trường gồm MT1, MT2, MT3, MT4 và MT5 được sử dụng để tối ưu hóa môi trường nhân giống cấp 2 cho chủng E2 (bảng 2).

Bảng 2. Thành phần môi trường nhân giống cấp 2.

Công thức	Thành phần (%)			
	Thóc luộc	Lõi ngô	Cám mạch	Bột nhẹ
MT1	99	-	-	1
MT2	-	89	10	1
MT3	-	79	20	1
MT4	-	69	30	1
MT5	30	59	10	1

Sinh trưởng hệ sợi, hình thành và phát triển mầm quả thể chủng nấm sò vua E2 trên một số giá thể nuôi trồng: giống nấm sò vua E2 được nuôi trồng trên 5 loại giá thể khác nhau với cơ chất chính là mùn cưa cao su và lõi ngô (bảng 3). Nguyên liệu được xử lý theo phương pháp của Nguyễn Thị Bích Thủy và các cộng sự (2016) [26]. Sau khi hệ sợi chủng E2 phát triển kín giá thể nuôi trồng, các bịch nấm được chuyển vào nhà nuôi trồng ở nhiệt độ 15-16°C và độ ẩm 75-80%. Phương pháp nuôi trồng theo Nguyễn Hữu Đồng và các cộng sự (2005) [28].

Bảng 3. Thành phần giá thể nuôi trồng.

Công thức	Thành phần (%)			
	Mùn cưa	Lõi ngô	Cám mạch	Bột nhẹ
GT1	79	-	20	1
GT2	-	79	20	1
GT3	59	20	20	1
GT4	39	40	20	1
GT5	19	60	20	1

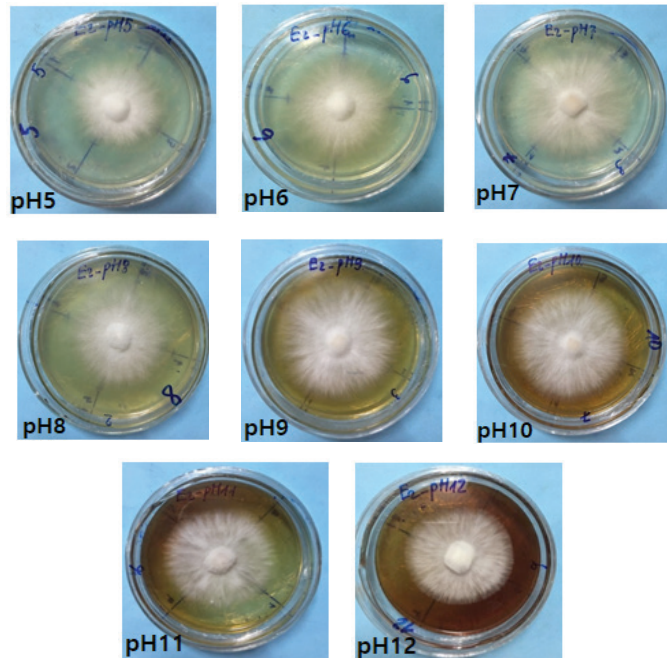
Đặc điểm sinh trưởng hệ sợi và phát triển quả thể: phương pháp nghiên cứu đặc điểm sinh trưởng (đường kính sợi, tốc độ sinh trưởng, mật độ) và hình thái hệ sợi được thực hiện theo Trịnh Tam Kiệt (2012) [29]. Chiều dài cuống (mm), khối lượng quả thể (g) được theo dõi. Thời gian quả thể trưởng thành (ngày) là thời gian cần thiết được tính từ khi cấy giống đến khi quả thể trưởng thành. Hiệu suất sinh học được tính bằng tỷ lệ (%) giữa khối lượng nấm tươi và khối lượng nguyên liệu khô.

Phương pháp xử lý số liệu: kết quả nghiên cứu được phân tích bằng phần mềm thống kê GraphPad Prism (version 7.0, GraphPad Software Inc., Hoa Kỳ), sử dụng one-way ANOVA followed by Turkey's multiple comparisons test, $P < 0,05$. Các giá trị trung bình mang các chữ cái khác nhau là khác nhau có ý nghĩa thống kê.

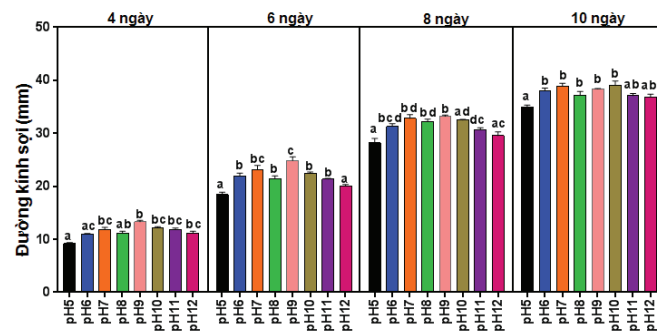
Kết quả và thảo luận

Ảnh hưởng của pH đến sự sinh trưởng hệ sợi nấm sò vua trên môi trường nuôi cấy thuần khiết PGA

pH môi trường có ảnh hưởng đến hoạt tính enzym, tính thấm thấu của màng và khả năng hấp thụ ion kim loại của nấm trên môi trường nuôi cấy. Trên môi trường PGA cải tiến, hình thái sợi chủng E2 mảnh, phân bố đồng đều, màu trắng ở pH 5-9. Ở ngưỡng pH 10, 11, 12, hệ sợi nấm bông, màu trắng đậm (hình 1). Tốc độ phát triển hệ sợi được thể hiện ở hình 2.



Hình 1. Sinh trưởng hệ sợi nấm sò vua chủng E2 trên môi trường nuôi cấy thuần khiết PGA cải tiến ở các ngưỡng pH khác nhau sau 8 ngày nuôi cấy.

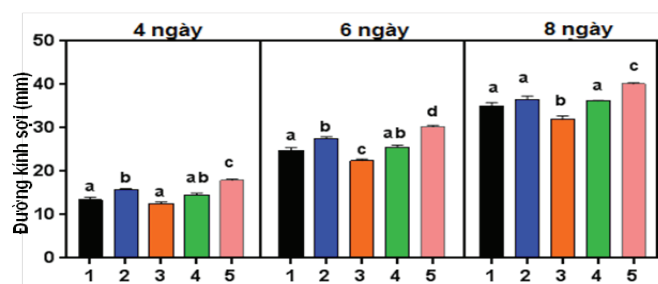


Hình 2. Đường kính hệ sợi nấm sò vua chủng E2 trên môi trường PGA cải tiến ở các ngưỡng pH khác nhau.

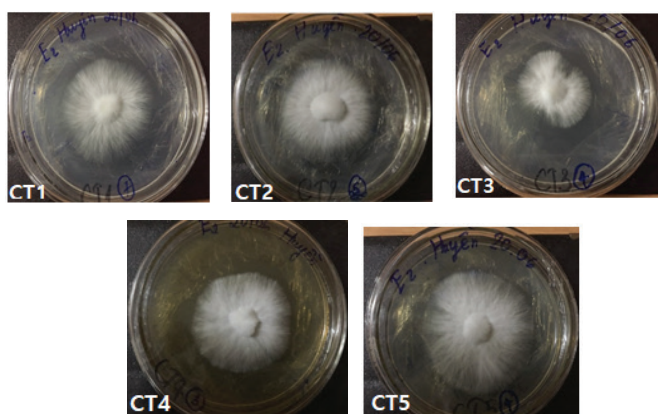
Sau 2 ngày nuôi cấy trên môi trường PGA cải tiến, chủng E2 bắt đầu bung sợi đồng đều và chưa có sự khác biệt ở cả 8 mức pH. Đường kính hệ sợi theo dõi ở ngày thứ 4, 6, 8 và 10 được thể hiện trên hình 2. So với các ngưỡng pH còn lại, tốc độ phát triển hệ sợi ở môi trường có pH 5 chậm hơn. Theo Szarvas (2011) [30], các loài thuộc chi *Pleurotus* có khả năng sinh trưởng ở môi trường pH cao. pH tối ưu phụ thuộc vào từng chủng và loài. Một số chủng có khả năng sinh trưởng tương đối nhanh trên môi trường có pH 8-9 [30]. Kết quả nghiên cứu của Alam và các cộng sự (2009) [31] cho thấy, nấm sò vua có thể sinh trưởng tốt trong khoảng pH 5 đến pH 9. Trong đó, pH tối ưu để hệ sợi sinh trưởng là pH 6. Trong thí nghiệm này, chủng E2 có thể sinh trưởng trên một khoảng pH rộng từ pH 5 đến pH12, đặc biệt từ 6-10.

Sinh trưởng hệ sợi chủng E2 ở các môi trường nuôi cấy thuần khiết khác nhau

Nhằm tối ưu môi trường nhân giống gốc và cấp 1, chủng E2 được nuôi cấy trên 5 môi trường nuôi cấy thuần khiết khác nhau. Quan sát thí nghiệm cho thấy, 2 ngày sau khi cấy giống, giống nấm bắt đầu bung sợi và chưa có sự khác biệt rõ rệt giữa các công thức. Tốc độ tăng trưởng, đặc điểm hệ sợi, mật độ hệ sợi ở các công thức khác biệt bắt đầu từ ngày thứ 4 (hình 3). Công thức môi trường 5 (PGA + cao nấm men) có tốc độ sinh trưởng tốt nhất, mật độ hệ sợi cao, đồng đều (hình 4). Sau 8 ngày nuôi cấy, độ dài hệ sợi nấm đạt 40,14 mm. CT3 (PGA + nấm tươi) sinh trưởng kém nhất trong các công thức thí nghiệm với độ dài hệ sợi nấm sau 8 ngày nuôi cấy là 31,92 mm, mật độ hệ sợi trung bình, phân bố không đồng đều. Như vậy, trong 5 môi trường nuôi cấy thử nghiệm, môi trường thích hợp nhất để nhân giống chủng E2 là môi trường PGA có bổ sung cao nấm men.



Hình 3. Sinh trưởng hệ sợi nấm sò vua chủng E2 trên các môi trường nuôi cấy thuần khiết.



Hình 4. Hệ sợi chủng nấm sò vua sau 6 ngày nuôi cấy trên các môi trường.

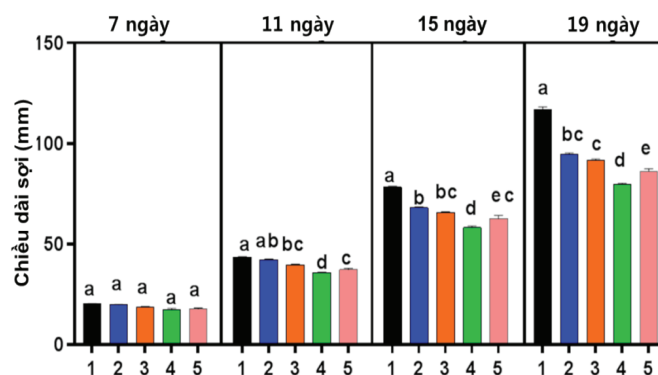
Theo Zăgrean (2016) [32], môi trường MEA (Malt Extract Agar) là môi trường nuôi cấy thuần khiết phù hợp nhất để hệ sợi nấm sò vua sinh trưởng. Kết quả nghiên cứu của Alam và các cộng sự (2009) [31] cho thấy, các môi trường glucose peptone (glucose, cao chiết malt, pepton, cao chiết nấm men), yeast malt extract (dextrose, cao chiết malt, pepton, cao chiết nấm men) và mushroom complete (cao chiết malt, pepton, cao chiết nấm men) là thích hợp nhất để làm

môi trường nhân giống nấm sò vua.

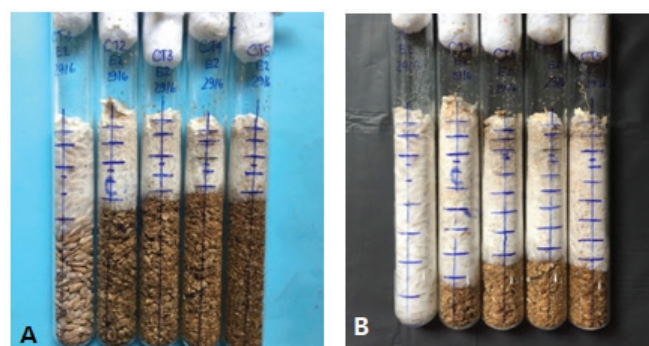
Sinh trưởng hệ sợi của chủng nấm sò vua E2 trên một số môi trường nhân giống cấp 2

Trong sản xuất giống nấm, để tăng hệ số nhân giống và để hệ sợi nấm thích nghi dần với môi trường giàu cellulose của giá thể nuôi trồng, giống nấm được nhân chuyển sang môi trường nhân giống cấp 2. Thí nghiệm này được tiến hành để đánh giá sự sinh trưởng của hệ sợi chủng E2 qua 5 môi trường nhân giống cấp 2.

Do môi trường thóc có hàm lượng dinh dưỡng và độ xốp cao, chứa nhiều oxy nên MT1 (99% thóc luộc + 1% CaCO_3) có tốc độ hệ sợi sinh trưởng nhanh nhất (6,14 mm/ngày) và thời gian phát triển kín giá thể trung bình ngắn nhất (22 ngày) (hình 5 và hình 6). MT2 (89% lõi ngô + 10% cám mạch + 1% CaCO_3) và MT3 (79% lõi ngô + 20% cám mạch + 1% CaCO_3) có tốc độ sinh trưởng hệ sợi lần lượt là 4,98 mm/ngày, 4,83 mm/ngày. Môi trường có hàm lượng cám mạch càng cao dẫn đến độ xốp, độ thông thoáng càng thấp do cám mạch nhỏ, mịn. Vì vậy, MT4 (69% lõi ngô + 30% cám mạch + 1% CaCO_3) có tốc độ sinh trưởng hệ sợi chậm nhất (4,19 mm/ngày) và thời gian mọc kín giá thể trung bình là 27,67 ngày. Dựa vào kết quả thu được, môi trường nhân giống cấp 2 phù hợp cho chủng E2 sinh trưởng và phát triển tốt nhất là MT1 (99% thóc luộc + 1% CaCO_3).



Hình 5. Chiều dài hệ sợi của chủng nấm E2 trên một số môi trường nhân giống cấp 2.

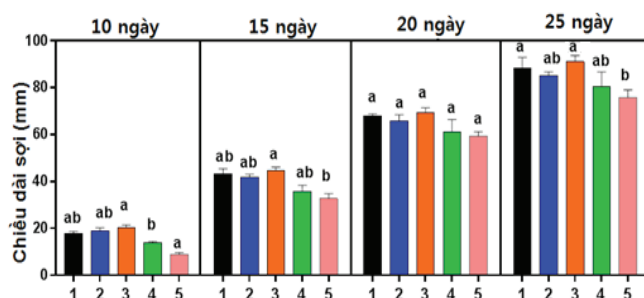


Hình 6. Hệ sợi nấm sò vua trên môi trường nhân giống cấp 2 qua 12 ngày sau cấy (A) và 20 ngày sau cấy (B) ở 26°C.

Sinh trưởng hệ sợi, hình thành và phát triển mầm quả thể của chủng nấm sò vua E2 trên một số giá thể nuôi trồng

Để đánh giá ảnh hưởng của giá thể nuôi trồng đến tốc độ sinh trưởng hệ sợi, hình thành và phát triển mầm quả thể, chủng E2 được nuôi cấy trên 5 giá thể với cơ chất chính là mùn cưa và lõi ngô. Với mục đích tăng năng suất sinh học, trong thí nghiệm này, giá thể nuôi trồng được bổ sung các chất phụ gia như cám gạo, cám mạch để cung cấp dinh dưỡng thêm cho hệ sợi nấm sinh trưởng và phát triển nhanh.

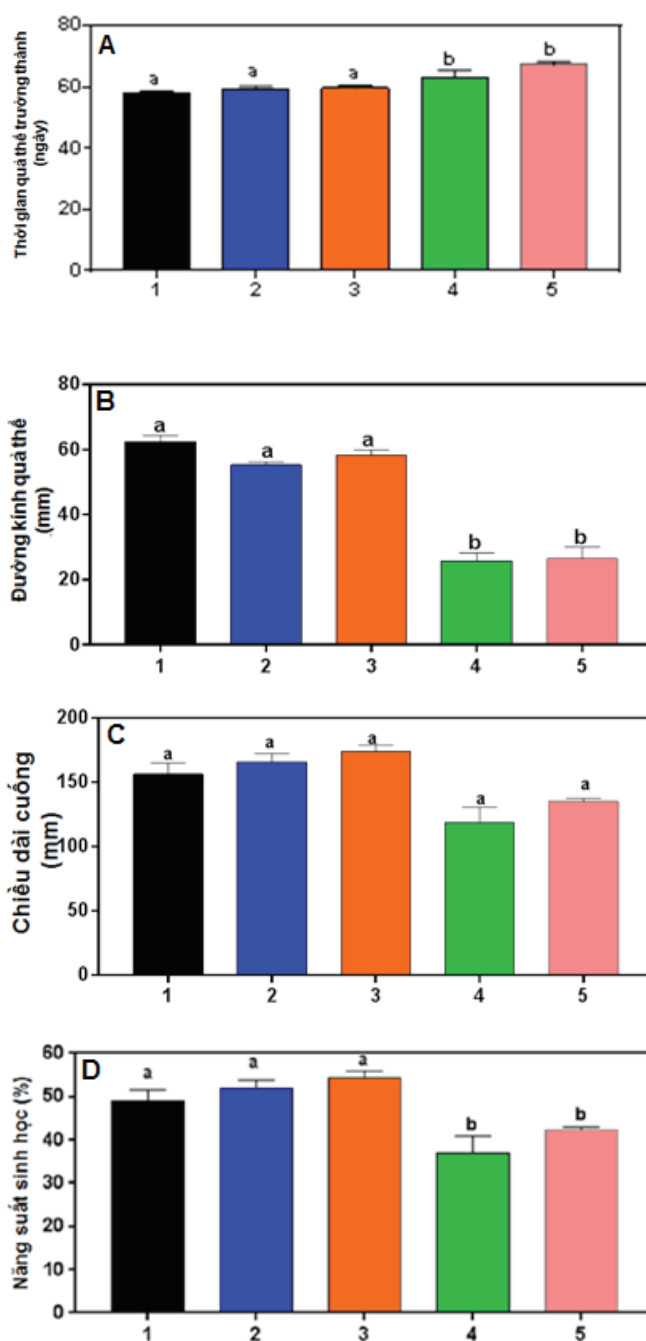
Trong các giá thể nuôi trồng thử nghiệm, chủng E2 có tốc độ sinh trưởng hệ sợi nhanh nhất ở GT3 (59% mùn cưa + 20% lõi ngô + 20% cám mạch + 1% CaCO_3), chậm nhất ở GT5 (19% mùn cưa + 60% lõi ngô + 20% cám mạch + 1% CaCO_3) (hình 7) và đều có khả năng hình thành quả thể (hình 8).



Hình 7. Chiều dài sinh trưởng hệ sợi chủng nấm E2 trên một số giá thể nuôi trồng.



Hình 8. Quả thể nấm sò vua ở các công thức giá thể nuôi trồng khác nhau.



Hình 9. Thời gian quả thể trưởng thành (A), đường kính quả thể (B), chiều dài cuống (C), và năng suất sinh học (D) của chủng nấm sò vua E2 trên một số giá thể nuôi trồng.

Kết quả thí nghiệm cho thấy, thời gian xuất hiện quả thể trưởng thành ở các công thức dao động từ 57-67 ngày (hình 9A). GT1 (79% mùn cưa + 20% cám mạch + 1% CaCO_3) có thời gian ra quả thể trưởng thành nhanh nhất (57,83 ngày). GT5 (19% mùn cưa + 60% lõi ngô + 20% cám mạch + 1% CaCO_3) có thời gian ra quả thể trưởng thành chậm nhất (67,17 ngày). Đường kính mũ nấm ở các công

thức dao động khoảng từ 25-62 mm, chiều dài cuống nấm ở các công thức dao động khoảng từ 178-204 mm. Trong đó, đường kính quả thể ở giá thể nuôi trồng công thức 1, 2 và 3 có kích thước lớn hơn so với công thức 4 và 5 (hình 9B). Qua xử lý thống kê cho thấy, không có sự khác biệt rõ ràng về chiều dài cuống quả thể ở các công thức nuôi trồng (hình 9C). Năng suất sinh học của chủng E2 được thể hiện ở hình 9D. Trong 5 công thức giá thể nuôi trồng, chủng E2 đều phát triển tốt trên GT1 (79% mùn cưa + 20% cám mạch + 1% CaCO_3), GT2 (79% lõi ngô + 20% cám mạch + 1% CaCO_3) và GT3 (59% mùn cưa + 20% lõi ngô + 20% cám mạch + 1% CaCO_3). So với các giá thể nuôi trồng còn lại, GT4 (39% mùn cưa + 40% lõi ngô + 20% cám mạch + 1% CaCO_3) và GT5 (19% mùn cưa + 60% lõi ngô + 20% cám mạch + 1% CaCO_3) có thời gian ra quả thể, hệ sợi nấm sinh trưởng phát triển chậm, khối lượng quả thể và hiệu suất sinh học thấp nên không phù hợp để nuôi trồng chủng E2.

Năng suất sinh học của nấm sò vua phụ thuộc vào kiểu gen, loại cơ chất nuôi trồng, chế độ chăm sóc [17, 33]. Chủng nấm sò vua Pe-1 được nuôi trồng trên cơ chất mùn cưa cho năng suất sinh học cao nhất đạt 73,5% [17]. Theo Peng và các cộng sự (2000) [33], nấm sò vua được nuôi trồng trên cơ chất mùn cưa dao động từ 88 đến 146 g trong đợt thu thứ nhất. Kết quả nghiên cứu của Kirbag và Akyuz [24] cho thấy, nấm sò vua cho năng suất sinh học đạt 48,05% khi nuôi trồng trên cơ chất rơm. Bổ sung 10% cám gạo vào giá thể nuôi trồng có thể giúp tăng năng suất sinh học lên 5% [24]. Năng suất của nấm sò vua chủng E1 trên công thức nguyên liệu (40% rơm rạ, 20% lõi ngô, 19% mùn cưa, 20% cám gạo và 1% CaCO_3) đạt hiệu quả sinh học cao 59,4% [26]. Trong nghiên cứu này, chủng E2 cho thấy tiềm năng nuôi trồng với năng suất sinh học cao nhất đạt 54,37%.

Kết luận

Hệ sợi chủng nấm sò vua E2 có thể sinh trưởng tốt trên khoảng pH rộng từ 5 đến 12. Môi trường PGA có bổ sung cao nấm men là môi trường nuôi cấy thuần khiết tốt nhất với mật độ hệ sợi cao, đồng đều. MT1 (99% thóc lứt + 1% CaCO_3) là môi trường nhân giống cấp 2 tối ưu nhất cho hệ sợi nấm sò vua E2 sinh trưởng và phát triển với tốc độ hệ sợi mọc/ngày là 6,14 mm. Chủng nấm sò vua E2 có thể hình thành mầm và phát triển quả thể, cho hiệu suất sinh học cao ở GT3 (59% mùn cưa + 20% lõi ngô + 20% cám mạch + 1% CaCO_3), GT2 (79% lõi ngô + 20% cám mạch + 1% CaCO_3) và GT1 (79% mùn cưa + 20% cám mạch + 1% CaCO_3).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] Trịnh Tam Kiệt (2011), *Nấm lớn ở Việt Nam*, Tập 1, Nhà xuất bản Khoa học Tự nhiên và Công nghệ.

[2] G.I. Zervakis, C. Balis (1996), "A pluralistic approach in the study of *Pleurotus* species with emphasis on compatibility and physi-

ology of the European morphotaxa", *Mycol. Res.*, **100**(6), pp.717-731.

[3] R.H. Yang, et al. (2016), "The genome of *Pleurotus eryngii* provides insights into the mechanisms of wood decay", *J. Biotechnol.*, **239**, pp.65-67.

[4] G. Zervakis, G. Venturella, K. Papadopoulou (2001), "Genetic polymorphism and taxonomic infrastructure of the *Pleurotus eryngii* species-complex as determined by RAPD analysis, isozyme profiles and ecomorphological characters", *Microbiology*, **147**, pp.3183-3194.

[5] D. Lewinsohn, S.P. Wasser, S.V. Reshetnikov, Y. Hadar, and E. Nevo (2002), "The *Pleurotus eryngii* species-complex in Israel: distribution and morphological description of a new taxon", *Mycotaxon*, **81**, pp.51-67.

[6] S.R. Couto, J.L.T. Herrera (2006), "Industrial and biotechnological applications of laccases: a review", *Biotechnol. Adv.*, **24**(5), pp.500-513.

[7] A. Gregori, M. Švagelj, J. Pohleven (2007), "Cultivation techniques and medicinal properties of *Pleurotus* spp", *Food Technol. Biotechnol.*, **45**(3), pp.238-249.

[8] E. Bernas, J. Grazyna, and Z. Lisiewska (2006), "Edible mushrooms as source of valuable nutritive constituents", *ACTA Sci. Polon. Technol. Aliment.*, **5**(1), pp.5-20.

[9] P. Manzi, L. Gambelli, S. Marconi, V. Vivanti, and L. Pizzoferrato (1999), "Nutrients in edible mushrooms - an inter-species comparative study", *Food Chem.*, **65**(4), pp.477-482.

[10] P. Manzi, S. Marconi, A. Aguzzi, and L. Pizzoferrato (2004), "Commercial mushrooms: nutritional quality and effect of cooking", *Food Chem.*, **84**(2), pp.201-206.

[11] S.P. Wasser and A.L. Weis (1999), "Medicinal properties of substances occurring in higher Basidiomycetes mushrooms: current perspectives (review)", *Int. J. Med. Mushrooms*, **1**, pp.47-50.

[12] H.X. Wang, and T.B. Ng (2006), "Purification of a laccase from fruiting bodies of the mushroom *Pleurotus eryngii*", *Appl. Microbiol. Biotech.*, **69**(5), pp.521-525.

[13] P.H. Ngai and T.B. Ng (2006), "A hemolysin from the mushroom *Pleurotus eryngii*", *Biotechnologically Relevant Enzymes and Proteins*, **72**(6), pp.1185-1191.

[14] M. Stajic, J. Vukujevic and S. Dulectic-Lausevic (2009), "Biology of *Pleurotus eryngii* and role in biotechnological processes", *Critical Reviews in Biotechnology*, **29**(1), pp.55-66.

[15] M.K. Kim, J. Ryu, Y. Lee, H. Kim (2013), "Breeding of a long shelf-life strain for commercial cultivation by mono-mono crossing in *Pleurotus eryngii*", *Sci. Hortic.*, **162**, pp.265-270.

[16] J. Szarvas, K. Pal, A. Geösel and J. Györfi (2011), "Comparative studies on the cultivation and phylogenetics of King Oyster Mushroom (*Pleurotus eryngii* (DC.: Fr.) Qu_el.) strains". *Acta Universitatis Sapientiae Agriculture and Environment*, **3**, pp.18-34.

[17] M. Moon, M.N. Uddin, S. Ahmed, N.J. Shelly, M.A. Khan (2010), "Cultivation of different strains of king oyster mushroom (*Pleurotus eryngii*) on saw dust and rice straw in Bangladesh", *Saudi J. Biol. Sci.*, **17**(4), pp.341-345.

[18] J. Ryu, M.K. Kim, C.H. Im, and P. Shin (2015), "Development

of cultivation media for extending the shelf-life and improving yield of king oyster mushrooms (*Pleurotus eryngii*)", *Sci. Hortic.*, **193**, pp.121-126.

[19] A. Zhang, X. Li, C. Xing, J. Yang, P. Sun (2014), "Antioxidant activity of polysaccharide extracted from *Pleurotus eryngii* using response surface methodology", *Int. J. Biol. Macromol.*, **65**, pp.28-32.

[20] A. Philippoussis, G. Zervakis, and P. Diamantopoulou (2001), "Bioconversion of Agricultural Lignocellulosic Wastes Through the Cultivation of the Edible Mushroom *Agrocybe aegerita*, *Volvariella volvacea* and *Pleurotus* spp", *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **17**(2), pp.191-200.

[21] K. Okano, S. Fukui, R. Kitao, and T. Usagawa (2007), "Effects of culture length of *Pleurotus eryngii* grown on sugarcane bagasse on in vitro digestibility and chemical composition", *Animal Feed Sci. Technol.*, **136**(3-4), pp.240-247.

[22] A.E. Rodriguez Estrada, D.J. Royse (2007), "Yield, size, bacterial blotch resistance of *Pleurotus eryngii* grown on cottonseed hulls/oak sawdust supplemented with manganese, copper, whole ground soybean", *Biores. Technol.*, **98**(10), pp.1898-1906.

[23] Z. Wang (2006), "Rare mushroom cultivation", *Edible and Medicinal mushroom workshop, Shanghai Academy of Agriculture Sciences*, pp.45-61.

[24] S. Kirbag, M. Akyuz (2008), "Effect of various agro-residues on growing periods, yield and biological efficiency of *Pleurotus eryngii*", *J. Food Agric. Environ.*, **66**(3-4), pp.402-405.

[25] P. Stamets (2000), *Growing Gourmet and Medicinal Mushrooms*, Ten Speed Press, pp.301-304.

[26] Nguyễn Thị Bích Thủy, Ngô Xuân Nghiễn, Nguyễn Thế Thắng, Trần Đông Anh, Nguyễn Xuân Cảnh, Nguyễn Văn Giang,

Trần Thị Đào (2016), "Đánh giá sinh trưởng và năng suất của nấm sò vua (*Pleurotus eryngii* (DC.: Fr.) Quel) trên nguyên liệu nuôi trồng khác nhau", *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*, **14**(5), tr.816-823.

[27] B.T. Nguyen, N. Ngo, V. Le, L. Nguyen, A. Tran, and L.H. Nguyen (2018), "Identification of Optimal Culture Conditions for Mycelial Growth and Cultivation of Monkey Head Mushrooms (*Hericium erinaceus* (Bull.: fr.) Pers)", *Vietnam Journal of Agricultural Sciences*, **1**(2), pp.117-126.

[28] Nguyễn Hữu Đồng, Đinh Xuân Linh, Nguyễn Thị Sơn, Ngô Xuân Nghiễn, Zani Federico (2005), *Nấm ăn - Cơ sở khoa học và công nghệ nuôi trồng*, Nhà xuất bản Nông nghiệp.

[29] Trịnh Tam Kiệt (2012), *Nấm lớn ở Việt Nam*, **Tập 2**, Nhà xuất bản Khoa học Tự nhiên và Công nghệ.

[30] J. Szarvas, A. Geösel, K. Pál, Z. Naár and J. Györfi (2011), "Comparative studies of the cultivable king oyster mushroom [*Pleurotus eryngii* (DC.: Fr.) Quel.] isolates by RAPD-PCR method", *Acta Alimentaria*, **40**, pp.41-46.

[31] N. Alam, M.J. Shim, M.W. Lee, P.G. Shin, Y.B. Yoo, and T.S. Lee (2009), "Vegetative Growth and Phylogenetic Relationship of Commercially Cultivated Strains of *Pleurotus eryngii* based on ITS sequence and RAPD", *Mycobiology*, **37**(4), pp.258-266.

[32] V. Zăgrean, G. Sbîrciog, M-A. Buzatu, I. Mândru (2016), "Effect of Nutritive Media and pH on Mycelial Growth of some *Pleurotus eryngii* Strains in vitro", *Bulletin UASVM Horticulture*, **73**(2), pp.276-278.

[33] J.T. Peng, C.M. Lee, Y.F. Tsai (2000), "Effect of rice bran on the production of different king oyster mushroom strains during bottle cultivation", *J. Agric. Res. China*, **49**(3), pp.60-67.

Nghiên cứu khả năng tạo rễ bất định Xáo tam phân (*Paramignya trimera*) trong điều kiện thủy canh *in vivo*

Phí Thị Cẩm Miện^{1*}, Nguyễn Đức Bách¹, Nguyễn Thị Vân Anh¹,
Phạm Bích Ngọc², Chu Hoàng Hà²

¹Khoa Công nghệ sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

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

Ngày nhận bài 25/2/2019; ngày chuyển phản biện 28/2/2019; ngày nhận phản biện 25/3/2019; ngày chấp nhận đăng 29/3/2019

Tóm tắt:

Rễ Xáo tam phân là một loại dược liệu quý, thường được sử dụng để chữa một số bệnh ung thư, đặc biệt là ung thư gan. Tuy nhiên, do bị khai thác trong một khoảng thời gian dài nên hiện nay số lượng loài Xáo tam phân phát triển rất chậm, do đó việc tìm ra phương pháp hữu hiệu giúp chủ động sản xuất rễ, cung cấp cho ngành công nghiệp dược phẩm là hết sức có ý nghĩa. Trong nghiên cứu này, các tác giả tiến hành các thử nghiệm tạo rễ bất định Xáo tam phân trong điều kiện thủy canh và tìm ra môi trường thích hợp cho sự sống và phát triển của Xáo tam phân là WPM/6 (tỷ lệ sống đạt 96,21%). Các cây có khả năng sinh trưởng tốt được chuyển sang môi trường có bổ sung IBA (7,0 mg/l), α -NAA (7,0 mg/l) để tạo rễ bất định; sau 8 tuần, số lượng rễ mới phát sinh đạt 21,12 rễ/cây con, tỷ lệ mẫu phát sinh rễ đạt 90,6%. Có thể thấy rằng, cây con Xáo tam phân có thể sống, sinh trưởng và phát triển tốt trong điều kiện thủy canh.

Keywords: *Paramignya trimera*, rễ bất định, thủy canh, ung thư gan, Xáo tam phân.

Chỉ số phân loại: 4.1

Đặt vấn đề

Chi Cựa gà (*Paramignya* Wight, 1931) thuộc họ Cam (Rutaceae), trên thế giới gồm khoảng 15 loài cây thân gỗ nhỏ, dạng dây leo có nguồn gốc từ phía nam, đông nam châu Á và ở miền bắc nước Úc [1, 2]. Theo số liệu điều tra, ở Việt Nam hiện có 7 loài thuộc chi *Paramignya*, trong đó có 5 loài đã được sử dụng làm thuốc chữa bệnh: *P. trimera* Oliv.; *P. griffithii*; *P. monophylla*; *P. armata* Oliv. var. *Andamanica* King; *P. scandens* [3-5]. Theo báo cáo của Viện Dược liệu, Xáo tam phân (*P. trimera* Oliv.) ở tỉnh Khánh Hòa đã được thí nghiệm làm thuốc điều trị thành công bệnh viêm gan cấp trên chuột trắng. Bên cạnh đó, nhiều thử nghiệm đã cho thấy, rễ của loài cây này có hoạt tính kháng nhiều loại tế bào ung thư như ung thư gan, ung thư vú, ung thư đại tràng, ung thư buồng trứng và ung thư cổ tử cung [6]. Ngoài ra, rễ Xáo tam phân còn chứa các hoạt chất chống oxy hóa [7].

Trong những năm gần đây, do tác dụng chữa và phòng ngừa ung thư của rễ Xáo tam phân được nhiều người biết đến nên giá của các cây thuộc chi *Paramignya*, đặc biệt là cây Xáo tam phân tăng lên nhanh chóng, khiến loài cây này bị khai thác ồ ạt. Hệ quả là số lượng cây Xáo tam phân trong tự nhiên bị suy giảm nghiêm

trọng. Trong khi đó, tốc độ sinh trưởng của cây Xáo tam phân trong tự nhiên rất chậm, nên nguồn rễ không đủ đáp ứng nhu cầu ngày càng tăng của thị trường. Do vậy, ngoài việc lưu giữ, bảo tồn và phát triển cây Xáo tam phân trong tự nhiên, cần phải phát triển phương pháp mới để chủ động sản xuất được rễ với lượng lớn, nhằm cung cấp nguyên liệu cho ngành công nghiệp dược phẩm. Để góp phần giải quyết vấn đề đặt ra, chúng tôi triển khai nghiên cứu này, tập trung vào các thử nghiệm nhằm tìm điều kiện để cảm ứng tạo rễ bất định của cây Xáo tam phân trong môi trường nuôi thủy canh.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu nghiên cứu

Cây Xáo tam phân (*P. trimera*) từ 12 đến 24 tháng tuổi thu thập tại tỉnh Khánh Hòa, được trồng trong khu nhà ươm cây tại Khoa Công nghệ sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam. Các dụng cụ bao gồm bình thủy tinh, hệ thống sục khí, phòng điều hòa nhiệt độ 25°C, phòng nuôi cấy từ 25-35°C. Các môi trường nền cơ bản bao gồm Murashige et Skoog (MS), Woody Plant Medium (WPM) và Knudson [6, 8, 9].

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

Study the ability to induce the adventitious root of *Paramignya trimera* in vivo hydroponic conditions

Thi Cam Mien Phi^{1*}, Duc Bach Nguyen¹,
Thi Van Anh Nguyen¹, Bich Ngoc Pham², Hoang Ha Chu²

¹Biotechnology Faculty, Vietnam National University of Agriculture
²Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology

Received 25 February 2019; accepted 29 March 2019

Abstract:

Xao tam phan, *Paramignya trimera*, is a precious medicinal plant belonging to genus *Citrus* (Rutaceae family), mainly distributed in Khanh Hoa and Tay Ninh provinces, Vietnam. For many years, *Paramignya trimera* has been used as an effectively medicinal plant to treat cancer, especially for liver cancer. Because of the natural active compounds of *Paramignya trimera* distributed mainly in the roots, the over-exploitation of *Paramignya trimera* for roots over time has resulted in the serious decline of this species. In nature, the growth of *Paramignya trimera* is slow, so it takes many years to be exploited. Therefore, in addition to planting *Paramignya trimera* in natural conditions to harvest roots, an alternative method should be developed to actively produce large amounts of roots for pharmaceutical industry. The study aims to create an method for the stimulation of adventitious roots of *Paramignya trimera* under hydroponic conditions. The results showed that *Paramignya trimera* was able to grow under hydroponic environment (WPM/6 medium) at the survival rate of 96.21%. The formation of adventitious roots in *Paramignya trimera* was observed in the WPM/6 medium supplemented with IBA (7.0 mg/l) and α -NAA (7.0 mg/l). After 8 weeks, the number of newly formed roots was 21.12 roots per plantlet, and the rate of root formation reached 90.6% in all cultured plantlets. The results exhibited that the *Paramignya trimera* could survive, grow, and develop well under hydroponic conditions.

Keywords: adventitious root, hydroponic, liver cancer, *Paramignya trimera*, Xao tam phan.

Classification number: 4.1

Phương pháp nghiên cứu

Trong thí nghiệm này, 3 loại môi trường nền cơ bản (WPM, MS và Knudson) được thử nghiệm để tìm được môi trường nền thích hợp nhất cho cây Xáo tam phân trong điều kiện thủy canh. Sau khi thử nghiệm và xác định được môi trường nền phù hợp, các chất sinh trưởng thuộc nhóm auxin (IAA, IBA và α -NAA) ở các nồng độ khác nhau từ 1,0-7,0 mg/l được bổ sung vào môi trường nền để cảm ứng sinh rễ bất định trong điều kiện thủy canh.

Các cây Xáo tam phân từ 12 đến 24 tháng tuổi được đưa vào các môi trường nền cơ bản MS pha loãng 4 lần (1/4X) trong 7 ngày (nhằm giúp cây thích nghi với trạng thái thủy canh). Sau 7 ngày, các cây được chuyển sang 3 môi trường tương ứng ở nồng độ 1X để xác định môi trường nền thích hợp nhất cho sự sinh tồn và phát triển của cây Xáo tam phân trong điều kiện thủy canh. Trong thí nghiệm đánh giá ảnh hưởng của môi trường nuôi, các cây ở độ tuổi khác nhau (từ 12 đến 24 tháng) được bố trí theo kiểu ngẫu nhiên, lặp lại. Môi trường thích hợp nhất cho sự phát triển của cây sẽ được tiếp tục bổ sung (α -NAA, IAA, IBA từ 1,0-9,0 mg/l) để đánh giá khả năng sản sinh rễ bất định Xáo tam phân [4, 5, 7, 10-12].

Tất cả các thí nghiệm được lặp lại ít nhất 3 lần. Trong mỗi công thức thí nghiệm, 9 mẫu được trồng lặp lại ngẫu nhiên. Sau mỗi tuần (7 ngày) số liệu được thu thập bao gồm tỷ lệ mẫu phát sinh chồi và tỷ lệ mẫu phát sinh rễ. Các chỉ tiêu về rễ được đo đặc bao gồm số lượng rễ, hình dạng rễ, màu sắc rễ và chất lượng rễ. Sự khác biệt về các giá trị trung bình giữa các công thức thí nghiệm được đánh giá bằng phân tích ANOVA. Sự khác biệt về giá trị trung bình giữa các cặp công thức thí nghiệm được đánh giá bằng kiểm định Duncan.

Kết quả và thảo luận

Ảnh hưởng của môi trường nền đến tỷ lệ sống của cây Xáo tam phân trong điều kiện nuôi thủy canh

Tỷ lệ sống là một trong những tiêu chí quan trọng nhất trong quá trình nuôi và nhân giống, đặc biệt đối với những cây thân gỗ. Trên cơ sở tham khảo các môi trường nhân giống cơ bản, 3 loại môi trường nền MS, WPM và Knudson đã được sử dụng để đánh giá khả năng thích ứng của cây [6, 8, 9]. Tỷ lệ sống và phản ứng của cây Xáo tam phân đối với các môi trường thử nghiệm được trình bày trong bảng 1.

Bảng 1. Ảnh hưởng của môi trường nền tới tỷ lệ sống của cây Xáo tam phân.

Môi trường nền	Tỷ lệ cây sống (%)	Phản ứng của cây đối với môi trường
MS	60,13 $\pm$ 4,75 ^c	Cây bắt đầu chết sau 2 tuần nghiên cứu
WPM	70,6 $\pm$ 6,65 ^a	Cây sinh trưởng tốt, khỏe mạnh, lá có màu xanh đậm*
Knudson	41,23 $\pm$ 4,25 ^b	Một số cây bị héo và lá vàng xuất hiện sau 2 tuần

*Giá trị trung bình của các cây ở nhóm tuổi khác nhau. Các chỉ số a, b và c thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê, p<0,01.

Kết quả nghiên cứu sau 8 tuần cho thấy, tỷ lệ sống (%) của cây Xáo tam phân trong 3 môi trường MS, WPM và Knudson tương ứng là $60,13 \pm 4,75$; $70,6 \pm 6,65$ và $41,23 \pm 4,25$. Trong đó, môi trường WPM phù hợp nhất cho sự sinh trưởng của cây Xáo tam phân trong điều kiện thủy canh *in vivo*. Trong môi trường WPM, cây sinh trưởng tốt, chồi mới xuất hiện nhiều, lá có màu xanh đậm, khỏe. Theo kết quả này, môi trường phù hợp cho nghiên cứu tạo rễ bất định Xáo tam phân trong điều kiện thủy canh *in vivo* là WPM.

Ảnh hưởng của độ tuổi đến tỷ lệ sống của cây trong điều kiện thủy canh

Để xác định ảnh hưởng của tuổi cây đến tỷ lệ sống trong điều kiện nuôi thủy canh, 3 nhóm cây ở các độ tuổi khác nhau 12, 18 và 24 tháng (tính từ thời điểm nảy mầm từ hạt) được thử nghiệm trong môi trường WPM. Kết quả cho thấy có mối liên quan chặt giữa tỷ lệ sống của cây với độ tuổi (bảng 2).

Bảng 2. Ảnh hưởng của tuổi cây Xáo tam phân đến tỷ lệ sống trong điều kiện thủy canh *in vivo*.

Tuổi cây (tháng)	Tỷ lệ sống (%)	Số lượng rễ mới phát sinh (rễ)	Đặc điểm cây
12	$68,12 \pm 4,4^c$	$3,2 \pm 0,15^c$	Hầu như không xuất hiện rễ mới, rễ cũ sinh trưởng chậm
18	$81,5 \pm 6,65^a$	$5,6 \pm 0,28^a$	Cây sinh trưởng khỏe mạnh, rễ mới xuất hiện nhiều
24	$78,11 \pm 4,75^b$	$4,4 \pm 0,31^b$	Xuất hiện một số rễ mới, rễ cũ sinh trưởng chậm

Theo kết quả ở bảng 2, tỷ lệ cây sống cao nhất ở độ tuổi 18 tháng, đạt $81,5 \pm 6,65\%$ và số lượng rễ mới xuất hiện trung bình là $5,6 \pm 0,28$ rễ/mẫu. Tỷ lệ sống giảm xuống $78,11 \pm 4,75\%$ đối với cây 24 tháng. Tỷ lệ sống thấp nhất $68,12 \pm 4,4\%$ quan sát thấy ở cây có độ tuổi 12 tháng. Như vậy, có sự ảnh hưởng của tuổi cây đến tỷ lệ sống cũng như tỷ lệ ra rễ mới khi đưa vào nuôi trong môi trường thủy canh.

Ảnh hưởng của nồng độ môi trường WPM đến tỷ lệ sống và sinh trưởng của cây Xáo tam phân

Các nồng độ khác nhau của môi trường WPM được thử nghiệm để xác định nồng độ thích hợp nhất cho sự phát triển của cây Xáo tam phân. Để tăng khả năng sống và thích nghi của cây con khi bắt đầu nuôi trồng, đồng thời giảm tỷ lệ sốc dinh dưỡng khi bắt đầu chuyển sang điều kiện thủy canh, cây con Xáo tam phân 18 tháng tuổi tiếp tục được thử nghiệm trong môi trường WPM ở các mức độ pha loãng khác nhau. Sau 4 tuần nuôi trong điều kiện thủy canh, sự xuất hiện của rễ mới và khả năng sinh trưởng ở các công thức khác nhau được trình bày trong bảng 3.

Bảng 3. Ảnh hưởng của nồng độ môi trường WPM đến tỷ lệ sống, sinh trưởng và phát triển của cây Xáo tam phân.

Nồng độ WPM	Tỷ lệ sống (%)	Đặc điểm cây
0	$22,21 \pm 1,75^c$	Tỷ lệ cây chết cao, cây héo vàng và yếu
1/8 WPM	$79,3 \pm 6,61^b$	Cây sinh trưởng chậm, lá vàng, rất ít rễ mới xuất hiện
1/6 WPM	$96,21 \pm 7,6^a$	Cây sinh trưởng khỏe, rất nhiều rễ mới xuất hiện
1/4 WPM	$91,5 \pm 6,65^a$	Cây khỏe, rễ mới xuất hiện ít
1/2 WPM	$85,62 \pm 4,92^b$	Cây khỏe, rễ mới xuất hiện ít
1 WPM	$76,3 \pm 6,0^c$	Cây sinh trưởng bình thường, tỷ lệ chết thấp
CV %	3,22	

Kết quả cho thấy, rễ mới bắt đầu xuất hiện sau 4 tuần. Ở các nồng độ WPM khác nhau, tỷ lệ sống của cây Xáo tam phân cũng có sự khác nhau ($p < 0,01$), dao động từ $22,21 \pm 1,75$ đến $96,21 \pm 7,6\%$. Phân tích Duncan cho thấy, không có sự khác biệt về mặt thống kê đối với tỷ lệ sống của cây ở môi trường WPM pha loãng 2 lần và 8 lần. Kết quả tương tự cũng quan sát được ở môi trường WPM pha loãng 4 lần và 6 lần. Nồng độ WPM cao nhất (không pha loãng) cho tỷ lệ sống thấp nhất, đạt $76,3 \pm 6,0\%$. Như vậy, môi trường WPM pha loãng 6 lần là điều kiện phù hợp nhất cho sự sinh trưởng của cây Xáo tam phân khi nuôi thủy canh. Trong môi trường WPM pha loãng 6 lần, tỷ lệ cây con sống sót đạt cao nhất ($96,21 \pm 7,6\%$) và rễ mới xuất hiện nhiều nhất.

Ảnh hưởng của hormon sinh trưởng đến khả năng tạo rễ bất định

Việc hình thành rễ bất định chịu ảnh hưởng bởi các hormon sinh trưởng thuộc nhóm auxin [13-15]. Để cảm ứng tạo rễ bất định ở Xáo tam phân, những cây khỏe mạnh được chuyển sang môi trường 1/6 WPM có bổ sung các hormon thuộc nhóm auxin (IAA, IBA, α -NAA) ở các nồng độ khác nhau để cảm ứng tạo rễ bất định.

Ảnh hưởng của IAA: môi trường 1/6 WPM được bổ sung IAA với các nồng độ từ 1,0 đến 7,0 mg/l. Kết quả cho thấy rễ mới bắt đầu xuất hiện sau 2 tuần (bảng 4). Tỷ lệ rễ mới xuất hiện cao nhất đạt $80 \pm 4,2\%$ ở môi trường bổ sung IAA nồng độ 5,0 mg/l và số lượng rễ mới xuất hiện đạt trung bình 11 rễ mới/cây con. Ở các nồng độ bổ sung IAA thấp hoặc cao hơn, tỷ lệ mẫu phát sinh rễ, số lượng rễ mới/cây và chất lượng rễ cũng giảm đáng kể.

Bảng 4. Ảnh hưởng của IAA tới khả năng tạo rễ bất định.

IAA (mg/l)	Tỷ lệ mẫu tạo rễ (%)	Số lượng rễ/mẫu	Số lượng rễ mới	Đặc điểm rễ
0	$15 \pm 0,8^c$	$5,6 \pm 1,23^c$	$4 \pm 0,25^d$	Mảnh, rễ yếu
1,0	$30 \pm 1,8^d$	$7,2 \pm 1,12^{bc}$	$5,2 \pm 0,49^c$	Số lượng rễ mới ít
3,0	$65 \pm 3,25^b$	$10,8 \pm 1,12^b$	$8,1 \pm 0,72^b$	Xuất hiện rễ mới
5,0	$80 \pm 4,2^a$	$15,2 \pm 1,68^a$	$11 \pm 1,21^a$	Rễ khỏe, rễ mới sinh trưởng tốt
7,0	$45 \pm 2,7^c$	$10,2 \pm 0,92^b$	$8,3 \pm 0,45^b$	Rễ mảnh, rễ mới mảnh, yếu
CV %	4,2	1,8	1,6	

Trong môi trường 1/6 WPM bổ sung IAA ở nồng độ 5,0 mg/l, lượng rễ mới xuất hiện nhiều, chất lượng rễ ban đầu và rễ mới hình thành ở trạng thái khỏe mạnh đạt $80 \pm 4,2\%$ và $11 \pm 1,21$ rễ mới/cây con.

Ảnh hưởng của IBA: IBA ở các nồng độ từ 1,0 đến 9,0 mg/l được bổ sung vào môi trường 1/6 WPM để đánh giá khả năng cảm ứng tạo rễ bất định trong điều kiện thủy canh. Sau 4 tuần nuôi, tỷ lệ mẫu xuất hiện rễ mới cao nhất đạt $80 \pm 6,3\%$ và số lượng rễ mới cao nhất đạt 13 rễ mới/cây con được quan sát thấy ở môi trường 1/6 WPM bổ sung IBA 7,0 mg/l (bảng 5, hình 1).

Bảng 5. Ảnh hưởng của IBA tới khả năng tạo rễ bất định.

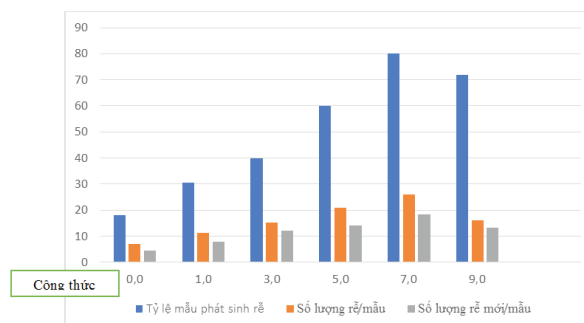
IBA (mg/l)	Tỷ lệ mẫu xuất hiện rễ (%)	Số lượng rễ/mẫu	Số lượng rễ mới sản sinh	Đặc điểm rễ
0	$16,2 \pm 1,56$	$15,0 \pm 1,56$	$3,2 \pm 0,25$	Rễ bình thường, không có rễ mới xuất hiện
1,0	$30,6 \pm 2,6^c$	$15,2 \pm 1,32^c$	$8,0 \pm 0,49^c$	Rất ít rễ mới xuất hiện
3,0	$40,6 \pm 2,5^c$	$16,4 \pm 1,12^c$	$10,13 \pm 0,72^c$	Rễ cũ phát triển tốt, có xuất hiện rễ mới
5,0	$65 \pm 3,6^b$	$18,4 \pm 0,92^b$	$11,24 \pm 1,03^b$	Rễ cũ phát triển tốt, có xuất hiện nhiều rễ mới
7,0	$80 \pm 6,3^a$	$24,6 \pm 1,94^a$	$13 \pm 0,8^a$	Rễ cũ phát triển tốt, có xuất hiện rất nhiều rễ mới
9,0	$76,62^b$	$16,4 \pm 1,21^c$	$9,12^c$	Rễ bị xỉn màu
CV %	4,26	2,75	1,6	



Hình 1. Ảnh hưởng của IBA đến sự hình thành rễ bất định trong môi trường thủy canh (hình 1A, 2A và 3A tương ứng với thời điểm ban đầu, nuôi trong môi trường thủy canh sau 0,2 và 4 tuần. Các hình 1B, 2B, 3B tương ứng với việc phát sinh rễ bất định tại các thời điểm ban đầu, nuôi trong môi trường thủy canh sau 0,2 và 4 tuần).

Ảnh hưởng của α -NAA: trong nhóm auxin thì α -NAA được xem như một loại hormone phổ biến kích thích tạo rễ bất định ở các loài thực vật. Do vậy, trong nghiên cứu này,

các nồng độ α -NAA khác nhau được thử nghiệm. Kết quả sau 4 tuần cho thấy, α -NAA có tác động mạnh tới khả năng tạo rễ bất định của Xáo tam phân trong điều kiện thủy canh. Nồng độ α -NAA 7,0 mg/l kích thích $80 \pm 5,6\%$ mẫu phát sinh rễ mới và lượng rễ mới cao nhất đạt 26 rễ/cây. Ở nồng độ α -NAA 7,0 mg/l, rễ cũng phát triển nhanh hơn và dài hơn so với các nồng độ α -NAA khác. Số lượng rễ/cây con dao động từ 7,6-26,2 khi nồng độ α -NAA tăng từ 0 đến 9,0 mg/l. Ở nồng độ α -NAA 9,0 mg/l, cây con sinh trưởng chậm, rễ yếu và nhanh chuyển sang màu nâu và đen (hình 2).



Hình 2. Ảnh hưởng của α -NAA tới khả năng tạo rễ bất định Xáo tam phân (sau 4 tuần).

Ảnh hưởng của IBA và α -NAA: những nghiên cứu gần đây cho thấy, sự kết hợp giữa 2 loại hormone thuộc nhóm auxin IBA và α -NAA có tác động kích thích khả năng sản sinh rễ ở thực vật [16-20]. Trong nghiên cứu này, sự kết hợp giữa α -NAA ở các khoảng nồng độ khác nhau với IBA (7,0 mg/l) đã được tiến hành. Kết quả nghiên cứu sau 4 tuần được thể hiện ở bảng 6.

Bảng 6. Ảnh hưởng của sự kết hợp giữa IBA, α -NAA đến khả năng tạo rễ bất định.

α -NAA (mg/l)	Tỷ lệ mẫu tạo rễ (%)	Số lượng rễ/mẫu (rễ)	Số lượng rễ mới (rễ)	Đặc điểm rễ
1,0	$80,2 \pm 4,81^b$	$20,2 \pm 1,33^c$	$16 \pm 0,49^c$	Rễ yếu, lượng rễ mới xuất hiện vừa phải
3,0	$82,6 \pm 5,64^a$	$21,2 \pm 1,18^b$	$17,6 \pm 0,82^b$	
5,0	$86,2 \pm 5,37^b$	$22,6 \pm 1,58^a$	$17,92 \pm 1,33^b$	
7,0	$90,6 \pm 4,6^a$	$23,2 \pm 1,62^a$	$21,12 \pm 1,33^a$	Rất nhiều rễ mới xuất hiện, khỏe và dài
9,0	$84 \pm 4,1^c$	$20,2 \pm 1,32^c$	$16,2 \pm 1,63^c$	Rễ yếu, dài và mảnh
CV %	4,76	1,38	1,82	

Như vậy, việc bổ sung α -NAA làm tăng cả chất lượng và số lượng rễ mới hình thành. Trong nghiên cứu này, nồng độ α -NAA từ 1,0 đến 9,0 mg/l kết hợp với 7,0 mg/l IBA cho thấy, lượng rễ mới xuất hiện nhiều và rất khỏe (hình 3). Khi nuôi cây trong môi trường bổ sung 7,0 mg/l α -NAA và 7,0 mg/l IBA $90,6 \pm 4,6\%$ mẫu xuất hiện rễ và số rễ mới đạt $21,12 \pm 1,33$ rễ/cây con (bảng 6), trong khi khi sử dụng riêng rẽ IBA chỉ đạt $80 \pm 6,3\%$ mẫu tạo rễ và số rễ mới đạt 13 rễ/cây con (bảng 5).



Hình 3. Sự hình thành rễ bất định trong môi trường 1/6 WPM bổ sung IBA và α -NAA (tổ hợp hai hormon thuộc nhóm auxin IBA và α -NAA ở nồng độ 7,0 mg/l sau 4 tuần nuôi trong điều kiện thủy canh *in vivo*).

Kết luận

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã tiến hành các thử nghiệm tạo rễ bất định Xáo tam phân trong điều kiện thủy canh và tìm ra môi trường thích hợp cho sự sống và phát triển của Xáo tam phân là WPM/6 (tỷ lệ sống đạt 96,21%). Các cây có khả năng sinh trưởng tốt được chuyển sang môi trường có bổ sung IBA (7,0 mg/l), α -NAA (7,0 mg/l) để tạo rễ bất định; sau 4 tuần, số lượng rễ mới phát sinh đạt 21,12 rễ/cây con, tỷ lệ mẫu phát sinh rễ đạt 90,6%. Có thể thấy rằng, cây con Xáo tam phân có thể sống, sinh trưởng và phát triển tốt trong điều kiện thủy canh. Việc bổ sung kết hợp giữa IBA 7,0 mg/l và α -NAA 7,0 mg/l trong môi trường WPM/6 là phù hợp nhất để cảm ứng tạo rễ bất định Xáo tam phân trong điều kiện thủy canh *in vivo*.

LỜI CẢM ƠN

Nhóm nghiên cứu xin cảm ơn Chương trình dự án Việt - Bỉ (AI Programe-VNUA, 2014-2019) đã hỗ trợ kinh phí cho đề tài “A study of phylogenetics and biopharmaceutical properties of the Vietnamese traditional medicinal plants belonging to the genus *Paramignya* for the development of hepatoprotective nutraceuticals”, năm 2018-2019.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] T.T.L. Bùi, H.P. Đặng, T.N. Nguyễn (2015), “Khảo sát thành phần hóa học cao chloroform của thân cây Xáo tam phân - *P. trimera* oliver burkill - họ Rutaceae”, *Tạp chí Phân tích hóa, lý và sinh học*, **20(4)**, tr.37-45.
- [2] M.C. Nguyễn, T.H. Trần, N.K. Phạm, T.S. Ninh, T.C. Nguyễn, T.T. Đỗ (2016), “Đánh giá tác dụng bảo vệ gan của rễ cây Xáo tam phân (*P. trimera*) trên chuột gây tổn thương gan bằng Paracetamol”, *Tạp chí Khoa học và công nghệ*, **54(1)**, tr.37-45.
- [3] L.T.A. Hoang, D.C. Kim, W. Ko, T.M. Ha, N.X. Nhiem, P.H. Yen, B.H. Tai, L.H. Truong, V.N. Long, T. Gioi, T. Hong Quang, C.V. Minh,

H. Oh, Y.C. Kim, P.V. Kiem (2017), “Anti-inflammatory coumarins from *Paramignya trimera*”, *Pharm. Biol.*, **55(1)**, pp.1195-1201.

[4] S.C. Jarvis, D.J. Hatch (1985), “Rates of hydrogen-ion efflux by nodulated legumes grown in flowing solution culture with continuous pH monitoring and adjustment”, *Annals of Botany*, **55(1)**, pp.41-51.

[5] J.B. Jones (1982), “Hydroponics: Its history and use in plant nutrition studies”, *Journal of Plant Nutrition*, **5(8)**, pp.1003-1030.

[6] B.H. McCown, G. Lloyd (1981), “A mineral nutrient formulation for microculture of woody plant species”, *HortScience*, **16**, p.453.

[7] D.R. Hoagland, D.I. Arnon (1938), *The water culture method for growing plants without soil*, University of California, College of Agriculture, Agricultural Experiment Station, Circular 347, Berkeley, USA.

[8] T. Murashige, F. Skoog (1962), “A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures”, *Physiol. Plant*, **15(3)**, pp.473-497.

[9] L. Knudson (1946), “A new nutrient solution for germination of orchid seeds”, *American Orchid Society Bulletin*, **15**, pp.214-217.

[10] R.B. Jackson, J.H. Manwaring, M.M. Caldwell (1990), “Rapid physiological adjustment of roots to localized soil enrichment”, *Nature*, **344(6261)**, pp. 58-60.

[11] H.A. Bilal, B. Guo, et al. (2011), “Thidiazuron: A multi-dimensional plant growth regulator”, *African Journal of Biotechnology*, **10(45)**, pp.8984-9000.

[12] P. Bradley, C. Marulanda (2000), *Potential of Simplified Hydroponics to Provide Urban Agriculture Income*.

[13] A.D. Mackay, S.A. Barber (1984), “Comparison of root and root hair-growth in solution and soil culture”, *Journal of Plant Nutrition*, **7(12)**, pp.1745-1757.

[14] M. Mehdi, G.O. Vali-Ollah, T. Sepide (2015), “The effect of different concentrations of TDZ and BA on *in vitro* regeneration of Iranian cannabis (*Cannabis sativa*) using cotyledon and epicotyl explants”, *Journal of Plant Molecular Breeding*, **3(2)**, pp.20-27.

[15] Nayan Tara, Meena (2017), “Application of nanotechnology to plant biotechnology”, *Journal of Plant Development Sciences*, **9(8)**, pp.757-760.

[16] A.G. Reza, R.S. Uma, A.A. Maheeran, M. Rosfarizan (2014), “Influence of Cytokinins in Combination with GA3 on Shoot Multiplication and Elongation of Tea Clone Iran 100 (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze)”, *Scientific World Journal*, Doi:10.1155/2014/943054.

[17] H.S. Shin, H.J. Yang, S.B. Kim, M.S. Lee (2004), “Mechanism of growth of colloidal silver nanoparticles stabilized by polyvinyl pyrrolidone in gamma - irradiated silver nitrate solution”, *J. Colloid Interface Sci.*, **274(1)**, pp.89-94.

[18] V.T. Tran, V.K. Le (2017), “Effect of growth stimulants on propagation of *Paramignya trimera* (Oliver) Burkill by cuttings and extracts”, *Hue Science Journal*, **126(3)**, pp.5-11.

[19] H.D. Trịnh, T.P. Trần (2016), “Coumarin và acridon alkaloid từ rễ cây Xáo tam phân (*P. trimera*)”, *Tạp chí Khoa học*, **32(4)**, tr.115-123.

[20] G. Wang, Ch. Shi, N. Zhao, X. Du (2007), “Synthesis and characterization of Ag nanoparticles assembled in ordered array pores of porous anodic alumina by chemical deposition”, *Materials Letters*, **61(18)**, pp.3795-3797.

Phá quang kỳ giống lúa mùa Nàng Quót Biển bằng phương pháp xử lý đột biến sốc nhiệt

Trần Thị Phương Thảo^{1*}, Võ Công Thành¹, Nguyễn Bích Hà Vũ²

¹Khoa Nông nghiệp và Sinh học ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ

²Khoa Nông nghiệp và Công nghệ thực phẩm, Trường Đại học Tiền Giang

Ngày nhận bài 18/10/2018; ngày chuyển phản biện 22/10/2018; ngày nhận phản biện 28/11/2018; ngày chấp nhận đăng 26/12/2018

Tóm tắt:

Trước tình hình biến đổi khí hậu, Đồng bằng sông Cửu Long đang cần những giống lúa ngắn ngày (90-120 ngày), có khả năng chịu mặn cao ($12-19 \text{ dSm}^{-1}$), kháng rầy nâu và phẩm chất tốt. Nàng Quót Biển là một giống lúa mùa có khả năng chịu mặn $12-15 \text{ dSm}^{-1}$. Tuy nhiên, giống có thời gian sinh trưởng khá dài (150-180 ngày). Chính vì vậy, giống lúa mùa Nàng Quót Biển được phá quang kỳ bằng phương pháp xử lý đột biến sốc nhiệt ở 50°C trong thời gian 5 phút. Các dòng đột biến được trắc nghiệm khả năng chống chịu mặn theo phương pháp của IRRI (1997), phân tích đánh giá phẩm chất qua các thể hệ và trắc nghiệm khả năng chống chịu rầy nâu, sau cùng kiểm tra độ thuần bằng phương pháp điện di SDS-PAGE. Kết quả cho thấy ở thể hệ M_4 chọn được hai dòng ưu tú NQBĐB 1-2-1-1 và NQBĐB 2-1-6-3 thuần có thời gian sinh trưởng ngắn (≤ 110 ngày), chiều cao cây $< 120 \text{ cm}$, hàm lượng amylose $< 20\%$, chống chịu rầy nâu, chống chịu đổ ngã. Đặc biệt, hai dòng này có khả năng chịu mặn ở 19 dSm^{-1} (cấp 5) và đều thích hợp cho mô hình tôm - lúa.

Từ khóa: chống chịu mặn, lúa mùa, SDS-PAGE, sốc nhiệt.

Chỉ số phân loại: 4.6

Đặt vấn đề

Trong lĩnh vực chọn tạo giống lúa, lai tạo và gây đột biến là các phương thức tạo đa dạng nguồn gen phục vụ cho công tác chọn tạo giống mới. Đột biến là một phương pháp có tính ứng dụng cao, trong đó sử dụng các tác nhân vật lý và hóa học để gây đột biến nhằm rút ngắn thời gian chọn tạo giống, có thể tạo ra những tính trạng quý chưa có ở giống gốc [1-3] hoặc cải thiện được một số tính trạng như năng suất, thời gian sinh trưởng, chiều cao cây, kháng sâu bệnh hoặc khả năng chống chịu stress với môi trường như hạn hán, ngập, mặn [4, 5]. Quan Thị Ái Liên và ctv (2013) [6] đã rút ngắn thời gian sinh trưởng của giống lúa “Sỏi” mùa bằng phương pháp gây đột biến sốc nhiệt.

Trong những năm gần đây, diện tích đất nhiễm mặn của vùng Đồng bằng sông Cửu Long (ĐBSCL) tăng do biến đổi khí hậu và ước có khoảng 700.000 ha lúa bị nhiễm mặn [7]. Điều tra vùng ĐBSCL, Quan Thị Ái Liên và ctv (2013) [6] đã ghi nhận nước mặn xâm nhập từ tháng 12 đến tháng 5, nông dân đã tranh thủ lấy nước mặn để nuôi tôm; từ tháng 6 đến tháng 12 rửa mặn bằng nước mưa để trồng lúa. Chính vì vậy, để gieo trồng kịp thời vụ, giống lúa được canh tác phải có khả năng chịu mặn cao ở giai đoạn mạ và ngắn ngày (< 120 ngày) để né mặn vào cuối vụ là yêu cầu cấp thiết hiện nay. Nàng Quót Biển là giống lúa mùa được thu thập tại

vùng ven biển các tỉnh ĐBSCL [8], có khả năng chịu mặn giai đoạn mạ cao ($12-15 \text{ dSm}^{-1}$) [1]. Tuy nhiên, giống có thời gian sinh trưởng dài (5-6 tháng) do ảnh hưởng quang kỳ [9] và nhiễm rầy nâu. Do đó, việc xử lý đột biến giống lúa mùa Nàng Quót Biển nhằm chọn được dòng lúa đột biến ngắn ngày, không bị ảnh hưởng quang kỳ, có khả năng chịu mặn vào giai đoạn mạ cao là mục tiêu của nghiên cứu này.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu, địa điểm, thời gian nghiên cứu

Sử dụng hạt giống lúa mùa Nàng Quót Biển do Bộ môn Di truyền và Chọn giống cây trồng, Trường Đại học Cần Thơ cung cấp để làm vật liệu xử lý đột biến.

Bảng 1. Một số đặc tính gốc của giống lúa mùa Nàng Quót Biển.

Giống	Đặc tính giống	Kết quả
Nàng Quót Biển	Thời gian sinh trưởng	170-180 ngày
	Chiều cao cây	180-190 cm
	Dạng hạt	Trung bình
	Khả năng chịu mặn	$12-15 \text{ dSm}^{-1}$
	Màu sắc hạt gạo	Đỏ
	Khả năng kháng rầy	Nhiễm

*Tác giả liên hệ: ttpuong thao@ctu.edu.vn

Shortening maturity duration of the seasonal rice variety Nang Quot Bien by temperature-sensitive method

Thi Phuong Thao Tran^{1*}, Cong Thanh Vo¹,
Bich Ha Vu Nguyen²

¹College of Agriculture and Applied Biology, Can Tho University

²College of Agriculture and Food Technology, Tien Giang University

Received 18 October 2018; accepted 26 December 2018

Abstract:

Coping with climate change, the Mekong River Delta of Viet Nam is in the need of rice varieties with short growth durations (90-120 days), good tolerance to salinity (12-19 dSm⁻¹), good resistance to brown plant hopper, and good grain quality. Nang Quot Bien is a seasonal rice with very good tolerance to salinity from 12 to 15 dSm⁻¹. However, its maturity duration is quite long (150-170 days). Therefore, Nang Quot Bien's maturity duration was shortened by temperature shock mutagen at 50°C for 5 minutes. Mutated lines were tested in terms of salinity tolerance according to IRRI method (1997), grain quality, brown plant hopper resistance, and pure line test by SDS-PAGE protein electrophoresis. Results at the M₄ generation showed that two elite lines NQBDB 1-2-1-1 and NQBDB 2-1-6-3 with short maturity (≤110 days), final height <120 cm, low amylose content <20%, resistance to brown plant hopper, lodging resistant. Particularly, the two lines could tolerate to 19 dSm⁻¹ (scale 5) and adapt well with the model of shrimp-rice.

Keywords: salinity tolerance, SDS-PAGE, seasonal rice, temperature-sensitive.

Classification number: 4.6

Các giống lúa đối chứng sử dụng đánh giá khả năng chịu mặn và kháng rầy nâu: chuẩn nhiễm mặn: IR28; chuẩn kháng mặn: Đốc Phụng; chuẩn nhiễm rầy nâu: TN1.

Phương pháp nghiên cứu

Xử lý đột biến: 1.000 hạt giống lúa mùa Nàng Quot Bien được lột vỏ trấu, ngâm ủ cho hạt vừa nảy mầm, gây đột biến bằng nhiệt độ ở 50°C trong 5 phút [6].

Chọn dòng đột biến: sau khi xử lý đột biến bằng nhiệt, tất cả các cá thể đã được xử lý (M₁) được đem gieo trồng trong mùa thuận (gieo vào 07/2014 dương lịch), theo dõi, ghi nhận, thu hoạch những cá thể trổ bông và chín sớm so với giống lúa mùa Nàng Quot Bien đối chứng. Tiếp tục nhân và chọn tất cả các cá thể theo hướng ngắn ngày (<120 ngày) thu được từ thế hệ M₁. Thế hệ M₂, các dòng được chọn trồng vào mùa nghịch (gieo vào 01/2015 dương lịch). Thế hệ M₃ và M₄ tiến hành tương tự hai vụ trước.

Qua mỗi thế hệ tiến hành đánh giá các chỉ tiêu nông học, thành phần năng suất, đánh giá khả năng chống chịu mặn, kháng rầy nâu, kháng đổ ngã, đánh giá các chỉ tiêu phẩm chất hạt.

Đánh giá chỉ tiêu nông học và thành phần năng suất theo Quy phạm khảo nghiệm giá trị canh tác và sử dụng của giống lúa QCVN 01-55: 2011/BNNPTNT [10].

Đánh giá khả năng chống chịu mặn theo IRRI 1997 [11] với các nồng độ 12, 15, 19 và 23 dSm⁻¹, kết quả được ghi nhận khi giống chuẩn nhiễm IR28 ở cấp 9.

Đánh giá khả năng kháng rầy nâu: áp dụng phương pháp thanh lọc theo tiêu chuẩn hộp mạ [12].

Đánh giá về khả năng chống chịu đổ ngã: các lóng thân của cây lúa được tách hết bẹ lá. Sử dụng máy đo độ cứng IMADA (Torque gauges IMADA) với độ chính xác +0,5% FS.

Đánh giá phẩm chất: điện di protein tổng số SDS-PAGE [13], phân tích hàm lượng amylose theo phương pháp của Cagampang và Rodriguez (1980) [14], hàm lượng protein [15], độ trở hồ [16], độ bền thể gel [17].

Kết quả và thảo luận

Thế hệ M₁

Ở thế hệ M₁ thu được 2 cá thể đột biến có thời gian sinh trưởng 121 ngày và 132 ngày, ngắn hơn so với đối chứng (175 ngày), được ký hiệu là NQBDB-1 và NQBDB-2.

Hai dòng biến dị này có một số đặc tính nông học và thành phần năng suất khác với giống gốc ban đầu, kết quả ghi nhận các chỉ tiêu nông học và thành phần năng suất của các dòng biến dị được trình bày trong bảng 2.

Bảng 2. Đặc tính nông học và thành phần năng suất thể hệ M_1 .

Tên giống/dòng	Thời gian sinh trưởng (ngày)	Cao cây (cm)	Bông/bụi	Hạt chắc/bông (%)	Hạt chắc (%)	Khối lượng 1.000 hạt (g)	Dài hạt (mm)	Màu sắc hạt gạo
NQBĐB 1	121	91	15	143	86	27,0	7,1	Đỏ
NQBĐB 2	132	104	21	134	82	26,5	6,5	Trắng
Đối chứng	175	145	11	110	77	26,0	6,9	Đỏ

Từ kết quả ghi nhận ở bảng 2 cho thấy, hai dòng biến dị QBĐB 1 và QBĐB 2 có chiều cao cây thấp và giảm khoảng 37,24% so với Năng Quót Biển mùa đối chứng. Chiều dài hạt thay đổi từ 6,9 mm (đối chứng) lên 7,1 mm (QBĐB 1) và xuống còn 6,5 mm (QBĐB 2). Đặc biệt, có sự thay đổi về màu sắc hạt, từ hạt gạo màu đỏ của giống Năng Quót Biển ban đầu, sau khi xử lý nhiệt độ đã thành hạt gạo màu trắng của dòng QBĐB 2. Kết quả này phù hợp với kết quả của Viện Di truyền nông nghiệp, sau khi xử lý hạt khô của giống Chiêm Bàu bằng tia gamma 200 Gy đã tạo ra giống lúa đột biến CM1 có màu sắc hạt gạo thay đổi từ đỏ thành trắng [5].

Thể hệ M_2 , M_3

Hai cá thể ở thể hệ M_1 được chọn thông qua thời gian sinh trưởng ngắn và chiều cao cây thấp được nhân dòng lên trong nhà lưới cùng với đối chứng Năng Quót Biển ở thể hệ M_2 và được bố trí vào vụ nghịch (trồng từ tháng 01/2015 dương lịch). Thể hệ M_2 , ghi nhận có 9 dòng có thời gian sinh trưởng ngắn biến thiên từ 100-125 ngày, chiều cao cây từ 102-110 cm, chiều dài hạt gạo biến thiên từ 6,3-7,5 cm, có sự phân ly về màu sắc hạt: 5 dòng hạt màu đỏ và 4 dòng hạt màu trắng, chọn 2 cá thể có thời gian sinh trưởng ngắn nhất (100 ngày) trong 9 cá thể để tiếp tục nhân dòng ở thể hệ M_3 . Thể hệ M_3 , chọn được 10 cá thể có thời gian sinh trưởng biến thiên từ 90-94 ngày, chiều cao cây 101-110 cm, chiều dài hạt gạo từ 6,6-7,5 cm, có 6 cá thể hạt màu đỏ và 4 cá thể hạt màu trắng. Kết thúc thể hệ M_3 , chọn được 7 cá thể ưu tú có thời gian sinh trưởng <100 ngày, chống chịu mặn 12-19 dSm⁻¹, kháng rầy nâu cấp 3, chống chịu đổ ngã cấp 1 tiếp tục được nhân lên tạo dòng thuần ở thể hệ M_4 .

Thể hệ M_4

Tương tự như các thể hệ trước, các dòng M_4 cũng được tuyển chọn theo hướng có đặc tính nông học tốt: thời gian sinh trưởng ngắn, thấp cây, nảy chồi tốt, chịu mặn... để tiếp tục chọn các dòng ưu tú.

Một số chỉ tiêu nông học và thành phần năng suất của các cá thể Năng Quót Biển đột biến thể hệ M_4 :

Đến thể hệ M_4 chọn được 14 cá thể có thời gian sinh trưởng tương đối ngắn, dao động từ 95-110 ngày (bảng 3) phù hợp với mục tiêu chọn lọc giống lúa chịu mặn cho vùng ĐBSCL [7]. Các dòng được chọn có chiều cao cây đa

dạng, biến thiên từ 90 đến 115 cm, thích hợp canh tác trong mô hình tôm - lúa. Nguyễn Thị Lang và ctv (2010) [18]; Nguyễn Hữu Hiệp và ctv (2009) [19] cũng cho rằng, giống lúa Một Bụi Đỏ là giống lúa mùa được chọn canh tác chính trong mô hình tôm - lúa tại các tỉnh thuộc ĐBSCL như Bạc Liêu, Cà Mau, Kiên Giang... cũng có chiều cao 100-120 cm, như vậy các dòng đột biến có chiều cao tiềm năng phù hợp canh tác trong mô hình tôm - lúa.

Các yếu tố cấu thành năng suất các dòng thể hệ M_4 (bảng 3) cho thấy hầu hết đạt tỷ lệ hạt chắc trên 80%, trung bình là 81,05%. Theo Nguyễn Ngọc Đệ (2008) [9], Jennings và ctv (1979) [16], giống lúa cho năng suất cao phải có tỷ lệ hạt chắc trên 80%, như vậy các dòng đột biến chịu mặn ở thể hệ M_4 là những dòng rất có tiềm năng cho năng suất cao. Khối lượng 1.000 hạt của các dòng biến thiên trong khoảng từ 23,6-28,8 g. Nguyễn Ngọc Đệ (2008) [9], Nguyễn Thị Lang (1994) [20] cho rằng, khối lượng 1.000 hạt thường biến thiên tập trung trong khoảng 20-30 g. Giống có khối lượng 1.000 hạt càng lớn thì năng suất của giống đó càng cao. Vì vậy, các cá thể đột biến chịu mặn có tiềm năng cho năng suất cao.

Bảng 3. Các chỉ tiêu nông học và thành phần năng suất các dòng thể hệ M_4 .

STT	Tên giống/dòng	Cao cây (cm)	Thời gian sinh trưởng (ngày)	Hạt chắc (%)	Dài bông (cm)	Khối lượng 1.000 hạt (g)
1	NQBĐB 1-2-1-1	100	97	82,1	25,3	26,0
2	NQBĐB 1-2-4-3	99	100	85,4	24,6	25,3
3	NQBĐB 2-1-3-1	90	103	84,7	27,8	25,6
4	NQBĐB 2-1-6-3	101	103	85,6	30,7	24,3
5	NQBĐB 1-2-1-2	116	97	79,6	30,3	26,3
6	NQBĐB 1-2-3-1	110	98	80,7	26,5	26,8
7	NQBĐB 1-2-4-2	105	98	80,2	27,5	27,3
8	NQBĐB 2-1-1-1	114	105	82,0	25,9	28,8
9	NQBĐB 2-1-3-2	103	110	83,5	26,5	25,7
10	NQBĐB 2-1-6-2	103	110	66,8	25,8	23,6
11	NQBĐB 1-2-2-1	104	100	80,3	24,8	25,3
12	NQBĐB 1-2-3-2	100	100	79,3	27,5	26,7
13	NQBĐB 2-1-1-2	103	107	83,2	25,6	26,3
14	NQBĐB 2-1-6-1	114	110	81,3	25,5	24,3
15	Đối chứng	-	-	-	-	-

Một số chỉ tiêu phẩm chất của các dòng đột biến thể hệ M_4 :

Bảng 4 trình bày kết quả phân tích các chỉ tiêu phẩm chất hạt gạo của các dòng đột biến ở thể hệ M_4 . Kích thước hạt gạo thay đổi trong khoảng từ 6,0 mm cho đến 7,8 mm, thấp nhất là dòng QBĐB 2-1-3-2 và cao nhất là dòng QBĐB 1-2-1-1.

Bảng 4. Các chỉ tiêu phẩm chất của các dòng đột biến ở thể hệ M_4 .

STT	Tên giống/dòng	A (%)	P (%)	Nhiệt trở hồ (cấp)	Độ bền gel (cấp)	Dài hạt (cm)	Màu sắc hạt
1	NQBDB 1-2-1-1	19,19	7,52	3	3	7,8	Đỏ
2	NQBDB 1-2-4-3	18,56	7,25	3	3	6,2	Trắng
3	NQBDB 2-1-3-1	17,64	7,20	3	3	6,2	Đỏ
4	NQBDB 2-1-6-3	15,08	6,45	3	3	7,0	Đỏ
5	NQBDB 1-2-1-2	17,69	7,81	5	3	6,9	Đỏ
6	NQBDB 1-2-3-1	18,01	7,92	3	3	6,3	Trắng
7	NQBDB 1-2-4-2	18,84	7,34	3	3	7,2	Đỏ
8	NQBDB 2-1-1-1	15,23	7,13	3	3	6,3	Trắng
9	NQBDB 2-1-3-2	17,99	8,50	3	3	6,0	Đỏ
10	NQBDB 2-1-6-2	16,04	7,18	3	1	6,9	Đỏ
11	NQBDB 1-2-2-1	15,60	6,53	3	3	7,1	Đỏ
12	NQBDB 1-2-3-2	17,99	7,02	5	3	7,0	Trắng
13	NQBDB 2-1-1-2	12,72	8,31	3	1	7,1	Trắng
14	NQBDB 2-1-6-1	18,25	6,64	3	3	7,2	Đỏ
15	Đối chứng	19,05	7,05	3	3	6,4	Đỏ

A: Hàm lượng amylose, P: hàm lượng protein.

Mười bốn dòng đột biến chịu mặn thể hệ M_4 có hàm lượng amylose thấp (<20%), biến thiên từ 15,08-19,19%, tương đương với đối chứng. Độ bền gel của các dòng đột biến chịu mặn được đánh giá từ cấp 1-3, protein đạt khá cao (đa số từ 7-8%, cao nhất là dòng NQBDB 2-1-3-2 có hàm lượng protein đạt 8,50%) (bảng 4). Kết thúc thể hệ M_4 vẫn ghi nhận có 2 màu sắc hạt gạo là màu đỏ và màu trắng.

**Hình 1. Màu sắc hạt gạo của (A) Đối chứng, (B) NQBDB 2-1-1-2 và (C) NQBDB 2-1-3-1.**

Đánh giá khả năng chống chịu mặn của các dòng đột biến thể hệ M_4 :

Kết quả đánh giá khả năng chịu mặn của 14 dòng đột biến ở thể hệ M_4 được trình bày trong bảng 5.

Bảng 5. Kết quả đánh giá khả năng chống chịu mặn của 14 dòng đột biến ở thể hệ M_4 (cấp độ chống chịu cao nhất).

STT	Tên giống/dòng	Nồng độ (dSm ⁻¹)	Mức phản ứng	Cấp đánh giá
1	NQBDB 1-2-1-1	19	Chống chịu trung bình	5
2	NQBDB 1-2-4-3	19	Nhiễm	7
3	NQBDB 2-1-3-1	19	Nhiễm	7
4	NQBDB 2-1-6-3	19	Chống chịu trung bình	5
5	NQBDB 1-2-1-2	15	Chống chịu trung bình	5
6	NQBDB 1-2-3-1	15	Nhiễm	7
7	NQBDB 1-2-4-2	15	Chống chịu trung bình	5
8	NQBDB 2-1-1-1	15	Nhiễm	7
9	NQBDB 2-1-3-2	15	Chống chịu trung bình	5
10	NQBDB 2-1-6-2	15	Chống chịu trung bình	5
11	NQBDB 1-2-2-1	12	Nhiễm	7
12	NQBDB 1-2-3-2	12	Chống chịu	3
13	NQBDB 2-1-1-2	12	Chống chịu trung bình	5
14	NQBDB 2-1-6-1	12	Chống chịu	3
15	Đối chứng	15	Chống chịu trung bình	5

Có hai dòng có khả năng chống chịu ở nồng độ muối 19 dSm⁻¹ là NQBDB 1-2-1-1 và NQBDB 2-1-6-3 được đánh giá cấp 5 (cấp chống chịu trung bình), cao hơn so với giống đối chứng Nàng Quýt Biển mùa. Các dòng còn lại có khả năng chống chịu ở các nồng độ muối là 15 và 12 dSm⁻¹, tương đương so với giống đối chứng.

Đánh giá khả năng chống chịu rầy nâu của các dòng đột biến thể hệ M_4 :

Kết quả thử rầy ghi nhận được sau 8 ngày (tính từ ngày thả rầy) khi giống chuẩn nhiễm chết hoàn toàn (bảng 6).

Bảng 6. Kết quả đánh giá khả năng kháng rầy của 14 dòng đột biến ở thể hệ M_4 .

STT	Tên giống/dòng	Mức phản ứng	Cấp đánh giá
1	NQBDB 1-2-1-1	Hơi kháng	3
2	NQBDB 1-2-4-3	Rất nhiễm	9
3	NQBDB 2-1-3-1	Rất nhiễm	9
4	NQBDB 2-1-6-3	Nhiễm	7
5	NQBDB 1-2-1-2	Hơi kháng	3
6	NQBDB 1-2-3-1	Nhiễm	7
7	NQBDB 1-2-4-2	Nhiễm	7
8	NQBDB 2-1-1-1	Nhiễm	7
9	NQBDB 2-1-3-2	Rất nhiễm	9
10	NQBDB 2-1-6-2	Hơi kháng	3
11	NQBDB 1-2-2-1	Nhiễm	7
12	NQBDB 1-2-3-2	Nhiễm	7
13	NQBDB 2-1-1-2	Nhiễm	7
14	NQBDB 2-1-6-1	Nhiễm	7
15	Đối chứng	Rất nhiễm	9

Theo kết quả bảng 6, các cá thể thể hệ M_4 tương đối nhiễm rầy. Tuy nhiên, có ba dòng NQBĐB 1-2-1-1, NQBĐB 1-2-1-2, NQBĐB 2-1-6-2 được đánh giá là hơi kháng rầy nâu cấp 3, trong khi đối chứng được đánh giá rất nhiễm rầy (cấp 9). Từ đó có thể kết luận rằng, ba cá thể NQBĐB 1-2-1-1, NQBĐB 1-2-1-2 và NQBĐB 2-1-6-2 đã cải thiện được khả năng chống chịu rầy nâu của giống đối chứng. Có 72 gene kiểm soát tính kháng côn trùng của cây lúa và các gene này có thể được biểu hiện sau khi chịu tác động của một tác nhân gây đột biến [21].

Đánh giá độ cứng cây của các dòng đột biến thể hệ M_4 :

Độ cứng và cấp đổ ngã của 14 dòng đột biến ở thể hệ M_4 được đánh giá cao. Tất cả các dòng đều được đánh giá là kháng đổ ngã (cấp 1). Độ cứng của các lóng cũng khá cao, cao nhất là dòng NQBĐB 2-1-1-2 có độ cứng các lóng 1, 2, 3, 4 lần lượt là 2,3 N/cm, 4,2 N/cm, 8,8 N/cm và 14,5 N/cm và thấp nhất là dòng NQBĐB 2-1-3-1 có độ cứng lần lượt là 2,1 N/cm, 4,8 N/cm, 7,5 N/cm và 10,4 N/cm (bảng 7).

Bảng 7. Độ cứng (N/cm) của các dòng đột biến ở thể hệ M_4 .

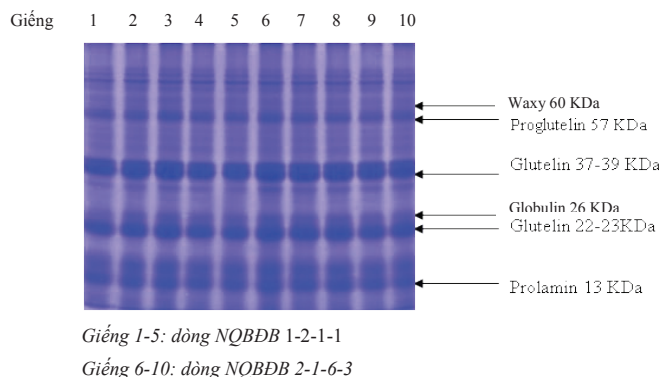
STT	Tên giống/dòng	Lóng 1	Lóng 2	Lóng 3	Lóng 4	Cấp đánh giá mức độ ngã
1	NQBĐB 1-2-1-1	2,0	4,6	7,8	11,3	1
2	NQBĐB 1-2-4-3	2,3	5,8	8,6	12,2	1
3	NQBĐB 2-1-3-1	2,1	4,8	7,5	10,4	1
4	NQBĐB 2-1-6-3	2,1	5,2	8,2	11,8	1
5	NQBĐB 1-2-1-2	2,3	5,4	7,6	10,5	1
6	NQBĐB 1-2-3-1	2,2	5,5	8,8	12,5	1
7	NQBĐB 1-2-4-2	2,3	5,6	7,7	11,9	1
8	NQBĐB 2-1-1-1	2,0	5,6	7,4	10,8	1
9	NQBĐB 2-1-3-2	2,1	4,8	7,5	11,5	1
10	NQBĐB 2-1-6-2	2,5	4,8	7,8	12,1	1
11	NQBĐB 1-2-2-1	2,5	5,6	9,0	11,8	1
12	NQBĐB 1-2-3-2	2,0	5,4	8,3	13,8	1
13	NQBĐB 2-1-1-2	2,3	4,2	8,8	14,5	1
14	NQBĐB 2-1-6-1	2,6	5,1	8,4	11,6	1
15	Đối chứng	-	-	-	-	-

Nhận xét chung: trong 14 cá thể được đánh giá ở thể hệ M_4 , hai cá thể đột biến NQBĐB 1-2-1-1 và NQBĐB 2-1-6-3 có các đặc tính vượt trội hơn các cá thể còn lại và khác biệt so với đối chứng, hai cá thể này có thời gian sinh trưởng ngắn 97-103 ngày, khả năng chịu mặn cao 19 dSm⁻¹ (cấp 5), hàm lượng amylose 15-19%. Tiến hành điện di protein SDS-PAGE để đánh giá độ thuần hai dòng đột biến này.

Đánh giá độ thuần bằng kỹ thuật điện di protein SDS-PAGE:

Qua kết quả điện di của hai dòng đột biến chịu mặn NQBĐB 1-2-1-1 và NQBĐB 2-1-6-3 được thể hiện ở hình

2. Kết quả cho thấy, các mức độ ăn màu giữa các band protein tương đối đồng đều với nhau, điều này chứng tỏ cả hai dòng đều đạt thuần, đồng thời các band waxy 60 KDa ăn màu rất nhạt với thuốc nhuộm Coomassie Brilliant Blue R250 chứng tỏ cả hai dòng này đều có hàm lượng amylose thấp và band α -Glutelin ăn màu đậm chứng tỏ hàm lượng protein cao [22]. Phổ điện di này cho kết quả rất phù hợp với kết quả phân tích định lượng hàm lượng amylose và protein của dòng hai dòng NQBĐB 1-2-1-1 và NQBĐB 2-1-6-3.



Hình 2. Phổ điện di protein tổng số hai dòng NQBĐB 1-2-1-1 và NQBĐB 2-1-6-3.

Kết luận

Kết thúc thể hệ M_4 đã chọn được 2 dòng ưu tú thuần từ các cá thể đột biến là NQBĐB 1-2-1-1 và NQBĐB 2-1-6-3 có đặc điểm sau:

NQBĐB 1-2-1-1 có thời gian sinh trưởng 97 ngày, chiều cao cây là 100 cm, chịu mặn 19 dSm⁻¹ (cấp 5), kháng rầy nâu cấp 3, kháng đổ ngã cấp 1, hàm lượng amylose 19,19%, hàm lượng protein 7,52%, dạng hạt thon dài.

NQBĐB 2-1-6-3 có thời gian sinh trưởng 103 ngày, chiều cao cây là 101 cm, chịu mặn 19 dSm⁻¹ (cấp 5), kháng rầy nâu cấp 7, kháng đổ ngã cấp 1, hàm lượng amylose 15,08%, hàm lượng protein 6,45%, dạng hạt thon dài.

Hai dòng lúa trên rất thích hợp để canh tác trong mô hình tôm - lúa tại các tỉnh ven biển ĐBSCL trong bối cảnh biến đổi khí hậu đang ngày càng diễn biến phức tạp hiện nay.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Nguyễn Văn Cường (2012), *Chọn giống lúa mùa chịu mặn cho vùng canh tác lúa - tôm tại huyện Hồng Dân, tỉnh Bạc Liêu*, Luận văn Thạc sỹ chuyên ngành trồng trọt, Trường Đại học Cần Thơ.
- [2] Nguyễn Mạnh Hùng (2009), *Bước đầu nghiên cứu xử lý đột biến thực nghiệm trên cây cẩm chương bằng tia gamma*, Luận văn Thạc sỹ chuyên ngành trồng trọt, Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội.
- [3] M. Ismachin and Sobrizal (2006), "A significant contribution of mutation techniques to rice breeding in Indonesia", *Plant Mutation*

Report, **1(1)**, pp.18-20.

- [4] A. Patnaik, D. Chaudhary and G.J.N. Rao (2006), “Genetic improvement of long grain aromatic rices through mutation approach”, *Plant Mutation Reports*, **1(1)**, pp.11-15.
- [5] D.Q. Tran, T.T.B. Dao, H.D. Nguyen, Q.D. Lam, H.T. Bui, V.B. Nguyen, V.X. Nguyen, V.N. Le, H.A. Do and P. Phan (2006), “Rice mutation breeding institute of agriculture genetics, Vietnam”, *Plant Mutation Reports*, **1(1)**, pp.47-48.
- [6] Quan Thị Ái Liên, Võ Công Thành và Nguyễn Bích Hà Vũ (2013), “Tạo giống lúa đột biến ngăn ngừa chống chịu mặn bằng phương pháp sốc nhiệt trên giống lúa mùa”, *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn: chuyên đề giống cây trồng vật nuôi*, **2**, tr.77-85.
- [7] N.T. Lang, S. Yanagihara and B.C. Buu (2001), “A microsatellite marker for a gene conferring salt tolerance on rice at the vegetative and reproductive stages”, *Sabao*, **33(1)**, pp.1-10.
- [8] Nguyễn Thanh Tường (2012), *Chọn giống lúa và kỹ thuật canh tác lúa cho mô hình lúa - tôm ở tỉnh Bạc Liêu*, Luận án Tiến sỹ nông nghiệp, Trường Đại học Cần Thơ.
- [9] Nguyễn Ngọc Đệ (2008), *Giáo trình cây lúa*, Nhà xuất bản Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh, 244 tr.
- [10] Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn (2011), *Quy phạm khảo nghiệm giá trị canh tác và sử dụng của giống lúa*, QCVN 01-55: 2011/BNNPTNT.
- [11] IRRI (1997), *Screening rice for salinity tolerance*.
- [12] E.A. Heinrichs and F.G. Medrano (1985), “Influence of N fertilizer on the population development of brown planthopper (BPH)”, *Rice Res. Notes*, **10**, pp.20-31.
- [13] U.K. Laemmli (1970), “Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4”, *Nature*, **227**, pp.680-685.
- [14] G.B. Cagampang, F.M. Rodriguez (1980), *Methods analysis for screening crops of appropriate qualities*, Institute of Plant Breeding, University of the Philippines at Los Banos. pp.8-9.
- [15] O.H. Lowry, N.J. Rosebroug, A.L. Farr and R.J. Raldall (1951), “Protein measurement with the Folin phenol reagent”, *J. Bio. Chem.*, **(6)**, pp.265-275.
- [16] P.R. Jennings, W.R. Coffman and H.E. Kauffman (1979), *Rice Improvement*, IRRI, Philippines, p.250.
- [17] S.X. Tang, G.S. Khush and B.O. Juliano (1991), “Genetic of gel consistency in rice”, *Indica, J. Genet.*, **70**, pp.69-78.
- [18] Nguyen Thi Lang, Trinh Thi Luy, Bui Chi Buu and Albel Ismail (2010), “The genetic association between the yield, yield component and salt tolerance in rice”, *Omonrice*, **19**, pp.99-104.
- [19] Nguyễn Hữu Hiệp và Trần Văn Chiêu (2009), *Ứng dụng vi khuẩn Azospirillum trong canh tác lúa Một Bụi Đỏ tại tỉnh Bạc Liêu*, Hội nghị Công nghệ sinh học phục vụ nông - lâm nghiệp và thủy sản, tr.131-133.
- [20] Nguyễn Thị Lang (1994), *Nghiên cứu một số ưu thế lai của một số tính trạng sinh lý và năng suất lúa*, Luận án Tiến sỹ nông nghiệp, Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam.
- [21] Nori Kurata, Kazumaru Miyoshi, Ken-Ichi Nonomura, Yukiko Yamazaki and Yukihiko Ito (2005), “Rice Mutants and Genes Related to Organ Development, Morphogenesis and Physiological Traits”, *Plant Cell Physiol.*, **46(1)**, pp.48-62.
- [22] Võ Công Thành và Phạm Văn Phương (2003), “Một số kết quả ứng dụng kỹ thuật điện di SDS-PAGE trong công tác chọn giống lúa chất lượng cao”, *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn*, **3**, tr.172-182.

Xác định và đánh giá mức độ biểu hiện của họ gen mã hóa tiểu phần Nuclear factor-YC ở cây sắn (*Manihot esculenta*)

Chu Đức Hà^{1*}, Nguyễn Đức Anh^{1,2}, Hoàng Thị Thao², Phạm Thị Lý Thu¹, Phạm Phương Thu³, Chu Thùy Dương², Nguyễn Thị Thu Phương², Phạm Xuân Hội¹

¹Viện Di truyền Nông nghiệp, Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam

²Khoa Nông học, Trường Đại học Nông lâm Bắc Giang

³Khoa Sinh - Kỹ thuật nông nghiệp, Trường Đại học Sư phạm Hà Nội 2

Ngày nhận bài 2/4/2019; ngày chuyển phản biện 5/4/2019; ngày nhận phản biện 6/5/2019; ngày chấp nhận đăng 21/5/2019

Tóm tắt:

Nhân tố phiên mã Nuclear factor-Y (NF-Y) được cấu tạo bởi 3 tiểu phần NF-YA, NF-YB và NF-YC, là nhóm protein điều hòa tham gia vào nhiều quá trình quan trọng ở thực vật. Trong nghiên cứu này, tiểu phần NF-YC đã được phân tích ở cây sắn (*Manihot esculenta*) dựa trên các phân tích tin sinh học. Kết quả đã xác định được 14 gen mã hóa NF-YC ở genome cây sắn, đặt tên là *MeNF-YC*. Phân tích cấu trúc cho thấy, phần lớn các gen *MeNF-YC* chỉ có một exon, tương tự như ghi nhận ở các loài thực vật khác. Đánh giá dữ liệu transcriptome của họ *MeNF-YC* đã chứng minh phần lớn các gen thành viên có biểu hiện ở ít nhất một mô cơ quan, bộ phận trên cây sắn trong điều kiện thường. Đặc biệt, *MeNF-YC05* được xác định là gen có biểu hiện mạnh ở nhiều vị trí nhất (ở cả mô phân sinh đỉnh chồi, mô phân sinh chóp rễ, tổ chức phát sinh phôi cấu tạo soma và củ). Những kết quả này đã cung cấp các dữ liệu một cách toàn diện về họ gen mã hóa tiểu phần NF-YC ở sắn, từ đó cung cấp gen ứng viên cho nghiên cứu chức năng tiếp theo nhằm nâng cao tính chống chịu bất lợi ở cây sắn.

Từ khóa: biểu hiện gen, cấu trúc gen, nuclear factor-YC, sắn, tin sinh học.

Chỉ số phân loại: 4.6

Mở đầu

Nhân tố phiên mã (transcription factor - TF) là những nhóm protein điều hòa, có trình tự đặc hiệu giúp quá trình nhận biết và bám trên vùng promoter của gen, từ đó điều hòa sự biểu hiện của gen. Ở thực vật, các họ TF đóng vai trò quan trọng, tham gia vào nhiều quá trình sinh học thiết yếu, có thể kể đến như quá trình chín quả ở cây cà chua (*Solanum lycopersicum*) [1], điều hòa sự tương tác giữa rễ - hệ vi sinh vật đất [2] và cơ chế phát sinh phôi ở cây bông (*Gossypium hirsutum*) [3]. Trong đó, Nuclear factor-Y (NF-Y), cấu tạo từ 3 tiểu phần NF-YA, NF-YB và NF-YC, là một trong những nhóm TF đặc trưng, được ghi nhận có mặt ở tất cả các loài thực vật [4].

Với những thành tựu của các công nghệ “-omics”, các họ TF NF-Y đã được nghiên cứu trên nhiều cây trồng quan trọng, như lúa gạo (*Oryza sativa*) [5], ngô (*Zea mays*) [6] và đậu tương (*Glycine max*) [7]. Trong các ghi nhận gần đây,

2 tiểu phần của TF NF-Y, bao gồm NF-YA và NF-YB đã được phân tích trên đối tượng cây sắn (*Manihot esculenta*) [8-10]. Đây là 1 trong 5 loài cây trồng quan trọng ở Việt Nam, được sử dụng là thực phẩm, nguyên liệu chế biến thức ăn gia súc và sản xuất nhiên liệu sinh học. Tuy nhiên, chưa có ghi nhận nào về tiểu phần NF-YC trên đối tượng cây có củ có ý nghĩa này.

Trong nghiên cứu này, họ gen mã hóa tiểu phần NF-YC đã được xác định trên genome của giống sắn mô hình ‘AM560-2’. Dựa trên các thông tin được chú giải, cấu trúc của các gen mã hóa NF-YC đã được phân tích. Thêm vào đó, thông tin biểu hiện của các gen NF-YC trong điều kiện thường đã được khai thác dựa trên cơ sở dữ liệu transcriptome. Kết quả của nghiên cứu này đã cung cấp thêm những dẫn liệu quan trọng về họ TF NF-Y ở cây sắn, từ đó có thể xem xét và đề xuất những gen ứng viên cho phân tích chức năng gen nhằm nâng cao tính chống chịu bất lợi ở cây sắn nói riêng và thực vật nói chung.

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

Identification and *in silico* analysis of expression profiles of genes encoding Nuclear factor-YC subunit in cassava (*Manihot esculenta*) using the bioinformatics approach

Duc Ha Chu^{*}, Duc Anh Nguyen^{1,2}, Thi Thao Hoang²,
Thi Ly Thu Pham¹, Phuong Thu Pham³,
Thuy Duong Chu², Thi Thu Phuong Nguyen², Xuan Hoi Pham¹

¹Agricultural Genetics Institute, Vietnam Academy of Agricultural Sciences

²Faculty of Agronomy, Bac Giang Agriculture and Forestry University

³Faculty of Biology - Agricultural Technology, Hanoi Pedagogical University 2

Received 2 April 2019; accepted 21 May 2019

Abstract:

Nuclear factor-Y (NF-Y), composed of NF-YA, NF-YB and NF-YC subunits, is known as the regulatory protein involving in various important processes in plants. In this study, the NF-YC subunit was analysed in cassava (*Manihot esculenta*) based on the bioinformatic approach. As the results, a total of 14 genes encoding NF-YC, namely *MeNF-YC*, were identified in the cassava genome. Our structural analysis showed that the majority of *MeNF-YC* contained only one exon, similar as previously confirmed in other plant species. Based on the available transcriptome atlas, most of *MeNF-YC* genes were found to express in at least one tissue, organ in cassava plants in the normal condition. Notably, *MeNF-YC05* was defined as the highly-expressed gene in many tissues, including the shoot and root apical meristems, somatic embryogenic structures, and storage roots. Our results would provide the comprehensive information of the genes encoding NF-YC in cassava, thereby suggesting a list of candidate genes for studying the functional characterisation to improve the unfavorable condition tolerance of cassava.

Keywords: bioinformatics, cassava, gene expression, gene structure, Nuclear factor-YC.

Classification number: 4.6

Dữ liệu và phương pháp nghiên cứu

Dữ liệu

Dữ liệu genome và proteome của giống sắn mô hình ‘AM560-2’ giải mã gần đây [11] được khai thác trên NCBI. Dữ liệu transcriptome của giống sắn ‘TME 204’ được công bố gần đây (GEO accession: GSE82279) [12].

Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp xác định NF-YC ở sắn: toàn bộ NF-YC ứng viên ở sắn được khai thác từ PlantTFDB [13]. Trình tự protein của các ứng viên được kiểm tra trên Pfam [14] để kiểm chứng sự có mặt của vùng bảo tồn NF-YC ở thực vật như trong ghi nhận gần đây [4].

Phương pháp chú giải thông tin gen NF-YC ở sắn: trình tự protein của NF-YC được BlastP vào proteome của sắn [11] trên NCBI để tìm kiếm mã gen, mã ARN và mã protein. Sau đó, trình tự gADN (genomic ADN), CDS (coding DNA sequence) và vị trí phân bố gen NF-YC được thu thập trên genome của sắn [11] tại NCBI.

Phương pháp phân tích cấu trúc gen NF-YC ở sắn: trình tự gADN và CDS của từng gen NF-YC ở sắn lần lượt được truy vấn trên PIECE [15] để phân tích cấu trúc exon/intron mục tiêu. Kết quả được mô hình hóa trên Illustrator. Sự sắp xếp của gen NF-YC được xác định dựa trên cây phân loại xây dựng theo phương pháp Neighbor-Joining trong MEGA [16].

Phương pháp đánh giá biểu hiện của gen NF-YC ở sắn: mã định danh gen NF-YC được sử dụng để khai thác trên transcriptome của sắn trong điều kiện thường [12]. Trong đó, các mẫu mô và bộ phận chính trên cây sắn được thu thập, bao gồm mô sẹo phôi hóa (Friable embryogenic callus - FEC), tổ chức phát sinh phôi cấu tạo soma (Somatic organized embryogenic structure - OES), mô phân sinh chóp rễ (Root apical meristem - RAM), mô phân sinh đỉnh chồi (Shoot apical meristem - SAM), củ (Storage root - SR), rễ sợi (Fibrous root - FR), thân (Shoot - S), chồi bên (Lateral bud - LB), lá (Leaf - L), gân lá (Mid vein - MV) và cuống lá (Petiole - P) [12].

Kết quả và thảo luận

Kết quả tìm kiếm và xác định tiểu phần NF-YC ở sắn

Để tìm kiếm toàn bộ các NF-YC ở sắn, cơ sở dữ liệu PlantTFDB [13] được rà soát để sàng lọc tất cả thông tin về tiểu phần này. Kiểm chứng vùng bảo thủ NF-YC trên Pfam [14], 14 protein ứng viên đã được xác định (bảng 1). Theo đó, các gen NF-YC được chú giải trên genome dựa

trên thuật toán BlastP trình tự amino acid tương ứng trên proteome của sắn [11] trên NCBI. Thông tin cơ bản về NF-YC ở sắn, bao gồm mã gen, mã mARN, mã protein và mã locus được thể hiện ở bảng 1.

Bảng 1. Thông tin chú giải của họ gen *MeNF-YC* ở cây sắn.

TT	Tên gen	Mã gen ¹	Mã mRNA ¹	Mã protein ^{1,2}	Mã locus ¹
1	<i>MeNF-YC01</i>	Manes.01G063900	cassava4.1_027362m	XP_021604318	LOC110609202
2	<i>MeNF-YC02</i>	Manes.01G113300	cassava4.1_026359m	XP_021629508	LOC110627482
3	<i>MeNF-YC03</i>	Manes.01G176600	cassava4.1_013455m	XP_021607456	LOC110611429
4	<i>MeNF-YC04</i>	Manes.03G183200	cassava4.1_031452m	XP_021607269	LOC110611327
5	<i>MeNF-YC05</i>	Manes.04G022800	cassava4.1_015531m	XP_021609413	LOC110612883
6	<i>MeNF-YC06</i>	Manes.04G155300	cassava4.1_012635m	XP_021610750	LOC110613762
7	<i>MeNF-YC07</i>	Manes.06G120200	cassava4.1_015422m	XP_021614739	LOC110616616
8	<i>MeNF-YC08</i>	Manes.06G176100	cassava4.1_014053m	XP_021616875	LOC110618125
9	<i>MeNF-YC09</i>	Manes.09G165000	cassava4.1_014289m	XP_021623996	LOC110623383
10	<i>MeNF-YC10</i>	Manes.11G008800	cassava4.1_012312m	XP_021628782	LOC110626907
11	<i>MeNF-YC11</i>	Manes.12G012100	cassava4.1_026058m	XP_021631336	LOC110628830
12	<i>MeNF-YC12</i>	Manes.14G009500	cassava4.1_014024m	XP_021592144	LOC110599865
13	<i>MeNF-YC13</i>	Manes.14G050900	cassava4.1_034343m	XP_021591876	LOC110599671
14	<i>MeNF-YC14</i>	Manes.15G024300	cassava4.1_029608m	XP_021595951	LOC110602683

Ghi chú: ¹: thông tin được khai thác từ NCBI; ²: thông tin khai thác từ PlantTFDB.

Trước đây, họ tiểu phân NF-YC cũng đã được xác định trên một số đối tượng cây trồng khác. Cụ thể, 16 thành viên OsNF-YC đã được ghi nhận trên lúa gạo [5], trong khi ở ngô, Zhang và cs (2016) đã sàng lọc được 18 NF-YC [6]. Trước đó, họ NF-YC (gồm 15 GmNF-YC) đã được nghiên cứu trên đậu tương [7]. Như vậy, các gen mã hóa tiểu phân NF-YC ở thực vật nói chung là họ đa gen, với số lượng gen thành viên khác nhau giữa các đối tượng.

Tiếp theo, vị trí phân bố của các gen *NF-YC* được xác định trên genome của sắn [11] trên NCBI. Theo đó, họ gen *NF-YC* phân bố rải rác trên các nhiễm sắc thể (NST) của sắn với tỷ lệ khác nhau. Cụ thể, 3 gen *NF-YC* nằm trên NST1, trong khi NST4, 6 và 14 đều chứa hai gen *NF-YC*. Các NST3, 9, 11, 12, 14 và 15 lần lượt chỉ chứa duy nhất một gen *NF-YC*. Trong nghiên cứu này, tên của các gen mã hóa tiểu phân NF-YC được đặt theo vị trí phân bố trên genome với ‘Me’ ký hiệu cho *M. esculenta* (bảng 1, 2), tương tự như phương thức đặt tên cho MeNF-YA và MeNF-YB đã được ghi nhận gần đây ở sắn [8-10] cũng như các loài thực vật khác [5-7].

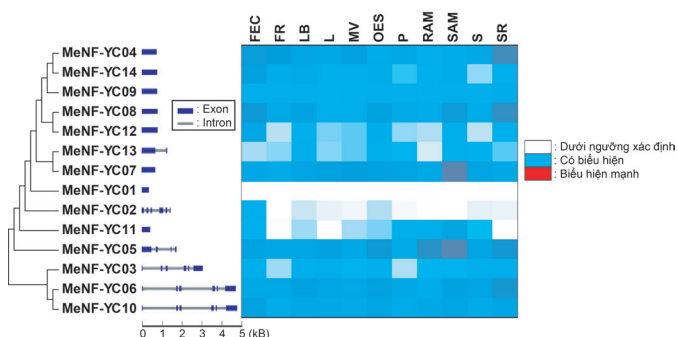
Bảng 2. Thông tin chú giải của họ gen *MeNF-YC* ở cây sắn

TT	Tên gen	Vị trí phân bố	Minh họa
1	<i>MeNF-YC01</i>	NST1: NC_035161.1 (18625791..18626144)	NST1
2	<i>MeNF-YC02</i>	NST1: NC_035161.1 (23354134..23356164)	NST1
3	<i>MeNF-YC03</i>	NST1: NC_035161.1 (27806813..27810509)	NST1
4	<i>MeNF-YC04</i>	NST3: NC_035163.1 (26997533..26999688, C)	NST3
5	<i>MeNF-YC05</i>	NST4: NC_035164.1 (2462001..2464098)	NST4
6	<i>MeNF-YC06</i>	NST4: NC_035164.1 (27771621..27776915)	NST4
7	<i>MeNF-YC07</i>	NST6: NC_035166.1 (22901983..22908231, C)	NST6
8	<i>MeNF-YC08</i>	NST6: NC_035166.1 (27506028..27508596)	NST6
9	<i>MeNF-YC09</i>	NST9: NC_035169.1 (27776414..27780827)	NST9
10	<i>MeNF-YC10</i>	NST11: NC_035171.1 (936525..941910, C)	NST11
11	<i>MeNF-YC11</i>	NST12: NC_035172.1 (1020980..1021585)	NST12
12	<i>MeNF-YC12</i>	NST14: NC_035174.1 (914713..917351, C)	NST14
13	<i>MeNF-YC13</i>	NST14: NC_035174.1 (4018243..4022194)	NST14
14	<i>MeNF-YC14</i>	NST15: NC_035175.1 (1853556..1855955)	NST15

Đáng chú ý, phần lớn họ gen *MeNF-YC* (11 trên 14) đều phân bố ở vùng cận đầu mút của các NST, ngoại trừ 3 gen *MeNF-YC* trên NST1 (bảng 2). Hiện tượng này cũng được quan sát thấy trên họ gen mã hóa tiểu phân NF-YA và NF-YB ở sắn [8-10] cũng như họ gen *NF-YC* trên các đối tượng khác [5-7].

Kết quả phân tích cấu trúc gen mã hóa tiểu phân NF-YC ở sắn

Họ *MeNF-YC* được phân tích trên PIECE [15] để xác định cấu trúc gen (exon/intron). Kết quả cho thấy, họ *MeNF-YC* có sự đa dạng về số lượng exon/intron trong cấu trúc của các gen thành viên (hình 1). Cụ thể, số lượng exon của họ gen *MeNF-YC* dao động từ một (8 gen), hai (1 gen), bốn (4 gen) đến sáu exon (4 gen) (hình 1). Đáng chú ý, các gen *MeNF-YC* nằm cùng một nhánh theo cây phân loại Neighbor-Joining thường có cấu trúc và kích thước gen tương tự nhau (hình 1).



Hình 1. Cấu trúc và mức độ biểu hiện của họ gen *MeNF-YC* trong điều kiện thường.

So sánh với số lượng exon trên *NF-YC* ở các loài thực vật khác cho thấy họ *NF-YC* có cấu trúc rất đa dạng. Ở cà chua, 13 trên tổng số 20 gen *SINF-YC* có một hoặc hai exon, trong khi số gen còn lại có cấu trúc dao động từ 3 đến 6 exon, duy nhất *Solyc02g091030* có 22 exon [1]. Trong khi đó, 12 thành viên của họ *ZmNF-YC* ở ngô (trên 18 gen) chỉ ghi nhận một exon, các gen còn lại chứa từ 2 đến 6 exon [6]. Các kết quả này cho thấy, họ *NF-YC* ở thực vật có cấu trúc gen đa dạng, tuy nhiên, một tỷ lệ lớn gen thành viên đều chỉ có một exon, tương tự như trong ghi nhận trước đây [4].

Kết quả đánh giá biểu hiện của các gen mã hóa tiểu phần *NF-YC* trong điều kiện thường

Trong nghiên cứu này, để tìm hiểu mức độ biểu hiện của họ gen *MeNF-YC* trong điều kiện thường, dữ liệu phiên mã ở 11 mẫu mô, cơ quan và bộ phận chính trên cây sắn đã được khai thác để xử lý [12]. Cụ thể, cây sắn ‘AM560-2’ đã được trồng trong điều kiện thường “tiêu chuẩn”, với chế độ ánh sáng 12h sáng - 12h tối, nhiệt độ tối ưu trong khoảng 28-32°C (ban ngày) và 25-27°C (ban đêm), độ ẩm 70% [12]. Mẫu thu thập tại các mô chính được sử dụng để tách chiết và giải trình tự RNA-Seq [12]. Gen được quy ước là ‘có biểu hiện’ khi giá trị Fragments per kilobase million (FPKM) >10, ‘biểu hiện mạnh’ khi FPKM >300, trong khi mức độ phiên mã của gen dưới ngưỡng phát hiện khi FPKM ~1 [12]. Kết quả phân tích biểu hiện của các gen *MeNF-YC* ở 11 mẫu mô được minh họa ở hình 1.

Phần lớn các gen đều có biểu hiện ở ít nhất một mẫu mô, cơ quan chính trên cây trong điều kiện thường, ngoại trừ gen *MeNF-YC01* có mức độ phiên mã dưới ngưỡng phát hiện (hình 1). Có thể thấy rằng, một số gen *MeNF-YC* có xu hướng biểu hiện mạnh tại các vị trí trên cây (hình 1). Cụ thể, *MeNF-YC04*, *MeNF-YC06* và *MeNF-YC08* được ghi nhận có xu hướng biểu hiện đặc thù ở SR, trong khi *MeNF-YC07* có mức độ phiên mã mạnh ở SAM (hình 1). Đáng chú ý, gen *MeNF-YC05* có biểu hiện tương đối mạnh ở cả RAM, SAM, OES và SR (hình 1), cho thấy gen này có thể tham gia vào các quá trình diễn ra tại những mô này.

Kết luận

Khai thác trên cơ sở dữ liệu PlantTFDB đã xác định được gen mã hóa tiểu phần *NF-YC* ở cây sắn là họ đa gen, giống như ở các loài thực vật khác. Trong đó, 14 gen *MeNF-YC* đã được sàng lọc và phân tích.

Phân tích cho thấy, họ *MeNF-YC* có cấu trúc gen từ 1 đến 6 exon. Mặc dù có phần đa dạng về trật tự exon/intron nhưng một tỷ lệ lớn các gen *MeNF-YC* đều chỉ có một exon, tương tự như họ *NF-YC* ở các đối tượng cây trồng khác.

Khai thác dữ liệu transcriptome đã chỉ ra rằng, hầu hết các gen *MeNF-YC* có biểu hiện ở ít nhất một vị trí trên cây sắn trong điều kiện thường. Kết quả đã xác định được *MeNF-YC05* là gen có biểu hiện mạnh ở cả RAM, SAM,

OES và SR.

Các kết quả của nghiên cứu này sẽ cung cấp những dẫn liệu quan trọng cho các phân tích chức năng gen tiếp theo nhằm tìm kiếm các gen ứng viên liên quan đến quá trình đáp ứng bất lợi ở cây sắn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] S. Li, et al. (2016), “Genome-wide analysis of tomato NF-Y factors and their role in fruit ripening”, *BMC Genomics*, **17**, p.36.
- [2] M.E. Zanetti, C. Ripodas, A. Niebel (2017), “Plant NF-Y transcription factors: Key players in plant-microbe interactions, root development and adaptation to stress”, *Biochim. Biophys. Acta.*, **1860**(5), pp.645-654.
- [3] Y. Chen, et al. (2018), “Genome-wide analysis of the NF-YB gene family in *Gossypium hirsutum* L. and characterization of the role of *GhDNF-YB22* in embryogenesis”, *Int. J. Mol. Sci.*, **19**, p.483.
- [4] T. Laloum, S. De Mita, P. Gamas, M. Baudin, A. Niebel (2013), “CCAAT-box binding transcription factors in plants: Y so many?”, *Trends Plant Sci.*, **18**(3), pp.157-166.
- [5] W. Yang, Z. Lu, Y. Xiong, J. Yao (2017), “Genome-wide identification and co-expression network analysis of the *OsNF-Y* gene family in rice”, *Crop. J.*, **5**(1), pp.21-31.
- [6] Z. Zhang, X. Li, C. Zhang, H. Zou, Z. Wu (2016), “Isolation, structural analysis, and expression characteristics of the maize nuclear factor Y gene families”, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **478**(2), pp.752-758.
- [7] T.N. Quach, et al. (2015), “Genome-wide expression analysis of soybean NF-Y genes reveals potential function in development and drought response”, *Mol. Genet. Genomics*, **290**(3), pp.1095-1115.
- [8] Chu Đức Hà, Lê Thị Thảo, Lê Quỳnh Mai, Phạm Thị Lý Thu (2017), “Xác định các gen mã hóa Nuclear factor - YB trên sắn (*Manihot esculenta* Crantz) bằng công cụ tin sinh học”, *Tạp chí Khoa học, Đại học Quốc gia Hà Nội*, **33**(1S), tr.133-137.
- [9] Chu Đức Hà, Lê Hoàng Thu Phương, Lê Thị Thảo, Hoàng Thị Thao, Phạm Thị Lý Thu (2018), “Nghiên cứu cấu trúc của gen mã hóa Nuclear factor - YB ở sắn liên quan đến tính chống chịu điều kiện bất lợi”, *Tạp chí Khoa học Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam*, **5**(90), tr.5-9.
- [10] Duc Ha Chu, Thi Thuy Tam Do, Xuan Dac Le, Thi Ly Thu Pham (2017), “Genome-wide identification and annotation of the Nuclear factor YA gene family in cassava (*Manihot esculenta* Crantz)”, *Vietnam J. Sci., Technol. Eng.*, **59**(3), pp.39-43.
- [11] J.V. Bredeson, et al. (2016), “Sequencing wild and cultivated cassava and related species reveals extensive interspecific hybridization and genetic diversity”, *Nat. Biotechnol.*, **34**(5), pp.562-570.
- [12] M.C. Wilson, et al. (2017), “Gene expression atlas for the food security crop cassava”, *New Phytol.*, **213**(4), pp.1632-1641.
- [13] J. Jin, F. Tian, D.-C. Yang, Y.-Q. Meng, L. Kong, J. Luo, G. Gao (2017), “PlantTFDB 4.0: Toward a central hub for transcription factors and regulatory interactions in plants”, *Nucleic Acids Res.*, **45**(D1), pp.D1040-D1045.
- [14] S. El-Gebali, et al. (2019), “The Pfam protein families database in 2019”, *Nucleic Acids Res.*, **47**(D1), pp.D427-D432.
- [15] Y. Wang, et al. (2013), “PIECE: a database for plant gene structure comparison and evolution”, *Nucleic Acids Res.*, **41**(D1), pp.D1159-D1166.
- [16] S. Kumar, G. Stecher, K. Tamura (2016), “MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets”, *Mol. Biol. Evol.*, **33**(7), pp.1870-1874.

Đánh giá đa dạng di truyền một số giống bơ (*Persea americana* Mill.) bằng chỉ thị phân tử SSR

Phạm Thị Phương^{1*}, Phạm Đức Toàn², Nguyễn Vũ Phong^{2*}

¹Trường Đại học Tây Nguyên

²Trường Đại học Nông lâm TP Hồ Chí Minh

Ngày nhận bài 14/1/2019; ngày chuyển phản biện 18/1/2019; ngày nhận phản biện 22/2/2019; ngày chấp nhận đăng 18/3/2019

Tóm tắt:

Cây bơ (*Persea americana* Mill.) được du nhập và trồng khá phổ biến ở vùng Tây Nguyên và Đông Nam Bộ. Mục tiêu của nghiên cứu này nhằm đánh giá mức độ đa dạng di truyền của 24 giống bơ dựa trên chỉ thị phân tử SSR. Tổng số 18 primer SSR đã ghi nhận kết quả có 59 băng đa hình trong tổng số 62 băng khuếch đại với kích thước dao động từ 70 đến 350 bp, trung bình 3,44 băng/primer. 3 primer cho kết quả 5 băng đa hình là AVAG13, AVAG21 và LMAV.33. Chỉ số PIC của các primer dao động từ 0,12 đến 0,9, trong đó primer LMAV.06 và primer LMAV.33 có tính đa hình cao nhất. Kết quả phân tích cũng cho thấy hệ số tương đồng di truyền của 24 giống bơ biến thiên từ 0,12 đến 0,99. Kết quả phân nhóm di truyền đã chia các giống bơ thành 6 nhóm chính với khoảng cách di truyền trung bình là 0,39.

Từ khóa: bơ, đa dạng di truyền, *Persea americana* Mill., SSR.

Chỉ số phân loại: 4.6

Mở đầu

Cây bơ được du nhập và trồng khá phổ biến ở vùng Tây Nguyên và Đông Nam bộ. Trong trái bơ, ngoài nước còn chứa chất béo, protein, các loại vitamin và các chất quan trọng khác như folate, choline. Có thể nói bơ là loại trái cây có nhiều chất dinh dưỡng, phù hợp với mọi lứa tuổi. Ngoài ra, một số giống bơ có thể sử dụng cho các mục đích khác như làm gốc ghép, gỗ thương phẩm, làm chất đốt [1, 2]. Ở Việt Nam, bơ được coi là một trong những loại trái cây đặc sản của vùng Tây Nguyên và được trồng thử nghiệm ở nhiều vùng, miền trên khắp cả nước. Việc nghiên cứu đa dạng di truyền của các giống bơ cung cấp dữ liệu ở mức độ phân tử, giúp cho việc lai chọn tạo giống tiết kiệm được thời gian, công sức. Nghiên cứu đa dạng di truyền cũng tạo cơ sở khoa học cho bảo tồn nguồn gen.

Trong những năm gần đây, các chỉ thị phân tử như RAPD, ISSR, SSR, ADN Barcode được sử dụng phổ biến trong đánh giá di truyền và đa dạng di truyền. Những chỉ thị này giúp các nghiên cứu di truyền chính xác hơn, việc phân loại tốt hơn và đi sâu vào quan hệ di truyền giữa các giống bơ, cũng có thể thêm kết quả phân loại đã công bố. Một số nghiên cứu gần đây đã góp phần làm sáng tỏ nguồn gốc của các giống cây lai khác nhau và xác định được các chỉ thị chuyên biệt cho từng giống. Sự đánh giá về cấu trúc di truyền của các nguồn sẽ giúp cho việc quản lý nguồn di truyền bơ tốt hơn cho các chương trình nhân giống và bảo

tồn vật liệu. Nhìn chung, các nghiên cứu hiện nay chủ yếu tập trung đánh giá đa dạng di truyền của các giống bơ và xác định mối quan hệ di truyền giữa các giống đó [3-9]. Ở Việt Nam, năm 2016, Lê Ngọc Triệu và cs [10] đã khảo sát đa dạng di truyền và xác lập chỉ thị phân tử nhận dạng một số dòng bơ tại Lâm Đồng bằng 10 chỉ thị ISSR. Kết quả thu được cho thấy, mức độ đa dạng di truyền thấp của 11 dòng bơ khảo sát và các dòng bơ được tạo giống và tuyển chọn tại Lâm Đồng có nguồn gốc gần nhau. Ngoài ra, nghiên cứu cũng đã xác lập được một số chỉ thị phân tử để nhận dạng 6 dòng bơ tiềm năng. Nhìn chung, việc sử dụng các chỉ thị phân tử để đánh giá đa dạng di truyền, xác định quan hệ di truyền giữa các giống nhằm mục đích bảo tồn và chọn tạo giống mới ở Việt Nam còn khá mới mẻ.

Trong nghiên cứu này, chỉ thị SSR được sử dụng đánh giá đa dạng nguồn gen của 24 giống, từ đó đưa ra những nhận định ban đầu về quan hệ di truyền của các giống bơ tham gia nghiên cứu, góp phần cung cấp dữ liệu sử dụng trong công tác lai tạo giống bơ phục vụ sản xuất.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu nghiên cứu

Tổng số 24 mẫu bơ được lưu giữ tại vườn tập đoàn giống thuộc Viện Khoa học Kỹ thuật Nông lâm nghiệp Tây Nguyên được sử dụng nghiên cứu (bảng 1).

*Tác giả liên hệ: ptpuong@gmail.com; nvphong@hcmuaf.edu.vn

Assessment on the genetic diversity of some avocado (*Persea americana* Mill.) varieties using microsatellite markers

Thi Phuong Pham^{1*}, Duc Toan Pham²,
Vu Phong nguyen^{2*}

¹Tay Nguyen University

²Nong Lam University Ho Chi Minh City

Received 14 January 2019; accepted 18 March 2019

Abstract:

Persea americana Mill is cultivated popularly in the Central Highlands and South Eastern regions of Vietnam. The purpose of this study was to assess the genetic diversity of twenty-four avocado (*Persea americana* Mill.) varieties based on molecular markers SSR. The PCR analysis with 18 SSR markers showed 62 amplified bands including 59 polymorphic bands, and other properties such as 3.44 bands/primer and molecular sizes ranging from 70 to 350 bp. Three primers namely AVAG13, AVAG21 and LMAV.33 gave five polymorphic bands. The polymorphic information content (PIC) ranged from 0.12 to 0.90, in which LMAV.06 and LMAV.33 markers had the highest polymorphism. The analysis result also exhibited the similarity coefficient of twenty-four avocado varieties varied from 0.12 to 0.99. The phylogenetic analysis divided the genotypes into six main groups which have the mean similarity coefficient of 0.39.

Keywords: avocado, genetic diversity, *Persea americana* Mill., SSR.

Classification number: 4.6

Bảng 1. Danh sách các giống bơ sử dụng trong nghiên cứu [11].

TT	Giống	Nguồn gốc	TT	Giống	Nguồn gốc	TT	Giống	Nguồn gốc
1	TA1	Đắk Lắk	9	TA36	Đắk Lắk	17	Arthdith	Nhập nội
2	TA3	Đắk Lắk	10	TA40	Đắk Lắk	18	Reed	Nhập nội
3	TA5	Đắk Lắk	11	TA44	Đắk Lắk	19	Ettinger	Nhập nội
4	TA6	Đắk Nông	12	TA47	Đắk Lắk	20	Fuerte	Nhập nội
5	TA17	Đắk Lắk	13	TA54	Gia Lai	21	Sharwill	Nhập nội
6	TA21	Đắk Lắk	14	Số 5	Nhập nội	22	GA	Nhập nội
7	TA26	Đắk Lắk	15	Booth 7	Nhập nội	23	GB	Nhập nội
8	TA31	Đắk Lắk	16	Hass	Nhập nội	24	GC	Nhập nội

Các primer sử dụng trong nghiên cứu được tham khảo từ công bố của Abraham và Takrama (2014) [5], Gross-German và Viruel (2012) [7], Sharon và cs (1997) [8].

Phương pháp nghiên cứu

Mẫu chồi non của từng giống bơ được thu riêng rẽ và tách chiết ADN tổng số theo phương pháp CTAB của J.J. Doyle và J.L. Doyle (1990) [12]. Phản ứng PCR được thực hiện với tổng thể tích phản ứng là 12 µl, gồm 6,25 µl Master Mix 2X (Bioline), 0,5 µl primer 10 µM mỗi loại, 0,5 µl ADN (50 ng/ul), 4,75 µl nước khử ion. Chu kỳ nhiệt phản ứng gồm 94°C (5 phút), 35 chu kỳ [94°C (5 giây), 52 hoặc 58°C (30 giây), 72°C (60 giây)] và kết thúc ở 72°C (7 phút). Sản phẩm PCR được kiểm tra trên gel agarose 1,5%, điện di ở 80 V, 400 mA trong 40 phút. Kích thước các đoạn ADN khuếch đại trong gel được ước lượng bằng cách so sánh với thang chuẩn ADN 100 bp.

Xây dựng cây phân nhóm di truyền: kết quả được ghi nhận dựa vào sự xuất hiện hay không xuất hiện của băng ADN. Số liệu được xử lý và phân tích bằng phần mềm NTSYSpc 2.1 để tìm mối tương quan giữa các giống nghiên cứu thông qua ma trận hệ số tương đồng di truyền (ma trận khoảng cách) được xây dựng trên công thức:

$$S_{xy} = \frac{2xy}{x + y}$$

Trong đó: xy là số băng chung giữa hai mẫu; x là số băng của mẫu x; y là số băng của mẫu y; Sxy là hệ số tương đồng giữa 2 mẫu. Từ Sxy tính được khoảng cách di truyền giữa x và y theo công thức: Dxy = 1 – Sxy.

Sự đa dạng di truyền của các giống còn được đánh giá ở mức độ đa dạng dựa vào tần suất xuất hiện band đa hình ở các primer phân tử và được thể hiện bằng chỉ số PIC và được tính bằng công thức:

$$PIC = 1 - \sum P_{ij}$$

Trong đó: P_{ij} là tần suất xuất hiện alen thứ j của locus SSR thứ i.

Kết quả và thảo luận

Kết quả phân tích SSR

Bảng 2. Kết quả phân tích của 18 primer SSR.

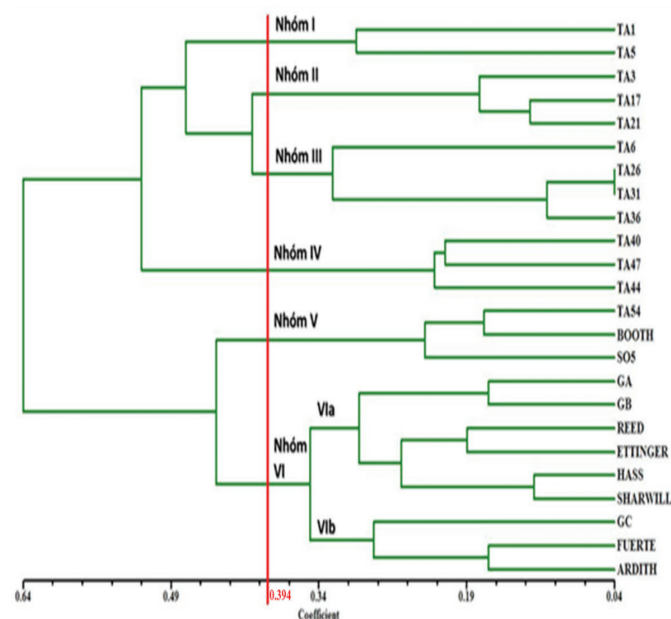
TT	Primer	Tổng số băng	Số băng đa hình	Tỷ lệ băng đa hình (%)	PIC	Kích thước băng (bp)
1	AVAC01	3	2	66,7	0,35	70-150
2	AVAG03	2	2	100	0,35	90-115
3	AVMIX04	3	3	100	0,67	150-200
4	AVAG05	3	3	100	0,47	70-100
5	AVAG06	2	2	100	0,44	70-105
6	AVAG10	3	3	100	0,12	70-230
7	AVAG13	5	5	100	0,62	80-175
8	AVAG21	5	4	80	0,63	150-230
9	AVAG22	4	4	100	0,59	80-130
10	AVAG25	3	3	100	0,58	100-150
11	LMAV.02	4	4	100	0,40	190-250
12	LMAV.06	2	2	100	0,89	180-200
13	LMAV.07	4	4	100	0,53	180-230
14	LMAV.14	3	3	100	0,47	200-260
15	LMAV.15	4	4	100	0,55	280-350
16	LMAV.18	4	4	100	0,49	170-215
17	LMAV.24	3	3	100	0,41	190-220
18	LMAV.33	5	4	80	0,90	70-305
Trung bình		3,44	3,27	96	0,53	70-350
Tổng số		62	59			

Kết quả nghiên cứu cho thấy, trong số 20 primer SSR sử dụng có 2 primer không cho sản phẩm khuếch đại (LMAV.04 và LMAV.31). Còn lại 18 primer cho sản phẩm đa hình 2-5 băng trên mỗi primer (bảng 2). Kích thước các băng dao động từ 70 đến 350 bp. Số băng được tạo ra đa số là 2 hoặc 3 băng ở hầu hết các primer. Các primer có nhiều băng nhất (5 băng) là AVAG13, AVAG21 và LMAV.33. Tổng số sản phẩm khuếch đại là 62 băng ADN, trong đó có 59 băng đa hình, đạt 96% với trung bình 3,44 băng/primer. Trong khi đó, cũng với 20 primer SSR trên, các tác giả khác đã thu được sản phẩm từ 5 băng (AVAG06) đến 22 băng (AVAG21). Tổng số sản phẩm khuếch đại là 247 băng, trung bình có 12 băng/primer. Sự khác biệt về số lượng các băng thu nhận được trong nghiên cứu này so với các nghiên cứu khác có thể do nguồn mẫu khác nhau, số lượng các cây giống tham gia vào nghiên cứu còn hạn chế. Kết quả cũng ghi nhận sự biến thiên về kích thước của các băng dao động từ 70 đến 350 bp. Ở các nghiên cứu trước, sự dao động này từ 71 đến 270 bp [5, 7]. Sự biến động kích thước các băng cũng phản ánh phần nào sự đa dạng di truyền của các giống bơ.

Chỉ số PIC của các primer dao động từ 0,12 đến 0,9. Trong một quần thể, giá trị PIC của primer bất kỳ càng lớn thì primer đó càng đa hình. Theo đó, primer LMAV.06 và LMAV.33 có tính đa hình cao nhất. Ngoài ra, giá trị PIC trung bình của 18 primer là 0,53 cho thấy có sự đa dạng di truyền nguồn gen của các giống bơ nghiên cứu.

Quan hệ di truyền giữa các giống bơ

Khoảng cách di truyền của 24 giống bơ trong nghiên cứu dao động từ 0,12 đến 0,99 (hình 1). Giá trị này cho thấy có sự khác biệt về mặt di truyền giữa các giống bơ. 24 giống bơ nghiên cứu được phân thành 6 nhóm chính ở mức giá trị trung bình khoảng cách di truyền là 0,39. Nhóm I, gồm 2 giống (TA1 và TA5) với hệ số tương đồng 0,3. Nhóm II, có 3 giống (TA3, TA17, TA21) với hệ số tương đồng từ 0,13 (giữa TA17 và TA21) đến 0,18 (giữa TA3 và TA17). Nhóm III, gồm 4 giống (TA6, TA26, TA31, TA36) với hệ số tương đồng từ 0,13 (giữa TA26 và TA31) đến 0,87 (giữa TA6 và TA36). 3 giống gồm TA40, TA44 và TA47 được xếp vào nhóm IV với hệ số tương đồng từ 0,21 (giữa TA44 và TA47; TA40 và TA47) đến 0,23 (giữa A40 và TA44). Nhóm V gồm 3 giống (TA54, Số 5, Booth 7) với hệ số tương đồng từ 0,17 (giữa TA54 và Booth 7) đến 0,25 (giữa Số 5 và Booth 7). Cuối cùng, nhóm VI có 9 giống (GA, GB, GC, Fuerte, Ardith, Reed, Ettinger, Hass, Sharwill) với hệ số tương đồng từ 0,12 (giữa Hass và Sharwill) đến 0,47 (giữa Ettinger và Fuerte). Trong đó, các giống lần lượt được xếp chung vào các nhóm nhỏ là Reed và Ettinger, Hass và Sharwill, Fuerte và Ardith. Kết quả này phù hợp với các nghiên cứu trước đó [13, 14].



Hình 1. Sơ đồ hình cây về mối quan hệ di truyền của 24 giống bơ dựa vào 18 primer SSR.

Nhìn chung, các giống bơ trong nước được phân bố vào các nhóm I, II, III, IV; các giống nhập nội thuộc nhóm VI; nhóm V gồm 1 giống trong nước (TA54) và 2 giống nhập nội (Booth 7 và Số 5). Giá trị trung bình khoảng cách di truyền của 24 giống bơ thấp, cho thấy các giống bơ có sự tương đồng lớn về đặc điểm di truyền. Tuy nhiên, sự biến thiên hệ số tương đồng giữa các giống bơ phần nào nói lên sự đa dạng di truyền và mối quan hệ di truyền của các giống bơ được nghiên cứu

Sự phân chia này có sự tách biệt hầu hết các giống bơ trong nước với các giống bơ nhập nội. Tuy nhiên, ở nhóm V, TA54 là giống trong nước lại được ghép chung với Booth 7 và Số 5. Điều này cho phép giả định rằng, TA54 là giống bơ được đưa vào Việt Nam trước đây hoặc liên quan đến giống bơ nào đó được di thực thông qua các chương trình nghiên cứu về bơ từ sớm. Điều đặc biệt là hai giống TA54 và Booth 7 được xếp vào cùng nhau trong một nhánh nhỏ hơn cho thấy có sự gần gũi về các đặc điểm di truyền của chúng. Về kiểu hình, cả Booth 7 và TA54 đều có đặc tính thịt quả là vàng đậm, dẻo, béo, không xơ, thơm, thậm chí độ dẻo và béo của TA54 còn cao hơn so với Booth 7. Ngoài đặc tính thịt quả, cả hai giống này còn có một số đặc điểm tương đồng khác như màu sắc lá non nâu đỏ, bánh tẻ xanh đậm, mép lá TA54 phẳng, Booth 7 hơi gợn sóng, khối lượng trái cũng gần tương đương nhau [11].

Trong nhóm V, giống Số 5 có màu sắc lá non nâu đỏ, lá bánh tẻ xanh đậm tương tự như TA54 và Booth 7. Tuy nhiên, thịt quả của nó là màu vàng kem, ít béo, ít sáp, xơ - khác biệt với thịt quả của 2 giống trên. Booth 7 được coi là kết quả lai giữa nhóm Guatemalan và West Indian, mang một số đặc điểm của cả nhóm West Indian (quả khi chín có màu xanh vàng) và nhóm Guatemalan (quả tròn, thời gian từ lúc nở hoa cho đến khi trưởng thành muộn, dao động từ 8 đến 12 tháng). Trong khi đó, TA54 có màu sắc trái màu vàng nâu và thời gian quả trưởng thành từ 5 đến 9 tháng, Số 5 có màu sắc trái màu xanh nâu và thời gian quả trưởng thành từ 5 đến 9 tháng [11]. Đây là những đặc điểm của nhóm West Indian.

Các giống bơ bản địa còn lại được chia thành 4 nhóm, số lượng giống trong mỗi nhóm dao động từ 2 đến 4. Trong đó nhóm I gồm TA1 và TA5 có thể là con lai giữa nhóm West Indian và Mexican. Nhóm II gồm 3 giống (TA3, TA17, TA21), trong đó TA17 và TA21 có một số đặc điểm của nhóm Mexican như thời gian trưởng thành quả từ 4 đến 8 tháng, mép lá gợn sóng ít, lá non có màu xanh vàng và lá trưởng thành có màu biến thiên từ xanh đến xanh đậm, thịt quả màu vàng nhạt, dẻo, béo, không xơ [11]. Tuy vậy, màu sắc quả khi chín lại mang hơi hướng của nhóm West Indian (xanh vàng ở TA17 và vàng nâu ở TA21), hình dạng trái thay đổi.

Trong nhóm III, TA6 là giống mang nhiều đặc điểm khác biệt nhất. Kiểu hình mang đặc tính của nhóm West Indian (màu sắc lá non, màu sắc lá bánh tẻ, màu quả chín) chiếm tỷ lệ nhiều hơn so nhóm Mexican (thời gian trưởng thành quả). Trong nhóm này TA26 và TA31 có nhiều điểm tương đồng với nhau với các đặc tính về màu sắc lá, màu sắc quả chín là những đặc trưng của nhóm West Indian, nhưng thời gian trưởng thành quả, dạng quả lại thiên về nhóm Mexican. Cũng nằm trong nhóm III, nhưng TA36 có quan hệ gần gũi với 2 giống TA26, TA31 hơn so với TA6 do mang đặc điểm của nhóm West Indian (màu sắc lá) và nhóm Mexican (dạng quả, màu quả chín, thời gian trưởng thành quả), trong đó nhóm Mexican chiếm ưu thế hơn.

Trong nhóm IV cho thấy TA40 và TA47 có nhiều điểm tương đồng về màu lá non, lá bánh tẻ, tán lá có dạng chóp, thời gian phát triển của quả và màu quả chín. Có thể thấy, 2 giống mang đặc tính của nhóm Mexican và Guatemalan. Giống TA44 có các đặc tính về màu sắc lá giống với nhóm West Indian và thời gian quả trưởng thành, dạng quả tương tự nhóm Mexican. Do vậy, giống này là dạng lai giữa nhóm West Indian và Mexican.

Nhóm VI bao gồm những dòng/giống nhập nội nhưng cũng được chia thành hai nhóm nhỏ là VIa và VIb. Trong nhóm VIa, các giống Reed, Ettinger, Hass và Sharwill được phân bố về một nhóm nhỏ hơn. Hass, Sharwill và Ettinger là con lai giữa nhóm Guatemalan và Mexican, còn Reed là giống Guatemalan thuần [14]. Sự phân chia này phù hợp với các kết quả nghiên cứu trước đó.

GA, GB, GC được tạo ra nhờ nhân giống vô tính từ các cây lai giữa *P. americana* với *P. schiedeana* có nguồn gốc ở Guatemala. Đây là những gốc ghép có giá trị thương mại ở Mỹ vì chúng có tính kháng bệnh thối rễ [2]. Trên cây phân nhóm, GA và GB được xếp vào nhóm VIa cùng với các giống Guatemalan thuần hoặc lai giữa Guatemalan và Mexican. Trong khi đó, GC lại được xếp vào nhóm VIb cùng với các giống lai giữa Guatemalan và Mexican. Trong một nghiên cứu về sản lượng của giống Hass được ghép trên các giống GA, GB, GC, người ta nhận thấy sản lượng của bơ Hass trên gốc ghép GA và GB cao hơn so với GC, các cây được ghép trên GC cũng nhỏ so với GA và GB. Trong nghiên cứu về tính kháng mặn của các gốc ghép, GB có tính kháng mặn trung bình. Ngoài ra, cả 3 giống đều có tính kháng lạnh ở mức trung bình, trong đó GC kháng mạnh hơn so với GA và GB. Các đặc tính kháng mặn và kháng lạnh biểu hiện ở các dòng này đều là những đặc tính của nhóm Guatemalan. Nhìn chung, các dòng/giống bơ nhập nội trong nghiên cứu có nhiều đặc điểm tương đồng với nhau. Kết quả là chúng được nhóm chủ yếu vào nhóm VI và một phần của nhóm V.

Kết luận

Sử dụng 18 primer SSR để nghiên cứu tính đa hình của 24 giống bơ đã ghi nhận có 59 băng đa hình, trung bình có 3,44 băng/primer. Chỉ số PIC trung bình của các primer là 0,53 cho thấy có sự đa dạng di truyền của các giống bơ nghiên cứu. Trên cây phân nhóm di truyền, 24 giống bơ được chia thành 6 nhóm với giá trị trung bình khoảng cách di truyền là 0,394. Nhóm I, II, III và IV bao gồm các giống trong nước, nhóm VI chứa hầu hết các giống nhập nội, riêng nhóm V có sự pha trộn giữa các giống trong nước và giống nhập nội. Kết quả nghiên cứu này là thông tin hữu ích, cung cấp thêm thông tin về đa dạng di truyền cây bơ tại Việt Nam, giúp phát triển và chọn tạo giống bơ triển vọng trong tương lai.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] J. Bost (2014), “*Persea schiedeana*: A high oil ‘Cinderella Species’ fruit with potential for tropical agroforestry systems”, *Sustainability*, **6**, pp.99-111.
- [2] S.B. Gary, M.L. Arpaia (2012), *Avocado production in California: A cultural handbook for growers*, The University of California Cooperative Extension, and The California Avocado Society Supported by the California Avocado Commission.
- [3] A.K. Acheampong, et al. (2008), “Genetic characterization of Ghanaian avocados using microsatellite markers”, *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **133**(6), pp.801-809.
- [4] M.L. Alcaraz, J.I. Hormaza (2007), “Molecular characterization and genetic diversity in an avocado collection of cultivars and local Spanish genotypes using SSRs”, *Hereditas*, **144**(6), pp.244-253.
- [5] J.D. Abraham, J.F. Takrama (2014), “Genetic characterization of avocado (*Persea americana* Mill.) in two regions of Ghana”, *African Journal of Biotechnology*, **13**(51), pp.4620-4627.
- [6] H. Cuiris-Pérez, et al. (2009), “Genetic Variability within Mexico race Avocado (*Persea americana* Mill.) Germplasm Collections Determined by ISSRs”, *Revista Chapingo Serie Horticultura*, **15**(2), pp.169-175.
- [7] E. Gross-German, M.A. Viruel (2012), “Molecular characterization of avocado germplasm with a new set of SSR and EST-SSR markers: genetic diversity, population structure, and identification of race-specific markers in a group of cultivated genotypes”, *Tree Genetics and Genomes*, **9**(2), pp.539-555.
- [8] D. Sharon, et al. (1997), “An integrated genetic linkage map of avocado”, *Theoretical and Applied Genetics*, **95**, pp.911-921.
- [9] J.C. Reyes-Alemán, et al. (2016), “Assessment of genetic relationship in *Persea* spp by traditional molecular markers”, *Genetics and Molecular Research*, **15**(2), doi: 10.4238/gmr.15027359.
- [10] Lê Ngọc Triệu, Nguyễn Hoàng Phong, Mai Tiến Đạt, Thái Thạch Bích, Nguyễn Thanh Tiền, Lê Đình Vĩnh Bảo, Nguyễn Khắc Quang, Phan Ngọc Quỳnh Như (2016), “Khảo sát đa dạng di truyền và xác lập chỉ thị phân tử cho việc nhận dạng một số dòng bơ (*Persea americana* Mill.) đã qua sơ bộ tuyển chọn tại Lâm Đồng”, *Tạp chí Khoa học, Trường Đại học Đà Lạt*, **6**(4), tr.1-14.
- [11] Hoàng Mạnh Cường (2015), *Nghiên cứu tuyển chọn giống bơ (*Persea americana* Mill.) thích hợp cho một số tỉnh Tây Nguyên*, Luận án tiến sĩ nông nghiệp, Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam.
- [12] J.J. Doyle, J.L. Doyle (1990), “Isolation of plant DNA from fresh tissue”, *Focus*, **12**, pp.11-15.
- [13] V.E. Ashworth, M.T. Clegg (2003), “Microsatellite markers in avocado (*Persea americana* Mill.): genealogical relationships among cultivated avocado genotypes”, *Journal of Heredity*, **94**(5), pp.407-415.
- [14] R.J. Schnell, et al. (2003), “Evaluation of avocado germplasm using microsatellite markers”, *Journal American Society Horticulture Science*, **128**(6), pp.881-889.

QUY ĐỊNH VỀ BÀI VIẾT ĐĂNG TẢI TRÊN TẠP CHÍ

Yêu cầu chung

Bài viết gửi đăng trên Tạp chí phải là bài viết nguyên thủy (chưa được công bố trước đó). Tác giả không được gửi đăng bài viết trên các tạp chí khác cho đến khi có quyết định xét duyệt của Ban Biên tập.

Bài báo dài không quá 10 trang (bao gồm cả bảng biểu, ghi chú, tài liệu tham khảo và phụ lục); font chữ: Times New Roman; cỡ chữ 13; khổ giấy A4, lề trên 2 cm, lề dưới 2 cm, lề trái 3 cm, lề phải 2 cm.

Bài viết gửi về Tòa soạn dưới dạng file mềm và bản in; có thể gửi trực tiếp đến Tạp chí (Phòng 507, số 113 Trần Duy Hưng, Cầu Giấy, Hà Nội) hoặc qua hòm thư điện tử, địa chỉ: khcnvn@most.gov.vn.

Tên bài báo

- Tên bài báo được viết bằng tiếng Việt và tiếng Anh, trên trang đầu của bài báo, không gạch chân hay viết nghiêng.

- Tên bài báo phải ngắn gọn, rõ ràng và phù hợp với nội dung bài báo.

- Phía dưới tên bài báo là tên tác giả không viết chức danh và học hàm, học vị. Nếu có nhiều tác giả làm việc ở các cơ quan khác nhau thì tên tác giả được đánh số (^{1,2...}) ở phía trên. Dấu hoa thị (*) chỉ tác giả liên hệ, được viết ở cuối trang đầu tiên của bài báo.

Tóm tắt

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

Dẫn nhập/đặt vấn đề

Định nghĩa vấn đề, tóm lược vấn đề nghiên cứu đã được công bố trong và ngoài nước, nêu mục tiêu nghiên cứu và giải thích sự lựa chọn đề tài và mục tiêu nghiên cứu để thấy được tính thời sự, tính khoa học và sự cần thiết của vấn đề nghiên cứu.

Đối tượng và phương pháp

Đối tượng nghiên cứu cần trình bày tiêu chuẩn lựa chọn, đặc điểm đối tượng nghiên cứu.

Phương pháp nghiên cứu cần nêu rõ cách tiếp cận nghiên cứu, loại hình nghiên cứu, phương pháp đo lường, công thức tính cỡ mẫu, phương pháp xử lý số liệu, mô tả kỹ các kỹ thuật tiến hành trong nghiên cứu; các quan điểm, lập luận, ý kiến tranh luận, các dẫn chứng...

Kết quả

Trình bày đầy đủ, khách quan các kết quả thu được sau nghiên cứu, các kết quả này phải phục vụ cho mục tiêu nghiên cứu. Các số liệu phải chính xác và khớp với nhau.

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

Bàn luận

Chủ yếu bàn luận các vấn đề liên quan đến mục tiêu đề tài.

Nhận xét, đánh giá một cách khách quan các kết quả nghiên cứu, có so sánh với các tác giả khác để khẳng định hoặc phủ định những hiểu biết đã có, qua đó nêu được những điểm mới và đóng góp của đề tài.

Dự báo hướng nghiên cứu tiếp và khả năng ứng dụng các kết quả nghiên cứu vào thực tiễn.

Kết luận

Nêu kết quả nghiên cứu chủ yếu của đề tài có tính khái quát liên quan đến mục tiêu nghiên cứu, đề xuất các vấn đề tiếp tục nghiên cứu.

Chú thích và tài liệu tham khảo

Chú thích được đánh số theo thứ tự xuất hiện (^{1,2,3...}) và được trình bày ngay ở cuối trang viết (footnote). Các tài liệu tham khảo được đánh số theo thứ tự xuất hiện để chỉ dẫn chúng được trích dẫn ở đâu trong bài báo. Số thứ tự được đánh trong ngoặc vuông, ví dụ: [3] với 1 hoặc [2, 5, 7-9] với nhiều số chỉ dẫn.

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

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

Năm xuất bản: năm xuất bản của tài liệu được tham khảo, trích dẫn.

Tên tài liệu được trích dẫn: là tên bài báo, chương/phần sách...

Tên nguồn có thể là tên tạp chí, tên sách, hay tên tài liệu gốc của tài liệu được trích dẫn (phần này được in nghiêng).

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

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

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

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

Các yêu cầu khác

- Bài viết không đạt yêu cầu, Tòa soạn không trả lại bản thảo.

- Bài viết chỉ được đăng khi phản biện nhận xét về chất lượng bài báo đồng ý cho đăng.

- Bản quyền: tác giả đồng ý trao bản quyền bài viết (bao gồm cả phần tóm tắt) cho Ban Biên tập Tạp chí.

PHÂN LOẠI LĨNH VỰC KHOA HỌC

1. Khoa học tự nhiên

- 1.1. Toán học và thống kê
- 1.2. Khoa học máy tính và thông tin
- 1.3. Vật lý
- 1.4. Hóa học
- 1.5. Khoa học trái đất và môi trường
- 1.6. Khoa học sự sống
- 1.7. Khoa học nano
- 1.8. Khoa học tính toán
- 1.9. Các lĩnh vực khác của khoa học tự nhiên

2. Khoa học kỹ thuật và công nghệ

- 2.1. Kỹ thuật dân dụng: kỹ thuật kiến trúc; kỹ thuật xây dựng; kỹ thuật kết cấu và đô thị; kỹ thuật giao thông vận tải; kỹ thuật thủy lợi; kỹ thuật địa chất công trình
- 2.2. Kỹ thuật điện, kỹ thuật điện tử, kỹ thuật thông tin
- 2.3. Kỹ thuật cơ khí, chế tạo máy
- 2.4. Kỹ thuật hóa học
- 2.5. Kỹ thuật vật liệu và luyện kim
- 2.6. Kỹ thuật y học
- 2.7. Kỹ thuật môi trường
- 2.8. Công nghệ sinh học công nghiệp
- 2.9. Công nghệ nano
- 2.10. Kỹ thuật thực phẩm và đồ uống
- 2.11. Các lĩnh vực khác của khoa học kỹ thuật và công nghệ

3. Khoa học y - dược

- 3.1. Y học cơ sở
- 3.2. Y học lâm sàng
- 3.3. Y học dự phòng
- 3.4. Dược học
- 3.5. Các lĩnh vực khác của Y - dược học

4. Khoa học nông nghiệp

- 4.1. Trồng trọt
- 4.2. Chăn nuôi
- 4.3. Thú y
- 4.4. Lâm nghiệp
- 4.5. Thủy sản
- 4.6. Công nghệ sinh học trong nông nghiệp, thủy sản
- 4.7. Các lĩnh vực khác của khoa học nông nghiệp

5. Khoa học xã hội và nhân văn

- 5.1. Tâm lý học
- 5.2. Kinh tế và kinh doanh
- 5.3. Khoa học giáo dục
- 5.4. Xã hội học
- 5.5. Pháp luật
- 5.6. Khoa học chính trị
- 5.7. Địa lý kinh tế và xã hội
- 5.8. Thông tin đại chúng và truyền thông
- 5.9. Lịch sử và khảo cổ học
- 5.10. Ngôn ngữ học và văn học
- 5.11. Triết học, đạo đức và tôn giáo
- 5.12. Nghiên cứu về khu vực và quốc tế
- 5.13. Các lĩnh vực khác của khoa học xã hội và nhân văn

TẠP CHÍ KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

Vietnam Journal of Science and Technology - MOST

Volume 61 - Number 7 - July 2019

Đặc điểm đột biến EGFR phát hiện trong huyết tương ở bệnh nhân ung thư phổi không tế bào nhỏ điều trị tại Bệnh viện Bạch Mai năm 2017-2018.

Phạm Cẩm Phương, Nguyễn Thuận Lợi, Nguyễn Hữu Thắng, Lê Thị Luyến

Kết quả điều trị nhỏ rễ thần kinh C5, C6, ±C7 đám rối cánh tay bằng phẫu thuật chuyển thần kinh.

Nguyễn Văn Phú, Lê Văn Đoàn, Vũ Hữu Trung, Bùi Việt Hùng, Nguyễn Huy Cảnh và cộng sự

Ứng dụng kỹ thuật PCR tổ định loài giun móc *Ancylostoma* spp. và giun mô *Necator americanus* ở người nhiễm bệnh.

Lưu Thanh Liêm, Lê Quốc Hùng, Lê Đức Vinh, Nguyễn Kim Thạch, Phan Văn Trọng

Xây dựng công thức gel nhũ tương dầu dừa (coconut oil) ứng dụng trong mỹ phẩm.

Phạm Đình Duy, Đoàn Duy Quốc

Phân lập và tối ưu hoá điều kiện nuôi cấy vi khuẩn lactic có khả năng kháng vi khuẩn *Propionibacterium* spp. được phân lập trên da người.

Bùi Hoàng Đăng Long, Nguyễn Thị Tuyết Mai, Huỳnh Xuân Phong, Phạm Thủy Vi, Nguyễn Ngọc Thanh

Biểu hiện của protein TIF-1A và sự sinh tổng hợp RNA ribosome tăng cao ở khối u của bệnh nhân ung thư đại - trực tràng.

Võ Nguyễn Thanh Thảo, Hoàng Đình Hòa, Huỳnh Vũ, Hồ Hữu Đức, Nguyễn Lê Xuân Trường, Nguyễn Đăng Quân

Kết quả phân tích tương quan giữa một số chỉ tiêu sinh trưởng cành quả và năng suất quả trên cây bưởi Da xanh tại Thái Nguyên.

Chu Thúc Đạt, Nguyễn Thị Thu Hà, Nguyễn Tiến Dũng, Nguyễn Thị Tinh, Bùi Trí Thức, Tống Hoàng Huyền, Nguyễn Văn Liễu, Ngô Xuân Bình

Sinh trưởng hệ sợi và hình thành quả thể của nấm sò vua *Pleurotus eryngii* (DC.: Fr.) chủng E2.

Nguyễn Thị Bích Thùy, Ngô Xuân Nghiễn, Lê Văn Vê, Nguyễn Thị Luyến, Nguyễn Thị Huyền Trang, Phan Thu Huyền

Nghiên cứu khả năng tạo rễ bất định Xáo tam phân (*Paramignya trimera*) trong điều kiện thủy canh *in vivo*.

Phí Thị Cẩm Miện, Nguyễn Đức Bách, Nguyễn Thị Vân Anh, Phạm Bích Ngọc, Chu Hoàng Hà

Phá quang kỳ giống lúa mùa Nàng Quýt Biển bằng phương pháp xử lý đột biến sốc nhiệt.

Trần Thị Phương Thảo, Võ Công Thành, Nguyễn Bích Hà Vũ

Xác định và đánh giá mức độ biểu hiện của họ gen mã hóa tiểu phần Nuclear factor-YC ở cây sắn (*Manihot esculenta*).

Chu Đức Hà, Nguyễn Đức Anh, Hoàng Thị Thao, Phạm Thị Lý Thu, Phạm Phương Thu, Chu Thùy Dương, Nguyễn Thị Thu Phương, Phạm Xuân Hội

Đánh giá đa dạng di truyền một số giống bơ (*Persea americana* Mill.) bằng chỉ thị phân tử SSR.

Phạm Thị Phương, Phạm Đức Toàn, Nguyễn Vũ Phong

1 Characteristics of EGFR mutations in plasma samples from non-small cell lung cancer patients at Bach Mai Hospital during 2017-2018.

Cam Phuong Pham, Thuan Loi Nguyen, Huu Thang Nguyen, Thi Luyen Le

5 Results on the treatment of C5, C6, ±C7 nerve root avulsion injuries with combined nerve transfers.

Van Phu Nguyen, Van Doan Le, Huu Trung Vu, Viet Hung Bui, Huy Canh Nguyen, et al.

10 Application of nested PCR to detect *Ancylostoma* spp. and *Necator americanus* infections in human.

Thanh Liem Luu, Quoc Hung Le, Duc Vinh Le, Kim Thach Nguyen, Van Trong Phan

14 Formulation of emulgel containing coconut oil.

Dinh Duy Pham, Duy Quoc Doan

21 Isolation and optimisation for culture conditions of lactic acid bacteria for antibacterial properties against *Propionibacterium* spp. isolated from human skin.

Hoang Dang Long Bui, Thi Tuyet Mai Nguyen, Xuan Phong Huynh, Thuy Vi Pham, Ngoc Thanh Nguyen

29 Expression of TIF-1A protein and biosynthesis of ribosomal RNA highly increase in colorectal cancer patients' tumors.

Nguyen Thanh Thao Vo, Dinh Hoa Hoang, Vu Huynh, Huu Duc Ho, Le Xuan Truong Nguyen, Dang Quan Nguyen

34 Results of correlative analysis between some growth criteria of fruit bearing branches and fruit yield of Da xanh pummelo (*C. grandis*).

Thuc Dat Chu, Thi Thu Ha Nguyen, Tien Dung Nguyen, Thi Tinh Nguyen, Tri Thuc Bui, Hoang Huyen Tong, Van Lieu Nguyen, Xuan Binh Ngo

38 Mycelial growth and fruting body formation of the king oyster mushroom *Pleurotus eryngii* (DC.: Fr.) strain E2.

Thi Bich Thuy Nguyen, Xuan Nghiên Ngo, Van Ve Le, Thi Luyen Nguyen, Thi Huyen Trang Nguyen, Thu Huyen Phan

45 Study the ability to induce the adventitious root of *Paramignya trimera* in vivo hydroponic conditions.

Thi Cam Mien Phi, Duc Bach Nguyen, Thi Van Anh Nguyen, Bich Ngoc Pham, Hoang Ha Chu

50 Shortening maturity duration of the seasonal rice variety Nang Quot Bien by temperature-sensitive method.

Thi Phuong Thao Tran, Cong Thanh Vo, Bich Ha Vu Nguyen

56 Identification and *in silico* analysis of expression profiles of genes encoding Nuclear factor-YC subunit in cassava (*Manihot esculenta*) using the bioinformatics approach.

Duc Ha Chu, Duc Anh Nguyen, Thi Thao Hoang, Thi Ly Thu Pham, Phuong Thu Pham, Thuy Duong Chu, Thi Thu Phuong Nguyen, Xuan Hoi Pham

60 Assessment on the genetic diversity of some avocado (*Persea americana* Mill.) varieties using microsatellite markers.

Thi Phuong Pham, Duc Toan Pham, Vu Phong Nguyen