

TẠP CHÍ

**NÔNG NGHIỆP
& PHÁT TRIỂN NÔNG THÔN**

ISSN 1859 - 4581

NĂM THỨ HAI MƯƠI HAI

**CÔNG NGHỆ SINH HỌC
THÁNG 10/2022**

**TỔNG BIÊN TẬP
TS. NGUYỄN THỊ THANH THỦY
ĐT: 024.37711070**

**PHÓ TỔNG BIÊN TẬP
TS. DƯƠNG THANH HẢI
ĐT: 024.38345457**

TOÀ SOẠN - TRỊ SỰ
Số 10 Nguyễn Công Hoan
Quận Ba Đình - Hà Nội
ĐT: 024.37711072
Fax: 024.37711073
Email: tapchinongnghiep@mard.gov.vn
Website: www.tapchikhoahocnongnghiep.vn

**VĂN PHÒNG ĐẠI DIỆN TẠP CHÍ
TẠI PHÍA NAM**
135 Pasteur
Quận 3 - TP. Hồ Chí Minh
ĐT/Fax: 028.38274089

Giấy phép số:
290/GP - BTTTT
Bộ Thông tin và Truyền thông
cấp ngày 03 tháng 6 năm 2016

**Công ty CP Khoa học
và Công nghệ Hoàng Quốc Việt**
Địa chỉ: Số 18, Hoàng Quốc Việt,
Cầu Giấy, Hà Nội
ĐT: 024.3756 2778

**Phát hành qua mạng lưới
Bưu điện Việt Nam; mã ấn phẩm
C138; Hotline 1800.585855**

MỤC LỤC

- | | |
|--|--------|
| ❑ NGUYỄN THỊ MINH NGUYỆT, NGUYỄN THỊ NHÀI, NGUYỄN BÁ NGỌC, KHUẤT THỊ MAI LƯƠNG, CHU ĐỨC HÀ, PHẠM XUÂN HỘI, NGUYỄN THỊ THANH THỦY, LÊ HÙNG LĨNH. Nghiên cứu xây dựng quy trình phân tích gen trong giống lúa bằng kỹ thuật sinh học phân tử phục vụ xác định tính khác biệt trong khảo nghiệm DUS | 3-16 |
| ❑ VÕ THỊ MINH TUYẾN, NGUYỄN THỊ HẢO, NGUYỄN THỊ HUÊ, ĐOÀN VĂN SƠN, HOÀNG MINH TRANG, LÊ VĂN TRƯỜNG. Nghiên cứu và hoàn thiện quy trình sản xuất hạt giống siêu nguyên chủng cho giống lúa kháng bệnh bạc lá DT82 | 17-25 |
| ❑ NGUYỄN TIẾN DŨNG, LÃ VĂN HIỂN, NGÔ XUÂN BÌNH. Xác định các yếu tố cis điều hòa hoạt động của gen <i>RMP</i> biểu hiện chuyên biệt ở hạt phần lúa (<i>Oryza sativa</i> L.) | 26-32 |
| ❑ ĐỒNG THỊ KIM CÚC, NGUYỄN THỊ LÝ, DƯƠNG HỒNG MAI, NGUYỄN HỮU HẢI, TRẦN ĐĂNG KHÁNH. Đánh giá đa dạng di truyền và xây dựng bộ tiêu bản ADN của giống lạc Chay và lạc Chay trắng | 33-42 |
| ❑ NGUYỄN THỊ HIỀN, VĂN THU HUYỀN, ĐỒNG THỊ ỨNG, NGUYỄN ANH DŨNG, LÊ THỊ HOA, LƯU THỊ QUỲNH, HOÀNG THỊ HỒNG HẠNH, MAI THỊ PHƯƠNG THÚY. Nghiên cứu nhân giống bạch đàn lai DH32-29 bằng kỹ thuật nuôi cấy mô tế bào | 43-51 |
| ❑ PHAN XUÂN HUYỀN, NGUYỄN THỊ THANH HẰNG, ĐINH VĂN KHIÊM. Nghiên cứu nhân giống <i>in vitro</i> cây tầm bóp Nam Mỹ (<i>Physalis peruviana</i> Linnaeus) | 52-59 |
| ❑ HÀ BÍCH HỒNG, NGUYỄN THẾ HƯỜNG, HOÀNG VĂN SÂM. Đa dạng Nucleotide trình tự ADN mã vạch <i>tmH-psbA</i> của loài Xà xị (<i>Cinnamomum parthenoxylon</i> (Jack) Meisn) tại một số tỉnh miền Bắc Việt Nam | 60-70 |
| ❑ NGUYỄN THỊ HẠNH. Phân lập và sơ bộ định tên vi khuẩn gây thối hồng nho Ninh Thuận | 71-79 |
| ❑ LÊ SƠN, TRẦN THANH TRẮNG, NGUYỄN ĐỨC KIÊN. Nghiên cứu liên kết trên toàn hệ gen (GWAS) về khả năng chống chịu ở Keo lai với bệnh chết héo do nấm <i>Ceratocystis</i> | 80-90 |
| ❑ HUỲNH ĐỨC ĐỊNH, TRẦN THANH, TRẦN ĐÌNH MINH, VŨ VĂN TRƯỜNG, HUỲNH THỊ MINH TÂM. Phân lập, tuyển chọn chủng vi khuẩn lactic từ mủ cao su ở Bình Dương và thử nghiệm trong đông mủ cao su | 91-100 |

**VIETNAM JOURNAL OF
AGRICULTURE AND RURAL
DEVELOPMENT**
ISSN 1859 - 4581

THE TWENTY SECOND YEAR

Editor-in-Chief
Dr. NGUYEN THI THANH THUY
Tel: 024.37711070

Deputy Editor-in-Chief
Dr. DUONG THANH HAI
Tel: 024.38345457

Head-office
No 10 Nguyenconghoan
Bach Dinh - Hanoi - Vietnam
Tel: 024.37711072
Fax: 024.37711073
Email: tapchinongnghiep@mard.gov.vn
Website: www.tapchikhoahocnongnghiep.vn

Representative Office
135 Pasteur
Dist 3 - Hochiminh City
Tel/Fax: 028.38274089

Printing in Hoang Quoc Viet
technology and science
joint stock company

CONTENTS

❑ NGUYEN THI MINH NGUYET, NGUYEN THI NHAI, NGUYEN BA NGOC, KHUAT THI MAI LUONG, CHU DUC HA, PHAM XUAN HOI, NGUYEN THI THANH THUY, LE HUNG LINH. Establishment of the process for gene determination in rice by using molecular biology techniques to support for identification and distinction new rice varieties in DUS testing	3-16
❑ VO THI MINH TUYEN, NGUYEN THI HAO, NGUYEN THI HUE, DOAN VAN SON, HOANG MINH TRANG, LE VAN TRUONG. Research and complete the production process of super-primary seeds for DT82, a bacterial leaf blight disease resistance rice variety	17-25
❑ NGUYEN TIEN DUNG, LA VAN HIEN, NGO XUAN BINH. Screening <i>cis</i> regulatory elements-CREs in the rice microspore/pollen specific promoter (RMP) gene	26-32
❑ DONG THI KIM CUC, NGUYEN THI LY, DUONG HONG MAI, NGUYEN HUU HAI, TRAN DANG KHANH. Evaluation of genetic diversity of Chay and white Chay peanut varieties	33-42
❑ NGUYEN THI HIEN, VAN THU HUYEN, DONG THI UNG, NGUYEN ANH DUNG, LE THI HOA, LUU THI QUYNH, HOANG THI HONG HANH, MAI THI PHUONG THUY. Study on propagation of <i>Eucalyptus</i> hybrid clone DH32-29 by tissue culture technique	43-51
❑ PHAN XUAN HUYEN, NGUYEN THI THANH HANG, DINH VAN KHIEM. Study on <i>in vitro</i> propagation of <i>Physalis peruviana</i> Linnaeus	52-59
❑ HA BICH HONG, NGUYEN THE HUONG, HOANG VAN SAM. Nucleotide diversity of DNA barcode sequence <i>trnH-psbA</i> in <i>Cinnamomum parthenoxylon</i> (Jack) Meisn species in some Northern provinces of Vietnam	60-70
❑ NGUYEN THI HANH. Isolation and identification bacteria causing the Ninh Thuan grapes spoilage	71-79
❑ LE SON, TRAN THANH TRANG, NGUYEN DUC KIEN. Genome-wide selection analysis for disease resistance to <i>Ceratocystis</i> in <i>Acacia hybrid</i>	80-90
❑ HUYNH DUC DINH, TRAN THANH, TRAN DINH MINH, VU VAN TRUONG, HUYNH THI MINH TAM. Isolation, selection of lactic acid bacteria from rubber latex in Binh Duong province and testing for coagulating of rubber latex	91-100

NGHIÊN CỨU XÂY DỰNG QUY TRÌNH PHÂN TÍCH GEN TRONG GIỐNG LÚA BẰNG KỸ THUẬT SINH HỌC PHÂN TỬ PHỤC VỤ XÁC ĐỊNH TÍNH KHÁC BIỆT TRONG KHẢO NGHIỆM DUS

Nguyễn Thị Minh Nguyệt^{1,*}, Nguyễn Thị Nhài¹, Nguyễn Bá Ngọc¹,
Khuất Thị Mai Lương¹, Chu Đức Hà², Phạm Xuân Hội¹, Nguyễn Thị Thanh Thủy³, Lê Hùng Lĩnh¹

TÓM TẮT

Nghiên cứu này được thực hiện với mục tiêu xây dựng quy trình phân tích, xác định sự có mặt của gen/locus gen mục tiêu bằng kỹ thuật sinh học phân tử phục vụ việc xác định tính khác biệt của giống lúa trong khảo nghiệm DUS, đáp ứng Tiêu chuẩn Quốc gia TCVN 13382-1: 2021. Kết quả nghiên cứu cho thấy các gen kháng bệnh đạo ôn (*Pik-m*, *Pi1*, *Pik-h*, *Pik-p*, *Pi7(t)*, *Pi9(t)*, *Piz*, *Piz-5*, *Piz-t*, *Pita-2* và *Pita*), gen kháng bệnh bạc lá (*xa5*, *Xa7*, *Xa21*), gen chống chịu rầy nâu (*Bph20*, *Bph21*, *Bph2*, *Bph17-ptb*, *Bph32*), gen chịu mặn *Saltol*, gen chịu ngập *Sub1*, gen quy định mùi thơm *fgr...* có thể được xác định bằng phương pháp phân tích với các chỉ thị phân tử liên kết gen mục tiêu cho đa hình ADN giữa giống chuẩn mang gen kháng và giống gốc không mang gen. Quy trình phân tích, xác định sự có mặt của gen mục tiêu trong giống lúa bằng kỹ thuật sinh học phân tử đã được hoàn thiện và có thể áp dụng trong việc hỗ trợ khảo nghiệm tính khác biệt trên cây lúa đối với các tính trạng kháng với bệnh đạo ôn, kháng bệnh bạc lá, chống chịu rầy nâu và các tính trạng đặc trưng khác (chịu ngập, chịu mặn, mùi thơm...).

Từ khóa: Chỉ thị phân tử, khảo nghiệm DUS, lúa, xác định gen.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Luật Trồng trọt số 31/2018/QH14 đã nêu rõ quy định khảo nghiệm giống cây trồng, theo đó, nội dung khảo nghiệm tính khác biệt, tính đồng nhất và tính ổn định của giống lúa đã được quy định cụ thể trong Tiêu chuẩn Quốc gia TCVN 13382-1: 2021: Giống cây trồng nông nghiệp - Khảo nghiệm tính khác biệt, tính đồng nhất và tính ổn định - Phần 1: Giống lúa. Trong đó, ba tính trạng bổ sung kháng với bệnh đạo ôn hại lá (68), kháng với bệnh bạc lá (69), kháng với rầy nâu (70) chỉ thực hiện khi cơ quan tác giả giống yêu cầu và áp dụng trong trường hợp đánh giá 67 tính trạng trước đó không có sự khác biệt giữa giống khảo nghiệm và giống tương tự. Giống được chọn tạo bằng phương pháp lai tích lũy, mức độ biểu hiện

kháng cấp bệnh hoặc cấp hại ≤ 3 (theo TCVN13381-1: 2021). Xác định sự có mặt của gen kháng bằng chỉ thị phân tử [1], [2]. Chính vì vậy, nghiên cứu này được thực hiện nhằm xây dựng và hoàn thiện Quy trình phân tích, xác định sự có mặt của gen mục tiêu trong giống lúa bằng kỹ thuật sinh học phân tử phục vụ việc xác định tính khác biệt của giống lúa trong khảo nghiệm DUS, đáp ứng tiêu chuẩn Quốc gia TCVN 13382-1: 2021.

Quy trình được xây dựng và phát triển dựa trên phương pháp lấy mẫu thử nghiệm và phương pháp xác định locus gen mục tiêu trên cây lúa phục vụ công tác thử nghiệm và giám định gen thực vật theo tiêu chuẩn ISO/IEC 17025: 2017 [3], [4].

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

- Mẫu giống lúa cần xác định gen, mẫu giống lúa gốc. Mẫu giống lúa cần xác định gen cần có lai lịch giống rõ ràng, được lai tạo theo phương pháp lai tích lũy từ giống gốc và giống chuẩn mang gen

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

² Trường Đại học Công nghệ, Đại học Quốc gia Hà Nội

³ Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn

*Email: nguyetha176@gmail.com

mục tiêu.

- Mẫu giống chuẩn mang gen/locus gen mục tiêu, mẫu giống chuẩn không mang gen do Viện Nghiên cứu Lúa Quốc tế (IRRI) cung cấp (Bảng 1) [4].

- Các chỉ thị phân tử liên kết với các gen kháng bệnh đạo ôn, bạc lá, rầy nâu, chịu mặn, chịu ngập... đã được công bố trên các tạp chí quốc tế có uy tín (Bảng 2) [4].

Bảng 1. Danh sách các giống lúa chuẩn mang gen/locus gen mục tiêu và các giống lúa miễn cảm, giống tham khảo sử dụng trong nghiên cứu

TT	Tên giống	Gen mục tiêu	Tính trạng
1	IRBLkm-Ts	<i>Pik-m</i>	Kháng bệnh đạo ôn
2	IRBL1-CL	<i>Pi1</i>	
3	IRBLkh-K3	<i>Pik-h</i>	
4	IRBLkp-K60	<i>Pik-p</i>	
5	IRBL7-M	<i>Pi7(t)</i>	
6	IRBL9-W	<i>Pi9(t)</i>	
7	IRBLz-Fu	<i>Piz</i>	
8	IRBLz5-CA	<i>Piz-5</i>	
9	IRBLzt-T	<i>Piz-t</i>	
10	IRBLta2-Pi	<i>Pita-2</i>	
11	IRBLta2-Re	<i>Pita-2</i>	
12	IRBLta-K1	<i>Pita</i>	
13	IRBLta-CP1	<i>Pita</i>	
14	IRBB5	<i>xa5</i>	Kháng bệnh bạc lá
15	IRBB7	<i>Xa7</i>	
16	IRBB21	<i>Xa21</i>	
17	IRBB57	<i>Xa4+xa5+Xa21</i>	
18	IRBB62	<i>Xa4+Xa7+Xa21</i>	
19	IRBB64	<i>Xa4+xa5+Xa7+Xa21</i>	
20	IR71033-121-55	<i>Bph20, Bph21</i>	Chịu mặn

21	PTB33	<i>Bph2, Bph17-ptb, Bph32</i>	Chịu ngập
22	IR64- <i>Salto1</i>	<i>Salto1</i>	Chịu mặn
23	IR64- <i>Sub1</i>	<i>Sub1</i>	Chịu ngập
24	Basmati	<i>fgr</i>	Mùi thơm
25	CO39	-	Mẫn cảm bệnh đạo ôn
26	LTH	-	Mẫn cảm bệnh đạo ôn
27	IR24	-	Mẫn cảm bệnh bạc lá
28	TN1	-	Mẫn cảm rầy nâu
29	IR64	-	Mẫn cảm ngập
30	IR29	-	Mẫn cảm mặn
31	BT7	-	Giống tham khảo
32	BC15	-	Giống tham khảo
33	KD18	-	Giống tham khảo
	...		

Bảng 2. Các chỉ thị phân tử liên kết với các gen/ locus gen mục tiêu sử dụng trong nghiên cứu

Gen kháng	NST	Chỉ thị liên kết	Khoảng cách (cM)	Trình tự mỗi xuôi/ngược	TLTK
<i>Pik-m</i>	11	RM224	0	F: ATCGATCGATCTTCACGAGG R: TGCTATAAAAGGCATTCGGG	[5]
<i>Pi1</i>	11	RM224	0	F: ATCGATCGATCTTCACGAGG R: TGCTATAAAAGGCATTCGGG	[5]
<i>Pik-h</i>	11	RM224	0	F: ATCGATCGATCTTCACGAGG R: TGCTATAAAAGGCATTCGGG	[5]

<i>Pik-p</i>	11	RM224	0	F: ATCGATCGATCTTCACGAGG R: TGCTATAAAAGGCATTCGGG	[5]
<i>Pi7(t)</i>	11	RM224	0	F: ATCGATCGATCTTCACGAGG RTGCTATAAAAGGCATTCGGG	[5]
<i>Pi9(t)</i>	6	pB8	0	F: CCGGACTAAGTACTGGCTTCGATA R: CCCAATCTCCAATGACCCATAAC	[6]
<i>Piz</i>	6	RM527	0,3	F: GGCTCGATCTAGAAAATCCG R: TTGCACAGGTTGCGATAGAG	[7]
<i>Piz-5</i>	6	RM527	0,3	F: GGCTCGATCTAGAAAATCCG R: TTGCACAGGTTGCGATAGAG	[7]
<i>Piz-t</i>	6	RM527	0,3	F: GGCTCGATCTAGAAAATCCG R: TTGCACAGGTTGCGATAGAG	[7]
<i>Pita-2</i>	12	RM7102	1,3	F: TTGAGAGCGTTTTTAGGATG R: TCGGTTTACTTGGTTACTCG	[7]
<i>Pita</i>	12	RM7102	1,3	F: TTGAGAGCGTTTTTAGGATG R: TCGGTTTACTTGGTTACTCG	[7]
<i>xa5</i>	5	RM153	5,6	F: GCCTCGAGCATCATCATCAG R : ATCAACCTGCACTTGCCTGG	[8]
		xa5FM	0	SF: GTCTGGAATTTGCTCGCGTTCG SR: TGGTAAAGTAGATACCTTATCAAAGTGGG RF: AGCTCGCCATTCAAGTTCTTGAG RR: TGAATTGGTTCTCCAAGGCTT	[9]

<i>Xa7</i>	6	P3	3,4	F: CAGGAATTGACTGGAGTAGTGGTT R: CATCACGGTCACCGCCATAT	[10]
<i>Xa21</i>	11	pTA248	0	F: AGACGCGGAAGGGTGGTTCCCGGA R: AGACGCGGTAATCGAAGATGAAA	[11]
<i>Bph20</i>	4	MS5	2,9	F: TTGTGGGTCCTCATCTCCTC R: TGACAACTTGTGCAAGATCAAA	[12]
		MS10	0,7	F: CAATACGAGAAGCCCCTCAC R: CTGAAGGAACACGCGGTAGT	
<i>Bph21</i>	12	S12091A	3,8	F: TGGGGTTAAATGTTGCCTCT R: CATATGTGGGAGCAGACTAGCA	
<i>Bph2</i>	12	RM28449	Chỉ thị liên kề	F: CACCCATTGATGTGAAACTCTGG R: GGATTCATGATACAGTGTGCAACG	[13]
		ID-161-2		F: ATCCTTTCGGACAGGGTGAT R: GGACGGGATGATACCTCAGA	
<i>Bph17-ptb</i>	4	RM1305	Chỉ thị liên kề	F: GGTACTACAAAGAAACCTGCATCG R: TCCTAGCTCAAATGTGCTATCTGG	[13]
		RM6156		F: CGTCCGCACGCAAGAAGAAGG R: CCGTACGTGTGGCTTCAGATTGG	
<i>Bph32</i>	6	RM508	Chỉ thị liên kề	F: AGAAGCCGGTTCATAGTTCATGC R: ACCCGTGAACCACAAAGAACG	[13]
		RM19341		F: GCTACAAATAGCCACCCACACC R: CAACACAAGCAGAGAAGTGAAGC	

<i>Salto1</i>	1	RM493	0	F: 3'-TAGCTCCAACAGGATCGACC R: 3'-GTACGTAAACGCGGAAGGTG	[14]
<i>Sub1</i>	9	ART5	0	F: CAGGGAAAGAGATGGTGGA R: TTGGCCCTAGGTTGTTTCAG	[15]
<i>fgr</i>	8	BAD2	0	ESP: TTGTTTGGAGCTTGCTGATG IFAP: CATAGGAGCAGCTGAAATATATACC INSP: CTGGTAAAAAGATTATGGCTTCA EAP: AGTGCTTTACAAAGTCCCGC	[16]

2.2. Phương pháp nghiên cứu

- Phương pháp lấy mẫu: mẫu giống được thu thập và bảo quản dựa trên phương pháp lấy mẫu lúa theo tiêu chuẩn ISO/IEC 17025: 2017 của phòng thử nghiệm theo mô tả trong nghiên cứu trước đây [3].

- Phương pháp tách chiết ADN tổng số: mẫu lá thử nghiệm được tách chiết ADN tổng số theo phương pháp CTAB (Cetyl trimethylammonium bromide) [17]. Chất lượng của ADN được kiểm tra trên hệ thống máy đọc quang phổ SpectroMAX 190 (Molecular Devices, Hoa Kỳ) [4].

- Phương pháp khuếch đại bằng phản ứng PCR: mẫu ADN pha loãng đến nồng độ 30 ng/μl được sử dụng làm khuôn cho phản ứng PCR trên máy C1000 Touch Thermal Cycler (Bio-rad, Hoa Kỳ) [4].

- Phương pháp kiểm tra sản phẩm PCR trên gel agarose: sản phẩm PCR được tiến hành điện di trên gel agarose 2,5% có bổ sung thuốc nhuộm safeview ADN với dung dịch đệm TBE 0,5X (Tris base, boric axit, EDTA) [4].

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả khảo sát xác định chỉ thị phân tử cho đa hình ADN giữa các nguồn vật liệu nghiên cứu

Phân tích đa hình ADN giữa giống lúa gốc và giống chuẩn mang gen mục tiêu là bước quan

trọng để xác định chỉ thị liên kết phù hợp cho thí nghiệm xác định sự có mặt của gen kháng trong các giống lúa khảo nghiệm. Trong nghiên cứu đã được công bố năm 2019, nhóm nghiên cứu đã xác định được 10 chỉ thị liên kết chặt với 10 gen/locus gen mục tiêu cho kết quả đa hình giữa giống chuẩn mang gen mục tiêu với giống chuẩn không mang gen mục tiêu và các giống tham khảo (Bắc Thơm số 7 (BT7), BC15, Khang Dân 18 (KD18)...) (Hình 1) [4]. Các chỉ thị được thống kê lại như sau:

- Chỉ thị RM153 liên kết với gen kháng bạc lá *xa5* cho kết quả đa hình giữa giống chuẩn mang gen kháng *xa5* (băng ADN ở vị trí ~185bp) với giống chuẩn không mang gen IR24 và các giống tham khảo BC15, KD18 và BT7.

- Chỉ thị P3 liên kết gen kháng bạc lá *Xa7* cho kết quả đa hình giữa giống chuẩn mang gen *Xa7* (băng ADN ở vị trí ~300 bp) với giống chuẩn không mang gen IR24 và các giống tham khảo.

- Chỉ thị pTA248 liên kết gen kháng bạc lá *Xa21* cho kết quả đa hình giữa giống chuẩn mang gen *Xa21* (băng ADN ở vị trí ~1.000 bp) với giống chuẩn không mang gen IR24 và các giống tham khảo.

- Chỉ thị RM224 liên kết chặt với gen kháng đạo ôn *Pik-h* cho kết quả đa hình giữa giống chuẩn mang gen kháng *Pik-h* (băng ADN ở vị trí ~135

bp) với giống chuẩn không mang gen CO39 và các giống tham khảo BC15, KD18 và BT7.

- Chỉ thị RM527 liên kết chặt với gen kháng đạo ôn *Piz-5* cho kết quả đa hình giữa giống chuẩn mang gen kháng *Piz-5* (băng ADN ở vị trí ~230 bp) với giống chuẩn không mang gen CO39 và các giống tham khảo BC15, KD18 và BT7.

- Chỉ thị trội pB8 liên kết chặt với gen kháng *Pi9(t)* cho kết quả giống chuẩn mang gen *Pi9(t)* cho băng ADN ở vị trí ~500 bp, các giống còn lại đều không cho băng ADN.

- Chỉ thị RM7102 liên kết gen *Pita-2* cho kết quả đa hình giữa giống chuẩn mang gen *Pita-2* (băng ADN ở vị trí ~190 bp) với giống chuẩn không mang gen CO39 và hai giống tham khảo BT7 và BC15, không cho đa hình với giống Khang Dân 18.

- Chỉ thị ART5 liên kết chặt với gen chịu ngập *Sub1* cho kết quả đa hình giữa giống chuẩn mang gen *Sub1* (băng ADN ở vị trí ~200 bp) với giống chuẩn không mang gen IR64 và các giống tham khảo BC15, KD18 và BT7.

- Chỉ thị RM493 liên kết chặt với gen chịu mặn *Saltol* cho kết quả đa hình giữa giống chuẩn mang gen *Saltol* (băng ADN ở vị trí ~228 bp) với giống không mang gen IR29 và các giống tham khảo.

- Chỉ thị BAD2 là chỉ thị đặc hiệu xác định gen qui định mùi thơm *fgr*, kết quả phân tích cho thấy chỉ thị cho đa hình rõ rệt giữa hai giống lúa thơm Basmati và Bắc Thơm 7 với các giống lúa không thơm BC15, KD18 và CO39.

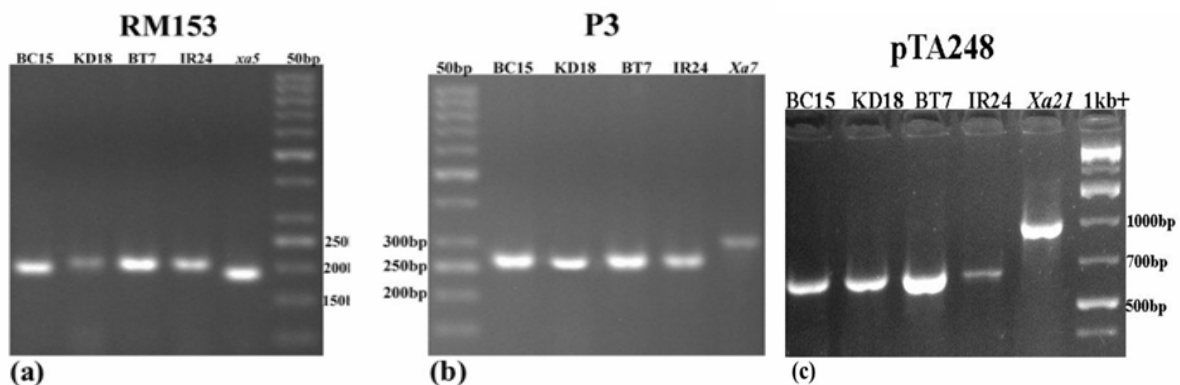
Trong nghiên cứu này, các chỉ thị phân tử liên kết chặt với gen kháng bệnh bạc lá *xa5*, các gen chống chịu rầy nâu *Bph20*, *Bph21*, *Bph2*, *Bph17-ptb*, *Bph32*... tiếp tục được phân tích nhằm xác định các chỉ thị phân tử phù hợp cho việc xác định sự có mặt của gen kháng mục tiêu trong các giống lúa khảo nghiệm. Kết quả thu được cho thấy:

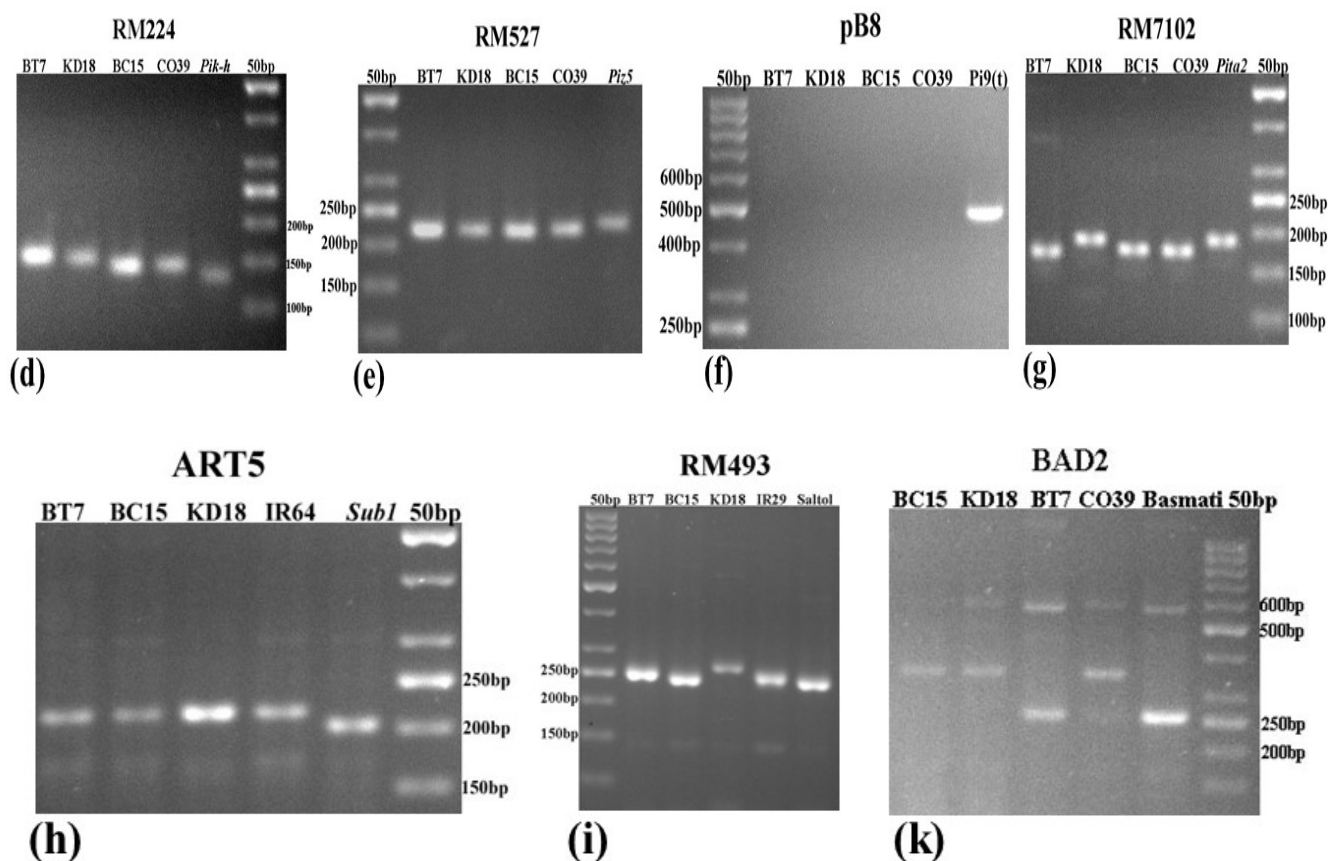
- Chỉ thị xa5FM liên kết gen *xa5* cho kết quả đa hình giữa giống chuẩn mang gen *xa5* (băng ADN ở vị trí ~180 bp) với giống không mang gen IR24 và các giống tham khảo BT7, BC15.

- Chỉ thị MS5 liên kết gen *Bph20* cho kết quả đa hình giữa giống chuẩn mang gen *Bph20* (băng ADN ở vị trí ~230 bp) với giống tham khảo BT7.

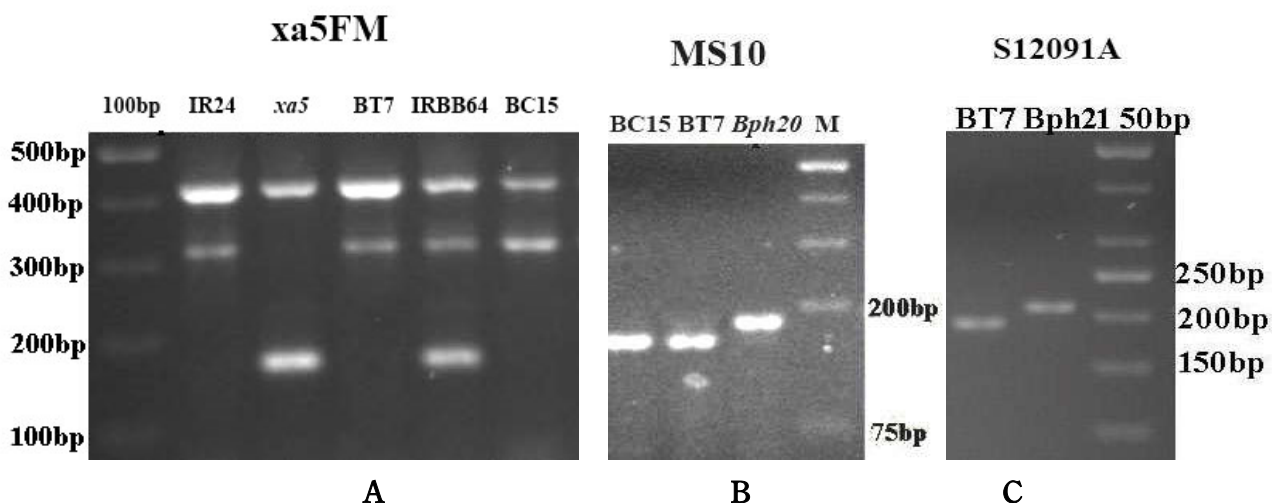
- Chỉ thị MS10 liên kết gen *Bph20* cho kết quả đa hình giữa giống chuẩn mang gen *Bph20* (băng ADN ở vị trí ~180 bp) với giống tham khảo BC15, BT7.

- Chỉ thị S12091A liên kết gen *Bph21* cho kết quả đa hình giữa giống chuẩn mang gen *Bph21* (băng ADN ở vị trí ~215 bp) với giống tham khảo BT7 (Hình 2).





Hình 1. Kết quả phân tích đa hình ADN giữa các giống lúa nghiên cứu với các chỉ thị liên kết các gen mục tiêu: (a) *xa5*, (b) *Xa7*, (c) *Xa21*, (d) *Pik-h*, (e) *Piz-5*, (f) *Pi9(t)*, (g) *Pita-2*, (h) *Sub1*, (i) *Saltol* và (k) *fgr[4]*



Hình 2. Kết quả phân tích đa hình ADN giữa các giống lúa nghiên cứu với các chỉ thị liên kết các gen mục tiêu: (a) *xa5*, (b) *Bph20* và (c) *Bph21*

3.2. Kết quả xây dựng quy trình phân tích, xác định sự có mặt của gen mục tiêu (kháng sâu bệnh, chống chịu điều kiện bất thuận...) bằng kỹ thuật sinh học phân tử

Từ kết quả phân tích đa hình ADN giữa các giống chuẩn mang gen mục tiêu kháng bệnh đạo ôn, bạc lá, rầy nâu, gen chịu ngập, chịu mặn..., đã xây dựng và hoàn thiện quy trình phân tích gen

trong giống lúa bằng kỹ thuật sinh học phân tử như sau:

Mục đích:

- Tách chiết ADN phục vụ cho việc thử nghiệm các gen/locus gen trên cây lúa.
- Xác định sự có mặt của gen/locus gen mục tiêu (gen kháng đạo ôn, gen kháng bạc lá, gen chống chịu rầy nâu, gen chịu ngập, chịu mặn...) trong các giống lúa phục vụ công tác khảo nghiệm DUS và công nhận giống cây trồng.

Phạm vi áp dụng:

- Quy trình này áp dụng cho việc tách chiết ADN từ mẫu lá lúa non và phát hiện sự có mặt của gen/locus gen bằng kỹ thuật PCR của Phòng Sinh học phân tử.

- Thời gian thực hiện: 30 ngày kể từ ngày nhận mẫu.

Tài liệu cơ sở: [3], [4].

Nội dung quy trình:

(1) Thiết bị: Các thiết bị phục vụ cho tách chiết ADN lúa từ mẫu lá và thử nghiệm xác định sự có mặt của gen mục tiêu ở các giống lúa bao gồm:

STT	Thiết bị	Số nhãn hiệu	Nguồn gốc
1	Máy nghiền mẫu	Mixer Mills MM 200	Retsch - Đức
2	Bể ổn nhiệt	WNB14	Memmert - Đức
3	Máy ly tâm	5430R	Eppendorf - Đức
4	Máy làm khô ADN	Vacufuge™ Concentrator	Eppendorf - Đức
5	Máy định lượng ADN	SpectraMax 190	Molecular Devices - Trung Quốc
6	Máy PCR	C1000 Touch	Bio-Rad - Singapore
7	Bộ điện di	Owl A2-BP	Thermo Scientific - Hoa Kỳ
8	Máy chụp ảnh gel	Analytik Jena UVP Geldoc-it2	Analytik Jena - Hoa Kỳ
9	Bộ pipet	Research® plus	Eppendorf - Đức

(2) Hóa chất, dụng cụ:

Hóa chất phục vụ tách chiết ADN tổng số từ mẫu lá

- Dung dịch chiết: 0,1M Tris-Cl, pH8; 0,05M EDTA; 0,5M NaCl; 0,07% β -mercaptoethanol.
- Dung dịch SDS 10%.
- Dung dịch đệm CTAB (0,2M Tris-Cl, pH7,5; 0,05M EDTA; 2M NaCl; 2% (w/v) CTAB).
- Hỗn hợp chloroform: Isoamyl alcohol (24: 1).
- Dịch đệm TE (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1,0 mM EDTA).
- RNase (10 mg/ml).
- 1M NaCl.
- Isopropanol.
- Ethanol.
- Nitor lỏng.
- Chỉ thị phân tử liên kết gen mục tiêu.
- Thang ADN chuẩn.
- Enzyme Taq polymerase (1: 50).
- PCR buffer (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl và 1,5 mM $MgCl_2$).
- 2,5 mM dNTP (Fermentas, Hoa Kỳ).
- Agarose SFR.
- Đệm TBE 5X (1,1 M Tris; 900 mM Borate; 25 mM EDTA; pH 8,3).
- Safeview DNA stains/Ethidium Bromide.

Dụng cụ, vật tư tiêu hao

- Các dụng cụ và vật tư tiêu hao cơ bản dùng trong sinh học phân tử, bao gồm kéo cắt mẫu, gang tay; eppendorf 0,2- 1,5 - 2,0 ml; bi nghiền sứ, đầu tip (10, 200, 1000 μ l), plate PCR, bút ghi nhãn...

(3) Phương pháp phân tích:

(a) Yêu cầu chung

- Mẫu lá lúa cần thử nghiệm xác định locus gen mục tiêu là mẫu lá non được cắt từ lá mầm hạt giống lúa do đơn vị có trách nhiệm/khách hàng cung cấp.

- Mẫu giống chuẩn mang gen/locus gen mục tiêu, mẫu giống chuẩn không mang gen do IRRI cung cấp.

- Mẫu giống gốc không mang gen mục tiêu, các mẫu giống lúa tham khảo.

(b) Số lượng mẫu

- Mỗi giống lúa đưa vào thử nghiệm được phân tích trên 200 mẫu ADN đại diện cho 200 cá thể ngẫu nhiên từ mẫu giống lúa.

- Mẫu giống chuẩn mang gen/locus gen mục tiêu, mẫu giống chuẩn không mang gen và giống lúa gốc, giống tham khảo được phân tích trên 1 mẫu ADN/mẫu giống.

- Thí nghiệm có thể lặp lại nếu kết quả lần 1 chưa đạt yêu cầu.

(c) Các bước tiến hành

Tách chiết ADN tổng số

- Mẫu lá lúa (500 mg) được cắt nhỏ vào ống eppendorf 2 ml có sẵn 1 viên bi nghiền. Ống eppendorf và giá đựng được làm lạnh bằng nitor lỏng, sau đó được đưa vào máy nghiền mẫu trong 3 phút để nghiền thành dạng bột mịn.

- Thêm 1 ml dung dịch chiết và 50 μ l 10% SDS trộn đều.

- Ủ 30 phút ở 65°C, lắc nhẹ. Ly tâm với tốc độ 12.000 rpm trong 15 phút.

- Thu lấy dung dịch nổi ở bên trên cho vào ống eppendorf mới và thêm vào đó một thể tích tương ứng isopropanol, lắc nhẹ. Ủ trong đá 10 - 30 phút.

- Ly tâm với tốc độ 12.000 rpm trong 10 phút.

- Bỏ pha dịch. Làm khô kết tủa. Thêm vào 400 μ l TE để hoà tan.

- Thêm 1 μ l RNase (10 mg/ml). Ủ mẫu ở 37°C trong 2 giờ.

- Bổ sung 1 ml dung dịch đệm CTAB và đảo đều ống trong 15 giây.

- Hỗn hợp được ủ trong bể ổn nhiệt (Mettler - Đức) ở 65°C với thời gian 30 phút.

- Ống được ly tâm trên hệ thống máy 5430R (Eppendorf - Đức) với tốc độ 12.000 rpm trong 10 phút ở 4°C, sau đó phần dịch nổi được chuyển sang ống mới.

- Bổ sung 800 µl hỗn hợp chloroform: isoamyl alcohol (24: 1) vào ống và lắc đều trước khi tiếp tục ly tâm với tốc độ 12.000 rpm trong 15 phút ở 4°C.

- Phần dịch nổi được chuyển sang ống mới; Isopropanol được bổ sung vào ống theo tỉ lệ 1: 1 cùng với 5 µl NaCl 1 M. Hỗn hợp được đảo đều trong 5 - 7 phút và ly tâm với tốc độ 12.000 rpm trong 10 phút để thu tủa.

- Kết tủa được rửa trong 500 µl Ethanol 70% và ly tâm 12.000 rpm trong 10 phút để thu tủa ADN.

- ADN tinh sạch được làm khô trong máy làm khô Eppendorf™ Vacufuge™ Concentrator ở 60°C trong 30 phút và hòa tan trong đệm TE.

- Đánh giá nồng độ và chất lượng ADN sau tinh sạch bằng máy đọc quang phổ SpectraMax 190. Mẫu ADN được bảo quản ở nhiệt độ -20°C hoặc -86°C cho các thí nghiệm tiếp theo.

Khuếch đại gen bằng kỹ thuật PCR

- Thành phần phản ứng của một phản ứng PCR như sau:

Thành phần	Thể tích (µl)
dH ₂ O	4,9
Buffer (10 X)	1,5
dNTPs (2,5 mM)	1,2

Taq Polymerase (5U)	0,2
Primer (10 pmol)	1,2
ADN (30 ng/µl)	1,0
Tổng thể tích	10,0

- Mẫu ADN đã pha loãng tới nồng độ 30 ng/µl được dùng làm khuôn cho phản ứng PCR bằng các chỉ thị phân tử đặc hiệu liên kết gen mục tiêu và cho đa hình ADN giữa giống chuẩn mang gen mục tiêu và giống gốc không mang gen/giống tham khảo.

Phản ứng PCR được tiến hành trên máy chu kỳ nhiệt PCR C1000 Touch (BioRad- Singapore). Chu trình nhiệt của phản ứng PCR được cài đặt như sau:

Các bước	Nhiệt độ (°C)	Thời gian	Số chu kỳ	Tác dụng
1	94	5 phút	1	Biến tính
2	94	15 giây	35	Biến tính
	55	30 giây		Gắn mồi
	72	1 phút		Tổng hợp
3	72	7 phút	1	Tổng hợp
4	4	∞		Bảo quản

Kiểm tra sản phẩm PCR trên gel agarose

Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng kỹ thuật điện di trên gel agarose 2,5% như sau:

- Cân 7,5 gram agarose bổ sung vào 300 ml dung dịch TBE 0,5X.
- Đun và khuấy đều dung dịch để tạo thành dạng gel trong 2 phút.
- Bổ sung 10 µl Safeview DNA stains vào dung dịch gel.
- Đổ gel nóng vào khay điện di đã cắm lược và để gel đông trong 45 phút.
- Chuẩn bị 3 lít dung dịch đệm TBE 0,5X vào bể điện di.
- Dùng pipette hút 10 µl sản phẩm PCR vào mỗi giếng.
- Sản phẩm PCR được tiến hành điện di với thang ADN chuẩn (50 bp, 100 bp, 1 kb+...) ở hiệu điện thế 90 V trong 3 giờ cho đến khi băng chỉ thị Bromophenol màu xanh gần ra khỏi bản gel.
- Bản gel sau khi điện di được đưa vào máy chụp ảnh gel Analytik Jena UVP Geldoc-it2 để ghi nhận kết quả.

(d) Phân tích và diễn giải kết quả

- Tất cả các bước thực hiện và kết quả phải được ghi chép rõ ràng.
- Nồng độ ADN tổng số được xác định bằng máy đọc quang phổ SpectraMax 190.
- Mẫu ADN được coi là âm tính khi: Nồng độ ADN tổng số < 50 µg/µl, tỷ lệ OD 260/280 < 1,85 hoặc > 2,10, có nghĩa là mẫu bị lẫn tạp chất, phải tiến hành tách chiết lại.
- Mẫu ADN được coi là dương tính khi: Nồng độ ADN tổng số > 50 µg/µl, OD260/280 trong khoảng 1,85 - 2,10. Kết luận mẫu đạt yêu cầu.
- Kết quả chụp ảnh gel được kết xuất ra máy tính để phân tích kết quả thử nghiệm.
- Mẫu thử nghiệm được coi là dương tính, có phát hiện gen mục tiêu khi giếng chứa mẫu xuất hiện băng điện di có kích thước giống như của giống chuẩn mang gen.

- Mẫu thử nghiệm được coi là không phát hiện gen mục tiêu khi giếng chứa mẫu xuất hiện băng điện di có kích thước khác với giống chuẩn mang gen.

- Giống lúa được xác nhận là mang gen mục tiêu khi 100% cá thể phân tích đều mang gen mục tiêu ở trạng thái đồng hợp tử.

(e) Biểu diễn kết quả

- Sau khi máy phân tích xong, kết quả được kết xuất ra máy tính để xử lý, sau đó trả kết quả dưới dạng văn bản cho khách hàng.

- In và ký phiếu kết quả thử nghiệm trả khách hàng.

- Lưu trữ các biểu mẫu theo đúng quy định của phòng.

4. KẾT LUẬN

Quy trình phân tích, xác định sự có mặt của gen mục tiêu trong giống lúa bằng kỹ thuật sinh học phân tử đã được xây dựng và hoàn thiện. Quy trình này có thể áp dụng trong việc hỗ trợ khảo nghiệm tính khác biệt trên cây lúa đối với các tính trạng kháng với bệnh đạo ôn, kháng bệnh bạc lá, chống chịu rầy nâu và các tính trạng đặc trưng khác (chịu ngập, chịu mặn, mùi thơm...) phục vụ khảo nghiệm DUS và công nhận giống cây trồng mới.

LỜI CẢM ƠN

Công trình nghiên cứu là kết quả nghiên cứu của Bộ môn Sinh học phân tử, Viện Di truyền Nông nghiệp, với sự hỗ trợ về khoa học và nguồn vật liệu từ Viện Nghiên cứu Lúa Quốc tế (IRRI), Trung tâm Nghiên cứu Khoa học Nông nghiệp Quốc tế Nhật Bản (JIRCAS).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Quốc hội (2018). *Luật Trồng trọt, luật số 31/2018/QH14.*
2. TCVN 13381-1: 2021 Tiêu chuẩn Quốc gia. Giống cây trồng Nông nghiệp - Khảo nghiệm giá trị canh tác và giá trị sử dụng; TCVN 13382-1: 2021 Tiêu chuẩn Quốc gia. Giống cây trồng Nông nghiệp - Khảo nghiệm tính khác biệt, tính đồng nhất và tính ổn định. Phần 1: Giống lúa.

2. Chu Đức Hà, Nguyễn Thị Minh Nguyệt, Nguyễn Thị Nhài, Nguyễn Bá Ngọc, Khuất Thị Mai Lương, Phạm Thị Lý Thu, Lê Hùng Linh (2018). Thiết lập phương pháp lấy mẫu thử nghiệm theo tiêu chuẩn ISO/IEC 17025: 2017 phục vụ xác định locus gen mục tiêu. *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*, 11: 46-50.
4. Nguyễn Thị Minh Nguyệt, Chu Đức Hà, Nguyễn Thị Nhài, Nguyễn Bá Ngọc, Khuất Thị Mai Lương, Phạm Thị Lý Thu, Lê Hùng Linh (2019). Xây dựng phương pháp xác định locus gen phục vụ cho công tác thử nghiệm và giám định gen ở cây lúa theo tiêu chuẩn ISO/IEC 17025: 2017. *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*, 3 (100): 98-103.
5. Fjellstrom R., C. A. Bormans, A. M. McClung, M. A. Marchetti, A. R. Shank, and W. D. Park (2004). Development of DNA markers suitable for marker assisted selection of three *Pyricularia grisea* pathotypes. *Crop Sci.*, 44: 1790-1798.
6. Wen S., B. Gao (2011). Introgressing Blast Resistant Gene *Pi-9(t)* into Elite Rice Restorer Luhui 17 by Marker-Assisted Selection. *Rice Genomics and Genetics*, 2 (4): 31-36.
7. Koide Y., Kobayashi N., Xu D. and Fukuta Y. (2009). Review Resistance Genes and Selection DNA Markers for Blast Disease in Rice (*Oryza sativa* L.). *JARQ* 43 (4): 255-280.
8. Blair M. W., Garriss A J, Iyer A S, Chapman B, Kresovich S, McCouch S R. (2003). High resolution genetic mapping and candidate gene identification at the *xa5* locus for bacterial blight resistance in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor Appl Genet*, 107: 62-73.
9. Hajira S. K, R. M. Sundaram, G. S. Laha, *et al.* (2016). A Single-Tube, Functional Marker-Based Multiplex PCR Assay for Simultaneous Detection of Major Bacterial Blight Resistance Genes *Xa21*, *xa13* and *xa5* in Rice (2016). *Rice Science*, 23(3): 144 -151.
10. Porter B. W., Chittoor, J. M., Yano, M., Sasaki, T., & White, F. F. (2003). Development and mapping linked to the rice bacterial blight resistance gene *Xa7*. *Crop Science*, 43, 1484-1492.
11. Huang N, Angeles ER, Domingo J, Magpantay G, Singh S, Zhang G, Kumaravadivel N, Bennett J, Khush GS (1997). Pyramiding of bacterial blight resistance genes in rice: marker assisted selection using RFLP and PCR. *Theor Appl Genet*, 95: 313-320.
12. Rahman M. L, W. Jiang, S. H. Chu, Y. Qiao, T. H. Ham, M. O. Woo, J. Lee, M. S. Khanam, J. H. Chin, J. U. Jeung, D. S. Brar, K. K. Jena, H. J. Koh (2009). High-resolution mapping of two rice brown planthopper resistance genes, *Bph20(t)* and *Bph21(t)*, originating from *Oryza minuta*. *Theor Appl Genet*, 119: 1237-1246.
13. Cuong D. N., S. H. Zheng, S. S. Morimura, M. Matsumura, H. Yasui, and D. Fujita (2021). Substitution mapping and characterization of brown planthopper resistance genes from indica rice variety, 'PTB33' (*Oryza sativa* L.). *Breed Sci.*, 71(5): 497-509.
14. Singh S., J. S. Sidhu, N. Huang, Y. Vikal, Z. Li, D. S. Brar, H. S. Dhaliwal, G. S. Khush (2001). Pyramiding three bacteria blight resistance genes (*xa5*, *xa13* and *Xa21*) using marker-assisted selection into indica rice cultivar PR106. *Theor Appl Genet*, 102: 1011-1015.
15. Xu, K., Xu, X., Ronald, P. C., Mackill, D. J. (2000). A high-resolution linkage map of the vicinity of the rice submergence tolerance locus Sub1. *Molecular & general genetics: MGG*, 263(4): 681-689.
16. Bradbury L. M. T., R. J. Henry, Q. Jin, R. F. Reinke and D. L. E. Waters (2005). A perfect Marker for Fragrance Genotyping in Rice. *Molecular Breeding* (2005) 16: 279-283.
17. Semagn K. (2014). Leaf Tissue Sampling and DNA Extraction Protocols. In: Besse P (ed) *Molecular Plant Taxonomy: Methods and Protocols*. Humana Press, Totowa, NJ, pp 53-67. doi:10.1007/978-1-62703-767-9_3

**ESTABLISHMENT OF THE PROCESS FOR GENE DETERMINATION IN RICE BY USING
MOLECULAR BIOLOGY TECHNIQUES TO SUPPORT FOR IDENTIFICATION AND DISTINCTION
NEW RICE VARIETIES IN DUS TESTING**

Nguyen Thi Minh Nguyet^{1,*}, Nguyen Thi Nhai¹, Nguyen Ba Ngoc¹, Khuat Thi Mai Luong¹,
Chu Duc Ha², Pham Xuan Hoi¹, Nguyen Thi Thanh Thuy³, Le Hung Linh¹

¹*Agricultural Genetics Institute, Vietnam Academy of Agricultural Sciences*

²*University of Engineering and Technology, Vietnam National University Hanoi*

³*Ministry of Agriculture and Rural Development*

**Email: nguyetha176@gmail.com*

Summary

This study was carried out with the purpose of construction a process to analyze and determine the presence of target genes/ loci by molecular biology techniques to support for the identification and distinction of new rice varieties in the DUS testing, meeting the national standard TCVN 13382-1: 2021. The results indicated that the resistance genes to blast disease (*Pik-m*, *Pi1*, *Pik-h*, *Pik-p*, *Pi7(t)*, *Pi9(t)*, *Piz*, *Piz-5*, *Piz-t*, *Pita-2*, and *Pita*), bacterial leaf blight resistance genes (*xa5*, *Xa7*, *Xa21*), brown planthopper tolerance genes (*Bph20*, *Bph21*, *Bph2*, *Bph17-ptb*, *Bph32*), *Saltol*, *Sub1*, *fgr*... can be determined by analysis with closed linked molecular markers which showed DNA polymorphisms among standard varieties carrying resistance genes and the original varieties without genes. "The process determination of target genes in rice by molecular biology techniques" has been completed and can be applied in supporting the testing of distinctness in rice for the traits of resistance to blast, bacterial leaf blight, brown planthopper and other characteristic traits (tolerant to submergence, salinity, fragrance, etc.).

Keywords: *DUS testing, gene determination, molecular marker, rice.*

Người phản biện: TS. Hà Quang Dũng

Ngày nhận bài: 5/9/2022

Ngày thông qua phản biện: 26/9/2022

Ngày duyệt đăng: 30/9/2022

NGHIÊN CỨU VÀ HOÀN THIỆN QUY TRÌNH SẢN XUẤT HẠT GIỐNG SIÊU NGUYÊN CHỦNG CHO GIỐNG LÚA KHÁNG BỆNH BẠC LÁ DT82

Võ Thị Minh Tuyền^{1,*}, Nguyễn Thị Hào¹, Nguyễn Thị Huệ¹,
Đoàn Văn Sơn¹, Hoàng Minh Trang¹, Lê Văn Trường²

TÓM TẮT

Hiện nay, trong quá trình sản xuất hạt giống, việc sàng lọc và kiểm tra sự có mặt của các gen kháng trong các giống lúa kháng bệnh chưa được chú trọng, dẫn đến việc các lô giống đưa vào sản xuất bị mất gen kháng và làm giảm tính kháng bệnh của giống. Giống lúa chất lượng DT82 mang 3 gen kháng bạc lá, có tiềm năng năng suất cao nhưng chưa có nghiên cứu cụ thể về quy trình sản xuất hạt giống siêu nguyên chủng. Việc chọn thuần hạt giống gốc để đưa vào hệ thống sản xuất hạt giống các cấp là rất cần thiết. Trong nghiên cứu này, 1.000 cây khỏe mạnh trên ruộng G0 đại diện cho giống lúa DT82 được đánh dấu (kí hiệu từ 1-1.000), lấy mẫu lá, tách chiết ADN và phân tích PCR với các chỉ thị MP1-2, P3, pTA248 liên kết với các gen kháng bệnh bạc lá *Xa4*, *Xa7*, *Xa21* để sàng lọc các cá thể mang gen kháng. Kết quả phân tích cho thấy, có 3,2% cá thể G0 không mang gen kháng bạc lá; 14,9% cá thể chỉ mang 1 gen kháng (ở trạng thái đồng hợp tử và dị hợp tử); 30,7% cá thể mang 2 gen kháng và 51,2% cá thể mang cả 3 gen kháng. Kết quả phân tích kiểu gen trong quần thể G1 cho thấy, 3,6% các dòng mang 2 gen kháng, 96,4% số dòng mang 3 gen kháng. Các dòng G1 đều có phản ứng kháng đến kháng cao với vi khuẩn gây bệnh bạc lá. Kết quả đánh giá mùi thơm trên gạo của các dòng G1 cho thấy có 12/31 dòng có mùi thơm đạt điểm ≥ 3 . Kết quả phân tích kiểu gen trên quần thể G2 (dòng siêu nguyên chủng) cho thấy, 100% các dòng đều mang cả 3 gen kháng bệnh bạc lá (*Xa21*, *Xa7*, *Xa4*) và đều có phản ứng kháng cao với vi khuẩn gây bệnh. Kết quả đánh giá mùi thơm trên gạo ở các dòng G2 cho thấy, 100% các dòng có mùi thơm đạt yêu cầu (điểm ≥ 3). Quy trình sản xuất hạt giống siêu nguyên chủng giống lúa kháng bệnh bạc lá DT82 đã được xây dựng và hoàn thiện dựa trên cơ sở quy trình kỹ thuật cơ bản về sản xuất giống lúa.

Từ khóa: Bệnh bạc lá, gen kháng, giống lúa, giống siêu nguyên chủng, sản xuất hạt giống.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Biến đổi khí hậu diễn biến ngày một phức tạp, nguy cơ xuất hiện dịch bệnh trong sản xuất lúa là rất lớn. Thời gian gần đây bệnh bạc lá xuất hiện ở nước ta ngày càng trầm trọng, không chỉ xuất hiện ở vụ mùa mà còn ở vụ xuân, đặc biệt các giống lúa chất lượng cao như Bắc thơm 7, Hương thơm 1...

Giống lúa DT82 là giống lúa chất lượng có mùi thơm nhẹ, được chọn tạo từ giống Bắc thơm 7, bằng phương pháp lai backcross kết hợp chỉ thị phân tử. Giống lúa DT82 là kết quả ứng dụng của đề tài: “Nghiên cứu chọn tạo giống lúa kháng bệnh bạc lá bằng chỉ thị phân tử” thuộc chương trình

trọng điểm phát triển và ứng dụng công nghệ sinh học trong lĩnh vực nông nghiệp và phát triển nông thôn, giai đoạn 2015 - 2020.

Hiện nay, trong quá trình sản xuất hạt giống, việc sàng lọc và kiểm tra sự có mặt của các gen kháng trong các giống lúa kháng bệnh chưa được chú trọng, dẫn đến việc các lô giống đưa vào sản xuất bị mất gen kháng và làm giảm tính kháng bệnh của giống.

Giống lúa chất lượng DT82 mang 3 gen kháng bệnh bạc lá, có tiềm năng năng suất cao nhưng chưa có nghiên cứu cụ thể về quy trình sản xuất hạt giống. Chính vì vậy, “Nghiên cứu và hoàn thiện quy trình sản xuất hạt giống siêu nguyên chủng cho giống lúa kháng bệnh bạc lá DT82” là rất cần thiết, đáp ứng nhu cầu sản xuất lúa hiện nay, nhằm

¹ Viện Di truyền Nông nghiệp

² Viện Khoa học Kỹ thuật Nông nghiệp Bắc Trung bộ

*Email: minhhtuyenagi@gmail.com

tạo được hạt giống có độ thuần cao, ổn định về gen, năng suất, chất lượng để đưa vào hệ thống sản xuất hạt giống các cấp và mở rộng diện tích gieo cấy giống lúa DT82 tại các tỉnh phía Bắc.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

- Giống lúa DT82: được chọn tạo từ tổ hợp lai giữa giống lúa Bắc thơm 7 và dòng đã được quy tụ 3 gen kháng bệnh bạc lá (*Xa4*, *Xa7* và *Xa21*) của Viện Nghiên cứu lúa Quốc tế IRRI, IRBB62.

- Sử dụng chủng vi khuẩn gây bệnh bạc lá của Bộ môn Bệnh học phân tử, Viện Di truyền Nông nghiệp: NĐ4.1 (chủng có độc tính mạnh nhất). Địa điểm thu mẫu tại Nam Định, giống lấy mẫu bệnh: Bắc thơm 7

- Các chỉ thị phân tử (CTPT): MP1-2, P3 và pTA 248, liên kết với các gen kháng bệnh bạc lá tương ứng: *Xa4*, *Xa7* và *Xa21* được sử dụng trong chọn lọc các cá thể mang gen kháng mục tiêu

2.2. Phương pháp nghiên cứu

- Phương pháp lấy mẫu trên ruộng: đánh giá và chọn cá thể có các đặc điểm nông sinh học đặc trưng của giống lúa DT82 tại ruộng G0; lấy mẫu lá

ngẫu nhiên của 1.000 cá thể sạch bệnh, giai đoạn đẻ nhánh để kiểm tra gen. Trong ruộng dòng G1 và G2, mỗi dòng lấy mẫu theo đường chéo 5 điểm, mỗi điểm 1 khóm cố định.

- Phương pháp sử dụng chỉ thị phân tử xác định gen kháng: tách chiết ADN theo Wang (1993) [1].

- Phương pháp lây nhiễm nhân tạo (LNNT) và đánh giá: sử dụng phương pháp lây nhiễm nhân tạo bệnh bạc lá, phương pháp cắt kéo. Giai đoạn lây nhiễm: lúa làm đồng - trổ. Sau 18-20 ngày lây nhiễm tiến hành đo đếm chiều dài vết bệnh [2].

- Phương pháp đánh giá cảm quan mùi thơm theo phương pháp của IRRI (2013) [2].

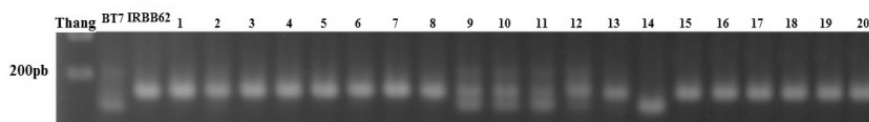
- Phương pháp đánh giá sâu, bệnh hại theo tiêu chí đánh giá của TCVN (2021) [3].

2.3. Địa điểm và thời gian nghiên cứu

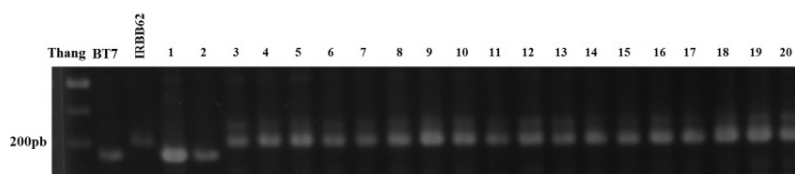
Tại Đông Anh, Hà Nội; vụ xuân, vụ mùa năm 2021 và vụ xuân năm 2022.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

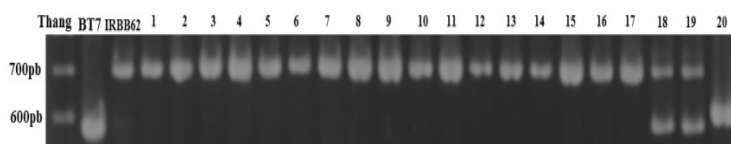
3.1. Sàng lọc các cá thể G0 mang gen kháng bệnh bạc lá bằng chỉ thị phân tử



Hình ảnh PCR với mỗi MP1-2 liên kết với gen *Xa4*



Hình ảnh PCR với mỗi P3 liên kết với gen *Xa7*



Hình ảnh PCR với mỗi pTA248 liên kết với gen *Xa21*

Hình 1. Sản phẩm PCR của các cá thể G0 với các cặp mồi liên kết gen kháng bệnh bạc lá

Ghi chú: từ trái qua phải: thang ADN chuẩn; BT7; IRBB62; các dòng G0, kí hiệu từ 1 - 20

Chọn 1.000 cây khỏe mạnh trên ruộng G0, đại diện cho quần thể, có đặc điểm NSH đặc trưng của giống DT82 để kiểm tra. Đánh dấu từng cây (kí hiệu từ 1-1.000) để theo dõi sinh trưởng, phát triển; lấy mẫu lá, tách chiết ADN; phân tích PCR với các chỉ thị MP1-2, P3, pTA248 để sàng lọc các cá thể mang gen kháng bệnh bạc lá: *Xa4*, *Xa7*, *Xa21*.

Kết quả kiểm tra gen kháng bệnh bạc lá của 1.000 cá thể G0 được thể hiện qua bảng 1.

Bảng 1. Kết quả kiểm tra gen kháng bệnh bạc lá trong quần thể G0 của giống DT82 - vụ xuân năm 2021

STT	Gen kháng	Số lượng cá thể	Tỷ lệ (%)
1	Không mang gen	32	3,2
2	<i>Xa4</i>	55	5,5
3	<i>Xa7</i>	54	5,4
4	<i>Xa21</i>	40	4,0
5	<i>Xa4, Xa7</i>	108	10,8
6	<i>Xa4, Xa21</i>	94	9,4
7	<i>Xa7, Xa21</i>	105	10,5
8	<i>Xa4, Xa7, Xa21</i>	512	51,2
	Tổng	1.000	100

Bảng 1 cho thấy, có 3,2% cá thể đã bị mất cả 3 gen kháng; 14,9% (5,5 + 5,4 + 4,0) cá thể chỉ còn 1 gen kháng (tính cả các gen ở trạng thái dị hợp tử); 30,7% cá thể bị mất 1 gen kháng và 51,2% cá thể vẫn còn cả 3 gen kháng.

Như vậy, trong thực tế sản xuất, đã xảy ra hiện tượng mất gen. Các giống mang càng nhiều gen kháng thì hiện tượng trên xảy ra càng nhiều.

512 cá thể mang đủ 3 gen kháng bệnh bạc lá tiếp tục được đánh giá đến khi thu hoạch, chọn ra được 309 cá thể G0 có kiểu hình đặc trưng, cây sinh trưởng tốt, cây ít bị sâu, bệnh hại hoặc chống chịu tốt với điều kiện môi trường.

Cắt bông của 309 cá thể đạt yêu cầu ở vị trí dưới cổ bông khoảng 10 cm, cho vào túi vải hoặc

túi giấy riêng biệt, ghi mã số từ 1-309, phơi cả túi đến khô và bảo quản trong điều kiện an toàn để gieo trồng ở vụ tiếp theo.

3.2. Đánh giá các dòng G1 và G2 bằng chỉ thị phân tử và lây nhiễm nhân tạo với vi khuẩn gây bệnh bạc lá

Ở vụ mùa 2021, tại Đông Anh, Hà Nội, 309 cá thể G0 được gieo cấy thành dòng riêng biệt để tạo các dòng G1. Sau khi quan sát các tính trạng đặc trưng của từng dòng và loại bỏ dần những dòng vẫn còn bị phân ly, cây sinh trưởng kém, cây bị sâu, bệnh hại hoặc chống chịu yếu đã loại bỏ 4 dòng, 305 dòng còn lại được tiếp tục lấy lá để tách chiết ADN để sử dụng phân tích PCR với các chỉ thị MP1-2, P3, pTA248, xác định các dòng mang gen kháng bệnh bạc lá *Xa4*, *Xa7*, *Xa21*. Kết quả được trình bày ở bảng 2.

Kết quả kiểm tra gen kháng cho thấy, trong tổng số 305 dòng G1 của giống DT82 có 4 dòng mang 2 gen *Xa4*, *Xa7*; 3 dòng mang hai gen *Xa4*, *Xa21*; 4 dòng mang hai gen *Xa7*, *Xa21* và 294 dòng mang đủ 3 gen *Xa4*, *Xa7*, *Xa21*. Như vậy ở thế hệ G1 vẫn tiếp tục xuất hiện hiện tượng mất gen, tuy nhiên tỷ lệ mất gen đã giảm nhiều. Tỷ lệ các dòng mất 1 gen là 3,6% và các dòng còn đủ cả 3 gen kháng là rất cao, 96,4%. Không có dòng mất 2 hoặc cả 3 gen kháng.

Bảng 2. Kết quả kiểm tra gen các dòng G1 của giống lúa DT82

STT	Mang gen	Số lượng dòng	Tỷ lệ (%)
1	<i>Xa4, Xa7</i>	4	1,3
2	<i>Xa4, Xa21</i>	3	1,0
3	<i>Xa7, Xa21</i>	4	1,3
4	<i>Xa4, Xa7, Xa21</i>	294	96,4
	Tổng	305	100

Các dòng G1 được tiếp tục lây nhiễm nhân tạo với vi khuẩn gây bệnh bạc lá ở giai đoạn vừa kết thúc đẻ nhánh. Dòng IRBB62 là dòng chuẩn kháng, dòng IR24 là dòng chuẩn nhiễm. Dòng BT7 là dòng đối chứng. Kết quả đo đếm, đánh giá sau 20 ngày lây nhiễm được trình bày ở bảng 3.

Bảng 3. Phản ứng của các dòng G1 với vi khuẩn gây bệnh bạc lá

STT	Tên	Gen	Số lượng cá thể	Chiều dài vết bệnh (cm)	Mức độ
1	IR24		-	20,8	Nhiễm nặng
2	BT7		-	18,4	Nhiễm
3	IRBB62	<i>Xa4, Xa7, Xa21</i>	-	1,5	Kháng cao
4	DT82	<i>Xa4, Xa7</i>	4	5,2 – 6,7	Kháng
5		<i>Xa4, Xa21</i>	3	7,2 – 9,5	Kháng trung bình
6		<i>Xa7, Xa21</i>	4	5,3 – 6,9	Kháng
7		<i>Xa4, Xa7, Xa21</i>	294	0,5 - 4,0	Kháng cao

Số liệu đánh giá cho thấy, dòng đối chứng nhiễm IR24 biểu hiện nhiễm bệnh bạc lá rất điển hình (nhiễm nặng), vết bệnh dài trên 20 cm. Chiều dài vết bệnh của giống BT7 ngắn hơn so với giống nhiễm chuẩn nhưng vẫn được đánh giá là nhiễm. Dòng IRBB62 thể hiện khả năng kháng cao với vi khuẩn gây bệnh (vết bệnh dài 1,5 cm).



Dòng mang 2 gen



Dòng không mang gen

Dòng mang 3 gen

Hình 2. Phản ứng của các dòng G1 (giống DT82) với vi khuẩn gây bệnh bạc lá (trong nhà lưới)

Trong tổng số 305 dòng G1 của giống lúa DT82 có 11 dòng mang hai gen kháng bệnh bạc lá có vết bệnh lây nhiễm từ 5,2 - 6,7 cm, được đánh giá có phản ứng kháng và kháng trung bình với vi khuẩn gây bệnh bạc lá. 294 dòng mang ba gen kháng bệnh bạc lá *Xa21, Xa7, Xa4* có vết bệnh dài từ 0,5 - 4,0 cm, được đánh giá có phản ứng kháng cao với vi khuẩn gây bệnh bạc lá.

Bảng 4. Bảng đánh giá khả năng chống chịu sâu, bệnh hại chính của các dòng G1 trên đồng ruộng

STT	Tên	Số lượng dòng G1		
		Điểm 1	Điểm 3	Điểm ≥ 5
1	Bệnh bạc lá	294	0	0
2	Bệnh đạo ôn	91	128	73
3	Rầy nâu	245	49	0
4	Sâu cuốn lá	113	149	32
5	Sâu đục thân	191	36	67

Các dòng G1 có đủ 3 gen kháng bệnh bạc lá tiếp tục được đánh giá khả năng chống chịu sâu, bệnh hại chính như: bệnh bạc lá, bệnh đạo ôn, rầy nâu, sâu cuốn lá, sâu đục thân trong điều kiện vụ mùa. Kết quả được tổng hợp trong bảng 4.

Qua bảng 4 (trong điều kiện có phun thuốc BVTV) cho thấy, tất cả các dòng đều chống chịu tốt với bệnh bạc lá và rầy nâu (điểm 1-3). 219 dòng

đạt điểm 1-3 với bệnh đạo ôn, 262 dòng đạt điểm 1-3 với sâu cuốn lá, 227 dòng đạt điểm 1-3 với sâu đục thân. Trong đó có 169 dòng chống chịu tốt, điểm 1-3, với tất cả 5 sâu, bệnh hại chính trên đồng ruộng.

Các dòng này tiếp tục được đánh giá đặc điểm nông, sinh học chính và năng suất dựa trên các đặc điểm nông, sinh học của giống lúa DT82 như sau: thời gian sinh trưởng trong vụ mùa khoảng 105 ngày; chiều cao cây khoảng 105 cm; số nhánh hữu hiệu 5-7 nhánh trên 1 khóm; chiều dài cổ bông trung bình từ 2,5 - 4 cm; chiều dài bông trung bình đạt từ 26 - 28 cm. Số hạt chắc trên bông trung bình từ 150 - 180 hạt. Tỷ lệ hạt lép thấp, trung bình từ 10 - 15%; khối lượng 1.000 hạt ổn định ở tất cả các dòng từ 23 - 23,5 g; năng suất trong vụ mùa của các dòng trung bình từ 55 - 60 tạ/ha.

Kết quả đánh giá đã chọn được 31 dòng G1 có các đặc điểm nông, sinh học chính và năng suất đạt yêu cầu. Tiến hành thu hoạch riêng các dòng để đánh giá mùi thơm, sử dụng dung dịch KOH 1,7%.



Hình 3. Mẫu gạo đã nghiền mịn vào ống và kiểm tra mùi thơm sau khi cho KOH

Bảng 5. Kết quả đánh giá mùi thơm trên gạo các dòng G1 của giống lúa DT82

Số TT	Ký hiệu dòng G1	Điểm đánh giá			Số TT	Ký hiệu dòng G1	Điểm đánh giá		
		1	2	≥ 3			1	2	≥ 3
1	D3		+		17	D80		+	
2	D9		+		18	D85			+
3	D11			+	19	D86		+	

4	D13		+		20	D92			+
5	D14			+	21	D93		+	
6	D18		+		22	D97			+
7	D25	+			23	D102	+		
8	D33			+	24	D110			+
9	D35		+		25	D115		+	
10	D36			+	26	D128			+
11	D40		+		27	D131		+	
12	D45			+	28	D146			+
13	D59	+			29	D149		+	
14	D65		+		30	D154		+	
15	D69			+	31	D157		+	
16	D71	+			Tổng số dòng		4	15	12

Kết quả đánh giá mùi thơm của các dòng G1 cho thấy, có 4/31 dòng không có mùi đặc trưng, 15 dòng có mùi thơm, hương thơm kém đặc trưng, có 12 dòng có mùi thơm hoặc thơm nhẹ đặc trưng, đó là các dòng có ký hiệu D11, D14, D33, D36, D45, D69, D85, D92, D97, D110, D128, D146.

12 dòng G1 của giống DT82 đạt yêu cầu về gen kháng, khả năng chống chịu, các đặc điểm nông, sinh học, năng suất và mùi thơm được ghi mã số từ 1-12 và bảo quản trong điều kiện an toàn để gieo trồng ở vụ tiếp theo thu giống siêu nguyên chủng.

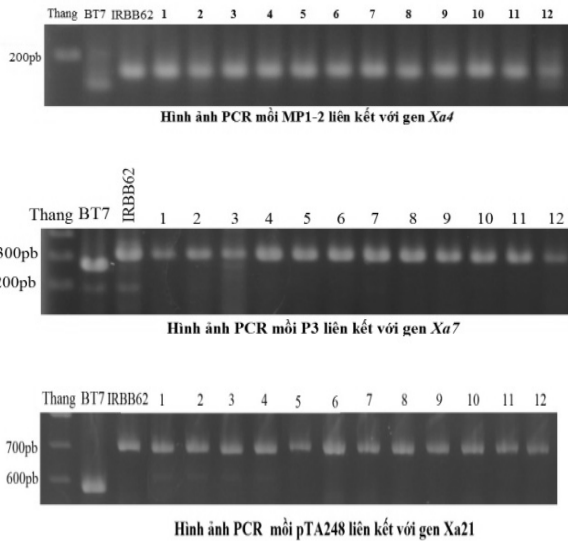
Vụ xuân năm 2022, các dòng G1 được gieo trồng để sản xuất dòng siêu nguyên chủng (G2). Ruộng thí nghiệm bằng phẳng, đầy đủ ánh sáng, chủ động tưới tiêu, sạch cỏ dại, sạch sâu, bệnh và không có lúa vụ trước mọc lại. Ruộng sản xuất hạt giống đảm bảo cách ly với các ruộng trồng lúa khác theo quy định. Áp dụng biện pháp kỹ thuật về mật độ, khoảng cách, phân bón, phòng trừ sâu, bệnh thích hợp để đạt năng suất, chất lượng và

hiệu quả cao nhất.

Để đảm bảo chất lượng lô hạt giống siêu nguyên chủng (G2), đã tiến hành lấy mẫu và kiểm tra gen kháng bằng chỉ thị phân tử (CTPT) và lây nhiễm bệnh nhân tạo với vi khuẩn gây bệnh bạc lá. Kết quả kiểm tra gen kháng cho thấy, 100% các dòng G2 đều có đủ 3 gen kháng bệnh bạc lá (*Xa21*, *Xa7*, *Xa4*). Tất cả các dòng G2 đều có phản ứng kháng cao với vi khuẩn gây bệnh bạc lá. Đánh giá mùi thơm trên gạo và đánh giá cơm khi nấu chín cho kết quả 100% các dòng có mùi thơm đạt yêu cầu (điểm đánh giá ≥ 3).

Hoàn thiện quy trình sản xuất hạt giống lúa siêu nguyên chủng cho giống lúa kháng bệnh bạc lá DT82

Từ các nghiên cứu trên cho thấy: có 3,2% cá thể (thể hệ G0) đã bị mất cả 3 gen kháng; 14,9% cá thể chỉ còn 1 gen kháng (tính cả các gen ở trạng thái dị hợp tử); 30,7% cá thể còn 2 gen kháng và 51,2% cá thể vẫn còn đủ 3 gen kháng.



Hình 4. Sản phẩm PCR của các cá thể G0 với các cặp mỗi LK gen kháng

Thế hệ G1 vẫn tiếp tục xuất hiện hiện tượng mất gen, tuy nhiên tỷ lệ mất 1 gen là 3,6% và tỷ lệ các dòng còn đủ 3 gen kháng cao, 96,4%. Không có dòng mất 2 hoặc cả 3 gen kháng. Các dòng G1 đều có phản ứng kháng đến kháng cao với vi khuẩn gây bệnh bạc lá. Đánh giá mùi thơm trên gạo của các dòng G1 cho thấy có 12/31 dòng có mùi thơm đạt điểm đánh giá ≥ 3 .

Kết quả kiểm tra gen kháng ở thế hệ G2 (dòng siêu nguyên chủng) cho thấy, 100% các dòng đều có đủ 3 gen kháng bệnh bạc lá (*Xa21*, *Xa7*, *Xa4*) và đều có phản ứng kháng cao với vi khuẩn gây bệnh. Đánh giá mùi thơm trên gạo ở các dòng G2 cho thấy, 100% các dòng có mùi thơm đạt yêu cầu (điểm đánh giá ≥ 3).

Như vậy, khi sản xuất hạt giống cho giống lúa DT82 cần sàng lọc bằng chỉ thị phân tử và đánh giá mùi thơm trên cơm gạo ở thế hệ G0 và G1 để đảm bảo giống ổn định về gen, tính kháng bệnh và chất lượng của giống khi đưa ra sản xuất.

Trên cơ sở quy trình kỹ thuật cơ bản về sản xuất giống lúa (TCVN 12181: 2018), quy trình sản xuất hạt giống cây trồng tự thụ phấn [4], đã đưa ra sơ đồ sản xuất hạt giống siêu nguyên chủng và các bước thực hiện trong quy trình sản xuất hạt giống siêu nguyên chủng cho giống lúa DT82 như sau:



Hình 5. Phản ứng của các dòng G2 với vi khuẩn gây bệnh bạc lá, trên đồng ruộng

Bước thứ nhất (vụ 1): Gieo trồng và chọn lọc cá thể (G0) ở ruộng vật liệu khởi đầu: dựa trên cơ sở bản mô tả giống của cơ quan khảo nghiệm DUS và tác giả giống. Khi chọn và đánh dấu tối thiểu 500 cây đại diện, sinh trưởng tốt, không nhiễm sâu, bệnh. Với các giống lúa mang gen kháng bệnh bạc lá cần lấy tối thiểu 700 mẫu lá của 700 cây đại diện trên đồng ruộng để tách chiết ADN và kiểm tra gen kháng bệnh bằng chỉ thị phân tử liên kết gen kháng bệnh. Tiếp tục đánh giá và chọn các cá thể ở trong phòng và tiến hành đo đếm các tính trạng của mỗi cá thể được phơi, sấy riêng cho đến khô (độ ẩm của hạt đạt 12%).

Bước thứ hai (vụ 2): Hạt của cá thể G0 được gieo ghi theo mã số để phục vụ việc đánh giá và chọn các dòng G1 ở ruộng so sánh: kiểm tra gen kháng bệnh bạc lá và lây nhiễm nhân tạo với vi khuẩn gây bệnh bạc lá trên từng dòng G1. Loại bỏ các dòng không đạt yêu cầu về gen và tính kháng bệnh. Thường xuyên theo dõi từ gieo đến thu hoạch với các dòng G1, không khử bỏ cây khác dạng, trừ trường hợp xác định chính xác khác dạng do lẫn cơ giới thì phải khử bỏ sớm. Loại bỏ dòng có cây khác dạng, dòng sinh trưởng, phát triển kém do nhiễm các loại sâu, bệnh hại hoặc bị ảnh hưởng của điều kiện ngoại cảnh bất thuận. Những dòng còn lại trước khi thu hoạch lấy ngẫu

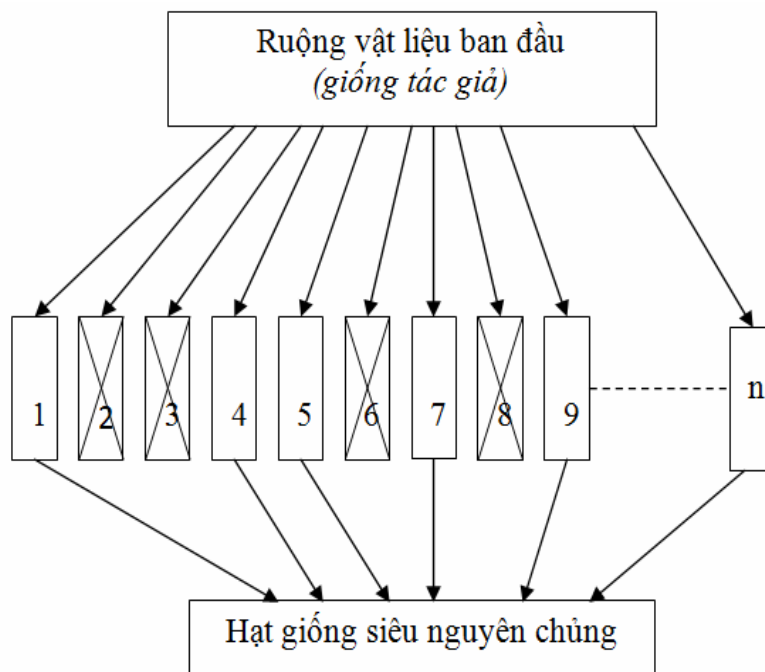
nhiên 10-20 khóm ở giữa băng để riêng và ghi mã số dòng, quan sát và đo các chỉ tiêu. Tính số liệu trung bình và loại bỏ những dòng không đạt yêu cầu. Giống lúa DT82 là giống lúa thơm, chất lượng

nên tiến hành kiểm tra tính trạng mùi thơm của các dòng G1 bằng cảm quan trên gạo và đánh giá người nếm độc lập.

Vụ thứ 1 (G0): Đánh giá đặc điểm NSH và sàng lọc CT mang gen bằng CTPT

Vụ thứ 2 (G1): Đánh giá đặc điểm NSH, KT dòng mang gen bằng CTPT; LNNT với VK gây bệnh; đánh giá mùi thơm

Vụ thứ 3 (G2): Dòng siêu nguyên chủng



Hình 6. Sơ đồ chọn giống lúa siêu nguyên chủng

Bước thứ 3: Sản xuất hạt giống siêu nguyên chủng. Căn cứ số lượng dòng đạt tiêu chuẩn và nhu cầu lượng hạt giống siêu nguyên chủng có thể tiến hành như sau:

- Nếu số lượng dòng G1 đạt yêu cầu từ 70% trở lên thì có thể hỗn các dòng G1 được chọn; lấy mẫu, kiểm nghiệm chất lượng theo tiêu chuẩn giống siêu nguyên chủng. Nếu đạt tiêu chuẩn thì được bảo quản để nhân giống nguyên chủng ở vụ sau. Trường hợp không đủ để nhân giống nguyên chủng thì tiếp tục gieo trồng, đánh giá và nhân các dòng G1 được chọn ở vụ thứ 3 (G2).

- Nếu số lượng dòng G1 đạt yêu cầu nhỏ hơn 70% thì tiếp tục gieo trồng, đánh giá và nhân các dòng được chọn ở vụ thứ 3 (G2).

4. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

4.1. Kết luận

Đã hoàn thiện quy trình sản xuất hạt giống siêu nguyên chủng cho giống lúa kháng bệnh bạc lá DT82

4.2. Đề nghị

Trong quá trình sản xuất hạt giống lúa mang gen kháng bệnh (đặc biệt với giống lúa mang nhiều gen kháng bệnh) cần chú ý công tác đánh giá, kiểm tra gen kháng trong quy trình sản xuất hạt giống siêu nguyên chủng để đảm bảo được hạt giống có độ thuần cao, ổn định về gen, năng suất, chất lượng để đưa vào hệ thống sản xuất hạt giống các cấp, đáp ứng yêu cầu của sản xuất lúa hiện nay.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Wang HM Qi and Cutler AJ (1993). A simple method of preparing plant samples for PCR. Nucleic Acids Res., 21(17): 4153-4154.
2. IRRI (2013). Standard evaluation system for rice. (IRRI - Manila Philippines).
3. Bộ Nông nghiệp và PTNT (2021). TCVN 13381-1: 2021/BNN&PTNT - Tiêu chuẩn Quốc gia về khảo nghiệm giá trị canh tác và giá trị sử dụng giống lúa.

4. Bộ Nông nghiệp và PTNT (2018). TCVN hạt giống cây trồng tự thụ phấn.
12181-1: 2018/BNN&PTNT - Quy trình sản xuất

RESEARCH AND COMPLETE THE PRODUCTION PROCESS OF SUPER-PRIMARY SEEDS FOR DT82, A BACTERIAL LEAF BLIGHT DISEASE RESISTANCE RICE VARIETY

Vo Thi Minh Tuyen¹, Nguyen Thi Hao¹, Nguyen Thi Hue¹,

Doan Van Son¹, Hoang Minh Trang¹, Le Van Truong²

¹Agriculture Genetic Institute

²Agricultural Sciences Institute of Northern Central Vietnam

Summary

In fact, in the process of seed production, screening and testing for resistance genes in resistance rice varieties were not focused, leading to seeds don't retain resistance genes, and rice variety was delivered to production reduced disease resistance. The quality rice variety, DT82, harboring three bacterial leaf blight (BLB) resistance genes, has high yield potential, but has not been studied specifically on the production process of super-primary seeds. The selection of pure seed for rice production system is very necessary. In this study, 1000 good plants in the G0 field representing DT82 rice variety were marked (from 1-1000), leaf sampling, DNA extraction, PCR analysis with markers MP1-2, P3, pTA248 linked to resistance genes *Xa4*, *Xa7*, *Xa21* for screening individuals carrying BLB resistance genes. The results showed that: 3.2% of G0 plants had not harbor BLB resistance genes; 14.9% of plants harbor one BLB resistance gene (including homozygote and heterozygote); 30.7% of plants still harboring 2 BLB resistance genes and 51.2% of plants harbor 3 BLB resistance genes. The genotyping analysis in G1 population indicated that 3.6% of lines harbor 2 BLB resistance genes, and 96.4% of lines harboring 3 BLB resistance genes. The G1 lines showed resistance to high resistance to Xoo bacterial. Evaluation of the aroma on G1 lines showed that 12/31 lines have aroma with an score of ≥ 3 . The genotyping analysis in G2 population (super-primary line) indicated that 100% of lines harbor 3 BLB resistance genes (*Xa4*, *Xa7*, *Xa21*) and all lines showed high resistance to Xoo bacterial. Evaluation of aroma on G2 lines showed that 100% of lines had aroma (score ≥ 3). The production process of super-primitive seeds for BLB resistance rice variety, DT82, was constructed and completed based on the basic technical process of rice seed production.

Keywords: *Bacterial leaf blight (BLB), resistance gene, rice variety, super-primary seeds, seed production.*

Người phản biện: TS. Hà Quang Dũng

Ngày nhận bài: 31/8/2022

Ngày thông qua phản biện: 22/9/2022

Ngày duyệt đăng: 28/9/2022

XÁC ĐỊNH CÁC YẾU TỐ *CIS* ĐIỀU HÒA HOẠT ĐỘNG CỦA GEN *RMP* BIỂU HIỆN CHUYÊN BIỆT Ở HẠT PHẤN LÚA (*Oryza sativa* L.)

Nguyễn Tiến Dũng^{1,*}, Lê Văn Hiền¹, Ngô Xuân Bình¹

TÓM TẮT

Biểu hiện chuyên biệt của gen chịu sự kiểm soát của các yếu tố *cis* điều hòa hoạt động gen (*cis*-Regulatory Element - CRE, gọi tắt là yếu tố điều hòa hoạt động) nằm trên vùng promoter. Mười gen biểu hiện chuyên biệt hạt phấn lúa (*Rice Microspore-Preferred gene, RMP*) (*RMP1-10*) được phân tích mức độ biểu hiện dựa trên cơ sở dữ liệu phân tích đã công bố. Tất cả các gen *RMP* biểu hiện mạnh ở hạt phấn giai đoạn trưởng thành khi bao phấn có kích thước từ 1,6 - 2,0 mm. Kết quả phân tích vùng promoter của 10 *RMP* bằng phần mềm PLACE cho thấy, có nhiều CRE được chia làm 3 nhóm, bao gồm: CRE phổ biến xuất hiện với tần số lớn như ACGTATERD1, ARR1AT, CAATBOX1, GATABOX, MYBCORE và DOFCOREZM; CRE hoạt động đặc hiệu mô/cơ quan GTGANTG10, POLLEN1LELAT52, SITEIIATCYTC, 5659BOXLELAT5659 và CRE chỉ có trên một *RMP* nhất định như CPBCSPOR, CTRMCAMV35S, GAGA8HVBKN3, GAGAGMGS1, LTRECOREATCOR15, S1FBOXSORPS1L21 và SEBFCONSSTPR10A trên promoter *RMP10*, AACACOREOSGLUB1, CACGTGMOTIF, SEF3MOTIFGM, CATATGGMSAUR trên *RMP1*. Promoter *RMP3* có ACGTABREMOTIFA20SEM, MYBPLANT, NODCON1GM, TATABOX2, INTRONLOWER, PREATPRODHD trên promoter *RMP2* và MELRECOREPCR1, MYBPZ trên *RMP7*. Bốn CRE GTGANTG10, POLLEN1LELAT52, SITEIIATCYTC và 5659BOXLELAT5659 được dự đoán tham gia trực tiếp kiểm soát biểu hiện gen *RMP* chuyên biệt ở hạt phấn lúa. Việc xác định được các CRE liên quan đến biểu hiện chuyên biệt ở hạt phấn có ý nghĩa quan trọng trong nghiên cứu tối ưu hóa kích thước promoter phục vụ các nghiên cứu thiết kế cấu trúc vector chuyển gen sau này.

Từ khóa: *Chuyên biệt, promoter, hạt phấn, lúa, yếu tố điều hòa-CRE.*

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Ở thực vật, hạt phấn là cơ quan sinh sản quan trọng liên quan trực tiếp đến năng suất và sản lượng của cây. Quá trình hình thành và phát triển của hạt phấn gồm các giai đoạn chuyển hóa, phân chia tế bào phức tạp và chịu sự chi phối của các gen liên quan. Cho tới nay, bằng kỹ thuật microarray đã có hàng trăm gen được xác định có tham gia vào quá trình phát triển của hạt phấn [1]. Ở lúa có nhiều gen biểu hiện ở hạt phấn đã được sàng lọc và chứng minh như *OsSCP*, *OSIPA*, *OsLTP6*, *OsLPS10-11*, *RMP1-9* [2]. Yếu tố điều hòa hoạt động là các trình tự nằm trên vùng promoter và tham gia vào quá trình điều hòa hoạt động của gen; trong đó một số CRE có vai trò quyết định sự biểu hiện đặc hiệu ở hạt phấn của gen [3]. Bate và

Twell (1998) [4] đã xác định được một số CRE chi phối quá trình hoạt động đặc hiệu ở hạt phấn cây cà chua nằm trên vùng promoter của gen *Lat52* như GTGATG10 và POLLEN1LeLAT52. Tương tự, các CRE này cũng được tìm thấy ở một số gen biểu hiện đặc hiệu ở hạt phấn *Arabidopsis* và lúa [1].

Promoter hoạt động đặc hiệu có tính ứng dụng rộng rãi trong nghiên cứu biểu hiện gen ở mô, cơ quan nhất định. Nhiều nhà khoa học nhận định rằng can thiệp vào hạt phấn thông qua các gen kiểm soát là cách tiếp cận có tính khả thi trong chọn tạo giống chống chịu điều kiện bất lợi [3], [5]. Vì vậy việc sàng lọc và đánh giá đầy đủ khả năng ứng dụng của các promoter *RMP* trên cây là rất cần thiết. Việc xác định được vai trò của các CRE quyết định khả năng hoạt động đặc hiệu của gen ở hạt phấn sẽ là cơ sở để tối ưu hóa kích thước promoter trong thiết kế cấu trúc vector chuyển gen. Các vùng promoter không thực sự

¹ Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Thái Nguyên

* Email: dungnt@tuaf.edu.vn

cần thiết cho biểu hiện chuyên biệt có thể được loại bỏ để tạo thuận lợi trong thiết kế cấu trúc vector chuyển gen. Đặc biệt các promoter RMP có thể ứng dụng trong kiểm soát các gen mục tiêu nhằm tăng cường tính chống chịu các điều kiện bất lợi của hạt phần như chịu nóng, chịu lạnh,...

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Gen *RMP*

Mười gen *RMP* (*RMP1-10*) [6] được lựa chọn và phân tích vùng promoter để xác định các yếu tố điều hòa hoạt động chuyên biệt hạt phần (Bảng 1).

Bảng 1. Danh sách các gen biểu hiện chuyên biệt ở hạt phần lúa sử dụng trong nghiên cứu

Gene	Locus ID	Mã số trên NCBI	Kích thước vùng promoter (bp)
<i>RMP1</i>	LOC_Os01g34920.1	Os01g0533400	1.343
<i>RMP2</i>	LOC_Os04g47400.1	Os04g0561900	754
<i>RMP3</i>	LOC_Os12g44010.1	Os12g0637100	1.420
<i>RMP4</i>	LOC_Os12g41260.1	Os12g0605900	1.294
<i>RMP5</i>	LOC_Os06g46730.1	Os06g0681100	1.514
<i>RMP6</i>	LOC_Os12g44080.1	Os12g0637900	1.962
<i>RMP7</i>	LOC_Os03g26430.1	Os03g0381000	2.046
<i>RMP8</i>	LOC_Os01g67350.1	Os01g0899100	2.053
<i>RMP9</i>	LOC_Os04g55660.1	Os04g0650200	1.934
<i>RMP10</i>	LOC_Os07g46950.1	Os07g0664600	1.924

2.2. Phân tích biểu hiện *RMP*

Biểu hiện của *RMP* được phân tích dựa trên dữ liệu công bố RiceXPro [7]. Biểu hiện gen dựa trên cường độ huỳnh quang Cy3 ở bao phần. Đồng thời, biểu hiện gen cũng được phân tích thêm dựa trên bản đồ nhiệt (heat map) bằng phần mềm ePlant [8].

2.3. Lựa chọn vùng điều hòa hoạt động của gen và phân tích CRE

Trình tự gen *RMP* (*RMP1-10*) lấy trên cơ sở dữ liệu Rice Functional Genomic Express Database [9]. Vùng trình tự nucleotide nằm liền kề

phía trước mã mở đầu ATG phía đầu 5' được xác định là vùng promoter. Kích thước trình tự promoter của gen *RMP* được thể hiện ở bảng 1. Để xác định CRE, trình tự promoter gen *RMP* được phân tích bằng phần mềm PLACE (Plant *cis*-Regulatory DNA Elements) [10]. CRE được phân thành 3 nhóm: (1) CRE phổ biến: Xuất hiện nhiều lần và có mặt trên tất cả các promoter RMP, (2) CRE hoạt động đặc hiệu mô, cơ quan hạt phần: tham gia biểu hiện gen ở mô, cơ quan, đặc biệt là bao phần, hạt phần, (3) CRE duy nhất: chỉ có mặt trên một RMP nhất định mà không có trên các promoter RMP khác.

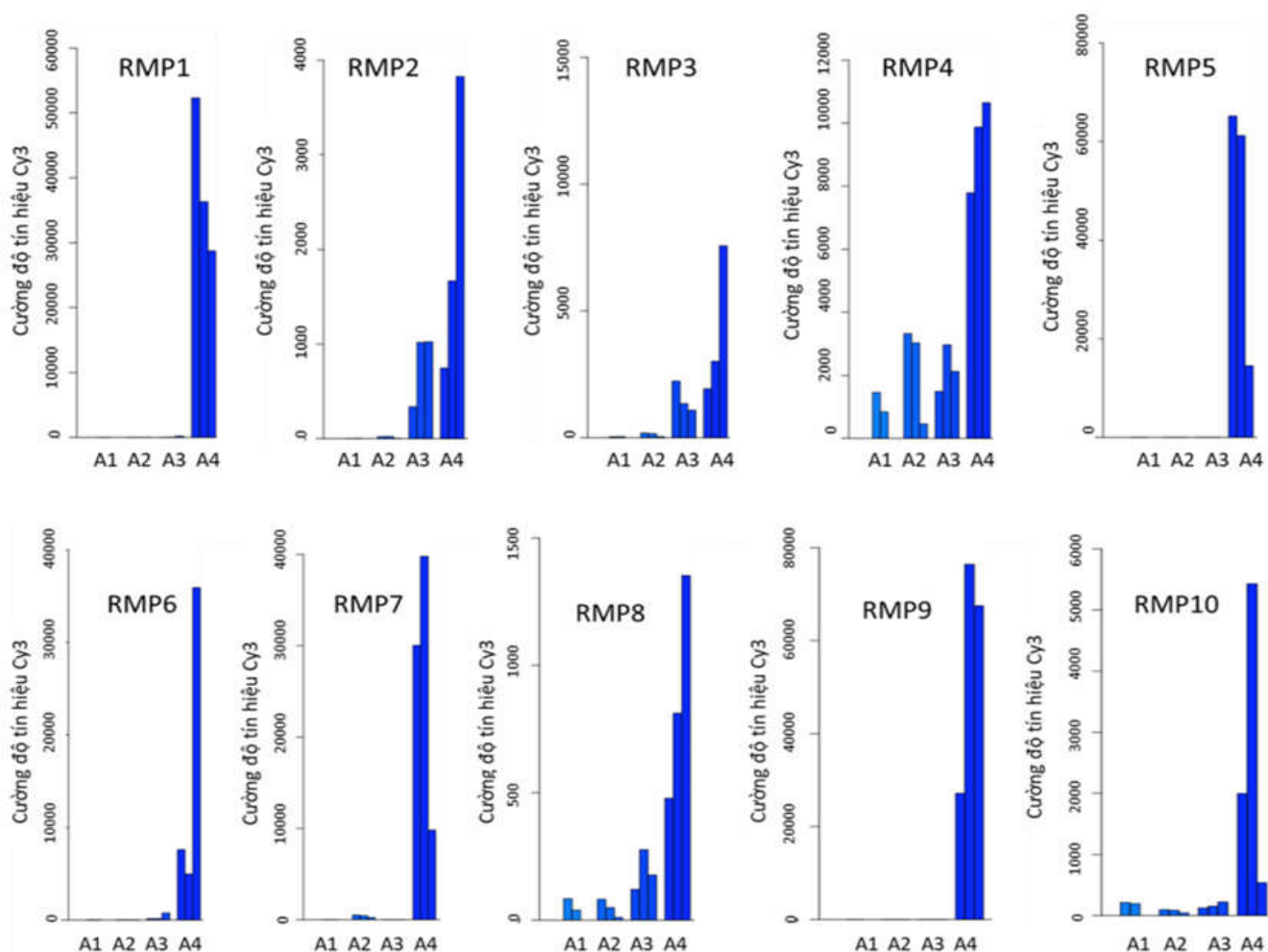
3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Biểu hiện của gen *RMP* ở hạt phấn lúa

Biểu hiện của gen *RMP* được phân tích dựa trên cơ sở dữ liệu RiceXPrO sử dụng mẫu bao phấn ở các giai đoạn phát triển khác nhau. Kết quả cho thấy toàn bộ mười gen *RMP* đều biểu hiện mạnh ở bao phấn (Hình 1). Trong đó các gen *RMP4*, *8* và *10* có cường độ biểu hiện rõ ràng ngay từ giai đoạn hạt phấn bắt đầu hình thành (A1) đến giai đoạn trưởng thành (A4) (Hình 1). Ở giai đoạn A1 (bao phấn có kích thước từ 0,3 - 0,6 mm), cường độ tín hiệu huỳnh quang Cy3 đo được mạnh nhất ở *RMP4* là 1.148, tiếp đến là *RMP10* đạt 220 và *RMP8* đạt 62. Các gen còn lại có tín hiệu huỳnh quang rất thấp, dao động từ 3,9 - 43,5 (Hình 1).

Ở giai đoạn bao phấn phát triển lớn hơn, kích thước đạt từ 0,7 - 1,0 mm (A2), biểu hiện gen bắt đầu được ghi nhận ở *RMP3* và *RMP7* với tín hiệu huỳnh quang đạt 137,6 và 396,4. *RMP2* và *RMP6* bắt đầu biểu hiện rõ rệt ở giai đoạn (A3) bao phấn có kích thước 1,2 - 1,5 mm với cường độ đạt lần lượt 1.586,7 và 361,4 (Hình 1).

Ở giai đoạn hạt phấn trưởng thành, bao phấn có kích thước từ 1,6 - 2,0 mm (A4) các *RMP* có biểu hiện mạnh nhất (Hình 1). Trong đó *RMP9* có tín hiệu biểu hiện mạnh nhất 67.484, tiếp đến là *RMP5* 61.184, *RMP1* 36.327. Các *RMP* còn lại có cường độ biểu hiện từ 1.996,8 (*RMP10*) đến 9.872,3 (*RMP4*) (Hình 1).



Hình 1. Biểu đồ thể hiện mức độ biểu hiện của gen *RMP* ở giai đoạn khác nhau của bao phấn lúa. A1 - kích thước bao phấn từ 0,3 - 0,6 mm, A2: 0,7 - 1,0 mm, A3: 1,2 - 1,5 mm, A4: 1,6 - 2,0 mm. Biểu đồ thể hiện số liệu 3 lần lặp lại.

3.2. Xác định CRE trên vùng promoter *RMP* của lúa

Để xác định các CRE liên quan đến biểu hiện chuyên biệt hạt phấn, trình tự các promoter *RMP* (từ *RMP1* đến *RMP10*) được phân tích dựa trên phần mềm PLACE [10]. Kết quả phân tích cho thấy có nhiều yếu tố điều hòa hoạt động của trên vùng promoter *RMP* và được phân chia thành 3 nhóm: (i) nhóm CRE phổ biến; (ii) nhóm CRE hoạt động đặc hiệu mô, cơ quan hạt phấn; (iii) nhóm CRE đặc trưng chỉ có ở một *RMP* nhất định (Hình 2A-C).

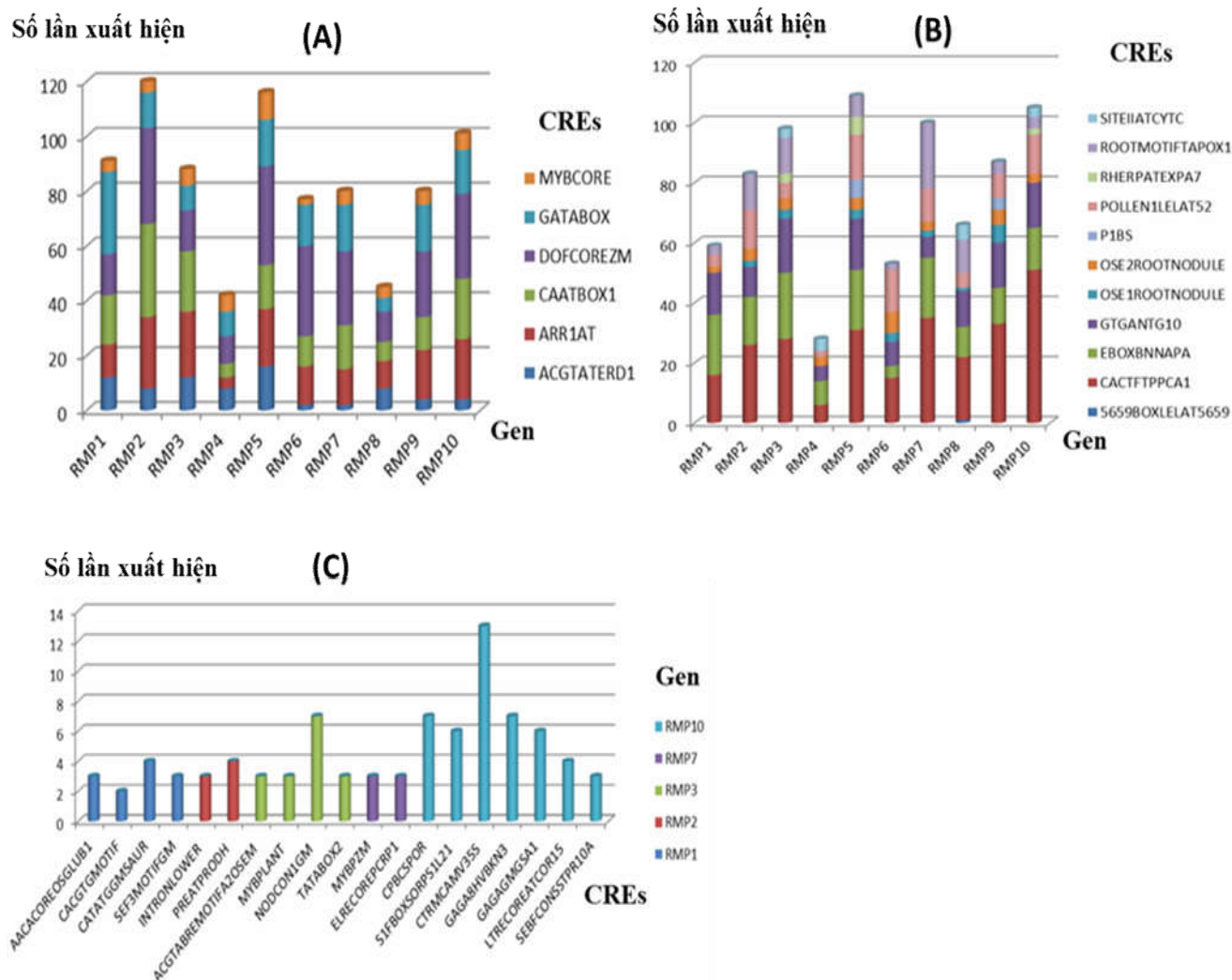
Kết quả phân tích PLACE cho thấy có sáu CRE (ACGTATERD1, ARR1AT, CAATBOX1, GATABOX, MYBCORE và DOFCOREZM) xuất hiện với tần số cao. Cụ thể, ACGTATERD1 xuất hiện 16 lần trên vùng promoter *RMP5*, 12 lần trên *RMP1* và *RMP3*, 8 lần trên *RMP2*, *RMP4* và *RMP8*, 4 lần trên *RMP9* và *RMP10*. ARR1AT xuất hiện 26 lần trên promoter *RMP2*, 24 lần trên *RMP3*, 22 lần trên *RMP10*, 21 lần trên *RMP5*, 18 lần trên *RMP9*, 14 lần trên *RMP6*, 13 lần trên *RMP7*, 12 lần trên *RMP1* và 4 lần trên *RMP4*. CAATBOX1 xuất hiện 34 lần trên *RMP2*, 22 lần trên *RMP3* và *RMP10*, 18 lần trên *RMP1*, 16 lần trên *RMP5* và *RMP7*, 12 lần trên *RMP9*, 11 lần trên *RMP6*, 7 lần trên *RMP8* và 4 lần trên *RMP4*. GATABOX xuất hiện 30 lần trên *RMP1*, 20 lần trên *RMP5*, 15-17 lần trên *RMP6*, *RMP7*, *RMP9* và *RMP10*. MYBCORE xuất hiện 10 lần trên *RMP5*, 6 lần trên *RMP3*, *RMP4* và *RMP10*, 4 lần trên *RMP1*, *RMP2* và *RMP8*, 3 lần trên *RMP6* và 5 lần trên *RMP9*. DOFCOREZM xuất hiện 36 lần trên *RMP5*, 35 lần trên *RMP2*, 33 lần trên *RMP6*, 27 lần trên *RMP7*, 31 lần trên *RMP10*, 24 lần trên *RMP9*, 15 lần trên *RMP1* và *RMP3*, 10 lần trên *RMP4* và 11 lần trên *RMP8* (Hình 2A).

Đối với nhóm CRE hoạt động đặc hiệu mô/cơ quan, kết quả phân tích xác định được các yếu tố CRE liên quan đến biểu hiện ở cơ quan hạt phấn như GTGANTG10, POLLEN1LELAT52, SITEIIATCYTC, 5659BOXLELAT5659 trên các promoter *RMP*. Cụ thể, GTGANTG10 xuất hiện từ 10-18 lần trên *RMP1*, *RMP2* và *RMP3*, 5 - 8 lần trên các promoter *RMP5*, *RMP8*, *RMP9* và *RMP10*.

POLLEN1LELAT52 xuất hiện 13 - 15 lần trên *RMP2*, *RMP5*, *RMP6* và *RMP10*, 2 - 8 lần trên các promoter còn lại. SITEIIATCYTC xuất hiện 3 lần trên *RMP10*, 4 lần trên *RMP4*, 5 lần trên *RMP8* (Hình 2B).

Kết quả phân tích cũng cho thấy trên một số *RMP* có xuất hiện các CRE đặc trưng. Trong đó, *RMP10* có 7 CRE: CPBCSPOR, CTRMCAMV35S, GAGA8HVBKN3, GAGAGMGSA1, LTRECOREATCOR15, S1FBOXSORPS1L21, SEBFCNSSTPR10A. *RMP1* có 4 CRE: AACACOREOSGLUB1, CACGTGMOTIF, SEF3MOTIFGM, CATATGGM SAUR. *RMP3* có 4 CRE: ACGTABREMOTIFA2 OSEM, MYBPLANT, NODCON1GM, TATABOX2. *RMP2* có 2 CRE: INTRONLOWER, PREATPROD. *RMP7* có 2 CRE: MELRECOREPCR1 và MYBPZ (Hình 2C).

Kết quả phân tích cho thấy trên vùng promoter của gen *RMP* có nhiều CRE, trong đó nhiều CRE đã được chứng minh vai trò trong điều hòa biểu hiện của gen. ACGTATERD1 là motif với trình tự lõi ACGT kết hợp với các yếu tố *cis* khác có chức năng quan trọng kiểm soát biểu hiện gen đáp ứng các yếu tố bất lợi ở lúa [11]. ARR1AT là một yếu tố liên kết liên có vai trò như nhân tố kích hoạt quá trình phiên mã tổng hợp cytokinin ở *Arabidopsis* và lúa [12]. Hộp CAATBOX1 chịu trách nhiệm cho gen *LegA* hoạt động biểu hiện đặc hiệu mô ở cây đậu ngự [13]. Hộp GATABOX có vai trò cần thiết cho các gen kiểm soát biểu hiện chuyên biệt mô ở cây *Arabidopsis* [14]. MYBCORE là vị trí liên kết của 2 protein MYB (AtMYB1 và AtMYB2) ở *Arabidopsis*, tham gia quá trình điều hòa gen trong điều kiện cây thiếu nước [15]. Borges và cs (2008) [14] cũng cho rằng các yếu tố phiên mã MYB biểu hiện mạnh ở tế bào hạt phấn có vai trò quan trọng trong quá trình phát triển của hạt phấn. AACACOREOS GLUB1 gồm hai motif ACGT và AACA cần thiết cho biểu hiện đặc hiệu gen ở nội nhũ lúa và bông [11]. EBOXBNNAPA tham gia vào quá trình biểu hiện đặc hiệu mô, cảm ứng ánh sáng và tổng hợp phenylpropanoid ở cây cải. P1BS được phát hiện ở cây một và hai lá mầm tham gia quá trình vận chuyển phosphate và kiểm soát biểu hiện gen ở vùng rễ [12].



Hình 2. Tần số xuất hiện các CRE trên vùng promoter của các gen *RMP* được xác định bằng công cụ PLACE. (A) CRE phổ biến; (B)- CRE hoạt động đặc hiệu mô, cơ quan; (C) CRE duy nhất

GTGANTG10 là motif được tìm thấy trên vùng promoter g10, chịu trách nhiệm kiểm soát biểu hiện đặc hiệu ở cây thuốc lá. Sau đó Liu và cs (2013) cũng chứng minh motif này làm tăng cường biểu hiện gen GUS ở hạt phần lúa. POLLEN1LELAT52 là motif kiểm soát biểu hiện Lat52 đặc hiệu hạt phần cây cà chua [2]. SITEIIATCYTC là protein liên kết với DNA tham gia kiểm soát biểu hiện chuyên biệt ở đỉnh sinh trưởng và hạt phần của cây [14]. 5659BO XLELAT5659 là motif có trình tự có ở cả gen Lat56 và Lat59 ở cây cà chua, kiểm soát biểu hiện gen ở hạt phần [2], [15].

AACACOREOSGLUB1 bao gồm hai motif ACGT và AACA cần thiết cho biểu hiện gen chuyên biệt ở nội nhũ hạt cũng như quá trình phát

triển của phôi. CATATGGMSAUR là motif cần thiết cho quá trình tổng hợp auxin và beta-conglyxinin. ACGTABREMOTIFA2OSEM được xác định bao gồm yếu tố ABRE và DRE tham gia quá trình đáp ứng ABA [16]. ELRECOREPCRP1 cần thiết cho các đáp ứng chống chịu điều kiện ngoại cảnh của cây [12].

4. KẾT LUẬN

Nhìn chung mười gen chuyên biệt hạt phần RMP đều có biểu hiện rõ rệt ở hạt phần, đặc biệt gen biểu hiện mạnh ở giai đoạn hạt phần trưởng thành khi kích thước bao phấn đạt từ 1,6 đến 2,0 mm. Trên vùng promoter của các gen RMP có nhiều yếu tố điều hòa hoạt động gen, trong đó có 4 CRE đã được chứng minh có vai trò chính chi phối biểu hiện chuyên biệt ở hạt phần của cây gồm:

GTGANTG10, POLLEN1LELAT52, SITEIIATCY TC, 5659BOXLELAT5659. Để đánh giá mức độ tham gia của các CRE này đối với biểu hiện của các gen RMP cần tiến hành thêm các nghiên cứu về vai trò của chúng đối với biểu hiện chuyên biệt ở hạt phấn của cây.

LỜI CẢM ƠN

Nhóm tác giả xin trân thành cảm ơn Quỹ phát triển Khoa học và Công nghệ Quốc gia (NAFOSTED) đã tài trợ nghiên cứu thông qua đề tài mã số 106.03-2017.19.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Li Y, Mullin M, Zhang Y, Drews Y, Welch LR, and Showalter AM (2020). *Identification of cis-regulatory sequences controlling pollen-specific expression of hydroxyproline-rich glycoprotein genes in Arabidopsis thaliana*. *Plants* 9: 1751.
2. Liu X, Shangguan Y, Zhu J, Lu Y, Han B (2013). The rice *OsLTP6* gene promoter directs anther-specific expression by a combination of positive and negative regulatory elements. *Planta* 238: 845-857.
3. Naqvi RZ, Mubeen H and Raza S (2016). Role of plant promoters and their *cis* regulatory elements in gene expression regulation. *European Journal of Pharmaceutical and Medical Research*. *EJPMR* 1: 347-352.
4. Bate N, Twell D (1998). Functional architecture of a late pollen promoter: Pollen - specific transcription is developmentally regulated by multiple stage specific and co-dependent activator elements. *Plant Mol Biol* 37: 859 - 886.
5. Sharma KD (2014). Pollen Development under cold stress: A Molecular Perspective. *Austin J Genet Genomic Res* 1: 4.
6. Nguyen TD, Moon S, Nguyen VN, Gho Y, Chandran AK, Soh MS, Song JT, An G, Oh SA, Park SK, Jung KH (2016) Genome-wide identification and analysis of rice genes preferentially expressed in pollen at an early developmental stage. *Plant Mol Biol* 92: 71 - 88.
7. Rice Expression Profile Database (RiceXPro): <https://ricexpro.dna.affrc.go.jp/>.
8. The Bio-Analytic Resource for Plant Biology: <https://bar.utoronto.ca/>.
9. RiceGE: http://signal.salk.edu/RiceGE/RiceGE_Data_Source.html.
10. Higo K, Ugawa Y, Iwamoto M, Korenaga T (1999). Plant *cis*-acting regulatory DNA elements (PLACE) database. *Nucleic Acids Res* 27: 297 - 300.
11. Mehrotra R, Sethi S, Zutshi I, Bhalothia P, Mehrotra S (2013). Patterns and evolution of ACGT repeat *cis*-element landscape across four plant genomes. *BMC genomics* 14: 203.
12. Sakai H, Aoyama T, Oka A (2000). Arabidopsis ARR1 and ARR2 response regulators operate as transcriptional activators. *Plant J* 24: 703-711.
13. Shirsat A, Wilford N, Croy R and Donald B (1989). Sequences responsible for the tissue specific promoter activity of a pea legumin gene in tobacco. *Mol Gen Genet* 215: 326 - 331.
14. Borges F, Gomes G, Gardner R, Moreno N, McCormick S, Feijo JA, Becker JD (2008). Comparative transcriptomics of *Arabidopsis* sperm cells. *Plant Physiol* 148 (2): 1168 - 1181.
15. Abe H, Urao T, Ito T, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi - Shinozaki K (2003). *Arabidopsis* AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. *Plant Cell* 15 (1): 63-78.
16. Wu C, Washida H, Onodera Y, Harada K, Takaiwa F (2000). Quantitative nature of the Prolamin-box, ACGT and AACA motifs in a rice glutelin gene promoter: minimal *cis*-element requirements for endosperm-specific gene expression. *Plant J* 23: 415-421.

SCREENING *Cis* REGULATORY ELEMENTS-CREs IN THE RICE MICROSPORE/POLLEN SPECIFIC PROMOTER (RMP) GENE**Nguyen Tien Dung^{1,*}, La Van Hien¹, Ngo Xuan Binh¹**¹*Thai Nguyen University of Agriculture and Forestry***Email: dungnt@tuaf.edu.vn***Summary**

Specific expression of genes is controlled by cis-regulatory elements (CREs) that are located on the promoter region. *Rice Microspore-Preferred* gene (*RMP*) was screened by microarray based on fluorescence signal intensity in rice anthers. Microarray database analysis showed that all ten *RMP* genes were highly expressed in mature pollen grains which corresponding to 1.6 to 2.0 mm in length of its anthers. The results of CREs scanning using PLACE online tool revealed that promoter regions of 10 rice microspore preferred genes (*RMP1-10*) showing a numbers of CREs which can be divided into 3 groups, including: abundant CREs appear with frequency large numbers such as ACGTATERD1, ARR1AT, CAATBOX1, GATABOX, MYBCORE, and DOFCOREZM; Tissue- and organ-specific CREs such as GTGANTG10, POLLEN1LELAT52, SITEIIATCYTC, 5659BOXLELAT5659 and unique CREs such as CPBCSPOR, CTRMCAMV35S, GAGA8HVBKN3, GAGAGMGSA1, LTRECOREATCOR15, S1FBOXSORPS1L21, SEBFCONSST in the *RMP10*. AACACOREOSGLUB1, CACGTGMOTIF, SEF3MOTIFGM, CATATGGMSAUR in the *RMP1*. ACGTABREMOTIFA2OSEM, MYBPLANT, NODCON1GM, TATABOX2 in the *RMP3*, INTRONLOWER, PREATPRODH in the *RMP2*, and MELRECOREPCR1, MYBPZ in *RMP7* promoter. CREs have been known with different functions involved in the regulation of *RMP* gene activity, in which 4 CREs, GTGANTG10, POLLEN1LELAT52, SITEIIATCYTC and 5659BOXLELAT5659, have been reported as anther/pollen-specific expression that were also found in all ten *RMP* promoter region. The identification of CREs related to pollen-specific expression is important in the study of optimizing promoter size that will be useful for transgenic vectors construction later on.

Keywords: *CRE, rice, specific expression, promoter, pollen.***Người phản biện:** TS. Nguyễn Duy Phương**Ngày nhận bài:** 24/5/2022**Ngày thông qua phản biện:** 24/6/2022**Ngày duyệt đăng:** 11/8/2022

ĐÁNH GIÁ ĐA DẠNG DI TRUYỀN VÀ XÂY DỰNG BỘ TIÊU BẢN ADN CỦA GIỐNG LẠC CHAY VÀ LẠC CHAY TRẮNG

Đồng Thị Kim Cúc^{1*}, Nguyễn Thị Lý²,
Dương Hồng Mai², Nguyễn Hữu Hải², Trần Đăng Khánh¹

TÓM TẮT

Phương pháp ứng dụng chỉ thị phân tử trong chọn tạo giống được sử dụng để rút ngắn thời gian chọn và tạo giống nhằm khắc phục điểm yếu của các phương pháp truyền thống. Việc đánh giá đa dạng di truyền các giống lạc là rất cần thiết trong chọn tạo giống. Vật liệu sử dụng trong nghiên cứu là 10 mẫu giống lạc được cung cấp bởi Trung tâm Tài nguyên Thực vật. Sử dụng một số hóa chất thông dụng dùng trong nghiên cứu sinh học phân tử, các hóa chất cho phản ứng PCR, các môi SSR dùng trong nghiên cứu của hãng IDT. Số liệu được chuyển sang chương trình NTSYSpc 2.1 để phân tích, tìm ra hệ số tương đồng di truyền (Jaccard) và thành lập cây quan hệ phát sinh. Kết quả thu được 14 chỉ thị cho kết quả đa hình (chiếm 58,33%) và 10 chỉ thị cho kết quả đơn hình (chiếm 41,67%). Bốn chỉ thị RN1A10, PM377, PM436 và TC4E10 có thể phân biệt được 2 mẫu giống lạc Chay và lạc Chay trắng. Hệ số tương đồng di truyền giữa các mẫu giống lạc dao động từ 0,56 đến 0,98. Mẫu giống lạc Chay trắng có mức tương đồng với mẫu giống lạc Chay là 0,66. Ở mức tương đồng di truyền 74% mười mẫu giống lạc nghiên cứu được chia thành 3 nhóm cách biệt di truyền.

Từ khóa: Lạc chay, lạc chay trắng, chỉ thị phân tử.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Hạt lạc là một trong những nguồn thực phẩm chứa nhiều chất béo và protein cần thiết cho khẩu phần ăn của con người. Ngoài ra, hạt lạc còn chứa các vitamin nhóm B và một lượng hydratcacbon nhất định. Ở Việt Nam, cây lạc đóng vai trò quan trọng trong cơ cấu cây nông nghiệp, đặc biệt ở những nơi khí hậu thường xuyên biến động và điều kiện canh tác còn gặp nhiều khó khăn. Trong những năm gần đây, việc tổng kết kinh nghiệm thực tiễn và ứng dụng khoa học tiên tiến vào sản xuất đã góp phần tăng năng suất lạc một cách đáng kể [1]. Phương pháp ứng dụng chỉ thị phân tử trong chọn tạo giống được sử dụng để rút ngắn thời gian chọn và tạo giống nhằm khắc phục điểm yếu của các phương pháp truyền thống. Việc đánh giá đa dạng di truyền các giống lạc là rất cần thiết trong chọn tạo giống [2].

Giống lạc Chay có nguồn gốc ở Bắc Giang, là giống lạc địa phương, được Trung tâm Tài nguyên

Thực vật thu thập về từ tháng 1 năm 2003 và nhân giống đánh giá bảo quản cho đến nay. Giống lạc này có nhiều đặc điểm nông học tốt, như thân khỏe, sinh trưởng nhanh, có khả năng chịu hạn khá, cho năng suất trung bình 1,8 - 2,0 tấn/ha. Giống lạc Chay trắng có nguồn gốc ở Nghệ An, Hòa Bình, là giống lạc địa phương, được Trung tâm Tài nguyên thực vật thu thập về từ năm 1996. Giống lạc này có nhiều đặc điểm nông học tốt, như dễ tính, thích ứng rộng, sinh trưởng khỏe, có khả năng chịu hạn khá, cho năng suất trung bình 1,7 - 2,0 tấn/ha [3].

Hai giống này trước đây đã được trồng phổ biến tại một số vùng canh tác nhờ nước trời (nước mưa) ở phía Bắc, rất có tiềm năng chịu hạn và có khả năng phát triển được ở những nơi khác ngoài vùng sản xuất truyền thống. Giống lạc Chay được trồng nhiều ở Bắc Giang, Vĩnh Phúc, Phú Thọ, Thái Nguyên... Giống lạc Chay trắng được trồng nhiều ở Nghệ An, Hòa Bình, Quảng Ninh. Tuy nhiên, do biến đổi của khí hậu, tình trạng hạn hán xảy ra thường xuyên nên một số giống lạc chịu hạn kém đã không phát triển được và cho năng

¹ Viện Di truyền Nông nghiệp

² Trung tâm Tài nguyên thực vật

*Email: dongthikimcuc@gmail.com

suất thấp, vì vậy các nhà chọn giống cần tạo ra các giống lạc có khả năng chịu hạn tốt, năng suất cao. Hai giống lạc Chay và Chay trắng đều có khả năng chịu hạn tốt các nhà chọn giống sẽ sử dụng làm vật liệu chọn giống để tạo ra các giống lạc mới có khả năng chịu hạn tốt, năng suất cao cho các vùng đất bị khô hạn. Đồng thời, nhằm góp phần phục vụ công tác thu thập, phân loại, đánh giá và bảo tồn nguồn gen, cũng như cung cấp thông tin về mối quan hệ di truyền giữa giống lạc Chay, lạc Chay trắng và một số các giống lạc khác làm cơ sở cho các chương trình chọn tạo giống và các hướng nghiên cứu tiếp theo, nghiên cứu *“Đánh giá đa dạng di truyền và xây dựng bộ tiêu bản ADN của giống lạc Chay và lạc Chay trắng”* đã được thực hiện

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

2.1.1. Vật liệu thực vật

Vật liệu sử dụng trong nghiên cứu là 1 giống lạc Chay, 1 giống lạc Chay trắng và 8 mẫu giống lạc được cung cấp bởi Trung tâm Tài nguyên thực vật.

Bảng 1. Danh sách các mẫu giống lạc nghiên cứu

STT	Mã số mẫu	Ký hiệu ADN
1	Lạc Chay	L1
2	Lạc Chay trắng	L2
3	5246	L3
4	5269	L4
5	4062	L5
6	4060	L6
7	5268	L7
8	5260	L8
9	4063	L9
10	5248	L10

2.1.2. Hoá chất

Bảng 2. Tên và trình tự các mồi SSR được dùng trong nghiên cứu lạc

TT	Tên mồi	Trình tự lặp	TT	Tên mồi	Trình tự lặp
1	TC1A02	(TC)35	13	RN0x690	(TGA)6
2	TC3A12	(TC)27	14	RN0x727	(TCG)4
3	TC3H07	(GA)20(TTC)4	15	RN1A09	(TA)10
4	TC4D02	(CT)21	16	RN1A10	(GTG)5
5	TC4E10	(CCT)4 + (T)12 + (CT)14	17	RN5G08	(CTG)5
6	TC6H03	(AG)21	18	RN5H02	(AT)11
7	TC9F04	(TC)23	19	RN5H08	(TGG)5
8	TC9F10	(AG)31	20	RN6B11	(CCA)6

9	TC11A04	(CT)16(CT)33	21	RN7D04	(AG)14
10	RI1F06	(ATA)6(ATT)4(GA)6	22	RN7G09	(AAT)5
11	RI2D06	(TCC)5	23	PM377	(GA)21
12	RN0x614	(CAA)7	24	PM436	(GA)19

- Một số hóa chất thông dụng dùng trong nghiên cứu sinh học phân tử của các hãng Sigma, Merck,... bao gồm: CTAB, Tris base, Boric axit, NaCl, EDTA, 6X orange loading dye solution, Taq Polymerase, Ethanol, 2-propanol, Phenol, Chloroform, isoamyl alcohol, Ribonuclease A, Acrylamide, Bis - Acrylamide.

- Các hóa chất cho phản ứng PCR: bốn loại deoxynucleotit triphosphat (dNTPs) và Taq-ADN Polymerase của Thermor.

- Các môi SSR dùng trong nghiên cứu của hãng IDT (Bảng 2).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Tách chiết ADN tổng số

Trong nghiên cứu này, đã lựa chọn phương pháp sử dụng CTAB của P. Doyle và Doyle (1987) [4] có một số cải tiến nhỏ để tiến hành tách chiết ADN từ các mẫu nghiên cứu.

Quy trình: chuẩn bị sẵn dung dịch đậm chiết CTAB ở 60°C. Nghiền 0,3 gam mẫu lá bằng chày cối sứ vô trùng trong nitor lỏng đến khi thành dạng bột mịn (mẫu húng, chày, cối được giữ trước ở -80°C). Hoà tan mẫu đã nghiền nhỏ trong 800 µl CTAB buffer và 60 µl SDS 10%. Thành phần dung dịch đậm chiết: Tris-bazơ 100 mM, EDTA 20 mM, NaCl 1,4 M, CTAB 2%. Ủ mẫu ở 65°C trong bể ổn nhiệt, thời gian 60 phút. Bổ sung chloroform, lắc nhẹ cho tới khi thành dạng nhũ sữa. Ly tâm 11.000 vòng/phút trong 30 phút ở nhiệt độ 4°C. Hút dung dịch phía trên chuyển sang ống mới. Tiếp tục chiết lần 2 bằng chloroform, thu được dịch chiết chứa ADN. Tủa ADN bằng isopropanol đã làm lạnh. Để ở -20°C trong 1 giờ. Ly tâm thu tủa 10.500 vòng/phút trong 15 phút ở 4°C. Rửa tủa bằng

ethanol 70%, ly tâm thu tủa, làm khô và hoà tan trong 100 µl đệm TE.

2.2.2. Phản ứng PCR

Mỗi phản ứng PCR bao gồm các thành phần và hàm lượng cụ thể như sau:

TT	Thành phần	Thể tích (µl)
1	Nước cất hai lần khử ion	4
2	Đệm PCR 10X + MgCl ₂ 25 mM	1
3	dNTPs 10 mM	0,2
4	Taq ADN polymerase 1 U/µl	0,8
5	Môi xuôi 5 µM	1
6	Môi ngược 5 µM	1
7	ADN 10 ng/µl	2
Tổng thể tích của một phản ứng		10,0

Điều kiện phản ứng PCR:

Các bước	Nhiệt độ (°C)	Thời gian	Số chu kỳ
I	94	5 phút	1
II	94	45 giây	37
	Tm	1 phút	
	72	1 phút	
III	72	5 phút	1

Giữ mẫu ở 4°C.

2.2.3. Điện di sản phẩm PCR

- Gel polyacrylamide bao gồm các thành phần sau (bản gel có kích thước 30 cm x 12 cm):

Nước cất khử ion: 22,2 ml; 10X TBE: 1,5 ml; dung dịch acrylamide 40%: 6 ml; dung dịch APS 10%: 300 µl; dung dịch TEMED: 25 µl; tổng thể tích gel: 30 ml.

Trộn đều hỗn hợp các dung dịch trên và dùng xi lanh bơm vào giữa hai tấm kính.

- Sau 30 phút gel được polyme hoá hoàn toàn. Lắp ráp máy điện di, tiến hành điện di sản phẩm PCR cùng với 2 loại ladder 20 bp và ladder 50 bp.

Thời gian điện di khoảng 50 - 60 phút. Lấy gel ra khỏi kính, nhuộm EtBr nồng độ 0,5% trong 15 phút, rửa lại bằng nước sạch. Soi và chụp ảnh gel bằng máy chụp ảnh gel DigiDoc-It.

2.2.4. Phân tích và xử lý số liệu

Để xác định quan hệ di truyền giữa các dòng lạc, các kết quả thu được từ quá trình điện di sản phẩm PCR được thành lập dựa vào sự xuất hiện hay không xuất hiện của các băng ADN nhờ khuếch đại bằng PCR.

- Số 1: các allele có xuất hiện băng ADN.
- Số 0: các allele không xuất hiện băng ADN.
- Số 9: các dòng không xuất hiện băng ADN ở tất cả các allele.

Các số liệu trên được nhập vào phần mềm Excel lần lượt theo từng môi. Sau đó, số liệu được chuyển sang chương trình NTSYSpc 2.1 để phân tích, tìm ra hệ số tương đồng di truyền (Jaccard) và thành lập cây quan hệ phát sinh.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Nguồn gốc, đặc tính nông sinh học của các giống lạc trong nghiên cứu

Bảng 3. Nguồn gốc và một số đặc tính nông sinh học của các giống lạc trong nghiên cứu

STT	Mã số mẫu	Nguồn gốc	Đặc tính nông sinh học			
			Thời gian sinh trưởng vụ xuân (ngày)	Chiều cao cây (cm)	Khả năng chống chịu sâu, bệnh hại (điểm)	Khả năng chịu hạn (điểm)
1	Lạc Chay	Bắc Giang, Vĩnh Phúc, Phú Thọ, Thái Nguyên...	120 - 125	40 - 45	Khá	1-3
2	Lạc Chay	Nghệ An, Hòa	120 -125	40 - 45	Khá	1-3

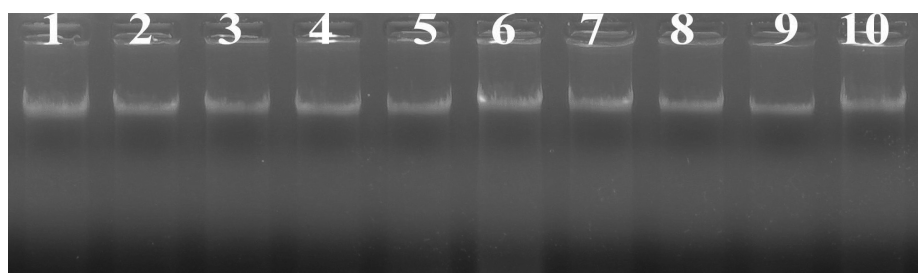
	trắng	Bình...				
3	5246	Địa phương	125 - 130	50 - 55	Trung bình	3
4	5269	Địa phương	120 -125	40 - 45	Khá	1-3
5	4062	Địa phương	120 -125	40 - 45	Khá	3
6	4060	Địa phương	120 -125	40 - 45	Khá	1-3
7	5268	Địa phương	125 - 130	50 - 55	Trung bình	3
8	5260	Địa phương	120 -125	40 -45	Khá	1-3
9	4063	Địa phương	120 -125	40 - 45	Khá	1-3
10	5248	Nhập nội	120 - 125	40 - 45	Khá	1-3

Như vậy, trong 10 giống lạc tham gia nghiên cứu thì có 9 giống có nguồn gốc địa phương và 1 giống có nguồn gốc nhập nội. Thời gian sinh trưởng của các giống phần lớn dao động từ 120 - 125 ngày, có 2 giống có thời gian sinh trưởng từ 125 - 130 ngày. Khả năng chống chịu một số sâu, bệnh hại chính đa số đạt khá, có 2 giống đạt điểm

trung bình. Khả năng chịu hạn của hai giống lạc Chay và Chay trắng đạt điểm 1-3 (chịu hạn tốt).

3.2. Kết quả tách chiết ADN tổng số

Tách chiết ADN là công việc đầu tiên đóng vai trò quan trọng trong các nghiên cứu sinh học phân tử. Kết quả tách chiết ADN tổng số của lạc được kiểm tra bằng phương pháp điện di trên gel agarose 0,8% (Hình 1).

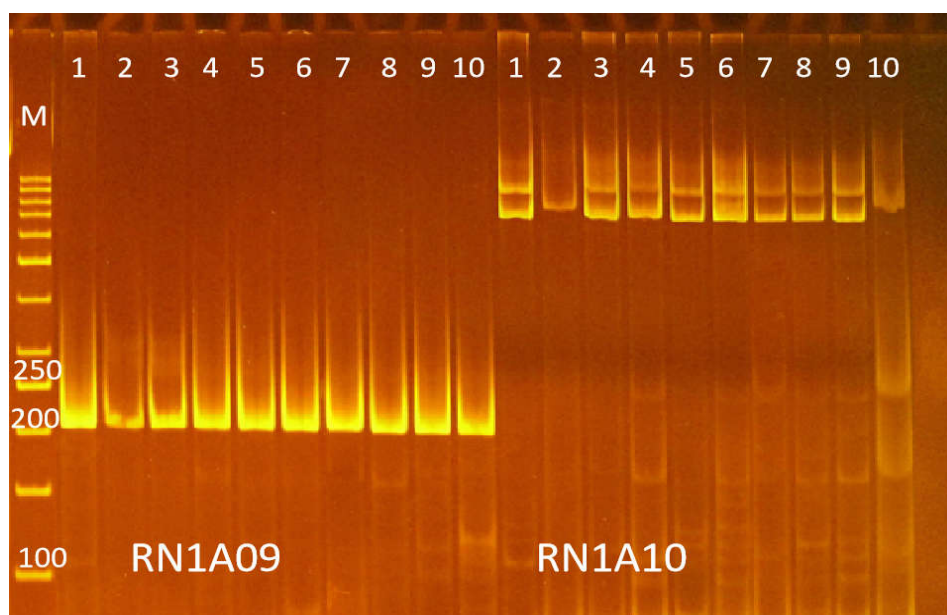


Hình 1. Kết quả kiểm tra ADN tổng số trên gel agarose của 10 mẫu giống lạc nghiên cứu

Qua kết quả điện di trên gel agarose 0,8% cho thấy, các băng ADN thu được của các mẫu giống lạc khá gọn và đồng đều, chứng tỏ chất lượng ADN của các mẫu là khá tốt, không bị đứt gãy. Mặt khác, không thấy xuất hiện vệt sáng RNA phía dưới, điều đó chứng tỏ RNA cũng đã được loại bỏ khỏi dịch chiết ADN. Kết quả điện di cũng cho thấy ADN có nồng độ tương đối cao, chất lượng tốt, đủ tiêu chuẩn thực hiện các bước tiếp theo.

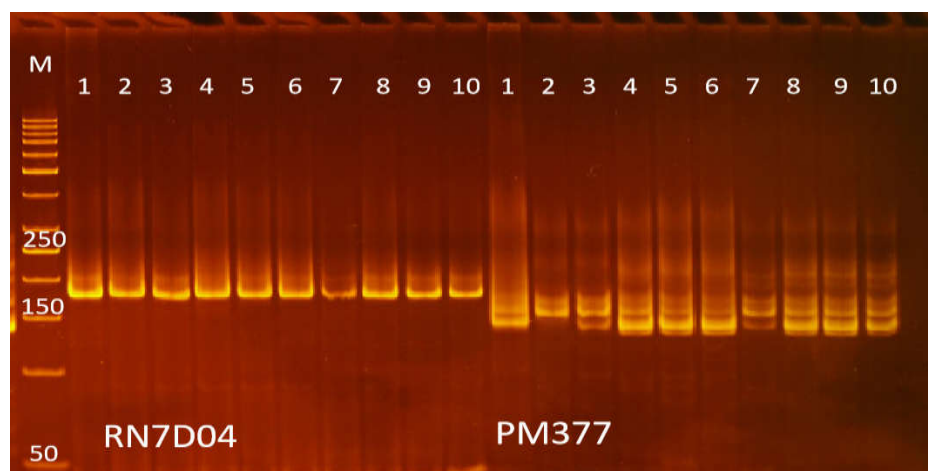
3.3. Kết quả phân tích đa hình và mối quan hệ di truyền của 10 mẫu giống lạc nghiên cứu

Trong nghiên cứu này đã sử dụng 24 chỉ thị SSR (Bảng 2), trong đó có 14 chỉ thị cho kết quả đa hình (chiếm 58,33%) và 10 chỉ thị cho kết quả đơn hình (chiếm 41,67%). Kết quả điện di sản phẩm PCR của 10 mẫu giống lạc nghiên cứu với mỗi RN1A10 thu được tổng số 18 băng, thuộc 3 loại băng đa hình. Kích thước băng dao động từ 4.800 bp đến khoảng 600 bp. Mẫu giống số 2 (lạc Chay trắng) và mẫu giống số 10 (5248) có 1 băng, khác biệt với mẫu giống số 1 (lạc Chay) và các mẫu giống còn lại có 2 băng (Hình 2).



Hình 2. Ảnh điện di sản phẩm PCR của các giống lạc mỗi với RN1A09 và RN1A10

Mẫu 1-10: Các mẫu giống lạc theo kí hiệu (Bảng 1); M: Marker generuler 50 bp

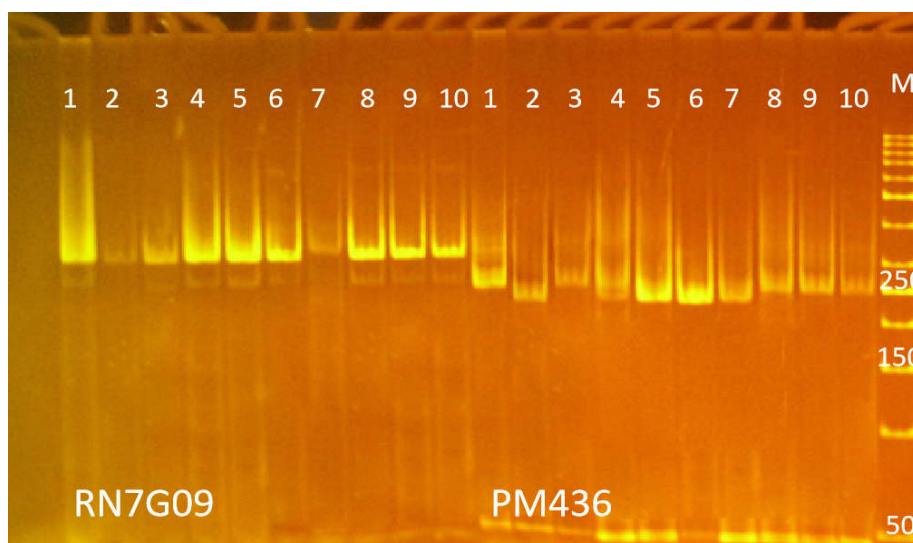


Hình 3. Ảnh điện di sản phẩm PCR của các giống lạc với mỗi RN7D04 và PM377

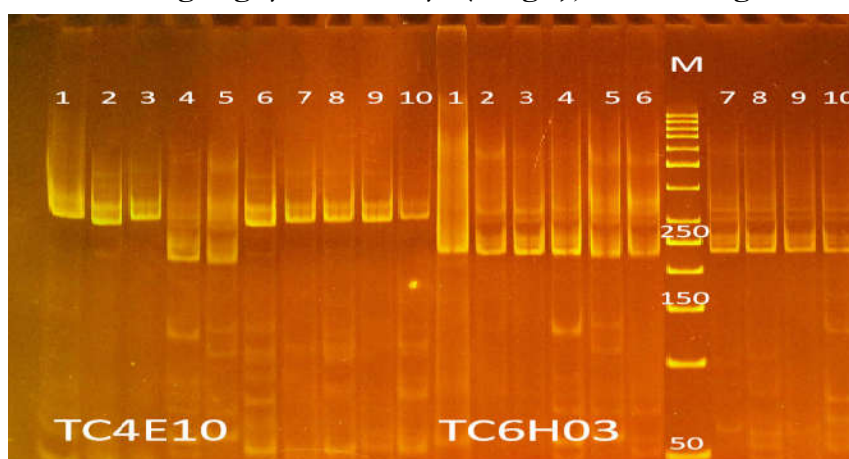
Mẫu 1-10: Các mẫu giống lạc theo kí hiệu (Bảng 1); M: Marker generuler 50 bp

Kết quả điện di sản phẩm PCR của 10 mẫu giống lạc nghiên cứu với mỗi PM377 thu được tổng số 12 băng, thuộc 2 loại băng đa hình. Kích thước băng dao động từ 140 bp đến khoảng 170

bp. Mẫu giống số 2 (lạc Chay trắng) có 1 băng ở vị trí kích thước khoảng 170 bp. Mẫu số 1 (lạc Chay) có 1 băng ở vị trí kích thước khoảng 140 bp (Hình 3).



Hình 4. Ảnh điện di sản phẩm PCR của các giống lạc với mỗi RN7G09 và PM436
Mẫu 1-10: Các mẫu giống lạc theo kí hiệu (Bảng 1); M: Marker generuler 50 bp



Hình 5. Ảnh điện di sản phẩm PCR của các giống lạc với mỗi TC4E10 và TC6H03
Mẫu 1-10: Các mẫu giống lạc theo kí hiệu (Bảng 1); M: Marker generuler 50 bp

Bảng 4. Bảng hệ số tương đồng di truyền giữa 10 mẫu giống lạc nghiên cứu

	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	L9	L10
L1	1									

L2	0,66	1,00								
L3	0,73	0,73	1,00							
L4	0,85	0,56	0,73	1,00						
L5	0,80	0,61	0,73	0,90	1,00					
L6	0,83	0,68	0,71	0,88	0,93	1,00				
L7	0,66	0,71	0,78	0,61	0,66	0,68	1,00			
L8	0,90	0,61	0,83	0,90	0,85	0,88	0,66	1,00		
L9	0,93	0,59	0,80	0,93	0,88	0,90	0,68	0,98	1,00	
L10	0,80	0,71	0,78	0,80	0,76	0,78	0,66	0,85	0,88	1,00

Trương tự, kết quả điện di sản phẩm PCR của 10 mẫu giống lạc nghiên cứu với mỗi PM436 và TC4E10 cũng cho thấy sự khác biệt giữa 2 mẫu giống số 1 (lạc Chay) và số 2 (lạc Chay trắng) với các băng ở vị trí kích thước khác nhau (Hình 4 và 5).

Như vậy dựa vào bốn chỉ thị RN1A10, PM377, PM436 và TC4E10 có thể phân biệt được 2 mẫu giống lạc Chay và lạc Chay trắng.

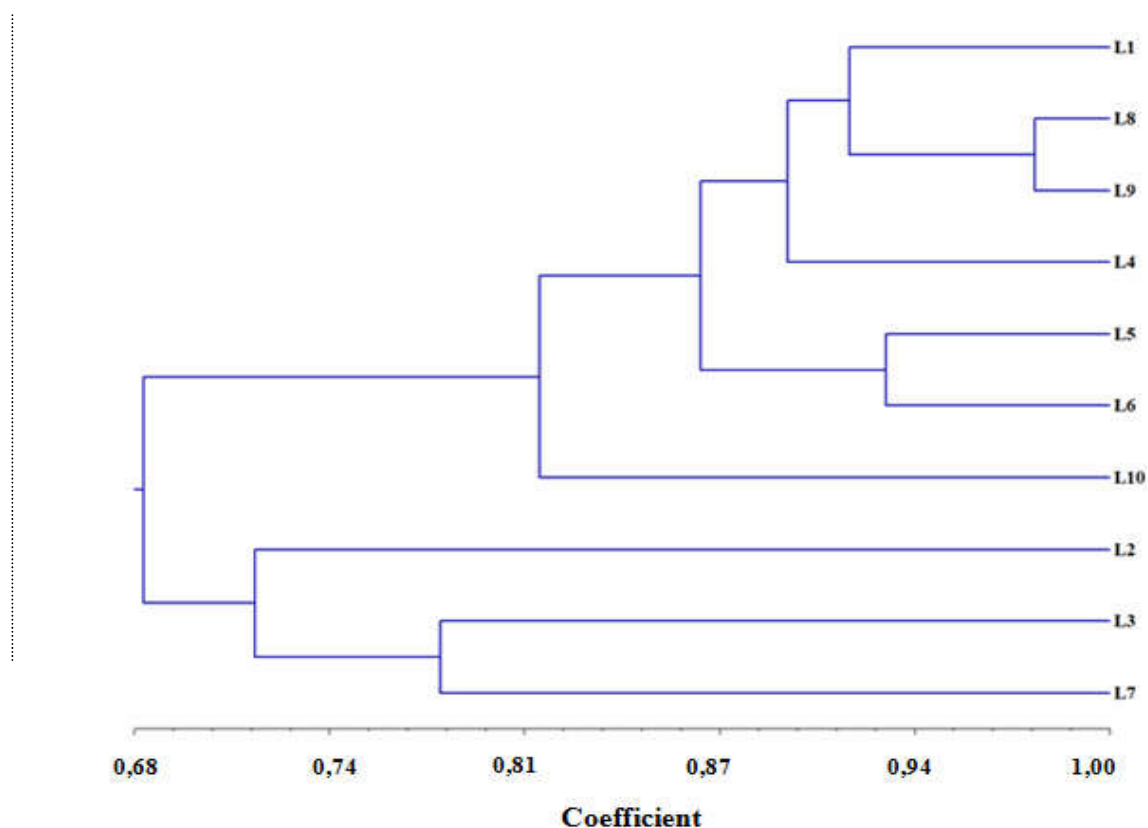
Số liệu thu được từ bản điện di 24 mỗi SSR của 10 mẫu giống lạc được thống kê và phân tích bằng phần mềm NTSYSpC 2,1, thiết lập bảng hệ số tương đồng di truyền (Bảng 3) và xây dựng sơ đồ phát sinh chủng loại (Hình 6). Kết quả cho thấy hệ số tương đồng di truyền của 10 giống lạc nghiên cứu dao động trong khoảng từ 0,56 đến 0,98. Ở

mức tương đồng di truyền 74%, 10 giống lạc nghiên cứu được chia thành 3 nhóm cách biệt di truyền:

- Nhóm I gồm 7 mẫu giống lạc là L1, L8, L9, L4, L5, L6 và L10. Hệ số tương đồng di truyền giữa các mẫu giống trong nhóm dao động trong khoảng 0,76 (giữa mẫu giống L5 và L10) đến 0,98 (giữa mẫu giống L8 và L9).

- Nhóm II gồm duy nhất mẫu giống L2, có hệ số tương đồng di truyền với các mẫu giống còn lại dao động từ 0,56 (giữa mẫu giống L2 với mẫu giống L4) đến 0,73 (giữa mẫu giống L2 với mẫu giống L3). Mẫu giống L2 (lạc Chay trắng) có mức tương đồng với mẫu giống L1 (lạc Chay) là 0,66.

- Nhóm III gồm 2 mẫu giống là L3 và L7 có mức tương đồng với nhau là 0,78.



Hình 6. Sơ đồ mối quan hệ di truyền giữa các mẫu giống lạc nghiên cứu

4. KẾT LUẬN

Kết quả phân tích 24 chỉ thị phân tử SSR với 10 mẫu giống lạc thu được 14 chỉ thị cho kết quả đa hình (chiếm 58,33%) và 10 chỉ thị cho kết quả đơn hình (chiếm 41,67%). Bốn chỉ thị RN1A10, PM377, PM436 và TC4E10 có thể phân biệt được 2 mẫu giống lạc Chay và lạc Chay trắng.

Mức độ đa dạng di truyền giữa các mẫu giống lạc khá cao. Hệ số tương đồng di truyền giữa các mẫu giống lạc dao động từ 0,56 đến 0,98. Mẫu giống lạc Chay trắng có mức tương đồng với mẫu giống lạc Chay là 0,66. Ở mức tương đồng di truyền 74% mười mẫu giống lạc nghiên cứu được chia thành 3 nhóm cách biệt di truyền.

Kết quả này góp phần phục vụ công tác thu thập, phân loại, đánh giá và bảo tồn nguồn gen, cũng như cung cấp thông tin về mối quan hệ di truyền giữa giống lạc Chay, lạc Chay trắng và một số các giống lạc khác làm cơ sở cho các chương trình chọn tạo giống và các hướng nghiên cứu tiếp theo.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. FAOSTAT (2018). Truy cập tại: <http://www.fao.org/faostat/en/#home>.
2. Lưu Minh Cúc (2009). *Sử dụng chỉ thị vi vệ tinh trong lập bản đồ gen kháng bệnh đốm lá muện ở lạc (Arachis hypogaea L.) phục vụ công tác chọn tạo giống*. Luận án tiến sĩ Nông nghiệp. Viện Khoa học Kỹ thuật Nông nghiệp Việt Nam. 159 trang.
3. Nguyễn Thị Lý và cs (2011). *Kết quả nghiên cứu và phát triển nguồn gen cây lạc cho vùng trung du và miền núi phía Bắc. Kỷ yếu Hội nghị Khoa học và Công nghệ nông nghiệp*. Nxb Nông nghiệp.
4. Doyle, J. J., Doyle, J. L. (1987). A rapid AND isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, V.19, p.11-15.

EVALUATION OF GENETIC DIVERSITY OF CHAY AND WHITE CHAY PEANUT VARIETIES

**Dong Thi Kim Cuc, Nguyen Thi Ly,
Duong Hong Mai, Nguyen Huu Hai, Tran Dang Khanh**

Summary

The method of applying molecular markers in breeding is used to shorten the time of selection and breeding in order to overcome the weaknesses of traditional methods. Evaluation of genetic diversity of peanut accessions is essential in breeding. Materials used in the study were 10 peanut accessions provided by the Plant Resource Center. Using some common chemicals used in molecular biology research, chemicals for PCR reactions, SSR primers used in IDT's research. The data was transferred to the NTSYSpc 2.1 program for analysis, finding the genetic similarity coefficient (Jaccard) and establishing a phylogenetic tree. The results obtained 14 indicators giving polymorphic results (58.33%) and 10 indicators giving monomorphic results (41.67%). Four indicators RN1A10, PM377, PM436 and TC4E10 could distinguish 2 varieties of Chay and white Chay peanuts. The coefficient of genetic similarity between the peanut accessions ranged from 0.56 to 0.98. The white Chay peanut variety sample has a similarity with the Chay peanut variety sample of 0.66. At the genetic similarity level of 74%, ten samples of peanut accessions studied were divided into 3 groups of genetic isolation.

Keywords: *Chay peanut, Chay trang peanut, molecular markers.*

Người phản biện: GS.VS.TSKH. Trần Đình Long

Ngày nhận bài: 5/9/2022

Ngày thông qua phản biện: 23/9/2022

Ngày duyệt đăng: 30/9/2022

NGHIÊN CỨU NHÂN GIỐNG BẠCH ĐÀN LAI DH32-29 BẰNG KỸ THUẬT NUÔI CẤY MÔ TẾ BÀO

Nguyễn Thị Hiền^{1*}, Văn Thu Huyền¹, Đồng Thị Ung¹,
Nguyễn Anh Dũng¹, Lê Thị Hoa¹, Lưu Thị Quỳnh¹,
Hoàng Thị Hồng Hạnh¹, Mai Thị Phương Thúy¹

TÓM TẮT

Thí nghiệm nhân giống bằng phương pháp nuôi cấy *in vitro* cho giống Bạch đàn DH32-29 được thực hiện nhằm xây dựng quy trình nhân giống bằng nuôi cấy mô và cung cấp giống với chất lượng di truyền ổn định cho rừng trồng. Kết quả nghiên cứu cho thấy khử trùng mẫu vật bằng HgCl₂ 0,05% trong 8 phút cho tỷ lệ mẫu sạch nảy chồi đạt tới 46,7%. Môi trường Murashige và Skoog cải tiến (MS*) + 1 mg/l BAP + 0,1 mg/l kinetin cho tỉ lệ tái sinh chồi cao nhất (đạt 100%) và cho số chồi trung bình tái sinh/nách lá cũng cao nhất (1,8 chồi/nách lá). Hệ số nhân chồi đạt 3,6 lần và chất lượng chồi tốt sau 20 ngày nuôi cấy trong môi trường MS cải tiến có bổ sung 1,0 mg/l BAP+ 0,5 mg/l Kn. Tỷ lệ ra rễ đạt 93,3% sau 10 ngày nuôi cấy trong môi trường 1/2 MS cải tiến + 1,0 mg/l IBA. Thời gian huấn luyện tại vườn ươm từ 11-14 ngày cho tỷ lệ sống cao nhất đạt 88,4%.

Từ khóa: Bạch đàn lai dòng DH32-29, chất điều hòa sinh trưởng, hệ số nhân chồi, môi trường MS, ra rễ *in vitro*.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Giống Bạch đàn DH32-29 là giống lai giữa Bạch đàn uro với Bạch đàn grandis (*E. urophylla* x *E. grandis*) do Lâm trường Dong Men Quảng Tây, Trung Quốc và Trung tâm Nghiên cứu Bạch đàn Trung Quốc chọn tạo và phát triển. Đây là giống lai sinh trưởng nhanh, chất lượng gỗ tốt và được gây trồng rộng rãi ở các tỉnh phía Đông Nam Trung Quốc [1]. Giống Bạch đàn DH32 - 29 được nhập nội vào Việt Nam từ năm 2006 - 2007 và được gây trồng chủ yếu ở các tỉnh phía Bắc như Lạng Sơn, Cao Bằng, Bắc Giang. Kết quả khảo nghiệm và trồng thử trên một số lập địa cho thấy giống này có sinh trưởng nhanh, trên một số lập địa tốt và được thâm canh phù hợp sau 3 năm có thể đạt đường kính trên 15 cm và chiều cao đạt từ 12 đến 15 m [2]. Năm 2017, Trung tâm Nghiên cứu Bạch đàn Trung Quốc đã chuyển giao giống này cho Viện Nghiên cứu Giống và Công nghệ sinh học lâm nghiệp để tiếp tục khảo nghiệm và phát triển ở Việt Nam. Giống Bạch đàn DH32-29 đã được công nhận là giống cây trồng lâm nghiệp mới cho trồng

rừng theo Quyết định số 4572/QĐ-BNN-TCLN ngày 8 tháng 11 năm 2017 của Bộ Nông nghiệp và PTNT.

Để đưa nhanh các giống tốt đã được công nhận vào sản xuất thì phương pháp nhân giống bằng kỹ thuật nuôi cấy mô tế bào đang được áp dụng rộng rãi. Đã có nhiều kết quả nghiên cứu về nhân giống bằng nuôi cấy mô đối với bạch đàn nói chung và bạch đàn lai nói riêng, tuy nhiên, mỗi giống lại phản ứng với điều kiện nuôi cấy khác nhau nên cần có nghiên cứu cụ thể cho từng đối tượng. Kế thừa các nghiên cứu về nhân giống bạch đàn lai bằng nuôi cấy mô trước đây, bài báo này trình bày kết quả nghiên cứu nhân giống Bạch đàn lai DH32-29 bằng phương pháp nuôi cấy mô tế bào để hoàn thiện quy trình sản xuất cây giống *in vitro* nhằm cung cấp nguồn cây giống có chất lượng, được kiểm soát nguồn gốc giống phục vụ cho trồng rừng.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Các chồi bánh tẻ thu từ cây mẹ 1 - 1,5 tuổi của giống Bạch đàn DH32 - 29 tại vườn ươm của Viện

¹ Viện Nghiên cứu Giống và Công nghệ sinh học lâm nghiệp

*Email: jamihien20198@gmail.com

Nghiên cứu Giống và Công nghệ sinh học lâm nghiệp.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Nghiên cứu được tiến hành theo các bước tạo mẫu sạch, tái sinh chồi, nhân chồi, ra rễ và tạo cây con hoàn chỉnh. Các chồi bánh tẻ dài 10 – 15 cm được thu trên cây mẹ đã được xử lý tạo chồi trước thời điểm lấy mẫu 2 tháng. Các chồi được cắt bỏ lá (để lại cuống lá), rửa mẫu dưới vòi nước chảy bằng chổi lông mềm, sau đó rửa mẫu bằng nước xà phòng loãng và làm sạch mẫu dưới vòi nước chảy.

2.2.1. Xác định công thức khử trùng thích hợp

Mẫu cấy được đựng trong bình scott, sau đó lắc mẫu trong dung dịch $HgCl_2$ (clorua thủy ngân) ở các nồng độ 0,05% và 0,1% với thời gian là 2, 4, 6, 8, 10, 12 phút, sau đó dùng nước cất đã hấp khử trùng tráng mẫu 4 - 5 lần. Mẫu vật được nuôi cấy trong môi trường MS [3], được bổ sung 30 g/l đường sucrose và 3,5 g/l agar.

2.2.2. Xác định môi trường tái sinh chồi, nhân chồi và nâng cao chất lượng chồi

- *Nghiên cứu ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng tái sinh chồi:*

Các chồi mới tái sinh được nuôi cấy trong môi trường MS cải tiến được kế thừa từ các nghiên cứu trước đây (MS*) có bổ sung BAP (6-Benzyleaminopurine) ở các nồng độ 0,25 mg/l; 0,5 mg/l; 0,75 mg/l; 1 mg/l và kinetin 0,1 mg/l.

- *Nghiên cứu ảnh hưởng kết hợp của BAP và Kinetin đến khả năng nhân nhanh chồi:*

Các chồi hữu hiệu (chồi có chiều cao từ 1,5 cm trở lên) được cấy chuyển trong môi trường MS* có bổ sung BAP ở các nồng độ 0,1 mg/l; 0,5 mg/l; 1,0 mg/l; 1,5 mg/l; 2,0 mg/l và 2,5 mg/l, bổ sung kinetin nồng độ 0,5 mg/l.

2.2.3. Xác định môi trường ra rễ thích hợp

Các chồi có chiều cao từ 2 cm trở lên, có thân, lá ngọn rõ ràng và nhiều hơn 2 cặp lá sẽ được cấy chuyển sang môi trường ra rễ 1/2 MS* có bổ sung

IBA (Indole butiric axit) ở các nồng độ 0,5 mg/l; 1 mg/l; 1,5 mg/l; 2 mg/l và 2,5 mg/l.

Các thí nghiệm được thực hiện ở điều kiện phòng thí nghiệm, các dụng cụ sử dụng và môi trường nuôi cấy mô được hấp khử trùng ở 121°C trong thời gian 20 phút, pH của các môi trường nuôi cấy được điều chỉnh ở 5,8.

Giai đoạn nhân nhanh chồi được nuôi trong điều kiện chiếu sáng 10 giờ/ngày với cường độ chiếu sáng 2.000- 3.000 lux trong 3 ngày, sau đó chuyển sang điều kiện tối hoàn toàn trong thời gian 8 - 10 ngày và cuối cùng chuyển sang điều kiện chiếu sáng 10 giờ/ngày với cường độ chiếu sáng 2.000 - 3.000 lux trong thời gian còn lại của chu kỳ nuôi (20 - 25 ngày).

2.2.4. Phương pháp huấn luyện cây mô

Cây mô có rễ hoàn chỉnh trong bình được chuyển ra khu huấn luyện trong điều kiện nhiệt độ và ánh sáng tự nhiên ở các thời gian khác nhau 5, 10, 15 và 20 ngày. Sau đó cây mô được lấy ra khỏi bình, rửa sạch thạch bám ở rễ rồi cấy vào bầu đất ngoài vườn ươm (thành phần bầu đất gồm 70% đất + 20% than trấu + 10% phân chuồng hoai). Sau khi cấy xong dùng vòm có phủ kín bằng nilông trắng, trên là lưới đen có độ che sáng 75% trong 10 ngày đầu sau khi cấy. Sau đó bỏ dần nilông, chỉ che lưới có độ che sáng 50%, khi cây được 20 - 25 ngày có thể bỏ hoàn toàn lưới che.

2.3. Phương pháp thu thập và xử lý số liệu

- *Bố trí thí nghiệm:* các thí nghiệm được bố trí ngẫu nhiên 3 lần lặp, 30 mẫu/lặp/công thức thí nghiệm.

- *Thu thập số liệu:*

+ *Khử trùng, tạo mẫu sạch in vitro:* số mẫu sạch nảy chồi, mẫu sạch chết và mẫu nhiễm sau 30 ngày khử trùng.

+ *Tái sinh chồi:* số chồi tái sinh, số chồi/nách lá, chất lượng chồi sau 4 tuần nuôi cấy.

+ *Nhân chồi:* số chồi mới hình thành, chất lượng chồi sau 20 ngày nuôi cấy.

+ Ra rễ: số chồi ra rễ, số rễ/chồi, chiều dài rễ, hình thái rễ sau 10 ngày nuôi cấy.

+ Huấn luyện: tỷ lệ cây sống (%), chiều cao cây (cm), thu thập số liệu sau 45 ngày kể từ khi cấy cây mô ra bầu đất.

- Xử lý số liệu:

$$\text{Tỷ lệ mẫu sạch nảy chồi (\%)} = \frac{\text{Tổng số mẫu sạch nảy chồi}}{\text{Tổng số mẫu ban đầu}} \times 100$$

$$\text{Tỷ lệ mẫu chết (\%)} = \frac{\text{Tổng số mẫu chết}}{\text{Tổng số mẫu ban đầu}} \times 100$$

$$\text{Tỷ lệ mẫu nhiễm (\%)} = \frac{\text{Tổng số mẫu chết}}{\text{Tổng số mẫu ban đầu}} \times 100$$

$$\text{Hệ số nhân chồi (lần)} = \frac{\text{Tổng số chồi mới hình thành}}{\text{Tổng số chồi ban đầu}}$$

$$\text{Tỷ lệ ra rễ (\%)} = \frac{\text{Tổng số chồi ra rễ}}{\text{Tổng số chồi nuôi cấy}} \times 100$$

Các số liệu được xử lý thống kê bằng Excel và SPSS sử dụng tiêu chuẩn F theo đó nếu xác suất của F tính (Sig) nhỏ hơn 0,05 là có sự sai khác giữa các công thức thí nghiệm.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả xác định chế độ khử trùng thích hợp

Bảng 1. Ảnh hưởng của chế độ khử trùng đến hiệu quả tạo mẫu sạch của bạch đàn (sau 4 tuần nuôi cấy)

Hóa chất	Thời gian(phút)	Số mẫu thí nghiệm	Mẫu sạch nảy chồi		Mẫu sạch chết		Mẫu nhiễm	
			Số mẫu	Tỷ lệ (%)	Số mẫu	Tỷ lệ(%)	Số mẫu	Tỷ lệ (%)
HgCl ₂ 0,05%	2	90	1	1,1	4	4,4	85	94,4
	4	90	13	14,4	6	6,7	71	78,9
	6	90	21	23,3	10	11,1	59	65,6
	8	90	42	46,7	12	13,3	36	40,0

	10	90	19	21,1	46	51,1	25	27,8
	12	90	0	0,0	50	55,6	40	44,4
HgCl ₂ 0,1%	2	90	15	16,7	7	7,8	68	75,6
	4	90	36	40,0	16	17,8	39	43,3
	6	90	24	26,7	43	47,8	23	25,6
	8	90	3	3,3	44	48,9	43	47,8
	10	90	0	0,0	53	58,9	37	41,1
	12	90	0	0,0	74	82,2	16	17,8
Sig					<0,001			

Clorua thủy ngân (HgCl₂) là một trong những hóa chất được sử dụng phổ biến để khử trùng cho mẫu vật trong nuôi cấy mô, song đặc điểm mẫu vật nuôi cấy ở từng loài là khác nhau, ngay cả trong loài, trên cùng 1 cây mẹ, các vị trí lấy mẫu vật khác nhau được sử dụng nồng độ và thời gian khử trùng khác nhau cũng sẽ cho kết quả khác nhau [4]. Do đó, cần lựa chọn nồng độ và thời gian khử trùng thích hợp để vừa đảm bảo tỷ lệ mẫu nhiễm thấp vừa đảm bảo tỷ lệ mẫu nảy chồi cao và chồi tạo được cần có khả năng sinh trưởng, phát triển tốt. Nếu nồng độ hóa chất thấp và thời gian khử trùng chưa đủ, các nguồn bụi bẩn, nấm bệnh, khuẩn... trên mẫu vật sẽ không thể được loại trừ hết; ngược lại, nếu nồng độ hóa chất quá cao hoặc thời gian khử trùng quá dài, hóa chất sẽ ngấm sâu và phá vỡ cấu trúc tế bào, ảnh hưởng đến sinh trưởng, làm giảm khả năng tái sinh chồi [5].

Kết quả ở bảng 1 cho thấy, khi sử dụng HgCl₂ 0,05% để khử trùng mẫu với số lần và thời gian khử trùng khác nhau đã có ảnh hưởng rõ rệt tới khả năng tạo mẫu sạch (Sig<0,001). Thời gian khử

trùng 8 phút đem lại hiệu quả khử trùng tốt nhất với tỷ lệ mẫu sạch nảy chồi là 46,7%. Khử trùng trong thời gian 2 phút hiệu quả khử trùng thấp nhất với tỉ lệ mẫu sạch nảy chồi là 1,1%. Khi tăng thời gian khử trùng quá 10 phút thì không thu được mẫu sạch nảy chồi, tỉ lệ mẫu sạch chết lên đến 55,6%. Với nồng độ HgCl₂ 0,1% thì thời gian 4 phút đem lại hiệu quả khử trùng tốt nhất với tỷ lệ mẫu sạch nảy chồi là 40,0%. Khử trùng trong thời gian 2 phút hiệu quả khử trùng thấp nhất với tỉ lệ mẫu sạch nảy chồi là 16,7%. Khi tăng thời gian khử trùng quá 8 phút không thu được mẫu sạch nảy chồi, tỉ lệ mẫu sạch chết khá cao lên đến 82,2%. Kết quả nghiên cứu cho thấy phương pháp khử trùng sử dụng HgCl₂ 0,05% trong thời gian 8 phút là tốt nhất cho giống Bạch đàn DH32-29.

Tương tự, clorua thủy ngân được Đoàn Thị Mai và Lê Sơn (2011) [6] thực hiện trên Bạch đàn lai UE35 (*E. urophylla* x *E. exserta*), kết quả cho thấy sử dụng HgCl₂ nồng độ 0,1%, thời gian khử trùng 10 phút, cho tỷ lệ mẫu bật chồi đạt 16,4%. Một số nghiên cứu khác cũng cho thấy sử dụng

HgCl₂ 0,05% trong thời gian 6-7 phút đem lại hiệu quả khử trùng tốt nhất trên một số dòng Bạch đàn lai UP [7], [8].



Hình 1. Mẫu sạch Bạch đàn DH 32-29 nảy chồi sau 4 tuần nuôi cấy

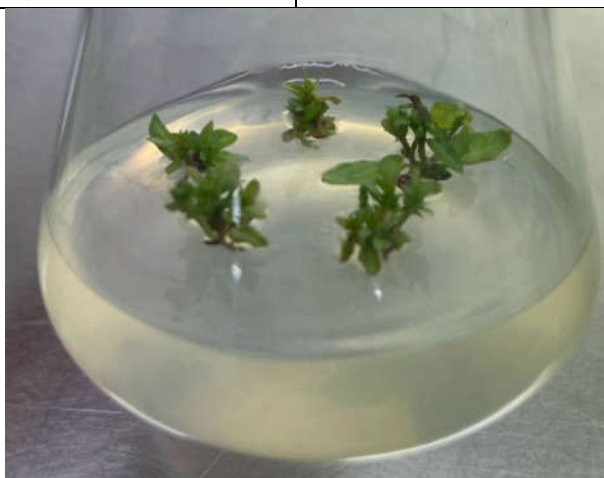
3.2. Xác định môi trường tái sinh và nhân nhanh chồi

3.2.1. Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng tái sinh chồi

Bảng 2 cho thấy Bạch đàn DH 32-29 có khả năng tái sinh chồi cao, đạt 100% ở các công thức thí nghiệm. Mặc dù vậy trong môi trường nuôi cấy khi sử dụng kết hợp các chất điều hòa sinh trưởng (ĐHST) ở các nồng độ khác nhau thì số chồi tái sinh/nách lá khác nhau. Trong môi trường nuôi cấy chỉ bổ sung BAP 0,25 mg/l thì số chồi tạo ra/nách lá trung bình thấp nhất (0,7 chồi). Khi bổ sung thêm 0,1 mg/l kinetin và tăng nồng độ BAP thì số chồi tạo ra/nách lá tăng rõ rệt (1,3-1,8 chồi). Trong nghiên cứu này, công thức tốt nhất tái sinh chồi Bạch đàn DH32-29 là môi trường MS được bổ sung 1 mg/l BAP + 0,1 mg/l kinetin cho số chồi trung bình tạo ra/nách lá cao nhất (1,8 chồi).

Bảng 2. Ảnh hưởng của chất ĐHST đến khả năng tái sinh chồi Bạch đàn DH32-29

Công thức thí nghiệm		Tỉ lệ mẫu tái sinh (%)	Số chồi trung bình tạo ra/nách lá
BAP(mg/l)	Kinetin(mg/l)		
0,25	0,0	100	0,7
0,50		100	0,9
0,75		100	1,0
1,00		100	1,2
0,25	0,1	100	1,3
0,50		100	1,4
0,75		100	1,6
1,00		100	1,8
Sig.		<0,001	



Hình 2. Chồi Bạch đàn DH 32-29 tái sinh sau 2 tuần cấy chuyển sang môi trường MS + 1,0 mg/l BAP + 0,1 mg/l kinetin

3.2.2. Ảnh hưởng của BAP và Kinetin đến khả năng nhân nhanh chồi

Các chất điều hòa sinh trưởng BAP và kinetin có vai trò rất quan trọng trong nhân chồi và nâng cao chất lượng chồi. Các kết quả nghiên cứu trước đây trên các đối tượng Bạch đàn lai UP [9] đã chỉ ra rằng hàm lượng kinetin 0,5 mg/l là tối ưu cho quá trình nhân chồi bạch đàn, do đó trong nghiên cứu này chỉ sử dụng kinetin nồng độ 0,5 mg/l kết hợp với BAP ở các nồng độ khác nhau để tìm ra công thức môi trường tốt nhất cho nhân nhanh chồi.

Kết quả nghiên cứu ở bảng 3 cho thấy, nồng độ BAP khác nhau có ảnh hưởng rõ rệt đến hệ số nhân chồi và chất lượng chồi của Bạch đàn DH 32-29. Ở nồng độ BAP thấp là 0,1 mg/l hệ số nhân chồi chỉ đạt 1,5 và ở nồng độ BAP cao là 2,5 mg/l hệ số nhân chồi chỉ đạt 1,2, chất lượng chồi

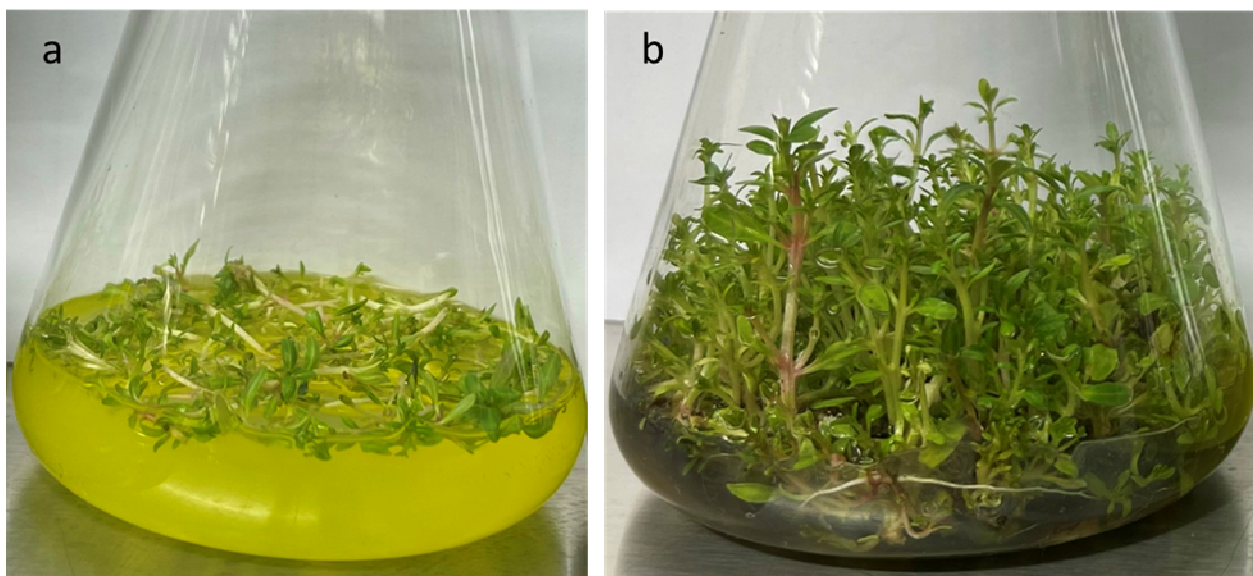
xấu. Như vậy, khi sử dụng hàm lượng BAP ở mức độ thích hợp thì giúp tăng hiệu quả nhân chồi, tạo cụm chồi to khỏe, thân chồi mập, chất lượng chồi tốt song nếu bổ sung với nồng độ thấp hoặc quá cao thì không những không làm tăng hiệu quả nhân chồi mà thậm chí còn làm cho hệ số nhân chồi bị giảm, chồi mới hình thành nhỏ và yếu. Từ kết quả ở bảng 3 cho thấy, đối với dòng Bạch đàn DH 32-29, khi sử dụng phối hợp môi trường 1,0 mg/l BAP kết hợp với 0,5 mg/l kinetin (Kn) cho kết quả hệ số nhân chồi là cao nhất đạt 3,6. Hệ số nhân chồi của bạch đàn DH32-29 (3,6) trong nghiên cứu này cao hơn so với một số dòng Bạch đàn lai UP [8], [9], hay dòng Bạch đàn lai UE35 [6].

Ngoài ra, ở công thức nồng độ này không những tăng hệ số nhân chồi mà còn giúp chồi phát triển đồng đều, lá mở hơn là tiền đề cho giai đoạn tạo rễ (Hình 3).

Bảng 3. Kết quả ảnh hưởng phối hợp của BAP + 0,5 mg/l Kn đến hệ số nhân chồi của Bạch đàn DH 32-29 (sau 20 ngày nuôi cấy)

Kinetin (mg/l)	BAP (mg/l)	Tổng số chồi ban đầu	Tổng số chồi mới thu được	Hệ số nhân chồi	Chất lượng chồi
0,5	0,1	90	135	1,5	+
	0,5	90	260	2,9	+++
	1,0	90	325	3,6	+++
	1,5	90	230	2,6	+++
	2,0	90	170	1,9	++
	2,5	90	110	1,2	+
<i>Sig.</i>		<0,001			

Ghi chú: (+) Màu sắc chồi kém xanh, thân chồi rất mảnh, thân phân lóng kém; (++) Màu sắc chồi xanh, thân chồi mảnh, thân phân lóng rõ ràng; (+++) Màu sắc chồi xanh, chồi mập, thân phân lóng rõ ràng.



Hình 3. Bạch đàn DH32-29 trong môi trường MS* + 1,0 mg/l BAP + 0,5 mg/l Kn khi chồi bắt đầu cho vào cấy nhân (a) và sau 15 ngày nuôi cấy (b)

3.3. Xác định môi trường ra rễ cho dòng Bạch đàn DH32-29

Chất điều hòa sinh trưởng IBA có vai trò rất quan trọng trong việc tạo rễ của cây nhân giống bằng nuôi cấy mô. Các nghiên cứu trước đây đã chỉ ra rằng sử dụng chất ĐHST cho kết quả tốt hơn so với đối chứng (không có chất ĐHST). Kết

quả ở bảng 4 cho thấy, môi trường 1/2MS* bổ sung 1,0 mg/l IBA cho tỷ lệ rễ đạt cao nhất (93,3%), chiều dài rễ 2,3 cm, rễ dài, trắng, khỏe. Trong khi đó, nếu bổ sung IBA ở các nồng độ thấp hơn hoặc cao hơn đều cho kết quả thu được thấp hơn, cụ thể tỉ lệ ra rễ chỉ đạt 46,7-77,8%, chiều dài rễ từ 0,5 đến 1,5 cm, rễ ngắn, mảnh, dễ gãy.

Bảng 4. Ảnh hưởng của IBA đến khả năng ra rễ của Bạch đàn DH32-29

Nồng độ IBA (mg/l)	Tỷ lệ chồi ra rễ (%)	Số rễ/chồi (cái)	Chiều dài rễ (cm)	Hình thái rễ
0,5	77,8	1,3	0,6	Rễ ngắn, giòn, dễ gãy
1,0	93,3	2,2	2,3	Rễ dài, trắng, khỏe
1,5	72,2	2,1	1,5	Rễ dài, khỏe
2,0	57,8	1,8	0,9	Rễ mảnh, đầu rễ đen
2,5	46,7	1,5	0,5	Rễ ngắn, dễ gãy, đầu rễ đen
Sig.	<0,001			

Triệu Thị Thu Hà và Cán Thị Lan(2015)[7] khi sử dụng môi trường có nồng độ IBA 1,0 mg/l cho một số dòng Bạch đàn UP cũng cho tỷ lệ ra rễ cao nhất đạt 92,36%, có 2,29 rễ/cây. Trong khi đó, nghiên cứu của Lê Thị Xuân Quỳnh và cs (2021) [8] trên các dòng Bạch đàn UP164, UP171 và UP223 lại cho thấy tỷ lệ ra rễ khá thấp, đạt 65,6-67,8% khi sử dụng IBA 1,5 mg/l. Điều này càng khẳng định thêm mỗi giống khác nhau thì mức độ phản ứng với môi trường nuôi cấy cũng khác nhau.



Hình 4. Chồi Bạch đàn DH 32-29 ra rễ trong môi trường ra rễ 1/2MS* +1,0 mg/l IBA sau 10 ngày

3.4. Ảnh hưởng của thời gian huấn luyện đến sinh trưởng của cây con ở vườn ươm (sau 45 ngày cấy vào giá thể)

Cây mô sau khi ra rễ trong điều kiện *in vitro* khoảng 10 ngày được chuyển ra khu huấn luyện trong các khoảng thời gian nhất định để thích nghi với điều kiện tự nhiên. Kết quả thí nghiệm về thời gian huấn luyện chồi ra rễ được trình bày trong bảng 5.

Kết quả thí nghiệm cho thấy, đối với Bạch đàn DH 32-29 ra rễ *in vitro*, thời gian huấn luyện tốt nhất là sau khi các chồi ra rễ được 11 - 14 ngày, vào thời điểm này các chồi ra rễ lúc đã đủ cứng cáp để có thể thích nghi dần với điều kiện tự nhiên. Nếu thời gian huấn luyện ít hơn 10 ngày, các rễ và bản thân cây mô còn non nên ảnh hưởng đến khả năng sinh trưởng và phát triển tại vườn ươm. Trong khi đó, nếu thời gian huấn luyện từ 15 ngày trở lên, các rễ quá dài nên khi cấy vào bầu rễ rất dễ bị cong, thời điểm này đầu rễ bắt đầu

chuyển sang màu đen sẽ kìm hãm việc sinh lông hút và làm hạn chế quá trình phát sinh rễ mới sau khi cấy chuyển cây con vào giá thể.

Bảng 5. Kết quả thí nghiệm huấn luyện cây con Bạch đàn DH32-29

Thời gian huấn luyện (ngày)	Tỷ lệ cây sống (%)	Chiều cao trung bình (cm)
0-3	10,4	6,31
4-6	41,5	6,50
7-10	79,7	6,42
11-14	88,4	6,65
15-20	75,3	6,22

4. KẾT LUẬN

Công thức khử trùng đạt hiệu quả tạo mẫu sạch Bạch đàn DH 32-29 cao nhất là sử dụng HgCl₂ 0,05% trong vòng 8 phút với tỉ lệ mẫu sạch nảy mầm cao nhất đạt 46,7%. Môi trường MS + 1,0 mg/l BAP + 0,1 mg/l kinetin cho tỉ lệ tái sinh chồi cao nhất (đạt 100%) và cho số chồi tái sinh/nách lá cũng cao nhất (1,8 chồi/nách lá). Môi trường MS cải tiến + 1,0 mg/l BAP + 0,5 mg/l Kinetin cho hệ số nhân chồi cao nhất đạt 3,6 lần sau 20 ngày nuôi cấy và chất lượng chồi tốt. Môi trường 1/2MS* +1,0 mg/l IBA cho hiệu quả ra rễ tạo cây con hoàn chỉnh tốt nhất với tỉ lệ chồi ra rễ đạt 93,3%; trung bình 2,2 rễ/chồi; chiều dài chồi đạt 2,3 cm và rễ có chất lượng tốt. Thời gian huấn luyện cây con ra rễ trong bình tốt nhất là từ 11-14 ngày đạt tỷ lệ sống là 88,4% và chiều cao cây đạt 6,65 cm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Xie, Y., Arnold, R., Wu, Z., Chen, S., Du A., Luo, L. (2017). Advances in eucalypt research in China. Frontier of Agricultural Science and Engineering, 4(4): 380–390.
2. Viện Nghiên cứu Giống và Công nghệ sinh học lâm nghiệp (2017). Kết quả đánh giá sinh trưởng của giống Bạch đàn DH32-29 trên một số lập địa ở vùng Đông Bắc.

3. Murashige T. and Skoog F. (1962). A resied medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plant*, (15): 473-495.
4. Trần Văn Minh (1997). *Nuôi cấy mô thực vật*. Nhà xuất bản Nông nghiệp, Hà Nội.
5. Nguyễn Đức Thành (2000). *Nuôi cấy mô tế bào thực vật - Nghiên cứu và ứng dụng*. Nhà xuất bản Nông nghiệp, Hà Nội.
6. Đoàn Thị Mai, Lê Sơn (2011). Nghiên cứu nhân nhanh giống Keo lai tự nhiên, Keo lai nhân tạo, Bạch đàn uro, Bạch đàn lai nhân tạo (mới chọn tạo) và Lát hoa bằng công nghệ tế bào. Báo cáo tổng kết đề tài, Trung tâm Nghiên cứu Giống cây rừng, Hà Nội.
7. Triệu Thị Thu Hà, Cấn Thị Lan (2015). Nghiên cứu nhân giống Bạch đàn lai UP (*Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus pellita*) bằng phương pháp nuôi cấy mô tế bào. *Tạp chí Nông nghiệp và PTNT*, Số 6/2015, 124-130.
8. Lê Thị Xuân Quỳnh, Khuất Thị Hải Ninh, Cấn Thị Lan, Kiều Thị Hà, Hà Thị Lệ, Đỗ Hữu Sơn (2021). Nghiên cứu nhân giống một số dòng bạch đàn lai mới (*Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus pellita*) UP223, UP171, UP164 bằng kỹ thuật nuôi cấy *in vitro*. *Tạp chí Khoa học Lâm nghiệp*, Số 5/2021, 24-37.
9. Cấn Thị Lan (2014). Nghiên cứu nhân nhanh một số giống keo và bạch đàn mới bằng công nghệ tế bào thực vật. Báo cáo tổng kết đề tài, Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam.

**STUDY ON PROPAGATION OF *Eucalyptus hybrid* CLONE DH32-29
BY TISSUE CULTURE TECHNIQUE**

**Nguyen Thi Hien, Van Thu Huyen, Dong Thi Ung,
Nguyen Anh Dung, Le Thi Hoa, Luu Thi Quynh,
Hoang Thi Hong Hanh, Mai Thi Phuong Thuy**

Summary

A protocol for the micropropagation of *Eucalyptus hybrid* clones DH32-29 has been developed to provide good quality trees for plantation. As a result, explant sterilization using HgCl₂ 0.05% for 8 minutes gave the highest clean shooting rate at 46.7%. The modified Murashige and Skoog (MS*) medium with or without plant regulators was used for *in vitro* shoot induction, shoot multiplication and root formation. The modified MS medium supplemented with 1 mg/l BAP and 0,1 mg/l kinetin gave the best shooting rate (100%) and highest number of shoot/axillary bud (1.8). The multiplication rate reached 3.6 times after 20 days of culture using MS* medium +1.0 mg/l BAP + 0.5 mg/l kinetin. The highest rooting rate (93.3%) was obtained in 1/2 MS* medium + 1.0 mg/l IBA. The training time at the nursery with the highest survival rate at 88.4% was 11-14 days.

Keywords: *Eucalyptus hybrid clone DH32-29, growth regulators, multiplication rate, MS medium culture, in vitro rooting.*

Người phản biện: TS. Đoàn Ngọc Dao

Ngày nhận bài: 7/9/2022

Ngày thông qua phản biện: 26/9/2022

Ngày duyệt đăng: 3/10/2022

NGHIÊN CỨU NHÂN GIỐNG *IN VITRO* CÂY TẦM BÓP NAM MỸ (*Physalis peruviana* Linnaeus)

Phan Xuân Huyền^{1,*}, Nguyễn Thị Thanh Hằng¹, Đinh Văn Khiêm¹

TÓM TẮT

Cây tầm bóp Nam Mỹ (*Physalis peruviana* Linnaeus) là giống cây ăn quả nhập nội có giá trị kinh tế, quả có nhiều chất dinh dưỡng tốt cho sức khỏe của con người. Hiện nay, trên thế giới đã có công bố nghiên cứu nhân giống *in vitro* cây tầm bóp Nam Mỹ, nhưng ở nước ta chưa có công bố. Trong nghiên cứu này, đã nghiên cứu nhân giống *in vitro* cây tầm bóp Nam Mỹ thông qua phương pháp nuôi cấy đốt thân. Kết quả cho thấy, môi trường MS bổ sung 0,5 mg/l BA, 30 sucrose g/l, 10 g/l agar, pH 5,8 là tốt nhất đến sự tái sinh và sinh trưởng chồi *in vitro*, với chiều cao chồi 6,36 cm, số đốt 4,20 đốt/chồi, số chồi 1 chồi/mẫu. Vị trí đốt thân thứ 2 đến thứ 4 là thích hợp làm nguồn vật liệu để nhân giống *in vitro*. Môi trường MS bổ sung 1 - 1 mg/l IBA, 30 sucrose g/l, 1 g/l than hoạt tính, 10 g/l agar, pH 5,8 là tốt nhất đến sự tạo rễ *in vitro*, với tỷ lệ tạo rễ đạt 100%. Chuyển cây cấy mô ra ngoài vườn ươm, giá thể vụn xơ dừa là tốt nhất đến sự thích nghi và sinh trưởng của cây, với tỷ lệ sống đạt 100%, chiều cao cây 12,50 cm. Cây sinh trưởng phát triển tốt trên giá thể vụn xơ dừa trong điều kiện nhà màng, cây có chiều cao 44,50 và 68,72 cm sau 45 và 60 ngày nuôi trồng. Sau 60 ngày nuôi trồng tất cả các cây đều ra hoa, sau 90 ngày nuôi trồng quả bắt đầu già chín, khối lượng tươi của quả 7,37 g/quả.

Từ khóa: Cây tầm bóp Nam Mỹ, môi trường MS, sinh trưởng, tái sinh, trong ống nghiệm.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây tầm bóp Nam Mỹ (*Physalis peruviana* Linnaeus) là một giống cây ăn trái có giá trị kinh tế, quả có nhiều chất dinh dưỡng tốt cho sức khỏe của con người. Trên thế giới quả tầm bóp Nam Mỹ được xếp hạng 1 trong 10 loại trái cây ngon nhất, ở nước ta quả tầm bóp Nam Mỹ được đánh giá 1 trong 12 loại quả đặc sản của tỉnh Lâm Đồng [1, 2, 3, 4]. Do đó, việc tiến hành nghiên cứu nhân giống *in vitro* và nuôi trồng thuần hóa cây tầm bóp Nam Mỹ ở nước ta là cần thiết.

Trên thế giới hiện nay đã có nghiên cứu nhân giống *in vitro* thành công cây tầm bóp Nam Mỹ [4, 5, 6, 7, 8, 9], nhưng ở Việt Nam chưa có công bố nghiên cứu nhân giống *in vitro*, cũng như nghiên cứu sự sinh trưởng, phát triển của cây tầm bóp Nam Mỹ cấy mô trong điều kiện nhà màng. Theo phương pháp nhân giống truyền thống bằng hạt và giám canh có những hạn chế như: cây bị phân ly tính trạng, hạt giống có tỉ lệ nảy mầm thấp; không tạo ra một số lượng lớn cây giống để trồng trên

quy mô công nghiệp, cây giống không đồng nhất, thường bị nhiễm bệnh và thoái hóa, cây sinh trưởng, phát triển kém và cho năng suất thấp. Ứng dụng công nghệ sinh học, nuôi cấy mô tế bào thực vật trong nhân giống *in vitro* cây tầm bóp Nam Mỹ sẽ khắc phục những hạn chế của phương pháp nhân giống trồng truyền thống. Trong nghiên cứu này, đã khảo sát ảnh hưởng của các chất điều hòa sinh trưởng đến sự tái sinh chồi *in vitro*, tạo cây hoàn chỉnh *in vitro*, chuyển cây cấy mô ra ngoài vườn ươm và theo dõi sự sinh trưởng, phát triển của cây trồng trên giá thể vụn xơ dừa trong điều kiện nhà màng. Kết quả của nghiên cứu góp phần cung cấp dữ liệu khoa học về nghiên cứu nhân giống *in vitro* cây tầm bóp Nam Mỹ và hướng đến cung cấp cây giống cấy mô.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Vật liệu: cây tầm bóp Nam Mỹ của Công ty TNHH Ngọc Tiên Physa trồng tại Đơn Dương - Lâm Đồng, thu cây giống về Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên để nghiên cứu. Những cành non của cây tầm bóp Nam Mỹ (Hình 1a) được chọn để khử trùng mẫu đưa vào ống nghiệm. Mẫu sau khi thu về được rửa sạch bằng nước xà phòng,

¹ Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

*Email: phanxuanhuyen1974@gmail.com

sau đó khử trùng bằng cồn 70° trong thời gian 1 phút, rửa lại mẫu bằng nước cất vô trùng 6 lần. Cuối cùng khử trùng bằng dung dịch NaOCl 2% trong thời gian 10 phút, rửa lại mẫu bằng nước cất vô trùng 6 lần. Mẫu sau khi khử trùng được cắt thành những đoạn khoảng 1 cm có mang đốt thân và cấy trên môi trường MS [10] bổ sung 0,1 mg/l BA [11] tạo chồi *in vitro* (Hình 1b). Những chồi *in vitro* này được tiếp tục cấy sang môi trường mới để tạo thêm nhiều chồi *in vitro* và các chồi này được sử dụng làm nguồn vật liệu cho các thí nghiệm (Hình 1c).

Môi trường: MS là môi trường được sử dụng cho những nghiên cứu nhân giống *in vitro*, tùy theo mục đích của các thí nghiệm mà bổ sung các chất điều hòa sinh trưởng thực vật như: BA (6-benzyl adenin), Kinetin, TDZ (Thidiazuron) và IBA (Indole-3-butyric axit). Giá thể nghiên cứu chuyển cây cấy mô ra ngoài vườn ươm là vụn xơ dừa và đất mùn.

Điều kiện nuôi cấy: đối với những thí nghiệm *in vitro*, thời gian chiếu sáng 8 giờ/ngày, cường độ ánh sáng 34 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, nhiệt độ $25 \pm 2^\circ\text{C}$ và độ ẩm không khí 75 - 85%. Thí nghiệm ngoài vườn ươm được thực hiện trong nhà màng có mái ni lông trắng che mưa, với nhiệt độ trung bình 18 - 21°C, độ ẩm trung bình 82% và theo ánh sáng tự nhiên [11, 12, 13].

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Khảo sát ảnh hưởng của BA, Kinetin, TDZ đến sự tái sinh và sinh trưởng chồi *in vitro*

Những đốt thân của cây tầm bóp Nam Mỹ *in vitro* (Hình 1c) được cấy trên môi trường MS có bổ sung các chất điều hòa sinh trưởng BA (0; 0,5; 1; 1,5; 2 mg/l) hoặc Kinetin (0; 0,5; 1; 1,5; 2 mg/l) hoặc TDZ (0; 0,1; 0,3; 0,5; 1 mg/l), 30 g/l sucrose, 10 g/l agar, pH 5,8. Mỗi nghiệm thức cấy 10 mẫu, sau 30 ngày nuôi cấy tiến hành thu số liệu. Chỉ tiêu theo dõi là chiều cao chồi (cm), số chồi/mẫu, số đốt/chồi và hình thái chồi.

2.2.2. Khảo sát ảnh hưởng của vị trí đốt thân đến sự tái sinh và sinh trưởng chồi *in vitro*

Các vị trí đốt thân của cùng một cây tầm bóp Nam Mỹ *in vitro* (Hình 1c) được đánh số theo thứ tự từ ngọn đến gốc: đốt thứ 1 (chồi ngọn), đốt thứ

2, đốt thứ 3, đốt thứ 4 và cấy trên môi trường MS có bổ sung 0,5 mg/l BA, 30 g/l sucrose, 10 g/l agar, pH 5,8. Mỗi nghiệm thức cấy 10 mẫu, sau 30 ngày nuôi cấy tiến hành thu số liệu. Chỉ tiêu theo dõi là chiều cao chồi (cm), số đốt/chồi, số chồi/mẫu và hình thái chồi.

2.2.3. Khảo sát ảnh hưởng của IBA đến sự tạo rễ *in vitro*

Những chồi ngọn của cây tầm bóp Nam Mỹ *in vitro* (Hình 1c) cấy trên môi trường MS có bổ sung 0, 0,5, 1 mg/l IBA, 30 g/l sucrose, 1 g/l than hoạt tính, 10 g/l agar, pH 5,8. Mỗi nghiệm thức cấy 10 mẫu, sau 20 ngày nuôi cấy tiến hành thu số liệu. Chỉ tiêu theo dõi là chiều dài rễ (cm), số rễ/cây, tỷ lệ tạo rễ (%) và hình thái cây.

2.2.4. Khảo sát ảnh hưởng của giá thể đến tỉ lệ sống và sinh trưởng cây cấy mô chuyển ra ngoài vườn ươm

Những cây tầm bóp Nam Mỹ cấy mô có đầy đủ thân, lá, rễ và có chiều cao khoảng 2,5 cm trồng trên giá thể vụn xơ dừa, đất mùn và 1/2 vụn xơ dừa kết hợp 1/2 đất mùn. Mỗi nghiệm thức trồng 10 cây, sau 30 ngày nuôi trồng và chăm sóc tiến hành thu số liệu. Chỉ tiêu theo dõi là chiều cao cây (cm), tỷ lệ sống (%) và hình thái chồi.

2.3. Xử lý số liệu

Số liệu của các thí nghiệm được xử lý bằng phần mềm thống kê SPSS (bản 16.0) trong Duncan's test [14] với $P \leq 0,05$.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Khảo sát ảnh hưởng của BA, Kinetin, TDZ đến sự tái sinh và sinh trưởng chồi *in vitro*

Khả năng tái sinh và sinh trưởng chồi *in vitro* cây tầm bóp Nam Mỹ từ đốt thân sau 30 ngày nuôi cấy được thể hiện trên bảng 1. Kết quả cho thấy, tất cả các đốt thân nuôi cấy trên những môi trường khác nhau đều tái sinh 1 chồi/mẫu, tuy nhiên sự sinh trưởng của chồi ở các môi trường bổ sung các nồng độ BA, Kinetin và TDZ khác nhau thì có sự khác nhau. Môi trường bổ sung 0,5 mg/l BA là tốt nhất đến sự tái sinh và sinh trưởng chồi, với chiều cao chồi 6,36 cm, số đốt 4,20 đốt/chồi. Môi trường bổ sung 0,5 mg/l Kinetin (chiều cao chồi 5,35 cm, số đốt 3,90 đốt/chồi) và môi trường bổ sung 0,1

g/l TDZ (chiều cao chồi 5,33 cm, số đốt 3,90 đốt/chồi) kém hơn môi trường bổ sung 0,5 mg/l BA nhưng tốt hơn các môi trường còn lại. Theo xử lý thống kê thì sự tái sinh, sinh trưởng chồi trên môi trường bổ sung 0,5 mg/l Kinetin và 0,1 g/l TDZ không có sự khác biệt. Điểm đặc biệt cho thấy, môi trường không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng thì mẫu hình thành rễ (Hình 1d), trong khi đó ở các nghiệm thức bổ sung chất điều hòa sinh trưởng thì mẫu không tạo rễ. Kết quả cũng cho thấy, khi tăng cao nồng độ BA, Kinetin và TDZ thì chiều cao chồi và số đốt giảm. Điều này

có thể giải thích khi tăng cao nồng độ BA, Kinetin và TDZ thì xảy ra quá trình ức chế sự tăng trưởng chiều cao và số đốt của chồi. Đặc điểm hình thái cho thấy, những chồi nuôi cấy trên môi trường bổ sung các nồng độ BA thì lá nhỏ và chồi mọc ra từ các nách lá (Hình 1e₁, 1e₂, 1e₃, 1e₄). Trong khi đó, những chồi sinh trưởng trên môi trường bổ sung các nồng độ Kinetin và TDZ thì có phiến lá lớn hơn, ở môi trường bổ sung 0,5 và 1 mg/l TDZ thì chồi có hiện tượng biến dị (Hình 1f₁, 1f₂, 1f₃, 1f₄; Hình 1g₁, 1g₂, 1g₃, 1g₄).

Bảng 1. Ảnh hưởng của BA, Kinetin, TDZ đến sự tái sinh và sinh trưởng chồi *in vitro* sau 30 ngày nuôi cấy

Chất điều hòa sinh trưởng		Chiều cao chồi (cm)	Số đốt/chồi	Số chồi/mẫu	Hình thái chồi
Tên chất	Nồng độ (mg/l)				
BA	0,0	4,52 ^{de*}	2,90 ^c	1 ^a	Chồi sinh trưởng tốt, phiến lá lớn và chồi hình thành rễ
	0,5	6,36 ^a	4,20 ^a	1 ^a	Chồi sinh trưởng tốt, phiến lá nhỏ và mọc chồi bên từ nách lá
	1,0	4,88 ^c	3,90 ^{ab}	1 ^a	Chồi sinh trưởng tốt, phiến lá nhỏ và mọc chồi bên từ nách lá
	1,5	3,81 ^f	3,80 ^{ab}	1 ^a	Chồi sinh trưởng tốt, phiến lá nhỏ và mọc chồi bên từ nách lá
	2,0	3,25 ^g	3,70 ^b	1 ^a	Chồi sinh trưởng tốt, phiến lá nhỏ và mọc chồi bên từ nách lá
Kinetin	0,5	5,35 ^b	3,90 ^{ab}	1 ^a	Chồi sinh trưởng tốt và phiến lá lớn
	1,0	4,43 ^c	3,70 ^b	1 ^a	Chồi sinh trưởng tốt và phiến lá lớn
	1,5	2,85 ^h	2,70 ^c	1 ^a	Chồi sinh trưởng kém và phiến lá lớn
	2,0	1,87 ⁱ	2,20 ^d	1 ^a	Chồi sinh trưởng kém và phiến lá lớn
TDZ	0,1	5,33 ^b	3,90 ^{ab}	1 ^a	Chồi sinh trưởng tốt và phiến lá lớn
	0,3	4,67 ^{cd}	3,60 ^b	1 ^a	Chồi sinh trưởng tốt và phiến lá lớn
	0,5	3,99 ^f	2,90 ^c	1 ^a	Chồi sinh trưởng kém, phiến lá lớn và chồi có biểu hiện biến dị
	1,0	2,93 ^h	2,30 ^d	1 ^a	Chồi sinh trưởng kém, phiến lá lớn và chồi có biểu hiện biến dị

*Chú thích: *Những chữ khác nhau (a, b,...) trong cùng một cột biểu diễn sự khác nhau có ý nghĩa với $P \leq 0,05$ trong Duncan's test.*

BA, Kinetin và TDZ là những chất điều hòa sinh trưởng thuộc nhóm cytokinin có vai trò quan trọng trong phân chia tế bào, kích thích sự hình thành chồi và hiện nay được sử dụng phổ biến

trong nuôi cấy mô tế bào thực vật ở giai đoạn nhân nhanh. Hiện nay, ở Việt Nam chưa có công bố nghiên cứu tái sinh và sinh trưởng chồi *in vitro* cây tầm bóp Nam Mỹ, nhưng trên thế giới đã có công

bố. Otroshy và cs (2013) [5] sử dụng BA hoặc Kinetin kết hợp với IBA nhân giống *in vitro* thành công loài *Physalis peruviana* từ mẫu lá và đốt thân. Ramar và cs (2014) [6] nghiên cứu tái sinh *in vitro* loài *Physalis peruviana* có hiệu quả khi kết hợp BA, GA₃ và 2,4-D. Mascarenhas và cs (2019) [9] vi nhân giống thành công loài *Physalis peruviana* khi sử dụng BA. Islam và Mohammed (2016) [4] kết hợp BA và NAA trong nghiên cứu tái sinh *in vitro* loài *Physalis peruviana*.

Như vậy, môi trường MS bổ sung 0,5 mg/l BA là tốt nhất đến sự tái sinh và sinh trưởng chồi *in vitro* cây tầm bóp Nam Mỹ.

3.2. Khảo sát ảnh hưởng của vị trí đốt thân đến sự tái sinh và sinh trưởng chồi *in vitro*

Những vị trí đốt thân của cùng 1 chồi được cấy trên môi trường MS bổ sung 0,5 mg/l BA, 30 g/l sucrose, 10 g/l agar, pH 5,8. Khả năng tái sinh và sinh trưởng chồi từ vị trí đốt thứ 1 đến thứ 4 sau 30 ngày nuôi cấy được thể hiện trên bảng 2. Kết quả cho thấy, tất cả các vị trí đốt của cùng một cây đều tái sinh 1 chồi/mẫu và sinh trưởng tăng chiều cao chồi, tuy nhiên ở những vị trí đốt khác nhau thì có sự tái sinh và sinh trưởng chồi khác nhau (Hình 2a). Sự tái sinh và sinh trưởng chồi ở vị trí đốt thân thứ 2 đến thứ 4 là tốt nhất và không có sự khác biệt theo xử lý thống kê số liệu (chiều cao chồi tương ứng 6,43, 6,42 và 6,41 cm; số đốt tương ứng

4,20, 4,20 và 4,10 và 8,40 đốt/chồi). Đốt thân thứ 1 tái sinh và sinh trưởng chồi kém hơn (chiều cao chồi 4,86 cm, số đốt 3,10 đốt/chồi). Kết quả hình thái chồi cho thấy, tất cả các chồi đều mọc chồi bên từ nách lá, chồi tái sinh từ vị trí đốt thứ 2 đến thứ 4 sinh trưởng tốt hơn chồi tái sinh từ đốt thứ 1.

Hiện nay chưa có công bố nghiên cứu tái sinh và sinh trưởng chồi từ các vị trí đốt thân cây tầm bóp Nam Mỹ, nhưng ở những loài khác đã có công bố. Các kết quả nghiên cứu chỉ ra rằng thường vị trí đốt thân thứ 2 hoặc thứ 3 trở về gốc thích hợp làm nguồn vật liệu nhân giống *in vitro*. Vũ Quốc Luận và cs (2015) [15] cho rằng vị trí đốt thân thứ 3 đến thứ 6 của cây lan gấm loài *Anoectochilus setaceus* Blume thích hợp làm nguyên liệu nhân giống *in vitro*. Phan Xuân Huyền và Nguyễn Thị Phương Hoàng (2017) [16] cũng chỉ ra rằng vị trí đốt thân thứ 2 đến thứ 6 thích hợp làm nguồn vật liệu nhân giống *in vitro* cây lan gấm loài *Anoectochilus formosanus* Hayata. Đối với cây sâm bố chính thì vị trí đốt thân thứ 1 đến đốt thứ 4 đều thích hợp làm nguồn vật liệu trong nhân giống *in vitro* [11]. Ở cây việt quất thì vị trí đốt thân thứ 3 đến thứ 6 là thích hợp làm nguồn vật liệu trong nhân giống *in vitro* [17].

Như vậy, vị trí đốt thân thứ 2 đến thứ 4 là thích hợp làm nguồn vật liệu để nhân giống *in vitro* cây tầm bóp Nam Mỹ.

Bảng 2. Ảnh hưởng của vị trí đốt thân đến sự tái sinh và sinh trưởng chồi *in vitro* sau 30 ngày nuôi cấy

Vị trí đốt	Chiều cao chồi (cm)	Số đốt/chồi	Số chồi/mẫu	Hình thái chồi
Đốt thứ 1 (chồi ngọn)	4,86 ^{b*}	3,10 ^b	1 ^a	Chồi sinh trưởng kém và mọc chồi bên từ nách lá
Đốt thứ 2	6,43 ^a	4,20 ^a	1 ^a	Chồi sinh trưởng tốt và mọc chồi bên từ nách lá
Đốt thứ 3	6,42 ^a	4,20 ^a	1 ^a	Chồi sinh trưởng tốt và mọc chồi bên từ nách lá
Đốt thứ 4	6,41 ^a	4,10 ^a	1 ^a	Chồi sinh trưởng tốt và mọc chồi bên từ nách lá

Chú thích: *Những chữ khác nhau (a, b,...) trong cùng một cột biểu diễn sự khác nhau có ý nghĩa với $P \leq 0,05$ trong Duncan's test.

3.3. Khảo sát ảnh hưởng của IBA đến sự tạo rễ *in vitro*

Khả năng tạo rễ *in vitro* cây tầm bóp Nam Mỹ sau 20 ngày nuôi cấy được thể hiện trên bảng 3. Kết quả cho thấy, các chồi cấy trên môi trường bổ sung và không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng đều tạo rễ với tỷ lệ đạt 100% (Hình 2b₁, 2b₂, 2b₃). Điều này cho thấy cây tầm bóp Nam Mỹ là đối tượng cây trồng dễ tạo rễ *in vitro*. Kết quả cũng cho thấy, khi nồng độ IBA thấp (0 - 0,5 mg/l) thì chiều dài rễ tăng lên, nhưng khi tăng cao nồng độ IBA (0,5 - 1 mg/l) thì chiều dài rễ giảm xuống. Điều này có thể giải thích khi nồng độ IBA thấp thì kích thích sự tăng trưởng chiều dài của rễ, nhưng khi nồng độ IBA tăng cao thì xảy ra quá trình ngược lại ức chế sự tăng trưởng chiều dài của rễ. Kết quả cũng chỉ ra rằng, khi tăng nồng độ IBA thì số rễ tăng lên, điều này cho thấy khi tăng cao nồng độ IBA thì kích thích chồi tạo nhiều rễ hơn. IBA là một

chất điều hòa sinh trưởng thuộc nhóm auxin có tác dụng kích thích tạo rễ và được sử dụng phổ biến trong nuôi cấy mô thực vật.

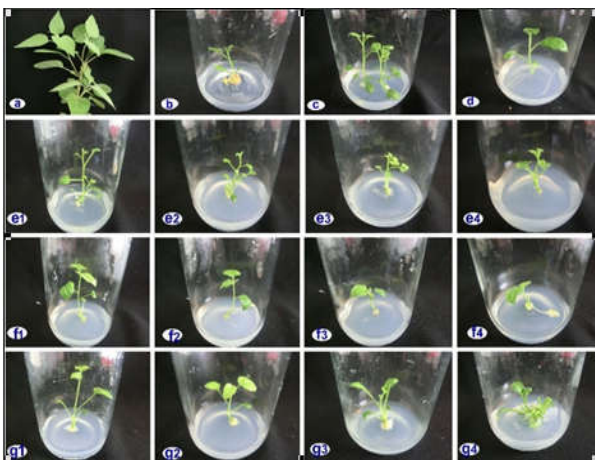
Ở nước ta hiện nay chưa có công bố sử dụng các chất thuộc nhóm auxin trong nghiên cứu tạo rễ *in vitro* cây tầm bóp Nam Mỹ, nhưng trên thế giới đã có công bố. Kết quả của nghiên cứu này phù hợp với nghiên cứu của Otrosky và cs (2013) [5] khi môi trường có bổ sung các nồng độ IBA và không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng thì các mẫu cấy của loài *Physalis peruviana* đều tạo rễ, tỷ lệ tạo rễ đạt 100%. Nhưng Radomir và cs (2018) [8] nghiên cứu cho thấy tỷ lệ tạo rễ cao nhất của loài *Physalis peruviana* chỉ đạt 95%. Guney và cs (2016) [7] cho thấy NAA thích hợp tạo rễ *in vitro* loài *Physalis peruviana*.

Như vậy, Môi trường MS bổ sung 0 - 1 mg/l IBA kết hợp 1 g/l than hoạt tính đều phù hợp đến sự tạo rễ *in vitro* cây tầm bóp Nam Mỹ.

Bảng 3. Ảnh hưởng của IBA đến sự tạo rễ *in vitro* sau 20 ngày nuôi cấy

IBA (mg/l)	Chiều dài rễ (cm)	Số rễ/cây	Tỷ lệ ra rễ (%)	Hình thái cây
0,0	2,53 ^b	3,20 ^c	100	Cây khỏe, có màu xanh mượt và sinh trưởng tốt
0,5	3,87 ^a	4,60 ^b	100	Cây khỏe, có màu xanh mượt và sinh trưởng tốt
1,0	1,84 ^c	5,80 ^a	100	Cây khỏe, có màu xanh mượt và sinh trưởng tốt

*Chú thích: *Những chữ khác nhau (a, b,...) trong cùng một cột biểu diễn sự khác nhau có ý nghĩa với $P \leq 0,05$ trong Duncan's test.*



Hình 1. Nghiên cứu nhân giống *in vitro* cây tầm bóp Nam Mỹ

Ghi chú: a. Cây tầm bóp Nam Mỹ; b, c. Tái sinh chồi in vitro từ mẫu khử trùng; d. Tái sinh và sinh trưởng chồi trên môi trường MS không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng thực vật; e₁, e₂, e₃, e₄. Tái sinh và sinh trưởng chồi trên môi trường MS bổ sung 0,5; 1; 1,5; 2 mg/l BA; f₁, f₂, f₃, f₄. Tái sinh và sinh trưởng chồi trên môi trường MS bổ sung 0,5; 1; 1,5; 2 mg/l Kinetin; g₁, g₂, g₃, g₄. Tái sinh và sinh trưởng chồi trên môi trường MS bổ sung 0,1; 0,3; 0,5; 1 mg/l TDZ.

3.4. Khảo sát ảnh hưởng của giá thể đến tỉ lệ sống và sinh trưởng cây cấy mô chuyển ra ngoài vườn ươm

Nghiên cứu chuyển cây cấy mô ra ngoài vườn ươm là một bước quan trọng trong nuôi cấy mô thực vật. Cây cấy mô thích nghi ở điều kiện mới khi chuyển từ điều kiện nuôi cấy *in vitro* ra điều kiện *ex vitro*, đặc biệt, bộ rễ của cây con thích nghi trên giá thể mới. Hơn nữa, độ ẩm trong điều kiện *in vitro* cao và ổn định hơn ở điều kiện ngoài vườn ươm, do đó cây con dễ bị héo và chết. Vì vậy, cây con cần chăm sóc cẩn thận trong thời gian đầu khi chuyển cây ra ngoài vườn ươm.

Khả năng thích nghi và sinh trưởng của cây cấy mô sau 30 ngày chăm sóc thể hiện trên bảng 4. Kết quả cho thấy, cây trồng trên giá thể vụn xơ dừa có tỷ lệ sống và sinh trưởng tốt nhất, với chiều cao cây 12,50 cm, tỷ lệ sống đạt 100% (Hình 2c₁). Cây trồng trên giá thể 1/2 vụn xơ dừa kết hợp 1/2 đất mùn kém hơn cây trồng trên giá thể vụn xơ dừa, nhưng tốt hơn giá thể đất mùn (chiều cao cây 10,41 cm, tỷ lệ sống 100%) (Hình 2c₂). Cây trồng trên giá thể đất mùn sinh trưởng kém nhất, với chiều cao cây 9,18 cm, tỷ lệ sống 95% (Hình 2c₃). Điều này cho thấy, cây tầm bóp Nam Mỹ cấy mô có sức sống mạnh và thích nghi cao với điều kiện ngoài vườn ươm. Hơn nữa, giá thể vụn xơ dừa có độ thông thoáng và giữ ẩm, thích hợp cho sự thích nghi và sinh trưởng của cây con trong giai đoạn

đầu khi chuyển ra ngoài vườn ươm. Từ kết quả của nghiên cứu này, chọn giá thể vụn xơ dừa nuôi trồng cây tầm bóp Nam Mỹ để theo dõi sự sinh trưởng, phát triển của cây trong điều kiện nhà màng. Kết quả cho thấy, cây cấy mô (Hình 2d, 2e) thích nghi và sinh trưởng tốt sau 20 ngày nuôi trồng (Hình 2f), với chiều cao 7,93 cm. Cây được trồng riêng từng chậu và sinh trưởng tốt sau 30 ngày nuôi trồng (Hình 2g), chiều cao cây 12,77 cm. Tất cả các cây sinh trưởng phát triển tốt và đều ra hoa sau 60 ngày nuôi trồng (Hình 2h), cây có chiều cao 68,72 cm. Quả của cây bắt đầu già chín sau 90 ngày nuôi trồng, khối lượng tươi của quả 7,37 g/quả (Hình 2i, 2j). Kết quả của nghiên cứu này cũng phù hợp với một số công bố nghiên cứu chuyển cây cấy mô loài *Physalis peruviana* ra vườn ươm như: Radomir và cs (2018) [8] cho thấy cây con thích nghi với điều kiện *ex vitro*, có tỷ lệ sống 92%; Ramar và cs (2014) [6] chuyển thành công cây con ra điều kiện ngoài vườn ươm; Mascarenhas và cs (2019) [9] chỉ ra tỷ lệ sống của cây đạt 100% khi chuyển cây con từ điều kiện *in vitro* ra điều kiện *ex vitro*; Guney và cs (2016) [7] cho biết chuyển cây con ra ngoài vườn ươm thành công.

Như vậy, giá thể vụn xơ dừa là tốt nhất để chuyển cây tầm bóp Nam Mỹ cấy mô ra ngoài vườn ươm.

Bảng 4. Ảnh hưởng của giá thể đến tỉ lệ sống và sinh trưởng cây cấy mô chuyển ra ngoài vườn ươm sau 30 ngày nuôi trồng

Giá thể	Chiều cao cây (cm)	Tỷ lệ sống (%)	Hình thái cây
Vụn xơ dừa	12,50 ^{a*}	100	Cây sinh trưởng tốt, có màu xanh non, phiến lá to, cành bên nhú ra
1/2 vụn xơ dừa + 1/2 đất mùn	10,41 ^b	100	Cây sinh trưởng bình thường, có màu xanh non, phiến lá to
Đất mùn	9,18 ^c	95	Cây sinh trưởng kém, có màu xanh non, phiến lá nhỏ

*Chú thích: *Những chữ khác nhau (a, b,...) trong cùng một cột biểu diễn sự khác nhau có ý nghĩa với $P \leq 0,05$ trong Duncan's test.*



Hình 2. Nghiên cứu nhân giống *in vitro* cây tầm bóp Nam Mỹ

*Ghi chú: a. Tái sinh và sinh trưởng chồi của vị trí đốt thứ 1 (chồi ngọn) đến đốt thứ 4; b₁, b₂, b₃. Tạo rễ *in vitro* trên môi trường MS bổ sung 0; 0,5; 1 mg/L IBA; c₁, c₂, c₃. Sự thích nghi và sinh trưởng của cây cấy mô trên giá thể vụn xơ dừa, 1/2 vụn xơ dừa + 1/2 đất mùn, đất mùn sau 30 ngày nuôi trồng; d, e. Cây cấy mô; f. Sự sinh trưởng của cây trên giá thể vụn xơ dừa sau 20 ngày nuôi trồng; g. Cây trồng riêng ra chậu trên giá thể vụn xơ dừa sau 30 ngày nuôi trồng; h. Sự sinh trưởng của cây trên giá thể vụn xơ dừa sau 60 ngày nuôi trồng; i, j. Quả đã già chín sau 90 ngày nuôi trồng.*

4. KẾT LUẬN

Môi trường MS bổ sung 0,5 mg/l BA là tốt nhất đến sự tái sinh và sinh trưởng chồi *in vitro*. Môi trường MS bổ sung 0 - 1 mg/l IBA kết hợp với 1 g/l than hoạt tính đều phù hợp đến sự tạo rễ *in vitro*. Giá thể vụn xơ dừa thích hợp để chuyển cây cấy mô ra ngoài vườn ươm. Giá thể vụn xơ dừa thích hợp cho cây tầm bóp Nam Mỹ cấy mô sinh trưởng phát triển tốt trong điều kiện nhà màng, sau 20, 45 và 60 ngày nuôi trồng cây đạt chiều cao tương ứng 7,93, 44,50 và 68,72 cm. Tất cả các cây đều ra hoa sau 60 ngày nuôi trồng, sau 90 ngày quả bắt đầu già chín và khối lượng tươi của quả 7,37 g/quả.

LỜI CẢM ƠN

Các tác giả xin chân thành cảm ơn Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên, Viện Hàn lâm

Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã hỗ trợ nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Wu S. J., Ng L. T., Chen C. H., Lin D. L., Wang S. S., Lin C. C. (2004). Antihepatoma activity of *Physalis angulata* and *Physalis peruviana* extracts and their effects on apoptosis in human Hep G2 cells. *Life Sci.*, 74: 2061-2073.
2. Wu S. J., Ng L. T., Huang Y. M., Lin D. L., Wang S. S., Huang S. N., Lin C. C. (2005). Antioxidant of *Physalis peruviana*. *Biol. Pharm. Bull.*, 28: 963-966.
3. Ramadan M. F., Moersel J. T. (2007). Impact of enzymatic treatment on chemical composition, physicochemical properties and radical scavenging activity of goldenberry (*Physalis peruviana* L.) juice. *J. Sci. Food Agr.*, 87: 452-460.
4. Islam I. L., Mohammed H. E. (2016). Evaluation of secondary metabolites in callus and tissues of *Physalis peruviana*. *Int. J. Mod. Bot.*, 6(1): 10-17.
5. Otrushy O. M., Mokhtari A., Khodaei S. M. M., Bazrafshan A. H. (2013). Direct regeneration from leaves and nodes explants of *Physalis peruviana* L. *Int. J. Farm. Alli. Sci.*, 2(9): 214-218.
6. Ramar K., Ayyadurai V., Arulprakash T. (2014). *In vitro* shoot multiplication and plant regeneration of *Physalis peruviana* L. an important medicinal plant. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.*, 3(3): 456-464.
7. Guney M., Kafkas S., Kefayati S., Motalebipour E. Z., Turkeli Y., Ercisli S., Kafkas E. (2016). *In vitro* propagation of *Physalis peruviana* (L.) using apical shoot explants. *Acta Sci. Pol.*, 15(5): 109-118.
8. Radomir A. M., Stan R., Vizitiu D. E. (2018). Obtaining biological material by *in vitro* multiplication at *Physalis peruviana* species, an important medicinal plant. *Ann. Univ., Craiova*, 23: 209-214.
9. Mascarenhas L. M. S., Santana J. R. F., Brito A. L. (2019). Micropropagation of *Physalis peruviana* L. *Pesq. Agropec. Trop.*, 49: 1-8.

10. Murashige T., Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue. *Plant Physiol.*, 15: 473-497.
11. Phan Xuân Huyền, Huỳnh Thị Ngoan, Nguyễn Thị Phương Hoàng (2017). Nghiên cứu nhân giống *in vitro* cây sâm bố chính (*Hibiscus sagittifolius* Kurz) thông qua nuôi cấy chồi ngủ đốt thân. *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*, 15(5): 664-672.
12. Nguyễn Văn Uyển (1984). *Nuôi cấy mô thực vật phục vụ công tác giống cây trồng*. Nxb thành phố Hồ Chí Minh.
13. Nguyen Van Ket (2003). Effect of Environmental Conditions on *In vitro* and *Ex vitro* Growth of Jewel Orchid (*Anoetochilus formosanus* Hayata). PhD Thesis of. Philosophy in Agriculture, The Graduate School of Chungbuk National University, Korea.
14. Duncan D. B. (1955). Multiple range and F tests. *Biometrics*, 11: 1-42.
15. Vũ Quốc Luận, Trần Đình Phương, Trần Công Luận, Dương Tấn Nhựt (2015). Vi nhân giống và xác định tính hoạt chất β -sitosterol trên cây lan kim tuyến (*Anoetochilus setaceus* Blume). *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 13(4): 1113-1125.
16. Phan Xuân Huyền, Nguyễn Thị Phương Hoàng (2017). Nghiên cứu tái sinh chồi *in vitro* và nuôi trồng cây lan gấm (*Anoetochilus formosanus* Hayata). *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 15(3): 515-524.
17. Nguyen Thi Thanh Hang, Nguyen Thi Phuong Hoang, Dinh Van Khiem, Phan Xuan Huyen (2022). Study on *in vitro* propagation of *Vaccinium myrtillus* Linn. via nodal culture method. *Academia Journal of Biology*, 44(2): 53-64.

STUDY ON IN VITRO PROPAGATION OF *Physalis peruviana* Linnaeus

Phan Xuan Huyen¹, Nguyen Thi Thanh Hang¹, Dinh Van Khiem¹

¹Tay Nguyen Institute for Scientific Research,
Vietnam Academy of Science and Technology

Summary

Physalis peruviana Linnaeus is an imported fruit tree with high economic value, due to its fruit have many nutrients good for human health. Currently, in the world, there have been many publications on *in vitro* propagation of the *Physalis peruviana* plant, but in Vietnam there has not been any publication. This study is focused on *in vitro* propagation of *Physalis peruviana* via nodal culture method. The results showed that MS medium supplemented with 0.5 mg/l BA, 30 g/l sucrose, 10 g/l agar, pH 5.8 was the best for *in vitro* shoot growth and regeneration, with shoot height of 6.36 cm, number of nodes 4.20 nodes/shoot, number of shoots of 1 shoot/explant. The second nodes to fourth nodes proved to be suitable materials for *in vitro* propagation of *Physalis peruviana*. For the *in vitro* rooting stage, the MS medium containing 0 - 1 mg/l IBA, 30 g/l sucrose, 1 g/l activated charcoal, 10 g/l agar, pH 5.8 resulted root formation rate 100%. After transferring the cultivated-tissue *Physalis peruviana* to the greenhouse, substrate with coconut fibre powder was the best, the results were observed to be plant height 12.50 cm, survival rate 100%. The plantlet growth increased overtime after 4 months in the greenhouse. The plantlet growth increased overtime on substrate of coconut fibre powder in the greenhouse condition after 45 and 60 days of cultivation, with the plant height 44.50 and 68.72 cm, respectively. After 60 days of cultivation, all plants flowered, after 90 days the fruits ripened and the fresh weight of fruit was 7.37 g/fruit.

Keywords: Growth, *in vitro*, MS medium, *Physalis peruviana*, regeneration.

Người phản biện: PGS.TS. Nguyễn Văn Đồng

Ngày nhận bài: 25/7/2022

Ngày thông qua phản biện: 02/8/2022

Ngày duyệt đăng: 26/8/2022

ĐA DẠNG NUCLEOTIDE TRÌNH TỰ ADN MÃ VẠCH *trnH-psbA* CỦA LOÀI XÁ XỊ (*Cinnamomum parthenoxylon* (Jack) Meisn) TẠI MỘT SỐ TỈNH MIỀN BẮC VIỆT NAM

Hà Bích Hồng^{1,*}, Nguyễn Thế Hưởng¹, Hoàng Văn Sâm¹

TÓM TẮT

Xá xị (*Cinnamomum parthenoxylon* (Jack) Meisn) là loài cây gỗ lớn có giá trị kinh tế cao được xếp trong nhóm IIA (Nghị định số 84/2021/NĐ-CP) và nhóm CR cực kỳ nguy cấp. Xá xị tái sinh tự nhiên kém, lại bị khai thác để lấy tinh dầu trong thời gian dài làm cho loài cây này đang đứng trước nguy cơ tuyệt chủng nên cần được bảo tồn, phát triển trong tự nhiên. Trong nghiên cứu này, chỉ thị *trnH-psbA* (với độ dài lý thuyết là 500 bp) được sử dụng để phân tích đa dạng di truyền cho 46 cây trệ Xá xị tại 4 tỉnh miền Bắc là: Phú Thọ, Hòa Bình, Quảng Ninh, Thanh Hóa. Kết quả cho thấy, chỉ thị *trnH-psbA* có mức độ sai khác về trình tự nucleotide tương đối lớn giữa các cây Xá xị nghiên cứu, cụ thể số vị trí biến đổi là 15 nucleotide trên tổng số 464 nucleotide, trong đó tất cả 15 vị trí biến đổi đều có ý nghĩa tiến hóa (parsimony informative sites). Số lượng haplotype (h) của tất cả các cây Xá xị nghiên cứu là 6, với chỉ số đa dạng haplotype tương đối cao ($H_d = 0,734$) và chỉ số đa dạng nucleotide ở mức thấp ($P_i = 0,00835$). Đa dạng di truyền của từng quần thể đạt mức trung bình ($H_d = 0,476 - 0,526$), chỉ riêng quần thể Xá xị tại tỉnh Quảng Ninh không cho thấy sự đa dạng di truyền ($H_d = 0,000$). Khoảng cách di truyền giữa các quần thể Xá xị thuộc các tỉnh khác nhau là tương đối thấp, dao động từ 0,000 đến 0,003, trong đó quần thể tại tỉnh Phú Thọ và tỉnh Hòa Bình có khoảng cách di truyền bằng 0,000. Kết quả phân tích đa dạng di truyền của loài Xá xị tại 4 tỉnh miền Bắc cho thấy, bên trong các quần thể có sự đa dạng di truyền thấp hơn giữa các quần thể, kết quả này là cơ sở khoa học để đưa ra giải pháp bảo tồn và phát triển hữu hiệu loài Xá xị.

Từ khóa: Đa dạng nucleotide, ADN mã vạch, *trnH-psbA*, Xá xị.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Xá xị là loài cây đa tác dụng và có giá trị kinh tế cao. Loài này cho gỗ tốt, có vân đẹp, khi khô ít bị nứt nẻ hay biến dạng, không bị mối mọt, chịu nước, dễ gia công chế biến. Lá dùng làm thuốc cầm máu, chữa đau dạ dày, phong thấp, mẩn ngứa ngoài da. Quả được dùng chữa cảm, sốt, lỵ, ho gà. Tinh dầu Xá xị được sử dụng rộng rãi trong công nghệ hoá mỹ phẩm, thực phẩm và dược phẩm, do đó có giá trị thương mại rất lớn trên thị trường thế giới [1], [2]. Với giá trị kinh tế cao lại cộng thêm khả năng tái sinh tự nhiên kém, nên loài Xá xị đang đứng trước nguy cơ tuyệt chủng. Do vậy, bảo tồn và phát triển nguồn gen Xá xị là việc làm hết sức cấp thiết. Tuy nhiên, để công tác bảo tồn có

hiệu quả, cần phối hợp đồng bộ cả biện pháp bảo tồn ngoại vi và bảo tồn nội vi. Trong đó giải pháp tối ưu và thiết thực nhất đó là nghiên cứu phát triển cùng với các chương trình trồng rừng [3]. Những nghiên cứu về đặc điểm sinh học, sinh thái và một số biện pháp nhân giống của loài Xá xị đã được thực hiện [4], [5]. Cho đến nay những nghiên cứu về định danh loài và đánh giá đa dạng di truyền dựa trên các chỉ thị phân tử của cây Xá xị chưa được thực hiện tại Việt Nam.

ADN mã vạch đã được chứng minh là những chỉ thị phân tử có độ chính xác cao trong việc định danh loài và đánh giá đa dạng di truyền. Yêu cầu của ADN mã vạch là phải phổ biến và đặc hiệu trong các biến dị và dễ dàng sử dụng. Điều này có nghĩa là các đoạn gen được sử dụng như một ADN mã vạch nên thích hợp cho nhiều đơn vị phân loại, có sự biến đổi giữa các loài nhưng ổn định và bảo

¹ Trường Đại học Lâm nghiệp
* Email: honghb@vnu.edu.vn

thủ cao bên trong loài hoặc biến đổi không đáng kể. Vì vậy, ADN mã vạch lý tưởng là một đoạn ADN có trình tự nucleotide ngắn, bắt cặp được với cặp mồi được thiết kế đặc hiệu để dễ dàng khuếch đại bằng PCR. Ở thực vật, các đoạn ADN mã vạch có thể là những đoạn ADN nằm trong hệ gen nhân (28S rDNA, ITS,...) [6], [7] hoặc hệ gen lục lạp (*matK*, *rbcl*, *trnH-psbA*, *rpo*, *trnL-trnF*, *ycf*, ...) [8], [9]. Chỉ thị ADN mã vạch là *rbcl*, *matK*, *trnH-psbA* được sử dụng để đánh giá sự đa dạng của các loài cây trong một khu rừng mưa nhiệt đới tại Queensland, Úc và kết luận rằng ADN mã vạch là một trợ giúp đáng kể trong đánh giá đa dạng sinh học và xác định các quần thể cây ngay cả khi chúng không thể phân biệt được tất cả các loài trong khu [10]. ADN mã vạch được sử dụng để giải quyết vấn đề bảo tồn đa dạng sinh học theo hai cách sau: một là đó là phương tiện giám sát đa

dạng sinh học chính xác và nhanh chóng cả trước và sau các hành động bảo tồn, hai là cung cấp dữ liệu để hỗ trợ trong việc ước tính sự đa dạng phát sinh loài để thiết lập các ưu tiên bảo tồn [11].

Xuất phát từ những cơ sở khoa học trên, nghiên cứu này đề cập đến kết quả đánh giá đa dạng nucleotide trình tự ADN mã vạch *trnH-psbA* của loài Xá xị tại một số tỉnh miền Bắc Việt Nam để đưa ra chiến lược bảo tồn và phát triển nguồn gen loài cây có giá trị này.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Lựa chọn mẫu và cách lấy mẫu

46 cây Xá xị được lựa chọn là các cây trội tại 4 tỉnh là: Phú Thọ, Hòa Bình, Quảng Ninh, Thanh Hóa. Ký hiệu mẫu, thời gian lấy mẫu, địa điểm và tọa độ thu mẫu được thể hiện ở bảng 1.

Bảng 1. Địa điểm và thời gian thu thập các mẫu Xá xị tại một số tỉnh miền Bắc

STT	Ký hiệu mẫu	Địa điểm thu nhận mẫu	Thời gian thu mẫu	Tọa độ	
				Kinh độ (m)	Vĩ độ (m)
1	PT01	Lai Đồng - Tân Sơn - Phú Thọ	9/2019	519751	2345887
2	PT02	Xuân Sơn - Tân Sơn - Phú Thọ	9/2019	521649	2333972
3	PT04	Xuân Đài - Tân Sơn - Phú Thọ	9/2019	520829	2333288
4	PT06	Xuân Đài - Tân Sơn - Phú Thọ	9/2019	522274	2340192
5	PT07	Xuân Đài - Tân Sơn - Phú Thọ	9/2019	519974	2334967
6	PT16	Thượng Cửu - Thanh Sơn - Phú Thọ	9/2019	539765	2321278
7	PT17	Thượng Cửu - Thanh Sơn - Phú Thọ	9/2019	539791	2321275
8	HBXa05	Thượng Tiến - Kim Bôi - Hòa Bình	9/2019	440320	2282090
9	HBXa07	Thượng Tiến - Kim Bôi - Hòa Bình	9/2019	441158	2282845
10	HBXa09	Thượng Tiến - Kim Bôi - Hòa Bình	9/2019	442155	2283052
11	HBXa10	Thượng Tiến - Kim Bôi - Hòa Bình	9/2019	442517	2283239
12	HBXa11	Thượng Tiến - Kim Bôi - Hòa Bình	9/2019	442489	2283718
13	HBXa13	Thượng Tiến - Kim Bôi - Hòa Bình	9/2019	440253	2281485
14	HBXa14	Thượng Tiến - Kim Bôi - Hòa Bình	9/2019	441069	2282090

KHOA HỌC CÔNG NGHỆ

15	HBXa15	Thượng Tiến - Kim Bôi - Hòa Bình	9/2019	441286	2281677
16	HBXa17	Thượng Tiến - Kim Bôi - Hòa Bình	9/2019	441820	2284653
17	QNXa02	Thượng Yên Công - Uông Bí - Quảng Ninh	4/2020	392897	2336995
18	QNXa03	Thượng Yên Công - Uông Bí - Quảng Ninh	4/2020	392857	2337024
19	QNXa06	Thượng Yên Công - Uông Bí - Quảng Ninh	4/2020	393238	2336753
20	QNXa08	Thượng Yên Công - Uông Bí - Quảng Ninh	4/2020	392613	2338971
21	QNXa09	Thượng Yên Công - Uông Bí - Quảng Ninh	4/2020	392596	2338888
22	QNXa10	Thượng Yên Công - Uông Bí - Quảng Ninh	4/2020	392577	2338877
23	QNXa12	Thượng Yên Công - Uông Bí - Quảng Ninh	4/2020	392589	2338850
24	QNXa13	Thượng Yên Công - Uông Bí - Quảng Ninh	4/2020	392601	2338831
25	QNXa14	Thượng Yên Công - Uông Bí - Quảng Ninh	4/2020	392634	2338822
26	QNXa15	Thượng Yên Công - Uông Bí - Quảng Ninh	4/2020	392655	2338749
27	QNXa16	Thượng Yên Công - Uông Bí - Quảng Ninh	4/2020	392668	2338751
28	TH01	Vạn Xuân – Thường Xuân – Thanh Hóa	3/2020	525775	2196982
29	TH03	Vạn Xuân – Thường Xuân – Thanh Hóa	3/2020	521241	2197179
30	TH04	Vạn Xuân – Thường Xuân – Thanh Hóa	3/2020	521394	2197202
31	TH05	Vạn Xuân – Thường Xuân – Thanh Hóa	3/2020	521791	2197191
32	TH08	Nam Động - Quan Hóa - Thanh Hóa	3/2020	489406	2247219
33	TH09	Vạn Xuân – Thường Xuân – Thanh Hóa	3/2020	525939	219494
34	TH13	Vạn Xuân – Thường Xuân – Thanh Hóa	3/2020	521509	2197001
35	TH15	Vạn Xuân – Thường Xuân – Thanh Hóa	3/2020	521910	2197660
36	TH17	Vạn Xuân – Thường Xuân – Thanh Hóa	3/2020	522435	2198306
37	TH24	Vạn Xuân – Thường Xuân – Thanh Hóa	3/2020	522319	2197838
38	TH34	Hiền Chung – Quan Hóa – Thanh Hóa	3/2020	488832	2260991

39	TH40	Hiền Chung – Quan Hóa – Thanh Hóa	3/2020	491744	2262371
40	TH42	Nam Tiến – Quan Hóa – Thanh Hóa	3/2020	491739	2262373
41	TH43	Hiền Chung – Quan Hóa – Thanh Hóa	3/2020	491724	2262342
42	TH45	Nam Tiến – Quan Hóa – Thanh Hóa	3/2020	494731	2262329
43	TH46	Hiền Chung – Quan Hóa – Thanh Hóa	3/2020	489053	2260772
44	TH47	Phú Sơn – Quan Hóa – Thanh Hóa	3/2020	498921	2270802
45	TH48	Phú Sơn – Quan Hóa – Thanh Hóa	3/2020	499722	2269954
46	TH49	Phú Sơn – Quan Hóa – Thanh Hóa	3/2020	499512	2270053

Sử dụng hệ tọa độ VN2000 múi chiều 3° tại các tỉnh nghiên cứu

Yêu cầu về mẫu lá và cách bảo quản: cắt những lá bánh tẻ, xanh và không bị sâu, bệnh. Sau đó bảo quản mẫu lá trong túi nylon có chứa hạt hút ẩm silica gel, vận chuyển về phòng thí nghiệm ngay trong ngày. Các mẫu lá được bảo quản trong tủ lạnh -20°C cho đến khi được sử dụng để tách chiết ADN tổng số.

2.2. Phương pháp tách chiết ADN tổng số

ADN tổng số được tách chiết từ mẫu lá Xá xị theo hướng dẫn sử dụng của bộ kit tách chiết ADN thực vật “DNA mini kit Qiagen” của hãng Qiagen, CHLB Đức. Các mẫu ADN tổng số sau khi tách chiết sẽ được đo nồng độ và độ tinh sạch bằng phương pháp quang phổ, sau đó được bảo quản ở nhiệt độ - 20°C.

2.3. Phương pháp khuếch đại PCR và xác định trình tự nucleotide

Phản ứng PCR được thực hiện trên máy Biometra Tadvanced PCR Systems 96S (Analytik Jena, Đức) với thành phần bao gồm: 10 µl PCR master mix 2X, 1 µl mỗi xuôi (10 µM) và 1 µl mỗi ngược (10 µM), 1 µl ADN khuôn (50 ng), bổ sung H₂O deion tới 20 µl. Chương trình nhiệt độ của phản ứng PCR như sau: biến tính ở 95°C trong 5 phút; 35 chu kỳ lặp lại của ba bước 95°C – 30 giây, 51°C – 30 giây, 72°C – 1 phút; kết thúc tổng hợp ở

72°C trong 5 phút; bảo quản sản phẩm PCR ở 4°C. Cặp mồi sử dụng để nhân bản đoạn gen *trnH-psbA* với kích thước khoảng 500 bp có trình tự là *trnH_F*: 5' CGCGCATGGTGGATTCACAATCC 3' và *psbA_R*: 5' GTTATGCATGAACGTAATGCTC 3' [12].

Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1,2% có bổ sung thuốc nhuộm axit nucleic (Redsafe). Sau khi điện di, bản gel agarose được soi dưới đèn UV và chụp ảnh.

Những sản phẩm PCR sau khi khuếch đại thành công sẽ được tinh sạch sử dụng bộ kit Purification Kit của hãng InTRON – Hàn Quốc.

Sản phẩm PCR tinh sạch được gửi cho phòng thí nghiệm 1st Base ở Malaysia để giải trình tự nucleotide theo cả hai chiều xuôi và ngược. Trình tự nucleotide của đoạn ADN được xác định bằng máy giải trình tự tự động dựa trên nguyên lý của Sanger, sử dụng bộ Kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing.

2.4. Phương pháp xử lý và phân tích trình tự nucleotide

Các trình tự nucleotide được phân tích và xử lý bằng phần mềm tin sinh BioEdit 7.2.5 [13], Mega7 [14] và các công cụ trên NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Cây quan hệ di truyền được xây dựng dựa trên phương pháp Maximum likelihood, với số lần lặp (Bootstrap) là 1000. Đa dạng nucleotide (Pi) và đa dạng

haplotype (Hd) được tính toán dựa trên phần mềm DnaSP v.5.0 [15].

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

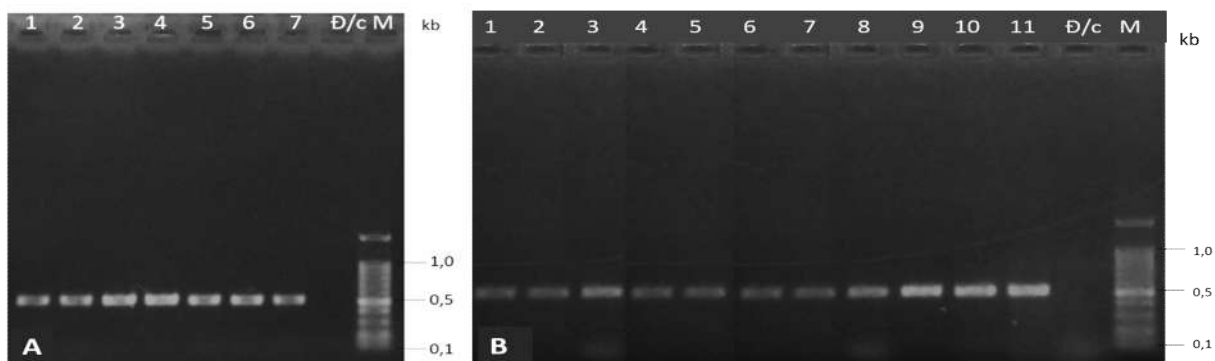
3.1. Tách chiết ADN tổng số

Quá trình tách chiết ADN được thực hiện theo chỉ dẫn của bộ Kit tách chiết ADN tổng số “DNA mini kit Qiagen” của Đức. Khi sử dụng phương pháp này ADN tổng số thu được không còn nhớt, dung dịch ADN hòa tan có màu trong chứ không có màu vàng nâu như phương pháp CTAB. Do đặc tính của cây Xá xị (trong cây có tinh dầu) nên trong quá trình tách chiết ADN tổng số thu được có hàm lượng ADN rất ít, do đó không hiển thị được băng ADN tổng số trên bản gel agarose 1,0%. Khi đo các mẫu ADN tổng số tách chiết được bằng phương pháp quang phổ trên máy Scandrop cho kết quả về nồng độ và độ tinh sạch cũng không được tốt (nồng độ thấp chỉ từ 12,4 - 35,8 ng/μl và độ tinh sạch tương ứng với chỉ số A260/A280 đạt từ 1,25 - 1,67) nên phải tiến hành kiểm tra hiệu quả của việc tách chiết ADN bằng phản ứng PCR với cặp mồi *matK*_F/R để nhân bản đoạn trình tự dài khoảng 850 bp (trình tự mồi *matK*_F: ACCCAGTCCATCTGGAAATCTGGTTC và *matK*_R: CGTACAGTACTTTTGTGTTTACGAG). Việc lựa chọn cặp mồi *matK*_F/R để kiểm tra kết quả tách chiết ADN là vì cặp mồi này nhân bản dễ dàng ở hầu hết các loài thực vật bậc cao do gen

matK là một gen tương đối bảo thủ. Kết quả thu được tất cả các mẫu ADN tổng số đều xuất hiện sản phẩm PCR là băng ADN có kích thước khoảng 850 bp đúng với kích thước lý thuyết. Từ kết quả PCR này khẳng định đã tách chiết thành công ADN tổng số từ 46 mẫu lá Xá xị sử dụng bộ Kit “DNA mini kit Qiagen” của Đức. Các mẫu ADN này được sử dụng trực tiếp cho thí nghiệm nhân bản các trình tự ADN mã vạch ở loài Xá xị nghiên cứu.

3.2. Kết quả nhân gen với đoạn ADN mã vạch *trnH-psbA* bằng kĩ thuật PCR

Cặp mồi *trnH*_F và *psbA*_R được sử dụng để nhân đoạn gen *trnH-psbA* ở tất cả 46 mẫu Xá xị. Kết quả kiểm tra sản phẩm điện di đoạn gen *trnH-psbA* trên gel agarose 1,2% cho thấy đoạn gen *trnH-psbA* được khuếch đại thành công ở tất cả 46 mẫu Xá xị nghiên cứu. Kích thước đoạn gen nhân bản khoảng 500 bp và các mẫu đều xuất hiện một băng ADN đặc hiệu, không có băng phụ (Hình 1). Sản phẩm PCR nhân bản đoạn gen *trnH-psbA* của 46 mẫu Xá xị sẽ được tinh sạch và xác định trình tự nucleotide bằng phương pháp giải trình tự tự động Sanger. Kết quả giải trình tự nucleotide rất tốt và một số hình ảnh minh họa về kết quả giải trình tự nucleotide của các đoạn *trnH-psbA* nhân bản ở loài Xá xị nghiên cứu được thể hiện ở hình 2.



Hình 1. Điện di sản phẩm PCR nhân bản trình tự *trnH-psbA* của 7 mẫu Xá xị tại Phú Thọ (A) và 11 mẫu Xá xị tại Quảng Ninh (B)

Ghi chú: Đ/c: mẫu đối chứng âm, ADN khuôn được thay bằng H_2O ; M: thang đo ADN 100 bp.



Hình 2. Kết quả giải trình tự của đoạn *trnH-psbA* loài Xá xị của mẫu PT02 và QN02

3.3. Đa dạng nucleotide trình tự ADN mã vạch *trnH-psbA*

Phân tích trình tự nucleotide của vùng *trnH-psbA* ở các mẫu Xá xị cho kết quả vùng bảo tồn là 449/464 nucleotide, số vị trí nucleotide biến đổi là 15/464 nucleotide, trong đó tất cả 15 vị trí đều là vị trí nucleotide biến đổi mang thông tin tiến hóa (parsimony informative sites). Trình tự *trnH-psbA* là trình tự không mã hóa nên có sự biến đổi giữa các cá thể cùng loài cũng như biến đổi lớn giữa các

loài [16]. Haplotype là một chỉ số quan trọng trong đánh giá đa dạng di truyền của quần thể dựa trên sự đa dạng về trình tự nucleotide. Haplotype là số lượng kiểu gen đơn bội có trong quần thể, số lượng haplotype càng lớn thì quần thể càng đa dạng. Khi phân tích trình tự nucleotide đoạn *trnH-psbA* của 46 cây Xá xị nghiên cứu thì có tổng cộng 6 haplotype, cụ thể về vị trí nucleotide sai khác tương ứng với từng dạng haplotype được thể hiện như trên bảng 2.

Bảng 2. Các dạng haplotype tương ứng với vị trí sai khác nucleotide trong trình tự *trnH-psbA*

Dạng haplotype	Số lượng mẫu	Vị trí nucleotide sai khác trong trình tự <i>trnH-psbA</i>														
		40	97	132	153	154	166	174	180	182	191	210	264	314	338	400
Hap 1	HBXa05, HBXa07, HBXa13, HBXa14, HBXa15, HBXa17	T	A	G	C	T	C	G	G	G	T	G	A	A	G	A
Hap 2	HBXa09, HBXa10, HBXa11	G	G	G	A	A	A	G	G	A	A	G	G	G	G	G
Hap 3	PT01, PT02, PT04, PT06, PT07	G	G	A	A	A	A	G	G	A	A	A	A	G	A	G
Hap 4	PT16, PT17	G	G	A	A	A	A	G	A	A	A	G	G	G	G	G

Hap 5	Tất cả 11 mẫu QN và TH08, TH34, TH40, TH42, TH43, Th45, TH46, TH47, TH48, TH49	G	G	G	A	A	A	G	A	A	A	G	G	G	G	G
Hap 6	TH01, TH03, TH04, TH05, TH09, TH13, TH15, TH17, TH24	G	G	G	A	A	A	A	A	A	A	G	G	G	G	G

6 haplotype phân bố khác nhau đối với từng quần thể, không có haplotype nào xuất hiện ở cả 4 quần thể. Haplotype 1 và haplotype 2 xuất hiện ở quần thể Xá xị tại tỉnh Hòa Bình. Haplotype 3 và haplotype 4 xuất hiện ở quần thể Xá xị tại tỉnh Phú Thọ. Haplotype 5 xuất hiện ở quần thể Xá xị tại tỉnh Quảng Ninh và 10/19 cây Xá xị tại tỉnh Thanh Hóa. Haplotype 6 xuất hiện ở 9/19 cây Xá xị tại tỉnh Thanh Hóa. Các haplotype tương ứng với các trình tự *trnH-psbA* khác nhau của 46 mẫu Xá xị được đăng ký thành công trên GenBank với các mã số lần lượt như sau: haplotype 1 mã số MZ821049, haplotype 2 mã số MZ821050, haplotype 3 mã số MZ821047, haplotype 4 mã số MZ821048, haplotype 5 mã số MZ821051, haplotype 6 mã số MZ821052.

Đa dạng haplotype (Hd) là chỉ số đánh giá mức độ xuất hiện kiểu đơn bội trong một quần thể. Hd = 1 khi toàn bộ cá thể trong quần thể có kiểu đơn bội khác nhau tức quần thể đa dạng di truyền cao, ngược lại Hd = 0 khi tất cả các cá thể trong quần thể chỉ có một kiểu đơn bội giống nhau và quần thể không có tính đa dạng di truyền. Đa dạng nucleotide (Pi) là chỉ số thể hiện giá trị trung bình tỷ lệ sai khác nucleotide giữa các cặp trình tự so sánh trong mỗi khảo sát.

Tính chung cả 4 quần thể Xá xị tại 4 tỉnh miền Bắc thì trung bình hệ số đa dạng haplotype tương đối cao (Hd = 0,734) và đa dạng nucleotide đạt mức thấp (Pi = 0,00835). Nhưng đối với từng quần thể thì hệ số đa dạng haplotype chỉ đạt mức trung bình (Hd = 0,476-0,526) và riêng quần thể Xá xị tại

tỉnh Quảng Ninh thì chỉ số Hd = 0,000 tức là chỉ có một dạng đơn bội duy nhất trong quần thể (Bảng 3). Kết quả này cho thấy đa dạng di truyền của quần thể Xá xị tại các tỉnh: Phú Thọ, Hòa Bình, Thanh Hóa đạt mức trung bình, do đó loài này vẫn có tiềm năng phát triển ngoài tự nhiên khi môi trường thay đổi. Đa dạng di truyền bị ảnh hưởng bởi một số yếu tố như tuổi đời, phạm vi phân bố, khả năng sinh sản và hệ thống sinh sản của loài [17], [18]. Xá xị là loài có khả năng tái sinh tự nhiên kém và có thể do hoạt động khai thác quá mức của con người mà loài này có số lượng cá thể ít và phân bố rải rác. Zhang và cs (2021) nghiên cứu đoạn trình tự *trnH-psbA* dài 452 bp của 5 quần thể loài *C. chago* tại Trung Quốc cho thấy sự đa dạng nucleotide tại 13 vị trí, có 4 haplotype trong các quần thể nghiên cứu [19]. Đa dạng di truyền của loài *C. chago* thấp hơn nhiều so với các loài phân bố rộng trong họ Long não như *C. camphora*. Nghiên cứu này cho rằng các hoạt động gây xáo trộn thường xuyên của con người như sự tàn phá và phân cách môi trường sống tự nhiên trong quần thể có tương quan chặt chẽ với mức độ đa dạng di truyền thấp của loài *C. chago*. Đa dạng di truyền bị ảnh hưởng bởi một số yếu tố như tuổi đời, phạm vi phân bố, khả năng sinh sản và hệ thống sinh sản của loài [17], [18]. Ngoài ra, đa dạng di truyền của quần thể có thể bị ảnh hưởng bởi một loạt các yếu tố bao gồm quy mô mẫu, thời gian thu mẫu, địa điểm thu mẫu cũng như các yếu tố diễn ra trong quá trình chọn lọc tự nhiên như tỷ lệ đột biến, lưu lượng gen giữa các quần thể và các yếu tố con người.

Bảng 3. Đa dạng di truyền và đa dạng nucleotide của các quần thể Xá xị tại 5 tỉnh miền Bắc dựa trên trình tự nucleotide đoạn *trnH-psbA*

STT	Quần thể Xá xị	Số mẫu (cây)	Số lượng haplotype	Đa dạng haplotype ($\pm$ SD)	Đa dạng nucleotide ($\pm$ SD)
1	Phú Thọ	7	2	0,476 $\pm$ 0,02935	0,00504 $\pm$ 0,00001
2	Hòa Bình	9	2	0,500 $\pm$ 0,01646	0,01075 $\pm$ 0,00002
3	Quảng Ninh	11	1	0,000 $\pm$ 0,00000	0,00000 $\pm$ 0,00000
4	Thanh Hóa	19	2	0,526 $\pm$ 0,00160	0,00222 $\pm$ 0,00000
	Tổng	46	6	0,734 $\pm$ 0,00250	0,00835 $\pm$ 0,00001

Khoảng cách di truyền cũng là một chỉ số để đánh giá đa dạng di truyền trong và giữa các quần thể. Khoảng cách di truyền giữa các cây Xá xị tại tỉnh Phú Thọ và tỉnh Hòa Bình là 0,000, cho thấy hai quần thể này có quan hệ di truyền rất gần gũi. Khoảng cách di truyền lớn nhất là giữa quần thể Xá xị tại tỉnh Phú Thọ và tỉnh Hòa Bình với quần thể tại tỉnh Thanh Hóa (0,003), khoảng cách di truyền giữa quần thể tại tỉnh Phú Thọ và tỉnh Hòa Bình với quần thể tại tỉnh Quảng Ninh là 0,002. Khoảng cách di truyền giữa quần thể Xá xị tại tỉnh Quảng Ninh và tỉnh Thanh Hóa là 0,001.

Cây quan hệ di truyền giữa 6 dạng haplotype của 4 quần thể Xá xị nghiên cứu và một số loài cùng chi *Cinnamomum* được xây dựng với số lần lặp lại 1.000 lần, sử dụng phương pháp Maximum likelihood. Kết quả cho thấy tất cả 6 dạng haplotype và các loài trong chi *Cinnamomum* tham khảo đều được nhóm vào một nhóm với khoảng cách di truyền rất nhỏ, chỉ từ 0,002 đến 0,035 (Hình 3). Trong đó, 5 dạng haplotype của các cây Xá xị được nhóm với nhau và rất gần với loài *C. parthenoxylon* có mã số MT621578 trên GenBank, riêng dạng haplotype 1 (HBXa05, HBXa07, HBXa13, HBXa14, HBXa15, HBXa17) thì gần hơn với hai loài *C. camphora* và *C. micranthum*. Kết quả này có thể giả thuyết rằng sáu mẫu Xá xị (HBXa05, HBXa07, HBXa13,

HBXa14, HBXa15, HBXa17) có thể có nguồn gốc khác so với các mẫu Xá xị còn lại và nguồn gốc này có thể là do quá trình lai khác loài hình thành, mà một bên bố/mẹ là loài *Cinnamomum parthenoxylon* và bên bố/mẹ còn lại là một loài khác trong chi *Cinnamomum* [20]. Loài *Cascabela thevetia* được sử dụng như một loài ngoài nhóm (out group) để thể hiện rõ được mối quan hệ di truyền gần gũi của các loài cùng chi *Cinnamomum*. Liu và cs (2016) [21] đã sử dụng 4 trình tự ADN mã vạch là *matK*, *rbcl*, *trnH-psbA* và ITS2 trên các loài thuộc họ Long não (Lauraceae) và đã kết luận rằng trình tự *trnH-psbA* có khả năng xác định loài tốt với tỷ lệ đạt 84,0%. Nghiên cứu cũng cho thấy, việc sử dụng chỉ thị *trnH-psbA* có hiệu quả xác định loài trong họ Long não cao hơn hẳn các chỉ thị *matK*, *rbcl*, hay sự kết hợp của cả *matK* và *rbcl*. Tại Việt Nam, những nghiên cứu đa dạng di truyền của loài Xá xị chưa được thực hiện. Tuy nhiên, một dự án nghiên cứu ứng dụng chỉ thị phân tử ADN mã vạch trong phân tích đa dạng di truyền và giám định sinh vật ở Việt Nam đã công bố nhiều trình tự ADN mã vạch của các loài cây rừng trong Ngân hàng dữ liệu ADN Việt Nam [22]. Kết quả của nghiên cứu này cũng góp phần xây dựng thêm cơ sở dữ liệu ADN mã vạch cho loài Xá xị và là cơ sở khoa học để bảo tồn cũng như phát triển loài cây này ở Việt Nam.



Hình 3. Cây quan hệ di truyền của 6 dạng haplotype của 4 quần thể Xá xị với một số loài trong chi *Cinnamomum* có trên GenBank dựa trên trình tự *trnH-psbA*

4. KẾT LUẬN

- Đã xác định được trình tự nucleotide của đoạn ADN mã vạch *trnH-psbA* cho loài Xá xị (*Cinnamomum parthenoxylon* (Jack) Meisn) tại các tỉnh: Phú Thọ, Hòa Bình, Quảng Ninh, Thanh Hóa. Các trình tự *trnH-psbA* của loài Xá xị được đăng ký thành công trên GenBank với các mã số từ MZ821045 đến MZ821052.

- Dựa trên trình tự *trnH-psbA* thì các cây Xá xị tại 4 tỉnh đều được nhóm vào một nhóm và có quan hệ rất gần với loài *C. parthenoxylon* (MT621578), tuy nhiên chỉ có haplotype 1 (HBXa05, HBXa07, HBXa13, HBXa14, HBXa15, HBXa17) có sự sai khác nhỏ và được nhóm cùng với loài *C. camphora* và *C. micranthum*.

- Sự đa dạng di truyền về trình tự nucleotide của các cây Xá xị tại 4 tỉnh miền Bắc dựa trên trình tự *trnH-psbA* cho thấy vị trí nucleotide bảo thủ (không biến đổi) giữa 46 mẫu nghiên cứu là 449 nucleotide, còn số vị trí nucleotide biến đổi là 15 nucleotide. Đa dạng haplotype tính chung ở mức

tương đối cao ($H_d = 0,734$) nhưng đa dạng haplotype của từng quần thể lại chỉ ở mức trung bình ($H_d = 0,467 - 0,0526$) và đa dạng nucleotide ở mức thấp ($P_i = 0,00835$).

LỜI CẢM ƠN

Kính phí thực hiện đề tài được hỗ trợ bởi nhiệm vụ cấp quốc gia “Bảo tồn và phát triển nguồn gen Xá xị (*Cinnamomum parthenoxylon* (Jack) Meisn) tại một số tỉnh miền Bắc” với mã số NVQG-2019/ĐT.14

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Lê Đình Khả (2003). *Chọn tạo giống và nhân giống cho một số loài cây trồng rừng chủ yếu ở Việt Nam*. Nhà xuất bản Nông nghiệp, Hà Nội.
2. Nguyễn Thị Ngọc Lan, Nguyễn Thị Lan Hoa, Nguyễn Thị Thanh Thủy, Lã Tuấn Nghĩa (2019). Nghiên cứu đa dạng di truyền của đoạn gen *matK* ở một số nguồn gen nhân Việt Nam. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam*, 61 (2): 61 - 64.
3. Nguyễn Tiến Bân (2003). *Danh lục các loài thực vật Việt Nam, Tập II*. Nhà xuất bản Nông nghiệp, Hà Nội.
4. Phạm Hoàng Hộ (1999). *Cây cỏ Việt Nam, Quyển 1*. Nhà xuất bản Trẻ, thành phố Hồ Chí Minh.
5. Phùng Văn Phê (2012). Nghiên cứu giảm hom cây Xá xị (*Cinnamomum parthenoxylon* (Jack) Meisn.) làm cơ sở cho công tác bảo tồn ở Vườn Quốc gia Tam Đảo, tỉnh Vĩnh Phúc. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ* 50 (6): 645 - 652.
6. Chandrasekara CHWMB, Naranpanawa DNU, Bandusekara BS, Pushpakumara DKN, Wijesundera DSA, Bandaranayake PCG (2021). Universal barcoding regions, *rbcL*, *matK* and *trnH-psbA* do not discriminate *Cinnamomum* species in Sri Lanka. *PLoS ONE* 16(2): e0245592.
7. Chase M. W., Cowan R. S., Hollingsworth P. M., Berg C. V. D., Madriñán S., Petersen G., Seberg O., Jørgensen T., Cameron K. M., Carine

- M., Pedersen N., Hedderson T. A. J., Conrad F., Salazar G. A., Richardson J. E., Hollingsworth M. L., Barraclough T. G., Kelly L., Wilkinson M. (2007). A proposal for a standardised protocol to barcode all DNA plants. *Taxon* 56 (2): 295-299.
8. Yu, J., Xue J. H., Zhou S. L. (2011). New universal matK primers for DNA barcoding angiosperms. *Journal of Systematics DNA Evolution* 49 (3): 176-181.
9. Hollingsworth M. L., Clark A. (2009). Selecting barcoding loci for plants: evaluation of seven cDNAidate loci with species-level sampling in three divergent groups of land plants. *Molecular Ecology Resources* 9 (2): 439-457.
10. Chen S., Yao H., Han J., Liu C., Song J., Shi L., Zhu Y., Ma X., Gao T., Pang X., Luo K., Li Y., Li X., Jia X., Lin Y., Leon C. (2010). Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species. *PloS One* 5 (1): e8613.
11. Chen J., Erickson D. L., Xia N., Kress W. J. (2015). Testing DNA barcodes in closely related species of *Curcuma* (Zingiberaceae) from Myanmar and China. *Mol Ecol Resour* 15 (2): 337-348.
12. Sang T., Crawford D. J., Stuessy T. F. (1997). Chloroplast DNA phylogeny, reticulate evolution, and biogeography of *Paeonia* (Paeoniaceae). *Am J Bot* 84: 1120-1136.
13. Hall T. A. (1999). BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95-98.
14. Kumar S., Stecher G., Tamura K. (2015). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725-2729.
15. Librado P., Rozas J. (2009). DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452.
16. Kress W. J., Erickson D. L. (2007). A Two-Locus Global DNA Barcode for Land Plants: The Coding rbcL Gene Complements the Non-Coding trnH-psbA Spacer Region. *PLoS ONE* 2(6): e508.
17. Nybom H. (2004). Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Mol. Ecol.* 13: 1143-1155.
18. Wu F. Q., Shen S. K., Zhang X. J., Wang Y. H., Sun W. B. (2015). Genetic diversity and population structure of an extremely endangered species: the world's *Rhododendron*. *AoB Plants* 7: 10696 - 10700.
19. Zhang X., Yang L., Liu Y. H., Zhou X. L., Zhang L. Q., Wang Y. H., Shen S. K. (2021). Genetic diversity, genetic structure, and demographic history of *Cinnamomum chago*, a plant species with extremely small populations in China. *Global Ecology and Conservation* 31: e01808.
20. Rohwer J. G., Trofimov D., Mayland-Quellhorst E., Albach D. (2019). Incongruence of morphological determinations and DNA barcode sequences: a case study in *Cinnamomum* (Lauraceae). – *Willdenowia* 49: 383-400.
21. Liu Z. F., Ci X. Q., Li L., Li H. W., Conran J. G., Li J. (2016). DNA barcoding evaluation and implication for phylogenetic relationships in Lauraceae from China. *PLoS ONE* 12 (4): e0175788.
22. Hà Văn Huân (2015). Nghiên cứu ứng dụng chỉ thị phân tử ADN mã vạch trong phân tích đa dạng di truyền và giám định sinh vật ở Việt Nam. Ngân hàng dữ liệu ADN Việt Nam.

NUCLEOTIDE DIVERSITY OF DNA BARCODE SEQUENCE *trnH-psbA* IN *Cinnamomum parthenoxylon* (Jack) Meisn SPECIES IN SOME NORTHERN PROVINCES OF VIETNAM**Ha Bich Hong¹, Nguyen The Huong¹, Hoang Van Sam¹**¹*Vietnam National University of Forestry***Summary**

Cinnamomum parthenoxylon (Jack) Meisn is a large tree with high economic value classified in group IIA (Decree 84/2021/ND-CP) and critically endangered CR group (Vietnam Red Book 2007). *C. parthenoxylon* has a poor natural regeneration ability, and it is indiscriminately exploited to store essential oil for a long time, making this tree species in danger of extinction and needs to be preserved and developed in the wild. DNA barcode markers have been effectively used in species identification and genetic diversity assessment. In this study, the DNA barcode marker *trnH-psbA* was used to analyze the genetic diversity of 46 dominant plants of *C. parthenoxylon* investigated in the four Northern provinces: Phu Tho, Hoa Binh, Quang Ninh, Thanh Hoa. The results show that the *trnH-psbA* marker had a relatively large difference in nucleotide sequence between the studied trees, specifically the number of variable positions was 15 nucleotides out of a total of 464 nucleotides, of which all the 15 variable positions are all of evolutionary significance (parsimony informative sites). The number of haplotypes (h) of all studied *C. parthenoxylon* plants was 6, with a relatively high haplotype diversity index ($H_d = 0.734$) and a low nucleotide diversity index ($\pi = 0.00835$). The genetic diversity within population reached an average level ($H_d = 0.476 - 0.526$), only the population in Quang Ninh province did not show genetic diversity ($H_d = 0.000$). The genetic distance between the populations of different provinces is relatively low, ranging from 0.000 to 0.003, of which the population in Phu Tho and Hoa Binh provinces has a genetic distance of 0.000. The results of genetic diversity assessment of *C. parthenoxylon* species in four Northern provinces show that genetic diversity within populations is lower genetic diversity among populations, this result is the scientific basis for making a solution. conservation and effective development of the sassafras species.

Keywords: Nucleotide diversity, DNA barcode, *trnH-psbA*, *Cinnamomum parthenoxylon*.

Người phản biện: PGS.TS. Đinh Thị Phòng

Ngày nhận bài: 26/8/2022

Ngày thông qua phản biện: 13/9/2022

Ngày duyệt đăng: 20/9/2022

PHÂN LẬP VÀ SƠ BỘ ĐỊNH TÊN VI KHUẨN GÂY THỐI HỒNG NHO NINH THUẬN

Nguyễn Thị Hạnh^{1,*}

TÓM TẮT

Nho (*Vitis vinifera* L), là loại quả có giá trị dinh dưỡng và giá trị kinh tế cao. Sau khi thu hoạch, nho rất dễ bị hư hỏng nếu không được bảo quản kịp thời. Một trong những nguyên nhân chính gây hư hỏng là do hệ vi sinh vật trong nho phát triển mạnh mẽ. Với mục đích kéo dài thời gian bảo quản của quả nho, đã tiến hành phân lập các loại vi sinh vật từ 2 giống nho NH01-48 (nho xanh) và Red Cardinal (nho đỏ) được trồng ở tỉnh Ninh Thuận. Khuẩn lạc đặc trưng được làm sạch, quan sát hình thái và định tên bằng phương pháp sinh học phân tử. Vi khuẩn được định tên bằng phương pháp giải trình tự gen 16S rRNA. Các trình tự gen thu được so sánh với cơ sở dữ liệu GenBank bằng phần mềm BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Sau khi giải trình tự gen và so sánh với cơ sở dữ liệu của GenBank với tỉ lệ tương đồng 99-100%, định tên được 4 loại vi khuẩn trên nho xanh là: *Flavobacterium* sp., *Bacillus cereus*, *Citrobacter* sp., *Pseudomonas oryzae*, 4 loại vi khuẩn trên nho đỏ là: *Citrobacter* sp., *Enterobacterium ludwigii*, *Bacillus thurengensis*, *Empedobacter brevis*. Kết quả này sẽ là nền tảng để nghiên cứu các giải pháp kéo dài thời gian bảo quản quả nho sau thu hái.

Từ khóa: Red Cardinal, NH01-48, Ninh Thuận, vi khuẩn, phân lập.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây nho (*Vitis vinifera* L), thuộc họ Vitaceae, có nguồn gốc ở vùng Bắc bán cầu, đặc biệt là vùng khí hậu ôn đới thuộc châu Âu, Bắc Mỹ, Trung Mỹ và Tây Bắc của Nam Mỹ [1]. Một số giống nho nổi tiếng trên thế giới như: nho không hạt Thompson Seedless, nho Aneb-e-Shahi, nho xanh Bangalore Blue, nho không hạt Beauty Seedless, nho không hạt Perlelte, nho đỏ Cardinal, nho tím Ribier [2].

Ở Việt Nam, tổng diện tích nho cả nước ước khoảng 2.500 - 3.000 ha, trong đó chiếm diện tích nhiều nhất là tỉnh Ninh Thuận với khoảng trên 55% tổng diện tích cả nước, tiếp đến là Bình Thuận với gần 10%, còn lại được trồng rải rác ở nhiều nơi trên cả nước [3]. Ninh Thuận đã hoàn thành quy hoạch vùng sản xuất nho an toàn với quy mô hơn 2.553 ha tập trung chủ yếu ở huyện Ninh Phước, Ninh

Hải và thành phố Phan Rang – Tháp Chàm, với nhiều loại giống nho mới năng suất chất lượng cao như giống nho ăn tươi NH01-93, NH01-48, NH01-96, giống Red Cardinal...[4].

Hệ vi sinh vật trên nho là vô cùng phong phú, các loại vi sinh vật hoạt động gây ra biến đổi về thành phần dinh dưỡng và gây thối hỏng quả nho. Sự xuất hiện các vi sinh vật trên nho phụ thuộc vào nhiều yếu tố: giống nho, đất đai, nguồn nước, khu vực trồng trọt, điều kiện chăm bón...Nho trồng ở vùng lãnh thổ khác nhau sẽ có hệ vi sinh vật khác nhau. Ở cùng một vùng trồng nho, các mùa khác nhau sẽ cho chất lượng và hệ vi sinh vật khác nhau [5].

Một số loại vi khuẩn có ảnh hưởng đến hương vị và năng suất của nho như: hệ vi khuẩn axit lactic, vi khuẩn axit acetic. Tuy nhiên, nó lại gây hư hỏng đối với nho ăn tươi. Đối với quả lạnh lặn, số lượng của chúng nhỏ, nhưng nếu có xây xước của vỏ quả, tạo điều kiện cho chúng phát triển mạnh, sử dụng chuyển hóa đường glucose,

¹ Viện Công nghệ Sinh học và Công nghệ Thực phẩm, Trường Đại học Bách khoa Hà Nội

* Email: hanh.nguyenthi@hust.edu.vn

fructose và pentose, sản xuất axit lactic và axit axetic, tạo mùi chua, giảm pH môi trường làm hạn chế sự tăng trưởng của vi khuẩn có lợi trên nho, gây thối hỏng nho nhanh chóng [6, 7].

Nghiên cứu này sẽ tiến hành phân lập mẫu nho được thu hái tại trang trại nho Ba Mọi – một trong những vườn nho nổi tiếng của tỉnh Ninh Thuận để chỉ ra sự có mặt của vi khuẩn trên bản thân quả nho.

2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu

Nguyên liệu nho được lấy mẫu vào chính vụ thu hoạch tháng 4 các năm 2014, 2015, 2016 và 2017 độ tuổi thu hoạch của các lần lấy mẫu từ 115 -

120 ngày (đối với nho NH01-48) và 90 - 95 ngày (đối với nho Red Cardinal) sau khi cắt cành. Địa điểm lấy mẫu tại thôn Thanh Sơn, xã Xuân Hải, huyện Ninh Hải, tỉnh Ninh Thuận là vùng nho sản xuất đạt tiêu chuẩn VietGAP. Thời điểm thu hái và lấy mẫu kết thúc trước 6 giờ sáng trong ngày. Mẫu nho được thu hái dạng chùm, lựa chọn các chùm có kích thước quả tương đối đồng đều (dài 28 ± 2 mm, rộng 18 ± 2 mm), cắt bỏ những quả bị khuyết tật với khối lượng khoảng 550 - 650 g/chùm. Tiếp theo các chùm nho được bao gói bằng bao bì PE đục lỗ, 2 chùm/bao, xếp trong thùng xốp có bảo ôn bằng đá, đảm bảo nhiệt độ trong thùng luôn ở mức 10 - 12°C, vận chuyển theo đường hàng không tuyến Nha Trang - Hà Nội về phòng thí nghiệm.



Vitis vinifera Red Cardinal (nho đỏ)



Vitis vinifera NH01-48 (nho xanh)

Hình 1. Nguyên liệu nho dùng trong nghiên cứu

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp phân lập vi khuẩn trên nho Ninh Thuận

- Cách tiến hành phân lập vi khuẩn trên nho được thực hiện theo quy trình sau [8]:

Lấy 50 g mẫu mỗi loại nho → Rửa bằng 500 ml nước vô trùng → Để nho tự thối hỏng ở nhiệt độ phòng → Chuyển 0,1 ml dịch nho lên môi trường Trypton Glucoza Agar (TGA) và Yeast Glucoza Chloramphenicol (YGC) → Nuôi cấy sau 48 giờ,

nhiệt độ 30°C → Phân lập và tinh sạch khuẩn lạc đặc trưng.

- Xác định đặc điểm hình thái – sinh hóa [9]:

Tiến hành nhuộm Gram, soi dưới kính hiển vi dầu 100x, quan sát tính bất màu của vi khuẩn, đặc điểm hình dạng và sơ bộ phân loại vi khuẩn.



Hình 2. Hình ảnh nho thối hỏng sau 5 ngày

2.2.2. Phương pháp định tên vi khuẩn trên nho Ninh Thuận

- Tiến hành định tên vi khuẩn đã phân lập được bằng phương pháp sinh học phân tử theo quy trình sau [10]:

Tách chiết ADN (Deoxyribonucleic acid) tổng số. ADN genome của các chủng vi khuẩn được

tách chiết theo phương pháp của Marmur (1961) và Saito (1963) [11, 12].

Điện di kiểm tra kết quả tách ADN. Các mẫu thu được sau quá trình tách ADN đem điện di gel agarose để kiểm tra xem quá trình có tách được ADN mong muốn hay không.

Khuếch đại gen mục tiêu. Khuếch đại gen mã hóa 16S rRNA theo trình tự xác định ở bảng 1.

Bảng 1. Trình tự mỗi dùng để xác định các gen

Ký hiệu primers		Chuỗi primers (5 - 3)
Vi khuẩn	27-F	5' – AGAGTTTGATCCTGGCTCAG – 3'
	1492-R	5' – GGTTACCTTGTTACGACTT – 3'

Các điều kiện trong phản ứng PCR như sau: ADN: 1,0 µl; mỗi (Primers) 5 mM: 2,0 µl; 5 mM dNTPs (Fermentas): 1,5 µl; 10X Tag Buffer (NEB): 2,5 µl; DreamTaq ADN pol: 0,5 µl; H₂O: 17,5 µl; Tổng thể tích phản ứng: 25 µl.

Điện di kiểm tra sản phẩm. Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng phương pháp điện di trên agarose với thành phần dung dịch đệm trong quá trình điện di: Tris base: 2,42 g; axit acetic: 571 µl; EDTA 50 mM: 1 ml; nước cất: 500 ml; thử pH

khoảng: 8,3 – 8,6; hiệu điện thế: 100 V; nồng độ gel agarose 0,8%.

Giải trình tự gen bằng phương pháp Sanger. Các gen đã khuếch đại được giải trình tự ở Công ty Macrogen, Hàn Quốc bằng phương pháp Sanger (1977) sử dụng cặp mồi: 27F và 1492R [13].

Định tên vi khuẩn. Kết quả giải trình tự gen thu được, sẽ được xử lý dữ liệu bằng phần mềm Bioedit, các chương trình Mult Alin, ADN bổ sung và so sánh trên cơ sở dữ liệu GenBank tại địa chỉ: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân lập vi khuẩn trên nho Ninh Thuận

Tiến hành phân lập các vi sinh vật có mặt ở 2 giống nho. Tần suất xuất hiện của các loại vi sinh vật được tính bằng số lần xuất hiện vi sinh vật trên tổng số quả đem phân lập. Kết quả thu được như sau:

- Đối với nho đỏ: trên môi trường TGA và YGC, vi sinh vật có mặt ở tất cả các quả nho có đặc điểm trắng nhày đục và vàng với tần suất xuất hiện 100%.

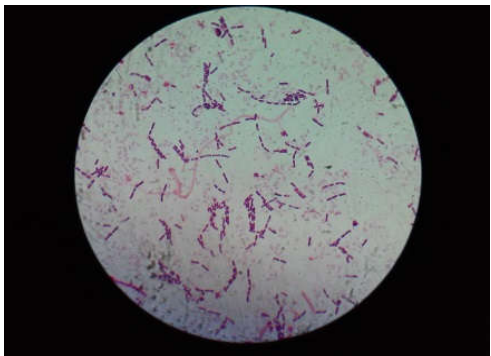
- Đối với nho xanh: ở cả hai môi trường nuôi cấy, loại vi sinh vật có đặc điểm đám trắng bé li ti

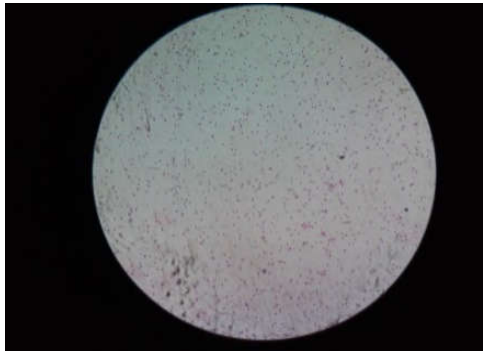
và trắng nhày, đục xuất hiện ở hầu hết các quả nho.

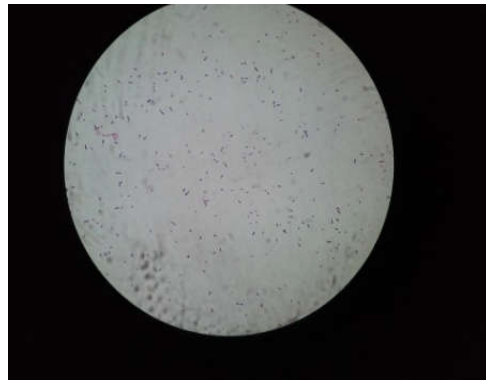
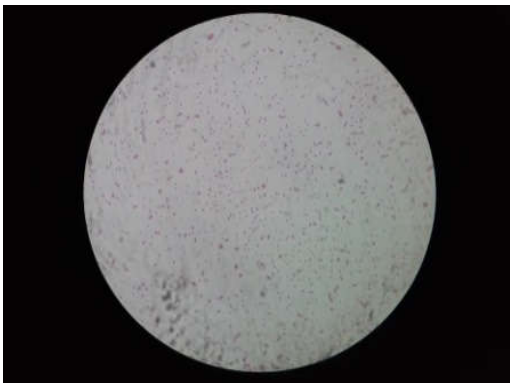
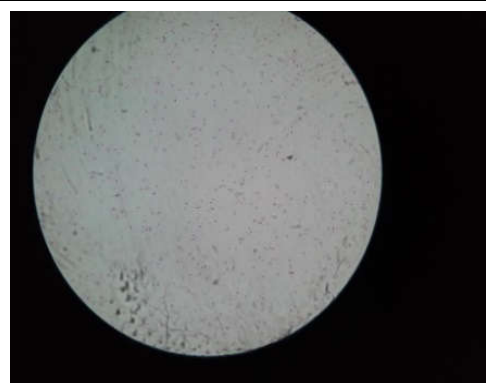
Sau khi đã phân lập và tinh sạch các khuẩn lạc đơn riêng rẽ thu được: trên nho đỏ phân lập được 4 mẫu khuẩn lạc vi khuẩn ký hiệu: A, B, C, D với tần suất xuất hiện tương ứng 90, 100, 100 và 100%. Trên nho xanh phân lập được 4 mẫu khuẩn lạc vi khuẩn ký hiệu: E, F, G, H với tần suất xuất hiện tương ứng 80, 60, 60 và 60%.

Sau khi quan sát các đặc điểm hình thái, màu sắc, kích thước của khuẩn lạc trên đĩa thạch đặc và quan sát hình thái tế bào vi khuẩn bằng phương pháp nhuộm gram soi dưới kính hiển vi độ phóng đại 100x, kết quả được thể hiện ở bảng 2.

Bảng 2. Đặc điểm hình thái của vi khuẩn phân lập được

Ký hiệu	Đặc điểm khuẩn lạc	Đặc điểm hình thái tế bào
A	 Khuẩn lạc phẳng, khá khuếch tán, hơi lồi, mép lồi lồi, màu trắng đục.	 Gram +. Trục khuẩn. Tế bào dày, kích thước lớn, thường đứng riêng rẽ hoặc tạo chuỗi. Bào tử hình bầu dục nằm lệch tâm
B	 Khuẩn lạc tròn, bờ đều, lồi bóng, màu vàng đậm	 Gram -. Trục khuẩn. Tế bào hình que nhỏ, không bào tử, 2 bên song song và đầu tròn

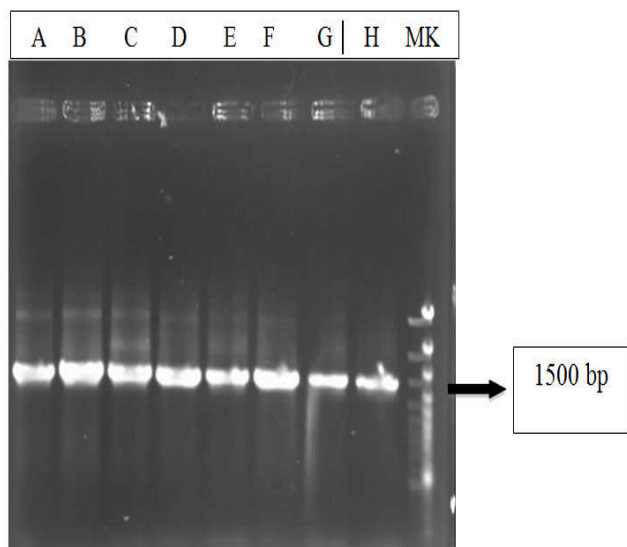
C	Khuẩn lạc mịn, lồi thấp, bề mặt nhẵn bóng, cạnh không đều, vàng nhạt hơi đục 	Gram -. Trục khuẩn. Tế bào hình que nhỏ, không bào tử, sống riêng lẻ hoặc tụ thành nhóm. 
D	 Khuẩn lạc tròn, trơn, hơi lồi, màu vàng trắng	 Gram -. Trục khuẩn. Tế bào hình que nhỏ, không bào tử
E	 Khuẩn lạc phẳng, khá khuếch tán, hơi lõm, mép răng cưa tròn, màu trắng kem.	 Gram +. Trục khuẩn. Tế bào kích thước lớn, thường đứng riêng rẽ hoặc tạo chuỗi. Bào tử hình bầu dục nằm lệch tâm
F	Bề mặt tròn, lồi thấp, mịn, sáng bóng, bờ đều. Màu vàng ánh xanh đậm	Gram -. Trục khuẩn. Tế bào kích thước nhỏ, không bào tử

		
G	Khuẩn lạc tròn mịn, lõi thấp, bề mặt nhẵn bóng, bờ đều, vàng nhạt 	Gram -. Trực khuẩn. Tế bào hình que nhỏ, không bào tử, sống riêng lẻ hoặc tụ thành nhóm 
H	 Khuẩn lạc tròn, bờ đều, lõi bóng, màu vàng đậm	 Gram - Trực khuẩn. Tế bào hình que nhỏ, không bào tử, 2 bên song song và đầu tròn, sống riêng lẻ hoặc thành đám

Từ kết quả ở bảng 2 cho thấy, ở nhỏ có sự phân bố của cả vi khuẩn gram âm và gram dương, cả loài sinh bào tử và không sinh bào tử với kích thước rất khác nhau, hình dạng khác nhau. Chúng đều có Enzyme catalase trong tế bào, thể hiện đều là vi khuẩn hiếu khí. Các vi khuẩn trên sinh trưởng khá nhanh và mạnh trên môi trường thạch TGA.

3.2. Định tên vi khuẩn

Các khuẩn lạc thu nhận được tách chiết ADN genome và khuếch đại gen 16S rRNA theo phương pháp đã mô tả ở mục 2.2.2. Các đoạn gen thu được của vi khuẩn có chiều dài khoảng 1.500 nucleotide (Hình 3).



Hình 3. Các đoạn gen 16S rARN của vi khuẩn phân lập được

Chú thích: A-mẫu vi khuẩn A, B-mẫu vi khuẩn B, C-mẫu vi khuẩn C, D-mẫu vi khuẩn D, E-mẫu vi khuẩn E, F-mẫu vi khuẩn F, G-mẫu vi khuẩn G, H-mẫu vi khuẩn H, MK-marker.

Từ kết quả ở hình 3 cho thấy, đã xuất hiện các vạch trên bản điện di, điều đó thể hiện mẫu sản phẩm sau PCR là đồng nhất, đạt điều kiện. Các vạch có chiều cao gần đều nhau, thể hiện chiều dài nucleotide không chênh lệch nhiều, khoảng 1.500 bp.

Các đoạn gen 16S rARN của vi khuẩn được giải trình tự theo phương pháp đã mô tả ở phần 2.2.2. Các trình tự gen thu được đem so sánh với cơ sở dữ liệu GenBank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) bằng chương trình BLAST. Độ tương đồng của các trình tự gen thu được thể hiện ở bảng 3, từ đó đã đề xuất định tên vi khuẩn phân lập được như sau:

Bảng 3. Định tên vi khuẩn phân lập được trên quả nho Ninh Thuận

Loại nho	Ký hiệu	Định danh	Độ tương đồng (%)
Nho đỏ	A	<i>Bacillus thuringiensis</i>	100
	B	<i>Empedobacter brevis</i>	99
	C	<i>Citrobacter</i> sp.	99
	D	<i>Enterobacterium ludwigii</i>	100

Nho xanh	E	<i>Bacillus cereus</i>	100
	F	<i>Pseudomonas oryzae</i> sp.	100
	G	<i>Citrobacter</i> sp.	99
	H	<i>Flavobacterium</i> sp.	100

Theo kết quả nhận được, so sánh với một số tài liệu nghiên cứu phân lập vi sinh vật trên nho thực hiện ở một số nơi trên thế giới như Iran, California-Mỹ, Australia, thấy rằng có một số loài vi sinh vật cùng loài với các vi sinh vật đã được tìm thấy trước đó, như: *Flavobacterium* sp., *Bacillus thuringiensis* [6, 7].

Bulgari D. và cs (2011) đã tiến hành phân lập vi sinh vật từ mẫu nho lấy ở vùng Tây Bắc nước Ý, định tên bằng phương pháp giải trình tự gen 16S rRNA (Ribonucleic acid), đã tìm ra một số loài vi khuẩn như: *Bacillus subtilis*, *Bacillus mycoides*, *Enterobacter* sp., *Pectobacterium* sp. và *Sphingomonas* sp. [14]. Martins G. và cs (2013) đã tiến hành phân lập vi sinh vật từ mẫu nho lấy tại 2 vùng ở Lussac St. Emilion miền Tây Nam nước Pháp, đều giống nhau về giống loài (Merlot), độ tuổi, điều kiện chăm sóc. Sau đó tiến hành định tên bằng phương pháp sinh học phân tử sử dụng mỗi 16S rRNA, đã tìm ra một số loài vi khuẩn như: *Burkholderia* sp., *Cellulomonas* sp., *Enterobacter* sp., *Massilia* sp., *Micrococcus* sp., *Sphingomonas* sp., *Bacillus* sp. [15]. Gilbert J. A. và cs (2014) đã tiến hành phân lập vi sinh vật từ mẫu nho lấy tại 8 vùng nho ở California - Mỹ, sử dụng phương pháp định tên bằng giải trình tự gen 16S rRNA cho thấy các loài vi khuẩn khác nhau ở các vùng khác nhau, với giống và thời điểm sản xuất nho khác nhau. Các loài vi khuẩn bao gồm: *Pseudomonas* sp., *Flavobacterium* sp., *Micrococcus* sp., *Bacillus* sp., *Massilia* sp., *Cellvibrio* sp., *Achromobacter* sp. [6]. Maulani S. và cs (2012) đã tiến hành phân lập vi sinh vật của 4 giống nho Shahan, Seedless Green, Seedless red và Askari của vườn nho Takestan, tỉnh Qazvin, trung tâm Iran. Sau đó quan sát và xác định hình thái tế bào, dùng phương pháp nhuộm gram và xét nghiệm sinh hóa. Có sự khác nhau về loài vi khuẩn tìm thấy giữa 2 loại mẫu xử lý. Mẫu xử lý không rửa nước có thêm các loài *Bacillus mycoides*, *Micrococcus* sp., *Clostridium* sp. [16]. Bokulich N. A. và cs (2014) đã tiến hành phân lập

vi sinh vật từ mẫu nho ở California – Mỹ và định tên bằng phương pháp giải trình tự gen 16S rRNA, đã tìm ra một số loài vi khuẩn như: *Pseudomonas* sp., *Micrococcus* sp., *Sphingomonas* sp., *Methylobacterium* sp., *Enterobacter* sp., *Gluconobacter* sp. [5]. Bae S. và cs (2006) đã phân lập vi sinh vật từ mẫu nho trồng ở vườn nho vùng New South Wales, Australia. Định tên bằng sinh học phân tử sử dụng mỗi 16S rRNA và phương pháp PCR-DGGE cũng được sử dụng đã tìm ra một số loài vi khuẩn như: *Lactobacillus* sp., *Enterococcus* sp., *Lactococcus* sp. và *Weissella* sp., *Sporolactobacillus* sp., *Bacillus* sp. [7].

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã phân lập và định tên được các loại vi khuẩn từ 2 mẫu nho Ninh Thuận gồm 4 loại vi khuẩn: *Bacillus thuringiensis*, *Empedobacter brevis*, *Citrobacter* sp. và *Enterobacterium ludwigii* phân lập được từ nho đỏ Red Cardinal và 4 loại vi khuẩn: *Bacillus cereus*, *Pseudomonas oryzae*, *Citrobacter* sp. và *Flavobacterium* sp. phân lập được từ nho xanh NH 01-48. Kết quả của nghiên cứu này là một trong những kết quả đầu tiên đóng góp vào cơ sở dữ liệu về vi sinh vật có mặt trên nho ăn ở Việt Nam. Đồng thời nó cũng là cơ sở để nghiên cứu các phương pháp nhằm tiêu diệt vi sinh vật gây thối hỏng và phối hợp với các phương pháp khác để kéo dài thời gian bảo quản nho sau thu hái.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Rustioni L., Maghradze D., Failla O. (2012) Optical properties of berry epicuticular waxes in four Georgian grape cultivars (*Vitis vinifera* L.). *South African Journal of Enology and Viticulture*, 33(2):138-143
2. David T. (2013) Grapes: A brief history. Missouri Environment & Garden, <https://ipm.missouri.edu>
3. Phạm Châu Hoàn (2014). Tiềm năng nho Ninh Thuận. Ninh Thuận Online, baoninhthuan.com.vn
4. Đình Tăng (2016). Hướng đi cho nho và vang nho Ninh Thuận. *Báo Điện tử Đảng Cộng sản Việt Nam*.
5. Bokulich N. A., Thorngate J. H., Richardson P. M., Mills D. A. (2014). Microbial biogeography of wine grapes is conditioned by cultivar, vintage, and climate. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(1):139-148.
6. Gilbert J. A., Daniel L., Iratxe Z. (2014). Microbial terroir for wine grapes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(1):5-6.
7. Bae S., Fleet G. H., Heard G. M. (2006). Lactic acid bacteria associated with wine grapes from several Australian vineyards. *Journal of Applied Microbiology*, 100(4):712-727.
8. Tournas V. H., Katsoudas E. (2005). Mould and yeast flora in fresh berries, grapes and citrus fruits. *International Journal of Food Microbiology*, 105(1):11-17.
9. Trần Linh Thuộc (2009). *Phương pháp phân tích vi sinh vật trong nước, thực phẩm và mỹ phẩm*. Nxb Giáo dục.
10. Frank J. A., Claudia I. R., Shobha S., Jon S. W., Brenda A. W., Gary J. O. (2008). Critical evaluation of two primers commonly used for amplification of bacterial 16S rRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(8):2461-2470.
11. Marmur J. (1961). A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *Journal of Molecular Biology*, 3:208-218.
12. Saito H., Miura K. I. (1963). Preparation of transforming deoxyribonucleic acid by phenol treatment. *Biochimica et Biophysica Acta*, 72:619-629.
13. Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors (DNA polymerase/nucleotide sequences/bacteriophage ΦX174). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(12):5463-5467.
14. Bulgari D., Casati P., Crepaldi P., Daffonchio D., Quaglino F., Brusetti L., Bianco P. A. (2011) Restructuring of endophytic bacterial communities in grapevine yellows-diseased and recovered *Vitis vinifera* L. plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(14):5018-5022.

15. Martins G., Lauga B., Miot-Sertier C., Mercier A., Lonvaud A., Soulas M. -L., Soulas G., Masneuf-Pomarède I. (2013). Characterization of epiphytic bacterial communities from grapes, leaves, bark and soil of grapevine plants grown, and their relations. *PLoS ONE*, 8(8): 73013.
16. Maulani S., Hosseini S. M., Elikeie A., Mirnurollahi S. M. (2012). Isolated microorganisms from Iranian grapes and its derivatives. *Iranian journal of Microbiology*, 4(1): 25-29.

ISOLATION AND IDENTIFICATION BACTERIA CAUSING THE NINH THUAN GRAPES SPOILAGE

Nguyen Thi Hanh^{1,*}

¹Institute of Biology and Food Technology, School of Hanoi University of Science and Technology

**Email: hanh.nguyenthi@hust.edu.vn*

Summary

Grape (*Vitis vinifera* L), is the fruit which has high nutrition and economic value. After being harvested and without opportune preservation, grapes are susceptible to spoilage. One of the main reasons which cause spoilage to the grape is significant growth of bacteria. To extend the preservation time, the research team isolated bacteria from NH01-48 (green grape) and Red Cardinal (red grape) harvested from Ninh Thuan province. The characterized colony was purified, observed the morphology and identified by the molecular biology method. The bacteria were identified by 16S rRNA sequence analysis method. The gene sequences obtained were compared with database from GenBank by the BLAST software (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). After sequencing the genes and comparing with database of GenBank with 99 – 100% similarity, 4 types of bacteria on green grapes were identified: *Flavobacterium* sp., *Bacillus cereus*, *Citrobacter* sp., *Pseudomonas oryzae*; 4 types of bacteria on red grapes were: *Citrobacter* sp., *Enterobacterium ludwigii*, *Bacillus thurengensis*, *Empedobacter brevis*. This result is the foundation for researching solutions to prolong the shelf life of post-harvested grapes.

Keywords: *Red Cardinal, NH01-48, Ninh Thuan, bacteria, isolation.*

Người phản biện: PGS.TS. Hà Viết Cường

Ngày nhận bài: 31/8/2022

Ngày thông qua phản biện: 30/9/2022

Ngày duyệt đăng: 5/10/2022

NGHIÊN CỨU LIÊN KẾT TRÊN TOÀN HỆ GEN (GWAS) VỀ KHẢ NĂNG CHỐNG CHỊU Ở KEO LAI VỚI BỆNH CHẾT HÉO DO NẤM *Ceratocystis*

Lê Sơn^{1*}, Trần Thanh Trăng², Nguyễn Đức Kiên¹

TÓM TẮT

Nghiên cứu liên kết trên toàn hệ gen được tiến hành với 80 kiểu gen có mức độ chống chịu khác nhau với bệnh chết héo ở giai đoạn vườn ươm bằng phương pháp gây nhiễm bệnh nhân tạo. Kết quả phân tích GBS đã xác định được 4.137 chỉ thị SNP có tính đa hình cao làm nền tảng cho các nghiên cứu tiếp theo. Qua phân tích mối tương quan giữa sự khác biệt về kiểu gen và kiểu hình đã xác định được 4 chỉ thị SNP có tương quan đến tính trạng chống chịu với bệnh chết héo ở điều kiện vườn ươm với mức sai khác ý nghĩa (giá trị p đạt từ $3,76 \times 10^{-6}$ đến $1,2 \times 10^{-5}$). Các chỉ thị này sau đó được áp dụng trên quần thể chọn giống gồm 57 dòng Keo lai và đã cho thấy tiềm năng rất lớn trong việc ứng dụng công nghệ sinh học trong cải thiện giống cây rừng.

Từ khóa: Bệnh chết héo, chỉ thị phân tử, Keo lai, liên kết trên toàn hệ gen, tính chống chịu.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Diện tích rừng trồng keo ở Việt Nam đến nay xấp xỉ 2 triệu ha [1] chủ yếu là Keo tai tượng (*Acacia mangium*) và giống Keo lai giữa Keo tai tượng và Keo lá tràm (*A. auriculiformis*). Keo lai giữa Keo tai tượng (*Acacia mangium*) và Keo lá tràm (*A. auriculiformis*) hoặc ngược lại đang được trồng ở một số nước vùng Đông Nam Á như Malaysia, Indonesia, Lào và Việt Nam. Rừng trồng Keo lai đang tăng lên ở các nước vùng Đông Nam Á để đáp ứng các nhu cầu về sản phẩm gỗ nội địa, tăng giá trị xuất khẩu, trợ giúp nền kinh tế nông thôn và giảm đói nghèo [2]. Keo lai được trồng phổ biến ở Việt Nam là do chúng có tốc độ sinh trưởng nhanh, phù hợp với nhiều điều kiện lập địa khác nhau [3] và diện tích rừng Keo lai ngày

càng tăng để đáp ứng nhu cầu về gỗ keo phục vụ sản xuất, xây dựng, tiêu thụ nội địa và xuất khẩu.

Dù vậy, trong những năm gần đây nấm gây bệnh chết héo *Ceratocystis manginecans* đang gây chết rừng keo với quy mô lớn ở Indonesia, Việt Nam và Malaysia với hàng ngàn héc ta rừng bị nhiễm bệnh [4, 5, 6, 7]. Do sự nguy hiểm gây ra bởi nấm *C. manginecans* nên đã có nhiều thí nghiệm nhiễm bệnh nhân tạo đã được thực hiện để thử nghiệm khả năng chống chịu bệnh với các quy mô khác nhau cho các loài keo ở Indonesia, Malaysia và Việt Nam [4, 5, 8, 6, 9]. Xu hướng trồng rừng trên thế giới hiện nay là sử dụng các dòng/giống cây trồng mang tính trạng kháng bệnh hoặc có khả năng chống chịu bệnh cao để quản lý bệnh.

Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam đã tạo ra được bộ giống gồm rất nhiều dòng Keo lai các loại, trong đó đã có nhiều dòng Keo lai đã được công nhận giống Tiến bộ kỹ thuật (TBKT) và giống Quốc gia với các ưu điểm là sinh trưởng nhanh,

¹ Viện Nghiên cứu Giống và Công nghệ sinh học Lâm nghiệp, Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam

² Trung tâm Nghiên cứu Bảo vệ rừng, Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam

*Email: leson@vafs.gov.vn

tuy nhiên đến nay có một số dòng Keo lai như dòng TB6, TB12 (giống TBKT) lại mắc cảm với bệnh chết héo [10]. Do đó, việc tiếp tục tiến hành chọn giống Keo lai theo hướng kết hợp giữa tính trạng sinh trưởng nhanh và tính chống chịu với bệnh chết héo là việc làm có ý nghĩa.

Hiện nay, ứng dụng công cụ sinh học phân tử trong việc chọn tạo giống như chọn tạo giống sinh trưởng nhanh, chọn giống kháng/chống chịu bệnh đối với cây trồng đã và đang được ứng dụng trên thế giới và gần đây là ở Việt Nam. Việc nghiên cứu chọn giống cây trồng với sự trợ giúp của chỉ thị phân tử đã được nghiên cứu và ứng dụng cho cây lâm nghiệp như cây thông, bạch đàn. Có nhiều phương pháp ứng dụng chỉ thị phân tử trong nghiên cứu chọn giống cây kháng bệnh, trong đó có phương pháp sử dụng chỉ thị SNP (Single Nucleotide Polymorphism). Xu hướng kết hợp chọn các dòng Keo lai vừa có tính trạng sinh trưởng nhanh, vừa có tính trạng kháng bệnh chết héo và việc kết hợp ứng dụng công cụ sinh học phân tử với chọn giống truyền thống là hướng đi có ý nghĩa thiết thực.

Trong nghiên cứu này, phương pháp GWAS (Genome wide association study - nghiên cứu liên kết trên toàn hệ gen) đã tiến hành trên quần thể thử nghiệm gồm 80 mẫu của các loài keo để xác định các chỉ thị phân tử có tương quan đến tính chống chịu với bệnh chết héo nhằm nâng cao hiệu quả của chương trình chọn giống Keo lai với sự hỗ trợ của các tiến bộ về công nghệ sinh học.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

- Vật liệu được sử dụng để phát triển các chỉ thị phân tử có tương quan đến tính trạng chống chịu bệnh chết héo (tổng cộng 80 dòng/cá thể

được chọn lọc sau khi thử nghiệm tính chống chịu bệnh tại vườn ươm), bao gồm:

+ Ba dòng Keo lá tràm Clt18, Clt19 và Clt26 là giống Quốc gia (Quyết định số 2763/QĐ-BNN-LN ngày 01/10/2009 và Quyết định số 3453/QĐ-BNN-LN ngày 23/12/2010 của Bộ Nông nghiệp và PTNT).

+ Hai dòng Keo lai AH1 và AH7 là giống Quốc gia (Quyết định số 3905/QĐ/BNN-TCLN 11/12/2007 và Quyết định số 3747/QĐ/BNN-TCLN ngày 15/09/2015 của Bộ Nông nghiệp và PTNT).

+ Năm dòng Keo lai ĐN1, ĐN2, ĐN3, ĐN4 và ĐN5.

+ Sáu gia đình Keo tai tượng (hạt thu từ vườn giống hữu tính Keo tai tượng thế hệ 2 tại Ba Vì - Quyết định số 507/QĐ-TCLN-PTR ngày 13/11/2016 của Bộ Nông nghiệp và PTNT) do Viện Nghiên cứu Giống và CNSH Lâm nghiệp chọn tạo.

- Vật liệu để đánh giá, kiểm nghiệm lại mức độ chính xác của mối liên kết giữa các chỉ thị phân tử xác định với tính trạng chống chịu với bệnh chết héo ở điều kiện vườn ươm, bao gồm 57 dòng Keo lai gồm 13 giống đã được công nhận do Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam, Viện Nghiên cứu Giống và CNSH Lâm nghiệp, Trung tâm Nghiên cứu thực nghiệm Lâm nghiệp Đông Nam bộ chọn lọc và 44 dòng Keo lai có tiềm năng sinh trưởng nhanh là sản phẩm của chương trình chọn giống Keo lai được thực hiện bởi Viện Nghiên cứu Giống và Công nghệ sinh học Lâm nghiệp.

Cây con của các dòng Keo lai, Keo lá tràm và các gia đình Keo tai tượng được trồng ở vườn ươm đến 8 tháng tuổi trước khi nhiễm bệnh nhân tạo.

Chủng nấm dùng để nhiễm bệnh nhân tạo: chủng nấm *Ceratocystis manginecans* A134 [11, 12] được sử dụng để nhiễm bệnh nhân tạo. Trước khi nhiễm bệnh, chủng nấm A134 được giải trình tự bằng môi β t1b [13] và được khẳng định là nấm *Ceratocystis manginecans*.

2.2. Phương pháp nghiên cứu và các bước tiến hành

2.2.1. Nhiễm bệnh nhân tạo và đánh giá khả năng kháng bệnh của quần thể tiêu chuẩn

Nhiễm bệnh nhân tạo trên lá ở phòng thí nghiệm và đánh giá tính kháng bệnh chết héo sau khi nhiễm bệnh được thực hiện theo phương pháp của Magalhaes và cs (2016) [14] với 4 lần lặp lại và 3 công thức thí nghiệm, sử dụng 1 lá/lặp/công thức:

Công thức 1: sử dụng chủng nấm *C. manginecans* A134 được nuôi trên môi trường PDA (thạch agar) trong đĩa petri. Sợi nấm 20 ngày tuổi được sử dụng để nhiễm bệnh nhân tạo.

Công thức 2: lá được tạo vết thương, úp thạch agar không có nấm bệnh.

Công thức 3: lá không bị tác động.

Cách tiến hành: mẫu lá của các cây keo con 3 tháng tuổi được cắt, làm sạch bằng cồn 70 độ, đặt trong túi ni lông gấp mép có giấy giữ ẩm và nước cất đã được hấp khử trùng. Úp miếng thạch agar có nấm *C. manginecans* hoặc miếng thạch agar không có nấm (đường kính 5 mm) vào vị trí vết xước nhân tạo. Sau 15 ngày, tiến hành chụp ảnh (đặt thước đo chia vạch trên mẫu lá), đo chiều dài vết bệnh (cm) dọc thân lá cho từng dòng/gia đình keo. Diện tích lá bị bệnh (cm^2) được tính dựa vào chiều dài vết bệnh, sử dụng phần mềm ImageJ 1.46r [15].

Nhiễm bệnh nhân tạo trên cây con ở vườn ươm và đánh giá tính kháng bệnh chết héo sau khi nhiễm bệnh theo phương pháp mô tả của Trang và cs (2018) [10]:

- Thí nghiệm được thiết kế theo khối ngẫu nhiên đầy đủ, với 4 lần lặp lại và 3 công thức thí nghiệm như sau:

Công thức 1: sử dụng chủng nấm *C. manginecans* A134 20 ngày tuổi được nuôi trên môi trường PDA trong đĩa Petri.

Công thức 2: đối chứng 1 (cây được tạo vết thương, úp thạch agar không có nấm bệnh).

Công thức 3: đối chứng 2 (cây không bị tác động).

Mỗi công thức thí nghiệm sử dụng 4 cây/dòng/gia đình trên mỗi lần lặp.

- Nhiễm bệnh: sử dụng dao mổ y tế (20 mm) vô trùng (nhúng cồn 100%, đốt trên ngọn lửa đèn cồn sau mỗi lần sử dụng) tạo vết thương sâu đến phần tượng tầng, dài khoảng 5 mm trên thân cây, cách gốc cây 10 cm. Úp mẫu nấm (đường kính 5 mm) vào vị trí vết thương nhân tạo, dùng băng parafin quấn lại để ngăn bị nhiễm tạp và giữ ẩm. Sau 45 ngày nhiễm bệnh nhân tạo, tiến hành đo chiều dài vết bệnh trên thân cho từng cây.

Mức độ chống chịu với bệnh chết héo do nấm *C. manginecans* gây ra được đánh giá theo 4 cấp độ: Cấp C0: chiều dài vết bệnh trung bình nhỏ hơn 10 cm, lá xanh; cấp C1: chiều dài vết bệnh trung bình nằm trong khoảng 10 cm – 20 cm, lá cây bắt đầu chuyển màu vàng; cấp C2: chiều dài vết bệnh trung bình nằm trong khoảng 20 cm – 30 cm, lá cây đã chuyển màu vàng; cấp C3: chiều dài vết bệnh trung bình lớn hơn 30 cm, lá bị héo, khô, rụng hoặc cây chết.

- Xử lý số liệu: số liệu nhiễm bệnh nhân tạo trong điều kiện phòng thí nghiệm và vườn ươm được kiểm nghiệm khoảng sai dị có ý nghĩa giữa các trung bình mẫu Lsd (least significant differences) bằng hàm Fisher's protected ($p < 0,05$) để xác định sự khác biệt về giá trị trung bình của chiều dài vết bệnh giữa các dòng/gia đình keo. Các phân tích thống kê (ANOVA) được xử lý bằng phần mềm GenStat version 12.1 (VSN International Ltd.).

Đánh giá, chọn lọc và ghép nhóm các cá thể có khả năng chống chịu bệnh theo các mức độ khác nhau làm cơ sở cho việc xác định các chỉ thị phân tử có tương quan đến tính chống chịu với bệnh chết héo:

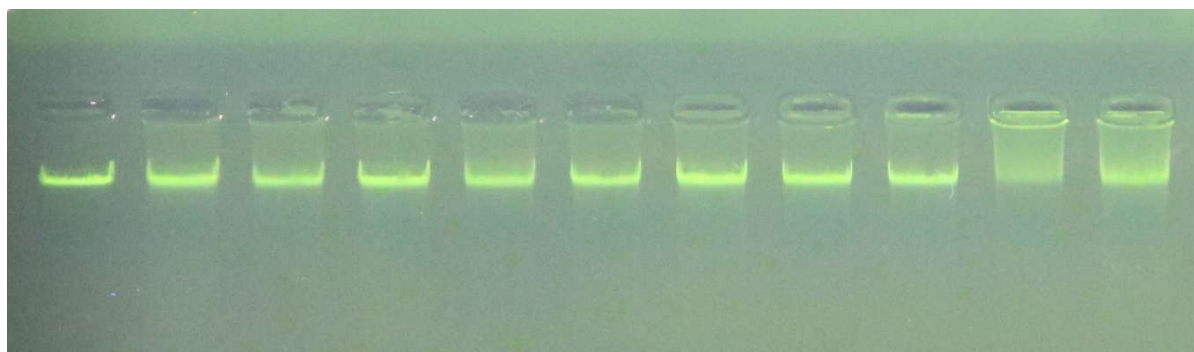
Dựa vào kết quả thí nghiệm nhiễm bệnh nhân tạo trên lá ở phòng thí nghiệm và trên cây con ở vườn ươm, tiến hành ghép nhóm các dòng/cá thể

có tính kháng bệnh theo các mức độ khác nhau [16] làm cơ sở cho việc nghiên cứu các chỉ thị phân tử có tương quan đến tính chống chịu với bệnh chết héo (20 cá thể/nhóm x 4 nhóm).

2.2.2. Phân tích kiểu gen của quần thể tiêu chuẩn liên quan đến tính trạng bệnh và chọn lọc chỉ thị phân tử SNP

Tách chiết, tinh sạch ADN từ các mẫu lá quần thể tiêu chuẩn thu ở vườn ươm:

Tách chiết và tinh sạch ADN từ các mẫu lá các dòng keo kháng bệnh, chống chịu bệnh và mẫn cảm với bệnh thu ở vườn ươm sử dụng các bộ kit tách chiết và tinh sạch DNAeasy plant mini kit của Qiagen (DNeasy Plant Mini Kit và DNeasy Plant Maxi Kit Handbook 8/2000) theo các bước của nhà sản xuất. Kiểm tra chất lượng và định lượng ADN trên bản gel (Hình 1) bằng máy đo nanodrop.



Hình 1. Kiểm tra ADN trên bản gel agarose

Xác định kiểu gen của các dòng/cá thể keo trong quần thể tiêu chuẩn bằng các chỉ thị SNP và xác định các chỉ thị SNP có tương quan đến tính trạng kháng bệnh:

- ADN tổng số của các mẫu nghiên cứu được giải trình tự theo phương pháp GBS (Genotyping By Sequencing) [17].

- Trình tự thô từ GBS định dạng *.FAST được xử lý và phân tích bằng phần mềm Mapnext hoặc MAQ (<http://maq.sourceforge.net>) để phát hiện

các chỉ thị SNP. Gần 2.500.000 đoạn trình tự/barcode được sử dụng để xác định các chỉ thị SNP qua việc so sánh trình tự của nhóm các đoạn tương đồng được nhân từ 1 barcode. Phần mềm sẽ xác định các chỉ thị barcode dựa trên sự có mặt hoặc vắng mặt của một trình tự nhất định (từ 1 bp đến 5 bp). Sau đó, các chỉ thị được sàng lọc dựa trên chỉ tiêu sau: có mặt ở ít nhất 80% tổng số các kiểu gen được phân tích, chỉ số đa hình PIC $> 0,05$, và tần số alen $> 0,025$ để chọn được các chỉ thị đa hình cho các nghiên cứu tiếp theo [18].

- Chỉ số PIC được tính theo công thức:

$$PIC = 1 - (f^2 + (1-f)^2)$$

Trong đó: f là tần số alen của chỉ thị SNP.

- Các chỉ thị SNP sau sàng lọc có tính đa hình cao được sử dụng để xác định có tương quan đến tính trạng kháng bệnh chết héo của các dòng Keo lai bằng phần mềm TASSEL [19] với dữ liệu kiểu hình (cấp bệnh) của 80 dòng trong quần thể tiêu chuẩn.

- Phân tích tương quan giữa kiểu gen và kiểu hình bằng phương pháp GLM (General Linear Model). Phương pháp này sẽ tính toán giá trị ước lượng (predicted value) và giá trị sai số (residual value) của từng marker cụ thể theo mô hình toán học của Anderson và Ter Braak (2003) [20].

- Xây dựng biểu đồ QQ plot (Quantile-Quantile plot) dựa trên các giá trị tính toán (residual value và predicted values) để xây dựng đường hồi quy giữa giá trị tính toán và giá trị thực (thể hiện tương quan giữa p-value quan sát và p-value ước tính) của từng chỉ thị. Từ biểu đồ này, các chỉ thị không có tương quan với tính trạng sẽ nằm trên đường hồi quy của biểu đồ, trong khi các chỉ thị có tương quan sẽ lệch khỏi đường hồi quy.

- Từ các chỉ thị có giá trị p-value $< 1e-4$ tiến

hành kiểm nghiệm tính tương quan qua việc tính toán p-value với phần mềm R và gói phân tích Q-value, mối tương quan giữa chỉ thị và tính trạng được khẳng định với mức ý nghĩa $< 0,05$ [21].

Ảnh hưởng của chỉ thị tương quan đến tính trạng nghiên cứu qua việc ước đoán sự khác biệt về tính trạng kiểu hình giữa 2 kiểu gen khác nhau được xác định bằng phần mềm TASSEL.

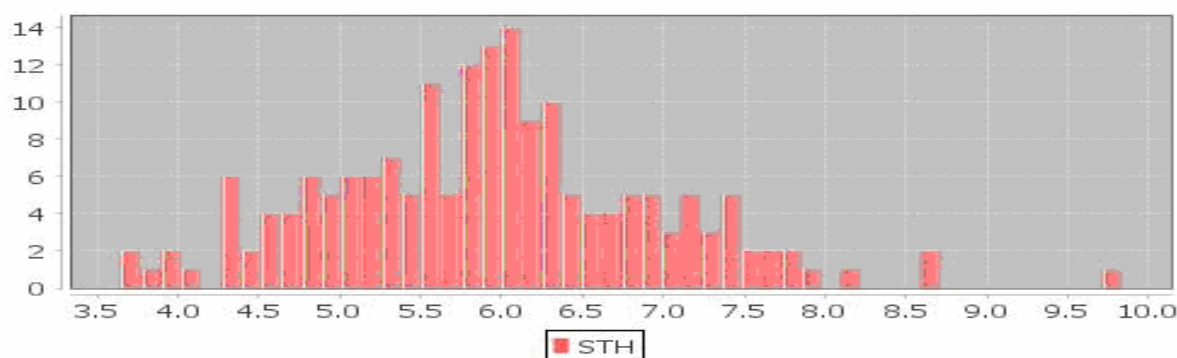
Các chỉ thị có tương quan đến tính chống chịu với bệnh chết héo ở Keo sau đó được tiến hành kiểm nghiệm trên tập hợp gồm 57 dòng Keo lai theo các phương pháp GBS và gây bệnh nhân tạo trong điều kiện vườn ươm đã được mô tả trước đó.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân tích kiểu gen của quần thể tiêu chuẩn liên quan đến tính trạng bệnh và chọn lọc chỉ thị phân tử SNPO

Kết quả phân tích biểu đồ phân bố về tính chống chịu với nấm bệnh ở vườn ươm của các dòng Keo lai nghiên cứu bằng phương pháp histogram cho thấy, phân bố của các cá thể trên biểu đồ là tương đối trải đều từ giá trị thấp nhất đến cao nhất của tính trạng theo dõi (Hình 1). Vì vậy, có thể sử dụng quần thể tiêu chuẩn này để tiến hành các bước nghiên cứu tiếp theo.

STH Distribution



Hình 2. Biểu đồ phân bố (histogram) về tính chống chịu bệnh của các dòng keo lai nghiên cứu

Ghi chú: STH: thể hiện chiều dài vết bệnh trên thân tính bằng cm.

Qua phân tích 80 kiểu gen đại diện cho 4 nhóm có mức độ kháng bệnh khác nhau đã được chọn lọc với tổng số hơn 8 triệu lần đọc trình tự (reads) cho các đoạn có chiều dài từ 1 bp (narrow reads) đến 300 bp (wide reads) với các đoạn trình tự barcode ngắn có chiều dài từ 4-8 bp được gắn vào các adaptor với số lượng lần đọc gần 1,5 triệu cho mỗi dòng Keo lai nghiên cứu. Thông qua phân tích đã phát triển được hơn 17.856 chỉ thị SNP.

Qua sàng lọc SNP sử dụng các phương pháp SVD (single value decomposition) và PPCA (probabilistic principal component analysis) theo Stacklies và cs (2007) [22], đã xác định được 4.137 chỉ thị SNPs có tính đa hình cao (giá trị PIC>0,05, tần số alen >0,025) và có mặt ở ít nhất 80% tổng số các dòng Keo lai phân tích đã được chọn lọc để tiến hành phân tích tương quan kiểu gen – kiểu hình (Bảng 1).

Bảng 1. Số lượng chỉ thị SNP phát triển và sàng lọc bằng phương pháp GWAS

Chỉ tiêu	Số lượng SNP không đáp ứng yêu cầu	Số lượng SNP còn lại
Call rate >50%	5.632	12.224
PIC	3623	8601
Tần số alen	2.637	5.964
Missing data (có mặt ít nhất ở 80% dòng phân tích)	1.827	4.137
Tổng cộng	13.791	4.137

3.2. Kết quả phân tích hệ gen (GWAS)

Phân tích GWAS dựa trên hệ số tương quan di truyền tính trạng chống chịu với bệnh chết héo được tính trên sự sai khác về kiểu gen và kiểu hình của 80 mẫu phân tích. Hệ số tương quan di truyền của tính trạng chống chịu với bệnh chết héo ở mức độ trung bình ($h^2 = 0,24 \pm 0,07$), thể hiện được sự ảnh hưởng của kiểu gen di truyền trong mối tương tác với điều kiện môi trường để biểu hiện kiểu

hình, ít nhất là ở giai đoạn vườn ươm. Kết quả phân tích GWAS thông qua QQ plot cho thấy, hầu hết các chỉ thị SNP đều được phân bố tập trung trên trường hồi quy cho thấy có 4 chỉ thị SNP (alen thay thế) có tương quan đến tính trạng chống chịu bệnh chết héo với giá trị p (giá trị tính toán) là từ $3,76 \times 10^{-6}$ đến $6,23 \times 10^{-5}$ với tần số xuất hiện từ 11,5% đến 15% (Bảng 2).

Bảng 2. Tổng hợp các chỉ thị SNP có tương quan đến tính trạng chống chịu bệnh chết héo ở Keo lai

STT	Alen thay thế (chỉ thị SNP)	Alen chính	p-value	Tần số alen	Chiều dài trình tự đoạn gen liên quan (bp)	Vị trí SNP
1	C	A	3,76E-06	0,125	135	88
2	A	G	1,2E-05	0,115	124	52
3	T	C	1,45E-05	0,150	78	41
4	G	A	6,23E-05	0,130	83	26

Kết quả tính toán còn cho thấy, trong kiểu gen của nhóm các cá thể có các chỉ thị tương quan đến tính trạng kháng bệnh chết héo có chiều dài vết bệnh thấp hơn từ 11,6 đến 16,2 cm so với các nhóm không có chỉ thị (Bảng 3). Tuy vậy, mức độ

sai khác này còn phụ thuộc vào kiểu gen của từng dòng/cá thể nghiên cứu cũng như mối tương tác giữa các kiểu gen với điều kiện môi trường ở một hoàn cảnh cụ thể.

Bảng 3. Đánh giá sự khác biệt về kiểu hình giữa các kiểu gen mang chỉ thị phân tử tương quan với tính trạng kháng bệnh chết héo

STT	Alen (SNP)	Khác biệt về tính kháng bệnh trung bình giữa 2 nhóm kiểu gen (cm)	
		Có mang chỉ thị	Không mang chỉ thị
1	C	0,0	12,3
2	A	0,0	11,6
3	T	0,0	16,2
4	G	0,0	15,4

3.3. Kiểm nghiệm mức độ liên kết giữa các chỉ thị phân tử xác định được và biểu hiện tính chống chịu của một số dòng Keo lai tại điều kiện vườn ươm

Để bước đầu kiểm nghiệm mức độ liên kết giữa các chỉ thị phân lập được với tính chống chịu bệnh chết héo ở Keo với việc sử dụng 57 dòng Keo

lai trong đó có một số giống được công nhận là có tính chống chịu bệnh, đồng thời có khả năng sinh trưởng nhanh cũng như một số dòng có tiềm năng khác đã được thực hiện. Kết quả phân tích kiểu gen cũng như mức độ chống chịu bệnh được tổng hợp tại bảng 4.

Bảng 4. Kết quả phân tích kiểu gen và mức độ chống chịu bệnh của các dòng Keo lai ở giai đoạn vườn ươm

STT	Dòng	Các chỉ thị SNP phân tích được				Cấp bệnh (C0-C3) khi được gây bệnh nhân tạo trong điều kiện vườn ươm
		Alen 1	Alen 2	Alen 3	Alen 4	
1	TB1	-	-	-	+	C2
2	TB6	+	-	-	-	C2
3	TB11	-	-	+	-	C1
4	TB12	-	-	-	-	C3
5	AH1	-	+	-	-	C1
6	AH7	+	-	-	-	C1
7	BV10	+	-	+	+	C0
8	BV16	-	+	-	-	C1
9	BV32	-	-	+	-	C2
10	BV33	-	+	-	-	C1
11	BV71	+	-	-	-	C2
12	BV73	-	+	-	-	C1
13	BV75	-	-	+	-	C2
14	BB/1	-	-	-	-	C3
15	18/2	+	-	-	-	C1
16	BV/3	-	-	-	-	C2

KHOA HỌC CÔNG NGHỆ

17	92/1	-	+	-	+	C0
18	233/4	-	-	-	-	C2
19	41	-	+	-	-	C2
20	20	-	-	-	-	C3
21	233/3	-	-	-	-	C2
22	90/2	-	-	-	-	C3
23	93/2	-	-	-	-	C1
24	42	-	+	-	-	C3
25	102	-	-	+	+	C0
26	97	-	-	-	-	C3
27	110	-	-	-	-	C2
28	40/1	-	+	-	-	C1
29	61/1	-	-	-	-	C2
30	33	-	-	-	-	C1
31	128	-	-	-	-	C3
32	12	-	-	-	-	C2
33	BV577	-	-	+	-	C3
34	BV434	-	-	-	-	C1
35	BV376	-	-	-	-	C2
36	BV435	-	-	-	-	C1
37	BV566	-	+	-	-	C1
38	BV340	-	-	-	-	C2
39	BV330	-	-	-	-	C3
40	BV430	-	-	-	-	C2
41	BV265	-	-	-	-	C1
42	BV182	-	-	-	-	C2
43	BV584	-	-	+	-	C2
44	BV511	+	-	-	-	C3
45	BV389	-	-	-	-	C1
46	BV306	-	-	-	-	C1
47	BV316	+	+	-	-	C0
48	BV355	-	-	-	-	C2
49	BV547	-	-	-	-	C3
50	BV518	-	-	-	+	C2
51	BV466	-	-	-	-	C1

52	BV268	+	-	-	-	C1
53	BV350	-	-	+	-	C1
54	BV342	-	-	-	-	C3
55	BV543	-	-	-	-	C2
56	BV567	-	+	-	+	C0
57	TB15	-	-	-	-	C1

Ghi chú: dấu + là có sự xuất hiện của chỉ thị SNP, dấu - là không có sự xuất hiện của chỉ thị SNP.

Kết quả ở bảng 4 cho thấy, có năm dòng Keo lai có sự xuất hiện của các chỉ thị SNP. Dòng BV10 có mang 3 chỉ thị SNP, trong khi đó 4 dòng (92/1, 102, BV316 và BV567) còn lại mang từ hai chỉ thị SNP. 20 dòng chỉ mang 1 chỉ thị và các dòng còn lại (32 dòng) không mang chỉ thị nào. Như vậy, kết quả kiểm nghiệm bước đầu cho thấy, các dòng Keo lai có tính chống chịu bệnh cao tại vườn ươm đều mang các chỉ thị SNP sàng lọc được, trong khi các dòng mẫu cảm không mang các chỉ thị này. Đây là kết quả có tiềm năng rất lớn để có thể ứng dụng trong các chương trình chọn giống kháng bệnh trong tương lai.

Tuy nhiên, đây là kết quả phân tích bước đầu, việc khẳng định mối tương quan giữa chỉ thị phân tử SNPs và tính chống chịu bệnh chết héo cần được tiếp tục kiểm nghiệm với các quần thể trên 3 hiện trường khảo nghiệm ở giai đoạn tiếp theo, khi các dòng cây keo ở độ tuổi cao hơn và khả năng bị bệnh chết héo trên hiện trường khảo nghiệm cao hơn.

4. KẾT LUẬN

Kết quả phân tích GBS trên 80 mẫu có mức độ chống chịu với bệnh chết héo trên keo ở giai đoạn vườn ươm đã thu được 4137 chỉ thị SNP có chỉ số PIC>0,5 và tần số alen từ 2,5% trở lên trên toàn bộ hệ gen các đối tượng nghiên cứu. Từ đó đã xác định được 4 chỉ thị SNP liên quan đến tính trạng kháng bệnh chết héo (giá trị p đạt từ $3,76 \times 10^{-6}$ đến $1,2 \times 10^{-5}$) và tần số alen đạt từ 11,5% đến 15%. Các chỉ thị này đã được thể hiện rõ ràng ở quần thể kiểm nghiệm gồm 57 dòng Keo lai nghiên cứu,

trong đó các dòng mang chỉ thị đều có tính chống chịu với bệnh chết héo cao hơn so với các dòng không mang có các chỉ thị này ở thí nghiệm gây bệnh nhân tạo trong điều kiện vườn ươm.

Tuy vậy, đây mới chỉ là những kết quả nghiên cứu bước đầu với số lượng kiểu gen sử dụng để phát triển các chỉ thị còn giới hạn. Mặt khác, việc đánh giá tính chống chịu với bệnh chết héo mới chỉ được thực hiện ở giai đoạn vườn ươm chứ chưa được tiến hành tại hiện trường nên kết quả có thể chưa phản ánh hết được mối tương quan giữa kiểu gen và kiểu hình. Việc tiếp tục nghiên cứu phân lập các chỉ thị SNP có tương quan đến tính chống chịu với các số liệu thu thập từ hiện trường là rất cần thiết và có ý nghĩa trong chương trình chọn giống Keo lai sinh trưởng nhanh và có tính chống chịu với bệnh chết héo.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Brawner, J., Chi, N. M., Chi, N., Glen, M., Mohammed, C., Thu, P. Q. & Kien, N. D. (2020). Tolerance of *Acacia* populations following inoculation with the *Ceratocystis* canker and wilt pathogen in Vietnam. *Tree Genetics & Genomes*, 16.
2. Nambiar, E. K. S., Harwood, C. E. & Kien, N. D. (2015). *Acacia* plantations in Vietnam: research and knowledge application to secure a sustainable future. *Southern Forests*, 77, 1-10.
3. Lê Đình Khả, Harwood, C. E., Kien, N. D., Baltunis, B. S., Hai, N. D. & Thinh, H. H. (2012).

Growth and wood basic density of acacia hybrid clones at three locations in Vietnam. *New Forests*, 43, 13-29.

4. Tarigan, M., Roux, J., Van Wyk, M., Tjahjono, B. & Wingfield, M. J. (2011). A new wilt and die-back disease of *Acacia mangium* associated with *Ceratocystis manginecans* and *C. acaciivora* sp. nov. in Indonesia. *South African Journal of Botany*, 77, 292-304.

5. Phạm Quang Thu, Đặng Như Quỳnh & Bernard Dell (2012). Nấm *Ceratocystis* sp. gây bệnh chết héo các loài keo (*Acacia* spp.) gây trồng ở nhiều vùng sinh thái trong cả nước. *Tạp chí Bảo vệ Thực vật*, 5, 24-30.

6. Brawner, J., Japarudin, Y., Lapammu, M., Rauf, R., Boden, D. & Wingfield, M. J. (2015). Evaluating the inheritance of *Ceratocystis acaciivora* symptom expression in a diverse *Acacia mangium* breeding population. *Southern Forests*, 77, 83-90.

7. Fourie, A., Wingfield, M. J., Wingfield, B. D., Thu, P. Q. & Barnes, I. (2016). A possible centre of diversity in South East Asia for the tree pathogen, *Ceratocystis manginecans*. *Infection, Genetics and Evolution*, 41, 73-83.

8. Chen, S., Wyk, M. V., Roux, J., Wingfield, M. J., Xie, Y. & Zhou, X. (2013). Taxonomy and pathogenicity of *Ceratocystis* species on *Eucalyptus* trees in South China, including *C. chinaeucensis* sp. nov. *Fungal Diversity*, 58, 267-279.

9. Tarigan, M., Yuliarto, M., Gafur, A., Yong, W. C. & Sharma, M. (2016). Other *Acacia* species as source of resistance to *Ceratocystis*. In: International Workshop on *Ceratocystis* in tropical hardwood plantations, Yogyakarta, Indonesia, 15th-18th February 2016, 13 pp.

10. Trang, T. T., Eyles, A., Davies, N. W., Glen, M., Ratkowsky, D. & Mohammed, C. L. (2018).

Screening for host responses in *Acacia* to a canker and wilt pathogen, *Ceratocystis manginecans*. *Forest Pathology*, 48, e12390.

11. Trần Thị Thanh Tâm, Phạm Quang Thu & Nguyễn Minh Chí (2017). Nghiên cứu đặc điểm sinh học của nấm *Ceratocystis manginecans* gây bệnh chết héo Keo tai tượng tại tỉnh Thái Nguyên. *Tạp chí Nông nghiệp và PTNT*, 21, 94-99.

12. Nguyễn Minh Chí (2017). Nghiên cứu bệnh chết héo (*Ceratocystis* sp.) phục vụ chọn giống Keo lá tràm sinh trưởng nhanh, kháng bệnh tại miền Trung và Đông Nam bộ. Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam, 149 trang.

13. Glass, N. L. and Donaldson, G. C. (1995). Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 1323-1330.

14. Magalhaes, D. M. A., Luz, E., Lopes, U. V., Niella, A. R. R. & Damaceno, V. O. (2016). Leaf disc method for screening *Ceratocystis* wilt resistance in cacao. *Tropical Plant Pathology*, 41, 155-161.

15. Schneider, C. A., Rasband, W. S. & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9, 671-675.

16. Trần Thanh Trảng, Trần Anh Tuấn, Hà Huy Nhật, Ngô Văn Chính, Lê Sơn, Nguyễn Đức Kiên, Đỗ Hữu Sơn, Nguyễn Văn Nam, Bùi Quang Tiếp, Phạm Thị Thủy, Nguyễn Hoài Thu, Phạm Thị Minh Hằng (2020). Đánh giá tính chống chịu bệnh chết héo của các giống Keo lai, Keo lá tràm và Keo tai tượng bằng nhiễm bệnh nhân tạo ở vườn ươm. *Tạp chí Khoa học Lâm nghiệp*, số 6, 101-110.

17. Kilian A, Wenzl P, Huttner E, Carling J, Xia L, Blois H, Caig V, Heller-Uszynska K, Jaccoud D, Hopper C (2012). Diversity Arrays Technology: A Generic Genome Profiling Technology on Open

- Platforms. In: Pompanon F, Bonin A (eds) Data Production and Analysis in Population Genomics. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols), vol 888. Humana Press, Totowa, NJ, pp 67-89
18. Isik, F. (2014). Genomic selection in forest tree breeding: the concept and an outlook to the future. *New Forests*, 45(3), 379-401.
19. Bradbury, P. J., Zhang, Z., Kroon, D. E., Casstevens, T. M., Ramdoss, Y. & Buckler, E. S. (2007). TASSEL: software for association mapping of complex traits in diverse samples. *Bioinformatics*, 23, 2633-2635.
20. Anderson, M. J. and ter Braak, C. J. F. (2003). Permutation tests for multifactorial analysis of variance *Journal of Statistical Computation and Simulation* 73, 85–113.
21. Gao X. (2011) Multiple testing corrections for imputed SNPs. *Genet Epidemiol.* 35(3):154–8.
22. Stacklies W, Redestig H, Scholz M, Walther D, Selbig J. (2007). PCA Methods-a bioconductor package providing PCA methods for incomplete data. *Bioinformatics*, 23(9):1164–7.

GENOME-WIDE SELECTION ANALYSIS FOR DISEASE RESISTANCE TO

Ceratocystis IN *Acacia hybrid*

Le Son, Tran Thanh Trang, Nguyen Duc Kien

Summary

Genome wide association studies were conducted based on the studied population of 80 samples with the difference in their ability to resistant to the *Ceratocystis* at the nursery stage via artificial inoculation test. In the GBS result, 4,137 SNP markers with highly PIC values were obtained. The GWAS for disease resistance was conducted by the combination of phenotypic and genotypic data through the general linear model approach. Four candidate SNPs were detected with p-values ranging from 3.76×10^{-6} to 1.2×10^{-5} . These SNPs then were also validated with the collection of 57 *Acacia hybrid* clones, the data analysis showed the high potential of using the molecular marker in forest tree breeding programs.

Keywords: *Acacia hybrid*, *Ceratocystis*, disease resistant, GWAS, molecular marker.

Người phản biện: TS. Trần Hồ Quang

Ngày nhận bài: 15/9/2022

Ngày thông qua phản biện: 3/10/2022

Ngày duyệt đăng: 7/10/2022

PHÂN LẬP, TUYỂN CHỌN CHỦNG VI KHUẨN LACTIC TỪ MỦ CAO SU Ở BÌNH DƯƠNG VÀ THỬ NGHIỆM TRONG ĐÔNG MỦ CAO SU

Huỳnh Đức Định^{1,2,*}, Trần Thanh³, Trần Đình Minh²,

Vũ Văn Trường², Huỳnh Thị Minh Tâm²

TÓM TẮT

Mục tiêu của nghiên cứu là phân lập được chủng vi khuẩn lactic có trong mủ cao su thiên nhiên tạo ra hàm lượng axit lactic cao nhất và xác định mật số vi khuẩn thích hợp để đông mủ cao su thiên nhiên. Chủng vi khuẩn lactic được phân lập và lựa chọn từ mủ cao su lấy tại lô CTLK07 thuộc xã Lai Hưng, huyện Bàu Bàng, tỉnh Bình Dương. Một ml dung dịch vi khuẩn lựa chọn có mật số 10^5 , 10^7 , 10^9 và 10^{11} tế bào/ml được thêm vào 2 kg mủ cao su đựng trong khay; hai nghiệm thức đối chứng, nghiệm thức đối chứng 1 sử dụng axit acetic 3% thêm vào 2 kg mủ cao su cho đến khi pH mủ đạt 5,4 và nghiệm thức đối chứng 2 là để 2 kg mủ cao su đông tự nhiên trong phòng thí nghiệm. Kết quả phân lập được 30 chủng vi khuẩn lactic, trong đó chủng vi khuẩn LK3 tạo ra lượng axit lactic cao nhất là 6,29 g/l, trình tự đoạn gen 16S rRNA của chủng vi khuẩn LK3 tương đồng 100% với trình tự đoạn gen 16S rRNA của chủng *Weissella paramesenteroides*. Kết quả sử dụng 1 ml dung dịch vi khuẩn *Weissella paramesenteroides* LK3 có mật số là 10^9 tế bào/ml cho khả năng đông mủ tối ưu nhất.

Từ khóa: Axit lactic, mủ cao su, mủ đông, vi khuẩn lactic, *Weissella paramesenteroides*.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong năm 2021, sản lượng cao su thiên nhiên của Việt Nam đứng thứ 3 trên thế giới, chỉ sau Thái Lan và Indonesia, dẫn đầu về năng suất trong khu vực châu Á với năng suất đạt 1.691 kg/ha [1]. Trong chế biến sản phẩm cao su hiện nay, mủ cao su được đánh đông chủ yếu bằng axit acetic và lượng axit sử dụng để đánh đông mủ cao su dao động từ 4 - 7 kg/tấn sản phẩm tùy chủng loại cao su [2]. Nhược điểm của việc sử dụng axit trong đánh đông mủ cao su là làm giảm pH nước thải trong quá trình chế biến cao su, ảnh hưởng đến môi trường xả thải nếu không có biện pháp xử lý

phù hợp, đồng thời cũng làm tăng lượng nước dùng để rửa cao su [3].

Ở cây cao su, sau khi chảy ra khỏi hệ thống ống mủ, mủ cao su rất dễ bị nhiễm vi sinh vật, bao gồm cả vi khuẩn và nấm. Vi khuẩn hiện diện trong mủ thuộc hai nhóm: (i) nhóm vi khuẩn kỵ khí thúc đẩy quá trình đông mủ bằng cách phân hủy đường và các hợp chất hydrocarbon khác trong mủ thành các axit, (ii) nhóm vi khuẩn hiếu khí ngăn cản quá trình đông mủ bằng cách phân hủy protein có trong mủ thành các sản phẩm thối rửa. Nếu môi trường có sự hiện diện của đường và protein thì quá trình lên men sẽ diễn ra nhanh hơn quá trình phân hủy protein. Do đó, quá trình đông mủ tự nhiên phụ thuộc rất nhiều vào chủng vi sinh vật hiện diện trong mủ [4]. Các axit sinh ra bởi nhóm vi khuẩn kỵ khí hầu hết là axit béo bay hơi và chủ yếu là axit lactic do vi khuẩn lactic sinh ra [5]. Taysum (1958) [6] quan sát thấy rằng quá trình đông mủ sẽ không diễn ra cho đến khi mật độ vi khuẩn sinh axit đạt mức 10^9 CFU/ml.

¹ Phòng Nghiên cứu Di truyền - Giống, Viện Nghiên cứu Cao su Việt Nam

² Khoa Khoa học Sinh học, Trường Đại học Nông Lâm thành phố Hồ Chí Minh

³ Công ty TNHH MTV Tổng Công ty Cao su Đồng Nai

*Email: huynhduc dinh@gmail.com

Satchuthananthavale và Satchuthananthavale (1971) [7] cho biết, mũ đông bằng cách bổ sung vi khuẩn sinh axit có độ xốp hơn so với mũ để đông tự nhiên và mũ có độ xốp hơn sẽ giúp cho quá trình chế biến và xông sấy mũ dễ dàng hơn. Nhằm rút ngắn thời gian đông mũ cao su trong tự nhiên đồng thời giảm quá trình phân hủy protein thành các sản phẩm thối rữa nhờ sự lấn át của nhóm vi khuẩn (i) đối với nhóm vi khuẩn (ii) trong quá trình đông mũ tự nhiên và giảm lượng hóa chất sử dụng, việc phân lập và lựa chọn chủng vi khuẩn sinh axit lactic cao nhất cần được nghiên cứu để đánh đông mũ cao su.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Mẫu mũ dùng để phân lập vi khuẩn lactic được thu thập trên dòng vô tính RRIV 124 tại lô CTLK07 thuộc xã Lai Hưng, huyện Bàu Bàng, tỉnh Bình Dương (vị trí tọa độ: 11.2051276, 106.6406105). Trộn đều mũ nước của 6 cây cao su, hút lấy 200 ml mũ nước cho vào chai đã hấp tiệt trùng sau đó đem về phòng thí nghiệm để tiến hành phân lập vi khuẩn.

Mẫu mũ dùng trong thí nghiệm khảo sát khả năng đông mũ của chủng vi khuẩn phân lập cũng được lấy từ dòng vô tính RRIV 124 tại lô CTLK07.

Các hoá chất được sử dụng trong nghiên cứu là môi trường MRS broth (Himedia, Ấn Độ), CaCO_3 (Himedia, Ấn Độ), bộ nhuộm Gram (Nam Khoa Corporation, Việt Nam), oxidase discs (Himedia, Ấn Độ), malachite green (Himedia, Ấn

Độ), Safranin (Biobasic, Canada), primer (Genewiz), agar (Phytotech, Mỹ), taq DNA polymerase (Biolin, Mỹ), dNTP (Promega, Mỹ), axit acetic (Lotte, Hàn Quốc),...

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phân lập vi khuẩn lactic

- Tăng sinh vi khuẩn lactic:

Hút 0,2 ml mũ cao su cho vào bình tam giác chứa 100 ml môi trường lỏng MRS. Đặt bình tam giác vào máy lắc điều chỉnh ở 37°C, nuôi trong 48 giờ.

- Lựa chọn vi khuẩn phân giải CaCO_3 :

Vi khuẩn lactic tạo axit lactic làm tan CaCO_3 có trong môi trường nuôi cấy sẽ tạo ra một vòng sáng bao quanh khuẩn lạc [8]. Pha loãng mẫu đã được tăng sinh ra thành các dung dịch có các nồng độ từ 10^{-1} đến 10^{-9} và cấy các dung dịch này vào các đĩa chứa môi trường thạch MRS bổ sung 2% CaCO_3 . Sau khi nuôi cấy các đĩa mẫu ở 37°C trong 48 giờ, tiến hành lựa chọn các khuẩn lạc mọc riêng lẻ có vòng sáng bao quanh cấy vào môi trường thạch MRS không có bổ sung CaCO_3 .

- Phân tích các chỉ tiêu sinh lý, sinh hóa và sinh học phân tử:

Định danh sơ bộ các đặc điểm sinh lý và sinh hóa của các chủng vi khuẩn phân lập bằng các chỉ tiêu như: nhuộm bào tử, thử nghiệm khả năng di động, nhuộm Gram, thử nghiệm oxidase, thử nghiệm catalase được thể hiện ở bảng 1.

Bảng 1. Phân tích các chỉ tiêu sinh lý và sinh hóa của vi khuẩn

Phương pháp	Nguyên lý chung	Đặc điểm của LAB	Nguồn trích dẫn
Nhuộm bào tử	Thuốc nhuộm lục malachite xâm nhập vào nội bào tử của vi khuẩn được đặt trên tiêu bản có hơi nóng dưới đèn cồn và làm bào tử có màu xanh lục. Nhuộm bổ sung bằng đỏ safranin sẽ làm phần bao quanh bào tử bắt màu đỏ hồng.	Không sinh bào tử [9]	Hussey và Zayaitz (2007) [10]

Khả năng di động	Vi sinh vật di động nhờ tiêm mao, phát triển lan ra khi dùng que cấy thẳng đâm sâu vào môi trường thạch mềm trong ống nghiệm	Không có khả năng di động [11, 12]	Shields và Cathcart (2011) [13]
Nhuộm Gram	Khi thêm thuốc nhuộm crystal violet vào vi khuẩn đã cố định trên lame kính trong 1 phút và rửa bằng nước cất, sau đó thêm thuốc nhuộm iodine, vi khuẩn Gram dương có lớp peptidoglycan dày ở thành tế bào (chiếm 90%) giúp giữ các phức hợp tinh thể xanh/tím khi dùng cồn tuyệt đối để rửa, nhưng vi khuẩn Gram âm có lớp peptidoglycan mỏng hơn (chiếm 10%) và lớp lipid cao hơn nên không giữ lại phức hợp tinh thể xanh/tím khi rửa bằng cồn tuyệt đối, khi phủ lên thuốc nhuộm safranine sẽ bắt màu hồng/đỏ. Sau quá trình nhuộm, mẫu vi khuẩn sẽ được quan sát dưới kính hiển vi quang học để xác định hình dạng, kích thước và đặc tính về nhuộm Gram của vi khuẩn	Gram dương, tế bào dạng hình cầu hoặc hình que [14]	Smith và Hussey (2016) [15]
Thử nghiệm oxidase	Enzyme cytochrome oxidase oxy hóa thuốc thử tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride thành indophenol có màu tím	Không có hệ enzyme oxidase [16]	Shields và Cathcart (2016) [17]
Thử nghiệm catalase	Enzyme catalase phân giải H ₂ O ₂ thành H ₂ O và O ₂ làm xuất hiện bọt khí	Không có hệ enzyme catalase [18]	Reiner (2016) [19]

Đoạn sản phẩm PCR của gen 16S rRNA ở các chủng vi khuẩn lactic được kiểm tra kích thước bằng cách điện di trên gel agarose. Các chủng vi khuẩn được ly trích DNA theo phương pháp sốc nhiệt [20], DNA sau khi ly trích được thực hiện phản ứng PCR với cặp mồi 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTC-3') và 1492R (5'-TACGGTTACCTTGTAGCACT-3'). Phản ứng chuỗi PCR được tiến hành với tổng thể tích là 25 µL bao gồm: đệm PCR, 0,8 µM primer mỗi loại, 1,5 U Taq DNA polymerase, 0,2 mM dNTP mix, 50 ng DNA tổng số. Phản ứng PCR được tiến hành trên

máy PCR PTC-100 (MJ Research PTC-100, Mỹ) theo chu trình nhiệt: 94°C trong 5 phút (94°C trong 1 phút, 53°C trong 30 giây và 72°C trong 1 phút) lặp lại 35 chu kỳ; 72°C trong 5 phút; 4°C trong 60 phút [21, 22]. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1,5%. Sau khi điện di, gel được chụp bằng máy chuyên dụng UVP (GelDoc It Imaging System UVP, Mỹ).

2.2.2. Lựa chọn và định danh chủng vi khuẩn *lactic*

- Xác định hàm lượng axit lactic tạo ra:

Sau khi xác định được vi khuẩn lactic thông qua các phân tích sinh lý, sinh hóa và sinh học phân tử, hút 1 ml môi trường lỏng MRS có chứa 10^5 tế bào/ml vi khuẩn lactic cho vào 50 ml môi trường lỏng MRS đã hấp tiệt trùng. Nuôi cấy lắc 90 vòng/phút ở nhiệt độ 37°C trong 24 giờ. Xác định hàm lượng axit lactic tạo ra bằng cách đo giá trị OD của sản phẩm phản ứng với FeCl_3 tạo ra sắt (III) lactat có màu vàng xanh (yellowish-green) ở bước sóng 390 nm theo phương pháp của Borshchevskaya và cs (2016) [23].

- Định danh chủng vi khuẩn lactic tạo axit lactic cao nhất:

Chủng vi khuẩn tạo ra axit lactic cao nhất được gửi đi giải trình tự tại Công ty TNHH Dịch vụ và Thương mại Nam Khoa (thành phố Hồ Chí Minh). Kết quả giải trình tự được so sánh bằng chương trình Blast search trên cơ sở dữ liệu ngân hàng gen NCBI để định danh loài vi khuẩn.

2.2.3. Khảo sát khả năng đông mủ của chủng vi khuẩn lactic lựa chọn

- Phương pháp đếm mật số tế bào vi khuẩn và chuẩn bị dịch vi khuẩn.

Chủng vi khuẩn lựa chọn được tăng sinh trong 100 ml môi trường MRS, nuôi cấy lắc 90 vòng/phút ở nhiệt độ 37°C trong 24 giờ. Mật số vi khuẩn sau 24 giờ nuôi cấy được đếm trên buồng đếm hồng cầu Neubauer theo phương pháp của Galli và cs (2020) [24]. Dung dịch vi khuẩn sau khi tăng sinh được pha loãng sao cho trong mỗi ô nhỏ của buồng đếm hồng cầu Neubauer chứa khoảng 5 - 10 tế bào khi quan sát dưới kính hiển vi quang học ở vật kính 100x có giọt dầu.

Vi khuẩn nuôi cấy trong 24 giờ được kiểm tra có mật số là $7,37 \times 10^{12}$ tế bào/ml, sau đó tiến hành pha loãng mẫu vào 5 bình tam giác có chứa môi trường MRS đã hấp tiệt trùng để đạt mật số vi khuẩn lần lượt là 10^5 , 10^7 , 10^9 và 10^{11} tế bào/ml. Sau khi pha loãng mẫu ở các mật số, hút 1 ml dung

dịch pha loãng ở các mật số cho liền vào các khay mủ ở các nghiệm thức đã bố trí sẵn để tránh vi khuẩn tăng sinh.

- Bố trí thí nghiệm đông mủ cao su bằng vi khuẩn lactic lựa chọn:

Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên, 6 nghiệm thức và 3 lần lặp lại. Mỗi nghiệm thức là một khay nhựa chứa 2 kg mủ nước. Mẫu mủ cao su lấy tại vườn cây có tổng hàm lượng chất rắn (total solid content, TSC) là 33,4%, pH 6,5 và nhiệt độ trong mủ là 26°C , tổng số vi khuẩn lactic có trong 1 ml mủ là $3,9 \times 10^6$ CFU/ml (số lượng vi khuẩn lactic có trong mẫu mủ được đếm bằng cách pha loãng mẫu mủ ở các nồng độ từ 10^{-1} đến 10^{-9} , cấy trang các nồng độ pha loãng lên môi trường thạch MRS có bổ sung 2% CaCO_3 , đem ủ ở 37°C trong 48 giờ. Sau đó lựa những đĩa có số khuẩn lạc khoảng 25 – 250 khuẩn lạc/đĩa, những khuẩn lạc có vòng sáng bao quanh được cấy sang 1 đĩa môi trường thạch MRS và được kiểm tra các chỉ tiêu sinh lý và sinh hóa như nhuộm bào tử, khả năng di động, nhuộm Gram, thử nghiệm oxidase, thử nghiệm catalase), sau đó mẫu mủ được chia vào các khay nhựa với khối lượng 2 kg mủ/khay. Sáu nghiệm thức thí nghiệm gồm có 1 nghiệm thức thêm axit acetic 3% đến khi pH trong mủ đạt 5,4 (đối chứng 1), 1 nghiệm thức để mủ cao su đông tự nhiên trong điều kiện phòng thí nghiệm (đối chứng 2) và 4 nghiệm thức thêm 1 ml dung dịch vi khuẩn lựa chọn có mật số lần lượt là 10^5 , 10^7 , 10^9 và 10^{11} tế bào/ml vào 2 kg mủ nước và khuấy đều. Các nghiệm thức để đông trong 24 giờ ở điều kiện nhiệt độ phòng thí nghiệm là 30°C và ẩm độ là 69,0%.

- Đánh giá khả năng đông mủ bằng vi khuẩn lactic lựa chọn:

Sau 24 giờ đánh đông mủ cao su, tiến hành thu mủ đông, cán mủ đông nhiều lần thành tờ mỏng với độ dày khoảng 0,25 cm và treo 2 ngày trong bóng mát. Sau 2 ngày, mẫu mủ được mang

sấy ở nhiệt độ 105°C đến khối lượng không đổi, cân khối lượng và ghi nhận kết quả. Ở từng nghiệm thức, mẫu nước thu được sau khi thu mủ đông và lượng nước tách trong quá trình cán mủ sẽ được thu gộp lại và sấy ở 105°C đến khi nước bốc hơi hoàn toàn, thu lượng mủ còn lại, cân khối lượng và ghi nhận kết quả.

2.3. Xử lý số liệu

Số liệu thí nghiệm được thu thập, phân tích và xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel. Trắc nghiệm phân hạng ANOVA bằng phần mềm SAS 9.1.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả phân lập và lựa chọn vi khuẩn lactic

Sau 48 giờ nuôi cấy, trong chín đĩa petri nuôi cấy vi khuẩn từ dung dịch tăng sinh ở các nồng độ pha loãng từ 10^{-1} đến 10^{-9} trên môi trường thạch MRS có bổ sung 2% CaCO_3 thì đĩa petri ở nồng độ pha loãng 10^{-3} có khuẩn lạc đa dạng, tách biệt nên được lựa chọn để lấy các vi khuẩn mọc riêng lẻ có vòng sáng bao quanh cấy sang môi trường thạch MRS. Tổng số có 30 chủng vi khuẩn phân lập được trình bày ở bảng 2, trong đó tất cả 30 chủng vi khuẩn phân lập đều có màu trắng đục và làm tan CaCO_3 có trong môi trường MRS, không tạo bào tử, không có khả năng di động, Gram dương, oxidase âm tính, catalase âm tính. Trong 30 chủng vi khuẩn phân lập, có 18 chủng vi khuẩn có tế bào dạng hình cầu và 12 chủng vi khuẩn có tế bào dạng hình que.

Bảng 2. Kết quả phân lập và hàm lượng axit lactic tạo thành của 30 chủng vi khuẩn

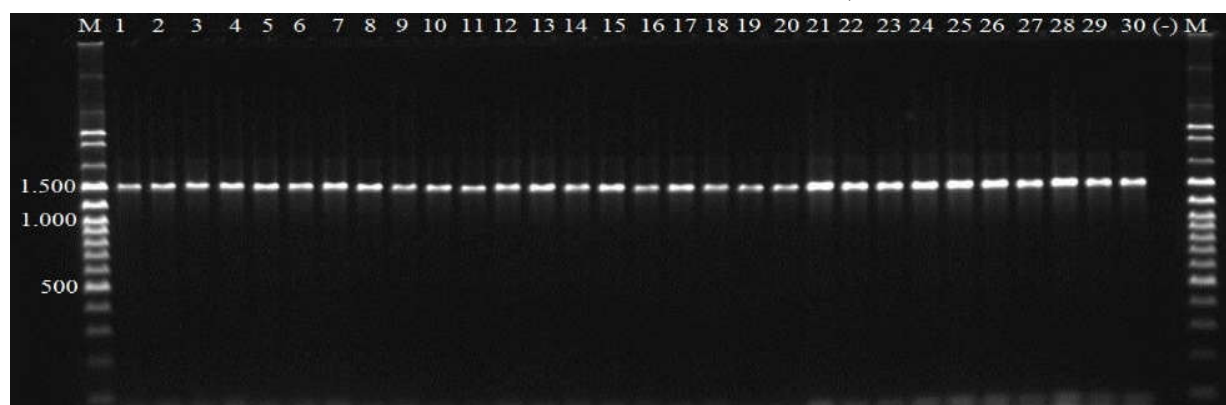
Chủng vi khuẩn	Đặc điểm khuẩn lạc				Dạng tế bào	Đặc điểm sinh lý và sinh hóa					Hàm lượng axit lactic (g/l)
	Hình dạng	Kích thước	Dạng mép	Bề mặt		Catalase	Bào tử	Oxidase	Gram	Di động	
LK1	tròn	nhỏ	trơn	phẳng	cầu	-	-	-	+	-	3,63 ^{fg}
LK2	tròn	nhỏ	trơn	phẳng	que	-	-	-	+	-	5,85 ^{ba}
LK3	tròn	to	trơn	lồi	cầu	-	-	-	+	-	6,29 ^a
LK4	tròn	to	trơn	lồi	cầu	-	-	-	+	-	5,32 ^{bdac}
LK5	tròn	nhỏ	trơn	phẳng	que	-	-	-	+	-	4,61 ^{dec}
LK6	tròn	nhỏ	trơn	lồi	que	-	-	-	+	-	5,00 ^{bdc}
LK7	tròn	nhỏ	trơn	lồi	cầu	-	-	-	+	-	3,67 ^{fg}
LK8	tròn	nhỏ	trơn	lồi	cầu	-	-	-	+	-	4,70 ^{dec}
LK9	tròn	nhỏ	trơn	phẳng	que	-	-	-	+	-	2,63 ^{ih}
LK10	tròn	nhỏ	trơn	lồi	cầu	-	-	-	+	-	4,39 ^{fde}
LK11	tròn	nhỏ	trơn	phẳng	cầu	-	-	-	+	-	2,33 ⁱ
LK12	tròn	to	gợn sóng	lồi	cầu	-	-	-	+	-	1,42 ^{kj}
LK13	tròn	to	gợn sóng	lồi	que	-	-	-	+	-	4,67 ^{dec}
LK14	tròn	to	gợn sóng	lồi	cầu	-	-	-	+	-	4,62 ^{dec}
LK15	không đều	to	trơn	Lồi	que	-	-	-	+	-	5,30 ^{bdac}
LK16	tròn	nhỏ	trơn	phẳng	cầu	-	-	-	+	-	1,16 ^k
LK17	tròn	to	gợn sóng	lồi	cầu	-	-	-	+	-	5,89 ^{ba}

LK18	tròn	nhỏ	tròn	lồi	que	-	-	-	+	-	5,98 ^{ba}
LK19	tròn	nhỏ	tròn	lồi	cầu	-	-	-	+	-	4,62 ^{dec}
LK20	tròn	nhỏ	tròn	lồi	que	-	-	-	+	-	2,11 ⁱ
LK21	tròn	nhỏ	tròn	lồi	cầu	-	-	-	+	-	2,36 ⁱ
LK22	tròn	to	tròn	lồi	que	-	-	-	+	-	3,20 ^{hg}
LK23	tròn	nhỏ	tròn	phẳng	cầu	-	-	-	+	-	1,58 ^j
LK24	tròn	nhỏ	tròn	lồi	que	-	-	-	+	-	2,31 ⁱ
LK25	tròn	nhỏ	tròn	lồi	cầu	-	-	-	+	-	3,88 ^{feg}
LK26	tròn	nhỏ	tròn	lồi	que	-	-	-	+	-	5,59 ^{bac}
LK27	tròn	nhỏ	tròn	lồi	que	-	-	-	+	-	4,56 ^{dec}
LK28	tròn	vừa	tròn	lồi	cầu	-	-	-	+	-	2,68 ⁱ
LK29	tròn	vừa	tròn	lồi	cầu	-	-	-	+	-	3,18 ^{hg}
LK30	tròn	to	tròn	lồi	cầu	-	-	-	+	-	2,32 ⁱ

*Ghi chú: Số liệu hàm lượng axit lactic được chuyển đổi bằng log (x+1) trước khi xử lý thống kê, với x là giá trị thực đo được, các số trung bình theo sau bởi các chữ cái khác nhau thì khác nhau có ý nghĩa thống kê ($p < 0,01$); +: dương tính; -: âm tính; giá trị $F = 43,77^{**}$ và $CV(\%) = 5,9\%$.*

Kết quả đánh giá hàm lượng axit lactic tạo thành sau 24 giờ nuôi cấy của 30 chủng vi khuẩn được thể hiện ở bảng 2, hàm lượng axit lactic do các chủng vi khuẩn tạo ra dao động từ 1,16 – 6,29 g/l, cao nhất là chủng vi khuẩn LK3 (6,29 g/l) và thấp nhất là chủng vi khuẩn LK16 (1,16 g/l).

Kết quả kiểm tra kích thước đoạn gen 16S rRNA bằng cặp mồi chuyên biệt của vi khuẩn lactic là 27F và 1492R được thể hiện ở hình 1 cho thấy sản phẩm đoạn băng khuếch đại có kích thước khoảng 1.500 bp, kích thước đoạn gen khuếch đại bằng với kích thước đoạn gen của vi khuẩn lactic [21, 22].

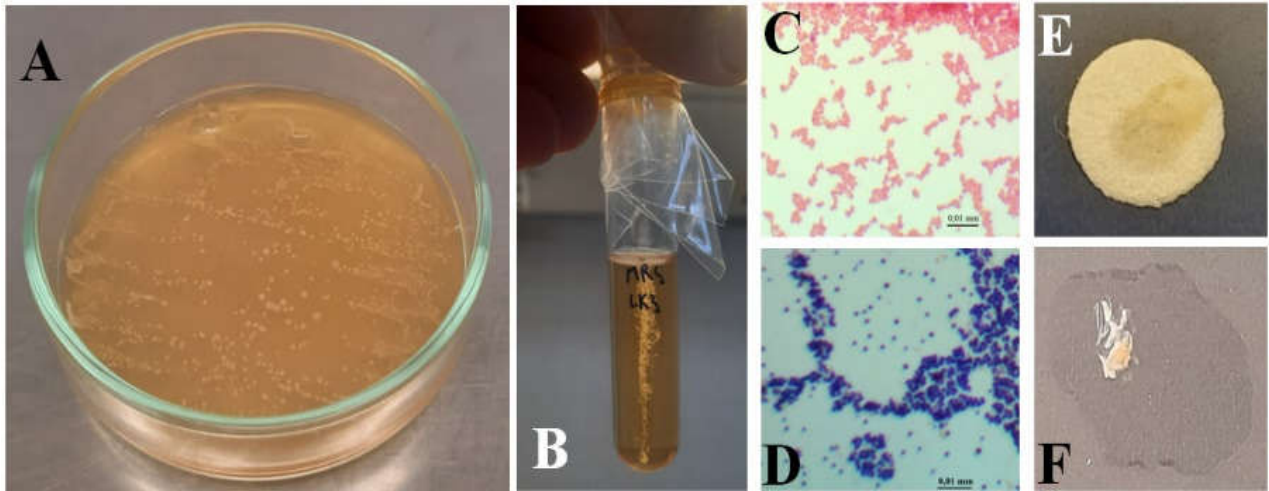


Hình 1. Sản phẩm PCR điện di trên gel agarose 1,5% của 30 chủng vi khuẩn

Ghi chú: M: Thang chuẩn, mã từ 1 đến 30 tương ứng với mã mẫu chủng vi khuẩn phân lập từ LK1 đến LK30; (-): đối chứng âm, thay thế ADN bằng nước không chứa ADN.

Từ kết quả phân lập, đánh giá chỉ tiêu hình thái, sinh lý, sinh hóa, kích thước đoạn gen 16S rRNA và hàm lượng axit lactic tạo ra cho thấy tất cả 30 chủng vi khuẩn phân lập đều là vi khuẩn lactic. Trong đó chủng vi khuẩn lactic LK3 tạo ra

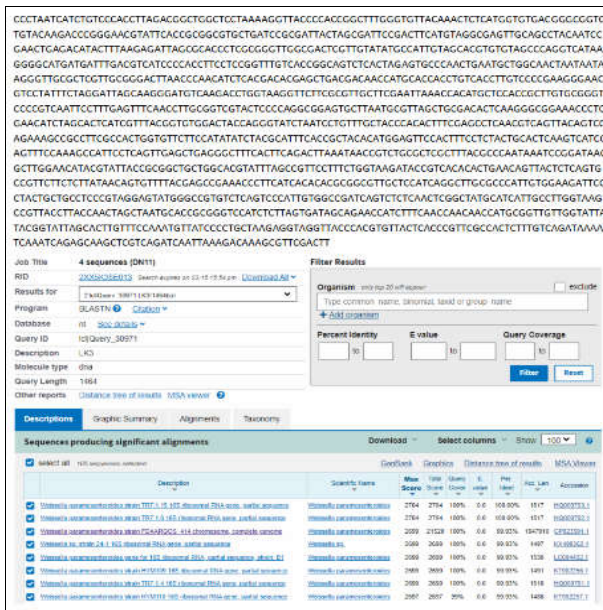
hàm lượng axit lactic cao nhất được lựa chọn để định danh loài vi khuẩn. Các đặc điểm hình thái, sinh lý và sinh hóa của vi khuẩn lactic LK3 được thể hiện ở hình 2.



Hình 2. Đặc điểm hình thái, sinh lý và sinh hóa của chủng vi khuẩn LK3

Ghi chú: A. vi khuẩn LK3 cấy trên môi trường MRS sau 48 giờ, B. kiểm tra khả năng di động (không di động), C: nhuộm bào tử (không tạo bào tử), D: nhuộm Gram (kết quả Gram dương), E: thử nghiệm oxidase (âm tính, không xuất hiện màu tím), F: thử nghiệm catalase (âm tính, không xuất hiện bọt).

3.2. Định danh loài vi khuẩn lactic lựa chọn



Hình 3. So sánh trình tự đoạn gen 16S rRNA của chủng vi khuẩn LK3

Kết quả giải trình tự gen và so sánh trên ngân hàng dữ liệu NCBI thể hiện ở hình 3. Kết quả cho thấy, trình tự đoạn gen 16S rRNA của chủng LK3 là tương đồng 100% với trình tự đoạn gen 16S rRNA của chủng *Weissella paramesenteroides*.

3.3. Mật số vi khuẩn *Weissella paramesenteroides* LK3 thích hợp để đông mủ cao su

Kết quả khảo sát mật số vi khuẩn *W. paramesenteroides* LK3 thích hợp để đánh đông mủ cao su được thể hiện ở bảng 3 và hình 4. Kết quả đánh giá đông mủ của 6 nghiệm thức cho thấy lượng mủ đông trung bình thu được là 620,87 g, mủ còn lại trong nước trung bình thu được là 46,09 g và tỷ lệ đông mủ trung bình là 93,09%. Trong đó, nghiệm thức đánh đông mủ cao su bằng axit acetic (NT1) có mủ đông thu được cao nhất (663,86 g), mủ còn lại trong nước thấp nhất (3,56 g), tỷ lệ đông mủ cao nhất (99,47%) và khác biệt ý nghĩa thống kê với 5 nghiệm thức còn lại. Nghiệm thức để đông tự nhiên (NT2) có mủ đông thu được thấp nhất (549,92 g), mủ còn lại trong nước cao nhất (116,84 g), tỷ lệ đông mủ thấp nhất (82,48%) và khác biệt ý nghĩa thống kê với 5 nghiệm thức còn lại. Trong 4 nghiệm thức (NT3, NT4, NT5, NT6) sử dụng các mật số vi khuẩn *W. paramesenteroides* LK3 khác nhau để đông mủ, mủ đông thu được dao động từ 573,54 g đến 655,10 g, mủ còn lại trong nước dao động từ 12,08 g đến 93,21 g, tỷ lệ mủ đông dao động từ 86,02% đến 98,19%, trong đó nghiệm thức NT6 có mủ đông thu được cao nhất (655,10 g), mủ còn lại

trong nước thấp nhất (12,08 g) và tỷ lệ mũ đông cao nhất (98,19%).

Bảng 3. Kết quả đông mũ cao su thiên nhiên của vi khuẩn *W. paramesenteroides* LK3

Nghiệm thức	Nội dung thí nghiệm	Mũ đông (g)	Mũ không đông (g)	Tỷ lệ đông mũ (%)
NT1	Bổ sung axit acetic 3% đến khi pH trong mũ đạt 5,4 (đối chứng)	663,86 ^a	3,56 ^d	99,47 ^a
NT2	Để đông tự nhiên (đối chứng)	549,92 ^c	116,84 ^a	82,48 ^c
NT3	Chủng 1 ml dung dịch có mật số vi khuẩn 10 ⁵ tế bào/ml	573,54 ^d	93,21 ^b	86,02 ^d
NT4	Chủng 1 ml dung dịch có mật số vi khuẩn 10 ⁷ tế bào/ml	629,01 ^c	37,83 ^c	94,33 ^c
NT5	Chủng 1 ml dung dịch có mật số vi khuẩn 10 ⁹ tế bào/ml	653,81 ^b	13,06 ^d	98,04 ^b
NT6	Chủng 1 ml dung dịch có mật số vi khuẩn 10 ¹¹ tế bào/ml	655,10 ^b	12,08 ^d	98,19 ^b
Trung bình		620,87	46,09	93,09
F tính		1949,00***	2059,35***	2042,01***
CV (%)		0,30	3,95	0,29

Ghi chú: Số liệu tỷ lệ đông được chuyển đổi bằng $(x)^{1/2}$ trước khi xử lý thống kê, với x là giá trị thực đo được; trong cùng một cột các giá trị trung bình có cùng ký tự không có sự khác biệt có ý nghĩa; ***: khác biệt rất có ý nghĩa ($p < 0,001$).



Hình 4. Đánh giá đông mũ cao su bằng vi khuẩn lactic

Ghi chú: A: chuẩn bị mẫu mũ; B: mũ đông sau khi sấy, NT là nghiệm thức, R là lần lặp lại; C: mũ không đông sau khi sấy.

Kết quả đánh giá đông mũ cho thấy mũ đông thu được, mũ còn lại trong nước và tỷ lệ đông mũ của 2 nghiệm thức đánh đông mũ cao su khi thêm vào 1 ml dung dịch có mật số vi khuẩn *W.*

paramesenteroides LK3 là 10⁹ tế bào/ml (NT5) và 10¹¹ tế bào/ml (NT6) không có sự khác biệt ý nghĩa thống kê, điều này cho thấy rằng khi tăng mật số vi khuẩn lên nhưng mũ đông vẫn không tăng, do đó nghiệm thức sử dụng 1 ml dung dịch có mật số vi khuẩn *W. paramesenteroides* LK3 là 10⁹ tế bào/ml đánh đông 2 kg mũ nước được chọn là nghiệm thức thích hợp nhất. Các nghiệm thức đánh đông bằng vi khuẩn *W. paramesenteroides* LK3 có tỷ lệ đông mũ thấp hơn so với đánh đông bằng axit acetic. Nghiệm thức để đông mũ tự nhiên (NT2) có tỷ lệ đông mũ thấp hơn các nghiệm thức đánh đông bằng vi khuẩn *W. paramesenteroides* LK3.

4. KẾT LUẬN

Từ mẫu mũ cao su tự nhiên tại Bình Dương đã phân lập được 30 chủng vi khuẩn lactic. Trong số 30 chủng vi khuẩn này đã lựa chọn và định danh được vi khuẩn *W. paramesenteroides* LK3 là vi khuẩn tạo ra hàm lượng axit lactic cao nhất, đạt 6,29 g/l khi nuôi 24 giờ trong 50 ml môi trường

lồng MRS ở nhiệt độ 37°C. Kết quả đông mủ tối ưu nhất khi thêm 1 ml vi khuẩn *W. paramesenteroides* LK 3 có mật số 10^9 tế bào/ml vào trong 2 kg mủ nước và để đông trong phòng thí nghiệm trong thời gian 24 giờ, tỷ lệ mủ đông thu được là 98,04%.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Hiệp hội Cao su Việt Nam (2022). *Thông tin chuyên đề cao su tập 1 năm 2022*. Nhà xuất bản Nông nghiệp.
2. Tập đoàn Công nghiệp Cao su Việt Nam – Công ty Cổ phần (2019). *Hướng dẫn kỹ thuật sản xuất cao su bền vững*. Nhà xuất bản Phụ nữ Việt Nam.
3. Viet N. T. (1999). Sustainable treatment of rubber latex processing wastewater, The UASB-System combined with aerobic post – treatment. PhD thesis, Wageningen University, Netherlands.
4. Altman R. F. A. (1947). Natural coagulation of Hevea latex. *Rubber Chemistry and Technology* 20 (4), 1124–1132.
5. Salomez M., Subileau M., Intapun J., Bonfils F., Sainte-Beuve J., Vaysse L. and Dubreucq E. (2014). Micro-organisms in latex and natural rubber coagula of Hevea brasiliensis and their impact on rubber composition, structure and properties. *Journal of Applied Microbiology* 117 (4), 921–929.
6. Taysum D. H. (1958). The numbers and growth rates of the bacteria in Hevea latex, ammoniated field latex and ammoniated latex concentrate. *Journal of Applied Bacteriology* 21 (2), 161–173.
7. Satchuthananthavale R. and Satchuthananthavale V. (1971). Bacterial coagulation of latex. *Golden Jubilee Rubber Research Institute of Ceylon* 48, 182–191.
8. Nira H. K., Aoki R., Mizumachi K., Sasaki K., Naito H., Sawada T. and Suzuki C. (2012). Interaction between *Lactococcus lactis* and *Lactococcus raffinolactis* during growth in milk: Development of a new starter culture. *Journal of Dairy Science* 95 (4), 2176–2185.
9. Mokoena M. P. (2017). Lactic acid bacteria and their bacteriocins: Classification, biosynthesis and applications against uropathogens: A mini-review. *Molecules* 22 (8), 1255.
10. Hussey M. A. and Zayaitz A. Z. (2007). *Endospore Stain Protocol*. Washington DC: American Society for Microbiology. 1–11.
11. Ismail Y., Yulvizar C. and Mazhitov B. (2018). Characterization of lactic acid bacteria from local cow's milk kefir. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* 130, 012019.
12. Sandi S., Yosi F., Sari M. L. and Gofar N. (2018). The Characteristics and potential of lactic acid bacteria as probiotics in silage made from *Hymenachne acutigluma* and *Neptunia oleracea* Lour. *E3S Web of Conferences* 68, 01017.
13. Shields P. and Cathcart L. (2011). Motility Test Medium Protocol. American Society for Microbiology. Available: <https://asm.org/Protocols/Motility-Test-Medium-Protocol>.
14. Cissé H., Kagambèga B., Sawadogo A., Tankoano A., Sangaré G., Traoré Y., Ouoba I. I. L. and Savadogo A. (2019). Molecular characterization of *Bacillus*, lactic acid bacteria and yeast as potential probiotic isolated from fermented food. *Scientific African* 6, e00175.
15. Smith A. C. and Hussey M. A. (2016). Gram Test Protocol. American Society for Microbiology. Available: <https://asm.org/Protocols/Gram-Stain-Protocols>.
16. Condon S. (1987). Responses of lactic acid bacteria to oxygen. *FEMS Microbiology Reviews* 46, 269 – 280.
17. Shields P. and Cathcart L. (2016). Oxidase Test Protocol. American Society for Microbiology. Available: <https://asm.org/Protocols/Oxidase-Test-Protocol>.
18. Dhameliya H. A., Mesara S. N., Mali H., Shah C. and Subramanian R. B. (2020). Biochemical and molecular characterization of lactic acid bacteria (LAB) Isolated from fermented pulses. *Iranian Journal of Science and Technology, Transactions A: Science* 44, 1279–1286.

19. Reiner K. (2016). Catalase Test Protocol. American Society for Microbiology. Available: <https://asm.org/Protocols/Catalase-Test-Protocol>.
20. Abdulla A. A. (2014). Optimization of DNA extraction of lactobacillus spp for Identification by tuf B gene-based polymerase chain reaction. *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare* 4 (8), 122–126.
21. Frank J. A., Reich C. I., Sharma S., Weisbaum J. S., Wilson B. A. and Olsen G. J. (2008). Critical evaluation of two primers commonly used for amplification of bacterial 16S rRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology* 74 (8), 2461–2470.
22. Garcia E. F., Luciano W. A., Xavier D. E., da Costa W. C. A., de Sousa Oliveira K., Franco O. L., de Morais Júnior M. A., Lucena B. T. L., Picão R. C., Magnani M., Saarela M. and de Souza E. L. (2016). Identification of lactic acid bacteria in fruit pulp processing byproducts and potential probiotic properties of selected Lactobacillus strains. *Frontiers in Microbiology* 7, 1371.
23. Borshchevskaya L. N., Gordeeva T. L., Kalinina A. N. and Sineokii S. P. (2016). Spectrophotometric determination of lactic acid. *Journal of Analytical Chemistry* 71 (8): 755–758.
24. Galli V., Venturi M., Pini N. and Granchi L. (2020). Technological feature assessment of lactic acid bacteria isolated from cricket powder's spontaneous fermentation as potential starters for cricket-wheat bread production. *Foods* 9 (9), 1322.

ISOLATION, SELECTION OF LACTIC ACID BACTERIA FROM RUBBER LATEX IN BINH DUONG PROVINCE AND TESTING FOR COAGULATING OF RUBBER LATEX

Huynh Duc Dinh, Tran Thanh, Tran Dinh Minh,

Vu Van Truong, Huynh Thi Minh Tam

Summary

The objectives of this study were to isolate the lactic acid bacteria (LAB) in natural rubber latex and to determine the appropriate amount of lactic acid bacteria (LAB) for coagulating of rubber latex. The LAB was isolated and selected from latex of clone RRIV 124 at plantation CTLK07 in Lai Hung commune, Bau Bang district, Binh Duong province. One ml of selected LAB solution with densities of 10^5 , 10^7 , 10^9 and 10^{11} cells/ml was added to 2 kilograms of rubber latex; two control treatments; meanwhile the control treatment No. 1 was added with 3% acetic acid until the latex pH value was at 5.4 and the control treatment No. 2 was left for natural coagulation. Thirty species were found in rubber latex, in which species LK3 produced the highest amount of lactic acid (6.29 g/l) and the 16S rRNA gene sequence of this strain was 100% similar to *Weissella paramesenteroides*. The results showed that 1 ml of 10^9 cells/ml of *W. paramesenteroides* LK3 inoculant was suitable for coagulating 2 kilograms of latex.

Keywords: *Coagula, lactic acid, lactic acid bacteria, rubber latex, Weissella paramesenteroides.*

Người phản biện: TS. Huỳnh Xuân Phong

Ngày nhận bài: 29/7/2022

Ngày thông qua phản biện: 16/8/2022

Ngày duyệt đăng: 23/8/2022