

PHÂN TÍCH DỮ LIỆU CỦA PROTEIN GIÀU METHIONINE THÔNG QUA SÀNG LỌC HỆ PROTEIN CỦA Sắn

Chu Đức Hà¹, Nguyễn Hà My², Nguyễn Chí Thanh³, Phạm Thị Dung³,
Nguyễn Quốc Trung³, Phạm Phương Thu², Lê Thị Ngọc Quỳnh⁴,
Hà Thị Quyển¹, Lê Thị Hiền¹, La Việt Hồng²

TÓM TẮT

Trong nghiên cứu này, thông tin về nhóm protein giàu Methionine (Methionine-rich protein, MRP) đã được tìm hiểu một cách đầy đủ trên cây sắn (*Manihot esculenta*) bằng các công cụ tin sinh học. Kết quả đã xác định được tổng số 155 MRP, với tiêu chí kích thước ≥ 95 axit amin và hàm lượng Met $\geq 6\%$. Trong đó, 52 (trên tổng số 155) MRP chưa được chú giải chức năng ở sắn. Phân tích cho thấy các MRP chưa rõ chức năng có đặc tính lý hóa đa dạng. Dự đoán vị trí phân bố nội bào đã chỉ ra rằng các MRP có thể nằm ở lục lạp, ty thể và hệ thống bao gói. Đáng chú ý, các gen mã hóa MRP chưa rõ chức năng có biểu hiện khác nhau trên các cơ quan chính trên cây sắn. Kết quả của nghiên cứu này đã cung cấp những dẫn liệu quan trọng cho việc tìm hiểu cơ chế đáp ứng bất lợi phi sinh học của cây sắn.

Từ khóa: Cây sắn (*Manihot esculenta*), protein giàu Methionine, đặc tính lý hóa, tin sinh học

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Các điều kiện bất thuận, như bất lợi về nguồn nước, bất lợi về nhiệt độ và nhiễm kim loại nặng, được xem là yếu tố gây tác động lớn đến sinh trưởng và phát triển của cây trồng. Cụ thể, bất lợi phi sinh học gây ra rối loạn các quá trình sinh lý, điển hình như kìm hãm khả năng nảy mầm, giảm quang hợp, khiến cây trồng chậm phát triển và gây thiệt hại khoảng 50% năng suất. Nhóm yếu tố bất lợi phi sinh học này được ghi nhận là nguyên nhân chính gây

nguy hại cho sản xuất nông nghiệp bền vững và đe dọa tình hình an ninh lương thực ở Việt Nam.

Ở cấp độ tế bào, tác động của bất lợi phi sinh học làm gia tăng quá mức các dạng ôxi phản ứng (reactive oxygen species, ROS) trong tế bào (Huang *et al.*, 2019). Sự dư thừa của gốc ROS có thể tạo ra những biến đổi trên phân tử của protein, đặc biệt là ôxi hóa gốc Methionine (Met) cấu trúc (Kim *et al.*, 2014). Các protein giàu Met (Methionine-rich protein, MRP) được xem là một trong những phân tử mẫn

¹ Khoa Công nghệ Nông nghiệp, Đại học Công nghệ, Đại học Quốc gia Hà Nội

² Khoa Sinh - Kỹ thuật Nông nghiệp, Đại học Sư phạm Hà Nội 2

³ Khoa Công nghệ Sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam; ⁴ Bộ môn Công nghệ Sinh học, Đại học Thủy lợi

cảm nhất với tác động của ROS trong tế bào. Tìm hiểu về các MRP này cho phép làm rõ hơn về cơ chế tác động của bất lợi phi sinh học, từ đó giải quyết cho bài toán nâng cao tính chống chịu ở cây trồng, nhất là trên cây sắn (*Manihot esculenta*), một trong những cây trồng quan trọng hàng đầu ở Việt Nam hiện nay (Malik *et al.*, 2020).

Mục tiêu của nghiên cứu này nhằm sàng lọc tất cả các MRP trong dữ liệu hệ protein của giống sắn KU50. Thông tin di truyền và chú giải gen sau đó được phân tích dựa trên dữ liệu hệ gen. Đặc tính cơ bản và vị trí phân bố nội bào của các protein được khai thác dựa trên các công cụ tin sinh học. Cuối cùng, dữ liệu biểu hiện gen mã hóa MRP tại các cơ quan được tái phân tích dựa trên thông tin giải trình tự hệ phiên mã.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Hệ gen, hệ protein của giống sắn KU 50 (mã dữ liệu: PRJNA234389) trên cơ sở dữ liệu Phytozome (Goodstein *et al.*, 2012) và NCBI (Bredeson *et al.*, 2016).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

- Phương pháp tìm kiếm MRP: Dữ liệu hệ protein của sắn khai thác trên cổng NCBI (Bredeson *et al.*, 2016) được sử dụng để sàng lọc các MRP bằng BioEDIT (Hall, 1999) dựa theo mô tả trong nghiên cứu trước đây (Chu *et al.*, 2016). Cụ thể, MRP được định nghĩa là trình tự peptide ≥ 95 axit amin (aa) và có tỷ lệ Met $\geq 6\%$ (Chu *et al.*, 2016). Toàn bộ trình tự đáp ứng yêu cầu được khai thác cho phân tích *in silico* tiếp theo.

- Phương pháp sàng lọc và chú giải gen mã hóa protein giàu: Trình tự aa ứng viên được truy vấn (BlastP) vào hệ protein của sắn trên cổng Phytozome (Goodstein *et al.*, 2012) và NCBI (Bredeson *et al.*, 2016) nhằm tìm kiếm đoạn gen mã hóa và mã định danh tương ứng. Các trình tự aa trùng mã định danh được sàng lọc thông qua căn trình tự bằng ClustalX (Thompson *et al.*, 2002) để lựa chọn protein có kích thước dài hơn (Chu *et al.*, 2016). Vị trí gen trên nhiễm sắc thể được xác định bằng cách truy vấn (BlastN) vào hệ gen tham chiếu trên NCBI (Bredeson *et al.*, 2016).

- Phương pháp phân loại chức năng của MRP: Trình tự aa và mã định danh tương ứng của MRP

được truy vấn trên MAPMAN (Schwacke *et al.*, 2019). Dữ liệu về chức năng của MRP sau đó được xử lý trên Microsoft Excel.

- Phương pháp phân tích đặc tính của MRP: Trình tự aa của MRP được truy vấn trên ExPASy ProtParam (Gasteiger *et al.*, 2005) để phân tích đặc tính về kích thước (aa), trọng lượng phân tử (kDa), điểm đẳng điện (< 7 , axit; > 7 , bazơ), độ bất ổn định (< 40 , ổn định; > 40 , bất ổn định) và độ ưa nước trung bình (< 0 , ưa nước; > 0 , kỵ nước).

- Phương pháp dự đoán vị trí phân bố nội bào của MRP: Trình tự aa đầy đủ của MRP được truy vấn trên cổng TargetP and SignalP (Emanuelsson *et al.*, 2007) theo mô tả trong nghiên cứu trước đây (Chu *et al.*, 2016). Trong đó, các đoạn tín hiệu đặc trưng cho bào quan, bao gồm hệ thống bao gói (signal peptide, SP), ty thể (mitochondrial transit peptide, mTP) và lục lạp (chloroplast transit peptide, cTP) (Emanuelsson *et al.*, 2007) được rà soát trên đầu N-terminal của MRP.

- Phương pháp đánh giá biểu hiện của gen mã hóa MRP: Dữ liệu RNA-Seq tại 11 mẫu mô (mã dữ liệu: GSE82279), gồm thân, chồi bên, lá, cuống lá, gân lá, củ, rễ sợi, mô sẹo có khả năng phôi hóa (friable embryogenic callus, FEC), tổ chức phát sinh phôi soma (somatic organized embryogenic structure, OES), mô phân sinh đỉnh chồi (shoot apical meristem, SAM) và mô phân sinh chóp rễ (root apical meristem, RAM) (Wilson *et al.*, 2017) đã được khai thác. Theo đó, mức độ biểu hiện của gen được thể hiện qua số lượng trình tự đọc sử dụng để lắp ráp nên mỗi transcript trong hệ phiên mã thô theo điểm số FPKM (Fragments Per Kilobase of exon per Million fragments mapped). Những transcript có điểm số FPKM ≤ 10 , dưới ngưỡng phát hiện; $10 < \text{FPKM} \leq 30$, có biểu hiện; $30 < \text{FPKM} \leq 50$, biểu hiện yếu; $50 < \text{FPKM} \leq 70$, có xu hướng biểu hiện mạnh; $70 < \text{FPKM} \leq 100$, biểu hiện mạnh; FPKM > 100 , biểu hiện đặc thù (Wilson *et al.*, 2017).

2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

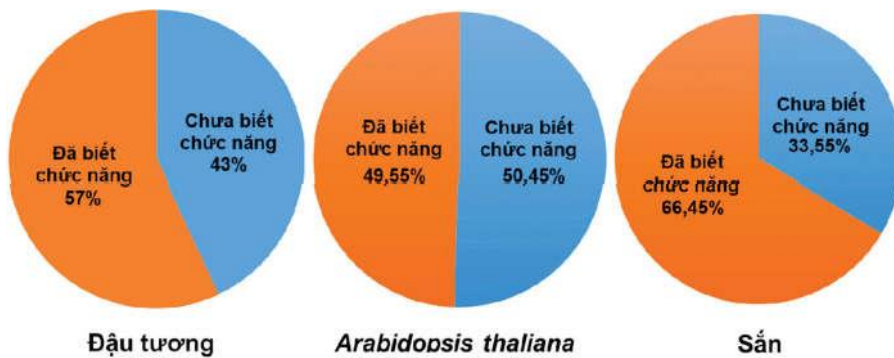
Nghiên cứu này được thực hiện từ tháng 11/2020 đến tháng 02/2021. Các phân tích *in silico* được tiến hành tại Học viện Nông nghiệp Việt Nam, Đại học Công nghệ (Đại học Quốc gia Hà Nội), Đại học Thủy lợi và Đại học Sư phạm Hà Nội 2.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Sàng lọc và xác định protein giàu Met trong hệ protein của cây sắn

Trước tiên, hệ protein của sắn (Bredeson *et al.*, 2016) được khai thác để sàng lọc toàn bộ MRP (kích thước ≥ 95 aa và hàm lượng Met $\geq 6\%$) (Chu *et al.*, 2016). Kết quả sàng lọc đã xác định được tổng số 155 phân tử MRP trong dữ liệu của cây sắn. Trong đó, đa số các MRP ($^{149}/_{155}$) được mã hóa bởi gen nhân, 6 MRP được quy định bởi gen chưa có thông tin chú giải (unplaced scaffold), trong khi không có

MRP nào được mã hóa bởi gen nằm trong tế bào chất. Trước đây, 121 và 213 MRP đã được báo cáo trên cây mô hình 2 lá mầm *Arabidopsis thaliana* và đậu tương (*Glycine max*), trong đó 2 gen mã hóa MRP nằm ở tế bào chất ở *Arabidopsis* (Chu *et al.*, 2016). Đáng chú ý, tất cả các gen mã hóa MRP đều được chú giải thông tin trong hệ tham chiếu của hai loài *Arabidopsis* và đậu tương (Chu *et al.*, 2016). Điều này được giải thích do bản tham chiếu của sắn chỉ có dung lượng khoảng ~582,28 Mb (Bredeson *et al.*, 2016), trong khi hệ gen của sắn có kích thước thực tế khoảng ~772 Mb (Awoloye *et al.*, 1994).



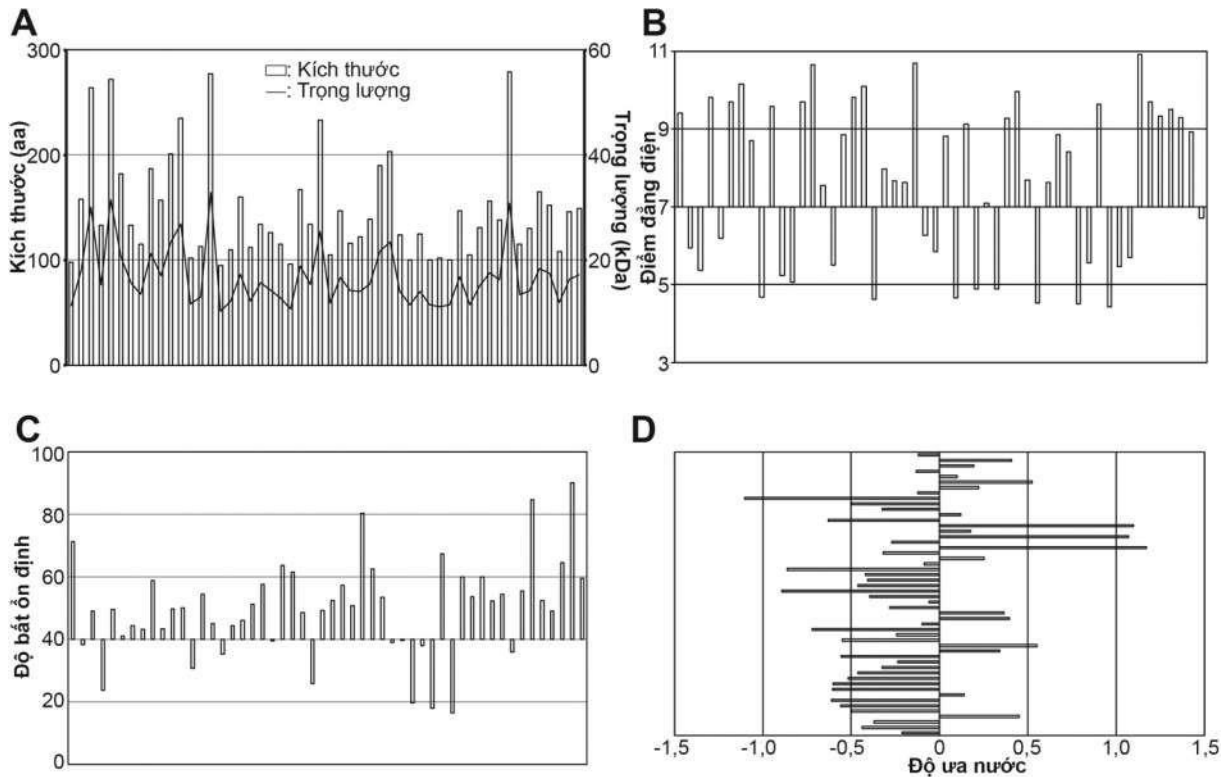
Hình 1. Phân loại chức năng của MRP ở đậu tương, *Arabidopsis* và sắn

Tiếp theo, các MRP ở sắn được phân loại chức năng theo trên MAPMAN (Schwacke *et al.*, 2019). Kết quả phân tích cho thấy $^{103}/_{155}$ (chiếm 66,45%) gen mã hóa MRP ở sắn đã được chú giải chức năng, trong khi $^{52}/_{155}$ (chiếm 33,55%) gen chưa rõ chức năng (Hình 1). Đáng chú ý, nghiên cứu đã chỉ ra rằng, toàn bộ các gen mã hóa MRP chưa biết chức năng ở sắn là những gen đặc thù ở thực vật, không có kết quả tìm kiếm tương đồng (BlastP) khi đối chiếu trên hệ tham chiếu của các loài động vật, tương tự như trong nghiên cứu trước đây (Chu *et al.*, 2016). Cụ thể, $^{56}/_{121}$ (chiếm 50,45%) và $^{92}/_{213}$ (chiếm 43%) gen mã hóa MRP ở *Arabidopsis* và đậu tương được ghi nhận là chưa có chức năng (Chu *et al.*, 2016).

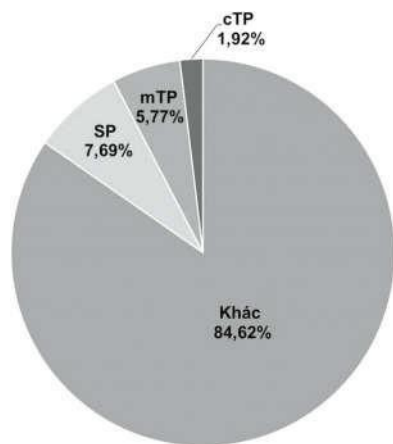
3.2. Phân tích đặc tính và vị trí phân bố nội bào của các protein giàu Met chưa biết chức năng ở sắn

Trong nghiên cứu này, một số đặc điểm cơ bản của MRP chưa biết chức năng ở sắn đã được phân tích bằng các công cụ tin sinh học. Theo đó, các trình tự aa đầy đủ của 52 MRP chưa biết chức năng ở sắn được truy vấn trên ExPASy Protparam (Gasteiger *et al.*, 2005) để phân tích các đặc điểm cấu trúc và đặc tính lý hóa của phân tử. Kết quả khai thác dữ liệu được minh họa ở hình 2.

Các MRP chưa biết chức năng ở sắn có kích thước trong ngưỡng từ 95 (XP_021606075.1) đến 279 aa (XP_021628969.1), mức trung bình đạt 148,13 aa (Hình 2A). Bên cạnh đó, trọng lượng của 52 MRP tỷ lệ thuận với kích thước, dao động từ 10,30 đến 32,91 kDa, giá trị trung bình đạt 16,84 kDa (Hình 2A). Các phân tử MRP chưa rõ chức năng có giá trị điểm đẳng điện trải dài từ khoảng axit (4,43 - XP_021628067.1) tới bazơ (10,92 - XP_021629128.1). Trong đó, $^{31}/_{52}$ (tương ứng 59,62%) MRP có pI > 7 (có tính bazơ) và $^{21}/_{52}$ (tương ứng 40,38%) phân tử có giá trị pI < 7 (có tính axit) (Hình 2B). Tiếp theo, chỉ số bất ổn định của các protein MRP chưa rõ chức năng nằm trong khoảng từ 16,62 (XP_021624467.1) đến 90,12 (XP_021633427.1). Nhìn chung, đa số các MRP (39/52) bất ổn định trong ống nghiệm (độ bất ổn định > 40), trong khi $^{13}/_{52}$ phân tử, với chỉ số bất ổn định < 40, thể hiện tính ổn định (Hình 2C). Giá trị ưa nước của 52 MRP dao động từ -1,102 (XP_021628075.1) đến 1,172 (XP_021623708.1) (Hình 2D). Phần lớn trong số này ($^{35}/_{52}$) thể hiện tính ưa nước (độ ưa nước đạt < 0), trong khi $^{17}/_{52}$ phân tử có tính kỵ nước (độ ưa nước > 0).



Hình 2. Đặc tính lý hóa, bao gồm (A) Kích thước và trọng lượng, (B) Điểm đẳng điện, (C) Độ bất ổn định và (D) Độ ưa nước, của MRP chưa rõ chức năng ở sắn



Hình 3. Dự đoán các trình tự tín hiệu đặc trưng cho vị trí cư trú nội bào của MRP chưa rõ chức năng ở sắn

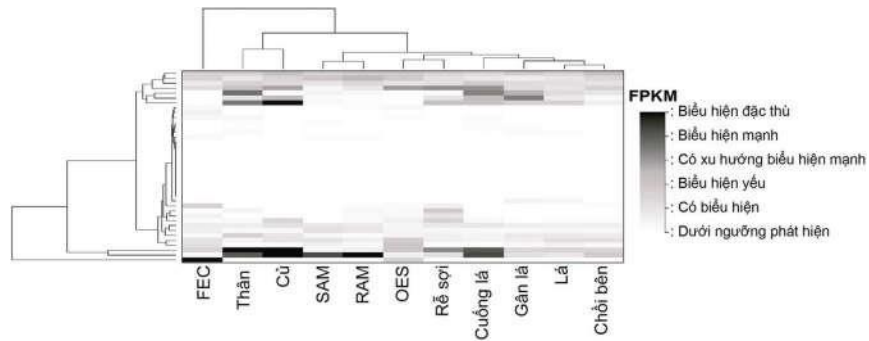
Ghi chú: cTP: trình tự tín hiệu có đích đến lục lạp; mTP: trình tự tín hiệu có đích đến ty thể, SP: hệ thống bao gói.

Tiếp theo, công cụ TargetP and SignalP (Emanuelsson *et al.*, 2007) được sử dụng để khai thác vị trí cư trú nội bào của các MRP chưa biết chức năng ở sắn. Theo đó, một phân tử MRP (XP_021630288.1) có đích đến ở lục lạp (mTP), ba MRP (XP_021602841.1, XP_021611978.1 và XP_021616891.1) có đích

đến ở ty thể (cTP), trong khi đã xác định được bốn phân tử (XP_021626513.1, XP_021624445.1, XP_021632296.1 và XP_021606075.1) nằm ở hệ thống bao gói (SP) (Hình 3). Báo cáo trước đây đã chứng minh lục lạp và ty thể dễ bị tổn thương do tác động của sự dư thừa ROS (Huang *et al.*, 2019, Kim *et al.*, 2014), nên các phân tử MRP cư trú tại hai bào quan này có thể là mục tiêu dễ bị oxy hóa trong điều kiện yếu tố bất lợi như đã ghi nhận trong nghiên cứu trước đây (Chu *et al.*, 2016).

3.3. Phân tích biểu hiện của các gen mã hóa protein giàu Met ở cây sắn trong các điều kiện xử lý bất lợi

Trong nghiên cứu này, dữ liệu phiên mã tại các mẫu mô chính (Wilson *et al.*, 2017) đã được phân tích để tìm hiểu mức độ biểu hiện của các gen mã hóa MRP chưa rõ chức năng ở cây sắn. Theo đó, mức độ biểu hiện của các gen mã hóa MRP chưa rõ chức năng được biểu hiện thông qua biểu đồ nhiệt ở hình 4. Kết quả cho thấy các gen mã hóa MRP chưa rõ chức năng có mức độ biểu hiện đa dạng ở các cơ quan/bộ phận chính trong cây sắn. Trong đó, nghiên cứu đã chỉ ra một số gen có mức độ biểu hiện mạnh/đặc thù ở các cơ quan/bộ phận trên cây.



Hình 4. Dữ liệu biểu hiện của các gen mã hóa MRP chưa rõ chức năng ở sắn

Cụ thể, gen *Manes.13G107300* và *Manes.07G015600* có mức biểu hiện đặc thù tại FEC và tại củ. Trong khi đó, *Manes.10G129200* được xác định là gen có mức biểu hiện mạnh/đặc thù tại 5 vị trí, gồm thân, củ, cuống lá, SAM và RAM. Ngoài ra, *Manes.05G182700* có biểu hiện mạnh tại cuống lá và đặc thù tại thân và củ. Trước đây, các gen mã hóa MRP ở *Arabidopsis* cũng có biểu hiện đa dạng tại thân, lá và hoa (Chu *et al.*, 2016). Ví dụ, *At1G67350* và *At5G39570*, hai gen mã hóa MRP chưa rõ chức năng, có mức biểu hiện mạnh ở cả ba cơ quan trong điều kiện thường (Chu *et al.*, 2016). Các kết quả này đã chỉ ra vai trò của các MRP liên quan đến sinh trưởng và phát triển tại một số vị trí đặc thù trên cây sắn nói riêng và thực vật nói chung.

IV. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

4.1. Kết luận

Nghiên cứu đã tìm kiếm được 155 MRP ở sắn dựa trên sàng lọc hệ protein. Chú giải gen cho thấy $^{103}/_{155}$ gen mã hóa MRP đã biết chức năng, trong khi $^{52}/_{155}$ gen mã hóa MRP chưa rõ chức năng.

Nghiên cứu đã chỉ ra rằng các MRP chưa rõ chức năng ở sắn có kích thước từ 95 - 279 aa, trọng lượng từ 10,30 - 32,91 kDa. Các MRP này có điểm đẳng điện từ axit tới bazơ, với $^{13}/_{52}$ MRP thể hiện tính ổn định, trong khi $^{35}/_{52}$ MRP có tính ưa nước. Nghiên cứu đã xác định được 1, 3 và 4 MRP có đích đến ở lục lạp, ty thể và hệ thống bao gói.

Nghiên cứu đã cho thấy các gen mã hóa MRP chưa rõ chức năng có mức độ biểu hiện đa dạng ở các cơ quan/bộ phận trên cây sắn. Trong đó, *Manes.10G129200* là gen có mức biểu hiện mạnh/đặc thù tại thân, củ, cuống lá, SAM và RAM.

4.2. Đề nghị

Nghiên cứu này sẽ tiếp tục nhằm tìm hiểu về mức độ biểu hiện của gen mã hóa MRP chưa rõ chức năng trong điều kiện xử lý cây sắn với các bất lợi phi sinh học.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Awolaye, F., van Duren, M., Dolezel, J., Novak, F. J., 1994. Nuclear DNA content and *in vitro* induced somatic polyploidization cassava (*Manihot esculenta* Crantz) breeding. *Euphytica*, 76(3): 195-202.
- Bredeson, J.V., Lyons, J.B., Prochnik, S.E., Wu, G.A., Ha, C.M., Edsinger-Gonzales, E., Grimwood, J., Schmutz, J., Rabbi, I.Y., Egesi, C., Nauluvula, P., Lebot, V., Ndunguru, J., Bart, R.S., Setter, T.L., Gleadow, R.M., Kulakow, P., Ferguson, M.E., Rounsley, S., Rokhsar, D.S., 2016. Sequencing wild and cultivated cassava and related species reveals extensive interspecific hybridization and genetic diversity. *Nat Biotechnol*, 34(5): 562-570.
- Chu, H.D., Le, Q.N., Nguyen, H.Q., Le, D.T., 2016. Genome-wide analysis of genes encoding Methionine-rich proteins in *Arabidopsis* and soybean suggesting their roles in the adaptation of plants to abiotic stress. *Int. J. Genomics*, 5427062.
- Emanuelsson, O., Brunak, S., von Heijne, G., Nielsen, H., 2007. Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools. *Nat. Prot.*, 2(4): 953-971.
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Wilkins, M.R., Appel, R.D., Bairoch, A., 2005. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. In: *Re proteomics protocols handbook*. Springer: 571-607.
- Goodstein, D., Shu, S., Howson, R., Neupane, R., Hayes, R., Mitros, T., Dirks, W., Hellsten, U., Putnam, N., Rokhsar, D., 2012. Phytozome: A comparative platform for green plant genomics. *Nucleic Acids Res.*, 40: 1178-1186.
- Hall, T.A., 1999. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.*, 41: 95-98.
- Huang, H., Ullah, F., Zhou, D.X., Yi, M., Zhao, Y., 2019. Mechanisms of ROS regulation of plant development and stress responses. *Front Plant Sci.*, 10: 800.

- Kim, G., Weiss, S.J., Levine, R.L., 2014. Methionine oxidation and reduction in proteins. *Biochim Biophys Acta*, 1840(2): 901-905.
- Malik, A.I., Kongsil, P., Nguyễn, V.A., Ou, W., Sholihin, Srean, P., Sheela, M.N., Becerra López-Lavalle, L.A., Utsumi, Y., Lu, C., Kittipadakul, P., Nguyễn, H.H., Ceballos, H., Nguyễn, T.H., Selvaraj Gomez, M., Aiemnaka, P., Labarta, R., Chen, S., Amawan, S., Sok, S., Youabee, L., Seki, M., Tokunaga, H., Wang, W., Li, K., Nguyễn, H.A., Nguyễn, V.Đ., Hàm, L.H., Ishitani, M., 2020. Cassava breeding and agronomy in Asia: 50 years of history and future directions. *Breed. Sci.*, 70(2): 145-166
- Schwacke, R., Ponce-Soto, G.Y., Krause, K., Bolger, A.M., Arsova, B., Hallab, A., Gruden, K., Stitt, M., Bolger, M.E., Usadel, B., 2019. MapMan4: A refined protein classification and annotation framework applicable to multi-omics data analysis. *Mol. Plant*, 12(6): 879-892.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Higgins, D.G., 2002. Multiple sequence alignment using ClustalW and ClustalX. *Curr. Protoc. Bioinformatics*, 2: 2-3.
- Wilson, M.C., Mutka, A.M., Hummel, A.W., Berry, J., Chauhan, R.D., Vijayaraghavan, A., Taylor, N.J., Voytas, D.F., Chitwood, D.H., Bart, R.S., 2017. Gene expression atlas for the food security crop cassava. *New Phytol.*, 213(4): 1632-1641.

Data mining of the Methionine-rich proteins by screening the proteome from cassava

Chu Duc Ha, Nguyen Ha My, Nguyen Chi Thanh, Pham Thi Dung,
Nguyen Quoc Trung, Pham Phuong Thu, Le Thi Ngoc Quynh,
Ha Thi Quyen, Le Thi Hien, La Viet Hong

Abstract

In this study, the Methionine-rich protein (MRP) were comprehensively investigated in cassava (*Manihot esculenta*) by various bioinformatics approaches. As the results, a total of 155 MRPs has been identified by the following criteria: size ≥ 95 amino acids and Met $\geq 6\%$. Among them, 52 (out of 155) MRPs have been not annotated and characterized in the proteome of cassava. We found that these uncharacterized MRPs exhibited a variation of physic-chemical features. Our results also predicted that a number of unknown MRPs could be localized in the chloroplast, mitochondria and secretory pathway. Interestingly, the genes encoding uncharacterized MRP exhibited differential expression in major organs in cassava plants. Taken together, our study could provide a critical foundation for further investigation of the mechanism of abiotic stress response in cassava plants.

Keywords: Cassava (*Manihot esculenta*), Methionine-rich protein, physic-chemical property, bioinformatics

Ngày nhận bài: 20/03/2021

Ngày phản biện: 21/4/2021

Người phản biện: TS. Phạm thị Lý Thu

Ngày duyệt đăng: 04/6/2021